



УДК 577.113.6:542.95

© 1993 И. Я. Дубей, Т. В. Ляпина,  
Д. М. ФедорякМИКРОСФЕРИЧЕСКИЙ АЭРОСИЛОГЕЛЬ СИЛОХРОМ-2 —  
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ НОСИТЕЛЬ ДЛЯ ТВЕРДОФАЗНОГО  
СИНТЕЗА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ*Институт биоорганической химии и нефтехимии АН Украины, Киев*

Одной из важнейших проблем твердофазного синтеза олигонуклеотидов является выбор эффективного полимерного носителя. В настоящее время обычно применяются жесткие ненабухающие носители на основе пористого стекла СРГ [1, 2] и силикагеля [3—5]. Для их получения используются в основном дорогие силикагели для ВЭЖХ типа Porasil, Fractosil и др. В настоящей работе описан синтез высокоэффективного носителя для твердофазного синтеза олигонуклеотидов на основе легкодоступного отечественного микросферического аэросилогеля Силохром-2 с синтетической спейсерной группой.

Силохром-2, известный как носитель для газовой хроматографии, по физическим параметрам близок к другим крупнопористым силикатным носителям для твердофазного олигонуклеотидного синтеза (таблица). От носителей на основе силикагеля Силохром С-80 [6] отличается правильной сферической формой частиц, а также большим диаметром пор, что, как известно, повышает эффективность синтеза [5—8]. Носитель механически достаточно прочен и с успехом может применяться в автоматических синтезаторах.

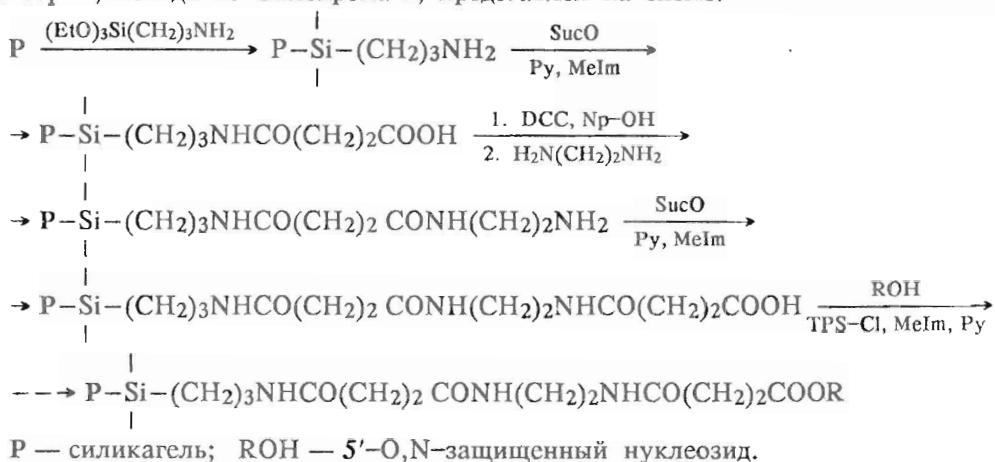
Некоторые физические параметры силикатных носителей  
для твердофазного синтеза олигонуклеотидов

Носитель	Размер частиц, мкм	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Средний диаметр пор, Å
СРГ-500	125—177	70	500
Fractosil-500	63—125	50	500
Силохром С-80	200—300	70—100	400—600
Силохром-2	150—250	40—60	600—900

Эффективность носителя зависит от таких факторов, как емкость, диаметр пор, природа спейсерной группы и др. [2, 5—8]. Предложен ряд конструкций спейсеров в основном полиамидной природы [1, 2, 7, 8]. Лучшие результаты (выход и гомогенность целевых олигонуклеотидов) достигаются со спейсерами с вытянутой конформацией [8]. По данным работы [7], эффективные спейсеры должны состоять из коротких полярных фрагментов, содержащих планарные амидные связи (например, известный диглицильный спейсер [2, 7]), что приводит

Сокращения: MeIm — 1-метилимидазол, TPS-Cl — триизопропилбензолсульфохлорид, SuCO — янтарный ангидрид, Np-OH — *n*-нитрофенол, Py — пиридин.

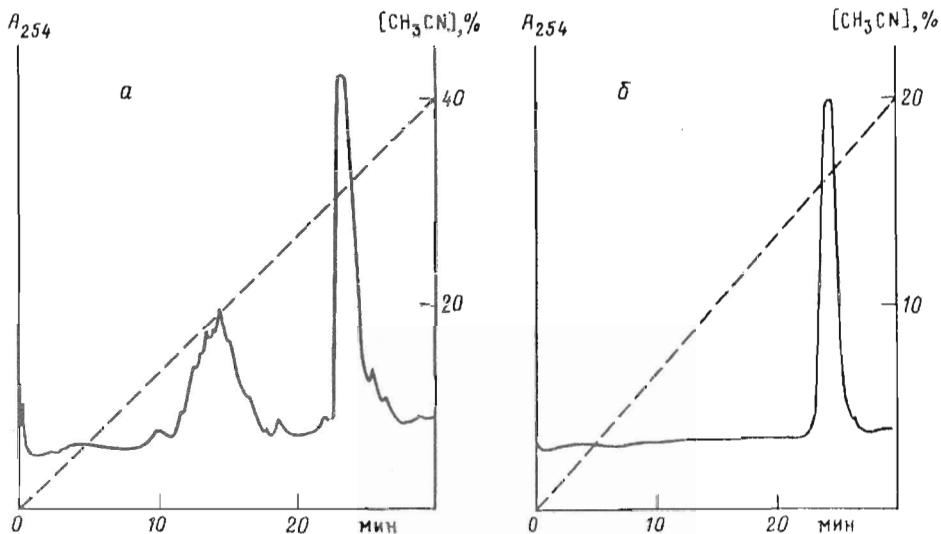
к удаленности первого нуклеозида от неполярной силианизированной поверхности силикагеля. Спейсерные группы, содержащие более длинные алифатические фрагменты, например бис- $\gamma$ -аминобутирильная группа, легче сгибаются с образованием внутримолекулярных связей, а также сильнее «залипают» на гидрофобной поверхности полимера, что уменьшает расстояние между олигонуклеотидом и носителем, снижая эффективность последнего. Мы использовали спейсерную группу, аналогичную эффективному спейсеру  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_6\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$  [8], в котором остаток гексаметилендиамина заменили более коротким этилендиамином. Разработанный нами способ синтеза носителя с таким спейсером, исходя из Силохрома-2, представлен на схеме:



Аминирование аэросилогеля осуществляли его обработкой аминопропилтриэтоксисиланом в водном этаноле, согласно [9]. Затем проводили сукцинирование аминогрупп на полимере янтарным ангидридом в пиридине в присутствии MeIm [10]. К остаткам янтарной кислоты присоединяли этилендиамин методом активированных эфиров. После дальнейшего наращивания спейсера повторным сукцинированием осуществляли посадку нуклеозидов на носитель, содержащий якорные карбоксильные группы, обрабатывая его соответствующим 5'-O-диметокситритил-N-ацилнуклеозидом в пиридине в присутствии TPS-Cl и MeIm, как описано в работе [10]. Полученные носители имели емкость 25—35 мкмоль/г, близкую к оптимальной при синтезе олигонуклеотидов для целей молекулярной биологии и генетической инженерии.

На полученном полимерном носителе с высокой эффективностью синтезировано несколько десятков олигодезоксирибонуклеотидов длиной до 30 звеньев. Синтез осуществляли N-фосфонатным методом с проведением конденсации в смеси  $\text{CH}_3\text{CN} - \text{пиридин}$  (4 : 1), как описано в [11], на синтезаторе «Виктория-6М» или в ручном варианте. Выходы реакций конденсации были достаточно высокими (в среднем 97,5—99% на стадию в автоматическом варианте синтеза) начиная с первой стадии и соответствовали или даже превосходили результаты, достигнутые на носителе CPG LCAA (500A; Pierce, США). Отметим, что на носителе на основе того же Силохрома-2, но без длинного спейсера, т. е. с простейшей аминопропил-сукцинированной связью между нуклеозидом и носителем, на первых 2—3 стадиях выходы конденсаций были существенно ниже (85—95%), как и гомогенность конечных продуктов. Деблокирование и выделение олигонуклеотидов осуществляли стандартными методами. Чистота синтезированных олигонуклеотидов, определяемая ВЭЖХ и гель-электрофорезом, соответствовала результатам, полученным на носителе CPG LCAA (рисунок).

Предложенный нами носитель по эффективности полностью соответствует лучшим в мировой практике носителям на основе пористого стекла CPG, но



Анализ 27-эвнного олигонуклеотида d(CCGGATCCATGAGTTGCCAACCTTTCА) обращенно-фазовой ВЭЖХ: а — реакционная смесь после удаления ацильных защитных групп; б — полностью деблокированный олигонуклеотид после очистки гель-электрофорезом. Хроматограф — Pharmacia FPLC System (Швеция), колонка — HR 5/2; градиент концентрации ацетонитрила в 0,1 М триэтиламмоний-ацетатном буфере. Скорость элюции 0,5 мл/мин

гораздо дешевле и доступнее. Описанная конструкция спейсера проста в получении и вместе с тем позволяет достичь высоких выходов и чистоты синтезируемых олигонуклеотидов.

Авторы благодарят Г. Панасенко за предоставленный образец аэросилогеля Силохром-2.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adams S. P., Kavka K. S., Wykes E. J., Holder S. B., Galluppi G. R. // J. Amer. Chem. Soc. 1983. V. 105. № 3. P. 661—663.
2. Koster H., Biernat J., McManus J., Wolter A., Stumpe A., Narang C. K., Sinha N. D. // Tetrahedron. 1984. V. 40. № 1. P. 103—112.
3. Matteucci M. D., Caruthers M. H. // J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. № 11. P. 3185—3191.
4. Chow F., Kempe T., Palm G. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 12. P. 2807—2817.
5. Kohli V., Balland A., Wintzerith M., Sauerwald R., Staub A., Lecocq J. P. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 22. P. 7439—7448.
6. Ломажин А. И., Ястребов С. И., Понов С. Г. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 7. С. 920—926.
7. Van Aerschot A., Herdewijn P., Vanderhaeghe H. // Nucleosides and Nucleotides. 1988. V. 7. № 1. P. 75—90.
8. Katzhendler J., Cohen S., Rahamim E., Weisz M., Ringel I., Deutsch J. // Tetrahedron. 1989. V. 45. № 9. P. 2777—2792.
9. Atkinson T., Smith M. // Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach/Ed. Gait M. J. Oxford: IRL Press, 1984. P. 35—81.
10. Efimov V. A., Buryakova A. A., Reverdatto S. V., Chakhmakcheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 23. P. 8369—8387.
11. Ефимов В. А., Дубей И. Я. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. № 2. С. 211—218.

Поступила в редакцию  
4.XII.1992

*I. Ya. Dubey, T. V. Lyapina, D. M. Fedoryak*  
**MICROSPHERIC SILICA «SILOCHROM-2» — A HIGHLY  
EFFICIENT SUPPORT FOR SOLID PHASE  
OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS**

*Institute of Bioorganic and Petroleum Chemistry,  
Ukrainian Academy of Sciences, Kiev*

New polymer support for highly efficient solid phase oligonucleotide synthesis based on microspheric silica «Silochrom-2» with a simple spacer group is proposed.

Технический редактор *Н. Н. Беляева*

---

Сдано в набор 13.02.93      Подписано к печати 24.03.93      Формат бумаги 70×100<sup>1/16</sup>  
Офсетная печать    Усл. печ. л. 6,5    Усл. кр.-отт. 3,9 тыс.    Уч.-изд. л. 8,0    Бум. л. 2,5  
Тираж 576 экз.    Зак. 3971    Цена 19 р. 40 к.

---

Адрес редакции: 117871, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, корп. 32, комн. 306  
·      Телефон: 330-60-38  
Московская типография № 2 ВО «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6