



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32.07+542.952.6

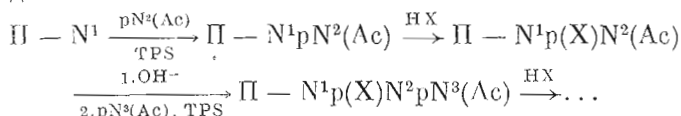
БЛОКИРОВАНИЕ МЕЖНУКЛЕОТИДНОЙ ФОСФАТНОЙ ГРУППЫ ПРИ ТВЕРДОФАЗНОМ СИНТЕЗЕ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ

Потанов В. К., Вейко В. П., Шабарова З. А.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Главным недостатком диэфирного метода синтеза олигодезоксирибонуклеотидов является протекание ряда побочных реакций, связанных с возможностью электрофильной атаки по межнуклеотидной фосфатной группе. Происходящая при этом деструкция полинуклеотидной цепи [1] кроме снижения выхода целевого олигонуклеотида при работе твердофазным методом приводит к накоплению на носителе последовательностей неконтролируемого состава, доля которых возрастает пропорционально длине олигонуклеотида. Это ухудшает качество разделения окончательной реакционной смеси и тем самым дополнительно уменьшает реальный выход олигонуклеотида заданной последовательности.

Для устранения указанных недостатков возможно или проведение синтеза целиком в триэфирном варианте, или блокирование межнуклеотидной фосфатной группы после каждой стадии наращивания цепи олигонуклеотида.



где П — полимерный носитель, N — дезоксиинуклеотид с защитой по экзациклической аминогруппе, X — фосфозащитная группа, TPS — 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид.

Преимущество комбинированного подхода состоит в том, что в качестве компонентов синтеза используются доступные дезоксирибонуклеозид-5'-фосфаты, а схема в целом хорошо отработана, и ее реализация в твердофазном варианте требует сравнительно небольших изменений существующих методик.

В настоящей работе для блокирования межнуклеотидного атома фосфора изучено применение анилидной группы, устойчивой в условиях щелочной обработки и легко вводимой в состав олигонуклеотида при действии смеси анилин — $(\text{Ph})_3\text{P} - \text{CCl}_4$ [2, 3]. Модельный синтез d(CTT) показал, что присоединение анилина происходит с выходом не менее 90% за 3,5 ч и не сопровождается расщеплением межнуклеотидной связи. Деблокирование протекает количественно за 8—10 ч (37°) при обработке полимер-олигонуклеотида изоамилнитритом [4].

Рис. 1. Хроматография смеси олигонуклеотидов после отщепления от носителя на DEAE-целлюлозе (С1) в градиенте концентрации хлористого натрия в 7 М мочевины (колонка 0,6 × 15 см, рН 7,5). Пики I — VI — динуклеотиды, пик VII — декануклеотид

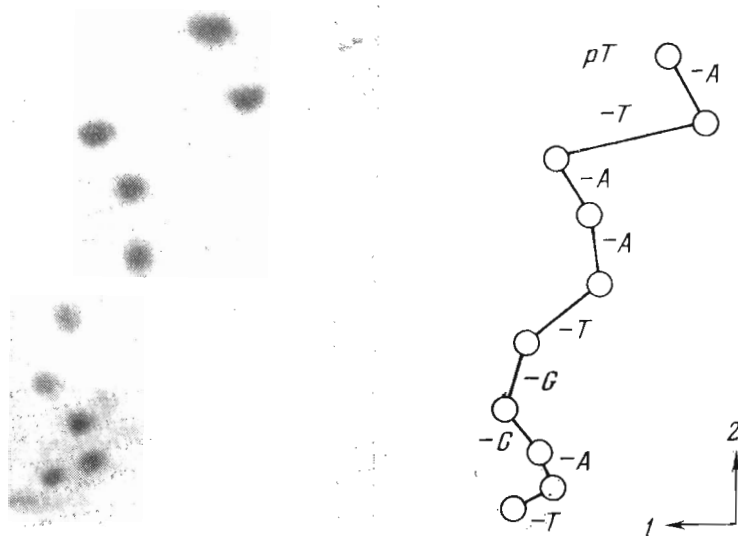
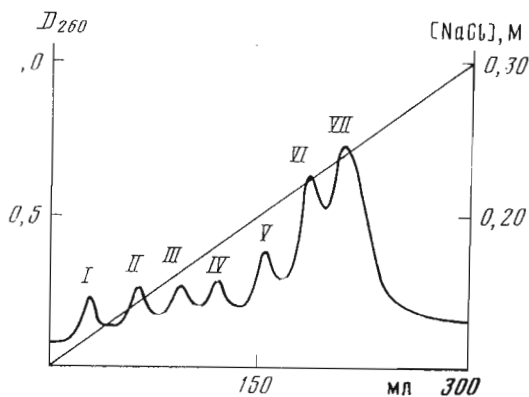


Рис. 2. Двумерное разделение продуктов частичного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда меченого декануклеотида $^{32}\text{pT-A-T-A-A-T-G-C-A-T}$. Направление 1 — электрофорез на ацетилцеллюлозе, рН 3,5, направление 2 — гомохроматография, обнаружение веществ — радиоавтография

По описанной схеме впервые в практике твердофазного метода проведен ступенчатый синтез декадезоксирибонуклеотида $\text{d(T-A-T-A-A-T-G-C-A-T)}$. В работе использован новый тип полимерного носителя, полученный модификацией полистирола [5], привитого на поверхность политетрафторэтилена [6]. В качестве якорной использована монометокситригидрокси группа, введенная в количестве 100 мкмоль/г носителя. Синтез (9 стадий конденсации, деблокирование и отщепление от носителя) осуществлен за 10 рабочих дней, исходя из полимер-тимидина (0,5 г, 50 мкмоль dT) на установке с проточным реактором колоночного типа, работающей в полуавтоматическом режиме (ручное переключение коллектора подачи растворителей). При проведении всех стадий конденсации использована стандартная методика прокачивания через слой носителя раствора 0,35 ммоль соответствующего преактивированного 1,5-кратным количеством TPS 3'-O-ацетилдезоксинуклеозид-5'-фосфата (при блокировании экзоциклических аминогрупп всех нуклеотидов использована бензоильная защита) в 2,5—3 мл абс. пиридина. Время конденсации 3,5 ч при 20°, а полное время цикла наращивания одного звена 8 ч. По окончании синтеза смесь олигонуклеотидов деблокировали обработкой изомилнитритом, а затем конц. аммиаком (12 ч, 50°) и отщепляли от носи-

теля обработкой 1% раствором трифторуксусной кислоты в хлористом метиле (5 мин, -30°). Хроматографическое разделение по методу Томлинсона — Тенера (рис. 1) смеси олигонуклеотидов, отщепленных с навески полимера (50 мг), показало, что количество неочищенного декануклеотида (пик VII, 47 ОЕ) составляет $\sim 25\%$ общей оптической плотности (200 ОЕ), а доля низкомолекулярных продуктов благодаря отсутствию распада межнуклеотидных связей уменьшилась по сравнению с обычным диэфирным методом в 2—3 раза.

Рехроматография фракции декануклеотида позволяет получить 34 ОЕ препарата, гомогенного по данным микроколоночной хроматографии при нейтральном и кислом значениях рН. Выход очищенного декануклеотида 6%, считая на исходный тимидин, что соответствует средней степени превращения на стадии 83—85%. Структура декануклеотида доказана определением последовательности оснований по методу нуклеотидных карт [7] (рис. 2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Nachmann J., Khorana H. G. (1968) J. Amer. Chem. Soc., 91, 2749—2757.
2. Appel R., Eining H. (1975) Z. anorg. und allg. Chem., 414, 241—246.
3. Митенина Г. Ф., Самуков В. В., Семенова Л. Н., Шубина Т. Н. (1978) Биоорганическая химия, 4, 735—739.
4. Ohtsuka E., Muraо K., Ubasawa M., Ikehara M. (1969) J. Amer. Chem. Soc., 91, 1537—1538.
5. Hayatsu H., Khorana H. G. (1967) J. Amer. Chem. Soc., 89, 3880—3883.
6. Потапов В. К., Туркин С. И., Вейко В. П., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1978) Докл. АН СССР, 241, 1352—1354.
7. Jay E., Bambara R., Padmana Chan P., Wu R. (1974) Nucleic Acids Res., 1, 331—353.

Поступило в редакцию
3.X.1978

BLOCKING OF THE INTERNUCLEOTIDE PHOSPHATE GROUP IN THE SOLID-PHASE SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES

ПОТАПОВ В. К., ВЕЙКО В. П., ШАБАРОВА З. А.

Chemistry Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

A new approach to the solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides has been worked out. It involves blocking the internucleotide phosphate group by aniline- $\text{Ph}_3\text{P}-\text{CCl}_4$ complex after each stage of the synthesis. The possibilities of the method are exemplified by the synthesis of decanucleotide d(T-A-T-A-A-T-G-C-A-T) which was carried out within 10 days and afforded the desired product in 6% overall yield.

Технический редактор Кузьмишкина Е. С.

Сдано в набор 20.12.78 Подписано к печати 06.02.79 Т-02833 Формат бумаги 70×108/16
Высокая печать Усл. печ. л. 14,0 Уч.-изд. л. 14,0 Бум. л. 5,0 Тираж 870 экз. Зак. 1260

Издательство «Наука». 103717 ГСП, Москва К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука». 121099, Москва, Шубинский пер., 10