



УДК 547.9 : 542.953.2

СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

VIII. СИНТЕЗ ДЕКАДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
n-БРОМАНИЛИДНОЙ Р-ЗАЩИТНОЙ ГРУППЫ *

Берлин Ю. А., Колосов М. Н., Чахмахчева О. Г.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

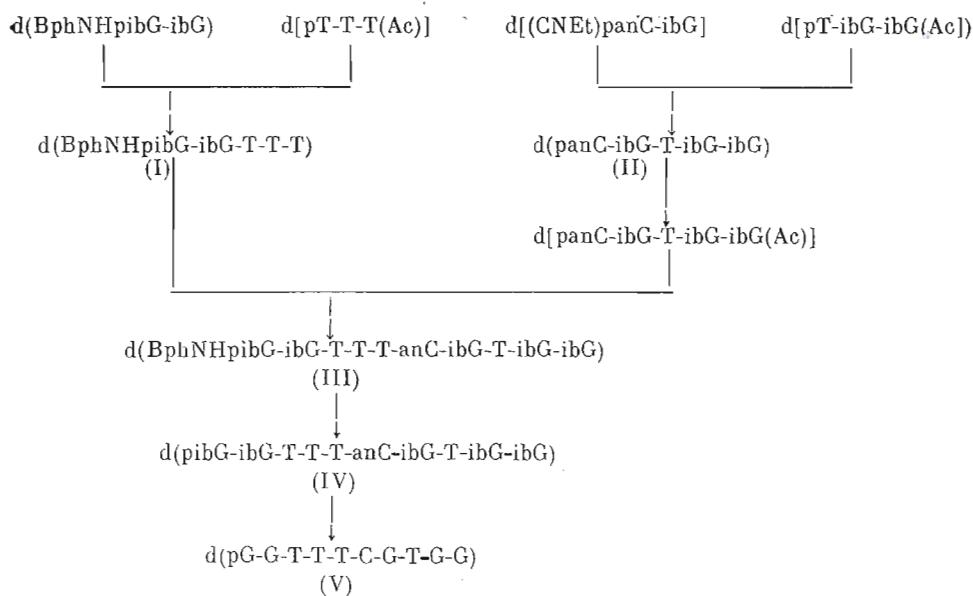
Из двух пентануклеотидов с помощью *n*-броманилидной защитной группы и мезитилсульфонилимидазолида в качестве конденсирующего реагента получен декадезоксирибонуклеотид $d(pG-G-T-T-T-C-G-T-G-G)$, гомологичный участку 1—10 дрожжевой тРНК₁^{val}.

При химическом синтезе олигонуклеотидов, имеющих концевой фосфатный остаток, перед проведением межнуклеотидных конденсаций этот остаток необходимо блокировать. Чаще всего для этого используют β-цианэтильную группу, которая легко вводится перед конденсацией и легко отщепляется после нее, но повторение реакций введения и удаления этой защитной группы на каждом этапе синтеза увеличивает число стадий и снижает общий выход, особенно при получении высших олигонуклеотидов. Поэтому продолжают поиски Р-защитных групп, сохраняющихся в ходе всего синтеза (см., например, [2—4]). Ранее мы показали, что для этой цели пригодна *n*-броманилидная группа, и с ее помощью синтезировали пентануклеотид $d(pibG-ibG-T-T-T)$ [5]. Однако позднее другими исследователями было отмечено, что при использовании анилидной группы в качестве защитной для концевого фосфатного остатка и применении арилсульфохлоридов в качестве конденсирующих реагентов может происходить расщепление фосфамидной связи [6]. Поэтому в развитие исследований по методам олигонуклеотидного синтеза мы обратились к использованию *n*-броманилидной группы в сочетании с более мягкими, чем сульфохлориды, конденсирующими реагентами — арилсульфонилимидазолидами [7]. Таким способом мы синтезировали декадезоксирибонуклеотид $d(pG-G-T-T-T-C-G-T-G-G)$, гомологичный участку 1—10 дрожжевой тРНК₁^{val} (см. схему).

Исходными веществами в этом синтезе были описанные нами в предыдущих сообщениях олигонуклеотиды $d(BphNHpibG-ibG)$ и $d(p-T-T-T)$ [5], $d(panC-ibG)$ и $d(pT-ibG-ibG)$ [7]. 5'-Концевой пентануклеотид $d(pibG-ibG-T-T-T)$ был получен с применением *n*-броманилидной Р-защитной группы, а второй пентануклеотид, $d(panC-ibG-T-ibG-ibG)$, — с помощью

* Сообщение VII см. [4]. В работе использованы следующие нестандартные сокращения: *ib* — изобутирил, MSI — мезитилсульфонилимидазолид, Bph — *n*-бромфенил, TEAB — бикарбонат триэтиламония.

Схема



β -цианэтильной группы с выходом соответственно 25 и 28%. Схема синтеза декануклеотида отличалась от опубликованной ранее [8] использованием в заключительной конденсации ОН-компонента, равного по длине Р-компоненту, что позволило проверить возможность синтеза полинуклеотидов из достаточно крупных блоков: в результате этой конденсации и удаления защитных групп конечный декануклеотид был получен с выходом 29%.

На всех этапах синтеза конденсирующим реагентом служил MSI. После завершения конденсации реакционную смесь обрабатывали щелочью для гидролиза 3'-ацетатного остатка, а затем хроматографировали на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации ТЕАВ. Декануклеотид (III), выделенный этим способом (рис. 1), последовательно освободили от броманилидной и N-ацильных групп действием изоамилнитрита, а затем аммиака и полученное вещество дважды хроматографировали в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine (рис. 2). Гомогенность синтезированных соединений контролировали микроколоночной хроматографией, а нуклеотидный состав определяли с помощью фосфодиэстеразы змеиного яда в ранее описанных условиях [9].

Осуществленный нами синтез декануклеотида $d(\text{pG-G-T-T-T-C-G-T-G-G})$ демонстрирует применение фосфамидных защитных групп при наращивании полинуклеотидной цепи в направлении от 5'- к 3'-концу и возможность синтеза олигонуклеотидов из крупных блоков, близких или равных по длине. Наличие фосфанилидной группы, обладающей повышенным сродством к модифицированным анионообменникам (например, бензоил-DEAE-целлюлозе), в ряде случаев позволяет упростить отделение продукта конденсации от пиррофосфата, образовавшегося из Р-компонента, и разделение непрореагировавших исходных веществ.

Экспериментальная часть

Общие сведения об эксперименте см. [5, 8]. В работе использовали мононуклеотиды производства опытного химического цеха НИОХ СО АН СССР (Новосибирск). Хроматографию проводили на бумаге ватман № 1

Рис. 1. Выделение декануклеотида (III). Хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 1×40 см) в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в 15%-ном спирте, скорость элюции 42 мл/ч, объем фракций 7 мл. Пик 1 (400 OE_{260}) содержит декануклеотид (III)

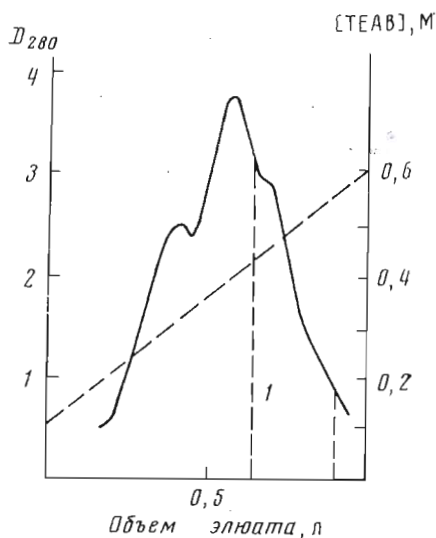


Рис. 1

Рис. 2. Выделение декануклеотида (V). Хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^- , 1×40 см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine, 0,01 М трис- HCl , pH 7,5 (0,4 л 0 М — 0,4 л 0,3 М). а (выделение) — скорость элюции 40 мл/ч, объем фракций 6,6 мл; центральная часть пика содержит 280 OE_{260} декануклеотида (V); б (рехроматография) — скорость элюции 16 мл/ч, объем фракций 4 мл; центральная часть пика содержит 190 OE_{260} декануклеотида (V)

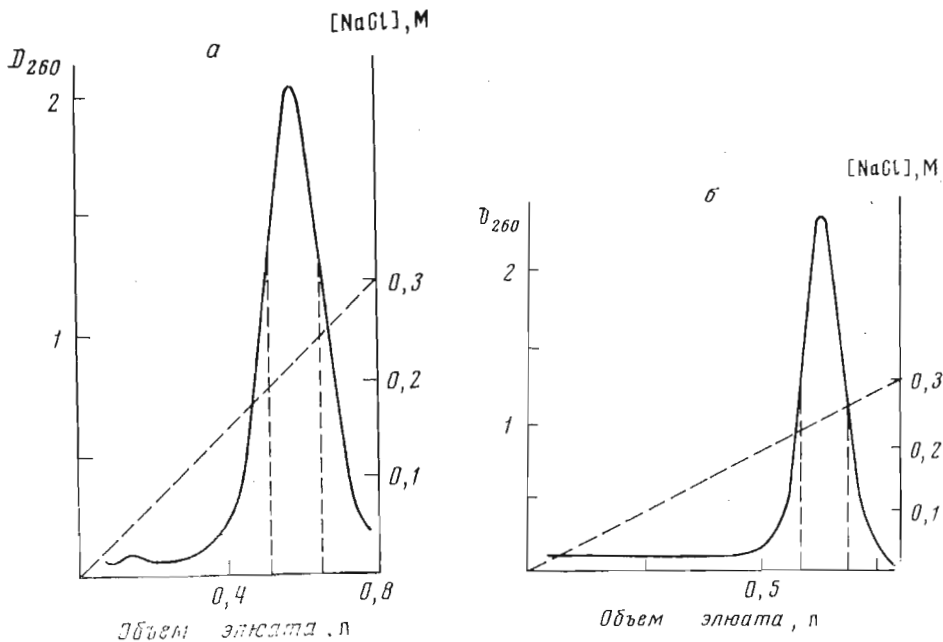


Рис. 2

в системах: EtOH — 1 М AcONH_4 , 7 : 3; pH 7,5 (А) и *n*-PrOH — конц. NH_3 — H_2O , 55 : 10 : 35 (Б). Получение *n*-броманилидов моно- и олигонуклеотидов описано ранее [5].

1. *d*(BphNHribG-ibG-T-T-T) (I) получили конденсацией 200 мг (0,15 ммоль) *d*(BphNHribG-ibG) [5] и 600 мг (0,5 ммоль) *d*[pT-T-T(Ac)] [5] в присутствии 300 мг (1,2 ммоль) MSI [6] в 4 мл пиридина в течение 5 сут при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавили равным объемом воды, затем при 0° обработали 8 мл 2 н. NaOH, через 10 мин избыток щелочи нейтрализовали дауэксом-50 (пиридиновая форма) до pH 8 и смолу отфильтровали. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 2×55 см) в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в 10%-ном спирте (1,5 л 0,05 М — 1,5 л 0,5 М), собирая фракции по

11 мл/10 мин. Из фракций 140—180 выделили 1800 OE_{260} (23%) пентануклеотида (I), R_{dPT} 1,0 (в системе А), λ_{max} 259 нм. Возврат $d(BphNHpibG-ibG)$ 38%, $d(pT-T-T)$ — 45%.

Для удаления броманилидной группы 50 OE_{260} пентануклеотида (I) растворили в 0,2 мл смеси пиридин — $AsOH$ (1 : 1), раствор охладили до 0° и прибавили 0,01 мл свежеперегнанного изоамилнитрита. Реакционную смесь выдержали 12 ч при комнатной температуре, после чего несколько

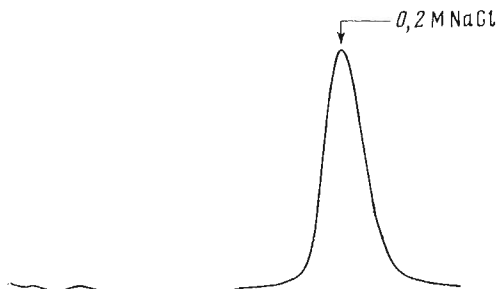


Рис. 3. Микроколоночная хроматография 0,05 OE_{260} декануклеотида (V) на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^- , $0,8 \times 80$ мм) в линейном градиенте концентрации $NaCl$ в 7 М мочеине, 0,01 М трис- HCl , pH 7,5 (0,0—0,25 М, общий объем градиента 600 мкл), скорость элюции 300 мкл/ч. Запись на спектрофотометрической приставке МСФП-1 (чувствительность 4 OE /шкала) при 260 нм

раз упарили с пиридином. Остаток растворили в 1 мл этилацетата и проэкстрагировали 0,1 М TEAB (2×1 мл). Водные экстракты упарили, к остатку прибавили 1 мл конц. NH_3 , выдержали 5 ч при 50° , упарили и хроматографировали в системе Б. Получили 19 OE_{260} $d(pG-G-T-T-T)$ с R_{dPT} 0,40, λ_{max} 263 нм; нуклеотидный состав: dpG — dpT 1,9 : 3,0.

2. $d(panC-ibG-T-ibG-ibG)$ (II) получили конденсацией 250 мг (0,21 ммоль) $d[(CNEt)panC-ibG]$ и 350 мг (0,2 ммоль) $d[pT-ibG-ibG(AC)]$ [7] в присутствии 125 мг (0,5 ммоль) MSI в 3 мл пиридина по методике опыта 1. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 2×30 см) в линейном градиенте концентрации TEAB в 10%-ном спирте (1,6 л 0,1 М — 1,6 л 0,5 М), собирая фракции по 9 мл/10 мин. Из фракций 130—200 выделили 3000 OE_{260} (27%) пентануклеотида (II); R_{dPT} 0,60 (в системе А), λ_{max} 259, 275 (плечо) нм. Возврат $d(panC-ibG)$ 47% $d(pT-ibG-ibG)$ 25%. После аммонолиза получили $d(pC-G-T-G-G)$, R_{dPT} 0,28 (в системе Б), λ_{max} 256 нм; нуклеотидный состав dpT — dpC — dpG 1,0 : 1,1 : 2,9 (ср. [5]).

3. $d(pG-G-T-T-T-C-G-T-G-G)$ (V). 1000 OE_{260} (15 мкмоль) 3'-ацетата пентануклеотида (II) (получен ацетилированием (II) по стандартной методике [5]) конденсировали с 500 OE_{260} (8 мкмоль) пентануклеотида (I) при помощи 15 мг (0,06 ммоль) MSI в 0,5 мл пиридина в условиях опыта 1. Результаты хроматографии приведены на рис. 1. Пик 1 (400 OE_{260}) содержал Р, N-защищенный декануклеотид (III), R_{dPT} 0,50 (в системе А). После упаривания объединенных фракций остаток обработали изоамилнитритом в условиях опыта 1. Полученный декануклеотид (IV) (R_{dPT} 0,20 в системе А) аммонолизovali 3 мл конц. NH_3 (5 ч при 50°) и дважды хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой в линейном градиенте концентрации $NaCl$ в 7 М мочеине (см. рис. 2). Полученные при второй хроматографии фракции 145—175 объединили, разбавили втрое водой и нанесли на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 2×5 см). Колонку отмыли 0,05 М TEAB от ионов хлора, после чего элюировали 50 мл 1 М TEAB и раствор несколько раз упарили со спиртом до полного удаления триэтиламина. Выход декануклеотида (V) 190 OE_{260} (29%). Результаты микроколоночной хроматографии приведены на рис. 3. Вещество идентифицировано прямым хроматографическим сравнением с образцом, полученным ранее [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин Ю. А., Вульфсон А. Н., Колосов М. Н. (1975) Биоорганич. химия, 1, 851—852.
2. Poonian M. S., Nowoswiat E. F., Nussbaum A. L. (1972) J. Amer. Chem. Soc., 94, 3992—3997.
3. Agarwal K. L., Fridkin M., Jay E., Khorana H. G. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 2020—2024.
4. Narang S. A., Itakura K., Bahl C. P., Katagiri N. (1974) J. Amer. Chem. Soc., 96, 7074—7077.
5. Берлин Ю. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Чахмахчева О. Г. (1973) Химия природн. соед., 410—417.
6. Бадашкева А. Г., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Шубина Т. Н. (1975) Биоорганич. химия, 1, 293—299.
7. Berlin Yu. A., Chakhmakheva O. G., Efimov V. A., Kolosov M. N., Korobko V. G. (1973) Tetrahedron Lett., 1353—1354.
8. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Чахмахчева О. Г., Шингарова Л. Н. (1975) Биоорганич. химия, 1, 1121—1129.
9. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) Биохимия, 39, 747—751.

Поступила в редакцию
7.VII.1975

SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES. VIII. SYNTHESIS OF A DECADEOXYRIBONUCLEOTIDE WITH THE USE OF THE *p*-BROMOANILIDE P-PROTECTING GROUP

BERLIN Yu. A., KOLOSOV M. N., CHAKHMAKHCHEVA O. G.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Decadeoxyribonucleotide d(pG-G-T-T-T-C-G-T-G-G) homologous to the 1—10 segment of yeast tRNA₁^{Val} is synthesized from two pentanucleotides with the use of *p*-bromanilide protecting group and mesitylenesulfonyl imidazolide as condensing reagent.
