



УДК 547.963.32' 118 : 542.91

**СИНТЕЗ 3'-ФОСФАТОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСТРАКЦИОННОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ**

*Баканова В. А., Сергеева Н. Ф., Джанаридзе Н. Ш.,
Смирнов В. Д., Соколова Н. И., Шабарова З. А.*

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Предложен препаративный метод фосфорилирования олигодезоксирибонуклеотидов с помощью имидазолида хлорокиси фосфора. Фосфорилированные моно- и олигонуклеотиды выделены из реакционной смеси в индивидуальном состоянии с помощью экстракции органическими растворителями.

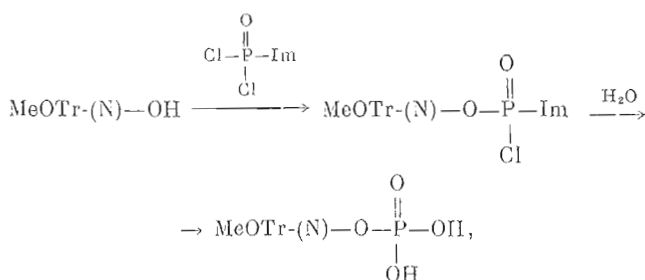
Несмотря на значительные успехи в области синтеза олигодезоксирибонуклеотидов, продолжают поиски новых, менее трудоемких методов их получения. Введение в практику олигонуклеотидного синтеза экстракционного метода выделения монометокситритилсодержащих (MeOTr) ди-, три- и тетрапуклеотидов вместо ионообменной хроматографии [1, 2] могло бы явиться основой для создания экспресс-метода синтеза олигонуклеотидных блоков, однако отсутствие в синтезированных таким образом олигомерах концевых фосфатных групп исключает возможность их использования для наращивания олигонуклеотидной цепи. Очевидным способом преодоления этого недостатка является разработка эффективного метода фосфорилирования олигодезоксирибонуклеотидов.

Ферментативный метод фосфорилирования олигонуклеотидов с помощью полинуклеотидкиназы [3] вследствие малой доступности фермента не может пока рассматриваться как препаративный.

Химические методы фосфорилирования олигонуклеотидов в растворе с помощью β -цианэтилфосфата [4] или хлорокиси фосфора [5], использованные только для фосфорилирования динуклеозидфосфатов, отличаются низкой эффективностью и необходимостью применения ионообменной хроматографии при выделении фосфорилированного продукта.

В связи с этим мы поставили своей задачей разработку препаративного метода фосфорилирования олигодезоксирибонуклеотидов с использованием экстракционного метода для выделения этих соединений. В качестве фосфорилирующего агента был использован имидазолид хлорокиси фосфора, который успешно применялся для введения фосфатных групп в олигонуклеотиды, закрепленные на полимерном носителе [6].

Фосфорилирование MeOTr-нуклеозидов, динуклеозидфосфата и тринуклеозиддифосфатов проводилось по следующей схеме:



где (N)=dT; dC^{An}; dA^{Bz}; d(T-C)^{An}; d(A^{Bz}-A^{Bz}-A^{Bz}); d(C^{An}-A^{Bz}-A^{Bz}); d(T-C^{An}-G^{tBu}).

В табл. 1 приводятся сведения о концентрации и избытке имидазолида хлорокси фосфора при фосфорилировании 3'-гидроксильной группы в моно- и олигодезоксирибонуклеотидах.

Как следует из данных табл. 1, на эффективность фосфорилирования влияет не только концентрация, но и величина избытка имидазолида хлорокси фосфора. Количественное фосфорилирование 3'-гидроксильных групп нуклеозидов достигается при использовании 50-кратного избытка имидазолида хлорокси фосфора, взятого в концентрации 0,024M. Для успешного фосфорилирования динуклеозидфосфатов и тринуклеозиддифосфатов концентрация фосфорилирующего агента должна быть на порядок выше. Причем даже использование 100—300-кратных избытков имидазолида хлорокси фосфора в концентрации, близкой к 1 M, не приводит к количественному выходу фосфорилированного продукта. Поскольку этот эффект отмечен для олигонуклеотидов, отличающихся по составу, объяснением его, вероятно, может быть участие межнуклеотидных фосфатных групп в образовании неустойчивых продуктов взаимодействия с имидазолидом хлорокси фосфора, затрудняющих фосфорилирование 3'-гидроксильных групп олигонуклеотидов.

Во всех случаях фосфорилированный продукт отделяли от исходного экстракцией последнего этилацетатом, содержащим 15% *n*-бутанола. Отделение фосфорилированного олигонуклеотида от избытка фосфорилирующего агента также легко достигалось экстракцией тритилсодержащего олигонуклеотида хлороформом, содержащим 15% *n*-бутанола.

Некоторые характеристики синтезированных 3'-фосфатов моно- и олигодезоксирибонуклеотидов представлены в табл. 2.

Таблица 1

Условия фосфорилирования нуклеозидов и олигонуклеотидов (5 мин, 0°)

Фосфорилируемый компонент, mM	Имидазолид хлорокси фосфора		Выход фосфорилированного продукта, %
	mM	M	
dMeOTr-T (0,19)	1,9	0,02	100
	0,85	0,024	100
	0,85	0,004	30
	0,19	0,024	50
	0,19	0,004	35
dMeOTr-C ^{An} (0,01)	3,7	0,9	100
dMeOTr-A ^{Bz} (0,01)	3,7	0,9	100
d(MeOTr-T-C ^{An}) (0,01)	1,0	0,2	70
	1,0	0,5	80
	1,0	1,0	85
	0,5	0,5	50
d(MeOTr-T-C ^{An} -G ^{tBu}) (0,013)	1,95	0,2	80
d(MeOTr-C ^{An} -A ^{Bz} -A ^{Bz}) (0,03)	11,0	0,9	85
d(MeOTr-A ^{Bz} -A ^{Bz} -A ^{Bz}) (0,03)	11,0	0,9	80

Некоторые характеристики продуктов фосфорилирования

Нуклеотид (олигонуклеотид)	Спектральные характеристики		R_f в тонком слое силикагеля	R_f на бумаге в системах		Электрофоретическая подвижность относительно $d_p T$
	λ_{\max}	λ_{\min}		А	В	
dMeOTr-Tr	272	240	0,65	—	—	—
dTr	267	234	—	0,4	0,53	1
dMeOTr-Cp ^{An}	304	230	0,55	—	—	—
dCp	271	250	—	0,4	0,38	1
dMeOTr-Ap ^{Bz}	280	245	0,56	—	—	—
dAp	260	228	—	0,34	0,6	1
d(MeOTr-T-Cp ^{An})	275,305	250	0,43	—	—	—
d(MeOTr-T-Cp)	270	250	—	0,58	0,69	—
d(T-Cp)	267	237	—	0,3	0,41	—
d(MeOTr-T-C ^{An} -Gp ^{tBu})	275	245	0,5	—	—	0,9
dMeOTr-T-C-Gp	270	245	—	0,45	0,63	—
d(T-C-Gp)	267(300)	234	—	0,2	0,38	0,98
d(MeOTr-A ^{Bz} -A ^{Bz} -Ap ^{Bz})	280	245	0,30	—	—	—
d(MeOTr-A-A-Ap)	260	220	0,22	—	0,55	—
d(A-A-Ap)	260	220	—	0,41	0,20	1
d(MeOTr-C ^{an} -A ^{Bz} -A ^{Bz})	280(300)	245	0,3	—	—	—
d(MeOTr-C-A-Ap)	260	220	0,22	—	0,55	—
d(C-A-Ap)	260	220	—	0,12	0,2	1

Наличие в полученных олигонуклеотидах 3'-концевой фосфатной группы устанавливалось на основании результатов ферментативного гидролиза соединений. При гидролизе полученных моно- и олигонуклеотидов щелочной фосфатазой из *E. coli* они количественно превращались в исходные соединения. Гидролиз тринуклеотидов d(T-C-Gp) и d(C-A-Ap) фосфоэстеразой селенки приводит к получению соответствующих нуклеозид-3'-фосфатов в соотношении dTr: dCp: dGp-1,07:1,0:1,3; dCp: dAp = 1:1,83. Единственным продуктом гидролиза тринуклеотида d(A-A-Ap) является dAp. При аналитической хроматографии d(A-A-Ap) и d(C-A-Ap) на микроколонке с DEAE-сефадексом А-25 в системе Томлинсона — Тенера [7] они элюировались в виде симметричных пиков 0,21 М NaCl, как и контрольный тринуклеотид — d(pA-A-A).

Наличие в полученных олигонуклеотидах 3'-концевой фосфатной группы подтверждается также их хроматографическими и электрофоретическими характеристиками (см. табл. 2).

Таким образом, предложенный метод позволяет осуществить фосфорилирование 3'-гидроксильной группы олигодезоксирибонуклеотидов различной длины и состава и использовать экстракционный метод выделения для получения олигонуклеотидов, содержащих концевую фосфатную группу.

Экспериментальная часть

Хроматографию и электрофорез проводили на бумаге N1 («Filtrak», ГДР). При хроматографии использовали системы: этанол — 1М ацетат аммония, 7:3 (А); *n*-пропанол — аммиак — вода, 55:10:35 (Б). Горизонтальный электрофорез проводили в течение часа при напряжении 42 В/см в 0,05 М триэтиламонийбикарбонатном буфере (рН 7,5).

ТСХ проводили на пластинках силуфол в системе вода — ацетонитрил, 1 : 4.

5'-О-метокситритилнуклеозиды $dMeOTr-T$, $dMeOTr-A^{Bz}$, $dMeOT-C^{An}$ получали обработкой dT , dA^{Bz} и dC^{An} метокситритилхлоридом по методикам Кораны [8].

Динуклеозидфосфат $d(MeOTr-T-C^{An})$ и тринуклеозиддифосфаты $d(MeOTr-T-C^{An}-G^{tBu})$, $d(MeOTr-C^{An}-A^{Bz}-A^{Bz})$ и $d(MeOTr-A^{Bz}-A^{Bz}-A^{Bz})$ были синтезированы по методикам Кораны с использованием экстракционного метода выделения [1, 2].

Приготовление фосфорилирующего агента [6]. К охлажденному до 0° раствору 0,2 мМ имидазола в абсолютном пиридине добавляли 0,2 мМ (0,02 мл) хлорокиси фосфора. Смесь встряхивали 5 мин при 0°, осадок хлоргидрата пиридина отделяли фильтрованием или центрифугированием. Фильтрат немедленно использовали для фосфорилирования.

Общая методика фосфорилирования. N-защищенный 5'-О-монометокситритил-дезоксирибонуклеозид (олигодезоксирибонуклеотид), не содержащий концевой фосфатной группы, тщательно высушивали многократной отгонкой сухого пиридина. К высушенному осадку при 0° добавляли рассчитанное количество раствора фосфорилирующего агента в пиридине и смесь встряхивали 5 мин при 0°. Раствор выливали в ледяную воду и осаждали при 0° на 12—16 ч, затем разбавляли пиридином до 70%-ной концентрации последнего и упаривали до консистенции масла. Остаток растворяли в 0,2 М триэтиламмонийбикарбонатном буфере (рН 7,5) из расчета 100 мл буфера на 1 мМ олигонуклеотида и раствор экстрагировали смесью *n*-бутанола с этилацетатом (15 : 85). Фосфорилированный продукт экстрагировали из буферного раствора смесью *n*-бутанола с хлористым метиленом (3 : 7), следя за ходом экстракции с помощью ТСХ. Органический слой разбавляли пиридином, раствор упаривали, остаток высушивали многократной отгонкой сухого пиридина, растворяли в сухом пиридине и выливали в сухой эфир (25 мл пиридина и 500 мл эфира на 1 мМ нуклеотидного материала). Осадок 3'-фосфата нуклеозида (олигонуклеотида) отделяли центрифугированием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Agarwal K. L., Kumar A., Khorana H. G. (1972) J. Mol. Biol., 72, 351—373.
2. Caruthers M. H., van de Sande J. H., Khorana H. G. (1972) J. Mol. Biol., 72, 375—405.
3. Van de Sande J. H., Bilsker M. (1973) Biochemistry, 12, 5056—5062.
4. Tener G. M. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 83, 159—168.
5. Köster H., Heidmann W. (1973) Angew. Chem., 85, 859—860.
6. Будапов М. В., Поталов В. К., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1975) Докл. АН СССР, 220, № 4, 841—843.
7. Власов В. В., Грачев М. А., Комарова Н. И., Кузьмин С. В., Мещерова Н. И. (1972) Молекулярн. биология, 809—816.
8. Büchi H., Khorana H. G. (1972) J. Mol. Biol., 72, 251—288.

Поступила в редакцию *
19.XI.1974

* Статья из портфеля редакции «Журнал общей химии»; дата поступления — 10.VII.1974. г.

**SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDE 3'-PHOSPHATES UTILIZING
THE EXTRACTION PROCEDURE FOR ISOLATION**

BAKANOVA V. A., SERGEEVA N. F., DJAPARIDZE N. Sh.,
SMIRNOV V. D., SOKOLOVA M. I., SHABAROVA Z. A.

M. V. Lomonosov State University, Moscow

A preparative method was developed in which oligodeoxyribonucleotides are phosphorylated with phosphoryl chloride imidazolide. Mono- and oligodeoxyribonucleotides were obtained with the 80—100% yields and isolated by means of extraction procedure.
