



УДК 577.113.6:542.95

АВТОМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ 20—47-ЗВЕННЫХ
ПОЛИДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ
ФОСФИТАМИДНЫМ МЕТОДОМ НА СИНТЕЗАТОРЕ
«ВИКТОРИЯ-4М»

Грязнов С. М., Чернов И. П*, Потапов В. К.,
Пурмаль А. А., Метелев В. Г., Елов А. А., Шабарова З. А.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет и межфакультетская проблемная
научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии
и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского, Москва;*

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

На синтезаторе «Виктория-4М» в соответствии с разработанной картой-схемой операций осуществлен синтез фосфитамидным методом ряда олиго- и полидезоксирибонуклеотидов длиной до 47 звеньев. Продолжительность одного синтетического цикла 12 мин. Средние выходы на стадию, рассчитанные по количеству удаляемой моно- или диметокситритильной группы, составляет 94–98%. В работе показано, что первичная структура синтезируемого олигонуклеотида не оказывает влияния на эффективность наращивания нуклеотидной цепи. Нуклеотидная последовательность полученных олигонуклеотидов подтверждена анализом по методу Максама – Гилберта. В качестве твердофазного носителя использовали отечественный аминопропилированный силикагель силохром С-80. Показано, что рабочие характеристики модифицированного силикохрома С-80 не уступают носителям на основе СРГ-500.

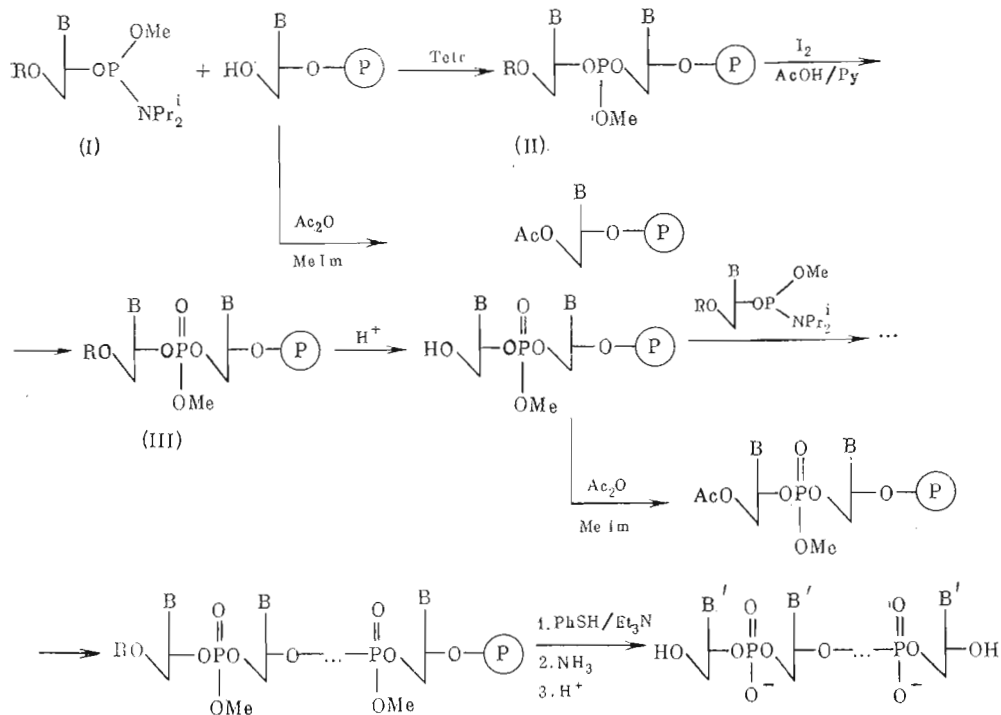
Развитие быстрых и высокоэффективных методов синтеза олигонуклеотидов, находящихся широкое применение в генетической инженерии, биотехнологии, молекулярной биологии и других областях, — одна из актуальных проблем современной биоорганической химии. В настоящее время наиболее перспективным способом синтеза является автоматический синтез олигонуклеотидов по фосфотриэфирной [1, 2] или фосфитным схемам [3, 4].

Целью настоящей работы была разработка оптимальной карты-схемы операций синтеза олиго- и полинуклеотидов на опытном образце установочной серии отечественных автоматов-синтезаторов олигонуклеотидов «Виктория-4М».

Ключевым моментом автоматического синтеза является химическая схема наращивания олигонуклеотидной цепи. На синтезаторе «Виктория-4М», конструкция которого описана ранее [5], нами была реализована фосфитамидная схема синтеза в направлении от 3'- к 5'-концу олигонуклеотида с использованием несущих обычные 5'-О- и N-защитные группы 3'-(N,N-диизопропиламид)метилфосфитов нуклеозидов [6]. В качестве 5'-О-защитных групп применяли как моно-, так и диметокситритильные группы. Для блокирования экзоциклических аминогрупп гетероциклических оснований цитидина и аденозина использовали бензоильную, а для гуанозина — как бензоильную, так и изобутирильную защитные группы. В общем виде схема синтеза олигонуклеотидов представлена ниже (схема 1).

Принятые сокращения: префикс d (дезокс) всюду опущен; Tetr — тетразол; MeIm — N-метилимидазол; MeOTr — монометокситритил; (MeO)₂Tr — диметокситритил.

Схема 1.



(P) — полимерный носитель

R = MeOTr, (MeO)₂Tr;

B = Thy, bzCyt, bzAde, bzGua, ibuGua, B' = Thy, Cyt, Ade, Gua.

Карта-схема операций рассматриваемой фосфитамидной схемы синтеза олигонуклеотидов представлена в табл. 1. Общая продолжительность синтетического цикла составляет 12 мин. Суммарный объем всех растворителей, расходуемых в цикле, не превышает 14 мл. Каждый цикл наращивания нуклеотидной цепи состоит из четырех химических стадий: детритилирования, межнуклеотидной конденсации, окисления фосфитной группы в фосфатную и блокирования непрореагировавших 5'-гидроксильных групп растущей цепи.

Для детритилирования 5'-гидроксильной группы нуклеозидного компонента в каждом цикле синтеза использовали 0,1 М раствор трифторуксусной кислоты в абсолютном хлористом метиле. Оказалось, что в этих условиях удаление моно- и диметокситритильных 5'-О-защитных групп протекает практически с одинаковой скоростью и эффективностью, причем в обоих случаях пуриновые нуклеозиды детритилируются быстрее, чем пиримидиновые, что также отмечалось в ряде работ [6, 7]. При отработке карты-схемы операций синтезатора «Виктория-4М» полноту детритилирования проверяли повторной обработкой 0,1 М трифторуксусной кислотой.

При проведении второй стадии цикла — межнуклеотидной конденсации — 0,1 М раствор фосфитамидного компонента (I) в абсолютном ацетонитриле преактивировался (20 с) с равным объемом 0,5 М раствора Tetf в ацетонитриле и затем полученная смесь вводилась в реактор. Ввиду плохой растворимости компонента (I) — производного N-бензоилгуанозина — в ацетонитриле его применяли в виде 0,1 М раствора в смеси хлористый метилен — ацетонитрил, 1 : 4. Во всех случаях независимо от длины синтезируемой последовательности и структуры нуклеотидных компонентов продолжительность межнуклеотидной конденсации составляла

Карта-схема операций одного цикла наращивания нуклеотидной цепи на автомате «Виктория-4М»

№	Операция	Реагент	Время операции, с
1	Промывка	CH ₂ Cl ₂	30
2	Детритилирование *	0,1 М TFA в CH ₂ Cl ₂	60-70
3	Промывка	CH ₂ Cl ₂	30
4	»	CH ₃ CN	50
5	Дозирование нуклеотидного компонента **	120 мкл 0,1 М раствора (I) в CH ₃ CN	—
6	Дозирование активатора **	120 мкл 0,5 М раствора Tetr в CH ₃ CN	—
7	Смешивание дозированных растворов	—	20
8	Ввод смеси в реактор	Объем 240 мкл	—
9	Циркуляция	—	120
10	Промывка	CH ₃ CN	30
11	Окисление	0,2 М I ₂ в смеси Py — AcOH, 9 : 1	30
12	Промывка	CH ₃ CN	30
13	Кеширование	1 М Ac ₂ O в смеси MeIm — Pr ₂ ⁱ EtN — CH ₃ CN, 1 : 4,5 : : 30	120
14	Промывка	CH ₃ CN	30

* Детритилирование при синтезе олигонуклеотидов до 20 и свыше 20 звеньев проводится соответственно 60 и 70 с.

** Дозирование растворов фосфитамида (I) и тетразола осуществляется в смесительную камеру, откуда после смешивания раствор активированного нуклеотидного компонента вводится в реактор.

2 мин. Проведение межнуклеотидной конденсации свыше 2 мин, по нашим данным, не приводит к увеличению выхода целевого олигонуклеотида. На стадии межнуклеотидной конденсации использовали примерно 10-кратный избыток нуклеотидного компонента по отношению к находящемуся на полимерном носителе нуклеозидному компоненту.

Третья стадии синтетического цикла — окисление образующегося при межнуклеотидной конденсации тризамещенного фосфита (II) в соответствующий фосфат (III). В литературе описан ряд окисляющих реагентов на основе либо растворов пероксида водорода в смеси растворителей, содержащих воду, которая является донором кислорода при образовании фосфорильной группы, либо безводных окислителей, например бисацетата иодозобензола в абсолютном пиридине и уксусном ангидриде [8], где источником кислорода фосфорильной группы является ацетат фенилиодония.

В настоящей работе на стадии окисления был использован реагент на основе легко доступного, в отличие от бисацетата иодозобензола, иода

Структура и выходы синтезированных

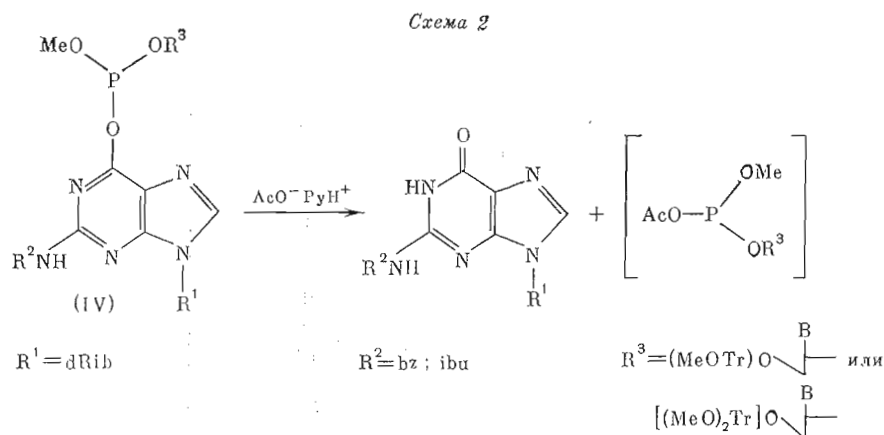
Номер	Олигонуклеотид	Длина нуклеотидов
1	GAGTTCGGGCATGGGGCTC	17
2	CGCACCGGGGATCCTAGGCA	20
3	GTGGGACCAACCGGCTACGG	20
4	GTCTGCATCTAGAGGCCTCTG	23
5	AATTCAGGAGGCCTCTAGATGCAG	24
6	AATTCAGGAGGCCTCTAGATGTGTTACTG	29
7	GGCTGCTTGATCTCCCCCACGTGTGTTTA	29
8	CCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACA	30
9	CCTGGCAGTAACACATCTAGAGGCCTCCTG	30
10	TCTGAATAAGTTTATACGTAAGCGAATGCGTTAAAAAGATLAACSTCAG	47

* Общий выход олигонуклеотида определялся после его выделения и очистки в расчете на

в виде 0,2 М раствора в смеси абсолютного пиридина и ледяной уксусной кислоты (9:1). В этом случае источником кислорода фосфорильной группы также является ацетат-анион.

В ряде работ отмечается, что в ходе олигонуклеотидного синтеза по фосфитамидной схеме во время межнуклеотидной конденсации происходит фосфорилирование атома кислорода O⁶ гуаниновых оснований [9, 10]. Образующиеся соединения типа (IV) (схема 2) легко разрушаются водой или другими нуклеофильными агентами, однако при окислении иодом в присутствии воды и пиридина наряду с регенерацией 6-оксогруппы происходит частичное превращение соединений (IV) в стабильные фосфатные производные, которые являются причиной роста побочных цепей, а также деградации олигонуклеотидной цепи при аммонолизе. Поэтому считается необходимым блокирование O⁶-функции гуаниновых оснований [10].

По нашему мнению, наличие в используемой окисляющей смеси значительно более сильного, чем вода, нуклеофила — ацетата пиридиния — приведет к быстрой и более полной регенерации модифицированных по атому O⁶ гуаниновых оснований и, следовательно, к существенному уменьшению протекания побочных процессов (схема 2).



Для подтверждения этого предположения нами было рассмотрено влияние первичной структуры синтезированных с применением указанной выше окисляющей смеси олигонуклеотидов на их выходы, рассчитанные как по удаляемой на каждой стадии моно(ди)метокситритильной группе, так и по количеству целевого продукта после его выделения и очистки (табл. 2). Особое внимание уделяли синтезу гуанозинбогатых пуклеотидных последовательностей, особенно на 3'-конце олигонуклеотида — в этом случае вероятность введения модификации максимальна ввиду значитель-

Таблица 2

олигонуклеотидов

Носитель	Содержание G, %	Содержание A+G, %	Средний выход на стадию по тритильной группе, %	Общий выход, % *
C-80	47	60	95	10
C-80	35	55	94,5	9,5
C-80	40	55	96	10,7
CPG	26	40	95	9,1
C-80	29	67	98	15
CPG	28	52	95	7,2
C-80	21	31	96,5	10,2
CPG	7	53	95,5	8
C-80	23	37	96,5	9,8
C-80	20	60	94,9	1,7

первый нуклеозид, присоединенный к твердофазному носителю.

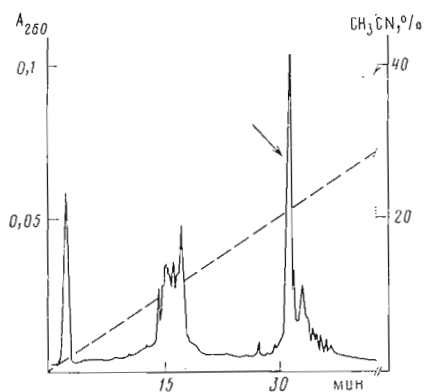


Рис. 1

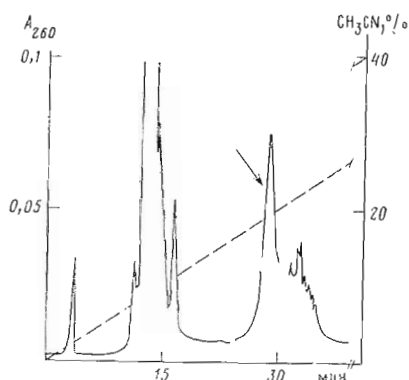


Рис. 2

Рис. 1. Обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционной смеси, полученной при синтезе тетракозануклеотида [(MeO)₂Tr]AATTCAGGAGGCGCTCTAGATGCAG (5); пик целевого продукта отмечен стрелкой. Условия хроматографии — см. «Экспер. часть»

Рис. 2. Обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционной смеси, полученной при синтезе гептатетраконтануклеотида [(MeO)₂Tr]TCTGAATAAGTTTATACGTAAGCGAATGCCTTAAAGATAASTCAG (10); пик целевого продукта отмечен стрелкой. Условия хроматографии — см. «Экспер. часть»

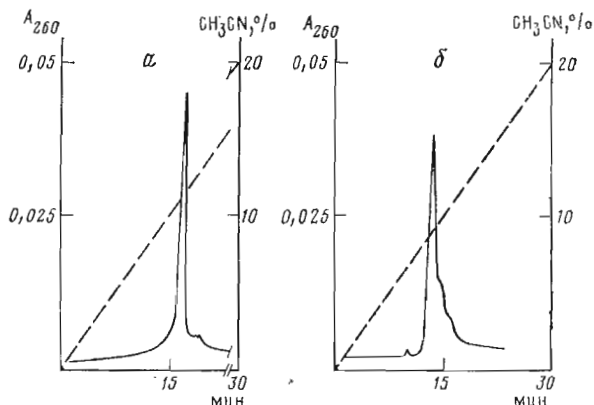


Рис. 3. Обращенно-фазовая ВЭЖХ выделенных олигонуклеотидов (см. рис. 1 и 2) после их детритилирования: тетракозануклеотида (5) (а) и гептатетраконтануклеотида (10) (б). Условия хроматографии — см. «Экспер. часть»

ного увеличения числа межнуклеотидных конденсаций. Полученные результаты свидетельствуют о том, что как первичная структура олигонуклеотидов, так и количество гуанозиновых звеньев при использовании безводной окисляющей смеси не оказывают существенного влияния на эффективность синтеза (см. табл. 2). Средние выходы на стадию по отщепляемой моно(ди)метокситритильной группе, а также в расчете на выделенный продукт для обогащенных гуанозиновыми звеньями олигонуклеотидов (1)–(3), (5), (6) (табл. 2) в целом мало отличаются от выходов в случае других олигонуклеотидов.

Следует также отметить, что отсутствие в окисляющем реагенте воды позволяет сократить время высушивания твердофазного носителя перед проведением следующей операции и, следовательно, уменьшить расход абсолютных растворителей при промывках.

Четвертой химической стадией в каждом синтетическом цикле (кроме последнего) является блокирование не вступивших в межнуклеотидную конденсацию 5'-гидроксильных групп — кепирование, эффективное проведение которого позволяет значительно упростить хроматографическое выделение целевых олигонуклеотидов. С этой целью нами была использована смесь уксусного ангидрида с нуклеофильным катализатором — N-метилимидазолом в присутствии сильного третичного амина — диизопро-

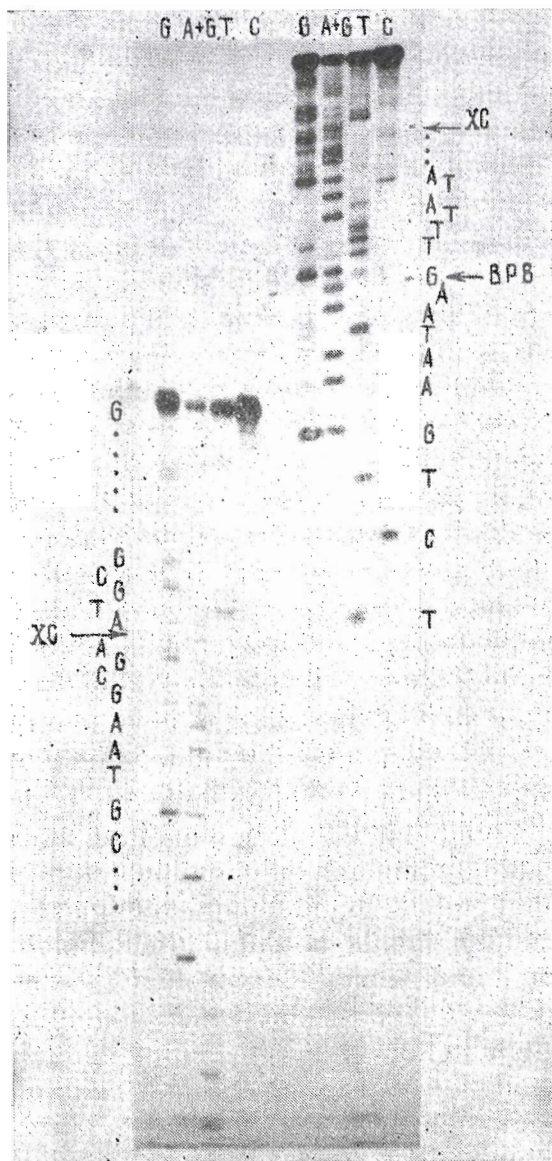


Рис. 4

Рис. 4. Анализ нуклеотидной последовательности гептатетраоктауклеотида (10) по методу Максама — Гилберта. XC и BPB — положения красителей ксиленцианола и бромфенолового синего

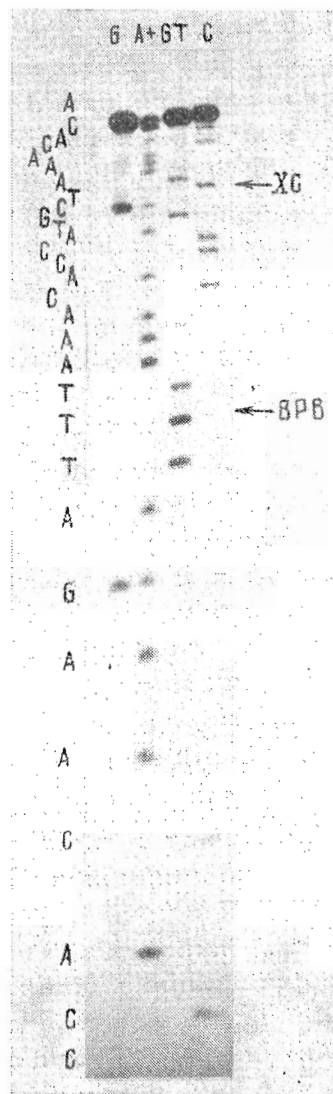


Рис. 5

Рис. 5. Анализ нуклеотидной последовательности триаоктауклеотида (8) по методу Максама — Гилберта. Обозначения — см. рис. 4

нилэтиламина (см. табл. 1). Наличие сильного основания, видимо, вызывает частичное депротонирование 5'-гидроксильной группы и ускоряет процесс ее ацилирования. Проведенные модельные эксперименты показали, что 2-минутное ацилирование в рассматриваемых условиях 5'-гидроксильной группы нуклеозидного компонента, присоединенного к твердофазному носителю, приводит к ее полному блокированию. Обработанный таким образом нуклеозидный компонент не вступает в стандартных условиях в межнуклеотидную конденсацию.

В качестве твердофазных носителей были использованы сорбенты, содержащие аминопропильные функциональные группы: силихром марки С-80 отечественного производства (размер частиц 100–200 мкм, диаметр пор 400–600 Å) и макропористое стекло СРG-500 фирмы Pierece (размер частиц 125–177 мкм).

Присоединение первого нуклеозидного звена к носителям обоих типов осуществляли через сукцинатную якорную группу. Количество присоединенного нуклеозида составляло 25–35 мкмоль/г. Для синтеза олигонуклеотидов использовали 35–40 мг носителя, помещенного в реактор проточного типа объемом 100 мл, что соответствует 0,9–1,2 мкмоль первого нуклеозида.

Проведенные эксперименты показали, что при одинаковой скорости и эффективности промывок обоих типов носителей выходы в расчете на выделенный продукт при синтезе олигонуклеотидов на силохроме С-80 в среднем выше, чем на СРГ-500.

В целом вся химическая схема автоматического синтеза олигонуклеотидов базируется на отечественном нуклеотидном сырье и растворителях.

Анализ и выделение деблокированных олигонуклеотидов, содержащих 5'-О-моно(ди)метокситритильную группу, проводили обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 1, 2). Далее целевой олигонуклеотид детритилировали, анализировали его гомогенность, а при необходимости очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 3) или электрофорезом в полиакриламидном геле. Нуклеотидную последовательность всех олигонуклеотидов подтверждали анализом по методу Максама – Гилберта (см., например, рис. 4, 5).

В результате в соответствии с рассмотренной картой-схемой операций был осуществлен полностью автоматический синтез более 30 10–47-звенных функционально значимых олиго- и полинуклеотидов; первичные структуры некоторых из них представлены в табл. 2. Олигонуклеотиды (7) и (8) предназначены для проведения диагностики некоторых вирусных заболеваний в рамках работ, проводимых в ИВП АМН СССР. Олигонуклеотиды (4)–(6) и (9) использовали как адаптеры для клонирования γ -интерферона в *E. coli*, а олигонуклеотид (10) является частью регуляторной области, предшествующей *gpIL*-гену *E. coli*. Другие синтезированные олигонуклеотиды в настоящее время широко применяются в молекулярно-биологических и биохимических исследованиях, проводимых на кафедре химии природных соединений и в межфакультетской проблемной лаборатории МГУ.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что предложенная карта-схема операций фосфитамидного синтеза олигонуклеотидов на автоматическом синтезаторе «Виктория-4М» позволяет быстро и эффективно получать достаточно протяженные олиго- и полинуклеотидные последовательности.

Экспериментальная часть

Синтез олигонуклеотидов выполняли на автоматическом синтезаторе «Виктория-4М» производства СКТБ специальной электроники и аналитического приборостроения СО АН СССР.

Ацетонитрил марки ч. пропускали через прокаленную окись алюминия и затем последовательно перегоняли над фосфорным ангидридом и гидридом кальция; растворитель хранили над гидридом кальция. Хлористый метилен марки ч. встряхивали с концентрированной серной кислотой, промывали водой, насыщенным водным раствором бикарбоната натрия, вновь водой, перегоняли над фосфорным ангидридом и затем над гидридом кальция; хранили над гидридом кальция.

Растворители и растворы реагентов закачивались в емкости синтезатора под действием избыточного давления (0,3 атм) сухого воздуха.

В работе использовались 2'-дезоксинуклеозиды отечественного производства. 5'-О-Моно(ди)метокситрип-*N*-ацилнуклеозид-3'-(*N,N*-диизопропиламид)метилфосфиты (I) синтезировали согласно методу [11], сушили 24 ч над фосфорным ангидридом в вакууме масляного насоса и хранили в эксикаторе, заполненном сухим аргоном над фосфорным ангидридом. Перед употреблением по 0,5 ммоль нуклеотидных компонентов растворяли в 5 мл абс. ацетонитрила и закачивали в соответствующие емкости синтезатора с помощью шприца. Тетразол перед употреблением сублимировали в вакууме.

Модификация полимерных носителей. Силохром марки С-80 (размер частиц 250–500 мкм) измельчали и отбирали фракцию 100–200 мкм; 10 г отфракционированного силохрома обрабатывали 50 мл 20% раствора γ -аминопропилтриэтоксисилана в абс. толуоле в течение 48 ч, а затем доводили до кипения и выдерживали 2 ч. Силохром отмывали абс. толуолом и абс. пиридином и заливали 30 мл 0,5 М раствора янтарного ангидрида в абс. пиридине, содержащем 2,4 мл *N*-метилпиперазина, выдерживали 5 ч. Полимерный носитель промывали абс. пиридином и обрабатывали 5 ч 30 мл 20% раствора триметилхлорсилана в абс. пиридине.

Силохром отфильтровывали, промывали абс. пиридином, этанолом, диэтиловым эфиром, сушили в вакууме над фосфорным ангидридом.

CPC-500 (диаметр пор 500 Å, размер частиц 125–177 мкм, Pierce, США) модифицировали аналогично силохрому С-80.

Присоединение первого нуклеозидного звена. К 1 г носителя (силохром С-80 или CPC-500) с сукцинатной якорной группой, суспензированного в 2 мл абс. пиридина, добавляли 200 мкмоль 5'-О-монометокситритил-N-ацилнуклеозида, 120 мг TPS и 80 мкл MeIm, встряхивали 1 ч, затем в смесь вводили 150 мкл абс. метанола и вновь встряхивали 30 мин. Полимерный носитель отфильтровывали, промывали абс. пиридином, этанолом, диэтиловым эфиром, сушили в вакууме. Количество присоединенного нуклеозида определяли спектрофотометрически по монометокситригидной группе ($\epsilon_{278}=55\,000$) в 0,1 М растворе трифторуксусной кислоты в хлористом метилеце.

Деблокирование, анализ и выделение олигонуклеотидов. По окончании олигонуклеотидного синтеза полимерный носитель помещали в пробирку (Eppendorf, объем 1 мл) и обрабатывали 200 мкл смеси тиофенола – абс. триэтиламина – абс. диоксана, 1 : 1 : 2, и встряхивали 40 мин. Затем полимерный носитель в той же пробирке промывали абс. диоксаном (4×1 мл), заливали 1 мл 28% аммиака и выдерживали 30 мин при 50°С. Аммиачный раствор олигонуклеотида отделяли от полимерного носителя и инкубировали 5 ч при 55°С в запаянной ампуле. Полученную после аммонолиза реакционную смесь концентрировали в вакууме, анализировали и выделяли целевой олигонуклеотид, содержащий 5'-О-моно(ди)метокситригидную группу, обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила от 0 до 40% за 60 мин в 0,1 М ацетате аммония при 50°С (рН 6,5, колонка 4,6×250 мм, носитель Zorbax C-8 (Du Pont, США), скорость элюции 1 мл/мин, хроматограф Altex (США)). Фракции, содержащие целевой олигонуклеотид, концентрировали в вакууме, упаривали с 50% водным спиртом и детритировали 80% уксусной кислотой в течение 30 мин. Полностью деблокированный олигонуклеотид анализировали на гомогенность обращенно-фазовой ВЭЖХ в указанных выше условиях, а также электрофорезом в 20% полиакриламидном геле после введения 5'-³²P-метки. Первичную структуру олигонуклеотидов подтверждали анализом по методу Максама – Гилберта [12]. Высокоспецифичное расщепление цепи по звеньям цитидина гидроксилацином при рН 6 и тимидина перманганатом калия осуществляли согласно работе [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ломакин А. Н., Ястребов С. Н., Попов С. Г. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 7, с. 920–926.
2. Sproat B. S., Gait M. I. Nucl. Acids Res., 1985, v. 13, № 8, p. 2959–2977.
3. Worner B. D., Warner M. E., Karus G. A., Ku L., Brawn-Shimer S., Urdea M. S. DNA, 1984, v. 3, № 5, p. 401–411.
4. Chow F., Kempe T., Palm G. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 12, p. 2807–2817.
5. Грязнов С. М., Потапов В. К., Гори В. В., Зарытова В. Ф., Средин Ю. Г., Погемкин Г. А., Шабарова З. А. Биополимеры и клетка, 1986, т. 2, № 6, с. 311–316.
6. Adams S. P., Kavka K. S., Wykes E. I., Holder S. B., Galluppi C. R. J. Amer. Chem. Soc., 1983, v. 105, № 3, p. 661–663.
7. Буткус В. В., Каюшин А. Л., Берлин Ю. А., Колосов М. Н., Смирнов И. В. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 11, с. 1518–1530.
8. Fourrey I. L., Varenne J. Tetrahedron Lett., 1985, v. 26, № 9, p. 1217–1220.
9. Pon R. T., Damha M. I., Ogilvie K. K. Tetrahedron Lett., 1985, v. 26, № 31, p. 2525–2528.
10. Pon R. T., Damha M. I., Ogilvie K. K. Nucl. Acids Res., 1985, v. 13, № 18, p. 6447–6465.
11. Barone A. D., Tang I. Y., Caruthers M. H. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 10, p. 4051–4061.
12. Maxam A. M., Gilbert W. Meth. Enzymol., 1980, v. 65, p. 499–560.
13. Rubin C. M., Schimid C. W. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 20, p. 4613–4619.

Поступила в редакцию
28.III.1986

AUTOMATIC SYNTHESIS OF 20–47-MEMBERED POLYDEOXYRIBONUCLEOTIDES BY THE PHOSPHOAMIDITE METHOD ON «VICTORIA-4M» SYNTHESIZER

GRYAZNOV S. M., CHERNOV I. P., POTAPOV V. K., PURMAL A. A.,
METELEV V. G., YOLOV A. A., SHABAROVA Z. A.

M. V. Lomonosov Moscow State University, Chemical Department and
A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic
Chemistry; *M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Oligo- and polydeoxyribonucleotides up to 47 nucleotides long have been prepared by the phosphoramidite method using «Victoria-4M» synthesizer. With 12 min for one cycle of synthesis, average yields according to released mono- or dimethoxytrityl group were 94–98%. Primary structure of the oligonucleotide synthesised does not affect the efficiency of the nucleotide chain elongation. All the oligonucleotides were sequenced by the Maxam – Gilbert method. Commercially available aminopropylated silica gel «Silochrom C-80» (USSR) was used as the polymer support, not yielding in working characteristics to modified CPC-500 supports.