



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32.057

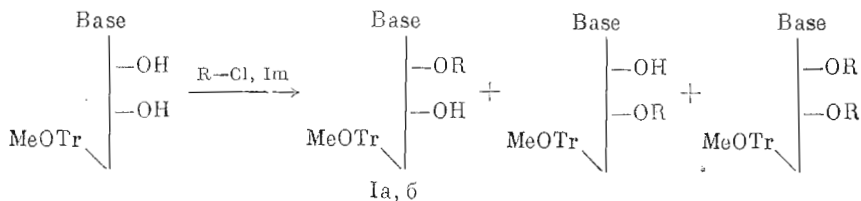
ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ РИБООЛИГОНУКЛЕОТИДОВ. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СБОРКИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОЙ ЦЕПИ ФОСФОТРИЭФИРНЫМ И ФОСФИТАМИДНЫМ МЕТОДАМИ

Потапов В. К., Доре И., Суханова Л. Л.,
Карасева Е. В., Линардонулос С.

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

Значительный прогресс, достигнутый за последние пять лет в области олигонуклеотидного синтеза, и создание автоматических синтезаторов за рубежом [1] и в нашей стране [2] относятся к области синтеза фрагментов ДНК. В то же время решение таких проблем, как механизм кодон-антикодонных взаимодействий [3], репликация вирусных РНК [4] или расшифровка химических основ сплайсинга [5], требует наличия рибоолигонуклеотидов заданной структуры. И хотя за последние два года в этой области есть определенные успехи, позволившие автоматическим способом синтезировать ряд гомоолигорибонуклеотидов [6], единой стратегии синтеза биополимеров этого класса до сих пор нет, и поиски оптимального подхода продолжаются. Целью настоящей работы было сопоставление эффективности двух наиболее распространенных схем твердофазной сборки олигорибонуклеотидной цепи и получение исходных данных для составления карты операций для автоматического синтезатора «Виктория-4М».

Синтез исходных N, 5', 2'-O-защищенных рибонуклеозидов был осуществлен по модифицированной схеме Наранга [7] с использованием для блокирования 2'-гидроксильной группы рибозы *tert*-бутилдиметилсилильной (Ia) или триизопропилсилильной (Iб) защитной группы.



Base=Ura, bz⁴Cyt, bz⁶Ade, ib²Gua

R=-SiMe₂Bu^t (а) или -SiPr₃ⁱ (б); Im — имидазол

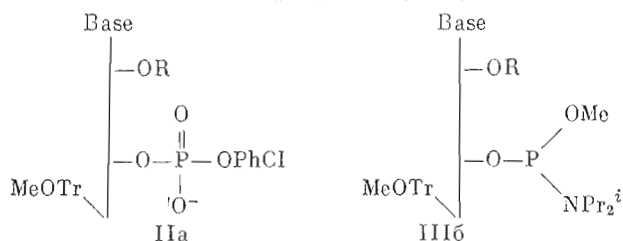
Структура 2'-O- и 3'-O-защищенных нуклеозидов после их разделения хроматографией на коротких колонках с силикагелем подтверждена методом ПМР-спектроскопии.

Базовые 3'-нуклеотидные компоненты (IIa) и (IIIб), использованные в дальнейшем для наращивания рибоолигонуклеотидной цепи, получены фосфорилированием производного (Ia) бистриазолидом *n*-хлорфенилфосфата в присутствии N-метилимидазола (Melm) в пиридине, а (Iб) — метил-бис(диизопропиламино)фосфитом в присутствии тетразола (Tetr) (соль с диизопропиламином) в хлористом метиле. Выходы *n*-хлорфенилфосфа-

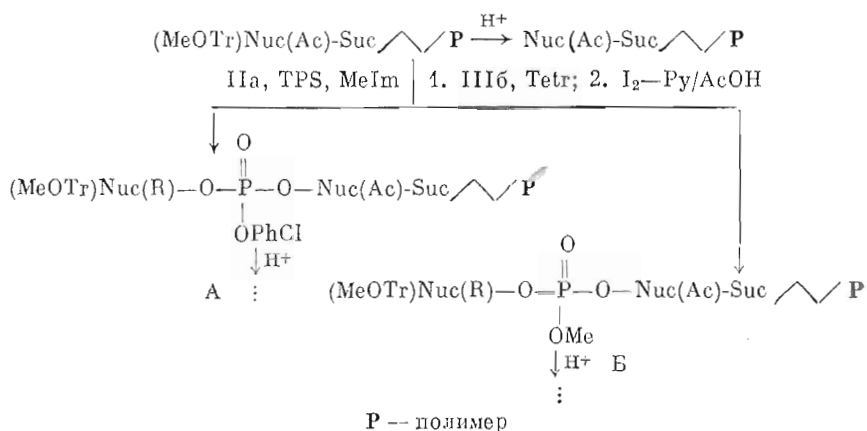
Выходы синтезированных олигонуклеотидов по фосфотриэфирной и фосфитамидной схеме

Носитель	Олигорибонуклеотид	Средняя степень превращения на цикл, %	
		схема А	схема Б
С-80	UGU	—	97
	CCU	62	87
	AAU	67	90
	A ₅	67	—
	GCCCU	—	96
CPG-500	AAGA	—	95
	AAU	65	92
	A ₅	65	—

тов (IIa) составляли 65—80%, а фосфитов (IIIб) — 90—95%.



Для оценки сравнительной эффективности твердофазного синтеза рибоолигонуклеотидов по фосфотриэфирному А и фосфитамидному Б методам была использована стандартная схема наращивания в направлении от 3'- к 5'-концу полинуклеотидной цепи.



В качестве полимерных носителей были изучены аминпропилированные образцы отечественного силохрома С-80 и пористого стекла СРG-500 фирмы Piets, модифицированные янтарным ангидридом. Первый N,5'-О-защищенный нуклеозид присоединяли к якорной карбоксильной группе носителя через гидроксил *cis*-гликольного центра рибозы, а остающуюся свободной 2' (3')-гидроксильную группу блокировали уксусным ангидридом. Загрузка носителя первым нуклеозидом составляла 30—40 мкмоль/г полимера. Синтез проводился в колоночном реакторе объемом 100 мкл (30—40 мг носителя). Объем вводимой в контур реакционной смеси составлял 200 мкл при концентрации Р-компонента 0,1 ммоль/мл и 2-кратном избытке конденсирующего агента (схема А) или 2,5-кратном избытке тетразола (схема Б). В качестве растворителя был использован ацетонитрил, выдержанный над гидридом кальция.

Время полного цикла наращивания одного нуклеотидного звена составило 60 мин (стадия конденсации 40 мин) и 30 мин (стадия конденсации 20 мин) для фосфотриэфирной и фосфитамидной схем соответственно.

Результаты, полученные при синтезе ряда праймеров для считывания дезоксиолигонуклеотидных матриц РНК-полимеразой, а также пентарибонуклеотида, являющегося рибофрагментом смешанного рибодезоксирибоолигонуклеотида, предназначенного для изучения действия РНКазы Н, представлены в таблице.

Приведенные в таблице величины определены в результате измерения количества отщепляемой метокситритильной группы на каждой стадии синтеза.

Олигонуклеотиды, полученные фосфитамидным методом, непосредственно на полимере обрабатывали Bu^tNH_2 (50° , 12 ч) для удаления метильной группы [5]. В дальнейшем отщепление нуклеотидного материала от носителя и полное деблокирование проводили по стандартной схеме: обработкой полимер-олигонуклеотида смесью конц. аммиак — спирт, 4 : 1 (10° C) в запаянной ампуле с последующим упариванием фильтрата и выдерживанием сухой реакционной смеси с 0,2 М раствором $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$ в абс. ацетонитриле (2 ч, 20° C). После упаривания ацетонитрила остаток растворяли в воде, пропускали через колонку с дауэксом 50W \times 2 (Ру-форма) и обессоливали на колонке с обращенной фазой (Zorbax C-18). Целевые олигонуклеотиды выделяли микроколоночной ионообменной хроматографией в градиенте фосфата натрия в 30% водном ацетонитриле.

Следует отметить, что носитель на базе силохрома С-80 по своим рабочим характеристикам (выходы, скорость отмывки) не уступает одному из лучших зарубежных полимерных носителей на основе СРС-500.

Таким образом, фосфитамидная схема твердофазного синтеза с использованием в качестве носителя модифицированного силохрома С-80 отечественного производства является хорошей базой для эффективной работы автоматического синтезатора «Виктория-4М». Как показали предварительные эксперименты, степени превращения на каждой стадии наращивания рибоолигонуклеотидной цепи в автоматическом режиме составляли 92—96% и практически не отличались от соответствующих величин для олигонуклеотидов дезоксирида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Caruthers M. H. // Science. 1985. V. 230. P. 281—285.
2. Грязнов С. М., Помапов В. Р., Метелев В. Г., Елов А. А., Пурмаль А. А., Шабарова Э. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 989—991.
3. Hartog J. A. J., Wille G., Schenblin R. A., van Boom J. H. // Biochemistry. 1982. V. 21. P. 1009—1018.
4. Nomoto T., Takaku H., Yoshida M. // J. Org. Chem. 1983. V. 48. № 9. P. 1399—1403.
5. Damha M. J., Pon R. T., Ogilvie K. K. // Tetrahedron Lett. 1985. V. 26. № 40. P. 4839—4842.
6. Pon R. T., Damha M. J., Ogilvie K. K. // Tetrahedron Lett. 1984. V. 25. № 7. P. 713—716.
7. Sung W. L., Narang S. A. // Can. J. Chem. 1981. V. 60. № 2. P. 111—119.

Поступило в редакцию
3.IX.1986
После доработки
17.XII.1986

SOLID-PHASE SYNTHESIS OF RIBOOLIGONUCLEOTIDES. COMPARISON OF EFFICIENCY OF PHOSPHO TRIESTER AND PHOSPHOAMIDITE METHODS

POTAPOV V. K., DORE I., SUKHANOVA L. L., KARASEVA E. V.,
LINARDOPULOS S.

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

Series of 3–5-mer ribooligonucleotides have been prepared by phosphotriester and phosphoamidite methods, using commercially available aminopropylated «Silochrom C-80» (USSR) as the polymer support. With 60 and 30 min for one cycle of the synthesis, average yields according to quantity of the released monomethoxytrityl group were 65—70 and 92—96%, respectively.