



УДК 547.963.32.057

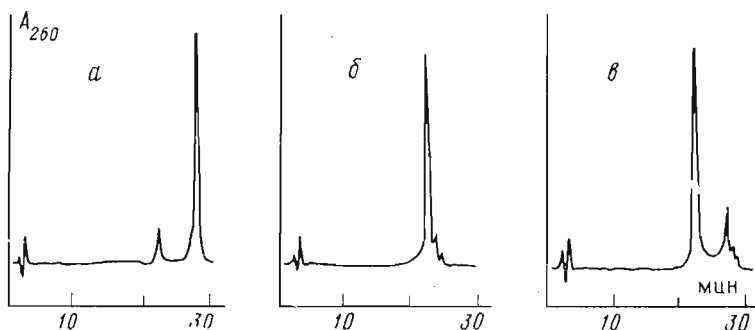
**СИНТЕЗ 5'-ФОСФОРИЛИРОВАННЫХ
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ
Н-ФОСФОНАТНЫМ МЕТОДОМ****Филиппов С. А., Есинов Д. С., Калинин С. В.,
Добрынин В. Н.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва*

Получены N,O-защищенные дезоксирибонуклеозид-3'-Н-фосфонаты и 2-(*n*-нитрофенил)этил-Н-фосфонат и использованы для твердофазного синтеза 5'-фосфорилированных ДНК. Н-Фосфонатные конденсации проводили при соотношении Р-компонента и пивалоилхлорида 1 : 2. Защитные группы удаляли ступенчатой обработкой NH₃ и 1,5-диазабидикло[5.4.0]ундец-5-еном или совместным действием этих реагентов. Олигонуклеотид-5'-фосфаты выделяли с помощью гель-электрофореза и обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Для ряда практических целей, таких, как полный синтез генов, введение нерадиоактивных меток и т. д., полезно располагать 5'-фосфорилированными олигодезоксирибонуклеотидами. Стандартные варианты олигонуклеотидного синтеза приводят, как правило, к соединениям со свободным 5'-гидроксильной группой. Такие синтетические ДНК чаще всего фосфорилируют, используя ферментативный метод введения 5'-концевой фосфатной группы. Известны также полностью химические способы получения олигонуклеотид-5'-фосфатов, базирующиеся на фосфотриэфирном [1, 2] и амидофосфитном [3, 4] подходах; при этом в заключительном цикле синтеза используются специализированные синтоны, с помощью которых осуществляется 5'-фосфорилирование.

Мы описываем в настоящем сообщении способ получения 5'-фосфорилированных олигодезоксирибонуклеотидов в условиях Н-фосфонатной (гидрофосфорильной) конденсации — способа, на наш взгляд, удобного и легко реализуемого. В качестве специализированного синтона для получения 5'-фосфорилированных синтетических ДНК предлагается 2-(*n*-нитрофенил)этил-Н-фосфонат. Это соединение было получено так же, как и N,O-защищенные дезоксирибонуклеозид-3'-Н-фосфонаты (фосфонатные синтоны), по методу [5]. Синтез фрагментов ДНК проводили твердофазным методом, используя для наращивания олигонуклеотидной цепи в качестве Р-компонентов фосфонатные синтоны, активированные пивалоилхлоридом. Синтез выполнялся на автоматическом синтезаторе System 1 (Beckman, США) по программе, приведенной в таблице. Соотношение Р-компонента и активатора, использованное нами, заметно отличается от рекомендованного (1 : 5) в работе [5]. В принципе достаточно эквимолярного соотношения Н-фосфоната и пивалоилхлорида, однако в нашей практике приближение к эквимолярному соотношению ухудшало результат конденсации.

По завершении наращивания нуклеотидной цепи твердофазный носитель делят на две порции, одну из них используют для получения 5'-фосфорилированного олигонуклеотида, а другую — для 5'-гидроксильного соединения. При получении 5'-фосфатов проводят еще один цикл синтеза с использованием нитрофенилэтил-Н-фосфоната. Далее каждую порцию обрабатывают раствором иода, а затем водным аммиаком. Олигодезоксинуклеотиды, несущие на 5'-конце нитрофенилэтилфосфатную группу



Обращенно-фазовая ВЭЖХ соединения (I), предварительно выделенного с помощью электрофореза в 20% ПААГ (а), соединения (II), полученного обработкой соединения (I) 20% DBU в ацетонитриле в течение 16 ч (б), соединения (II), выделенного с помощью электрофореза в 20% ПААГ из смеси синтетических продуктов, деблокированных при совместном действии аммиака и DBU (10%), 16 ч, 50°С (в). Колонка 4,6×250 см, Ultrasphere ODS (Altex), градиент концентрации ацетонитрила 5–15% в 0,1 М триэтиламмонийацетате (рН 7,0) за 30 мин, скорость элюции 1 мл/мин.

((Nре)р), например 5'-(Nре)рGCTTTGGCTTGGGTCATCTTTTAGGCT (I), выделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и ВЭЖХ (рисунок, а). Известно, что (Nре)р-группировка расщепляется под действием сильного основания [2]. Мы использовали 1,5-дизабицикло [5.4.0]ундец-5-ен (DBU) и в результате полного деблокирования соединения (I) получили рGCTTTGGCTTGGGTCATCTTTTAGGCT (II) (рисунок, б). Если не использовать гидрофобные свойства Nре-группы для удобства выделения синтезированного олигонуклеотида, то эту группу можно удалить одновременно с другими защитами, создав в водном аммиаке концентрацию DBU 10%. В этом случае для выделения деблокированного олигонуклеотид-5'-фосфата (II) удобно использовать электрофорез в 20% ПААГ с последующей ВЭЖХ (рисунок, в). Сопоставление нуклеотидного состава и последовательности образцов 28-мера (II), выделенных после ступенчатого и одновременного деблокирования, показало их идентичность.

Из второй, нефосфорилированной порции (см. выше) с помощью электрофореза и ВЭЖХ выделяют 5'-ОН-аналог соединения (II).

Таким образом, в одном синтезе получают 5'-фосфорилированный олигодезоксирибонуклеотид и его 5'-гидроксильный аналог; оба соединения использованы нами при получении протяженных ДНК методом ферментативного лигирования каждой цепи по отдельности, как это описано в работе [6].

Авторы благодарят Я. Ставинского и В. П. Кумарева за полезное обсуждение условий Н-фосфонатной конденсации и А. И. Чернышева за снятие ЯМР-спектра.

Последовательность операций синтетического цикла

Операция	Растворители и реагенты	Объем, мл	Время, с
Промывка	Ацетонитрил	1,5	15
Детритилирование	0,5 М дихлоруксусная кислота в дихлорэтаноле	1–1,5	40–60
Промывка	Ацетонитрил	1	10
»	Абс. ацетонитрил	2	20
Конденсация	0,01 М Р-компонент + 0,02 М пивалоилхлорид в смеси пиридин – ацетонитрил (1 : 1)	0,13	60
Промывка	Ацетонитрил	1	10

1. 2-(*p*-Нитрофенилэтил)-*H*-фосфонат триэтиламмония. К охлажденному до 0° С раствору 1,2,4-триазола (8,3 г, 120 ммоль) в абс. ацетонитриле (240 мл) добавляли PCl_3 (3,5 мл, 40 ммоль). К перемешиваемой смеси в течение 35 мин добавляли по каплям раствор *p*-нитрофенилэтанола (3,34 г, 20 ммоль) в абс. ацетонитриле (35 мл). По окончании реакции (контроль ТСХ на пластинках Silufol UV 254 в системе А — хлороформ — метанол — триэтиламин, 90 : 8 : 2, показывает отсутствие нитрофенилэтанола) добавляли 5 мл воды, выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха, остаток растворяли в хлороформе и хроматографировали на колонке с силикагелем в изократическом режиме в системе А. Фракции, содержащие соединение с R_f 0,4 (ТСХ, система А), объединяли, концентрировали, трижды упаривали с ацетонитрилом и высушивали в вакууме. Получали 4 г (56%) триэтиламмониевой соли 2-(*p*-нитрофенил)этил-*H*-фосфоната (масло); УФ (CH_3CN): λ_{max} 274 нм, ϵ 8000; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , δ , м. д.): CH_3C 1,31 (9H, т, J 7,2 Гц); CH_2N 3,04 (6H, кв, J 7,2 Гц); CH_2C 3,08 (2H, т, J 6,6 Гц); CH_2OP 4,16 (2H, тд, J 6,6 и 8,1 Гц); H-P 6,81 (1H, д, J 622,8 Гц); ароматические протоны 7,42 (2H, J 8,8 Гц), 8,13 (2H, J 8,8 Гц).

2. Выделение синтетических 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов. По завершении синтетических циклов (см. таблицу) полимерный носитель обрабатывали 0,1 М раствором иода в смеси пиридин — вода (15 : 1) в течение 15 мин при 20° С, носитель отмывали от иода 4—5 мл ацетонитрила и выдерживали с конц. NH_3 16 ч при 50° С. Аммиачный раствор упаривали, остаток растворяли в 0,1 мл 0,05 М водно-спиртового раствора триэтиламмонийбикарбоната, центрифугировали для отделения нерастворившегося материала, из надосадочной жидкости олигонуклеотид осаждали 1 мл ацетона и выделяли с помощью гель-электрофореза в 20% ПААГ и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Выделенный 5'-*N*-ре-олигонуклеотид деблокировали 20% DBU в ацетонитриле в течение 16 ч и далее очищали с помощью ВЭЖХ (см., например, рисунок).

3. Определение нуклеотидного состава 5'-фосфорилированных олигодезоксирибонуклеотидов. 0,1—0,2 OE_{260} полностью деблокированного олигодезоксирибонуклеотид-5'-фосфата инкубировали с 30 ед. акт. S1-нуклеазы (Sigma, США) в буфере, содержащем 0,28 М NaCl, 0,05 М AcONa (рН 4,6), 4,5 мМ ZnSO_4 , в течение 30 мин при 37° С. Образовавшиеся дезоксинуклеозид-5'-фосфаты разделяли с помощью ВЭЖХ. Колонка Ultrasphere ODS (Altex), градиент ацетонитрила (0—12%) в 0,1 М триэтиламмонийацетате, рН 7,0, за 30 мин, скорость элюции 1 мл/мин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marugg J. E., Piel N., McLaughlin L. W., Tromp M., Veeneman G. H., van der Marrel G. A., van Boom J. H. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 22. P. 8639—8651.
2. Himmelsbach F., Pfeleiderer W. // Tetrahedron Lett. 1982. V. 23. № 46. P. 4793—4796.
3. Connolly A. B. // Tetrahedron Lett. 1987. V. 18. № 4. P. 463—466.
4. Uhlmann E., Engels J. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 9. P. 1023—1026.
5. Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5389—5407.
6. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Шингарова Л. Н., Чувило С. А., Звонок Н. М., Филиппова Л. Ю., Васильева Т. Е., Колосов М. Н. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 69—82.

Поступила в редакцию
4.VII.1988

THE SYNTHESIS OF 5'-PHOSPHORYLATED OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES BY H-PHOSPHONATE METHOD

FILIPPOV S. A., ESIPOV D. S., KALINICHENKO S. V., DOBRYNIN V. N.

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

N,O-protected 2'-deoxyribonucleotide-3'-*H*-phosphonates and 2-(*p*-nitrophenylethyl)-*H*-phosphonate were prepared and used in solid-phase synthesis of 5'-phosphorylated DNA. *H*-Phosphonate condensation is performed with 1 : 2 ratio of P-component to activator (pivaloyl chloride). Protection groups were removed either by sequential treatment with conc. NH_3 and DBU or by combination of these reagents.