



УДК 577.113.6

© 1991 г.

*Н. Н. Полушин, И. Н. Пашкова, В. А. Ефимов***БЫСТРЫЙ МЕТОД ПОЛНОГО ДЕБЛОКИРОВАНИЯ
СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва*

В последнее время с появлением высокоэффективных синтезаторов химический синтез олигодезоксирибонуклеотидов перестал быть трудоемким и утомительным процессом. Однако узким местом в олигонуклеотидном синтезе по-прежнему остаются постсинтетические процедуры, включающие в себя удаление защитных групп с синтетических олигонуклеотидов и выделение целевого олигонуклеотида из «сырого» олигонуклеотидного материала.

Для деблокирования олигонуклеотидов, получаемых наиболее распространенными в настоящее время фосфотриэфирным, фосфитамидным и Н-фосфонатным методами, как правило, используется концентрированный водный раствор аммиака. Водный аммиак эффективно разрушает сложноэфирную связь между 3'-концевым нуклеозидом и полимерным носителем, а также почти мгновенно удаляет щелочлабильную β -цианэтильную фосфатазащитную группу. Однако он достаточно медленно, в течение 5—12 ч при 55° С или 2—3 сут при 20° С, удаляет ацильные защитные группы, обычно используемые для блокирования аминофункций гетероциклических оснований. Ранее было показано, что значительно быстрее, чем водным аммиаком, ацильные группы удаляются этилендиамином, который также способен эффективно разрушать сложноэфирную связь олигонуклеотида с полимерным носителем [1]. Но применение этилендиамина для деблокирования синтетических олигонуклеотидов нежелательно из-за побочной реакции образования 4-аминоэтилцитозинового производного при дебензоилировании N⁴-бензоилцитозина (атака по атому С4 цитозинового кольца) [2].

Вместе с тем мы обнаружили, что моноэтаноламин, являясь почти таким же сильным, как этилендиамин, дезацилирующим реагентом, не дает вышеупомянутой побочной реакции. Эти данные побудили нас исследовать возможность применения моноэтаноламина для деблокирования синтетических олигонуклеотидов. По аналогии с этилендиамином [1] была использована смесь МЕА — EtOH, 1 : 1, а для интенсификации процесса деблокирование проводили при 70° С. Поскольку моноэтаноламин является высококипящей жидкостью (т. кип. 171° С), повышение температуры до 70° С не приводит к неудобствам, связанным с необходимостью строгого соблюдения требований по герметизации рабочего сосуда, как в случае аммиака.

Кинетика удаления ацильных защитных групп с гетероциклических оснований исследовалась на примере 5'-диметокситрилит-N-ацил-2'-дезоксинуклеозидов (рис. 1а). Было установлено, что при 70° С смесь МЕА — EtOH (1 : 1) полностью удаляет изобутирильную защитную группу с [(MeO)₂Tr]ibG за 15 мин ($\tau_{1/2}$ = 3 мин), а бензоильную группу с [(MeO)₂·Tr]bzA и [(MeO)₂Tr]bzC за 10 мин. Во всех трех случаях с помощью ТСХ не удалось обнаружить никаких побочных продуктов. В то же вре-

Сокращения: МЕА — моноэтаноламин, Omp — 1-оксидо-4-метокси-6-метил-2-пиколил-, н. з. — нуклеотидное звено.

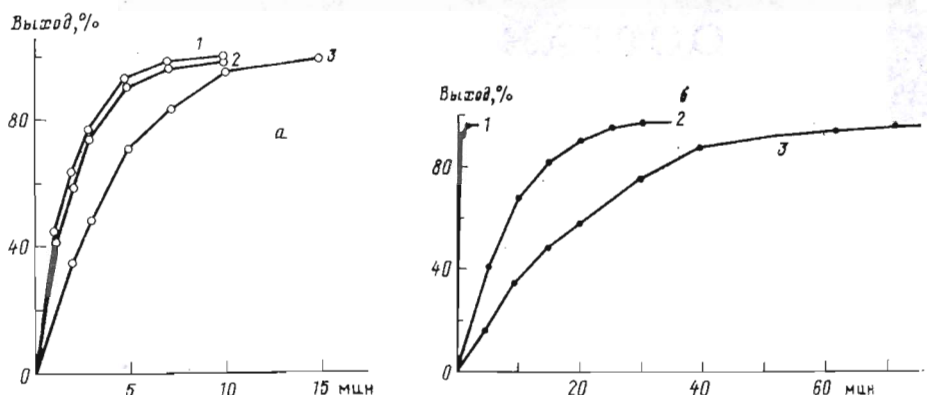


Рис. 1. Кинетические кривые дезацилирования $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]bzA$ (1), $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]bzC$ (2) и $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]ibG$ (3) (a) и удаления фосфатзащитных групп с триэфира $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]Tp(R)T$ (6), где $R = \text{CNEt}$ (1), Me (2) и Ommp (3), смесью $\text{MEA} - \text{EtOH}$, 1 : 1, при 70°C

мя спиртовой раствор моноэтаноламина полностью разрушает сложноэфирную связь между 3'-концевым нуклеозидом и полимерным носителем (макропористое стекло, модифицированное аминоалкильными группами) за 15–20 мин.

Мы обнаружили также, что в смеси моноэтаноламина со спиртом селективно удаляется β -цианэтильная, метильная, а также 1-оксидо-4-метокси-6-метил-2-пиколильная (Ommp -) фосфатзащитные группы [3, 4]. Кинетика удаления фосфатзащитных групп изучалась на примере соответствующего триэфира динуклеозидмонофосфата (рис. 1б). При обработке спиртовым раствором моноэтаноламина при 70°C β -цианэтильная группа удалялась в течение 2 мин, а для удаления метильной группы требовалось 30 мин ($\tau_{1/2} = 6,5$ мин). Наконец, снятие Ommp -защитной группы с межнуклеотидного фосфата завершалось за 70 мин ($\tau_{1/2} = 16$ мин). Во всех случаях единственным продуктом реакции нуклеотидной природы был диэфир $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]T-T$, который идентифицировался методом ТСХ со свидетелем.

Основываясь на полученных нами результатах, мы предложили следующий вариант полного деблокирования синтетических олигонуклеотидов, полученных фосфотриэфирным методом с применением Ommp -фосфатзащитной группы: обработка полимерного носителя с прикрепленным к нему олигонуклеотидным материалом смесью $\text{MEA} - \text{EtOH}$ (1 : 1) при 70°C в течение 80–100 мин (80 мин при длине олигонуклеотидной последовательности до 30 н. з., 100 мин — при длине от 30 до 50 н. з.). Удаление концевой 5'-диметокситритильной группы осуществлялось непосредственно после окончания наращивания цепи на синтезаторе. Скорость деблокирования можно несколько повысить, если использовать не смесь $\text{MEA} - \text{EtOH}$ (1 : 1), а чистый моноэтаноламин. В этом случае время обработки составляет 60 мин при длине олигонуклеотидов до 30 н. з. и 80 мин при длине от 30 до 50 н. з. Этот метод был применен для деблокирования ряда олигодезоксирибонуклеотидов, синтезированных на синтезаторе фирмы Applied Biosystems (модель 381A) по триэфирной схеме с внутримолекулярным О-нуклеофильным катализом (см. рис. 2).

При полном деблокировании предлагаемым реагентом синтетических олигонуклеотидов с β -цианэтильной фосфатзащитной группой ($\tau_{1/2} < 1$ мин) определяющей является скорость удаления защитных групп с гетероциклических оснований, а также скорость удаления олигонуклеотида с полимерного носителя. Поэтому в данном случае необходима обработка полимерного носителя с иммобилизованным олигонуклеотидным материалом в течение 30–40 мин при 70°C в зависимости от длины цепи.

При деблокировании спиртовым раствором моноэтаноламина олигонуклеотидов, полученных метильным фосфитамидным методом, процессом, определяющим время обработки, является удаление защитных групп с межнуклеотидных фосфатов. Принимая во внимание, что для полного

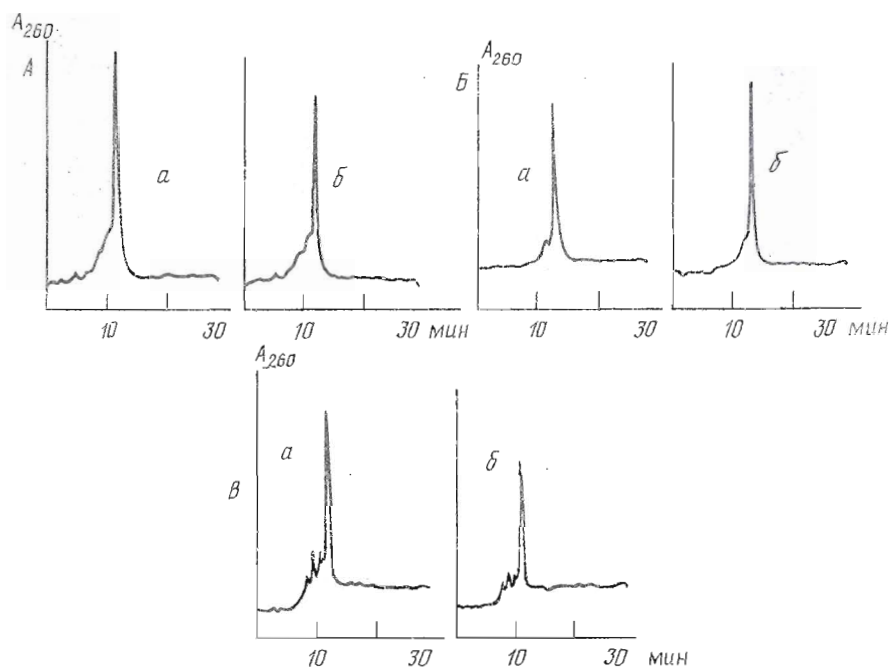


Рис. 2. Обращенно-фазовая ВЭЖХ в градиенте концентраций ацетонитрила 5—40% в 0,1 М ацетате триэтиламмония реакционных смесей, полученных при синтезе 30-мера d(TACACATACGATTTAGGTGACASTATAGAA) фосфотриэфирным методом с использованием Omp-фосфатзащитной группы (А), 40-мера d(AATTCCAGATCTTGATGTGTAGCGATTTCACCGCGTGTGTGT) цианэтильным фосфитамидным методом (Б) и 29-мера d(GGCGGGGATCCACCTTCAGCCCATGCAGG) Н-фосфонатным методом (В) на колонке ProRPC HR 5/10 (Pharmacia) после удаления всех защитных групп смесью MEA — EtOH (1 : 1) при 70° С (а) и концентрированным водным раствором аммиака (б)

удаления защитных групп с димера при 70° С требуется 30 мин (рис. 1б), а при деблокировании более длинных олигомеров время обработки следует увеличивать на 10—20 мин, можно рекомендовать обработку полимерного носителя с иммобилизованным олигонуклеотидным материалом смесью MEA — EtOH (1 : 1) при 70° С в течение 40—60 мин.

При синтезе олигонуклеотидов Н-фосфонатным методом после заключительной стадии окисления мы уже имеем природные диэфирные межнуклеотидные связи. Следовательно, процедура удаления защитных групп в данном случае сводится к удалению защитных групп с остатков гетероциклических оснований и разрыву сложноэфирной связи с полимерным носителем. Поэтому удаление защитных групп с олигонуклеотидов, полученных Н-фосфонатным способом, осуществлялось в тех же условиях, что и для олигонуклеотидов с β-цианэтильными фосфатзащитными группами.

Описанным в данной работе методом был деблокирован ряд олигонуклеотидов, синтезированных различными методами. Сравнение кривых обращенно-фазовой ВЭЖХ олигонуклеотидов, полученных после обработки конц. водным раствором аммиака и спиртовым раствором моноэтанолamina (рис. 2), свидетельствует о полной их идентичности. Структура олигонуклеотидов подтверждалась как после клонирования синтетических фрагментов ДНК, в состав которых они входили [5, 6] *, так и прямым их сиквенсом методом химических модификаций [7].

Авторы благодарят О. Г. Чахмахчеву за участие в обсуждении результатов и полезные советы.

* См. также статью Ефимова В. А., Андреевой А. В., Ревердатто С. В., Чахмахчевой О. Г. «Фотосистема II ячменя. Нуклеотидная последовательность генов psbB, psbC, psbE, psbF, psbH ячменя и примыкающих к ним областей хлоропластной ДНК» (будет опубликована в одном из ближайших номеров журнала «Биоорганическая химия»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller P. S., Agris C. H., Murakami A., Reddy P. M., Spitz S. A., Ts'O P. O. P. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 18. P. 6225—6242.
2. Miller P. S., Parameswara M. R., Murakami A., Blake K. R., Lin-Shwu-Bin, Agris C. H. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 18. P. 5092—5097.
3. Efimov V. A., Buryakova A. A., Dubey I. Ya., Polushin N. N., Chakhmakheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 16. P. 6525—6540.
4. Efimov V. A., Chakhmakheva O. G., Polushin N. N., Dubey I. Ya. // Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1987. V. 15. № 18. P. 213—216.
5. Ефимов В. А., Бурякова А. А., Пашкова И. Н., Полушин Н. Н., Чахмахчева О. Г. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 8. С. 1070—1077.
6. Ефимов В. А., Бурякова А. А., Полушин Н. Н., Пашкова И. Н., Дмитрикова Е. В., Чахмахчева О. Г. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 499—507.
7. Mazam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 6525—6540.

Поступило в редакцию
18.III.1991

N. N. POLUSHIN, I. N. PASHKOVA, V. A. EFIMOV

A RAPID DEPROTECTION PROCEDURE FOR SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES

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

A new rapid procedure for the full deprotection of synthetic oligonucleotides has been developed. At 70° C, mixture of ethanolamine and ethanol (1 : 1) removes blocking groups from heterocyclic bases and cleaves the ester linkage between oligonucleotide and solid support within 20 min. Under the same conditions the β -cyanoethyl phosphate protecting group is removed in 2 min methyl phosphate protecting group in 30 min and 1-oxido-4-methoxy-6-methyl-2-picoly group in one hour.