



УДК 577.113.4

© 1994 В. А. Власов, С. М. Калачиков, Г. М. Дымшиц

**СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
УРИДИН-5'-ТРИФОСФАТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
НЕРАДИОАКТИВНО МЕЧЕННЫХ РНК-ЗОНДОВ***Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

Осуществлен синтез аналогов уридин-5'-трифосфата, несущих на конце спейсера, введенного в положение С5 пиримидинового кольца, остатки флуоресцентных красителей — флуоресцеина и родамина. Исследовано влияние реакционных условий на выход целевых продуктов, изучены оптические и люминесцентные свойства полученных соединений.

Ряд векторов, используемых для клонирования фрагментов генома (плазмиды pGEM) и получения геномных библиотек (космиды Lorist), позволяет осуществлять клонирование ДНК непосредственно под промоторы РНК-полимераз фагов Т7 и SP6. Это дает возможность получать транскрипты с минимальным размером участка, комплементарного векторной ДНК. Такой подход значительно снижает трудоемкость получения гибридационных РНК-зондов к концам клонированных фрагментов, так как не требует освобождения вставки от векторной ДНК.

Фаговые РНК-полимеразы очень специфичны к своим, весьма консервативным промоторным последовательностям [1—3] и предъявляют более жесткие требования к сигналам терминации, чем РНК-полимераза *E. coli*, что позволяет получать полноразмерные транскрипты с большинства матриц [4] без загрязнения транскрипта примесью посторонней РНК. В оптимальных условиях синтез РНК фаговыми полимеразами характеризуется высокой процессивностью (в 5—6 раз выше, чем у РНК-полимеразы *E. coli*), так что с 1 мкг матричной ДНК, как правило, можно синтезировать 5—20 мкг меченого РНК-зонда. Таким образом, описанный подход получения зондов, будучи достаточно универсальным, позволяет снизить стоимость и трудоемкость гибридационных экспериментов, что важно при осуществлении крупномасштабных проектов, связанных с анализом геномных библиотек. Кроме того, само число гибридационных экспериментов можно резко сократить благодаря одновременному использованию нескольких зондов, несущих различные сигнальные соединения (радионуклиды, биотин, дигоксигенин, флуорохромы).

В настоящей работе описан синтез флуоресцентно меченных производных УТР с целью получения флуоресцентно меченных полинуклеотидных РНК-зондов. Получено два аналога УТР, несущих на конце спейсера, введенного по положению С5 пиримидинового кольца, остатки флуоресцентных красителей — флуоресцеина

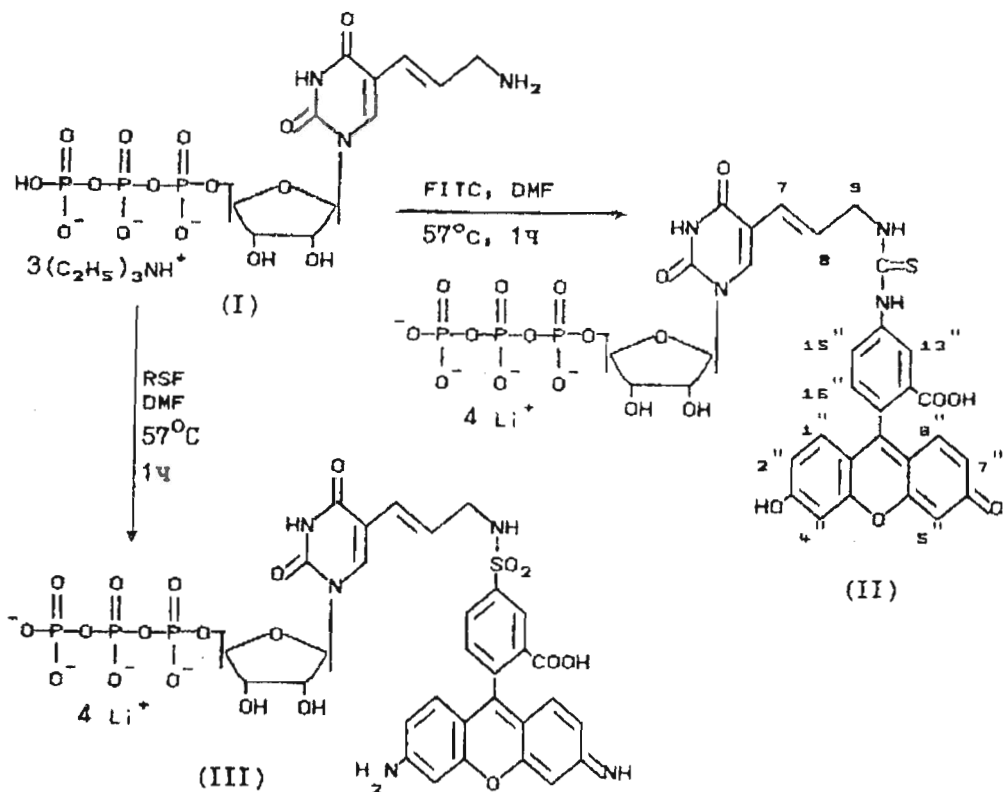
Сокращения: FITC — флуоресцеинизотиоцианат, RSF — родаминсульфофторид.

и родамина (соединения II и III соответственно) (схема). Выбор структуры этих производных определялся двумя факторами:

1) модификация природного субстрата РНК-полимеразы не должна влиять на возможность и правильность его комплементарного узнавания;

2) хотя любой модифицированный субстрат узнается ферментом хуже, чем природный, длина и структура спейсера, с помощью которого в нуклеозид-5'-трифосфат вводится сигнальное соединение, не должны существенно влиять на эффективность узнавания этого субстрата полимеразой (показано, что при использовании флуоресцентно меченных дидезоксинуклеозид-5'-трифосфатов различными ДНК-полимеразами короткие спейсеры даже предпочтительнее [5]).

Схема синтеза флуоресцентных производных UTP



Синтезы различных флуоресцентно меченных дезокси- и дидезоксинуклеозид-5'-трифосфатов уже неоднократно описывались ранее. Эти соединения, несущие остатки дансила [6], флуоресцеина [7] и его производных [5], предназначались, как правило, для замены радиоактивной метки при осуществлении широкомасштабных проектов по секвенированию ДНК и автоматизации процесса секвенирования. Широкое применение нашли также синтетические олигонуклеотиды, меченные флуорохромами, которые вводились либо через концевые фосфатные группы, либо через спейсер с аминогруппой на конце, введенный по основаниям различных нуклеотидов. Приводимый в данной работе экспериментальный материал указывает на предпочтительность использования FITC и RSF как химически активных и коммерчески доступных соединений для синтеза флуоресцентно меченных рибонуклеозид-5'-трифосфатов. Эти красители и их производные имеют значительные коэффициенты экстинкции в максимуме поглощения и высокий квантовый выход флуоресценции, что определяет высокую чувствительность флуоресцентного анализа.

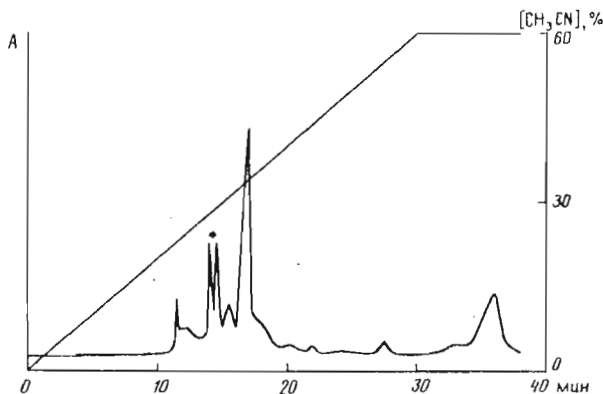


Рис. 1. Хроматографический профиль выделения соединения (II) при обращенно-фазовой ВЭЖХ (пояснения в тексте). Место выхода продукта отмечено звездочкой

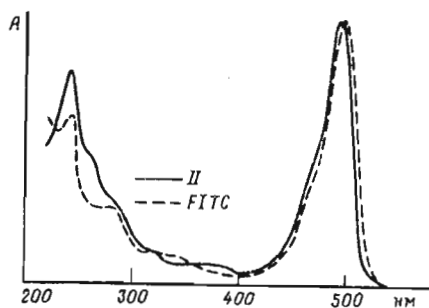


Рис. 2. Электронные спектры поглощения соединения (II) и FITC в 0,1 М ТЕАВ, рН 8,0. Концентрации обоих веществ одинаковы

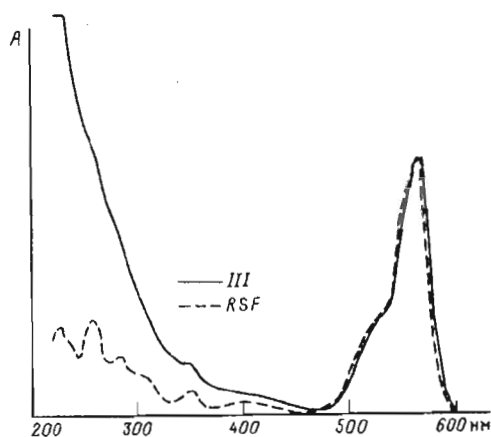


Рис. 3. Электронные спектры поглощения соединения (III) и RSF в 0,1 М ТЕАВ, рН 8,0. Концентрации обоих веществ одинаковы

Присоединение флуоресцентных красителей производилось к 5-(*транс*-3-аминопропил-1)уридин-5'-трифосфату (I) [8]. Соединение (II) было получено обработкой в течение 1 ч при 57° С триэтиламмонийной соли (I) 3-кратным избытком FITC в безводном DMF в присутствии 1,2-кратного количества триэтиламина. Продукт был отделен от избытка красителя хроматографией на DEAE-целлюлозе. Окончательная очистка была достигнута с помощью ионообменной и затем обращенно-фазовой (рис. 1) ВЭЖХ. Продукт элюируется в виде раздвоенного пика, что, возможно, связано с наличием (*E*)-(*R*)-изомерии у *N*, *N'*-дизамещенных тиомочевин [9]. Было обнаружено, что реакция не протекает при комнатной температуре, как это имеет место при синтезе флуоресцентного производного dATP [7], что можно объяснить меньшей реакционной способностью аминогруппы, в β -положении к которой находится двойная связь. В ходе реакции образуется также значительное количество неидентифицированных нефлуоресцирующих продуктов, имеющих искаженный спектр поглощения в области 400—500 нм. Принимая ϵ_{495} продукта равным ϵ_{495} FITC [5], выход составляет 15%.

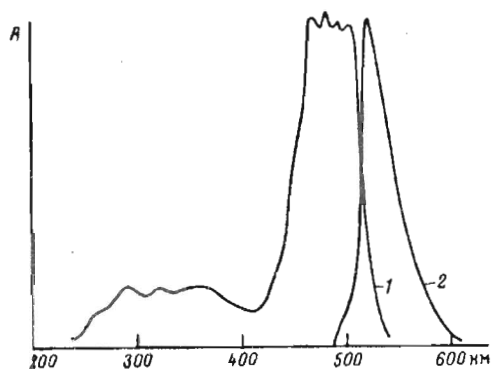


Рис. 4. Спектры возбуждения (1) и испускания (2) флуоресценции соединения (II) в 0,1 М ТЕАВ, рН 8,0

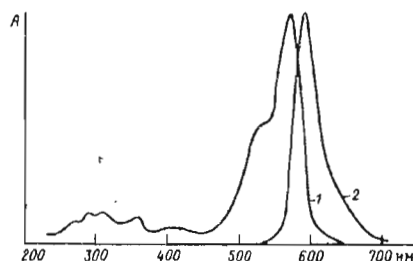


Рис. 5. Спектры возбуждения (1) и испускания (2) флуоресценции соединения (III) в 0,1 М ТЕАВ, рН 8,0

Присоединение RSF в тех же условиях не наблюдалось, что, по-видимому, объясняется высокой скоростью гидролиза до соответствующей сульфокислоты в щелочных условиях (при рН 9,5 полный гидролиз RSF протекает за несколько минут). Проведение реакции в безводном DMF с использованием триэтиламинной соли (I) и N-метилимидазола как нуклеофильного катализатора в течение 4 ч при 57° С приводит к соединению (III) с выходом 1—2%. Использование вместо N-метилимидазола других третичных аминов (триэтиламин, 4-(N,N-диметиламино)пиридин, 4-(N,N-диметиламино)пиридин-N-оксид) оказалось неэффективным. Продукт был выделен хроматографией на силикагеле (диоксан — конц. аммиак — вода, 6 : 1 : 4) с окончательной очисткой обращенно-фазовой ВЭЖХ. В этих условиях образуется единственный продукт, соответствующий нуклеозид-5'-трифосфату.

Соединения (II) и (III) имеют характерные спектры поглощения (рис. 2, 3). Сравнение этих спектров со спектрами исходных красителей выявляет теоретически ожидаемое большее поглощение (II) и (III) в УФ-области, чем у FITC и RSF. Спектры возбуждения и испускания флуоресценции соответствуют таковым для исходных красителей (рис. 4, 5). Времена удерживания при обращенно-фазовой ВЭЖХ и значения R_f на ТСХ соответствуют теоретически ожидаемым для нуклеозид-5'-трифосфатов, несущих гидрофобные группировки.

Оба соединения были исследованы в реакции транскрипции *in vitro* и обнаружили способность эффективно включаться в состав РНК с получением полноразмерных транскриптов (материал готовится к печати).

Экспериментальная часть

В работе использовали FITC (Fluka, Швейцария), RSF (ИРЕА ОТОР, Москва).

Электронные спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой области регистрировали на спектрофотометре Specord UV-VIS (Karl Zeiss, ГДР), спектры флуоресценции — на спектрофлуориметре MPF-4 (Hitachi, Япония).

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системе диоксан — конц. аммиак — вода, 6 : 1 : 4. ВЭЖХ выполняли на колонках с носителями Полисил СА-500 (НПО «Вектор», пос. Кольцово) и Lichrosorb RP-18 (10 мкм, Merck, ФРГ) с использованием прибора Waters-510 (Millipore, США). Абсорбционную колоночную хроматографию проводили на силикагеле марки КСК, фракция 0,140—0,315 (НИОХ СО РАН), анионообменную — на DEAE-целлюлозе DE-32 (Whatman, Великобритания).

Спектры ^1H -ЯМР (200,13 МГц) записывали на спектрометре WP-200 (Bruker, ФРГ) в D_2O .

5-(транс-3-(Флуоресцеинил-4'-тиокарбамоил)пропенил-1)уридин-5'-трифосфат (II). К раствору 45,8 мкмоль сухой триэтиламмонийной соли соединения (I) в 1 мл свежеперегнанного DMF добавляли 55 мкмоль триэтиламина (7,7 мкл, 1,2-кратный избыток) и 137 мкмоль FITC (53 мг, 3-кратный избыток) в 0,4 мл DMF. Смесь инкубировали 1 ч при 57° С, после чего реакционную смесь разбавляли в 5 раз водой и наносили на колонку (0,9×23 см) с DEAE-целлюлозой, предварительно уравновешенную 0,3 М ТЕАВ (50 мл). Продукт элюировали в градиенте ТЕАВ, рН 7,5 (0,3—0,7 М; объем элюента 500 мл), буфер упаривали, остаток несколько раз упаривали с абсолютным этанолом, растворяли в воде и наносили на колонку (1×25 см) со смолой Полисил СА-500. Продукт элюировали в градиенте 0—0,3 М KH_2PO_4 , рН 6,5, в 30% ацетонитриле. Соответствующий трифосфату пик упаривали и окончательно очищали обращенно-фазовой хроматографией на колонке (1×25 см) со смолой Lichrosorb RP-18 в градиенте 0—30% ацетонитрила в 0,05 М ТЕАВ, рН 7,5 (рис. 1). Продукт упаривали, растворяли в минимальном объеме воды и осаждали 2% LiClO_4 в ацетоне. Осадок высушивали при 37° С. Выход 6,87 мкмоль (15%). R_f 0,3. УФ-спектр (0,1 М ТЕАВ, рН 8,0), λ_{max} нм (ϵ): 240 (54 000), 492 (72 600). Спектр флуоресценции (0,1 М ТЕАВ, рН 8,0, $\lambda_{\text{возб}}$ 480 нм): λ_{max} 520 нм. ^1H -ЯМР-спектр (δ , м. д.): 3,92 (д, 2H, H-9), 4,06 (м, 1H, H-4'), 4,22 (м, 1H, H-3'), 4,48 (м, 1H, H-2'), 5,78 (д, 1H, H-1'), 6,29 (с, 1H, H-7), 6,34 (т, 1H, H-8), 6,50 (м, 6H, H-1'', H-2'', H-4'', H-5'', H-7'', H-8''), 7,14 (д, H-16''), 7,47 (дд, 1H, H-15''), 7,60 (д, 1H, H-13''), 7,78 (с, 1H, H-6).

5-(транс-3-(Родаминил-4'-сульфамидо)пропенил-1)уридин-5'-трифосфат (III). К раствору 30,4 мкмоль сухой триэтиламмонийной соли соединения (I) в 1 мл свежеперегнанного DMF добавляли 91,2 мкмоль N-метилимидазола (7,3 мкл, 3-кратный избыток) и 60,8 мкмоль RSF (24,5 мг, 3-кратный избыток) в 1 мл DMF. Смесь инкубировали 1 ч при 57° С, после чего отделяли избыток непрореагировавшего красителя хроматографией на силикагеле (диоксан — конц. аммиак — вода, 6 : 1 : 4). Продукт упаривали и подвергали окончательной очистке с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке (1×25 см) со смолой Lichrosorb RP-18 в градиенте 0—60% ацетонитрила в 0,05 М ТЕАВ, рН 7,5. Очищенный продукт упаривали, растворяли в минимальном объеме воды и осаждали 2% LiClO_4 в ацетоне. Осадок высушивали при 37° С. Выход 0,4 мкмоль (1,3%). R_f 0,35. УФ-спектр (0,1 М ТЕАВ, рН 8,0), λ_{max} нм (ϵ): 569 (64 000). Спектр флуоресценции (0,1 М ТЕАВ, рН 8,0, $\lambda_{\text{возб}}$ 563 нм): λ_{max} 590 нм.

Работа выполнена в рамках программы «Геном человека».

Авторы выражают глубокую признательность А. С. Левиной, Д. В. Пышному, Т. М. Ивановой (Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН) за помощь при выполнении данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bailey G. N., Klement J. F. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 10. P. 2814—2818.
2. Golomb M., Chamberlin M. J. // J. Virol. 1977. V. 21. № 2. P. 743—752.
3. Chamberlin M., Ring J. // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. № 6. P. 2235—2244.
4. Jeng Shih-Tong, Gardner J. F., Gumpert R. I. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 7. P. 3823—3830.
5. European Patent Application, 87305844.0, 1987.
6. Александрова Л. А., Атражев А. М., Куханова М. К., Краевский А. А. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 643—647.
7. Sarfati S. R., Namane A. // Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 18. P. 2581—2584.

8. Langer P. R., Waldrop A. A., Ward D. S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 11. P. 6633—6637.
9. Walter W., Becker R. F. // Ann. Chem. 1972. V. 755. P. 145.

Поступила в редакцию
24.VIII.1993

После доработки
25.XI.1993

W. A. Wlassoff, S. M. Kalachikov, G. M. Dymshits

**SYNTHESIS OF FLUORESCENT LABELLED URIDINE
5'-TRIPHOSPHATE DERIVATIVES FOR PREPARATION
OF NONRADIOACTIVE RNA PROBES**

*Institute of Cytology and Genetics, Syberian Division, Russian Academy of
Sciences, Novosibirsk*

Synthesis of uridine 5'-triphosphate derivatives bearing residues of fluorescent dyes (fluorescein and rhodamine) at the terminus of a spacer at C5 of pyrimidine ring is described. The influence of the reaction conditions on the yield of the desired products and their optical characteristics were studied.