



УДК 577.113.6 : 577.164.187

© 1994 М. С. Щепинов, Д. С. Есипов, В. Г. Коробко,  
В. Н. Добрынин

## СПЕЦИФИЧНО ОТЩЕПЛЯЕМЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ ОБРАТИМОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ДНК

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и  
Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

**Ключевые слова:** авидин-биотиновая технология; олигонуклеотиды; иммобилизация.

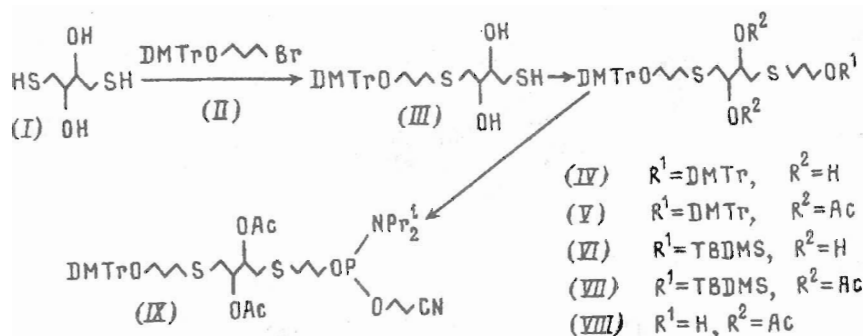
В качестве средств для обратимой иммобилизации ДНК приготовлены носитель на основе TSK-геля со стрептавидинилированной поверхностью емкостью 50—70 нмоль олигонуклеотида на 1 г сухого носителя и олигонуклеотиды, содержащие в 5'- либо в 3'-концевой части биотиновый остаток, отделенный от нуклеотидной последовательности 4,9-дитиадодекан-6,7-дигидрокси-1,12-дифосфатным звеном, способным селективно расщепляться под действием периодата натрия по гликольной группировке. Время полного расщепления периодатом в растворе составило 45 мин, а в гетерофазе — 3 ч. Для введения в синтетические олигонуклеотиды биотинового и размыкаемого элементов синтезированы соответствующие амидофосфитные реагенты и биотинилированный СРГ.

С использованием в олигонуклеотидном синтезе мономеров ненуклеотидной природы были получены фрагменты нуклеиновых кислот с характерными функциями, отличающими их от природных прототипов. В одних случаях это олигонуклеотиды с алифатическими аминогруппами, обеспечивающими введение репортерных групп в условиях, при которых функциональный набор нуклеиновых оснований и сахарофосфатного кора остается незатронутым [1—5]. В других случаях с помощью специализированных синтонов созданы нуклеотидные «щелочные» структуры, способные, с одной стороны, выполнять функции зонда, а

---

Использованные сокращения: ВАР — щелочная фосфатаза, СРГ — стекло с контролируемым размером пор, ДСС — дициклогексилкарбодимид, ДМТг — 4,4'-диметокситритил, ДТТ — дитиотреит, Fmoc — 9-флуоренилметоксикарбонил, Pfp — пентафторфенил, SVFDE — фосфодиэстераза змеиного яда, TBDMS — трет-бутилдиметилсилил. В буквенных формулах префикс «d» везде опущен. Рибозвено маркировано значком «г».

*Почтовый адрес:* 117871, Москва, В-437, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Институт биоорганической химии РАН, Лаборатория химии генов.



с другой — умножать гибридизационный сигнал [6, 7]. Для оценки вклада ненуклеозидных «дырок» в формирование модифицированных дуплексов и выявления термодинамических характеристик последних синтезированы олигонуклеотиды с безнуклеозидными звеньями [8—10]. Следует отметить еще и специализированные синтоны, позволяющие при завершающем  $\beta$ -элиминировании получать 5'-фосфорилированные фрагменты нуклеиновых кислот [11, 12].

Настоящим сообщением мы расширяем арсенал амидофосфитных реагентов ненуклеотидной природы. Рассматриваемые здесь синтоны использованы нами в целях получения средств для обратимой иммобилизации ДНК.

Введение якорных групп и твердофазный подход могут обеспечить несомненные удобства при манипулировании ДНК или другими биополимерами. Наиболее ярко эти особенности могут проявиться при реализации (стрепт)авидин-биотиновой технологии [13—15]. Высокая прочность биотин-белкового комплекса является основой для такой технологии, но может стать и серьезным препятствием, если возникает необходимость отделить иммобилизованные молекулы от носителя. Поэтому нам представляется целесообразным ввести в спейсерную часть между биотиновым остатком и биополимером структурный «элемент», специфично размыкаемый в условиях, при которых сохраняется целостность биополимера. В случае ДНК такая специфичность должна обеспечить целостность нуклеиновых оснований, сахарофосфатного остова, а иногда и дуплексной структуры.

Выбор специфично расщепляемых группировок и, следовательно, реакций, протекающих с удовлетворением этих условий, достаточно ограничен — среди них можно выделить, во-первых, щелочное расщепление по рибонуклеозидфосфатному звену, введенному в дезоксирибонуклеотидную цепь, во-вторых, периодатное расщепление по 1,2-диольной группировке, в-третьих, восстановительное расщепление дисульфидов, а также расщепление алкилтиофосфатов в присутствии солей тяжелых металлов [16]. Таким образом, синтоном, вносящим в синтетический олигонуклеотид размыкаемый «элемент», может служить либо традиционно защищенный рибомономер, либо защищенное и функционализированное полиольное соединение, несущее временно блокированную гликольную группировку, либо дисульфидное производное. О реагентах, содержащих гликольную «размычку», в литературе имеются сообщения [6, 17]. Мы для этой цели, со своей стороны, предлагаем использовать соединение (IX), полученное исходя из дитиотреита (I) (схема 1).

Степень алкилирования дитиотреита 1-диметокситритилоксипропан-3-бромидом (II) в ацетоне в присутствии поташа зависит от соотношения реагентов. Эту реакцию можно легко провести с предпочтительным образованием продукта моноалкилирования (III), практически избежав дальнейших превращений. Однако бистритильное соединение (IV) может быть получено из тиола (III) путем строго контролируемого добавления алкилирующего компонента (II) во избежание

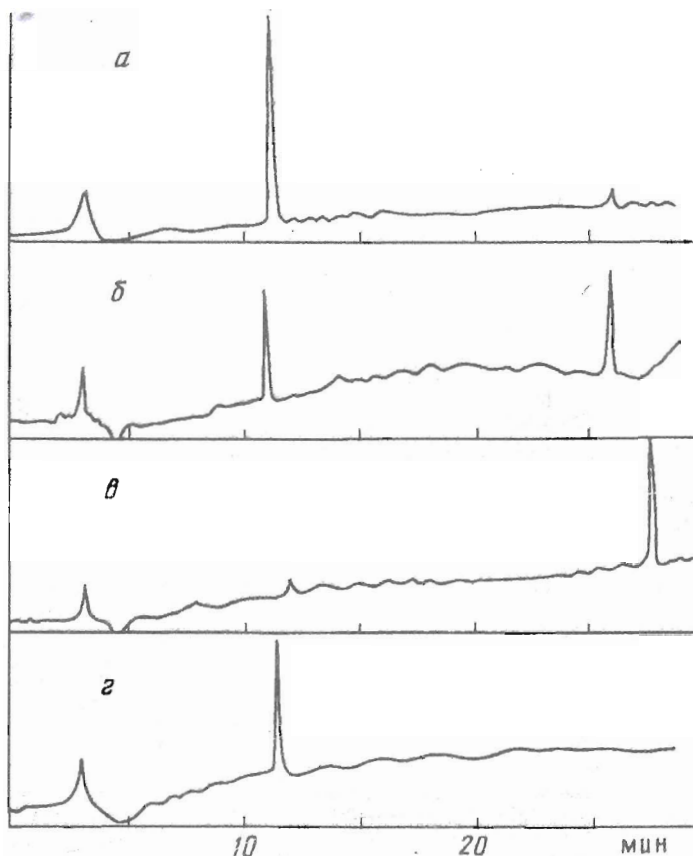


Рис. 1. ВЭЖХ-анализ продуктов enzymатического расщепления олигонуклеотида (X): а — (X) + SVPDE + BAP, 1 ч; б — (5') Т-«дио́л»-Т + SVPDE + BAP, 1 ч; в — (5') Т-«дио́л»-Т; г — дТ. Условия разделения: колонка — Zorbax ODS (4,6×250 мм). Градиент концентрации ацетонитрила в 0,1 М ацетате триэтиламмония: 2,5—12,5% за 20 мин, 12,5—32,5% за 20 мин

протекания реакции по диалкилсульфидным группам. Ацилирование гликольной группировки в симметричном соединении (IV) привело к диацетату (V), осуществить дифференцированное детритилирование которого с приемлемым выходом монотритилированного соединения (VIII) не удалось. Поэтому тиольная группа соединения (III) была подвергнута алкилированию другим производным 3-бромпропанола, его *трет*-бутилдиметилсилиловым эфиром, что привело к образованию производного 4,9-дитадодекан-1,6,7,12-тетраола (VI), первичные гидроксильные группы которого защищены по-разному, а это дает основание для дифференцированного деблокирования одной из групп. Ацетилирование свободных гидроксильных групп в соединении (VI) и последующее десилилирование диацетата (VII) привели к ключевому соединению (VIII), далее превращенному в амидофосфитный синтон (IX).

С участием мономера (IX) был синтезирован олигонуклеотид (5') Т<sub>7</sub>-«дио́л»-Т<sub>14</sub> (X), имеющий гомотимидиловую последовательность и диольную вставку. Эффективность конденсации с участием фосфитамида (IX) в автоматическом твердофазном синтезе, составившая не менее 95% (по поглощению DMTг-катиона), не снижалась на протяжении по меньшей мере 48 ч со времени загрузки в синтезатор. Наличие в синтезированном модифицированном унэйкозатимидилате (X) диольной вставки было подтверждено ферментативным гидролизом при помощи SVPDE и BAP с последующим ВЭЖХ-анализом (рис. 1). Олигонуклеотид (X) является модельным и предназначен для оценки скорости расщепления гликольной группировки. Расщепление производили раствором NaIO<sub>4</sub> и оценивали

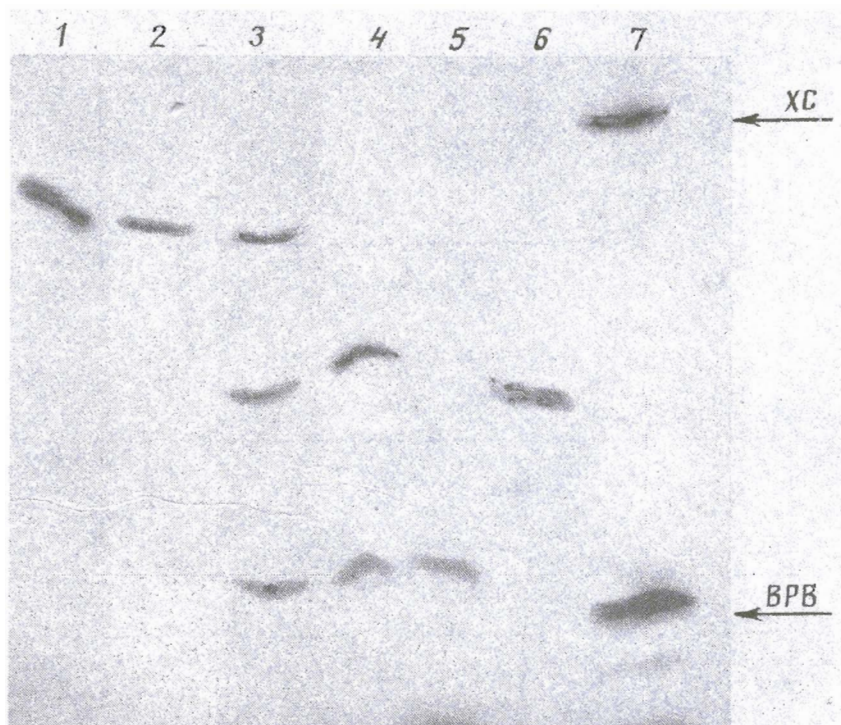


Рис. 2. Анализ продуктов расщепления олигонуклеотида (X) 0,05 М раствором  $\text{NaIO}_4$  в условиях денатурирующего гель-электрофореза (20% ПААГ): 1 — T<sub>21</sub>; 2 — олигонуклеотид (X); 3 — (X) +  $\text{NaIO}_4$ , 30 мин; 4 — (X) +  $\text{NaIO}_4$ , 45 мин; 5 — T<sub>7</sub>; 6 — T<sub>14</sub>; 7 — маркерные красители. XC и BPB — положения маркерных красителей ксиленицианола и бромфенолового синего

посредством гель-электрофореза (рис. 2). Установлено, что в выбранных условиях время для достижения полного расщепления гликольной группировки составило около 45 мин.

Как уже отмечалось выше, расположение размыкаемого элемента в синтетических олигонуклеотидах запланировано между биотиновым остатком и нуклеотидной последовательностью. В зависимости от того, какую функцию отводят синтетическому олигонуклеотиду, якорная группа и размыкаемый элемент могут располагаться либо в 5'-, либо в 3'-концевых областях (типы А и Б соответственно). Олигонуклеотиды типа А предназначаются в качестве праймеров, поэтому 3'-концевая область должна быть свободна для осуществления элонгации. Олиго-

Схема 2

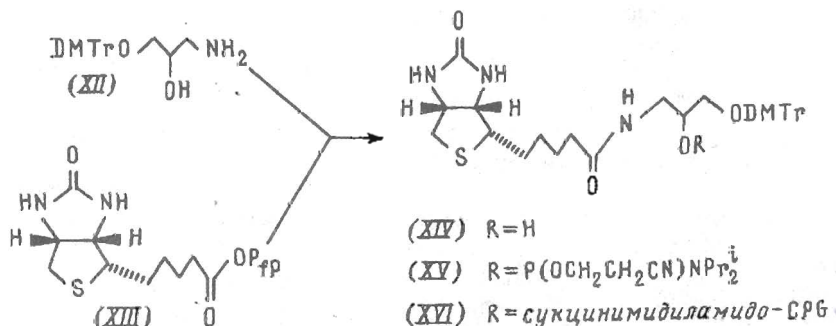
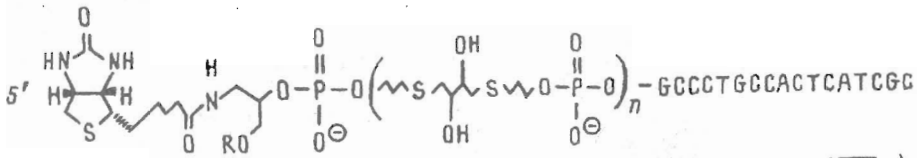


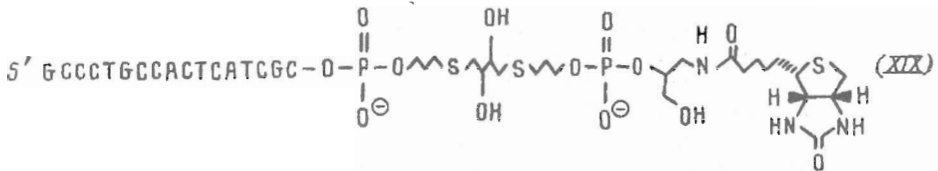
схема 3



$n=0$ ; R=DMTP (XVIIa)

R=H (XVIIb)

$n=1$ ; R=H (XVIII)



5' GCGATGAGTGGCAGGGC (XX)

5' GGATCATTGCCCTGTAGGATGGACGAACATCCAACCTTCCCA (XXI)

5' GCCCTGCCACTCATCGC (XXII)

нуклеотиды типа Б могут выполнять роль адаптеров (например, для заполнения одного из выступающих концов ДНК фага лямбда с целью их дифференцировки); в этом случае «размычка» и биотин располагаются в 3'-концевой области адаптера, поскольку 5'-конец должен быть фосфорилированным, чтобы обеспечить лигирование с двухтяжевой ДНК.

Для синтеза такого рода олигонуклеотидов мы приготовили биотинсодержащий амидофосфитный реагент (XV) и биотинилированный СРГ-носитель (XVI), используя биотинилированный аминокликоль (XIV), который, в свою очередь, был синтезирован посредством конденсации пентафторфенилового эфира биотина (XIII) с 1-О-диметокситритил-3-амино-1,2-пропандиолом (XII) (схема 2).

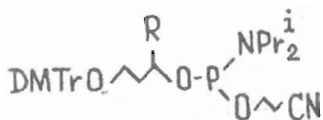
Уже описано большое число биотинсодержащих амидофосфитных синтонов [18—21], в том числе аналогичные реагенты на основе 2-аминоалкилпропан-1,3-диола [20]. Свой выбор синтона на основе 3-аминопропан-1,2-диола мы обосновывали тем, что один из гидроксильных группировки (тот, что при создании олигонуклеотидной цепи не включается в состав фосфодиэфирной связи), будучи активированным, сможет, по-видимому, обеспечить расщепление этой связи подобно тому, как это имеет место в олигорибонуклеотидах при действии щелочи. А это могло бы означать, что реагент (XV) оказывался бы способным привносить в олигонуклеотид не только якорную биотиновую функцию, но и размыкаемый элемент.

Для выяснения этого вопроса мы синтезировали олигонуклеотид (XVIIб), выделив его первоначально в диметокситритилированной форме (XVIIа), чтобы избежать преждевременного воздействия основания на  $\alpha$ -гидроксифосфатную группировку, и гептадекануклеотид (XXII), а также соединение (XXI), содержащее рибозвено (схема 3).

Олигонуклеотид (XXI) был синтезирован посредством элонгации (с помощью Таq-ДНК-полимеразы и четырех dNTP) соответствующего олигодезоксинуклеотида, содержащего 3'-концевое рибозвено, на комплементарной матрице (подробная методика синтеза будет опубликована позже). Полностью деблокированный олигонуклеотид (XVIIб), а также  $^{32}\text{P}$ -меченый олигонуклеотид (pXXI) были

испытаны на устойчивость (вернее, на расщепляемость) при действии 0,3 М раствора щелочи. Определенное посредством обращенно-фазового ВЭЖХ-анализа время полупревращения ( $\tau/2$ ) (XVIIб) в (XXII) составило около 3 ч, а подобная характеристика скорости щелочного расщепления соединения (XXI), установленная посредством гель-электрофореза, не превышала 11 мин, что говорит об отсутствии заметного анхимерного вклада со стороны первичной гидроксильной группы в расщепление соседней фосфодиэфирной связи по сравнению с рибозвеном. Специально проведенная обработка соединения (XVIIб) концентрированным водным аммиаком при 55° С вообще не приводила к образованию (XXII).

В качестве твердой фазы в биотин-(стрепт)авидиновой технологии широко используются магнитные шарики фирмы Dunal [13]. Не имея возможности пользоваться этим коммерческим носителем, мы приготовили свой стрептавидиновый носитель, к сожалению, без магнитных свойств. Исходным материалом для его приготовления послужил TSK-гель HW-75 фирмы Тоуоргар1, используемый в эксклюзионной хроматографии. Выбранный материал представляет собой пористые гранулы (размером 32—63 мкм), поверхность которых содержит большое число гидроксильных групп, что позволило вырастить сначала заготовки гидрофильных цепей посредством трех последовательных обработок одним из амидофосфитов: пропиленовым (XXIII) [9] или изобутиленовым (XXIV), а затем биотинилировать их, используя биотинсодержащий амидофосфит (XV).

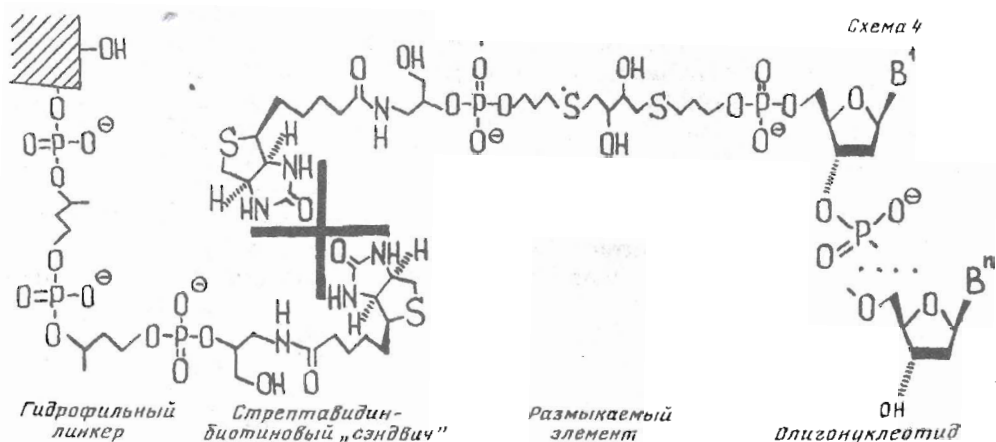


(XXIII) R=H

(XXIV) R=CH<sub>3</sub>

Функционализация поверхности высушенных гранул проводилась на автоматическом синтезаторе по протоколу амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов. Синтоны (XXIII) и (XXIV) обеспечивают удлинение спейсерной части на одинаковое число атомов. Однако пропиленовый синтон (XXIII) утрачивает эффективность конденсации значительно быстрее, чем изобутиленовый (XXIV), что вызвано, по-видимому, большей реакционной способностью фосфинильной группы, связанной с первичным гидроксилом. В результате достигнутая степень биотинилирования составила 20 мкмоль/г носителя (определена косвенно по величине поглощения удаленного DMTr-катиона). Далее биотинилированный носитель инкубировали со стрептавидином в течение 2 ч и несвязавшийся белок отмывали.

Для того чтобы определить, какое количество биотинилированного олигонуклеотида способен связать приготовленный носитель, мы использовали олигонуклеотид (XVIII), а также 5'-[P<sup>32</sup>]фосфорилированные олигонуклеотиды (pXIX) и (pXX). Инкубация с меченым небитинилированным соединением (pXX) и последующая трехкратная отмывка показали, что степень необратимой сорбции ничтожна, а последующая инкубация с биотинилированным 5'-меченым (pXIX) позволили установить, что степень иммобилизации составляет 50—70 пмоль/мг. Та же величина была определена после обработки NaIO<sub>4</sub> и измерения радиоактивности, перешедшей в раствор, причем необходимая продолжительность обработки раствором NaIO<sub>4</sub> составляла 2,5—3 ч. Такую же емкость (50 пмоль/мг) приготовленный носитель проявил и в отношении соединения (XVIII) (образующаяся при иммобилизации сэндвичевая структура приведена на схеме 4). Это было установлено путем следующего ряда операций: иммобилизация соединения (XVIII) на носителе, дальнейшая инкубация носителя с 5'-<sup>32</sup>P-меченым (pXX) (гибридизация), обработка NaIO<sub>4</sub> (отвязка), измерение радиоактивности в отделенном растворе. (Для сравнения: магнитные носители Dunal способны иммобилизовать до 200 пмоль биотинилированного олигонуклеотида на 1 мг носителя.)



Таким образом, нами созданы средства для обратимой иммобилизации фрагментов ДНК на носителе с целью разработки и совершенствования диагностических и аналитических методов исследования ДНК.

### Экспериментальная часть

Использовали (9-флуоренилметил)хлорформиат (Merck, Германия), 3-амино-1,2-пропандиол, тетрабутиламмонийфторид (Fluka, Швейцария), биотин (Sigma, США), дитиотреит (Reanal, Венгрия), TSK-гель Toyopearl HW-75 категории «fine» (Тоуо-сода, Япония); остальные реактивы отечественного производства. Стрептавидин получен на лаборатории биотехнологии ИБХ РАН. Пиридин кипятили над  $\text{CaH}_2$  и перегоняли; ацетон (ос. ч.) сушили над молекулярными ситами 4 Å; ацетонитрил (ос. ч.) кипятили над  $\text{CaH}_2$  и перегоняли. Бис-N,N-диизопропиламино-2-цианэтилфосфит синтезировали как описано в литературе [22, 23].

Спектры  $^1\text{H}$ - и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР регистрировали на приборе Bruker AC-500 (500 МГц) в  $\text{CDCl}_3$  (шкала  $\delta$ ); ИК-спектры регистрировали на приборе UR-20 в таблетке с KBr; олигонуклеотиды синтезировали на синтезаторе 380B (Applied Biosystems, США) с использованием приготовленных в лаборатории реагентов [22], выделяли при помощи ВЭЖХ и анализировали методами ионообменной хроматографии и электрофореза в 20% ПААГ; высокоэффективную жидкостную хроматографию осуществляли на приборе Beckman-314; радиоактивность измеряли на приборе Mark-3. Масс-спектры получены на приборах Varian MAT-44S, Kratos MS50TC и на времяпролетном масс-спектрометре МСБХ с ионизацией осколками деления  $^{252}\text{Cf}$  (ПО «Электрон», Сумы, Украина).

Для ТСХ использовали пластинки Kieselgel 60F<sub>254</sub> (Merck) и системы: хлороформ (А), хлороформ — метанол, 9 : 1 (Б), хлороформ — метанол, 7 : 1 (В), хлороформ — триэтиламин, 99 : 1 (Г), хлороформ — гексан — триэтиламин, 50 : 50 : 1 (Д), хлороформ — метанол — триэтиламин, 97 : 2 : 1 (Е). Для колоночной хроматографии использовали силикагель MN-Kieselgel 60 (Macherey Nagel, Германия).

Введение  $^{32}\text{P}$ -метки и гибридизацию олигонуклеотидов выполняли, как описано в работе [24]. PBS-буфер для биотин-стрептавидинового связывания готовили, как описано там же.

*О-Диметокситритил-3-бромпропанол (II)*. К свежеперегнанному раствору 3-бромпропанола (2 мл, 22 ммоль) в 50 мл сухого пиридина добавляли при перемешивании 8,15 г (24 ммоль) перекристаллизованного DMTг-Cl и перемешивали 5 ч при 20° С. Затем раствор концентрировали, разбавляли 100 мл этилацетата, дважды промывали равным объемом насыщенного раствора  $\text{NaHCO}_3$ ,

и один раз равным объемом насыщенного раствора NaCl. Органический слой сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) и упаривали с толуолом. Полученное масло растворяли при нагревании в 10 мл толуола и 40 мл пентана. Выпавшие кристаллы промывали холодным гексаном и сушили над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Получили 5,3 г (55% без учета оставшегося в маточнике) продукта, т. пл. 70—71° С,  $R_f$  0,92 (Г). Масс-спектр (FAB),  $m/z^+$ : 303, 441 (M).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м. д.): 7,45—6,77 (м, аром., 13H), 3,81 (с,  $\text{OCH}_3$ , 6H), 3,56 (т,  $\text{OCH}_2$ , J 7,5, 2H), 3,24 (м,  $\text{CCH}_2\text{C}$ , 2H), 2,14 (т,  $\text{CH}_2\text{Br}$ , J 7, 2H).

*O',O''-Бис(диметокситритил)-6,7-диацетокси-4,9-дитиадодекан-1,12-диол* (V). Высушенный над  $\text{P}_2\text{O}_5$  дитиотреит (I) (0,77 г, 5 ммоль) растворяли в 20 мл сухого ацетона. После добавления 1,5 г сухого поташа смесь при перемешивании доводили до кипения и в течение 14 ч добавляли по каплям раствор бромида (II) (5,5 г, 12,5 ммоль) в сухом ацетоне. Смесь кипятили еще 4 ч, контролируя по ТСХ исчезновение исходного (I) (система E). Осадок отфильтровывали, растворитель упаривали, остаток растворяли в 100 мл этилацетата, промывали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (2×50 мл) и насыщенным раствором NaCl (2×50 мл), затем сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали. Полученное бесцветное масло (3,5 г) упаривали с сухим пиридином (30 мл), растворяли в 50 мл сухого пиридина и добавляли при перемешивании 2,5 мл (26 ммоль) уксусного ангидрида. Через 8 ч реакционную смесь упаривали до 10 мл, при интенсивном перемешивании вливали в 150 мл воды со льдом. Выпавший в виде белых хлопьев продукт дважды упаривали с сухим ацетонитрилом и вспенивали в вакууме масляного насоса. Выход 2,58 г (54%).  $R_f$  0,55 (Д). Масс-спектр (с ионизацией осколками деления  $^{252}\text{Cf}$ ),  $m/z^+$ : 980,7 (M + Na). Вычислено для ( $\text{C}_{56}\text{H}_{62}\text{O}_{10}\text{S}_2 + \text{Na}$ ): 981,1.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м. д.): 7,44—6,85 (м, 26H, аром.), 5,25 (м, 2H, CH), 3,8 (с, 12H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,15 (т, 4H, J 6,3, DMTr- $\text{OCH}_2$ ), 2,63 (м, 8H,  $\text{CH}_2\text{SCH}_2$ ), 2,09 (с, 6H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1,88 (м, 4H,  $\text{CCH}_2\text{C}$ ).

*2,3-Дигидрокси-4-(3-диметокситритилоксипропилтио)бутантиол* (III). Высушенный над  $\text{P}_2\text{O}_5$  дитиотреит (I) (3,85 г, 25 ммоль) растворяли в 30 мл сухого ацетона. После добавления 1,5 г сухого поташа смесь при перемешивании доводили до кипения и в течение 14 ч добавляли по каплям раствор бромида (II) (2,2 г, 5 ммоль) в сухом ацетоне. После этого смесь кипятили еще 4 ч, контролируя по ТСХ исчезновение алкилирующего реагента (II) (система E). Осадок отфильтровывали, промывали ацетоном (3×20 мл), фильтрат упаривали, остаток растворяли в 100 мл этилацетата, промывали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (12×25 мл) и насыщенным раствором NaCl (2×50 мл). Водные фракции использовали для выделения непрореагировавшего дитиотреита. Органическую фазу сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали до масла, которое подвергали колоночной хроматографии (бензол + 0,5% триэтиламина в градиенте хлороформа 0—30%). Получили 2 г (78%) бесцветного масла.  $R_f$  0,29 (E), масс-спектр (FAB),  $m/z^+$ : 303, 514 (M).

*O-трет-Бутилдиметилсилил-3-бромпропанол*. К свежеперегнанному раствору 3-бромпропанола (2 мл, 22 ммоль) в сухом хлористом метиле (30 мл) добавляли при перемешивании 5 мл (30 ммоль) этилдиизопропиламина и 3,48 г (23 ммоль) трет-бутилдиметилсилилхлорида. Через 48 ч реакционную смесь разбавляли 75 мл этилацетата, дважды промывали 50 мл насыщенного раствора  $\text{NaHCO}_3$  и один раз равным объемом насыщенного раствора NaCl. Органический слой сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) и упаривали на роторном испарителе при 20° С. Остаток перегоняли в вакууме водоструйного насоса. Основную фракцию отгоняли при 89—92° С в виде бесцветной прозрачной жидкости. Выход после перегонки 5 г (90%),  $d_{20} = 1,15$ . Масс-спектр,  $m/z^+$ : 115, 139, 195, 253 (M).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м. д.): 3,75 (т,  $\text{OCH}_2$ , J 5,6, 2H), 3,52 (т,  $\text{CH}_2\text{Br}$ , J 6,6, 2H), 2,04 (м,  $\text{CH}_2$ , 2H), 0,91 (с,  $(\text{CH}_3)_3$ , 9H), 0,18 (с,  $(\text{CH}_3)_2$ , 6H).

*O'-трет-Бутилдиметилсилил-O''-диметокситритил-4,9-дитиадодекан-1,6,7,12-тетраол* (VI). К перемешиваемому раствору тиола (III) (1,54 г, 3 ммоль) в сухом ацетоне добавляли 1 г сухого поташа, доводили до кипения и при



перемешивании в течение 5 ч добавляли по каплям раствор свежеперегнанного *O*-трет-бутилдиметилсилил-3-бромпроанола (0,76 мл, 3,2 ммоль) в сухом ацетоне, после чего смесь кипятили еще 2 ч. Осадок отфильтровывали, промывали ацетоном (3×20 мл), растворитель упаривали. Выход продукта после колоночной хроматографии (условия см. (III)): 2,01 г (93%), *R<sub>f</sub>* 0,35 (E). Масс-спектр (с ионизацией осколками деления <sup>252</sup>Cf), *m/z*<sup>+</sup>: 709,8 (*M* + Na). Вычислено для (C<sub>37</sub>H<sub>54</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>Si + Na): 710.

*O*<sup>1</sup>-трет-Бутилдиметилсилил-*O*<sup>12</sup>-диметокситритил-6,7-диацетокси-4,9-дитададодекан-1,12-диол (VII). К раствору 2 г (2,77 ммоль) диола (VI) в 50 мл сухого пиридина добавляли при перемешивании 2,3 мл (24 ммоль) уксусного ангидрида. Через 15 ч реакционную смесь упаривали до 10 мл и при интенсивном перемешивании вливали в 150 мл воды со льдом. Выпавший в виде бесцветного масла продукт дважды упаривали с сухим ацетонитрилом. Выход 2,14 г (96%). *R<sub>f</sub>* 0,5 (D). Масс-спектр (с ионизацией осколками деления <sup>252</sup>Cf), *m/z*<sup>+</sup>: 796,6 (*M* + Na). Вычислено для (C<sub>41</sub>H<sub>58</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>Si + Na): 794,1. <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, δ, м. д.): 7,45—6,3 (м, 13H, аром.), 5,25 (м, 2H, CH), 3,8 (с, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,68 (м, 2H, CH<sub>2</sub>O-TBDMS), 3,14 (т, 2H, J 6,7, DMTr-OCH<sub>2</sub>), 2,7—2,06 (м, 8H, CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>), 2,11 (с, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2,09 (с, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1,85 (м, 2H, DMTr-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1,77 (м, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-TBDMS), 0,85 (с, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 9H), 0,1 (с, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 6H).

*O*<sup>12</sup>-Диметокситритил-6,7-диацетокси-4,9-дитададодекан-1,12-диол (VIII). К 6 мл 1 М раствора фторида тетрабутиламмония в тетрагидрофуране добавляли при перемешивании 2 г (2,6 ммоль) соединения (VII). Через 3,5 ч реакционную смесь растворяли в 75 мл этилацетата и дважды промывали равным объемом насыщенного раствора NaCl. Органическую фазу сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали до масла. После колоночной хроматографии получили 1,56 г (92%) бесцветного масла. *R<sub>f</sub>* 0,38 (Г). Масс-спектр (с ионизацией осколками деления <sup>252</sup>Cf), *m/z*<sup>+</sup>: 679,3 (*M* + Na). Вычислено для (C<sub>35</sub>H<sub>44</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> + Na): 679,8. <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, δ, м. д.): 7,45—6,77 (м, аром., 13H), 5,27 (м, CH, 2H), 3,8 (с, OCH<sub>3</sub>, 6H), 3,7 (м, CH<sub>2</sub>OH, 2H), 3,15 (т, OCH<sub>2</sub>, J 2,8, 2H), 2,67 (м, SCH<sub>2</sub>, 8H), 2,11 (с, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2,09 (с, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1,9—1,75 (м, CCH<sub>2</sub>C, 4H).

*O*<sup>1</sup>-Диметокситритил-*O*<sup>12</sup>-(*N,N*-диизопропиламино-2-цианэтоксифосфинил)-6,7-диацетокси-4,9-дитададодекан-1,12-диол (IX) синтезировали по методике, описанной для соединения (XV). Продукт получили с выходом 89% в виде бесцветного масла. *R<sub>f</sub>* 0,8 (A + 0,5% триэтиламина). Масс-спектр (с ионизацией осколками деления <sup>252</sup>Cf), *m/z*<sup>+</sup>: 879,6 (*M* + Na). Вычислено для (C<sub>44</sub>H<sub>61</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>PS<sub>2</sub> + Na): 880. <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, δ, м. д.): 145,686.

(±)-*N*-Флуоренилметоксикарбонил-3-амино-1,2-пропандиол. К перемешиваемому раствору (±)-3-амино-1,2-пропандиола ((XI), 1,5 г, 16,7 ммоль) в 15 мл сухого пиридина добавляли 4,83 г (18,3 ммоль) Fmoc-Cl. Смесь перемешивали до полного исчезновения исходного амина (ТСХ, система Б, отрицательный тест с флуорескамином), обычно около 2 ч, после чего ее выливали в 200 мл холодного насыщенного раствора бикарбоната натрия. Выпавший в виде белых хлопьев осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили в вакууме. После рекристаллизации из смеси этилацетат — гексан получили 4,1 г (72%) бесцветных кристаллов, т. пл. 135—140°С, *R<sub>f</sub>* 0,4 (B). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, δ, м. д.): 7,79—7,31 (м, 8H, аром.), 4,42 (м, 2H, CH<sub>2</sub>OCO), 4,2 (м, 1H, CHCH<sub>2</sub>OCO), 3,75 (м, 1H, CHOH), 3,56 (м, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3,32 (м, 2H, CH<sub>2</sub>OH). ИК (см<sup>-1</sup>): 3340, 1680, 1530, 1270, 1160.

(±)-*O*<sup>1</sup>-Диметокситритил-3-амино-1,2-пропандиол (XII). 5 г (8 ммоль) (±)-*N*-флуоренилметоксикарбонил-*O*<sup>1</sup>-диметокситритил-3-амино-1,2-пропандиола, полученного, как описано в работе [25], растворяли в 12 мл пиперидина и перемешивали 1 ч при 20°С в неплотно закрытом сосуде (ТСХ, система Б, положительный тест с флуорескамином на NH<sub>2</sub>-группу, красная окраска в парах CF<sub>3</sub>COOH). После упаривания реакционной смеси ее дополнительно упаривали с пиридином, затем с толуолом. Полученное масло разбавляли небольшим ко-

личеством толуола и осаждали в 700 мл холодного пентана. Выпавший в виде белых хлопьев осадок отфильтровывали, промывали пентаном и сушили в вакууме. Получили 3,15 г (100%) желтоватого порошка.  $R_f$  0,25 (Б). Масс-спектр (FAB),  $m/z^+$ : 303, 393 (М).

*Пентафторфениловый эфир биотина (XIII)*. (+)-Биотин (4,88 г, 20 ммоль) упаривали с сухим пиридином и растворяли при нагревании в 150 мл сухого пиридина. К охлажденному раствору биотина добавляли 3,68 г (20 ммоль) пентафторфенола и перемешивали 20 мин, после чего в течение 30 мин добавляли 4,13 г (20 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали 24 ч при 20° С, выпавший осадок N,N'-дициклогексилмочевины отфильтровывали и промывали 15 мл пиридина. Объединенные фракции упаривали до 50 мл и оставляли на ночь при 5° С. Вновь выпавший осадок N,N'-дициклогексилмочевины отделяли, как описано выше. Пиридин упаривали досуха, осадок переносили на фильтр и после промывки холодным пиридином и сушки получили 7,8 г (93%) белых кристаллов. Т. пл. 183—185° С (186—187° С [26]),  $R_f$  0,22 (система В, проявление иодом), масс-спектр,  $m/z^+$ : 410 (М).

*Биотинил-3-амино-О'-диметокситритил-1,2-пропандиол (XIV)*. 2 г (5 ммоль) пентафторфенилового эфира биотина (XIII) растворяли при нагревании в 50 мл сухого пиридина, после чего в реакционной смеси постепенно растворяли 1,97 г (5 ммоль) аминспирта (XII). Через 24 ч ТСХ показывала почти полное исчезновение исходного амина (система Б, тест с флуорескаминол). Затем реакционную смесь упаривали досуха и еще раз упаривали с толуолом. Растворяли в 100 мл хлористого метилена, дважды промывали равным объемом насыщенного раствора  $\text{NaHCO}_3$ , сушили органический слой над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали и остаток хроматографировали на силикагеле (система Г). Содержащие продукт фракции упаривали, растворяли в 10 мл толуола и переосаждали в 600 мл гексана. Растворитель декантировали, остаток растворяли в сухом хлористом метилене, упаривали и сушили в вакууме. Получили 2,85 г (92%) белого порошка.  $R_f$  0,36 (Б). Масс-спектр (FAB),  $m/z^+$ : 227, 303, 619 (М).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м. д.): 7,6—6,8 (м, 13H, аром.), 6,45, 6,36 (2 уш. с, 2H,  $\text{NHCONH}$ ), 5,45 (м, 1H, OH), 4,5 (м, 2H, C4), 4,3 (м, 2H, C3), 3,95 (м, 1H,  $\text{CHON}$ ), 3,85 (с, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,6 (м, 2H,  $\text{CONHCH}_2$ ), 3,4 (м, 1H, C2), 3,2 (д, 2H, J 6,4,  $\text{CH}_2\text{O-DMTr}$ ), 2,75 (т, 2H, J 11, C5), 2,2 (т, 2H, J 12, C9), 2,0—1,0 (м, 6H, C6—C8).

*Биотинил-3-амино-О'-диметокситритил-О<sup>2</sup>-(N,N-диизопропиламино-2-цианэтоксифосфинил)-1,2-пропандиол (XV)*. 1 г (1,6 ммоль) спирта (XIV) сушили 24 ч в вакууме над  $\text{P}_2\text{O}_5$ , затем под аргоном переносили в 20 мл сухого хлористого метилена, добавляли 68 мг (0,4 ммоль) сухого тетразолида диизопропиламмония, 0,55 мл (1,7 ммоль) бис-N,N-диизопропиламино-2-цианэтилфосфита и перемешивали под аргоном при 20° С. Когда скорость реакции сильно замедлялась (контроль по ТСХ, система Б + 0,5% триэтиламина, пластинки предварительно выдержаны в элюенте), обычно через 4—4,5 ч, реакционную смесь промывали 50 мл насыщенного раствора  $\text{NaHCO}_3$ , сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), упаривали и быстро чистили на колонке с силикагелем (система Д). Содержащие продукт фракции упаривали и растворяли в 5 мл толуола. После переосаждения в 500 мл пентана растворитель декантировали, осадок растворяли в сухом ацетонитриле, упаривали и сутки сушили в вакууме (при 0,04 Торр). Получали 1,12 г (86%) белого порошка.  $R_f$  0,45 (Б). Масс-спектр (FAB),  $m/z^+$ : 70, 227, 303, 821.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м. д.): 7,6—6,7 (м, 13H, аром.), 6,3, 6,25 (2 уш. с, 2H,  $\text{NHCONH}$ ), 4,8 (м, 2H,  $\text{CH}_2\text{OP}$ ), 4,5 (м, 2H, C4), 4,3 (м, 2H, C3), 4,1 (м, 1H,  $\text{CHOP}$ ), 3,9—3,2 (м, 15H,  $\text{CH}_2\text{OP}$ ,  $\text{OCH}_3$ , C2,  $\text{CONHCH}_2$ ,  $\text{CHN}$ ,  $\text{CH}_2\text{O-DMTr}$ ), 2,9—2,6 (м, 2H, C5), 2,5 (м, 2H,  $\text{NCCH}_2$ ), 2,15 (м, 2H,  $\text{COCH}_2$ ), 1,8—1,1 (м, 18H, C6—C8,  $\text{CHCH}_3$ ).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 147,674 и 147,335.

*Иммобилизация спирта (XIV) на СРГ* выполнялась, как описано в работе [27].

*О'-Диметокситритил-1,3-бутиленгликоль* получали, как описано в работе [10].

*О'-Диметокситритил-О<sup>3</sup>-(N,N-диизопропиламино-2-цианэтоксифосфинил)-1,3-*

бутиленгликоль (XXIV) синтезировали по методике, описанной для соединения (XV). Продукт получали с выходом 85% в виде белого порошка.  $R_f$  0,85 (Г).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 147,985 и 147,443.

**Приготовление носителя.** 1 мл TSK HW-75 промывали на стеклянном фильтре водой (2×15 мл), ацетонитрилом (3×15 мл) и ацетоном (15 мл), затем сутки сушили в вакууме при 0,04 Торр. 10 мг сухого геля помещали в колонку для твердофазного синтеза ДНК и проводили три последовательные конденсации с амидофосфитом (XXIV) и одну конденсацию с амидофосфитом (XV) в микрольном режиме синтеза. Подачу амидита и тетразола на колонку вели в течение 15 с, время конденсации — 1 мин, окисление иодом — 35 с, удаление DMTr-группы — 1,5 мин. После конденсации с (XV) носитель заливали 1 мл 50% раствора триэтиламина в ацетонитриле, через 30 мин промывали ацетонитрилом (3×15 мл), водой, ацетоном и сушили. 10 мг биотинилированного TSK HW-75 инкубировали с 4 мг стрептавидина в 400 мкл 1×PBS (pH 7,4) при 37° С в течение 2 ч. Носитель промывали 5 объемами того же буфера, затем 5 объемами 1×PBS, содержащего 0,1% твин-40.

**Определение емкости носителя.** а)  $^{32}\text{P}$ -меченый олигонуклеотид (рXIX) инкубировали 1 ч с 0,1 мг носителя в 50 мкл 1×PBS. Носитель отмывали тем же буфером. Для определения количества неспецифически сорбируемого материала с таким же количеством носителя инкубировали  $^{32}\text{P}$ -меченый олигонуклеотид (рXX), не содержащий биотина, и далее отмывали 1×PBS, контролируя радиоактивность носителя и смывок с помощью счетчика.

б) Олигонуклеотид (XVIII) инкубировали 1 ч с 0,1 мг носителя в 50 мкл 1×PBS. Носитель отмывали тем же буфером (3×50 мкл). К полученному носителю добавляли  $^{32}\text{P}$ -меченый олигонуклеотид (рXX) в 6×SSC, содержащем 0,1% SDS. Реакционную смесь прогревали 10 мин при 70° С, затем охлаждали до 20° С и промывали 1 М раствором NaCl (3×50 мкл). Радиоактивность носителя определяли с помощью счетчика.

**Периодатное расщепление олигонуклеотидов с диольной вставкой.** а) в растворе. 1 ОЕ<sub>260</sub> лиофилизованного олигонуклеотида (X) растворяли в 75 мкл 0,05 М раствора периодата натрия в воде при 20° С. Через 45—60 мин реакционную смесь обессоливали на колонке (0,6×10 см), заполненной гелем ToyorearI TSK HW-40, и анализировали на 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

б) На носителе. 1 мг носителя, содержащего либо иммобилизованный  $^{32}\text{P}$ -меченый олигонуклеотид (рXIX), либо иммобилизованный дуплекс, состоящий из олигонуклеотида (XVIII) (50 пмоль) и  $^{32}\text{P}$ -меченого олигонуклеотида (рXX), заливали 50 мкл 0,05 М раствора периодата натрия в воде при 20° С. Через 2,5—3 ч носитель промывали водой (3×50 мкл) и определяли на счетчике радиоактивность носителя и промывочных фракций.

Авторы благодарны Т. А. Балашовой за регистрацию  $^1\text{H}$ -ЯМР- и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектров и Ю. П. Козьмину за регистрацию масс-спектров.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coull J. M., Weith H. L., Bishoff R. // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. № 27. P. 3991—3994.
2. Agrawal S., Christodoulou C., Gait M. J. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 15. P. 6227—6245.
3. Connolly B. A. // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. № 7. P. 3131—3139.
4. Sinha N. D., Cook R. M. // *Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16. № 6. P. 2659—2669.
5. Nelson P. S., Sherman-Gold R., Leon R. // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. № 18. P. 7179—7194.
6. Horn T., Chang C.-A., Fultz T. J., Ahle D., Hamren S. J., Urdea M. S. // *Nucl. Acids Res., Symp. Ser.* 1991. № 24. P. 201—202.
7. Urdea M. S., Running J. A., Horn T., Clyne J., Ku L., Warner B. D. // *Gene.* 1987. V. 61. № 3. P. 253—264.

8. *Vasnavev G., Chang C. N., Eisenberg M., Grollman A., Breslauer K. J.*//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 3614—3618.
9. *Seela F., Kaiser K.*//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 7. P. 3113—3129.
10. *Wilk A., Koziolkiewicz M., Grajkowski A., Uznanski B., Stec W. J.*//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 8. P. 2065—2068.
11. *Urdea M. S., Horn T.*//Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. P. 4705.
12. *Connolly B. A.*//Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 12. P. 4485—4502.
13. DYNAL Technical Handbook, 1 ed., 1992.
14. Avidin-Biotin Technology/Eds Bayer E. A., Wilchek M.//Meth. Enzymol. 1990. V. 184.
15. *Bayer E. A., Skutelsky E., Wilchek M.*//Meth. Enzymol. 1979. V. 62. P. 308—315.
16. *Mag M., Luking S., Engels J. W.*//Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 7. P. 1437—1441.
17. *Horn T., Downing K., Gee Y., Urdea M. S.*//9th International Round Table. Nucleosides, Nucleotides and their Biological Applications. 1990. Sweden. P. 30.
18. *Pon R. T.*//Tetrahedron Lett. 1991. V. 32. № 14. P. 1715—1718.
19. *Alves A. M., Holland D., Edge M. D.*//Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 23. P. 3089—3092.
20. *Bengstron M., Paulin L.*//Nucl. Acids Res., Symp. Ser. 1991. № 24. P. 289.
21. *Коршун В. А., Ножевникова Е. В., Берлин Ю. А.*//Биоорган. химия. 1993. Т. 19. № 1. С. 139—141.
22. *Caruthers M. H., Varone A. D., Beaucage S. L., Dodds D. R., Fisher E. F., McBride L. J., Matteucci M., Stabinsky J., Tang J.-Y.*//Meth. Enzymol. 1987. V. 154. P. 287—313.
23. *Nielsen J., Dahl O.*//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 11. P. 3626.
24. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 132—136.
25. *Nelson P. S., Skerman-Gold R., Leon R.*//Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 18. P. 7179—7194.
26. *Рабинков А. Г., Поздnev В. Ф., Амонтов С. В., Копелевич В. М., Гунар В. И.*//Химия природн. соед. 1989. № 3. С. 404—408.
27. *Damha M. J., Giannaris P. A., Zubarylo S. V.*//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 3813—3821.

Поступила в редакцию  
22.III.1994

*M. S. Schepinov, D. S. Esipov, V. G. Korobko, V. N. Dobrynin*

## SELECTIVELY CLEAVABLE SYNTHETIC OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES FOR THE REVERSIBLE IMMOBILIZATION OF DNA

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Key words: avidin-biotin technology, oligonucleotides, immobilization.

A streptavidin-coated TSK-gel support, with the loading capacity of 50—70 nmol of biotinylated substance per gram of dry support, and biotinylated oligonucleotides, containing the 4,9-dithiadodecane-6,7-dihydroxy-1,12-diphosphate insert, were prepared for the reversible immobilization of DNA. A non-nucleotide link can be located either at 5'- or 3'-end of the DNA fragment between the biotin moiety and the nucleotide sequence and is subjected to the selective periodate cleavage at the glycol group, which takes 45 min in solution and 3 h in heterophase. For the incorporation of the cleavable and biotin moieties into synthetic oligonucleotides, the corresponding phosphamidite reagents and biotinylated CPG support were synthesized.

Post address: Laboratory of Gene Chemistry, M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Ul. Miklukho-Maklaya 16/10, V-437, Moscow, GSP-7, 117871, Russia.