



УДК 577.113.6

УДОБНЫЙ НОСИТЕЛЬ ДЛЯ СИНТЕЗА 3'-ФОСФАТОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

© 1995 г. В. А. Ефимов*, А. Л. Калинин, О. Г. Чахмахчева

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 8.08.94 г.

Разработан твердофазный способ получения 3'-фосфатов олигонуклеотидов на носителе на основе стеклянных шариков, модифицированном алкилсульфонилэтильными группировками. С использованием этих носителей автоматический синтез олигонуклеотидов может проводиться по стандартным методикам и программам, разработанным для амидофосфитного и Н-фосфонатного методов.

Ключевые слова: олигонуклеотиды, твердофазный синтез; 3'-фосфаты; амидофосфитный и Н-фосфонатный методы синтеза.

В настоящее время имеется большая потребность в синтетических олигонуклеотидах, несущих на 3'- или 5'-конце амино-, тиольную, карбоксильную и некоторые другие группировки. В ряде случаев, в частности при химическом лигировании, модификации межнуклеотидных связей или получения меченных флуоресцентными красителями фрагментов нуклеиновых кислот, необходимы олигонуклеотиды с 3'-концевой фосфатной группой [1 - 3]. Известен ряд методов синтеза 3'-фосфатов олигонуклеотидов в растворе и на полимерных носителях, которые, однако, не получили широкого распространения ввиду недостатков, связанных как с низкой эффективностью процесса, так и с трудностями при получении соответствующим образом модифицированных полимерных носителей или при работе с ними [4 - 6]. Наиболее перспективен недавно предложенный носитель на основе тионилированного стекла, модифицированного диметокситритилоксиэтил-2-меркаптогруппами, который предусматривает удаление готового олигонуклеотида с носителя обработкой дитиотреитом в присутствии аммиака [7].

Недавно нами было показано, что дипентафторфенилкарбонат является высокоэффективным конденсирующим реагентом в синтезе олигонуклеотидов Н-фосфонатным методом [8]. Кроме того, этот реагент удобен для функционализации полимерных носителей, в частности для присоединения нуклеозид-3'-сукцинатов к аминированному носителю на основе СРГ [9]. Ранее нами

был предложен твердофазный способ синтеза коротких олигомеров в качестве синтонов для фосфотриэфирного синтеза олигонуклеотидов, основанный на использовании в качестве носителя полистирола, модифицированного сульфонилэтильными группировками [10]. В продолжение этих разработок мы использовали подобную группировку для модификации носителя на основе СРГ и исследовали этот носитель в синтезе олигодезоксирибонуклеотидов амидофосфитным и Н-фосфонатным методами.

В качестве исходного материала был взят аминопропил-СРГ, который функционализировали способами, показанными на схемах 1 и 2. В обоих случаях использовались диметокситритильные производные алкилсульфонилэтилсодержащих соединений (III) и (VI). Карбоксисодержащее производное (III) получали диметокситритилированием этилового эфира (I) с последующим омылением этильной группы и активировали обработкой небольшим избытком PFPC в сухом ацетонитриле или дихлорметане в присутствии триэтиламина (схема 1). В свою очередь, соединение (VI) получали тритилированием бис(2-гидроксиэтил)сульфона [11] и превращали его в соответствующий пентафторфениловый эфир обработкой PFPC в присутствии триэтиламина. В обоих случаях пентафторфениловые эфиры (IV) и (VII) образовывались практически с количественным выходом и отделялись от остальных реагентов и образующегося в процессе реакции пентафторфенола осаждением пентаном или фильтрацией через небольшую колонку с силикагелем.

Присоединение производных (IV) и (VII) к аминопропил-СРГ проводили в диметилформамиде или ацетонитриле в присутствии триэтил-

Условные обозначения: PFPC – дипентафторфенилкарбонат, СРГ – шарики из макропористого стекла, СЕ – цианэтил, префикс "d" везде опущен.

*Автор для переписки.

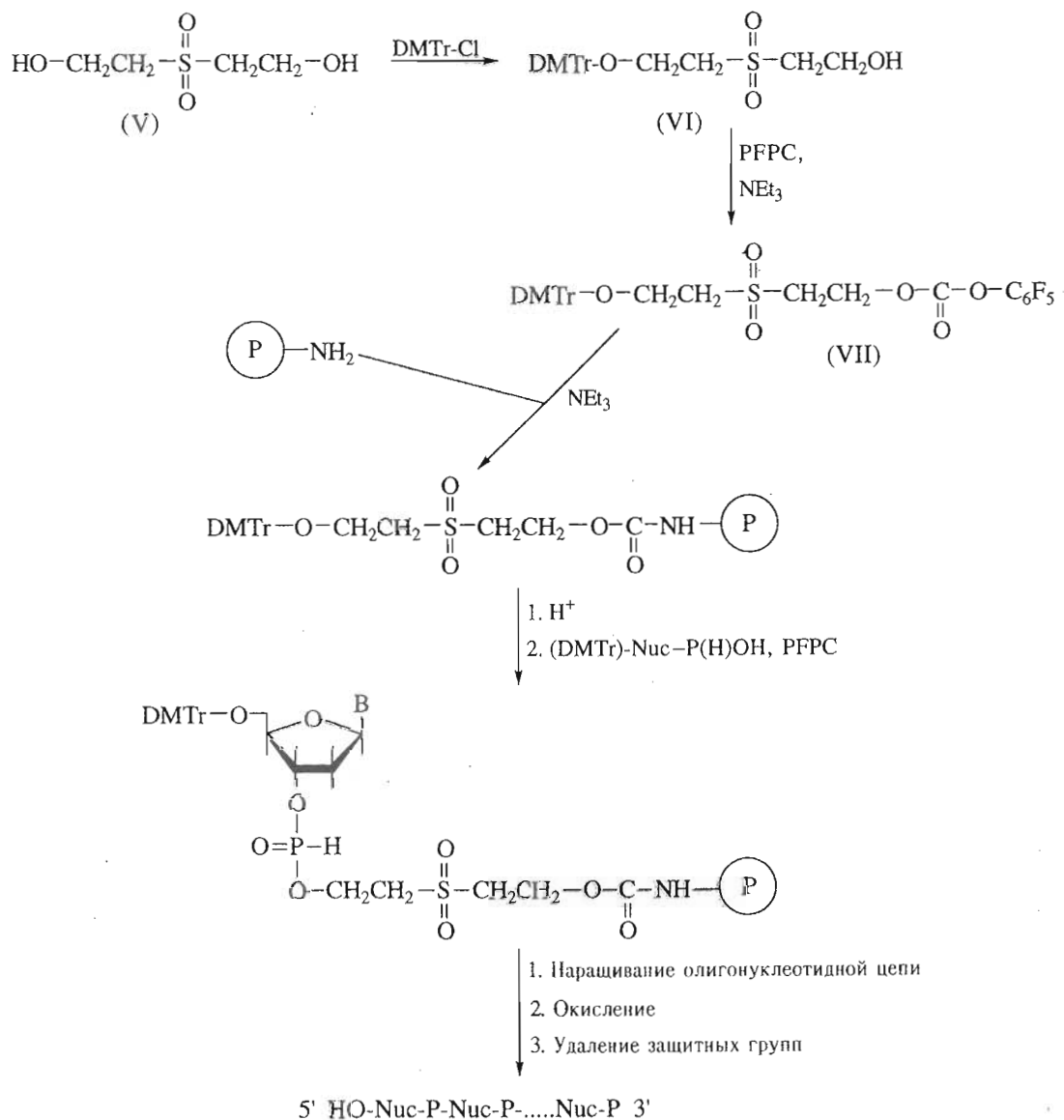


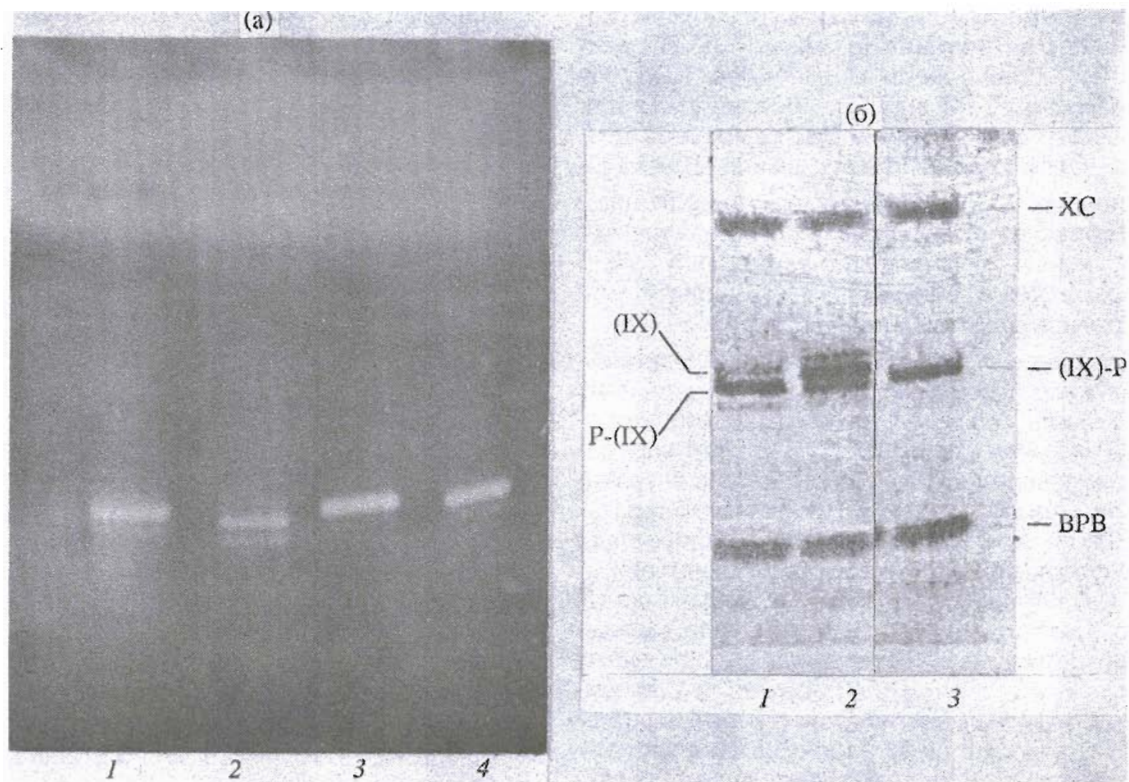
Схема 2.

межнуклеотидной конденсации, так и при остальных обработках в течение стандартного цикла наращивания цепи (удалении диметокситрильной группы, кэпировании и окислении).

Подобно тому как это описывалось ранее [8, 12], в 5'-конец олигонуклеотид-3'-фосфата могут быть введены различные группировки, например липид или полиэтиленгликоль, а для получения 3',5'-дифосфатов олигонуклеотидов после присоединения последнего нуклеотидного звена может быть проведена дополнительная стадия фосфорилирования.

Олигонуклеотид-3'-фосфаты с носителя после завершения синтеза удаляли действием моноэтаноламина или гидразина, как это описано ранее [13], или действием концентрированного аммиака.

Полученные таким образом олигонуклеотиды выделяли электрофорезом в ПААГ, а их гомогенность подтверждали ВЭЖХ. Как можно видеть на рисунке, 3'-фосфаты олигонуклеотидов (VIII)-P и (IX)-P имели при электрофорезе несколько большую подвижность, чем олигонуклеотиды (VIII, IX) с той же последовательностью оснований без концевых фосфатных групп, синтезированные на стандартных SPG, функционализированных сукцинатами нуклеозидов. Для сравнения подвижности фосфорилированных и нефосфорилированных олигонуклеотидов на электрофорезе использовались 5'-фосфаты олигонуклеотидов P-(VIII) и P-(IX), полученные введением фосфатной группы в соединения (VII) и (IX) с помощью АТР и Т4-полинуклеотидкиназы.



Электрофорез в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины, после удаления защитных групп: а – 15-звенного олигонуклеотида d(ATCGCTTCTGTACT) (VIII), не содержащего (1, 3) и содержащего (2, 4) 3'-фосфатную группу, полученного Н-фосфонатным (1, 2) и амидофосфитным (3, 4) методом, фотография в УФ-свете после прокрашивания геля этидий-бромидом; б – 14-звенного олигонуклеотида d(CTTTCTTTCTCTT) (IX), полученного Н-фосфонатным методом, с 3'-фосфатной группой (3), с 5'-фосфатом, введенным в (IX) с помощью АТР и Т4-полинуклеотидкиназы (1), а также смеси нефосфорилированного олигонуклеотида (IX) и его 3'-фосфата (2). Фотография в отраженном УФ-свете.

Таким образом, было показано, что представленные в данной работе носители могут быть с успехом использованы для эффективного синтеза 3'-фосфатов олигонуклеотидов амидофосфитным или Н-фосфонатным методами на серийных синтезаторах по стандартным программам. Синтез подобных носителей достаточно прост, и для работы на них не требуется получения специальных производных нуклеозидов, отличных от коммерчески доступных амидофосфитов или Н-фосфонатов. Кроме того, удаление олигонуклеотида с носителя может проводиться действием аммиака, моноэтаноламина или гидразина, обычно применяемых для этих целей в практике олигонуклеотидного синтеза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались: носитель на основе аминопропил-CPG фирмы Fluka (50 мкмоль аминогрупп на 1 г); диметокситритилхлорид и бис(2-гидроксиэтил)сульфон (Aldrich, США); 3'-Н-фосфонаты и 3'-фосфоамидиты дезоксинуклеозидов (Millipore, США); пиридин, ацетонитрил, дихлор-

метан, диметилформамид, трис (Merck, ФРГ), Т4-полинуклеотидкиназа (Pharmacia, Швеция). Этиловый эфир 2-гидроксиэтилсульфонилуксусной кислоты был любезно предоставлен С.В. Ревердатто (Пердью Университет, США).

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F254 (Merck, ФРГ). Для обессоливания олигонуклеотидов использовали колонки NAP-10 и NAP-25 (Pharmacia, Швеция), соединения элюировали 0.05 М ТЕАВ.

Карбоксисодержащее производное (III). Этиловый эфир 2-гидроксиэтилсульфонилуксусной кислоты (I) (35 ммоль) вводили в реакцию с диметокситритилхлоридом (50 ммоль) в 100 мл сухого пиридина. Через 5 - 6 ч в реакционную смесь прибавляли воду и продукт (II) экстрагировали хлороформом. Органическую фазу упаривали, остаток растворяли в 300 мл смеси пиридин-этанол-2 М NaOH (1 : 3 : 2). Через 20 мин смесь нейтрализовали добавлением даукса-50 (PyH⁺). Смолу отфильтровывали, промывали 70% водным пиридином. После добавления триэтиламина (10 мл) фильтрат упаривали, остаток растворяли в хлороформе. Целевой продукт (III) выделяли

хроматографией на силикагеле в линейном градиенте концентрации метанола (0 - 10%) в хлороформе. Выход составил 30 ммоль (60%). Соединение (III) активировали обработкой 1,2-кратным избытком PFPC в сухом ацетонитриле или дихлорметане в течение 1 ч при комнатной температуре в присутствии триэтиламина (1.2 экв.).

Соединение (VI) получали тритилированием бис(2-гидроксиэтил)сульфона и превращали его в соответствующий пентафторфениловый эфир (VII) обработкой PFPC (1.1 экв.) в течение 40 мин в присутствии триэтиламина (1.2 экв.).

Аминопропил-CPG (1 г) функционализировали действием избытка пентафторфенилового эфира (IV) или (VII) (0.25 ммоль на 1 г аминопропил-CPG) в сухом диметилформамиде (4 мл), содержащем триэтиламин (0.1 мл). После встряхивания в течение 6 - 8 ч при комнатной температуре носитель отфильтровывали и промывали диметилформамидом (2 × 10 мл), ацетонитрилом (2 × 10 мл), эфиром (3 × 10 мл) и высушивали в вакууме. Затем носитель обрабатывали смесью уксусный ангидрид-1-метилимидазол-ацетонитрил (1 : 1 : 8) в течение 1 ч и промывали ацетонитрилом (2 × 10 мл), метанолом (10 мл), эфиром (3 × 10 мл) и высушивали. Продукт анализировали на содержание диметокситритильной группы как описано ранее [8].

Твердофазный синтез олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих и не содержащих концевую 3'-фосфатную группировку, проводился по стандартным программам на синтезаторе фирмы Applied Biosystems, модель 381A (США) в масштабе 1, 0.2 и 10 мкмоль (см. также [10, 12]). 5'-Фосфаты олигонуклеотидов получали с помощью T4-полинуклеотидкиназы согласно [14]. Деблокирование синтетических олигодезоксирибонуклеотидов проводили так, как описано в работе [13].

Выделение олигонуклеотидов после удаления защитных групп осуществляли электрофорезом в ПААГ, содержащем 7 М мочевины (рисунок).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shabarova Z.A., Dolinnaya N.G., Drutsa V.L., Melnicova N.P., Pural A.A. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 21. P. 5747 - 5761.
2. Пурмаль А.А., Друца В.Л., Шабарова З.А. // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. № 3. С. 394 - 400.
3. Bower M., Summers M.F., Kell B., Hoskins J., Zon G., Wilson W.D. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 8. P. 3531 - 3547.
4. Gough G.R., Brunden K.J., Gilham P.T. // Tetrahedron Lett. 1983. V. 24. № 48. P. 5317 - 5320.
5. Felder E., Schwyzer R., Charubalā R., Pfeleiderer W., Schultz B. // Tetrahedron Lett. 1984. V. 25. № 36. P. 3967 - 3969.
6. Markiewicz W.T., Wyrzykiewicz T.K. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 18. P. 7149 - 7158.
7. Kumar P., Bose N.K., Gupta K.C. // Tetrahedron Lett. 1991. V. 32. № 7. P. 967 - 970.
8. Efimov V.A., Kalinkina A.L., Chakhmakhcheva O.G. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. № 23. P. 5337 - 5344.
9. Ефимов В.А., Калинкина А.Л., Чахмахчева О.Г. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. № 3. С. 323 - 326.
10. Efimov V.A., Buryakova A.A., Reverdatto S.V., Chakhmakhcheva O.G., Ovchinnikov Yu.A. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 23. P. 8369 - 8387.
11. Horn T., Urdea M. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. P. 4705 - 4708.
12. Ефимов В.А., Пашкова И.Н., Калинкина А.Л., Чахмахчева О.Г. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. № 8. С. 800 - 804.
13. Полушин Н.Н., Пашкова И.Н., Ефимов В.А. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 8. С. 1145 - 1148.
14. Maxam A.M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499 - 560.

A Convenient Support for the Synthesis of Oligonucleotide 3'-Phosphates

V. A. Efimov,¹ A. L. Kalinkina, and O. G. Chakhmakhcheva

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia

Abstract — A solid phase method for the synthesis of oligonucleotide 3'-phosphates using an alkylsulfonylethyl controlled pore glass support was developed. Using this support, the automated synthesis of oligonucleotides can be performed according to standard procedures and programs developed for phosphoroamidite and H-phosphate methods.

Key words: oligonucleotides, solid phase synthesis, 3'-phosphates, phosphoroamidite and H-phosphate methods of synthesis.

¹To whom correspondence should be addressed.