



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32.07

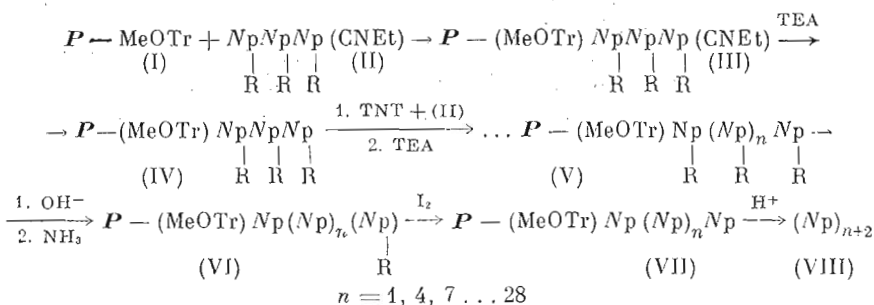
ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ПОЛИДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ МОДИФИЦИРОВАННЫМ ТРИЭФИРНЫМ МЕТОДОМ

Амирханов Ш. В., Гумарев В. П., Ривкин М. И.,
Рыбаков В. Н.

*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Широко известный метод синтеза олигонуклеотидов на полимере основан на использовании защищенных нуклеозид-3'-фосфатов и арилсульфотетразолидов в качестве конденсирующих агентов. При этом происходит конденсация полимер-нуклеозидного компонента с фосфатным компонентом в растворе, а цепь удлиняется в направлении 3'→5' [1]. Основным недостатком этого метода является наличие кислотной обработки на каждом шаге наращивания для удаления диметокситритильной защиты.

Нами была исследована возможность блочного синтеза олиго- и полинуклеотидов в направлении 5'→3', включающего конденсацию полимер-нуклеотидного компонента (IV) с нуклеозидным компонентом (II) в растворе (см. схему).



R=SCH₃, P — MeOTr — полимерный носитель с монометокситритильными якорными группами, N — N-защищенный нуклеозид, CNEt — 2-цианэтил; TEA — триэтиламин, TNT — *n*-толуолсульфо-3-нитро-1,2,4-триазол.

Такой метод позволяет исключить кислотную обработку полимера на каждом шаге наращивания, поскольку при этом проводят β-элиминирование CNEt-защиты с 3'-фосфата с помощью триэтиламина. По такой схеме, исходя из тринуклеотидных блоков, нами синтезированы политимидловая и полиадениловая кислоты длиной 31 и 30 нуклеотидных звеньев соответственно.

Вместо обычно используемых в триэфирном синтезе мономеров с *n*-Cl-фенильной фосфатной защитой нами использованы мономеры с SMe-защитой фосфатных групп. Это исключило необходимость дополнительного синтеза 3'-концевых блоков, так как SMe-группа легко удаляется с концевого 3'-дифирного фосфата (VI) обработкой последнего раствором иода в водном пиридине [2]. Из соответствующих полностью защищенных мономеров по стандартной триэфирной схеме [3] нами синтезированы тринуклеозидтрифосфатные блоки (II), которые были использованы как для присоединения к полимеру, так и для дальнейшего наращивания

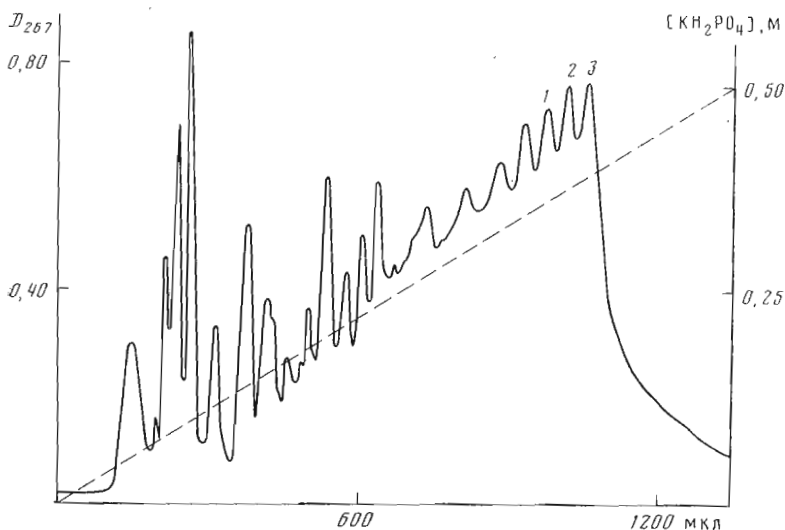


Рис. 1

Рис. 1. Микроколоночная ионообменная хроматография полинуклеотидной смеси, содержащей $(Tr)_{31}$, после отщепления от полимера. Хроматографию проводили на аминокроме в градиенте калий-фосфатного буфера, pH 7,0 (колонка 1×50 мм): 1 — $(Tr)_{25}$; 2 — $(Tr)_{28}$; 3 — $(Tr)_{31}$

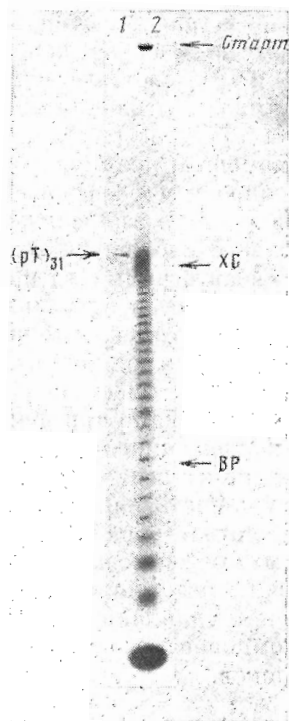


Рис. 2. Авторадиография электрофореграммы продуктов неполного гидролиза $(pT)_{31}$ в 20% полиакриламидном геле. Полоса 1 — исходный продукт $(pT)_{31}$ до гидролиза, полоса 2 — $(pT)_{31}$ после частичного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда. XE — ксиленианол, BR — бромфеноловый синий

Рис. 2

олигонуклеотидной цепи на полимере. В качестве полимерного носителя использовали привитый на поверхность политетрафторэтилена полистирол с монометокситритильными якорными группами [4].

В случае синтеза полиадениловой кислоты к тритилхлоридной смоле (I) присоединяли тринуклеотидный блок (II) (емкость полимер-тринуклеотида 60 мкмоль/г). При синтезе $(Tr)_{31}$ вначале к полимеру присоединяли мономерный блок $Tr(SMe, CNEt)$ (емкость полимер-нуклеотида 100 мкмоль/г) и затем проводили дальнейшее наращивание цепи тринуклеотидными блоками. Все реакции твердофазного синтеза вели без перемешивания в установке, описанной Гайтом [5]. Каждая стадия наращивания включала удаление цианэтильной защиты и межнуклеотидную конденсацию; конденсации на полимере проводили в 0,05–0,1 М пиридиновом

растворе тринуклеотида (II) (5–10-кратный избыток относительно первого нуклеотидного звена на полимере) в присутствии 1,5–2-кратного избытка конденсирующего агента *n*-толуолсульфо-3-нитро-1,2,4-триазолида относительно тринуклеотида (II) (3 ч, 20° С).

Цианэтильную группу удаляли обработкой полимер-нуклеотида смесью триэтиламин — пиридин, 1:1 (3–6 ч, 20° С). SMe-Защитные группы с межнуклеотидных фосфатов в конце синтеза удаляли обработкой полимер-полинуклеотида (V) 0,1 н. NaOH в смеси диоксан — вода, 4:1 (16 ч, 20° С). Аммонолиз проводили 30% NH₃ (10 ч, 60° С). Полностью деблокированные полинуклеотиды отщепляли от полимера по методике [4]. После каждой стадии наращивания отбирали часть носителя для анализа полученной полинуклеотидной смеси на полимере. Такую смесь после полного деблокирования и отщепления от полимера подвергали микроколоночной хроматографии на аминохrome. Выход на отдельных стадиях колебался от 70 до 100%.

На рис. 1 показана микроколоночная хроматография конечной полинуклеотидной смеси, содержащей (Tr)₃₁ (пик (3)). Целевые полинуклеотиды выделяли препаративной ионообменной хроматографией на аминохrome в градиенте калий-фосфатного буфера, pH 7,0. Хроматографически гомогенные унтриконтатамидилат и триконтатаденилат после рехроматографии были получены с выходом 0,3 и 0,7% соответственно, считая на исходный моно- и тринуклеотид, присоединенный к полимеру, что соответствует среднему выходу на каждой из 10 стадий для (Tr)₃₁ и 9 стадий для (Ar)₃₀ 56 и 75% соответственно, если не учитывать потерь при отщеплении от полимера и деблокировании. Для доказательства длины полученных продукты (Tr)₃₁ и (Ar)₃₀ дефосфорилировали, метили [³²P]ATP по 5'-концу с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 и далее подвергали частичному гидролизу фосфодиэстеразой змеиного яда. После гель-электрофореза полученного гидролизата в 20% полиакриламидном геле на радиоавтограммах наблюдали для (pT)₃₁ 31 полосу (рис. 2) и для (pA)₃₀ 30 полос (радиоавтограмма не приведена).

Таким образом, нами показана принципиальная возможность твердофазного синтеза олигонуклеотидной цепи в направлении от 5'-конца к 3'-концу, исходя из защищенных нуклеозид-3'-фосфатов. Предложенный нами метод синтеза имеет по крайней мере два преимущества перед традиционными методами триэфирного твердофазного синтеза. Во-первых, выходы при конденсации на каждом шаге наращивания и выходы конечного продукта не зависят от того, какой полинуклеотид синтезируется на полимере — пуриновый или пиримидиновый, так как в данном случае исключается кислотная обработка на каждой стадии, ведущая к апуринизации. Во-вторых, метод позволяет использовать одинаковый тип моно-, дили или тринуклеотидных блоков как для присоединения к полимеру, так и для дальнейшего удлинения путем конденсации последних с полимер-нуклеотидным компонентом, что значительно сокращает число исходных нуклеотидных блоков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Miyoshi K., Miyake T., Hozumi T., Itakura K. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 22, p. 5473–5489.
2. Sommer H., Cramer F. Angew. Chem. internat. Edit. Engl., 1972, v. 11, № 8, p. 717–718.
3. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353–371.
4. Potapov V. K., Veiko V. P., Koroleva O. N., Shabarova Z. A. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 6, p. 2041–2056.
5. Gait M. J., Sheppard R. C. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 4, p. 1135–1158.

Поступило в редакцию
6.VIII.1981

SOLID-PHASE SYNTHESIS OF FOLYDEOXYRIBONUCLEOTIDES BY A MODIFIED PHOSPHOTRIESTER METHOD

AMIRKHANOV N. V., KUMAREV V. P., RIVKIN M. I., RYBAKOV V. N.

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The possibility of synthesis of oligo- and polydeoxyribonucleotides on a polymeric support was investigated. The synthesis was conducted by triester method; the chain was grown in 5'→3' direction with polymer-bound phosphate component activation using protected nucleoside 3'-phosphates as starting material. The same trinucleotides with internucleotide phosphate groupings blocked by S-methyl residues were attached to polymer support through their 5'-hydroxyl groups and used for chain elongation both as intermediates and 3'-terminal fragments. Each elongation step involved removing of CNet protection groups and condensation of the polymer-bound nucleotide component with nucleoside component present in solution. Starting from such trinucleotide blocks and one monomer block attached to polymer support, polythymidylic and polyadenylic acids consisting of 31 and 30 nucleotide residues were synthesized in 0,3% and 0,7% yields, respectively.