



УДК 577.143.6:542.95

АВТОМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ

II. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕГМЕНТНЫХ НОСИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

*Ломакин А. П., Попов С. Г.**Всероссийский научно-исследовательский институт
молекулярной биологии, пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Для автоматического твердофазного синтеза олигонуклеотидов получены сегментные носители на основе целлюлозы с высокой нагрузкой защищенного нуклеозида (100–300 мкмоль/г). Они использованы в синтезе пяти олигодезоксирибонуклеотидов длиной 13–18 звеньев на установке «Виктория-2» в автоматическом режиме. Одновременное проведение некоторых стадий конденсации и использование моно- и динуклеотидов для наращивания олигонуклеотидной цепи позволило существенно сократить общее время синтеза.

Искусственные фрагменты ДНК, полученные как химическим, так и химико-ферментативным путем, играют в настоящее время важную роль в развитии целого ряда направлений молекулярной биологии. Успехи, достигнутые в области химического синтеза фрагментов ДНК, позволяют быстро получать достаточно протяженные олигодезоксирибонуклеотиды [1, 2]. Однако синтез большого числа олигонуклеотидов, в совокупности составляющих последовательность какого-либо гена длиной в несколько сотен пар оснований, до сих пор представляет сложную задачу. Выполнение ее требует больших затрат времени и человеческих ресурсов, так как каждый олигонуклеотид синтезируется отдельно (либо несколько олигонуклеотидов — параллельно).

Недавно был предложен альтернативный подход, позволяющий получать большое число олигонуклеотидов одновременно на так называемых сегментных носителях на основе целлюлозы (бумажных дисках) [3]. Этот подход позволил синтезировать олигодезоксирибонуклеотиды, составляющие нуклеотидную последовательность гена α -интерферона (514 пар оснований), за две недели [4]. Несмотря на большое число операций при использовании такой методики (в одном цикле конденсации — 18 операций), все они проводились вручную. Цель настоящей работы — исследование возможности применения сегментных носителей на основе целлюлозы в автоматическом синтезе олигодезоксирибонуклеотидов.

Ранее сообщалось, что отечественные установки для твердофазного синтеза олигонуклеотидов успешно использовались для химического синтеза фрагментов ДНК как в полуавтоматическом («Виктория-1») [5], так и в автоматическом режиме («Виктория-2») [6]. Реактор колоночного типа установки «Виктория-2» с изменяющимся внутренним объемом (0,1–5 мл) позволяет загружать в него несколько десятков целлюлозных дисков диаметром 10 мм. В предварительном эксперименте мы установили, что 20 целлюлозных дисков, помещенных в реактор установки «Виктория-2», легко отмывались растворителями (пиридином, хлорформом) в автоматическом режиме и их большое число не влияло на скорость элюции.

Одной из основных задач в синтезе на сегментных носителях является увеличение нагрузки первого нуклеозидного звена. Нагрузка в 20–

Принятые сокращения: MS — мезитилсульфонилхлорид, TPS — трипропилбензолсульфонилхлорид, MeIm — N-метилимидазол, ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография. Остальные сокращения даны в соответствии с рекомендациями IUPAC — IUB. Префикс «d» (дезоксид) в формулах нуклеотидов для краткости опущен.

Карта операций для одного цикла наращивания цепи *

Операции	Растворители и реагенты	Время, мин
1. Деблокирование	3% CF ₃ COOH в 1,2-дихлорэтано	6
2. Промывка	Хлороформ	8
3. »	Пиридин	3
4. »	Абс. пиридин	10
5. Конденсация	(I) или (II), MS, MeIm (1:3:9), абс. пиридин	90-180
6. Промывка	Пиридин	3
7. »	Хлороформ	8

* Структуру нуклеотидов (I) и (II) см. в табл. 3.

Таблица 2

Выходы олигонуклеотидов, синтезированных на целлюлозных дисках

Олигонуклеотид	Исходное количество нуклеотида на носителе, мкмоль	Количество стадий конденсации	Выход продукта после ВЭЖХ, %	
			на исходный нуклеозид	средний в расчете на стадию конденсации
1. АТААГАТАТТГТТ (III)	2,27	8	1,64	60
2. ААТТСТСГАТТАТТ (IV)	2,14	8	2,68	64
3. ААТТТСТСГТААААГ (V)	4,55	8	1,77	61
4. ТТТТАТАТТАТТААТТ (VI)	2,14	8	3,03	65
5. ТТАТСГААТТААТААТАТ (VII)	2,37	11	1,71	69

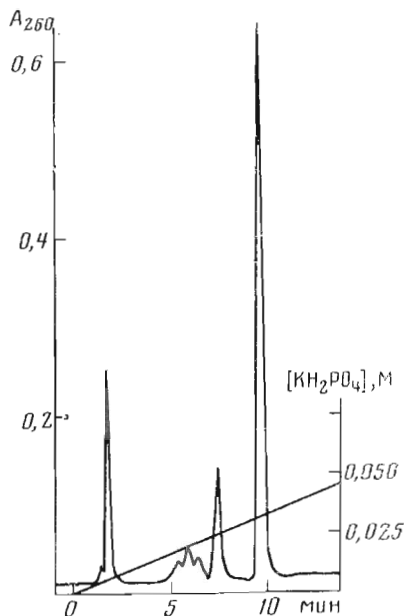
30 мкмоль на 1 г носителя, полученная в работе [3], представлялась нам недостаточной, так как при такой нагрузке один целлюлозный диск (Whatman 3 MM) диаметром 1 см содержал лишь ~0,5 мкмоль нуклеозида. Мы изменили условия присоединения нуклеозида к целлюлозе, воспользовавшись опубликованной недавно методикой модификации носителей на основе силикагеля [1]. Целлюлозные диски, предварительно высушенные азеотропным упариванием с абс. пиридином, обрабатывали 2 ч раствором 5'-О-диметокситритилтимидин-3'-О-сукцината, триизопробилбензолсульфонилхлоридом и метилимидазолом (в соотношении 1:3:9) в абс. пиридине, затем промывали абс. пиридином. Оставшиеся незамещенными ОН-группы блокировали с помощью смеси MeIm — уксусный ангидрид — абс. пиридин (1:2:20, 30 мин). Количество введенного 5'-О-диметокситритилтимидина составило 128 мкмоль на 1 г носителя. Аналогичным образом были получены целлюлозные носители, содержащие в 1 г 290 мкмоль 5'-О-диметокситритил-N⁶-бензоилцитидина, 108 мкмоль 5'-О-диметокситритил-N⁶-бензоиладенозина и 191 мкмоль 5'-О-диметокситритил-N²-изобутирилгуанозина.

Количество нуклеозида, присоединенного к целлюлозному носителю по описанному выше способу, существенно зависит от концентрации защищенного дезоксирибонуклеозид-3'-О-сукцината в реакционной смеси. Так, изменяя концентрацию 5'-О-диметокситритилтимидин-3'-О-сукцината в пределах 0,1-0,25 М, мы получили ряд целлюлозных носителей, содержащих 52, 128, 494 мкмоль 5'-О-диметокситритилтимидина на 1 г носителя*.

Возможность получать с помощью описанного выше способа целлюлозные носители с высокой нагрузкой нуклеозидов обусловлена не только заменой конденсирующего агента (по сравнению с [3]), но, по-видимому, и тем, что целлюлозные диски перед реакцией присоединения нуклеозидов

* Носитель, содержащий 494 мкмоль защищенного нуклеозида, имел рыхлую структуру и оказался непригодным для синтеза олигонуклеотидов из-за недостаточной механической прочности.

Рис. 1. Ионообменная ВЭЖХ реакционной смеси, полученной в автоматическом синтезе тетрагидримидинтрифосфата $(Tr)_3T$ на целлюлозных дисках, после удаления всех защитных групп; колонка с Partisil 10 SAX (3,2×250 мм), градиент 0–0,3 М KH_2PO_4 (рН 6,5) в 30% CH_3CN , скорость элюции 1 мл/мин



высушивали азеотропным упариванием с абс. пиридином. При попытке осуществить присоединение нуклеозида к целлюлозным дискам в реакторе установки «Виктория-2», где высушивание дисков осуществлялось с помощью промывки абс. пиридином в течение 15 мин со скоростью 100 мл/ч, количество введенного 5'-О-диметокситритилтимидина составило лишь 25 мкмоль на 1 г носителя. Это указывает на то, что промывка дисков абс. пиридином менее эффективна для удаления следов влаги, чем азеотропное упаривание с абс. пиридином.

После выполнения данной работы появилась статья [6], в которой применен аналогичный способ увеличения нагрузки бумажных дисков до 80 мкмоль/г с помощью мезитиленсульфонилнитротриазола и N-метилпимидазола.

Для проверки пригодности носителей на основе целлюлозы при автоматическом твердофазном синтезе олигодезоксирибонуклеотидов мы осуществили синтез тетрагидримидинтрифосфата $(Tr)_3T$, который оказался удобной моделью для проверки свойств носителей [7]. Два целлюлозных диска, содержащих 4,4 мкмоль 5'-О-диметокситритилтимидина, помещали в реактор установки «Виктория-2». Деблокирование 3% CF_3COOH в 1,2-дихлорэтано [8] и все промывки дисков осуществляли с помощью блока электронного управления. Карта операций для одного цикла приведена в табл. 1. Скорость промывок 100 мл/ч. Для наращивания цепи использовали 0,1–0,15 М раствор 5'-О-диметокситритилтимидин-3'-*n*-хлорфенилфосфата в абс. пиридине, активированного смесью мезитиленсульфонилхлорида и метилпимидазола, который вводили в реактор с помощью шприца. Отщепление $(Tr)_3T$ от носителя и полное деблокирование осуществляли последовательной обработкой смесью конц. аммиак – пиридин (9:1, 72 ч при 20°С) и 80% уксусной кислотой (30 мин при 20°С). Реакционную смесь анализировали методом ионообменной ВЭЖХ на колонке с Partisil 10 SAX (рис. 1). Выходы, определенные по $(MeO)_2TrOH$ [9], составили 84 и 73% для 1-й и 2-й стадии конденсации. После ионообменной ВЭЖХ было выделено 35% $(Tr)_3T$ (средний выход на стадии конденсации составил 71%).

Полученные результаты позволили нам приступить к автоматическому синтезу пяти целевых олигодезоксирибонуклеотидов длиной 13–18 звеньев на целлюлозных дисках (табл. 2). Поскольку для синтеза этих олигонуклеотидов был использован один реактор установки «Виктория-2», это позволило на отдельных стадиях объединять несколько дисков (2–5 шт.) для одновременного проведения деблокирования, промывок и конденса-

Олиго- нуклеотид	Моно- (I) * или динуклеотидный (II) блок,										
	(III)				AT	A	AT				
(IV)		AA					T	TC	TC	G	
(V)		AA	TT					TC	TC	G	
(VI)	TT		TT	AT		AT					
(VII)	TT 19	18	17	16	A 15	14	13	12	TC 11	G 10	A 9

* (I) — [(MeO)₂Tr]N¹P(PhCl); (II) — [(MeO)₂Tr]N¹P(PhCl)N²P(PhCl); N¹, N² = T, bzC, bzA,

цш. Согласно выбранному нами оптимальному плану синтеза (табл. 3), для получения всех пяти олигодезоксирибонуклеотидов требовалось проведение 19 стадий конденсации вместо 71 (при использовании мононуклеотидов) или 37 стадий (при использовании динуклеотидов).

Наращивание олигонуклеотидных цепей осуществлялось фосфотриэфирным методом с помощью защищенных моно- (I) и динуклеотидных блоков (II), активированных смесью мезитилсульфонилхлорида и метилимидазола в абс. пиридине. Последовательность и продолжительность операций аналогична приведенной в табл. 1.

Отщепление от носителей и полное деблокирование проводили в условиях, описанных выше. После предварительного обессоливания реакционных смесей на колонке с биогелем P-2 целевые продукты выделяли методом ионообменной ВЭЖХ на колонке с Partisil 10 SAX в градиенте калийфосфатного буфера (рис. 2). Выделенные олигодезоксирибонуклеотиды обессоливали на колонке с Lichrosorb RP-18 в градиенте ацетонитрила (выходы приведены в табл. 2). Гомогенность синтезированных олигонуклеотидов подтверждена электрофорезом в полиакриламидном геле, а их первичная структура — методом Максама — Гилберта [10].

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования сегментных носителей на основе целлюлозы в автоматическом твердофазном синтезе олигонуклеотидов. Предложенный недавно синтез на сегментных носителях предлагался именно как ручной вариант, позволяющий за короткое время синтезировать одновременно большое число олигонуклеотидов [3]. Установки для автоматического синтеза отвергаются в этом подходе из-за их большой стоимости и недостаточной надежности [3, 11]. Очевидно, что использование автоматических установок для синтеза олигонуклеотидов позволяет существенно упростить предлагаемую в работе [3] методику синтеза и может привести к значительной экономии труда, времени, а также растворителей и реагентов. Установка для автоматического синтеза «Виктория-2», хорошо зарекомендовавшая себя в синтезе олигонуклеотидов фосфотриэфирным методом [7], располагает двумя гидравлическими стойками, т. е. делает возможным проведение одновременного синтеза в двух реакторах. Кроме того, конструкция установки «Виктория-2» позволяет использовать, по крайней мере на промывках и деблокировании, четыре реактора, присоединенные последовательно, по одному реактору для каждого из четырех защищенных мононуклеотидов (I). Это дает возможность одновременного синтеза большого числа олигонуклеотидов по аналогии с [3], но в автоматическом режиме.

Таким образом, в настоящей работе получены сегментные носители на основе целлюлозы с высокой нагрузкой защищенного нуклеозида (100–300 мкмоль на 1 г носителя), которые были использованы для автоматического синтеза пяти олигодезоксирибонуклеотидов длиной 13–18 звеньев на установке «Виктория-2». Одновременное проведение некоторых кондеп-

(III)–(VII) на целлюлозных дисках

используемый в конденсации								Нуклеозид на носителе
	ТА		ТТ		G	Т		Т
АТ	ТА					Т		Т
	ТА			АА			А	G
	ТА		ТТ	АА		Т		Т
АТ	ТА	АТ		АА		Т	А	Т
8	7	6	5	4	3	2	1	№ стадии конденсации

ibG; PhCl — *n*-хлорфенил.

садий с помощью моно- и динуклеотидных блоков позволило существенно сократить общее количество стадий и время синтеза. Полученные результаты показывают, что установка «Виктория-2» с модифицированной гидравлической схемой весьма перспективна для одновременного синтеза большого числа олигонуклеотидов в автоматическом режиме.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксирибонуклеозиды (НИКТИ БАВ, Бердск), целлюлозные диски (Whatman 3 MM, Англия) диаметром 1 см, MS, TPS, *N*-метилимидазол (Fluka, Швейцария).

Защищенные моно- и динуклеотиды получали по методу, описанному в работе [12]. Защищенные нуклеозид-3'-О-сукцинаты получали по методике [13].

Твердофазный синтез олигонуклеотидов проводили в реакторе колоночного типа на установке для автоматического синтеза олигонуклеотидов «Виктория-2» (производство СКТБ СЭ и АП СО АН СССР, Новосибирск) с модифицированной гидравлической схемой [7] в автоматическом режиме с помощью блока электронного управления.

Ионообменную ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Altex 322 (США) на колонке (3,2×250 мм) с Partisil 10 SAX (Whatman, Англия); для обессоливания использовали колонки (3,2×250 мм) с Lichrosorb RP-18 (Merck, ФРГ).

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Perkin — Elmer 550 (США).

Иммобилизация первого нуклеозидного звена. Смесь 10 целлюлозных дисков (0,15 г), 0,2 ммоль защищенного нуклеозид-3'-О-сукцината и 1,8 ммоль (0,15 мл) MeIm высушивали азеотропным упариванием с абс. пиридином (3×10 мл), прибавляли 2 мл абс. пиридина и 0,6 ммоль (0,18 г) TPS. Через 2 ч диски промывали абс. пиридином (4×5 мл), прибавляли 0,1 мл MeIm, высушивали азеотропным упариванием с абс. пиридином (3×10 мл), прибавляли 2 мл абс. пиридина и 0,2 мл свежеперегнанного уксусного ангидрида. Через 30 мин диски промывали пиридином (6×10 мл), этанолом (3×10 мл) и эфиром (3×10 мл). Количество введенного нуклеозида, определенное спектрофотометрически по (MeO)₂TiOH (ϵ_{499} 71 700 в смеси HClO₄ — C₂H₅OH, 3 : 2, [9]), составило 128, 290, 108 и 191 ммоль/г для Т, С, А и G соответственно.

Иммобилизация 5'-О-диметокситригилтимидина на установке «Виктория-2». Помещали 10 целлюлозных дисков (0,15 г) в реактор установки «Виктория-2» и промывали хлороформом (6 мин), пиридином (4 мин) и абс. пиридином (15 мин). Растворитель выдавливали осушенным воздухом (10 с) и в реактор подавали раствор 0,2 ммоль 5'-О-диметокситригилтимидин-3'-О-сукцината (0,15 г), 1,8 ммоль (0,15 мл) MeIm, высушенных

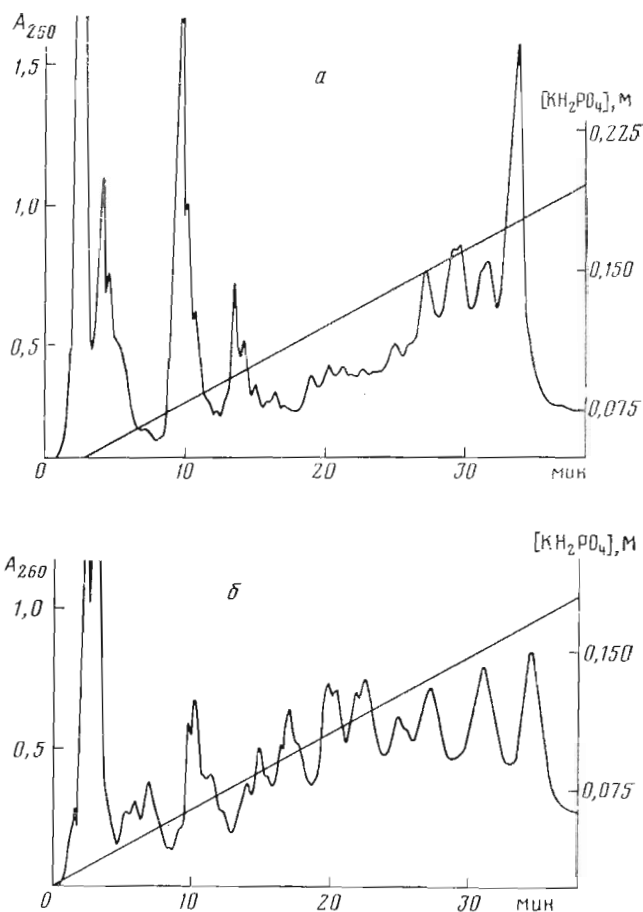


Рис. 2. Ионнообменная ВЭЖХ реакционных смесей, полученных в автоматическом синтезе олигонуклеотидов ААТТСТСГАТТАТТ (IV) (а) и ТТГТАТАТТААТТ (VI) (б). Условия ВЭЖХ см. подпись к рис. 1, градиент KH_2PO_4 , 0,02–0,3 М

азеотропным упариванием с абс. пиридином (3×5 мл), и 0,6 ммоль (0,18 г) TPS в 2 мл абс. пиридина. Носитель с этим раствором выдерживали 2 ч без перемешивания, промывали абс. пиридином (15 мин) и в реактор подавали 2,3 мл смеси N-метилимидазола, уксусного ангидрида и абс. пиридина (1 : 2 : 20). Через 30 мин диски промывали пиридином (10×5 мл), этанолом (4×5 мл) и эфиром (3×5 мл). Количество введенного 5'-O-диметокситритилтимидина, определенное по [9], составило 25 мкмоль на 1 г носителя.

Проведение одного цикла на целлюлозном носителе. Целлюлозные диски (1–5 шт.), содержащие нуклеозид, помещали в реактор установки «Виктория-2», через который пропускали растворители (пиридин, хлороформ, абс. пиридин) или раствор 3% CF_3COOH в 1,2-дихлорэтане со скоростью 100 мл/ч. Последовательность и время пропускания запрограммировались с помощью блока электронного управления и указаны в табл. 1. При необходимости определения выхода в реакции конденсации по $(\text{MeO})_2\text{TgOH}$ элюаты детритилирующего раствора и следующего за ним хлороформа собирали. Перед каждой последующей операцией реактор освобождался от растворителя (или раствора) с помощью осушенного воздуха в течение 10 с. После промывки носителя абс. пиридином и выдавливания растворителя осушенным воздухом в реактор подавали 0,1–0,15 М раствор нуклеотида (I) или (II) (не менее 3 экв. в расчете на общее количество первого нуклеозида для 1–5 дисков), MeIm, предварительно высушенных азеотропным упариванием с абс. пиридином (3×5 мл), и MS

в абс. пиридине. Носитель с этим раствором выдерживали 1,5–3 ч, изредка встряхивая. Перед деблокированием 3% CF_3COOH в 1,2-дихлорэтано реактор раскрывали и изменяли комбинацию дисков в соответствии с табл. 3, после чего повторяли перечисленные в табл. 1 операции.

Деблокирование и выделение олигонуклеотидов. После проведения последней стадии конденсации диски промывали пиридином (6×5 мл) и обрабатывали по отдельности 5 мл смеси конц. аммиак–пиридин (9:1) в течение 72 ч при 20° С. Носитель отфильтровывали и промывали 50% спиртом (3×3 мл) и водой (3×3 мл). Объединенные фильтраты упаривали досуха, остаток обрабатывали 80% уксусной кислотой (3 мл, 30 мин при 20° С) и после упаривания обессоливали на колонке с биогеелем Р-2. Выделение деблокированных олигодезоксирибонуклеотидов проводили с помощью ионообменной ВЭЖХ на колонке с Partisil 10 SAX в градиенте концентрации калийфосфатного буфера в 30% CH_3CN . Фракции, содержащие олигонуклеотид, обессоливали на колонке с Lichrosorb RP-18 в градиенте ацетонитрила (5–20%) в 0,05 М триэтиламмонийацетатном буфере. Выходы синтезированных олигонуклеотидов приведены в табл. 2. Последовательность нуклеотидов в синтезированных олигомерах подтверждена анализом по методу Максама – Гилберта [10].

Авторы выражают благодарность С. И. Ястребову и Н. К. Данилюк за проведение анализов последовательностей олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Efimov V. A., Buryakova A. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. *Nucleic Acids Res.*, 1983, v. 11, № 23, p. 8369–8387.
2. Cao T. M., Bingham S. E., Sung M. T. *Tetrahedron Lett.*, 1983, v. 24, № 10, p. 1019–1020.
3. Frank R., Heikens W., Heisterberg-Moutsis G., Blöcker H. *Nucleic Acids Res.*, 1983, v. 11, № 13, p. 4365–4377.
4. Blöcker H., Frank R. *Umschau*, 1983, v. 83, № 19, p. 562–563.
5. Попов В. К., Потемкин Г. А., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Средин Ю. Г., Шабарова Э. А., Кнорре Д. Г. Докл. АН СССР, 1982, т. 263, № 6, с. 1386–1389.
6. Matthes H. W. D., Zenke W. M., Grundström T., Staub A., Wintzerith M., Chambon P. *EMBO J.*, 1984, v. 3, № 4, p. 801–805.
7. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. *Биоорг. химия*, 1985, т. 11, № 7, с. 920–926.
8. Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Быстров Н. С., Северцова И. В., Колосов М. И. *Биоорг. химия*, 1983, т. 9, № 5, с. 706–710.
9. Ohtsuka E., Takashima H., Ikehara M. *Tetrahedron Lett.*, 1982, v. 23, № 30, p. 3081–3084.
10. Maxam A. M., Gilbert W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.
11. *New scientist*, 1981, v. 89, № 1238, p. 261 (*РЖ Биол.*, 1982, 4 Б 96).
12. Силяков А. Н., Ломакин А. И., Ялшиков В. Ф., Попов С. Г. *Биоорг. химия*, 1982, т. 8, № 4, с. 490–498.
13. Gait M. J., Singh M., Sheppard R. C., Edge M. D., Greene A. R., Heathcliff G. R., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F. *Nucleic Acids Res.*, 1980, v. 8, № 5, p. 1081–1096.

Поступила в редакцию
23.X.1984
После доработки
22.II.1985

AUTOMATED SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES. II. USE OF SEGMENTAL SOLID SUPPORTS BASED ON A CELLULOSE

LOMAKIN A. I., POPOV S. G.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo,
Novosibirsk region*

Segmental solid supports based on a cellulose with high contents of protected nucleosides have been prepared and used in automated synthesis of five oligodeoxyribonucleotides 13 to 18 units long on a synthesizer «Victoriya-2». The total time of the synthesis was considerably decreased due to simultaneous elongations of several oligonucleotides with mono- and dinucleotides.