



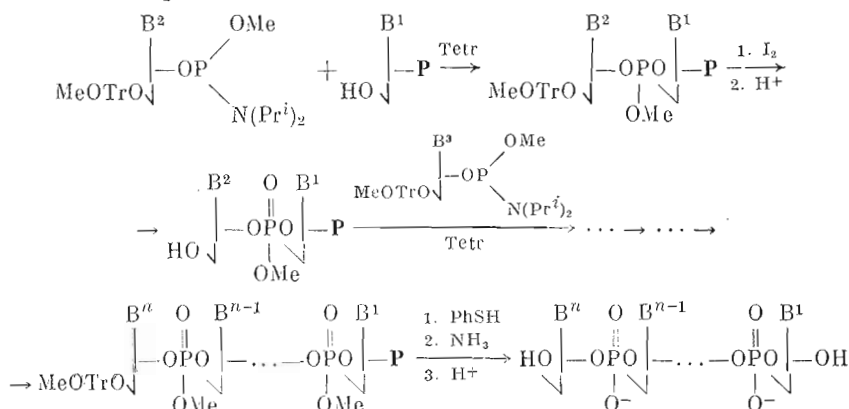
УДК 577.113.6:542.95

ПОЛНОСТЬЮ АВТОМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ ФОСФИТАМИДНЫМ МЕТОДОМ НА СИНТЕЗАТОРЕ «ВИКТОРИЯ-4М»

Грязнов С. М., Потапов В. Е., Метелев В. Г.,
Ёлов А. А., Шурмаль А. А., Шабарова З. А.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет, *Межфакультетская проблемная научно-исследовательская
лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского,
Москва*

В настоящее время одной из актуальных проблем биоорганической химии является автоматизация олигонуклеотидного синтеза. Проводимые в нашей стране работы [1] завершились в настоящее время созданием автоматического синтезатора олигонуклеотидов «Виктория-4М», функциональные характеристики и конструкционные особенности которого будут описаны. В настоящем сообщении представлены результаты, полученные при использовании синтезатора «Виктория-4М» для быстрого синтеза протяженных (до 29-звенных) олигодезоксирибонуклеотидов (далее префикс d (дезоксид) всюду опущен) по фосфитной схеме [2, 3] в полностью автоматическом режиме.



В качестве исходных мономеров использовались 5'-О-метокситригидрил-N-бензоил-3'-(N,N-диизопропиламид)метилфосфиты нуклеозидов. Такой выбор обусловлен высокой стабильностью этих соединений в условиях длительного хранения, что важно именно для автоматического синтеза, а также большей скоростью образования межнуклеотидной связи (менее 2 мин) по сравнению с другими фосфитамидами [3, 4]. Каждый цикл присоединения одного нуклеотидного звена осуществляли согласно экспериментально определенной карте-схеме операций, представленной в таблице. Время одного цикла составляет 12 мин, что не превышает продолжительности цикла для лучших известных регламентов синтеза [3, 5]. Следовательно, на синтез 20-звенного олигонуклеотида требуется 4 ч машинного времени, а общий объем растворителей, расходуемых на 1 стадию, не превышает 18 мл. В целом на автомате «Виктория-4М» по рас-

Сокращения: MeOTr — n-метокситригидрил; Tetr — тетразол; TFA — трифторуксусная кислота; P — полимерный носитель.

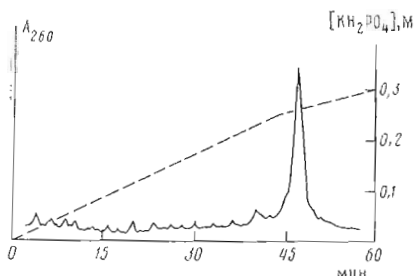


Рис. 1

Рис. 1. Новообменная ВЭЖХ реакционной смеси, полученной при синтезе эйкозануклеотида AGACATATTTTGTAATTGTA; носитель — Partisil 10SAX (4,6 × 250 мм), 45° С, градиент KH_2PO_4 (0—0,3 М, рН 6,5) в 30% CH_3CN ; скорость элюции 2,5 мл/мин, хроматограф Altex (США)

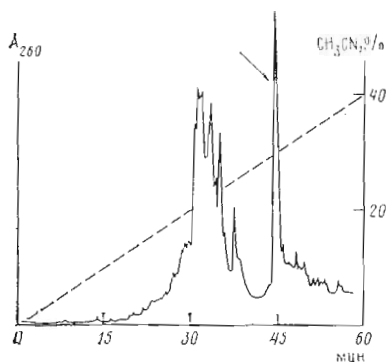
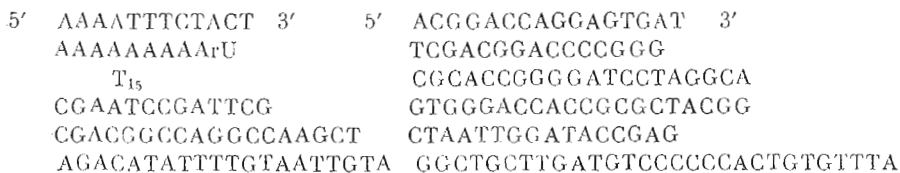


Рис. 2

Рис. 2. Обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционной смеси, полученной при синтезе нонакозануклеотида (MeOTr) GGCTGCTTGATGTCCCCCACTGTGTTTA, пик конечного продукта на рис. 2 отмечен стрелкой; носитель — Zorbax C-8 (4,6 × 250 мм), 45° С, градиент CH_3CN (0—40%) в 0,1 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$; рН 6,5; скорость элюции 1 мл/мин, хроматограф Altex (США)

сматриваемой схеме было проведено 237 синтетических циклов, что потребовало 47 ч машинного времени, а с начала испытаний синтезатора уже осуществлено более 500 циклов. В качестве полимерного носителя был использован хорошо зарекомендовавший себя в олигонуклеотидном синтезе силохром марки С-80 отечественного производства [6].

В результате на синтезаторе «Виктория-4М» в полностью автоматическом режиме был осуществлен синтез двенадцати 10—29-звенных олигонуклеотидов, предназначенных для различных молекулярно-биологических исследований; их нуклеотидные последовательности представлены ниже:



Карта-схема операций автоматического синтезатора олигонуклеотидов «Виктория-4М»

№	Операция	Реагент	Время или объем
1	Промывка	CH_2Cl_2	30 с
2	Дезитилирование	0,1 М TFA в CH_2Cl_2	1 мин
3	Промывка	CH_2Cl_2	30 с
4	»	CH_3CN	1 мин
5	Дозировка нуклеотидного компонента	0,1 М (MeO)TrONucOP(OMe)N(Pr ⁱ) ₂	120 мкл
6	Дозировка конденсирующего реагента	0,5 М Tetr в CH_3CN	120 мкл
7	Циркуляция	№ 5 + № 6	2 мин
8	Промывка	CH_3CN	30 с
9	Окисление	0,2 М I ₂ Pu : AcOH = 9 : 1	30 с
10	Промывка	CH_3CN	30 с
11	Кеширование	Ac ₂ O : Et ₃ N : MeIm : CH_3CN = 4,5 : 4,5 : 1 : 30	2,5 мин
12	Промывка	CH_3CN	30 с

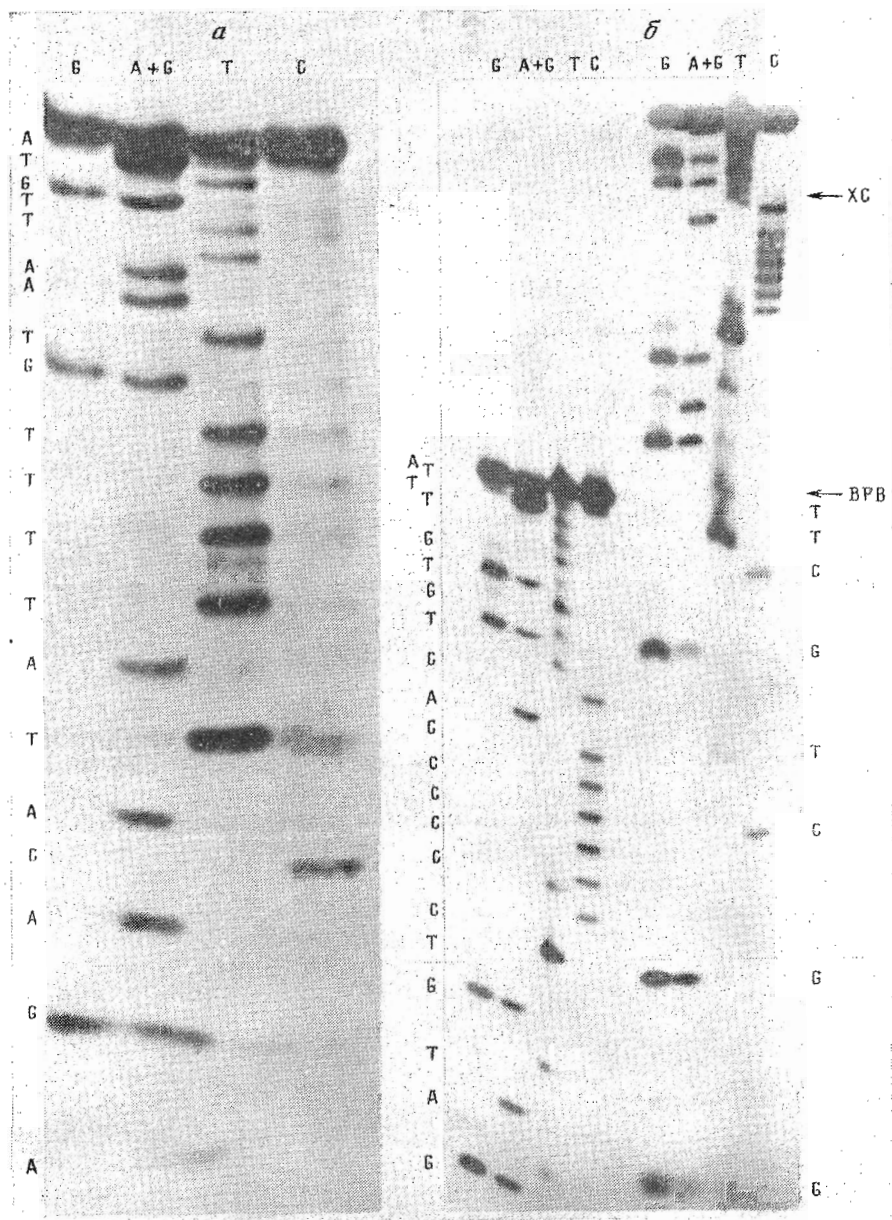


Рис. 3. Анализ нуклеотидной последовательности по методу Максама — Гилберта [7] эйкозануклеотида AGACATATTTTGTAAATTGTA (*a*) и нонакануклеотида GGCTGCTTGATGTCCCCCACTGTGTTTA (*b*)

Средняя степень превращения на каждой стадии в расчете на удаляемую монометокситригильную группу составляет 94—96%, а выходы в пересчете на вещество, выделенное после ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ или только обращенно-фазовой ВЭЖХ, равны 85—92%. Характерные профили элюции реакционных смесей, получаемых при синтезе олигонуклеотидов после удаления защитных групп, представлены на рис. 1 и 2. Первичная структура синтезированных олигонуклеотидов подтверждена методом Максама — Гилберта [7] (рис. 3). Таким образом, высокие выходы (до 98%) на каждой стадии, малая продолжительность цикла присоединения одного нуклеотидного звена (12 мин), а также хорошая воспроизводимость результатов в рассмотренном фосфитамидном варианте синтеза позволяют сделать вывод о возможности эффективного использования синтезатора «Виктория-4М» для синтеза 20-звенных и более протяженных олигонуклеотидов любой последовательности.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Потапов В. К., Потемкин Г. А., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Средин Ю. Г., Шабарова З. А., Кнорре Д. Г.* Докл. АН СССР, 1982, т. 263, № 6, с. 1336—1389.
2. *Beaucage S., Caruthers M. H.* Tetrahedron Lett., 1981, v. 22, № 20, p. 1895—1862.
3. *Adams S. P., Kavka K. S., Wykes E. I., Holder S. B., Galluppi G. R.* J. Amer. Chem. Soc., 1983, v. 105, № 3, p. 661—663.
4. *McBride L. I., Caruthers M. H.* Tetrahedron Lett., 1983, v. 24, № 3, p. 245—248.
5. *Warner B. D., Warner M. E., Karus G. A., Ku L., Brown-Shimer S., Urdea M. S.* DNA, 1984, v. 3, № 25, p. 401—411.
6. *Ломakin А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г.* Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 7, с. 920—926.
7. *Maxam A. M., Gilbert W.* Meth. Enzymol., 1980, v. 65, p. 499—560.

Поступило в редакцию
21.I.1986

FULLY AUTOMATED SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES BY AMIDOPHOSPHITE APPROACH USING «VICTORY-4M» SYNTHESIZER

GRYAZNOV S. M., POTAPOV V. K., METELEV V. G.*, YOLOV A. A.,
PURMAL A. A., SHABAROVA Z. A.

*Department of Chemistry and * A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology
and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

A rapid synthesis of a set of 10—29-mer oligonucleotides was carried out by amidophosphite approach using «Victory-4M» synthesizer in a fully automatic regime. Average yields at each step of the synthesis reached 98%.