



УДК 577.113.6.057 : 546.284

СИЛИКАТНЫЕ ШИРОКОПОРИСТЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ СИНТЕЗА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

*Ястребов С. И., Ломакин А. И., Горбунов Ю. А.,
Карнышев Н. Н.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт
молекулярной биологии, пос. Кольцово Новосибирской обл.*

При твердофазном синтезе олигонуклеотидов увеличение емкости по первому нуклеозиду позволяет уменьшить объем носителя и за счет этого значительно сократить продолжительность промывок и расход растворителей, ускорить синтез в целом [1, 2].

Наиболее употребимыми в последнее время для синтеза олигонуклеотидов являются силикагели и пористые стекла. Однако для широкопористых носителей с диаметром пор более 50 нм характерна сравнительно низкая емкость [3]. С целью повышения емкости носителей нами проверена возможность увеличения количества легко модифицируемых групп на поверхности кремнеземов путем создания тонких полимерных покрытий с помощью полифункциональных реагентов. Наиболее приемлемыми для этого оказались кремнеземы с диаметром пор 1000 Å и более. В качестве полимеров были выбраны полиэтиленмин (ПЭИ) и поливиниловый спирт (ПВС), которые хорошо сорбируются на поверхности пор силикагелей; при этом образуется покрытие, толщина которого перед закреплением легко регулируется промывкой подходящими растворителями [4, 5].

Полиэтиленминное покрытие получали на аминопропил-Силохроме С-20 или на аминопропилстекле СРG-10 с контролируемым размером пор (см. таблицу). Носители обрабатывали янтарным ангидридом в присутствии 4-N,N-диметиламинопиридина для введения якорных карбоксильных групп [6], а затем 1 или 10% раствором ПЭИ (молекулярная масса 30—40 тыс.) в этаноле. Избыток модифицирующего реагента отмывали этанолом, а сорбированный ПЭИ присоединяли к карбоксильным группам с помощью дициклогексилкарбодимида и диметиламинопиридина в пиридине.

Характеристики широкопористых силикатных носителей с полимерным покрытием и результаты синтеза на них олигонуклеотидов *

Номер	Тип носителя	Использованный полимер	Диаметр пор, нм	Удельная поверхность, м ² /г	Емкость по нуклеозиду, мкмоль/г	Синтезированный олигонуклеотид	Средний выход на стадию, %	
							по (MeO) ₂ ГгОН	после ВЭЖХ
1	Силохром С-20	ПЭИ	130	15—25	102	ACTCTTT	90	77
2	СРG-10 **	»	220	17	45	ACTCTTT	90	75
3	СРG-10	»	220	17	126	ACTCTTT	89	77
4	Силохром С-20 ***	ПВС	130	15—25	82	T ₂ CACA ₃ C ₂ ACT ₂ C ₂ A	93	84
5	СРG-10 ***	»	220	17	156	GATCGTAG ₂ C ₃ TATAGC TACGTACGCGC	96	89

* Носители 1—3 проверяли в синтезе олигонуклеотидов фосфотриэфирным, а носители 4—5 — фосфитным методами.

** Носитель обрабатывали 1% ПЭИ в этаноле; в случае носителей 1 и 3 — 10% ПЭИ.

*** Носитель со спейсером из двух остатков аминокпроновой кислоты [2].

Носители с полным покрытием готовили обработкой Силохрома С-20 или СРГ-10 1% водным раствором ПВС (молекулярная масса 80 тыс.), избыток реагента отмывали водой. Сорбированный ПВС закрепляли в порах носителей поперечной сшивкой диэпоксидной смолой ДЭГ-4 в присутствии эфира трифтористого бора [7].

К полученным таким образом носителям присоединяли нуклеозидсукцины в условиях, описанных в работе [2]: количество первого нуклеозида при этом варьировалось от 45 до 156 мкмоль/г (таблица). Проверку носителей в синтезе олигодезоксирибонуклеотидов проводили как автоматизированным фосфотриэфирным [8], так и шприцевым фосфитным [9] методами. Средние выходы на стадиях конденсации, определенные по количеству диметокситриэтилкарбинола, составляли 85–96% (таблица) и были сравнимы с результатами, полученными в синтезе на других силикатных носителях этими методами [6, 8, 9].

Таким образом, нами показано, что с помощью полифункциональных реагентов удается значительно увеличить емкость широкопористых силикатных носителей, пригодных для синтеза олигонуклеотидов различными методами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Minganti C., Ganesh K. N., Sproat B. S., Gait M. J.* // *Anal. Biochem.* 1985. V. 147. № 1. P. 63–74.
2. *Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г.* // *Биооргац. химия.* 1986. Т. 12. № 2. С. 213–219.
3. *Köster H., Biernat J., McManus J., Wolter A., Stumpe A., Narang C. K., Sinha N. D.* // *Tetrahedron.* 1984. V. 40. № 1. P. 103–112.
4. *Alpert A. J., Regnier F. E.* // *J. Chromatogr.* 1979. V. 185. № 3. P. 375–392.
5. *Айлер Р.* *Химия кремнезема.* Т. 2. М.: Мир, 1982. С. 973–979.
6. *Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г.* // *Биооргац. химия.* 1985. Т. 11. № 7. С. 920–926.
7. *Hieten S., Rosengren J., Pahlmann S.* // *J. Chromatogr.* 1974. V. 101. № 2. P. 281–288.
8. *Ломакин А. И., Ястребов С. И., Горбунов Ю. А., Сажуков В. В., Попов С. Г.* // *Химия природн. соединений.* 1986. № 3. С. 386.
9. *Карпышев Н. Н., Ястребов С. И., Попов С. Г.* // *Биооргац. химия.* 1985. Т. 11. № 10. С. 1361–1366.

Поступило в редакцию
11.III.1987
После доработки
19.V.1987

MACROPOROUS SILICA SUPPORTS FOR OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS

YASTREBOV S. I., LOMAKIN A. I., GORBUNOV Yu. A., KARPYSHEV N. N.

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

Polyethyleneimine and polyvinylalcohol have been used to increase loading of macroporous silica supports. The supports modified contained up to 156 μ moles of the nucleoside per gramm and were successfully tested in automated phosphotriester and syringe phosphoramidite syntheses of oligodeoxyribonucleotides up to 30 bases long.