



УДК 547.963.057

© 1990 г.

*М. Г. Исагуллыц, В. В. Самошин, И. В. Макеева,
В. Д. Смирнов*

ЭФФЕКТИВНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГО(ПОЛИ)ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ Н-ФОСФОНАТНЫМ МЕТОДОМ В ПЛАСТИКОВОЙ МИКРОКОЛОНКЕ

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР, Москва

Описана простая методика ручного твердофазного синтеза олиго(поли)дезоксирибонуклеотидов Н-фосфонатным методом, основанная на использовании в качестве колонок наконечников к автоматическим пипеткам. По предлагаемой методике синтезировано более 40 олигонуклеотидов с длиной цепи от 12 до 55 звеньев; описано их клонирование в плазмидные векторы.

Синтетические фрагменты ДНК находят все более широкое применение в работах как молекулярно-биологического, так и медицинского характера. В связи с этим актуальной остается разработка простых и экономичных методик, позволяющих проводить синтез без специальной аппаратуры. Наиболее перспективен для ручного синтеза, по-видимому, Н-фосфонатный метод [1, 2], в котором число операций при наращивании цепи меньше, чем в фосфоамидитном [3], а используемые синтоны устойчивы к действию влаги и кислорода воздуха. В литературе описаны методики ручного твердофазного синтеза в стеклянных колонках [4, 5], различных пластиковых колонках [6], шприцах [3, 7, 8]. В настоящей работе описана простая методика ручного Н-фосфонатного синтеза олиго(поли)нуклеотидов в одноразовых пластиковых микроколонках и молекулярное клонирование полученных соединений.

Синтез проводили в масштабе от 0,1 до 1,2 мкмоль на носителе Long Chain Amino CPG-500 с навесками полимера до 15 мг. В качестве колонок использовали 1-мл наконечники к автоматическим пипеткам с фильтром из силиконизированной стекловаты, который в отличие от стеклянного не засоряется, обеспечивая высокую скорость потока реагентов через колонку. Реагенты и растворители подавали на колонку шприцами и продавливали через нее током сухого воздуха. Непосредственно перед конденсацией колонку переключали снизу так, чтобы свободное пространство под фильтром было минимальным, затем вводили растворы Н-фосфонатов нуклеозидов и пивалоилхлорида (табл. 1) и перемешивали содержимое колонки движением поршня присоединенной к ней автоматической пипетки (при синтезе в шприце эти операции затруднены). При проведении конденсации в наконечнике объем реакционной смеси минимален (до 60 мкл), что обуславливает малый расход реагентов, несмотря на их высокую концентрацию (табл. 1). Выход на стадию конденсации, определенный по поглощению диметокситритил-катиона при 498 нм, составлял 97—98%; препаративный выход, рассчитанный после выделения олигонуклеотидов, — 86—88%.

После окончания синтеза олигонуклеотид окисляли [1], деблокировали и выделяли электрофорезом в денатурирующем ПААГ (см., например, рис. 1), после чего анализировали электрофорезом в ПААГ в виде 5'-³²P-фосфатов.

Сокращения: ПААГ — полиакриламидный гель, HBV — вирус гепатита В человека, HIV — вирус иммунодефицита человека.

Схема операций одного цикла наращивания цепи

Номер операции	Операция	Растворители, реагенты	Объем, мкм	Время, с
1	Деблокирование	2,5% CCl ₃ COOH в CH ₂ Cl ₂	3×300	50–70
2	Промывка	Абс. CH ₂ Cl ₂	2×300	20–25
3	»	Абс. CH ₃ CN/Py (7 : 3)	3×300	20–25
4	Конденсация	0,2 М ФН* в CH ₃ CN/Py (1 : 1) и 1,25 М пивалоилхлорид в CH ₃ CN/Py (1 : 1), перемешивание	25–30 25–30	50–60
5	Промывка	Абс. CH ₃ CN/Py	2×300	20–25
6	»	Абс. CH ₂ Cl ₂	3×300	20–25

* Н-Фосфонат нуклеозида.

Таблица 2

Сравнение методик Н-фосфонатного синтеза

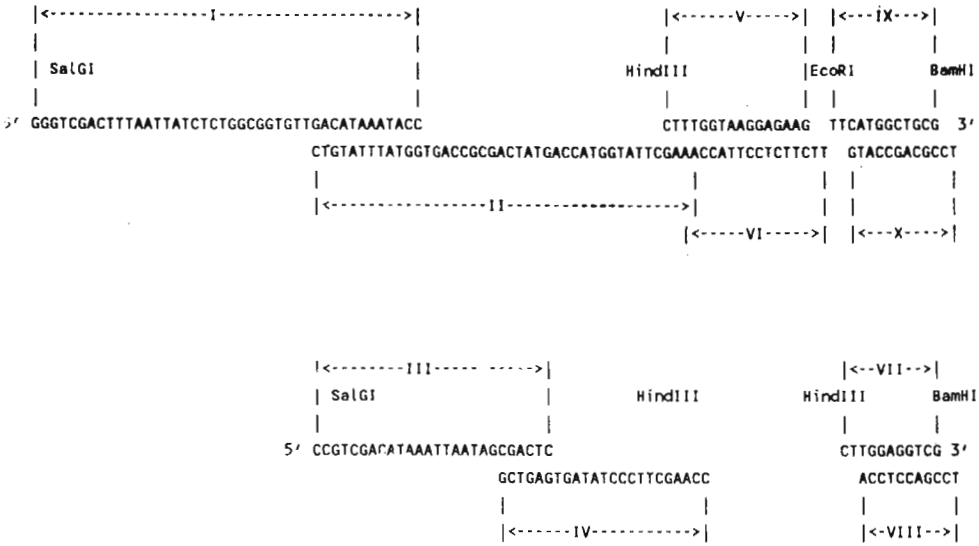
Параметр	Автоматический синтез на «Ген-2М» [9]	Синтез в шприце [8]	Синтез в пластиковой микроколонке
Длительность цикла, с	70–120	Около 300	180–230
Масштаб синтеза, мкмоль	0,15–0,25	0,7–0,8	0,1–1,0
Расход на стадию: растворителей (суммарный), мл;	5,0–6,6	3,0	3,0
Н-фосфонатов нуклеозидов, мкмоль;	12	5–7	5
деблокирующей смеси, мл	2,5–3,3	0,6	0,9
Синтезированные олигонуклеотиды (максимальное описанное число звеньев в цепи)	83	30	55

Сопоставление предлагаемой нами методики с методиками, используемыми при синтезе в шприце [8] и в автоматическом режиме на приборе «Ген-2М» [9] (см. табл. 2), показывает, что настоящий вариант метода эффективен, экономичен и позволяет получать протяженные олиго(поли)нуклеотиды.

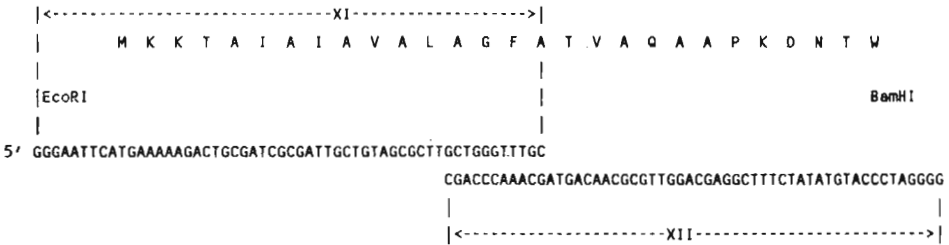
По этой методике мы синтезировали более 40 олигонуклеотидов размером 12–55 звеньев, в том числе кодирующие ряд антигенных детерминант HIV-I [10] и HBV [11], нетранслируемые регуляторные области — P_L (I/II)- и T7 (III/IV)-промоторы, различные варианты последовательности Шайн — Дальгарно (V–VIII), фрагменты, задающие точку инициации трансляции (IX, X), а также ген сигнального пептида белка OmpA *E. coli* (XI/XII), олигонуклеотиды для сайт-мутажнеза участков, прилегающих к стартовому кодону генов 12 (XIII) и 23 (XIV) бактериофага T4, и др. (схема). Первичную структуру олигонуклеотидов подтверждали секвенированием по Максому — Гилберту [12] (см., например, рис. 2).

Синтезированные олигонуклеотиды были клонированы в плазмидные векторы; клонирование фрагментов ДНК, кодирующих антигенные детерминанты HIV-I и HBV, будет описано в отдельных публикациях. Клонирование дуплексов (V/VI), (VII/VIII), (IX/X), фланкированных неполными рестриктными сайтами, проводилось как описано ранее [10, 13]. Структуру фрагментов в составе рекомбинантных плазмид подтверждали секвенированием по методу Максима — Гилберта [12]. В качестве примера (рис. 3) представлена нуклеотидная последовательность олигонуклеотида (IX), клонированного в составе дуплекса (IX/X) в рекомбинантную плазмиду pCSG 2-195, которая была получена на основе описанной ранее pMM 24 [14]. Плазмиды pCSG 2-195 содержит ген β-галактозидазы со вставкой участка из преS2-области белка оболочки HBV; ATG-кодон на 5'-конце последовательности, кодирующей гибридный белок, обеспечивает его трансляцию. Клоны, содержащие плазмиду со вставкой, отбирали по появлению β-галактозидазной активности, их структуру подтверждали рестрикционным анализом.

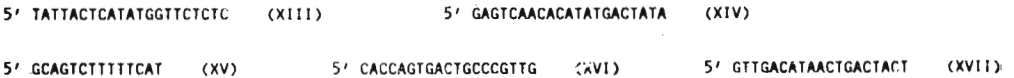
α



δ



β



Структура синтезированных Н-фосфонатным методом олигонуклеотидов (I—XVII): (а) нетранслируемые регуляторные элементы: (I/II) — P_L⁻, (III/IV) — T7-промоторы, V/VI и VII/VIII — варианты последовательности Шайн — Дальгарно; IX/X — содержит точку инициации трансляции; (б) (XI/XII) — кодируют сигнальный пептид белка OmpA *E. coli* (сверху указана аминокислотная последовательность); (в) (XIII), (XIV) предназначены для сайт-мутagenеза участков, примыкающих к ATG-кодону генов 12 (XIII) и 23 (XIV) бактериофага T4 для введения *MdeI*-сайта; (XV) — *λgt11*-праймер, (XVI), (XVII) — праймеры для секвенирования олиго(полп)-нуклеотидных вставок в гены *lacZ* (XVI) и белка нуклеокапсида HBV (XVII)

Для клонирования дуплексов (I/II), (III/IV), (IX/XII) (схема) проводили их достройку с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I [15, с. 123]. После обработки рестриктазами (указаны на схеме), которую контролировали с помощью аналитической полимеразной достройки [15,

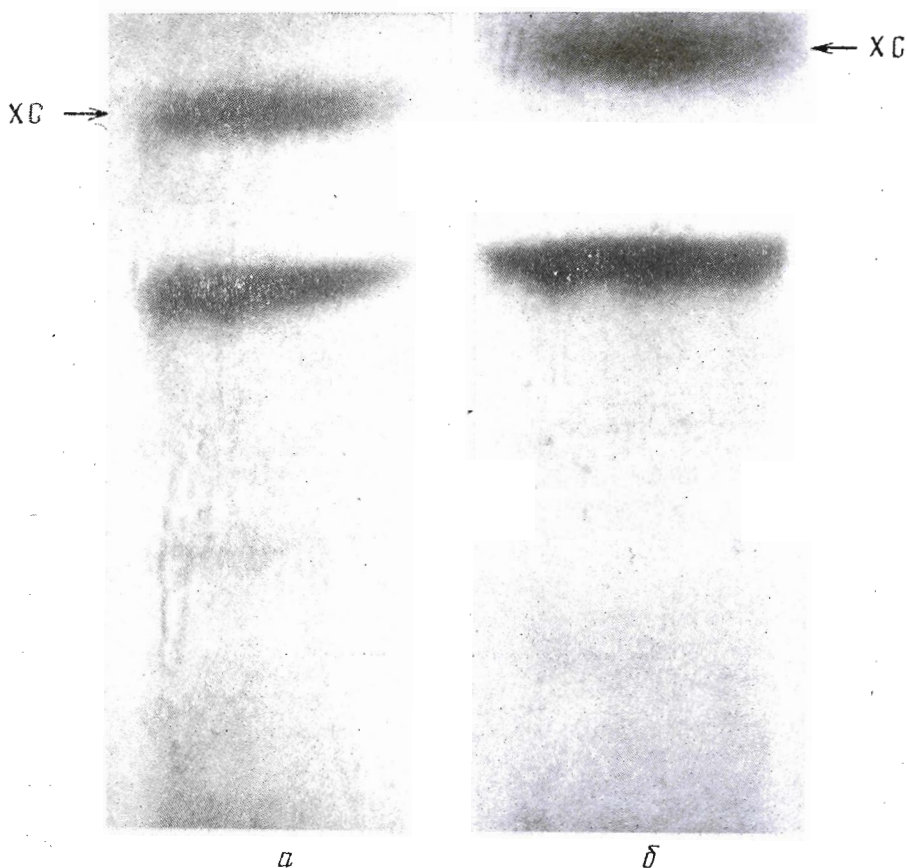


Рис. 1. Анализ электрофорезом в 8% денатурирующем ПААГ реакционных смесей после синтеза полинуклеотидов (XI) (а) и (XII) (б) (см. схему). ХС — положение красителя ксиленианола. Визуализация зон в УФ-свете при 254 нм

с. 125], реакционные смеси использовали для прямого лигирования с векторами pBR322 в случае гена сигнального пептида белка OmpA *E. coli* и pMM23 [14] в случае P_L- и T7-промоторов, после чего проводили трансформацию клеток *E. coli* (соответственно HB101 и ΔH). Для уменьшения числа фоновых колоний гидролизованные рестриктазами векторные ДНК отделяли от вырезанных фрагментов электрофорезом в агарозном геле [15, с. 173]. Секвенирование рекомбинантных плазмид по Сенгеру [16, 17] (см., например, рис. 4) подтвердило структуры синтезированных олигонуклеотидов.

Полученные нами данные показывают, что при проведении синтезов в масштабе до 1 мкмоль при больших избытках Н-фосфонатов нуклеозидов не требуется кебирования после каждого этапа элонгации; к такому же выводу пришли в работе [18] при работе в масштабе до 15 мкмоль. Возможные модификации [1, 19], в частности делеции и вставки нуклеотидов [1], не являются помехой при условии тщательного выделения фрагментов ДНК нужной длины.

Успешное использование олигонуклеотидов в клонировании с целью сайтнонаправленного мутагенеза, а также в качестве праймеров для секвенирования ДНК и гибридизационных зондов показывает, что предложенный нами ручной вариант Н-фосфонатного синтеза может быть использован в работах по молекулярной биологии и генной инженерии.

Экспериментальная часть

Использовали пиридин, хлористый метилен, ацетонитрил (Merck), абсолютированные; акриламид, N, N'-метиленбисакриламид, триазол (Sigma), пивалоилхлорид, моно- и диметокситритилхлориды (Fluka). Осталь-

ные реактивы — отечественного производства. Нуклеозиды защищали как описано в работе [20]. Н-фосфонаты получали по методике [1], выделяли хроматографией на силикагеле L 40/100 (200—400 меш; ЧСФР) в градиенте этанола (0—20%) в хлороформе, элюат упаривали в вакууме. Перед синтезом Н-фосфонаты сушили упариванием с абс. MeCN, затем в течение 1 сут в вакууме (0,1—0,2 мм) над P₂O₅. Присоединение первого звена к CPG-500 (Long Chain Amino, Electro-Nucleonics, Inc.) проводили как описано в работе [21].

Синтез олиго(поли)нуклеотидов: 0,2—0,25 М растворы Н-фосфонатов нуклеозидов и 1,25 М раствор пивалоилхлорида в смеси пиридин — MeCN (1 : 1) готовили непосредственно перед синтезом; на каждой стадии использовали отдельную порцию Н-фосфонатов. Полимер (10—15 мг) с содержанием нуклеозида 15—25 мкмоль/г помещали в пластиковый наконечник для пипетки на 1 мл с фильтром из силиконизированной стекловаты (Serva), последовательно промывали MeCN и CH₂Cl₂ и затем проводили операции согласно табл. 1. При промывках (стадии 2 и 6, табл. 1) вместо CH₂Cl₂ использовали также 1,2-дихлорэтан; на стадиях 2—3, 5, 6 — двойные объемы MeCN. Окисление после окончания синтеза проводили в две стадии [1].

Доблокирование и выделение олигонуклеотидов. После окисления полимер, содержащий олигонуклеотид, промывали пиридином, MeCN, CHCl₃, высушивали, конец колонки запаивали и проводили инкубацию с 200—400 мкл конц. водного NH₃ (16 ч при 65° С) в автоклаве. По окончании аммонолиза конец колонки обрезали, профильтрованный через стекловату раствор олигонуклеотида нейтрализовали AcOH, упаривали вдвое и осаждали при —70° С избытком этанола: 10-кратным для 12—20-звенных, 5-кратным для 20—35-звенных и 3-кратным для 35—55-звенных олигонуклеотидов. После обычной обработки проводили электрофорез в 8—20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины, из расчета 5—7 ОЕ₂₆₀ на ячейку геля размером 10 × 10 × 1 мм; гель сканировали при 254 нм. Олигонуклеотиды элюировали 0,5 М KOAc в 1-мл заплывленном кончике с фильтром из стекловаты в течение 12—14 ч при 37° С или 2—3 ч при 50° С и после фильтрования и концентрирования осаждали этанолом.

Фосфорилирование олигонуклеотидов, полимеразную достройку ДНК-дуплексов, расщепление рестриктазами и лигирование проводили как описано в работе [15]. T4-полинуклеотидкиназа, ДНК-лигаза фага T4 — НПО «Фермент», остальные ферменты фирмы Pharmacia. [γ-³²P]ATP — отечественный препарат, [α-³²P]dNTP — фирмы Amersham. В случае рекомбинантных плазмид на основе pBR322 плазмидные ДНК выделяли

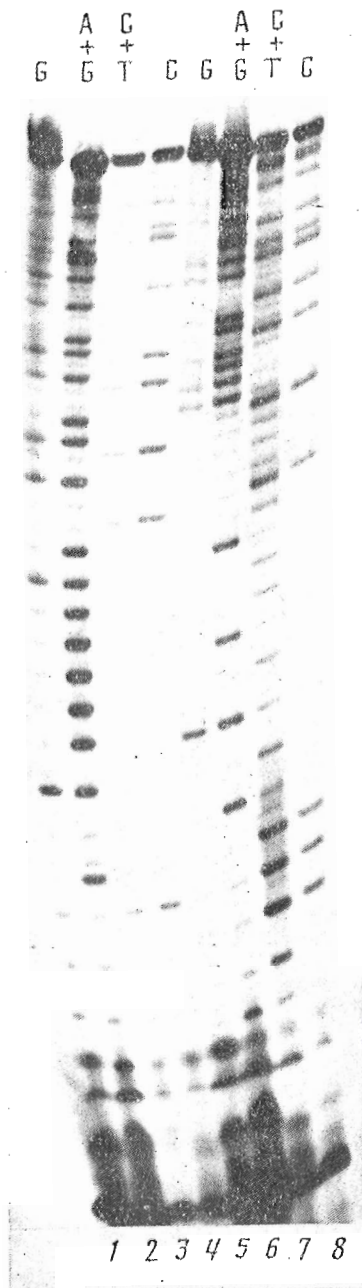


Рис. 2. Радиавтограмма 20% денатурирующего ПААГ, полученного при определении нуклеотидной последовательности олигонуклеотидов (XI) (1—4) и (XII) (5—8) методом Максама—Гилберта [12]

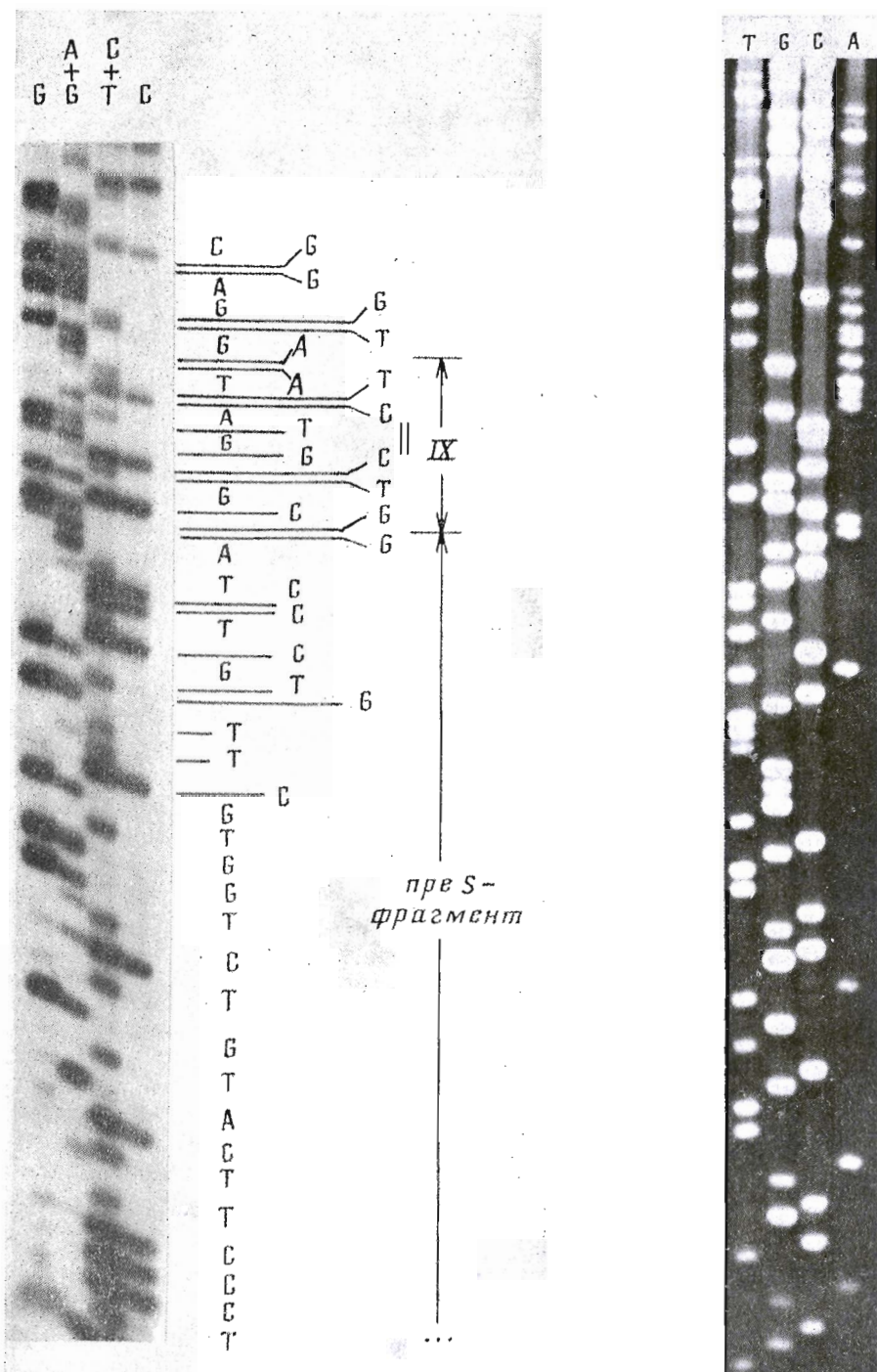


Рис. 3. Радиоавтограмма 12% денатурирующего ПААГ, полученного при определении нуклеотидной последовательности *XhoI/PstI*-фрагмента рекомбинантной плазмиды, сконструированной на основе рPSG 2-195, методом Максама — Гилберта [12]. Стрелками отмечены последовательности вставок: олигонуклеотида (IX) (схема) и синтетического фрагмента ДНК, кодирующего участок со 133-й по 143-ю аминокислоту из преS2-области белка оболочки HBV. Двумя чертами выделен инициаторный кодон

Рис. 4. Радиоавтограмма 6% денатурирующего ПААГ, полученного при определении нуклеотидной последовательности (+)-цепи гена, кодирующего сигнальный пептид белка OmpA *E. coli* (схема), по методу Сенгера на плазмиде [16, 17]

Рис. 4

щелочным лизисом [15, с. 101], расщепляли соответствующими рестриктазами, вектор с липкими концами выделяли из легкоплавкой агарозы (Bio-Rad) с последующей гель-фильтрацией на сефарозе CL-4B (Pharmacia). В случае остальных конструкций плазмидную ДНК выделяли кипячением [15, с. 100], после расщепления рестриктазами вектор с липкими концами выделяли электрооэлюцией из агарозы типа III.

Лигирование вектора с ДНК-дуплексами осуществляли в буфере, содержащем 66 мМ трис-НСI (рН 7,6), 5 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, 1 мМ АТР, в течение 16 ч при 6° С. Трансформацию компетентных клеток *E. coli* проводили лигазной смесью с применением хлористого кальция [15, с. 240]. Рекомбинантные клоны на основе pBR322 отбирали по потере устойчивости к тетрациклину, на основе pCSG 2-195 — по появлению β-галактозидазной активности на агаре МакКонки, на основе pMM23 — рестрикционным анализом.

Рестрикционный анализ клонов. ДНК клонов выделяли щелочным лизисом [15, с. 333], расщепляли парами рестриктаз, реакционные смеси анализировали электрофорезом в 1% агарозе, а также электрофорезом в 5—6% ПААГ после введения ³²P-метки с помощью специфических [α-³²P]dNTP и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I.

Авторы выражают глубокую благодарность Е. И. Марусич (Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР) и С. В. Беликову (Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР), оказавшим помощь в выполнении данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Froehler B. C., Ng P. C., Matteucci M. D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5399—5407.
2. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R. // Chem. scr. 1986. V. 26. № 1. P. 59—62.
3. Tanaka T., Letsinger R. L. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 10. P. 3249—3260.
4. Ito H., Ike Y., Ikuta S., Itakura A. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 5. P. 1755—1769.
5. Позмогова Г. Е. Исследования в области синтеза олигодезоксирибонуклеотидов на твердой фазе в неавтоматическом режиме. Синтез генов пептидных гормонов: Дис. ... канд. хим. наук. М.: ИМБ АН СССР, 1988.
6. Seliger H., Ballas K., Herold A., Kotschi U., Lyons J. // Chem. scr. 1986. V. 26. № 4. P. 569—577.
7. Pless R. C., Letsinger R. L. // Nucl. Acids Res. 1975. V. 2. № 6. P. 773—786.
8. Дамьков Ю. В., Батчигова Н. В., Скапцова Н. В., Бесидский Е. С., Ажаев А. В. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 5. С. 615—620.
9. Кумарев В. И., Баранова И. В., Кобзев В. Ф., Кузнецов К. Д., Средин Ю. Г. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 276—278.
10. Исагулянц М. Г., Смирнов В. Д. // Матер. конф. «Структура и функции биополимеров». Львов, 1989. Киев: ИМБПГ АН УССР, 1988. С. 24.
11. Худяков Ю. Е., Самошин В. В., Калинина Т. И., Смирнов В. Д. // Матер. Всесоюз. конф. «Новые направления биотехнологии». Пущино-на-Оке, 1988. С. 108.
12. Maxam A. M., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560—564.
13. Пеплюева В. С. Экспрессия гена белка нуклеокапсида вируса гепатита В человека в *E. coli*: Дис. ... канд. биол. наук. М.: Ин-т вирусологии АМН СССР, 1989.
14. Скрипкин Е. А., Манькин А. С., Копылов А. М., Худяков Ю. Е. // Биополимеры и клетка. 1987. Т. 3. № 5. С. 263—269.
15. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
16. Korneluk R. G., Quan F., Gravel R. A. // Gene. 1985. V. 40. № 2/3. P. 317—323.
17. Hattori M., Sakaki Y. // Analyt. Biochem. 1986. V. 152. № 2. P. 232—238.
18. Gaffney B. L., Jones R. A. // Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 22. P. 2619—2622.
19. Regberg T., Stawinski J., Stromberg R. // Nucleosides and Nucleotides. 1988. V. 7. № 1. P. 23—25.
20. Shaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G. // J. Amer. Chem. Soc. 1963. V. 85. № 23. P. 3821—3827.
21. Грязнов С. М., Чернов И. П., Потапов В. К., Пурмаль А. А., Метелев В. Г., Елов А. А., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1604—1611.

Поступила в редакцию
31.I.1989

После доработки
18.XII.1989

M. G. ISAGULIANTS, V. V. SAMOSHIN, I. V. MAKEEVA, V. D. SMIRNOV
EFFICIENT MANUAL OLIGO(POLY)DEOXYRIBONUCLEOTIDE SYNTHESIS
IN PIPETTE TIPS VIA H-PHOSPHONATE APPROACH

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Academy of Medical Sciences, Moscow

A facile technique of manual oligonucleotide synthesis via H-phosphonate approach is developed. Syntheses carried out in pipette tips with siliconised glasswool filters take 3—3,5 min per cycle with 97—98% yields per condensation. The method was used to synthesize 12—55-mers: T7 and P_L promoter regions, gene of the signal peptide of the *E. coli* OmpA protein, oligonucleotides coding for amino acid sequences 94—105 of *preS1*- and 133—143 of *preS2*-regions of hepatitis B virus, hybridisation probes, sequencing primers, oligonucleotides for site-directed mutagenesis, etc.