



ISSN 577.113.4+547.435+547.546

ФОТОЛАБИЛЬНЫЙ ЛИНКЕР ДЛЯ ОБРАТИМОГО ВВЕДЕНИЯ ЛИГАНДОВ В ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ

© 1999 г. Т. В. Абрамова[#], Д. В. Бугреев, М. И. Добриков, Ж. П. Леонетти*, Б. Лебле*Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8;

* Институт молекулярной генетики, Университет Монпелье, Монпелье, Франция

Поступила в редакцию 14.04.98 г. Принята к печати 10.07.98 г.

Синтезирован фотолабильный линкер – 1-(*o*-нитрофенил)-2-аминоэтанол для обратимого введения в синтетические олигонуклеотиды различных группировок. С использованием этого реагента получены феназиниевое и биотиновое производные додекануклеотида. Биотиновое производное додекануклеотида, содержащее фотолабильный линкер, расщепляется при облучении УФ-светом 313–365 нм, при этом освобождается немодифицированный олигонуклеотид. Биотиновое производное додекануклеотида, содержащее фотолабильный линкер, связывается с авидином в растворе и с иммобилизованным авидином. При облучении полученного комплекса УФ-светом происходит освобождение исходного олигонуклеотида.

Ключевые слова: олигонуклеотиды, синтез производных; фотолабильный линкер; биотин.

Введение в олигонуклеотиды различных группировок чаще всего осуществляется с помощью линкеров, присоединенных к 3'- или 5'-концу олигонуклеотидов, к межнуклеотидным фосфатным группам или к гетероциклическим основаниям в процессе олигонуклеотидного синтеза или постсинтетически [1]. Обратимое присоединение лигандов к олигонуклеотидам открывает новые возможности применения производных олигонуклеотидов в изучении белково-нуклеиновых взаимодействий, для аффинной хроматографии, при амплификации фрагментов нуклеиновых кислот. К настоящему времени предложен лабильный линкер для модификации олигонуклеотидов, содержащий дисульфидную связь [2], а также биотинсодержащий фотолабильный линкер на основе 1-(*o*-нитрофенил)этанола [3]. Однако линкеры, расщепляемые тиолами, недостаточно стабильны, а фотолабильный линкер [3] позволяет вводить в олигонуклеотиды только биотин. В данной работе мы описываем синтез универсального фотолабильного линкера.

К настоящему времени хорошо изучен фотолитиз *o*-нитробензилового спирта и родственных

соединений [4, 5], а также синтезировано большое число соединений нуклеотидной, белковой и иной природы, содержащих остаток *o*-нитробензилового спирта или его аналогов, для изучения механизма функционирования биополимеров в клетке [6–8]. Некоторые из этих соединений коммерчески доступны (Molecular probes, Inc., США). Поэтому мы выбрали для синтеза универсального фотолабильного линкера производное *o*-нитробензилового спирта и ввели в структуру фотолинкера кроме гидроксильной также и аминогруппу (схема 1, соединение (VI)), что позволило нам впоследствии получать на его основе различные производные олигонуклеотидов.

Синтез 1-(*o*-нитрофенил)-2-аминоэтанола (Naс-ОН, (VI)) осуществляли по схеме 1 из коммерчески доступного *o*-нитрофенилэтиленгликоля (I) (смесь энантиомеров). Защиту первичной гидроксигруппы *o*-нитрофенилэтиленгликоля проводили обработкой диметокситритилхлоридом, затем защищали вторичную гидроксигруппу с помощью леулинового ангидрида в присутствии *N*-метилмидазола и удаляли диметокситритильную защитную группу обработкой 80% уксусной кислотой. Далее соединение (IV) обрабатывали трихлорбромметаном в присутствии трифенилфосфина аналогично описанному [9]. Обработкой соединения (V) водно-метанольным раствором аммиака получали гидробромид 1-(*o*-нитрофенил)-2-аминоэтанола (VI) (HBr Naс-ОН). Соединение (VI) превращали в этилтрифторацетамидное производное (VII), пригодное для введения в олигонуклеотиды в качестве фотолабильного линкера.

Сокращения: Naс-ОН – 1-(*o*-нитрофенил)-2-аминоэтанол; DMTr – диметокситритил; Lev – леулинил; TPS-C) – трипропилбензолсульфонилхлорид; TBAF – тетрабутиламмонийфторид; MeIm – *N*-метилмидазол; Pnp – феназиний; *p* – остаток *p*-хлорфенилфосфорной кислоты; *p* – остаток фосфорной кислоты; CNEt – 2-цианоэтил; TEA – триэтиламин; Bio – биотин. Префикс "d" в обозначениях дезоксирибоолигонуклеотидов опущен.

[#] Автор для переписки (тел.: (3832) 33-32-71; e-mail: abramova@modul.bioch.nsk.su).

спектр производного (XI) является суперпозицией спектров рТрТ и нитрофениламиноэтанола. Соединение (XI) охарактеризовано также с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии.

При облучении водного раствора производного (Naе)рТрТ УФ-светом в диапазоне 254–365 нм происходит быстрое отщепление линкера и освобождение немодифицированного динуклеотида рТрТ с периодом полупревращения около полутора мин (рис. 3, кривая 1). Анализ продуктов превращения проводили методом обращенно-фазовой хроматографии.

Следующим этапом работы было введение фотолабильного линкера в протяженный олигонуклеотид, синтез производных модифицированного олигонуклеотида и изучение скорости фоторасщепления полученных конъюгатов. Конденсацию соединения (VII) с соответствующим образцом защищенным додекаолигонуклеотидом рАрТрГрСрСрСрСрТрСрАрАрС(Lev), деблокирование и выделение продукта реакции (XII) проводили аналогично описанному выше для модельного динуклеотида (см. схему 2). При анализе соединения (XII) методом ионообменной хроматографии видно (рис. 4), что его время удерживания меньше, чем время удерживания немодифицированного додекануклеотида, что соответствует уменьшению общего отрицательного заряда на две единицы при превращении исходного додекануклеотида в производное (XII).

Для доказательства наличия в соединении (XII) алифатической аминогруппы провели реакцию этого соединения с феназином, как описано в работе [12]. В спектре поглощения полученного конъюгата (Phn, Naе)рАТGССССТСААС (XIII) присутствуют максимумы поглощения аминифеназиниевого остатка в видимой области. Соотношение интенсивностей полос поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях спектра (λ_{max} 236, 263, 392, 528 нм) равно 1 : 1.23 : 0.15 : 0.18 и соответствует ожидаемому [12].

Присоединение биотина к аминогруппе фотолабильного линкера в соединении (XII) было проведено с помощью обработки избытком *n*-нитрофенилового эфира биотина в условиях работы [13]. При облучении полученного конъюгата (Bio, Naе)рАТGССССТСААС (XIV) УФ-светом в диапазоне 313–365 нм происходит быстрое освобождение додекануклеотида с периодом полупревращения около 6 мин (рис. 3, кривая 2, таблица). При смешивании с авидином производное (XIV) образует прочный комплекс, не разрушающийся в условиях гель-фильтрации на сефадексе G-75. При гель-фильтрации облученного комплекса в тех же условиях наблюдается появление пика, соответствующего свободному олигонуклеотиду (рис. 5, кривая 2). Скорость освобождения додекануклеотида из комплекса соединения (XIV) с

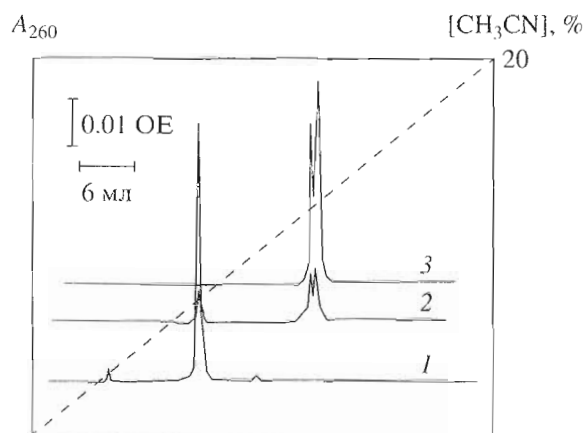


Рис. 1. Анализ методом обращенно-фазовой хроматографии рТрТ (1) и (Naе)рТрТ (2) после облучения 30 с УФ-светом в диапазоне длин волн 254–365 нм; 3 – (Naе)рТрТ без облучения. Условия аналитической хроматографии приведены в “Эксперимент. части”.

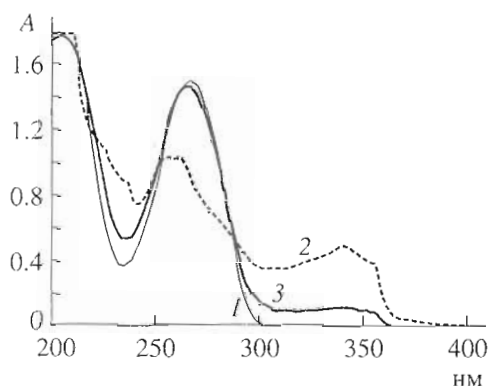


Рис. 2. Спектры электронного поглощения рТрТ (1), NBг·Naе-ОН (2) и (Naе)рТрТ (3) в воде.

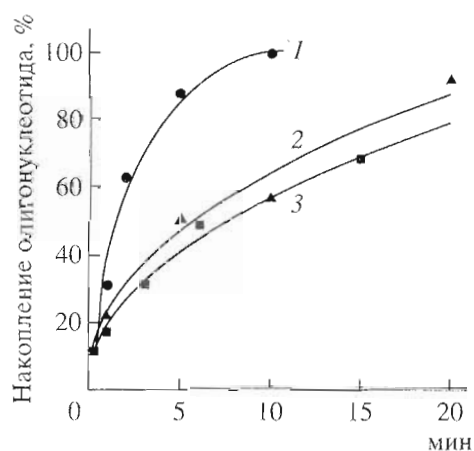


Рис. 3. Накопление немодифицированного олигонуклеотида в результате облучения УФ-светом фотолабильных производных олигонуклеотидов: (Naе)рТрТ (1), (Bio, Naе)рАТGССССТСААС (2), комплекса авидина с (Bio, Naе)рАТGССССТСААС (3) (анализ продуктов фотолитиза комплекса методом гель-фильтрации). Условия облучения приведены в “Эксперимент. части”.

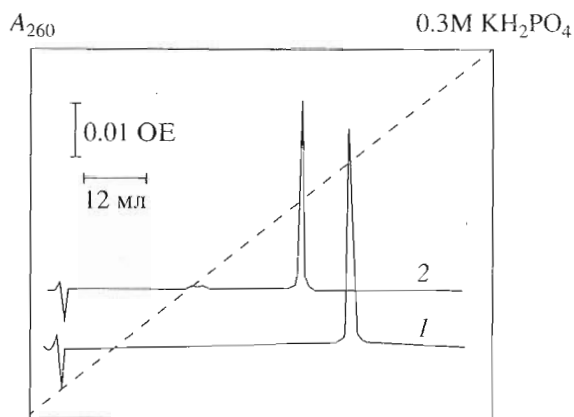


Рис. 4. Анализ додекануклеотидов рATGCCCCTCAAC (1), (Naε)рATGCCCCTCAAC (2) методом ионообменной хроматографии. Условия аналитической хроматографии приведены в "Эксперимент. части".

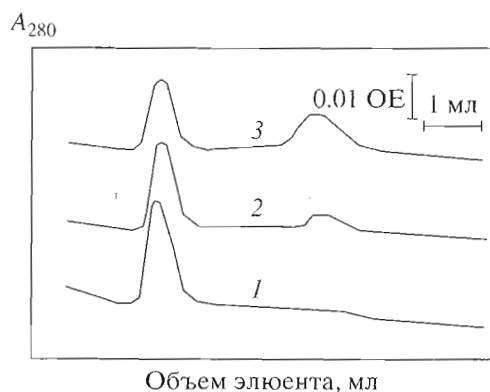


Рис. 5. Гель-фильтрация комплекса авидина с (Bio, Naε)рATGCCCCTCAAC до облучения (1), после облучения УФ-светом (313–365 нм) в течение 10 (2) и 20 мин (3).

авидином при облучении соответствует скорости фотолиза производного (XIV) (рис. 3, кривая 3, таблица).

Для дополнительного доказательства комплексообразования производного (XIV) с авидином

Время полупревращения ($\tau_{1/2}$) фоточувствительных производных олигонуклеотидов при облучении УФ-светом в диапазоне длин волн 313–365 нм

Соединение или комплекс его с авидином	$\tau_{1/2}$, мин
(Naε)рTrT (VII)	1.5*
(Bio, Naε)рATGCCCCTCAAC (XIV)	6.0
Авидин-(XIV)**	8.2 (7.5)
Авидин-ультрагель А2-(XIV)	8.0

* Облучение проводили УФ-светом в диапазоне длин волн 254–365 нм.

** Анализ продуктов реакции с помощью гель-фильтрации и (в скобках) гель-электрофореза.

ном и более точной оценки степени освобождения олигонуклеотида из комплекса мы проанализировали аналогичные облученные реакционные смеси с помощью гель-электрофореза. Предварительно в производное (XIV) в присутствии комплементарной матрицы GTGTTGAGGGGCAT с помощью фрагмента Кленова и радиоактивно меченных $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ вводили радиоактивную метку на 3'-конец. Радиоактивно меченный дуплекс смешивали с десятикратным молярным избытком авидина и подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-75. Высокмолекулярные фракции, содержащие радиоактивную метку, облучали УФ-светом (313–365 нм). Продукты реакции анализировали с помощью гель-электрофореза. Как видно из рис. 6 (кривая 1), при облучении комплекса авидина с радиоактивно меченным биотинилированным комплементарным дуплексом происходит освобождение нуклеотидного материала. Около 30% радиоактивной метки остается связанной с авидином даже после 60 мин облучения. Скорость освобождения олигонуклеотидного материала, соответствует скорости фотолиза соединения (XIV) (рис. 3 и 6, таблица).

Мы оценили также степень освобождения олигонуклеотида в случае, когда авидин ковалентно связан с носителем, т.е. провели фотолиз комплекса в гетерогенном варианте. Аликвоту радиоактивно меченного дуплекса смешивали с избытком авидин-ультрагеля А2 и сорбент отмывали от несорбировавшегося радиоактивного материала. Порции сорбента облучали длинноволновым УФ-светом. Как видно из рис. 6 (кривая 2), за 20 мин освобождается около 50% радиоактивно меченного материала, дальнейшее облучение не приводит к дополнительному выходу олигонуклеотида в раствор. Время полупревращения в этих экспериментах соответствует времени полупревращения аналогичного комплекса в гомогенной системе (таблица). Неполное освобождение олигонуклеотида при облучении комплекса конъюгата (XIV) с авидином как в гомогенной, так и в гетерогенной среде можно объяснить специфическим окружением фотореакционного центра в комплексе с белком. Возможно, присоединение биотина к конъюгату (Naε)рATGCCCCTCAAC через дополнительный линкер способствовало бы полному освобождению олигонуклеотида из комплекса при облучении, так как введение протяженного линкера между биотином и фотореакционным центром снизило бы влияние специфического белкового окружения на фоторасщепление. При облучении конъюгата (XIV) в отсутствие авидина происходит практически количественное освобождение олигонуклеотида (рис. 3, кривая 2).

Таким образом, мы представили синтез нового фоточувствительного линкера, пригодного для введения в олигонуклеотиды различных производных,

продемонстрировали присоединение остатков феназиния и биотина к модифицированным олигонуклеотидам и изучили некоторые свойства полученных производных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали TPS-Cl, диметокситритилхлорид производства ОХП НИОХ СО РАН, *N*-метилимидазол, тетрабутиламмонийфторид (Fluka, Швейцария), левулиновую кислоту, трихлорбромметан, этилтрифторацетат, 1-(2-нитрофенил)этиленгликоль, трифенилфосфин (Aldrich, США), *n*-нитрофениловый эфир биотина (Sigma, США), фрагмент Кленова *exo minus* (КФ 2.7.7.7) (Promega, США), акриламид и бисакриламид (Serva, США). Авидин и авидин-ультрагель А2 (0.5 мг авидина на 1 мл смолы) любезно предоставлены П.В. Лактионовым (НИБХ СО РАН). $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (4×10^3 Ки/ммоль) получены в лаборатории радиохимии НИБХ СО РАН.

Олигонуклеотиды синтезировали фосфотрифирным методом в растворе по методикам [10]. Спектры ЯМР записывали на спектрометре WP-200 или AC-250 (Bruker, ФРГ) в CDCl_3 , D_2O или CD_3OD , химические сдвиги выражали в миллионных долях (шкала δ), используя в спектрах ^1H -ЯМР сигналы остаточных протонов растворителя в качестве стандартов; приведены также константы спин-спинового взаимодействия (J) в герцах. При снятии спектров ^{19}F -ЯМР добавляли гексафторбензол в качестве стандарта. Спектры поглощения записывали на спектрометре Shimadzu (Shimadzu, Япония), масс-спектры получали на спектрометре Jeol DX 300 (Франция) с помощью метода бомбардировки ускоренными атомами ($\text{FAB} > 0$), используя в качестве матрицы смесь глицерина и тиоглицерина (GT) или нитробензиловый спирт (NBA). Хроматографию в тонком слое проводили на пластинках с силикагелем 60F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системе хлористый метилен-метанол, 9 : 1 (если не указано другое). Для колоночной хроматографии на силикагеле использовали Porasil Silica 125A (55–105 мкм, Millipore, США), колонка 30 × 300 мм, общий объем градиента 1 л). Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на хроматографе Waters 600E с детектором Waters 486 (Millipore, США), используя для ионообменной хроматографии Полисил СА (Теоретическая практика, Россия), а для обращенно-фазовой хроматографии — LiChroprep RP 18 (Merck, ФРГ). Для гель-фильтрации использовали сефадексы G-75 sf и G-25 sf (Pharmacia, Швеция). Радиоактивность ^{32}P -меченых проб определяли по Черенкову на счетчике Tri-Carb 2100TR (Packard, США).

1-(*o*-Нитрофенил)-2-*O*-диметокситритилэтиленгликоль (II). 1-(*o*-нитрофенил)этиленгликоль (0.92 г, 5 ммоль, смесь изомеров) упарили с абсо-

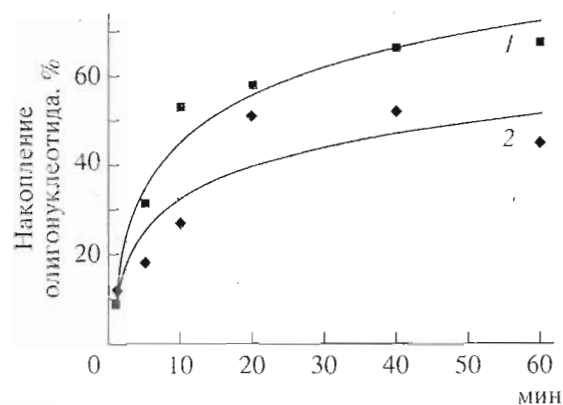


Рис. 6. Накопление немодифицированного олигонуклеотида в результате облучения УФ-светом 313–365 нм фотолабильных производных олигонуклеотидов: фотолиз комплекса радиоактивно меченого соединения (XIV) в виде дуплекса с авидином в растворе (анализ с помощью гель-электрофореза) (1), фотолиз комплекса радиоактивно меченого соединения (XIV) с авидином, иммобилизованным на ультрагеле А2 (2).

лютным пиридином (3×10 мл), растворили в 20 мл сухого пиридина и добавили 1.88 г (5.5 ммоль) диметокситритилхлорида. После завершения реакции (2 ч, контроль ТСХ в системе $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{--CH}_3\text{OH}$, 95 : 5) в реакционную смесь добавили 20 мл 5% раствора NaHCO_3 , упарили, остаток растворили в 100 мл хлористого метилена и раствор промыли 5% раствором NaHCO_3 (3×50 мл). Органический слой высушили над Na_2SO_4 и упарили. Сырой продукт очищали хроматографией на силикагеле в линейном градиенте концентрации метанола в хлористом метиле (0 → 5%) в присутствии 0.1% пиридина. Фракции, содержащие целевой продукт, упарили. После высушивания остатка при 1 мм рт. ст. над P_2O_5 получено 1.94 г (4 ммоль, смесь изомеров, выход — 80%) производного (II) в виде пены. R_f 0.21 в CH_2Cl_2 . ^1H -ЯМР в CDCl_3 : 7.85 (дд, 1H, $J_{3,4} 8, J_{3,5} 1.5$, H3, ArNO_2); 7.44 (дт, 1H, $J_{4,5} = J_{6,5} = 8, J_{3,5} 1.5$, H5, ArNO_2); 7.3 (м, 2H, H4, H6, ArNO_2); 7.2–6.76 (м, 13H, Ar, DMTr); 5.45 (м, 1H, $\text{O--CH}_2\text{--CH--Ar}$); 3.70, 3.72 (2 с, 6H, $(\text{Ar--OCH}_2)_2$); 3.55, 3.4 (2 д, 2H, $\text{O--CH}_2\text{--CH--Ar}$). MS (GT): M^+ 485.

1-(*o*-Нитрофенил)-1-*O*-левулинилэтиленгликоль (IV). Левулиновую кислоту (2.78 г, 24 ммоль) растворили в 30 мл сухого серного эфира и добавили 2.47 г (12 ммоль) дициклогексилкарбодиимида. Реакционную смесь перемешивали на магнитной мешалке 3 ч, осадок отфильтровали, фильтрат упарили, остаток растворили в 20 мл безводного пиридина. В раствор ввели 1.94 г (4 ммоль) производного (II) и 1.68 мл (24 ммоль) *N*-метилимидазола. Через 30 мин (контроль ТСХ, $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{--CH}_3\text{OH}$, 95 : 5) реакционную смесь обрабатывали как описано выше для соединения (II). После тщательного удаления пиридина азеотропным упариванием с

толуолом сырой продукт (III) обработали 30 мл 80% уксусной кислоты в течение 2 ч при 50°C. После удаления уксусной кислоты упариванием продукт (IV) выделяли хроматографией на силикагеле в линейном градиенте концентрации метанола в хлористом метиле (0 → 10%). Продукт (IV) получен в виде масла красного цвета (0.7 г, 2.5 ммоль, смесь диастереомеров, выход 63%). R_f 0.13; 0.15 (для двух изомеров). ^1H -ЯМР в CDCl_3 : 8.05 (дд, 1H, $J_{3,4}$ 8, $J_{3,5}$ 1.5, H3, ArNO_2); 7.92 (дд, 1H, $J_{5,6}$ 8, $J_{4,6}$ 1.5, H6, ArNO_2); 7.71 (м, 1H, H5, ArNO_2); 7.45 (м, 1H, H4, ArNO_2); 6.40, 5.57 (2 м, 1H, $\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}-\text{Ar}$); 4.45, 3.94 (2 м, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}-\text{Ar}$); 2.8 (м, 2H, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COO}$); 2.6 (м, 2H, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COO}$); 2.21, 2.9 (2 с, 3H, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_3$). MS (NBA): $(M+H)^+$ 282.

1-(*o*-Нитрофенил)-1-*O*-левулинил-2-бромэтанол (V). Производное (IV) (0.7 г, 2.5 ммоль) упарили три раза с абсолютным ацетонитрилом, растворили в 10 мл безводного диметилформамида, добавили 1.97 г (7.5 ммоль) трифенилфосфина и 1 мл (10 ммоль) трихлорбромметана. Реакционную смесь перемешивали на магнитной мешалке в течение ночи при комнатной температуре. Затем реакционную смесь упарили, сырой продукт (V) очищали хроматографией на силикагеле в линейном градиенте концентрации метанола в хлористом метиле 0–10%. Получено 0.97 г продукта (V) в виде масла желтого цвета (2 ммоль, смесь изомеров, выход 81%). R_f 0.76. ^1H -ЯМР в CDCl_3 : 8.05 (дд, 1H, $J_{3,4}$ 8, $J_{3,5}$ 1.5, H3, ArNO_2); 7.9 (дд, 1H, $J_{5,6}$ 8, $J_{4,6}$ 1.5, H6, ArNO_2); 7.7 (м, 1H, H5, ArNO_2); 7.5 (м, 1H, H4, ArNO_2); 6.50, 5.8 (2 м, 1H, $\text{Br}-\text{CH}_2\text{CH}-\text{Ar}$); 4.6, 3.65 (2 м, 2H, $\text{Br}-\text{CH}_2\text{CH}-\text{Ar}$); 2.8 (м, 2H, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COO}$); 2.6 (м, 2H, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COO}$); 2.18 (с, 3H, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_3$). MS (GT): M^+ 344.

1-(*o*-Нитрофенил)-2-аминоэтанол, гидробромид (VI). Продукт (V) растворили в 5 мл метанола и добавили 5 мл 25% водного аммиака. Реакционную смесь выдержали ночь при 50°C, после окончания реакции (контроль ТСХ, вещество с R_f 0.03 дает положительную реакцию при обработке нингидрином) реакционную смесь упарили, осадок перекристаллизовали из этанола и эфира. Получено 0.39 г продукта (VI) (1.5 ммоль, смесь изомеров, выход 75%). Часть вещества растворили в 0.1 М NaOH и свободный амин экстрагировали хлористым метилом. ^1H -ЯМР в CDCl_3 для свободного амина: 7.95 (дд, 1H, $J_{3,4}$ 8, $J_{3,5}$ 1.5, H3, ArNO_2); 7.82 (дд, 1H, $J_{5,6}$ 8, $J_{4,6}$ 1.5, H6, ArNO_2); 7.61 (дд, 1H, $J_{4,5} = J_{6,5} = 8$, $J_{3,5}$ 1.5, H5, ArNO_2); 7.41 (дд, 1H, $J_{4,5} = J_{4,3} = 8$, $J_{4,6}$ 1.5, H4, ArNO_2); 5.15 (м, 1H, $\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}-\text{Ar}$); 3.34, 2.69 (2 м, 2H, $\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}-\text{Ar}$). MS (NBA): $(M+H)^+$ 183.

1-(*o*-Нитрофенил)-2-(трифторацетиламино)этанол (VII). К 2 мл раствора соединения (VI) (0.263 г, 1 ммоль) в метаноле добавили 168 мг

(2 ммоль) NaHCO_3 и 0.24 мл (2 ммоль) этилтрифторацетата. Через 20 ч реакционную смесь (контроль ТСХ) отфильтровали, фильтрат упарили. Сырой продукт (VII) очищали хроматографией на силикагеле в линейном градиенте концентрации метанола в хлористом метиле (0 → 10%). После осаждения вещества гексаном получено 0.23 г продукта (0.83 ммоль, смесь диастереомеров, выход 83%). R_f 0.76. ^1H -ЯМР в CD_3OD : 7.94 (дд, 2H, $J_{3,4} = J_{5,6} = 8$, $J_{3,5} = J_{6,4} = 1.5$, H3, H6, ArNO_2); 7.74 (м, 1H, H5, ArNO_2); 7.54 (м 1H, H4, ArNO_2); 5.41 (м, 1H, $\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}-\text{Ar}$); 3.67 (м, 2H, $\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}-\text{Ar}$). ^{19}F -ЯМР в CD_3OD : 88.40, 88.13 (2с).

Производные олигонуклеотидов (XI) и (XII) синтезировали в условиях триэфирного синтеза олигонуклеотидов по методике [10], используя в качестве спиртового компонента соединение (VII) (схема 2). Деблокирование олигонуклеотидов проводили по [11]. Производные (XI) и (XII) выделили ионообменной хроматографией на смоле Полисил СА (10 мкм), в линейном градиенте концентрации калий-фосфатного буфера pH 7.0 в 30% водном ацетонитриле (0.05 → 0.30 М, за 60 мин); колонка 1 × 20 см, скорость элюции 6 мл/мин. Фракции, соответствующие целевым продуктам, упарили, затем проводили обращенно-фазовую хроматографию на смоле LiChroprep RP 18 (10–25 мкм) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила в 0.03 М LiClO_4 (0 → 20% за 30 мин); колонка 1 × 20 см, скорость элюции 6 мл/мин. Фракции, соответствующие целевым продуктам, упарили. Соединение (XII) осадил из водного раствора десятикратным объемом 2% раствора LiClO_4 в ацетоне, осадок промыли ацетоном и высушили. Соединение (XI) использовали для дальнейшей работы в виде водного раствора без обессоливания. Спектр электронного поглощения соединения (XI) приведен на рис. 2. ^1H -ЯМР для соединения (XI) в D_2O : 8.13 (д, 1H, $J_{3,4}$ 8, H3, ArNO_2); 7.89–7.58 (м, 3H, H4, H5, H6, ArNO_2); 7.44 (д, 2H, $J_{5,6}$ 7, 2 × H6, Thy); 6.36, 6.14 (2м, 2 × H1, dRib); 6.00 (м, 1H, $\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}-\text{Ar}$); 4.25–3.80 (2м, 7H, 2 × H4, 2 × H5a,b, H3, dRib); 3.58–3.26 (2H, $\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}-\text{Ar}$); 2.43 (м, 4H, 2 × H2a,b, dRib); 1.94 (с, 6H, 2 × CH_3 , Thy).

Феназинное производное (XIII) синтезировали по методике [12]. Продукт выделяли обращенно-фазовой хроматографией и осаждали как описано выше. Соединение (XIII) имеет большее время удерживания при обращенно-фазовой хроматографии, чем соединение (XII) (данные не приведены).

Биотиновое производное (XIV) синтезировали аналогично описанному [13], используя *n*-нитрофениловый эфир биотина в качестве активированного производного в смеси диметилформид–0.1 М NaHCO_3 (1 : 1). Продукт выделяли обращенно-фазовой хроматографией и осаждали как описано выше для соединения (XII). Соедине-

ние (XIV) имеет большее время удерживания при обращенно-фазовой хроматографии, чем соединение (XII) (данные не приведены).

Фоторасщепление (Naе)рТрТ (XI) проводили при комнатной температуре с использованием ультрафиолетовой лампы "Фотон" (40 Вт), излучающей в диапазоне длин волн 254–365 нм; водный раствор образца (3.5×10^{-5} М) располагали на расстоянии 10 см. Аликвоты отбирали через определенные промежутки времени и анализировали обращенно-фазовой хроматографией в линейном градиенте концентрации ацетонитрила в 0.03 М LiClO₄ (0 → 20% за 30 мин); колонка 4 × 200 мм, скорость элюции 1.5 мл/мин. Степень фотолитического расщепления рассчитывали по соотношению площадей пиков исходного производного и продукта фотолитического расщепления — немодифицированного олигонуклеотида.

Фоторасщепление (Bio, Naе)рATGCCCTCAAC (XIV) проводили при комнатной температуре с использованием ртутной лампы высокого давления (ДРК-120), вырезая с помощью светофильтров БС-4, УФС-2 область излучения 313–365 нм (W 0.3 мВт см⁻²), водный раствор образца (3.5×10^{-5} М) располагали на расстоянии 10 см. Аликвоты отбирали через определенные промежутки времени и анализировали ионообменной хроматографией в линейном градиенте концентраций калий-фосфатного буфера рН 7.0 (0.05 → 0.30 М за 60 мин); колонка 4 × 200 мм, скорость элюции 1.5 мл/мин. Степень фотолитического расщепления определяли как описано выше.

Фоторасщепление комплекса авидин-(Bio, Naе)рATGCCCTCAAC. Смешали 25 мкл 10^{-4} М раствора авидина в воде и 125 мкл 2×10^{-5} М раствора производного (XIV) в воде. Смесь облучали светом с λ 313–365 нм как описано выше. Аликвоты объемом 30 мкл отбирали через определенные промежутки времени (включая нулевую контрольную точку) и анализировали с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-75 в 1 М NaCl, 0.1 М NaHCO₃. Степень фоторасщепления рассчитывали по соотношению площадей пиков комплекса с авидином и освобожденного олигонуклеотида, принимая, что на 280 нм авидин и додекануклеотид имеют одинаковые молярные коэффициенты поглощения.

Введение радиоактивной метки в (Bio, Naе)рATGCCCTCAAC (XIV). Эквимольные количества соединения (XIV) и комплементарной матрицы GTGTTGAGGGGCAT в концентрации 1×10^{-5} М гибридизовали в буфере рН 7.5 (50 мМ Трис-НСl, 50 мМ KCl). К 100 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 2 мМ EDTA, 5 мМ MgCl₂, 30 мМ KCl и 10 ед. акт. фрагмента Кленова *exo minus*, добавили 2.5 мкл раствора комплементарного дуплекса, инкубировали 30 мин при 30°C, добавили 60 пмоль [α -³²P]dATP и 0.5 нмоль dATP, а затем (через 30 мин) 60 пмоль

[α -³²P]dCTP и 0.5 нмоль dCTP до конечной концентрации каждого трифосфата 5 мкМ. Через 30 мин реакционную смесь подвергали гель-фильтрации на колонке (0.5 × 15 см) с сефадексом G-25 sf. Получено 20 пмоль радиоактивно меченного комплементарного дуплекса с удельной радиоактивностью 0.5 Ки/нмоль.

Фоторасщепление комплекса производного (XIV) с иммобилизованным авидином. 20 мкл 1×10^{-7} М раствора радиоактивно меченного дуплекса нанесли на 0.5 мл авидин-ультрагеля А2. Смола промыта на фильтре раствором 1 М NaCl, 0.1 М NaHCO₃ до отсутствия радиоактивности в промывных водах, суспендировали в 0.5 мл того же буфера. Аликвоты суспендированной смолы по 0.2 мл облучали длинноволновым светом как описано выше, центрифугировали, смолу промыли тем же буфером. Измерили радиоактивность, сорбиравшуюся на смоле, и радиоактивность супернатантов, просчитывая пробы по Черенкову (Tri-Carb 2100TR, Packard, США). Степень фоторасщепления определили как отношение радиоактивности супернатанта и радиоактивности смолы.

Анализ продуктов фотолитического расщепления комплекса производного (XIV) с авидином методом гель-электрофореза. Радиоактивно меченное соединение (XIV) смешали с десятикратным молярным избытком авидина и подвергли гель-фильтрации на сефадексе G-75 sf в 1 М NaCl, 0.1 М NaHCO₃. Высокмолекулярные фракции, содержащие радиоактивную метку, место выхода которых соответствует месту выхода комплекса авидина с производным (XIV), облучали УФ-светом 313–365 нм. Аликвоты объемом 10 мкл отбирали через определенные промежутки времени, добавляли по 2 мкл раствора, содержащего 20% фикола и 0.1% бромфенолового синь, и анализировали продукты реакции электрофорезом в 20% ПААГ при 10°C (буфер 90 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 90 мМ H₃BO₃, 1 мМ EDTA; 60 В/см; 45 мА), после чего гель сушили и радиоавтографировали. Участки геля, соответствующие продуктам фотолитического расщепления, вырезали и определяли их радиоактивность по Черенкову (Tri-Carb 2100TR, Packard, США).

Авторы выражают благодарность О.Д. Захаровой за введение метки в модифицированный олигонуклеотид и Г.А. Невинскому за участие в планировании экспериментов по введению метки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Manoharan M. // Antisense Research and Applications / Eds S.T. Crook, B. Lebleu. Boca Raton; Ann Arbor; London; Tokyo: CRC Press, Inc., 1993. P. 303–350.
2. Dawson B.A., Herman T., Lough J. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 12830–12837.

3. Olejnik J., Krzymanska-Olejnik E., Rothschild K.J. // Nucl. Acids Res. 1996. V. 24. P. 361–366.
4. McCray J.A., Trentham D.R. // Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 1989. V. 18. P. 239–270.
5. Adams S.R., Tsien R.Y. // Annu. Rev. Physiol. 1993. V. 55. P. 755–784.
6. Adams S.R., Kao J.P.Y., Tsien R.Y. // J. Am. Chem. Soc. 1989. V. 111. P. 7957–7968.
7. Marriott G. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 9092–9097.
8. Walker J.W., Reid G.P., McCray J.A., Trentham D.R. // J. Amer. Chem. Soc. 1988. V. 110. P. 7170–7177.
9. Thuong N.T., Asseline U. // Oligonucleotides and Analogs. A Practical Approach / Ed. F. Eckstein. Oxford; New York; Tokyo: IRL Press at Oxford University Press, 1991. P. 283–308.
10. Зарьтова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П. // Биоорган. химия. 1982. Т. 9. С. 516–521.
11. Бауск Е.В., Горн В.В., Лебедев А.В. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. С. 815–820.
12. Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Sergeev D.S., Silnikov V.N., Kutuyavin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.F. // Bioconj. Chem. 1992. V. 3. P. 414–419.
13. Sinha N.D., Striepeke S. // Oligonucleotides and Analogs. A Practical Approach / Ed. F. Eckstein. Oxford; New York; Tokyo: IRL Press at Oxford University Press, 1991. P. 185–210.

A Photolabile Linker for Reversible Introduction of Ligands into Oligonucleotides

T. V. Abramova*[#], D. V. Bugreev*, M. I. Dobrikov*, J. P. Leonetti**[#], and B. Lebleu**[#]

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**Institut de Génétique Moléculaire, CNRS Université de Montpellier,
1919, route de Mende, 34033 Montpellier, France

A photolabile linker, 1-(*o*-nitrophenyl)-2-aminoethanol, was synthesized for the reversible introduction of various groups into synthetic oligonucleotides. With this reagent, phenazinium and biotin dodecanucleotide derivatives were prepared. The biotin dodecanucleotide derivative containing a photolabile linker is degraded upon UV irradiation at 313–365 nm to release the nonmodified oligonucleotide. It also binds to avidin both immobilized and in solution. Upon UV-irradiation, it releases the starting oligonucleotide.

Key words: oligonucleotides, synthesis of derivatives, photolabile linker, biotin

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (3832) 33-3271; e-mail: abramova@modul.bioch.nsk.su.