

В. Ф. ЗАРЫТОВА, В. К. ПОТАПОВ, З. А. ШАБАРОВА,
член-корреспондент АН СССР Д. Г. КНОРРЕ

СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НА ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЯХ
СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ
ДЕЗОКСИГУАНИЛОВУЮ КИСЛОТУ

Синтез олигонуклеотидов на полимерных носителях, впервые осуществленный в работе (1), привлекает внимание исследователей тем, что открывает перспективу синтеза олигонуклеотидных блоков путем повторения легко поддающихся автоматизации процедур с минимумом механических потерь. Однако, как указано в работе (2), с увеличением длины цепи затрудняется отщепление полученного олигонуклеотида от полимера. Обусловленная этим необходимость применения более жестких условий на этой стадии может привести к частичной апуринизации синтезированного олигонуклеотида. Поэтому число работ, в которых при синтезе на полимерах в олигонуклеотид вводились бы остатки дезоксигуаниловой кислоты, сравнительно невелико (3, 4). Целью настоящей работы было изучение возможности препаративного получения олигонуклеотидов, содержащих дезоксигуаниловые блоки на слабосшитом полимере полистирольного типа на примере синтеза d-(TrGrGrG).

Полимерный носитель получен модификацией сополимера стирола с 2% *n*-дивинилбензола (5). Соотношение фенильных и тритилхлоридных остатков в полимере составляло 5 : 1.

Присоединение тимидина к носителю проводилось обработкой 5 г полимера раствором 2 г тимидина в 50 мл абсолютного пиридина при 60° в течение 1 часа и выдерживания реакционной смеси сутки при комнатной температуре. Непрореагировавшие остатки тритилхлорида этерифицировались метанолом (объем 5 мл; $t = 60^\circ$; время этерификации 30 мин.). Полученный полимер — тимидин Ps — Tr — T(I) тщательно отмывался и высушивался. Количество присоединенного тимидина составляло 35—40 мг (~0,15 ммол.) на 1 г носителя.

Синтез d-(TrG) проводился обработкой 3 г I 350 мг пиридиниевой соли N,O²-диацетилдезоксигуанозин-5'-фосфата d-pG^{Ac}oAc(II) (6), 500 мг дициклогексилкарбодимида (ДЦК) в 20 мл абс. пиридина в течение 4 суток при комнатной температуре, после чего к реакционной смеси добавлялось еще 175 мг II и 250 мг ДЦК. Через сутки полимер отфильтровывался и тщательно отмывался от дициклогексилмочевины при 30° последовательно следующими растворителями: пиридином, диметилформамидом, дихлорметаном, диоксаном, метанолом, эфиром и абс. петролевым эфиром.

Для селективного удаления 3'-ацетильного остатка полученный Ps — Tr — TrG^{Ac}oAc обрабатывался смесью 2 N NaOH — пиридин — метанол (с объемным соотношением 10 : 10 : 7) при перемешивании в течение 3 час. при комнатной температуре, затем отмывался водой, метанолом и высушивался. Определение выхода d-(TrG) проводилось после отщепления нуклеотидного материала со 100 мг Ps — Tr — TrG^{Ac}(III) обработкой 5 мл 2% трифторуксусной кислоты (ТФК) в абс. бензоле в течение 15 мин. при 15°. Бензол и ТФК полностью удалялись упариванием в вакууме, а остаток экстрагировался 50% водным диоксаном 10 час. Раствор

упаривался при 23°, остаток выдерживался 3 дня в 5 мл концентрированного аммиака и, после упаривания аммиака в вакууме, вещество хроматографировалось на бумаге в системе этанол — 1 M CH₃COONH₄ (7:3), pH 7,5 (система А). На хроматограмме обнаружены d-(TrG) и тимидин. Динуклеозидфосфат идентифицирован по у.-ф. спектрам, хроматографической подвижности в системе изопропанол — аммиак — вода (7:1:2), R_f 0,22⁽⁵⁾ и по электрофоретической подвижности (э.п.) 0,45⁽⁵⁾ в 0,025 M триэтиламмоний и б-карбонатном буфере (ТЭАБ), pH 7,5. Выход d-(TrG) 27% (44 μмол/г полимера).

Синтез d-(TrGrG) проводился обработкой III 350 мг пиридиниевой соли d-pG^{Ac}oAc(II), 500 мг ДЦК в 10 мл пиридина в течение 3 дней с последующим добавлением еще 150 мг II и 500 мг ДЦК. Через 3 дня полимер отфильтровывался, отмывался и высушивался.

Синтез d-(TrGrGrG) проводился обработкой Ps — Tr — TrG^{Ac}pG^{Ac} (селективное удаление 3'-ацетильного остатка описано выше) пиридиниевой солью II (300 мг), ДЦК (500 мг) в пиридине (7 мл) в течение 3 дней с последующим добавлением еще 300 мг II и 500 мг ДЦК. Через 15 дней полимер тщательно отмывался, как описано выше, и высушивался.

Нуклеотидный материал отщеплялся с полимера и защитные группы снимались, как описано выше. Аммиак удалялся в вакууме, остаток растворялся в 100 мл воды и раствор наносился на колонку с гранулированной ДЕАЕ-целлюлозой в HCO₃⁻-форме (2 × 45 см). Элюция веществ проводилась градиентом 0,05—0,5 M ТЭАБ в 10% этаноле, pH 7,5. После дополнительной очистки веществ хроматографированием на бумаге в системе А с последующей элюцией водой получено: 0,67 ммол. тимидина, 0,185 ммол. d-(TrG), 0,030 ммол. d-(TrGrG) и 0,016 ммол. d-(TrGrGrG). Количества веществ были оценены спектрофотометрически, принимая коэффициенты экстинкции при 260 мμ равными

Вещество	T	d-(TrG)	d-(TrGrG)	d-(TrGrGrG)
ϵ_{260}	8,85 · 10 ³	20,5 · 10 ³	32,2 · 10 ³	44 · 10 ³

Значения были получены суммированием ϵ_{260} при T и pG⁽¹⁾.

Идентификация полученных олигонуклеотидов проводилась с помощью экзонуклеазы A₂ из актиномицетов, расщепляющей олигонуклеотиды ступенчато с 3'-конца до 5'-нуклеотидов и концевого динуклеозидфосфата. Гидролизат хроматографировался на бумаге в системе изомасляная кислота — конц. NH₃ (99:1). Количество d-pG и d-(TrG) определялось спектрофотометрически после элюции веществ с бумаги. Соотношение d-pG : d-(TrG) в d-(TrGrG) было найдено равным 1:0,86, а в d-(TrGrGrG) 1:1,8.

Суммарный выход олигонуклеотидов составлял 26%. Следовательно, при получении три- и тетра-нуклеотидов не происходило дальнейшего фосфорилирования тимидина. Это дает основание предполагать, что сравнительно низкий выход на стадии фосфорилирования тимидина связан не с израсходованием нуклеотидной компоненты или конденсирующего реагента, а с пространственной недоступностью значительной части тимидина. В пользу этого говорят также результаты опытов по синтезу d-(TrG), проведенных при разных концентрациях d-pG^{Ac}oAc (табл. 1).

Таблица 1

Выход d-(TrG), μмол. на 1 г полимера

Количество присоединенного тимидина на 1 г полимера, мг	Количество d-pG ^{Ac} oAc на 1 г полимера, г	За	За	За	За
		20 час.	3 сут.	7 сут.	10 сут.
120	2	31	40	35	34
40	0,76		24	37	31*
	0,17		44		

* После повторной обработки тем же количеством реагента.

Таким образом, увеличение количества тимидина, присоединенного к полимеру, повышение концентрации нуклеотидной компоненты, и повторное проведение конденсации не приводят к заметному изменению выхода d-(TpG).

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
1 X 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. L. Letsinger, V. Mahadevan, J. Am. Chem. Soc., 87, 3526 (1965).
² F. Cramer, H. Röster, Angew. Chem., 80, 488 (1968). ³ T. Shimidzu, R. L. Letsinger, J. Org. Chem., 33, 708 (1968). ⁴ R. L. Melby, D. R. Strobach, J. Org. Chem., 34, 427 (1969). ⁵ H. Hayatsu, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 89, 3880 (1967). ⁶ R. K. Ralph, W. S. Connors, J. Am. Chem. Soc., 85, 1983 (1963).
⁷ Т. В. Венкстерн, А. А. Баев, Спектры поглощения минорных компонентов и некоторых олигонуклеотидов рибонуклеиновых кислот, «Наука», 1965.