

И. Я. Дубей, Т. В. Ляпина, А. П. Галкин, Д. М. Федоряк

**ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО
ПОЛИМЕРНОГО НОСИТЕЛЯ ДЛЯ ТВЕРДОФАЗНОГО СИНТЕЗА
ФРАГМЕНТОВ ДНК НА ОСНОВЕ МИКРОСФЕРИЧЕСКОГО
АЭРОСИЛОГЕЛЯ «СИЛОХРОМ-2»**

Предложен новый полимерный носитель для высокоэффективного синтеза олигонуклеотидов на основе микросферического аэросилогеля «Силохром-2» с простой синтетической спейсерной группой между нуклеозидом и полимером. На носителе с успехом осуществлен синтез нескольких десятков олигодезоксирибонуклеотидов длиной до 35-звенных.

Введение. Одной из важнейших проблем твердофазного синтеза олигонуклеотидов является выбор эффективного полимерного носителя. Носители на основе полистирола [1], целлюлозы [2] или полиамидных смол [3, 4] используются редко, так как они малоэффективны вследствие низкой механической прочности, избыточного набухания полимеров, необратимой адсорбции реагентов, низких выходов конденсаций и др. Этих недостатков можно избежать при использовании жестких, ненабухающих, пористых неорганических полимеров. В настоящее время применяются носители на основе пористого стекла СРГ [5—8] и силикагеля [8—13], реже — кизельгура [14]. Силикагельные носители механически стабильны, химически инертны в условиях олигонуклеотидного синтеза, легко отмываются и функционализируются, хорошо сочетаются с любым методом синтеза. Для получения носителя используют в основном дорогие силикагели для ВЭЖХ типа «Porasil», «Fractosil», «Vudac» и др.; неплохие результаты демонстрируют и носители на основе силикагеля «Силохром С-80» [15—17]. В настоящей работе описано получение высокоэффективного носителя для твердофазного синтеза олигонуклеотидов на основе легкодоступного отечественного микросферического аэросилогеля «Силохром-2» с синтетическим спейсером.

Материалы и методы. В работе использованы янтарный ангидрид («Merck», ФРГ), 1-метилимидазол (MeIm), 3-аминопропилтриэтоксисилан («Fluka», Швейцария), пористое стекло СРГ LCAA, 500 Å («Pierse», США). Остальные реагенты и растворители отечественного производства. Растворители абсолютировали, как описано в [18]. Защищенные нуклеозиды получали согласно [18], Н-фосфонаты нуклеозидов — [19]. Содержание аминогрупп на полимере контролировали при помощи нингидринового теста [18], карбоксильных групп — согласно [11]. Спектрофотометрические измерения проводили на приборе СФ-46. Функционализацию стекла СРГ LCAA осуществляли по [8]. Автоматический синтез олигонуклеотидов проводили на синтезаторе «Виктория-6М»; обращенно-фазовую ВЭЖХ — на хроматографе Pharmacia FPLC System (Швеция) на колонке HR 5/2 с использованием градиента концентрации ацетонитрила в 0,1 М триэтиламонийацетатном буфере (рН 7,5) со скоростью элюции 0,5 мл/мин.

Получение носителя. Аминирование. «Силохром-2» (4 г) промывали конц. HCl, водой, метанолом и эфиром, высушивали при 60 °С. Суспендировали в 25 мл 95 %-го этанола, прибавляли 6 мл аминопиперидилтриэтоксисилана и выдерживали 2 ч при периодическом перемешивании. Носитель отфильтровывали, промывали спиртом и эфиром, высушивали в вакууме и выдерживали 1 ч при 110 °С. После обработки 5 мл триметилхлорсилана в 15 мл абсолютного пиридина (Py) в течение 2 ч носитель отфильтровывали, промывали пиридином, метанолом, затем раствором 5 %-го триэтиламина в хлороформе (для образования свободных аминогрупп), хлороформом и эфиром, высушивали в вакууме.

Карбоксилирование. Носитель упарили с абсолютным пиридином, суспендировали в 20 мл абсолютного пиридина, добавили 3 мл MeIm и 3 г янтарного ангидрида и выдержали в течение ночи. После полного исчезновения аминогрупп (нингидриновый тест) носитель отфильтровали, промыли пиридином, метанолом и водой, затем 0,1 М трихлоруксусной кислотой для образования свободных карбоксильных групп. Промыли водой до нейтрального pH, ацетоном и эфиром, высушили в вакууме.

Введение этилендиамина. Носитель обработали раствором 1 г *n*-нитрофенола и 1,35 г N, N'-дициклогексилкарбодимида (DCC) в смеси 2 мл абсолютного пиридина и 20 мл абсолютного ацетонитрила. Через 2 ч добавили 2,5 мл этилендиамина и выдержали смесь в течение ночи. Реакцию вели до полного исчезновения карбоксильных групп, повторяя ее при необходимости. Носитель отфильтровали, промыли пиридином, метанолом, 5 %-м триэтиламинном в хлороформе, затем хлороформом и эфиром. Высушивали в вакууме.

Повторное карбоксилирование проводили, как описано выше.

Посадка нуклеозидов. 1 г носителя, содержащего якорные COOH-группы, и 0,3 ммоль соответствующего 5'-O-диметокситритил-N-ацилнуклеозиды дважды упарили с абсолютным пиридином и обработали 0,6 ммоль тринизопропилбензолсульфохлорида (TPSCI, 180 г) и 2 ммоль MeIm (160 мкл) в 5 мл абсолютного пиридина в течение 1 ч, затем добавили 200 мкл абсолютного этанола для блокирования оставшихся карбоксильных групп. Через 30 мин носитель отфильтровали, промыли пиридином, метанолом, хлороформом и эфиром, высушили в вакууме. Если оставались свободные COOH-группы, то повторяли конденсацию со спиртом или всю процедуру в зависимости от их количества. Емкость носителей, определявшаяся спектрофотометрически по оптической плотности диметокситритильного катиона согласно [11, 18], составила 25—35 мкмоль/г.

Синтез олигонуклеотидов. Твердофазный синтез олигодезоксирибонуклеотидов осуществляли H-фосфонатным методом с проведением конденсаций в смеси CH₃CN — Py (4: 1) в ручном и автоматическом вариантах, как описано [20, 21]. После деблокирования целевые олигонуклеотиды выделяли электрофорезом в полиакриламидном геле.

Результаты и обсуждение. Микросферический аэросилогель «Силохром-2», известный как носитель для газовой хроматографии, по физическим параметрам близок к другим крупнопористым силикатным носителям для твердофазного синтеза олигонуклеотидов (табл. 1). Его преимуществом по сравнению с «Силохромом С-80» является правильная сферическая форма частиц, а также больший диаметр пор, что, как известно, повышает эффективность синтеза [5, 10, 13, 16]. Носитель механически достаточно прочный и успешно может использоваться в автоматических синтезаторах.

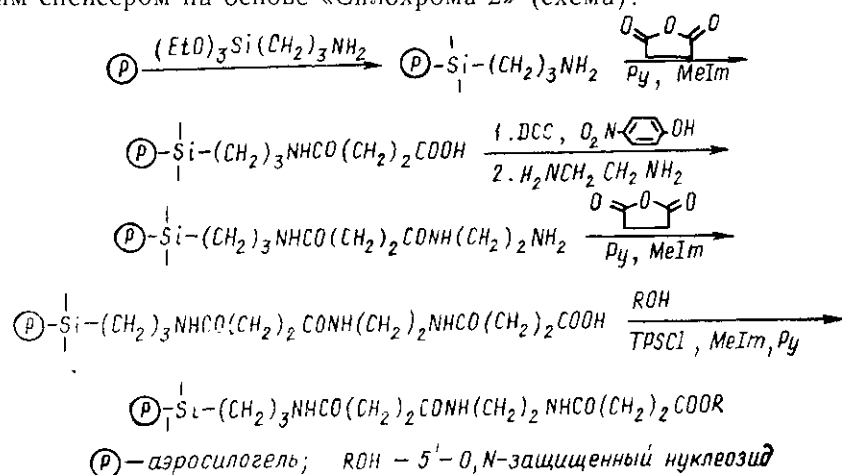
Эффективность носителя зависит от ряда факторов, среди которых емкость, диаметр пор, концентрация свободных силанольных групп, наличие и природа спейсерной группы и др. [5, 10—13, 15, 16]. Выходы реакций конденсации связаны со стерическими параметрами — концен-

Таблица 1
Физические параметры некоторых силикатных носителей для твердофазного синтеза олигонуклеотидов

Носитель	Размер частиц, мкм	Удельная поверхность, м ² /г	Средний диаметр пор, нм
«CPG-500»	125—177	70	50
«Fractosil-500»	63—125	50	50
«Силохром С-80»	200—300	70—100	40—60
«Силохром-2»	150—250	40—60	60—90

трацией функциональных групп на поверхности полимера и легкостью доступа к ним. Для повышения выходов увеличивают расстояние между носителем и олигонуклеотидной цепью при помощи спейсера. Предложен целый ряд конструкций спейсерных групп, в основном, полиамидной природы (табл. 2). Более высокая эффективность носителей со спейсерами объясняется уменьшением несвязанных взаимодействий между нуклеозидами и поверхностью полимера и устранением стерических препятствий для присоединения мономеров, особенно на первых стадиях синтеза (далее роль спейсера может играть растущая олигонуклеотидная цепь). Важнейшее значение имеют длина и структура спейсерной группы. Лучшие результаты (выход и гомогенность целевых олигонуклеотидов) достигаются со спейсерами вытянутой конформации, тогда как рост внутримолекулярных водородных связей и диполь-дипольных взаимодействий увеличивает вероятность изогнутых конформаций и снижает выход продуктов [12, 13]. Эффективные спейсеры должны состоять из коротких полярных фрагментов, содержащих планарные амидные связи, что вызывает удаление первого нуклеозида от неполярной силанизированной поверхности силикагеля [12]. К таким спейсерам относится, например, диглицильный спейсер (табл. 2, № 4), демонстрирующий отличные результаты, несмотря на относительно небольшую длину. Ему значительно уступают спейсеры, содержащие более длинные алифатические фрагменты, такие как бис- γ -аминобутирильный или бис- ϵ -аминогексанонильный, поскольку они легче сгибаются с образованием внутримолекулярных связей, а также «западают» на неполярной поверхности носителя в результате гидрофобных взаимодействий. Последнее уменьшает расстояние между олигонуклеотидом и носителем, снижая тем самым эффективность носителя [12].

Среди широкого круга изученных спейсеров [13] одним из лучших был спейсер № 8 (табл. 2). Для получения носителя нами использована спейсерная группа аналогичной конструкции (№ 10), в которой исходя из вышеизложенного остаток гексаметилендиамина заменен более коротким этилендиамином. Разработан способ синтеза носителя с таким спейсером на основе «Силохрома-2» (схема):



Аминирование аэросилогеля осуществляли обработкой аминопропилтриэтоксисиланом в водном этаноле согласно [18]. Этот метод дает лучшие результаты по сравнению с другими, например, кипячением в толуоле. После блокирования непрореагировавших силанольных групп триметилхлорсиланом в пиридине проводили сукцинирование аминогрупп на полимере янтарным ангидридом в пиридине в присутствии MeIm, как описано в [8]. К остаткам янтарной кислоты методом активированных эфиров присоединяли этилендиамин. Затем наращивали спейсер повторным сукцинированием и осуществляли посадку нуклеозидов на носитель, содержащий якорные гидроксильные группы, обрабатывая его соответствующим 5'-O-диметокситритил-N-ацилнуклеози-

дом в присутствии TPSCl и MeIm [8]. Преимущество такого подхода состоит в том, что отпадает необходимость в получении 3'-сукцилатов четырех нуклеозидов. Наши носители имели емкость 25—35 мкмоль/г, что близко к оптимальной при синтезе олигонуклеотидов для целей молекулярной биологии и генетической инженерии. Для крупнопористых носителей, в том числе «Силохрома-2», характерны относительно невысокая удельная площадь поверхности и, следовательно, емкость. Однако только носители с достаточно большим диаметром пор (50 нм и более) дают высокие выходы реакций конденсации, так как при этом облегчен доступ реагентов в поры [13, 16]. Стремление к увеличению загрузки не всегда оправдано, поскольку при этом часто снижаются выходы конденсации из-за влияния стерических факторов, связанных с увеличением плотности функциональных групп на поверхности полимера. При невысокой плотности посадки нуклеозидов выходы конденсаций выше, и могут быть получены более длинные олигонуклеотиды [10, 13].

На носителе с высокой эффективностью синтезировано несколько десятков олигодезоксирибонуклеотидов длиной до 35-звенных, в том числе фрагментов для последующей сборки гена металлотенина *Neurospora crassa*. Синтез осуществляли Н-фосфонатным методом с конденсацией в смеси ацетонитрил — пиридин (4 : 1) согласно [20, 21]. Последовательности и выходы некоторых олигонуклеотидов приведены в табл. 3. Выходы реакций конденсации были весьма высокими (в среднем 96—98 % на стадию в ручном и 97,5—99 % в автоматическом вариантах синтеза), начиная с первой стадии, и соответствовали или даже превосходили результаты, полученные на носителе CPG LCAA.

Таблица 2

Некоторые спейсерные группы в полимерных носителях вида R*·O—X—P

№	Спейсерная группа (X)	Полимер Р	Литературный источник
1	-Su-AP	Si, CPG	[5, 8—11, 17, 18]
2	-Su-Gly-EDA-	Polyamide	[3]
3	-Su-Gly-Gly-EDA-	Kieselguhr	[14, 18]
4	-Su-Gly-Gly-AP-	Si, CPG	[5, 12]
5	-Su-[NH(CH ₂) _n CO] _m -AP- (n=2,5; m=1,2)	Силохром С-80	[16]
6	-Su-NH(CH ₂) ₅ CO-AP-	CPG	**
7	-Su-NH(CH ₂) ₁₂ CO-NH-	Mono Beads	***
8	-Su-HMDA-Su-AP-	Si, CPG	[13]
9	-Su-HMDA-COOCH ₂ CH(OAc)CH ₂ O(CH ₂) ₃	CPG	[6, 18], ****
10	-Su-EDA-Su-AP-	Силохром-2	Данная работа

Примечание. Su — сукцилат, -COCH₂CH₂CO-; AP-аминопропил, -NH(CH₂)₃-; Gly — глицин, -NHCH₂CO-; EDA — этилендиамин, -NHCH₂CH₂NH-; HMDA — гексаметилендиамин, -NH(CH₂)₆NH-. * Остаток нуклеозида; ** носитель фирмы «Cruachem»; *** Gene Assembler Support («Pharmacia»); **** носитель CPG LCAA («Pierce», «Sigma»).

Таблица 3

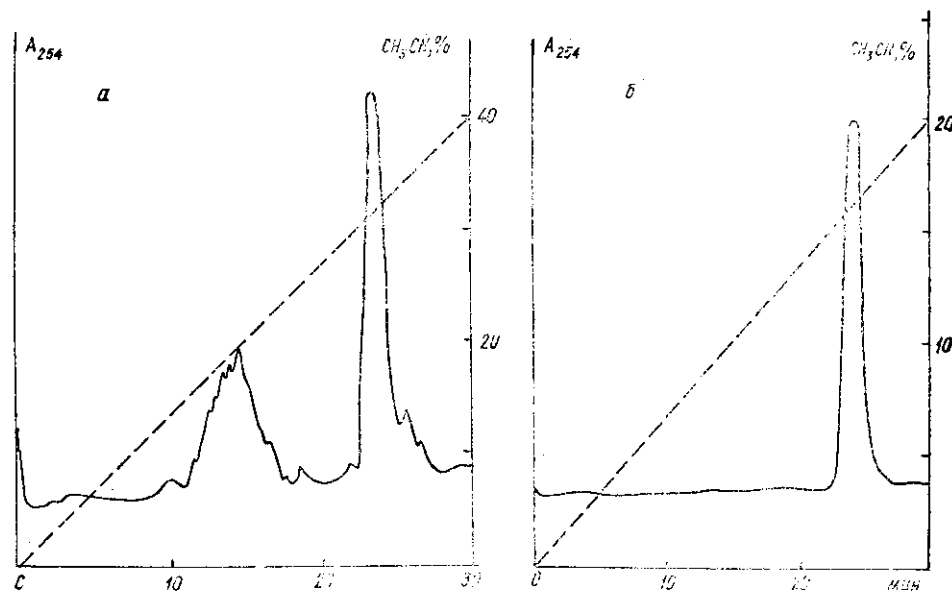
Последовательности и выходы некоторых синтезированных олигонуклеотидов

№	Последовательность	Выход*, %	Средний выход на стадию, %
I	d(CGGATCCG)	89	98,6
II	d(CACCACCACCACCAC)	86	99,0
III	d(TTGCCACTCCCTCTCTGCG)	70	98,2
VI	d(TCAGCATCTCATCAATTTTCAGTCA)	71	98,5
V	d(CCGCATCCATGAGTTGCCAACCTTTCA)	55	97,8

* В пересчете на первое звено, присоединенное к носителю.

Следует отметить, что в случае синтеза на носителе на основе того же аэросилогеля «Силохром-2», но без длинного спейсера, т. е. с простейшей связью между нуклеозидом и полимером (№ 1, табл. 2), на первых двух — трех стадиях выходы конденсаций были существенно ниже (85—95 %), как и гомогенность целевых продуктов.

Деблокирование и выделение олигонуклеотидов осуществляли стандартными методами. Чистота и гомогенность синтезированных соедине-



Анализ олигонуклеотида (V) обращенно-фазовой ВЭЖХ: а — реакционная смесь после удаления ацильных защитных групп; б — полностью деблокированный олигонуклеотид после очистки гель-электрофорезом

ний, определенные при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ и гель-электрофореза, не уступали результатам, полученным на носителе SPG LСАА (рисунок).

Таким образом, предложенный нами носитель для твердофазного синтеза олигонуклеотидов на основе микросферического аэросилогеля «Силохром-2» по своей эффективности полностью соответствует лучшим в мировой практике (но дорогим и труднодоступным) носителям на основе пористого стекла SPG. Описанная конструкция спейсера проста в получении и вместе с тем позволяет достичь весьма высоких выходов и чистоты синтезируемых соединений.

Авторы благодарят Г. Панасенко за предоставление образца «Силохрома-2».

Работа финансировалась Государственным комитетом Украины по вопросам науки и технологии.

Резюме. Запропоновано новий полімерний носій для високоефективного синтезу олигонуклеотидів на основі микросферичного аэросилогелю «Силохром-2» з простою спейсерною групою між нуклеозидом і полімером. На ньому успішно синтезовано декілька десятків олігодеоксирибонуклеотидів довжиною до 35 ланок.

Summary. New polymer support for the highly efficient oligonucleotide synthesis is proposed. It is based on the microspheric silica «Silochrom-2» with a simple synthetic spacer group between the nucleoside and polymer. On this support a few dozens of oligodeoxyribonucleotides up to 35 bases in length were synthesized successfully.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Miyoshi K., Arentzen R., Huang T., Itakura K.* Solid-phase synthesis of polynucleotides. IV. Usage of polystyrene resins for the synthesis of polynucleotides by the phosphotriester method // *Nucl. Acids Res.*—1980.—8, N 22.—P. 5507—5517.
2. *Crea R., Horn T.* Synthesis of oligonucleotides on cellulose by a phosphotriester method // *Ibid.*—N 10.—P. 2331—2348.
3. *Gait M. J., Singh M., Sheppard R. C. et al.* Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides. IV. Improved solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides through phosphotriester intermediates // *Ibid.*—N 5.—P. 1081—1096.
4. *Miyoshi K., Miyake T., Hozumi T., Itakura K.* Solid-phase synthesis of polynucleotides. II. Synthesis of polythymidylic acids by the block coupling phosphotriester method // *Ibid.*—N 22.—P. 5473—5489.
5. *Koster H., Biernat J., McManus J. et al.* Polymer support oligonucleotide synthesis. XY. Synthesis of oligodeoxynucleotides on controlled pore glass (CPG) using phosphate and phosphite triester approach // *Tetrahedron.*—1984.—40, N 1.—P. 103—112.
6. *Adams S. P., Kavka K. S., Wykes E. J. et al.* Hindered dialkylamino nucleoside phosphite reagents in the synthesis of two DNA 51-mers // *J. Amer. Chem. Soc.*—1983.—105, N 3.—P. 661—663.
7. *Sproat B. S., Bannwarth W.* Improved synthesis of oligodeoxynucleotides on controlled pore glass using phosphotriester chemistry and a flow system // *Tetrahedron Lett.*—1983.—24, N 51.—P. 5771—5774.
8. *Ejinov V. A., Buryakova A. A., Reverdatto S. V. et al.* Rapid synthesis of long-chain deoxyribooligonucleotides by the N-methylimidazolide phosphotriester method // *Nucl. Acids Res.*—1983.—11, N 23.—P. 8369—8387.
9. *Chow F., Kempe T., Palm G.* Synthesis of oligodeoxyribonucleotides on silicagel support // *Ibid.*—1981.—9, N 12.—P. 2807—2817.
10. *Kohli V., Balland A., Wintzerith M. et al.* Silica gel: an improved support for the solid-phase phosphotriester synthesis of oligonucleotides // *Ibid.*—1982.—10, N 22.—P. 7439—7448.
11. *Matteucci M. D., Caruthers M. H.* Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support // *J. Amer. Chem. Soc.*—1981.—103, N 11.—P. 3185—3191.
12. *Van Aerschoi A., Herdewijn P., Vanderhaeghe H.* Silice gel functionalized with different spacers as solid support for oligonucleotide synthesis // *Nucleosides and Nucleotides.*—1988.—7, N 1.—P. 75—90.
13. *Katzhendler J., Cohen S., Rahamim E. et al.* The effect of spacer, linkage and solid support on the synthesis of oligonucleotides // *Tetrahedron.*—1989.—45, N 9.—P. 2777—2792.
14. *Gait M. J., Matthes H. W. D., Sing M. et al.* Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides. YII. Solid phase-synthesis of oligodeoxyribonucleotides by a continuous flow phosphotriester method on a kieselguhr-polyamide support // *Nucl. Acid Res.*—1982.—10, N 20.—P. 6243—6254.
15. *Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г.* Автоматический синтез олигодезоксирибонуклеотидов. I. Исследование носителей на основе силикагеля марки «Силохром» // *Биоорг. химия.*—1985.—11, № 7.—С. 920—926.
16. *Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г.* Автоматический синтез олигодезоксирибонуклеотидов. III. Исследование носителей на основе силикагелей марки «Силихром» и «Силипор» // *Там же.*—1986.—12, № 2.—С. 213—219.
17. *Грязнов С. М., Чернов И. П., Поганов В. К. и др.* Автоматический синтез 20—47-звучных полидезоксирибонуклеотидов фосфитамидным методом на синтезаторе «Виктория-4М» // *Там же.*—№ 12.—С. 1604—1611.
18. *Oligonucleotide synthesis: a practical approach* / Ed. M. J. Gait.—Oxford; Washington, DC: IRL press, 1984.—218 p.
19. *Froehler B. C., Matteucci M. D., Ng P. C.* Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates // *Nucl. Acids Res.*—1986.—14, N 13.—P. 5399—5407.
20. *Ефимов В. А., Дубей И. Я.* Модификация H-фосфонатного метода синтеза олигонуклеотидов на полимерных носителях // *Биоорг. химия.*—1990.—16, № 2.—С. 211—218.
21. *Дубей И. Я., Ляпина Т. В., Федоряк Д. М.* Универсальный вариант твердофазного H-фосфонатного метода синтеза олигодезоксирибонуклеотидов // *Там же.*—№ 11.—С. 1574—1576.

Ин-т биоорг. химии и нефтехимии АН Украины, Киев

Получено 27.11.92