

1. *Ajtkhozhin M. A., Akhanov A. U., Doschanov Kh. I.* Informosomes of germinating wheat embryos // FEBS Lett.—1973.—31, N 1.—P. 104—106.
2. *Ajtkhozhin M. A., Akhanov A. U.* Release of mRNP-particles of the informosome type from polyribosomes of higher plant embryos // Ibid.—1974.—41, N 2.—P. 275—279.
3. *Spirin A. S., Ajtkhozhin M. A.* Informosomes and polyribosome associated proteins in eukaryotes // Trends Biochem. Sci.—1985.—10, N 4.—P. 162—165.
4. *Филимонов Н. Г., Айтхожин М. А., Газарян К. Г.* Поли(А)-содержащие РНК из прорастающих зародышей пшеницы // Молекуляр. биология.—1978.—12, № 3.—С. 552—556.
5. *Организация нуклеотидных последовательностей ядерной ДНК зародышей пшеницы* / Н. Г. Филимонов, Н. А. Мартакова, Л. С. Попов и др. // Биохимия.—1982.—47, № 7.—С. 1198—1207.
6. *On the lability of poly(A)-sequences during the extraction of messenger RNA from polyribosomes* / R. P. Perry, J. La Torre, D. E. Kelley, J. R. Greenberg // Biochim. et biophys. acta.—1972.—262, N 2.—P. 220—226.
7. *Маниагис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Выделение, очистка и анализ мРНК из эукариотических клеток // Методы генетической инженерии.—М.: Мир, 1984.—С. 186—204.
8. *The separation of soluble ribonucleic acids on benzoylated diethylaminoethylcellulose* / J. Gillam, S. Millward, D. Biew et al. // Biochemistry.—1967.—6, N 10.—P. 3043—3056.
9. *Marcus A., Efron D., Weeks D. P.* The wheat embryos cell-free system // Meth. Enzymol.—1974.—30.—P. 749—754.
10. *Roberts W. K.* Use of benzoylated cellulose columns for the isolation of poly(adenylic acid) containing RNA and other polynucleotides with little secondary structure // Biochemistry.—1974.—13, N 18.—P. 3677—3682.
11. *Role of the polyadenylate segment in the translation of globin mRNA in Xenopus oocytes* / G. Huez, G. Marbaix, E. Hubert et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1974.—71, N 7.—P. 3143—3146.

Ин-т молекуляр. биологии и биохимии
АН КазССР, Алма-Ата

Получено 14.10.85

УДК 577.113.6:542.95

ПОЛНЫЙ АВТОМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ФОСФОТРИЭФИРНЫМ МЕТОДОМ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ НА СИНТЕЗАТОРЕ «ВИКТОРИЯ-4М»

**С. М. Грязнов, В. К. Потапов, В. В. Горн,
В. Ф. Зарытова, Ю. Г. Средин, Г. А. Потемкин, Э. А. Шабарова**

Разработка и использование автоматических синтезаторов олигодезоксирибонуклеотидов является логическим следствием прогресса, достигнутого в последние годы в области химического олигонуклеотидного синтеза [1, 2]. Работы по автоматическому твердофазному синтезу олигонуклеотидов, проводимые в нашей стране с начала 70-х годов в МГУ, СКТБ специальной электроники и аналитического приборостроения и Новосибирском институте биорганической химии СО АН СССР, завершились в настоящее время созданием синтезатора «Виктория-4М», результаты испытаний которого в различных вариантах триэфирной схемы в полностью автоматическом режиме описаны в настоящей статье.

Материалы и методы. В работе использовали TPS, полученный в Опытном химическом производстве Новосибирского института органической химии СО АН СССР; MeIm («Fluka», Швейцария); силикагель Kieselgel-60 («Merck», ФРГ); Kieselgel-RPTMS («Merck», ФРГ); тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках Kieselgel-F₂₅₄ («Merck», ФРГ) в системах хлороформ—этанол (9:1, v/v) и ацетонитрил—вода (9:1, v/v); 5'-(п-хлорфенил-β-цианэтил)-фосфат-N-ацил-нуклеозиды,

Принятые обозначения: приставка d-(дезоксид-) везде опущена; TPS — 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид; MeIm — 1-метилимидазол, pN — 5'p-(п-хлорфенил, β-цианэтил)-N-ацил-нуклеотид; ММТг — (п-метокси)-трифенилметил; ТМГ — тетраметилгуанидин; ТФУ — трифторуксусная кислота; ТБАФ — тетрабутиламмонийфторид.

производства ОХП НИОХ СО АН СССР; 2'-дезоксирибонуклеозиды (СКТБ БАВ, Новосибирск); получение 5'-монометокситритил-3'-(п-хлорфенил)-фосфат-N-бензоил-нуклеозидов проводили согласно [3, 4]. Их очистку осуществляли колоночной хроматографией на силикагеле Kieselgel-RPTMS («Merck», ФРГ) в системе ацетон — вода (40 : 60, v/v). Элюат, содержащий продукт (ТСХ контроль), упаривали до масла, переупаривали с абсолютным пиридином для удаления остатков воды, а затем вспенивали из раствора в 1,2-дихлорэтаноле. Вспененные нуклеотиды сушили в вакууме масляного насоса над P₂O₅ в течение 48 ч.

Полимерный носитель П₁ получали модификацией носителя ГЖХ марки «Полихром-1», размер частиц 250—500 мкм, по методике [5]. Полимерный носитель П₂ получали из коммерческого силихрома марки С-80, размер частиц 100—200 мкм, внутренний диаметр пор 50 нм, последовательно обрабатывая его γ-аминопропиотриэтоксисилоном и янтарным ангидридом по методике [2]. Количество первого присоединенного нуклеозидов составляло 55—60 мкмоль/г.

Растворы нуклеотидов (0,3 М) в абсолютном ацетонитриле, 1,5 М TPS в хлороформе (или 1,2-дихлорэтаноле — схема 2) и 6 М MeIm в пиридине вводили в сосуды синтезатора с помощью шприца. Соотношение реагирующих веществ в реакторе в ходе синтеза по обеим схемам составляло рN (ММТгНр) : TPS : MeIm = 1 : 3 : 8, при этом концентрации реагентов в смеси соответственно равнялись 0,15, 0,45 и 1,2 М.

Синтез олигонуклеотидов на синтезаторе «Виктория-4М» проводили в реакторе проточного типа объемом 100 мкл на 35—40 мг соответствующего носителя. Количество удаляемой монометокситритильной группы при синтезе по схеме 2 определяли спектрофотометрически в 0,5 М растворе ТФУ в 1,2-дихлорэтаноле на приборе Specord UV-VIS (ГДР), E₄₇₆ = 55000. По окончании синтеза полимер-олигонуклеотид извлекали из реактора и обрабатывали согласно [6] — схема 1 и [2, 7] — схема 2 для удаления защитных групп.

Олигонуклеотиды после удаления защитных групп выделяли ионообменной хроматографией по методу [6] на приборе «Altex» (США) в градиенте концентраций калий-фосфатного буфера от 0 до 0,3 М, содержащего 30 % ацетонитрила при 52 °С. Выделенные олигонуклеотиды анализировали на гомогенность и обессоливали высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографией на приборе «Altex» (США), носитель Nucleosil-RP-18-45000, в градиенте ацетонитрила от 0 до 30 % в 0,05 М буфере перхлората лития [6].

Результаты и обсуждение. Принципиальная гидравлическая схема прибора представлена на рисунке. Следует отметить несколько важных конструктивных особенностей модели синтезатора «Виктория-4М». Во-первых, в автомате «Виктория-4М» растворы нуклеотидного или нуклеозидного компонентов, TPS и нуклеофильного катализатора в соответствующих пропорциях дозируются в смесительную камеру, откуда после перемешивания смесь подается в реактор с полимерным носителем. Наличие смесительной камеры очень важно. Такая конструкция позволяет подавать в колоночный реактор смесь реагентов строго контролируемой концентрации, чего не было в предыдущей модели «Виктория-3» [7], где растворы нуклеотида и конденсирующего агента подавались в колонку последовательно. Это обстоятельство являлось причиной различий в составе реакционной смеси в зоне полимера (особенно в реакторах малого объема) по сравнению с программируемой, вследствие чего конденсации в каждом цикле синтеза на автомате «Виктория-3» протекали с низкими выходами (65—70 %).

Вторым важным моментом в конструкции «Виктория-4М» является возможность отдельного хранения и дозирования нуклеофильного катализатора, что сняло проблему его совместного хранения с конденсирующим агентом или нуклеотидами.

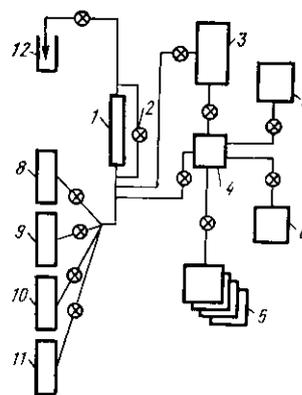
Автомат имеет четыре сосуда для хранения нуклеотидов (рисунок) и таким образом рассчитан на работу с мономерными компонентами. При использовании колоночного реактора объемом 100 мкл одной заправки (5 мл) достаточно для проведения 25—28 конденсаций с каждым нуклеотидом (всего на 100 и более конденсаций). Общий расход растворителей и деблокирующих реагентов на одну стадию синтеза составляет 15 мл.

Блок электронного управления позволяет записать в память команды для проведения синтеза вплоть до 64-членного олигонуклеотида, причем каждый цикл введения одного нуклеотидного звена может включать 30 различных операций. При необходимости продолжения наращивания цепи сверх 64 звеньев может быть запущена новая программа синтеза.

В целях определения возможностей синтезатора «Виктория-4М» синтез олигонуклеотидов проводили по двум схемам в направлении

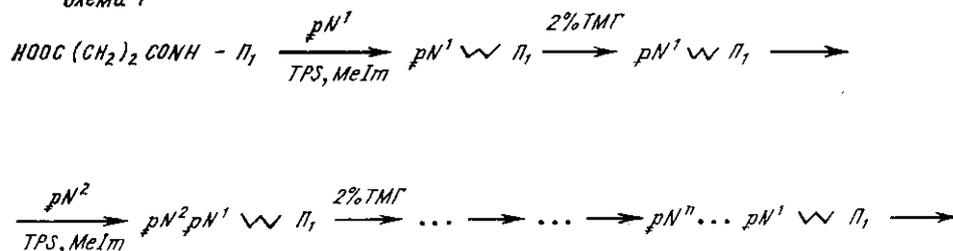
Принципиальная гидравлическая схема автомата-синтезатора «Виктория-4М»: реактор (1); циркулярный контур (2); сосуд для абсолютного растворителя объемом 450 мл (3); смесительная камера, 500 мкл (4); емкости для нуклеотидных компонентов, 4×5 мл (5); сосуды для конденсирующих реагентов, 2×20 мл (6, 7); сосуды для вспомогательных растворов, 400 мл, 3×200 мл (8–11); слив (12); х — запорный клапан.

General scheme of the automatic synthesizer «Victory-4M»: reactor (1); circular contour (2); dry solvent vessel, vol. 450 ml (3); mixing chamber, vol. 500 µl (4); nucleotide vessels, 4×5 ml (5); condensing agents vessels, 2×20 ml (6, 7); additional solvents vessels, 400 ml, 3×200 ml (8–11); waste (12); x — closing valve.



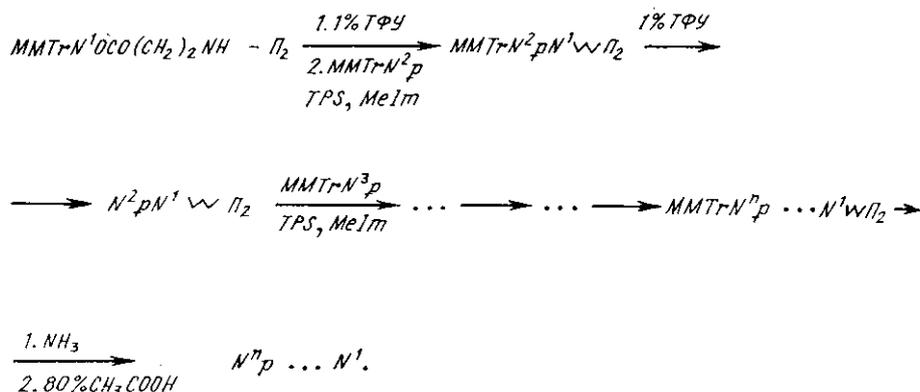
3'→5' защищенными мономерами, используя: 1) 5'-Р-нуклеотидный компонент, присоединенный к полимеру П₁ и 3'-ОН-нуклеозидный компонент в растворе [5, 6] (схема 1); 2) 3'-Р-нуклеотидный компонент

Схема 1



в растворе и 5'-ОН-нуклеозидный компонент, присоединенный к полимеру П₂ [3, 7] (схема 2).

Схема 2



В качестве носителей использовали полимеры двух различных типов — модифицированный полистирол с карбоксильными якорными группами, радиационно привитый на тефлоновые гранулы (П₁) [7], и отечественный силохром С-80 с карбоксильными якорными группами (П₂). Предварительного присоединения первого нуклеотидного звена на полимер П₁ не проводили. Его осуществляли в ходе наращивания олигонуклеотидной цепи по схеме 1 (практически количественно по всем карбоксильным группам) и общему регламенту (табл. 1). Это позволяет использовать один универсальный полимерный носитель для любых синтезируемых последовательностей [5]. На полимер П₂ первый нуклеозид предварительно присоединяли с помощью 3'-гидроксильной группы 5'-мометокситритил-N-бензоил-нуклеозида [2]. Синтез олигонуклеотидов по схеме 1 проводили на полимерном носителе П₁, а по схеме 2 — как на П₁, так и на П₂. Использование носителя П₂ для синтеза по первой схеме невозможно, ввиду протекающей под действием тетраметилгуанидина глубокой деструкции поверхностного слоя полимера и, следовательно, потери нуклеотидного материала на каждой стадии. Тем не менее доступность и простота модификации (отсутствие радиационной прививки) силохрома С-80 и хорошие функциональные

Таблица 1

Карта-схема операций автомата-синтезатора «Виктория-4М» для синтеза олигонуклеотидов

The working regime of automatic oligonucleotides synthesiser «Victory-4M»

Операция	Реагент	Растворитель	Время*, с	Количество** доз
По схеме 1				
Промывка	—	Пиридин : ацетонитрил, 1 : 1	40	—
Дозация нуклеотида	0,3 М рН	Ацетонитрил	—	6
Дозация КР1	1,5 М TPS	Хлороформ	—	4
Дозация КР2	6 М MeIm	Пиридин	—	3
Перемешивание	—	—	40	—
Ввод смеси	—	—	—	8
Циркуляция	—	—	30 мин	—
Промывка	—	Пиридин : ацетонитрил, 1 : 1	60	—
Промывка	2 %-ный ТМГ	Пиридин	40	—
Пауза	—	—	60	—
Промывка	—	Ацетонитрил	30	—
Промывка	5 %-ная CH ₃ COOH	Хлороформ	40	—
Промывка	—	Ацетонитрил	30	—
Промывка	—	Пиридин : ацетонитрил, 1 : 1	60	—
По схеме 2				
Промывка	—	Дихлорэтан	40	—
Промывка	0,1 М ТФУ	Дихлорэтан	20	—
Пауза	—	—	20	—
Промывка	0,1 М ТФУ	Дихлорэтан	20	—
Промывка	—	Дихлорэтан	30	—
Промывка	20 %-ный ДМФ	Дихлорэтан	30	—
Промывка	—	Пиридин : ацетонитрил, 1 : 1	60	—
Дозация нуклеотида	0,3 М ММTrNp	Ацетонитрил	—	6
Дозация КР1	1,5 М TPS	Дихлорэтан	—	4
Дозация КР2	6 М MeIm	Пиридин	—	3
Перемешивание	—	—	40	—
Ввод смеси	—	—	—	8
Циркуляция	—	—	20 мин	—
Промывка	—	Пиридин : ацетонитрил, 1 : 1	60	—
Промывка	—	Ацетонитрил	40	—
		As ₂ O : Et ₃ N : MeIm = 4,5 : 4,5 : 1		
Пауза	—	—	4 мин	—
Промывка	—	Дихлорэтан	40	—

* Время одного цикла по схеме 1—40 мин; по схеме 2 — 35 мин. ** Объем одной дозы 25 мкл.

свойства делают его весьма перспективным для автоматического синтеза по схемам, аналогичным схеме 2 — без обработок сильными основаниями.

Карта-схема операций одного цикла наращивания олигонуклеотидной цепи на синтезаторе «Виктория-4М» определена экспериментально и представлена в табл. 1. В соответствии с полученной картой-схемой был осуществлен полный автоматический синтез ряда 4—11-звенных олигонуклеотидов, структура и другие характеристики которых представлены в табл. 2. Самокомплементарные олигонуклеотиды (3—5), содержащие природные и модифицированные участки узнавания эндонуклеазы рестрикции Sso-1, предназначены для изучения влияния различного окружения центральной тетра-нуклеотидной последовательности ААТТ на функционирование фермента. Гептануклеотид (7) и ундекануклеотид (9) входят в состав ДНК-дуплексов, на которых исследовали реакцию химического лигирования [8].

Таблица 2
Структура и выходы синтезированных олигонуклеотидов
Structure and yields of the synthesised oligonucleotides

Олигонуклеотид	Схема	Полимер	Выделено ОЕ ₂₆₀	Средний выход на стадию, %		Общий выход олигонуклеотидов*, %
				по ММТг	по выделенно- му продукту	
1. pGCAT	1	Тефлон	56	—	75	21
2. pCCCTTCTCT	1	»	30	—	79	15
3. pGTТААТТААС	1	»	25	—	78	15
4. pGTGAATTСАС	1	»	10	—	65	6
5. pGTAAATTTAC	1	»	5	—	71	11
6. GТАСТ	2	С-80	20	84	74	18
7. АСGGATrU	2	С-80	16	86	75	13
7'. АСGGATrU	2	Тефлон	13	79	71	12
8. TCTCTTCTT	2	С-80	21	81	74	14
9. ССAGGAGTGAT	2	С-80	6	82	70	10
9'. ССAGGAGTGAT	2	Тефлон	8	83	72	11

* Выход определяли в расчете на первое нуклеотидное звено после хроматографического выделения продукта.

Следует отметить, что при проведении синтеза по схеме 1 наблюдается резкое падение выхода после введения в состав олигонуклеотида гуанинового нуклеотида. Отмеченное явление связано, по-видимому, с легко протекающим внутримолекулярным фосфорилированием оксо-группы в положении 6 гуанинового основания, пространственно сближенной 5'-фосфатной группой, на что указывалось в ряде работ [9]. Это приводит к выводу из сферы реакции нуклеотидного компонента, иммобилизованного на полимере, и как следствие — снижению общего выхода олигонуклеотида.

При синтезе по схеме 2, где 3'-Р-нуклеотидный компонент находится в растворе и большом избытке по отношению к нуклеозидному компоненту, иммобилизованному на полимере, заметного падения выходов при и после присоединения гуанинового нуклеотида не наблюдается.

Измерение количества удаляемой на каждой стадии монометокситритильной группы (схема 2) позволяет достаточно точно оценить выход продукта конденсации при условии проведения постадийного блокирования уксусным ангидридом непрореагировавших 5'-гидроксильных групп. Конечный выход олигонуклеотидов (6—9), рассчитанный по этому методу, хорошо согласуется с выходом после выделения и хроматографической очистки (табл. 2). В целом олигонуклеотидный синтез (выходы, затраты времени, растворителей, чистота продуктов и т. д.) в автоматическом режиме по обеим схемам протекает с практически одинаковой эффективностью (табл. 2).

Достаточно высокие и стабильные выходы олигонуклеотидов, полученных в автоматическом режиме на синтезаторе «Виктория-4М», а также полная воспроизводимость результатов, свидетельствуют о точности и надежности выполнения прибором всех программируемых операций. Учитывая то обстоятельство, что приведенные в табл. 2 средние выходы на стадию рассчитывали, исходя из количества выделенного продукта и, следовательно, степени превращения на отдельных стадиях конденсации на 10—15 % выше и составляют 85—90 %, можно констатировать, что эффективность работы синтезатора соответствует лучшим результатам триэфирных схем синтеза [7, 10].

THE ALL-MACHINE SYNTHESIS
OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES BY PHOSPHOTRIESTER
APPROACH USING AUTOMATIC SYNTHESIZER «VICTORY-4M»

S. M. Gryaznov, V. K. Potapov, V. V. Gorn, V. F. Zarytova,
Yu. G. Sredin, G. A. Potemkin, Z. A. Shabarova

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow
Institute of Bioorganic Chemistry,
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk
Special Design Technological Office
of the Special Electronics and Analytical Instrument Engineering,
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

Summary

The working regime of new model of automatic synthesizer of oligodeoxyribonucleotides «Victory-4M» applicable for two schemes of phosphotriester synthesis of oligonucleotides in 3'-5' direction has been developed, the nucleotide components being either dissolved in the solvents or immobilized on polymer supports. Both styrene-teflon copolymer and silochrome C-80 were used as polymer supports. The comparative analysis of the results of all-machine synthesis of the series of oligodeoxyribonucleotides has shown, that inspite of the differences in the structure and chemical nature of supports and nucleotide components, the average yield was about 75-80 % per step. These results demonstrated the efficiency of synthesizer and applicability of the both synthetic approaches for automatized synthesis of oligonucleotides.

1. Полуавтоматический твердофазный синтез олигодезоксирибонуклеотидов / В. К. Потопов, Г. А. Потемкин и др. // Докл. АН СССР.— 1982.—263, № 6.— С. 1386.
2. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. Автоматический синтез олигодезоксирибонуклеотидов. I. Исследование носителей на основе силикагеля марки «Силохром» // Биооргани. химия.— 1985.—11, № 7.— С. 920—926.
3. New effective method for the synthesis of oligonucleotides via phosphotriester intermediates / V. A. Efimov, A. A. Buryakova, S. V. Reverdatto et al. // Nucl. Acids Res.— 1982.—11, N 23.— P. 8369—8387.
4. Triester-Festphasensynthese von oligodesoxyribonucleotiden an polystyren — teflon trägern / A. Rosenthal, D. Cech, V. P. Veiko et al. // Tetrahedron Lett.— 1983.—26, N 16.— P. 1691—1694.
5. Горн В. В., Зарытова В. Ф. Твердофазный синтез олигодезоксирибонуклеотидов, пригодных для непосредственного использования в лигазной реакции // Биооргани. химия.— 1985.—11, № 6.— С. 808—814.
6. Бауск Е. В., Горн В. В., Лебедев А. В. Унифицированный вариант твердофазного синтеза 5'-фосфорилированных олигодезоксирибонуклеотидов на основе β-цианэтиловых п-хлорфениловых эфиров N-ацилнуклеозид-5'-фосфатов // Там же.— С. 815.
7. Грязнов С. М. Отработка регламента работы автомата-синтезатора олигонуклеотидов «Виктория-3» / МГУ.— М., 1984.— 3 с.— Деп. в ВИНТИ 30.08.84, № 6054.
8. Синтез и изучение термической устойчивости олигодезоксирибонуклеотидных дуплексов со структурными аномалиями / О. И. Грязнова, Н. Г. Долинина, М. Г. Исагуляни и др. // Биооргани. химия.— 1986.—12, № 1.— С. 124—131.
9. The protection of uracil and guanine residues in oligonucleotides synthesis / S. S. Jones, C. B. Reese, S. Sifanda, A. Ubasawa // Tetrahedron Lett.— 1981.—22, N 47.— P. 4755—4758.
10. Катализируемый метилимидазолом быстрый синтез олигодезоксирибонуклеотидов фосфотриэфирным путем на силикагельном носителе в дихлорэтане / В. Н. Добрынин, С. А. Филиппов и др. // Биооргани. химия.— 1983.—9, № 5.— С. 706—710.

МГУ им. М. В. Ломоносова

Ин-т биооргани. химии СО АН СССР, Новосибирск
СКТБ спец. электроники и аналит. приборостроения
СО АН СССР, Новосибирск

Получено 28.12.85