

УДК 542.06; 577.113.6

М. Ю. ТАТУЛЬЧЕНКОВ, А. Р. НАБИУЛЛИН, М. В. КВАЧ

АМИДОФОСФИТНЫЙ РЕАГЕНТ И ТВЕРДОФАЗНЫЙ НОСИТЕЛЬ ДЛЯ СИНТЕЗА 5'- И 3'-ФОСФОРИЛИРОВАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Институт физико-органической химии НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 30.12.2013)

Нуклеиновые кислоты, содержащие 5'-концевую фосфатную группу, применяются в молекулярной биологии при проведении лигазной цепной реакции [1], а также в генной инженерии и других приложениях [2, 3]. Для их получения используется фосфорилирование олигонуклеотидов T_4 -полинуклеотидкиназой [4], однако более распространенными являются химические методы, поскольку они дешевле и проще в применении.

Фосфорилированные олигонуклеотиды могут быть получены в условиях автоматического твердофазного синтеза в ДНК-синтезаторе. Для введения модификации по 5'-положению используют амидофосфитные реагенты, синтез которых описан в работах [5, 6]. Для введения метки в 3'-положение олигонуклеотидной цепи применяют модифицированный твердофазный носитель, получение которого в литературе не описано.

В данной работе мы приводим синтез амидофосфитного реагента и твердофазного носителя, позволяющих проводить 5'- и 3'-фосфорилирование олигонуклеотидов в автоматизированном режиме.

Экспериментальная часть. В работе использовали *бис*-(2-гидроксиэтил)сульфид (Aldrich), пергидроль (ГОСТ 177–88), *N,N*-диизопропилэтиламин (Fluka), 4,4'-диметокситритилхлорид (GL-biochem), LCAA-CPG (long chain aminoalkyl controlled pore glass, Pierce, 500Å, 80 мкмоль/г аминогрупп). Растворители очищали перегонкой. (*N,N*-диизопропиламино)-(2-цианоэтокси)хлорфосфин синтезирован по ранее описанной методике [7]. За ходом реакций следили с помощью ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F_{254} (Merck); пятна визуализировали при помощи ультрафиолета, паров иода, водного раствора перманганата калия и паров трифторуксусной кислоты. Для колоночной хроматографии использовали силикагель Kieselgel 60 (Merck), размер частиц 40–63 мкм. Спектры ЯМР регистрировали при 500 МГц (1H) и 202,4 МГц (^{31}P) на спектрометре Bruker AC-500. Спектры калиброваны по остаточным сигналам протонов растворителя, химические сдвиги приведены относительно $SiMe_4$ (1H) и 85 % аq. H_3PO_4 (^{31}P). Олигонуклеотидный синтез проводили на приборе BiosSet ASM-800 в масштабе 200 нмоль по стандартным протоколам изготовителя.

***Бис*-(2-гидроксиэтил)сульфон (1).** *Бис*-(2-гидроксиэтил)сульфид (15 г, 0,123 моль) растворяли в ледяной уксусной кислоте (110 мл). Раствор охлаждали до 0 °С, и при перемешивании прибавляли 30%-ный раствор пероксида водорода (48 мл, 0,492 моль). Смесь нагревали до 80 °С и выдерживали при этой температуре 2,5 ч, после чего добавляли 15 мл уксусного альдегида для удаления избытка перекиси. Растворители упаривали на роторном испарителе, в результате чего получена бесцветная маслянистая жидкость, из которой выделено вещество **1** при помощи колоночной хроматографии. Получили 5,04 г сульфона **1** (27 %), представляющего собой бесцветные кристаллы. 1H ЯМР ($CDCl_3$): δ 4,13 (t, 4H), 3,37 (t, 4H).

2-((2-(4,4'-диметокситритилокси)этил)сульфонил)этанол (2). Сульфен **1** (4,63 г, 0,03 моль) растворяли в пиридине (65 мл), и при перемешивании прибавляли 4,4'-диметокситритилхлорид

(7,40 г, 0,022 моль). Смесь перемешивали в течение 18 ч, после чего раствор упаривали на ротормном испарителе. Остаток разбавляли этилацетатом (180 мл) и промывали насыщенными растворами NaHCO_3 (180 мл) и NaCl (180 мл). Сушили безводным сульфатом натрия, раствор упаривали, а остаток хроматографировали, элюируя градиентом метанола (0 → 3 %) в хлороформе с добавлением 1 % триэтиламина. В результате выделили 6,15 г густого маслянистого вещества **2** (61,7 %), имеющего слабую желтоватую окраску. ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 7,42–7,38 (m, 2H), 7,33–7,27 (m, 6H), 7,25–7,21 (m, 1H), 6,87–6,82 (m, 4H), 4,12–4,08 (m, 2H), 3,79 (m, 6H), 3,67 (t, 2H), 3,38 (t, 2H), 3,19 (t, 2H).

(2-((2-(4,4'-диметокситритилокси)этил)сульфонил)этил)-(2-цианоэтил)диизопропилфосфорамидит (3). Спирт **2** (0,912 г, 2 ммоль) растворяли в CH_2Cl_2 (5 мл), при 0 °С прибавляли *N,N*-диизопропилэтиламин (0,376 мл, 2,2 ммоль) и (*N,N*-диизопропиламино)-(2-цианоэтокси)хлорфосфин (0,52 г, 2,2 ммоль). Раствор нагревали до комнатной температуры, перемешивали 10 мин, разбавляли CH_2Cl_2 (20 мл) и промывали насыщенными растворами NaHCO_3 (10 мл) и NaCl (2 × 10 мл). Сушили безводным сульфатом натрия и упаривали на ротормном испарителе. Остаток растворяли в небольшом объеме (5 мл) толуола и осаждали в гексан. Раствор декантировали, продукт растворяли в хлористом метиле и упаривали досуха. Получили 1,11 г целевого амидофосфита **3** (84,6 %). ^1H ЯМР (CD_3CN): δ 7,46–7,41 (m, 2H), 7,34–7,28 (m, 6H), 7,26–7,21 (m, 1H), 6,90–6,84 (m, 4H), 4,07–3,96 (m, 2H), 3,85–3,73 (m, 8H), 3,66–3,57 (m, 2H), 3,48–3,30 (m, 6H), 2,62 (t, 2H), 1,18 (d, 6H), 1,16 (d, 6H). ^{31}P ЯМР (CD_3CN): δ 148,4.

Твердофазный носитель (4). Твердофазный носитель LCAA-CPG (2 г), содержащий первичные аминогруппы, обрабатывали 3%-ным раствором трифторуксусной кислоты в CH_2Cl_2 (20 мл) в течение 4 ч, отфильтровывали, промывали смесью $\text{Et}_3\text{N}/\text{DIPEA}$ 9:1 (10 мл) и сушили в вакууме. Активированный носитель суспендировали в пиридине (67 мл) и добавляли *n*-*N,N*-диметиламинопиридин (ДМАП) (0,54 г, 4,4 ммоль) и янтарный ангидрид (2 г, 20 ммоль). Смесь выдерживали 48 ч, отфильтровывали, промывали пиридином (50 мл), ацетонитрилом (50 мл), CH_2Cl_2 (50 мл) и эфиром (50 мл), сушили в вакууме. Получили носитель, содержащий карбоксильные группы (LCAA-CPG- CO_2H).

Данный носитель (0,88 г) суспендировали в смеси ДМФ/пиридин (5/5 мл), добавляли сульфон (**2**) (0,3 г, 0,66 ммоль), ДМАП (53 мг, 0,43 ммоль) и диизопропилкарбодимид (741 мкл, 4,74 ммоль). Смесь выдерживали 72 ч, добавляли 0,26 г пентафторфенола и оставляли на ночь. Носитель отфильтровывали, промывали CHCl_3 (20 мл) и суспендировали в растворе пиперидина (450 мкл) в пиридине (9 мл). Выдерживали 5 мин, отфильтровывали, промывали пиридином (50 мл), метанолом (50 мл), ацетонитрилом (50 мл), CH_2Cl_2 (50 мл) и эфиром (50 мл), сушили в вакууме.

По поглощению диметокситритил-катиона в растворе дихлоруксусной кислоты в CH_2Cl_2 при 505 нм (коэффициент экстинкции $76\,000\ \text{л} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$) определяли загрузку полученного твердофазного носителя **4**, которая составила 23 мкмоль/г.

Олигонуклеотидный синтез проводили в автоматическом режиме с использованием стандартных амидофосфитов по протоколам изготовителя прибора. Конденсацию терминального амидофосфита **3** проводили в течение 7,5 мин. Отщепление олигонуклеотида от носителя и деблокирование осуществляли концентрированным аммиаком (28 %, 0,75 мл). Электрофорез модифицированных олигонуклеотидов проводили в 20%-ном денатурирующем (7 М мочевины) полиакриламидном геле.

Результаты и их обсуждение. В качестве синтетического блока для получения амидофосфитного реагента и твердофазного носителя, с помощью которых осуществляется химическое фосфорилирование олигонуклеотидов, можно использовать универсальный реагент *бис*-(2-гидроксиэтил)сульфон. Производные этого соединения стабильны на всех стадиях процесса олигонуклеотидного синтеза, но они достаточно лабильны в основной среде, что связано с образованием стабилизированного карбаниона при атоме серы и протекающим далее бета-элиминированием. Это свойство позволяет проводить деблокирование продукта олигонуклеотидного синтеза концентрированным водным раствором аммиака с образованием фосфатной группы по 5'- или 3'-положению.

Целевой бис-(2-гидроксиэтил)сульфон может быть получен из доступного бис-(2-гидроксиэтил)сульфида окислением перекисью водорода. Нами установлено, что основными побочными продуктами реакции являются моно- и диацетат, которые удалось отделить колоночной хроматографией.

Диметокситритилирование вещества (1) проводили при недостатке 4,4'-диметокситритилхлорида, что обеспечивало минимальное образование побочного бис-продукта. При помощи колоночной хроматографии монотритилированный продукт (2) легко отделяется от исходного соединения и продукта дитритилирования.

Превращение полученного реагента (2) в твердофазный носитель (4) и амидофосфитный реагент (3) осуществлено по схеме, представленной на рис. 1.

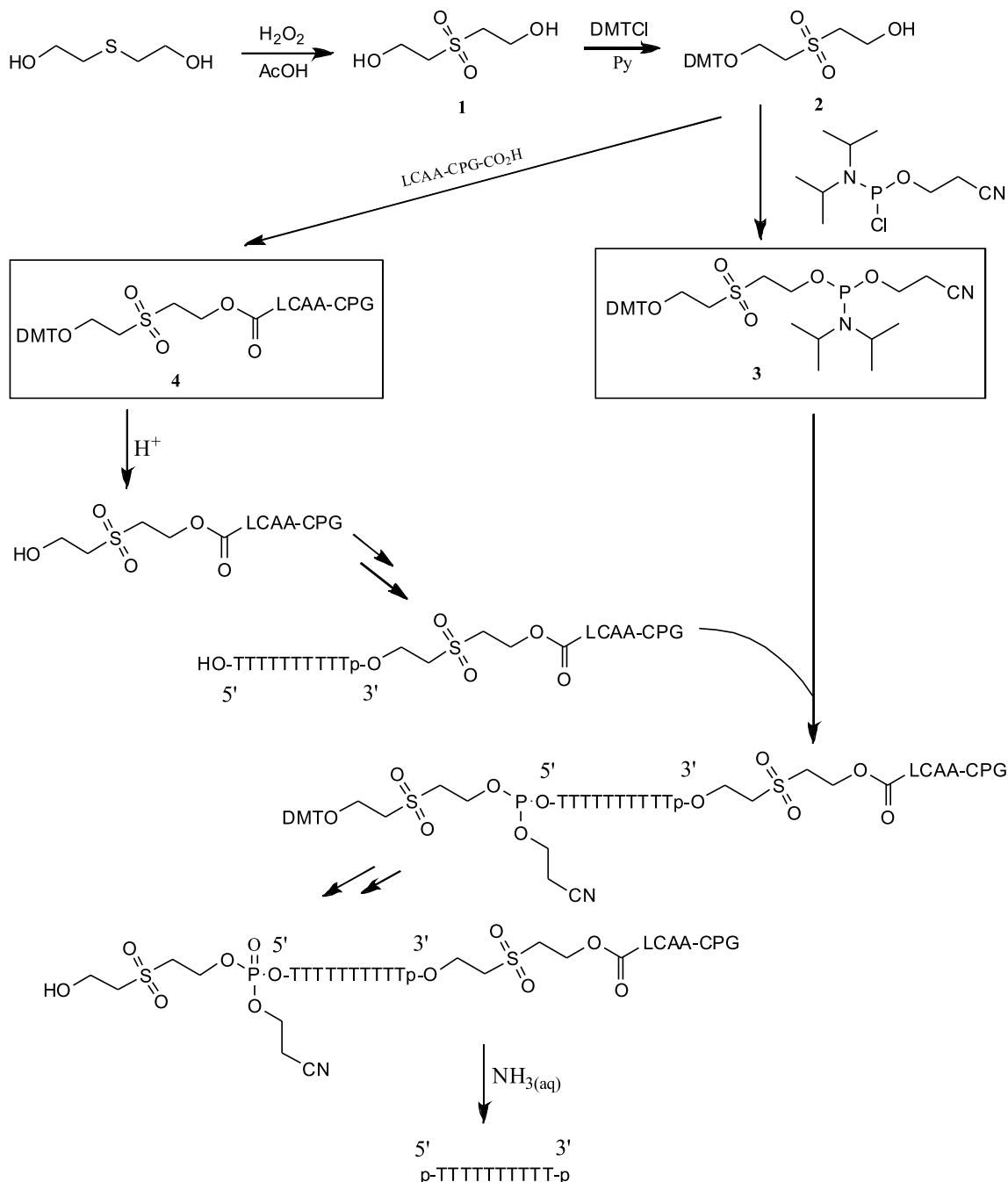


Рис. 1. Схема синтеза амидофосфитного реагента (3) и твердофазного носителя (4) и их использование для 3'- и 5'-фосфорилирования олигонуклеотидов

Полученный амидофосфитный реагент (3) и твердофазный носитель (4) протестированы в условиях автоматического олигонуклеотидного синтеза. С помощью этих реагентов были синтезированы олигонуклеотиды разного состава (таблица).

**Структура олигонуклеотидов, полученных с использованием синтезированных реагентов
(р – остаток фосфорной кислоты, Т – тимидин)**

Название	Последовательность, 5' → 3'	Выход, % (ВЭЖХ)
ON1	TTTTTTTTTT	82
ON2	TTTTTTTTTр	96
ON3	рTTTTTTTTTT	75
ON4	рTTTTTTTTTр	90

Оценка чистоты продуктов олигонуклеотидного синтеза осуществлена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 2). Как и следовало ожидать, олигонуклеотиды **ON1-ON4** обладают различной электрофоретической подвижностью, причем нефосфорилированный олигонуклеотид **ON1** наименее подвижен; фосфорилированный с обоих концов **ON4** имеет максимальную подвижность, а монофосфорилированные олигонуклеотиды **ON2** и **ON3** по подвижности примерно одинаковы. Это можно объяснить увеличением заряда олигонуклеотида при введении каждой дополнительной фосфатной группы, что оказывает более существенное влияние на подвижность, чем незначительное увеличение молекулярной массы.

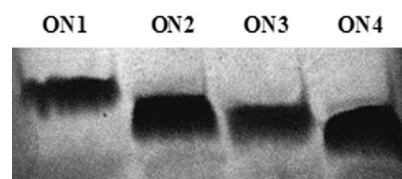


Рис. 2. Электрофорез модифицированных олигонуклеотидов (подписи соответствуют данным таблицы)

Хроматографический анализ продуктов олигонуклеотидного синтеза проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке С-18 в градиенте ацетонитрила от 0 до 15 % за 30 мин со скоростью 1 мл/мин. В результате анализа установлено, что все четыре олигонуклеотида получены с удовлетворительным выходом (результаты представлены в таблице).

Таким образом, синтезированы и испытаны реагенты для получения в условиях автоматического твердофазного синтеза олигонуклеотидов, фосфорилированных по 5'- и 3'-положениям.

Литература

1. Barany F. // Genome res. 1991. Vol. 1. N1. P. 5–16.
2. Modrich P., Lehman I. R. // J. Biol.Chem. 1973. Vol. 248. N21. P. 7502–7511.
3. Fritz H.-J. DNA Cloning: A Practical Approach : in 2 volumes / H.-J. Fritz. Oxford : IRL Press, 1985. Vol. 1. P. 151–163.
4. Van Houten V. et al. // Analytical Biochemistry. 1998. Vol. 265. N2. P. 386–389.
5. Horn T., Urdea M. S. // Tetrahedron Lett. 1986. Vol. 27. N39. P. 4705–4708.
6. Guzaev A. et al. // Tetrahedron. 1995. Vol. 51. N34. P. 9375–9384.
7. Bannwarth W., Trzeciak A. // Helv. Chim. Acta. 1987. Vol. 70. N1. P. 175–186.

M. Yu. TATULCHENKOV, A. R. NABIULLIN, M. V. KVACH

PHOSPHORAMIDITE REAGENT AND SOLID-PHASE SUPPORT FOR SYNTHESIS OF 5'- AND 3'-PHOSPHORYLATED OLIGONUCLEOTIDES

Summary

Syntheses of a phosphoramidite reagent for 5'-phosphorylation of oligonucleotides, and of a modified solid-phase support (controlled pore glass, CPG) for 3'-phosphate modification of oligonucleotides are described. Efficacy of the reagents has been confirmed by the synthesis of phosphorylated oligonucleotides. The oligonucleotides have been analyzed by electrophoresis and HPLC.