

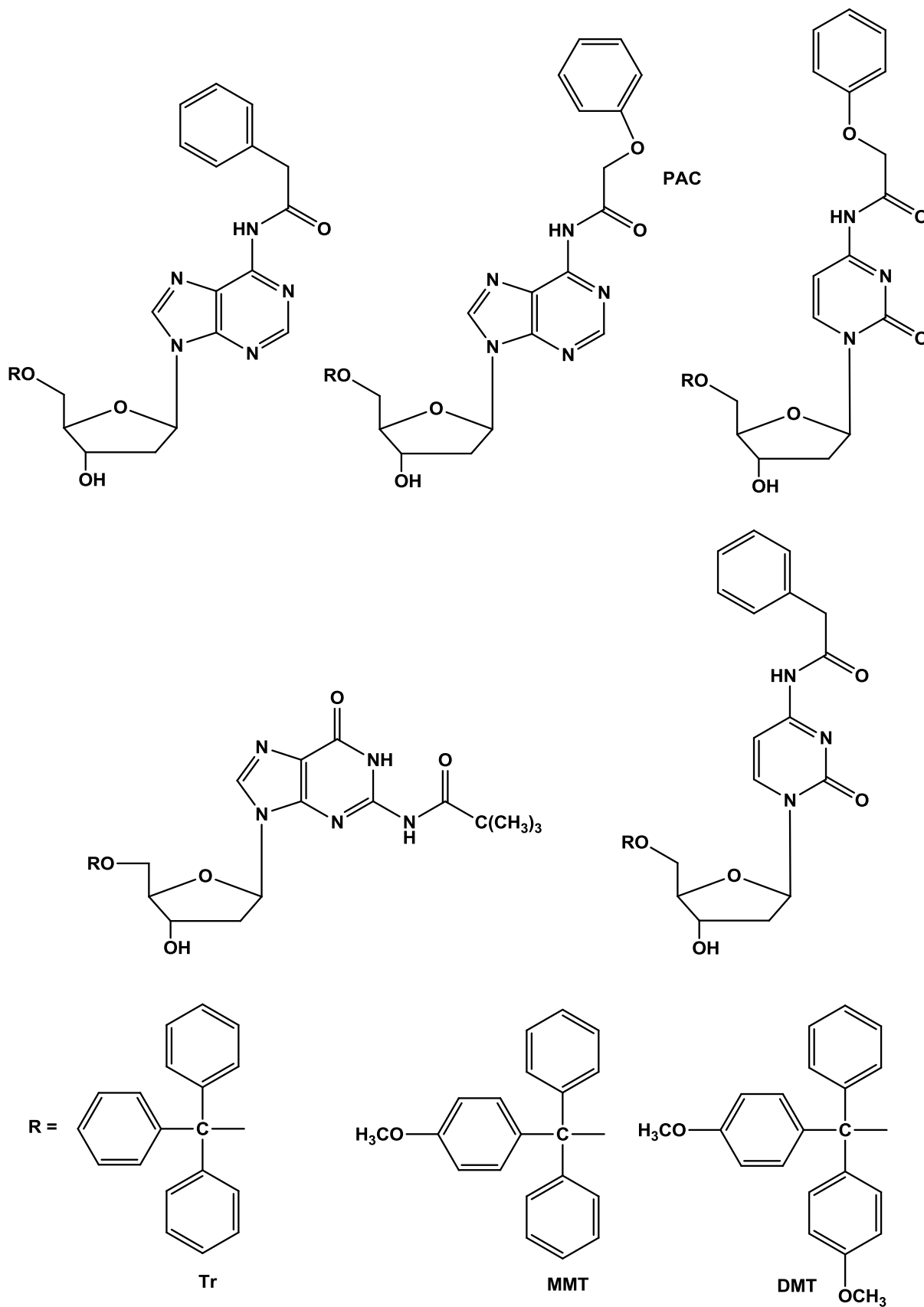


Synteza oligonukleotydów przy użyciu automatycznego syntezyzatora

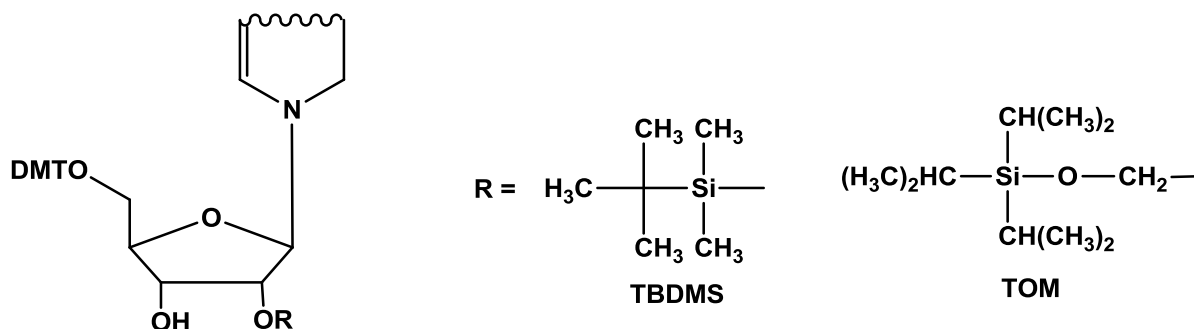
W latach 90-tych opracowano metody preparatywne pozwalające zastosować technikę podobną do stosowanej już wcześniej w syntezie peptydów. Ogólnie technika ta polega na zastosowaniu stałego nośnika (suportu) w formie krótkiej (kilka mm) kolumny wykonanej ze szkła o ściśle określonej wielkości porów (średnica = 50000 – 300000 pm, 1pm = 10^{-12} m) lub makroporowego polistyrenu. Zastosowanie tej techniki syntezy umożliwia otrzymanie oligonukleotydów o długości ok. 200 nukleotydów, osiągnięte stężenia oligonukleotydów wahają się w zakresie 40 nmoli do 1 mikromola. Ze wzrostem stężenia wzrasta także stężenie produktów ubocznych powstających w trakcie syntezy i przy wyższych stężeniach oczyszczenie oligonukleotydów staje się trudniejsze. Bez względu na zastosowany materiał nośnika, przed użyciem zostaje on poddany zabiegom chemicznym, które umożliwią przyłączenie nukleotydów do powierzchni. Szkło porowate poddaje się działaniu 3-aminopropylotrietoksyilanu. Zawarte na powierzchni szkła grupy hydroksylowe ulegają alkilowaniu i powstaje zakończenia 3-aminopropylowe. Wolne grupy aminowe zabezpiecza się traktując je bezwodnikiem octowym. Dla celów syntezy oligonukleotydów taki linker jest jeszcze zbyt krótki i zazwyczaj zostaje przedłużony przez utworzenie wiązania amidowego w reakcji z bezwodnikiem bursztynowym lub chlorkiem kwasu bursztynowego. W innym wariantcie grupą aminową linkera traktuje się izocjanianem 1,2-etandiolu. Wolne grupy hydroksylowe w tym wypadku zabezpiecza się poprzez tritylowanie (pierwszorzędową) i estryfikację kwasem dichlorooctowym (drugorzędową).

W przypadku porowatego polistyrenu, jest on wysoce usieciowanym kopolimerem diwinylobenzenu, styrenu i 4-chlorometylostyrenu. Obecne w kopolimerze atomy chloru wymienia się na grupy aminowe, powstają grupy aminometylowe, które funkcjonalizuje się podobnie jak powyżej.

W przeciwieństwie do naturalnej syntezy oligonukleotydów (5'-3'), w syntezie na fazie stałej oligonukleotydy łączone są wiązaniem fosfodiesterowym w kierunku 3'-5'. Aby zminimalizować udział reakcji ubocznych, pozostałe w cząsteczkach nukleotydów grupy o charakterze nukleofilowym (aminowe i hydroksylowe) muszą być zabezpieczone (rys.2). W przypadku syntezy oligonukleotydów RNA grupę hydroksylową 2'-OH zabezpiecza się grupą *tert*-butylodimetylosililową lub tris-isopropylsililoksymetylową (rys.2).

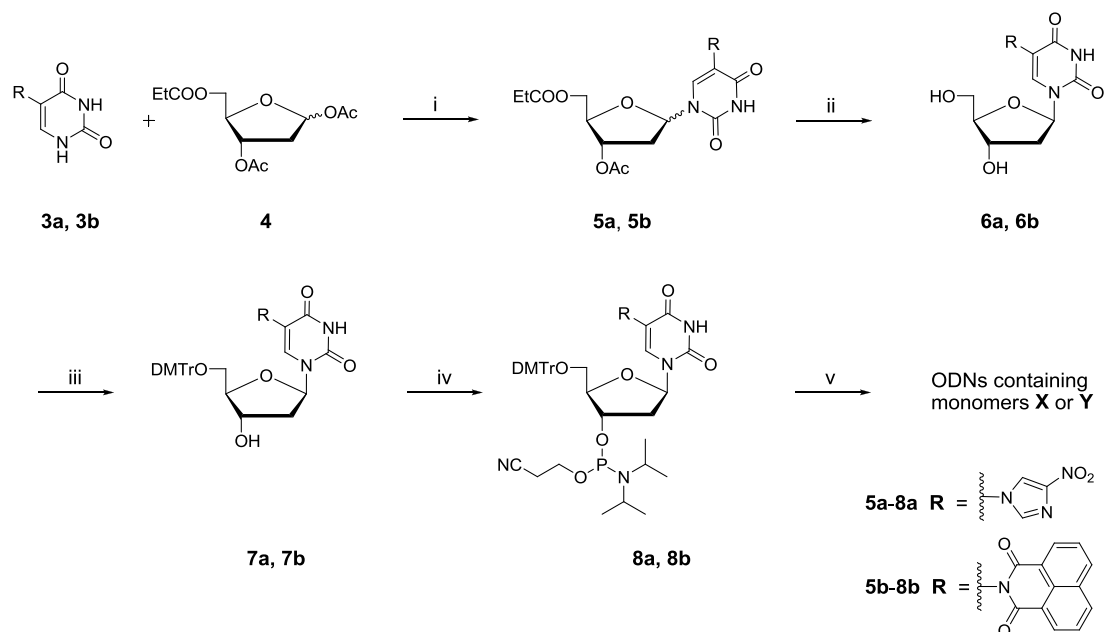


Rys. 1. Zabezpieczenia nukleozydów DNA stosowane w syntezie oligonukleotydów na fazie stałej



Rys. 2. Grupy zabezpieczające w syntezie oligo-RNA

Grupa 3'-OH, biorąca bezpośredni udział w syntezie jest przeprowadzana w odpowiednią pochodną fosforową, najczęściej poddaje się ja reakcji z chloro[(*N,N*-diizopropylamino)-2-cyanoetoksy]fosfiną. Pełną sekwencję reakcji prowadzących do otrzymania monomeru użytego następnie do syntezy oligo-DNA przedstawia schemat 1.



Reagenty i warunki reakcji: i) HMDS, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, następnie CH_3CN , TMSOTf, -15 to 0 °C (**5a**: 93%; **5b**: 86%); ii) a) NaOMe/MeOH, 90 min. t.p.; b) Amberlist IRC 120 (**6a**: 36%, **6b**: 33%); iii) DMTrCl, pirydyna, t.p. (**7a**: 80%; **7b**: 86%); iv) $\text{NC}(\text{CH}_2)_2\text{OP}(\text{Cl})\text{N}(\text{i-Pr})_2$, CH_3CN , diizopropylaminy, t.p. (**8a**: 83%, **8b**: 73%); v) syntezytor DNA; (A. Gondela; T. Santhosh Kumar; K. Walczak; J. Wengel, *Chemistry and Biodiversity*, 7(2), 350, (2010).

Schemat 1. Typowa sekwencja reakcji w syntezie monomeru modyfikowanego nukleozydu

Synteza oligonukleotydów obejmuje pięć etapów:

Deprotekcja (detrylowanie)

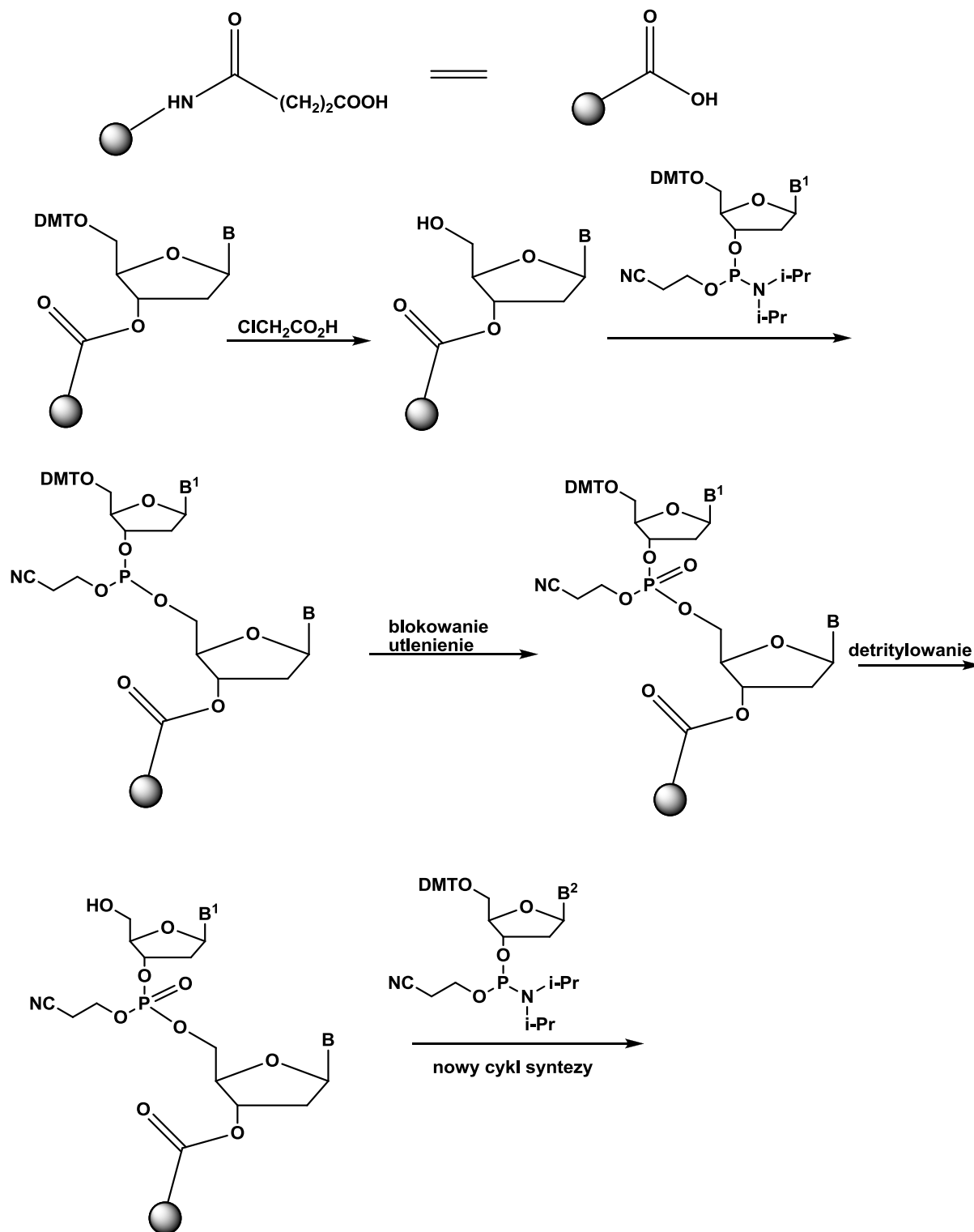
Aktywacja



Kondensacja

Blokowanie (capping)

Utlenie



Schemat 2. Synteza oligo-DNA metodą fosforamidową.



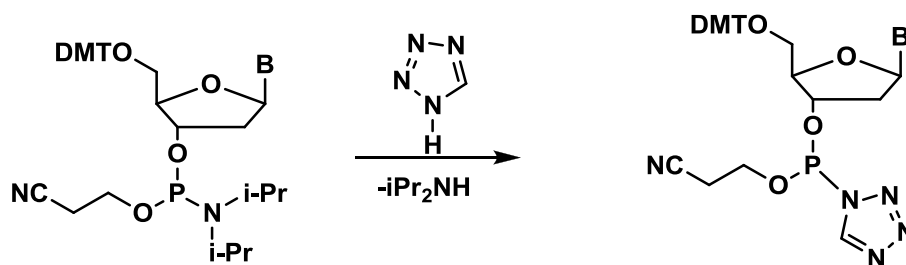
Synteza oligonukleotydów

Detritylowanie

Grupę 4,4'-dimetoksytrytylową (DMT) terminalnego nukleotydu rozszczepia się w warunkach kwasowych, za pomocą rozcieńczonego kwasu trichlorooctowego lub dichlorooctowego w rozpuszczalniku obojętnym (chlorek metylenu lub toluen). W tych warunkach wydzielony alkohol dimetoksytrytylowy rozpuszcza się i jest odmywany. Pozostaje czysty nukleotyd przyłączony do nośnika z wolną grupą 5'-hydroksylową, która może atakować zabezpieczoną pozycję 3'-hydroksylową następnego zabezpieczonego nukleozydu.

Aktywacja

Roztwór fosforamidu nowego nukleozydu w acetonitrylu jest traktowany aktywatorami: tetrazolu, 2-etylotiotetrazolu, 4,5-dicyjanoimidazolu lub podobnymi kwasowymi azolami, następuje wymiana grupy diizopropylaminowej na tetrazoliową (Schemat 3).



Schemat 3. Aktywacja monomeru w synteźatorze oligonukleotydów.

Kondensacja

Aktywowany monomer w dużym nadmiarze (nawet 20-krotnym) reaguje z terminalną grupą 5'-OH ostatniego dobudowanego nukleotydu tworząc fosforyn (trialkoksyfosfinę).

Blokowanie

Nośnik wraz z syntezowanym fragmentem oligonukleotydów traktuje się mieszaniną 1-metyloimidazolu i bezwodnika octowego. Zabieg ten ma na celu zablokowanie, poprzez estryfikację, wolnych grup 5'-OH, które nie przereagowały w etapie syntezy. Celem jest zapobieżenie powstania oligonukleotydów z delecją (pominięcie w sekwencji jakiegoś nukleotydu).



Utlenienie

Fosforyn utlenia się do fosforanu wodnym roztworem jodu w obecności pirydyny lub innej słabej zasady organicznej (najczęściej stosuje się kolidynę lub lutydynę).

Pojedynczy cykl syntezy jest zakończony i można rozpocząć następny przez usunięcie grupy dimetoksytrytylowej i powtórzyć całą sekwencję reakcji.

Po zakończeniu zaprogramowanej liczby cykli, należy rozszczepić wiązanie łączące oligonukleotyd z nośnikiem i odblokować zabezpieczone grupy zarówno w nukleozasadzie jak i w reszcie fosforanowej. Grupy te usuwa się przez traktowanie nośnika z oligonukleotydem stęż. roztworem amoniaku w wodzie w temp. 50 °C w czasie ok. 24 godzin. W przypadku zastosowania jako zabezpieczenia grupy fenoksyacetylowej i piwaloilowej, usuwa się je działaniem amoniaku w bezwodnym metanolu.

Końcowe oczyszczanie oligonukleotydów przeprowadza się przy pomocy HPLC a następnie określa masę cząsteczkową (ES MS lub MALDI MS).