

А.В.Степанов, Н.В.Майоров, А.К.Никифоров

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ СИНТЕЗА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В результате проведенных исследований усовершенствована технология синтеза олигонуклеотидных праймеров – ингредиентов выпускаемых РосНИПЧИ «Микроб» ПЦР-тест-систем. Установлено, что использование 25 % водного раствора аммиака при аммонолизе увеличивает выход конечного продукта до 93 %, а применение растворов Сар А № 1 и Сар Б № 3 на стадии кэппирования – на 16 %. Использование усовершенствованной технологии синтеза олигонуклеотидов для производства генодиагностических препаратов позволит увеличить количество выпускаемой продукции и снизить затраты на дорогостоящие реагенты.

Ключевые слова: синтез олигонуклеотидов, кэппирование, аммонолиз.

Синтетические фрагменты ДНК находят все более широкое применение в работах как молекулярно-биологического, так и медицинского характера. Олигонуклеотиды используются в ПЦР для детекции ДНК и РНК различных возбудителей, типирования, в качестве зондов при гибридизации, а также линкеров, облегчающих клонирование.

История синтеза олигонуклеотидных праймеров началась в 60-х годах прошлого века. Основной вклад в его развитие внесли Н.G.Khorana и соавторы, осуществившие в 1968 г. химический синтез фрагментов нуклеиновых кислот заданной последовательности. В 1970 г. они впервые синтезировали полный ген аланиновой транспортной РНК.

Первый метод синтеза, получивший название фосфодиэфирного, был основан на образовании фосфодиэфирной связи между нуклеотидами. Однако этот метод оказался малоэффективным из-за ряда побочных реакций, приводящих к значительным временным затратам и низкому выходу продукта.

Фосфотриэфирный метод, разработанный вскоре, позволил сократить синтез до нескольких часов, в отличие от фосфодиэфирного, протекавшего несколько суток.

В начале 80-х годов американский ученый М.Н.Сарутерс (1984) разработал твердофазный амидофосфитный метод синтеза. Синтезируемая цепь ДНК при этом фиксируется на твердом носителе, что позволяет проводить процессы в одной емкости, легко отмывать после каждого этапа использованные реагенты и добавлять новые в количестве, обеспечивающем возможно полное протекание реакции. Открытие твердофазного метода стало настоящим прорывом в технологии синтеза.

Среди существующих в настоящее время твердофазных разновидностей синтеза, наиболее популярными являются Н-фосфонатный и фосфитамидный методы. В Н-фосфонатном используются Н-фосфонатные синтоны [2, 3], в фосфитамидном в качестве синтонов используются фосфорамидиты [1].

Нами при производстве препаратов для генной диагностики особо опасных инфекций используется фосфитамидный метод. Его основным преимуществом является существенно меньшее время образо-

вания связи между Р- и ОН-компонентами, которое занимает несколько минут, против нескольких часов, например, у фосфотриэфирной или нескольких дней при фосфодиэфирной конденсации. Кроме того, исходные реагенты для фосфоамидитного синтеза более стабильны, что позволяет хранить их в течение длительного времени.

Известно, что синтез праймеров представляет собой циклический процесс. За время каждого цикла происходит присоединение одного из оснований. Цикл состоит из пяти этапов: первый – твердая фаза с пришитым химическим способом мономером обрабатывается трихлоруксусной кислотой для удаления защитной группировки; второй – происходит активация добавляемого в реакционную среду мономера; третий – осуществляется непосредственно синтез олигонуклеотида; четвертый – происходит кэппирование – процесс блокирования продуктов, не вступивших в синтез; пятый (заключительный) – межнуклеотидная связь из фосфитной, с помощью окислителя, переводится в более устойчивую – фосфатную.

После пятого этапа начинается следующий цикл и продолжается до тех пор, пока цепочка олигонуклеотида не достигнет заданной длины. По окончании синтеза производится аммонолиз – снятие защитных групп и отсоединение праймера от полимерного носителя. Далее праймеры очищаются от примесей посредством обращенно-фазовой хроматографии на RP-картриджах, гель-электрофорезом в полиакриламиде, а также при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для оценки качества синтеза проводят вертикальный электрофорез полученного продукта в 20 % ПААГ (полиакриламидном геле) в денатурирующих условиях или лазерную десорбционно-ионизационную спектрометрию.

Для количественной оценки олигонуклеотида определяют его оптическую плотность при 260 нм.

Задача, которую мы поставили в своих исследованиях, заключалась в изучении возможности повышения эффективности синтеза олигонуклеотидных праймеров на стадиях аммонолиза и кэппирования для увеличения их количественного выхода и сни-

жения материальных затрат, что особенно важно в условиях масштабного производства генодиагностических препаратов.

Материалы и методы

Синтез олигонуклеотидов стх2 – 5'-cgggcagat-tctagacctctg-3' и стх3 – 5'-cgatgatcttggg-gcattccac-3', входящих в состав ПЦР-тест-системы ГенХол, проводили в восьмиканальном синтезаторе ДНК ASM-800 (Биоссет, Россия) твердофазным фосфитамидным методом.

Эксперименты по изучению влияния аммонолиза на выход конечного продукта проводили двумя приемами: стандартным – раствором моноэтаноламина (Экрос, Россия) в воде (2:1) в течение 1 ч при температуре 60 °С и экспериментальным – с 25 % аммиаком (Экрос, Россия) в течение 12 ч при температуре 50 °С.

Изучение влияния кэспирующих растворов проводили следующими стандартными и экспериментальными реактивами: деблокирующий раствор – 3 % трихлоруксусная кислота (Экрос, Россия) в дихлорметане (Merck, Германия); активатор – 0,4 М раствор тетразола (Технолог, Россия) в ацетонитриле (Panreac, Испания); окислитель – смесь, состоящая из 0,1 М йода (Экрос, Россия) в растворе уксусной кислоты (Экрос, Россия) и пиридина (Лаверна, Россия) в пропорции (1:9); 0,05 М раствор амидофосфитных производных нуклеозидов (Glen Research, США) в ацетонитриле; кэспирующий раствор А № 1, состоящий из уксусного ангидрида (Acros, США), 2,6-лутидина (Merck, Германия) и ацетонитрила в соотношении 1:1:8; кэспирующий раствор А № 2, состоящий из ацетонитрила и уксусного ангидрида в соотношении 9:1; кэспирующий раствор А № 3, состоящий из 22,5 % раствора уксусного ангидрида в ацетонитриле; кэспирующий раствор Б № 1, состоящий из 1-метилимидазола (Aldrich, США), пиридина и ацетонитрила в соотношении 1:1:8; кэспирующий раствор Б № 2, состоящий из 6,5 % раствора диметиламинопиридина (Fluka, Швейцария) в пиридине и ацетонитриле в соотношении 1:8; кэспирующий раствор Б № 3, состоящий из 1-метилимидазола, триэтиламина (Merck, Германия) и ацетонитрила в соотношении 1:4,5:14,5; кэспирующий раствор Б № 4, состоящий из 1-метилимидазола и ацетонитрила в соотношении (1:4). Уксусный ангидрид и пиридин очищали обычной перегонкой, дихлорметан и ацетонитрил перегоняли над пентоксидом фосфора.

Очистку синтезированных праймеров осуществляли методом обращенно-фазовой хроматографии на RP-картриджах (ChemGenes, США) на двухканальной системе очистки OPS-201 (Биоссет, Россия). Затем олигонуклеотиды переосаждали 6 % перхлоратом лития (Fluka, Швейцария) в ацетоне (Экрос, Россия), отмывали от солей ацетоном и подсушивали этоксиэтаном (Вектон, Россия).

Качество синтезируемого продукта проверяли

электрофорезом в 20 % ПААГ (Reanal, Венгрия) в денатурирующих условиях (с 7 М мочевиной). В качестве лидирующего красителя использовали смесь 0,05 % бромфенолового синего и 0,05 % ксиленианола (Диа-М, Россия) в 95 % водном растворе формамида (Merck, Германия) с 10 мМ NaOH (Хеликон, Россия). Для окрашивания полос и визуализации результата использовали 0,75 % Stains-all (Serva, Германия) в 50 % водном растворе формамида.

Оптическую плотность олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически при 260 нм на СФ-26 (ЛОМО, Россия) в 1 мм кварцевых кюветах и пересчитывали в пмоль/мкл с помощью формулы:

$$C = \frac{10 \cdot A_{260}}{1,54 \cdot nA + 0,75 \cdot nC + 1,17 \cdot nG + 0,92 \cdot nT},$$

где A_{260} – коэффициент поглощения при длине волны 260 нм, а nA, nC, nG, nT – количество оснований в нуклеотидной последовательности праймера.

Аналитическую и специфическую активность праймеров стх2 и стх3 проверяли в составе изготавливаемой нами коммерческой ПЦР-тест-системы ГенХол. Для этого (в соответствии с ТУ 8895-006-01898109-2007) выращивали штаммы холерных вибрионов: классического биовара 569В, биовара эльтор: М-1298 и 158, а также *E. coli* 12226 О-55. Обеззараживание стандартных бактериальных суспензий и выделение ДНК осуществляли прогреванием при 56 °С в течение 30 мин с 0,01 % мертиолятом натрия в соответствии с методическими указаниями [5]. ДНК, полученную из тест-штаммов, в объеме 10 мкл вносили в ПЦР-реакционную смесь, состоящую из (приведены конечные концентрации): 0,7 М триса (ICN, США), 0,2 М аммония сернокислого (Sigma, США); 0,1 % Твина-20 (Sigma, США), 0,02 % БСА (Serva, Германия), 2 мМ дНТФ (Медиген, Россия), 1,5 мМ MgCl₂ (Serva, Германия) и 0,25 мкл (1,25 ед.) Taq-полимеразы (Бионем, Россия).

Термоциклирование проводили в амплификаторе МС-2 «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) по матричному способу регулирования: предварительная денатурация при 94 °С в течение 5 мин; затем 35 циклов, включающих 3 шага по 30 с каждый: денатурация при 94 °С, отжиг при 60 °С и синтез при 72 °С; в заключение проводили дополнительный синтез в течение 7 мин.

Результат ПЦР оценивали методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле с бромидом этидия (0,5 мкг/мл). Документирование осуществляли с помощью Bio-Rad Gel Doc™ XR System (США). Данные обработаны с применением стандартных статистических методов [4].

Результаты и обсуждение

Аммонолиз – снятие синтезированного олигонуклеотида с твердофазного носителя и удаление защитных групп. Этот процесс, используемый в настоящее время и названный нами в дальнейшем стандартным,

заключается в снятии праймера с носителя водным раствором моноэтаноламина при температуре 60 °С. Стандартный прием занимает 1 ч, что позволяет синтезировать и очистить 4 пары праймеров за один день. Однако его существенным недостатком, по нашим наблюдениям, является низкий выход конечного продукта. Другой вид аммонолиза, называемый в дальнейшем предлагаемым, осуществляется 25 % водным раствором аммиака при температуре 55 °С в течение 12 ч. При таком способе обработки синтез 4 пар праймеров занимает два рабочих дня [7].

Нами было решено изучить стандартный и предлагаемый методы аммонолиза в сравнении и установить, какой из них обеспечивает наибольший выход конечного продукта.

Выбор праймеров ctx2 и ctx3 в качестве объекта для синтеза был обусловлен тем, что они входят в состав выпускаемого нами препарата для детекции ДНК возбудителя холеры ГенХол, процедура проверки которого стандартизирована, изложена в ТУ 8895-006-01898109-2007 и регулярно выполняется при его изготовлении.

Сравнительные эксперименты проводили в стандартных условиях одинакового масштаба синтеза – 40 нмоль. Всего было проведено 16 синтезов: 8 – с моноэтаноламином и 8 – с аммиаком. Получено 16 праймеров, из них 8 ctx2 и 8 ctx3, каждый из которых был охарактеризован количественно (по оптической плотности в ОЕ) и по специфической активности (в ПЦР). Количественный выход олигонуклеотидов (в ОЕ) представлен в таблице.

В результате проведенных исследований и как видно из таблицы использование аммонолиза с аммиаком приводит к существенному повышению выхода продукта. Так, например, для праймеров ctx2 и ctx3 при аммонолизе стандартным методом с использованием моноэтаноламина выход составил 2,93 и 3,85 ОЕ соответственно, а при использовании предлагаемого приема с гидроксидом аммония – 3,78 и 7,35 ОЕ.

Таким образом, использование предлагаемой методики приводит к увеличению выхода продукта: ctx2 – на 31 %, а ctx3 – на 93 %. Однако аммонолиз с использованием аммиака позволяет проводить полный синтез и очистку четырех пар праймеров за два рабочих дня, в то время как аммонолиз с моноэтаноламином – за один. Поэтому для оперативной работы и выполнения срочных заказов (синтез олигонуклеотидов в малых масштабах, не требующих высоких концентраций) более подходит метод синтеза с использованием моноэтаноламина, а для производ-

ственных целей, например масштабного производства генодиагностических препаратов, – аммонолиз с аммиаком.

На третьем этапе выход продукта составляет 96–98 %, и, как следствие, с каждым циклом увеличивается содержание непрореагировавших 5'-гидроксильных групп, что может привести к нарушению в последовательности синтезируемых праймеров. Чтобы исключить это явление проводят кэппирование – ацетилирование непрореагировавших гидроксильных групп, после которого не вступившие в реакцию мономеры и цепочки олигонуклеотидов блокируются, теряя способность к образованию неспецифического продукта.

Для изучения влияния кэппирования на выход олигонуклеотидов были использованы применяемые в настоящее время растворы, названные нами стандартными: кэппирующий раствор А, состоящий из уксусного ангидрида, 2,6-лутидина и ацетонитрила в соотношении 1:1:8; кэппирующий раствор Б, состоящий из 1-метилимидазола, пиридина и ацетонитрила в соотношении 1:1:8.

В качестве экспериментальных были использованы подобранные на основании литературных данных и в дальнейшем названные нами предлагаемыми следующие растворы:

Кэппирующий раствор А (Сар А): Сар А № 2 – ацетонитрил и уксусный ангидрид в пропорции (9:1) [8]; Сар А № 3 – 22,5 % раствор уксусного ангидрида в ацетонитриле [1].

Кэппирующий раствор Б (Сар Б): Сар Б № 2 – 6,5 % раствор диметиламинопиридина в пиридине и ацетонитриле в пропорции (1:8) [8]; Сар Б № 3 – 1-метилимидазол, триэтиламин и ацетонитрил в пропорции (1:4,5:14,5) [1]; Сар Б № 4 – 1-метилимидазол и ацетонитрил в пропорции (1:4) [6].

Изучение влияния кэппирующих растворов и их сочетаний по сравнению со стандартной методикой проводили в условиях одинакового масштаба синтеза (40 нмоль). В качестве контроля использовали метод, заключающийся в применении растворов Сар А № 1 и Сар Б № 1. Для количественной оценки синтезируемых олигонуклеотидов использовали спектрофотометрическое определение оптической плотности при 260 нм. Результаты выражали в виде суммарной величины, включающей общее количество праймеров ctx2 и ctx3.

Результаты изучения влияния кэппирующих растворов в различных сочетаниях на выход олигонуклеотидных праймеров приведены на рис. 1, на котором на оси ординат приведены используемые реагенты и их сочетания, а на оси абсцисс – суммарный выход праймеров ctx2 и ctx3 в оптических единицах, наименьший выход олигонуклеотидов (по сравнению с контролем – реагенты Сар А № 1 и Сар Б № 1) – от 6 до 7,5 ОЕ отмечался при использовании Сар А № 2 и Сар Б № 4, Сар А № 3 и Сар Б № 4, Сар А № 3 и Сар Б № 3 и Сар А № 3 и Сар Б № 2. Средние показатели – 3,7 ОЕ были продемонстрированы Сар А № 3 и Сар Б № 1. Высокие показатели – от 13 до 13,2 ОЕ

Влияние метода аммонолиза на количественный выход олигонуклеотидов ctx2 и ctx3

Синтезируемый праймер	Метод аммонолиза и выход продукта М±m ОЕ		Увеличение выхода праймера, %
	с моноэтаноламином	с аммиаком	
ctx2	2,93±1,15	3,78±1,47	31
ctx3	3,85±0,52	7,35±0,89	93

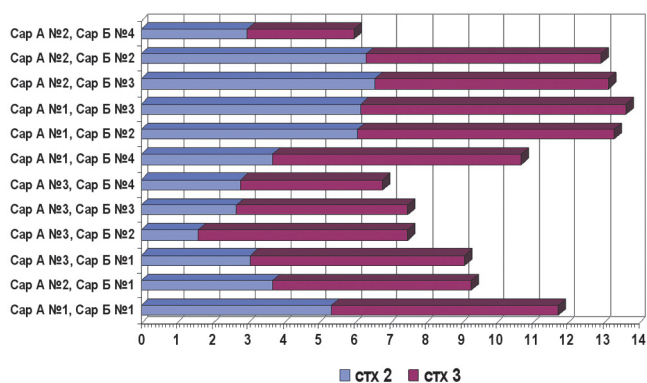


Рис. 1. Влияние экппирующих растворов и их сочетаний на суммарный выход олигонуклеотидных праймеров ctx2 и ctx3

отмечены при использовании Сар А № 2 и Сар Б № 2, Сар А № 2 и Сар Б № 3 и Сар А № 1 и Сар Б № 2. Наибольший выход продукта – 13,7 ОЕ наблюдался при использовании Сар А № 1 и Сар Б № 3.

Изучение влияния экппирующих растворов и их сочетаний на количественный выход олигонуклеотидов показало, что наилучшим эффектом обладает сочетание экспериментальных растворов Сар А № 1 и Сар Б № 3. Их применение позволяет увеличить выход синтезируемого продукта на 16 % по сравнению с используемым в настоящее время стандартным способом.

Олигонуклеотиды ctx2 и ctx3, полученные с использованием отработанных приемов – аммонолиза с 25 % аммиаком и экппированием с растворами Сар А № 1 и Сар Б № 3, в составе коммерческой тест-системы ГенХол были изучены в ПЦР для проверки ее аналитических и специфических свойств. Определение аналитической и специфической активности проводили в соответствии с ТУ 8895-006-01898109-2007 на «Тест-систему для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA+) методом полимеразной цепной реакции». Для этого выращивали тест-штаммы – холерные вибрионы: классического биовара 569В; биовара эльтор: М-1298 и 158, а также *E. coli* 12226 О-55, готовили из них стандартные разведения, обеззараживали и выделяли ДНК. С полученной ДНК проводили ПЦР. Результаты представлены на рис. 2.

Постановка ПЦР с праймерами в составе тест-системы ГенХол, синтезированными с использованием отработанных приемов – аммонолиза с 25 % аммиаком и экппированием с растворами Сар А № 1 и Сар Б № 3, продемонстрировала следующие результаты: трек № 1 – суспензия холерных вибрионов биовара эльтор 158 (ctxA-) – $1 \cdot 10^7$ м.кл./мл, результат отрицательный; трек № 2 – суспензия кишечной палочки 12226 О-55 – $1 \cdot 10^7$ м.кл./мл, результат отрицательный; треки №№ 3–5 – суспензия холерных вибрионов классического биовара 569В $1 \cdot 10^1$ – $1 \cdot 10^3$ м.кл./мл, результат положительный; треки №№ 6–8 – суспензия холерных вибрионов биовара эльтор М1298 – $1 \cdot 10^1$ – $1 \cdot 10^3$ м.кл./мл, результат положительный; треки №№ 9, 10 – препарат контрольной

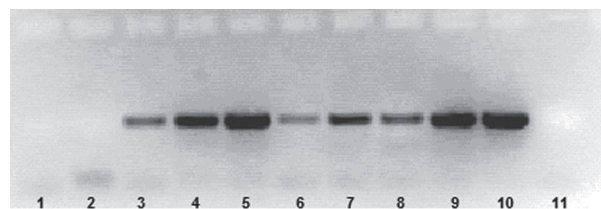


Рис. 2. Проверка праймеров ctx2 и ctx3 в составе ПЦР-тест-системы ГенХол с тест-штаммами. Электрофорез в 1,5 % агарозном геле с этидиум бромидом

ДНК в концентрации 0,1 и 1 нг/мкл, результат положительный; трек № 11 – отрицательный контроль, результат отрицательный.

Проверка ПЦР-тест-системы ГенХол с праймерами ctx2 и ctx3, синтезированных с помощью разработанных приемов, подтвердила ее соответствие требованиям ТУ 8895-006-01898109-2007: специфическая активность – не реагирует с отрицательными штаммами (холерными вибрионами биовара эльтор 158 и кишечной палочкой 12226 О-55, не содержащими специфическую область ДНК-мишени) – треки 1 и 2; аналитическая активность – положительный результат со штаммами, содержащими ctx-участок – в концентрации $1 \cdot 10^3$ м.кл./мл – треки 3–8 (рис. 2).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов усовершенствована и оптимизирована схема синтеза олигонуклеотидных праймеров, входящих в состав выпускаемых ПЦР-тест-систем. Установлено, что использование 25 % водного раствора аммиака на стадии аммонолиза приводит к существенному увеличению выхода праймеров – до 93 %; применение экппирующих растворов в сочетании: Сар А № 1 и Сар Б № 3 повышает количественный выход олигонуклеотидов – до 16 %; разработанные аммонолиз и экппирование в условиях масштабного производства генодиагностических препаратов позволяют значительно увеличить количество выпускаемой продукции и снизить затраты на дорогостоящие реагенты; подходы и методические приемы, использованные нами для решения поставленных задач, могут быть применены при оптимизации других этапов синтеза в технологии производства генодиагностических препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грязнов С.М., Потапов В.К., Метелев В.Г., Елов А.А., Пурмаль А.А., Шабарова З.А. Полностью автоматический синтез олигодезоксирибонуклеотидов фосфитамидным методом на синтезаторе «Виктория-4 М». Биоорганическая химия. 1986; 12 (7):988–91.
2. Ефимов В.А., Дубей И.Я. Модификация Н-фосфонатного метода синтеза олигонуклеотидов на полимерных носителях. Биоорганическая химия. 1990; 16(2):211–8.
3. Исагулянц М.Г., Самошин В.В., Макеева И.В., Смирнов В.Д. Эффективный синтез олиго(поли)дезоксирибонуклеотидов Н-фосфонатным методом в пластиковой микроколонке. Биоорганическая химия. 1990; 16(7):933–40.
4. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. М.: Финансы и статистика; 1982. 344 с.
5. Шевырев М.П., Федоров Ю.М., Куличенко А.Н., Осина Н.А., Шарова И.Н., Ляпин М.Н. и др. Методические указания МУ 1.3.1794-03. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II

групп патогенности.

6. *Manoharan Muthiah, Jung Michael E., Rajeev Kallanthottathil G., Pandey Rajendra K., Wang Gang.* US Patent Application No: 2009/0005, 549 (2009).

7. *Syrjänen S.* Oligonucleotides. In: *Methods in Molecular Medicine*. Vol. 12. Stephenson J.R., Warnes A., editors. Diagnostic Virology Protocols. Humana Press; 1998. P. 341–65.

8. <http://www.glenresearch.com/GlenReports/GR17-13>.

A.V.Stepanov, N.V.Mayorov, A.K.Nikiforov

Improvement of Oligonucleotide Primers Synthesis Technology for PCR Test Systems Production

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The investigations carried out resulted in the improvement of technology of synthesis of the oligonucleotide primers, components of the PCR test systems produced in the RARI "Microbe". The final product output was dem-

onstrated to increase by 93 % when 25 % aquatic ammonium solution was used for ammonolysis, and by 16 % if solutions Cap A N1 and Cap B N 3 were used at the stage of capping. Application of the improved technology of oligonucleotide synthesis for gene diagnostic preparations production will permit to increase the amount of the output products and reduce expenses for high-priced reagents.

Key words: oligonucleotide synthesis, capping, ammonolysis

Об авторах:

Степанов А.В., Майоров Н.В., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Stepanov A.V., Mayorov N.V., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 28.12.09.