

核苷氢磷酸法固相合成 DNA 片段研究

韩学军 宗建超 孙顺能 俞耀庭

(南开大学分子生物学研究所,天津)

继亚磷酰胺法之后,国外近年来又推出了用氢磷酸法合成 DNA 和 RNA 片段的方法^[1-6]。提出氢磷酸法比亚磷酰胺法具有更简便、高效和实用性好的特点。

我们用自己制备的氢磷酸核苷活性单体,以长链烷氨基多孔玻璃珠(CPG)为载体,用自制的缩合剂三甲基乙酰氯成功地合成了(dT)₁₀的 DNA 片段。

手工合成操作的基本方法是:称取含1 μ mol 核苷的 CPG 载体,单体活性核苷每次用量为20 μ mol,缩合剂每次用100—200 μ mol,缩合反应时间为3—4分钟,每个循环在25分钟内完成,平均每步缩合收率在92%以上。整个片段合成完成后,用碘水溶液氧化十分钟,使其变成天然磷酸二酯键结构。整个合成过程既不需在干燥箱中进行也不需惰性气体保护,在一般实验室条件下可顺利完成。

从我们的实验结果可以看出,氢磷酸法相对于亚磷酰胺法的优点是:

1. 氢磷酸核苷单体的活性磷酸部分不需特殊保护,制备简单且比较稳定,不易被氧化和潮解。而亚磷酰胺单体的活性亚磷要有两种特殊保护基,单体合成要经过多步反应,而且不够稳定,难以长期存放。

2. 氢磷酸法合成 DNA 片段的操作比亚磷酰胺法每个循环节省1—2步反应(氧化和“戴

帽”),在片段合成完毕,只需一次氧化步骤,即可将整个片段全部氧化为天然 DNA 的磷酸二酯键形式,这样可缩短合成 DNA 片段的时间。

3. 氢磷酸法合成 DNA 片段对于无水条件要求不严苛,一般磷酸三酯法的无水环境即可,易于被一般实验室接受。而亚磷酰胺法要求严格无水条件,惰性气体保护,反应条件苛刻。

该方法所用试剂比亚磷酰胺法少,而且容易制备,可以更快实现国产化。

我们正在进一步完善这一新方法,以便使其尽快在自动 DNA 合成仪和手工合成 DNA 小片段上发挥优势。

参 考 文 献

- [1] Garegg, P. J. et al.: *Chemica Scripta*, 1986, **26**, 59.
- [2] Froehler, B. C. et al.: *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 469.
- [3] Garegg, P. J. et al.: *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 4055.
- [4] Vroom, E. D. et al.: *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1987, **106**, 65.
- [5] Garegg, P. J. et al.: *Nucleosides & Nucleotides*, 1987, **6**, 283.
- [6] Froehler, B. C. et al.: *Nucleosides & Nucleotides*, 1987, **6**, 287.

[本文于1988年9月14日收到]

本文联系人:宗建超。