

# Синтез нуклеозид 5'-трифосфатов, меченных радиоактивными изотопами фосфора

Ю.С.Скоблов, А.Э.Королев, Р.Н.Маслова

Государственный научный центр Российской Федерации, Физико-энергетический институт  
249020 Обнинск, пл. Бондаренко, 1

ООО «Изотопхим»

16 04310 Ганагоби-Пери, Франция, факс 10(92)68–0813

Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук  
117984 Москва, ул. Вавилова, 32, факс (095)135–1405

В обзоре проведен анализ химических, химико-ферментативных и ферментативных методов синтеза нуклеозид-5'-трифосфатов, меченных изотопами фосфора ( $^{32}\text{P}$  и  $^{33}\text{P}$ ) в  $\alpha$ - и  $\gamma$ -положениях. Большая часть обзора посвящена ферментативным методам синтеза, поскольку они имеют неоспоримые преимущества. Детально описываются ферментативные реакции, рассматривается специфичность и доступность ферментов, для некоторых ферментов приводятся сведения об их радиационной стабильности.

Библиография — 29 ссылок.

## Оглавление

|                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------|-----|
| I. Введение                                                            | 850 |
| II. Синтез нуклеозид 5'-[ $\gamma$ - $^{32(33)}\text{P}$ ]трифосфатов  | 852 |
| III. Синтез нуклеозид 5'-[ $\alpha$ - $^{32(33)}\text{P}$ ]трифосфатов | 855 |

## I. Введение

При исследовании структуры и функции нуклеиновых кислот уже давно широко применялись радиоактивные изотопы. Первоначально использовался в основном изотоп углерода  $^{14}\text{C}$ . С развитием техники измерения радиоактивности и с применением жидких скintилляторов резко возрос интерес исследователей к соединениям, меченным тритием. Это было обусловлено значительно более высокой молярной радиоактивностью данных соединений, что позволило уменьшить на два порядка количество образца, необходимое для его надежного тестирования по радиоактивному излучению.

Также давно применялся и изотоп фосфора-32. Первоначально соединения, меченные  $^{32}\text{P}$ , получали по реакции  $^{31}\text{P}(n,\gamma)^{32}\text{P}$  облучением нейтронами неорганического соеди-

нения, чаще всего соли ортофосфорной кислоты, при этом молярная радиоактивность полученного продукта была не выше, чем у тритиевых соединений.

В последние несколько лет объектами исследования стали не целые молекулы нуклеиновых кислот, а лишь их небольшие фрагменты, полученные генно-инженерными методами. Это потребовало перехода на пикомолярные количества материала, и для надежного тестирования образца требуется значительно более высокая удельная радиоактивность. Наиболее подходящим с этой точки зрения изотопом оказался изотоп фосфора-32, полученный по реакции  $^{32}\text{S}(n,p)^{32}\text{P}$  нейтронным облучением элементарной серы. Удельная радиоактивность фосфора-32 без носителя (при 100%-ном изотопном обогащении) составляет 9131 Ки·мАт $^{-1}$ , т.е. в 300 раз выше, чем у трития. Кроме этого изотопа успешно применяются для мечения нуклеиновых кислот изотопы фосфора-33 и серы-35, обладающие также достаточно высокой удельной радиоактивностью (см. таблицу).

Нуклеиновые кислоты, меченные радиоактивными изотопами фосфора ( $^{32}\text{P}$  и  $^{33}\text{P}$ ) а также серы ( $^{35}\text{S}$ ), широко используются в молекулярно-биологических исследованиях и являются краеугольным камнем основных методик, таких как гибридизация на фильтрах, гибридизация *in situ*, секвенирование ДНК и ряда других. Выбор радиоактивной метки определяется в основном двумя параметрами: чувствительностью автордиографического детектирования и пространственным разрешением.<sup>1</sup> Эти параметры зависят в свою очередь от энергии  $\beta$ -излучения радиоактивного изотопа и времени его полураспада, определяющего максимальную удельную радиоактивность соответствующего изотопа. В таблице приведены физические характеристики указанных выше изотопов.

**Ю.С.Скоблов.** Кандидат химических наук, старший научный сотрудник отдела изотопов ГНЦ РФ ФЭИ. Телефон (084)399–5772. Область научных интересов: химия, энзимология, синтез радиоактивно меченных соединений, введение радиоактивной метки в предшественники нуклеиновых кислот.

**А.Э.Королев.** Инженер-технолог фирмы «Изотопхим». Область научных интересов: химия, синтез радиоактивно меченных соединений.

**Р.Н.Маслова.** Кандидат химических наук, старший научный сотрудник группы изотопных исследований ИМБ РАН. Телефон 135–1540. Область научных интересов: молекулярная биология (пространственная структура нуклеиновых кислот, их взаимодействие с белками), введение радиоактивной метки в нуклеиновые кислоты и их предшественники.

Дата поступления 3 марта 1995 г.

Таблица. Физические характеристики радионуклидов

| Физические характеристики                                                                               | Изотоп          |                 |                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                                                                                         | $^{32}\text{P}$ | $^{33}\text{P}$ | $^{35}\text{S}$ |
| Период полураспада, сут                                                                                 | 14.3            | 25.4            | 87.4            |
| Максимальная энергия $\beta$ -излучения, МэВ                                                            | 1.71            | 0.20            | 0.167           |
| Теоретическая удельная активность радионуклида, Ки $\cdot$ мАт $^{-1}$                                  | 9 120           | 5 200           | 1 488           |
| Максимальная (практически достижимая) удельная активность меченых нуклеотидов, Ки $\cdot$ ммоль $^{-1}$ | 7 000           | 4 500           | 1 500           |

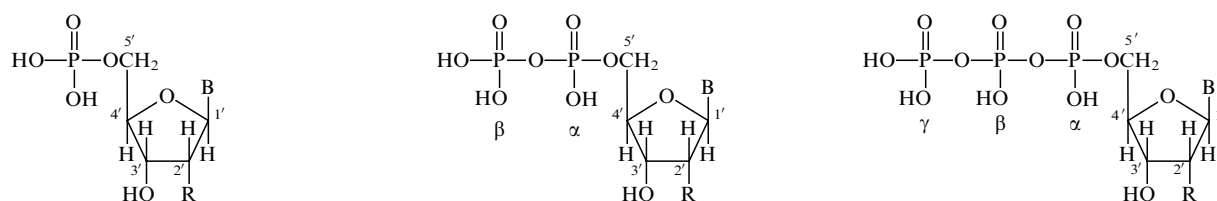
При определении единичных генов животных методом блот-гибридизации по Саузерну<sup>2</sup> определяющим является требование максимальной чувствительности автордиографического детектирования, необходимое для субпиктограммовых количеств, которое может быть обеспечено только изотопом фосфора-32, обладающим самой высокой удельной радиоактивностью из рассматриваемых здесь изотопов. В методе же дидеоксинуклеотидного секвенирования ДНК требованием чувствительности можно поступить в пользу высокого разрешения полос на автордиограмме,<sup>3</sup> которое может быть обеспечено лучше всего мечением нуклеиновых кислот серой-35, а также фосфором-33, обладающих низкой энергией и поэтому небольшим пробегом  $\beta$ -частиц в геле. Это относится в равной мере и к методике гибридизации *in situ*, для которой пространственное разрешение является определяющим.

Фосфор-33 в ряде случаев обладает преимуществом по сравнению с серой-35, поскольку позволяет значительно повысить чувствительность детектирования и лишь незначительно ослабить пространственное разрешение. Это оказалось особенно важным для методики полимеразной цепной реакции («циклическое секвенирование»), дающей возможность секвенировать относительно небольшие количества матрицы при высоких температурах для снижения артефактов определения структуры.<sup>4</sup> Праймер, меченный  $^{33}\text{P}$ , обеспечивает достаточную чувствительность и позволяет проводить автордиографическую экспозицию за одну ночь. Это же относится и к методике, используемой при анализе полиморфизма одноцепочечных конфигураций, в которой требования как к пространственному разрешению, так и к чувствительности детектирования достаточно высоки.<sup>5</sup> Более детальное обоснование выбора радиоактивного изотопа для указанных методик исследований приведено в обзоре Эванса и Рида.<sup>1</sup>

Можно отметить еще одно преимущество нуклеозид 5'-трифосфатов, меченных фосфором-33, перед этими соединениями, меченными серой-35, а именно их полную химическую идентичность с природными соединениями, что исключает любые артефакты при ферментативных реакциях, в которых используются в качестве субстратов меченные нуклеозид 5'-трифосфаты. Надо отметить, что большинство методик предъявляет высокие требования к качеству меченных радиоактивными изотопами фосфора нуклеозид 5'-трифосфатам, особенно обладающим высокой молярной радиоактивностью, но не всегда возможно доставить в отдаленные районы эти соединения в течение 2–3 дней в соответствующем температурном режиме, используя сухой лед, поэтому мы сочли полезным дать обзор известных методов синтеза этих соединений.

Литература по этой специфической теме весьма ограничена, так как в открытой печати публикуются в основном принципиальные схемы синтеза без технологических подробностей, которые являются по большей части know-how.

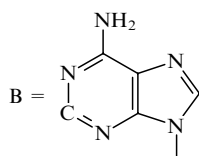
Схема 1



Нуклеозид 5'-монофосфаты

Нуклеозид 5'-дифосфаты

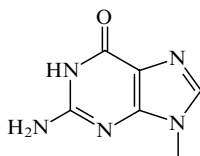
Нуклеозид 5'-трифосфаты



Аденин

R = OH (AMP, ADP, ATP)

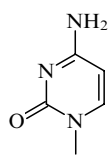
R = H (dAMP, dADP, dATP)



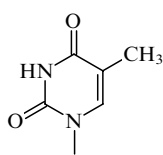
Гуанин

R = OH (GMP, GDP, GTP)

R = H (dGMP, dGDP, dGTP)

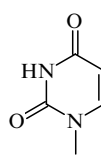


Цитозин

R = OH (CMP, CDP, CTP)  
R = H (dCMP, dCDP, dCTP)

Тимин

R = H (TMP, TDP, TTP)



Урацил

R = OH (UMP, UDP, UTP)

Следует подчеркнуть, что даже самое тщательное, скрупулезное копирование опубликованных методик не всегда приводит к ожидаемым результатам. В данном обзоре мы попытались привести не только опубликованные схемы синтезов, но и оценить степень их надежности и воспроизводимости, основываясь на личном опыте авторов.

Для получения меченых нуклеиновых кислот *in vitro* чаще всего используют нуклеозид 5'-трифосфаты, содержащие радиоактивный изотоп в альфа- или в гамма-положениях фосфатных групп. Для введения метки в 3'-конец ДНК с помощью различных ДНК-полимераз и для синтеза радиоактивной молекулы ДНК, содержащей метку в одном, двух или всех четырех нуклеотидах, используют дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, меченные фосфором в альфа-положении. Для введения метки в 5'-концы ДНК и РНК используют аденозинтрифосфат, меченный фосфором в гамма-положении. На схеме 1 представлены формулы всех нуклеозидтрифосфатов, используемых в молекулярно-биологических исследованиях, синтез которых описан в настоящем обзоре.

Синтез нуклеозид 5'-трифосфатов, меченных фосфором в альфа- и гамма-положениях с высокой молярной радиоактивностью (3000–6000 Ки·ммоль<sup>-1</sup>) имеет ряд специфических трудностей.

1. Используемые реакции получения целевых соединений не должны приводить к неконтролируемому изотопному разбавлению радиоактивного фосфора нерадиоактивным изотопом — фосфором-31.

2. Местоположение радиоактивного атома должно быть строго фиксировано. Недопустимо применение методов, которые могли бы изменить местоположение радиоактивного атома или неконтролируемо вводить метку в различные положения.

3. Высокая молярная радиоактивность используемых в молекулярной биологии нуклеозид 5'-трифосфатов вынуждает проводить синтезы с количествами радиоактивного изотопа 10<sup>-9</sup>–10<sup>-8</sup> моля, что соответствует активности 10–100 мКи (для фосфора-32).

4. Низкая концентрация радиоактивного вещества требует использования большого избытка нерадиоактивных компонентов для увеличения скорости и выхода реакции, что часто приводит к появлению побочных соединений.

5. При высокой объемной радиоактивности реакционной смеси (1–10 Ки·мл<sup>-1</sup>) длительность реакции должна быть сведена к минимуму, так как быстро накапливаются значительные количества в основном неидентифицированных продуктов, индуцированных ионизирующим излучением (продукты радиолитиза, а также продукты радикальных реакций).

6. Очистка и особенно анализ продуктов затруднены из-за малого количества вещества и делают практически невозможным использование классических методов очистки, применяемых в органической химии (кристаллизацию, экстракцию, перегонку, фильтрование и др.), и таких методов анализа, как ЯМР-, ЭПР-, ИК-спектроскопия, масс-спектрометрия, рентгеноструктурный анализ.

7. Работа с радиоактивными веществами требует обеспечения безопасности персонала, поэтому все манипуляции при проведении синтезов необходимо выполнять с учетом норм радиационной безопасности, желательно дистанционно, в изолированных боксах.

Методы синтеза нуклеотидов и нуклеозид 5'-трифосфатов, меченных радиоактивными изотопами фосфора, описаны весьма скромно. Исходным сырьем в представленных синтезах является ортофосфорная кислота. Все методы можно разделить на следующие группы:

а) химические методы, в которых на всех стадиях используются химические реагенты;

б) химико-ферментативные методы, в которых наряду с химическими реакциями используются ферментативные реакции;

в) ферментативные методы, в которых все стадии синтеза проводят с помощью ферментов.

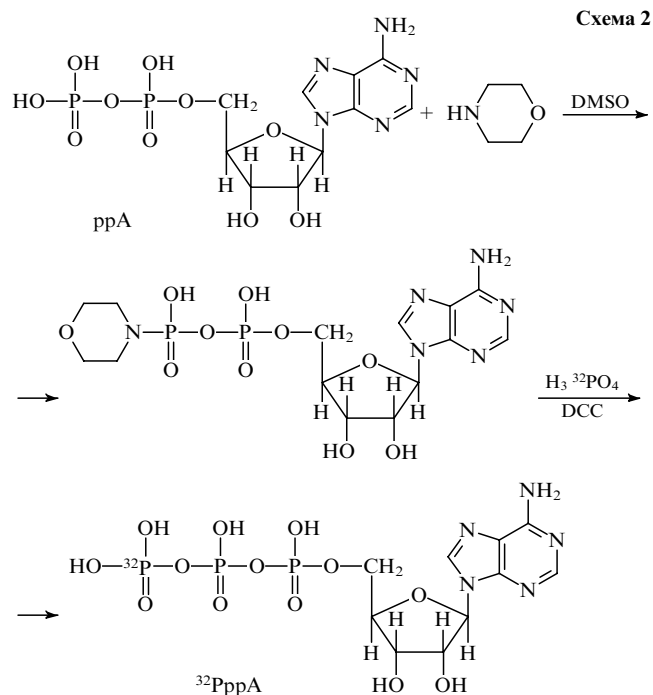
Наибольший интерес для молекулярной биологии представляют нуклеозид 5'-трифосфаты, меченные радиоактивными изотопами фосфора в альфа- или гамма-положениях, и предлагаемый обзор посвящен анализу методов синтеза этих соединений. Ферментативным методам синтеза уделено основное внимание, поскольку в настоящее время эти методы находят все более широкое применение для синтеза предшественников нуклеиновых кислот, меченных радиоактивными изотопами не только фосфора и серы, но и углерода, а также тритием.<sup>6</sup>

Большинство работ, рассмотренных в настоящем обзоре, было выполнено с использованием <sup>32</sup>P-ортофосфорной кислоты, однако все приведенные методические разработки справедливы и для синтезов с использованием <sup>33</sup>P-ортофосфорной кислоты. Это подтверждается и личным опытом авторов настоящего обзора.

## II. Синтез нуклеозид 5'-[γ-<sup>32</sup>(<sup>33</sup>)P]трифосфатов

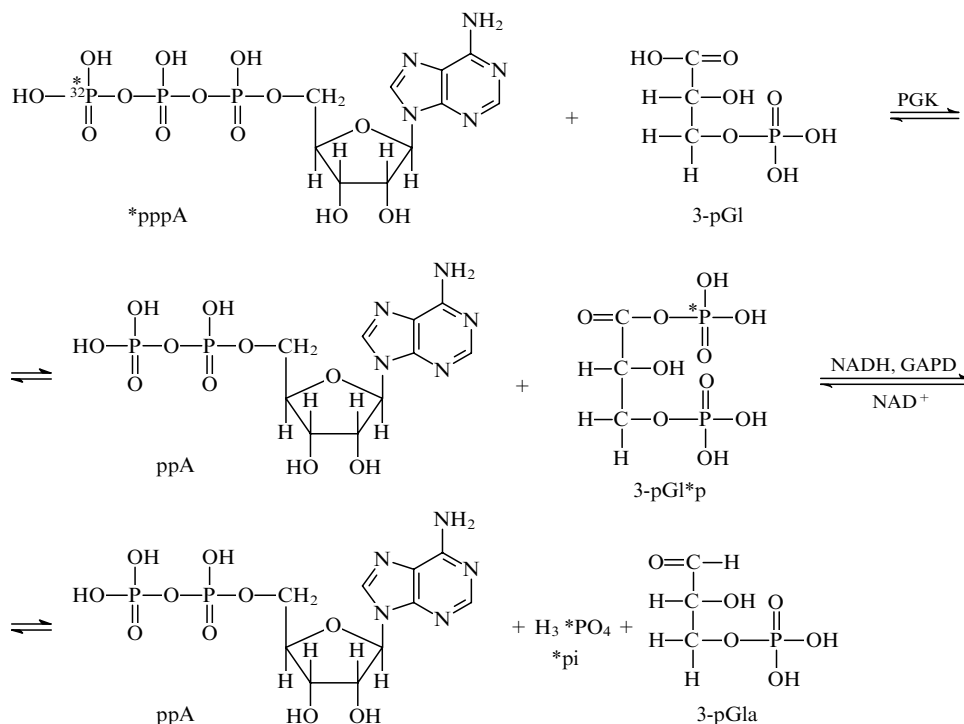
### 1. Химические методы

Синтез нуклеозид 5'-трифосфатов, меченных радиоактивным фосфором в гамма-положении, не является очень сложной задачей. Первым предложил метод синтеза [γ-<sup>32</sup>P]АТР (<sup>32</sup>PppA) из ADP (ppA) и <sup>32</sup>P-ортофосфорной кислоты (<sup>32</sup>P<sub>i</sub>) Моффат.<sup>7</sup> Для активации β-фосфата ADP была использована реакция образования промежуточного морфолидатного производного (схема 2). Реакция с H<sub>3</sub><sup>32</sup>PO<sub>4</sub> проводилась в безводном диметилсульфоксиде (DMSO) в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодиимида (DCC).



Этим методом был получен [γ-<sup>32</sup>P] АТР с выходом 65% и молярной активностью 10 мКи·ммоль<sup>-1</sup>. Столь низкая молярная активность продукта объясняется отсутствием в то время <sup>32</sup>P-ортофосфорной кислоты с высокой молярной активностью. В настоящее время метод позволяет получать продукт с высокой молярной радиоактивностью (до 1000 Ки·ммоль<sup>-1</sup>). Основной недостаток предложенного метода заключается в нестабильности промежуточного морфолидатного производного (разлагается при комнатной температуре за несколько часов).

Схема 3



Этот метод был улучшен группой исследователей из ВНИИ МБ Новосибирска,<sup>8</sup> которая сумела подобрать условия стабильного выделения и хранения промежуточного активированного производного ADP. Для ускорения второй стадии — собственно синтеза  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  — был предложен *n*-*N,N*-диметиламинопиридин. С помощью этой модификации можно сравнительно просто получать  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  с любой заданной молярной активностью вплоть до предельной. Метод может быть успешно применен и для синтеза других нуклеозид 5'-трифосфатов если использовать соответствующий нуклеозид 5'-дифосфат.

Реакция проводится также в безводном диметилсульфоксиде, проходит довольно быстро (10–20 мин), но часто сопровождается накоплением побочных продуктов типа АрррррА, АррррррА и других неидентифицированных соединений. Это обстоятельство не только снижает выход целевого продукта, но и резко усложняет его выделение. Присутствие же в целевом продукте подобных примесей крайне нежелательно, поскольку они обладают сильными сорбционными свойствами. Поэтому широкого распространения в лабораторной практике или в промышленном производстве этот метод не получил.

## 2. Химико-ферментативный метод

Единственный описанный в литературе химико-ферментативный метод синтеза  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$  заключается в получении  $^{33}\text{P}$ -ацетилфосфата из уксусного ангидрида и  $^{33}\text{P}$ -ортофосфорной кислоты с последующим фосфорилированием этим реагентом ADP с помощью ацетилкиназы.<sup>9</sup>

Учитывая разнообразие и обратимость ферментативных реакций с участием АТФ, можно было бы предложить несколько вариантов, аналогичных описанному. Например, синтез  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  из меченого фосфором-32 фосфоэнолпирувата с помощью пируваткиназы или из меченого креатинфосфата с помощью креатинкиназы. Такие реакции протекали бы быстро, без образования побочных продуктов и с хорошим выходом. Тем не менее затраты на получение меченых предшественников из  $^{32}\text{P}$ -ортофосфорной кислоты ( $^{32}\text{P}$ -ацетилфосфата,  $^{32}\text{P}$ -фосфоэнолпирувата или  $^{32}\text{P}$ -креатинфосфата) и их выделение из реакционной смеси перед

ферментативной стадией делают синтез трудоемким и неконкурентоспособным по сравнению с ферментативными методами, в силу чего он не получил широкого применения.

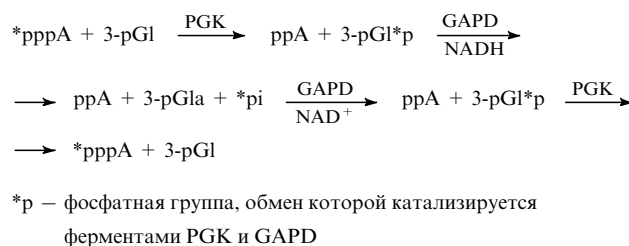
В целом химико-ферментативные методы синтеза  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  представляют в настоящее время чисто теоретический интерес и в препаративных целях не используются.

## 3. Ферментативные методы

Наиболее простым в исполнении и эффективным для синтеза нуклеозид 5'-трифосфатов, меченных  $^{32}\text{P}$  (или  $^{33}\text{P}$ ) в  $\gamma$ -положении, оказался ферментативный метод. Первоначальная идея метода заключалась в использовании обратимости реакций гликолиза в реконструированном фрагменте цепочки нуклеотида (схема 3).

С помощью фосфоглицераткиназы (PGK) и глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы (GAPD) АТФ превращался в ADP и ортофосфат через промежуточный 1,3-дифосфоглицерат (pGlp) (в присутствии 3-фосфоглицерата (3-pGL)). Добавление  $^{32}\text{P}$ -ортофосфорной кислоты к реакционной смеси на последней стадии неизбежно приводит к образованию  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  за счет обратимости ферментативной реакции при установлении равновесия в системе (схема 3а). Этот

Схема 3а



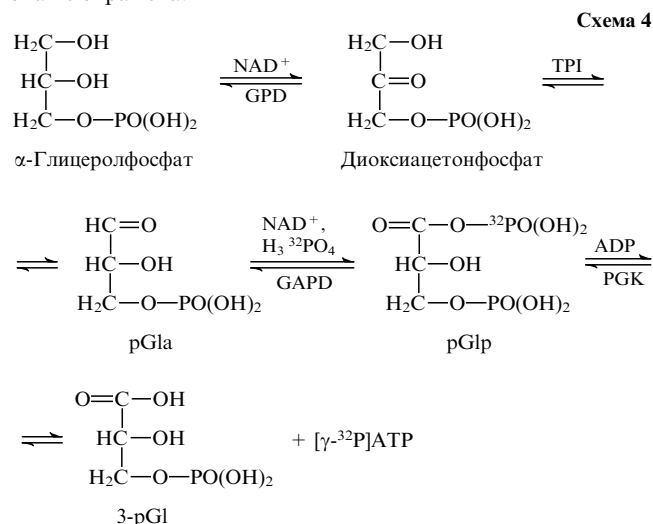
метод, предложенный Глинном и Чапелом,<sup>10</sup> был быстро внедрен в лабораторную практику. Особую популярность приобрел этот метод благодаря простой и хорошо воспроизводимой методике, предложенной Максамом и Гилбертом<sup>11</sup> применительно к секвенсу ДНК. Вся процедура получения  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  этим методом занимала менее двух часов, и

продукт без выделения мог быть использован для введения метки в 5'-конец ДНК. Однако метод принципиально не позволяет получать  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$  без разбавления изотопом фосфора-31 и реально дает конечный продукт с выходом 60–70% и молярной активностью 1000–1500 Ки·ммоль<sup>-1</sup>.

Позднее Ступар и Лескович<sup>12</sup> проанализировали метод Глинна и Чаппела с точки зрения оптимизации выхода реакции и значения молярной активности получаемого  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ .

В 1973 г. Шендел и Веллс<sup>13</sup> опубликовали работу, в которой предложили «перевернуть» схему метода Глинна – Чаппела и использовать прямую реакцию синтеза  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$  из глицеральдегид-3-фосфата и  $^{32}\text{P}$ -ортофосфорной кислоты. Теоретически это позволило бы получить  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$  с предельно возможной молярной радиоактивностью, равной молярной радиоактивности исходной  $^{32}\text{P}$ -ортофосфорной кислоты, т.е. без изотопного разбавления. Учитывая нестабильность глицеральдегид-3-фосфата, авторы предложили использовать стабильный и коммерчески доступный препарат — диэтилацеталь глицеральдегид-3-фосфата. При этом на первой стадии — химического гидролиза диэтилацетала — образовывался свободный глицеральдегид-3-фосфат, а затем уже проводился собственно ферментативный синтез. Однако примеси неорганического фосфата, которые образуются из нестабильного глицеральдегид-3-фосфата на первой стадии гидролиза диэтилацетала, резко и неконтролируемо снижают молярную активность  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$  из-за изотопного разбавления. Поэтому этот метод не нашел широкого применения ни в лабораторной практике, ни в производстве.

С целью увеличения молярной активности препарата Вальсесом и Джонсоном<sup>14</sup> было сделано дальнейшее усовершенствование метода — фрагмент цепочки гликолиза дополнили еще тремя ферментами: глицеролфосфатдегидрогеназой (GPD), триозофосфатизомеразой (TPI) и лактатдегидрогеназой (LDH). При этом GPD и TPI синтезировали глицеральдегид-3-фосфат из  $\alpha$ -глицеролфосфата, а LDH добавляли в систему для регенерации  $\text{NAD}^+$  (схема 4). Поскольку LDH непосредственно не участвует в синтезе  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$  на схеме 4 она не отражена.

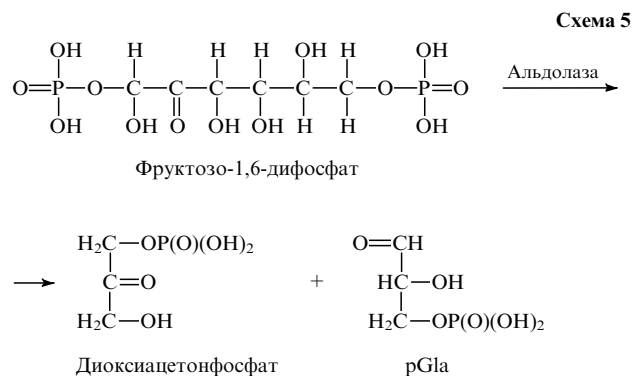


Выход АТР увеличивался до 90–98% и, главное, молярная активность возрастала до предельных величин, определяемых молярной радиоактивностью исходной  $^{32}\text{P}$ -ортофосфорной кислоты, а также содержанием «холодного» ортофосфата в используемых реактивах.

Вместо ADP можно использовать другие нуклеозид 5'-дифосфаты: GPD, IDP, CDP, UDP, dADP, dGDP, получая соответствующие трифосфаты, меченные фосфором в гамма-положении. Метод прост, хорошо воспроизводим и

нашел самое широкое применение в различных лабораториях. Судя по весьма скудным и отрывочным литературным данным, именно этим методом (возможно, с какими-то модификациями) производят  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$  все основные фирмы-производители.

Баншке с соавт.<sup>15</sup> предложили еще один путь синтеза глицеральдегидфосфата. Они использовали расщепление фруктозо-1,6-дифосфата альдозазой (схема 5).



На наш взгляд этот путь по сравнению с синтезом по схеме 4 имеет по крайней мере два недостатка. Во-первых, в растворе фруктозо-1,6-дифосфат не очень стабилен и, следовательно, существует реальная возможность изотопного разбавления «холодным» фосфором. Во-вторых, для увеличения выхода накапливающийся диоксиацетонфосфат необходимо удалять, например, с помощью той же самой ТРІ. Таким образом, особых преимуществ этот метод не имеет, поскольку замена GPD на альдозазу и, соответственно, глицерол-3-фосфата на фруктозо-1,6-дифосфат не кажется оправданной. Правда, авторы указывают на большую устойчивость альдозазы к действию ионизирующего излучения, что может быть существенно для промышленного синтеза. Для лабораторного использования в масштабе 1–10 мКи, безусловно, более предпочтительным является хорошо отработанный синтез, представленный на схеме 4.

Совсем недавно фирмой «ICN Biomedical Inc.» был запатентован<sup>16</sup> еще один способ синтеза  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$  — своего рода промежуточный вариант между методом Джонсона – Вальсеса и Шенделла – Веллса. Автор этой схемы Линн предлагает отказаться от  $\alpha$ -глицеролфосфата и, соответственно, глицеролфосфатдегидрогеназы, а использовать в качестве исходного нерadioактивного сырья сразу диоксиацетонфосфат. Фактически предложено «укоротить» схему Джонсона – Вальсеса на одну (первую) стадию (см. схему 4). Одновременно Линн предложил заменить привычную  $\text{NAD}$ -регенерирующую систему (лактатдегидрогеназа – пироват) на более экзотическую (малатдегидрогеназа – оксалоацетат). По сообщению автора эти два изменения позволяют масштабировать синтез с загрузкой до 500 мКи  $^{32}\text{P}$ -ортофосфата с неизменно высоким выходом (~95%) за 15–20 мин. Учитывая имеющиеся в литературе данные<sup>17</sup> о низкой устойчивости глицеролфосфатдегидрогеназы к действию ионизирующего излучения фосфора-32, это весьма правдоподобно. Действительно, прямое копирование метода Джонсона – Вальсеса позволяет получать хорошие результаты для синтеза 1–10 мКи фосфора-32 (обычный лабораторный синтез). Увеличение количества фосфора-32 до 100 мКи или далее до 1 Ки резко снижает выход реакции.

Следует подчеркнуть, что в методе Линна все ингредиенты реакционной смеси, включая ферменты, берутся в количествах логичных и обоснованных, чего никак нельзя сказать об оригинальной работе Джонсона – Вальсеса. Тем не менее патент «ICN» выглядит, скорее, способом «обойти» патент Джонсона – Вальсеса, чем серьезным улучшением технологии, и вряд ли будет широко внедрен в практику.

Нами была предложена довольно простая и удобная модификация метода Джонсона–Валсеса для масштабного синтеза (100–1 000 мКи фосфора-32). Подробно ее лабораторный вариант описан в диссертации Карамышева.<sup>18</sup> Суть модификации заключалась в предварительной наработке прямо в реакционном сосуде глицеральдегид-3-фосфата: сульфатаммонийный осадок смеси ферментов после центрифугирования растворяли в буфере, содержащем дитиотреитол, в этот раствор вносили все необходимые ингредиенты для синтеза  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ , за исключением  $^{32}\text{P}$ -ортофосфорной кислоты и АРР. После 20 мин предынкубации добавляли эти последние ингредиенты и проводили синтез. Такие изменения в порядке внесения реактивов в реакционную смесь принципиально ничего не изменяют, однако, по наблюдениям авторов, они увеличивают и стабилизируют выход продукта синтеза благодаря эффективной наработке глицеральдегид-3-трифосфата (согласно схеме 4) до начала собственно синтеза  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ .

### III. Синтез нуклеозид 5'- $[\alpha\text{-}^{32(33)}\text{P}]\text{трифосфатов}$

Схема синтеза нуклеозид 5'-трифосфатов (NTP), меченных фосфором-32(33) в альфа-положении, намного сложнее описанных и требует решения фактически двух самостоятельных задач. Первая задача — синтез соответствующего нуклеозид 5'-монофосфата (NMP), меченного фосфором, путем введения  $^{32(33)}\text{P}$ -ортофосфата строго в 5'-положение нуклеозида. Вторая задача — синтез собственно нуклеозид 5'- $[\alpha\text{-}^{32(33)}\text{P}]\text{трифосфатов}$  из соответствующих 5'- $[\alpha\text{-}^{32(33)}\text{P}]\text{NMP}$ .

#### 1. Синтез нуклеозид 5'- $[\alpha\text{-}^{32(33)}\text{P}]\text{монофосфатов}$

##### а. Химические методы

Большинство химических методов введения меченого ортофосфата в нуклеозиды неспецифично, поэтому для синтеза (5'- $[\alpha\text{-}^{32(33)}\text{P}]\text{NMP}$ ) используют нуклеозиды, защищенные по 2'- и 3'-гидроксильным группам. После синтеза защитную группу (изопропилиденовую, ацетильную или бензоильную) удаляют кислотным или щелочным гидролизом.

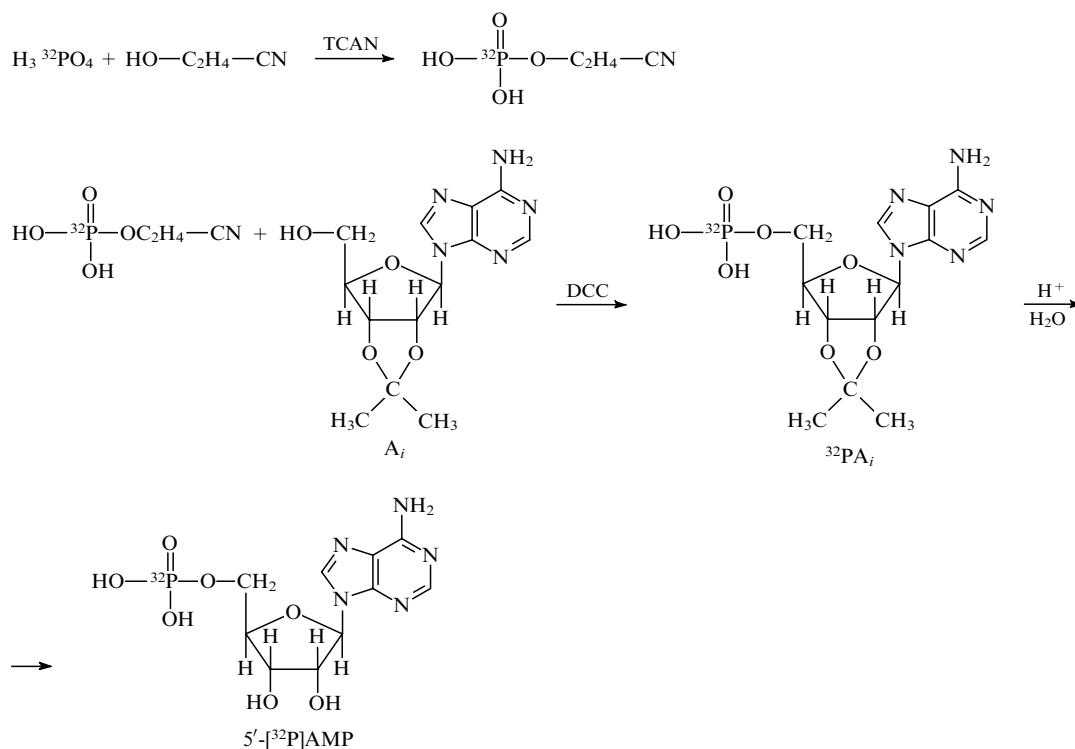
Первым нуклеозид 5'-монофосфат, меченный фосфором-32, синтезировал Моффат,<sup>7</sup> который использовал для фосфорилирования 2',3'-*о*-изопропилиденаденозина ( $\text{A}_i$ ) меченный фосфором-32  $\beta$ -цианэтилфосфат в присутствии DCC (схема 6). Меченый  $\beta$ -цианэтилфосфат получали конденсированием  $^{32}\text{P}$ -ортофосфорной кислоты с  $\beta$ -цианэтанолом в присутствии трихлорацетонитрила (TCAN). В кислой среде  $^{32}\text{P}\text{A}_i$  гидролизовали до меченого фосфором-32 аденозин 5'-монофосфата (5'- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{AMP}$ ).

Симонс<sup>19</sup> упростил получение нуклеозид 5'- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{монофосфата}$ , используя TCAN для синтеза 5'- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{AMP}$  непосредственно из защищенного аденозина и триэтиламмонийной соли  $^{32}\text{P}$ -ортофосфорной кислоты. Такое упрощение сразу сделало этот метод весьма популярным как в лабораториях, так и в промышленном производстве. Следует отметить, что несмотря на кажущуюся простоту метод содержит ряд недостатков, основной из которых — образование значительного числа побочных продуктов и невысокий выход — отмечался в работе<sup>20</sup>. Жесткие требования к качеству реагентов и растворителей, а также чрезвычайно сложная смесь продуктов реакции заставили исследователей продолжить поиск альтернативных путей синтеза.

Некоторое улучшение метода Симонса было предложено Аммосовым и соавт.<sup>21</sup> Оно заключалось в использовании нуклеозидов с ацетильной защитой вместо нуклеозидов с изопропилиденовой или бензоильной защитой. Условия снятия ацетильной защиты после конденсации защищенного нуклеозида с  $^{32}\text{P}$ -ортофосфорной кислотой достаточно мягкие (обычно это обработка раствором аммиака), что позволяет получить конечный продукт с выходом до 70–80%. В случае же изопропилиденовой защиты, которая снимается в существенно более жестких условиях (при обработке соляной кислотой), выход реакции по Симонсу для пиримидиновых нуклеозидов не превышает 40%, а для производных 2'-дезоксинуклеозидов пуринового ряда получение нуклеозид 5'- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{монофосфата}$  становится вообще проблематичным.

Интересной оказалась попытка Биебричера<sup>22</sup> использовать в качестве конденсирующего агента мочевины. Раствор соответствующего нуклеозида, аммонийной соли  $^{32}\text{P}$ -ортофосфорной кислоты и мочевины упаривали досуха, сухой

Схема 6

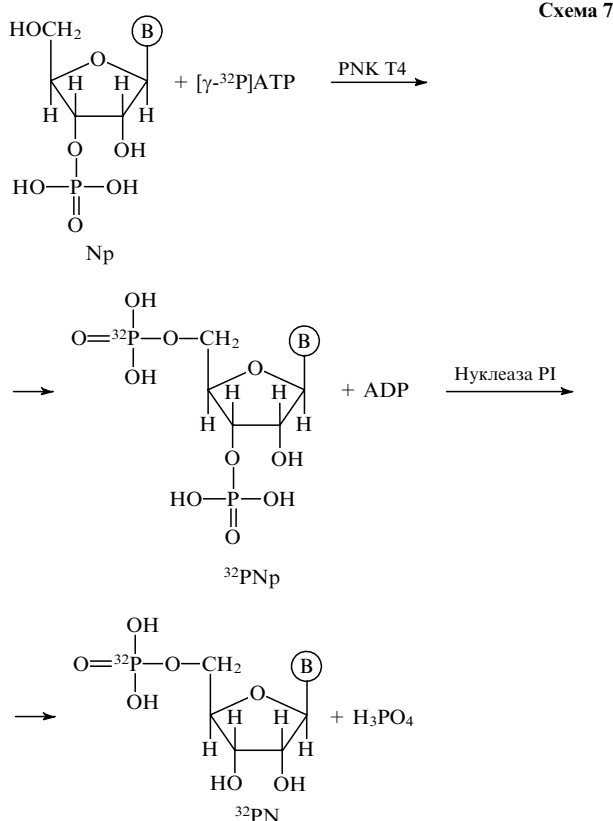


остаток нагревали в течение нескольких часов при 110–120°C, охлаждали и растворяли в воде. В растворе идентифицировали нуклеозид 5'-[<sup>32</sup>P]монофосфаты с выходом 15–40% в зависимости от природы гетероциклического основания нуклеозида. К сожалению, сложнейшая смесь неидентифицированных побочных продуктов реакции затрудняет использование этого метода.

Чисто исторический интерес представляет и попытка Харлберга и Фарлонга<sup>23</sup> использовать для получения <sup>32</sup>P-нуклеотидов биосинтетический путь на основе *E.coli*. Главный недостаток предложенного метода — очень низкая молярная активность (10–20 мКи·ммоль<sup>-1</sup>). Неконтролируемое изотопное разбавление и высокая потребность *E.coli* в неорганическом фосфате принципиально не позволяют получить меченные фосфором нуклеотиды высокой молярной активности.

#### 6. Ферментативные методы синтеза нуклеозид 5'-[<sup>32(33)</sup>P]монофосфата

Джонсон и Валсес<sup>24</sup> предложили ферментативный способ получения нуклеозид 5'-[<sup>32</sup>P]монофосфатов с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 (PNK T4) и нуклеазы PI (схема 7). Акцептором радиоактивного фосфата является нуклеозид 3'-монофосфат (Np), а донором — [γ-<sup>32</sup>P]АТР.



Использование [γ-<sup>32</sup>P]АТР для синтеза меченного фосфором нуклеозид 5'-монофосфата оказалось вполне оправдано, так как ферментативный метод получения [γ-<sup>32</sup>P]АТР позволяет не только быстро и с высоким выходом синтезировать этот продукт, но и проводить дальнейший синтез меченных фосфором-32 нуклеозидтрифосфатов с помощью PNK T4 в этой же реакционной смеси без выделения [γ-<sup>32</sup>P]АТР. Этот метод делает универсальным то, что PNK T4 фосфорилирует все природные нуклеозид 3'-монофосфаты. Высокая скорость и специфичность ферментативных реакций обеспечивают минимальное количество побочных продуктов. Все перечисленные достоинства привлекают внимание своей

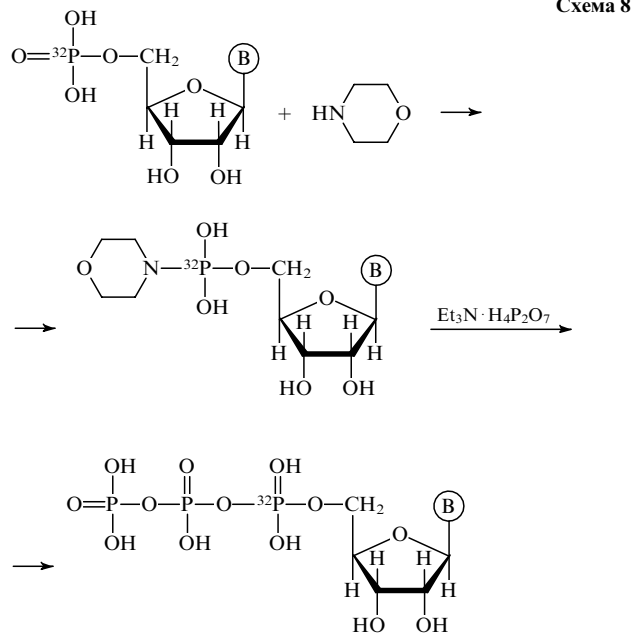
технологичностью. Единственный существенный недостаток метода — потребность в ряде весьма дорогих и очень чистых ферментов.

Отсутствие чистых и стабильных ферментов — нуклеозидкиназ — не позволило до сих пор опробовать еще одну возможность получения нуклеотидов, меченных фосфором. Это путь прямого трансфосфорилирования нуклеозидов с помощью нуклеозидкиназ и [γ-<sup>32</sup>P]АТР. Простота этого подхода очевидна, однако нуклеозидкиназы, как правило, строго специфичны к природе гетероциклического основания нуклеозида, и, следовательно, для синтеза всех природных нуклеозид 5'-[<sup>32(33)</sup>P]монофосфатов необходимо иметь 4–5 высокоочищенных нуклеозидкиназ. Попытки выделения этих ферментов из различных источников предпринимались неоднократно, однако стабильных препаратов, пригодных для препаративного синтеза нуклеотидов, получить, как нам известно, до сих пор не удалось.

#### 2. Методы фосфорилирования нуклеозид 5'-[<sup>32(33)</sup>P]монофосфатов до нуклеозид 5'-[α-<sup>32(33)</sup>P]трифосфатов

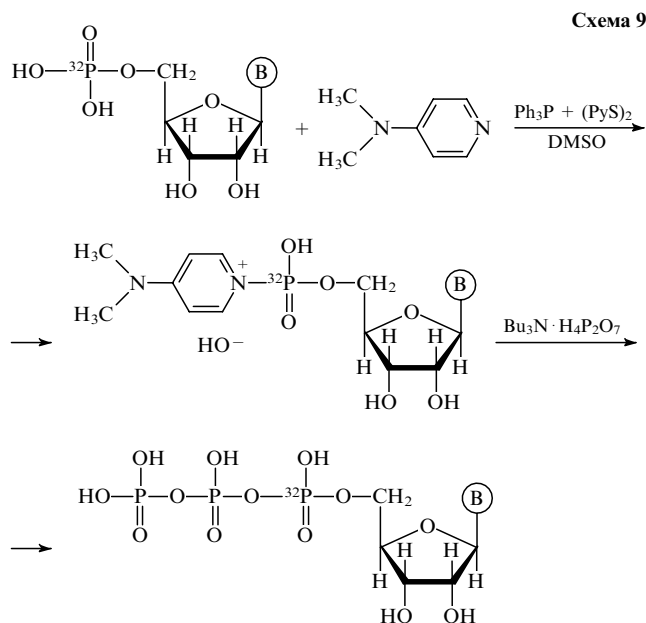
##### а. Химические методы

Мофат<sup>7</sup> синтезировал нуклеозид 5'-[α-<sup>32</sup>P]трифосфаты через морфолидатовую активацию нуклеозид 5'-[<sup>32</sup>P]монофосфата. Образовавшийся морфолидат реагирует с триэтил-аммонийной солью пирофосфорной кислоты с хорошим выходом (схема 8).



Полученный согласно схеме 8 [α-<sup>32</sup>P]АТР имел очень низкую молярную активность — около 10 мКи·ммоль<sup>-1</sup>. Несмотря на хороший выход — 65%, метод не получил признания, так как попытки увеличить молярную активность продукта приводили к резкому снижению его выхода и накоплению побочных продуктов.

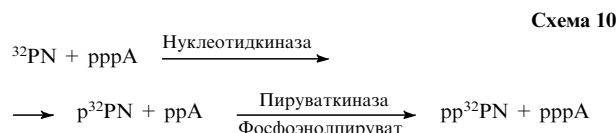
Сибирскими учеными был предложен другой, более удачный метод активации нуклеозид 5'-[<sup>32</sup>P]монофосфата,<sup>25</sup> заключающийся в том, что синтезировали промежуточный продукт — производное *n*-*N,N*-диметиламинопиридина. В качестве катализатора использовали окислительно-восстановительную пару: трифенилфосфин и *n*-дипиридилдисульфид. Образовавшийся промежуточный продукт — весьма нестойкое соединение — реагирует далее с трибутиламмонийной солью пирофосфорной кислоты непосредственно в этом же реакционном сосуде (схема 9).



Согласно схеме 9 были синтезированы все природные нуклеозид 5'-[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]трифосфаты с молярной активностью 2000–3000 Ки · ммоль $^{-1}$  и более. Выход составлял 15–40% от исходной  $^{32}\text{P}$ -ортофосфорной кислоты. Метод хорошо зарекомендовал себя при проведении синтезов с 1–10 мКи фосфора-32. Увеличение загрузки по радиоактивному сырью до 100–200 мКи приводит к получению очень сложной смеси и снижает выход целевого продукта, по-видимому, вследствие радиолиза компонентов реакции.

## 6. Ферментативные методы

Более перспективными для решения этой задачи представляются варианты ферментативного фосфорилирования нуклеозид 5'-[ $^{32(33)}\text{P}$ ]монофосфатов до трифосфатов с помощью соответствующих нуклеотидкиназ. Реакция фосфорилирования может быть представлена схемой 10.



Первоначально для фосфорилирования нуклеозид 5'-[ $^{32}\text{P}$ ]монофосфатов использовали не индивидуальные ферменты, а киназную фракцию белков, выделенную из бактериальной биомассы с помощью сульфатаммонийного фракционирования.<sup>26</sup> Безусловно, такой ферментативный препарат содержал много балластного белка, в том числе и нежелательные примеси: фосфатазы и неспецифические АТФ-фазы. Чтобы подавить деградацию меченых нуклеотидов и нуклеозидтрифосфатов и поддержать постоянный уровень АТФ, в реакционную смесь вводили АТФ-регенерирующую систему: креатинфосфат–креатинкиназа или фосфоэнолпируват–пируваткиназа.<sup>23,26</sup> Иногда использовали ацетилфосфат, при этом добавления экзогенной ацетаткиназы не требовалось.<sup>27</sup> Тем не менее воспроизводимость результатов была очень плохой.

Это побудило Биебричера<sup>22</sup> разработать простой способ одновременного выделения всех необходимых нуклеозидмонофосфаткиназ из *E. coli*. Хотя ферменты очищались не до гомогенного состояния, все же уровень примесных ферментативных активностей в препаратах, использованных Биербричером, был во много раз ниже, и воспроизводимость синтезов существенно повысилась.

Позднее был разработан способ выделения из *E. coli* всех необходимых нуклеозидмонофосфаткиназ достаточно высокой степени чистоты специально для синтеза всех нуклеозид 5'-[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]трифосфатов.<sup>28</sup>

Джонсон и Валсес<sup>24</sup> использовали в синтезе коммерческие препараты пируваткиназы и нуклеозидмонофосфаткиназ: аденилаткиназу (миокиназу), гуанилаткиназу и нуклеозидмонофосфаткиназу (все ферменты фирмы «Boehringer–Mannheim»). При этом следует обратить внимание на ряд особенностей этих препаратов.

1. Аденилаткиназа (миокиназа) и гуанилаткиназа — это индивидуальные ферменты, и хотя препараты этих ферментов фирмы «Boehringer–Mannheim» содержат много балластного белка, а иногда и нежелательные примеси, тем не менее синтез [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]АТФ, [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]дАТФ и, соответственно, [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ГТФ и [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]дГТФ идет вполне удовлетворительно.

2. Препарат нуклеозидмонофосфаткиназа — это не индивидуальный фермент, а некая белковая фракция, содержащая кроме балласта по крайней мере два необходимых фермента — тимидинмонофосфаткиназу и цитидинмонофосфаткиназу. Наименования этих ферментов в чистом виде в каталогах фирм отсутствуют.

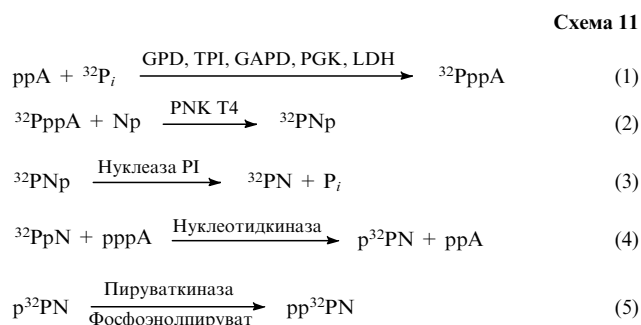
3. Принято считать, что цитидинмонофосфаткиназа способна фосфорилировать и UMP (и наоборот), т.е. что цитидинмонофосфаткиназа и уридинмонофосфаткиназа — это один и тот же фермент.

4. Соотношение ферментативных активностей препарата «нуклеозидмонофосфаткиназа» к ТМР, СМР и UMP значительно варьирует от партии к партии, особенно колеблется уровень активности ТМР-киназы и несколько меньше UMP-киназы. В связи с этим эффективность применения нуклеозидмонофосфаткиназы может быть различной для разных субстратов — обычно лучше идет синтез СТР или дСТР, слабее УТР и еще слабее ТТР.

5. Пируваткиназа — фермент, фосфорилирующий NDP до NTP за счет фосфоэнолпирувата, фосфорилирует пуриновые нуклеотиды легче, чем пиримидиновые, особенно трудно фосфорилируется ТДР.

Несмотря на указанные особенности этих препаратов фирмы «Boehringer–Mannheim» ферментативное фосфорилирование 5'-[ $^{32}\text{P}$ ]NMP до 5'-[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]NTP по эффективности и технологичности процесса намного превосходит другие пути фосфорилирования нуклеозидмонофосфатов.

Полный процесс ферментативного синтеза [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]NTP может быть представлен схемой 11.<sup>29</sup>



$^{32}\text{P}_i$  — ион неорганического ортофосфата, меченного радиоактивным изотопом фосфора-32 (или фосфора-33)

Все реакции протекают в одном реакционном сосуде, выделения промежуточных продуктов не требуется. На схеме 11 не отражена еще одна реакция, которую рекомендуют проводить авторы, но которая не затрагивает принципов этого метода. Речь идет о разрушении остатков непрореагировавшего [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]АТФ после реакции с PNK T4. Во избежании введения метки в  $\beta$ -положение нуклеозид

5'-дифосфата на последующих за 2-й стадиях реакции фосфорилирования авторы предложили использовать гексокиназу для разрушения остатков  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$  после реакции дефосфорилирования дифосфата нуклеазой PI. После действия гексокиназы смесь прогревали 2 мин на водяной бане для термоинактивации ферментов и продолжали синтез в том же сосуде по схеме 11.

Предложенный Джонсоном и Валсесом метод синтеза нуклеозид 5'- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ трифосфатов обладает неоспоримыми преимуществами перед всеми описанными выше методами и нашел широкое применение как в лабораторной практике, так и в соответствующем производстве.

Анализ тенденций развития методов синтеза нуклеозид 5'- $[\text{}^{32}\text{P}]$ трифосфатов, меченных радиоактивным фосфором в альфа- или гамма-положениях, показывает, что ферментативные методы являются более предпочтительными и постепенно вытесняют химические и химико-ферментативные методы синтеза из лабораторной практики и промышленного производства.

## Литература

1. M.R.Evans, C.A.Read. *Nature (London)*, **358**, 520 (1992)
2. E.M.Southern. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503 (1975)
3. M.D.Biggin, T.J.Gibson, G.F.Hong. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3963 (1983)
4. V.Murray. *Nucl. Acids Res.*, **358**, 520 (1992)
5. M.Orita, Y.Suzuki, T.Sekiya, K.Hayashi. *Genomics*, **5**, 874 (1989)
6. V.D.Frank-Kamenetskaya, G.V.Knizhnikova, N.F.Myasoyedov. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **121**, 161(1988)
7. A.M.Moffat. *Methods Enzymol.*, Part A, **12**, 182 (1967)
8. М.П.Гришаев, М.Ю.Рукавишников, В.В.Самуков, Ю.В.Туманов, А.Д.Аммосов. В кн. *И Всесоюз. совещ. по проблеме «Биологически активные соединения, меченные радиоактивными изотопами»*. Звенигород, 1985. (Тез. докл.). ИАЭ, Москва, 1985. С.57
9. Е.Е.Вояковская, Л.Ю.Захарова, Е.В.Зуева, В.В.Кулене, Д.П.Карпавичене, В.С.Цветков, Е.Г.Титкова. В кн. *II Симп. стран-членов СЭВ «Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами»*. Ленинград, 1981. ЦНИИ Атоминформ, Москва, 1982. С.141
10. I.M.Glynn, J.B.Chappell. *Biochem. J.*, **90**, 147 (1964)
11. A.M.Maxam, W.Gilbert. *Methods Enzymol.*, Part I, **65**, 499 (1980)
12. M.Stupar, V.Leskovac. *Iugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta*, **18**, 269 (1982)
13. K.Schedel, M.Wells. *J. Biol. Chem.*, **248**, 8319 (1973)
14. T.F.Walseth, R.A.Johnson. *Biochim. Biophys. Acta*, **526**, 11 (1979)
15. Пат. 212391 ГДР (1984)
16. Пат. 0 577 255 А2 Европа (1994)
17. И.К.Духницкая. Дис. канд. биол. наук. ЛТИ им. Ленсовета, Ленинград, 1991
18. В.Н.Карамышев. Дис. канд. хим. наук. НИБХ СО РАН, Новосибирск, 1993
19. R.H.Symons. *Methods Enzymol.*, Part E, **29**, 102 (1974)
20. Р.Н.Маслова, М.Абдукаюмов, Ю.С.Скоблов. В кн. *И Всесоюз. совещ. по проблеме «Биологически активные соединения, меченные радиоактивными изотопами»*. Звенигород, 1985. (Тез. докл.). ИАЭ, Москва, 1985. С.55
21. М.П.Гришаев, М.Ю.Рукавишников, В.В.Самуков, А.Д.Аммосов, А.П.Портяков, В.Н.Сидоров. В кн. *И Всесоюз. совещ. по проблеме «Биологически активные соединения, меченные радиоактивными изотопами»*. Звенигород, 1985. (Тез. докл.). ИАЭ, Москва, 1985. С.56
22. Ch.K.Biebricher. *Anal. Biochem.*, **95**, 429 (1979)
23. R.Hurlbert, N.Furlong. *Methods Enzymol.*, Part A, **12**, 193 (1967)
24. R.A.Johnson, T.F.Walseth. In *Advances in Cyclic Nucleotide Research. V.10*. (Eds P.Greengard, G.A.Robison). Raven Press, New York, 1979. P.135
25. М.П.Гришаев, М.Ю.Рукавишников, В.В.Самуков, Ю.В.Туманов, А.Д.Аммосов, А.П.Портяко, В.Н.Сидоров. В кн. *И Всесоюз. совещ. по проблеме «Биологически активные соединения, меченные радиоактивными изотопами»*. Звенигород, 1985. (Тез. докл.). ИАЭ, Москва, 1985. С.56
26. М.Д.Франк-Камеицкая, Г.В.Книжникова, М.Ф.Мясоедов. *Биоорг. химия*, **10**, 515 (1984)
27. С.А.Феофанов. Дис. канд. хим. наук. НИБХ СО АН СССР, Новосибирск, 1985
28. В.А.Рихтер, И.В.Рабинов, С.А.Кузнецов, Т.Б.Павлий, Ю.С.Скоблов. *Прикл. биохимия и микробиология*, **24**, 310 (1988)
29. T.F.Walseth, P.S.T.Yuen, M.C.Moos, Jr. *Methods Enzymol.*, **195**, 29 (1991)

## SYNTHESIS OF NUCLEOSIDE 5'-TRIPHOSPHATES LABELED WITH RADIATION PHOSPHORUS ISOTOPES

**Yu.S.Skoblov, A.E.Korolev, R.N.Maslova**

*State Scientific Centre of Russian Federation, Physic Energetic Institute*

*1, Pl. Bondarenko, 249020 Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation*

*Isotopchim S.A.R.L. B.P.*

*16 04310 Ganagobie-Peryis, France, Fax 10(92)68-0813*

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences*

*32, Ul. Vavilova, 117984 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)135-1405*

The review deals with the analysis of chemical, chemical and enzymological, and enzymological methods of synthesis of nucleoside 5'-triphosphates labeled with phosphorus isotopes at  $\alpha$ - and  $\gamma$ -positions. As soon as enzymological methods are undoubtedly most favorable they are discussed more thoroughly. Enzymatic reactions involved in this synthesis are described in detail. The specificity and availability of enzymes are considered, and data on radiation stability of some of them are given.

Bibliography — 29 references.

*Received 3rd March 1995*