

聚苯乙烯基质 RNA 固相有机合成载体的制备与性能表征

梁洪^{1,2}, 李鹏^{1,2}, 张竞¹, 苏志国¹

(1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 将氨基衍生的聚苯乙烯载体与 3-氨基-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-1,2-丙二醇通过琥珀酸键连接, 成功制备了一种新型的通用型 RNA 固相有机合成载体. 载体有效载量达 61~92 $\mu\text{mol/g}$, 高于传统可控孔度玻璃(CPG)载体; 载体偶联效率大于 95%, 与 CPG 载体相似; RNA 产物合成后处理条件温和. 反相高效液相色谱显示自制载体合成产物与 CPG 载体合成产物具有同一性, 没有明显降解现象发生. 这种聚苯乙烯基质 RNA 固相有机合成载体由于其高载量、通用性及较好的合成性能等优点, 具有替代传统 CPG 载体的潜力.

关键词: 聚苯乙烯; RNA 固相有机合成; 固相载体

中图分类号: O632.13; Q520.3

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2009)04-0770-06

1 前言

自 Fire 等^[1]发现 RNA 干扰(Ribonucleic Acid Interference, RNAi)现象并因此获得 2006 年诺贝尔医学和生理学奖以来, 小分子干扰核酸(Small Interfering RNA, siRNA)作为一种潜在的基因药物, 迅速成为相关领域的研究热点. 固相有机合成是目前获得大量 siRNA 最主要的途径之一, 它是脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid, DNA)固相有机合成为基础, 在 RNA 固相载体上进行目标序列合成的一种方法^[2-4].

目前大多数 RNA 固相载体均是在可控孔度玻璃(Controlled Pore Glass, CPG)上连接目标 RNA 的起始核苷单体, 以提供 RNA 序列合成的活性位点^[3-5], 进行 RNA 序列的合成. 如 Sigma 公司的核酸合成系列载体就是将 CPG 与核苷单体通过琥珀酸键连接得到的, CPG 上核苷单体作为合成核酸序列的起始核苷单体. CPG 作为一种无机硅氧基载体, 具有表面易衍生、反应活性较高等优点, 但其表面富含羟基, 亲水性较强, 且羟基保护基在合成过程中易脱落^[6], 一定程度上影响了 RNA 的合成效率和质量. 聚苯乙烯(Polystyrene, PS)是一种性能优异的有机载体, McCollum 等^[7]利用甲基聚苯乙烯偶联核苷单体琥珀酸衍生物作为固相载体进行 DNA 的合成, 取得了较好的效果. 聚苯乙烯载体表面疏水, 经无水有机溶剂淋洗能彻底除去表面的残留水分, 减少水分对 RNA 合成的干扰, 其表面氨基衍生后活性位点相对较少, RNA 合成过程中不易产生错误序列, 产物纯度较高, 因此, 更适合 RNA 的固相合成.

固相载体与起始核苷单体间需通过间臂偶联, 除琥

珀酸键外, 还有一些化学间臂也能用于连接载体和起始核苷单体, 如 Alul 等^[8]和 Pon 等^[9]分别采用乙二酰键和对苯二酚-O,O'-乙酰乙酸键作为连接间臂, 得到了不同的 CPG 固相有机合成载体. 这些传统化学间臂制备的载体根据连接的起始核苷单体(A, U, C, G)分为不同种类, 要满足不同序列的合成要求, 需准备 4 种固相载体, 增加了实验成本和工作量. 针对这一问题, Lyttle 等^[10]开发了一种以 CPG 为基质的通用载体, 它仅提供核酸合成的活性位点(羟基)而不连接起始核苷单体, 能满足不同核酸序列合成的需要, 解决了固相载体分类问题. Azhayev 等^[11]通过在 CPG 上连接 3-氨基-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-1,2-丙二醇间臂, 得到了可用于 DNA 合成的通用载体. Nelson 等^[12]开发了一种名为 RainbowTM 的通用 CPG 载体, 合成性能也相当优异.

本工作将聚苯乙烯载体的优良特性与 Azhayev 等^[11]在 DNA 合成中使用的间臂的通用性相结合, 将氨基衍生的聚苯乙烯载体取代 CPG 作为基质, 与 3-氨基-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-1,2-丙二醇间臂通过琥珀酸键连接, 得到一种新型的通用型 RNA 固相有机合成载体, 并对合成过程和载体性能进行研究.

2 实验

2.1 试剂及仪器

试剂: 聚苯乙烯载体(1.5%二乙烯基苯交联, 粒径 80~120 μm , 无孔)由本实验室工程中心提供, N-氯甲基邻苯二甲酰亚胺、3-氨基-1,2-丙二醇、4,4'-二甲氧三苯甲基氯(4,4'-Dimethoxytritylchloride, DMT-Cl)和 N-甲基咪唑(1-Methylimidazole, NMI)均为分析纯, Alfa Aesar

公司; 三氯化铁(化学纯)、85%水合肼溶液(分析纯)、琥珀酸酐(化学纯)均购自国药集团化学试剂公司; N,N'-二环己基碳二亚胺(Dicyclohexylcarbodiimide, DCC), 分析纯, J&K 百灵威公司; 1-羟基苯并三唑(1-Hydroxybenzotriazole, HoBt), 分析纯, 上海吉尔生化有限公司; 二苯甲酮, 化学纯, 北京化学试剂公司; 三氟乙酸甲酯, 工业品(纯度>99%), 杭州宝凯生物化学有限公司; RNA 化学合成单体及 CPG 载体购自 Sigma Aldrich 公司, 其余试剂均为分析纯, 购自北京化工厂。

仪器设备: 茄形瓶(100 mL, 北京科普佳化学试剂公司), 85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司), 傅里叶变换红外光谱仪(日本 JASCO 公司), Waters2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Ultrospec 2100 Pro 紫外分光光度计(美国 GE 公司), Zorbax SB-C18 反相色谱柱(美国 Agilent 公司), LCQ Deca^{XP} 电喷雾质谱仪(美国 Thermo Election 公司)。

2.2 聚苯乙烯基质 RNA 固相有机合成载体的制备

2.2.1 氨甲基聚苯乙烯载体的合成

将 1.0 g 聚苯乙烯载体、1.1 mmol N-氯甲基邻苯二甲酰亚胺、12 mL 二氯甲烷加入茄形瓶中, 搅拌 15 min, 加入 0.6 mL 0.6 mol/L 三氯化铁-二苯甲酮的二氯甲烷溶液作催化剂, 45 °C 搅拌反应 6 h。反应结束后, 分别用 0.1 mol/L 盐酸的 N,N'-二甲基甲酰胺溶液(3×10 mL)、N,N'-二甲基甲酰胺(3×10 mL)、二氯甲烷(5×10 mL)、甲醇(2×10 mL)淋洗载体, 真空干燥 2 h。干燥后的载体加入 20 mL 5% 肼的乙醇溶液中, 回流反应 5 h, 然后用乙醇(3×10 mL)、甲醇(3×10 mL)淋洗, 真空干燥得氨甲基聚苯乙烯载体。水杨醛法测载体氨基载量^[13]。反应方程式如图 1 所示。

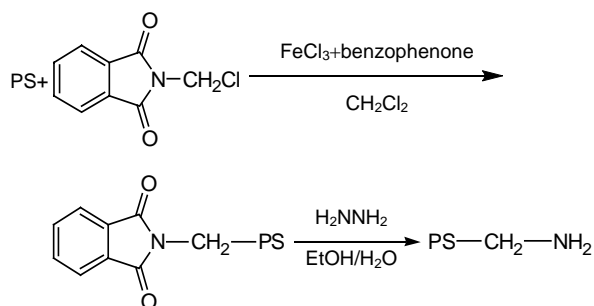


图1 氨甲基聚苯乙烯载体的合成
Fig.1 Synthesis of aminomethyl-polystyrene support

2.2.2 3-氨基-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-1,2-丙二醇间臂的合成

30 mmol 3-氨基-1,2-丙二醇加入 30 mL 三氟乙酸甲酯中, 室温搅拌反应 12 h, 反应结束后蒸馏除去三氟乙

酸甲酯, 剩余产物加入 100 mL 甲苯, 回流除水, 得无色油状产物 3-三氟乙酰胺-1,2-丙二醇。5 mmol 3-三氟乙酰胺-1,2-丙二醇加入 20 mL 无水吡啶中, 搅拌同时加入 5 mmol DMT-Cl, 室温搅拌反应 12 h 后, 加入 2 mL 甲醇终止反应。蒸馏除去溶剂, 剩余物加入 50 mL 乙酸乙酯中, 依次用饱和碳酸氢钠溶液(3×30 mL)和纯水(2×30 mL)洗涤乙酸乙酯, 收集有机相, 加入 10 g 无水硫酸钠搅拌 2 h 除水, 然后过滤除去硫酸钠, 蒸发除去乙酸乙酯, 得淡黄色油状产物。产物用硅胶柱色谱纯化, 0.1% 吡啶和 0~2% 甲醇的二氯甲烷溶液为流动相进行阶梯洗脱, 得淡黄色油状产物 3-三氟乙酰胺-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-1,2-丙二醇。2.5 g 3-三氟乙酰胺-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-1,2-丙二醇加入 75 mL 9 mol/L 氨的甲醇溶液中, 室温搅拌反应过夜, 蒸干得无色油状产物 3-氨基-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-1,2-丙二醇, 直接用于载体制备。反应方程式如图 2 所示。

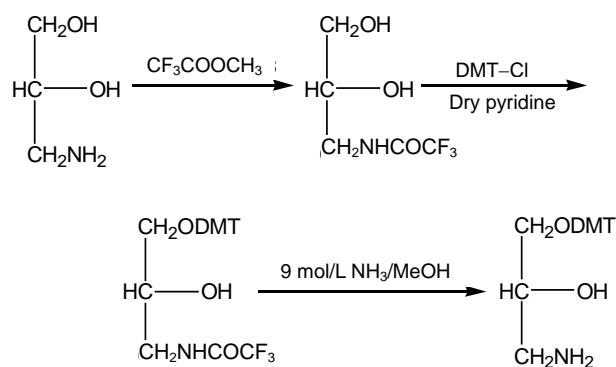


图2 3-氨基-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-1,2-丙二醇间臂的合成
Fig.2 Synthesis of 3-amino-1-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-1,2-propanediol linker

2.2.3 氨甲基聚苯乙烯载体与间臂的偶联

称取 1.0 g 氨甲基聚苯乙烯载体, 0.75 g 琥珀酸酐, 加入 5 mL 吡啶、0.8 mL N-甲基咪唑、4.2 mL 四氢呋喃(Tetrahydrofuran, THF)的混合溶液, 室温振荡过夜。反应后的载体分别用 5 mL 吡啶和 5 mL 四氢呋喃淋洗, 得到琥珀酰胺甲基聚苯乙烯载体。载体悬浮于 0.8 mL N-甲基咪唑、0.5 mL 乙酸酐、0.5 mL 2,6-二甲基吡啶和 8.2 mL 四氢呋喃的混合液中, 室温振荡反应 45 min。分别用 5 mL 四氢呋喃、5 mL 吡啶、10 mL 乙腈淋洗, 真空干燥 2 h, 与 2.5 mmol 3-氨基-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-1,2-丙二醇、3 mmol 1-羟基苯并三唑、3 mmol N,N'-二环己基碳二亚胺、7.5 mL 吡啶混合, 20 °C 振荡反应过夜。收集的载体用 5 mL 乙腈淋洗后, 悬浮于 1 mL 三乙胺、1 mL 水、3 mL 乙腈的混合溶液中, 室温振荡反应 45 min 后, 用 10 mL 乙腈淋洗, 真空干燥 2 h。0.42 g 干燥后的

载体悬浮于 6 mL 2,6-二甲基吡啶和 7 mL 四氢呋喃的混合溶液中, 加入甲酸和乙酸酐混合溶液(体积比 2:3, 加 3 次, 每次 0.5 mL, 间隔 1h)进行甲酰化, 室温振荡反应过夜. 用 10 mL 乙腈淋洗载体, 真空干燥 2 h, 得目

标产物聚苯乙烯基质 RNA 固相有机合成载体, 分光光度法检测 4,4'-二甲氧三苯甲基(DMT)载量^[14]. 反应方程式如图 3 所示.

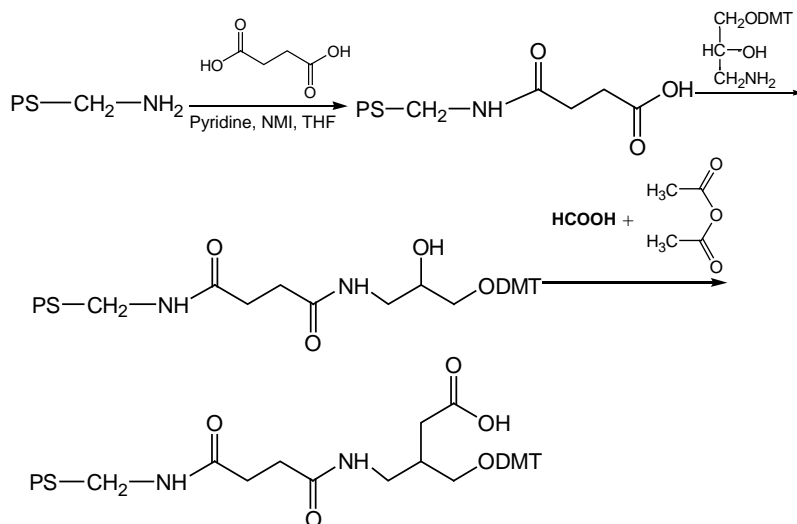


图 3 氨基聚苯乙烯载体与间臂的连接

Fig.3 Attachment of aminomethyl-polystyrene support and linker

2.3 载体合成性能的检测

在与文献[4]相同的实验条件下, 分别以自制载体与购自 Sigma 公司的 rA-CPG 载体(载量为 35 $\mu\text{mol/g}$)为固相有机合成载体, 合成核酸序列 5'-AGCUA-3'. CPG 载体合成产物后处理方法与文献[4]相同, 自制载体合成产物后处理方法为: 加入 2 mol/L 氨的甲醇溶液, 20 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 将产物从载体上切割, 加入 32% (ω) 氨水, 55 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 h 脱除保护基. 所得产物溶解于 20% 乙腈水溶液中, 进行反相高效液相色谱(RP-HPLC)检测, 检测条件: Waters2695 型高效液相色谱仪, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C18 反相色谱柱(2.1 mm \times 1.5 mm, 5 μm), 流动相为 2%~15% 乙腈的磷酸缓冲溶液(0.05 mol/L, pH 7.0), 梯度洗脱, 运行时间 30 min, 柱温 45 $^{\circ}\text{C}$, 流速 0.5 mL/min, 检测波长 265 nm.

3 结果与讨论

3.1 聚苯乙烯载体氨基化过程中红外谱图的变化

图 4 为聚苯乙烯载体氨基化过程中聚苯乙烯载体、邻苯二甲酰亚胺甲基聚苯乙烯载体、氨基聚苯乙烯载体的红外光谱图. 从图可以看出, 氨基化过程中聚苯乙烯载体红外吸收发生明显变化. 聚苯乙烯载体与 N-氯甲基邻苯二甲酰亚胺反应后生成的邻苯二甲酰亚胺甲基聚苯乙烯载体在 1771(环酐的 C=O 伸缩振动峰)和 1720 cm^{-1} 处(酰亚胺的伸缩振动峰)产生新的吸收峰,

这说明聚苯乙烯载体经过第一步反应后连接上了环酐酰亚胺结构, 与反应方程式符合. 腈解反应后邻苯二甲酰亚胺结构从载体上脱除, 得到氨基衍生聚苯乙烯载体, 其 FT-IR 谱图中这两处吸收峰也相应消失.

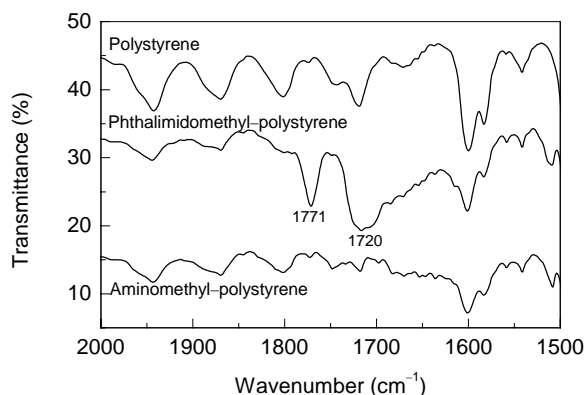


图 4 聚苯乙烯载体、邻苯二甲酰亚胺甲基聚苯乙烯载体、氨基聚苯乙烯载体的红外谱图

Fig.4 FT-IR spectra of polystyrene support, phthalimidomethyl-polystyrene support and aminomethyl-polystyrene support

3.2 反应条件对载体氨基载量的影响

3.2.1 反应时间对载体氨基载量的影响

1 g 载体加入 1.1 mmol N-氯甲基邻苯二甲酰亚胺, 0.6 mL 催化剂, 反应温度 45 $^{\circ}\text{C}$, 考察不同反应时间对载体氨基载量的影响, 结果如图 5 所示. 0~6 h 内, 随反应时间延长, 载体载量显著增加, 但 6 h 后再延长反应

时间, 载量增加不明显, 且反应时间延长增加了载体对催化剂中 FeCl_3 的吸附, 使载体变为深褐色, 过多的 FeCl_3 在淋洗中难以完全除去, 因此 6 h 为较适反应时间, 既能保证氨基载量较高, 又不影响载体的品质。

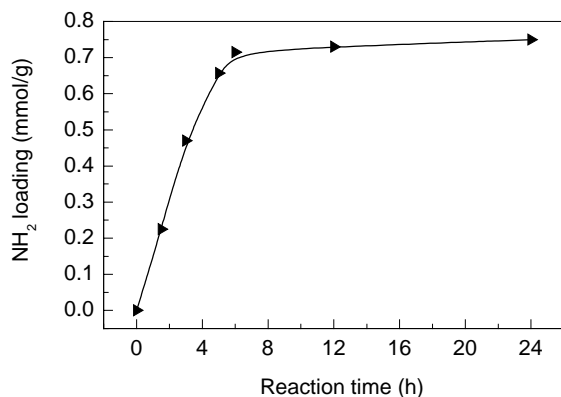


图5 反应时间对氨基载量的影响

Fig.5 Effect of reaction time on loading of amino group

3.2.2 反应温度对载体氨基载量的影响

1 g 载体加入 1.1 mmol N-氯甲基邻苯二甲酰亚胺, 0.6 mL 催化剂, 反应 6 h, 考察不同反应温度对载体氨基载量的影响, 结果如表 1 所示. 反应温度从 25 °C 升高到 45 °C, 氨基载量提高约 10%, 再升高 20 °C 载量仅提高 3%, 反应温度从 65 °C 提高至 85 °C 时载量已基本不变. 反应温度升高能增加反应物碰撞几率, 提高反应效率, 从而提高氨基载量, 但当反应已达到最大转化率时, 再升高温度对氨基载量影响变小. 考虑到温度增加会相应

增加能耗, 提高载体成本, 选择 45 °C 为反应温度。

表 1 反应温度对氨基载量的影响
Table 1 Effect of reaction temperature on loading of amino group

Reaction	Temperature (°C)	NH ₂ loading (mmol/g)
1	25	0.646
2	45	0.715
3	65	0.74
4	85	0.745

3.2.3 其他反应条件对载体氨基载量的影响

考察了催化剂用量和 N-氯甲基邻苯二甲酰亚胺用量对载体氨基载量的影响. 催化剂用量对载体载量的影响较小, 但催化剂用量增加会增加载体对 FeCl_3 的吸附, 故催化剂用量不宜太大, 0.6 mL 即能保证较好的催化效率. 增加 N-氯甲基邻苯二甲酰亚胺用量可提高载体的氨基载量, 这对制备更高载量的氨基载体有意义, 但 N-氯甲基邻苯二甲酰亚胺的转化率有所下降, 且改善其他反应条件也很难达到低投料比下的转化率, 这对反应不经济. 特别对于本实验, 1.1 mmol/g 的 N-氯甲基邻苯二甲酰亚胺用量所得氨基载体已能满足后续反应需求. 因此, 确定本反应最适催化剂用量为 0.6 mL/g, N-氯甲基邻苯二甲酰亚胺用量为 1.1 mmol/g.

3.3 3-氨基-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-1,2-丙二醇间臂合成过程中产物鉴定

间臂合成过程中采用 IR 和 ESI MS 对每步反应的产物进行检测, 以确定反应结果的正确性, 检测数据如表 2 所示.

表 2 化合物的红外光谱和 ESI MS 数据
Table 2 FT-IR (KBr) and ESI MS data of compounds

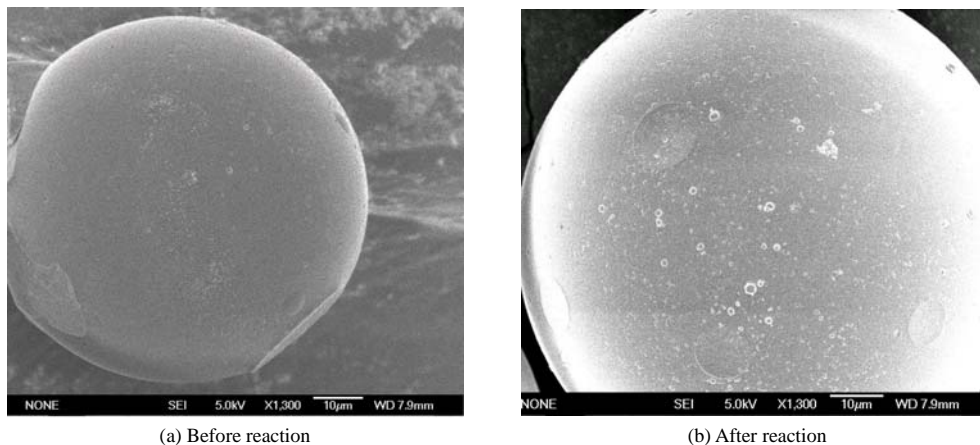
Compound	FT-IR, $\nu(\text{cm}^{-1})$	ESI MS analysis	Expected mass
3-Trifluoroacetamido-1,2-propanediol	3380(ν_{OH}), 3108(ν_{NH}), 2945(ν_{CH}), 1715($\nu_{\text{C=O}}$), 1568(δ_{NH}), 1350($\nu_{\text{C-N}}$), 1209($\nu_{\text{C-O}}$), 1150($\nu_{\text{C-F}}$)	187.2	187.0
3-Trifluoroacetamido-1-DMT-1,2-propanediol	3460(ν_{OH}), 3060(ν_{NH}), 1722($\nu_{\text{C=O}}$), 1608($\nu_{\text{C=C}}$), 1580(δ_{NH}), 1412($\nu_{\text{C-N}}$), 1250($\nu_{\text{C-O}}$), 1173($\nu_{\text{C-F}}$)	489.1	489.2
3-Amino-1-DMT-1,2-propanediol	3407(ν_{OH}), 3055(ν_{NH}), 2934(ν_{CH}), 1520($\nu_{\text{C=C}}$), 1400($\nu_{\text{C-N}}$), 1210($\nu_{\text{C-O}}$)	393.2	393.2

从表 2 可见, 由 FT-IR 谱图吸收峰与特定官能团的对应和 ESI MS 进行分子量检测可确定, 反应过程的中间产物 3-三氟乙酰胺-1,2-丙二醇、3-三氟乙酰胺-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-1,2-丙二醇, 终产物 3-氨基-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-1,2-丙二醇的检测数据与目标产物符合。

3.4 聚苯乙烯基质 RNA 固相有机合成载体 DMT 载量检测

使用粒径 80~120 μm 、氨基载量为 0.715 mmol/g 的聚苯乙烯载体, 与 3-氨基-1-(DMT)-1,2-丙二醇间臂通过琥珀酸键连接, 得到聚苯乙烯基质 RNA 固相有机合成载体, 其电镜照片如图 6 所示, 从图可以看出, 反应前后聚苯乙烯载体表面没有发生明显的结构改变. 分光光

度法检测载体的 DMT 载量为 123 $\mu\text{mol/g}$, 即在 RNA 合成时, 载体在脱除 DMT 保护基团后, 能提供 RNA 序列衍生的活性羟基位点为 123 $\mu\text{mol/g}$. 本载体在合成过程中会产生副产物, 副产物在后处理后依然连接在载体上, 不会影响产物的纯度. 根据目标 RNA 序列的长度不同, 产物产率约为 50%~75%^[11], 故实际有效载量约为 61~92 $\mu\text{mol/g}$, 比商业 CPG 载体(载量约为 35 $\mu\text{mol/g}$)有明显优势, 聚苯乙烯表面的疏水性也保证了在载量较高的情况下仍然能得到高质量的 RNA 产物. 此外, 自制载体由于能满足不同 RNA 序列合成的要求, 比商业载体具有较大的优势。



(a) Before reaction

(b) After reaction

图6 聚苯乙烯载体反应前后的扫描电镜照片

Fig.6 SEM images of polystyrene support before and after reaction

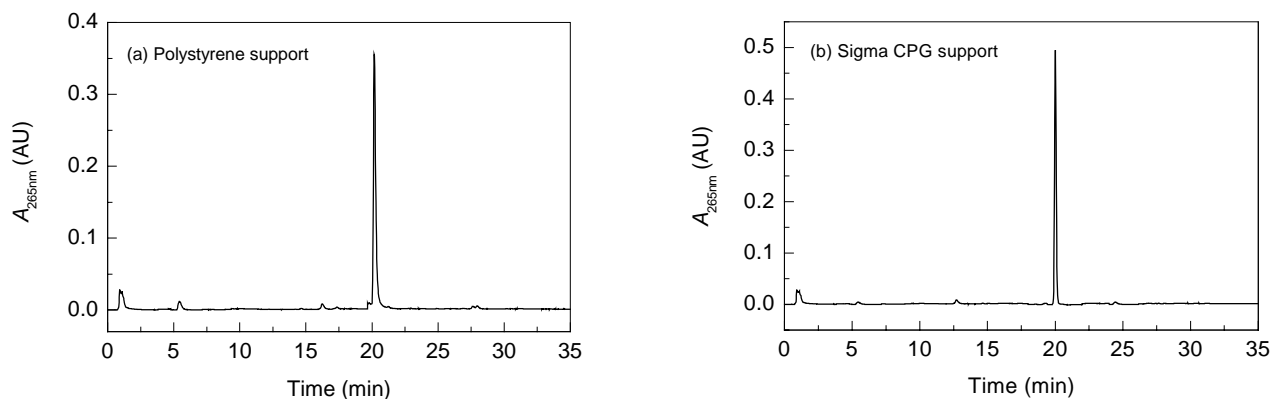


图7 自制聚苯乙烯载体与 Sigma 公司 CPG 载体合成 5'-AGCUA-3' 的高效液相色谱谱结果

Fig.7 RP-HPLC analysis of 5'-AGCUA-3' synthesized on polystyrene support and CPG support

3.5 自制载体与商业载体合成性能比较

利用自制载体与商业载体分别合成核苷酸序列 5'-AGCUA-3'。合成过程中通过分光光度法对 DMT 浓度检测可知,商业载体和自制载体每步偶联效率相似,均高于 95%。产物脱保护后进行 RP-HPLC 分析,结果如图 7 所示。从图可以看出,自制的聚苯乙烯固相载体合成的 RNA 产物与 Sigma 公司的 CPG 载体产物在相同条件下主峰出峰时间相同,产物具有同一性,且自制载体产物液相色谱图中没有明显的杂质峰(1.0 min 峰为后处理残留溶剂峰),说明产物未发生明显的降解,合成过程中错误序列等副产物较少,载体合成性能较好。

4 结论

(1) 将氨基衍生的聚苯乙烯载体与 3-氨基-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-1,2-丙二醇间臂通过琥珀酸键连接,制备了一种新型的通用型 RNA 固相有机合成载体,能满足不同 RNA 序列的合成需求,载体合成条件温和,有

效载量达 61~92 $\mu\text{mol/g}$,明显高于传统 CPG 载体的载量。

(2) 采用自制载体合成 RNA 时,产物后处理条件为: 2 mol/L 氨的甲醇溶液, 20 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 32%(w)氨水溶液, 55 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 h。载体偶联效率大于 95%,与 CPG 载体相似,产物与 CPG 载体合成的同序列产物具有同一性。

(3) 所制聚苯乙烯基质 RNA 固相有机合成载体由于其高载量、通用性及较好的合成性能等优点,具有替代传统 CPG 载体的潜力。

参考文献:

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and Specific Genetic Interference Mediated by Double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.
- [2] Marshall W S, Kaiser R J. Recent Advances in the High-speed Solid Phase Synthesis of RNA [J]. Curr. Opin. Chem. Biol., 2004, 8(3): 222-229.
- [3] Usman N, Ogilvie K, Jiang M. Automated Chemical Synthesis of Long Oligonucleotides Using 2'-O-Silylated Ribonucleoside

- 3'-O-Phosphoramidites on a Controlled-pore Glass Support: Synthesis of a 43-Nucleotide Sequence Similar to the 3'-Half Molecule of an *Escherichia coli* Formylmethionine tRNA [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109(25): 7845–7854.
- [4] Wincott F, DiRenzo A, Shaffer C, et al. Synthesis, Deprotection, Analysis and Purification of RNA and Ribosomes [J]. *Nucl. Acids Res.*, 1995, 23(14): 2677–2684.
- [5] Pon R T, Yu S. Linker Phosphoramidite Reagents for Oligonucleotide Synthesis on Underivatized Solid-phase Supports [J]. *Tetrahedron Lett.*, 2001, 42(51): 8943–8946.
- [6] Pon R T, Usman N, Ogilvie K K. Derivatization of Controlled Pore Glass Beads for Solid Phase Oligonucleotide Synthesis [J]. *Biotechniques*, 1988, 6(8): 768–775
- [7] McCollum C, Andrus A. An Optimized Polystyrene Support for Rapid, Efficient Oligonucleotide Synthesis [J]. *Tetrahedron Lett.*, 1991, 32(33): 4069–4072.
- [8] Alul R H, Singman C N, Zhang G, et al. Oxalyl-CPG: A Labile Support for Synthesis of Sensitive Oligonucleotide Derivatives [J]. *Nucl. Acids Res.*, 1991, 19(7): 1527–1532.
- [9] Pon R T, Yu S. Hydroquinone-O,O'-diacetic Acid ('Q-linker') as a Replacement for Succinyl and Oxalyl Linker Arms in Solid Phase Oligonucleotide Synthesis [J]. *Nucl. Acids Res.*, 1997, 25(18): 3629–3635.
- [10] Lyttle M H, Hudson D, Cook R M. A New Universal Linker for Solid Phase DNA Synthesis [J]. *Nucl. Acids Res.*, 1996, 24(14): 2793–2798.
- [11] Azhayev A V, Antopolsky M L. Amide Group Assisted 3'-Dephosphorylation of Oligonucleotides Synthesized on Universal A-supports [J]. *Tetrahedron*, 2001, 57(23): 4977–4986.
- [12] Nelson P S, Muthini S, Vierra M, et al. Rainbow Universal CPG: A Versatile Solid Support for Oligonucleotide Synthesis [J]. *Biotechniques*, 1997, 22(4): 752–756.
- [13] 邹永水, 钱肖贞. 固相上氨基酸与多肽氨基的测定 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1978, 5(4): 12–14.
- [14] 金冬雁, 金奇, 侯匀德. 核酸和蛋白质的化学合成与序列分析 [M]. 北京: 科学出版社, 1996. 12–13.

Preparation and Characterization of Polystyrene Support for Solid Phase Organic Synthesis of RNA

LIANG Hong^{1,2}, LI Peng^{1,2}, ZHANG Jing¹, SU Zhi-guo¹

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Science, Beijing 100190, China;
2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A new universal polystyrene support for solid phase organic synthesis of ribonucleic acid (RNA) was prepared efficiently through the attachment of 3-amino-1-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-1,2-propanediol linker and aminomethyl-polystyrene support via succinic anhydride. The synthetic efficiencies of the new support and traditional controlled pore glass (CPG) support were almost at the same level. The loading of activating site of the new support was 61~92 $\mu\text{mol/g}$, which was much higher than that of the latter. Moreover, the new support could be used as a universal support to synthesize any sequence RNA. The condition of cleavage and deprotection of the product was very mild. RP-HPLC analysis showed that the product synthesized on universal polystyrene support and CPG support was identical, and no degradation was found. This universal solid support may replace conventional CPG support.

Key words: polystyrene; solid phase organic synthesis of RNA; solid phase support