

硫代修饰-反义寡核苷酸合成

赛百盛可以为客户提供在定制寡核苷酸中加入硫代磷酸酯键的服务。这种修饰很有趣，因为它不是添加某种化学物质，比如非常规的碱基或淬灭剂，而是一种特殊的碱基之间的键。在自然界中，标准的 DNA 骨架上碱基之间是磷酸二酯键，这个寡核苷酸骨架上的键可以被改为硫代磷酸酯键（图 1）。

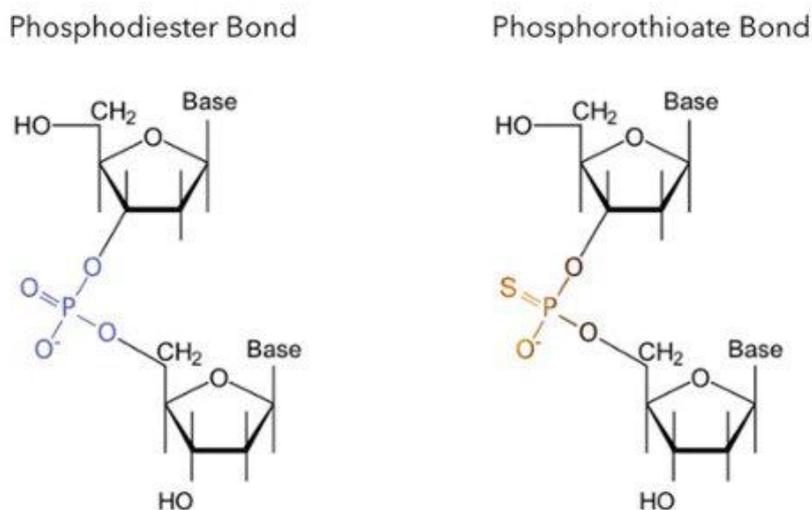


图 1 - 左图是一个标准的寡核苷酸磷酸二酯键连接图，两个五碳糖是通过磷酸键形成典型的寡核苷酸骨架。右图中可以看到硫代磷酸酯键，其中硫原子取代了寡核苷酸中碱基之间的磷酸酯键中的一个氧原子。

寡核苷酸的硫代修饰是将原有磷酸键中一个非桥连的氧原子用硫原子来置换。这种置换实际上改变了寡核苷酸的整体化学性质，使其更适用于一些分子和细胞生物学的研究。其中特别的一点是，加入硫代磷酸酯键后寡核苷酸的稳定性更好，能抵抗核酸酶的降解，因此有效地增强了寡核苷酸在细胞环境中的半衰期。这使得这种修饰的键在产生反义寡核苷酸方面非常有用，当反义寡核苷酸被引入细胞或生物基质中时，可以与靶核酸相互作用以沉默特定转录物的表达。含有硫代磷酸酯键的寡核苷酸通过直接阻断翻译过程或通过 RNA 酶 H 介导的机制实现靶转录物的酶促降解来实现这一功能。

尽管这些特殊键赋予针对无差别核酸酶消化的稳定性，但这些键的重复引入也可能对它们作为反义寡核苷酸的功能产生限制。引入寡核苷酸的每个硫代磷酸酯键在每个键处产生“Sp”或“Rp”构性的手性中心。这最终导致合成期间会产生寡核苷酸的多种异构体。这些单独的异构体已被证实会具有不同的特征和功能特性。幸运的是，通过仔细定位修饰或通过硫代磷酸酯键一起使用额外的修饰，可以减轻反义寡核苷酸上的大部分异构体效应；显著减少对非外消旋混合物的忧虑。

基本上，设计使用硫代磷酸酯键的寡核苷酸可能需要大量的试验和误差才能达到预期的结果，因为修饰的键合效应是难以预测的。但是，我们对这些寡核苷酸有一些一般性建议，应在设计过程中予以考虑。对于需要对核酸外切酶作用进行保护的寡核苷酸，需要在寡核苷

酸的 5'和 3'末端附近加入硫代磷酸酯键。但是，如果针对的是核酸内切酶，建议将这些键包含在整个寡核苷酸序列中。无论在哪种情况下，重要的是要认识到，硫代磷酸酯键修饰不应该被用于寡核苷酸中的每个可用位置。相反，应谨慎使用它们，并仔细考虑每个键可能对上述手性问题产生影响的因素，也因为此键对寡核苷酸杂交动力学具有轻微的不稳定作用。增加寡核苷酸中硫代磷酸酯键的数量往往会降低寡核苷酸对其预期靶标的解链温度（ T_m ）。因此，在设计这些寡核苷酸时，考虑所需的核酸酶抗性是必须仔细平衡其对靶序列进行有效和特异性杂交的需要。

参考文献:

1. **Effect of deoxynucleoside phosphorothioates incorporated in DNA on cleavage by restriction enzymes.** Vosberg, H. P., and F. Eckstein. *Journal of Biological Chemistry* 257.11 (1982): 6595-6599.
2. *Antisense research and applications.* Crooke, Stanley T., and Bernard Lebleu. CRC Press, 1993.
3. **Antisense technologies.** Kurreck, Jens. *European Journal of Biochemistry* 270.8 (2003): 1628-1644.
4. **Bond order and charge localization in nucleoside phosphorothioates.** Frey, Perry A., and R. Douglas Sammons. *Science* 228.4699 (1985): 541-545.
5. **Stability of Stereoregular Oligo (nucleoside Phosphorothioate) s in Human Plasma: Diastereoselectivity of Plasma 3' -Exonuclease.** Koziolkiewicz, Maria, et al. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 7.1 (1997): 43-48.
6. **Stereodifferentiation—the effect of P chirality of oligo (nucleoside phosphorothioates) on the activity of bacterial RNase H.** Koziolkiewicz, Maria, et al. *Nucleic acids research* 23.24 (1995): 5000-5005.
7. **Synthesis, biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages.** Wan, W. Brad, et al. *Nucleic acids research* (2014): gku1115. doi: 10.1093/nar/gku1115.
8. **Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application.** Chan, Jasmine HP, Shuhui Lim, and W. S. Wong. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 33.5 - 6 (2006): 533-540.