



УДК 547.962.321 : 543.544.6

АНАЛИЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ И НУКЛЕОЗИДПОЛИФОСФАТОВ НА ГОМОГЕННОСТЬ

Демушкин В. П., Пляшкевич Ю. Г., Шалина Н. М.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Разработаны оптимальные условия анализа гомогенности олигонуклеотидов и нуклеозидполифосфатов микроколоночной хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе в 7М мочеvine при рН 7,0 и 60°. Показано, что профиль хроматографии зависит от сорта ДЕАЕ-целлюлозы, формы градиента элюирующего раствора, температуры и скорости хроматографии.

Анализ олигонуклеотидов и нуклеозидполифосфатов на гомогенность необходим при химическом синтезе олигонуклеотидов, анализе структуры фрагментов нуклеиновых кислот и при исследовании биохимических реакций. Используемые для анализа методы БХ [1, 2], ТСХ [3, 4], электрофореза [5, 6] и ионообменной хроматографии [7—9] требуют либо значительных затрат времени, либо больших количеств вещества. Для сокращения времени анализа и уменьшения количества вещества весьма перспективна микроколоночная хроматография [10]. В данной работе изложены результаты подбора оптимальных условий анализа олигонуклеотидов и нуклеозидполифосфатов с использованием микроколоночной хроматографии.

Для колоночной хроматографии веществ весьма существенными факторами являются качество материала набивки колонки и условия хроматографии. При разделении природных и синтетических олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот широкое распространение получила хроматография на ДЕАЕ-целлюлозе [11]. Этот сорбент обладает малой необратимой сорбцией нуклеотидного материала и хорошей разрешающей способностью, поэтому и был использован для хроматографического анализа. Для уменьшения неионных взаимодействий разделяемых веществ с материалом набивки колонки хроматографию проводили в растворе 7 М мочеvine по Генеру и соавт. [12]. Элюцию осуществляли ступенчатым градиентом концентрации.

При испытании различных сортов ДЕАЕ-целлюлозы оказалось (рис. 1), что разрешающая способность колонки зависит от марки сорбента. Наилучшее разделение наблюдается при хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе фирмы «Reanal» (рис. 1, а, б), и при этом оно не зависит от партии сорбента. Другие типы целлюлоз менее эффективны.

Для подбора оптимальных условий разделения длинных олигонуклеотидов исследовали хроматографию РНКазного гидролизата poly(A₉, U) при различных температурах. Как видно из рис. 2, коэффициент разре-

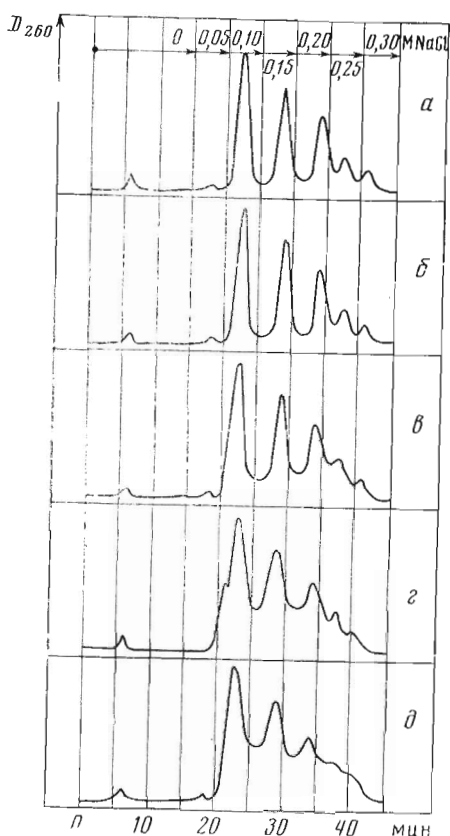


Рис. 1

Рис. 1. Хроматография 0,05 ОЕ (260 нм) РНКазного гидролизата тРНК на различных типах ДЕАЕ-целлюлоз, скорость элюирования 660 мкл/ч: а — ДЕАЕ-целлюлоза фирмы «Reanal», партия № 71093591, б — партия № 70124636, в — ДЕАЕ-целлюлоза «Олайн», г — ДЕАЕ-целлюлоза фирмы «Serva», д — DE-32

Рис. 2. Зависимость степени разрешения R_s для олигонуклеотидов РНКазного гидролизата poly(A₉,U) от температуры при хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе фирмы «Reanal». На анализ взято 0,1 ОЕ (260 нм) гидролизата, скорость элюции 170 мкл/ч. 1 — для моно- и динуклеотидов, 2 — для ди- и три-нуклеотидов и т. д.

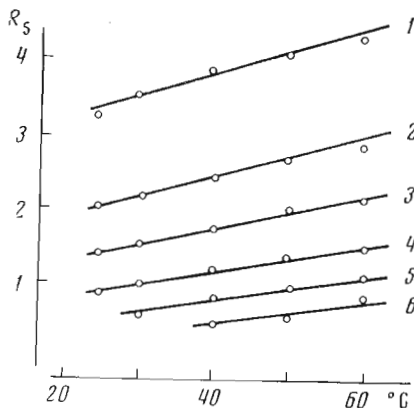


Рис. 2

шения $R_s = 2\Delta t/w_1 + w_2$, где Δt — разница во временах удерживания для веществ, имеющих ширины пиков w_1 и w_2 , увеличивается при увеличении температуры, при которой проводят разделение. Поскольку при температурах выше 65° часто наблюдается образование в колонке микропузырьков газа, хроматографию целесообразно проводить при 60° . Эта температура вполне достаточна для хорошего разделения довольно длинных олигонуклеотидов (см. далее).

Степень разрешения фракций зависит также от состава элюирующего буфера. Наилучшее разделение олигонуклеотидов наблюдается при использовании фосфата натрия при pH 7,0. Менее эффективно использование NaCl. Худшие результаты получаются при элюировании растворами NaOAc и LiCl.

Существенным фактором разрешения фракций олигонуклеотидов оказалась и скорость хроматографии. Как видно из рис. 3, разделение олигонуклеотидов, имеющих заряд ≥ -8 с R_s больше 1, наблюдается при довольно малых линейных скоростях тока раствора через колонку. Для коротких олигонуклеотидов хорошее разрешение наблюдается и при более высоких скоростях. Поэтому анализ гомогенности олигонуклеотида в зависимости от его длины необходимо проводить за то время, которое для данного олигонуклеотида является оптимальным. Хроматографическая система в целом (ДЕАЕ-целлюлоза «Reanal», фосфат натрия и 60°) обладает хорошей разрешающей способностью и позволяет определять примеси в олигонуклеотиде, отличающиеся от анализируемого вещества количеством фосфатных групп. Анализ синтетических дезоксирибо-

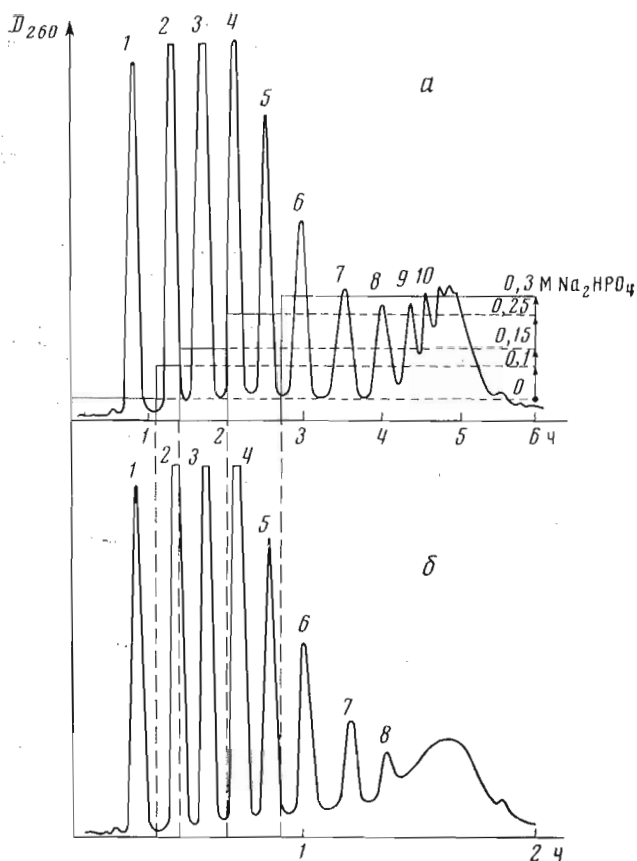


Рис. 3. Хроматография 0,1 ОЕ (260 нм) олигонуклеотидов РНКазного гидролизата poly(A₉,U) на DEAE-целлюлозе фирмы «Reanal» при различных скоростях элюции: а — 82 мкл/ч; б — 330 мкл/ч при 60°; 1 — мононуклеотид, 2 — динуклеотид, 3 — тринуклеотид и т. д.

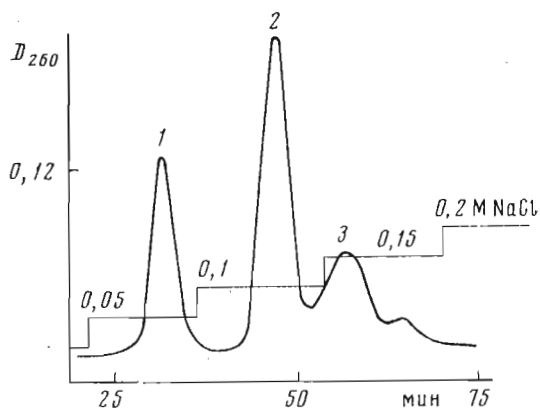


Рис. 4. Хроматография GTP на DEAE-целлюлозе фирмы «Reanal» при 60°, скорость элюции 660 мкл/ч: 1 — нуклеозидмонофосфат, 2 — нуклеозиддифосфат, 3 — нуклеозидтрифосфат

Основное вещество		Примеси, содержание, %		
Нуклеозидтрифосфат	Содержание, %	нуклеозиддифосфат	нуклеозидмонофосфат	неидентифицированное вещество
АТР	94,8±0,8*	5,1±0,3	0,5	—
ГТР	22,6±0,4	49±0,5	24,3±0,6	3,9±0,3
СТР	43±0,8	41±0,6	9,2±0,2	6,4±0,2
УТР	78,3±0,7	18,4±0,3	3,1±0,2	0,5

* Ошибки относительные.

нуклеотидов показал, что их хроматографическое поведение не отличается от поведения рибоолигонуклеотидов, т. е. система анализа универсальна.

Для нуклеозидполифосфатов, имеющих суммарный заряд в условиях разделения ≤ -4 , а в качестве возможных примесей нуклеозиддифосфаты (заряд -3), нуклеозидмонофосфаты (заряд -2) и нуклеозиды (заряд 0), хорошее разрешение наблюдается при скорости разделения 300 мкл/ч даже при элюции NaCl. На рис. 4 приведен в качестве примера анализ гомогенности гуанозинтрифосфата. Анализ других нуклеозидтрифосфатов фирмы «Reanal», проведенный в аналогичных условиях, показал, что препараты содержат 25—95% основного вещества (см. таблицу). Количественные данные получены расчетом площадей пиков по формуле $S = hw$, где h — высота пика, а w — ширина пика на полувысоте. Обработка результатов проведена стандартными методами [13].

Таким образом, на основе ионообменной микроколоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе отработаны условия анализа гомогенности олигонуклеотидов и нуклеозидполифосфатов.

Экспериментальная часть

Микроколоночную хроматографию проводили на капиллярных стеклянных колонках длиной 60 мм, объемом 20 мкл, используя в качестве материала набивки DEAE-целлюлозу. Оптическую плотность элюата измеряли на проточной микроспектрофотометрической приставке МФСП-1 [14], изготовленной в мастерских института. Вещества с колонки элюировали ступенчато возрастающей концентрацией (0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 М) Na_2HPO_4 в 7М мочеvine в 0,005М трис-HCl (pH 7,0). Для термостатирования колонок использовали термостат U-1 (ГДР). DEAE-целлюлоза фирмы «Serva» (ФРГ) емкостью 0,5 мэкв/г, «Reanal» (Венгрия) — 0,6 мэкв/г, DE-32 «Whatman» (Англия) — 0,5 мэкв/г и завода «Олайне» — 0,5 мэкв/г (СССР). 10 г целлюлозы замачивали в 1 л 0,05 М трис-HCl (pH 7,0) и после 12 ч набухания взбалтывали до гомогенной суспензии. После 3-минутного отстаивания неосевшую суспензию сливали и отбрасывали. Осадок взбалтывали и после отстаивания в течение 3 ч неосевшую суспензию сливали. Для анализа использовали осевшую целлюлозу. Набивку колонок производили с помощью специального устройства [15]. Раствор мочеvine очищали, пропуская через колонки с ионообменными смолами [16]. Poly (A, U), АТР, ГТР, СТР и УТР — препараты фирмы «Reanal» (Венгрия). РНКазный гидролиз проводили в 0,05 М трис-HCl (pH 7,6) при 37° 2 ч при соотношении фермент — субстрат 1 : 20. Циклофосфаты разрушали обработкой 0,1 М HCl при $\sim 20^\circ$ 4 ч [17]. Остальные реагенты марки х. ч.

Авторы выражают глубокую благодарность С. В. Кузьмину, М. А. Иванову и В. Г. Демину за изготовление микроспектрофотометрической приставки и А. А. Тагаеву за помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Milewska Z., Panusz H. (1974) *Anal. Biochem.*, **57**, 8—13.
2. Tyndall R. L., Jacobson K. B., Teeter E. (1965) *Biochim. et biophys. acta*, **108**, 11—17.
3. Bergquist P. L. (1965) *J. Chromatogr.*, **19**, 615—618.
4. Mirsabekov A. D., Griffon B. F. (1972) *J. Molec. Biol.*, **72**, 633—643.
5. Jovin T. M. (1971) *Methods in Enzymol.*, **21**, 179—187.
6. Barrell B. G. (1971) in *Procedures in Nucleic Acid Res.* (Cantoni G. L., Davies D. R., eds.), vol. 2, pp. 751—779, Harper & Row., N. Y.—London.
7. Zdražil C., Sormova Z. (1961) *Collect. Czechosl. Chem. Commun.*, **26**, 2651—2655.
8. Василенко С. К., Демушкин В. П., Кнорре Д. Г., Будовский Э. И. (1965) *ДАН СССР*, **162**, 694—697.
9. Vlasov K. K., Grineva N. I., Knorre D. G. (1972) *FEBS Lett.*, **20**, 66—70.
10. Кнорре Д. Г., Сандахчиев Л. С. (1973) в сб. *Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот* (Кнорре Д. Г., Венкстерн Т. В., ред.), стр. 7—23, «Наука», М.
11. Гуськова Л. И., Демушкин В. П. (1974) *Успехи химии*, **7**, 1241—1281.
12. Tomlinson R. V., Tener G. M. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 2644—2645.
13. Дюерфельд К. (1969) *Статистика в аналитической химии*, «Мир», М.
14. Кузьмин С. В., Магвеев В. В., Прессман Е. К., Сандахчиев Л. С. (1969) *Биохимия*, **34**, 706—711.
15. Прессман Е. К. (1973) в сб. *Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот* (Кнорре Д. Г., Венкстерн Т. В., ред.), стр. 135—138, «Наука», М.
16. Аксельрод В. Д., Венкстерн Т. В., Баев А. А. (1965) *Биохимия*, **30**, 999—1006.
17. Мирзабеков А. Д., Венкстерн Т. В., Баев А. А. (1965) *Биохимия*, **30**, 825—835.

Поступила в редакцию
28.III.1975

ANALYSIS OF THE HOMOGENEITY OF OLIGONUCLEOTIDES AND NUCLEOSIDE POLYPHOSPHATES

DEMUSHKIN V. P., PLYASHKEVICH Yu. G., SHALINA N. M.

*M. M. Shemyakin Institute of Biorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Optimal conditions for analysing the homogeneity of oligonucleotides and nucleoside polyphosphates by microcolumn chromatography on DEAE-cellulose in 7 M urea at 60°C in a 0—0.3 M Na₂HPO₄ gradient have been developed. The resolution and separation of components is shown to depend on grade of DEAE-cellulose, gradient profile, temperature, and solution velocity.