



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.113.083:546.34'137

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРХЛОРАТА ЛИТИЯ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ  
И АНАЛИЗЕ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

Барам Г. И., Грачев С. А.

*Институт биоорганической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск*

В настоящей статье нами предлагается использовать перхлорат лития при выделении дезоксирибоолигонуклеотидов или их производных (например, несущих химически активные группы) обращенно-фазовой хроматографией, а также при осаждении нуклеотидного материала как в процессе его выделения, так и при анализе строения олиго- и полинуклеотидов методом Максама — Гилберта (2%  $\text{LiClO}_4$  в ацетоне).

Имеются следующие, на наш взгляд, преимущества проведения хроматографии на сорбентах с привитой обращенной фазой в присутствии перхлората лития по сравнению с используемыми обычно растворами ацетата натрия или аммония [1]. Во-первых,  $\text{LiClO}_4$  имеет очень высокую растворимость в органических растворителях, не обладая при этом буферными свойствами, что позволяет в широких пределах изменять как концентрацию его в элюенте, так и pH элюента. Таким образом, становится возможным проводить рехроматографию выделяемого олигонуклеотида на том же сорбенте, резко изменяя параметры элюирующего раствора. Во-вторых, известно, что как ионы  $\text{Li}^+$ , так и ионы  $\text{ClO}_4^-$  обладают хаотропными (дестабилизирующими структуру) свойствами по отношению к биополимерам [2]. Кроме того,  $\text{LiClO}_4$  подавляет понообменные взаимодействия основных групп хроматографируемого вещества (например,  $\text{NH}_2$ -групп) с открытыми силанольными группами неподвижной фазы. Оптические свойства перхлората лития ( $A_{210}$  менее 0,2 для 1 М раствора в воде) позволяют использовать высокие концентрации его с применением УФ-детекции разделяемых веществ в процессе хроматографии. Сочетание именно этих свойств привело к использованию перхлоратов при хроматографии на обращенной фазе белков и пептидов [3].

К достоинствам  $\text{LiClO}_4$  следует отнести также возможность экстракции его органическими растворителями (например, *n*-бутанолом) или отделения его от нуклеотидного материала осаждением ацетоном или ацетонитрилом.

На примере разделения двух олигонуклеотидов на колонке с Nucleosil 5-C8 показано (рис. 1), что в присутствии перхлората лития по сравнению с ацетатом аммония наблюдается, несмотря на меньший pH элюента, уменьшение концентрации ацетонитрила, необходимой для элюции олигонуклеотидов. В некоторой степени увеличивается симметричность пиков. При повышении концентрации  $\text{LiClO}_4$  в элюенте до 1 М качество разделения олигонуклеотидов практически не меняется, обнаружено лишь ускорение элюции тимидинбогатых олигонуклеотидов. Аналогичные результаты получены при использовании сорбента Nucleosil 5-C18.

Опыт использования в нашем институте перхлората лития в элюирующих растворах при проведении обращенно-фазовой хроматографии позволяет сделать вывод о большей устойчивости в этих условиях сорбентов на основе силикагеля с привитой обращенной фазой, что можно объяснить

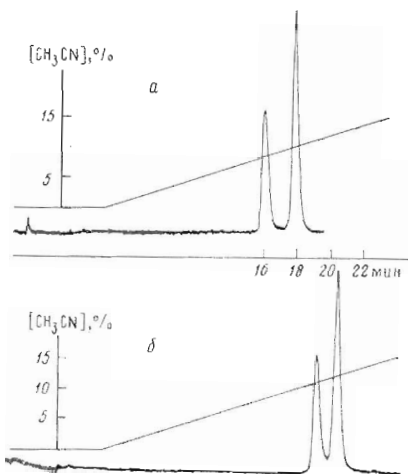


Рис. 1

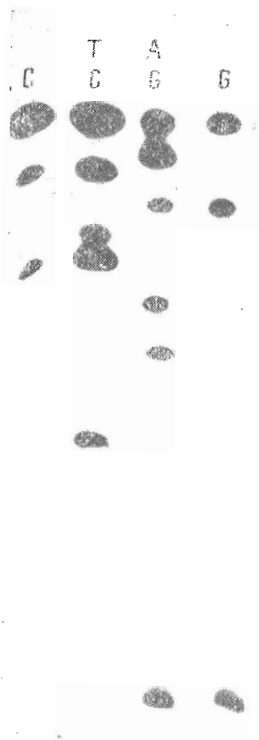


Рис. 2

Рис. 1. Разделение смеси олигонуклеотидов  $d(pAACCA)$  и  $d(pCCCTCTTT\cdot CTT)$  хроматографией на колонке ( $2 \times 62$  мм) с Nucleosil 5-C8 в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,2 М перхлорате лития, pH 5,7 (а), 0,2 М ацетате аммония, pH 6,8 (б). Скорость потока 50 мкл/мин, детекцию проводили при 260 нм с помощью микроспектрофотометра «Обь»

Рис. 2. Анализ олигонуклеотида  $d[5-^{32}P]pGTAACGCA$  методом Максама — Гилберта с осаждением нуклеотидного материала 10 объемами 2% перхлората лития в ацетоне

крайне низкой растворимостью силикатов лития в воде. Добавление в элюент солей лития должно, следовательно, увеличить также и рабочий pH-диапазон сорбентов.

По завершении хроматографии в предлагаемых нами условиях нуклеотидный материал осаждают добавлением 5–10-кратного избытка (по объему) 2% перхлората лития в ацетоне. Для полного удаления литиевой соли осадок промывают ацетоном, этанолом и высушивают. Формирование осадка в отличие от спиртового осаждения происходит практически мгновенно при комнатной температуре и не требует добавления ДНК- (или РНК-) носителя.

Перхлорат лития обладает высокой элюирующей способностью (по сравнению с NaCl или солями фосфорной кислоты) при извлечении нуклеотидного материала с DEAE-целлюлозы. 1 М  $LiClO_4$  практически количественно элюирует олигонуклеотиды. Степень извлечения фрагментов ДНК длиной  $\sim 500$  нуклеотидов достигает минимум 80–90% (при 60–80°С). Таким образом, перхлорат лития удобно использовать для извлечения полинуклеотидов с DEAE-бумаги после проведения электроэлюции из полиакриламидного геля. Нуклеотидный материал перед дальнейшим использованием осаждают от солей осаждением ацетоном. 2 М  $LiClO_4$  используется нами при экстракции нуклеотидного материала из полиакриламидных гелей.

Особенно удобно использовать осаждение перхлоратом лития в процессе секвенирования олиго- или полинуклеотидов методом Максама — Гилберта как в обычном [4], так и в твердофазном вариантах [5]. При этом

не происходит потери низкомолекулярных продуктов деградации и сокращается процедура отделения различных химических реагентов как на первой стадии (модификация диметилсульфатом, гидразином и т. д.), так и на стадии гидролиза 1 М пиперидином (перед осаждением необходимо нейтрализовать пиперидин равным объемом 1 М уксусной кислоты). На рис. 2 приведена радиоавтограмма полиакриламидного геля, полученного при анализе строения химически синтезированного олигонуклеотида. Аналогичным образом нами была модифицирована процедура секвенирования протяженных последовательностей ДНК.

Авторы благодарны всем, кто принял участие в обсуждении или апробации предлагаемых нами методик.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вульфсон А. Н., Якимов С. А. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 3, с. 365–390.
2. Хиппель П., Шлейх Т. В кн.: Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, 1973, с. 351–361.
3. Meek J. L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 3, p. 1632–1636.
4. Maxam A. M., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.
5. Чувпило С. А., Кравченко В. В. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1634–1637.

Поступило в редакцию  
9.IV.1985

#### USE OF LITHIUM PERCHLORATE FOR ISOLATION AND ANALYSIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES

BARAM G. I., GRACHEV S. A.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the  
Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Lithium perchlorate is recommended to be used in the following procedures; 1) isolation of deoxyribooligonucleotides and their derivatives by reversed-phase liquid chromatography; 2) precipitation of oligo- and polynucleotides by 2% LiClO<sub>4</sub> solution in acetone during their isolation and sequencing by the Maxam – Gilbert method.