



УДК 577.113.4.083 : 543.544.6

**СИЛЬНЫЕ АНИОНООБМЕННИКИ НА ОСНОВЕ СИЛИКАГЕЛЯ
И ПОЛИЭТИЛЕНИМИНА ДЛЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ***Ястребов С. И., Попов С. Г.**Всероссийский научно-исследовательский институт
молекулярной биологии, пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Описаны получение и свойства сильных анионообменников для высокоэффективной жидкостной хроматографии на основе силикагеля и полиэтиленимина, дополнительно кватернизованного иодистым метилом. Показано, что обработка иодистым метилом существенно увеличивает селективность и разрешающую способность ионообменников и позволяет на небольших колонках (объемом 2—4 мл) осуществлять как аналитические, так и препаративные (до 50 мг) разделения сложных смесей олиго- и полинуклеотидов длиной до 52 оснований. Полученные анионообменники, названные «Полисил СА», отличаются высокой стабильностью и могут быть легко получены в лабораторных условиях.

Разделение смесей олиго- и полинуклеотидов методами высокоэффективной жидкостной хроматографии является ключевой стадией во многих биохимических исследованиях. Особое значение методы ВЭЖХ имеют при выделении и очистке синтезированных олигонуклеотидов. В настоящее время в связи с быстрым развитием методов синтеза возникла потребность в разделении сложных смесей полинуклеотидов длиной 20—60 оснований [1]. Существующие ионообменники, такие, как «Partisil SAX», «Lichrosorb NH₂», «Силосорб Амин», позволяют проводить разделение реакционных смесей и очистку полинуклеотидов длиной до 20 звеньев. Однако емкость этих сорбентов низка, поэтому уже для миллиграммовых количеств разделяемых веществ необходимы колонки большого объема (20—40 мл). Время жизни колонок с такими материалами невелико.

Высокая емкость и стабильность характерны для анионообменников на основе силикагелей и поперечно сшитых полиэтилениминов [2—4]. Такие сорбенты эффективны и в обычной колоночной хроматографии, однако разрешающую способность имеют несколько ниже, чем сильные анионообменники типа «Partisil SAX».

Ранее нами показано [5], что при обработке силикагелей с поперечно сшитым полиэтиленимином (PEI) избытком иодистого метила в результате кватернизации имеющихся на поверхности пор аминокрупп селективность и разрешающая способность при разделении олигонуклеотидов значительно возрастают. Позднее эффективность такой обработки была подтверждена в работе [6].

В данной работе ставилась задача оптимизации ионообменной хроматографии олигонуклеотидов с учетом не только селективности и разрешающей способности, но и достижения наибольшей производительности, т. е. возможности на небольших колонках (объемом 2—4 мл) проводить разделение как в аналитическом, так и в препаративном масштабах.

Мы испытали сорбенты на основе силикагеля «Kieselgel Si 500» и аэро-силиогеля «Силохром С-80» отечественного производства. Силикагели обрабатывали PEI (молекулярная масса 30 000—40 000) и сшивали дибромэтаном или эпоксидной смолой ДЭГ-1 по описанной методике [4]. Кроме того, с целью более плотной пришивки PEI к стенкам пор его наносили на силикагель, предварительно обработанный бромметилдиметилхлорсиланом, после чего дополнительно сшивали дибромэтаном. Полученные PEI-сорбенты выдерживали в 30% растворе иодистого метила

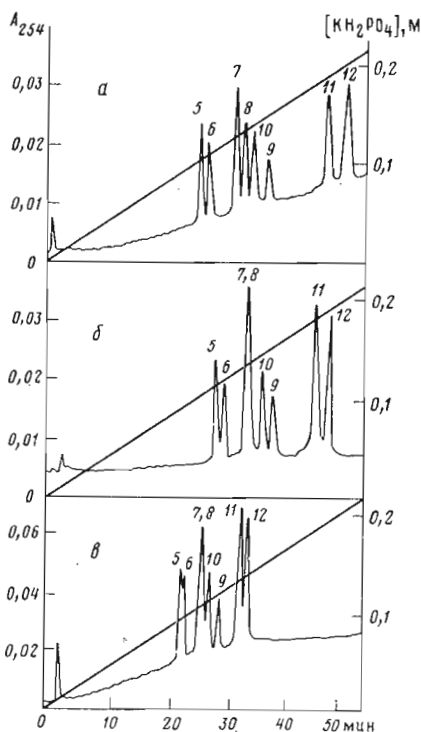
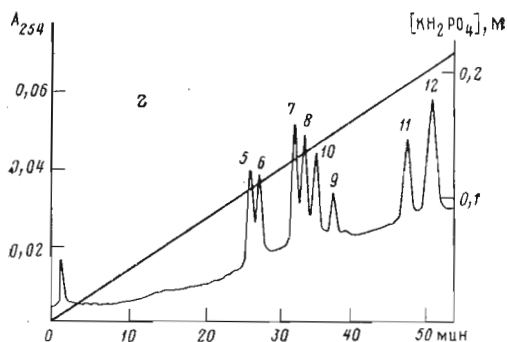


Рис. 1. Профили элюции при анионообменной хроматографии контрольной смеси олигодезоксирибонуклеотидов длиной 9—20 нуклеотидных звеньев на колонке (3,2 × 250 мм) с «Полисил СА2» (а), «Partisil SAX» (б), «Силохром РЕИ» (в), «Полисил СА1» (г), проработавшей 7 мес. Линейный градиент концентрации фосфата калия (рН 6,5) в 30% ацетонитриле со скоростью элюции 1,5 (а, в), 1 мл/мин (б, г). Цифры обозначают номер олигонуклеотида в контрольной смеси (см. «Экспер. часть»)



в ацетонитриле. Основные характеристики исследованных сорбентов представлены в табл. 1.

Сравнение свойств полученных сорбентов, названных нами «Полисил СА», со свойствами PEI-сорбентов, не обработанных подистым метилом («Силохром PEI» (табл. 1) получен нами согласно работе [4]), и ионообменником «Partisil SAX» проводили путем хроматографии смеси четырех

Таблица 1

Основные характеристики исследованных сорбентов

Ионообменник	Носитель	Способ обработки	Удельная поверхность, м ² /г *	Диаметр пор, нм *	Содержание азота мкг/г
Kieselgel PEI	Kieselgel Si500	PEI, смола ДЭГ-1	50	50	1,1
Полисил СА1	»	PEI, смола ДЭГ-1, CH ₃ I	50	50	1,0
Kieselgel PEI	»	PEI, дибромэтан	50	50	1,0
Силохром PEI	Силохром С-80	То же	70-100	40-60	1,6
Полисил СА2	»	PEI, дибромэтан, CH ₃ I	70-100	40-60	1,5
Полисил СА3	»	BrCH ₂ (CH ₃) ₂ SiCl, PEI, CH ₃ I	70-100	40-60	1,3
Partisil SAX	Partisil	Без обработки	400	5	0,7

* Данные по удельной поверхности и диаметру пор взяты из работы [7].

Таблица 2

Сравнение селективности и разрешения исследованных сорбентов на примере разделения олигодезоксирибонуклеотидов (1)–(4)

Ионообменник	Селективность, $\alpha_{1,n}$			Разрешение, $R_{1,n}$		
	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,4}$	$R_{1,2}$	$R_{1,3}$	$R_{1,4}$
Полисил СА2 *	2,54	4,30	7,46	5,3	6,6	9,7
Силохром PEI *	1,83	1,58	3,33	1,3	0,89	2,3
Partisil SAX *	2,14	3,29	5,57	1,4	2,5	4,3
Полисил СА1 **	2,67	5,41	8,37	4,9	6,3	9,1

* Скорость элюции 0,5, ** 1,5 мл/мин.

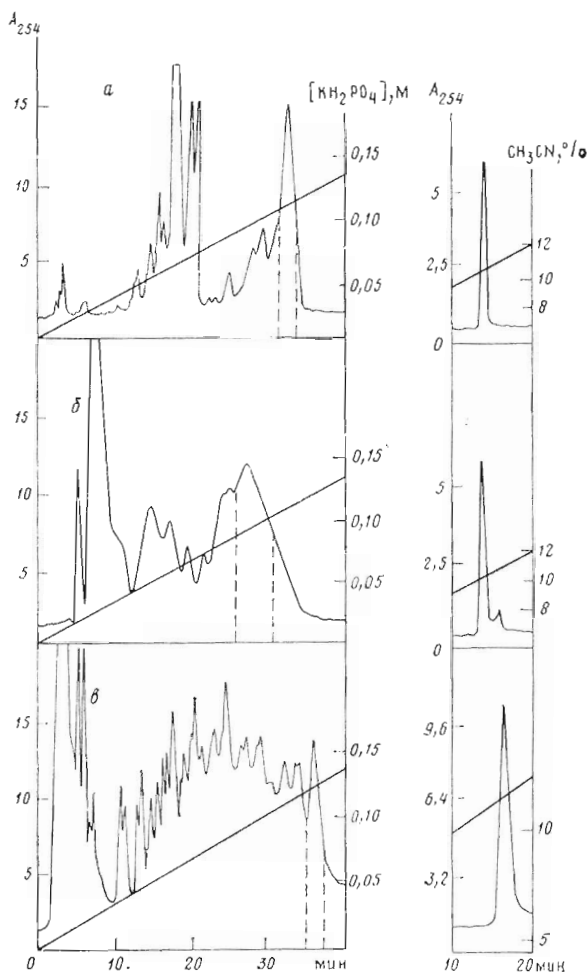


Рис. 2. Препаративное выделение олигодезоксирибонуклеотидов: а — 270 ОЕ₂₅₄ реакционной смеси d(G-A-T-C-A-C-A-C-A-T-C-T-T-T-G-C-A-A) на колонке (3,2 × 250 мм) с «Полисил СА2»; б — то же на колонке (3,2 × 250 мм) с «Partisil SAX»; в — 930 ОЕ₂₅₄ реакционной смеси d(pA-G-A-G-T-A-T-T-G-A-C-T-T-A) на колонке (4,6 × 250 мм) с «Полисил СА2». Справа приведены профили обращенно-фазовой хроматографии указанных продуктов на колонке (3,2 × 250 мм) с «Lichrosorb-RP18» (10 мкм), градиент концентрации ацетонитрила в 0,05 М ацетате триэтиламония (рН 6,5). Условия ионообменной хроматографии см. в подписи к рис. 1

олигодезоксирибонуклеотидов длиной 10—14 оснований: d(C-A-A-G-C-C-T-C-C-A) (1), d(G-T-G-T-T-A-C-C-G-A-A) (2), d(G-A-A-A-G-G-T-G-A-A-T-A) (3), d(A-A-A-A-C-G-C-T-T-A-C-A-A) (4) и расчета селективности и разрешения по известным формулам [8]:

$$\alpha_{1, n} = \frac{t_n - t_0}{t_1 - t_0}; \quad R_{1, n} = \frac{2(t_n - t_1)}{w_1 + w_n},$$

где t_n — время удерживания, n — номер олигонуклеотида, t_0 — время удерживания несорбируемого вещества, w_n — ширина пика олигонуклеотида. Результаты приведены в табл. 2.

Кроме того, сравнение проводили при разделении контрольной смеси олигодезоксирибонуклеотидов (см. «Экспериментальную часть») длиной 9—20 оснований с использованием градиента фосфата калия в 30% ацетонитриле.

Как видно из табл. 2, наибольшим разрешением и селективностью обладает сорбент на основе РЕI, шитого смолой ДЭГ-1 («Полисил СА1»), однако при разделении такой сорбент характеризуется большими временами удерживания, что приводит к значительному уширению пиков. Ионообменники с РЕI, шитым дибромэтаном («Полисил СА2»), а также

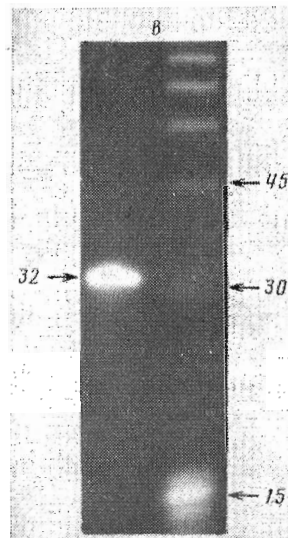
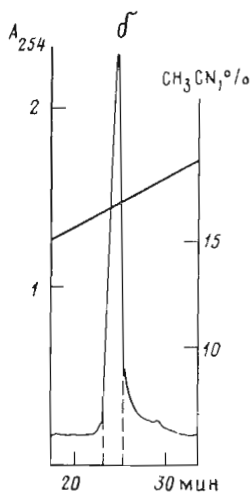
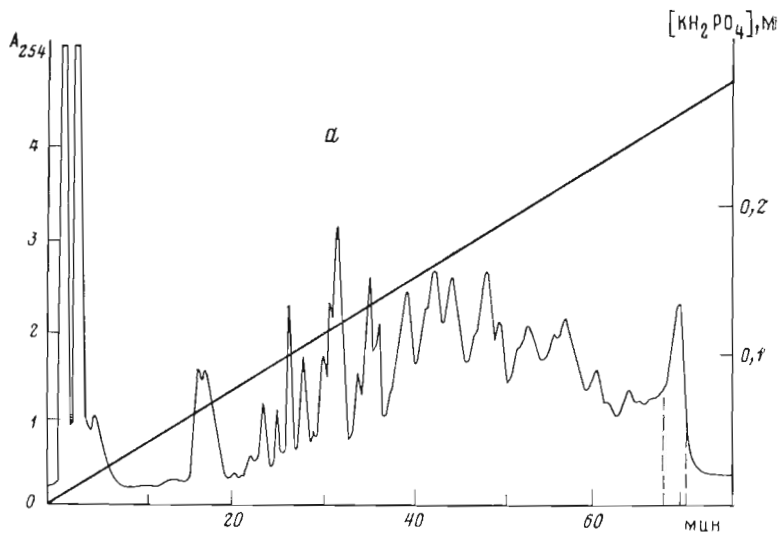


Рис. 3. Выделение полинуклеотидов: *a* — ионообменная хроматография 140 ОЕ₂₅₄ реакционной смеси 32-мера d(C-C-G-C-A-T-C-C-T-T-G-T-A-A-T-T-A-T-T-A-A-T-T-C-C-A-T-T-G-A-A-A) на колонке (3,2 × 250 мм) с «Полисил СА2»; *б* — профиль обращенно-фазовой рехроматографии; *в* — анализ электрофорезом в 16% ПААГ после обращенно-фазовой хроматографии 32-мера; *г* — ионообменная хроматография 25 ОЕ₂₅₄ реакционной смеси 52-мера d(T-C-G-A-C-T-A-G-A-T-A-T-T-G-C-T-C-A-T-T-A-A-G-T-C-T-T-A-G-G-T-C-T-T-A-A-G-T-G-A-A-A-G-T-T-T-T-G-C-T) на колонке (3,2 × 250 мм) с «Полисил СА2»; *д* — профиль, обращенно-фазовой рехроматографии; *е* — анализ электрофорезом в 16% ПААГ 52-мера. Условия хроматографии см. в подпункте к рис. 1 и 2

на основе силикагеля, обработанного бромметилдиметилхлорсиланом («Полисил СА3»), дают практически одинаковые результаты по разрешающей способности и времени удерживания. В связи с тем что получение последнего требует длительного высушивания силикагеля в вакууме при 200° С, а также «сухих» условий обработки силаном, такое усложнение метода получения нецелесообразно. Сорбенты на основе «Kieselgel Si 500» отличаются несколько меньшим содержанием азота, чем на основе «Силохрома С-80» (см. табл. 1), что отражает его пониженную ионообменную емкость. Поэтому предпочтение было отдано сорбенту на основе «Силохрома С-80» с РЕ1, шитым дибромэтаном. Такой носитель, обработанный иодистым метилом («Полисил СА2»), показал очень хорошие свойства. При

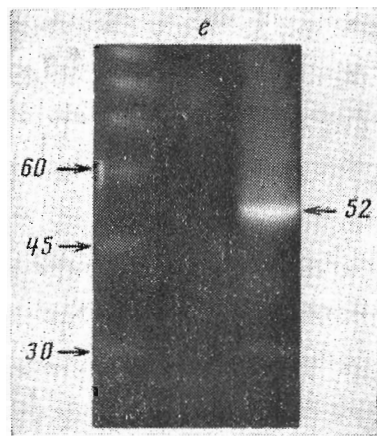
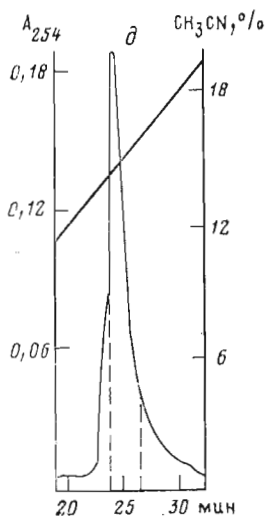
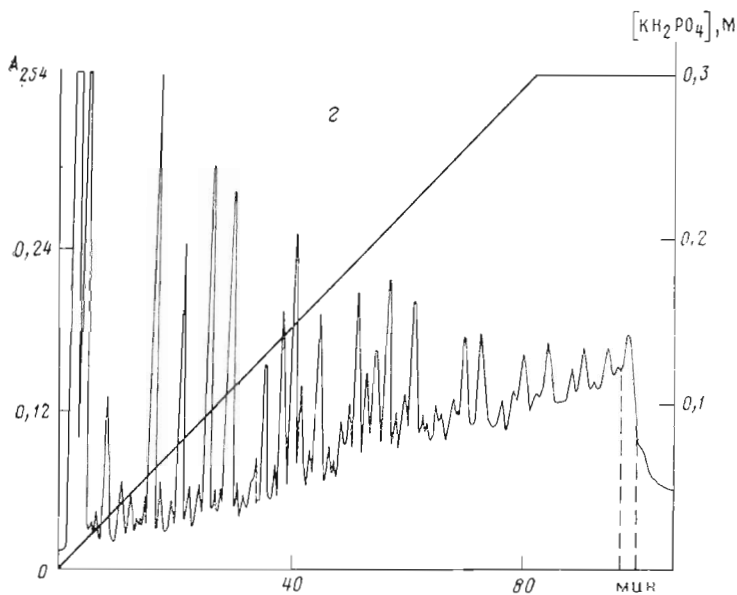


Рис. 3 *г, д, е*

хроматографии контрольной смеси олигонуклеотидов наблюдали практически полное разделение всех восьми олигонуклеотидов (рис. 1а). «Partisil SAX» и «Силохром РЕИ» показали худшее разрешение (рис. 1б, в).

Всем полученным ионообменникам типа «Полисил СА» свойственна высокая производительность. На рис. 2а представлена хроматограмма выделения из реакционной смеси олигонуклеотида $d(G-A-T-C-A-C-A-C-A-T-C-T-T-T-G-C-A-A)$, синтезированного фосфотриэфирным методом в растворе, после удаления всех защитных групп. На колонке ($3,2 \times 250$ мм) с «Полисил СА2» суммарная нагрузка составила 270 OE_{254} смеси. Для сравнения на рис. 2б приведена хроматограмма разделения этой же смеси на колонке ($3,2 \times 250$ мм) с «Partisil SAX». На рис. 2в показано выделение из реакционной смеси олигонуклеотида $d(pA-G-A-G-T-A-T-T-G-A-C-T-T-A)$, синтезированного твердофазным триэфирным методом, на колонке ($4,6 \times 250$ мм) с «Полисил СА2». Общая нагрузка составила 930 OE_{254} . По данным обращенно-фазовой хроматографии, выделенные олигонуклеотиды были практически гомогенны.

Высокая разрешающая способность полученных анионообменников позволяет разделять смеси полинуклеотидов длиной свыше 50 звеньев.

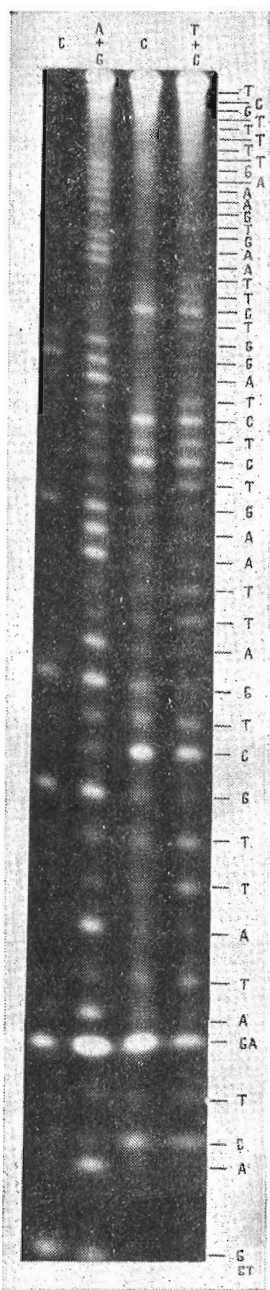


Рис. 4. Анализ последовательности 52-мера по методу Максама—Гилберта

колонке, проработавшей семь месяцев (без предколонки). За это время на ней было сделано несколько сот разделений и не менее 30% из них препаративных. Колонки хранятся обычно в той же системе, в которой проводится разделение.

Таким образом, сильные анионообменники на основе силикагелей, с поперечно сшитым РЕI и дополнительно кватернизованные иодистым метилом обладают высокой селективностью и разрешающей способностью, позволяющей разделять полинуклеотиды длиной до 52 оснований. Другим достоинством является их высокая производительность, позволяющая на

На рис. 3 представлены результаты выделения 32- и 52-членных полинуклеотидов (анализ структуры последнего — см. рис. 4), синтезированных фосфотриэфирным и фосфитным методами соответственно. По данным гель-электрофореза, эти полинуклеотиды также практически не содержали примесей.

Вполне удобны полученные анионообменники для анализа и очистки препаративных количеств смесей 5'-моно-, ди- и трифосфатов нуклеозидов. Разделение мононуклеотидов может быть достигнуто в изократических условиях за несколько минут. На рис. 5 представлено разделение 5'-моно-, ди- и трифосфатов четырех основных дезоксирибонуклеозидов с использованием градиента концентрации фосфата калия (рН 3,0) с удовлетворительным разрешением всех компонентов смеси.

Следует отметить, что природа соли, а также замена ацетонитрила на другие растворители оказывают большое влияние на параметры разделения.

Нами были исследованы элюенты, содержащие LiCl, NaCl, LiClO₄, Li₂SO₄, Na₂SO₄. По элюирующей силе только Li₂SO₄ и Na₂SO₄ приближаются к фосфату калия, но несколько ухудшают разрешение. При замене фосфата калия на LiCl, LiClO₄ или NaCl олигонуклеотиды элюируются при более высоких концентрациях солей со значительной потерей разрешения. Однако применение LiClO₄ и LiCl, растворяющихся в ацетоне и спирте, оказывается удобным, например, при обессоливании нуклеотидных продуктов (после разделения) путем их осаждения этими растворителями.

Замена ацетонитрила на этиловый или метиловый спирты резко снижает разрешение. Пропиловый и изопропиловый спирты дают разрешение, близкое к таковому в системе с ацетонитрилом, но имеют высокую вязкость. Это ведет к значительному увеличению перепада давления в хроматографической системе, что уменьшает время жизни колонок. Высокая вязкость препятствует также использованию системы Томлинсона — Генера, содержащей 7 М мочевины, в присутствии которой существенного улучшения разрешения по сравнению с ацетонитрилом мы не наблюдали даже при разделении самокомплементарных олигонуклеотидов.

Для полученных сорбентов характерна высокая стабильность. На рис. 1г приведена хроматограмма контрольной смеси олигонуклеотидов на колонке, проработавшей семь месяцев (без предколонки). За это время на ней было сделано несколько сот разделений и не менее 30% из них препаративных. Колонки хранятся обычно в той же системе, в которой проводится разделение.

Таким образом, сильные анионообменники на основе силикагелей, с поперечно сшитым РЕI и дополнительно кватернизованные иодистым метилом обладают высокой селективностью и разрешающей способностью, позволяющей разделять полинуклеотиды длиной до 52 оснований. Другим достоинством является их высокая производительность, позволяющая на

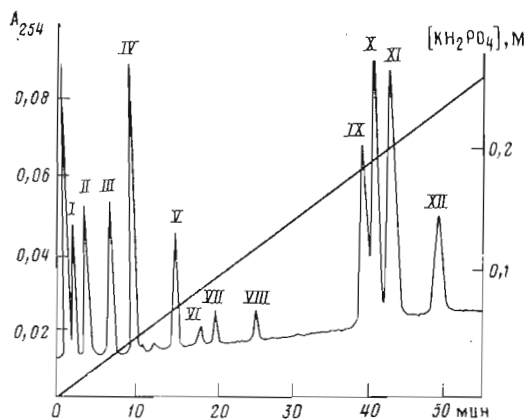


Рис. 5. Разделение смеси моно-, ди- и трифосфатов дезокси-нуклеозидов на колонке ($3,2 \times 250$ мм) с «Полисил СА2» с «Полисил СА2»: I — dCMP; II — dAMP; III — dTMP; IV — dGMP; V — dCDP; VI — dADP; VII — dTDP; VIII — dGDP; IX — dCTP; X — dATP; XI — dTTP; XII — dGTP. Градиент концентрации фосфата калия (рН 3,0) в 30% ацетонитриле (0,02—0,3 М), скорость потока 1,5 мл/мин

аналитических колонках разделять препаративные количества реакционных смесей олигонуклеотидов. Сорбенты отличаются высокой стабильностью и могут быть легко получены в лабораторных условиях.

Экспериментальная часть

В работе применяли силикагель «Kieselgel Si500» с размером частиц 10—12 мкм (Merck, ФРГ), «Partisil SAX» (Whatman, Англия) [(10 мкм); полиэтиленмин (M 30 000—40 000, Fluka, Швейцария), 1,2-дибромэтан (Arolda, ГДР), эпоксидную смолу ДЭГ-1 отечественного производства. «Силохром С-80» (отечественного производства) с размером частиц 10—12 мкм получали методом фракционной седиментации размолотого на шаровой мельнице силикагеля с размером частиц 200—300 мкм. Использовали реактивы следующих квалификации: подистый метил — ч., KH_2PO_4 , $LiCl \cdot H_2O$, $NaCl$ — ос. ч., Na_2SO_4 , $LiClO_4 \cdot 3H_2O$ — х. ч., *n*-пропиловый спирт — х. ч., изопропиловый спирт — ос. ч., моно-, ди-, трифосфаты дезокси-нуклеозидов производства НИКТИ БАВ (Бердск). Ацетонитрил для хроматографии получали из препарата квалификации ч. перегонкой над P_2O_5 , отбирая фракцию с оптическим поглощением не более 0,03 OE_{254} ; растворы фосфата калия, рН 6,5 и 3,0, получали из KH_2PO_4 с добавлением водного раствора КОН (ос. ч.) и H_3PO_4 (х. ч.) соответственно. Стальные колонки ($3,2 \times 250$; $4,6 \times 250$ мм (Altech, США) заполняли взвесью сорбентов в изопропанол из резервуара объемом 20 или 40 мл, прокачивая дополнительно 50—100 мл изопропанола при 400—600 атм насосами DST-150 (Haskel, США) или Altex, модель 110 (США). Набитые таким образом колонки перед хроматографией промывали ацетонитрилом, водой, конечным и стартовым буферами. Регенерация колонок после хроматографии включает промывку колонки 5—7 объемами 0,3 М фосфата калия в 30% ацетонитриле с последующим уравниванием 10—15 объемами исходного буфера (0,02 М фосфат калия, рН 6,5). Хроматографию проводили на хроматографе «Altex», модель 332 (США).

Контрольная смесь олигонуклеотидов имела следующий состав: d(A-C-T-T-C-G-T-G) (5), d(C-A-A-G-C-C-T-C-C-A) (6), d(G-T-G-T-T-A-C-C-G-A-A) (7), d(T-C-T-A-A-G-G-A-A-T-A-G) (8), d(G-A-A-A-G-G-T-G-A-A-T-A-A) (9), d(A-A-A-A-A-C-G-C-T-T-A-C-A-A) (10), d(C-C-C-A-T-G-A-A-A-T-C-T-T-G-A-C-A-T) (11), d(C-A-G-T-T-T-A-G-G-A-T-C-C-A-T-T-T-C-A-C) (12).

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов проводили в растворе [9] и на полимерном носителе [10] с использованием концевых 5'-О-диметокситригильной и 3'-цианэтильной защитных групп, которые удаляли в усло-

виях, описанных в работе [11]. Межнуклеотидные фосфатные остатки блокировались *n*-хлорфенильной группой, экзоциклические аминогруппы аденозина и цитидина — бензоильной группой, гуанозина — изобутирильной группой. В качестве полимерного носителя применяли силикагель с якорными аминопропильными остатками [10]. Конденсирующим реагентом служил 2, 4, 6-триизопропилбензолсульфо-3-нитро-1, 2, 4-триазолид или смесь *N*-метилимидазола с 2, 4, 6-триизопропилбензолсульфонилхлоридом. Синтез олигонуклеотидов фосфитным методом проводили как описано в работе [12].

Элюцию олигонуклеотидов для расчета селективности и разрешения проводили 0,1 М фосфатом калия (рН 6,6) в 20% ацетонитриле. Хроматографию контрольной смеси осуществляли с использованием градиента концентрации фосфата калия (рН 6,5) в 30% ацетонитриле. Скорость увеличения концентрации соли 2% в 1 мин. Элюцию 5'-моно-, ди- и трифосфатов нуклеозидов проводили с использованием градиента концентрации (0,002—0,3 М) фосфата калия (рН 3,0). Скорость увеличения концентрации соли 1,7% в 1 мин.

Содержание азота в сорбентах определено элементным анализом в лаборатории микроанализа НИОХ СО АН СССР.

Общая методика получения анионообменников. Силикагель (5 г) выдерживали в конц. HNO_3 2—3 ч, промывали затем водой до нейтрального значения рН, этанолом (3×20 мл) и сушили в вакууме (1 ч, 20° С, 10 мм рт. ст.). РЕИ наносили согласно методике, описанной в работе [4]. После обработки сшивающим агентом носитель промывали диоксаном (3×20 мл), спиртом (2×20 мл), ацетонитрилом (3×20 мл), сушили в вакууме (1 ч, 20° С, 10 мм рт. ст.), добавляли 50 мл 30% раствора нидистого метила в ацетонитриле, перемешивали, дегазировали и оставляли на 12—18 ч при 20° С, после чего смесь грели 1 ч на кипящей водяной бане. Сорбент отфильтровывали, промывали ацетонитрилом (3×50 мл), этанолом (3×20 мл), сушили в вакууме при 30—40° С.

Авторы выражают благодарность Н. Н. Карпышеву и Ю. А. Горбуну за предоставленные реакционные смеси олигонуклеотидов, А. Н. Снякову и В. В. Горну — за предоставленные хроматограммы реакционных смесей полинуклеотидов, А. И. Ломакину — за техническую помощь и обсуждение результатов работы, Т. П. Артамоновой — за анализ последовательностей олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rink H., Liersh M., Sieber P., Meyer F. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 16, p. 6369—6387.
2. Pearson J. D., Regnier F. E. J. Chromatogr., 1983, v. 255, p. 137—149.
3. Lawson T. G., Regnier F. E., Weith H. L. Anal. Biochem., 1983, v. 133, № 1, p. 345—353.
4. Офицеров В. И., Ямщиков В. Ф. Биоорганич. химия, 1983, т. 9, № 9, с. 1248—1253.
5. А. с. № 1153976 (СССР). Способ получения сорбента/Ястребов С. И. Заявл. 08.12.83, № 8670634. Опубл. в Б. И., 1985, № 16.
6. Drager R. R., Regnier F. E. Anal. Biochem., 1985, v. 145, № 1, p. 47—56.
7. Лурье А. А. В кн.: Хроматографические материалы. М.: Химия, 1978, с. 14, 75.
8. Каргер Б. В кн.: Современное состояние жидкостной хроматографии. М.: Мир, 1974, с. 16—17.
9. Hirose T., Crea R., Itakura K. Tetrahedron Lett., 1978, v. 28, p. 2449—2452.
10. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. Биоорганич. химия, 1985, т. 11, № 7, с. 920—926.
11. Gait M. G., Popov S. G., Singh M., Titmas R. C. Nucl. Acids Res., Symposium Ser., 1980, № 7, p. 225—232.
12. Карпышев Н. Н., Ястребов С. И., Попов С. Г. Биоорганич. химия, 1985, т. 11, № 10, с. 1361—1366.

Поступила в редакцию
8.VII.1985
После доработки
14.X.1985

STRONG ANION EXCHANGERS BASED ON POLYETHYLENEIMINE-MODIFIED
SILICA FOR HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF OLIGO- AND
POLYNUCLEOTIDES

YASTREBOV S. I., POPOV S. G.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Kol'tsovo,
Novosibirsk Region*

The preparation and properties of strong anion exchangers for HPLC on the basis of a silica modified with polyethyleneimine was described. These supports, quaternized with methyl iodide, possessed the high selectivity and resolution, thus making possible both the analytical and preparative (up to 50 mg) separations of complex oligo- and polynucleotide (up to 52-base length) mixtures on small columns of 2—4 ml. These anion exchangers, named «Polysil SA», have a high stability and may be easily prepared.