



УДК 547.962.32 : 543.54

НОВЫЙ ТИП СОРБЕНТОВ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ*Скрябин Ю. Г., Варламов В. П., Захарьев В. М.,
Рогожин С. В., Баев А. А.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР;
Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР*

На основе неорганических материалов (силохром, пористое стекло и хромсорб) синтезированы сорбенты с аминопропильными (I) и гидразидными (II) группами. В результате присоединения к таким сорбентам окисленной периодатом тРНК (*E. coli*) были получены препараты, содержащие от 100 до 900 ОЕ₂₆₀ на 1 г сорбента. На сорбенте типа (I) проведена также иммобилизация ДНК (фрагменты длиной ~500 нуклеотидов), модифицированной присоединением к ее 3'-концу одного или двух рибонуклеотидных звеньев с помощью терминальной нуклеотидилтрансферазы. Для устранения неспецифической сорбции, обусловленной избыточными аминопропильными группами, препараты с иммобилизованными нуклеиновыми кислотами обрабатывали уксусным ангидридом. В результате такой обработки получены носители с иммобилизованной РНК, практически не сорбирующие гетерологичную ДНК.

В последние годы аффинная хроматография, основанная на специфическом взаимодействии иммобилизованного лиганда со строго определенным партнером, приобрела большое значение для эффективной очистки и выделения целого ряда ферментов, ингибиторов и других биологически активных соединений [1]. Иммобилизация нуклеиновых кислот приобретает важное значение по двум причинам: во-первых, иммобилизованные нуклеиновые кислоты дают возможность выделять и исследовать белки, образующие с ними комплексы; во-вторых, позволяют упростить выделение РНК с использованием комплементарной иммобилизованной ДНК [2—5].

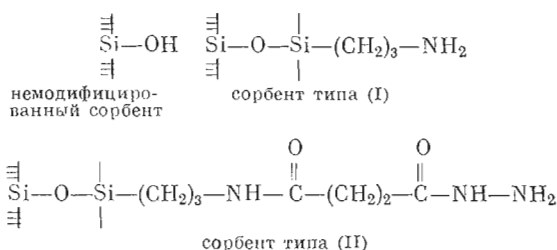
К настоящему времени опубликовано много работ, посвященных иммобилизации нуклеиновых кислот на различных сорбентах: целлюлозе [4—6], сефадексе [7], агарозе [8—11], фиколе [12]. Однако большинство предложенных сорбентов и способов иммобилизации имеет существенные недостатки, которые состоят в следующем: связывание, как правило, происходит по нескольким точкам (обычно по гетероциклическим основаниям); носители, полученные на основе сефарозы, нестабильны при температуре выше 60°; носители на основе целлюлозы обладают свойством неспецифически сорбировать нуклеиновые кислоты, что совершенно недопустимо при выделении комплементарных фрагментов ДНК или РНК; в случае присоединения ДНК концом ее полимерной цепи получают препараты с низким содержанием иммобилизованной нуклеиновой кислоты, что затрудняет эффективное использование таких аффинных сорбентов.

В данной работе мы попытались получить иммобилизованные нуклеиновые кислоты, устранив перечисленные выше недостатки. В качестве

носителей нами были использованы неорганические материалы (силохром, пористое стекло и хромосорб), обладающие целым рядом преимуществ: механической, микробиологической, химической и термической устойчивостью; жесткостью каркаса, не изменяющего своей структуры при изменении рН, ионной силы, температуры и типа растворителя; высокой фильтрующей способностью на колонках; возможностью стерилизации и регенерации (650°, HNO₃) для присоединения новой порции лиганда [13, 14].

Иммобилизацию нуклеиновых кислот проводили строго по 3'-концу, используя способность окисленной периодатом рибозы к взаимодействию с первичными amino-, а также гидразидными группами. Такой способ иммобилизации оставляет молекулу нуклеиновой кислоты свободной и доступной для образования комплементарных комплексов.

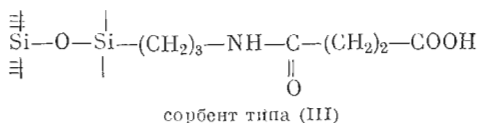
Возможность присоединения значительного количества нуклеиновой кислоты к сорбенту определяется наличием в нем большого числа аминогрупп, что обеспечивает лучшую ориентацию нуклеиновой кислоты на сорбенте и способствует образованию ковалентной связи по 3'-концевому нуклеотиду [9].



Сорбенты типа (I), полученные нами на основе силохрома и пористого стекла, имели концентрацию аминпропильных групп (0,5—0,8) · 10⁻³ моль/г; в случае хромосорба концентрация не превышала 10⁻⁵ моль/г, что объясняется малой площадью поверхности носителя.

К сорбенту типа (I), полученному на основе силохрома, удалось присоединить тРНК в количестве 350 ОЕ/г носителя, а в случае сорбента типа (II) — 900 ОЕ/г (табл. 1). Большее количество иммобилизованной тРНК на сорбенте типа (II), видимо, связано с удалением гидразидной группировки от поверхности носителя, что облегчает взаимодействие тРНК с носителем. Кроме того, тРНК, присоединенная к сорбенту типа (II), не требует обработки получаемого комплекса боргидридом натрия [9] и полностью стабильна в диапазоне рН 4—8.

Далее нами была показана возможность присоединения тРНК с помощью дициклогексилкарбодимида к сорбенту типа (III):



Однако содержание иммобилизованной тРНК на таком сорбенте не превышало 30 ОЕ/г (1,2% взятого количества), поэтому в дальнейшем этот препарат нами не использовался.

На основе пористого стекла марки СРГ и хромосорба Р были получены сорбенты типа (I). При присоединении к ним окисленной периодатом натрия тРНК на пористом стекле удалось иммобилизовать до 750 ОЕ/г, а на хромосорбе Р — до 100—120 ОЕ тРНК на 1 г сорбента. Количественные различия в связывании тРНК с сорбентами типа (I) на основе силохрома, пористого стекла и хромосорба объясняются, видимо, различием в величине удельной поверхности носителей и концентрации аминпропильных групп [13].

Емкость различных типов неорганических сорбентов при иммобилизации тРНК

Сорбент	Взято тРНК, ОЕ ₂₆₀ на 1 г сорбента	Связано сорбентом тРНК, ОЕ ₂₆₀ /г	Иммобилизованная тРНК, %
Тип (I) на основе силихрома	1000	350	35,0
Тип (II) на основе силихрома	1350	900	67,0
Тип (III) на основе силихрома	2500	30	1,2
Тип (I) на основе пористого стекла СРГ	1120	750	61,2
Тип (I) на основе хромосорба	100	90	90,0
То же	200	86	43,0
»	500	110	22,0
»	1000	98	9,8
»	2000	120	6,0

Таблица 2

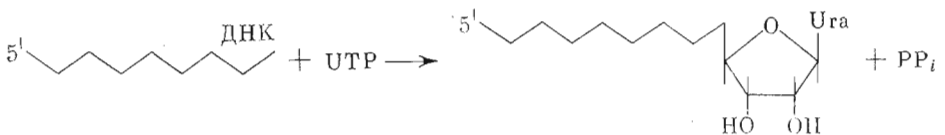
Сорбция [³H] ДНК на немодифицированных неорганических сорбентах

Немодифицированный сорбент	Диаметр пор, Å	Удельная поверхность, м ² /г	Несорбируемая ДНК, %
Силохром	350	80,0	72,0
	760	50,0	49,0
Пористое стекло СРГ	80	207,8	98,0
	120	181,0	97,5
	500	56,0	97,5
Хромосорб Р-ав	До 2 000 000	4,0	100,0

При иммобилизации тРНК на хромосорбе происходит насыщение сорбента при концентрации 100 ОЕ/г и за 30 мин реакция практически заканчивается (табл. 1).

Если иммобилизация значительного количества по 3'-концевому гидроксигруппе РНК не представляет существенных сложностей, то присоединение по концевому нуклеотиду ДНК в аналогичных количествах до сих пор не удавалось.

В настоящей работе для иммобилизации ДНК было использовано свойство терминальной нуклеотидилтрансферазы присоединять к дезоксиполинуклеотидам в 3'-положении одно или два рибонуклеотидных звена [15].



Таким методом нами были получены фрагменты радиоактивной ДНК (~500 нуклеотидов), несущие рибонуклеотиды в 3'-концевом положении.

Эти фрагменты с окисленным концевым нуклеотидом были иммобилизованы на носителе типа (I) на основе хромосорба, причем количество сорбированной нуклеиновой кислоты (60 ОЕ), видимо, не является предельным.

Эффективность применения сорбента в аффинной хроматографии определяется не только его емкостью, но и в значительной мере отсутствием неспецифической сорбции, interfering с биоспецифическим средством. Для выбора сорбента, лишённого способности неспецифически связывать нуклеиновые кислоты, была изучена сорбция одноцепочечной высокоочищенной [³H]ДНК длиной ~500 нуклеотидов на немодифицированных сорбентах (табл. 2).

Из табл. 2 видно, что из опробованных сорбентов высокой неспецифической сорбцией обладает силиохром. Поэтому для дальнейшей работы мы использовали пористое стекло СРГ и хромосорб Р-aw, отличающиеся от силиохрома химической природой поверхности, так как помимо SiO_2 содержат V_2O_5 и Al_2O_3 , что приводит к образованию на поверхности более сильных кислотных центров, чем силанольные группы [16]. Различие в сорбционной способности силиохрома и пористого стекла по отношению к белкам было отмечено ранее [17]. Было выяснено, что $[^3\text{H}]\text{ДНК}$ не сорбируется на пористом стекле в пределах изученных нами концентраций — от 7,5 до 96 мкг/мл.

Однако оказалось, что сорбенты типа (I) на основе пористого стекла с иммобилизованной тРНК обладают свойством сорбировать некоторые количества гетерологичной ДНК (иммобилизованная тРНК *S. cerevisiae* и ДНК *E. coli*), что, видимо, можно объяснить большим количеством остаточных аминопропильных групп на сорбенте. Наличие этих групп не столь важно для хроматографии на таких сорбентах основных белков [18], но совершенно неприемлемо для аффинной хроматографии нуклеиновых кислот.

Нами была проведена обработка свободных аминогрупп уксусным ангидридом в условиях, при которых нуклеиновые кислоты не модифицируются [19]. В результате были получены сорбенты, практически не сорбирующие ДНК. Необходимо отметить, что в контрольных экспериментах с неокисленной тРНК и последующей обработкой уксусным ангидридом после проведения всех этапов присоединения сохраняется связанная с сорбентом около 10 ОЕ/г (~10%), которая эффективно десорбируется лишь при повышении температуры до 60°.

Экспериментальная часть

В работе использовались сорбенты: силиохром (ВНИИЛ, г. Ставрополь), пористое стекло СРГ (Corning Glass, США), хромосорб Р-aw (Johns-Manville, США). Терминальная нуклеотидилтрансфераза тимуса теленка (КФ 2.7.7.31) любезно предоставлена А. Л. Бочаровым (ИМБ АН СССР), эндонуклеаза А236 (КФ 3.1.4) — Н. М. Абросимовой-Амельянчик (ИМБ АН СССР).

Сорбенты типа (I) и (III) получали по описанной ранее методике [13].

Сорбент типа (II). 1 г сорбента типа (III) суспендировали в 50 мл абс. MeOH и пропускали сухой HCl при перемешивании в течение 3 ч при кипении. Полученный метиловый эфир карбоксилохрома промывали на фильтре метанолом (300 мл), к полученному производному добавляли 30 мл воды, 0,4 мл гидразидгидрата и кипятили 3 ч при перемешивании. Сорбент отмывали на фильтре водой до исчезновения в элюате следов гидразина (положительная реакция с салициловым альдегидом).

тРНК E. coli и S. cerevisiae выделяли по методу [20].

$[^3\text{H}]\text{ДНК E. coli}$ выделяли по методу Мармура [21] из биомассы, выращенной на $[^3\text{H}]\text{тимидине}$.

Периодатное окисление осуществляли по стандартной методике [22], используя ~100-кратный избыток NaIO_4 в пересчете на тРНК.

Включение рибонуклеотидных звеньев в 3'-концевое положение ДНК проводили по методу [15] с использованием $[^3\text{H}]\text{ДНК}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$ и нуклеотидилтрансферазы тимуса теленка.

Иммобилизация тРНК на сорбенте типа (I). Окисленную периодатом тРНК растворяли в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,5. К 4 мл раствора тРНК добавляли 2 г сорбента типа (I) и инкубировали 3 ч при комнатной температуре, периодически встряхивая. Затем сорбент промывали на фильтре 0,1 М трис-HCl-буфером, pH 9,0 (200 мл), суспендировали в 5 мл того же буфера, добавляли 50 мг NaN_4 и перемешивали 2 ч при комнатной температуре. Полученный продукт промывали на фильтре 0,1 М

трис-НСl-буфером, рН 9,0 (200 мл) и 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,0), содержащим $5 \cdot 10^{-3}$ М Mg^{2+} (100 мл), суспендировали в 5 мл того же буфера, добавляли 0,1 мл уксусного ангидрида и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Сорбент с иммобилизованной тРНК промывали на фильтре 0,1 М фосфатным буфером, рН 7,0 (300 мл), водой (200 мл) и высушивали на фильтре.

Иммобилизацию тРНК на сорбенте типа (II) проводили аналогично описанной для сорбента типа (I), исключая стадию восстановления иммобилизованного препарата боргидридом натрия.

Иммобилизация тРНК на сорбенте типа (III). К 0,6 г сорбента типа (III) добавляли 0,21 г N, N'-дихлоргексилкарбодиимида в 10 мл пиридина и 2 мл раствора тРНК в воде (875 ОЕ/мл). Реакцию проводили при комнатной температуре 6 сут при периодическом встряхивании. Полученный продукт промывали водой (500 мл), спиртом (500 мл), 1 М NaCl (300 мл), водой (300 мл), спиртом (50 мл) и высушивали на фильтре.

Определение количества тРНК на сорбенте. а) Сорбент с иммобилизованной тРНК (20 мг) кипятили 30 мин в 4 мл 0,5 н. $HClO_4$, смесь охлаждали и измеряли оптическую плотность раствора при λ 260 нм.

б) К сорбенту с иммобилизованной тРНК (20 мг) в 4,9 мл 0,1 М трис-НСl-буфера (рН 9), содержащего $5 \cdot 10^{-3}$ М Mg^{2+} , добавляли эндонуклеазу A236 [23] (0,1 мл; 50 ед. акт.) и смесь инкубировали 2 ч при 37°. Количество тРНК на сорбенте в обоих случаях вычисляли по оптической плотности супернатанта с учетом объема пробы и навески сорбента.

Определение сорбции $[^3H]$ ДНК на сорбентах. Водный раствор $[^3H]$ ДНК *E. coli* прогревали при 100° в течение 10 мин, после чего к раствору добавляли 1/100 объема буфера, содержащего 1,5 М NaCl и 0,15 М цитрат натрия, рН 7. Затем к 1,5 мл $[^3H]$ ДНК с концентрацией 7,5 мкг/мл (уд. акт. 29 000 имп/мин на 1 мкг) добавляли 30 мг сорбента и инкубировали 30 мин при 60°. Сорбент промывали дважды 3 мл буфера, содержащего 0,025 М NaCl и 0,0015 М цитрат натрия, рН 7, один раз 3 мл воды и в случае большой сорбции 3 мл 5 М NaCl. Общую радиоактивность измеряли во всех промывных растворах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cuatrecasas P. (1970) J. Biol. Chem., 245, 3059—3065.
2. Преображенский А. А., Елизаров С. М. (1975) Биоорг. химия, 1, 1633—1638.
3. Burrell H. R., Horowitz J. (1973) FEBS Lett., 49, 306—309.
4. Shih T. Y., Martin M. A. (1974) Biochemistry, 13, 3411—3418.
5. Noyes B. E., Stark G. R. (1975) Cell, 5, 301—310.
6. Gilham P. T. (1968) Biochemistry, 7, 2809—2813.
7. Куриненко Б. М., Шаги-Мухаметова Ф. Ф., Нужина А. И. (1975) Биоорг. химия, 1, 1624—1632.
8. Poonian M. S., Schlabach A. J., Weissbach A. (1971) Biochemistry, 10, 424—427.
9. Robberson D. L., Davidson N. (1972) Biochemistry, 11, 533—537.
10. Rickwood D. (1972) Biochim. et biophys. acta, 239, 47—50.
11. Wagner A. F., Bugianesi R. L., Shen T. Y. (1971) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 45, 184—189.
12. Scheffler I. E., Richardson S. C. (1972) J. Biol. Chem., 247, 5736—5745.
13. Рогожин С. В., Варламов В. П., Вальковский Д. Г. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1718—1721.
14. Weetall H. H. (1971) Res. Develop., 22, 18—22.
15. Kossel H., Rouchoudhyru R. (1971) Eur. J. Biochem., 22, 271—310.
16. Бреслер С. Е., Коликов В. М., Катушкина Н. В., Пономарева Р. Б., Демин А. А., Жданов С. П., Каромальди Е. В. (1974) Коллоидн. ж., 35, 638—642.
17. Бреслер С. Е., Коликов В. М., Катушкина Н. В., Пономарева Р. Б., Жданов С. П., Каромальди Е. В. (1974) Коллоидн. ж., 33, 748—751.
18. Eltekov Yu. A., Kiselev A. V., Khokhlova T. D., Nikitin Yu. S. (1973) Chromatographia, 6, 187—189.
19. Кнорре Д. Г., Малышева А. Н., Пустошилова Н. М., Севастьянов А. П., Шаповаловский Г. Г. (1966) Биохимия, 31, 1181—1187.
20. Pinkerton T. C., Paddock G., Abelson J. (1973) J. Biol. Chem., 248, 6348—6365.
21. Marmur J. (1961) J. Mol. Biol., 3, 208—218.

22. Методы исследования нуклеиновых кислот (1970) с. 106, «Мир», М.
23. Варламов В. П., Львова Т. Н., Банникова Г. Е., Абросимова-Амельяничук Н. М., Вальковский Д. Г., Татарская Р. И., Рогожин С. В. (1976) Биоорганич. химия, 2, 558—564.

Поступила в редакцию
23.III.1976

A NEW TYPE OF SUPPORTS FOR NUCLEIC ACIDS IMMOBILIZATION

SKRYABIN K. G., VARLAMOV V. P., ZAKHARIEV V. M.,
ROGOZHIN S. V., BAYEV A. A.

*Institute of Molecular Biology and Institute of Organo Element
Compounds, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

On the basis of inorganic materials such as silochrom, porous glass and chromosorb, a number of supports have been synthesized which have aminopropyl and hydrazide groups (designated as type I and II, respectively). As a result of attachment of periodate-oxidized *E. coli* tRNA to these materials, the preparations were obtained having as much as 100-900 A₂₆₀ units per gram of sorbent. Type I support was used also for immobilization of DNA (the fragments of about 500 nucleotide length) which has been preliminary modified by terminal nucleotidyl transferase-mediated coupling with one or two ribonucleotides at the 3'-terminus. To avoid nonspecific sorption which might arise due to excess aminopropyl groups, the preparations of immobilized nucleic acids were treated with acetic anhydride. The supports with immobilized RNA thus obtained were shown to be almost completely inert with respect to heterological DNA.
