



УДК 547.963.32.05

ИММОБИЛИЗАЦИЯ НУКЛЕОЗИДОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ
НА АМИНООКСИДСОРБЕНТАХ *

Недоспасов А. А., Хомутов Р. М.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Описано применение аминоксибутилцеллюлозы для иммобилизации окисленных периодатом нуклеозидов, их моно-, ди- и трифосфатов, тРНК, poly(A), poly(U), S-аденозил-L-гомоцистеина. На примере изопропиллиден-5'-дезоксип-5'-оксадеозина и рибозо-5-фосфата показаны другие возможности иммобилизации нуклеотидов по сахарным остаткам. Показано, что неокисленные производные цитидина и цитозинсодержащие полинуклеотиды при pH 5 легко реагируют с АВ-целлюлозой по остаткам цитозина, в то время как poly(A) и poly(U) иммобилизуются значительно медленнее. Для достижения избирательности иммобилизации на АВ-целлюлозе сорбент модифицировали α -кетоглутаровой кислотой, что приводит к возрастанию скорости иммобилизации положительно заряженных компонентов. Обсуждается возможность создания высокоизбирательных сорбентов на этой основе.

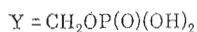
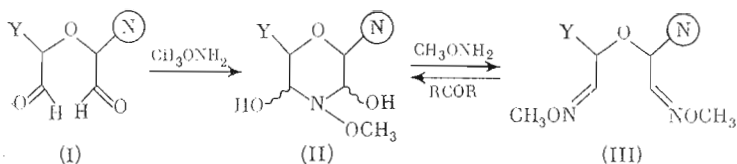
Разработка методов иммобилизации нуклеиновых кислот на нерастворимых матрицах имеет важное значение для эффективного решения многих задач биохимии и молекулярной биологии. Существующие способы иммобилизации, как правило, трудоемки и применимы лишь к какому-то определенному классу нуклеотидов. Так, иммобилизация окисленных периодатом производных рибозы на гидразидных сорбентах [2, 3] неприменима непосредственно к ДНК, что заставляет вводить в последнюю дополнительно рибонуклеотид [4]. Кроме того, имеющиеся сорбенты не отличаются высокой стабильностью. Не решена задача избирательной иммобилизации нуклеиновых кислот в присутствии соединений других классов, например белков.

Ранее нами описаны аминоксисалкилцеллюлозы и показана применимость их для ковалентной иммобилизации различных соединений в мягких условиях [5]. Пригодность целлюлозных матриц, содержащих H_2NO - и >C=NO -группы, для аффинной хроматографии нуклеиновых кислот была показана на примере модифицированных аминоксисалкилцеллюлоз, содержащих SH-группы и связывающих меркурированные полинуклеотиды [6].

В настоящем сообщении исследованы новые возможности иммобилизации на аминоксибутилцеллюлозе (АВ-целлюлоза) модифицированных по рибозным остаткам нуклеозидов и нуклеиновых кислот, а также немодифицированных нуклеотидов прямой реакцией H_2NO -группы АВ-целлюлозы с гетероциклическими основаниями.

Известно немало реакций диальдегидов, образующихся при окислении периодатом нуклеотидов и нуклеозидов, с различными азотистыми основаниями (обзор см. [7]). Мы исследовали взаимодействие окисленного периодатом аденозин-5'-фосфата (9(1,5-диоксо-4(S)фосфооксиметил-3'-оксапент-2(R)-ил)аденина) (I) с метоксиамином.

* Сообщение 6 в серии «Аминоксисадсорбенты». Сообщение 5 см. [1].



(N) - аденил

Эквимольные количества окисленного периодатом аденозин-5'-фосфата (I) и метоксиамин CH_3ONH_2 в водном растворе быстро образуют «монооксим» (II), являющийся, видимо, смесью трех изомеров с морфолиновой структурой. В пользу этого свидетельствуют наличие трех синглетов метильных протонов в ПМР-спектре; отсутствие слабopольных сигналов, характерных для альдегидов, исключает структуры со свободной >C=O -группой. «Монооксим» (II) оказался вполне устойчивым соединением — хроматографически не удалось обнаружить продуктов разложения после 24 ч инкубирования его в буферных растворах (pH 2,5—10,5) при 25° даже в присутствии аминов. В 0,01 M NaOH за сутки при 25° разложилось ~40% вещества (II).

В избытке CH_3ONH_2 «монооксим» (II) превращался в «дioxим» (III), который был устойчив в водных растворах при нейтральных pH, но медленно переходил в монооксим (II) в присутствии ацетона. Таким образом, как высокая скорость реакции окисленных нуклеотидов с RONH_2 , так и стабильность образующихся продуктов (чем последние выгодно отличаются от соединений, полученных в аналогичных реакциях с аминами и гидразинами) делали вариант иммобилизации нуклеотидов и нуклеиновых кислот через O-замещенные оксимы (N-алкоксиморфолины) особенно привлекательным.

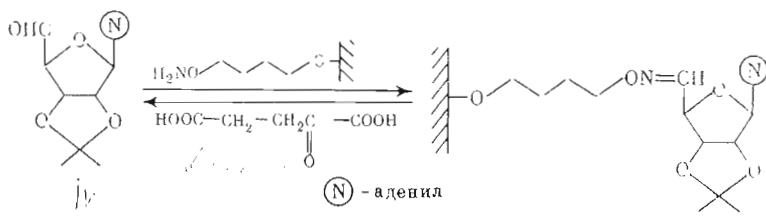
Взаимодействие АВ-целлюлозы с диальдегидом (I) в натрий-ацетатном буфере (pH 5,0) приводило к ковалентному связыванию нуклеотида с матрицей, причем последующая обработка сорбента водными растворами ацетона (см. ниже) не вызывала отщепления нуклеотида (I).

Емкость использованной АВ-целлюлозы (до 0,5 экв. H_2NO -групп на 1 г сухого сорбента) была достаточна для связывания весьма большого количества нуклеотидного материала (в несколько раз превышающего вес самого сорбента в случае тРНК), однако достижение таких высоких значений связывания приводило к изменению набухаемости, гидрофобности, заряда и других свойств АВ-целлюлозы, что в большинстве случаев было нежелательно. В этой связи при использовании АВ-целлюлозы для иммобилизации полинуклеотидов в реакцию вводили обычно не более 1000 ОЕ₂₆₀ нуклеотидного материала на 1 г сорбента. По завершении иммобилизации свободные аминоксигруппы инактивировали ацетоном.

Описанным методом на АВ-целлюлозе были иммобилизованы продукты периодатного окисления суммарной и ряда индивидуальных (валиновая I и II, фенилаланиновая) тРНК *E. coli*, полиадениловой и полиуридиловой кислот, нуклеозидов и их моно-, ди- и трифосфатов, а также S-аденозил-L-гомоцистеина.

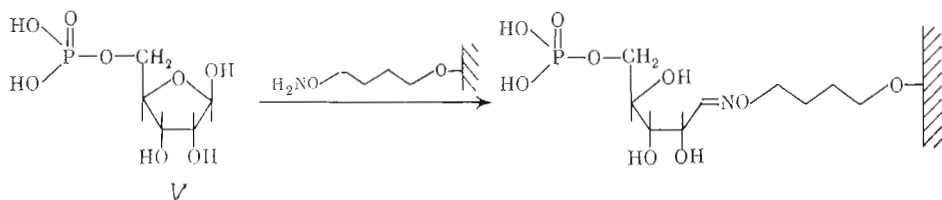
Далее на примере изопропилиден-5'-дезоксиз-5'-оксоаденозина (IV) и рибозо-5-фосфата (V) были показаны другие возможности иммобилизации на АВ-целлюлозе нуклеотидов по сахарным остаткам.

При перемешивании суспензии АВ-целлюлозы в растворе альдегида (IV) или при пропускании раствора последнего через колонку с сорбентом происходило ковалентное связывание нуклеозида, причем изопропилиденная защитная группа сохранялась. Обращения реакции удалось достичь, промывая колонку с иммобилизованным нуклеозидом раствором



α -кетоглутаровой кислоты, что приводило к переоксимированию. Хотя методы окисления концевых 5'-ОН-групп развиты еще недостаточно, этот вариант мог бы найти применение в твердофазном синтезе при использовании аминоксидсорбентов, не содержащих ОН-групп.

Разработанные в последнее время методы удаления части оснований [8] нуклеиновых кислот без разрыва фосфатных связей сделали актуальной задачу иммобилизации образующихся полимеров. С целью выяснения возможности применения в этом случае аминоксидсорбентов мы изучили взаимодействие рибозо-5-фосфата с АВ-целлюлозой. В водных растворах реакция протекала легко и быстро приводила к иммобилизации рибозо-5-фосфата в виде оксима.



Известно, что О-алкилгидроксиламины способны реагировать лишь с производными цитозина и аденина, тогда как урацильное и гуаниновое ядра не затрагиваются [9]. В случае цитозина реакция приводит к соответствующим диалкоксиамино-5,6-дигидропроизводным, находящимся в равновесии с 4-алкоксиамино-2-оксопроизводными [10], в то время как протекающая со значительно меньшей скоростью реакция с аденином приводит к 6-алкоксиаминопроизводному последнего [11].

Мы обнаружили, что в результате инкубации растворов полицитидиловой кислоты, тРНК (суммарная фракция) и денатурированной ДНК с нашим сорбентом происходит необратимое связывание нуклеотидного материала матрицей (рис. 1). В аналогичных условиях, но существенно медленнее с АВ-целлюлозой реагировали полиадениловая кислота и неденатурированная ДНК.

Этот метод иммобилизации отличается простотой операций и широкими возможностями регулирования процесса (см. далее) по сравнению с описанными в литературе методами, требующими предварительного введения реакционноспособных групп в молекулы иммобилизуемых соединений. Следует отметить, что адсорбенты, содержащие иммобилизованные на АВ-целлюлозе тРНК, были с успехом использованы для аффинной хроматографии ряда ферментов (аминоацил-тРНК-синтетаза*, тРНК-метилаза**).

В литературе имеются указания на индифферентность урацила к действию О-замещенных гидроксиламинов [9], однако при длительной инкубации полиурицидовой кислоты с АВ-целлюлозой нами было отмечено значительное ковалентное связывание. Возможно, это объясняется исключительно медленной модификацией уридина, не замеченной при исполь-

* Работа выполнена совместно с Л. В. Недоспасовой. Основные положения доложены на Всесоюзном совещании «Кристаллические ферменты: методы получения, их характеристики и использование» [12] (ср. [13]).

** Работа будет опубликована отдельно.

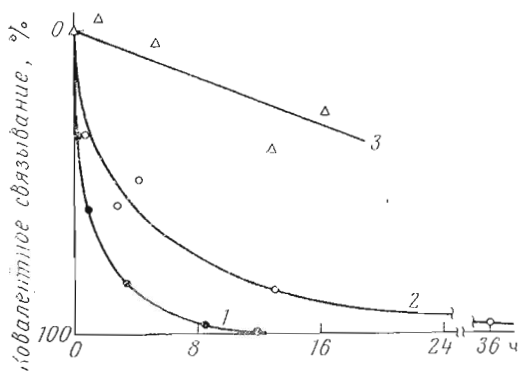


Рис. 1. Зависимость ковалентной сорбции poly(C) (1), суммарной tPHK (2) и poly(A) (3) на АВ-целлюлозе от времени (расчет см. «Экспер. часть»)

урацила, будет близка к экспериментально наблюдаемым значениям. Возможен, наконец, и какой-то принципиально новый механизм взаимодействия, не замеченный при исследовании низкомолекулярных субстратов, но проявляющийся при взаимодействии полимер — полимер.

В заключение целесообразно кратко остановиться на некоторых факторах, определяющих реакционную способность аминоксидсорбентов в рассмотренных выше реакциях. Влияние матрицы на скорость реакции иммобилизации нуклеиновых кислот на АВ-целлюлозе было показано на примере двух препаратов сорбента, имевших одинаковую емкость по H_2NO -группам, но полученных из разных образцов целлюлозы: микрокристаллическая АВ-целлюлоза реагирует с денатурированной ДНК существенно медленнее, чем тонковолокнистая.

Нами была выявлена резкая зависимость скорости реакции иммобилизации от pH. При $pH \lesssim 5$ значительная доля H_2NO -групп протонирована, сорбент действует как ионообменник, что может привести к концентрированию на нем отрицательно заряженных компонентов и тем самым изменить наблюдаемую скорость реакции на несколько порядков (рис. 2).

При работе с нуклеиновыми кислотами обычно принимают меры предосторожности для предотвращения действия нуклеаз, для чего часто используются поверхностно-активные вещества, например додецилсульфат натрия.

При исследовании влияния додецилсульфата натрия на скорость иммобилизации нуклеиновых кислот было установлено, что в его присутствии наблюдается резкая инактивация АВ-целлюлозы как реагента, что, видимо, связано с ионной сорбцией додецилсульфат-иона. Образующийся на адсорбенте гидрофобный слой делает аминоксигруппы недоступными для реакции с полинуклеотидами. При удалении детергента реакционная способность АВ-целлюлозы полностью восстанавливалась.

Учитывая вышеприведенные данные, представлялось интересным синтезировать аминоксидсорбенты, обладающие способностью к ионной сорбции, обеспечиваемой группами, отличными от H_2NO -групп, и соответственно значениями изоэлектрических точек в широком интервале pH. Простым методом получения таких сорбентов оказалась реакция избытка АВ-целлюлозы с контролируемым количеством карбонильных соединений, в состав молекул которых входит заряженная группа. Так, обработкой АВ-целлюлозы раствором α -кетоглутаровой кислоты получен сорбент, содержащий одновременно $-COOH$ - и H_2NO -группы. Сравнение реакционной способности полученного сорбента и АВ-целлюлозы в отношении

звания других методов исследования (некоторое время и аденин считался нечувствительным к атаке O-замещенными гидроксиламинами) [14]. Не исключено также присутствие в использованном препарате полиуридилловой кислоты, получаемой ферментативной полимеризацией UMP, примеси модифицируемого сорбентом нуклеинового основания. Так, примесь $\sim 0,5\%$ CMP в UMP, использованном при синтезе полиуридилловой кислоты, приведет к сополимеру, скорость иммобилизации которого на АВ-целлюлозе по цитозиновым ядрам, при условии полной индифферентности

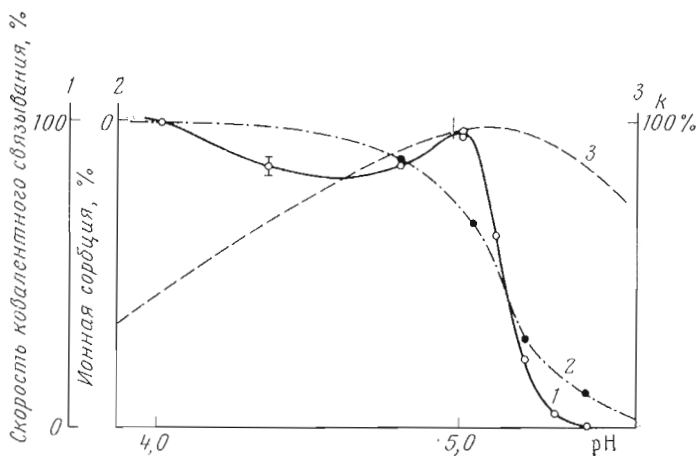


Рис. 2. Зависимость скорости ковалентного связывания (за 100% принята максимальная скорость в исследованном интервале рН) (1) и величины ионной сорбции (2) poly(C) на АВ-целлюлозе от рН. Для сравнения приведена зависимость константы скорости реакции СМР с CH_3ONH_2 по данным работы [15] (3)

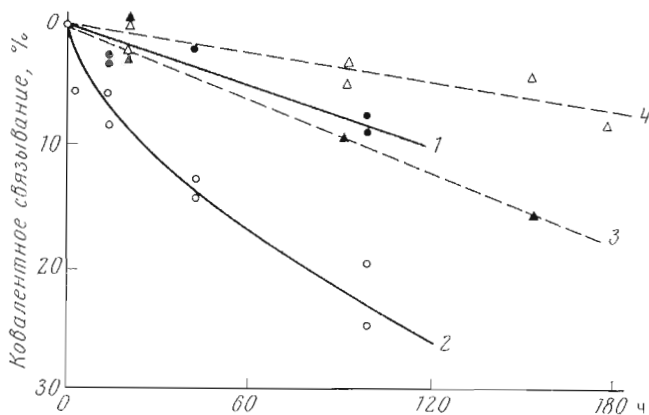


Рис. 3. Зависимость ковалентного связывания цитидина (1, 3) и СМР (2, 4) на АВ-целлюлозе (1, 2) и на АВ-целлюлозе, модифицированной α -кетоглутаровой кислотой (3, 4)

цитидина и СМР (рис. 3) показывает, что скорость реакции противоположно заряженных компонентов существенно выше.

Предлагаемым методом могут быть получены высокоизбирательные сорбенты, реакционная способность которых зависит от соотношения зарядов субстрата и матрицы сорбента и определяется рН (рис. 4). Подобный подход может представлять интерес как для иммобилизации различных соединений, так и для регуляции реакционной способности полимеров в растворе.

Влияние длины полиметиленового (или иного) звена, связывающего иммобилизованную молекулу с матрицей аминоксидсорбента, может быть существенным, как показали эксперименты по взаимодействию аспарат : кетоглутарат трансаминазы с различными аминоксидцеллюлозами [16]. Этот вопрос, как и влияние полисахаридной матрицы аминоксид-

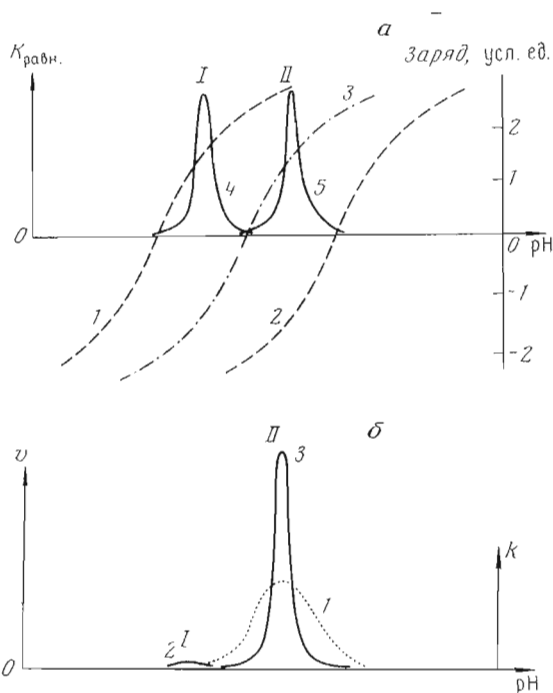


Рис. 4. К зависимости скорости взаимодействия заряженных субстратов с матрицей от pH: а — гипотетические pH-зависимости собственных зарядов субстратов (I) и (II) (1, 2) и матрицы (3), а также ионной сорбции субстратов (I) (4) и (II) (5) на матрице М; б — гипотетические pH-зависимости константы скорости реакции незаряженного субстрата с низкомолекулярным соединением X (1) и скорости реакции заряженных субстратов (I) и (II) с соединением X, иммобилизованным на матрице (кривые 2 и 3 соответственно)

сорбентов на конформацию иммобилизованной нуклеиновой кислоты, является предметом дальнейших исследований.

Авторы выражают благодарность М. Ю. Покровской за снятие спектров ПМР.

Экспериментальная часть

Аденозин, цитидин, АМР, СМР, poly(A), poly(C) и poly(U) — коммерческие препараты фирмы Reanal (ВНР). Суммарная фракция тРНК *E. coli* получена как описано в работе [17], фракционирование на бензоилированной DEAE-целлюлозе для получения обогащенных по индивидуальным тРНК препаратов проводили в соответствии с методикой, опубликованной ранее [18]. ДНК тимуса теленка (Олайнский завод химреактивов) фрагментировали методом гидродинамического сдвига при 1600 атм. Изопропилиден-5'-дезоксид-5'-оксоаденозин получали по методу [19] с незначительными изменениями. S-Аденозил-L-гомоцистеин получен по методу [20]. Рибозо-5-фосфат — коммерческий препарат фирмы Serva (ФРГ).

Этанол дважды абсолютирован над Mg, ацетон (ч.д.а., Chemapol, ЧССР) использовали без дополнительной очистки. Метоксиамин получен по методу [21]. АВ-целлюлоза (тонковолокнистая и микрокристаллическая) получена по методу, описанному ранее [6], исходя из целлюлозы Chellex-N-1 (Bio-Rad, США) и ЛК (Chemapol, ЧССР). Емкость сорбента по H_2NO -группам определяли как описано в работе [6]. Неорганические соединения — коммерческие препараты квалификации не ниже ч.д.а. — использовали без дополнительной очистки.

ТСХ проводили на пластинках «Silufol» и «Silufol UV-254» (ЧССР) в системах изопропанол — 25% NH_4OH — H_2O , 7 : 1 : 2 (система А), и пропанол — 25% NH_4OH — H_2O , 11 : 4 : 5 (система Б). Количественный анализ хроматограмм осуществляли с помощью сканирующего спектрофотометра фирмы Opton (ФРГ). Фосфорсодержащие соединения обнаруживали реакцией с молибденовой кислотой, как описано в работе [22]. УФ-спектры сняты на спектрофотометре Specord-UV-VIS (ГДР). Концентрацию нуклеотидов определяли по поглощению при 260 нм. Спектры ПМР сняты на приборе Varian-X100 в D_2O при 25° с *трет*-бутанолом в качестве внутреннего стандарта. Химические сдвиги приведены в миллионных долях δ -шкалы относительно ТМС, химический сдвиг *трет*-бутанола принимали равным 1,19.

Взаимодействие 9(1',5'-диоксо-4(S)фосфоциметил-3-оксапент-2(R)ил)-аденина (I) с CH_3ONH_2 . 1) 2 мл 0,1 М водного раствора соединения (I) и 2 мл 0,1 М водного CH_3ONH_2 перемешивали 10 мин, фильтровали через слой АВ-целлюлозы для удаления непрореагировавшего альдегида (I), лиофилизовали, растворяли в минимальном количестве воды и высаживали изопропанолом, содержащим 1% ацетона. Выпавший монооксим (II) отделяли, промывали на фильтре эфиром и сушили в вакууме. Вещество гомогенно по ТСХ (R_f 0,16 (А), R_f 0,50 (Б)). ПМР: 8,50—8,14 м ($\text{H}_{(2)}$, $\text{H}_{(8)}$); 6,15—4,80 м ($\text{H}_{(1')}$, $\text{H}_{(2')}$, $\text{H}_{(3')}$); 4,20—3,60 м ($2\text{H}_{(5')}$, $\text{H}_{(4')}$); 3,85 с, 3,80 с, 3,73 с (CH_3).

2) 2 мл 0,1 М водного раствора соединения (I) и 2 мл 0,5 М водного раствора CH_3ONH_2 перемешивали 8 ч при 20°, лиофилизовали, растворяли в минимальном количестве воды и высаживали изопропанолом. Выпавший продукт (III) отделяли, сушили в вакууме. Полученный диоксим (III) гомогенен по ТСХ (R_f 0,26 (А), R_f 0,57 (Б)). ПМР: 8,47—8,42 м ($\text{H}_{(8)}$); 8,37—8,33 м ($\text{H}_{(2)}$); 7,94 д ($\text{H}_{(2')}$); 7,62—7,50 м ($\text{H}_{(3')}$); 6,55 д ($\text{H}_{(1')}$); 3,84 с, 3,83 с, (2CH_3); 3,83 с (CH_3ONH_2).

Взаимодействие альдегида (I) с АВ-целлюлозой (типовая методика). К суспензии 3,0 г сорбента (микрористаллический, 0,46 мэкв/г) в 50 мл 0,02 М ацетата натрия при перемешивании на магнитной мешалке добавляли раствор 2000 ОЕ₂₆₀ (I) в 2 мл воды. Перемешивали 8 ч, АВ-целлюлозу фильтровали, промывали водой, 0,05 М буфером трис-НСl, рН 8,0 (в объединенных фильтратах ~ 4 ОЕ). Для блокирования свободных аминокси-групп целлюлозу промывали в хроматографической колонке 40 мл 0,5% раствора ацетона в 0,01 М натрий-ацетатном буфере (рН 5,0) или суспендировали 2 ч в том же растворе. Окончательно промывали на фильтре водой, спиртом, эфиром и сушили в вакууме. Приведенная методика без существенных изменений была использована для иммобилизации продуктов окисления нуклеозидов, их моно-, ди- и трифосфатов, а также S-аденозил-L-гомоцистеина.

Иммобилизация окисленной периодатом тРНК на АВ-целлюлозе. 200 ОЕ₂₆₀ тРНК *E. coli*, обогащенной по тРНК^{Val}, как описано в работе [17], окисляли NaIO_4 по методике [23], предварительно проаминоацилировав смесью аминокислот (без валина) по методу [24]. После освобождения от низкомолекулярных веществ на сефадексе G-25 и пересадения спиртом тРНК промывали эфиром и сушили в вакууме. 150 ОЕ тРНК, обработанной как описано выше, растворяли в 14 мл 0,1 М натрий-ацетатного буфера (рН 5,6), содержащего 0,02 М MgSO_4 , добавляли 0,5 г сорбента (тонковолокнистый, 0,4 мэкв/г) и перемешивали 12 ч при 20°. Целлюлозу промывали как описано выше. В объединенных фильтратах сохранилось 114 ОЕ₂₆₀ тРНК, с АВ-целлюлозой связалось 36 ОЕ₂₆₀ тРНК. По указанной методике проводили иммобилизацию окисленных по концевой рибозе тРНК, а также poly(A) и poly(U).

Взаимодействие изопропилиден-5'-дезоксид-5'-оксааденозина (IV) с АВ-целлюлозой. 200 ОЕ₂₆₀ альдегида (IV) в растворе, содержащем 0,1 мл 1 М натрий-ацетатного буфера (рН 4,5), 1,5 мл этанола и 0,4 мл этилацетата,

перемешивали с 250 мг сорбента (микрористаллический, 0,29 мэкв/г) 10 ч при 20°, фильтровали, промывали на фильтре водно-спиртовым раствором ацетата натрия до отсутствия поглощения при 260 нм (~30 мл). В объединенных фильтратах содержалось ~5% исходного соединения (IV). Для десорбции 100 мг полученной целлюлозы промывали на колонке 0,1 М раствором α -кетоглутаровой кислоты, рН 3,6 (NaOH), со скоростью 0,5 мл/ч. ТСХ элюата обнаружен чистый продукт (IV) (не более 5% нуклеотидсодержащих примесей). Отдельным опытом на примере изопропилиденаденозина доказана устойчивость изопропилиденовой защиты в условиях опыта.

Иммобилизация рибозо-5-фосфата (V) на АВ-целлюлозе проведена по методике, аналогичной описанной для производного (I). Для анализа продукта (V) в элюатах использовали высокочувствительную реакцию с аминоксиданином с последующей хроматографией по методике [25], на хроматограммах и в иммобилизованном виде на сорбенте соединение (V) обнаруживали реакцией с молибдатом аммония.

Взаимодействие полинуклеотидов с АВ-целлюлозой (типовая методика). Аликвоты, содержащие по 1 г АВ-целлюлозы (тонковолокнистая) и 75 ОЕ₂₆₀ фрагментированной и денатурированной ДНК в 15 мл 0,1 М натрий-ацетатного буфера (рН 5,0), перемешивали небольшим плавающим магнитом на магнитной мешалке. В фиксированные промежутки времени суспензию одной аликвоты фильтровали через стеклянный фильтр, сорбент промывали на фильтре 25 мл трис-HCl-буфера (рН 8,0). По поглощению объединенных фильтратов рассчитывали количество нуклеотидного материала и по разности с исходной величиной определяли ковалентное связывание в разные промежутки времени. После 48 ч инкубации связывание денатурированной ДНК количественное. При проведении опыта с неденатурированной ДНК за 48 ч в тех же условиях связалось менее 10% нуклеотидного материала.

Аналогично проводили иммобилизацию РНК, poly(A), poly(C) (см. рис. 1).

Данные по ковалентному связыванию poly(C) за 15—75 мин в 0,1 М натрий-ацетатном буфере (рН 3,8—5,8) использовали для определения зависимости скорости ковалентного связывания от рН (см. рис. 2, 1).

Определение ионной сорбции poly(C) на АВ-целлюлозе (рис. 2, 2). К аликвотам, содержащим по 10 ОЕ₂₆₀ poly(C) в 2 мл 0,1 М натрий-ацетатного буфера (рН 3,8—5,8), добавляли по 150 мг АВ-целлюлозы (тонковолокнистая). Суспензию интенсивно встряхивали 1,5 мин, фильтровали, в элюате определяли количество нуклеотидного материала и по разности с исходной величиной рассчитывали ионную сорбцию.

Иммобилизация poly(U) на АВ-целлюлозе. 1 г АВ-целлюлозы (тонковолокнистая, 0,29 мэкв/г) в 5 мл 0,1 М натрий-ацетатного буфера (рН 5,0), содержащего 170 ОЕ₂₆₀ poly(U), суспендировали 120 ч. Сорбент промывали как описано выше и в объединенных фильтратах определяли D₂₆₀. С сорбентом связалось 130 ОЕ₂₆₀ poly(U). В аналогичном опыте из 11 ОЕ₂₆₀ с 120 мг АВ-целлюлозы за 48 ч связалось 6 ОЕ₂₆₀.

Модификация АВ-целлюлозы α -кетоглутаровой кислотой. 50 мг (0,36 ммоль) α -кетоглутаровой кислоты растворяли в 60 мл 0,05 М ацетата натрия, добавляли 8,0 г АВ-целлюлозы (микрористаллическая, 0,29 мэкв/г) и перемешивали 4 ч при 20°. Целлюлозу фильтровали, промывали 50 мл 0,1 М ацетата натрия, водой, спиртом, эфиром и сушили в вакууме. Полученная целлюлоза содержала 0,09 мэкв/г COOH-групп и 0,24 мэкв/г H₂NO-групп.

Взаимодействие цитидина и СМР с АВ-целлюлозой и сорбентом, модифицированным α -кетоглутаровой кислотой. Пробы, содержащие 100 мг сорбента, 2 мл 0,1 М натрий-ацетатного буфера (рН 5,0) и 20 ОЕ₂₆₀ нуклеотидного материала, инкубировали при перемешивании в течение 3—180 ч при 25°. По окончании инкубации смесь фильтровали через стеклян-

ный фильтр и сорбент промывали на фильтре 10 мл 0,2 М трис-НСl-буфера (рН 8,0). Спектрофотометрически определяли содержание нуклеотидного материала в филтрататах, по разности рассчитывали ковалентное связывание (см. рис. 3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Недоспасов А. А., Хомутов Р. М. (1978) Изв. АН СССР. Сер. хим., 962—964.
2. Кнорре Д. Г., Мызина С. Д., Саядахчиев Л. С. (1964) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., 11, 133—148.
3. Robberson D. L., Davidson N. (1972) Biochemistry, 7, 2809—2813.
4. Скрябин К. Г., Варламов В. П., Захаров В. М., Рогожин Р. В., Баев А. А. (1976) Биоорган. химия, 2, 1416—1421.
5. Недоспасов А. А., Хомутов Р. М. (1976) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2113—2115.
6. Недоспасов А. А., Хомутов Р. М. (1976) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1136—1141.
7. Hansske F., Sprinze M., Cramer F. (1974) Bioorgan. Chem., 3, 367—376.
8. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симукова Н. А., Турчинский М. Ф., Шибасва В. Н. (1970) Органическая химия пуклениновых кислот, с. 485—510, «Химия», М.
9. Kochetkov N. K., Budowsky E. I., Shibaeva R. P. (1963) Biochim. et biophys. acta, 68, 493—496.
10. Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Шибасва Р. П., Монастырская Т. С., Кочетков Н. К. (1968) Молекулярн. биология, 2, 329—338.
11. Budowsky E. I., Sverdlow E. D., Monastyrskaya G. S. (1969) J. Mol. Biol., 44, 205—207.
12. Недоспасов А. А., Хомутов Р. М. (1975) Кристаллические ферменты: методы получения, их характеристика и использование (тез. докл.), с. 83, Вильнюс.
13. Joyce K. M., Knowles J. R. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 60, 1278—1285.
14. Будовский Э. И., Симукова Н. А., Шибасва Р. П., Кочетков Н. К. (1965) Биохимия, 30, 902—908.
15. Budowsky E. I., Sverdlow E. D., Shibaeva R. P., Monastyrskaya G. S. (1971) Biochim. et biophys. acta, 246, 300—319.
16. Недоспасов А. А., Хомутов Р. М. (1977) Биохимия, 42, 700—705.
17. Gutcho S. (1968) Biochim. et biophys. acta, 157, 77.
18. Gullam J. C., Teuer G. M. (1971) in Methods in Enzymology (Colowick S. P., Kaplan N. O., eds.), v. 20, p. 55, Acad. Press, N. Y.
19. Pflizner K. E., Moffat J. G. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 3027.
20. Biochemical Preparations (1961) Meister A., ed., 8, 8—11.
21. Хомутов Р. М. (1961) Ж. общ. химии, 31, 1991—1995.
22. Stanley C. W. (1964) J. Chromatogr., 16, 467—475.
23. Stephenson M. L., Zamecnik P. C. (1967) in Methods in Enzymology (Grossman L., Moldave K., eds.), v. 12-A, p. 674, Acad. Press, N. Y.
24. Radlowski M., Augustyniak J. (1974) FEBS Lett., 43, 112—115.
25. Недоспасов А. А., Хомутов Р. М. (1976) Тезисы докладов на III Всесоюзной конференции по аналитической химии органических соединений, с. 43—44, «Наука», М.

Поступила в редакцию
2.IX.1977

После доработки
2.XII.1977

NUCLEOSIDE AND NUCLEIC ACID IMMOBILIZATION ON AMINOXY-ADSORBENTS

NEDOSPASOV A. A., KHOMUTOV R. M.

Institute of Molecular Biology,

Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The aminoxy-butylcellulose (AB-cellulose) application is reported for immobilizing periodate-oxidized nucleosides, their mono-, di-, and triphosphates, as well as tRNA, poly(A), poly(U), and S-adenosyl-L-homocysteine. Other possibilities for nucleotide immobilization through saccharide residues were exemplified with isopropylidene-5'-deoxy-5'-oxoadenosine and ribose 5'-phosphate. At pH 5 non-oxidized cytidine derivatives and cytidine-containing polynucleotides were shown to react easily with AB-cellulose via cytidine moieties, whereas immobilization of poly(A) and poly(U) proceeded at a considerably lower rate. In order to attain selective immobilization AB-cellulose was subjected to modification with α -ketoglutaric acid, which resulted in enhanced rate for immobilization of positively-charged components. A possibility for developing highly selective sorbents on this basis is discussed.