



УДК 547.963.32.04 + 543.544.8

**НОВЫЙ ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ИММОБИЛИЗАЦИИ
РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И НУКЛЕОТИДОВ НА АГАРОЗЕ***Устав М. В., Ремме Я. Л., Линд А. Я.**Лаборатория молекулярной биологии Тартуского государственного университета**Виллемс Р. Л.-Э.**Лаборатория молекулярной генетики Института физики Академии наук ЭССР,
Тарту*

Приведена методика синтеза аффинных сорбентов, содержащих иммобилизованные нуклеотиды и полинуклеотиды. Синтез включает три этапа: 1) активация агарозы эпихлоргидрином в щелочной среде, 2) присоединение дигидразида адипиновой кислоты к активированной эпоксигруппами агарозе, 3) сочетание ацилгидразидной группы с 2',3'-окисленной рибозой нуклеотида или полинуклеотида. Возможно получение аффинных сорбентов, содержащих высокие количества лиганда и имеющих очень малую способность к неспецифическим взаимодействиям с белками и нуклеиновыми кислотами.

Олиго- и полинуклеотиды являются субстратами ряда ферментов и служат аллостерическими регуляторами многих комплексных биохимических систем. Иммобилизация компонентов нуклеиновых кислот на перерастворимых носителях дает возможность изучать их взаимодействие с различными ферментами (белками), а также использовать носители, содержащие РНК (ДНК), в качестве сорбентов для аффинной хроматографии белков.

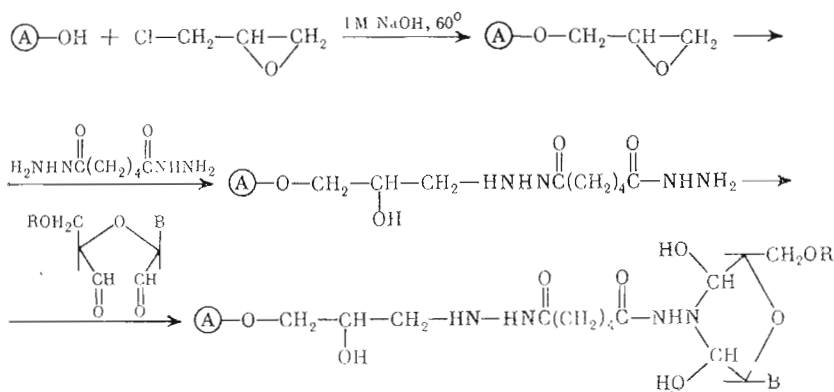
Многие описанные методы иммобилизации заключаются в связывании нуклеиновой кислоты с носителем под действием УФ-излучения или же в результате реакций активированных группировок матрицы с основаниями нуклеиновой кислоты [1]. В итоге получают сорбенты, на которых нуклеиновая кислота пришита многими участками молекулы. Ясно, что это ведет к изменению третичной и вторичной структуры пришитой нуклеиновой кислоты. Методы, согласно которым иммобилизация происходит по определенным участкам молекулы нуклеиновой кислоты, например по 2'(3')-гидроксигруппе рибозы или 5'-фосфатной группе [2—10], позволяют синтезировать аффинные сорбенты, содержащие нуклеиновую кислоту в состоянии, близком к нативному. Об этом свидетельствуют экспериментальные данные, показывающие идентичность свойств иммобилизованной и свободной нуклеиновых кислот [11—13].

В подавляющем большинстве случаев в качестве исходного носителя используют активированные бромцианом агарозу или другие природные и синтетические матрицы. Однако, хотя положительные стороны данного метода активации несомненны, при реакции первичных аминов с бромциан-

активированными носителями образуются N-замещенные изомочевины, являющиеся заряженными при pH ниже 10,4 [14]. Полученные таким способом аффинные сорбенты взаимодействуют с белками [15, 16] и нуклеиновыми кислотами неспецифически при низких ионных силах.

Наиболее перспективным методом исходной активации носителей является обработка последних 1-хлор-2,3-эпоксипропаном (эпихлоргидрином) или бисоксираном [17, 18]. В процессе активации происходит поперечное связывание молекул агарозы, повышающее химическую стабильность гелей, а происходящее в щелочных условиях реакции десульфатирование агарозектина, загрязняющее промышленные препараты агарозы, позволяет получить гель, свободный от заряженных групп. Активированный эпоксигруппами сорбент пригоден для иммобилизации лигандов, содержащих amino-, thio- или гидроксильные группы [18—20].

Недавно нами была описана методика иммобилизации РНК и нуклеотидов на активированной бисоксираном [1,4-бис(2,3-эпоксипропокс)бутан]агарозе при помощи дигидрида адипиновой кислоты [11, 12]. В настоящем сообщении мы приводим методику иммобилизации РНК и нуклеотидов на агарозе, активированной эпихлоргидрином. Этапы ковалентного связывания представлены на схеме.



Для начальной активации носителя (A) эпихлоргидрином использовали ранее описанную методику [17, 18]. На следующем этапе проводили реакцию дигидрида адипиновой кислоты с реакционноспособными эпоксигруппами модифицированной агарозы. Полученная гидразид-агароза является стабильной. При длительном хранении в нейтральном буфере при 4° она не теряет способности ковалентного связывания окисленных нуклеотидов. Известно, что ацилгидразидная группа имеет pK ниже 4 [21], т. е. при физиологических значениях pH гидразид-агароза не содержит заряженных группировок. Таким образом, синтезированная гидразид-агароза имеет очень малую способность к неспецифическим электростатическим взаимодействиям с белками и нуклеиновыми кислотами. Неспецифические гидрофобные взаимодействия «ножки» исключены ввиду гидрофильности последней.

Иммобилизация РНК и нуклеотидов на данной агарозе по 2',3'-положениям окисленной рибозы проводилась по ранее опубликованной методике [11]. Результаты ковалентного связывания представлены в таблице. Как видно, сорбенты, полученные со всеми использованными нами типами агароз, в одинаковой мере эффективно связывали окисленные нуклеотиды и РНК. Иммобилизации неокисленных нуклеотидов не наблюдалось.

Изучение свойств синтезированных аффинных сорбентов показало, что при хранении в течение нескольких месяцев освобождения РНК не наблюдалось, что свидетельствует о прочности иммобилизации.

Иммобилизация нуклеотидов и полинуклеотидов к гидразид-сефарозе

Сефароза	Количество мкмоль/мл геля		Нуклеотидный материал		
	эпоксигрупп	гидразидных групп	соединение	количество, ОЕ ₂₆₀ /мл геля	
				прибавлено	связано
2В	16	9,6	АТР	80	57
			ГТР	75	60
			тРНК	72	69
			MS2 РНК	24	16
			poly(A) *	38	30
4В	26	15	АТР	130	102
			АДР	167	142
			АМР	173	156
			ГТР	120	90
			ГДР	100	89
			ГМР	121	96
			СМР	81	65
			тРНК	92	79
			Неокисленная		
			ГДР	120	0
			poly(U) *	45	35
6В	58	32	ГТР	160	100
			ГДР	157	130

* Poly(A) и poly(U) дефосфорилировали щелочной фосфатазой в буфере 0,1 М трис-НСl (рН 8,7), 10 мМ MgCl₂ при 37°.

Аффинный сорбент, содержащий ГТР, был использован нами для выделения аффинной хроматографией фактора элонгации Tu из пострибосомального супернатанта разрушенных клеток *Escherichia coli* MRE 600 при низкой ионной силе. Белок, элюирующийся раствором 0,4 мМ ГДР в этом же буфере, был физически однородным, что следовало из результатов электрофореза в полиакриламидном геле по Лямбли [22] и по Говарду и Трауту [23]. Сорбции посторонних белков на колонку не обнаружили (данные не приводятся).

Таким образом, предложенный простой и эффективный метод иммобилизации нуклеотидов и РНК существенно расширяет возможности использования аффинной хроматографии в исследованиях для изолирования различных ферментов и других белков, а также для выделения комплементарной ДНК. Синтезированная гидразид-агароза может быть исходным продуктом при синтезе многих типов аффинных сорбентов [24]. Количество иммобилизованного на агарозе лиганда можно варьировать прибавлением разных объемов эпихлоргидрина при начальной активации [18] или количеством прибавленного окисленного лиганда.

Экспериментальная часть

Использованы коммерческие препараты Sepharose 2В, 4В, 6В (Pharmacia, Швеция). Нуклеотиды, poly(A) и poly(U) (Reanal, Венгрия) применялись без дополнительной очистки. РНК фага MS2 была любезно предоставлена нам проф. Э. Я. Греном (Институт органического синтеза АИ ЛатвССР). Транспортную РНК печени крысы выделили по ранее опубликованной методике [25].

1-Хлор-2,3-эпоксипропан (эпихлоргидрин) перегоняли и собирали фракцию с т. кип. 117—118°/756 мм рт. ст. Все использованные неорганические соединения имели марку х.ч. или выше.

Дигидразид адипиновой кислоты синтезировали по методике Вилхека и Ламеда [8] из диэтилового эфира адипиновой кислоты и гидразингидрата

(98%) и кристаллизовали дважды из смеси вода — этиловый спирт (т. пл. 175—177°).

Масса клеток *E. coli* MRE 600 (предназначенная для выделения рибосом) была приобретена в ВНИИ прикладной биохимии (г. Олайне, ЛатвССР).

Активация агарозных гелей проведена по описанной методике [17, 18]. Сефарозу 2В, 4В или 6В промывали на стеклянном фильтре бидистиллированной водой. После удаления лишней воды гель суспендировали в 2 объемах 1М NaOH. К суспензии прибавили при перемешивании 0,2 объема эпихлоргидрина, температуру повысили до 60° и реакцию проводили при перемешивании суспензии в течение 2 ч. После окончания реакции гель охладили до комнатной температуры и промывали бидистиллированной водой до нейтральной реакции промывного раствора. Продукт не подлежит длительному хранению [18].

Для синтеза гидразид-агарозы эпоксиагароза была суспендирована при 20° в 2 объемах 0,1 М Na-карбонатного буфера (рН 9,5), насыщенного дигриазидом адипиновой кислоты (~ 14 г/100 мл). Реакционную смесь перемешивали 12—16 ч (20°), после чего гель тщательно промывали на стеклянном фильтре попеременно бидистиллированной водой и 0,3 М NaCl. Синтезированную гидразид-агарозу хранили в бидистиллированной воде (прибавив каплю толуола) при 4°. Перед использованием геля для иммобилизации нуклеотидного материала гидразид-агарозу промывали бидистиллированной водой и 0,1 М Na-ацетатным буфером, рН 5,8.

Нуклеотиды окисляли метаперодатом натрия по методике Вилхека и Ламеда [8] в 0,1 М Na-ацетатном буфере (рН 5,8) при 4° в течение 1 ч в темноте (окислитель — нуклеотид 0,9 : 1,0). Аналогично окисляли полинуклеотиды (окислитель — РНК 200 : 1). Непрореагировавший метаперодат натрия удаляли трехкратным пересаживанием РНК этанолом из 0,1 М Na-ацетатного буфера, рН 5,8.

Иммобилизацию окисленных нуклеотидов и РНК на гидразид-агарозе осуществляли в 0,1 М Na-ацетатном буфере (рН 5,8), суспензию перемешивали 4—12 ч при 4° с прибавленным окисленным лигандом. После окончания реакции гель промывали тем же буфером и 1 М NaCl, промывные растворы объединяли и спектрофотометрически определяли в них количество непрореагировавшего нуклеотида или РНК (см. таблицу).

Содержание эпокси групп в эпихлоргидридном активированном геле устанавливали по опубликованной методике [18], содержание гидразидных групп — титрованием 0,005 М HCl, используя титриграф TTT1d/SBR2c/ABU1c (Radiometer, Дания). Ошибка при титровании составляла примерно 20% от среднего значения, приведенного в таблице. Количество геля (в мл) определяли после центрифугирования суспензии при 400 об/мин в течение 5 мин на центрифуге К-23.

Фактор элонгации Ti выделяли согласно методике, описанной в работе [10]. Нами была использована GTP-сефароза 6В. Все процедуры выделения проводились в буфере 10 мМ трис-HCl (рН 7,5), 100 мМ NH₄Cl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ 2-меркаптоэтанол при 4°.

Авторы приносят глубокую благодарность проф. Э. Я. Грену за предоставление препарата фага MS2, а также своим коллегам Л. С. Уускюла, М. Ю. Саарма, Т. О. Пюсса и А. Х. Метспалу за критические замечания при проведении и написании этой работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Potuzak H., Dean P. D. G. (1978) FEBS Lett., 88, 161—166.
2. Gilham P. T. (1968) Biochemistry, 7, 2809—2813.
3. Erhan S., Northrup L. G., Leach F. R. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 646—652.
4. Rickwood D. (1972) Bioclim. et biophys. acta, 269, 47—50.
5. Носова В. В., Вельмога И. С., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1974) Докл. АН СССР, 219, 1134—1136.

6. Robberson D. L., Davidson N. (1972) *Biochemistry*, **11**, 533—537.
7. Lamed R., Levin Y., Wilchek M. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **304**, 231—235.
8. Wilchek M., Lamed R. (1974) in: *Methods in Enzymology* (Jacoby E., Wilchek M., eds.), vol. 34, pp. 475—479.
9. Guilford H., Larsson P.-O., Mosbach O. (1972) *Chemica Scripta*, **2**, 165—170.
10. Jacobson G. R., Rosenbusch J. P. (1977) *FEBS Lett.*, **79**, 8—10.
11. Ustav M., Villems R., Lind A. (1977) *FEBS Lett.*, **82**, 259—262.
12. Устав М. Б., Линд А. Я., Саарма М. Ю., Виллемс Р. Л.-Э. (1977) *Биоорганическая химия*, **3**, 1699—1701.
13. Burell H. R., Horowitz J. (1975) *FEBS Lett.*, **49**, 306—309.
14. Svensson B. (1973) *FEBS Lett.*, **29**, 167—169.
15. Hofstee B. H. J. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **53**, 1137—1144.
16. Hjertén S. (1973) *J. Chromatogr.*, **87**, 325—331.
17. Sundberg L., Porath J. (1974) *J. Chromatogr.*, **90**, 87—98.
18. Axen R., Drevin H., Carlsson J. (1975) *Acta chem. scand.*, **B29**, 471—474.
19. Porath J., Janson J., Låås T. (1971) *J. Chromatogr.*, **60**, 167—177.
20. Porath J. (1973) *Biochimie*, **55**, 943—951.
21. In: *Tables of rate and equilibrium constants of heterogenic organic reactions* (1976) (Palm V., ed.), vol. 2, part 1, p. 26, Moscow.
22. Laemmli U. K. (1970) *Nature*, **227**, 680—685.
23. Howard G. A., Traut R. R. (1974) in: *Methods in Enzymology* (Moldave K., Grossmann L., eds.), vol. 30, part F, pp. 526—539.
24. Wilchek M. (1974) in: *Immobilized Biochemical and Affinity Chromatography*, pp. 15—31, New York, London.
25. Виллемс Р. Л.-Э., Линд А. Я. (1971) *Уч. зап. Тартуск. гос. ун-та*, **285**, 82—87.

Поступила в редакцию
18.VII.1978

A NEW EFFICIENT ROUTE TO IMMOBILIZATION OF RIBONUCLEIC ACIDS AND NUCLEOTIDES ON AGAROSE

USTAV M. B., REMME J. L., LIND A. J., VILLEMS R. L.-E.

*Laboratory of Molecular Biology, Tartu University, Tartu,
Laboratory of Molecular Genetics, Institute of Physics,
Academy of Sciences of the Estonian SSR, Tartu*

A simple and efficient route for immobilizing oligo and polynucleotides was suggested. During initial activation of agarose gels (Sephacrose 2B, 4B or 6B) by epichlorohydrine cross-linking of gel beads and hydrolysis of sulphoester groups take place. These reactions make the agarose beads chemically more stable and the removing of the sulphoester groups reduced the probability of non-specific interactions between the matrix and the substances during affinity chromatography. Epichlorohydrine-activated agarose gels were thereupon reacted with adipic acid dihydrazide. The synthesized compound functions as a hydrophilic, long and non-charged (acylhydrazides have $pK < 4$) spacer arm between the matrix and the sodium metaperiodate-oxidized RNA or nucleotides.