



УДК 661.183.1+547.244+547.476.2+547.963.32

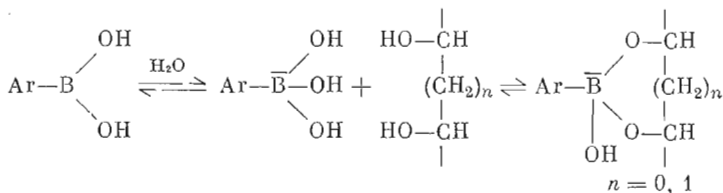
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРОВ, СОДЕРЖАЩИХ ГРУППЫ *n*-АМИНОМЕТИЛФЕНИЛБОРНОЙ КИСЛОТЫ, ДЛЯ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ И РАЗДЕЛЕНИЯ СМЕСЕЙ АЛЬДОНОВЫХ КИСЛОТ И НУКЛЕОЗИДПОЛИФОСФАТОВ

Колодкина И. И., Евстигнеева Н. А., Мамонтова Т. А.,
Гриднева В. С., Юркевич А. М.

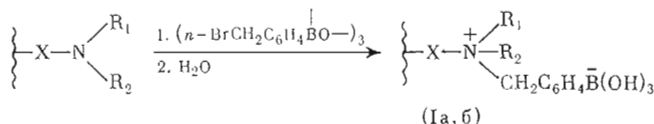
Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва

Определены константы устойчивости комплексов альдоновых кислот с фенилборной кислотой. На примере сополимера *N*-винилпирролидона с *N,N*-диметил-*N*-(*n*-метилфенилдиоксборил)аминоэтилметакрилата при использовании в качестве лигандов аденозина и тРНК изучен процесс комплексообразования ионообменных бор-полимеров с нуклеозидами и полинуклеотидами. Выяснено, что растворы $MgCl_2$ увеличивают специфичность связывания бор-полимерами *цис*-диолов, содержащих кислотные группы, в частности тРНК и аденозинполифосфатов. Изучено хроматографическое поведение на *N,N*-диэтил-*N*-(*n*-метилфенилдиоксборил)аминоэтилсефадексе А-25 (ДЕВАЕ-сефадекс А-25) *L*-идоновой и *D*-глюконовой кислот. С учетом различий в связывании бор-полимерами аденозина и тРНК изучена возможность использования ДЕВАЕ-сефадекса А-25 для фракционирования аденозина, АМР, АДФ, АТР; показаны некоторые преимущества применения ДЕВАЕ-сефадекса А-25 сравнительно с анионитами типа дауэкс-1 и ДЕАЕ-сефадекса А-25.

Использование полимеров, содержащих остаток замещенной борной кислоты, основано на способности анионов борониевых кислот давать комплексы с соединениями, имеющими *цис*-гликольные группировки:



Модификацией ДЕАЕ-сефадекса А-25 и сополимера *N*-винилпирролидона и *N,N*-диметил-*N*-аминоэтилметакрилата *n*-бромметилфенилбороксолом мы получили полимеры (Ia, б), содержащие *N,N*-диалкил-*N*-(*n*-метил-



а) $X = \text{CH}_2\text{CH}_2$, $R_1 = R_2 = \text{C}_2\text{H}_5$

б) $X = \text{COOCH}_2\text{CH}_2$, $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$

фенилдиоксидборил)аминоалкильные и ионообменные *N,N*-диалкиламиноалкильные группы. Степень модификации составила 50—60% [1, 2].

Было выяснено, что полимеры такого типа приобретают способность прочно удерживать рибонуклеотиды и олигорибонуклеотиды и извлекать их таким образом из смеси с 2'(3')-дезоксинуклеотидами [3, 4], а также разделять смеси углеводов, содержащих *цис*-гликольные группы, но различающихся рядом конформационных и структурных особенностей [5].

Продолжая работы по использованию полимеров типа (I) как специфических сорбентов полиоксисоединений, мы изучили связывание ими *цис*-диолов, содержащих анионные группы: альдоновых кислот, тРНК, нуклеозидфосфатов.

Ранее было найдено, что хроматографическое поведение углеводов и нуклеозидов хорошо согласуется с устойчивостью их комплексов с мономерными арилборными кислотами [3, 5—8]. В связи с этим были определены константы устойчивости K_c комплексов *L*-идоновой и *D*-глюконовой кислот с фенилборной кислотой. Можно было предположить [9], что наибольшей склонностью к образованию циклических производных с арилборными кислотами будут обладать гидроксильные группы при С2- и С4-атомах в случае *D*-глюконовой и при С3- и С5-, С2- и С4-атомах в случае *L*-идоновой кислот.

Образование и устойчивость циклических комплексов альдоновых кислот с фенилборной кислотой изучали методом рН-метрии [6, 7]. Образование комплексов в области рН 3,0—8,5, сопровождающееся уменьшением рН растворов, наблюдали сразу же при сливании водных растворов веществ. Молярное соотношение сахар—фенилборонатный буфер во всех случаях составляло 1:1. Максимальное значение Δ рН при исходном рН 7,5 достигало в случае *L*-идоновой кислоты 1,06, а для *D*-глюконовой кислоты — 1,2 рН. Полученные значения Δ рН использовали для вычисления равновесной концентрации комплексного аниона и констант устойчивости методом, описанным ранее [6]. Оказалось, что фенилборонатные комплексы альдоновых кислот образуются в отличие от комплексов рибонуклеозидов [6] уже в кислых растворах при рН 4,5 и наиболее устойчивы при рН 7,5. При более высоких величинах рН значения K_c уменьшаются, что связано с проявлением электростатического отталкивания реагирующих анионов. Константы устойчивости комплексов двух изомерных альдоновых кислот близки, но при всех значениях рН с *L*-идоновой кислотой они несколько меньше, чем с *D*-глюконовой (рис. 1). По-видимому, одной из причин указанных различий может быть дополнительное син-аксиальное взаимодействие между ОН-группами при С2—С4-атомах в молекуле *L*-идоновой кислоты.

Для изучения процесса комплексообразования с полинуклеотидами, содержащими незамещенные *цис*-гликольные группы, определяли методом гель-фильтрации константы связывания (K_c) суммарной тРНК дрожжей (далее тРНК) водорастворимым сополимером *N*-винилпирролидона и *N,N*-диметил-*N*-(*n*-метилфенилдиоксидборил)аминоэтилметакрилата (Iб) [10]. Для того чтобы выяснить, как влияют фосфатные группы на связывание *цис*-диолов полимерами такого типа, в аналогичных условиях определяли константу связывания аденозина. Для определения K_c сополимер (Iб) обрабатывали раствором аденозина или тРНК и образовавшиеся при этом комплексы хроматографировали на термостатированных колонках, содержащих гели. В случае аденозина применяли полиакриламидный гель акрилекс Р-6, в случае тРНК — биогель Р-150. Соотношение эквивалентов $V^-(\text{OH})_2$ -групп и 2',3'-*цис*-групп аденозина брали из расчета 2,3:1. Учитывая, что связывание *цис*-диолов, содержащих анионные группы, возможно и за счет ионного взаимодействия, для тРНК соотношение изменяли до 33:1—37:1. Хроматографирование комплекса с аденозином проводили в 0,1 М ацетате натрия (рис. 2), комплекса с тРНК — в 0,1 М хлориде натрия (рис. 3а) и в 0,1 М хлористом натрия, содержащем 0,1 М хло-

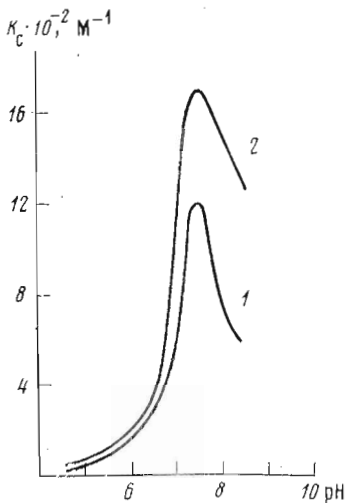


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость от pH констант устойчивости (K_c) комплексов *L*-тироновой (1) и *D*-глюкоаминовой (2) кислот с фенолборной кислотой

Рис. 2. Гель-фильтрация сополимера *N*-винилпирролидона и *N,N*-диметил-*N*-(*n*-метилфенилдиоксиборил)аминоэтилметакрилата (1б) в присутствии аденозина на полиакриламидном геле акрилекс Р-6 (колонка 1,4×40 см): 1 — комплекс полимера (1б) с аденозином; 2 — аденозин. Элюция 0,1 М ацетатом натрия

Рис. 3. Гель-фильтрация борполимера (1б) в присутствии тРНК на биогеле Р-150 (колонка 1,4×57 см): а — в 0,1 М NaCl; б — в 0,1 М NaCl, содержащем 0,1 М MgCl₂. 1 — комплекс полимера (1б) с тРНК; 2 — тРНК

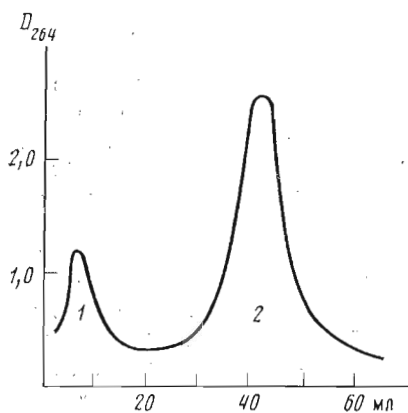


Рис. 2

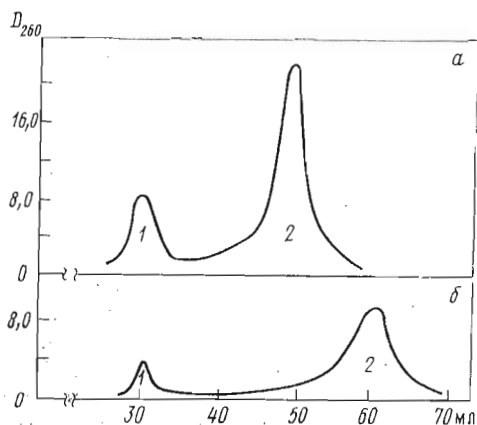


Рис. 3

ристый магний (рис. 3б). Для уменьшения взаимодействия нуклеозида (или полинуклеотида) с матрицей геля колонку во всех случаях предварительно уравнивали тем же раствором, содержащим соответствующий нуклеозид (или полинуклеотид). Кривые элюции состояли из 2 пиков. Первый пик с объемом выхода (V_e), равным V_e полимера (1б), соответствовал связанному нуклеозиду (или полинуклеотиду), второй — избыточному, свободному нуклеозиду. Объемы выхода полимера, аденозина и тРНК устанавливали соответствующими контрольными опытами. Константу связывания (K_c) определяли методом [10] по уравнению

$$K_c = \frac{[\text{ПБ}N]}{[\text{ПБ}]_{\text{св}} [N]_{\text{св}}},$$

где $[\text{ПБ}]_{\text{св}} = [\text{ПБ}]_{\text{поли}} - [\text{ПБ}N]$ — концентрация свободной формы борполимера, $[N]_{\text{св}}$ — концентрация свободной формы нуклеозида (или полинуклеотида), $[\text{ПБ}N]$ — концентрация комплекса нуклеозида (или полинуклеотида) с полимером. Так как комплекс продвигался по колонке, уравновешенной нуклеозидом с концентрацией $[N]_{\text{св}}$, увеличение концентрации нуклеозида относительно $[N]_{\text{св}}$ было равно количеству нуклео-

зида, связанного с полимером $[ПВН] = [N]_{полн} - [N]_{св}$. Константу связывания вычисляли для фракций первого пика, содержащих наиболее высокие концентрации полимера и лиганда.

Связывание полимером аденозина обусловлено именно образованием комплекса, так как избыточные аминогруппы полимера непосредственно с нуклеозидом не взаимодействуют, поэтому численные значения константы связывания и комплексообразования ($6,81 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) в данном случае совпадают. Для тРНК величина K_c , являющаяся суммарной константой связывания полинуклеотида по *цис*-гликольской и фосфатным группам, выше ($5,71 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$), но в 0,1 M NaCl, содержащем 0,1 M MgCl₂, уменьшающий неспецифическое ионное связывание [11], приближается по своему значению ($8,9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) к K_c аденозина. Большие значения констант связывания указывают на возможность использования полимера (Iб) для выделения веществ, содержащих *цис*-гликольские группы, методом гель-фильтрации.

Для хроматографического разделения альдоновых кислот используют сильные аниониты, элюцию проводят боратными или ацетатными буферами [12, 13]. Недостатком применяемых методов является низкая емкость полимеров относительно углеводного материала и необходимость использования больших объемов элюирующих растворов. Небольшие различия в константах устойчивости фенолборатных комплексов *L*-идоновой и *D*-глюконовой кислот позволили предположить, что связывание кислот борполимерами (I) будет различно. Хроматографическое поведение кислот изучили на *N,N*-диэтил-*N*-(*n*-метилфенилдиоксиборил)аминоэтилсефадексе А-25 (DEBAE-сефадексе А-25, Ia).

Первоначальные опыты фракционирования смеси кислот и их кальциевых солей проводили, применяя солевые растворы, pH < 5,0. При этом выяснили, что кислоты в отличие от ранее изучаемых углеводов [5] прочно удерживались полимером не только в нейтральных, но и в слабокислых средах. Столь прочное удерживание полимером (Ia) *D*-глюконовой и *L*-идоновой кислот может быть объяснено тем, что вещества связаны с полимером как за счет образования комплексов с диоксиборильными группами, так и за счет дополнительного ионного взаимодействия. Кроме того, по-видимому, в процессе хроматографирования на борсодержащем полимере (Ia) равновесие между лактонами и кислотой в отличие от равновесия в водных растворах смещается в сторону кислоты, образующей более прочный комплекс. Изменение соотношения аномерных и конформационных форм углеводов при хроматографировании на борсодержащих полимерах наблюдалось и ранее, при исследовании пиранозно-фуранозной конверсии глюкозы [5] и при превращении глюкозы во фруктозу [14].

Как видно из рис. 1, наибольшие различия в устойчивости фенолборатных комплексов наблюдаются у кислот в области pH 7,5–8,0. Можно было предположить, что свойства комплексов альдоновых кислот с диоксиборильными группами полимера будут аналогичными. В связи с этим было проведено фракционирование кислот в нейтральных растворах, содержащих буру. Выделение веществ в этом случае осуществляли за счет лигандного замещения с использованием растворов увеличивающейся концентрации хлористого натрия и буры (рис. 4). Анализ фракций проводили методом ГЖХ после предварительной лактонизации и силилирования. Полного разделения альдоновых кислот этим методом достичь не удалось. Оценку содержания изомерных кислот проводили методом нормирования. Было установлено, что первые фракции содержали больше *L*-идоновой, конечные — *D*-глюконовой кислоты. Так, количество *L*-идоновой кислоты в 1,25 раза больше в первых, а *D*-глюконовой в 2,5 раза больше в последних фракциях сравнительно с содержанием изомеров в исходной смеси. Применение более пологого градиента бората и хлористого натрия, увеличение количества полимера, наконец, уменьшение скорости хроматографирования не привели к полному разделению смеси. По-видимому, неболь-

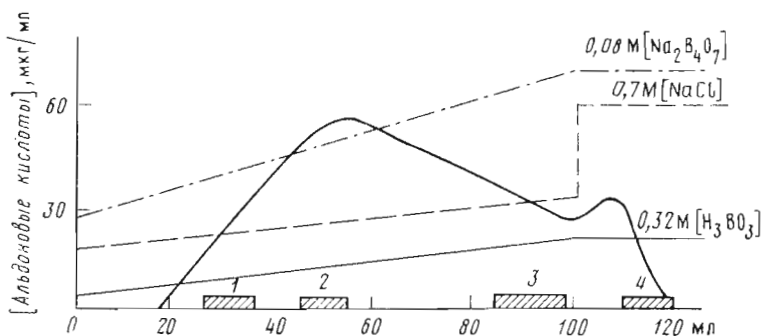


Рис. 4. Хроматография смеси *L*-идоновой и *D*-глюконовой кислот на колонке (0,5×41 см) с ДЕВАЕ-сефадексом А-25 (Ia) (CH_3COO^-) в градиенте концентраций H_3BO_3 , NaCl и $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. 1–4 – фракции для ГЖХ-анализа

шие различия в устойчивости полимерных арилборонатных комплексов оказались недостаточными для фракционирования кислот в изучаемых нами условиях.

Как уже отмечалось, константа связывания тРНК полимером (Iб) больше соответствующей константы для аденозина, что указывало на возможность хроматографического разделения на ДЕВАЕ-сефадексе А-25 (Ia) аденозина, аденозин-5'-моно-, ди- и трифосфатов, константы устойчивости фенилборонатных комплексов которых близки [6], но количество заряженных групп в отличие от изомерных альдоновых кислот различно.

Для хроматографии использовали полимер (Ia) в ацетатной и Cl^- -формах (таблица). На ацетатной форме полимера выделение нуклеотидного материала проводили ацетатными буферными растворами (рН 5,0). При этом выяснили, что нуклеотиды за счет дополнительного ионного связывания удерживаются полимером (Ia) прочнее аденозином и могут быть выделены растворами с более высокой ионной силой (опыт 1). Напротив, при хроматографии в растворе MgCl_2 ионообменные свойства полимера (Ia) выражены слабее и сорбция аденозинфосфатов, так же как аденозина, обусловлена в основном лишь образованием комплексов с диоксиборильными группами. Выделение нуклеотидного материала происходило в более мягких условиях, но разделение смеси оказалось невозможным. Положительные результаты получили при последовательном использовании ацетатных растворов и тех же растворов, содержащих MgCl_2 (опыт 2). В этом случае концентрация ацетата аммония, необходимая для выделения АТР, может быть уменьшена с 1,0 до 0,2 М.

При использовании Cl^- -формы полимера (Ia) применяли солянокислые растворы и те же растворы, содержащие хлористый литий. Удерживаемость аденозина и АМР полимером (Ia) в этих условиях близка, что затрудняло их разделение. Лучшие результаты получили с 0,003 М HCl , содержащей 0,025 М LiCl (опыт 3), или при последовательном использовании 0,003 М HCl и градиента концентрации LiCl в 0,003 М HCl (опыт 4), но и в этих условиях добиться полного разделения смеси не удалось. АМР, АДФ и АТР выделяли в условиях градиентной элюции (опыт 5–7).

Сравнение результатов фракционирования на полимере (Ia) и ДЕВАЕ-сефадексе А-25 показало, что удерживаемость изучаемых веществ бор-полимером выше вследствие его комплексообразующих свойств. Особенно наглядно это видно на примере аденозина, который не может быть выделен с полимера (Ia), в отличие от ДЕВАЕ-сефадекса, при промывке колонки водой. Вместе с тем выделение аденозинполифосфатов со смолы дауэкс-1, содержащей аналогично полимеру (Ia) четвертичные аммониевые группы, наблюдали при большей концентрации элюирующего раствора, несмотря на то что связывание аденозинфосфатов бор-полимером обусловлено и образованием комплекса, и ионным взаимодействием. Причиной

Фракционирование смеси аденозина, АМР, АДР, АТР на ДЕВАЕ-сефадексе А-25, дауэксе 1×4 и ДЕАЕ-сефадексе А-25
Условия элюции в каждом опыте см. «Экспер. часть»

| Номер опыта | Полимер | Результаты фракционирования (элюирующая концентрация, выход, мол. % *) | | | |
|-------------|---|--|--|--|---|
| | | Аденозин | АМР | АДР | АТР |
| 1 | ДЕВАЕ А-25 (CH ₃ COO ⁻) | 0,17 М АсОНН ₄ , рН 5,0 (100,9) | 0,45 М АсОНН ₄ , рН 5,0 (102,6) | 0,74 М АсОНН ₄ , рН 5,0 (115,6) | 1 М АсОНН ₄ , рН 5,0 (80,9) |
| 2 | То же | 0,2 М АсОНН ₄ , рН 5,0 (100,3) | 0,45 М АсОНН ₄ , рН 5,0 (96,2) | 0,74 М АсОНН ₄ , рН 5,0 (106,4) | 0,2 М АсОНН ₄ , 0,1 М MgCl ₂ , рН 5,0 (97,4) |
| 3 | ДЕВАЕ А-25 (Cl ⁻) ** | 0,025 М LiCl *** (102,54) | 0,025 М LiCl (97,49) | | |
| 4 | То же | 0,003 М HCl (111,65) | 0,026 М LiCl (88,35) | | |
| 5 | ДЕВАЕ А-25 (Cl ⁻) | | 0,037 М LiCl (104,2) | 0,047 М LiCl (108,3) | 0,01 М LiCl в 0,05 М HCl (87,5) |
| 6 | То же | | | 0,035 М LiCl (107,4) | 0,195 М LiCl (92,6) |
| 7 | » | | 0,019 М LiCl в 0,02 М HCl (106,8) | 0,037 М LiCl в 0,02 М HCl (93,2) | |
| 8 | Дауэкс 1×4 (Cl ⁻) | | 0,085 М LiCl (109,7) | 0,13 М LiCl (109,3) | 0,23 М LiCl (81,0) |
| 9 | ДЕАЕ А-25 (CH ₃ COO ⁻) | H ₂ O (108,5) | 0,2 М АсОНН ₄ , рН 5,0 (113,85) | 0,44 М АсОНН ₄ , рН 5,0 (87,85) | 0,86 М АсОНН ₄ , рН 5,0 (89,8) |

* 100% соответствует количеству вещества, нанесенного на колонку.

** Разделение неполное.

*** Для LiCl везде, где не указано, раствор в 0,003 М HCl.

ослабления сорбционных свойств бор-полимера является биполярная структура его ионогенных групп. Указанная особенность строения бор-полимеров типа (I) дает возможность одновременно с фракционированием отделять нуклеотидный материал от примесей неорганических фосфатов, которые количественно удаляются при промывке колонки водой. Необходимо отметить, что отделение неорганического фосфата, удерживаемого анионитами, как правило, более прочно [15], от фракций АМР в ряде случаев невозможно [16, 17], что затрудняет выделение вещества в чистом виде.

По-видимому, возможность использования анионообменных бор-полимеров типа (I) не ограничится их применением для фракционирования нуклеозидполифосфатов, а может представить интерес для выделения ряда соединений, содержащих *цис*-гликольные и кислотные группы.

Экспериментальная часть

Для хроматографии использовали пластинки Silufol и системы растворителей: изопропиловый спирт — аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (А), *n*-пропиловый спирт — аммиак — вода, 20 : 12 : 3 (Б). Гель-фильтрацию проводили на колонке с сефадексом G-25, предварительно уравновешенной 0,1 M NH₄НСО₃, по методу [18]. Для отбора фракций применяли прибор Radi Rac (ЛКВ, Швеция). Объем выхода V_e при гель-фильтрации определяли как объем элюата, собранный с момента внесения вещества на колонку до появления фракции, соответствующей максимуму пика на кривой элюции.

Количественное определение диоксиборильных групп в растворах полимера (16) проводили спектрофотометрически в виде его комплекса с азометином «Н», имеющим максимум поглощения при 435 нм [19]; использовали стандартные растворы полимера с концентрацией 20, 30, 40 и 60 мкг/мл.

Процентное содержание кальциевых солей *L*-идоновой и *D*-глюконовой кислот в виде их комплексов с молибдатом натрия определяли поляриметрически. Количественное определение альдоновых кислот проводили спектрофотометрически при 570 нм [20] после обработки фракций периодатом натрия и хромотроповой кислотой; использовали стандартные растворы, содержащие 10, 20, 40 и 100 мкг/мл кальциевых солей *L*-идоновой и *D*-глюконовой кислот. Соотношение кислот во фракциях определяли после предварительного упаривания, лактонизации и силилирования методом ГЖХ на приборе «Хром-4» с детектором по теплопроводности (температура термостата 180°, колонка 2,5 м, неподвижная фаза SE-30, газ-носитель — гелий, скорость газа 30–40 мл/мин). Время удержания для лактонов *D*-глюконовой и *L*-идоновой кислот 17 мин 30 с и 19 мин соответственно. Потенциометрические измерения проводили на потенциометре рН-340 (погрешность ±0,005 рН, стабильность не ниже 0,05 единиц рН); спектрофотометрические — на спектрофотометре Specord (ГДР). Неорганический фосфор определяли молибдатным методом [21]. Для фракционирования использовали образцы аденозина и динатриевых солей нуклеотидов (Reanal, Венгрия), кальциевых солей *L*-идоновой и *D*-глюконовой кислот с содержанием 90 и 99% соответственно, тРНК — препарат суммарной дрожжевой тРНК, имеющей 10% акцепторной активности по валину.

N,N-Диэтил-N-(*n*-метилфенилдиоксиборил)аминоэтилсефадекс А-25 (DEBAE-сефадекс А-25, Ia) получали модификацией DEAE-сефадекса А-25 по методу [1]. Емкость по бору 1,5–1,6 мэкв/г. Сополимер N-винилпирролидона и N,N-диметил-N-(*n*-метилфенилдиоксиборил)аминоэтилметакрилата (16) [10] очищали гель-фильтрацией на полиакриламидном геле Р-6 (Reanal, Венгрии) или биогелях Р-150 и Р-30 (Bio-Rad, США). Емкость по бору 1,72 мэкв/г. УФ-спектр (в воде): λ_{max} 270 нм, ϵ 620 [2].

Определение констант устойчивости (K_c) комплексов *L*-идоновой и *D*-глюконовой кислот с фенолборной кислотой. Навески *L*-идоната и *D*-глюконата кальция растворяли в 1 М KNO_3 и хранили в виде 0,01 М растворов; 0,1 М раствор фенолборной кислоты доводили до нужных значений рН добавлением 2 М растворов KOH или HCl . В контрольных опытах использовали трис-буфер соответствующей молярности и рН. При определении депрессии рН (ΔpH) брали количества растворов реагентов, соответствующие молярному отношению фенолборной и альдоновой кислот 1 : 1. Измерения проводили в растворах с концентрацией фенолборной кислоты 9,1 мМ (рис. 1).

Комплексы сополимера *N*-винилпирролидона и *N,N*-диметил-*N*-(*n*-метилфенилдиоксиборил)аминоэтилметакрилата (Iб) с аденозином. Раствор 4 мг сополимера (Iб) в 0,3 мл 37,5 мкМ раствора аденозина в 0,1 М ацетате натрия (рН 7,5) смешивали с 0,8 мл 3,75 мМ раствора аденозина в том же буфере. Смесь нагревали 10–12 мин при 50° и оставляли на 24 ч в холодильнике. Раствор хроматографировали при 20° на колонке с полиакриламидным гелем акрилекс Р-6 (1,4×40 см), уравновешенной сначала 0,1 М ацетатом натрия, затем 37,5 мкМ раствором аденозина в 0,1 М ацетате натрия. Элюцию осуществляли последним буфером при 20° со скоростью 12,5 мл/ч; объем фракций 1,8 мл (рис. 2). Аликвоты трех фракций первого пика, содержащих наибольшую концентрацию аденозина, использовали для определения $[\text{ПВ}]$ и $[\text{ПВ}]_{\text{полн}}$. Вычисленные значения констант устойчивости $K_c \cdot 10^{-5}$ 6,93; 6,46; 7,96 M^{-1} . Среднее значение — 6,81 M^{-1} . Емкость по аденозину 34 мкмоль/г.

Комплексы полимера (Iб) с тРНК. а) Раствор 19,2 мг сополимера (Iб) в 0,4 мл 1,275 мкМ раствора тРНК в 0,1 М NaCl (рН 6,8) смешивали с 0,4 мл 2,55 мМ раствора тРНК в том же буфере, перемешивали 2 ч и хроматографировали на колонке с биогеом Р-150 (1,4×57 см), уравновешенной 1,275 мкМ раствором тРНК в 0,1 М NaCl , при 10° со скоростью 2,4 мл/ч. Объем фракций 1,2 мл (рис. 3а). $[\text{ПВ}]$ и $[\text{ПВ}]_{\text{полн}}$ определяли из пяти фракций первого пика. Вычисленные значения $K_c \cdot 10^{-6}$ 6,02; 5,92; 4,84; 6,50, среднее значение 5,71 M^{-1} . Емкость по тРНК 25 мкмоль/г. б) Раствор 19,3 мг сополимера (Iб) в 0,4 мл 1,255 мкМ раствора тРНК в 0,1 М NaCl , содержащем 0,1 М MgCl_2 (рН 6,5), смешивали с 0,4 мл 2,29 мМ раствора тРНК в том же буфере. Хроматографировали аналогично предыдущему. Объем фракций 0,8 мл (рис. 3б). Значения $K_c \cdot 10^{-5}$ 7,09; 8,86; 8,79; 9,0; 11,3, среднее значение 8,9 M^{-1} .

Хроматография *D*-глюконовой и *L*-идоновой кислот. а) На колонку с ДЕВАЕ-сефадексом А-25 (Iа) [1] (CH_3COO -форма, 0,5×11 см), уравновешенную 1 мМ раствором ацетата аммония, помещали 0,2 мл раствора ацетата аммония, содержащего 6 мг смеси кальциевых солей *D*-глюконовой и *L*-идоновой кислот в соотношении 0,82 : 1. Элюцию углеводного материала проводили со скоростью 30–35 мл/ч последовательно в градиенте концентрации ацетатного буфера: резервуар — 50 мл 0,3 М AcONH_4 , рН 4,0, смеситель — 50 мл 1 мМ AcONH_4 , рН 7,5; резервуар — 20 мл 1,0 М AcONH_4 , рН 4,0, смеситель — 20 мл 0,3 М AcONH_4 , рН 4,0; 50 мл 0,1 мМ HCl , рН 4,0; в градиенте NaCl и HCl : резервуар — 50 мл 1,0 М NaCl в 0,01 М HCl , рН 2,0, смеситель — 50 мл 0,1 мМ HCl , рН 4,0. Смесь веществ вымывалась острым пиком, соответствующим 0,38 М NaCl , рН 3,2.

б) Раствор, содержащий 200 мг кальциевых солей альдоновых кислот в 4 мл воды, обрабатывали при перемешивании катионитом КУ-2×8 (H^+), 0,2 мл полученного раствора помещали на колонку с полимером (Iа) и хроматографировали аналогично вышеописанному.

в) На колонку с полимером (Iа), уравновешенную боратным буфером, содержащим 0,045 М NaCl , 0,005 М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0,02 М H_3BO_3 , рН 7,4, помещали 0,2 мл раствора, содержащего 8 мг смеси кальциевых солей альдоновых кислот. Колонку промывали 20 мл того же буфера. Элюцию проводили последовательно в градиенте концентрации хлористого натрия, буры и

борной кислоты: резервуар — 50 мл раствора, содержащего 0,4 М NaCl, 0,32 М H₃BO₃, 0,08 М Na₂B₄O₇, pH 7,4, смеситель — 50 мл 0,3 М NaCl, 0,2 М H₃BO₃, 0,05 М Na₂B₄O₇, pH 7,4, и 30 мл раствора, содержащего 0,7 М NaCl, 0,32 М H₃BO₃, 0,08 М Na₂B₄O₇, pH 7,4 (рис. 4). Фракции 1—4 упаривали, обрабатывали 5 мл 2 М соляной кислоты, вновь упаривали, высушивали азеотропной отгонкой с метанолом и бензолом (3×5 мл), растворяли в 0,4 мл пиридина и отделяли от нерастворившегося осадка. К раствору добавляли 0,4 мл гексаметилдисилазана, 0,2 мл триметилхлорсилана, перемешивали 10 мин и анализировали методом ГЖХ. Содержание во фракциях углеводного материала и соотношение *L*-идоновой — *D*-глюконовой кислот: 1 — 10% 1,13 : 1; 2 — 23% 0,54 : 1; 3 — 15,86% 0,47 : 1; 4 — 1,4% 0,31 : 1.

Фракционирование нуклеотидов (см. таблицу). 1, 2. На колонку с ДЕВАЕ-сефадексом А-25 (Ia) (CH₃COO⁻, 0,8×16 см), уравновешенную водой, pH 6,3, помещали 5 мл раствора, pH 6,3, содержащего по 1 мг аденозина и динатриевых солей AMP, ADP, ATP. Колонку промывали 20—30 мл воды. Элюцию нуклеотидного материала проводили со скоростью 25—60 мл/ч (опыт 1) в градиенте концентрации ацетата аммония: резервуар — 100 мл 1 М AcONH₄, pH 5,0, смеситель — 100 мл 0,1 М AcONH₄, pH 5,0, или (опыт 2) последовательно 50 мл 0,2 М AcONH₄, pH 5,0, затем в градиенте концентрации AcONH₄: резервуар — 100 мл 1 М AcONH₄, pH 5,0, смеситель — 100 мл 0,2 М AcONH₄, pH 5,0; 50 мл 0,2 М AcONH₄, pH 5,0; 60 мл 0,1 М MgCl₂ в 0,2 М AcONH₄, pH 5,0. Для анализа фракции нуклеотидного материала (здесь и далее в опытах 3—9) нейтрализовали при охлаждении аммиаком и обрабатывали 10—15 г активированного угля ОУ марки А. Уголь тщательно промывали охлажденной водой и водно-спиртовым раствором аммиака (25% NH₃—C₂H₅OH—H₂O 10 : 50 : 40). Спиртово-аммиачный раствор упаривали и хроматографировали на силуфол в системах А и Б. Дополнительно после нейтрализации и концентрирования проводили гель-фильтрацию фракций на колонке с сефадексом G-25 (0,5×150 см) в 0,1 М NH₄HCO₃, в присутствии контрольных образцов аденозина, AMP, ADP, ATP.

3, 4. На колонку с полимером (Ia) (Cl⁻) помещали в условиях, аналогичных описанным выше, раствор смеси аденозина и динатриевой соли AMP. Колонку промывали 20—30 мл воды. Элюцию нуклеотидного материала проводили (опыт 3) 140 мл 0,025 М LiCl в 0,003 М HCl или (опыт 4) последовательно 130 мл 0,003 М HCl и в градиенте концентрации LiCl в 0,003 М HCl: резервуар — 100 мл 0,1 М LiCl в 0,003 М HCl, смеситель — 100 мл 0,003 М HCl.

5, 6, 7. На колонку с полимером (Ia) (Cl⁻) помещали раствор динатриевых солей аденозинфосфатов. Элюцию проводили (опыт 5) последовательно в градиенте концентрации LiCl в 0,003 М HCl: резервуар — 200 мл 0,1 М LiCl в 0,003 М HCl, смеситель — 200 мл 0,003 М HCl; 50 мл 0,1 М LiCl в 0,05 М HCl или (опыт 6) последовательно 190 мл 0,035 М LiCl в 0,003 М HCl и в градиенте концентрации LiCl в 0,003 М HCl: резервуар — 100 мл 0,4 М LiCl в 0,003 М HCl, смеситель — 100 мл 0,045 М LiCl в 0,003 М HCl или (опыт 7) в градиенте концентрации LiCl в 0,02 М HCl: резервуар — 100 мл 0,1 М LiCl в 0,02 М HCl, смеситель — 100 мл 0,02 М HCl.

8. На колонку с дауэксом 1×4 (Cl⁻, 0,8×16 см) помещали раствор динатриевых солей AMP, ADP, ATP. Элюцию нуклеотидного материала проводили в градиенте концентрации LiCl в 0,003 М HCl: резервуар — 200 мл 0,4 М LiCl в 0,003 М HCl, смеситель — 200 мл 0,003 М HCl.

9. На колонку с ДЕВАЕ-сефадексом А-25 (CH₃COO⁻) помещали в условиях, аналогичных опыту 1, раствор смеси аденозина и динатриевых солей AMP, ADP, ATP. Колонку промывали 30 мл воды. Элюцию нуклеотидного материала проводили 50 мл 0,2 М AcONH₄, pH 5,0, и в градиенте концентрации ацетата аммония: резервуар — 100 мл 1 М AcONH₄, pH 5,0, смеситель — 100 мл 0,2 М AcONH₄, pH 5,0.

На колонку с полимером (Ia) (CH_3COO^- или Cl^-) помещали в условиях, аналогичных опыту I, раствор смеси 1,5 мг фосфорной кислоты и 1 мг АМР. Колонку промывали 20–30 мл воды до отрицательной реакции на ион PO_4^{3-} . Элюцию АМР проводили в условиях, аналогичных опыту I или 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колодкина И. И., Вальковский Д. Г., Пичужкина Е. И., Иванова Е. А., Рогожин С. В., Юркевич А. М. (1976) *Высокомолекулярн. соед.*, **18A**, 47–51.
2. Колодкина И. И., Юркевич А. М., Паварин Е. Ф. (1976) *Высокомолекулярн. соед.*, **18A**, 490–493.
3. Иванова Е. А., Колодкина И. И., Юркевич А. М. (1974) *Ж. общ. химии*, **44**, 430–431.
4. Иванова Е. А., Колодкина И. И., Гринева Н. И., Тарусова Н. Б., Цилевич Т. Л., Готтих Б. П., Юркевич А. М. (1975) *Биохимия*, **40**, 204–206.
5. Yurkevich A. M., Kolodkina I. I., Ivanova E. A., Pichuzhkina E. I. (1975) *Carbohydr. Res.*, **43**, 215–224.
6. Иванова Е. А., Колодкина И. И., Юркевич А. М. (1974) *Ж. общ. химии*, **41**, 455–459.
7. Lorand J. P., Edwards J. O. (1959) *J. Org. Chem.*, **24**, 769–774.
8. Barker S. A., Chopra A. K., Hatt B. W., Somers P. J. (1973) *Carbohydr. Res.*, **26**, 33–40.
9. Стоддарт Д. (1975) *Стереохимия углеводов*, с. 121–127, «Мир», М.
10. Munn S. H., Mann J. D. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 2165–2170.
11. Rosenberg M., Wiebers J. Z., Gilham P. T. (1972) *Biochemistry*, **11**, 3623–3628.
12. Aoki I., Hori M., Matsumaru H. (1969) *Bunseki Kagaku*, **18**, 346–348; *Chem. Abstr.* (1969) **71**, 514.
13. Samuelson O., Wallenius L. O. (1963) *J. Chromatogr.*, **12**, 236–241.
14. Barker S. A., Hatt B. W., Somers P. J., Woodbury R. R. (1973) *Carbohydr. Res.*, **26**, 55–64.
15. Ohashi S., Tsuji N., Veno Y., Takeshita M., Muto M. (1970) *J. Chromatogr.*, **50**, 349–353.
16. Чарграфф Э., Дэвидсон Д. (1957) *Нуклеиновые кислоты*, с. 474, 480, Изд-во иностр. лит., М.
17. Duncan H. Y. (1971) *J. Chromatogr.*, **62**, 391–397.
18. Hohn T., Schaller H. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **138**, 466–473.
19. Шанина Т. М., Гельман Н. Э., Михайловская В. С. (1967) *Ж. аналитич. химии*, **22**, 782–787.
20. Spencer N. (1967) *J. Chromatogr.*, **30**, 566–571.
21. Hanes C. S., Isherwood F. (1949) *Nature*, **164**, 1107–1112.

Поступила в редакцию
25.VII.1978

После доработки
11.X.1978

APPLICATION OF POLYMERS CONTAINING *p*-AMINOMETHYLPHENYLBORONIC ACID GROUPS FOR POLYNUCLEOTIDE GEL-FILTRATION AND FRACTIONATION OF ALDONIC ACID AND NUCLEOSIDE POLYPHOSPHATE MIXTURES

KOLODKINA I. I., EVSTIGNEVA N. A., MAMONTOVA T. A.,
GRIDNEVA V. S., YURKEVICH A. M.

All-Union Vitamin Research Institute, Moscow

The stability constants of the complexes formed by aldonic acids with phenylboronic acid were determined. The complex formation of ion-exchange boron polymers with nucleosides and polynucleotides was studied using *N*-vinylpyrrolidone (SVP) and *N,N*-dimethyl-*N*-(*p*-methylphenyldihydroxyboronic)-aminoethylmetacrylate copolymer and adenosine and *t*-RNA as ligands. The MgCl_2 solutions were found to increase the specificity of boron-polymers association with *cis*-diols containing acidic groupings, namely *t*-RNA and adenosine polyphosphates. The chromatographic behaviour on *N*-diethyl-(*p*-methylphenyldihydroxyboronic)aminoethylsephadex A-25 (DEBAE-Sephadex A-25) of *L*-idonic and *D*-gluconic acids was studied. Taking into account the differences in adenosine and *t*-RNA binding to boron-polymers, the possibility of application of DEBAE-Sephadex A-25 for fractionating adenosine, AMP, ADP, and ATP, was examined, whereby some advantages of this resin in comparison with the Dowex-1 type anion-exchangers or DEAE-Sephadex A-25 were demonstrated.