



УДК 577.113.083 : 543.544

© 1991 г.

*Т. В. Абрамова, Н. В. Амирханов, В. В. Горн,
В. Ф. Зарытова, Е. И. Фролова, И. Г. Шишкина*

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК И БЛОКИРОВАННЫХ ПО МЕЖНУКЛЕОТИДНЫМ ФОСФАТАМ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР

Продемонстрированы широкие возможности аффинной хроматографии на примере выделения одноцепочечного фрагмента ДНК вируса клещевого энцефалита (302) и 34-членного олигонуклеотида из реакционных смесей, а также разделения смесей диастереомеров октатимидилата (модифицированного по межнуклеотидным фосфатам) на отдельные фракции диастереомеров, различающиеся по температуре плавления комплекментарных комплексов.

В настоящее время разработаны достаточно простые и эффективные методы синтеза олигодезоксирибонуклеотидов и их различных производных. Однако при получении таких соединений, как правило, образуется сложная реакционная смесь, где помимо примесей ненуклеотидной природы присутствуют фрагменты НК меньшей длины и «испорченные» — модифицированные в процессе синтеза и последующих обработок последовательности. Выделение целевого продукта чаще всего осуществляют с помощью ионообменной и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии или гель-электрофореза. Аффинная хроматография для этих целей использовалась редко и в основном для выделения гомогенных последовательностей [1].

Аффинная хроматография может оказаться перспективной для разделения нуклеиновых кислот и особенно блокированных по межнуклеотидным фосфатам олигонуклеотидов, используемых в качестве ингибиторов экспрессии генов [4]. Такие производные (например, этиловые эфиры и метилфосфонаты олигонуклеотидов) получают в виде трудноразделяемой обычными методами смеси диастереомеров, способных образовывать комплекментарные комплексы различной стабильности [3, 5]. Первые данные по аффинному разделению этиловых эфиров нонатимидилилуридина на фракции диастереомеров были получены на CNBr-сефарозе с иммобилизованной poly(A) [6].

В данной работе представлены результаты аффинной хроматографии гомо- и гетероолигодезоксирибонуклеотидов, полученных химически, одноцепочечного фрагмента ДНК (302 н. о.), а также блокированных по межнуклеотидным фосфатам октатимидилатов, с применением сорбентов на основе силикагеля с ковалентно иммобилизованными олигонуклеотидами.

Указанные носители были выбраны с учетом их химической стойкости и способности выдерживать высокое давление. Получение аффинных сорбентов, т. е. ковалентное присоединение олигонуклеотида к носителю, описано в работе [7]. Для этого 5'-фосфорилированный олигонуклеотид обрабатывали смесью трифенилфосфина и дипиридилдисульфида в присутствии N-метилимидазола и образующееся активированное производное

Сокращения: P_1 — LiChrosorb- NH_2 ; P_2 — Полисил СА [2]; $P-(pN)_{17}$ — сорбент с присоединенным гептадекануклеотидом; $P-(pN)_{18}$ — сорбент с присоединенным гексадекануклеотидом; p' и p'' соответствуют асимметрическим атомам фосфора; согласно [3], конфигурация фосфора в Tr'T была определена как S_p ; префикс «d» в обозначении дезоксирибоолигонуклеотидов опущен.

олигонуклеотида [8] добавляли к полимеру, содержащему алифатическую аминогруппу.

Аффинную хроматографию проводили в двух вариантах: на микроколонке с регистрацией оптической плотности на хроматографе «Милихром» и в статических условиях. Разрушение комплексов, образованных с участием олигонуклеотидов, связанных с полимером, осуществляли либо снижением ионной силы (промыть сорбента водой), либо повышением температуры колонки и буфера.

Для проверки аффинных свойств сорбентов через колонку с полимером, на который иммобилизован олигонуклеотид $(pA)_{16}$ ($\Pi_1-(pA)_{16}$), пропускали солевые растворы комплементарного $(pT)_8$ или некомплементарного $(pA)_{16}$ олигонуклеотидов. Затем полимер промывали водой. Аналогичная проверка сорбентов проводилась и в случае гетерогенных олигонуклеотидов. Во всех случаях наблюдалась сорбция только комплементарных олигонуклеотидов (рис. 1). Некомплементарные олигонуклеотиды элюировались с колонки в солевом буфере, а при промывке полимера водой оптическая плотность практически не регистрировалась. Это свидетельствует о том, что полученные сорбенты обладают аффинными свойствами и могут быть использованы для хроматографии олигонуклеотидов и их производных.

Аффинная хроматография может оказаться особенно полезной при выделении гетерогенных, достаточно протяженных (больше 30 звеньев) олигонуклеотидов, которые обычными хроматографическими методами выделить сложно и иногда (например, при отсутствии тритильной защитной группы в синтетических олигонуклеотидах) практически невозможно. Для выделения олигонуклеотидов могут быть использованы сорбенты с иммобилизованными относительно короткими олигонуклеотидными фрагментами, комплементарными 5'-концевому участку синтезируемого нуклеотида. Все более короткие, чем целевой олигонуклеотид, последовательности, присутствующие в реакционной смеси после синтеза и деблокирования олигонуклеотида, будут образовывать менее прочные комплексы с сорбентом либо не образовывать их вообще. Варьируя температуру или концентрацию соли при хроматографии, можно разделить олигонуклеотиды по их способности образовывать комплементарные комплексы, т. е. в данном случае по длине. Такой подход был реализован при выделении 34-звенного олигонуклеотида (N_{34}) — дезоксикопии фрагмента РНК вируса клещевого энцефалита (рис. 2), который был синтезирован в направлении $3' \rightarrow 5'$ фосфитамидным способом [9].

После удаления олигонуклеотидного материала с полимера и обработки аммиаком, с целью деблокирования гетероциклических оснований и фосфатных групп, часть реакционной смеси была обработана 80% уксусной кислотой для удаления диметокситритильной группы и подвергнута аффинной хроматографии на полимере $LiChrosorb-NH_2$ с соединенным 17-членным олигонуклеотидом, комплементарным 5'-концу 34-звенного фрагмента РНК (рис. 2). Из рис. 3 видно, что при $20^\circ C$ водой с аффинного сорбента элюируется не только целевой продукт, но и более короткие нуклеотиды. Это может быть объяснено малой разницей в стабильности образующихся олигонуклеотидных дуплексов при этих условиях. При $65^\circ C$ элюируется уже только 34-звенный фрагмент. Этот же 34-звенный олигонуклеотид из другой части реакционной смеси выделяли с помощью двух обращенно-фазовых ВЭЖХ (первая хроматография —

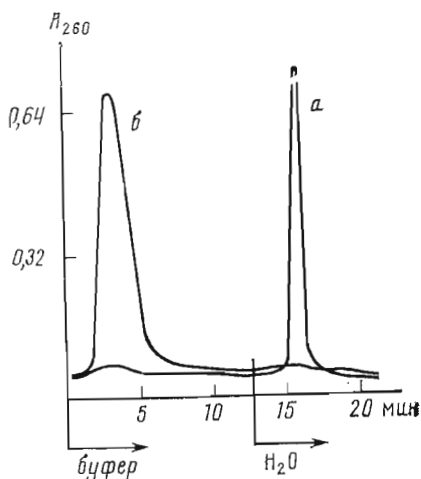


Рис. 1. Профили элюции $(pT)_8$ — 11,3 нмоль (а) и $(pA)_{16}$ — 5 нмоль (б) с 12 мг сорбента $\Pi_1-(pA)_{16}$, содержащего 32,5 нмоль олигонуклеотида (колонка 2×40 мм)

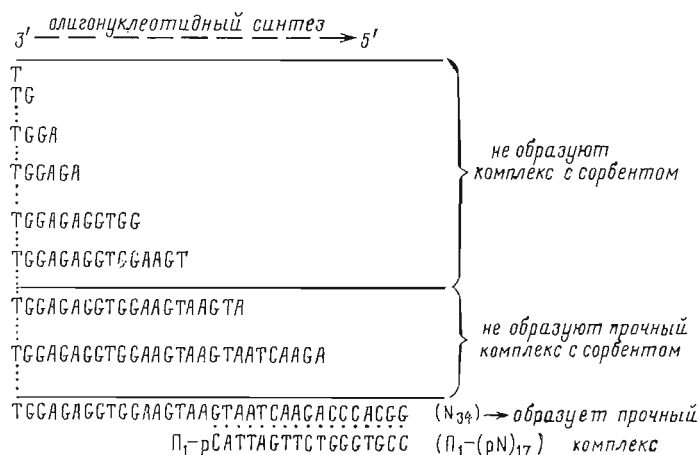


Рис. 2. Возможный набор олигонуклеотидов, образующийся при синтезе целевого продукта (N₃₄), присутствующий при хроматографии на аффинном сорбенте Π₁-(pN)₁₇

до удаления тритильной защитной группы, вторая — после удаления) [10]. Чистоту выделенных разными способами олигонуклеотидов контролировали гель-электрофорезом в 20% ПААГ с 8 М мочевиной, предварительно вводя радиоактивную ³²P-метку в 5'-конец олигонуклеотидов с помощью Т4-полинуклеотидкиназы [11]. Видно (рис. 3), что 34-звенный олигонуклеотид, выделенный аффинной хроматографией, содержит меньше примесей, чем этот же олигонуклеотид, выделенный с помощью ВЭЖХ.

Кроме синтетических олигонуклеотидов с помощью аффинной хроматографии можно выделять фрагменты ДНК из смесей, получающихся при расщеплении ДНК ферментами рестрикции. Так, была выделена 302-звенная одноцепочечная ДНК, соответствующая по структуре фрагменту РНК вируса клещевого энцефалита, с помощью иммобилизованного на сорбент Π₂ гексадекануклеотида, комплементарного участку 259—274. Участок связывания фрагмента ДНК с аффинным сорбентом Π₂-(pN)₁₆ (где pN)₁₆ = = pTGACCCTCTCCCATTT) представлен на схеме, полная структура этого фрагмента (302 н. о.) приведена в работе [12]. Из авторадииограммы

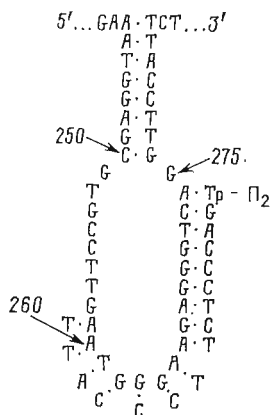


рис. 4) видно, что аффинная хроматография позволяет разделить реакционную смесь, образующуюся при получении 302-членного нуклеотидного фрагмента и содержащую [α-³²P]АТР и другие фрагменты нуклеиновых кислот. Таким образом, продемонстрирована принципиальная возможность выделения нуклеиновых кислот, содержащих одноцепочечные участки с помощью аффинных сорбентов.

В настоящей работе аффинные сорбенты применены и для разделения блокированных по межнуклеотидным фосфатам олигонуклеотидов, представляющих собой смесь диастереомеров. Предварительно было показа-

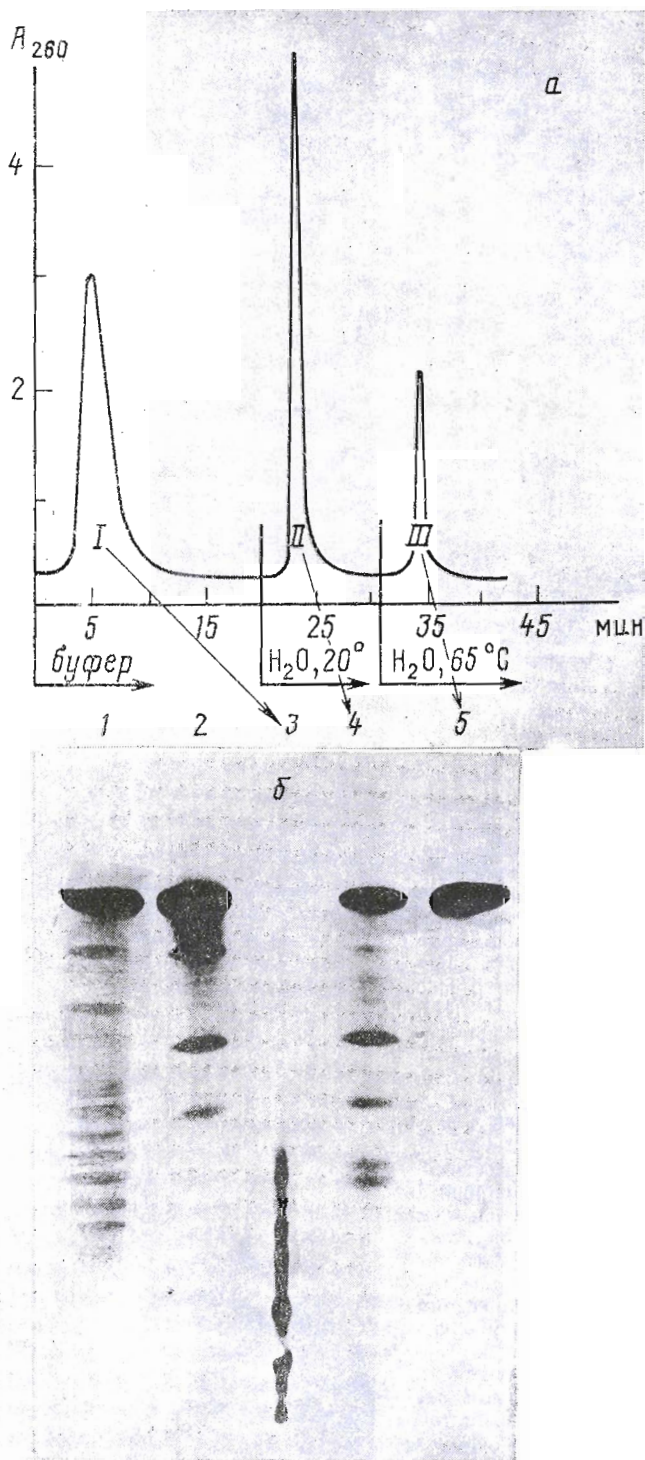
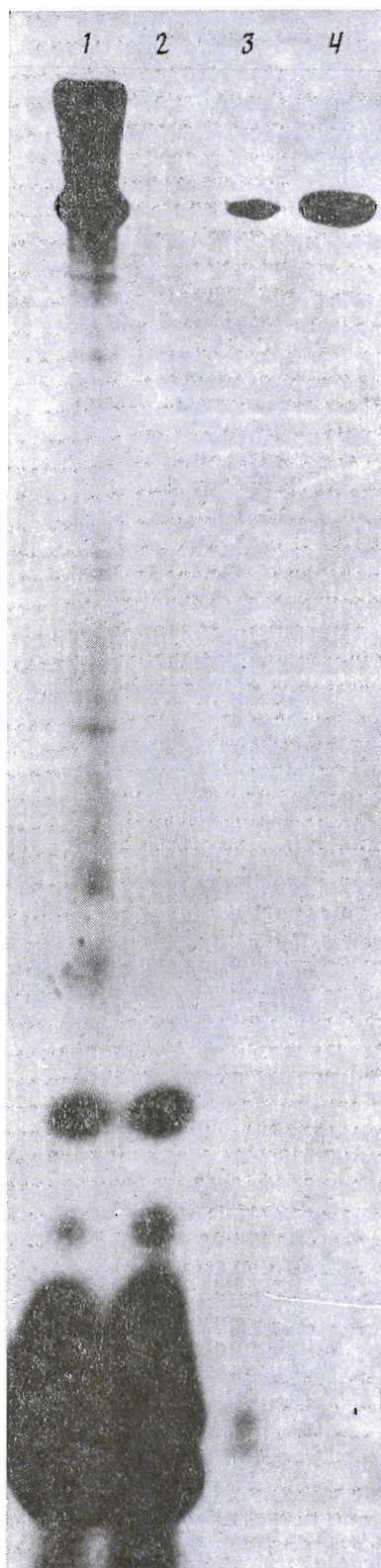


Рис. 3. Хроматография реакционной смеси, полученной при синтезе олигонуклеотида N_{34} (см. рис. 2), на аффинном сорбенте $P_1-(pN)_{17}$ и анализ полученных продуктов денатурирующим гелем-электрофорезом: *a* — профиль элюции $0,8 \text{ OE}_{260}$ (40 мкг) реакционной смеси после завершения синтеза N_{34} с колонки ($2 \times 40 \text{ мм}$), содержащей 14 мг $P_1-(pN)_{17}$ (14 нмоль гептадекаолигонуклеотида); *б* — результаты анализа продуктов аффинной хроматографии денатурирующим электрофорезом в 20% ПААГ с 8 М мочевиной (^{32}P -метка введена в $5'$ -конец олигонуклеотида после проведения хроматографии); *I* — реакционная смесь после синтеза и деблокирования олигонуклеотида N_{34} ; *2* — N_{34} после выделения за тритильную защитную группу с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ ($0 \rightarrow 20\% \text{ CH}_3\text{CN}$, в $0,05 \text{ М LiClO}_4$, $0,1\%$ триэтиламин) и последующего детритилирования; дорожки *3–5* соответствуют пикам (*I–III*), выделенным из реакционной смеси с помощью аффинной хроматографии

Рис. 4. Результаты анализа продуктов аффинной хроматографии фрагмента ДНК денатурирующим электрофорезом в 6% ПААГ с 8 М мочевиной. Хроматографию одноцепочечной ДНК гибридного бактериофага М13 (0,6 ОЕ₂₆₀) после гидролиза рестриктазой *Bam*HI и введения ³²P-метки в 3'-конц фрагмента ДНК (смесь 1, дорожка 1) осуществляли на 14 мг сорбента П₂-(pN)₁₆, содержащем 22 нмоль олигонуклеотида. 2 — продукты, не сорбирующиеся на П₂-(pN)₁₆ при нанесении смеси 1 в солевом буфере, 3 — продукт из смеси 1, сорбирующийся на П₂-(pN)₁₆ в солевом буфере и выделенный при промывке этого аффинного сорбента водой при 65° С, 4 — 302-членный нуклеотидный фрагмент, предварительно выделенный гель-электрофорезом



но, что индивидуальные диастереомеры этиловых эфиров октатимидилата по-разному взаимодействуют с аффинными сорбентами. Синтез и выделение изомеров [Tr'(Et)Tr]₄ и [Tr''(Et)Tr]₄ с чередующимися триафирными и диафирными межнуклеотидными группировками был описан ранее [3].

С poly(A) эти изомеры образуют комплексы разной стабильности: для $[\text{Tr}'(\text{Et})\text{Tr}]_4$ температура плавления комплекса составляет 6°C , для $[\text{Tr}''(\text{Et})\text{Tr}]_4$ — 29°C [3]. Из данных, приведенных на рис. 5, видно, что при нанесении изомера $[\text{Tr}'(\text{Et})\text{Tr}]_4$ на колонку с полимером $\Pi_1\text{-(pA)}_{14}$ в солевом буфере при 10°C олигонуклеотид быстро элюируется этим солевым буфером, т. е. не образует прочного комплекса с $\Pi_1\text{-(pA)}_{14}$. Изомер $[\text{Tr}''(\text{Et})\text{Tr}]_4$ при тех же условиях сорбируется на этом полимере, т. е. образует прочный комплекс с $\Pi_1\text{-(pA)}_{14}$, который можно разрушить в бессолевых условиях (рис. 5). Полученные данные свидетельствуют, что диастереомеры этилированных олигонуклеотидов, способные образовывать комплементарные комплексы различной стабильности, могут быть разделены на аффинных сорбентах.

Аффинная хроматография была использована для разделения смеси диастереомеров метилфосфонатных аналогов октатимидилата на фракции изомеров, различающихся по температуре плавления. Смесь восьми изомеров $\text{TrTrTr}(\text{CH}_3)\text{TrTr}(\text{CH}_3)\text{TrTr}(\text{CH}_3)\text{Tr}(\text{SCH}_3)$ наносили при 0°C в солевом буфере на полимер, содержащий ковалентно пришитый $(\text{pA})_{16}$, и выдерживали при этой температуре 5 мин. Часть олигонуклеотидного материала смывалась солевым буфером при 0°C . Вероятно, это производные октатимидилата, не способные образовывать стабильные комплексы с $\Pi_1\text{-(pA)}_{16}$. Оставшуюся на колонке смесь изомеров элюировали солевым буфером, дискретно увеличивая температуру: 0, 10, 18, 24, 30, 39, 48 $^\circ\text{C}$. Как видно из рис. 6а, при повышении температуры элюируется нуклеотидный материал, т. е. происходит разрушение все более и более прочных комплексов, образованных $\Pi_1\text{-(pA)}_{16}$ и изомерами октатимидилата, которые имеют одинаковую структуру, но различаются конфигурацией заместителей при атомах фосфора. Подтверждением того, что смесь изомеров разделена по их способности образовывать комплементарные комплексы, служат следующие данные. Нуклеотидный материал каждой фракции образует комплементарные комплексы с $(\text{pA})_8$, причем, чем выше температура, при которой элюируется фракция диастереомеров с полимера, тем выше температура плавления соответствующей фракции с $(\text{pA})_8$ (см. данные $T^\circ\text{C}$ на рис. 6а). Хроматография октатимидилата $(\text{Tr})_7\text{Tr}(\text{SCH}_3)$, не имеющего диастереомеров, на том же сорбенте $\Pi_1\text{-(pA)}_{16}$ с дискретным изменением температуры не приводит к фракционированию последнего (рис. 6б). Согласно полученным данным, аффинная хроматография позволяет фракционировать олигонуклеотиды по их сродству к комплементарной матрице. Аффинные сорбенты могут быть легко регенерированы и использованы многократно. Такой подход можно использовать и в случае разделения гетерогенных блокированных по межнауклеотидным фосфатам олигонуклеотидов на фракции диастереомеров, обладающих близкими комплексообразующими свойствами.

Таким образом, использование аффинной хроматографии открывает широкие возможности для выделения индивидуальных нуклеиновых кислот, а также олигонуклеотидов и их аналогов.

Экспериментальная часть

В работе использовали N-ацил-3'-О-левулинил-5'-n-хлорфениловые эфиры 5'-моно- и динуклеотидов, 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид — продукты опытного химического производства НИОХ СО АН СССР; N-метилимидазол (Ega, ФРГ); дипиридилдисульфид (Fluka, Швейцария), трифенилфосфин (Chemapol, Чехо-Словакия). Остальные реактивы имели квалификацию х.ч. или ос.ч.

Олигонуклеотиды $(\text{pT})_8$, $(\text{pA})_{14}$, $(\text{pA})_{16}$, $\text{pCATTAGTTCTGGGTGCC}$, pTGACCCTCTCCCATTT синтезированы фосфотриэфирным методом из защищенных динуклеотидов [13]; остальные — на установке «Виктория-5М», фосфитаминым методом [9]. Все олигонуклеотиды выделяли ВЭЖХ с помощью хроматографа Altex-332 (США) на колонках размером $10 \times$

Рис. 5. Профиль элюции 2 нмоль этилированных олигонуклеотидов $[\text{Tr}'(\text{Et})\cdot\text{Tr}]_4$ (а) и $[\text{Tr}''(\text{Et})\text{Tr}]_4$ (б) при 10°C с 11 мг сорбента $\Pi_1\text{-(pA)}_{14}$, содержащего 37 нмоль олигонуклеотида (колонка 2×40 мм)

Рис. 6. Профиль ступенчатой элюции 5 нмоль смеси диастереомеров $\text{TrTrTr}\cdot(\text{CH}_3)\text{TrTrTr}(\text{CH}_3)\text{TrTr}(\text{CH}_3)\text{Tr}(\text{SCH}_3)$ (а) и 4 нмоль $(\text{Tr})_7\text{Tr}(\text{SCH}_3)$ (б). Сорбент — 36 мг $\Pi_1\text{-(pA)}_{16}$, содержащего 100 нмоль олигонуклеотида (колонка $2,5 \times 60$ мм). Для комплексов, образованных отдельными фракциями с $(\text{pA})_8$, указаны значения температур плавления

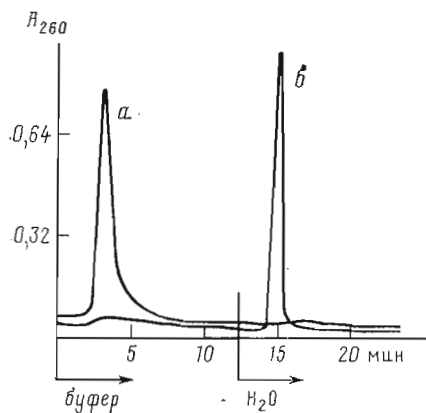


Рис. 5

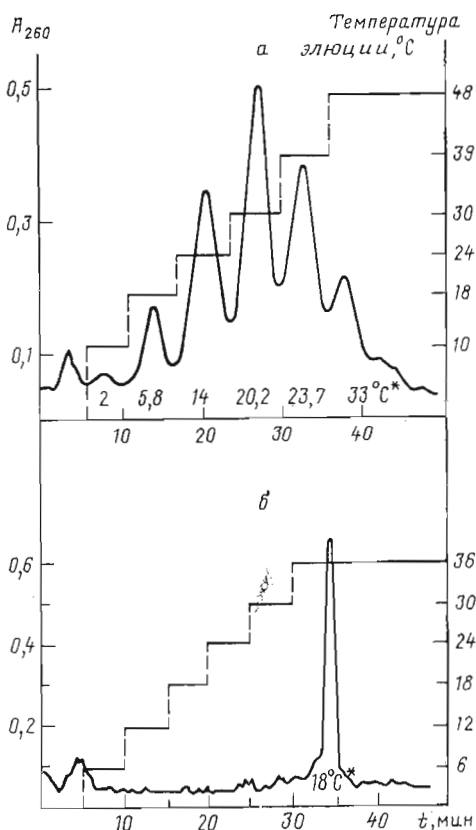


Рис. 6

$\times 250$ мм. В качестве носителя для ионообменной хроматографии использовали Partisil 10 SAX (Whatman, Англия), для обращенно-фазовой — LiChrosorb RP-18 (Merck, ФРГ). Этиловые эфиры октатимидилата были синтезированы по описанной ранее методике [3], метилфосфонатные производные октатимидилата — по [14].

В работе также был использован 302-членный нуклеотидный фрагмент ДНК, соответствующий по последовательности участку РНК вируса клещевого энцефалита. Фрагмент был клонирован и поработан в составе фага M13mp7 и любезно предоставлен С. В. Мамаевым. Выделение фрагмента ДНК и введение 3'-концевой ^{32}P -метки осуществляли согласно методике, описанной в работе [12].

В качестве носителя для иммобилизации применяли аминосиликагель: LiChrosorb- $\text{NH}_2(\Pi_1)$ (Merck, ФРГ), Полисил-CA [2] (Π_2). Аффинную хроматографию олигонуклеотидов проводили в солевом буфере — 0,5 М водный NaCl, 0,01 М MgCl_2 , 0,01 М трис-HCl, pH 7,5, используя хроматограф «Милихром» (г. Орел) и криостат МК-70 (Veb MLW, ГДР).

УФ-спектры олигонуклеотидов регистрировали на спектрофотометре Specord M40 (Carl Zeiss Jena, ГДР). Кривые плавления комплементарных комплексов олигонуклеотидов (концентрация во всех случаях $2,2 \cdot 10^{-5}$ М) регистрировали с помощью установки для исследования термической денатурации в ультратракромасштабе, созданной в НИБХ СО АН СССР на базе спектрофотометра «Обь-4». Плавление комплексов олигонуклеотидов с этиловыми эфирами октатимидилата осуществляли в 0,2 М водном NaCl, 0,01 М MgCl_2 , 0,01 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4; комплексов с метилфосфонатными производными октатимидилата в 0,2 М водном NaCl, 0,01 М MgCl_2 , 0,01 М трис-HCl, pH 7,0.

Количество иммобилизованного олигонуклеотида на сорбентах, полученных по методике работы [7], определяли с помощью кислотного гид-

ролиза. Для этого 20 мг полимера с иммобилизованным олигонуклеотидом обрабатывали 1 мл 0,5 М HCl и выдерживали 15 ч при 25° С. Полимер отфильтровывали и по данным оптического поглощения водного гидролизата (λ_{260}) определяли количество иммобилизованного олигонуклеотида. Это количество составляло от 0,1 до 5 мкмоль олигонуклеотида на 1 г носителя.

Общая методика аффинной хроматографии с помощью изменения концентрации соли. Термостатированную колонку с определенным количеством аффинного сорбента уравнивали солевым буфером и наносили 0,1—2 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида (комплементарного или некомплементарного к олигонуклеотиду, иммобилизованному на полимере) в 50 мкл солевого буфера. Колонку промывали этим же буфером до отсутствия оптического поглощения (при λ_{260}) в элюате. Образовавшийся комплементарный комплекс разрушали элюцией водой при той же температуре. Скорость нанесения, промывки и элюции была 30 мкл/мин. Профили элюции приведены на рис. 1.

Общая методика аффинной хроматографии с помощью градиента температур. Термостатированную колонку с аффинным сорбентом уравнивали солевым буфером и наносили 0,3—0,8 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида (индивидуального или смеси диастереомеров) в 50 мкл солевого буфера. Колонку промывали 200 мкл буфера, а затем повышали температуру колонки и элюирующего солевого буфера. Скорость нанесения, промывки и элюции была 30 мкл/мин. Характерный профиль элюции приведен на рис. 6.

Авторы глубоко признательны С. В. Мамаеву за любезно предоставленный препарат 302-членного нуклеотидного фрагмента ДНК, Н. В. Булычеву за помощь при плавлении комплементарных комплексов олигонуклеотидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chow T., Juby C., Yuen L. // *Anal. Biochem.* 1988. V. 175. № 1. P. 63—66.
2. Ястребов С. И., Попов С. Г. // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. № 5. С. 661—669.
3. Абрамова Т. В., Воробьев Ю. Н., Лебедев А. В. // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. № 10. С. 1335—1347.
4. Miller P. S., Braiterman L. T., Ts'o P. O. P. // *Biochemistry.* 1977. V. 16. № 9. P. 1988—1996.
5. Miller P. S., Dreon N., Pulford S., McParland K. B. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. № 20. P. 9659—9665.
6. Карпова Г. Г., Козлова Л. О., Пичко Н. П. // *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук.* 1983. № 7. Вып. 3. С. 96—100.
7. Дегтярев С. Х., Белагин П. А., Шишкина И. Г., Зарытова В. Ф., Гаврюченко Л. П., Морозов С. Н. // *Биоорган. химия.* 1989. Т. 15. № 3. С. 358—362.
8. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. № 4. С. 475—481.
9. Грязнов С. М., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Кумарев В. П., Левина А. С., Полищук А. С. // *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук.* 1987. № 2. Вып. 1. С. 119—123.
10. Adams S. P., Kavka K. S., Wykes E. J., Holder S. B., Galluppi G. R. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1983. V. 105. № 3. P. 661—663.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Молекулярное клонирование.* М.: Мир, 1984. С. 107—156.
12. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Плетнев А. Г., Подыминов М. А. // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. № 2. С. 240—247.
13. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. // *Биоорган. химия.* 1983. Т. 9. № 4. С. 516—521.
14. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф. // *Биополимеры и клетка.* 1989. Т. 5. № 1. С. 132—135.

Поступила в редакцию
31.VII.1989

После доработки
2.IV.1990

T. V. ABRAMOVA, N. V. AMIRKHANOV, V. V. GORN, V. F. ZARYTOVA,
E. I. FROLOVA, I. G. SHISHKINA

**AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF DNA FRAGMENTS AND P-MODIFIED
OLIGONUCLEOTIDES**

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,
Academy of Sciences of the USSR*

Affinity chromatography on covalently immobilized oligonucleotides has been used to isolate a fragment (302-mer) of the tick-borne encephalitis virus single-stranded DNA and an oligonucleotide (34-mer) from reaction mixtures, and to separate mixtures of octathymidylates modified at internucleotide phosphates into fractions of diastereoisomers.