



УДК 547.963.32

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ МЕЖДУ
СИНТЕТИЧЕСКИМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ,
ОДИН ИЗ КОТОРЫХ ИММОБИЛИЗОВАН НА НОСИТЕЛЕ

Ильина Е. В., Смирнов В. Д., Шабарова З. А.,
Прокофьев М. А.

*Химический факультет и Межфакультетская лаборатория биоорганической химии
Московского государственного университета и.м. М. В. Ломоносова*

Изучена сорбция тринуклеотида $d(pG-G-T)$, гексануклеотида $d(pG-G-T)_2$ и полинуклеотида $pU_n-(G-G-U)_4$ (где $n = 60-70$) на сорбентах (целлюлозе и гексаметилендиаминсефарозе), содержащих иммобилизованные олигодезоксирибонуклеотиды $d(pA-C-C)_n$, где $n = 2, 4, > 4$. Показана возможность применения таких сорбентов для разделения олиго- и полинуклеотидов путем десорбции последних в условиях градиента температуры.

В последние годы для выделения индивидуальных нуклеиновых кислот, некоторых ферментов нуклеинового обмена, а также изучения кодон-антикодонного взаимодействия успешно применяется метод аффинной хроматографии с использованием олиго- и полинуклеотидов, иммобилизованных на носителе [1-4]. Сродство выделяемых таким методом полинуклеотидов к сорбенту основано на их способности к образованию элементарных комплексов с иммобилизованными олигонуклеотидами. Для успешного развития работ в этом направлении необходимо располагать эффективными методами иммобилизации синтетических олигонуклеотидов и сведениями о свойствах элементарных комплексов, которые они образуют с олиго- и полинуклеотидами, находящимися в растворе.

Настоящая работа посвящена изучению условий комплексообразования олигодезоксирибонуклеотидов $d(pG-G-T)$ и $d(pG-G-T)_2$, а также полирибонуклеотида $pU_n-(G-G-U)_4$ (где $n = 60-70$) с $d(pA-C-C)_2$, $d(pA-C-C)_4$ и $d(pA-C-C)_{n>4}$, иммобилизованными на целлюлозе или ГМДА-сефарозе.

Наиболее распространенный метод иммобилизации олигодезоксирибонуклеотидов — ковалентное связывание их 5'-фосфатных групп с гидроксильными группами целлюлозы под действием ДЦГК в среде абсолютного растворителя [5] или ЦГМК в буферном растворе 2-(N-морфолино)-этилсульфоната натрия, pH 6,0 [6]. В 1974 г. В. В. Носовой и др. предложен удобный метод [7], предусматривающий образование фосфамидной связи между 5'-фосфатной группой олигонуклеотида, активированной образованием смешанного ангидрида с мезитиленкарбоновой кислотой [8], и аминогруппой ГМДА-сефарозы.]

Используемые сокращения: ДЦГК — дициклогексилкарбодимид; ЦГМК — N-циклогексил-N'-β-(4-метилморфолино)-этилкарбодимид; ГМДА-сефароза — гексаметилендиаминсефароза.

Таблица 1

Характеристика сорбентов с иммобилизованными олигодезоксирибонуклеотидами

Сорбент	Получение сорбента			Иммобилизованный олигонуклеотид, % к исходному	Емкость сорбента **
	носитель	реагент	олигонуклеотид		
(I)	Целлюлоза, СС-31	ДЦГК	d(pA-C-C) ₂	75	17,3
(II)	»	ЦГМК	d(pA-C-C) ₄	50	4,2
(III)	»	»	d(pA-C-C) ₂	50	15,5
(IV)	ГМДА-сефароза	МК *	d(pA-C-C) ₂	70	70
(V)	»	»	d(pA-C-C) _{n>4}	90	103

* МК — хлорагидрид мезитиленкарбоновой кислоты.

** Для сорбентов (I) — (III) в ОЕ₂₀₀ на 1 г носителя, для (IV), (V) — в ОЕ₂₀₀ на 1 мл носителя.

Таблица 2

Характеристика комплексообразования олиго- и полинуклеотидов с иммобилизованными олигодезоксирибонуклеотидами

Сорбент	Иммобилизованный на носителе олигонуклеотид		Сорбируемый олигонуклеотид	Сорбированный на колонке олигонуклеотид		T _{дес} **, °C	T _{пл} , °C (концентрация компонентов, M) [9]
	количество носителя *	количество иммобилизованного олигонуклеотида ОЕ ₂₀₀		нанесено ОЕ ₂₀₀	сорбировано ОЕ ₂₀₀		
(I)	0,5	8,65	d(pG-G-T)	1,2	Не сорбируется	—	Комплекс не обнаружен (10 ⁻²)
(II)	0,5	2,4	d(pG-G-T) ₂	0,5	То же	—	—
			d(pG-G-T)	1,0	5·10 ⁻³	15	20 (10 ⁻²) 12 (10 ⁻³)
			d(pG-G-T) ₂	0,5	5·10 ⁻³	10	27 (10 ⁻²) 20 (10 ⁻³)
(V)	0,5	54,5	pU _n -(G-G-U) ₄	300 000 ***	13 000	30	—
			d(pG-G-T)	1,1	7,5·10 ⁻³	18—20	—
			d(pG-G-T) ₂	0,5	7·10 ⁻³	23—25	—
			pU _n -(G-G-U) ₄	90 000 ***	4200	35	—

* Для сорбентов (I) и (II) — в г, для (V) — в мл. ** T_{дес} — температура десорбции. *** Количества полирибонуклеотида приведены в единицах радиоактивности (расп/мин).

Преимущество метода заключается в получении сорбента, в котором олигонуклеотид пространственно удален от поверхности носителя, что может повышать эффективность комплексообразования.

Иммобилизация олигонуклеотидов d(pA-C-C)₂, d(pA-C-C)₄ и d(pA-C-C)_{n>4} была осуществлена с использованием всех трех описанных методов (табл. 1).

Как видно из табл. 1, во всех случаях иммобилизация осуществляется с высоким выходом, который практически не зависит от длины цепи олигонуклеотида. Наибольшую емкость имеют препараты, полученные по методу [7].

Комплексообразование олиго- и полинуклеотидов с иммобилизованными на носителях олигодезоксирибонуклеотидами изучали, осуществляя сорбцию тринуклеотида d(pG-G-T), гексануклеотида d(pG-G-T)₂ и полирибонуклеотида pU_n-(G-G-U)₄ на колонках с сорбентом и исследуя устой-

чивость комплексов в условиях повышения температуры (линейный градиент). Результаты исследования и сведения о температурах плавления соответствующих комплексов в растворе, полученные ранее [9], приведены в табл. 2.

При пропускании через колонку с иммобилизованным гексануклеотидом $d(pA-C-C)_2$ растворов олигонуклеотидов $d(pG-G-T)$ и $d(pG-G-T)_2$ сорбции не наблюдалось, хотя и происходила некоторая задержка олигонуклеотида на колонке по сравнению с элюцией некомплементарного олигонуклеотида. Этот результат совпадает с результатами Астель и Смита [10, 11], которые отмечали зависимость эффективности десорбции олигодезоксирибонуклеотидов с олигонуклеотидсодержащих сорбентов от прочности образуемого комплементарного комплекса. Тринуклеотид $d(pG-G-T)$ не образует комплекса с гексануклеотидом $d(pA-C-C)_2$ в растворе (табл. 2) и, видимо, поэтому не сорбируется на колонке. Отсутствие сорбции гексануклеотида $d(pG-G-T)_2$ на колонке явилось неожиданностью, хотя такой результат можно объяснить хорошо известной способностью олигонуклеотидов с высоким содержанием гуаниловой кислоты к самоагрегации [12], которая возможна в условиях эксперимента (достаточно высокая ионная сила буфера и концентрация ионов Mg^{2+} и низкая температура). Вероятно, при пропускании раствора гексануклеотида через колонку с иммобилизованным $d(pA-C-C)_2$ происходит своеобразная конкуренция двух процессов — образования комплементарного комплекса $d(pA-C-C)_2 \cdot d(pG-G-T)_2$ и самоагрегации $d(pG-G-T)_2$. Если учесть, что молекулы $d(pA-C-C)_2$ находятся на носителе и удалены друг от друга, то, видимо, отсутствие сорбции в данном случае можно объяснить преобладанием процесса самоагрегации $d(pG-G-T)_2$.

При изучении комплексообразования $d(pG-G-T)$ с иммобилизованными $d(pA-C-C)_4$ и $d(pA-C-C)_{n>4}$ мы обнаружили, что в зависимости от скорости пропускания буфера через колонку при низкой температуре несорбированный олигонуклеотид вымывается различными объемами элюента (26 мл при скорости элюции 0,1 мл/мин и 56 мл при скорости 2 мл/мин).

Очевидно, для систем, содержащих сравнительно короткие олигонуклеотиды, важным условием существования комплекса является установление динамического равновесия. Поэтому даже при условии образования комплекса изменение концентрации одного из компонентов при пропускании буфера через колонку сразу же смещает равновесие в сторону разрушения комплекса и часть олигонуклеотида вымывается с колонки при низких температурах. С этим связана, видимо, и очень низкая фактическая комплексообразующая емкость колонок по сравнению с максимально возможной, рассчитанной по количеству иммобилизованного олигонуклеотида (табл. 2).

Имеются сведения, что при иммобилизации одного из компонентов устойчивость комплекса может повышаться [11, 13]. Мы не обнаружили такой стабилизации. Наоборот, в наших опытах температуры десорбции олигонуклеотидов с колонки ниже, чем температуры плавления соответствующих комплексов в растворе (рис. 1, а, б и табл. 2), что можно объяснить снижением концентрации одного из компонентов комплекса в условиях его элюции.

Общая закономерность изменения устойчивости комплексов в растворе и на колонках сохраняется, т. е. более высокомолекулярные олигонуклеотиды элюируются с колонки при более высоких температурах. Исключение составляет более прочное связывание $d(pG-G-T)$ по сравнению с $d(pG-G-T)_2$ на колонке с иммобилизованным комплементарным додекануклеотидом (см. рис. 1, а, б и табл. 2). Объяснить подобный факт можно, как и в случае с использованием иммобилизованного $d(pA-C-C)_2$, склонностью гуанинсодержащих олигонуклеотидов к самоагрегации. С ростом длины олигомеров их способность к самоагрегации увеличивается, и поэтому гексануклеотид в условиях эксперимента нельзя рассматривать

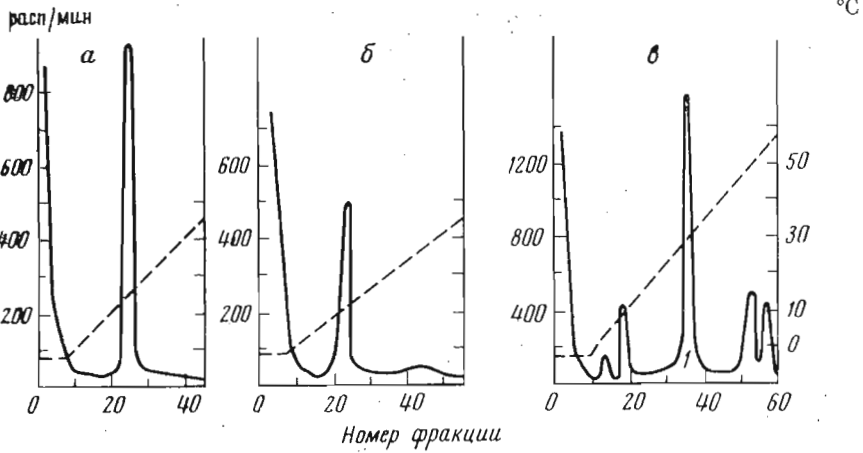


Рис. 1. Десорбция олигонуклеотидов с колонки, содержащей сорбент (II), в линейном градиенте температуры: *a* — *d*(pG-G-T), *б* — *d*(pG-G-T)₂, *в* — pU_n-(G-G-U)₄. Пик 1 соответствует pU_n-(G-G-U)₄

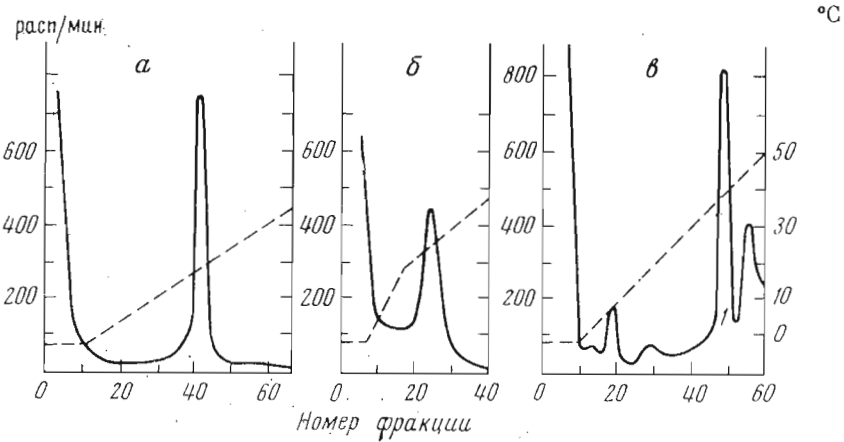


Рис. 2. Десорбция олигонуклеотидов с колонки, содержащей сорбент (V), в линейном градиенте температуры: *a* — *d*(pG-G-T), *б* — *d*(pG-G-T)₂, *в* — pU_n-(G-G-U)₄. Пик 1 соответствует pU_n-(G-G-U)₄

как молекулу, способную образовать 4G-C- и 2A-T-пары с комплементарным олигонуклеотидом из-за частичного участия гуаниновых гетероциклов в самоагрегации. Так как степень агрегации гексануклеотида больше, чем тринуклеотида, он слабее удерживается на колонке. Подобной аномалии не наблюдается при переходе к сорбенту, содержащему иммобилизованный $d(pA-C-C)_{n>4}$. Этот сорбент отличается большей длиной цепи иммобилизованного олигонуклеотида и существенно более высокой емкостью (табл. 1, 2), благодаря чему в «конкуренции» самоагрегации и образования комплементарных пар выигрывает последний процесс (рис. 2, *a*, *б*).

Присоединение к комплементарному олигонуклеотиду длинного некомплементарного участка (система с pU_n-(G-G-U)₄) не приводит к существенной дестабилизации комплекса (рис. 1, *в*, 2, *в* и табл. 2). Этот результат представляет особый интерес, так как может быть положен в основу метода извлечения из сложных смесей полинуклеотидов, содержащих относительно небольшие участки, комплементарные олигонуклеотидам, иммобилизованным на носителе. Подтверждением этого вывода служит и тот факт, что при разделении смеси олигонуклеотидов *d*(pG-G-T), *d*(pG-G-T)₂

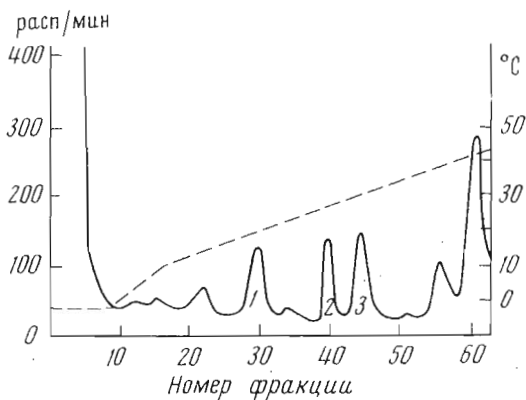


Рис.3. Разделение смеси $d(pG-G-T)$, $d(pG-G-T)_2$ и $pU_n-(G-G-U)_4$ на колонке, содержащей сорбент (V), в линейном градиенте температуры. Пик 1 соответствует $d(pG-G-T)$, пик 2 — $d(pG-G-T)_2$, пик 3 — $pU_n-(G-G-U)_4$

и $pU_n-(G-G-U)_4$ на колонке с иммобилизованным $d(pA-C-C)_{n>4}$ была получена удовлетворительная картина фракционирования (рис. 3), причем температуры десорбции олигонуклеотидов совпадали с температурами, определенными для индивидуальных соединений.

Экспериментальная часть

Хроматографию осуществляли на ватмане № 1 или «Filtrak» № 1, 3 в системе н.пропанол — аммиак — вода (55 : 10 : 35) (A). При исследовании применяли меченные тритием олигонуклеотиды [14] (уд. акт. $d(pG-G-T)$ — 6800 мкКи/ммоль, $d(pG-G-T)_2$ — 4300 мкКи/ммоль).

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре SP-800 (Англия) и «Cary-18» (США), просчет проб по радиоактивности — на счетчике «Mark-1» (Nuclear Chicago) в 10 мл диоксанового сцинтиллятора Брэя с внешним стандартом.

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов описан нами ранее [15]. Полирибонуклеотид $pU_n-(G-G-U)_4$ синтезирован Р. Ш. Бибилашвили (ИМБ АН СССР) с использованием меченого тритием GTP (уд. акт. 1,8 мкКи/ммоль), путем транскрипции полидезоксирибонуклеотида $d(pA-C-C)_4-d(pA)_n$ (где $n = 60-70$), полученного «достройкой» синтезированного нами [15] додекануклеотида $d(pA-C-C)_4$ участком $d(pA)_n$ с помощью концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы из тимуса теленка [16].

Препарат $pU_n-(G-G-U)_4$ содержал примеси низкомолекулярных продуктов деградации, а также продуктов транскрипции, превосходящих по размеру исходную матрицу $d(pA-C-C)_4-d(pA)_n$.

Иммобилизация олигонуклеотидов с использованием ДЦГК. Олигонуклеотид (11,5 ОЕ₂₆₀) высушивали отгонкой абс. пиридина, растворяли в 1 мл абс. пиридина, раствор приливали к 0,5 г сухого порошка целлюлозы СС-31 и добавляли 0,5 г ДЦГК. Смесь перемешивали на качалке 10 сут, разбавляли водой (1 мл) и перемешивали еще 16 ч при 20°. Порошок целлюлозы промывали водным пиридином, а затем этанолом до отсутствия УФ-поглощения в элюате. Элюат упаривали до объема ~20 мл, отфильтровывали выпавшую в осадок дициклогексилмочевину, раствор обессоливали на колонке с DEAE-сефадексом и спектрофотометрировали. Количество иммобилизованного олигонуклеотида определяли как разницу между количеством введенного и несвязавшегося олигонуклеотида. Емкость сорбента (I) — 17,3 ОЕ₂₆₀/г носителя (табл. 1).

Иммобилизация олигонуклеотидов с использованием ЦГМК. Олигонуклеотид (31 ОЕ₂₆₀) растворяли в 3,5 мл 0,04 М 2-(N-морфолино)-этилсуль-

фоната натрия, рН 5,9, добавляли 1 г целлюлозы СС-31 и 100 мг ЦГМК. Смесь перемешивали 3 сут, затем добавляли еще 50 мг ЦГМК и перемешивали еще 2 сут. Целлюлозу промывали 0,05 М Na_2HPO_4 до отсутствия УФ-поглощения в элюате. Элюат упаривали, хроматографировали на бумаге в системе (А) и определяли количество несвязавшегося олигонуклеотида спектрофотометрически. Емкость сорбента (III) — 15,5 OE_{260} на 1 г носителя (табл. 1).

Иммобилизация олигонуклеотидов с помощью образования смешанного ангидрида с мезитиленкарбоновой кислотой. Олигонуклеотид (для d (pA-C-C)₂ 50 OE_{260} — пиридиниевая соль, для d (pA-C-C)_{n>4} 57 OE_{260} — цетавлоновая) сушили отгонкой абс. пиридина (5 × 10 мл), растворяли в 0,25 мл абс. пиридина, добавляли 0,02 мл хлорангидрида мезитиленкарбоновой кислоты и встряхивали 10—15 мин. Затем приливали 10 мл воды и экстрагировали избыток кислоты эфиром (3 × 2 мл). Водный слой упаривали, остаток растворяли в 2 мл воды и добавляли к 0,5 мл геля ГМДА-сефарозы (8 мкмоль свободных аминогрупп на 1 мл носителя). Смесь перемешивали 3 сут, промывали водой до отсутствия УФ-поглощения в элюате. Количество несорбированного олигонуклеотида определяли после хроматографирования элюата на бумаге в системе (А). Емкость сорбента (IV) — 70 $\text{OE}_{260}/\text{мл}$, сорбента (V) — 103 $\text{OE}_{260}/\text{мл}$ (табл. 1).

Колоночная хроматография на олигонуклеотид-целлюлозе (сефарозе). Олигонуклеотид-целлюлозу (сефарозу) (количество см. табл. 2) помещали в термостатированную колонку (0,8 × 6 см), промывали при -2° 0,004 М фосфатным буфером (рН 7,3), содержащим 0,075 М MgCl_2 и 0,2 М NaCl , затем на колонку наносили раствор исследуемого олигонуклеотида в объеме буфера, равном половине объема носителя в колонке. Смесь выдерживали 16 ч при -2° , промывали буфером при -2° , а затем медленно повышали температуру при постоянном токе буфера (скорость элюции 0,1 мл/мин). Объем фракций 2 мл. Результаты исследования приведены в табл. 2 и на рис. 1—3.

Авторы выражают благодарность В. Л. Друце за введение тритиевой метки в олигонуклеотиды и Р. Ш. Бибилашвили за предоставленный полирибонуклеотид $pU_n\text{-(G-G-U)}_4$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Erhan S., Horthrup L. G., Zeach E. R. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 646—652.
2. Doel M. T., Smith M. (1973) FEBS Lett., 34, 99—102.
3. Merriam E. V., Dumas L., Sinsheimer R. L. (1970) Anal. Biochem., 36, 389—395.
4. Litman R. L. (1968) J. Biol. Chem., 243, 6222—6233.
5. Gilham P. T. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 85, 1311—1312.
6. Gilham P. T. (1968) Biochemistry, 7, 2809—2813.
7. Носова В. В., Вельмога И. С., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1974) Докл. АН СССР, 219, 1134—1136.
8. Носова В. В., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1972) Докл. АН СССР, 206, 129—131.
9. Долинная Н. Г., Громова Е. С., Ильина Е. В., Сергеева Н. Ф., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1975) Биоорг. химия, 1, 1296—1303.
10. Astell C. R., Smith M. (1971) J. Biol. Chem., 246, 1944—1946.
11. Astell C. R., Doel M. T., Jahnke P. A., Smith M. (1973) Biochemistry, 12, 5068—5074.
12. Fresco J. R., Massoulie J. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 1352—1353.
13. Astell C. R., Smith M. (1972) Biochemistry, 11, 4114—4120.
14. Друца В. Л., Соколова Н. И., Шабарова З. А. (1974) Молекулярн. биология, 8, 921—926.
15. Смирнов В. Д., Ильина Е. В., Сергеева Н. Ф., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1974) Докл. АН СССР, 218, 722—725.
16. Chang L. M. S., Bollum F. J. (1971) J. Biol. Chem., 246, 909—916.

Поступила в редакцию
24.VI.1975

A STUDY OF COMPLEMENTARY COMPLEXES OF THE SYNTHETIC
OLIGONUCLEOTIDES ONE OF WHICH IS IMMOBILIZED
ON INSOLUBLE CARRIER

ILYINA E. V., SMIRNOV V. D., SHABAROVA Z. A.,
PROKOFIEV M. A.

*Department of Chemistry and Laboratory of Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov State University, Moscow*

A study has been made of the sorption of trinucleotide d (pG-G-T), hexanucleotide d (pG-G-T)₂ and polynucleotide pU_n-(G-G-U)₄ ($n = 60-70$) on cellulose and hexamethylenediaminesephare containing immobilized oligodeoxyribonucleotides d (pA-C-C)_n ($n = 2, 4, > 4$). It has been demonstrated that the sorbents may be used for separating oligo-end polynucleotides via desorption of the latter by stepwise alteration of temperature.
