



УДК 547.963.32 : 543.544

АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДОВ МИКРОКОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

*Власов В. В., Меламед Н. В., Чижиков В. Е.,
Тукало М. А.*

*Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР Новосибирск;*

Институт молекулярной биологии и генетики Академии наук УССР, Киев

Описан анализ нуклеотидов в микромасштабе с количествами нуклеотидного материала 10^{-4} — 10^{-3} мг с помощью установки для микроколоночной хроматографии, сконструированной в НИОХ СО АН СССР.

Нуклеотиды разделяли ионообменной хроматографией на дауэксе-1 в градиенте концентрации ацетата и формиата аммония, а также соляной кислоты вместе с хлоридом натрия. Предложена модификация метода разделения нуклеотидов хроматографией на дауэксе-50 для анализа разбавленных растворов нуклеотидов.

Из существующих в настоящее время методов разделения нуклеотидов наиболее популярна колоночная хроматография, так как этот метод позволяет проводить анализ быстро и с высокой точностью. Предложены методы разделения нуклеотидов гель-хроматографией [1], хроматографией на анионообменных [2—6] и катионообменных смолах [7].

Применение высокочувствительных ультрафиолетовых детекторов и хроматографии под высоким давлением на поверхностно-пористых (целлюлярных) смолах позволяет быстро анализировать количества нуклеотидов порядка 10^{-3} мг [8].

Наиболее удобными, однако, следует признать методы анализа на ионообменных смолах типа дауэкс, так как они имеют высокую по сравнению с целлюлярными ионообменниками емкость и позволяют производить определение нуклеотидов в сильно разбавленных многокомпонентных растворах, например после ферментативного гидролиза олигонуклеотидов. Как показали специальные исследования, при этом можно получить высокое разрешение компонентов за короткое время и без использования высоких давлений [9].

Ранее нами было описано применение регистрирующего микроспектрофотометра и хроматографической техники, сконструированной в НИОХ СО АН СССР, для разделения олигонуклеотидов [10]. Разделение проводилось быстро, на обычных ионообменниках, при комнатной температуре и под давлением менее 5 атм. Учитывая, что приборы подобного класса скоро появятся во многих лабораториях, представилось целесообразным описать анализ нуклеотидов на такой установке. Известные методики разделения мононуклеотидов были специально модифицированы нами для работы в микромасштабе и ускорения процедуры анализа. Нами был разработан метод анализа разбавленных растворов нуклеотидов на дауэксе-50.

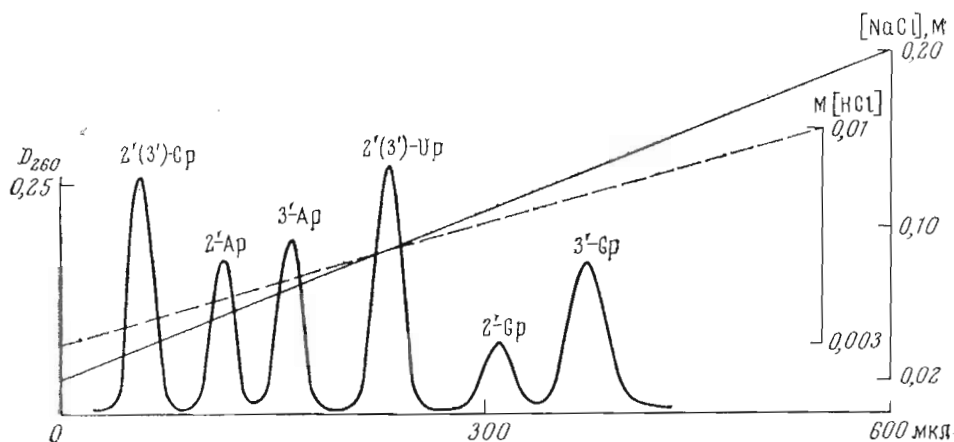


Рис. 1. Хроматография смеси нуклеозид-2'(3')-фосфатов ($\sim 5 \cdot 10^{-3}$ ОЕ₂₆₀ каждого компонента) на колонке с дауэксом 1×8 (Cl⁻) ($0,7 \times 60$ мм) в линейном градиенте концентрации HCl и NaCl, 0,003—0,01 М HCl, 0,2 М NaCl (общий объем элюента 600 мкл). Скорость элюции 300 мкл/ч

Используя хроматографию на дауэксе-1 в линейном градиенте соляной кислоты и хлорида натрия, можно достичь высокого разрешения нуклеотидов, в том числе 2'- и 3'-изомеров пуриновых нуклеотидов (рис. 1). Анализ занимает около 2 ч. При этом удается разделить нуклеозид-5'- и -2'(3')-монофосфаты. Недостатком этой хроматографической системы является то, что цитидиловая кислота элюируется в градиенте соляной кислоты и хлорида натрия узким пиком, что неудобно для количественного определения, а также то, что после нанесения на дауэкс-1 нуклеотидов в буферных растворах требуется тщательная отмывка колонки 0,02 М раствором хлорида аммония и водой. (Промывка необходима для того, чтобы уравнивание колонки кислым элюирующим раствором не происходило во время хроматографии, поскольку это приводит к элюции адениловой и цитидиловой кислот одним острым пиком.)

Для проведения серийных анализов удобнее использовать хроматографию на дауэксе-1 с элюцией в градиенте концентрации формиата или ацетата аммония (рис. 2 и 3). Эти хроматографические системы характеризуются несколько более низким разрешением, однако при их использовании не требуется специальных отмывок колонки после нанесения образца и цитидиловая кислота элюируется не столь острым пиком, как при использовании градиента соляной кислоты и хлорида натрия. В таких системах полностью разделяются нуклеозид-5'-фосфаты. При разделении смеси нуклеозид-2'(3')-фосфатов наблюдается перекрывание пиков 3'-адениловой и 2'-гуаниловой кислот. Опыт занимает ~ 1 ч. Недостатком методики является возрастание оптической плотности элюирующего буфера по ходу хроматографии за счет повышения концентрации элюирующих солей (до нескольких десятых единицы оптической плотности при 250 нм при концентрациях формиата или ацетата аммония, обеспечивающих элюцию гуаниловой кислоты). При обработке хроматограмм фоновое поглощение растворителя может быть просто вычтено, однако при дальнейшем уменьшении масштаба за счет разбавления возникают неудобства в работе, когда оптическая плотность в пиках существенно менее 0,1. При этом изменение поглощения растворителя составляет практически полную шкалу прибора на максимальной чувствительности.

Анализ нуклеотидов с помощью ионообменной хроматографии прост и эффективен. Однако этот метод требует формирования градиента концентрации солей в элюирующем растворе и регенерации колонок перед на-

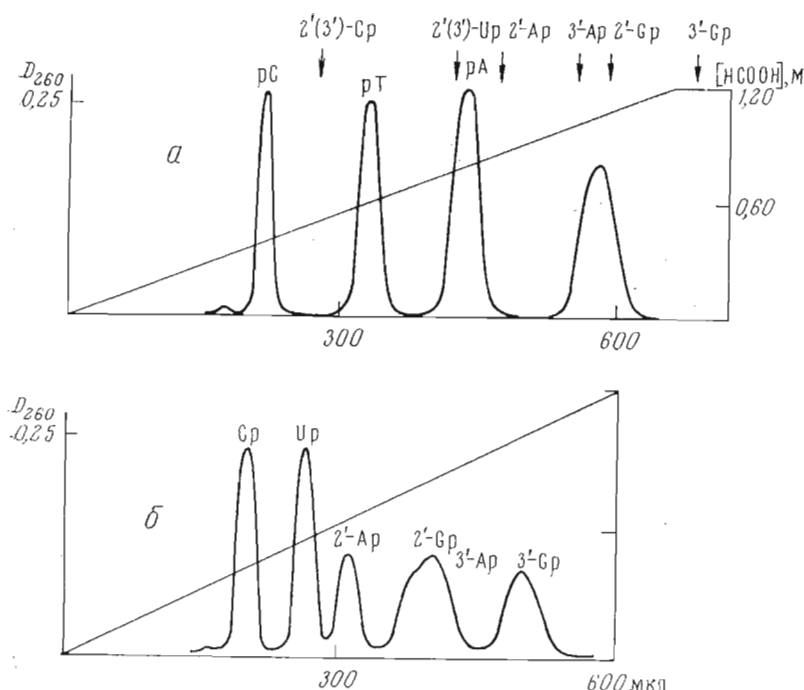


Рис. 2. Хроматография смеси нуклеозид-5'- и -2'(3')-фосфатов ($\sim 5 \times 10^{-3}$ ОЕ₂₆₀ каждого компонента) на колонке с дауэксом 1×8 (HCOO- или CH₃COO-) ($0,7 \times 60$ мм) в линейном градиенте концентрации формиата аммония, 0,01—1,2 М, рН 4,4 (а) или ацетата аммония, 0,1—4 М, рН 4,6 (б) (общий объем элюента 600 мкл). Скорость элюции 300 мкл/ч

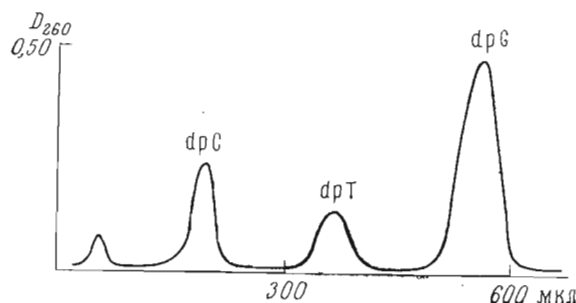


Рис. 3. Анализ нуклеотидного состава синтетического дезоксирибоолигонуклеотида d(pC-G-T-G-G) после гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда на колонке с дауэксом 1×2 (HCOO-) в градиенте концентрации формиата аммония

сением образца. Существует ряд методов деления нуклеотидов без использования градиентной элюции — на биогелях [1] и на катионообменниках [7]. Однако при использовании этих методов нуклеотиды необходимо наносить на колонки в очень малых объемах растворителей (см. рис. 4). В реальных задачах, например при разделении нуклеотидов, полученных гидролизом синтетических или природных олиго- или полинуклеотидов, практически всегда приходится иметь дело с ограниченным количеством нуклеотидного материала в относительно больших объемах буферных растворов. Мы усовершенствовали метод анализа нуклеотидов на дауексе-50 [7], введя предварительное концентрирование нуклеотидов на слабом анионообменнике DEAE-целлюлозе. Разбавленный раствор нук-

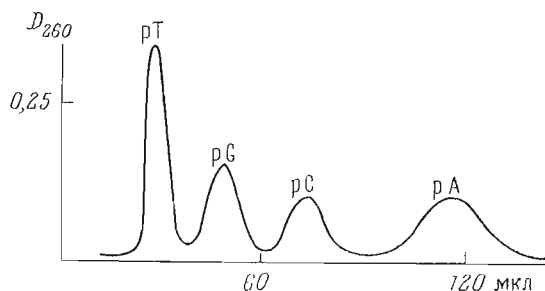


Рис. 4. Хроматография смеси нуклеозид-5'-фосфатов ($\sim 5 \cdot 10^{-3}$ ОЕ₂₆₀ каждого компонента) на колонке с дауэксом 50×4 (40 мкл) в 0,1 М формиате аммония, рН 3,0

леотидов наносили на колонку (2—3 мкл) с DEAE-целлюлозой, отмывали колонку от буферных компонентов водой и подключали к колонке с дауэксом-50, предварительно заменив воду в капилляре, подключенном к колонке с DEAE-целлюлозой, на 0,1 М формиат аммония, рН 3,0. Нуклеотиды элюировались с DEAE-целлюлозы узкой зоной (в объеме, равном объему колонки с DEAE-целлюлозой) и поступали на колонку с дауэксом-50, где происходило фракционирование (рис. 4). Смесь нуклеозид-5'-фосфатов разделялась полностью. При делении в этих условиях смеси нуклеозид-2'(3')-монофосфатов наблюдалось перекрывание пиков 2'-адениловой и 2'(3')-цитидиловых кислот. Полное деление нуклеозид-2'(3')-фосфатов может быть достигнуто в более щелочной среде [7]. На рис. 4 приведен опыт, где разделение продолжалось 45 мин. При скорости элюции, обеспечивающей разделение за 15 мин, также наблюдается практически полное разделение нуклеозид-5'-фосфатов.

Описанные методы применялись нами для анализа нуклеотидов, получаемых при ферментативном гидролизе синтетических дезоксиолигонуклеотидов и природных рибоолигонуклеотидов.

Экспериментальная часть

Для приготовления колонок использовали ионообменники с размером зерен 10—30 мкм, полученные фракционированием торговых препаратов в аппарате Гамильтона [11]. Не фракционировали лишь аминекс Q15S.

В работе использовали ионообменные смолы: дауэкс 1×4 , 1×8 , 50×4 , DEAE-целлюлозу фирмы «Serva» (ФРГ) и аминекс Q15S фирмы «Bio-Rad» (США). Препарат фосфодиэстеразы змеиного яда, иммобилизованной на целлюлозе по методу [12], был любезно предоставлен Ю. А. Берлиным (Институт биоорганической химии АН СССР), а синтетический олигонуклеотид d(pC-G-T-G-G) — Т. Н. Шубиной (Институт органической химии СО АН СССР).

Оптическую плотность элюатов непрерывно регистрировали с помощью микроспектрофотометра при 250, 260, 270, 280 и 290 нм. Спектральные характеристики нуклеотидов при рН 4,4 приведены в работе [3].

Так как шкала прибора линейна относительно оптической плотности, количество нуклеотидов в пиках находили из площади этих пиков с учетом коэффициентов экстинкции нуклеотидов. Ошибка определения количества нуклеотидов составляла не более 10%, а неспецифическая сорбция — не более 5%. Основные характеристики установки, приготовление микроколонок и создание градиента концентрации веществ в элюирующих растворах описаны нами ранее [10].

Щелочной гидролиз олигонуклеотидов. К 20 мкл водного раствора олигонуклеотида добавляли 10 мкл 1М КОН (свободного от карбонатов), герметично закрывали пробирку и термостатировали смесь 18 ч при 37°. Полученный гидролизат для обессоливания пропускали через колонку с дауэксом-50 в H⁺-форме (5 мкл), подключенную к колонке с дауэксом-1, и наносили, таким образом, полученные нуклеотиды на ионообменник.

Гидролиз дезоксиолигонуклеотида d(pC-G-T-G-G) иммобилизованной фосфодиэстеразой змеиного яда. Колонку (25 мкл) с иммобилизованной фосфодиэстеразой уравнивали 0,05 М трис-формиаом (рН 8,5), пропускали через нее раствор олигонуклеотида в том же буфере со скоростью 300 мкл/ч. При этом колонка с ферментом была подключена непосредственно к колонке с дауэксом-1, отмытым водой. Разделение проводили, как указано ниже. Экспериментально найденные соотношения дезоксирибонуклеотидов dpT : dpC : dpG = 1 : 1,04 : 2,96.

Разделение нуклеозид-2',(3')-фосфатов на дауэксе 1 × 8 в хлоридной системе. Колонку с дауэксом 1 × 8 (0,7 × 60 мм) промывали 100 мкл 1 М NaCl, 100 мкл 0,3 М NaCl в 0,01 М HCl и 600 мкл воды. Затем наносили нуклеотиды, по ~5·10⁻³ ОЕ₂₆₀ каждого компонента в объеме 30—600 мкл со скоростью 600 мкл/ч. После этого промывали колонку 200 мкл 0,02 М хлористого аммония (если в образце содержались нуклеозиды, они смывались с колонки при этой промывке). Затем промывали колонку 120 мкл воды и 60 мкл 0,001 М HCl (если в образце содержалась 5'-цитидиловая кислота, она элюировалась с колонки при последней промывке).

Элюцию нуклеотидов проводили в линейном градиенте 0,003—0,01 М HCl, 0,2 М NaCl. Общий объем элюирующего раствора 600 мкл, скорость элюции 300 мкл/ч (рис. 1).

Разделение мононуклеотидов на дауэксе 1 × 8 в формиатной и ацетатной системах. Колонку с дауэксом 1 × 8 (0,7 × 60 мм) после перевода в соответствующую форму отмывали водой, наносили раствор нуклеотидов со скоростью 300 мкл/ч, промывали колонку 150 мкл начального раствора градиента и затем проводили элюцию в линейном градиенте формиата аммония (0,01—1,2 М, рН 4,4) или ацетата аммония (0,01—4,0 М, рН 4,6). Общий объем элюирующего раствора 600 мкл, скорость элюции 300 мкл/ч (рис. 2).

Анализ нуклеотидов на дауэксе 50 × 4. Колонку с дауэксом 50 × 4 или с аминексом Q15S (40 мкл) уравнивали 0,1 М формиатом аммония, рН 3,0. Нуклеотиды (по ~5·10⁻³ ОЕ₂₆₀ каждого компонента) наносили в объеме 2 мкл и вели элюцию 0,1 М формиатом аммония (рис. 4). В опытах с разбавленными растворами нуклеотиды (по ~5·10⁻³ ОЕ₂₆₀ каждого компонента в 120 мкл) предварительно сорбировали на колонке с DEAE-целлюлозой (2—3 мкл), отмывали ее водой, подключали к основной колонке с дауэксом 50 × 4 и проводили хроматографию, пропуская через эту систему 0,1 М формиат аммония, рН 3,0. Профиль элюции был аналогичен в этом случае разделению на рис. 4. Для регенерации колонки достаточно промыть ее 0,1 М формиатом аммония, рН 3,0. Колонку с дауэксом-50 необходимо промывать непосредственно перед опытом, так как на ней постоянно накапливаются поглощающие в ультрафиолете вещества. В наших опытах удавалось проводить на одной колонке несколько десятков разделений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kull F. J., Soodak M. (1970) Anal. Biochem., 32, 10—13.
2. Cohn W. E. (1955) in The Nucleic Acids (Chargaff E., Davidson J. N., eds.), vol. 1, pp. 211—241, Acad. Press, N. Y.
3. Хори М. (1971) в сб. Методы исследования нуклеиновых кислот, с. 75—81, «Мир», М.
4. Kaulmann D. G., Grisham J. W. (1971) J. Chromatogr., 57, 275—280.
5. Miller R. A., Kirkpatrick J. W. (1969) Anal. Biochem., 27, 306—310.

6. Rustum Y. M., Schwartz H. S. (1973) *Anal. Biochem.*, **53**, 411—419.
7. Blattner F. R., Erickson H. P. (1967) *Anal. Biochem.*, **18**, 220—227.
8. Гере Р. (1974) в сб. Современное состояние жидкостной хроматографии (под ред. Киркленда Дж.), с. 298—313, «Мир», М.
9. Martin M., Eon C., Gujochon G. (1974) *J. Chromatogr.*, **99**, 357—376.
10. Власов В. В., Грачев М. А., Комарова Н. И., Кузьмин С. В., Мензорова Н. И. (1972) *Молекулярн. биология*, **6**, 809—816.
11. Бельский Б. Г. (1961) в сб. Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров, с. 65—80, «Наука», М.
12. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) *Биохимия*, **39**, 747—750.

Поступила в редакцию
12.XI.1975

После переработки
8.I.1976

NUCLEOTIDE ANALYSIS BY MICRO-COLUMN CHROMATOGRAPHY

VLASOV V. V., MELAMED N. V., CHIZHIKOV V. E.,
TUKALO M. A.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Division of the
Academy of Sciences of the U.S.S.R., Novosibirsk
Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the UkrSSR, Kiev*

The nucleotide analysis is described which involves microcolumn chromatography on Dowex-1 using gradient of ammonium acetate and formate as well as that of hydrochloric acid with sodium chloride. The equipment developed in the Institute of Organic Chemistry (Novosibirsk) enabled the analyses of 10^{-4} — 10^{-3} mg of nucleotide mixtures within one hour at room temperature and under the pressure less than 10 atm. The method of the separation of nucleotides by Dowex-50 column chromatography was adapted for the analysis of diluted nucleotide solutions.