



УДК 577.113.4.6:543.544

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ  
В ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОМ СИНТЕЗЕ*Калашиников В. В., Самуков В. В., Шубина Т. Н.,  
Ямщиков В. Ф.**Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,  
пос. Кольцово, Новосибирская обл.*

В работе описан препаративный метод обращенно-фазовой хроматографии полностью защищенных и деблокированных олигонуклеотидов. Испытаны три типа хроматографических носителей: силанизированный силикагель, силанизированное пористое стекло типа СРG и отечественный носитель для газожидкостной хроматографии Полихром-1 (пористые агломераты тефлоновых частиц). Силанизированные носители отличаются высокой стабильностью в условиях хроматографии, простотой регенерации и возможностью широкого варьирования селективности.

Стандартным приемом для выделения полностью защищенных олигонуклеотидов является колоночная хроматография на силикагеле в системе хлороформ—метанол. Она достаточно эффективна для очистки небольших олигонуклеотидов — от мономеров до тетрамеров, однако часто дает неудовлетворительные результаты при выделении более длинных олигонуклеотидов. Причина этого обсуждается в литературе [1, 2]. Неотделенные примеси приводят к снижению выходов на последующих стадиях, и в конечном счете выделение чистых олигонуклеотидов после деблокирования становится серьезной проблемой, которая не решается традиционными методами хроматографии на DEAE-целлюлозе или DEAE-сефадексе.

В последнее время совершенствованию методов разделения в олигонуклеотидном синтезе уделяется большое внимание. Для выделения защищенных олигонуклеотидов используется хроматография на сефадексе LH-60 [1] или на дезактивированном силикагеле [3]. Для очистки деблокированных олигонуклеотидов широко применяется хроматография на привитых и пептикулярных ионообменниках [4].

Большими возможностями обладает метод обращенно-фазовой хроматографии на модифицированных силикагелях. Работы Наранга [2] и Кораны [5] продемонстрировали высокую эффективность этого метода для выделения защищенных и деблокированных олигонуклеотидов. Однако в этих работах используется дорогостоящая техника высокого давления и стандартные аналитические и полупрепаративные колонки весьма небольшого размера, что ограничивает масштаб разделения и требует специальной очистки растворителей и реактивов.

Цель настоящего исследования — разработка препаративных методов обращенно-фазовой хроматографии, пригодных для эффективной очистки полностью защищенных и деблокированных олигонуклеотидов. Эти методы не требуют специального оборудования и материалов и могут быть использованы в любой химической лаборатории.

Нами были испытаны три типа хроматографических носителей: силанизированный силикагель (TMS-силикагель), силанизированное пористое стекло типа СРG (TMS-СРG) и продажный носитель для газожидкостной хроматографии Полихром-1 (пористые агломераты тефлоновых частиц).

---

*Принятые обозначения:* TMS — триметилсилил, MTг — метокситритил,  $\mp$  — межнуклеотидный 4-хлорфенилфосфат, CNEt — цианэтил, Ms — 2,4,6-триметилбензолсульфонил, TPS — 2,4,6-тринизопропилбензолсульфонил, TEAA — ацетат триэтиламония.

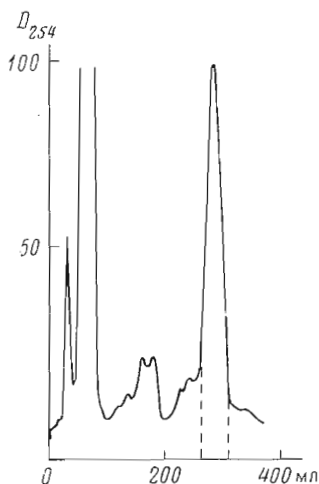


Рис. 1

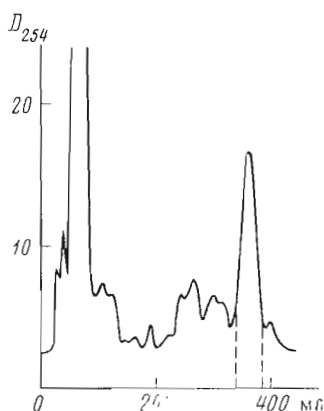


Рис. 2

Рис. 1. Выделение на TMS-силикагеле гексануклеотида  $d[(MTr)T\equiv ibG\equiv bzA\equiv bzA\equiv \equiv bzC\equiv Tr(CiPh)(CNEt)]$ , синтезированного из 75 мкмоль  $d[(MTr)T\equiv ibGp(CiPh)]$  и 50 мкмоль  $d[bzA\equiv bzA\equiv bzC\equiv Tr(CiPh)(CNEt)]$  (200 мкмоль Ms-тетразолида, 1,5 мл пиридина, 40 мин). Колонка 15×300 мм; градиент диоксиана в воде 60→90% (400 мл); наносили реакционную смесь в пиридине; скорость элюции 180 мл/ч

Рис. 2. Выделение на TMS-силикагеле декануклеотида  $d[(MTr)T\equiv ibG\equiv bzA\equiv bzC\equiv \equiv T\equiv ibG\equiv T\equiv bzA\equiv bzC(Ac)]$ , синтезированного из 10 мкмоль  $d[(MTr)T\equiv ibG\equiv bzA\equiv bzA\equiv \equiv bzC\equiv Tr(CiPh)]$  и 8 мкмоль  $d[ibG\equiv T\equiv bzA\equiv bzC(Ac)]$  (25 мкмоль Ms-тетразолида, 0,3 мл пиридина, 1,5 ч). Условия хроматографии см. в подяиси к рис. 1

TMS-силикагель готовят из обычного мелкопористого силикагеля для колоночной хроматографии (фракции 40–60 мкм) обработкой триметилхлорсиланом (ср. [6]). Нужно отметить, что для получения хорошего TMS-силикагеля приходится использовать триметилхлорсилан в большем количестве, чем указано в методике, описанной в работе [6]. Чтобы обеспечить более равномерное кипение гетерогенной смеси, вместо толуола в качестве растворителя лучше использовать хлороформ или  $CCl_4$ . Такая же методика применялась для получения TMS-CPG.

Сорбенты с размерами частиц 40–60 мкм являются оптимальными для наполнения больших препаративных колонок, так как при больших скоростях элюции обеспечивают значительно большую эффективность разделения, чем обычно используемые сорбенты с размерами частиц 50–300 мкм. Сопровождающее течение у слоя частиц 40–60 мкм невелико, и необходимая скорость элюции (80–120 мл/ч·см<sup>2</sup> на колонке длиной 300 мм) может поддерживаться перепадом давлений в 0,5–1 атм. Такой перепад давлений можно создать простым поршневым или даже перистальтическим насосом.

В условиях, применяемых для обращенно-фазовой хроматографии олигонуклеотидов, колонка с TMS-силикагелем или TMS-CPG может быть использована десятки и даже сотни раз без заметного снижения качества разделения.

Обращенно-фазовую хроматографию защищенных олигонуклеотидов, синтезированных методом Наранга [7], проводили главным образом на TMS-силикагеле в системе диоксан–вода. На колонку, уравновешенную 50%-ным водным диоксаном, наносили реакционную смесь, растворенную в минимальном объеме пиридина или диоксана, и элюировали в градиенте концентрации диоксана в воде (от 60 до 90% по объему). Типичные профили элюции представлены на рис. 1 и 2.

Наранг с сотр. [2] для обращенно-фазовой хроматографии защищенных олигонуклеотидов использовали систему ацетонитрил–вода. Однако олигонуклеотиды плохо растворяются в ацетонитриле и его смесях с водой, что при больших нагрузках на колонку приводит к значительному уширению пиков и снижению эффективности разделения. Замена ацетонитрила

диоксаном позволяет увеличить допустимые нагрузки на колонку до 15–20 мг на 1 г сорбента. Так, на колонке размером 15×300 мм можно разделить от 20 до 400 мг реакционной смеси (табл. 1).

Максимальные значения нагрузок, приведенные в табл. 1, очевидно, превышают линейную емкость носителя, тем не менее во многих случаях даже при таких нагрузках разделения вполне удаются.

При выделении на TMS-силикагеле полностью защищенных олигонуклеотидов из реакционных смесей порядок элюции компонентов обратный наблюдаемому при хроматографии на силикагеле в системе  $\text{CHCl}_3$ –метанол, т. е. продукт конденсации элюируется последним. Как правило, полностью защищенный олигонуклеотид хорошо отделяется от непрореагировавшего гидроксильного компонента и различных побочных продуктов (в частности, от продукта сульфонилирования гидроксильного компонента), даже в тех случаях, когда попытки разделить смесь на силикагеле оказываются безуспешными [2]. Различия в удерживании стереоизомеров олигонуклеотида на TMS-силикагеле очень незначительны, поэтому ширина и форма пиков практически не зависят от длины и состава выделяемого защищенного олигонуклеотида (см. рис. 1 и 2). Это позволяет легко очищать даже 10–15-членные олигонуклеотиды, что весьма трудно сделать хроматографией на силикагеле.

Следует отметить, что использование TPS-тетразолида в качестве конденсирующего агента для синтеза триэфиров часто приводит к осложнениям при разделении реакционных смесей на TMS-силикагеле. TPS-ки-

Таблица 1

Зависимость параметров пика от нагрузки на колонку при хроматографии защищенного динуклеотида  $d[(MTr)bzC\equiv Tp(CNEt)(CIPh)]$  Колонка 15×300 мм \*

Состав пробы **	Элюирующая концентрация диоксана, %	Ширина пика, мл
10(0,07)	78	38
30(0,12)	78	40
80(0,2)	76	43
150(0,4)	73	44
300(1,0)	70	50

\* Условия хроматографии см. в подписи к рис. 1.

\*\* Приводится количество нуклеотида, мг (в скобках объем пробы в диоксане, мл).

Таблица 2

Хроматография деблокированных олигонуклеотидов на TMS-силикагеле

Колонка 10×300 мм, градиент ацетонитрила (7 → 17%) в 0,05 М ТЕАА (рН 6,5), 300 мл, скорость элюции 70–90 мл/ч

Олигонуклеотид	Элюирующая концентрация $\text{CH}_3\text{CN}$ , %	Выход олигонуклеотида *, %
A-G-C-A-T-C-C-T-G-G	13,3	90
G-G-T-C-G-T-T-G-A-G	11,2	80
C-A-A-G-C-C-T-C-C-A	10,3	87
A-C-T-C-C-G-C-T-G-A	11,7	85
A-G-C-A-T-C-C-T-G-G	12,6	82
T-G-A-A-C-T-G-T-A-C	11,2	84
T-G-A-A-A-G-A-G-G-A-T	9,8	90
G-T-T-C-A-G-T-G-T-A-G	11,0	79
T-T-T-C-A-T-C-A-G-C-G	12,3	65
A-T-G-G-T-G-G-C-T-T-T-C	11,8	70
G-A-A-A-G-G-T-G-A-A-T-A-A	11,4	60
G-C-G-C-A-G-A-A-C-G-C-G-T-C	10,5	52

\* Выход олигонуклеотида вычисляли из хроматограммы как отношение площади пика олигонуклеотида к сумме площадей всех пиков. Общий выход УФ-поглощающего материала с колонки составлял 90–95% от нанесенного на колонку.

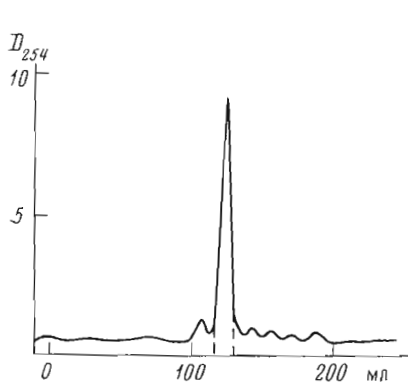


Рис. 3

Рис. 3. Рехроматография на TMS-силикагеле декануклеотида  $d(C-A-A-G-C-C-T-C-C-A)$  после выделения на DEAE-целлюлозе. Нанесено на колонку 100 OE<sub>260</sub>. Условия хроматографии см. в табл. 2

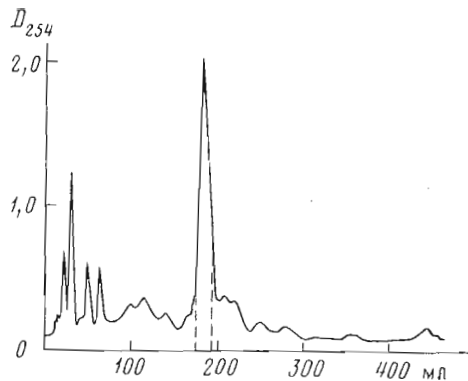


Рис. 4

Рис. 4. Выделение на TMS-CPG нонануклеотида  $d(A-G-C-A-A-C-A-C-G)$  после деблокирования и гель-фильтрации на биогеле P-2. Колонка 10×300 мл; градиент 4–12% ацетонитрила в растворе 0,1 М ТЕАА (рН 6,5); общий объем 500 мл; скорость элюции 100 мл/ч. Нанесено на колонку 20 OE<sub>260</sub>

слота долго удерживается на колонке и элюируется в той же области концентрацией диоксана, что и главный продукт реакции — полностью защищенный олигонуклеотид. Поэтому для того, чтобы избежать загрязнения олигонуклеотидов кислотными примесями, нужно предварительно удалять из реакционной смеси ТРС-кислоту или использовать другие конденсирующие агенты, например Ms-тетразолид.

TMS-силикагель не сорбирует разделяемые вещества необратимо, поэтому выход с колонки почти всегда близок к количественному. Для регенерации колонки достаточно пропустить через нее 1,5–2 свободных объема диоксана, после чего можно уравнивать ее для следующего разделения. Время, необходимое для одного разделения, включая регенерацию и уравнивание колонки, не превышает 2–2,5 ч.

Эффективность обращенно-фазовой хроматографии на TMS-силикагеле для очистки защищенных олигонуклеотидов проведена нами в синтезе шести гетерогенных олигонуклеотидов длиной 10–12 звеньев.

TMS-силикагель также был использован для очистки деблокированных олигонуклеотидов обращенно-фазовой хроматографией в условиях, которые аналогичны описанным в литературе для силикагелей, модифицированных октадецилтрихлорсиланом [5]. На колонку, промытую ацетонитрилом и уравновешенную 0,05–0,1 М раствором ТЕАА, наносили образец, растворенный в этом же растворе, и далее элюировали в градиенте концентрации ацетонитрила в ТЕАА.

Ряд деблокированных олигонуклеотидов после хроматографии на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl (7 М мочевины, рН 7,5) был подвергнут рехроматографии на TMS-силикагеле (табл. 2, рис. 3).

Все олигонуклеотиды, выделенные на DEAE-целлюлозе, содержали примеси, которые отделились при рехроматографии. Чистота полученных олигонуклеотидов оказалась удовлетворительной по данным метода нуклеотидных карт и электрофореза в полиакриламидном геле.

Значения концентраций ацетонитрила, при которых олигонуклеотиды элюируются с колонки, зависят от крутизны градиента и начальной концентрации ацетонитрила, но при соблюдении стандартных условий воспроизводятся с точностью  $\pm 0,15\%$  независимо от концентраций олигонуклеотида и солей в растворе, наносимом на колонку. Как видно из табл. 2, не существует простой зависимости между длиной и составом олигонуклеотида, с одной стороны, и удерживанием его на колонке — с другой. Этот факт, а также другие особенности хроматографии деблокированных олигонуклеотидов на TMS-силикагеле соответствуют имеющимся дан-

ным по хроматографии олигонуклеотидов на обращенно-фазовых носителях с длинными алкильными радикалами —  $C_8$  и  $C_{18}$  [5, 7].

Природа буфера, входящего в состав элюента, имеет большое значение. При замене ацетата триэтиламмония ацетатом аммония олигонуклеотиды элюируются с колонки при более низких концентрациях ацетонитрила и разделение при этом ухудшается. Буферы с более липофильными катионами (например, тетрабутиламмония) будут, по-видимому, усиливать связывание олигонуклеотидов с TMS-силикагелем (см., например, [8]). Для разделения таких полярных соединений, как деблокированные олигонуклеотиды, очень важно также качество привитой фазы. Если TMS-силикагель приготовлен правильно и колонка равномерно упакована, пики получаются узкими и симметричными. Асимметрия пика в этом случае указывает на присутствие неотделившихся примесей. Если же поверхность сорбента содержит некоторое количество силанольных групп, доступных для взаимодействия с подвижной фазой, пики получаются асимметричными — появляются «хвосты».

TMS-силикагель очень удобен для обессоливания и концентрирования олигонуклеотидов. Нанесение олигонуклеотидов на колонку можно производить из больших объемов водных растворов, содержащих высокие концентрации солей и мочевины, если предварительно добавить к раствору перед нанесением ацетат триэтиламмония до концентрации 0,01–0,03 М. Олигонуклеотиды легко элюируются с колонки 20% водным ацетонитрилом. На колонке (10×300 мм) с TMS-силикагелем можно хроматографировать до 200 ОЕ<sub>260</sub> и обессоливать до 2000 ОЕ<sub>260</sub> олигонуклеотидов.

При хроматографии деблокированных олигонуклеотидов колонки с TMS-CPG не уступают в эффективности колонкам с TMS-силикагелем, а порой и превосходят их. У использованного нами пористого стекла поры были крупнее, чем у силикагеля, и, следовательно, оно имело меньшую удельную поверхность, поэтому оптимальные пределы градиентов для хроматографии были иными и олигонуклеотиды элюировались при более низких концентрациях ацетонитрила (как правило, в пределах 4–15%) (рис. 4). Преимуществами TMS-CPG являются как большая однородность размеров пор, так и меньшее гидродинамическое сопротивление по сравнению с TMS-силикагелем того же зернения. Однако силикагель гораздо дешевле и доступнее.

Для разделения рестриктов ДНК была успешно использована обращенно-фазовая хроматография на тефлоновом носителе — порошке полифторхлорэтилена [9]. В связи с этим для хроматографии деблокированных олигонуклеотидов нами был испытан отечественный носитель для ГЖХ на основе политетрафторэтилена — Полихром-1. Этот носитель не требует

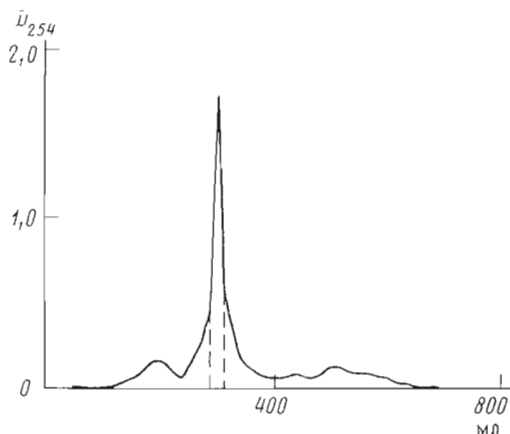


Рис. 5. Выделение на Полихроме-1 гексадекануклеотида d(T-T-C-A-C-A-C-A-G-G-A-A-A-C-A-C) после деблокирования и гель-фильтрации на биогеле Р-6. Колонка 10×550 мм; градиент 4–14% ацетонитрила в растворе, 0,1 М ацетат аммония (рН 7,2); общий объем 800 мл; скорость элюции 55 мл/ч. Нанесено на колонку 90 ОЕ<sub>260</sub>

никакой предварительной обработки, все операции с ним аналогичны операциям с носителями на основе силикагеля и пористого стекла.

В наших экспериментах Полихром-1 оказался менее эффективным прежде всего потому, что использовался носитель с очень крупными частицами (0,25–0,5 мм). Из-за малой удельной поверхности (3–6 м<sup>2</sup>/г) емкость сорбента невелика, поэтому даже для разделения 50–100 ОЕ<sub>260</sub> смеси олигонуклеотидов необходимы большие колонки (10×500 мм) и, следовательно, большие объемы градиентов (см. рис. 5). Носитель типа Полихром-1 с частицами правильной формы и узким интервалом зернения (например, 20±5 мкм), по-видимому, мог бы быть хорошей насадкой для аналитических колонок.

Таким образом, обращенно-фазовая хроматография является эффективным методом разделения и очистки в ходе синтеза олигонуклеотидов. Сорбенты для препаративной хроматографии типа TMS-силикагеля или TMS-CPG достаточно высокого качества могут быть легко приготовлены в лабораторных условиях. Они отличаются высокой стабильностью в условиях хроматографии — отдельные колонки интенсивно эксплуатируются уже более года. Другими достоинствами препаративной обращенно-фазовой хроматографии являются высокая емкость колонок, простота их регенерации, воспроизводимость разделений, возможность широкого варьирования селективности путем изменения состава элюента. Сорбенты, модифицированные триметилхлорсиланом, в большинстве случаев могут успешно конкурировать с дорогими и труднодоступными сорбентами на основе октил- или октадецилтрихлорсилана, которые применяются в высокоэффективной аналитической и препаративной хроматографии.

### Экспериментальная часть

В работе использовали пористое стекло CPG-10 (200–400 меш, средний диаметр пор 164 Å; Serva, ФРГ); Полихром-1 размером 0,25–0,5 мм (Союзреактив); триметилхлорсилан (Fluka, Швейцария); силикагель с диаметром частиц 40–60 мкм получали фракционной седиментацией в воде препарата Kieselgel 60, фракция <63 мкм (Merck, ФРГ).

Ацетонитрил марки ч. использовали без дополнительной очистки. Хлороформ для силанизирования сушили над CaCl<sub>2</sub> в течение недели. Триэтиламин для буферов перегоняли над твердым КОН. Диоксан марки ч.д.а очищали фильтрованием через колонку с Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> I или II степени активности по Брокману.

Стеклообразные колонки с адаптерами 10×300, 25×300 мм (SR-10 и SR-25, Pharmacia, Швеция), 15×300 мм (Whatman, Англия) наполняли суспензией сорбента в этаноле либо сухим способом с последующим прокачиванием этанола или ацетонитрила для удаления воздуха. Эффективности колонок, вычисленные из данных хроматографии МГГ (3–4 мг в 0,1 мл ацетонитрила), составляли для TMS-силикагеля 600–700 теоретических тарелок (элюент — 45% водный ацетонитрил, фактор удерживания  $K = 7,8–8,5$ ) для TMS-CPG — 550–650 теоретических тарелок (элюент — 35% водный ацетонитрил,  $K = 6,9–7,6$ ) при линейных скоростях элюции 1,5–2 см/мин. Эффективность колонок с Полихромом-1 не определяли.

Подачу элюента на колонки проводили поршневым насосом ММС (ЗС) (Чехословакия) или перистальтическими насосами Р-3 (Pharmacia, Швеция) и Varioprepex-II (ЛКВ, Швеция) с трубками из силиконовой резины. Поглощение элюата измеряли на проточном УФ-денситометре фирмы Bio-Rad Laboratories (США), модель 1300. Защищенные и деблокированные дезоксирибоолигонуклеотиды получены по методу Наранга [10].

*Приготовление TMS-силикагеля.* Силикагель с частицами размером 40–60 мкм выдерживали в течение 1 сут в разбавленной HNO<sub>3</sub>, промывали на фильтре сначала дистиллированной водой до нейтрального pH, а затем метанолом и далее высушивали в сушильном шкафу при 50–70° С.

Силикагель (50 г) нагревали 5–7 ч в вакууме при 160–180° С, охлаждали без доступа влаги и воздуха, затем переносили в колбу объемом 500 мл с эффективным обратным холодильником, закрытым хлоркальцие-

вой трубкой. Добавляли 150 мл сухого хлороформа, 20 мл триметилхлорсилана и 25 мл пиридина, нагревали до слабого кипения на водяной бане и кипятили 8–10 ч, после чего оставляли на 12 ч при 20° С. Из колбы отбирали 0,2–0,3 г полученного TMS-силикателя, промывали хлороформом, метанолом и высушивали в вакууме. Образец встряхивали с 5 мл 1%-ного раствора метилового красного в бензоле, отсасывали на стеклянном фильтре и промывали 5–7 раз бензолом (по 5 мл). Если образец сохранял первоначальный белый цвет, то весь TMS-силикагель отфильтровывали на стеклянном фильтре (№ 3 или 4), промывали хлороформом, ацетоном, метанолом и 50% водным метанолом и сушили в шкафу при 50–70° С. Если образец TMS-силикагеля после обработки метиловым красным приобретал красноватый или розовый оттенок, то ко всей смеси добавляли 8–10 мл триметилхлорсилана и 10 мл пиридина и кипятили еще 5–6 ч, после чего повторно отбирали пробу для испытания. TMS-CPG готовили аналогично.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *De Rooij J. F. M., Arentzen R., Den Hartog J. A. J., Van Der Marel G., Van Boom J. H.* J. Chromatography, 1978, v. 171, p. 453–459.
2. *Hsiung H. M., Brousseau R., Michniewiez J., Narang S. A.* Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 4, p. 1371–1385.
3. *Sung W. L., Hsiung H. M., Brousseau R., Michniewiez J., Wu R., Narang S. A.* Nucl. Acids Res., 1980, v. 7, № 8, p. 2199–2212.
4. *Gait M. J., Sheppard R. C.* Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 12, p. 4391–4410.
5. *Jones R. A., Fritz H.-J., Khorana H. G.* Biochemistry, 1978, v. 17, № 7, p. 1268–1278.
6. *Hemetsberger H., Behrensmeier P., Henning J., Ricken H.* Chromatographia, 1979, v. 12, № 2, p. 71–77.
7. *Molko D., Derbyshire R., Guy A., Roget A., Teoule R., Boucherle A.* J. Chromatography, 1981, v. 206, № 3, p. 493–500.
8. *Walseth T. F., Graff G., Moos M. C., Goldberg N. D.* Anal. Biochem., 1980, v. 107, № 1, p. 240–245.
9. *Usher D. A.* Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, p. 2289–2306.
10. *Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R.* Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353–371.

Поступила в редакцию  
22.VI.1982.

#### APPLICATION OF THE REVERSE-PHASE CHROMATOGRAPHY IN OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS

KALASHNIKOV V. V., SAMUKOV V. V., SHUBINA T. N., YAMSHCHIKOV V. F.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo,  
Novosibirsk Region*

A method of preparative reverse-phase chromatography for purification of protected or fully deblocked oligonucleotides during triester oligonucleotide synthesis in solution was described. Three kinds of sorbents were tested: silanized silica, silanized porous glass of the CPG type and commercial sorbent for GLC Polychrom-1 (USSR). Silanized sorbents exhibited high stability under chromatographic conditions. The main advantages of preparative reverse-phase columns are the ease of regeneration and pre-equilibration, high reproducibility and the possibility of wide variation of selectivity by changing the eluant composition. The relationship between the retention of deblocked oligonucleotides and their nucleotide composition, method of application and properties of the buffer solution is discussed.