



УДК 577.113.3 : 543.544

РАЗДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ СМЕСЕЙ РИБОНУКЛЕОТИДОВ
МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ НА АНИОНООБМЕННИКАХ*Блохин Д. Ю., Потешных А. В.**Всесоюзный онкологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Разработан метод аналитического разделения 12 основных рибонуклеотидов (5'-моно-, ди- и трифосфатов Ado, GuO, Urd, Cud), а также Ipo-5'-P с применением ионообменной ВЭЖХ. Разделение осуществляется на колонке с химически связанным сильным анионообменником при пропускании водного раствора хлорида калия в фосфатном буфере с градиентом ионной силы и pH элюента. Рибонуклеозидмоно-, ди- и трифосфаты, а также нуклеотидсодержащие коферменты могут быть количественно определены в биологическом материале за 40 мин анализа. Применение специальной процедуры очистки элюента и метода оптической компенсации сдвига базовой линии позволяет производить УФ-фотометрическое определение рибонуклеотидов в пикомольных количествах.

Информация о величине внутриклеточных пулов свободных рибонуклеотидов представляет значительный интерес при изучении биосинтеза нуклеиновых кислот и метаболических путей клетки. Разработка быстрого и надежного метода количественного анализа рибонуклеотидов является актуальной задачей.

Опубликовано большое число работ, посвященных анализу рибонуклеотидов с помощью ВЭЖХ [1-7]. Описано разделение нуклеотидов в различных вариантах ВЭЖХ: ионообменной, обращенно-фазовой, ион-парной. Анионообменная ВЭЖХ позволяет надежно разделять нуклеотиды по природе основания и по степени фосфорилирования. При этом положительно заряженные соединения, неизбежно присутствующие в биологических экстрактах (основания, нуклеозиды, олигопептиды основного характера и некоторые другие вещества), выходят с фронтом растворителя, что значительно упрощает задачу разделения смеси и идентификацию отдельных компонентов.

Целью настоящей работы являлась оптимизация хроматографического разделения путем подбора состава ПФ и условий хроматографии, обеспечивающая оптимальное разделение 12 основных рибонуклеотидов (5'-моно-, ди- и трифосфатов аденозина, гуанозина, уридина и цитидина, а также инозин-5'-монофосфата) и дающая возможность их количественного определения непосредственно в клеточном экстракте без дополнительной обработки.

Предварительно мы разработали эффективный метод очистки фосфатного элюента от поглощающих в УФ-свете примесей. Получаемый в результате такой очистки дигидрофосфат калия (1 М) имеет удельное поглощение при длине волны 254 нм не более 0,035 ОЕ и может быть использован для приготовления элюента для ВЭЖХ.

При выборе оптимальных условий разделения изучен ряд ПФ. Успешное разделение таких сильно различающихся по кислотно-основным свойствам соединений, какими являются нуклеозидмоно-, -ди- и -трифосфаты, возможно только при применении градиентного режима элюирования пробы с возрастанием ионной силы элюента на один-два порядка. Нами использовалась бинарная система растворителей.

Сокращения: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, ПФ – подвижная фаза.

В качестве стартового компонента ПФ (буфер низкой ионной силы) испытывались следующие растворы: 3,0 мМ KH_2PO_4 ; 6,6 мМ KH_2PO_4 ; 12,5 мМ KH_2PO_4 ; 20,0 мМ KH_2PO_4 ; 1,5 мМ KH_2PO_4 +1,5 мМ KCl ; 3,0 мМ KH_2PO_4 +3,0 мМ KCl ; 10,0 мМ KH_2PO_4 +2,0 мМ KCl ; 10,0 мМ KH_2PO_4 +10,0 мМ KCl ; pH всех растворов варьировался от 2,8 до 4,0 с интервалом 0,1–0,2 ед. pH.

В качестве конечного компонента ПФ (буфер высокой ионной силы) испытывались: 0,5 М KH_2PO_4 ; 0,6 М KH_2PO_4 ; 0,7 М KH_2PO_4 ; 0,5 М KH_2PO_4 +0,1 М KCl ; 0,25 М KH_2PO_4 +0,25 М KCl ; 0,3 М KH_2PO_4 +0,3 М KCl ; 0,3 М KH_2PO_4 +0,5 М KCl ; pH всех растворов варьировался в пределах от 3,6 до 5,0 с интервалом 0,1–0,2 ед. pH.

При приготовлении стартового и конечного компонентов ПФ хлорид калия растворялся в растворе дигидрофосфата калия.

Для компенсации сдвига базовой линии УФ-детектора, связанного с градиентом концентрации фосфата, применялся обратный градиент концентрации неионогенного УФ-поглощающего компонента ПФ (метод оптической компенсации). В качестве такого компонента нами использован ацетон.

На основании экспериментальных данных сделаны заключения:

1) изменение ионной силы стартового буфера в пределах концентраций от 3,0 до 20,0 мМ KH_2PO_4 существенно не сказывается на времени удерживания компонентов пробы (времена удерживания нуклеозидмонофосфатов изменяются не более чем на 10% без изменения порядка выхода и селективности разделения; на времена удерживания нуклеозидди- и -трифосфатов изменение ионной силы в указанных пределах не влияет);

2) повышение pH стартового буфера от 2,8 до 4,0 ведет к значительному росту времени удерживания нуклеозидмоно- и -дифосфатов и одновременно к снижению селективности разделения дифосфатов;

3) введение хлорида в стартовый буфер не ухудшает разделения, но сокращает время уравнивания колонки перед вводом пробы;

4) частичная замена фосфата хлоридом в конечном буфере уменьшает сдвиг базовой линии УФ-детектора, не ухудшая разделения;

5) оптимальным соотношением фосфата и хлорида в конечном буфере является эквимольное (при понижении доли хлорида изменяется форма базовой линии, при повышении снижается селективность разделения и разрешение нуклеозидтрифосфатов: в частности, разделение пар УТР — СТР и АТР — ГТР);

6) повышение pH конечного буфера от 3,6 до 5,0 уменьшает сдвиг базовой линии, сокращает время удерживания и повышает селективность разделения нуклеозидди- и -трифосфатов.

Оптимальное разделение рибонуклеотидов происходит при следующих условиях хроматографирования:

состав ПФ: стартовый буфер — 3,0 мМ KH_2PO_4 +3,0 мМ KCl , pH 3,3; конечный буфер — 0,3 М KH_2PO_4 +0,3 М KCl , pH 4,9; в стартовый буфер добавляется ацетон до концентрации не более 0,003%;

программа ПФ: линейный градиент от 0 до 100% конечного буфера со скоростью 5%/мин с задержкой начала градиента на 4 мин после ввода пробы; далее изократический режим с конечным буфером после окончания градиента и до выхода пика ГТР (около 20 мин);

уравнивание колонки стартовым буфером перед вводом пробы 10 мин;

скорость тока ПФ 2,0 мл/мин;

температура колонки 35° С.

При этих условиях искусственная смесь рибонуклеотидов полностью разделяется за 40 мин. Порядок выхода и время (мин): CMP 5,2, AMP 9,0, UMP 10,3, GMP 12,5, IMP 13,0, UDP 18,1, CDP 19,6, ADP 20,6, GDP 22,7, УТР 28,5, СТР 31,2, АТР 33,6, ГТР 38,9. Для коферментов UDPG, NADH и NADPH времена удерживания составили 13,4; 14,8 и 21,8 мин соответственно. Эти значения времен удерживания получены при работе на новой колонке (первые 50 ч). Далее все значения несколько уменьшаются.

Времена удерживания для пяти последовательных разделений воспро-

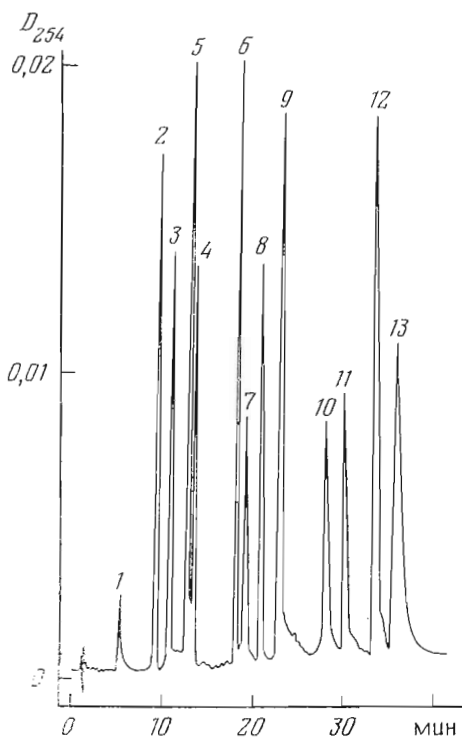


Рис. 1

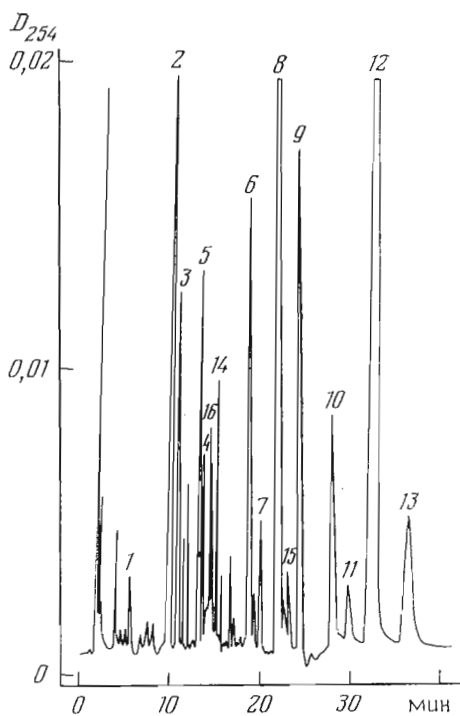


Рис. 2

Рис. 1. Хроматограмма искусственной смеси рибонуклеотидов: 1 — CMP, 2 — AMP, 3 — UMP, 4 — IMP, 5 — GMP, 6 — UDP, 7 — CDP, 8 — ADP, 9 — GDP, 10 — UTP, 11 — CTP, 12 — ATP, 13 — GTP. Условия разделения см. в тексте

Рис. 2. Хроматограмма кислоторастворимой фракции клеток мышинного лейкоза L1210 (проба представляет собой экстракт из $2,3 \cdot 10^6$ клеток): 1 — CMP, 2 — AMP, 3 — UMP, 4 — IMP, 5 — GMP, 6 — UDP, 7 — CDP, 8 — ADP, 9 — GDP, 10 — UTP, 11 — CTP, 12 — ATP, 13 — GTP, 14 — NADH, 15 — NADPH, 16 — UDPG. Условия разделения см. в тексте

изводятся с точностью: для нуклеозид-5'-монофосфатов — $\pm 1,5\%$, для нуклеозид-5'-дифосфатов — $\pm 1\%$, для нуклеозид-5'-трифосфатов — менее $\pm 1\%$.

При делении искусственной смеси стандартных рибонуклеотидов больших трудностей в идентификации отдельных пиков, как правило, не возникает, однако при хроматографировании биологического материала с колонки элюируется большое количество посторонних пиков, в том числе минорные нуклеотиды, нуклеотидные и флавиновые коферменты, уридиндифосфосахара, фолаты и др. Нуклеозиды и основания, а также аминокислоты и олигопептиды практически не удерживаются на колонке и выходят с фронтом растворителей. Таким образом, хроматограмма искусственной смеси нуклеотидов выглядит довольно «пустой», отдельные пики отстоят друг от друга на значительное расстояние, причем время удерживания каждого пика хорошо воспроизводится (рис. 1).

Совершенно по-иному выглядят хроматограммы неочищенного биоэкстракта (рис. 2). Способ приготовления биоэкстракта может влиять на времена удерживания отдельных компонентов пробы. Некоторые индивидуальные пики могут разделяться не полностью либо сливаться. Избежать таких явлений можно с помощью стандартизации условий экстракции. В нашей работе в качестве анализируемого образца использовалась кислоторастворимая фракция клеток мышинного лейкоза, получаемая путем обработки клеточной массы или тканевого гомогената 0,5 M хлорной кислотой. В предварительных исследованиях найдено, что однократная экстракция 10-кратным объемом (по отношению к исходному объему ткани) хлорной кислоты практически достаточна для количественного извлечения

всех кислоторастворимых компонентов из клетки. Процедура хлоратной экстракции предельно проста [8], однако имеет некоторые существенные недостатки. Так, остающийся после нейтрализации кислоты хлорат калия (примерно 0,06 М раствор при 0° С) является сильным элюирующим агентом, и его примесь в пробе приводит к значительному снижению времен удерживания на колонке, особенно для веществ, которые элюируются за первые 10 мин. Таким образом, идентификация пиков на хроматограмме по времени удерживания, определенному с использованием искусственной смеси нуклеотидов, приготовленной на воде, приводит к неизбежным ошибкам. Хорошее совпадение времен удерживания для идентичных веществ кислоторастворимой фракции и стандартной смеси наблюдается при приготовлении последней на нейтрализованной хлорной кислоте.

Еще одним недостатком хлоратной экстракции следует считать потерю нуклеотидов при кристаллизации хлората калия в момент нейтрализации экстракта. В наших экспериментах концентрация нуклеотидов в жидкой фазе сразу после нейтрализации кислоты составляла около 70% от расчетной исходной величины и возвращалась к расчетному значению в течение суток при 4° С. Поэтому немедленное после нейтрализации отбрасывание кристаллов труднорастворимого хлората калия заметно уменьшает истинную концентрацию нуклеотидов, что недопустимо при количественном анализе. Практически нейтрализованный экстракт следует выдержать 1 сут при 4° С, после чего его можно хроматографировать либо заморозить и хранить при -20° С. Такое хранение в поликарбонатных флаконах или стеклянных пробирках, обработанных диметилдихлорсиланом, обеспечивает сохранность образцов в течение 3 месяцев без заметного изменения концентраций отдельных компонентов.

Экспериментальная часть

В настоящей работе использован жидкостный хроматограф высокого давления, модель SP-8000 (Spectra Physics, США) с УФ-детектором SP-8310 (254 нм) и электронным интегратором той же фирмы. Хроматографическое разделение производилось на стандартной аналитической колонке с химически привитой фазой Partisil-10 SAX, размер 250×4,6 мм (Whatman, США); для защиты колонки применялась предколонка размером 80×4,6 мм с пелликулярным анионообменником Pellicular Anion Exchanger (Whatman, США).

Для мембранной фильтрации элюентов и образцов использовались фильтры типа HA с размером пор 0,45 мкм и типа GS с размером пор 0,22 мкм (Millipore, США).

Для приготовления элюентов использован хлорид калия марки х.ч. (Союзреактив) без дополнительной очистки; дигидрофосфат калия марки х.ч. (Союзреактив) дополнительно очищали как описано ниже.

$\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ растворяли при нагревании в воде (97° С) до конечной концентрации 5 М, после чего раствор быстро охлаждали на ледяной бане (без сотрясения!) до 10–12° С. Охлажденный пересыщенный раствор интенсивно перемешивали механической мешалкой в течение 30 с. Выпавшие мелкие кристаллы соли собирали на бумажный фильтр, высушивали на воронке Бюхнера. Эту процедуру производили трижды, затем соль растворяли при нагревании в воде (80° С) до конечной концентрации 4 М, раствор охлаждали до 60° С, после чего в него маленькими порциями вливали метанол (при непрерывном перемешивании). Общий объем метанола должен составлять половину объема воды, использованной для приготовления раствора соли. Выпавшие из водно-метанольной смеси мелкие кристаллы $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ собирали на бумажный фильтр, высушивали на воронке Бюхнера и окончательно — в сухожаровом шкафу при 120° С в течение 3 ч.

Этот метод апробирован нами на различных партиях отечественного реактива, различающихся исходным уровнем удельного оптического поглощения. Достижимая степень очистки — $D_{254}^{1,0\text{M}}$ 0,015–0,035 ОЕ.

В работе использованы стандартные рибонуклеотиды: AMP, CMP, UMP, GMP, ADP, CDP, UDP, GDP, UTP, GTP (Serva, ФРГ); ATP (Merck,

ФРГ); СТР (P-L Biochemicals, Inc., США); коферменты NADH и NADPH (Sigma, США); уридиндифосфоглюкоза (Reanal, Венгрия).

При количественном анализе нами использовалась калибровка значений площадей пиков для нуклеотидов четырех оснований. Числовые значения получены при обработке результатов восьми разделений четырех смесей стандартных нуклеотидов. Получены следующие значения соотношений между площадями пиков (мВ·с) и количеством соответствующих нуклеотидов в пробе (пикомоли): адениновые — $6,7 \pm 1,2$; гуаниновые — $7,9 \pm 0,3$; урациловые — $10,8 \pm 0,4$; цитозиновые — $16,0 \pm 0,6$ (коэффициент надежности $P \leq 0,05$).

Кислоторастворимую фракцию извлекали из клеток мышечного лейкоза L 1210 и из ткани печени мышши-самцов линии DBA₂; клетки лейкоза получали на 6–7-е сут после внутрибрюшинной перевивки 10^7 клеток на мышшь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brown P. R. J. Chromatogr., 1970, v. 51, p. 183–194.
2. Brown P. R. J. Chromatogr., 1970, v. 52, p. 257–272.
3. Schmukler H. W. J. Chromatogr. Sci., 1970, v. 8, p. 653–656.
4. Hartwick R. A., Brown P. R. J. Chromatogr., 1975, v. 112, p. 651–657.
5. McKeag M., Brown P. R. J. Chromatogr., 1978, v. 152, p. 253–254.
6. Lui M. S., Jackson R. C., Weber G. Biochem. Pharmacol., 1979, v. 28, № 4, p. 1189–1195.
7. Jackson R. C., Lui M. S., Boritzki T. J., Morris H. P., Weber G. Cancer Res., 1980, v. 40, № 4, p. 1286–1291.
8. Rose L. M., Brockman R. W. J. Chromatogr., 1977, v. 133, № 2, p. 335–341.

Поступила в редакцию
26.X.1982

SEPARATION AND ANALYSIS OF RIBONUCLEOTIDE MIXTURES BY ANION-EXCHANGE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

БЛОКХИН Д. Ю., ПОТЕШНЫХ А. В.

All-Union Cancer Research Center, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow

Ribonucleotides in the artificial mixture or from natural extracts were separated by HPLC on a column with strong anion-exchanger in gradient of pH and concentration of phosphate-chloride buffer system. Peaks were detected by UV-absorbance at 254 nm and detector sensitivity of 0,02 optical units for a full scale, whereas their identification was based on comparison of retention times with those of pure standards. An electronic integrator calibrated for each nucleotide was used for quantitative analysis. The conditions for separating 13 ribonucleotides (including IMP) during 40-minute HPLC-analysis were specified. Some problems pertinent to nucleotide extractions from biological samples are discussed.