



УДК 547.962.32 : 543.544.45

**ПРИМЕНЕНИЕ ВЫСОКОСКОРОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
НА ИОНООБМЕННЫХ СМОЛАХ В НУКЛЕОТИДНОМ АНАЛИЗЕ***Демушкин В. П., Пляшкевич Ю. Г.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Разработаны условия разделения нуклеиновых оснований, нуклеозидов, нуклеотидов и их смесей из гидролизатов НК и олигонуклеотидов методом высокоскоростной жидкостной хроматографии на ионообменных смолах. Показано, что этот метод может быть использован для анализа нуклеотидного состава и концевых звеньев НК и олигонуклеотидов.

Исследование состава и строения НК и олигонуклеотидов включает в себя разделение и идентификацию продуктов их химической или ферментативной деструкции. Такие традиционные методы разделения, как БХ, ТСХ, КХ и электрофорез, требуют либо больших затрат времени, либо значительных количеств вещества [1]. Для сокращения времени анализа и уменьшения количества вещества весьма перспективна скоростная КХ с использованием хроматографов высокого давления [2]. Однако большинство известных хроматографических систем не может быть использовано в хроматографах высокого давления из-за их малой коррозионной устойчивости. В настоящей работе изложены результаты по подбору условий разделения продуктов химического и ферментативного гидролиза НК и олигонуклеотидов методом высокоскоростной жидкостной хроматографии.

Продукты гидролиза НК и олигонуклеотидов разделяли методом ионообменной хроматографии, которая наиболее устойчива к изменению солевого состава среды, вызванного введением образца.

Как показали многочисленные исследования, хроматографическое поведение компонентов НК на колонках с ионообменными смолами определяется величиной заряда и силами неионного взаимодействия разделяемых соединений с полимерной матрицей насадки. При поиске хроматографических систем исходили из соответствия условий хроматографии условиям гидролиза, т. е. фракционирование продуктов кислотного гидролиза проводили при низком значении рН элюирующего буфера, а продуктов ферментативного и щелочного гидролиза — при слабощелочном рН. Если в выбранной по этому принципу области рН компоненты гидролизата сильно различались по зарядам, то их разделяли в условиях, когда неионные взаимодействия уменьшены повышением температуры и добавлением в элюирующий буфер спирта. Если же заряды компонентов были близки, хроматографию проводили в условиях, способствующих неионным взаимодействиям.

В зависимости от природы анализируемого вещества используют химические или ферментативные способы гидролиза, продуктами которого

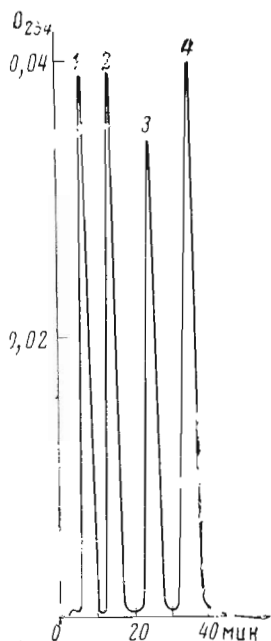


Рис. 1

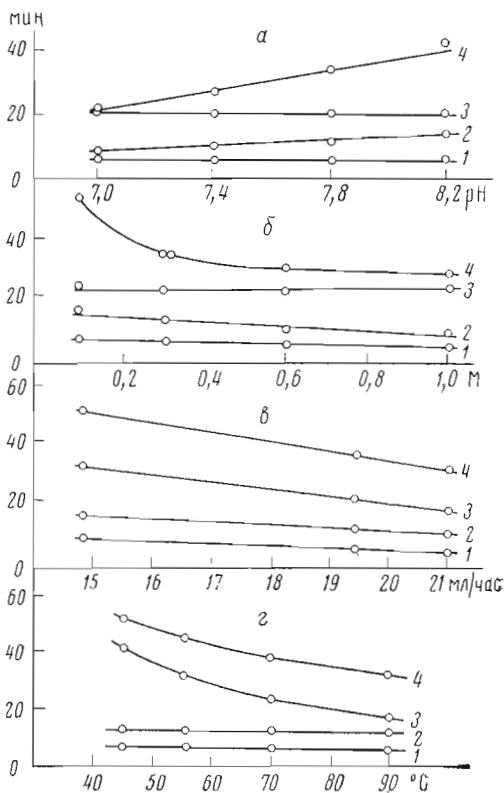


Рис. 2

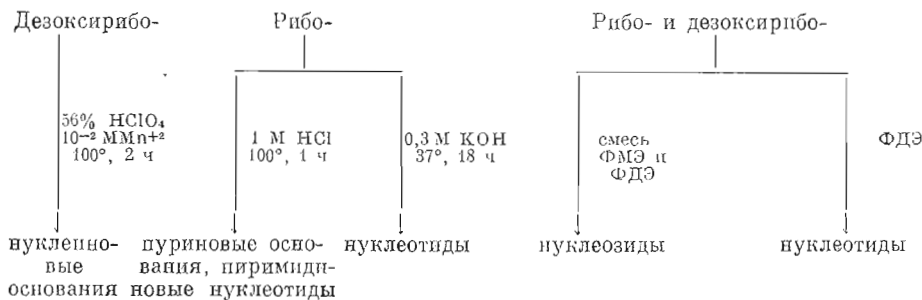
Рис. 1. Хроматография 0,08 ОЕ₂₆₀ нуклеиновых оснований после гидролиза ДНК хлорной кислотой на колонке Б с Aminex А-7. Элюент — содержащий 20% спирта, 1 М NaH₂PO₄, доведенный муравьиной кислотой до pH 3,4, температура 70°, скорость элюции 8 мл/ч, давление 138·10⁴ Н/м². 1 — Thy, 2 — Gua, 3 — Ade, 4 — Cyt

Рис. 2. Зависимость времени удерживания рибонуклеозидов на колонке В с Aminex А-28 от pH элюирующего 0,3 М фосфат-боратного буфера, 70°, 20 мл/ч (а); концентрации при pH 7,8; 70°, 20 мл/ч (б); скорости элюции тем же буфером при pH 7,8 и 70° (в); температуры — элюция тем же буфером при pH 7,8; 20 мл/ч (г). 1 — Cyt, 2 — Urd, 3 — Ado, 4 — Guo

являются нуклеиновые основания, нуклеозиды и нуклеотиды. В связи с этим возможны различные варианты анализа нуклеотидного состава НК и олигонуклеотидов (схема 1).

Схема 1

Анализ нуклеотидного состава нуклеиновых кислот и олигонуклеотидов
(ФМЭ — фосфомоноэстераза, ФДЭ — фосфодиэстераза)



Продукты кислотного гидролиза ДНК и дезоксиолигонуклеотидов фракционировали при 70° на катионите Aminex А-7 в 1 М NaH₂PO₄, со-

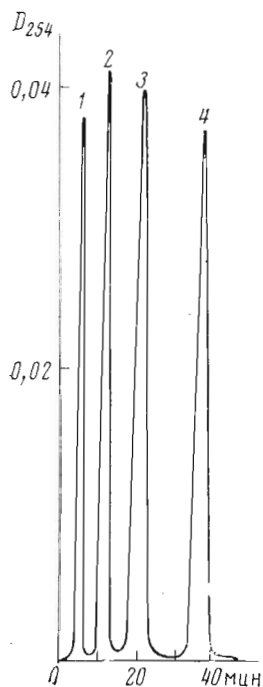


Рис. 3

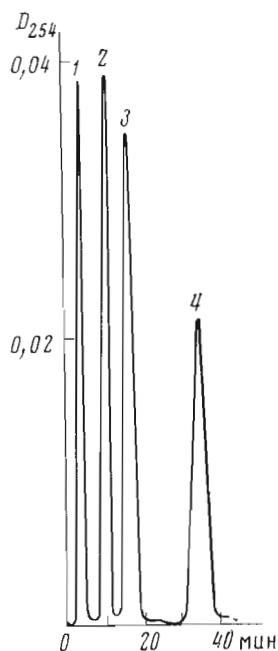


Рис. 4

Рис. 3. Хроматография 0,08 OE_{260} смеси рибонуклеозидов на колонке В с Aminex A-28. Элюент — 0,3 М фосфат-боратный буфер, рН 7,8, температура 70° , скорость элюции 20 мл/ч, давление $165 \cdot 10^4$ Н/м². 1 — Cyd, 2 — Urd, 3 — Ado, 4 — Guo

Рис. 4. Хроматография 0,08 OE_{260} смеси дезоксирибонуклеозидов на колонке В с Aminex A-28. Элюент — 0,1 М фосфат-боратный буфер, рН 7,8, температура 60° , скорость элюции 20 мл/ч, давление $179 \cdot 10^4$ Н/м². 1 — dCyd, 2 — dThd, 3 — dAdo, 4 — dGuo

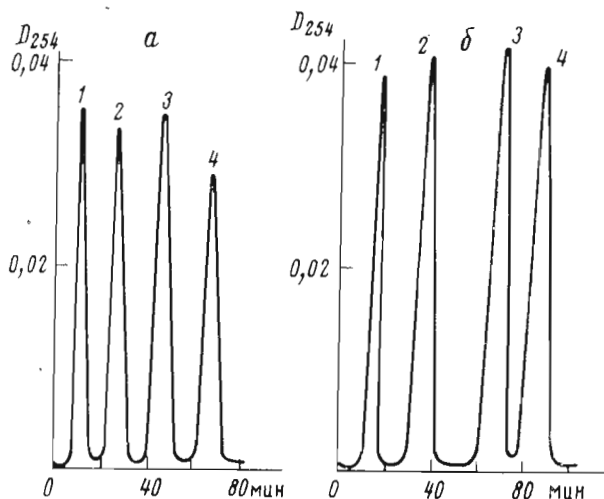


Рис. 5. Хроматография 0,08 OE_{260} смеси 5'-нуклеотидов рибо- (а) и дезоксирибонуклеотида (б) на колонке В с Aminex A-28. Элюент — 0,8 М фосфат-боратный буфер, рН 7, 8, температура 70° , скорость элюции 20 мл/ч, давление $131 \cdot 10^4$ Н/м². а) 1 — CMP, 2 — UMP, 3 — AMP, 4 — GMP; б) 1 — dCMP, 2 — dTMP, 3 — dAMP, 4 — dGMP

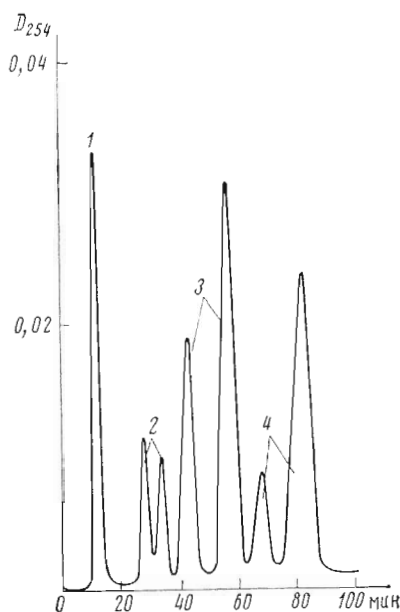


Рис. 6

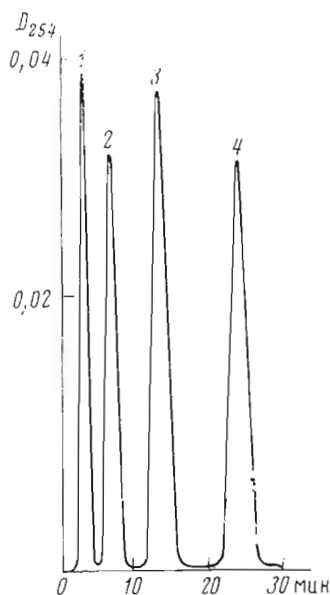


Рис. 7

Рис. 6. Хроматография 0,08 ОЕ₂₆₀ смеси 2'(3')-моонуклеотидов на колонке В с Aminex A-28. Элюент — 0,8 М фосфат-боратный буфер, рН 7, 8, температура 90°, скорость элюции 30 мл/ч, давление $255 \cdot 10^4$ Н/м². 1 — CMP, 2 — UMP, 3 — AMP, 4 — GMP

Рис. 7. Хроматография 0,08 ОЕ₂₆₀ гидролизата РНК 1 М HCl на двух сборных колонках А с Aminex A-28 и Aminex A-7. Элюент — 1 М фосфатный буфер, рН 3,5, температура 70°, скорость элюции 16 мл/ч, давление $241 \cdot 10^4$ Н/м². 1 — Ср, 2 — Ур, 3 — Gua, 4 — Ade

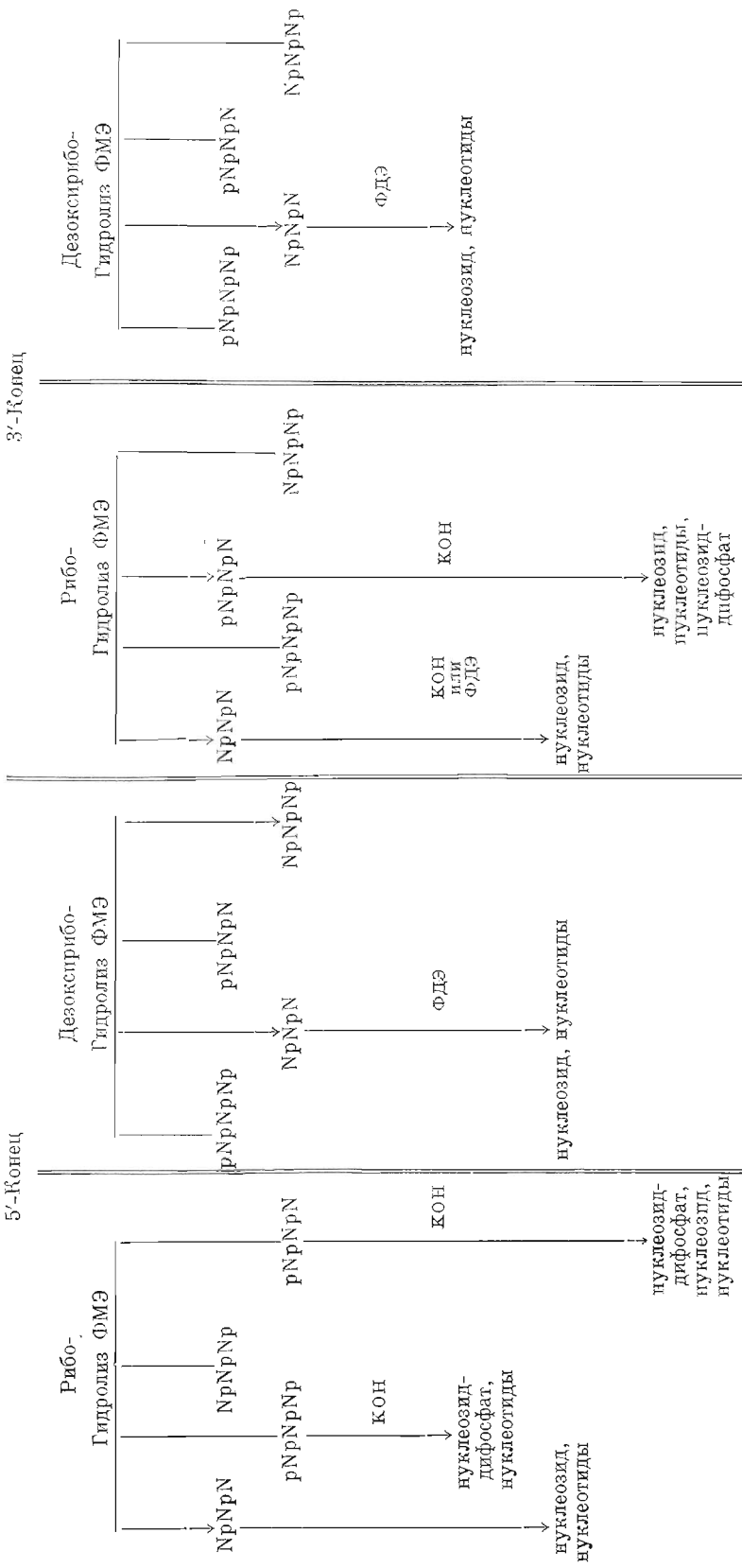
держащем 20% спирта, при рН 3,4. В этих условиях наблюдается сильное различие в зарядах нуклеиновых оснований, а неионные взаимодействия подавлены за счет повышенной температуры и добавления спирта. Все четыре основания разделяются количественно, порядок их выхода с колонки коррелирует с величиной заряда в условиях разделения (рис. 1.)

Продуктами ферментативного гидролиза РНК, ДНК и соответствующих олигонуклеотидов являются нуклеозиды и нуклеотиды. Так как гидролиз проходит в нейтральной или щелочной среде, хроматографию проводили при слабощелочном значении рН элюирующего буфера. В этих условиях нуклеозиды и нуклеотиды несут нулевой или отрицательный заряд, поэтому в качестве насадки использовали анионообменную смолу Aminex A-28. Как было показано нами ранее [3], при элюции фосфат-боратным буфером (рН 8,25) наблюдается хорошее разделение нуклеиновых оснований. Поскольку при рН ≤ 8 разница в зарядах нуклеиновых оснований и соответствующих нуклеозидов незначительна, можно ожидать, что последние будут делиться в близких с основаниями условиях.

Для выяснения характера взаимодействия с ионообменной смолой были изучены зависимости времени удерживания рибонуклеозидов от рН элюирующего буфера, концентрации, скорости элюции и температуры. Анализ полученных результатов (рис. 2) показывает, что время удерживания для цитидина, уридина и аденозина практически не зависит от концентрации и рН элюирующего буфера. Следовательно, их хроматографическое поведение определяется в основном силами неионного взаимодействия с насадкой. Некоторое увеличение времени удерживания аденозина с возрастанием концентрации буфера, вероятно, объясняется эффектом высаливания. Графики зависимости времени удерживания гуанозина от

Схема 2

Анализ концевых групп олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот



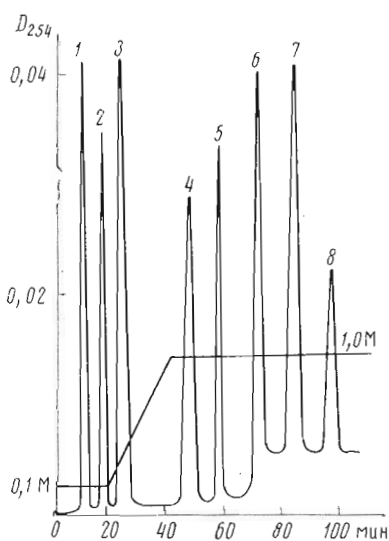


Рис. 8

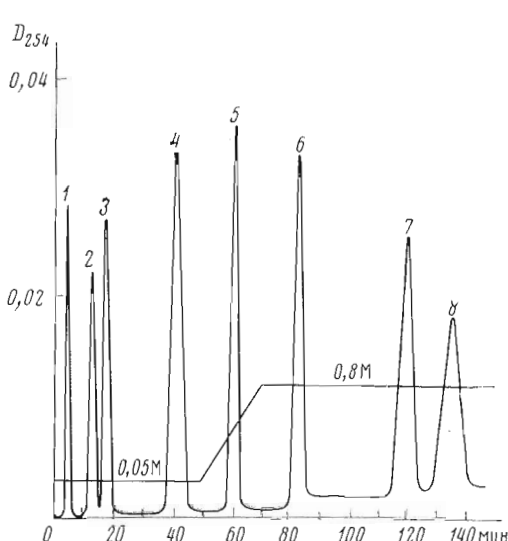


Рис. 9

Рис. 8. Хроматография 0,14 OE_{260} смеси рибонуклеозидов и 5'-нуклеотидов на колонке В с Aminex A-28. Элюент — градиент 0,1—1 М фосфат-боратного буфера, рН 7,8, температура 70°, скорость элюции 25 мл/ч, давление $193 \cdot 10^4$ Н/м². 1 — Urd, 2 — Urd, 3 — Ado, 4 — Guo, 5 — CMP, 6 — UMP, 7 — AMP, 8 — GMP

Рис. 9. Хроматография 0,14 OE_{260} смеси дезоксирибонуклеозидов и 5'-нуклеотидов на колонке В с Aminex A-28. Элюент — градиент 0,05—0,8 М фосфат-боратного буфера, температура 60°, скорость элюции 25 мл/ч, давление $221 \cdot 10^4$ Н/м². 1 — dCyd, 2 — dThd, 3 — dAdo, 4 — dGuo, 5 — dCMP, 6 — dTMP, 7 — dAMP, 8 — dGMP

температуры, концентрации и рН элюирующего буфера показывают, что его хроматографическое поведение определяется как силами неионного взаимодействия, так и наличием слабого отрицательного заряда. В зависимости от температуры время удерживания пуриновых нуклеозидов больше, нежели пиримидиновых.

Таким образом, разделение всех нуклеозидов достигается за счет сил неионного взаимодействия с полимерной матрицей ионообменной смолы. Оптимальные условия разделения приведены на рис. 3. Разделение дезоксирибонуклеозидов наблюдается при том же значении рН, но меньшей концентрации элюирующего буфера (рис. 4).

Изучение хроматографического поведения нуклеозидов на Aminex A-28 позволило легко подобрать условия разделения 5'-рибо- и дезоксирибонуклеотидов (рис. 5).

Смесь 2'(3')-мононуклеотидов после щелочного гидролиза РНК хроматографировали при рН 7,8, увеличив концентрацию буфера, температуру и скорость элюции. В этих условиях для уридин-, аденозин- и гуанозин-монофосфатов наблюдается разделение 2'- и 3'-производных (рис. 6).

Опыт, накопленный при хроматографическом разделении нуклеиновых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов, значительно ускорил поиск системы для фракционирования пуриновых оснований и пиримидиновых нуклеотидов, образующихся при гидролизе РНК с помощью 1 М НСl. Так как при хроматографии в кислой системе, которая оптимальна для разделения оснований и соответствует условиям гидролиза, нуклеотиды разделяются на катионите хуже, чем на анионите, для фракционирования гидролизата РНК использовали предложенный ранее [4] метод сборных колонок (рис. 7).

Стандартный анализ концевых групп рибо- и дезоксирибоолигонуклеотидов и нуклеиновых кислот, являющийся одним из необходимых методов

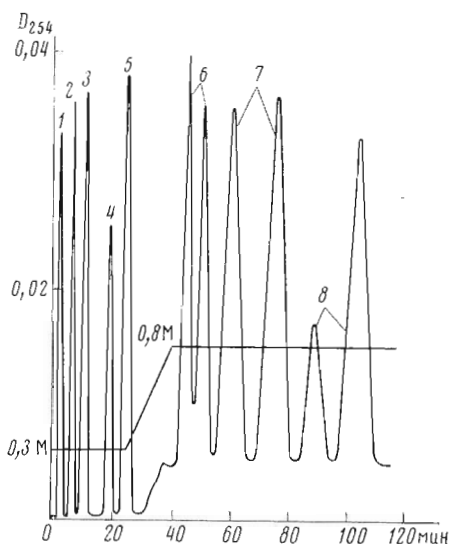


Рис. 10. Хроматография 0,15 OE_{260} смеси нуклеозидов и 2' (3')-моонуклеотидов на колонке В Aminex A-28. Элюент — градиент 0,3—0,8 М фосфат-боратного буфера, рН 7,8, температура 85° , скорость элюции 30 мл/ч, давление $241 \cdot 10^4$ Н/м². 1 — Cyd, 2 — Urd, 3 — Ado, 4 — Guo, 5 — CMP, 6 — UMP, 7 — AMP, 8 — GMP

колонку без предварительной нейтрализации, что повышает воспроизводимость и облегчает процедуру анализа. Для всех компонентов рассматриваемых смесей коэффициент разрешения $R_s > 1$, что позволяет проводить как качественный, так и количественный анализ. Ошибка количественного определения при использовании интегратора фирмы Varian Aerograph (модель 485) $\pm 3\%$.

Экспериментальная часть

Использовали нуклеиновые основания, нуклеозиды, нуклеотиды и ДНК из эритроцитов цыпленка (Reanal, Венгрия), РНК (Serva, Англия). Буферные растворы готовили из NaH_2PO_4 марки х.ч., H_3PO_4 , $HCOOH$ и H_3BO_3 марки ч.д.а. («Реахим», СССР) и $NaOH$ (Reanal, Венгрия). Хлорную кислоту перегоняли под вакуумом и разбавляли дистиллированной водой до концентрации 56%.

В качестве набивки использовали анионообменную смолу Aminex A-28 и катионообменную смолу Aminex A-7, Bio-Rad (США).

Хроматографию проводили на жидкостном хроматографе высокого давления Varian LC-4200 (Varian Aerograph, Швейцария) с ультрафиолетовой детекцией при 254 нм. Колонки из нержавеющей стали диаметром 1,8 мм и длиной 20 (А), 25 (Б) и 50 см (В).

Гидролиз хлорной кислоты. Раствор (20—100 мкл), содержащий 0,25 OE_{260} ДНК или дезоксиолигонуклеотида и 1 мкл 0,1 М $MnSO_4$ в стеклянной ампуле длиной 40 мм и внутренним диаметром 2,5 мм, высушивали досуха струей воздуха. Затем в ампулу вводили 10 мкл 56% $HClO_4$, запаивали и нагревали 2 ч при 100° . Как показали специальные опыты, в этих условиях не происходит разложения тимина, а основание отщепляется полностью даже от наиболее устойчивой к гидролизу дрС. Пробы гидролизата по 3 мкл вводили с помощью гамльтоновского шприца через стеклянную насадку.

нуклеотидного анализа, обычно проводится по схеме 2. Нетрудно видеть, что основные продукты гидролиза — это нуклеозиды, нуклеотидмоно- и дифосфаты. Приведенные ранее системы оказались, как основа, весьма эффективными для разделения такого типа соединений. Используя градиентную элюцию, удалось разделить смеси нуклеозидов и 5'-нуклеотидов рибо- (рис. 8) и дезоксирибоза (рис. 9) и смеси нуклеозидов и 2' (3')-нуклеотидов (рис. 10).

Таким образом, разработан комплекс методов определения состава и концевых звеньев НК и олигонуклеотидов с помощью высокоскоростной жидкостной хроматографии на ионообменных смолах продуктов соответствующих гидролизатов с использованием двух типов ионообменных смол. Разделение большинства гидролизатов проводится при одном и том же значении рН элюирующего буфера, что позволяет быстро переходить с одного вида анализа на другой. Деструкции образцов в процессе анализа не наблюдается. Условия хроматографии позволяют вносить образец в

Гидролиз РНК осуществляли 1 М HCl в запаянной ампуле при 100° в течение 1 ч [5]. Щелочной гидролиз РНК проводили 0,3 М KOH при 37° в течение 18 ч [6].

Количественный анализ фракций осуществляли с помощью электронного цифрового интегратора фирмы Varian Aerograph (модель 485) с использованием стандартных методов [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуськова Л. И., Демущкин В. П. (1974) Успехи химии, XIII, вып. 7, 1241—1281.
2. Burtis C. A., Gere D. R. (1970) Nucleic Acid Constituents by Liquid Chromatography, Varian Aerograph, Switzerland.
3. Demushkin V. P., Plyashkevich Yu. G. (1976) Anal. Biochem., in press.
4. Snyder L. R. (1970) J. Chromatogr. Sci., 8, 692—706.
5. Уайт Г. (1957) Нуклеиновые кислоты (под ред. Чаргафф Э., Давидсон Дж.), Изд-во иностр. лит., М.
6. Davidson J. N., Smellie R. M. S. (1952) Biochem. J., 52, 594—599.
7. Дюерфель К. (1969) Статистика в аналитической химии, «Мир», М.

Поступила в редакцию
3.V.1976

THE USE OF HIGH-SPEED ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY IN THE NUCLEOTIDE ANALYSIS

DEMUSHKIN V. P., PLYASHKEVICH Yu. G.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The systems for high-speed liquid ion-exchange chromatography of nucleic bases, nucleosides, nucleotides and their mixtures in NA and oligonucleotide hydrolysates are developed. The method potency is demonstrated for the analyses of nucleotide composition and end groups of NA and oligonucleotides.