



УДК 547.963.32.057:542.95

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ИОН-ПАРНОЙ ВЭЖХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

© 1997 г. В. Н. Ташлицкий<sup>#</sup>, Т. С. Орецкая*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119899, Москва*

Поступила в редакцию 25.10.96 г. Принята к печати 22.05.97 г.

Изучены закономерности ион-парной ВЭЖХ олигонуклеотидов. Предложен алгоритм расчета градиента концентрации ацетонитрила, обеспечивающего прямую пропорциональность между числом нуклеотидных звеньев и временем удерживания ( $t_R$ ) олигонуклеотида. Такое разделение названо эквидистантным. Алгоритм основан на экстраполяции результатов разделения тестовой смеси пяти олигонуклеотидов длиной от 10 до 30 звеньев. Показано, что логарифмический градиент концентрации ацетонитрила  $C_0 + m \ln(t)$  приводит к эквидистантному разделению олигонуклеотидов. Разделение характеризуют два измеряемых параметра: шаг времени удерживания и степень эквидистантности. Экспериментально установлена функциональная зависимость измеряемых параметров от двух варьируемых параметров логарифмической функции ( $C_0$ ,  $m$ ). Предложен метод расчета ожидаемого времени удерживания олигонуклеотида по его нуклеозидному составу.

*Ключевые слова:* олигонуклеотиды, ион-парная высокоэффективная жидкостная хроматография, эквидистантное разделение.

Получение олигодезоксирибонуклеотидов высокой степени чистоты становится актуальной задачей в связи с их широким использованием для гибридизационного метода диагностики, в генно-инженерных экспериментах [1, 2], в качестве праймеров для автоматического секвенса ДНК и полимеразной цепной реакции [3, 4]. Кроме того, предпринимаются попытки использования модифицированных олигонуклеотидов в антисенсовой терапии [5, 6]. Необходимая степень чистоты синтетического олигонуклеотида зависит от его предполагаемого применения. Наиболее тщательные очистка и анализ синтетических олигонуклеотидов желательны для сайт-направленного мутагенеза и в антисенсовых исследованиях. Традиционно эти задачи решаются методом электрофореза в полиакриламидном геле [7], что обусловлено превосходным разрешением, чувствительностью и производительностью данного метода в сочетании со сравнительной дешевизной. Однако большие потери, наблюдающиеся при элюции олигонуклеотидов из полиакриламидного геля, затрудняют использование данного метода в препаративных целях, а полуколичественный характер получаемых результатов препятствует его применению для контроля чистоты выделенных олигонуклеотидов. Метод капиллярного зонного электрофореза сочетает ряд достоинств электрофореза с возможностью количественной оценки и простотой визуализации данных [8]. Благодаря этому метод капиллярного

зонного электрофореза представляется весьма перспективным для анализа чистоты олигонуклеотидов, но непригоден в препаративных целях. Таким образом, единственным методом, сочетающим необходимые разрешение и чувствительность с решением препаративных задач, остается высокоэффективная жидкостная хроматография.

Задача анализа и разделения олигонуклеотидов решается двумя основными методами ВЭЖХ: обращенно-фазовой и анионообменной [9–11]. Наиболее часто используется обращенно-фазовая ВЭЖХ, однако для разделения сложных, многокомпонентных смесей моно-, олиго- и полинуклеотидов применяются различные варианты анионообменной хроматографии [10–14]. К недостаткам анионообменной ВЭЖХ следует отнести ее относительную дороговизну и отсутствие универсальности анионообменных сорбентов. Достоинства анионообменной хроматографии соединились с относительной дешевизной и большей универсальностью обращенно-фазовой хроматографии в ион-парной ВЭЖХ. В данном методе используются сорбент со стандартной для обращенно-фазовой ВЭЖХ стационарной фазой (ODS) и градиент концентрации ацетонитрила, но в элюенте содержится ион-парный компонент. Для разделения нуклеиновых кислот лучшим ион-парным компонентом является ион тетрабутиламмония [15]. Установлены оптимальные концентрации иона тетрабутиламмония (2 мМ) и калий-фосфатного буфера (50 мМ, рН 7) [15, 16]. Причина, по которой

<sup>#</sup> Автор для переписки.

метод ион-парной ВЭЖХ не получил должной популярности при анализе сложных смесей олигонуклеотидов, связана, по-видимому, с его более низкой селективностью по сравнению с ионным обменом. Есть немногочисленные данные об успешном использовании ион-парного метода, однако для каждой реакционной смеси олигонуклеотидов приходилось подбирать индивидуальный линейный градиент концентрации ацетонитрила [15], соли [17] или иона тетрабутиламмония [18]. Цель настоящего исследования – разработка метода расчета универсальных градиентов, обеспечивающих эквидистантное разделение олигонуклеотидов, основанного на экстраполяции результатов разделения тестовой смеси, состоящей из набора олигонуклеотидов различной длины. Эквидистантное разделение олигонуклеотидов характеризуется прямой пропорциональностью между временем удерживания олигонуклеотида и числом нуклеотидных звеньев, входящих в его состав.

### 1. ВЫБОР ГРАДИЕНТА ДЛЯ ЭКВИДИСТАНТНОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Тестовая смесь включает набор олигодезоксирибоаденилатов, содержащих 10, 15, 20, 25 и 30 нуклеотидных звеньев. Разделение этой тестовой смеси в линейном градиенте ацетонитрила от 5 до 40% за 60 мин (рис. 1, профиль элюции 1) не может считаться удовлетворительным, так как шаг времени удерживания ( $\delta t_R$ ), т.е. разница во временах удерживания олигонуклеотидов, длина которых отличается на одно звено, резко убывает с увеличением длины олигонуклеотидов. Оказалось, что в условиях линейного градиента зависимость времени удерживания олигонуклеотида ( $t_R$ ) от числа нуклеотидных звеньев ( $n$ ), входящих в его состав, удовлетворительно описывается логарифмической функцией вида

$$t_R^{(n)} = t_0 + k \ln(n),$$

где  $t_R^{(n)}$  – время удерживания олигоаденилата, содержащего  $n$  звеньев. Линейный градиент концентрации ацетонитрила означает, что

$$C_{MeCN} = k_1 t + b$$

( $C_{MeCN}$  – объемная концентрация ацетонитрила в подвижной фазе), т.е.

$$C_{MeCN} = k_1 t_0 + b + k_1 k \ln(n). \quad (1)$$

Такая зависимость обусловлена, по-видимому, постоянством относительного вклада каждого нуклеотидного звена. Таким образом,

$$d(t_R^{(n)}) = kdn/n = (1/k_1) dC_{MeCN}.$$

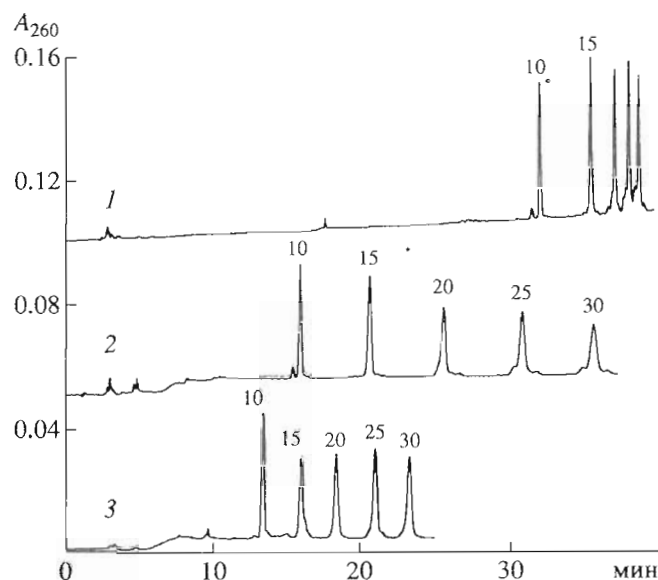


Рис. 1. Разделение тестовой смеси олигонуклеотидов с использованием линейного градиента ацетонитрила 5–40% за 60 мин (1) и логарифмических градиентов с шагом 1 (2) и 0.5 мин/звено (3). Цифры над пиками соответствуют длине олигомера, входящего в состав тестовой смеси.

Наиболее привлекательно эквидистантное разделение олигонуклеотидов, которое характеризуется постоянством шага времени удерживания для олигонуклеотидов различной длины. Это означает, что величина  $t_R$  должна быть прямо пропорциональна числу нуклеотидных звеньев олигонуклеотида с коэффициентом пропорциональности, равным  $\delta t_R$ :

$$t_R^{(n)} = \delta t_R n,$$

где  $\delta t_R$  – шаг времени удерживания.

Подстановка этого уравнения в (1) дает вид функции градиента концентрации ацетонитрила, удовлетворяющий эквидистантному разделению олигонуклеотидов:

$$C_{MeCN} = C_0 + m \ln(t), \quad (2)$$

где  $C_0 = k_1 t_0 + b - \ln(\delta t_R)$ ,  $m = k_1 k$ .

Видно, что концентрация ацетонитрила при  $t = 1$  мин (параметр  $C_0$ ) является функцией шага времени удерживания  $\delta t_R$ , а инкремент  $m$  – величина постоянная. Стандартные системы ВЭЖХ-контроллеров не предусматривают использования логарифмических градиентов. Чтобы обойти это затруднение, можно описать логарифмическую функцию ограниченным числом линейных сегментов. Оказалось, что эквидистантная элюция тестовой смеси не нарушается в течение 40 мин, если использовать всего семь линейных сегментов: 0–1; 1–2; 2–5; 5–10; 10–20; 20–30 и 30–40 мин.

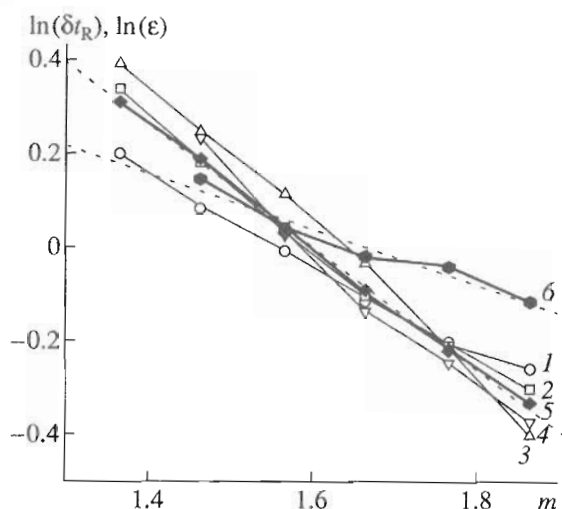


Рис. 2. Зависимости в полулогарифмических координатах шага времени удерживания 10, 15, 20 и 25-звенных олигонуклеотидов тестовой смеси (1–4 соответственно), среднего шага времени удерживания (5) и степени эквидистантности (6) от инкремента  $m$  при постоянном свободном члене  $C_0 = 18.44\%$  логарифмического градиента концентрации ацетонитрила. Пунктиром обозначены линейные аппроксимации (5, 6).

Значения концентрации ацетонитрила в моменты времени 1, 2, 5, 10, 20, 30 и 40 мин рассчитываются по уравнению (2). На рис. 1 (2, 3) показано разделение тестовой смеси олигонуклеотидов с шагом времени удерживания 1 и 0.5 мин/звено соответственно в градиентах концентрации ацетонитрила, удовлетворяющих уравнению (2).

## 2. ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКВИДИСТАНТНОГО ГРАДИЕНТА МЕТОДОМ ЭКСТРАПОЛЯЦИИ

Для разработки алгоритма оптимизации градиента по результатам разделения тестовой смеси олигонуклеотидов была установлена связь между варьируемыми параметрами градиента ( $C_0$  и  $m$ ) и измеряемыми величинами удерживания, характеризующими разделение тестовой смеси. Профиль элюции тестовой смеси позволяет рассчитать четыре шага времени удерживания для 10, 15, 20 и 25-звенных олигодезоксирибоаденилатов по формуле

$$\delta t_R^{(5+5i)} = (t_R^{(10+5i)} - t_R^{(5+5i)})/5,$$

где  $t_R^{(5+5i)}$  и  $t_R^{(10+5i)}$  – времена удерживания  $i$ -го и  $i+1$ -го компонентов тестовой смеси, содержащих  $5+5i$  и  $10+5i$  звеньев;  $\delta t_R^{(5+5i)}$  – шаг времени удерживания  $i$ -го компонента тестовой смеси.

Оказалось, что шаг времени удерживания экспоненциально убывает с увеличением инкремента  $m$ . На рис. 2 приведены зависимости шага времени удерживания 10, 15, 20 и 25-звенных олиго-

дезоксирибоаденилатов от параметра  $m$  в полулогарифмических координатах (кривые 1–4 соответственно) при  $C_0 = 18.44\%$ . Условие эквидистантности достигается в точке пересечения этих четырех кривых. В качестве параметра, характеризующего степень эквидистантности ( $\epsilon$ ), целесообразно выбрать отношение шагов времени удерживания 25- и 10-звенного олигонуклеотидов тестовой смеси. Рассчитывается степень эквидистантности по уравнению

$$\epsilon = (t_R^{(30)} - t_R^{(25)}) / (t_R^{(15)} - t_R^{(10)}), \quad (3)$$

где  $t_R^{(10)}$ ,  $t_R^{(15)}$ ,  $t_R^{(25)}$  и  $t_R^{(30)}$  – времена удерживания 10, 15, 25 и 30-звенных олигонуклеотидов тестовой смеси.

По тангенсу угла наклона линейной аппроксимации зависимости степени эквидистантности  $\epsilon$  от инкремента  $m$  в полулогарифмических координатах (рис. 2, б) рассчитан коэффициент  $\alpha = -d(\ln(\epsilon))/dm$  – первая константа, необходимая для оптимизации градиента.

Вторым анализируемым параметром является средний шаг времени удерживания олигонуклеотидов тестовой смеси. Так как тестовая смесь состоит из олигодезоксирибоаденилатов, средний шаг времени удерживания дезоксирибозидозинного звена ( $\delta t_R^A$ ) вычисляется по формуле

$$\delta t_R^A = (t_R^{(30)} - t_R^{(10)})/20. \quad (4)$$

По тангенсу угла наклона линейной аппроксимации зависимости среднего шага  $\delta t_R^A$  от инкремента  $m$  в полулогарифмических координатах (рис. 2, 5) рассчитывается коэффициент  $\beta = -d(\ln(\delta t_R^A))/dm$  – вторая константа, используемая для оптимизации градиента.

Как видно из рис. 3, степень эквидистантности практически не зависит от параметра  $C_0$ , а средний шаг времени удерживания экспоненциально убывает с увеличением  $C_0$ . График зависимости  $\ln(\delta t_R^A)$  от  $C_0$  позволяет рассчитать коэффициент  $\gamma = -d(\ln(\delta t_R^A))/dC_0$ . Коэффициенты, необходимые для расчета эквидистантного градиента, оказались равны:  $\alpha = 0.5983$ ,  $\beta = 1.308$ ,  $\gamma = 0.4538$ . Однако эти коэффициенты различаются для сорбентов разных фирм, зависят от размеров колонки и условий разделения (температуры, скорости потока и состава элюентов). Поэтому для оптимизации градиента методом экстраполяции каждый новый тип колонок или условия разделения должны тестироваться и коэффициенты  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  рассчитываться заново. Построение эквидистантного градиента с заданным шагом ( $i$ ) требует расчета уточненных значений начальной концентрации  $C_0^{(i)}$  и инкремента  $m^{(i)}$  с помощью степени

эквидистантности  $\epsilon$  и среднего шага  $\delta t_R A$ , найденных при анализе тестовой смеси олигодезоксирибоаденилатов по градиенту с произвольно выбранными значениями  $C_0$  и  $m$ . Для градиента с шагом 1 мин/звено параметры рассчитываются по уравнениям

$$m^{(1)} = m + (\ln(\epsilon))/\alpha, \tag{5}$$

$$C_0^{(1)} = C_0 + (\ln(\delta t_R) - (\beta \ln(\epsilon))/\alpha)/\gamma.$$

Второй градиент (с шагом 0.5 мин/звено) отличается только величиной параметра  $C_0$ :

$$C_0^{(2)} = C_0^{(1)} + (\ln(2))/\gamma, \tag{6}$$

$$m^{(2)} = m^{(1)}.$$

Профили элюции 2 и 3 (на рис. 1) показывают разделение тестовой смеси олигонуклеотидов с шагом времени удерживания 1 и 0.5 мин/звено соответственно по эквидистантным градиентам, значения  $C_0^{(1)}$ ,  $C_0^{(2)}$  и  $m$  которых рассчитаны по уравнениям (5) и (6).

### 3. РАСЧЕТ ВРЕМЕНИ УДЕРЖИВАНИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ГЕТЕРОГЕННОГО СОСТАВА

Результаты хроматографического анализа смесей олигонуклеотидов гомогенного состава по эквидистантному градиенту с шагом времени удерживания 1 мин/звено, рассчитанному с помощью найденных выше закономерностей по разделению тестовой смеси олигодезоксирибоаденилатов (рис. 4), показали, что природа нуклеозидного звена влияет на шаг времени удерживания, но не влияет на степень эквидистантности. На примере олигоаденилатов видно, что дезокси- и рибонуклеозиды имеют практически одинаковый шаг времени удерживания. Значения относительного шага времени удерживания, рассчитанные по результатам анализа смесей олигонуклеотидов, гомогенного и гетерогенного состава (таблица), свидетельствует, что увеличение шага времени удерживания в ряду звеньев G, C, U, A и T не совпадает с ростом времени удерживания нуклеозидов в ряду C, U, G, T и A при ВЭЖХ в аналогичных условиях [16]. Следовательно, величина шага времени удерживания обусловлена не только гидрофобностью соответствующих нуклеозидов. С другой стороны, время удерживания для нуклеозидмонофосфатов возрастает в ряду CMP, UMP, GMP и AMP, а время удерживания нуклеозидди- и трифосфатов увеличивается в ряду CDP (CTP), GDP (GTP), UDP (UTP) и ADP (ATP) [16]. Эти изменения в зависимости времени удерживания нуклеотида и олигонуклеотида от числа фосфатных групп и природы основания в нем позволяют предположить, что во взаимодействии с ионом тетрабутиламмония, используемого в качестве ион-парного компонента,

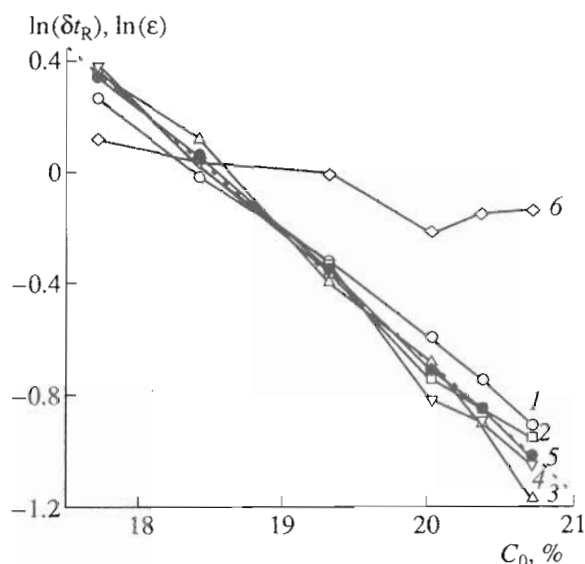


Рис. 3. Зависимости в полулогарифмических координатах шага времени удерживания 10, 15, 20 и 25-звенных олигонуклеотидов тестовой смеси (1-4 соответственно), среднего шага времени удерживания (5) и степени эквидистантности (6) от свободного члена  $C_0$  логарифмического градиента концентрации ацетонитрила при постоянном инкременте  $m = 1.564$ . Пунктиром обозначена линейная аппроксимация (5).

участвует как фосфатная группа, так и нуклеиновое основание. Кроме того, взаимодействие иона тетрабутиламмония с межнуклеотидной, пирофосфатной и концевой фосфатной группами несколько различается.

Исходя из предположения аддитивности вклада каждого нуклеозидного звена время удерживания олигонуклеотида можно рассчитать по уравнению

$$t_R = T_0 + \delta t_R^A \{ n_A + n_T (\delta t_R^T / \delta t_R^A) + n_C (\delta t_R^C / \delta t_R^A) + n_G (\delta t_R^G / \delta t_R^A) \}, \tag{7}$$

где  $T_0$  – время, теоретически соответствующее началу элюции олигонуклеотидов,  $n_A, n_T, n_C, n_G$  – число соответствующих нуклеозидов (A, T, C, G) в составе исследуемого олигонуклеотида.

Необходимое для расчета по уравнению (7) значение  $T_0$  может быть вычислено по результатам разделения тестовой смеси:

$$T_{0,i} = t_R^{(s+5i)} - 5(i+1)\delta t_R^{(s+5i)}, \tag{8}$$

Зависимость относительного шага времени удерживания от природы нуклеозидного звена

Нуклеозид (N)	rA, dA	U	rC, dC	T	rG, dG
$\delta t_R^N / \delta t_R^A$	1.000	0.854	0.567	1.302	0.520

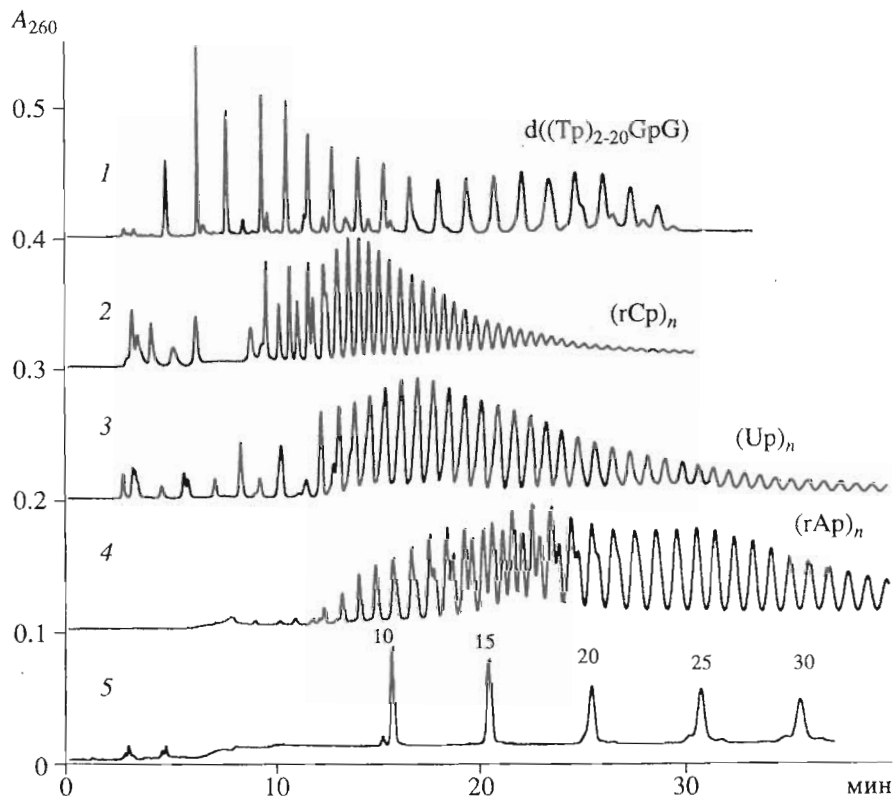


Рис. 4. Анализ смеси олигонуклеотидов гомогенного состава с шагом времени удерживания 1 мин/звено ( $C_0 = 18.44\%$ ,  $m = 1.564$ ): 1 –  $d((Tp)_{2-20}GpG)$ , 2 – олигорибоцитидин, 3 – олигорибоуридин, 4 – олигорибоаденозин, 5 – тестовая смесь олигодезоксирибоаденозинов.

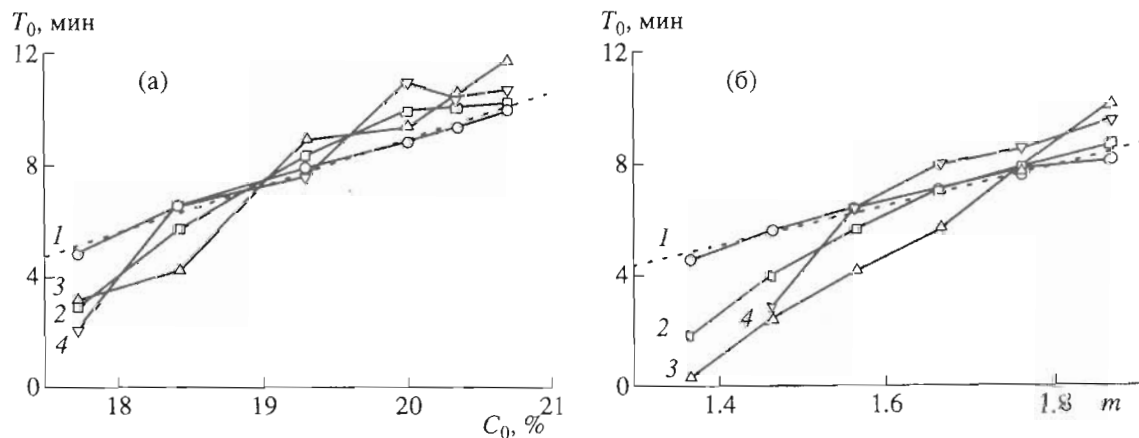


Рис. 5. Зависимость начального времени удерживания  $T_0$ , рассчитанного по времени удерживания 10, 15, 20 и 25-звенных (1–4 соответственно) компонентов тестовой смеси, от свободного члена  $C_0$  при постоянном  $m = 1.564$  (а) и от инкремента  $m$  при постоянном  $C_0 = 18.44\%$  (б) логарифмического градиента концентрации ацетонитрила. Пунктиром обозначены линейные аппроксимации (1а, 1б).

где  $i$  – порядковый номер одного из пяти компонентов тестовой смеси, а  $t_R^{(5+5i)}$  – соответствующее ему время удерживания.

Оказалось, что величина  $T_0$  зависит от выбранного шага времени удерживания ( $\delta t_R^A$ ) и, следова-

тельно, является функцией параметра  $C_0$ . Так,  $T_0$ , рассчитанное с помощью уравнения (8) по времени удерживания четырех компонентов тестовой смеси, несколько по-разному зависит от начальной концентрации ацетонитрила  $C_0$  (рис. 5а). Для линейной аппроксимации наиболее подходящей

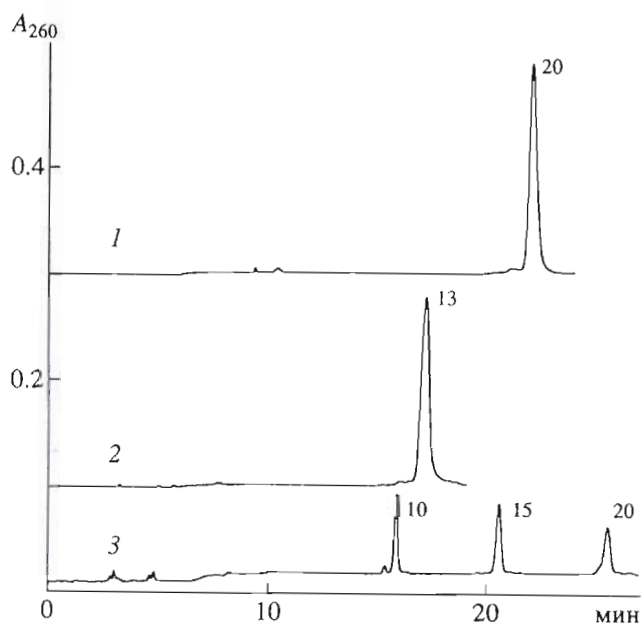


Рис. 6. Типичные примеры анализа с шагом 1 мин/звено ( $C_0 = 18.44\%$ ,  $m = 1.564$ ) синтетических олигодезоксирибонуклеотидов, выделенных методом обращенно-фазовой ВЭЖХ: 20-звенного (1), 13-звенного (2) и тестовой смеси (3).

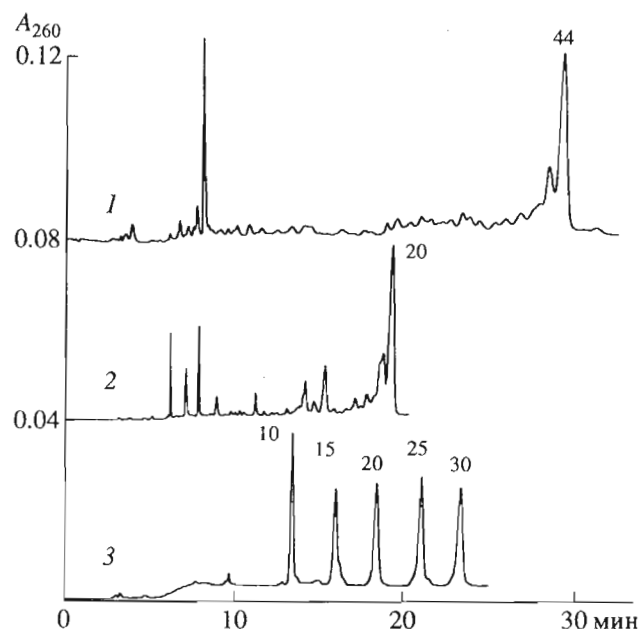


Рис. 7. Типичные примеры анализа с шагом 0.5 мин/звено ( $C_0 = 19.97\%$ ,  $m = 1.564$ ) реакционных смесей синтетических олигодезоксирибонуклеотидов: 44-звенного (1), 20-звенного (2) и тестовой смеси (3).

представляется зависимость величины  $T_0$ , рассчитанной по времени удерживания 10-звенного компонента тестовой смеси, от параметра  $C_0$  (рис. 5а, 1). Найденный тангенс угла наклона этой линейной зависимости ( $\chi = 1.637$ ) позволяет экстраполировать значение  $T_0$  для выбранного шага времени удерживания по результатам разделения тестовой смеси. Значение  $T_0$  требует уточнения после оптимизации градиента концентрации ацетонитрила по уравнениям (6) и (7). Кроме параметра  $C_0$  на величину  $T_0$  влияет и инкремент логарифмического градиента  $m$ . Наиболее подходящей для линейной аппроксимации оказалась также зависимость величины  $T_0$ , рассчитанной по времени удерживания 10-звенного компонента тестовой смеси, от величины  $m$  (рис. 5б, 1). Тангенс угла наклона этой прямой ( $\omega = 7.35$ ) позволяет экстраполировать значение  $T_0$  для уточненного значения  $m$ . Таким образом, после оптимизации градиента значение  $T_0$  может быть уточнено с помощью коэффициентов  $\chi$  и  $\omega$ , найденных выше:

$$T_0^{(i)} = T_0 + (C_0^{(i)} - C_0)\chi + (m^{(i)} - m)\omega, \quad (9)$$

где  $T_0^{(i)}$ ,  $C_0^{(i)}$  и  $m^{(i)}$  – уточненные значения градиента с  $i$ -м шагом времени удерживания (1 или 0.5 мин/звено), а  $T_0$  рассчитано по результатам разделения тестовой смеси по логарифмическому градиенту с параметрами  $C_0$  и  $m$ .

На рис. 6 и 7 приведены примеры анализа реакционных смесей и очищенных олигонуклеотидов гетерогенного состава с шагом 1 и 0.5 мин/звено соответственно. Видно, что 13-звенный олигонуклеотид ( ${}^5\text{TTACGGTTCGGTAA}$ ) элюируется на 17.2-й мин, а расчет по уравнению (5) дает величину времени удерживания, равную 17.3 мин (рис. 6). Другой, 20-звенный олигонуклеотид ( ${}^5\text{ATGCGTTGTTCCATACAACC}$ ) имеет экспериментальное и теоретическое времена удерживания 22.1 и 23.5 мин соответственно. Для анализа 20–60-звенных олигонуклеотидов целесообразно использовать градиент с шагом времени удерживания 0.5 мин/звено. Анализ реакционной смеси 20-звенного олигонуклеотида ( ${}^5\text{TGCATGCCTGCTTATCAAGT}$ ) с использованием такого градиента (рис. 7, 2) показывает, что вместо теоретически ожидаемого времени удерживания 17.4 мин экспериментально получаем 19.3 мин. Другой, 44-звенный олигонуклеотид ( ${}^5\text{AACAGSTATGACCTGAAGCATGATTACGAA-TTTGGCACTGGCCG}$ ) имеет теоретическое и экспериментальное времена удерживания 27.0 и 29.3 мин соответственно. Таким образом, теоретические значения времени удерживания удовлетворительно соответствуют экспериментальным, но погрешность возрастает с уменьшением шага времени удерживания.

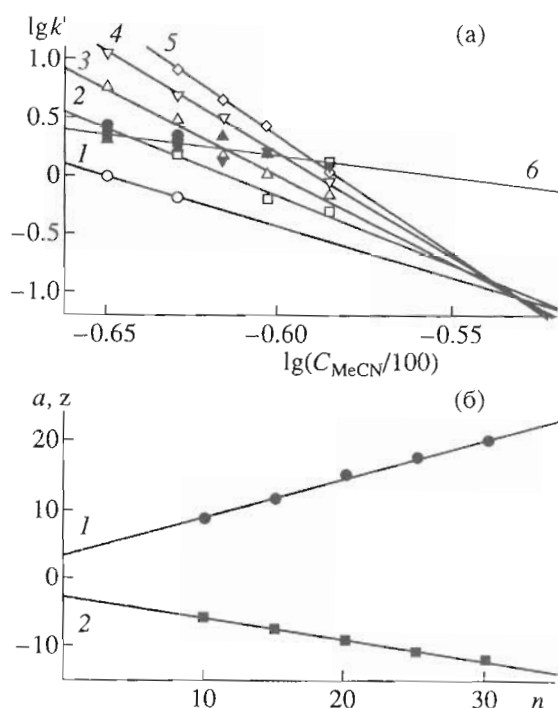


Рис. 8. Зависимости логарифма коэффициента емкости олигоаденилатов тестовой смеси длиной 10, 15, 20, 25 и 30 звеньев (1–5 соответственно) и селективности (б) от логарифма концентрации ацетонитрила (в изократических условиях) (а). Зависимость коэффициентов  $z$  и  $a$  уравнения (11) от числа звеньев разделяемых олигонуклеотидов (1 и 2 соответственно) (б).

#### 4. СЕЛЕКТИВНОСТЬ ИОН-ПАРНОГО МЕТОДА ВЭЖХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ И ПРОБЛЕМА РАЗДЕЛЕНИЯ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

Для исследования зависимости селективности разделения олигонуклеотидов от их длины и условий ВЭЖХ тестовая смесь олигодезоксирибонаденилатов была проанализирована в изократических условиях. По временам удерживания соответствующих компонентов тестовой смеси были рассчитаны коэффициенты емкости:

$$k'_{(Si+5)} = t_R^{(Si+5)}/t_R^0 - 1, \quad (10)$$

где  $k'_{(Si+5)}$  и  $t_R^{(Si+5)}$  – коэффициент емкости и время удерживания  $i$ -го компонента тестовой смеси, а  $t_R^0$  – время удерживания несорбируемого компонента.

График зависимости коэффициентов емкости от концентрации ацетонитрила в логарифмических координатах приведен на рис. 8а (1–5). Для каждого компонента тестовой смеси зависимость коэффициента емкости от концентрации ацетонитрила удовлетворительно описывается функцией вида [10, 11]

$$\lg(k'_{(Si+5)}) = a_{(Si+5)} - z_{(Si+5)} \lg(C_{\text{MeCN}}/100), \quad (11)$$

где  $a_{(Si+5)}$  и  $z_{(Si+5)}$  – свободный и первый члены линейной аппроксимации зависимости логарифма коэффициента емкости  $i$ -го компонента тестовой смеси от логарифма объемной доли ацетонитрила.

Коэффициент  $z$  уравнения (11) линейно возрастает с увеличением числа звеньев разделяемых олигодезоксирибонаденилатов с инкрементом  $\delta z = 0.5728$ , а свободный член  $a$  уравнения (11) линейно убывает с инкрементом  $\delta a = -0.3052$  (рис. 8б). Селективность колонки может быть рассчитана по значениям времени удерживания двух любых компонентов тестовой смеси:

$$\alpha_{(Si+5)} = (t_R^{(Si+10)} - t_R^0)/(t_R^{(Si+5)} - t_R^0), \quad (12)$$

где  $\alpha_{(Si+5)}$  – селективность, рассчитанная для  $i$ -го и  $i+1$ -го компонентов тестовой смеси.

Это уравнение с учетом (10) и (11) преобразуется к виду

$$\lg(\alpha_{(Si+5)}) = \lg(k'_{(Si+10)}) - \lg(k'_{(Si+5)}) = \Delta n(\delta a - \delta z \lg(C_{\text{MeCN}}/100)), \quad (13)$$

где  $\Delta n = 5$  – разность длины разделяемых олигонуклеотидов.

Прямые, соответствующие экстраполяции линейных функций (11) всех пяти компонентов тестовой смеси, пересекаются в одной точке (рис. 8а). Следовательно, в точке пересечения имеет место равенство коэффициентов емкости и селективности колонки равна 1. Так как при этом разделение олигонуклеотидов не происходит, то координата точки пересечения компонентов тестовой смеси – концентрация ацетонитрила  $C_{\text{max}} = 28.15\%$  является критической. С учетом этого уравнение (13) преобразуется к виду

$$\lg(\alpha_{i,i+1}) = \Delta n \delta z \lg(C_{\text{max}}/C_{\text{MeCN}}).$$

Данное уравнение удовлетворительно описывает зависимость селективности, рассчитанной по уравнению (13), от концентрации ацетонитрила в логарифмических координатах (рис. 8а, б). Предельное значение концентрации ограничивает продолжительность градиента ацетонитрила ( $t_R^{\text{max}}$ ) согласно уравнениям (2) и (5):

$$\ln(t_R^{\text{max}}) = (C_{\text{max}} - C_0 + (\ln(\delta t_R))/\gamma)/m. \quad (14)$$

Максимальное время эквидистантного разделения связано с числом звеньев наиболее протяженных олигонуклеотидов ( $n_{\text{max}}$ ), разделяемых данным градиентом с заданным шагом времени удерживания:

$$n_{\text{max}} = (t_R^{\text{max}} - T_0)/\delta t_R = (\exp((C_{\text{max}} - C_0 + (\ln(\delta t_R))/\gamma)/m) - T_0 + (\chi \ln(\delta t_R))/\gamma)/\delta t_R, \quad (15)$$

где  $C_{\max}$ ,  $C_0$ ,  $\gamma$ ,  $m$ ,  $T_0$  и  $\chi$  – константы и параметры, найденные выше. Расчет по уравнению (15) показывает, что при шаге времени удерживания 1 мин/звено максимальная длина разделяемых олигонуклеотидов составляет  $n_{\max} \approx 500$  звеньев, однако время, необходимое для анализа такого полинуклеотида согласно уравнению (14), составляет 8 ч. Сократить время анализа можно за счет уменьшения шага времени удерживания. К сожалению, согласно уравнению (14), это ведет к уменьшению максимальной длины разделяемых олигонуклеотидов. Так, при  $\delta t_R = 0.5$  мин/звено расчет по уравнениям (15) и (14) дает  $n_{\max} \approx 360$  звеньев и  $t_R^{\max} \approx 3$  ч, а при  $\delta t_R = 0.2$  мин/звено  $n_{\max} \approx 200$  звеньев и  $t_R^{\max} \approx 50$  мин. Очевидно, что дальнейшее уменьшение шага времени удерживания становится бесполезным, так как ведет к уменьшению максимальной длины разделяемых олигонуклеотидов. Таким образом, при оптимальном времени разделения 1 ч максимальная длина разделяемых олигонуклеотидов составляет только 200 звеньев по эквидистантному градиенту с шагом времени удерживания 0.2 мин/звено.

#### 5. ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ЭКВИДИСТАНТНОЙ ИОН-ПАРНОЙ ВЭЖХ ДЛЯ АНАЛИЗА СЛОЖНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ СМЕСЕЙ

Ранее метод эквидистантной ион-парной ВЭЖХ успешно применялся для исследования процессов ферментативного гидролиза олигонуклеотидов. Этим методом определялась начальная скорость гидролиза олигорибоадениловой кислоты в составе гибридного дуплекса с олигодезоксириботимидиновой кислотой и ее модифицированными аналогами под действием РНКазы Н из *E. coli* [19–21]. Так же определялась устойчивость олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 1-( $\beta$ -D-3'-дезокси-трео-пентофуранозил)пиримидиновые звенья, к действию фосфодиэстеразы змеиного яда [22]. Расчет ожидаемого времени удерживания олигонуклеотидов позволил обнаружить изменение места гидролиза олигонуклеотидных дуплексов, содержащих 1,2-дидезокси-D-рибофуранозные звенья в сайте рестрикции, под действием эндонуклеазы рестрикции *SsoII* из *Shigella sonnei* [23].

Предлагаемый метод оказался весьма полезным для контроля постадийного выхода в процессе автоматического синтеза олигонуклеотидов. Снижение выхода целевого олигонуклеотида может быть обусловлено рядом причин, одной из которых является падение выхода на стадии конденсации одного, нескольких или всех нуклеозидов. Анализ реакционной смеси 26-звенного олигонуклеотида ( ${}^3\text{CTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGG}$ ) по эквидистантному градиенту с шагом времени

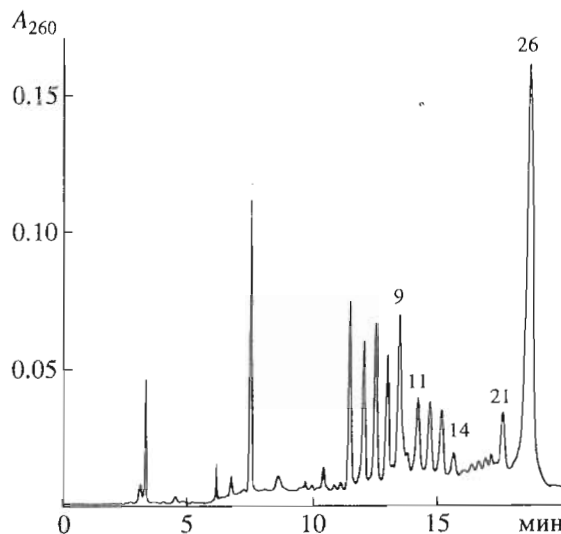


Рис. 9. Анализ с шагом 0.5 мин/звено ( $C_0 = 19.97\%$ ,  $m = 1.564$ ) реакционной смеси синтетического олигодезоксирибонуклеотида  ${}^3\text{CTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGG}$ . Цифры над пиками соответствуют длине олигонуклеотидов.

удерживания 0.5 мин/звено помог идентифицировать дефект в работе автоматического ДНК-синтезатора (рис. 9). Теоретически ожидаемое время удерживания (19.3 мин) удовлетворительно коррелирует с экспериментальным полученным (18.6 мин). Сопоставление экспериментальных времен удерживания наибольших пиков с теоретическим расчетом и первичной последовательностью олигонуклеотида позволило установить, что обрыв цепи происходил на стадии присоединения только аденозинового звена. Такая диагностика существенно упрощает поиск и устранение неисправностей автоматического ДНК-синтезатора.

Метод ион-парной ВЭЖХ успешно решает задачу анализа и выделения ДНК-дуплексов, содержащих ковалентную связь между цепями [24, 25]. Такие “сшитые” дуплексы могут быть получены при действии водорастворимого карбодиимида на две комплементарные цепи модифицированных олигонуклеотидов, один из которых содержит алифатическую аминогруппу, а другой – карбоксильную группу. Трудность анализа возникает тогда, когда смеси комплементарных олигонуклеотидов образуют достаточно прочные дуплексы с температурой плавления более 50°C. При анализе таких смесей методом ион-парной ВЭЖХ наблюдаются два уширенных пика, один из которых по времени удерживания соответствует двум диссоциированным ДНК-цепям, а второй, с большим временем удерживания, – дуплексу, образованному этими комплементарными 25-звенными олигонуклеотидами (рис. 10, пики 1 и 2 соответственно). Уширение пиков, по-видимому, объясняется взаимными переходами олигонуклеотидов между ними. Продукт реакции – “сшитый” дуп-



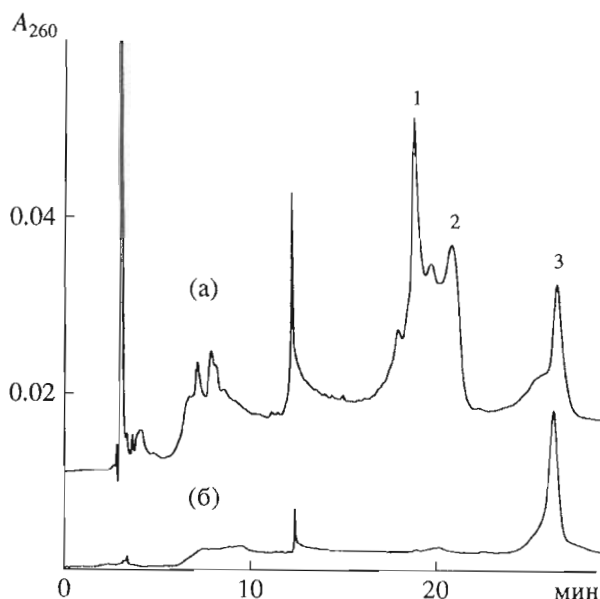


Рис. 10. Анализ с шагом 0.5 мин/звено ( $C_0 = 19.97\%$ ,  $m = 1.564$ ) реакционной смеси, полученной при синтезе 25-звенного олигонуклеотидного дуплекса с ковалентно связанными цепями (а), и выделенного “сшитого” дуплекса (б).

лекс (рис. 10, пик 3) характеризуется меньшей шириной пика и большим временем удерживания по сравнению с “несшитым”.

## 6. ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ МЕТОДА ЭКВИДИСТАНТНОЙ ИОН-ПАРНОЙ ВЭЖХ

Предлагаемый метод эквидистантной ион-парной ВЭЖХ сочетает в себе простоту и относительную дешевизну обращенно-фазовой ВЭЖХ с информативностью анионообменной ВЭЖХ, электрофореза в полиакриламидном геле и капиллярного электрофореза. Этот метод удобнее гелевого электрофореза, так как позволяет не только быстрее (около 20 мин) анализировать сложные олигонуклеотидные смеси, но и легко выделять из них интересные компоненты. Возможность препаративного выделения целевого олигонуклеотида из сложных смесей является преимуществом данного метода по сравнению с методом капиллярного электрофореза.

Выявленные закономерности легли в основу простой компьютерной программы с удобным интерфейсом, позволяющей автоматически рассчитывать эквидистантные градиенты с шагом времени удерживания 1, 0.5 и 0.2 мин/звено по результатам анализа тестовой смеси. Градиент с шагом времени удерживания 1 мин/звено целесообразно использовать для анализа олигонуклеотидов от 8 до 20 звеньев длиной. Градиент с шагом 0.5 мин/звено необходим для разделения 20–60-звенных олигонуклеотидов. Для анализа более протяженных олигонуклеотидов может ис-

пользоваться третий градиент с шагом 0.2 мин/звено. Разработанная программа позволяет также по каждому из трех градиентов оценивать время удерживания анализируемого олигонуклеотида с известной первичной последовательностью.

Перспективы развития данного метода определяются выявленными трудностями в анализе полинуклеотидов и прочных олигонуклеотидных дуплексов. Решению этих проблем будут посвящены дальнейшие исследования.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались дигидрофосфат калия и гидроксид калия марки ос. ч., дигидрофосфат тетрабутиламмония марки “хроматографически чистый” (КНПО “Диагностикум”, Россия), ацетонитрил марки “для жидкостной хроматографии” (Merck, Германия).

Синтез всех олигодезоксирибонуклеотидов выполняли на автоматическом синтезаторе Applied Biosystems 380В (США).

Очистку синтезированных олигонуклеотидов осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, как описано ранее [26].

Смеси гомоолигорибонуклеотидов получали частичным гидролизом соответствующих полирибонуклеотидов при 95°C в 0.1 М растворе бикарбоната натрия за 30 мин.

Дуплексы с ковалентно связанными цепями получали по методике, описанной ранее [24, 25].

Использовалась система для высокоэффективной жидкостной хроматографии фирмы Waters (США), состоящая из двух насосов (модель 510), универсального инжектора УБК, УФ-детектора (модель 484) и хроматографической рабочей станции Maxima 820 для управления насосами и накопления данных детектора на базе интерфейса (Waters) и персонального компьютера (NEC). Подвижная фаза насыщалась гелием с помощью системы MPSA (Waters). Термостатирование колонок осуществлялось с помощью системы контроля температуры (Waters).

Концентрированный (20-кратный) буферный раствор, содержащий 0.96 М дигидрофосфат калия и 0.04 М дигидрофосфат тетрабутиламмония (рН 7.0), фильтровали через 0.45-мкм НА-фильтр фирмы Millipore (США). Элюенты готовили смешением рассчитанных количеств ацетонитрила, воды и 20-кратного буферного раствора без дополнительного фильтрования. Разделение осуществлялось на колонке Диасорб  $C_{16}T$  (6 мкм, 4 × 250 мм; ЭЛСИКО и БиоХимМак, Россия), градиент концентрации ацетонитрила 5–40%, скорость элюции 1 мл/мин, температура 45°C. Испытывались также колонки Ultrasphere ODS, IP (5 мкм; 4.6 × 250 мм; Beckman, США), Zorbax ODS (5 мкм; 4.6 × 250 мм; DuPont, США), Nucleosil 300-5  $C_{18}$  (5 мкм; 4.6 × 250 мм; Macherey-Nagel, Герма-

ния), MinRPC (5 мкм; 5 × 200 мм; Pharmacia, Швеция), которые показали аналогичные результаты.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-50397) и программы "Университеты России" (грант uni-011-95).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brandt C.D., Rakusan T.A., Sison A.V., Josephs S.H., Saxena E.S., Herzog K.D., Parrott R.H., Sever J.L. // J. Clin. Microbiol. 1992. V. 30. P. 36–40.
2. Koopman M.B.H., De Leeuw O.S., Van Der Zeijst B.A.M., Kusters J.G. // Infect. Immunol. 1992. V. 60. P. 2920–2925.
3. Ciccarelli R.B., Gunyuzlu P., Huang J., Scott C., Oakes F. // Nucleic Acids Res. 1991. V. 19. P. 6007–6013.
4. Slightom J.L., Sieu L.C. // BioTechniques. 1992. V. 13. P. 94–105.
5. Cohen J.S., Hogan M.E. // Sci. Am. December. 1994. P. 50–55.
6. Wagner R.W. // Nature. 1994. V. 372. P. 333–335.
7. Efcavitch W.J. // Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach / Eds D. Rickwood, B.B. Hames. Oxford: IRL Press, 1990. P. 125–149.
8. Gelfi C., Perego M., Morelli S., Nicolini A., Righetti P.G. // Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1996. V. 6. P. 47–53.
9. Warren W.J., Vella G. // Methods in Molecular Biology / Ed. S. Agrawal. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1994. V. 26. P. 233–264.
10. Вульфсон А.Н., Якимов С.А. // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. С. 365–390.
11. Wulfson A.N., Yakimov S.A. // J. High Resol. Chrom. 1984. V. 7. P. 442–460.
12. Gait M.J., Matthes H.W.D., Singh M., Sproat B.S., Timas R.C. // Nucleic Acids Res. 1982. V. 10. P. 6243–6254.
13. Hecker R., Coplan M., Reisner D. // J. Chromatogr. 1985. V. 326. P. 251–261.
14. Katz E.D., Dong M.W. // BioTechniques. 1990. V. 8. P. 546–554.
15. Kwiatkowski M., Sandstrom A., Balgobin N., Chattopadhyaya J. // Acta Chem. Scand. 1984. V. 38. P. 721–733.
16. Pimenov A.M., Tikhonov Yu.V., Meisner I.S., Toguzov R.T. // J. Chromatogr. 1986. V. 365. P. 221–227.
17. McLaughlin L.W. // Chem. Rev. 1989. V. 89. P. 309–319.
18. Sokolowski A. // J. Chromatogr. 1987. V. 384. P. 1–12.
19. Крынецкая Н.Ф., Ташицкий В.Н., Метелев В.Г., Шабарова З.А. // Биохимия. 1991. Т. 54. С. 687–693.
20. Крынецкая Н.Ф., Алексеев Я.И., Белков В.М., Ибрагим Х.К.Х., Ташицкий В.Н., Орецкая Т.С., Шабарова З.А. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 1218–1225.
21. Petrauskene O.V., Krynetskaya N.F., Tashlitsky V.N., Belkov V.M., Kubareva E.A., Gromova E.S., Guschlbauer W., Shabarova Z.A. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1995. V. 37. P. 1127–1135.
22. Орецкая Т.С., Ибрагим Х.К.Х., Волков Е.М., Романова Е.А., Ташицкий В.Н., Шабарова З.А. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 967–974.
23. Kubareva E.A., Petrauskene O.V., Karyagina A.S., Tashlitsky V.N., Nikolskaya I.I., Gromova E.S. // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20. P. 4533–4538.
24. Анцыпович С.И., Орецкая Т.С., Романова Е.А., Волков Е.М., Ташицкий В.Н., Вассер М., Шабарова З.А. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 774–780.
25. Antsyrovich S.I., Oretskaya T.S., Romanova E.A., Volkov E.M., Tashlitsky V.N., Vasser M., Shabarova Z.A. // FEBS Lett. 1996. V. 378. P. 224–226.
26. Кузнецова Л.Г., Романова Е.А., Волков Е.М., Ташицкий В.Н., Орецкая Т.С., Крынецкая Н.Ф., Шабарова З.А. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 455–466.

## Optimization of Conditions for Ion-Pair HPLC of Oligonucleotides

V. N. Tashlitskii and T. S. Oretskaya

Chemical Faculty, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

**Abstract**—Regularities of ion-pair HPLC of oligonucleotides were studied. An algorithm was suggested for the calculation of the acetonitrile gradient providing proportionality between the number of nucleotide residues and the retention time of the oligonucleotide ( $t_R$ ) (equidistant separation of oligonucleotides). The algorithm is based on extrapolation of the results of separation of a test mixture of five oligonucleotides varying in length from 10 to 30 units. It was shown that the logarithmic gradient of acetonitrile  $C_0 + m \ln(t)$  leads to the equidistant separation of oligonucleotides. The separation is characterized by two measured parameters: the retention time step and the extent of equidistantness. A functional dependence of the measured parameters on two varying parameters of the logarithmic function ( $C_0$  and  $m$ ) was established experimentally. A method for calculating the expected retention time of an oligonucleotide from its nucleoside composition was suggested.

*Key words:* oligonucleotides, ion-pair HPLC, equidistant separation.