



УДК 547.963.32

ОБРАТИМАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ МОНО- И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ПО КОНЦЕВЫМ ФОСФАТНЫМ ГРУППАМ НА АМИНООКСИБУТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЕ

Шумянцева В. В., Хомутов Р. М.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Предложен новый метод иммобилизации моно- и олигонуклеотидов, заключающийся во взаимодействии активированных по фосфатной группе нуклеотидов с аминооксибутилцеллюлозой. Для активации нуклеотидов использовали хлорангидрид мезитилекарбоновой кислоты. Получены целлюлозы с ковалентно связанной рС, рА, рРз. Показано, что иммобилизованные нуклеотиды можно снимать с матрицы в присутствии карбонильных соединений или мягким кислотным гидролизом.

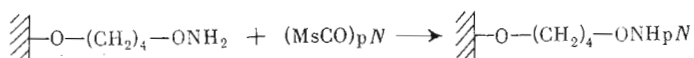
В последние годы в молекулярно-биологических исследованиях получает распространение метод исследования комплексов биологически активных соединений, один из компонентов которых закреплен на матрице. Например, в работе [1] показано, что рибосомы образуют специфический транскрибирующий комплекс с poly(U), ковалентно присоединенной к целлюлозе. Однако дальнейшему развитию такого подхода мешает недостаточная разработанность методов снятия с матрицы иммобилизованного комплекса без разрушения последнего. Описаны способы либо необратимой фиксации биополимеров (см., например, [2, 3]), либо связанной с химической модификацией иммобилизованного вещества при снятии с матрицы [1, 4].

Ранее мы описали синтез и свойства нового типа нуклеотидных производных — алкоксиамидов нуклеотидов [5]. В настоящем сообщении показано, что расщепление Р—N-связи в этих соединениях в мягких условиях без изменения структуры нуклеотидов может быть применено для обратной иммобилизации моно- и олигонуклеотидов по концевым фосфатным группам. В качестве матрицы была использована аминооксибутилцеллюлоза (АВ-целлюлоза), успешно применяющаяся для иммобилизации карбонильных соединений, а также нуклеозидов и нуклеиновых кислот по гетероциклическим основаниям [6, 7].

Для получения целлюлозы с иммобилизованными нуклеотидами АВ-целлюлозу вводили в реакцию с активированными по фосфатной группе нуклеотидами. Для активации нуклеотидов использовали хлорангидрид мезитилекарбоновой кислоты (MsCOCl) [8]. Смешанные ангидриды аденозин-5'-фосфата, цитидин-5'-фосфата, тридезоксиаденилата с мезитилекарбоновой кислотой реагировали с АВ-целлюлозой с образованием алкок-

Принятые сокращения: АВ-целлюлоза — аминооксибутилцеллюлоза; Ms — мезитиле-((CH₃)₃C₆H₂-), СМР- и АМР-целлюлоза — АВ-целлюлоза с ковалентно связанным цитидин- и аденозин-5'-фосфатом.

сиаמידной связи по уравнению



Так как АВ-целлюлоза — ионообменник с $pK \leq 5,5$, а для эффективной реакции используемых смешанных ангидридов с аминоксигруппами необходима непротонированная форма последних, реакцию вели в 0,004 М фосфатном буфере при рН 7,5. В этих условиях образующаяся фосфоамидная связь устойчива. При рН > 7 становится неустойчивой ангидридная связь в активированном производном [8], при рН < 7 лабильна фосфоамидная связь [9]. Емкость полученных сорбентов составляла 0,05—0,15 ммоль нуклеотида на 1 г АВ-целлюлозы.

Расщепление связи нуклеотид—матрица проводили в присутствии карбонильных соединений (ацетон — 0,01 М $\text{NH}_4\text{Cl—NH}_3$, рН 7,5) или мягким кислотным гидролизом (0,01 н. HCl). Проверено, что и фосфоэфирные, и гликозидные связи устойчивы в этих условиях. В первом случае в раствор переходило 60—70% нуклеотидного материала, во втором аденозин-5'-фосфат и тридезоксаденилат количественно отщеплялись от матрицы. В случае цитидин-5'-фосфата полной обратимости достичь не удалось: при обработке СМР-целлюлозы 0,01 н. HCl в раствор переходило лишь 60—70% иммобилизованного материала. По-видимому, связывание цитидин-5'-фосфата с АВ-целлюлозой происходит как по активированной фосфатной группе, так и по экзоциклической аминогруппе цитозина, хотя скорость последней реакции при рН 7 мала [7].

Таким образом, предложен метод иммобилизации моно- и олигонуклеотидов по концевым фосфатным группам на аминоксигруппах целлюлозы. Лабильность образуемой алкоксиамидной связи позволяет в мягких условиях снимать с матрицы ковалентно связанный нуклеотид.

Экспериментальная часть

Смешанные ангидриды моно- и олигонуклеотидов с мезитиленкарбонной кислотой были получены по методике [8] и очищены дополнительно препаративной ТСХ на силикагеле ЛСЛ₂₅₄ (Chemapol, Чехословакия) в системе изопропанол — конц. аммиак — вода (7 : 1 : 2). АВ-целлюлоза, синтез которой описан в работе [6], была любезно предоставлена А. А. Недоспасовым. Емкость использованной целлюлозы 0,43 экв. H_2NO -групп на 1 г сорбента.

AMP-целлюлоза. 100 мг АВ-целлюлозы суспендировали в 5 мл 0,004 М фосфатного буфера (рН 7,5) и прибавляли 50 мкмоль $(\text{MsCO})_p\text{A}$. Целлюлозу перемешивали на магнитной мешалке. Через 3 сут целлюлозу отфильтровывали и промывали водным аммиаком (рН 8) до отсутствия УФ-поглощения в промывных водах. Количество прореагировавших с активированным нуклеотидом H_2NO -групп определяли на основании: 1) измерения остаточного УФ-поглощения раствора нуклеотида после связывания; 2) определения количества непрореагировавших H_2NO -групп целлюлозы по реакции с пиридоксаль-5'-фосфатом [6]. Емкость AMP-целлюлозы — 0,15 ммоль рА на 1 г АВ-целлюлозы.

Аналогично была получена целлюлоза с ковалентно связанными СМР и ррА₃ с емкостью 0,12 и 0,05 ммоль нуклеотида на 1 г АВ-целлюлозы.

Гидролиз целлюлозы с иммобилизованными нуклеотидами:

1) 100 мг AMP-целлюлозы суспендировали в 5 мл 0,01 н. HCl , перемешивали на магнитной мешалке 30 мин. Целлюлозу отфильтровывали, промывали водой до рН 5—6, а затем водным аммиаком (рН 8) до отсутствия УФ-поглощения в промывных водах. Количество нуклеотидного материала в элюате рассчитывали спектрофотометрически;

2) 100 мг AMP-целлюлозы суспендировали в 5 мл смеси ацетон — 0,01 М $\text{NH}_4\text{Cl—NH}_3$, рН 7,5 (1 : 1) и перемешивали на магнитной мешалке

1 суг. Целлюлозу отфильтровывали, промывали водным аммиаком (рН 8) до отсутствия поглощения в промывных водах. Элюат упаривали досуха, остаток растворяли в воде. Количество нуклеотидного материала в растворе рассчитывали спектрофотометрически. Аналогично проводили снятие иммобилизованных рА₃ и рС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Belitsina N. V., Elizarov S. M., Glukhova M. A., Spirin A. S., Butorin A. S., Vasilenko S. K. (1975) FEBS Lett., 57, 262—266.
2. Gilham P. T. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 4982—4989.
3. Craven D. V., Harvey H. J., Lowe G. R., Deak P. D. G. (1974) Eur. J. Biochem., 41, 329—333.
4. Буторин А. С., Василенко С. К. (1976) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим н., 4, 143—147.
5. Шумянцева В. В., Хомутов Р. М. (1977) Биоорган. химия, 3, 1471—1473.
6. Недоспасов А. А., Хомутов Р. М. (1976) Изв. АН СССР. Сер. хим., 5, 1136—1141.
7. Недоспасов А. А., Хомутов Р. М. (1978) Биоорган. химия, 4, 645—653.
8. Shumyantseva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. (1976) Nucleic Acids Res., 3, 903—916.
9. Преображенская Н. Н. (1972) Успехи химии, 41, 99—116.

Поступила в редакцию
21.IV.1978

REVERSIBLE IMMOBILIZATION OF MONO- AND OLIGONUCLEOTIDES ON AMINOXYBUTYLCELLULOSE VIA TERMINAL PHOSPHATE GROUPS

[SHUMYANTSEVA V. V., KHOMUTOV R. M.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A new method of reversible immobilization of mono- and oligonucleotides by the end phosphate groups is described. Aminoxybutylcellulose was allowed to react with the activated nucleotides, mesitoyl chloride being used for this purpose. The celluloses with covalently bound pC, pA, and dpA₃ were synthesized. Decoupling of nucleotide material was carried out in the presence of carbonyl compounds or by mild acid hydrolysis.