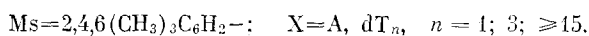
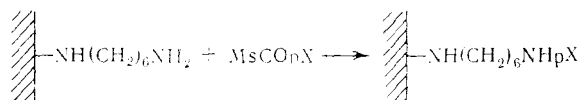


В. В. НОСОВА, И. С. ВЕЛЬМОГА, Н. И. СОКОЛОВА, З. А. ШАБАРОВА,
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

НОВЫЙ МЕТОД ИММОБИЛИЗАЦИИ МОНО- И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ПО 5'-КОНЦЕВЫМ ФОСФАТНЫМ ГРУППАМ

В связи с широким использованием синтетических олигодезокси-нуклеотидов для аффинной хроматографии возникла задача разработки удобных методов закрепления их на матрице. Так, для выделения ревертаз используются сорбенты с присоединенной олиготимидиловой кислотой⁽¹⁾, для очистки дегидрогеназ и киназ — с ковалентно связанной АМФ⁽²⁾.

В настоящем сообщении предлагается метод иммобилизации моно- и олигонуклеотидов посредством фосфоамидной связи, образованной концевой 5'-фосфатной группой нуклеотида и аминогруппой гексаметилендиамина, закрепленного на сефарозе.



При взаимодействии моно- и олигонуклеотидов с хлорангидридом мезитиленкарбоновой кислоты образуются смешанные ангидриды, которые служат активными фосфорилирующими агентами в реакции с аминами⁽³⁾. Из-за стерической затрудненности карбоксильной группы в мезитиленкарбоновой кислоте резко снижается ее ацилирующая способность и в незащищенных по сахару и гетероциклу олигонуклеотидах удается избирательно активировать только концевые фосфатные группы, не затрагивая межнуклеотидные. Высокая избирательность хлорангидрида мезитиленкарбоновой кислоты и устойчивость образующихся смешанных ангидридов с нуклеотидами в водных средах позволили использовать этот реагент для иммобилизации олигонуклеотидов.

В качестве матрицы была использована сефароза 4В.

Известно, что аффинная хроматография наиболее эффективна при удалении лиганда от поверхности сорбента на 4–6 метиленовых звеньев⁽⁴⁾. Поэтому активированную бромцианом сефарозу вводили в реакцию с гексаметилендиаминном.

Для определения оптимального соотношения нуклеотидного компонента и матрицы были использованы различные избытки смешанного ангидрида тимидиловой и мезитиленкарбоновой кислот (MsCOdpT). В реакцию с гексаметилендиаминсефарозой вводили также смешанные ангидриды мезитиленкарбоновой кислоты и АМФ, dpT_3 , dpT_n ($n \geq 15$). Результаты связывания представлены в табл. 1.

Из данных табл. 1 следует, что эффективность связывания не зависит от структуры нуклеотида: количества иммобилизованной тимидиловой и адениловой кислот при использовании одинаковых избытков смешанных ангидридов близки между собой. Кроме того, из сравнения результатов

Таблица 1

Связывание моно-(олиго)-нуклеотидов с гексаметилендиаминсефарозой

Нуклеотидный компонент	Количество вводимого в реакцию смешанного ангидрида, мкмол.	Соотношение смешанного ангидрида и аминогрупп сефарозы, мкмол.	Время реакции, сутки	Количество прореагировавших аминогрупп	
				мкмол.	%
дpT	60	1 : 7,5	4	5,3	66
	30	1 : 3,5	4	4,7	60
	12	1 : 1,5	4	1,8	23
	8	1 : 1	4	1,7	21
pA	160	1 : 20	4	6,0	75
	60	1 : 7,5	4	5,1	64
	3	1 : 0,25	4	1,3	16
дpT ₃	8	1 : 1	5	1,3	20
дpT _n n ≥ 15	60 о.е.	—	5	37 о.е.	62 *

* Выход дан по отношению к вводимому в реакцию смешанному ангидриду олиготимидиловой и мезитиленкарбоновой кислот.

взаимодействия смешанных ангидридов моно- и олиготимидиловых кислот очевидно, что длина олигонуклеотида также не влияет на эффективность связывания. Определяющим фактором является количество вводимого в реакцию с гексаметилендиаминсефарозой смешанного ангидрида нуклеотида, причем при увеличении избытка смешанного ангидрида более чем в 7–8 раз по отношению к свободным аминным группам сорбента емкость колонок возрастает незначительно. Так, при увеличении с 7,5 до 20-кратного избытка MsCOpA процент иммобилизации нуклеотида возрос с 64 до 75%. Непрореагировавшие с носителем смешанные ангидриды моно- и олигонуклеотидов могут быть использованы для иммобилизации повторно.

Таким образом, предложенный метод может быть применен для получения сорбентов с фиксированными по концевой фосфатной группе моно- и олигодезоксинуклеотидами различной длины и состава. Метод прост экспериментально, активация нуклеотидов перед иммобилизацией протекает количественно и в мягких условиях. В зависимости от целей, стоящих перед исследователем, и доступности олигонуклеотидного материала могут быть приготовлены сефарозные колонки различной емкости.

Хроматографию и электрофорез проводили на бумаге «Filtrak» №1 и №3. При хроматографии использовали системы: А) этиловый спирт — 1 М ацетат аммония (7 : 3) рН 7,5; Б) изопропиловый спирт — конц. аммиак — вода (7 : 1 : 2).

Вертикальный высоковольтный электрофорез проводили в течение 1,5 часа при напряжении 900 в на приборе «Labor» (Венгрия) в 0,05 М триэтиламмонийбикарбонатном буфере, рН 7,5. Электрофоретические подвижности вычисляли относительно дезокситимидин-5'-фосфата. Гексаметилендиаминсефарозу получали обработкой активированной бромцианом сефарозы 4В гексаметилендиаминном⁽⁴⁾. Методом кондуктометрического титрования определили, что 1 мл полученной сефарозы содержит 8 мкмол. свободных аминных групп.

Синтез MsCOдpT. 64 мг дезокситимидин-5'-фосфата растворяли в 1,5 мл абс. пиридина и 0,5 мл абс. ацетонитрила и добавляли 0,16 мл хлорангидрида мезитиленкарбоновой кислоты. Реакционную смесь встряхивали 10 мин., затем разбавляли 2 мл воды и экстрагировали эфиром (3×4 мл), чтобы удалить мезитиленкарбоновую кислоту. Водный слой хроматографировали в системах А, Б. Выход MsCOдpT — 100%. R_f в системах А, Б — 0,84; 0,78 соответственно. U отн. ТМФ = 0,50.

MsCOpA получали аналогично из 35 мг аденозин-5'-фосфата и 0,08 мл хлорангидрида мезитиленкарбоновой кислоты. Выход MsCOpA составил 100%. R_f в системах А, Б — 0,85; 0,78 соответственно. U отн. ТМФ=0,40.

MsCOdpT₃ получали аналогично из 11 мкмол. dpT₃ и 0,02 мл MsCOCl. Выход полученного соединения — 90%. R_f в системах А, Б — 0,52; 0,57 соответственно. U отн. ТМФ=0,82.

MsCOdpT_n ($n \geq 15$) получали аналогично из 60 о.е. dpT_n и 0,02 мл MsCOCl.

Количественное определение иммобилизованного моно- (олиго)-нуклеотида проводили двумя способами: 1) измерением остаточного у.-ф. поглощения раствора после связывания, 2) определением у.-ф. поглощения в растворе после кислотного гидролиза сефарозы с иммобилизованным нуклеотидом.

Определив, что 1 мл сефарозы содержит 8 мкмол. аминогрупп, количество ковалентно закрепленного моно- или олигонуклеотида в процентах на 1 мл носителя рассчитывали по формуле:

$$x = a \cdot 100 / (V \cdot 8),$$

где a — количество микромолей смешанного ангидрида, прореагировавшего с сефарозой; V — объем сефарозы.

dpT-сефароза. В 4 пробирки, содержащие по 1 мл активированной сефарозы с концентрацией аминогрупп 8 мкмол/мл приливали растворы 8, 12, 30 и 60 мкмол. MsCOdpT в 2 мл воды. Смеси перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре. Через 4 суток сефарозу промывали на фильтре водой до отсутствия поглощения в промывных водах при 267 нм. Определив концентрацию вещества в элюате, по разности между исходным и непрореагировавшим смешанным ангидридом рассчитывали количество ковалентно закрепленного мононуклеотида (см. табл. 1).

pA-сефарозу получали по методике, описанной выше, из 1 мл гексаметилендиаминсефарозы (8 мкмол. NH₂-групп) и 60 мкмол. MsCOpA. По объему фильтрата и его поглощению при 260 нм определяли количество непрореагировавшего смешанного ангидрида.

dpT₃-сефарозу получали аналогично инкубацией 8,0 мкмол. MsCOdpT₃ с 1 мл сефарозы.

Олиго-dT-сефароза синтезирована аналогично встряхиванием 0,5 мл сефарозы со смешанным ангидридом, полученным взаимодействием 60 о.е. олиго-dT с хлорангидридом мезитиленкарбоновой кислоты.

Кислотный гидролиз гексаметилендиаминсефарозы с иммобилизованным моно- и олигонуклеотидом.

Полимерный носитель, предварительно отмытый от избытка нуклеотидного материала, обрабатывали 0,6 N HCl при комнатной температуре в течение 12 час. при перемешивании. Затем сефарозу тщательно промывали водой и по у.-ф. поглощению элюата определяли количество иммобилизованного нуклеотида.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
23 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ B. I. Germin, J. B. Milstein, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 69, 2599 (1972). ² D. B. Graven, M. J. Harvey et al., Europ. J. Biochem., v. 41, 329 (1974). ³ Н. И. Соколова, В. В. Носова и др., ДАН, т. 206, 129 (1972). ⁴ P. Cuatrecasas, C. B. Anfinsen, Methods in Enzymology, v. 22, 345 (1974).