

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Факультет естественных наук**

Кафедра аналитической химии

Дипломная работа

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ОСНОВАНИЙ
В МОЛЕКУЛАХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЭЖХ И
УФ СПЕКТРОМЕТРИИ**

Самсонов Сергей Васильевич

Научный руководитель

к.х.н. Азарова Ирина Николаевна

Новосибирск – 2010

СОДЕРЖАНИЕ

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	3
1. ВВЕДЕНИЕ.....	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
2.1. УФ спектроскопия олигонуклеотидов.....	6
2.2. Хроматография олигонуклеотидов	
2.2.1. Обращенно-фазовая хроматография олигонуклеотидов.....	12
2.2.2. Ион-парная хроматография олигонуклеотидов.....	12
2.2.3. Ионообменная хроматография олигонуклеотидов.....	13
2.3. Определение состава олигонуклеотидов.....	14
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
3.1. Материалы.....	16
3.2. Оборудование.....	16
3.3. Методы	
3.3.1. Оценка погрешности приготовления растворов.....	17
3.3.2. Приготовление растворов.....	17
3.3.3. Оценка метрологических характеристик детектора хроматографа.....	19
3.3.4. Регистрация спектров поглощения растворов с помощью УФ детектора хроматографа.....	22
3.3.5. Методика очистки фосфодиэстеразы.....	23
3.3.6. Методика ферментативного гидролиза олигонуклеотидов.....	24
3.3.7. Методика упаковки хроматографической колонки сорбентом Диасфер-250 ПА.....	25
3.3.8. Методика обращенно-фазовой ВЭЖХ олигонуклеотидов.....	25
3.3.9. Методика ионообменной ВЭЖХ олигонуклеотидов.....	26
3.3.10. Методика очистки олигонуклеотида при помощи хроматографии.....	26
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	
4.1. Алгоритм определения нуклеотидной последовательности в молекулах коротких олигонуклеотидов.....	27
4.2. Выбор и обеспечение условий для устранения гипохромизма.....	28
4.3. Проверка применимости предложенного метода идентификации по УФ спектру для длинных олигонуклеотидов.....	31
4.4. Исследование влияния условий хроматографического процесса на ионообменную хроматографию олигонуклеотидов.....	33
4.5. Ферментативный гидролиз олигонуклеотидов фосфодиэстеразой.....	36
4.6. Проверка пригодности метода.....	37
5. ВЫВОДЫ.....	43
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	44

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- Δ_{ω} – допускаемая погрешность содержания примесей в основном веществе, %
 Δ_m – допускаемая погрешность взвешивания, мг
 Δ_V – допускаемая погрешность измерения объема, мл
 δ_C – погрешность приготовления растворов, %
 δ_m – относительная погрешность определения массы вещества
 δ_{ω} – относительная погрешность определения массовой доли основного вещества в образце, %
 ε_{260} – коэффициент молярной экстинкции раствора вещества при $\lambda=260$ нм, л·моль⁻¹·см⁻¹
 λ – длина волны, нм
 ω – массовая доля основного вещества в образце, %
 $\omega_{1/2}$ – ширина хроматографического пика на полувысоте
 A_{260} – поглощение раствора вещества при $\lambda=260$ нм, е.о.п.
 $A_{\lambda_1}/A_{\lambda_2}$ – спектральное отношение как отношение оптических плотностей раствора при длинах волн λ_1 и λ_2
 C_m – массовая концентрация, г/л
 C_M – молярная концентрация, моль/л
 m – масса, г
 M – молярная концентрация, моль/л
 n – число оснований в молекуле олигонуклеотида
 pK_a – константа кислотности
 R_{λ_1/λ_2} – спектральное отношение при длинах волн λ_1 и λ_2
 S_{λ} – площадь хроматографического пика при длине волны детектирования λ
 V_R – объем удерживания вещества в колонке, мкл
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием в УФ-диапазоне длин волн
ЖХ – жидкостная хроматография
ИО – ионообменная
ИП – ион-парная
конц. – концентрированный (-ая)
МС – масс-спектрометрия
ОФ – обращенная фаза; обращенно-фазовая
ПАВ – поверхностно-активное вещество
ТБА – тетрабутиламмоний
Трис – трис(гидроксиметил)аминометан
УФ – ультрафиолетовый
ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид

1. ВВЕДЕНИЕ

Олигонуклеотиды – линейные полимеры, построенные из нуклеотидов, которые в свою очередь являются комбинацией азотистого основания, рибозы или дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты. Олигонуклеотиды, содержащие, как правило, более 20 нуклеотидных звеньев, называют полинуклеотидами. Полинуклеотиды встречаются в природе в виде ДНК и РНК. Синтетические олигонуклеотиды широко используются во многих биологических, биохимических и биофизических исследованиях.

Параметры, по которым производится контроль чистоты синтетического олигонуклеотида, могут различаться в зависимости от назначения целевого продукта. В одних случаях контролируется содержание в продукте более коротких олигонуклеотидов-предшественников, в других - наличие модификаций азотистых оснований или полнота удаления различных защитных функциональных групп.

Важнейшим методом очистки олигонуклеотидов является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ фотометрическим или МС-детектированием. Эти способы детектирования в многоканальном режиме позволяют надежно проверять "чистоту" ("гомогенность") хроматографического пика. Использование УФ детектора при анализе олигонуклеотидов часто предпочтительнее, так как он, в отличие от МС-детектора, малочувствителен к изменению состава подвижной фазы в широких пределах (интервал значений pH и ионной силы, добавление ион-парных агентов), что дает возможность хроматографировать олигонуклеотиды в оптимальных условиях.

Несмотря на то, что многоволновое УФ детектирование активно применяется в ВЭЖХ уже более 30 лет, постоянное улучшение метрологических характеристик приборов, появление новых алгоритмов математической обработки спектральной информации и повышение мощности компьютеров являются очевидными предпосылками к развитию исследований в области УФ детектирования при ВЭЖХ олигонуклеотидов.

Также предпосылкой к подобному исследованию может являться тот факт, что нуклеотидная последовательность в синтетических олигонуклеотидах обычно не анализируется. Принято считать, что автоматические синтезаторы работают правильно, и состав получаемых олигонуклеотидов соответствует заданному. Это некорректно с точки зрения аналитической химии. В то же время существующие методы не позволяют анализировать продукты синтеза за соизмеримое с длительностью синтеза время, поэтому структура олигонуклеотидов после синтеза на практике не подтверждается. Особенно это важно при синтезе олигонуклеотида в большом масштабе. Поэтому разработка

"экспрессной" методики подтверждения состава олигонуклеотидов и последовательности мономеров в молекуле нам представляется актуальной.

Целью данного исследования является разработка метода определения последовательности оснований в молекулах коротких олигонуклеотидов при помощи методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и УФ спектрометрии и реализация разработанного метода на хроматографе "Милихром А-02.

Все результаты, представленные в работе, получены непосредственно автором. Автор участвовал в постановке задач, решаемых в рамках дипломной работы; самостоятельно проводил эксперименты; обрабатывал результаты, принимал участие в интерпретации полученных данных.

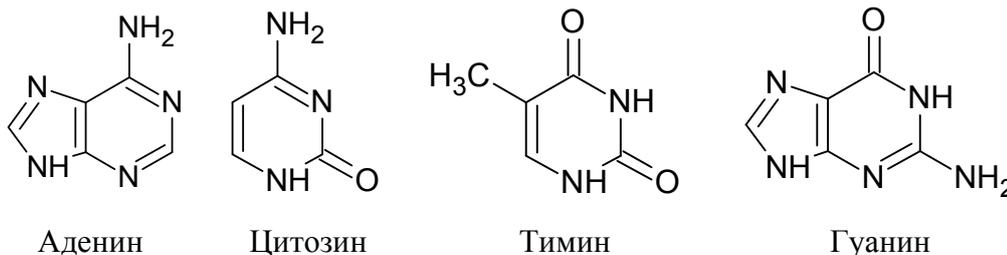
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. УФ спектроскопия олигонуклеотидов

Электронная абсорбционная спектроскопия – один из старейших физических методов аналитической химии. В УФ спектроскопии измеряется оптическое поглощение в диапазоне длин волн от 170 нм до 400 нм. Область длин волн ниже 170 нм называется областью вакуумного ультрафиолета, так как требует измерения поглощения в вакууме, чтобы удалить мешающие газы, входящие в состав воздуха. Для спектроскопии олигонуклеотидов применяют УФ излучение в диапазоне 190-300 нм, так как они поглощают именно в этой области спектра.

Поглощение в области 180-280 нм обусловлено $n \rightarrow \pi^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами электронов в азотистых основаниях, в рибозе или дезоксирибозе. Группы атомов, обуславливающие появление полос поглощения в электронных спектрах, называются хромофорами ("носителями цвета") [1]. Обычно это полярные группы или группы с ненасыщенными связями. Если два хромофора не находятся в сопряжении, их поглощение будет практически аддитивным, тогда как для сопряженных хромофоров сдвиг максимума поглощения может быть значительным. Некоторые заместители, имеющие в составе несвязывающие электроны, могут изменять положение максимума поглощения. Такие группы называются ауксохромами. К ним относятся, например, амино-, гидроксигруппы и метоксигруппы [2, 3].

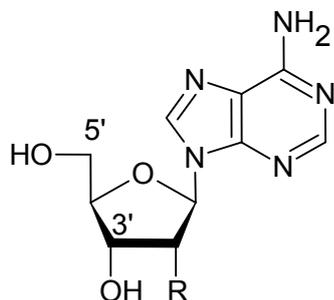
Мономеры дезоксирибоолигонуклеотидов – нуклеотиды – являются производными четырех азотистых оснований: аденина (*A*), гуанина (*G*), тимина (*T*) и цитозина (*C*):



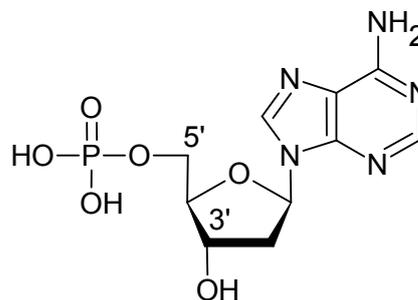
Каждый нуклеотид состоит из остатка азотистого основания, углевода (рибозы или дезоксирибозы) и фосфорной кислоты. В свою очередь гетероциклическое основание, связанное с углеводом, называется нуклеозидом. Ниже приведены формулы нуклеозида (слева) и нуклеотида (справа).

Оптическое поглощение олигонуклеотидов обусловлено поглощением составляющих их мононуклеотидов, для которых, в свою очередь, наибольший вклад в поглощение вносит азотистое основание. Фосфатные группы и остатки рибозы/дезоксирибозы поглощают в области длин волн 190-220 нм. Также в этой области

длин волн обычно поглощают различные примеси, присутствующие в реагентах, поэтому для спектроскопии моно- и олигонуклеотидов чаще всего выбирают диапазон длин волн от 220 нм до 300 нм, в котором почти нет посторонних сигналов.



R=H - дезоксирибоаденозин
R= OH - рибоаденозин



Дезоксирибоаденозин-5'-фосфат

Формулы нуклеозида (слева) и нуклеотида (справа)

В области длин волн 220-300 нм спектры соответствующих дезоксирибо- и рибо-нуклеотидов практически не отличаются, как и спектры соответствующих нуклеотидов и нуклеозидов. Эталонные спектры могут быть полезны при количественном спектрофотометрическом анализе, когда необходимо определить содержание основного вещества в образце неизвестной степени очистки.

Так как УФ спектр – это характеристика электронной структуры молекулы, то изменение последней сказывается на спектре. В частности, для нуклеозидов довольно значительные изменения могут быть вызваны, например, изменением кислотности растворителя. Свойства нуклеозидов приведены в таблице 1:

Таблица 1.Свойства дезоксирибонуклеотидов [4].

Нуклеотиды	Молярная масса, г/моль	ϵ_{260} , л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹		pK_a
		pH 7	pH 2	
<i>dA</i>	331,2	15300	14500	4; ~6,5
<i>dG</i>	347,2	11700	11600	3; 6,3; 9,3
<i>dC</i>	307,2	7400	6300	4,2; 12,3
<i>dT</i>	322,2	9300	9300	9,8; >13

Определение состава олигонуклеотида по его спектру было бы весьма легко осуществить, если бы спектры олигонуклеотидов представляли собой простую суперпозицию спектров составляющих их мононуклеотидов. Но в отношении олигонуклеотидов принцип аддитивности не соблюдается [5-9]. Экстинкция одноцепочечного олигонуклеотида на 15-50% ниже, чем суммарная экстинкция составляющих его

моонуклеотидов. Это явление носит название гипохромизма [5,9]. Оно связано с изменением электронной структуры в результате внутримолекулярных взаимодействий.

Олигонуклеотидные цепочки могут образовывать т. н. "шпильки" (рис. 1) при наличии комплементарных участков в пределах одной цепи [5]. Одноцепочечные олигонуклеотиды в водном растворе могут образовывать одинарные спирали, в которых на один виток приходится примерно 10 оснований [9]. Гидрофобные основания при этом располагаются внутри спирали и стабилизируются перекрыванием их π -электронных облаков (так называемое "стекинг-взаимодействие"), а гидрофильные отрицательно заряженные фосфаты располагаются на внешней стороне спирали. Стекинг-взаимодействие оснований стабилизирует спиральную структуру молекулы (рис. 1).

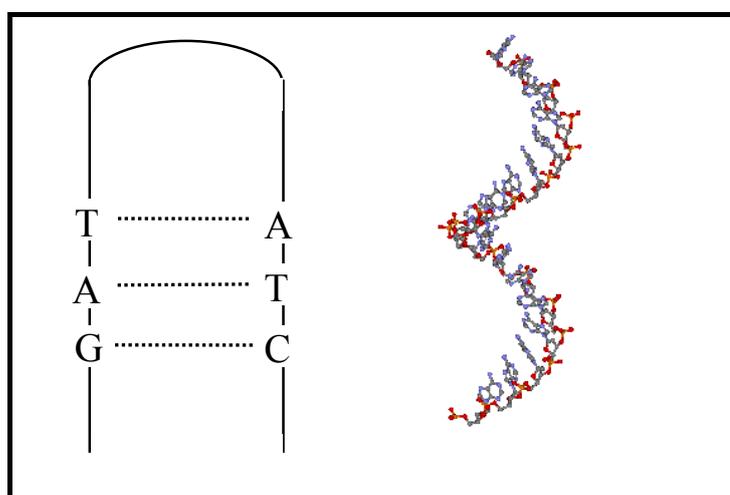


Рис. 1. Пространственная структура молекул олигонуклеотидов: "шпилька" (слева) и одноцепочечная спираль (справа).

Влияние температуры на вид УФ спектра олигонуклеотида заключается в явлении, называемом тепловой денатурацией. При повышении температуры водородные связи между парами оснований в структурах типа "шпилька" разрушаются, что приводит к изменению УФ спектра. Температуру, при которой половина молекул олигонуклеотида структурирована, а половина нет, называют температурой плавления (рис. 2) [5]. Точно температуру плавления можно определить лишь для двухцепочечной ДНК. Для одноцепочечной ДНК точное определение температуры плавления связано со трудностями: переход между двумя состояниями происходит в широком интервале температур, поэтому не всегда удается зарегистрировать полное расплавление.

Изменение оптического поглощения при нагревании зависит и от состава олигонуклеотида: например, образование комплементарных связей между аденином и тиминном вызывает более эффективное снижение ультрафиолетового поглощения ($\lambda \sim 260$ нм), чем образование связей между гуанином и цитозинном, хотя стабильность пространственной

структуры при нагревании определяется последней парой [5]. Для одноцепочечных олигонуклеотидов повышение температуры приводит к разрушению стекинг-взаимодействий. При повышении температуры энергия молекулы увеличивается, вероятность того, что тепловые колебания приведут к разрушению структуры, также стремительно возрастает. Также разрушение структуры может быть связано с тем, что при повышении температуры разрушается структура воды (т. н. "ближний порядок") и, тем самым, ослабляются гидрофобные взаимодействия, стабилизирующие спиральную структуру.

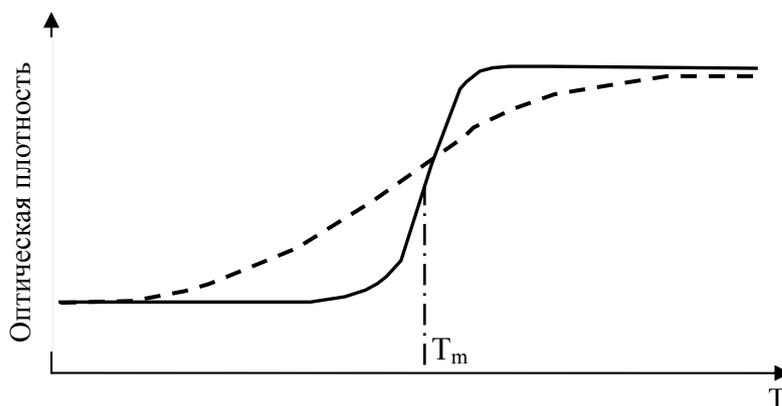


Рис. 2. Типичная кривая плавления двухцепочечной (сплошная линия) и одноцепочечной (пунктирная линия) ДНК.

Если каким-то способом учесть эти взаимодействия, либо построить эксперимент так, чтобы от них избавиться, то, казалось бы, можно решать задачу подтверждения состава олигонуклеотида спектрофотометрическим методом. Однако другие факторы также вносят вклад в погрешность при измерении оптического поглощения и записи спектра методом обычной УФ спектрофотометрии. В частности, это характеристики вещества (его химическая чистота) и спектрофотометра (линейность, погрешность детектирования, межприборная воспроизводимость). Так, примеси могут поглощать в том же диапазоне, что и определяемое вещество, что повлечет за собой искажение спектра. Избавиться от влияния примесей можно, комбинируя метод УФ спектроскопии с методом ВЭЖХ. Хроматография позволяет получать пик чистого вещества, после чего записывается спектр этого пика, свободного ото всех мешающих примесей [10].

Отметим, что нельзя сравнивать напрямую спектры одного и того же вещества, даже записанные в одних и тех же хроматографических условиях с одинаковым составом подвижной фазы, но на разных приборах. Это обусловлено наличием таких приборных факторов, как ширина оптической щели спектрофотометра, точность настройки монохроматора по длинам волн, его линейный диапазон. Так, например, от ширины щели зависит оптическое разрешение спектра. Для разных спектрофотометров размеры щели

могут сильно отличаться, а для спектрофотометрических хроматографических детекторов точное численное значение ширины щели часто неизвестно. Однако некоторые параметры приборов (например, линейность, точность настройки по длинам волн) можно измерить и учесть в дальнейших расчетах, о чем будет сказано ниже.

Невозможно создать общую спектральную базу, применимую к хроматографии с фотометрическим детектированием. Это следует из самой сути хроматографического процесса, так как целевое вещество в разных экспериментах выходит из колонки при разных составах подвижной фазы и это, в особенности, относится к градиентной хроматографии. Спектральную информацию из многочисленных атласов УФ спектров нельзя применить в хроматографии, так как эти спектры записаны, как правило, в чистых растворителях. Очевидно, что для метода ВЭЖХ-УФ необходимо создавать собственную спектральную базу данных, предназначенную для использования с конкретным хроматографом и для конкретной хроматографической системы (колонка-элюент).

Одно из преимуществ многоканальных детекторов [10] и, в частности, восьми-волнового УФ детектора хроматографа "Милихром А-02" – возможность оперирования такой спектральной характеристикой, как спектральные отношения. Спектральное отношение – это отношение величин поглощения при двух выбранных длинах волн:

$$R_{\lambda_1/\lambda_2} = \frac{A_{\lambda_1}}{A_{\lambda_2}} = \frac{\varepsilon_{\lambda_1} \cdot C \cdot l}{\varepsilon_{\lambda_2} \cdot C \cdot l} = \frac{\varepsilon_{\lambda_1}}{\varepsilon_{\lambda_2}}, \quad (1)$$

где A_{λ_1} и A_{λ_2} – оптическая плотность (е.о.п.) при длинах волн λ_1 и λ_2 , ε_{λ_1} и ε_{λ_2} – коэффициенты молярной экстинкции при соответствующих длинах волн ($\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), C – концентрация вещества в растворе (моль/л), l – длина кюветы (см). Важнейшее свойство спектрального отношения – его независимость от концентрации вещества и длины кюветы. Это свойство используется для контроля чистоты раствора вещества, выходящего из хроматографической колонки ("гомогенности хроматографического пика").

Легко показать, что постоянство спектральных отношений на протяжении хроматографического пика является признаком гомогенности пика. Для оценки гомогенности пика следует выбирать такие спектральные отношения, которые различны для вещества и предполагаемой примеси. Пояснение сказанного приведено на рис. 3.

Понятие "спектральное отношение" в традиционном спектральном анализе используется довольно редко, хотя в химии нуклеотидов оно принято уже более 50 лет. Характеристическими длинами волн для этих веществ являются 250, 260 и 280 нм, а спектральные отношения $R_{250/260}$ и $R_{280/260}$ являются справочными величинами [4, 11].

В настоящее время спектральные отношения в хроматографии используются для оценки гомогенности хроматографических пиков, для математического разделения плохо

разрешенных пиков (факторный анализ) [12]. На основании спектральных отношений и времён удерживания различных веществ строят матрицы числовых данных, с помощью которых рассчитывают время удерживания неизвестных компонентов, предсказывают положение "потерянных" пиков – т.е. моделируют многоканальную хроматограмму [13].

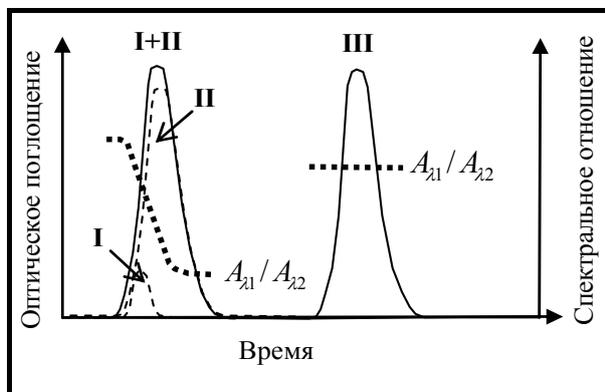


Рис. 3. Негомогенный (I+II) и гомогенный (III) хроматографические пики. (Показан сигнал детектора только на одной длине волны).

На данный момент определенная работа в области моделирования спектров олигонуклеотидов уже проведена. Авторы работы [14] создали алгоритм предсказания спектров одно- и двухцепочечных олигонуклеотидов, на основе которого ими же была создана компьютерная программа для расчета спектра олигонуклеотида произвольного состава [15]. Алгоритм носит название "nearest-neighbor model" ("модель ближайшего соседа"). Отметим, что данная программа обладает рядом недостатков. Например, авторы предупреждают, что спектральная информация, полученная с помощью этой программы, будет достоверной только в области значений pH 6-7; программа не учитывает влияние растворителя. Однако эти недостатки не мешают биохимикам использовать данную модель при анализе состава олигонуклеотидов, полученных твердофазным синтезом. В последнее время научные работы по данной теме посвящены уточнению параметров данной модели, а также оптимизации и оценке точности предложенного метода расчета спектров олигонуклеотидов [16, 17].

Авторы работы [18] пытаются анализировать и предсказывать спектр олигонуклеотидов с помощью разностных спектров олигонуклеотида при температурах до и после температуры плавления, пытаясь таким образом учесть влияние гипохромизма. Метод получил название "thermal difference spectra". На сегодняшний день авторы только накапливают спектры различных олигонуклеотидов, а сам алгоритм моделирования спектров окончательно не разработан.

В работах [19, 20] описаны исследования в области предсказания спектров немодифицированных и модифицированных (замещенных) оснований и нуклеотидов путем

исследования взаимодействия олигонуклеотидов с аминокислотами, однако о практических результатах пока не сообщается.

2.2. Хроматография олигонуклеотидов

Выделение олигонуклеотидов из реакционной смеси после синтеза и их очистку, а также разделение "гомологичных" ($d(N)_n$ и $d(N)_nX$) олигонуклеотидов чаще всего проводят с помощью ВЭЖХ. Применяется несколько вариантов хроматографии: обращенно-фазовая, ион-парная и ионообменная.

2.2.1. Обращенно-фазовая хроматография олигонуклеотидов

Метод обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) является самым распространенным при анализе органических соединений. В данном методе разделение основано на различии в гидрофобных свойствах молекул веществ-аналитов. Возможность использовать сорбенты с привитыми гидрофобными заместителями в сочетании с растворителями разной элюирующей силы позволяет изменять селективность хроматографической системы в очень широких пределах [21].

Следует отметить, что использование ОФ ВЭЖХ часто не позволяет решить многие аналитические задачи применительно к олигонуклеотидам из-за низкой селективности, которая определяется только пуриновыми и пиримидиновыми основаниями. Фосфатные группы, несущие отрицательный заряд, при ОФ ВЭЖХ, "отталкиваясь" от гидрофобной поверхности неподвижной фазы, уменьшают удерживание олигонуклеотида и не вносят заметного вклада в селективность хроматографической системы. Для решения этой проблемы в большинстве случаев ОФ ВЭЖХ используют в ион-парном варианте, добавляя в подвижную фазу в качестве динамических модификаторов гидрофобные амины [22].

2.2.2. Ион-парная хроматография олигонуклеотидов

Ион-парная (ИП) хроматография занимает промежуточное положение между ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Суть метода заключается в том, что при разделении слабоудерживаемых соединений, в молекулах которых есть заряженные (ионогенные) группы, в подвижную фазу добавляют гидрофобные ионы с противоположным зарядом, образующие ионные пары с молекулами веществ-аналитов. Тем самым увеличивается гидрофобность разделяемых соединений и, как следствие, их удерживание [22]. Недостатком метода является большее время уравнивания колонки ион-парным модификатором (до нескольких часов). Также к недостаткам следует отнести сложный механизм взаимодействия аналита с ион-парным агентом и неподвижной фазой, в результате чего для описания хроматографического процесса необходимо применять сложные математические уравнения.

При разделении олигонуклеотидов методом ИП ВЭЖХ в качестве элюентов обычно используют водные растворы ацетонитрила с добавкой солей алкиламинов и слабых кислот

(уксусная, ортофосфорная), которые одновременно обеспечивают режим ИП ЖХ и необходимую буферную емкость подвижной фазы при заданном значении pH . Выбор правильного типа ион-парного агента позволяет добиваться разделения фрагментов нуклеиновых кислот в соответствии с числом оснований (пар оснований) [21, с. 216-217].

2.2.3. Ионообменная хроматография олигонуклеотидов

Методом ионообменной (ИО) хроматографии разделяют частицы, несущие заряд, поэтому данный метод позволяет разделять олигонуклеотиды по общему заряду молекулы [23], а, следовательно, по длине. До середины 70-х годов прошлого века для очистки олигонуклеотидов применяли адсорбенты-ионообменники, синтезированные на основе целлюлозы или декстрана. В настоящее время эти "мягкие" ионообменники практически полностью вытеснены "жесткими" неподвижными фазами, синтезированными на основе полистирола или микропористых силикагелей, позволяющими быстро хроматографировать вещества в режиме высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [24]. С течением времени появляются все новые типы ионообменников, как например пелликулярные аниониты фирмы *Dionex Corp.*, обладающие еще большей селективностью и позволяющие работать в более широком интервале значений pH подвижной фазы [25].

Выделяют два типа ионообменных сорбентов: анионообменники (аниониты) с положительно заряженными группами, удерживающими анионы; и катионообменники (катиониты) с отрицательно заряженными группами, удерживающими катионы. Для ионнообменной хроматографии олигонуклеотидов используют аниониты, так как общий заряд молекулы олигонуклеотида обусловлен фосфатными группами, при нейтральном pH имеющими отрицательный заряд.

В качестве подвижных фаз используют буферные растворы, позволяющие регулировать значения pH . Для слабых ионообменников выбор pH определяет степень ионизации их ионогенных групп, которая влияет на прочность связывания вещества, прежде всего, через изменение плотности распределения зарядов по объему сорбента и соответствующее изменение возможностей многоточечной сорбции. Кроме того, и сами процессы нейтрализации или ионизации ионогенных групп сорбента при сдвигах pH буфера соответственно затрудняют или способствуют взаимодействию вещества с сорбентом. С другой стороны, pH определяет среднее значение суммарного заряда молекул вещества, полноту ионизации его ионогенных групп, число и характер распределения зарядов на поверхности молекул. Сочетание двух упомянутых эффектов выбора pH может в широком диапазоне изменять характер и силу взаимодействия вещества с ионообменником и, что особенно важно, соотношение этих сил для разных компонентов анализируемой смеси веществ.

Однако даже подбор оптимального значения pH не гарантирует разделения компонентов смеси. Прочность сорбции вещества зависит также от концентрации в элюенте ионов соли. При малой их концентрации вещество практически не будет продвигаться по колонке. При чересчур большой концентрации соли в подвижной фазе вещества-аналиты не будут сорбироваться и, не разделившись, быстро выйдут из колонки. Для промежуточных значений концентрации соли в элюенте будет иметь место равновесие сорбции и десорбции, специфическое для каждого анализируемого вещества, когда часть его молекул будет находиться в подвижной фазе, а другая (желательно большая) часть окажется связанной с сорбентом. При правильном подборе сорбента и состава элюентов удастся разделять фрагменты олигонуклеотидов длиной N и $N-1$ мономерных звеньев, как, например, для олигонуклеотида $p(C)_{30}$ в работе [26].

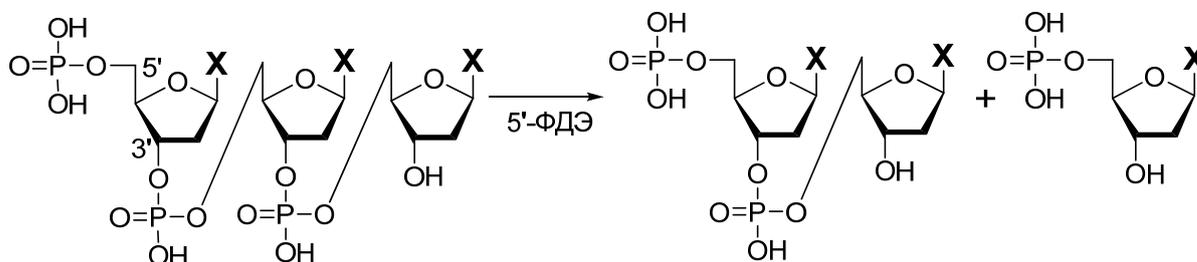
Помимо описанных ионных взаимодействий, в хроматографическом процессе в большей или меньшей степени участвуют и другие виды взаимодействия вещества с сорбентом. Свой вклад неизбежно вносят гидрофобное взаимодействие с материалом матрицы, адсорбция за счет водородных связей и ван-дер-ваальсовых сил. Неионные взаимодействия вещества с ионообменником, как правило, ухудшают хроматографическое разрешение, вызывают размывание и ухудшение симметрии пиков. Их стараются подавить путем соответствующего выбора пористости сорбента, введения органических растворителей или мочевины, и др. Но иногда неионные взаимодействия могут и способствовать разделению близких по величине суммарного заряда веществ. Примером может служить метод разделения индивидуальных тРНК на бензоилированной целлюлозе [24]. В этом случае матрицу целлюлозы химически модифицировали таким образом, чтобы придать ей определенную гидрофобность. При этом удерживание на сорбенте, помимо ионного обмена, было обусловлено еще и степенью гидрофобности молекул различных тРНК.

2.3. Определение состава олигонуклеотидов

Для получения информации о составе олигонуклеотидов могут быть использованы различные методы анализа. Однако само понятие "состав олигонуклеотида" неоднозначно: под этим может подразумеваться как информация о нуклеотидном составе молекул образца, так и информация о последовательности нуклеотидов в молекуле полимера. Сочетание методов УФ спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяет получать информацию о составе олигонуклеотида в любом ее понимании.

УФ спектр олигонуклеотида характеризует его состав. Ионообменная хроматография может быть применена для определения длины олигонуклеотида. Для этого

хроматографируют продукты ферментативного гидролиза олигонуклеотида под действием любой экзонуклеазы, например, 5'-фосфодиэстеразы яда змеи (5'-ФДЭ). Этот фермент относится к классу экзонуклеаз, то есть последовательно отщепляет нуклеотиды от молекулы олигонуклеотида, начиная со свободного 3'-конца цепи [27]. Схематически процесс гидролиза показан ниже, где X – азотистое основание:



Нуклеотидные единицы при этом освобождаются в форме нуклеозид-5'-фосфатов. Таким образом, реакционная смесь (гидролизат) представляет собой смесь олигонуклеотидов длиной n , $n-1$, $n-2$ и так далее вплоть до мононуклеотидов. Соседние пики на хроматограмме в режиме ионообменной ВЭЖХ будут принадлежать этим "гомологичным" олигонуклеотидам, а число пиков будет соответствовать количеству оснований в олигонуклеотиде. Сравнивая УФ спектры "гомологичных" олигонуклеотидов, можно установить последовательность нуклеотидов в исходном соединении. Это метод носит название дифференциальный спектральный метод определения первичной структуры олигонуклеотидов [28].

Существуют и другие, "классические", методы определения состава олигонуклеотидов, которые широко используются в биохимии (методы Сенджера и Максама-Гилберта [29], метод с использованием ион-парной обращенно-фазовой хроматографии при матричной-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией [30]). В первом случае анализируют продукты действия на олигонуклеотид ДНК-полимеразы, разделенные гель-электрофорезом. Во втором случае меченый, например, радиоактивным остатком фосфорной кислоты олигонуклеотид подвергают серии химических воздействий, расщепляющих связи между определенными типами нуклеотидов, после чего реакционную смесь разделяют с помощью гель-электрофореза. Однако для анализа коротких олигонуклеотидов эти методы неэффективны (время анализа значительно превышает длительность синтеза). Поэтому разработка "экспрессного", относительно простого и экономичного метода подтверждения состава коротких олигонуклеотидов с помощью сочетания методов ВЭЖХ и УФ спектрометрии представляется перспективной.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Материалы

Ацетонитрил "Сорт 0" (НПК "Криохром", С.-Петербург); уксусная кислота "хч" (ГК "Лаверна", Москва); триэтиламин $N[Et]_3$ перегнанный; цетил-триметиламмония бромид (ЦТАБ) "хч"; тетрабутиламмония гидроксид "хч" 40%; фосфорная кислота "хч" 81,3%; хлорная кислота "хч" 60%; серная кислота "чда" конц.; трифторуксусная кислота ("ICN Biomedicals", Inc., США); соляная кислота, стандарт-титр 0,1 н ("Реахим", Россия); перхлорат лития тригидрат ("Panreac", Испания); сульфат цинка гептагидрат "осч" ("Реахим", Россия); хлорид магния гексагидрат "хч" ("Реахим", Россия); *трис*(гидрокси-метил)аминометан ("Serva", Германия); фосфодиэстераза в виде сухого яда змеи *Crotalus atrox* (Cat. No. P-4506) ("Sigma-Aldrich", Co., США). Дезоксирибонуклеозиды и нуклеотиды в твердом виде, рибоолигонуклеотид $r(pA)_{12}$ в виде водного раствора (~0,3 мг/мл) и 2'-дезоксирибоолигонуклеотиды $d(pA)_{20}$, $d(pC)_5$, $d(pA)_{10}$, $(pT)_5$; $(pT)_{10}$, $d(pA)_5$, $d(pApC)$, $d(pApCpG)$, $d(pApCpGpCpTpApGpTpApC)$ (далее олиго-10) в виде водных растворов (~0,3 мг/мл до ~3 мг/мл) предоставлены ООО "БИОССЕТ" (Новосибирск).

3.2. Оборудование

Хроматограф жидкостной микроколоночный "Милихром А-02" (ЗАО "ЭкоНова", Новосибирск); колонка (2x75 мм) с обращенно-фазовым сорбентом ProntoSil 120-5-C18 AQ (5 мкм) ("Bischoff Analysentechnik und-Geräte", GmbH, Германия); колонка (2x75 мм) с анионообменным сорбентом Диасфер-250 ПА (5 мкм) (ЗАО "БиоХимМак СТ", Москва); весы аналитические "Adventurer", точность взвешивания $\pm 0,0001$ г ("Ohaus" Corp., США); рН-метр "Анион-4100", точность измерения $pH \pm 0,03$ (НПП "Инфраспек-Аналит", Россия); центрифуга "MiniSpin", макс. 13400 об./мин ("Eppendorf", Corp., Германия); насос шприцевого типа (ЗАО "Эконова", Россия); мембранные фильтры для водных растворов "Dugapore 0,22 μm GV" ("Millipore" Corp., США); установка для упаковки хроматографических колонок с насосом высокого давления (до 400 атм) (ЗАО "Эконова", Россия); пипетки переменного объема со сменными наконечниками "Ленпипет Колор" $1 \pm 2\% \div 20 \pm 2\%$ мкл, $20 \pm 2\% \div 200 \pm 1,5\%$ мкл и $100 \pm 1,5\% \div 1000 \pm 1\%$ мкл (ЗАО "ТермоЛаб-системс", С.-Петербург); пипетки стеклянные $10 \pm 0,05$ мл и $5 \pm 0,05$ мл с делениями; колбы мерные ($50 \pm 0,1\%$ мл, $100 \pm 0,1\%$ мл, $250 \pm 0,1\%$ мл).

Обработку хроматограмм проводили с помощью компьютерной программы "Мультихром-СПЕКТР" (ЗАО "Амперсенд", Россия).

Расчет спектральных параметров проводили с помощью компьютерной программы "Microsoft® Excel 2003" ("Microsoft Corp.", США).

3.3. Методы

3.3.1 Оценка погрешности приготовления растворов

При приготовлении растворов массовую (C_m) и молярную (C_M) концентрации вещества определяли соответственно по формулам:

$$C_m = \varpi \cdot \frac{m}{V}, \quad C_M = \varpi \cdot \frac{m}{V \cdot M_A}$$

где ϖ - массовая доля основного вещества в препарате; m - масса препарата (г), V - объем раствора (мл), M_A - молярная масса вещества.

Погрешность приготовления контрольного раствора определяется погрешностью, обусловленной наличием примесей в препарате, погрешностью взвешивания, погрешностью используемой мерной посуды. Предел допускаемой погрешности весов Adventurer составляет 0,0001 г. Относительную погрешность определения массы вещества δ_m определяли по формуле:

$$\delta_m = \pm \Delta_m / m,$$

где Δ_m - допускаемая погрешность взвешивания (г).

Допускаемая погрешность взвешивания для двух измерений $\Delta_m^{\text{взвеш.}}$ (пустой тары и тары с навеской):

$$\Delta_m^{\text{взвеш.}} = \sqrt{\Delta_{m1}^2 + \Delta_{m2}^2},$$

Относительная погрешность используемой мерной посуды δ_V :

$$\delta_V = \pm \Delta_V / V,$$

где Δ_V - допускаемая погрешность от номинальной вместимости мерной посуды (мл), V - объем раствора (мл).

Относительная погрешность определения массовой доли основного вещества δ_ϖ :

$$\delta_\varpi = \pm \Delta_\varpi / \varpi,$$

где Δ_ϖ - допускаемая погрешность от содержания примесей в основном веществе (%).

Погрешность приготовления растворов δ_C (%):

$$\delta_C = \pm 100 \cdot \sqrt{\delta_m^2 + \delta_V^2 + \delta_\varpi^2}$$

3.3.2. Приготовление растворов

Фосфорная кислота 0,024 М, рН 1,94. В мерную колбу вместимостью 250 мл приливали 450 мкл фосфорной кислоты, доводили до метки дистиллированной водой, перемешивали. Значение рН контролировали по показаниям рН-метра.

Хлорная кислота 2 М. В стакан вместимостью 50 мл приливали 15,7 мл дистиллированной воды, 4,3 мл хлорной кислоты, перемешивали.

Раствор для "псевдохроматографии" №1 (0,4 М LiClO₄ + 0,02 М HClO₄, pH 2,1). В мерную колбу вместимостью 100 мл приливали 10 мл раствора перхлората лития 4 М, 120 мкл хлорной кислоты, доводили до метки дистиллированной водой, перемешивали.

Раствор для псевдохроматографии №2 (0,024 М H₃PO₄ + 0,1% ЦТАБ). В стакан вместимостью 50 мл вносили 2 мг ЦТАБ, приливали 20 мл раствора фосфорной кислоты 0,024 М, перемешивали.

Раствор для "псевдохроматографии" №3 (0,01 М сульфат тетрабутиламмония, pH 2). В стакан вместимостью 50 мл вносили 0,32 г раствора ТБА с концентрацией 40%, добавляли 50 мл дистиллированной воды, перемешивали. Добавляли серную кислоту до pH 2 по показаниям pH-метра.

Раствор для "псевдохроматографии" №4 (0,01 М трифторацетат тетрабутиламмония, pH 2). В стакан вместимостью 50 мл помещали 50 мл раствора 0,01 М ТБА, приготовленного вышеописанным способом. Добавляли трифторуксусную кислоту до pH 2 по показаниям pH-метра.

Раствор 1 М HCl. В мерную колбу вместимостью 100 мл количественно переносили содержимое фиксаля, доводили до метки дистиллированной водой.

Раствор 1 М HClO₄. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносили 12 мл концентрированной HClO₄, доводили до метки дистиллированной водой.

Буферный раствор 1 М Трис-HCl, 0,2 М MgCl₂ (pH 8,9). В мерный стакан вместимостью 50 мл вносили 6 г Трис, 2 г MgCl₂·6H₂O, приливали около 20 мл воды, доводили раствором 1 М HCl до pH 8,9 по показаниям pH-метра. Полученный раствор переливали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили дистиллированной водой до метки.

Буферный раствор 1 М Трис-HClO₄ (pH 7,4). В мерный стакан вместимостью 50 мл вносили 6 г Трис, приливали около 20 мл воды, доводили раствором концентрированной HClO₄ до pH 7,4 по показаниям pH-метра. Полученный раствор переливали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили дистиллированной водой до метки.

Буферный раствор 1 М N[Et]₃ - HOAc, pH 5,5. В 10,1 г триэтиламина растворяли в 50 мл подкисленной воды, в раствор добавляли эквимолярное количество концентрированной уксусной кислоты и доводили разбавленной кислотой до pH 5,5 по показаниям pH-метра. Полученный раствор переливали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили дистиллированной водой до метки.

Буферный раствор 0,1 М N[Et]₃ - HOAc, pH 5,5. В мерную колбу вместимостью 100 мл приливали 10 мл концентрированного буферного раствора 1 М N[Et]₃ - HOAc pH 5,5, доводили до метки дистиллированной водой, перемешивали.

Элюент А для ионообменной хроматографии: 0,025 М Трис-НСlO₄ (pH 7,4), 0,01 М LiClO₄, 10% (об./об.) ацетонитрила. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносили 2,5 мл буферного раствора 1 М Трис-НСlO₄ (pH 7,4), 250 мкл водного раствора 4 М LiClO₄, 10 мл ацетонитрила, доводили до метки дистиллированной водой.

Остальные элюенты для ионообменной хроматографии с различными концентрациями соли и ацетонитрила готовили аналогично.

Раствор 0,05 М ZnSO₄. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносили 1,44 г ZnSO₄·7H₂O, доводили до метки дистиллированной водой.

Растворы дезоксирибонуклеозидов и дезоксирибонуклеотидов. В полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл вносили 1,0 мг порошка, добавляли 1 мл дистиллированной воды, перемешивали. Растворы хранили при температуре -18°C.

Растворы олигонуклеотидов для "псевдохроматографии". В стеклянную пробирку вместимостью 200 мкл отбирали 20 мкл концентрированного водного раствора олигонуклеотида (п. 3.1), добавляли 80 мкл элюента А (растворы для псевдохроматографии), перемешивали.

3.3.3. Методика оценки метрологических характеристик детектора хроматографа.

При работе со спектральными данными необходимо соблюдать требования к точности получаемой спектральной информации. В первую очередь она зависит от точности настройки спектрофотометрического детектора хроматографа. Поэтому необходима по возможности простая методика, позволяющая контролировать метрологические характеристики детектора хроматографа.

Оценка точности установки длин волн. Точность установки длин волн оценивали по положению максимума спектра пленки полистирола вблизи длины волны 261 нм. Оценку проводили с помощью устройства, изготовленного на основе т. н. имитатора кюветы детектора (входит в комплект хроматографа).

Записывали спектр полистирола в диапазоне от 240 до 280 нм с шагом 2 нм. С помощью программы "Microsoft® Excel 2003" имитировали сдвиг настройки монохроматора детектора вправо и влево по длинам волн последовательно на 0,1 нм и рассчитывали соответствующее изменение спектрального отношения полистирола A_{250}/A_{270} .

Математическую обработку проводили следующим образом:

1. Аппроксимировали прямыми участки спектра справа и слева от максимума (рис. 4). Далее одновременно сдвигали обе прямые вправо и влево с шагом 0,1 нм и вычисляли измененные значения оптической плотности.

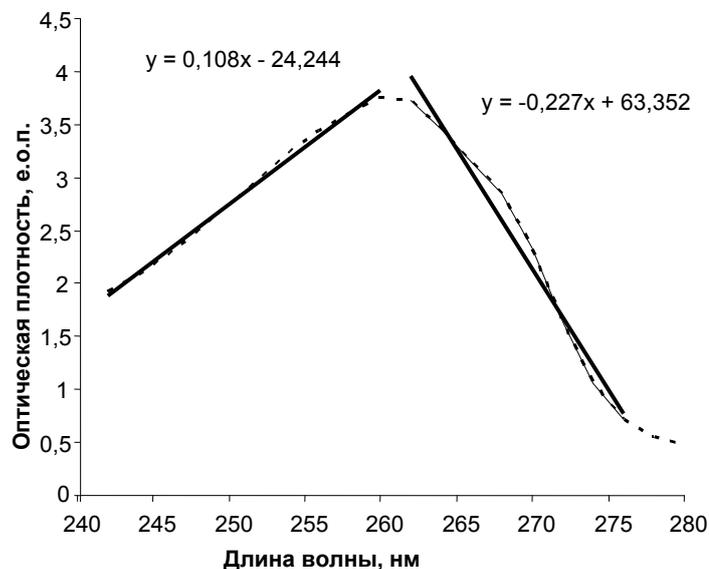


Рис. 4. Аппроксимация пика в спектре полистирола двумя прямыми. Пунктирная линия – спектр полистирола, сплошные линии – аппроксимирующие прямые.

2. Вычисляли спектральное отношение до и после сдвига настройки (табл. 2). Характерные точки – A_{250} и A_{270} – выбирали на соседних склонах спектра так, чтобы $A_{250}/A_{270} \approx 1$. При оценке погрешности настройки конкретного монохроматора пользовались этой таблицей.

Для детекторов хроматографа "Милихром А-02" паспортное значение точности установки длины волны составляет $\pm 0,5$ нм [31]. Зная погрешность установки длин волн для конкретного прибора, можно вносить необходимые коррективы в спектры, записанные на данном приборе.

На используемом в работе хроматографе сер. № 178 точность установки длины волны детектора составила $\pm 0,2$ нм. Это обеспечивает погрешность значений спектральных отношений в диапазоне 0,1-1,0 не хуже $\pm 0,03$, что соответствует погрешности, установленной при межлабораторных испытаниях и аттестованной Всероссийским научно-исследовательским институтом метрологической службы Ростехрегулирования [31].

Оценка воспроизводимости установки длины волны детектора при циклической работе (многоволновая детекция). Выбирали "крутой" участок спектра полистирола, близкий к линейному (270-274 нм). Измерения оптической плотности проводили на длине волны 272 нм в однолучевом режиме в двух вариантах: одноволновом и двухволновом режиме.

Таблица 2. Спектральные отношения A_{250}/A_{270} пленки полистирола, вычисленные при сдвиге настройки детектора хроматографа "Милюхром А-02" на ± 1 нм относительно $\lambda=261$ нм (правильное значение).

λ , нм	$\Delta \lambda_0$, нм	A_{250}/A_{270}	λ , нм	$\Delta \lambda_0$, нм	A_{250}/A_{270}
260,0	-1,0	1,117	261,0	0,0	1,286
260,1	-0,9	1,133	261,1	0,1	1,305
260,2	-0,8	1,149	261,2	0,2	1,324
260,3	-0,7	1,165	261,3	0,3	1,344
260,4	-0,6	1,181	261,4	0,4	1,364
260,5	-0,5	1,198	261,5	0,5	1,384
260,6	-0,4	1,214	261,6	0,6	1,405
260,7	-0,3	1,232	261,7	0,7	1,427
260,8	-0,2	1,25	261,8	0,8	1,449
260,9	-0,1	1,268	261,9	0,9	1,472
261,0	0,0	1,286	262,0	1,0	1,495

Сигнал детектора регистрировали 3 мин и определяли уровни шумов при длине волны 272 нм при возвращении из положения 260 нм (ΔA_{272-2} и ΔA_{272-1}). Критерием невоспроизводимости установки длины волны детектора ($\Delta \lambda$) является наличие шума в двухволновом режиме, то есть $\Delta \lambda = f(\Delta A_{272-2} - \Delta A_{272-1})$. Расчетные значения $\Delta \lambda$ приведены в таблице 3.

Таблица 3. Расчетные значения $\Delta \lambda$ для различного уровня шума.

$\Delta \lambda$, нм	$(\Delta A_{272-2} - \Delta A_{272-1})$, е.о.п.
1	0,3
0,1	0,03
0,01	0,003
0,001	0,0003

Так как измеренная разность амплитуд шумов ($\Delta A_{272-2} - \Delta A_{272-1}$) меньше 0,003 е.о.п., можно заключить, что погрешность установки длины волны в многоволновом режиме не превышает $\pm 0,01$ нм (см. табл. 3).

Оценка границы диапазона линейности детектора. Линейность детектора оценивали по поглощению растворов аденозина в воде с концентрацией 0,22 мг/мл. В кювету методом псевдохроматографии вводили пробы объемом 2, 10, 20 и 50 мкл, рассчитывали площади пиков и сравнивали отношения A_{220}/A_{260} , A_{250}/A_{260} , A_{280}/A_{260} и A_{300}/A_{260} .

Из табл. 4 следует, что спектральные отношения в диапазоне оптической плотности до 10 е.о.п. остаются практически постоянными, отклоняясь не более чем на $\pm 0,004$. В диапазоне более высоких значений оптической плотности линейность детектора не

проверяли, так как на практике хроматографические пики имеют высоту не более 3-6 е.о.п. во избежание перегрузки колонки.

Таблица 4. Оценка диапазона линейности детектора.

Объем пробы, мкл	A_{260} в макс. пика, е.о.п.	A_{220}/A_{260}	A_{250}/A_{260}	A_{280}/A_{260}	A_{300}/A_{260}
2	0,5	0,437	0,773	0,159	0,003
10	2,8	0,435	0,772	0,160	0,000
20	4,8	0,436	0,770	0,157	0,001
50	9,6	0,440	0,777	0,160	0,001

3.3.4. Регистрация спектров поглощения растворов с помощью УФ детектора хроматографа

Получение спектральной информации с помощью хроматографического УФ детектора может осуществляться двумя способами: первый – как в обычном спектрофотометре – после заполнения ячейки детектора раствором вещества, например, с помощью шприца; второй – непрерывная запись величины оптического поглощения элюата в проточном (хроматографическом) режиме, когда в колонку вводится небольшая порция исследуемого раствора.

Недостаток первого метода – опасность загрязнения кюветы механическими примесями и возможность образования микропузырьков воздуха, мешающих записи спектра. Во втором случае этих недостатков нет, но конструктивные особенности хроматографа не позволяют напрямую определять концентрацию вещества в растворе по оптическому поглощению. Эта концентрация может быть найдена из интеграла хроматографического пика по объему удерживания (площади пика) с помощью компьютерной программы обработки хроматографических данных, например, "Мультихром-СПЕКТР".

Программа для обработки хроматограмм "Мультихром-СПЕКТР" рассчитывает площадь пика в единицах "е.о.п.·мкл", где е.о.п. – единицы оптической плотности. Зная объем вводимой в колонку пробы и площадь хроматографического пика, из уравнения материального баланса можно найти концентрацию вещества в пробе: $S_{\text{проба}} = S_{\text{пик}}$
 $C_{\text{проба}} \cdot V_{\text{проба}} = \int C_{\text{пик}} dV$. Графически это показано на рис. 5.

При работе с растворами чистых веществ (с целью записи их спектров) хроматографическая колонка может быть заменена капилляром. Этот прием, который мы в дальнейшем использовали, можно назвать "псевдохроматографией".

Для экспериментов был взят капилляр с внутренним диаметром 0,5 мм, объемом ~35 мкл. Оптимизация скорости потока и объема вводимой пробы проводилась одновременно. В качестве оптимальной скорости потока взято значение 20 мкл/мин, так как при более высокой скорости пик вещества на выходе наблюдается асимметричным и

широким (рис. 6), при более низкой - увеличивается время анализа, пик также уширяется вследствие диффузии. В качестве оптимального объема вводимой пробы взято значение 2-5 мкл. Большой объем приводит к асимметрии пика.

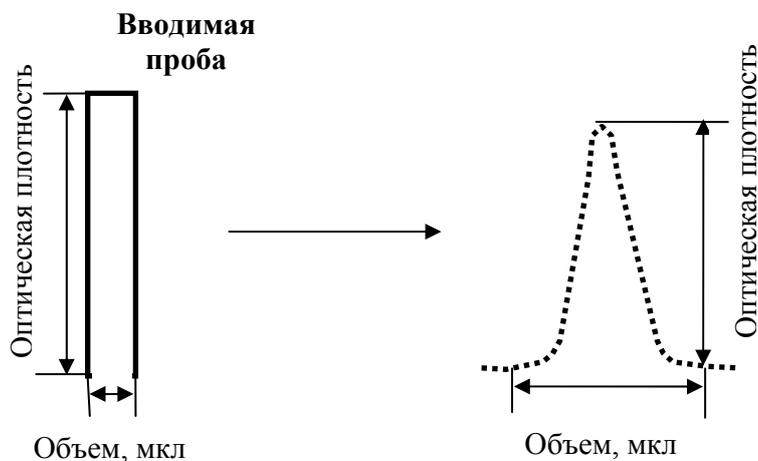


Рис. 5. Иллюстрация к расчету оптической плотности раствора, вводимого в колонку.

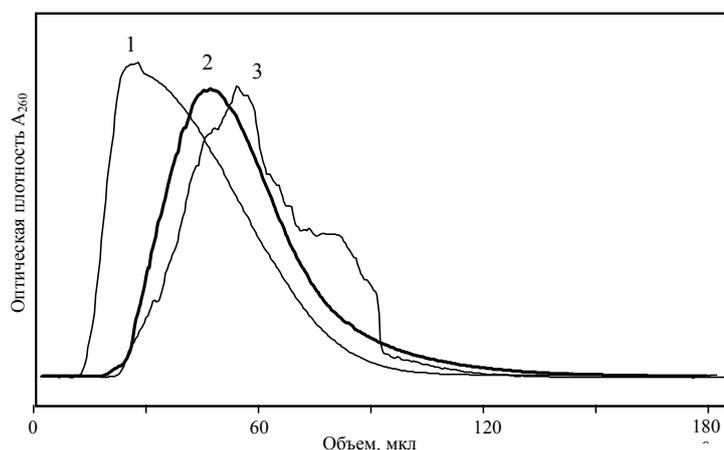


Рис. 6. Форма "пика" раствора аденозина в режиме псевдохроматографии.
1– $V_{\text{проба}}=15$ мкл; скорость потока 20 мкл/мин, 2– $V_{\text{проба}}=5$ мкл; скорость потока 20 мкл/мин, 3– $V_{\text{проба}}=5$ мкл, скорость потока 50 мкл/мин.

3.3.5. Методика очистки фосфодиэстеразы змеиного яда

Ферментативный гидролиз олигонуклеотидов проводили с помощью фосфодиэстеразы (ФДЭ) змеиного яда. Имеющийся в наличии реактив является не чистым ферментом, а очищенным змеиным ядом. Известно, что яд змеи содержит также фермент 5'-нуклеотидазу [28], которая отщепляет фосфатные группы от 5'-конца олигонуклеотидной цепочки. Отщепление концевых фосфатных групп в олигонуклеотиде приведет к изменению общего заряда молекулы и, как следствие, к изменению удерживания вещества при ионообменной хроматографии. Реакция отщепления фосфатных групп в данном случае не будет протекать полностью, так как условия не будут являться оптимальными для активности 5'-нуклеотидазы. Таким образом, необходима предварительная очистка фосфодиэстеразы от присутствующей в реактиве 5'-нуклеотидазы.

Наличие и активность 5'-нуклеотидазы проверяли на модельном растворе 5'-аденозинмонофосфата. Как можно видеть на рис. 7, после инкубации водного раствора 5'-аденозинмонофосфата с раствором препарата змеиного яда в течение 2 ч пик нуклеотида полностью исчез, левее на хроматограмме появился пик нуклеозида. Таким образом, было показано, что 5'-нуклеотидаза действительно содержится в имеющемся реактиве и необходима его предварительная очистка.

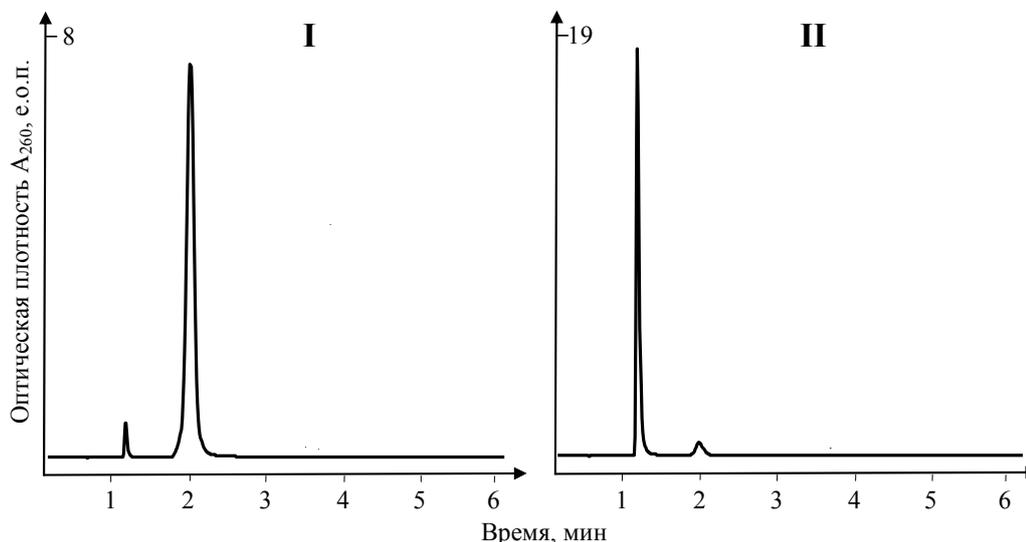


Рис. 7. Хроматограммы раствора 5'-аденозинмонофосфата до (I) и после (II) инкубации со змеиным ядом в течение 1 часа. Колонка (2x75 мм) с сорбентом Диасфер-250 ПА; элюент А – [0,025 мМ Трис-НСlO₄ (pH 7,4), 0,01 М LiClO₄, ацетонитрил 10 % (об./об.)], элюент Б – [0,025 мМ Трис-НСlO₄ (pH 7,4), 0,15 М LiClO₄, ацетонитрил 10 % (об./об.)]; градиент: от 0 до 100% Б за 20 мин; поток 200 мкл/мин; детектор: 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 нм (показано поглощение при 260 нм); температура колонки 65°C. Объем пробы 5 мкл.

Для удаления 5'-нуклеотидазы из раствора использовали известную методику [32]. Навеску препарата змеиного яда (20 мг) растворяли в 900 мкл воды, к полученному раствору приливали 200 мкл буферного раствора 0,1 М Трис-НСl (pH 8,6) и 400 мкл 50 мМ ZnSO₄. Полученный раствор перемешивали, инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Затем центрифугировали (13000 об./мин, 5 мин), осадок отбрасывали.

Было показано, что активность ФДЭ после очистки осталась на прежнем уровне а активностью 5'-нуклеотидазы можно пренебречь, как видно из рис. 8.

3.3.6. Методика ферментативного гидролиза олигонуклеотида

К 100 мкл водного раствора олигонуклеотида приливали 10 мкл буферного раствора (1 М Трис-НСl (pH 8,9), 0,2 М MgCl₂) и 10 мкл раствора очищенной ФДЭ (п. 3.3.4.). Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 30 минут, отбирая аликвоты по 20 мкл в начальный момент времени, через 2, 5, 15 и 30 минут после начала реакции. ФДЭ дезактивировали выдерживанием аликвот на кипящей водяной бане в течение 3 минут.

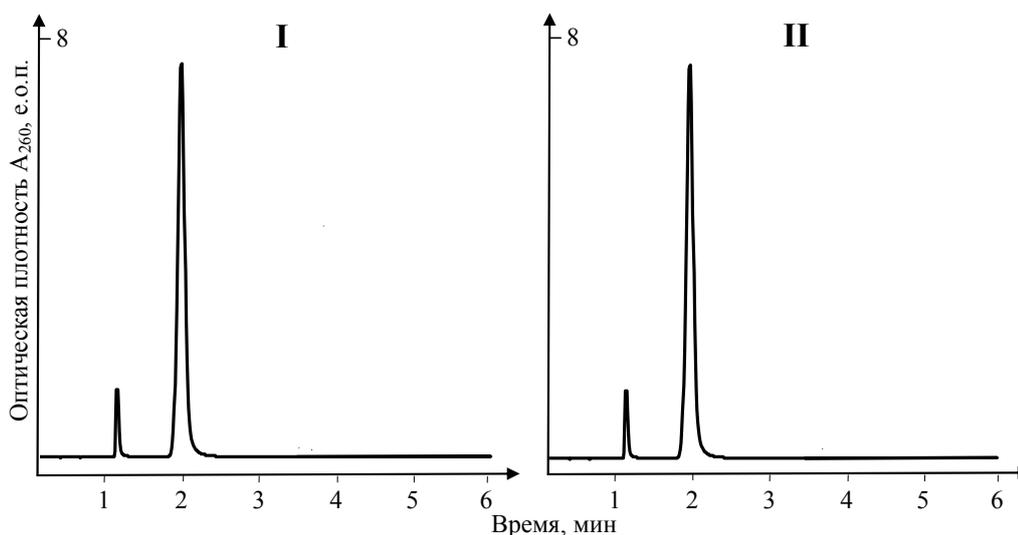


Рис. 8. Хроматограмма раствора 5'-аденозинмонофосфата до (I) и после (II) инкубации с очищенной ФДЭ в течение 2 часов. Условия анализа указаны в подписи к рис. 7.

3.3.7. Методика упаковки хроматографической колонки сорбентом Диасфер-250 ПА

0,7 мл пастообразной суспензии сорбента в этаноле дважды промывали 0,7 мл буферного раствора (0,2 М CH_3COONa , pH 5), предварительно профильтрованного через фильтр с порами 0,22 мкм. Смесь центрифугировали (10000 g , 1 мин) и надосадочный раствор отбрасывали. К осадку добавляли 0,7 мл того же буферного раствора, затем при перемешивании доводили объем до 10 мл этим раствором. Полученную суспензию сорбента помещали в резервуар установки для упаковки колонок. Упаковку проводили при ориентации колонки "снизу вверх", скорость потока 1 мл/мин в течение 10 мин, максимальное давление 126 атм. Затем сорбент в колонке уплотняли потоком этого же буферного раствора при скорости 2 мл/мин в течение 15 мин, максимальное давление составляло 276 атм. Колонку после упаковки промывали 2 мл воды со скоростью 200 мкл/мин, затем смесью вода-ацетонитрил при градиентном элюировании (от 0 до 100% ацетонитрила за 3000 мкл, скорость потока 150 мкл/мин, температура термостата 35°C).

3.3.8. Методика обращенно-фазовой ВЭЖХ олигонуклеотидов

Для обращенно-фазовой хроматографии олигонуклеотидов использовали сорбент ProntoSil 120-5-C18 AQ (5 мкм). Элюент А – 0,2 М LiClO_4 и 0,005 М HClO_4 в воде; элюент Б – CH_3CN . Хроматографировали при градиентном элюировании от 5% до 100% Б за 4000 мкл при скорости 100 мкл/мин. Длины волн детектирования: 240, 250, 260, 270, 280, 290 и 300 нм, постоянная времени $\tau=0,18$ с. Температура термостата колонки 40°C. Объем вводимой пробы 4 мкл.

3.3.9. Методика ионообменной ВЭЖХ олигонуклеотидов

Для ионообменной хроматографии олигонуклеотидов использовали колонки с "Диасфер-250 ПА" (5 мкм) (стиролдивинилбензол с четвертичными аммониевыми группами, размер частиц 5 мкм, обменная емкость 2,0 моль/г). Элюенты "А" и "Б" – водные буферные растворы [Трис- HClO_4 , pH 7,3] с добавкой перхлората лития LiClO_4 и CH_3CN . Концентрацию LiClO_4 в элюентах варьировали в пределах от 0,002 М до 0,6 М, объемную долю CH_3CN от 0% до 40%. Концентрация Трис- HClO_4 в элюентах составляла от 0,005 до 0,025 М. Хроматографию проводили при градиентном элюировании от 0% до 100% элюента Б за 4000 мкл при скоростях 50, 100 и 200 мкл/мин. Детектирование осуществляли на длинах волн 240, 250, 260, 270, 280, 290 и 300 нм. Температуру термостата колонки варьировали от 35 до 80°C. Объем пробы составлял от 2 до 10 мкл.

3.3.10. Методика очистки олигонуклеотида при помощи хроматографии

Образцы исследуемых олигонуклеотидов содержат различные примеси, искажающие вид спектров компонентов гидролизата, поэтому необходима предварительная очистка исследуемого образца. На первой стадии собирали пик олигонуклеотида в процессе ионообменной хроматографии. Элюент А – 0,002 М LiClO_4 , 0,005 М Трис, 40% (об./об.) CH_3CN ; элюент Б – 0,1 М LiClO_4 , 0,025 М Трис, 40% (об./об.) CH_3CN ; скорость потока 200 мкл/мин, температура колонки 60°C, объем вводимой пробы 90 мкл. Из ~300 мкл собранной фракции удаляли избыток растворителя до объема ~40-50 мкл в потоке аргона. Полученный раствор вводили в колонку с обращенно-фазовым сорбентом и хроматографировали в следующих условиях: элюент А – вода, элюент Б – CH_3CN ; градиент от 1% до 100% CH_3CN за 3000 мкл при скорости потока 200 мкл/мин; температура колонки 60°C. Вновь собирали пик олигонуклеотида. Полностью удалив растворитель пропуская поток аргона, добавляли расчетное количество дистиллированной воды и проводили процедуру ферментативного гидролиза.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Алгоритм определения нуклеотидной последовательности в молекулах коротких олигонуклеотидов

Определение последовательности нуклеотидов в коротких олигонуклеотидах (до 10-15 оснований) до сих пор является весьма сложной задачей. Несмотря на то, что с этими веществами работают уже более 40 лет, относительно простое и экономичное решение так и не найдено. В настоящей работе предлагается алгоритм и метод определения состава и последовательности нуклеотидов в короткоцепочечных олигонуклеотидах на основе хроматографической и спектральной информации, а также обосновывается возможность реализации такого метода с использованием хроматографа "Милихром А-02".

Суть алгоритма, показанная на схеме в Приложении, заключается в следующем:

1. Образец олигонуклеотида хроматографируется на обращенно-фазовом сорбенте при $pH 2$, для пика олигонуклеотида вычисляются спектральные отношения. Определяется формула (нуклеотидный состав) олигонуклеотида по предварительно сформированной базе спектральных отношений.

2. Определяется длина исследуемого олигонуклеотида (число нуклеотидов в цепи). Для этого предлагается гидролизовать исследуемый олигонуклеотид фосфодиэстеразой для получения набора олигонуклеотидов длины n , $n-1$, $n-2$ и т.д. до мононуклеотидов. Затем реакционная смесь разделяется на колонке с ионообменником, при этом "гидролитические" олигонуклеотиды элюируются в строгом порядке увеличения их заряда и, соответственно, длины. Эта процедура в химии олигонуклеотидов хорошо известна [23, 32]. Разделение проводится при $pH \approx 7$.

3. Определяется нуклеотидная последовательность. Восстановление последовательности нуклеотидов в исходном олигонуклеотиде осуществляется путем сравнения УФ спектров соседних олигонуклеотидов – $d(N)_n$ и $d(N)_nX$, в результате которого можно идентифицировать нуклеотид X .

Сравнительный анализ спектров "гомологичных" (полученных при последовательном отщеплении мономеров с одного из концов цепи) олигонуклеотидов был бы крайне прост при отсутствии гипохромизма. В этом случае спектр каждого олигонуклеотида являлся бы суммой спектров составляющих его нуклеотидов. Поэтому перспективным представляется подбор условий хроматографического процесса, при которых гипохромизм либо отсутствует, либо крайне незначительно влияет на вид спектра. Условиями, которые могут быть изменены с целью подавления меж- и внутримолекулярных взаимодействий, вызывающих гипохромизм, являются температура, ионная сила элюента и его pH [5, 9].

Подбор оптимального температурного режима, при котором олигонуклеотиды находились бы в "расплавленном" состоянии, и их спектр соответствовал бы сумме спектров составляющих их мононуклеотидов, представляется технически сложным ввиду отсутствия в хроматографе "Миличром А-02" термостатированной кюветы. Изменение же ионной силы элюента путем изменения солевого состава, по данным литературных источников [5, 9], в большинстве случаев недостаточно эффективно. Наиболее простым и эффективным способом нам представляется варьирование pH .

4.2. Выбор и обеспечение условий для устранения гипохромизма

На основании обзора литературы было решено проводить запись спектров олигонуклеотидов в условиях pH 1-2, при котором все азотистые основания протонированы, что, как следствие, должно приводить к исчезновению гипохромизма.

Для сравнения записали спектры нуклеозидов в остановленном потоке при pH 2 в условиях псевдохроматографии (элюент - 0,024 М раствор H_3PO_4). Спектры dA , dT и dG нормировали на величину поглощения при 260 нм, спектр dC нормировали на поглощение при длине волны 280 нм (рис. 9). Полученные спектральные отношения (табл. 5) были использованы в качестве "эталонных" спектральных отношений при $pH \sim 2$ для вычисления расчетных спектров и сравнения со спектральными отношениями олигонуклеотидов.

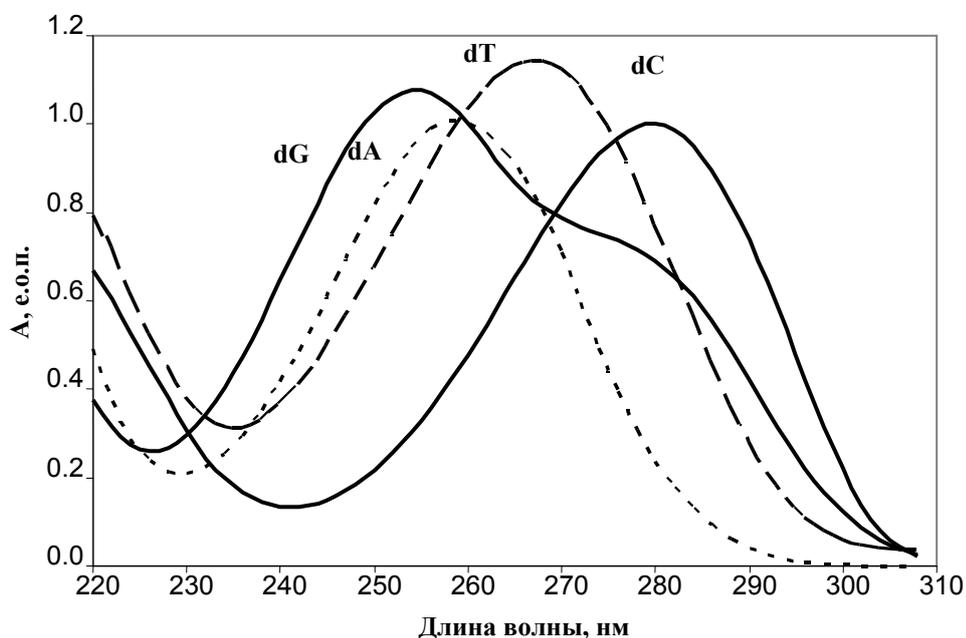


Рис. 9. Нормированные спектры водных растворов дезоксирибонуклеотидов при pH 2. Спектры dA , dT и dG нормированы на величину поглощения при 260 нм, спектр dC нормирован на величину поглощения при 280 нм.

Для проверки провели запись спектра короткого олигонуклеотида при этом же значении pH . Для данного эксперимента выбрали олиго-С, поскольку зависимость вида

спектра от pH для цитидина наиболее сильная среди всех нуклеозидов. Спектральные отношения для образца $d(pC)_5$, полученные в тех же условиях, соответствуют "эталонным" значениям спектральных отношений dC .

Таблица 5. Спектральные отношения A_λ/A_{260} нуклеозидов при pH 2.

λ , нм	A_λ/A_{260}			
	dA	$dC (A_\lambda/A_{280})$	dG	dT
240	0,42	0,13	0,65	0,33
250	0,82	0,22	1,03	0,65
260	1,00	0,48	1,00	1,00
270	0,71	0,82	0,79	1,09
280	0,23	1,00	0,69	0,74
300	0,00	0,22	0,12	0,03

Хроматографию олигонуклеотидов на обращенно-фазовых сорбентах проводят при градиентном элюировании, когда доля сильного элюента в ходе анализа постепенно увеличивается. В качестве сильного компонента подвижной фазы чаще всего используют CH_3CN . Поэтому для сравнения спектров необходимо установить, вызывает ли изменение доли ацетонитрила в растворе изменение спектральных отношений олигонуклеотидов.

Для этого записали спектр образца $d(pC)_5$ в условиях псевдохроматографии с различным содержанием CH_3CN в элюенте (0-80% с шагом в 20%). Спектральные отношения для этого образца олигонуклеотида, вычисленные для каждого случая, отличаются друг от друга не более чем на 0,03, что не превышает аттестованного значения погрешности спектральных отношений для хроматографа "Милихром А-02" [30].

Таким образом, было показано, что спектр короткого олигонуклеотида при pH 2 соответствует сумме спектров составляющих его мононуклеотидов и не зависит от содержания CH_3CN в элюенте в интервале от 0 до 80% по объему.

Ионообменная хроматография олигонуклеотидов, как следует из литературного обзора, проводится при pH , близком к нейтральному. Поэтому для получения "правильной" спектральной информации в процессе ионообменной хроматографии целесообразным представляется постколоночное изменение кислотности элюата до pH 2. Для проверки технической возможности этого подхода была реализована следующая схема (рис. 10): колонку присоединяли к кювете спектрофотометра через тройник, а к боковому входу тройника подключали градиентный насос шприцевого типа, подающий раствор кислоты для создания $pH \sim 1-2$. Элюат разбавлялся 1 М раствором $HClO_4$, подаваемым со скоростью 20 мкл/мин при скорости элюции 100 мкл/мин. Данный режим после

смешивания потоков обеспечивал на входе в кювету pH 1,9 (по показаниям pH -метра). Качество смешивания элюата с раствором кислоты контролировали хроматографически.

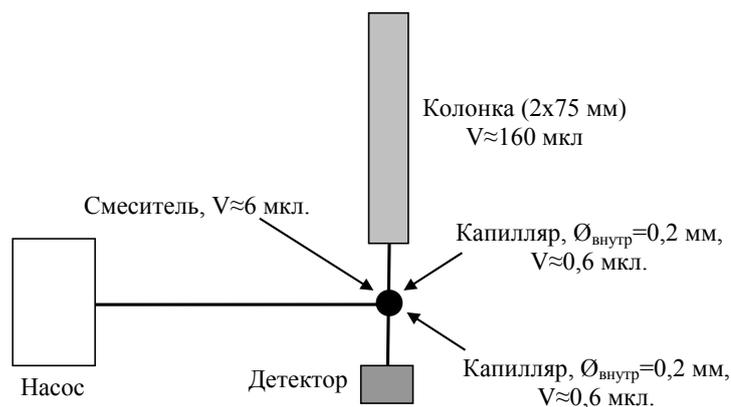


Рис. 10. Схема постколоночного изменения pH элюата при хроматографии.

В данных условиях хроматографировали образец $d(pC)_5$, хроматограммы без изменения pH элюата и с подкислением до pH 2 приведены на рис. 11.

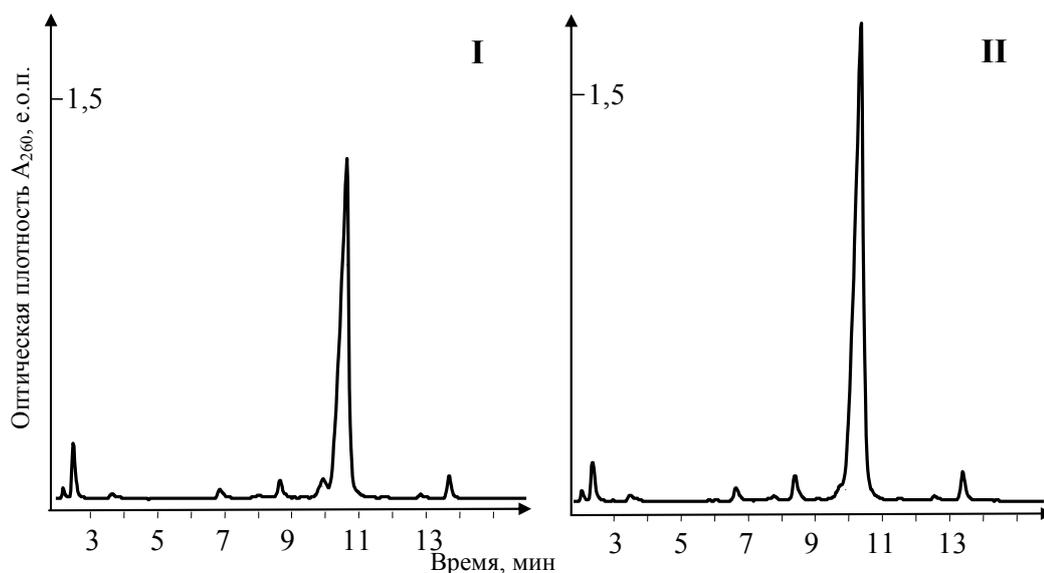


Рис. 11. Хроматографические пики олигонуклеотида $d(pC)_5$ без постколоночного добавления кислоты (I) и с добавлением кислоты (II). Колонка (2×75 мм) с ProntoSIL 120-5-C18 AQ; элюент А – $[0,1 \text{ M N[Et]}_3 - \text{HOAc}]$ (pH 5,5), элюент Б – $[\text{CH}_3\text{CN} - \text{элюент А}] = (50:50)$ по объему; градиент: от 10 до 30% Б за 15 мин; скорость потока 100 мкл/мин; детектор: 240, 250, 260, 270, 280, 300 нм (показано поглощение при 260 нм); температура колонки 40°C . Проба: раствор $d(pC)_5$ в воде, объем пробы 5 мкл. Раствор для постколоночного изменения pH элюата: 1 M HClO_4 , скорость потока 20 мкл/мин.

Добавление кислоты после колонки должно вызывать уширение пиков, причем соотношение ширины пиков без добавления кислоты и с добавлением должно соответствовать соотношению суммарных скоростей потока в первом и во втором случае соответственно (в нашем случае это соотношение составляет $1/1,2$). Полуширина пика олигонуклеотида при хроматографии без постколоночного изменения pH элюата

составляет 30 мкл (0,33 мин). Из соотношения скоростей потока следует, что при пост-колоночном добавлении кислоты полуширина пика будет составлять $30 \cdot 1,2 = 36$ мкл. Именно такую полуширину пика и наблюдали во втором случае, из чего сделали вывод, что при данном способе изменения pH элюата смешивание растворов на входе в кювету детектора осуществляется достаточно хорошо, необходимости в установке дополнительного смесителя нет [34, 35]. Спектральные отношения для пиков с изменением и без изменения pH элюата, как и следовало ожидать, отличаются значительно (см. табл. 6). Спектральные отношения олигонуклеотида $p(C)_5$ при $pH \sim 2$ в пределах установленной погрешности $\Delta = \pm 0,03$ соответствуют спектральным отношениям нуклеозида dC .

Таблица 6. Спектральные отношения A_λ/A_{280} для dC и для $p(dC)_5$ при различных значениях pH .

pH	Вещество	A_{240}/A_{280}	A_{250}/A_{280}	A_{260}/A_{280}	A_{270}/A_{280}	A_{300}/A_{280}
$pH 5,5$	$p(C)_5$	0,87	0,80	0,94	1,16	0,07
	dC	0,80	0,77	0,90	0,71	0,03
$pH 2,0$	$p(C)_5$	0,12	0,22	0,47	0,80	0,22
	dC	0,13	0,22	0,48	0,82	0,22

Таким образом, нами было показано, что при подкислении раствора до $pH 2$ спектр короткого олигонуклеотида соответствует сумме спектров составляющих его нуклеотидов и показана техническая возможность постколоночного изменения pH элюента.

4.3. Проверка применимости предложенного метода идентификации по УФ спектру для длинных олигонуклеотидов

Известно, что с увеличением длины олигонуклеотида вследствие усиливающихся стекнинг-взаимодействий возрастает и гипохромизм [5]. Поэтому было важно выяснить, исчезают ли полностью стекнинг-взаимодействия в молекулах более длинных олигонуклеотидов при выбранном $pH 2$. Для этого записывали спектр раствора $d(pA)_{20}$ при $pH 2$ в режиме псевдохроматографии. Был получен пик с очень высоким уровнем "шума" (рис. 12). Спектр раствора этого олигонуклеотида, записанный при $pH 2$ при прямом вводе образца в кювету спектрофотометра, не совпадает со спектром аденозина (рис. 13).

Подобный вид спектра раствора $p(dA)_{20}$, и, в частности, – наличие поглощения при длинах волн более 300 нм, предположительно, может указывать на образование микро-частиц в растворе [36, 37]. Литературные данные свидетельствуют, что в кислой среде образуются агрегаты молекул олигонуклеотида, в частности, двухцепочечные спирали [9]. Их возникновение, по-видимому, связано с образованием межмолекулярных водородных связей с участием протонированных азотистых оснований. Агрегаты такого типа могут

разрушаться в присутствии ПАВ или ион-парных агентов. В первом случае – из-за "гидрофобных" взаимодействий молекул олигонуклеотида с молекулами ПАВ, во втором случае – из-за "блокирования" ион-парным агентом взаимодействия между диполями.

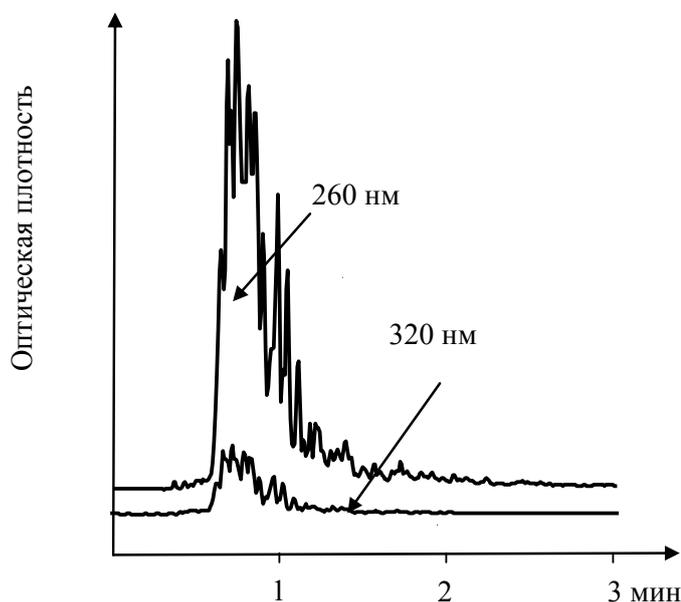


Рис. 12. Псевдохроматографические "пики" раствора образца $d(pA)_{20}$ при $pH 2$.

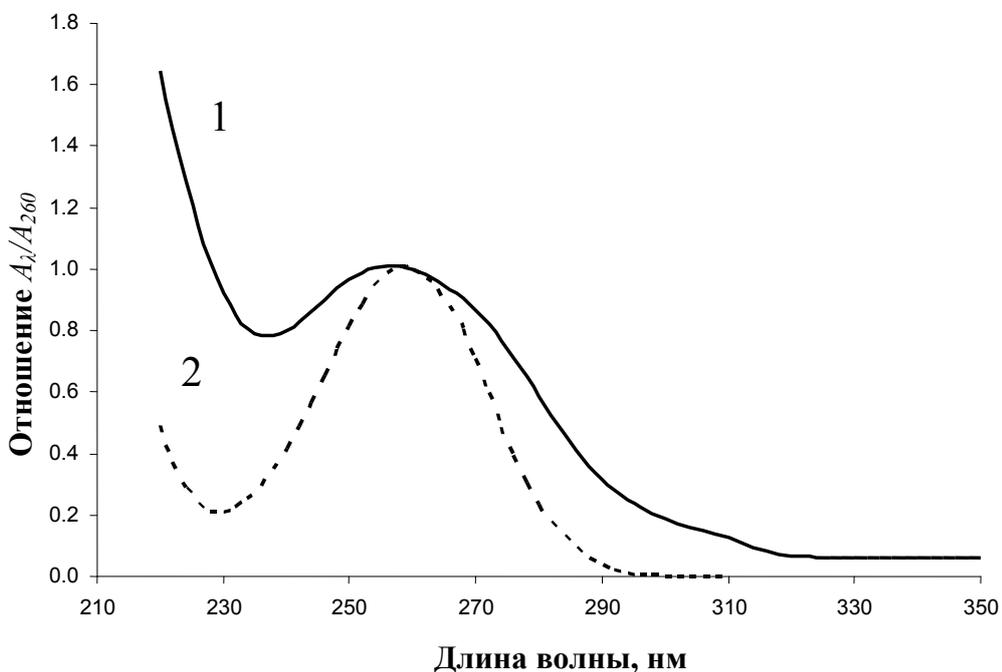


Рис. 13. Нормированные спектры: 1 – раствора олигонуклеотида $d(pA)_{20}$,
2 – раствора аденозина при $pH 2$.

Для того чтобы препятствовать образованию агрегатов, применяли $LiClO_4$ в концентрации 1 M, бромид цетилтриметиламмония в качестве ПАВ с массовой концентрацией 0,1%, сульфат трибутиламмония в качестве ион-парного агента в концентрации

0,01 М, трифторацетат трибутиламмония в качестве двойного ион-парного агента в концентрации 0,01 М. Во всех случаях наблюдали вид "пика", приведенный на рис. 12.

Таким образом, показано, что предложенный метод с постколоночным изменением pH применим для идентификации по УФ спектру только коротких олигонуклеотидов. Для относительно длинных олигонуклеотидов, содержащих порядка 20 мономерных звеньев, предложенный вариант метода неприменим вследствие возможности агрегации их молекул в кислом растворе.

4.4. Исследование влияния условий хроматографического процесса на ионообменную хроматографию олигонуклеотидов

Было показано, что спектры олигонуклеотидов длиной 20 и более оснований не могут быть записаны в области низких значений pH в результате образования кислотонерастворимых агрегатов молекул. Поэтому дальнейшие эксперименты проводили для олигонуклеотидов длиной не более 10-12 оснований. Для оптимизации ИО ВЭЖХ были выбраны олигонуклеотиды $(pT)_5$ и $r(pA)_{12}$.

Оптимизация ИО ВЭЖХ может проводиться при помощи варьирования состава элюентов, температуры колонки, скорости элюции. На примере олигонуклеотидов $(pT)_5$ и $r(pA)_{12}$ были получены зависимости удерживания и полуширины хроматографического пика олигонуклеотидов при градиентном элюировании от температуры, объемной доли ацетонитрила в подвижной фазе и концентрации соли ($LiClO_4$) в элюенте **Б** при постоянной его концентрации в элюенте **А**. Остальные хроматографические параметры указаны в "Экспериментальной части". Данные представлены в табл. 7:

Таблица 7. Зависимость объемов удерживания (V_R) олигонуклеотидов $r(pA)_{12}$ и $(pT)_5$ и ширины хроматографических пиков на половине высоты ($\omega_{1/2}$) при градиентном элюировании от концентрации соли в элюенте "Б", от содержания ацетонитрила в элюентах и от температуры колонки. Колонка (2x75 мм) с Диасфер-250 ПА.

Хроматографические условия		$r(pA)_{12}$		$(pT)_5$	
		V_R , мкл	$\omega_{1/2}$, мкл	V_R , мкл	$\omega_{1/2}$, мкл
Содержание $LiClO_4$ в элюенте "Б" (моль/л)	0,15	2096	43,7	1128	42,3
	0,3	1404	28,7	970	25,3
	0,6	959	16,1	890	14
Доля ацетонитрила в элюентах (об. %)	0	2073	66,6	2111	145,6
	10	1404	28,7	970	25,3
	20	870	15,2	-	-
Температура колонки (°C)	35	1662	32,8	913	28
	45	1919	36,1	1018	28,6
	55	2182	42,4	1130	32
	65	2453	49,4	1266	33,3
	75	2729	53,7	-	-

Можно видеть, что чем больше удерживание олигонуклеотида, тем шире его пик. Для вычисления правильных спектральных отношений необходимо получать неперекрывающиеся друг с другом хроматографические пики. Поэтому можно сделать вывод, что для лучшего разделения различных олигонуклеотидов длиной до 10-12 мономерных звеньев необходимо выбрать возможно меньшую концентрацию LiClO_4 в элюенте "Б". Оптимальную температуру также можно выбрать из соображения оптимального разделения пиков, а также руководствуясь тем фактом, что при более высокой температуре олигонуклеотидные цепочки будут находиться в "расплавленном" состоянии, то есть возможный вклад стерических факторов в удерживание будет минимален.

Уменьшение удерживания при увеличении концентрации CH_3CN можно объяснить тем, что на данном сорбенте в указанных условиях олигонуклеотиды удерживаются помимо основного, ионообменного, механизма по "побочному", обращенно-фазовому, механизму. Поэтому необходимо выбрать такую концентрацию CH_3CN в элюентах, при которой обращенно-фазовый механизм не будет вносить вклада в удерживание.

В качестве наиболее простого и понятного способа оптимизации в данном случае был выбран хроматографический эксперимент со смесью мононуклеотидов. Раствор смеси дезоксирибонуклеотидов с концентрациями ~ 1 мг/мл хроматографировали при разном содержании CH_3CN в элюентах. Из хроматограмм, приведенных на рис. 14, можно видеть, что в отсутствие CH_3CN в элюентах нуклеотиды разделяются между собой, хотя их молекулы имеют одинаковый заряд. Это свидетельствует в пользу возможности смешанного механизма удерживания на данном ионообменном сорбенте. При увеличении концентрации CH_3CN в подвижной фазе до 40% нуклеотиды элюируются одним пиком.

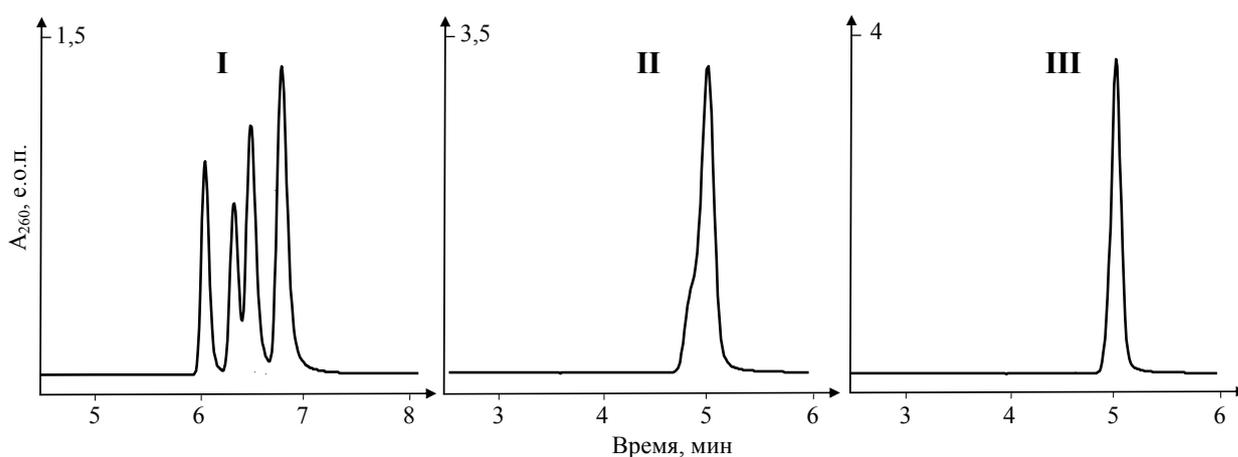


Рис. 14. Хроматограммы раствора смеси четырех нуклеотидов (по ~ 1 мг/мл) при различном содержании CH_3CN в подвижной фазе: **I** – 0%, **II** – 20%, **III** – 40%. Колонка (2x75 мм) с Диасфер-250 ПА. Элюент **A** – [0,005 мМ Трис- HClO_4 (pH 7,4), 0,002 М LiClO_4 , CH_3CN X% (об./об.)], элюент **B** – [0,025 мМ Трис- HClO_4 (pH 7,4), 0,1 М LiClO_4 , CH_3CN X% (об./об.)]; градиент: от 0 до 100% **B** за 20 мин; скорость потока 200 мкл/мин; детектор: 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 нм (показано поглощение при 260 нм); температура колонки 80°C . Объем пробы 4 мкл.

Анализы ФДЭ-гидролизата олигонуклеотида $d(pA)_{10}$, показали: чем длиннее олигонуклеотид, тем сильнее его удерживание при повышении температуры (рис. 15). Можно полагать, что для более длинных олигонуклеотидов стерические факторы играют бóльшую роль при удерживании на используемом сорбенте. Структурирование не позволяет молекуле удерживаться на сорбенте одновременно всеми "активными центрами", что приводит к уменьшению удерживания. При повышении температуры внутренняя структура разрушается. Поэтому целесообразно хроматографировать смеси "гомологичных" олигонуклеотидов (например, фосфодиэстеразного гидролизата индивидуального олигонуклеотида) при повышенной температуре.

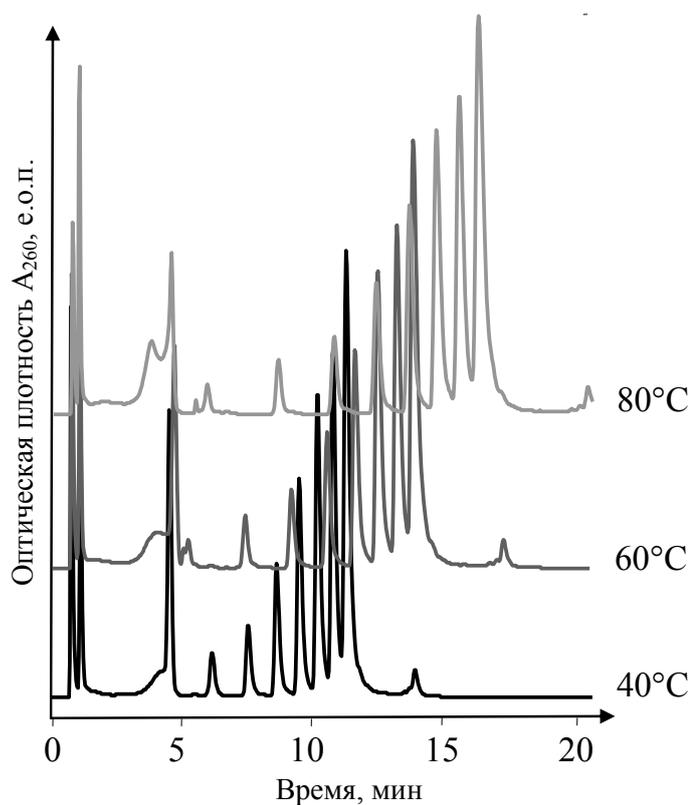


Рис. 15. Хроматограммы фосфодиэстеразного гидролизата $p(dA)_{10}$ при различных температурах. Колонка (2x75 мм) с Диасфер-250 ПА. Элюент **А** — [0,005 мМ Трис-НСlO₄ (pH 7,4), 0,002 М LiClO₄, CH₃CN 40 % (об./об.)], элюент **Б** — [0,025 мМ Трис-НСlO₄ (pH 7,4), 0,1 М LiClO₄, CH₃CN 40 % (об./об.)]; градиент: от 0 до 100% **Б** за 20 мин; скорость потока 200 мкл/мин; детектор: 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 нм (показано поглощение при 260 нм). Объем пробы 10 мкл.

На образце ФДЭ-гидролизата $p(dA)_{10}$ также показано, что скорость потока в диапазоне от 50 до 200 мкл/мин практически не влияет на разрешение пиков на хроматограмме, поэтому в качестве оптимальной для проведения экспериментов была выбрана скорость элюции 200 мкл/мин, что сокращает время анализа. Данные приведены в табл. 8.

Таким образом, по результатам исследований были выбраны следующие условия ионообменной хроматографии: элюент **А** — [0,002 М LiClO₄ в водном буфере 0,005 М Трис-НСl (pH 7,3)]:CH₃CN=(60:40); элюент **Б** — [0,1 М LiClO₄ в водном буфере 0,025 М

Трис-НCl (pH 7,3)]:CH₃CN=(60:40); скорость потока подвижной фазы 200 мкл/мин; температура термостата колонки 80°C; объем вводимой в колонку пробы 10 мкл; градиентное элюирование от 0% до 100% Б за 4000 мкл. Соответственно, скорость потока кислоты, добавляемой для постколоночной замены pH элюата, установили 40 мкл/мин.

Таблица 8. Зависимость ширины хроматографических пиков олигонуклеотидов на половине высоты ($\omega_{1/2}$) при градиентном элюировании от скорости потока. Колонка (2x75 мм) с Диасфер-250 ПА.

№ пика	Олигонуклеотид	Полуширина пика $\omega_{1/2}$, мкл.		
		50 мкл/мин	100 мкл/мин	200 мкл/мин
1	$p(dA)_{10}$	56,8	58,5	68,2
2	$p(dA)_9$	48,0	50,1	59,2
3	$p(dA)_8$	44,4	46,9	55,6
4	$p(dA)_7$	39,8	42,8	53,1
5	$p(dA)_6$	35,1	39,4	52,4

В рамках данной работы испытывали новый ионооб-менный сорбент "Диасфер-250 ПА" как перспективную неподвижную фазу для анализа олигонуклеотидов. Сорбент был синтезирован в ЗАО "БиоХимМак СТ" по оригинальной методике и представляет собой полистирол, сшитый дивинилбензолом, содержащий четвертичные аммониевые группы. Показано, что сорбент пригоден для хроматографирования в режиме ИО ВЭЖХ гомо- и гетероолигонуклеотидов длиной до 20 оснований, отличающихся по длине на одно мономерное звено ($l_{max}=20$).

4.5. Ферментативный гидролиз олигонуклеотидов фосфодиэстеразой

Для получения из олигонуклеотида длиной n мономерных звеньев полного набора "гомологичных" олигонуклеотидов длиной $n-1$, $n-2$ и т.д. использовали очищенный фермент 5'-фосфодиэстеразу I змеиного яда *Crotalus Atrox*. Очистка фермента описана в п. 3.3.5. Экспериментальной части.

Исследовали влияние условий хранения раствора фермента на его активность показало, что активность в разбавленном водном растворе (0,02 мг/мл) при +3°C падает вплоть до полного ее исчезновения примерно через 7 суток, а при хранении концентрированного (15 мг/мл) раствора в замороженном состоянии (-18°C) активность фермента оставалась неизменной на протяжении месяца и более.

Основным требованием для процедуры гидролиза является получение из анализируемого олигонуклеотида смеси олигонуклеотидов длиной n , $n-1$, $n-2$ и т.д. в сопоставимых концентрациях за приемлемое время. Для оптимизации известной методики гидролиза олигонуклеотидов ФДЭ [38, 39] провели кинетический эксперимент: 200 мкл $\sim 1 \cdot 10^{-5}$ М раствора $p(dA)_{10}$ гидролизовали при 37°C путем добавления 20 мкл раствора

фермента с концентрацией 2 мг/мл. Из реакционной смеси через определенные промежутки времени отбирали аликвоты по 20 мкл и хроматографировали их в режиме ИО ВЭЖХ. Изменение содержания в растворе исходного олигонуклеотида и получаемых из него более коротких фрагментов в зависимости от времени показано на рис. 16.

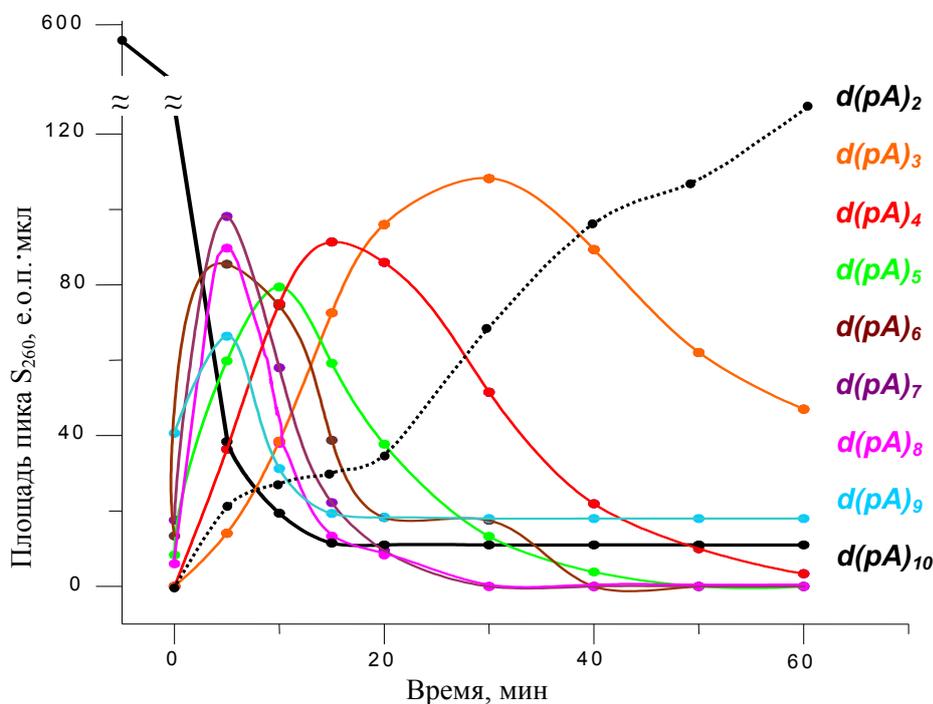


Рис. 16. Зависимость содержания продуктов гидролиза $d(pA)_{10}$ в реакционной смеси (площади пиков S_{260}) от времени.

Можно видеть, что содержание в смеси олигомеров длиной от 5 до 9 нуклеотидных звеньев максимально в первые 15-20 минут протекания реакции, а более коротких полимеров – через 30 минут после начала реакции. Также можно видеть, что содержание диаденилата ($pApA$) со временем лишь возрастает, что может свидетельствовать о низкой активности фермента по отношению к олигонуклеотидам-димерам.

Для проведения процедуры подтверждения состава олигонуклеотида необходимо иметь в растворе полный набор его фрагментов и проводить процедуру гидролиза за возможно меньшее время. Поэтому был проведен гидролиз декаолигоаденилата более концентрированным (13 мг/мл) раствором ФДЭ. Аликвоты по 20 мкл из реакционной смеси отбирали через <1, 2, 5, 15 и 30 минут после начала реакции, затем все аликвоты смешивали и полученный раствор хроматографировали. Был получен гидролизат с содержанием всех олигонуклеотидов-предшественников в сопоставимых концентрациях; его хроматограмма представлена на рис. 17.

4.6. Проверка пригодности метода

После разработки отдельных стадий пригодность всего метода проверили на образце гетероолигонуклеотида $pApCpGpCpTpApGpTpApC$ (олиго-10). Первая стадия подтверж-

дения состава – вычисление спектральных отношений для пика олигонуклеотида при хроматографировании с многоволновым детектированием на обращенно-фазовом сорбенте (методика п. 3.3.8 Экспериментальной части) и сравнение их с расчетными. Это необходимо для проверки чистоты образца перед проведением дальнейших анализов. Данная методика применима и отдельно для подтверждения состава олигонуклеотида.

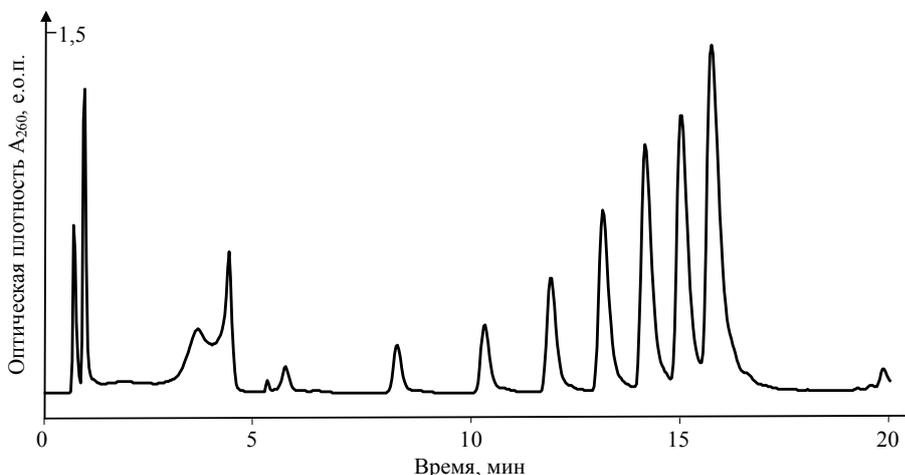


Рис. 17. Хроматограмма ФДЭ-гидролизата $p(dA)_{10}$. Колонка 2x75 мм с Диасфер-250 ПА; элюент **А** – [0,005 мМ Трис-НСlO₄ (pH 7,4), 0,002 М LiClO₄, CH₃CN 40 % (об./об.)], элюент **Б** – [0,025 мМ Трис-НСlO₄ (pH 7,4), 0,1 М LiClO₄, CH₃CN 40 % (об./об.)]; градиент: от 0 до 100% **Б** за 20 мин; поток 200 мкл/мин; детектор: 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 нм (показано поглощение при 260 нм); температура 80°C. Объем пробы 10 мкл.

Образец олигонуклеотида олиго-10 хроматографировали в указанных выше условиях, хроматограмма приведена на рис. 18. Спектральные отношения, вычисленные для пика олигонуклеотида, соответствуют расчетным в пределах погрешности $\Delta = \pm 0,03$ (см. табл. 9), что подтверждает соответствие нуклеотидного состава номинальному.

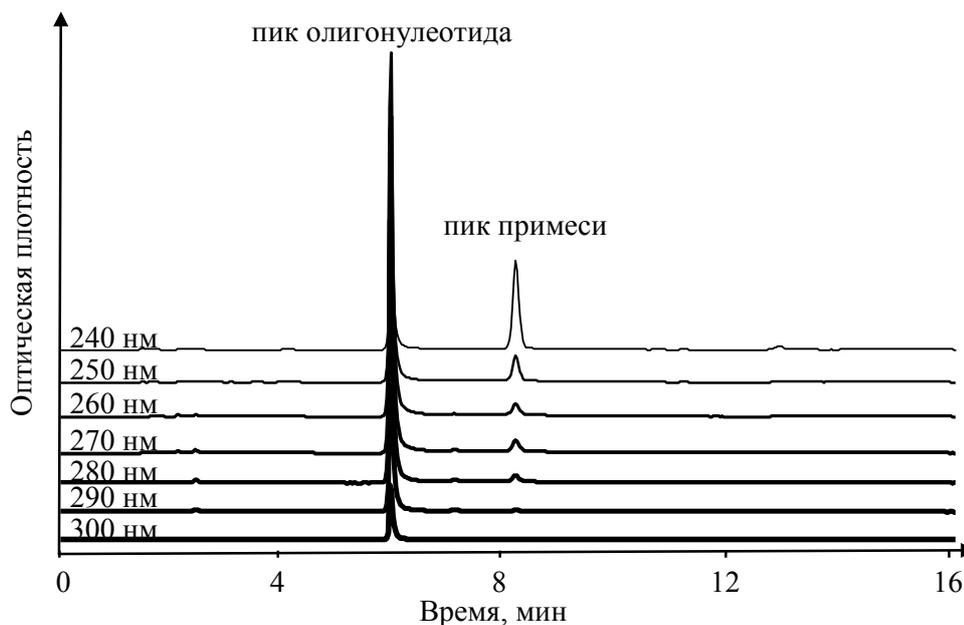


Рис. 18. Хроматограмма образца олиго-10 на обращенно-фазовом сорбенте при pH 2.

Таблица 9. Спектральные отношения для пика олигонуклеотида при ОФ ВЭЖХ при pH 2.

		Спектральное отношение					
		$R_{240/260}$	$R_{250/260}$	$R_{270/260}$	$R_{280/260}$	$R_{290/260}$	$R_{300/260}$
олиго-10	эксперимент	0,42	0,76	0,97	0,77	0,44	0,13
	расчет	0,43	0,77	0,98	0,76	0,43	0,12

Олигонуклеотид гидролизовали ФДЭ по методике п. 3.3.6. Экспериментальной части. Полученный гидролизат хроматографировали на ионообменном сорбенте с постколоночным подкислением элюата. Хроматограмма приведена на рис. 19.

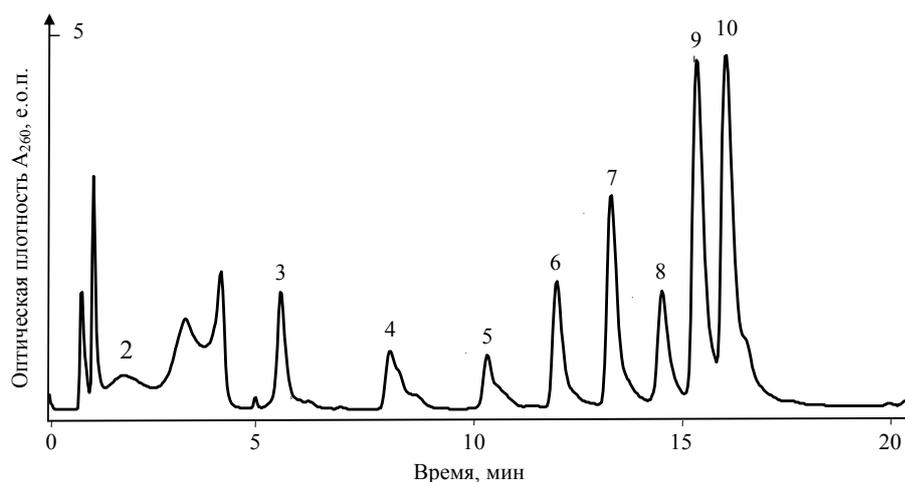


Рис. 19. Хроматограмма ФДЭ-гидролизата олиго-10. Цифрами отмечены пики олигонуклеотидов соответствующей длины. Условия разделения в подписи к рис. 17. Скорость постколоночного добавления кислоты 40 мкл/мин.

Можно видеть, что пики олигонуклеотидов перекрываются с меньшими пиками неизвестных примесей. Спектральные отношения, вычисленные по данной хроматограмме, значительно расходятся с расчетными. Было решено очистить исходный олигонуклеотид от примесей по методике п. 3.3.10 (ИО ВЭЖХ). Раствор очищенного олигонуклеотида хроматографировали методом ОФ ВЭЖХ для удаления $LiClO_4$ и $Tris-HClO_4$, которые, как было показано нами экспериментально, полностью ингибируют активность ФДЭ.

Хроматограмма гидролизата очищенного образца олигонуклеотида олиго-10 приведена на рис. 20). На данной хроматограмме пики характеризуются значительно меньшей асимметрией, что свидетельствует в пользу необходимости предварительной очистки олигонуклеотида. Практически все спектральные отношения, вычисленные по данной хроматограмме, совпадают с расчетными в пределах погрешности $\pm 0,03$ (табл. 10).

Исключение составляет спектральное отношение A_{300}/A_{260} - оно расходится с расчетным несколько больше. Такое расхождение можно связать с тем, что поглощение на длине волны 300 нм для олигонуклеотидов мало и, соответственно, площадь пика измеряется с

большей относительной погрешностью, что влечет за собой возрастание погрешности вычисления соответствующего спектрального отношения.

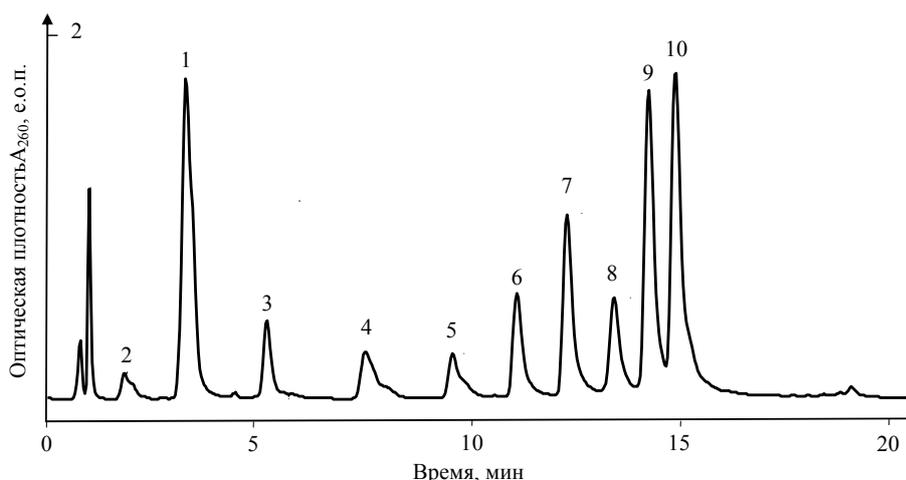


Рис. 20. Хроматограмма ФДЭ-гидролизата олиго-10. Цифрами отмечены пики олигонуклеотидов соответствующей длины (1 – суммарный пик мононуклеотидов). Условия разделения в подписи к рис. 17.

Таблица 10. Экспериментальные и расчетные спектральные отношения для продуктов ФДЭ-гидролизата декаолигонуклеотида. Погрешность вычисления спектральных отношений $\pm 0,03$.

Дезоксириболигонуклеотид		Спектральное отношение					
		$R_{240/260}$	$R_{250/260}$	$R_{270/260}$	$R_{280/260}$	$R_{290/260}$	$R_{300/260}$
<i>pApCpGpCpTpApGpTpApC</i>	эксп.	0,40	0,75	0,97	0,77	0,45	0,16
	расчетн.	0,43	0,77	0,98	0,76	0,43	0,12
<i>pApCpGpCpTpApGpTpA</i>	эксп.	0,41	0,77	0,93	0,68	0,40	0,13
	расчетн.	0,44	0,79	0,93	0,68	0,37	0,09
<i>pApCpGpCpTpApGpT</i>	эксп.	0,41	0,76	0,96	0,76	0,45	0,15
	расчетн.	0,44	0,78	0,97	0,75	0,42	0,11
<i>pApCpGpCpTpApG</i>	эксп.	0,42	0,77	0,94	0,76	0,46	0,15
	расчетн.	0,45	0,80	0,95	0,75	0,44	0,12
<i>pApCpGpCpTpA</i>	эксп.	0,40	0,74	0,98	0,78	0,49	0,16
	расчетн.	0,42	0,76	0,98	0,77	0,48	0,12
<i>pApCpGpCpT</i>	эксп.	0,39	0,71	1,06	0,93	0,61	0,20
	расчетн.	0,42	0,74	1,07	0,93	0,58	0,17
<i>pApCpGpC</i>	эксп.	0,40	0,73	1,06	0,98	0,70	0,25
	расчетн.	0,43	0,76	1,06	0,97	0,67	0,19
<i>pApCpG</i>	эксп.	0,44	0,79	0,93	0,77	0,50	0,17
	расчетн.	0,47	0,82	0,93	0,76	0,47	0,13
<i>pApC</i>	эксп.	0,38	0,71	1,02	0,82	0,55	0,18
	расчетн.	0,37	0,71	1,01	0,79	0,53	0,14

Отдельно необходимо отметить тот факт, что пик динуклеотида *pApC* находится на хроматограмме левее суммарного пика мононуклеотидов. Априори можно было ожидать, что удерживание динуклеотида *pApC* будет больше, чем для мононуклеотидов, и меньше,

чем для тринуклеотида *pApCpG*. Для объяснения этого факта нами были отдельно хроматографированы в этих же условиях специально синтезированные для этой цели олигонуклеотиды *pApC* и *pApCpG*, а также смесь мононуклеотидов. Было подтверждено, что хроматографические пики отнесены верно и "аномальное" удерживание для динуклеотида в действительности имеет место. Объяснения этому явлению нами пока не предложено.

Для оценки достоверности и однозначности определения нуклеотидной последовательности по данной методике в качестве примера рассмотрим идентификацию декаолигонуклеотида олиго-10 при условии, что структура олиго-9 уже расшифрована. Можно рассчитать спектральные отношения для четырех возможных вариантов олиго-10, начинающихся с последовательности *pApCpGpCpTpApGpTpA* (табл. 11).

Таблица 11. Идентификация декаолигонуклеотида по спектральным отношениям.

Олигонуклеотид	Спектральные отношения (расчет), $\frac{A_{\lambda}}{A_{260}}$					
	$\frac{A_{240}}{A_{260}}$	$\frac{A_{250}}{A_{260}}$	$\frac{A_{270}}{A_{260}}$	$\frac{A_{280}}{A_{260}}$	$\frac{A_{290}}{A_{260}}$	$\frac{A_{300}}{A_{260}}$
<i>pApCpGpCpTpApGpTpApA</i>	0,43	0,79	0,90	0,62	0,32	0,08
<i>pApCpGpCpTpApGpTpApC</i>	0,43	0,77	0,98	0,76	0,43	0,12
<i>pApCpGpCpTpApGpTpApG</i>	0,46	0,81	0,91	0,68	0,37	0,10
<i>pApCpGpCpTpApGpTpApT</i>	0,43	0,77	0,94	0,68	0,35	0,09
Эксп. данные ($\pm 0,03$)	0,40	0,75	0,97	0,77	0,45	0,16

Как видно из таблицы, экспериментальные данные в пределах погрешности $\pm 0,03$ полностью соответствуют только одному варианту олигонуклеотида (серым выделены не совпадающие спектральные отношения). Как мы уже отмечали, данная методика имеет ограничения, обусловленные, в частности, метрологическими характеристиками детектора. Для более полной характеристики границ применимости методики необходимы более детальные исследования на большем количестве разных олигонуклеотидов.

Работа по развитию и совершенствованию предложенного метода может быть продолжена в нескольких направлениях. Одно из них – оптимизация метода для рутинного применения; определение максимальной длины анализируемого олигонуклеотида, для которой применим метод.

Другое направление – разработка методики определения состава неизвестного олигонуклеотида. Для этого очищенный образец олигонуклеотида необходимо подверг-

нуть воздействию 5'-нуклеотидазы для удаления концевой фосфатной группы. Затем ингибировать фермент и гидролизовать полученный олигонуклеотид со свободными от фосфатных групп 3'- и 5'-концами фосфодиэстеразой. Таким образом, может быть получен набор олигонуклеотидов длиной N , $N-1$, $N-2$ и т. д. до динуклеотида и концевого мономера в форме нуклеозида, который будет единственным, так как остальные отщепившиеся мономеры будут являться нуклеотидами. Вычисляя спектральные отношения для пика нуклеозида и сравнивая их с эталонными, можно определить мономер, находящийся на 5'-конце олигонуклеотида. Затем можно рассчитать спектральные отношения для всех четырех возможных динуклеотидов (к известному концевому мономеру может быть добавлено только четыре варианта мономеров-дезоксирибонуклеотидов), вычислить спектральные отношения хроматографического пика динуклеотида и идентифицировать его. Таким же образом последовательно вычисляя спектральные отношения для пиков олигонуклеотидов длиной, большей на одно мономерное звено, и сравнивая вычисленные спектральные отношения с рассчитанными теоретически, можно определить последовательность оснований в неизвестном олигонуклеотиде.

Стоит отметить, что при анализе олигонуклеотида при помощи данной методики необходимо использовать препараты ферментов высокой чистоты.

Таким образом, в результате данной работы был разработан метод подтверждения состава и нуклеотидной последовательности коротких олигонуклеотидов при помощи ВЭЖХ и УФ спектрометрии. Предложенный подход реализован на хроматографе "Милихром А-02" для олигонуклеотидов длиной до 10-12 оснований. Для подтверждения первичной структуры олигонуклеотида требуется около 10 наномоль вещества. Время анализа, включая подготовку образца и обработку результатов, не превышает 2 часов.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 02.522.12.2005, шифр № 2008-2-2.2-04-01 "Разработка технологий и выпуск опытных образцов приборных комплексов для синтеза, анализа и очистки фрагментов ДНК, РНК и их синтетических аналогов".

5. ВЫВОДЫ

1. Предложен метод подтверждения состава и нуклеотидной последовательности в молекулах синтетических дезоксирибоолигонуклеотидов на основе сочетания ВЭЖХ и УФ спектрометрии, включающий в себя:

- подтверждение состава олигонуклеотида по спектральным отношениям его хроматографического пика в режиме ОФ ВЭЖХ с многоволновой УФ детекцией;

- определение длины олигонуклеотида по числу пиков на хроматограмме его ферментативного гидролизата в режиме ионообменной ВЭЖХ-УФ;

- определение нуклеотидной последовательности путем сравнения спектральных отношений хроматографических пиков фрагментов олигонуклеотида, отличающихся на одно мономерное звено.

2. Исследовано влияние pH и ионной силы раствора на величину гипохромизма в УФ спектрах олигонуклеотидов. Показано, что для коротких олигонуклеотидов ($n \leq 10$) при pH 2 гипохромизм не наблюдается, и спектр полимера представляет собой суперпозицию спектров мономеров.

3. Разработана методика гидролиза олигонуклеотидов фосфодиэстеразой, позволяющая за 20 мин получить смесь фрагментов, отличающихся по длине на одно мономерное звено, в сопоставимых концентрациях.

4. Исследовано влияние состава подвижной фазы, температуры, скорости потока на ионообменную ВЭЖХ олигонуклеотидов. Разработана методика разделения гидролизатов коротких ($n \leq 10$) олигонуклеотидов с разрешением $R_{(i+1, i)} \geq 1$; время анализа 25 мин.

5. Показана техническая возможность постколоночного изменения pH подвижной фазы в потоке для *on-line*-определения состава олигонуклеотидов по их УФ спектрам.

6. Метод реализован на микроколоночном хроматографе "Милихром А-02" и апробирован для гомо- и гетеродезоксирибоолигонуклеотидов длиной до 10 мономерных звеньев.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Браун, Д., Флойд, А., Сейнзбери, М. Спектроскопия органических веществ./ М.: Мир – 1992 – с 13-17
2. Штерн, Э., Тиммонс, К. Электронная абсорбция в органической химии./ М.: Мир – 1974 – 295 с.
3. Волкова, О. С., Кириллова, Л. Н., Кузнецова, Е. В. Практикум по физической химии. Спектрофотометрия. (Методическое пособие)/ Новосибирск: НГУ – 2005 – 42 с.
4. Досон, Р., Элиот, Д., Элиот, У., Джонс, К. Справочник биохимика. Перевод с англ. Друцы, В. Л., Королевой, О. В./ М.: Мир – 1991 – 540 с.
5. Михельсон, А. М. Химия нуклеотидов и нуклеозидов, пер. с англ. под ред. Прокофьева М. А./ М.: Мир – 1966 – 668 с.
6. Mergny, J.-L., Li, J., Lacroix, L., Amrane, S. and Chaires, J. B. Thermal difference spectra: a specific signature for nucleic acid structures./ *Nucleic Acids Research* – 2005. – Vol. 33, No. 16 – e 138.
7. Davis, T. M., McFail-Isom, L., Keane, E., Williams, L. D. Melting of DNA hairpin without Hyperchromism./ *Biochemistry* – 1998 – No. 37 – pp 6975-6978.
8. Aoyagi, S., Inoue, Y. Oligonucleotide studies./ *The Journal of Biological Chemistry*. – 1968 – Vol. 243, No. 3 – pp 514-520.
9. Зенгер, В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот./ М.: Мир – 1987 – с 151.
10. Хубер, Л. Применение диодно-матричного детектирования в ВЭЖХ./ М.: Мир – 1993 – с 94.
11. Грачев, М. А. Микроспектрофотометр МСФП-1 и его применение для микроколоночной хроматографии и спектрального анализа олигонуклеотидов./ *Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот*. – М.: Наука, 1973 – с. 104-121.
12. Polster, J., Sauerwald, N., Feucht, W., Treutter, D. New methods for spectrometric peak purity analysis in chromatography./ *Journal of Chromatography A* – 1998 – No. 800 – pp 121-133.
13. Bogomolov, A., McBrien, M. Mutual peak matching in a series of HPLC-DAD mixture analyses./ *Analitica Chimica Acta* – 2003 – No. 490 – pp 41-58.
14. Tataurov, A. V., You, Y., Owczarzy, R. Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded DNAs./ *Biophysical Chemistry* – 2008 – No. 133 – pp 66-70.
15. Tataurov, A. V. at al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers./ *Nucleic Acids Research* – 2008 – July 1; 36(Web Server issue): W163–W169.
16. Cavaluzzi, M. J., Borer, P. N. Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA./ *Nucleic Acids Research* – 2004 – Vol. 32, No. 1 – e13.
17. Peyret, N. Prediction of nucleic acid hybridization: parameters and algorithms. Dissertation for the doctor of philosophy degree./ N. Peyret. Detroit, Michigan, Wayne State University. – Detroit, 2000 – pp 1–327.
18. Mergny, J.-L. at al. Thermal difference spectra: a specific signature for nucleic acid structures./ *Nucleic Acids Research* – 2005 – Vol. 33, No. 16 – e138.
19. Stepanyugin, A. V. at al. Influence of methylation and interactions with amino acid carboxylic group on UV spectra of purine nucleotide bases and nucleosides in dimethylsulfoxide./ *Biopolymers and cell* – 2000 – No.16 (5) – pp 384-402.
20. Stepanyugin, A. V. at al. UV spectra of pyrimidine bases and nucleosides in the context of methylsubstitution and interaction with amino acid carboxylic group./ *Biopolymers and cell* – 2003 – No. 19 (1) – pp 43-63.
21. High Performance Liquid Chromatography: fundamental principles and practical. Edition by Lough, W. and Wainer, I./ Blackie Academic – 1996 – pp 52-70.
22. Схунмакерс, П. (пер. с англ. под ред. д. х. н. Даванкова В. А.) Оптимизация селективности в хроматографии./ М.: Мир – 1989 – 399 с.
23. Остерман, Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот./ М.: Наука – 1985 – с. 321-326.
24. Кокотов, Ю. А. Иониты и ионный обмен./ Ленинград: Химия – 1980 – с 35, 69.
25. The DNAPac columns set the industry standard for oligonucleotide purity checks, fast screenings, and purification. – USA:Dionex Corporation, – 1998-2010./ Режим доступа: <http://www.dionex.com>

26. Földes-Papp, Z., Birich-Hirschfeld, E. et al. Efficiency of oligonucleotide synthesis evaluated by ion-exchange high-performance liquid chromatography./ *J. Chromatogr. A.* – 1995. – V.706. – pp 405-419.
27. Ленинджер, А. Биохимия: молекулярные основы структуры и функций клетки./ М.: Мир – 1974 – с 300.
28. Кузьмин, С. В., Перельройзен, М. П. Дифференциальный спектральный метод определения первичной структуры олигонуклеотидов./ Тез. докл. 3 Семинар "Использование вычислительных машин в спектроскопии молекул". Новосибирск – 1975 – с 67-68.
29. Овчинников, Ю. А. Биоорганическая химия./ М.: Просвещение – 1987 – с 307-330.
30. Vallone, P. M., Devaney, J. M., Marino, M. A., Butler, J. M.. A strategy for examining complex mixtures of deoxyoligonucleotides using ion-pair-reverse-phase high-performance liquid chromatography, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, and informatics./ *Analytical Biochemistry* – 2002 – V.304 – pp 257-265.
31. Методика "Хроматографические и спектральные параметры УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии"/ Федеральный реестр методик выполнения измерений, применяемых в сферах распространения государственного метеорологического контроля и надзора, № ФР.1.31.2003.00951.
32. Ahmed, Z., Reis, J. L. The activation and inhibition 5-nucleotidase./ *J. Biochem* – 1958 – No. 69 (3) – pp 386-386.
33. Хеншен, А., Хупе, К.-П., Лотшпайх, Ф., Вельтер, В. (пер. с англ. под ред. Березина И.В.) Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии./ М.: Мир – 1988 – с 476.
34. Scott, R. Liquid chromatography detectors./ *Chrom-Ed book series* – 108 p.
35. Исии, Д. Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную хроматографию, перевод с английского к. х. н. Соколова Д. Н./ М.: Мир – 1991 – с 24, 36.
36. Воюцкий, С. С. Курс коллоидной химии, издание 1-ое./ М.: Химия – 1974 – с 57.
37. Борен, К., Хафмен, Д. Поглощение и рассеивание света малыми частицами./ М.: Мир – 1986 – с 358-362.
38. Козлов, А. В., Ткачук, З. Ю. Изучение устойчивости различных аналогов 2',5'-олигоаденилатов к действию фосфодиэстераз./ *Биополимеры и клетка* – 1994 – т. 10 No. 1 – с 47-52.
39. Тетерина, Н. Л., Каграманова, В. К., Копылов, А. М., Богданов, А. А. Топография рРНК в рибосомах./ *Биоорганическая химия* – 1978 – т. 4 No. 3 – с 415-416.