

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2021.02.115>
УДК 577.113.6:577.322:543.51

З.Ю. Ткачук, С.М. Левченко

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ
E-mail: ztkachuk@bigmir.net

Мас-спектрометричний аналіз олігорибонуклеотидів сумарної дріжджової РНК

Представлено академіком НАН України М.А. Тукалом

Досліджено олігорибонуклеотидний склад сумарної дріжджової РНК, що входить до складу противірусного препарату широкого спектра дії Нуклекс. Для аналізу природних рибонуклеотидів використано методи рідинної хроматографії та мас-спектрометрії MALDI-Tof-Tof. У складі сумарної дріжджової РНК встановлено три основні фракції: перша — від 2 до 4 нуклеотидів, друга — від 4 до 7, третя — від 10 до 15. Зроблено висновок, що досліджувана РНК містить олігорибонуклеотиди різної довжини, а саме від 4 до 15 ланок.

Ключові слова: дріжджова РНК, рибонуклеотиди, рідинна хроматографія, мас-спектрометрія MALDI-Tof-Tof.

В усьому світі науковці значну увагу приділяють розробці лікарських препаратів на основі нуклеїнових кислот чи їх хімічно модифікованих фрагментів [1–3]. Значною перевагою фармакологічних препаратів на основі рибонуклеотидів є те, що за своєю природою вони практично не відрізняються від речовин, існуючих у природі. Проте природні РНК *in vivo* є дуже нестабільними молекулами, що призводить до їх швидкої деградації у разі потрапляння в організм і, відповідно, ускладнює їх використання як ліків у чистому вигляді. Серед можливих шляхів вирішення даної проблеми найпоширенішими є хімічні модифікації та додавання до РНК речовин, які дають можливість збільшити їх час життя в організмі, не змінюючи при цьому їх лікувальні властивості [4]. Результатом досліджень нашої лабораторії в даній галузі стала поява противірусного препарату, створеного на основі природної РНК, — Нуклекс [5]. Для більш глибокого розуміння механізмів дії даного препарату та для створення більш ефективних РНК-вмісних препаратів насамперед необхідно детально дослідити олігорибонуклеотидний склад РНК. Адже загальновідомо, що РНК залежно від їх нуклеотидної послідовності та конформації беруть участь у регуляції різноманітних функцій у клітинах живих організмів. Так, наприклад, РНК-аптамери залежно від їх довжини здатні модулювати функції білків певного типу, зв'язуючись з ними з високою афінністю та інгібуючи їх активність [6].

Цитування: Ткачук З.Ю., Левченко С.М. Мас-спектрометричний аналіз олігорибонуклеотидів сумарної дріжджової РНК. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2021. № 2. С. 115–122. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2021.02.115>

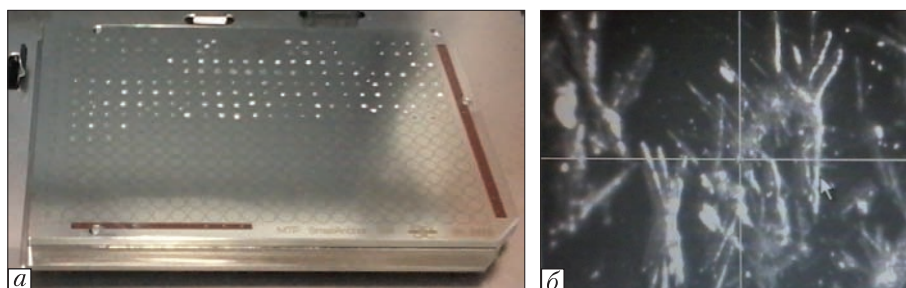


Рис. 1. Підкладка AnchorChip™ з нанесеним зразком (а) і збільшене зображення кристалізованого зразка разом з матричним реагентом (б)

Мас-спектрометрія належить до методів, які дають змогу досить швидко з високою точністю провести аналіз як самих нуклеїнових кислот, так і їх комплексів з білками та іншими лігандами [7–9]. Зокрема, найпоширенішим методом мас-спектрометрії для дослідження біополімерів (білків, пептидів, нуклеїнових кислот, олігонуклеотидів і т.д.) є MALDI-Tof-Tof (matrix-assisted laser desorption and ionisation time-of-flight/ time-of-flight mass spectrometry, часопрелітна мас-спектрометрія з матрично-активованою лазерною десорбцією/іонізацією). Однією зі значних переваг даного методу є можливість з мінімальними затратами досліджуваних речовин (0,5–2 мкл) отримати багато важливої інформації: значення молекулярної маси з високою точністю, чистоту досліджуваного зразка, ідентифікувати наявні в ньому домішки тощо. Аналіз РНК методом MALDI-Tof-Tof децю ускладнюється через певні особливості методики приготування зразків, тоді як для пептидів та білків вже існує ряд розроблених стандартних протоколів [10].

Матеріали і методи. Для досліджень використовували комерційну дріжджову РНК, яка являє собою фракцію низькомолекулярних олігорибонуклеотидів.

Розділення сумарної дріжджової РНК методом *високоєфективної рідинної хроматографії* проводили з використанням обернено-фазової колонки Source™ 5RPC 4.6/15. Для градієнтного елюювання використовували розчинники 200 мМ ТЕАА, рН 7,0/ацетонітрил (ACN). Буфер А: 200 мМ ТЕАА, буфер В: 50 % ACN і 200 мМ ТЕАА. Перед використанням усі розчини фільтрували та дегазували [11]. Сигнал детектували УФ-детектором на довжинах хвиль 254 і 280 нм. Для подальшого аналізу зразок збирали за допомогою колектора фракцій. Об'єм кожної фракції становив 1 мл.

Для визначення чистоти РНК за значенням співвідношення A_{260}/A_{280} використовували спектрофотометр NanoDrop (Thermo Scientific, США).

Вибрані фракції висушували шляхом вакуумного центрифугування при температурі 20 °С за допомогою SpeedVac™ (Thermo Scientific, США) протягом 4–5 год.

Перед нанесенням зразків для зменшення кількості іонів калію та натрію проводили процедуру знесолення за допомогою C18ZipTip (Millipore, США). Використаний протокол Millipore ZipTips для MALDI-Tof мас-спектрометрії описаний на офіційному сайті виробника (Millipore).

Зразки наносили на гідрофобний AnchorChip™ (Bruker Daltonics, Німеччина), який сприяє концентруванню зразка в центрі лунки після нанесення, що значно покращує якість сигналу.

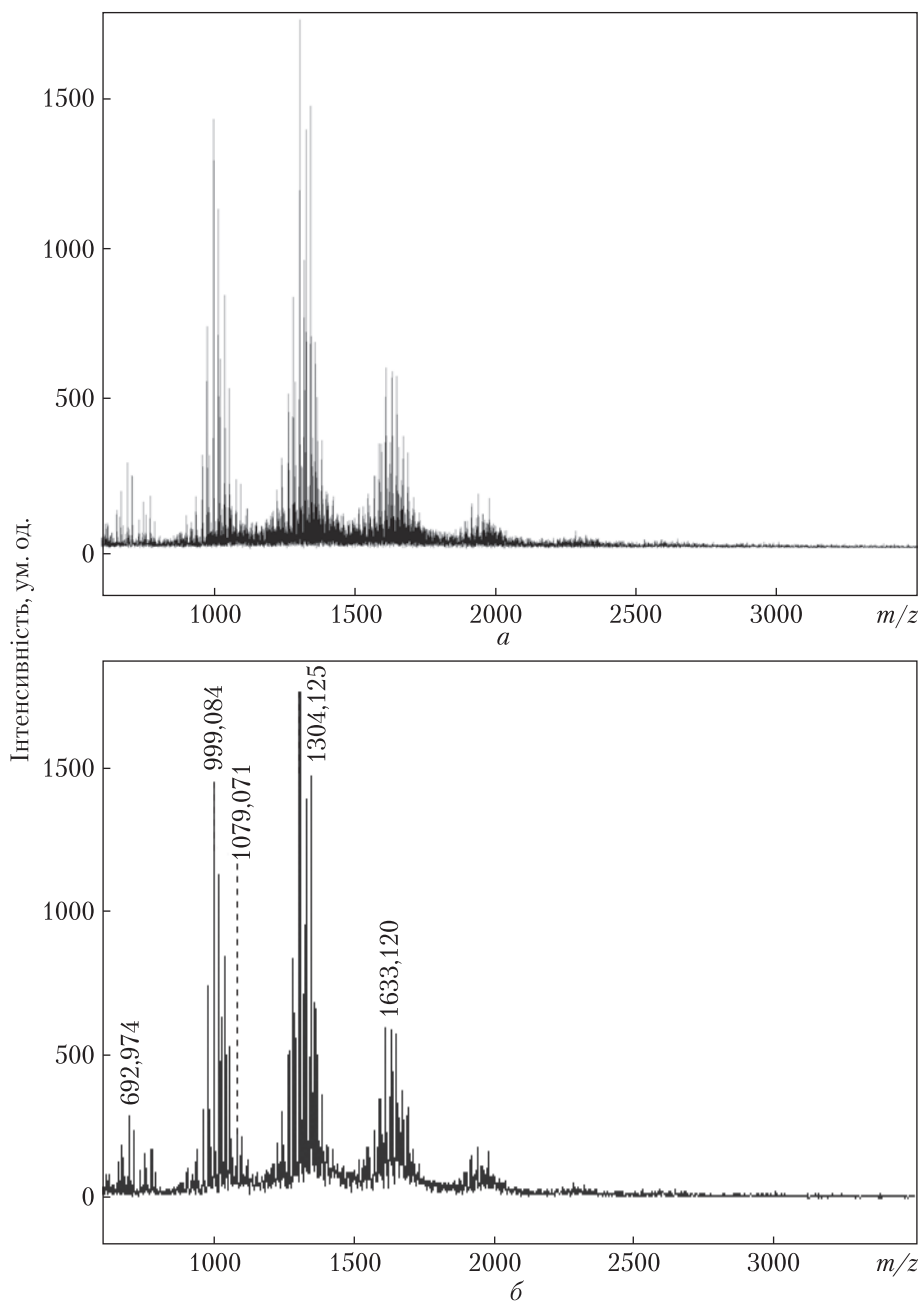


Рис. 2. MALDI-ToF-ToF мас-спектри сумарної дріжджової РНК (а) і сумарної дріжджової РНК із її попереднім знесоленням за допомогою C18ZipTip (б)

Мас-спектрометричний аналіз проводили на MALDI-ToF-ToF спектрометрі (UltrafleXtrem MALDI-ToF-ToF mass spectrometer, Bruker Daltonics, Німеччина). Паспортна точність вимірювання мас становить 0,05 %, вимірювання проводили в діапазоні 500–15 000 m/z . Застосовували H^+ -матричну іонізацію білків і олігонуклеотидів за допомогою 2',4',6'-тригідроацетофенону моногідрату (THAP, Sigma-Aldrich, США). Молекулярну масу визнача-

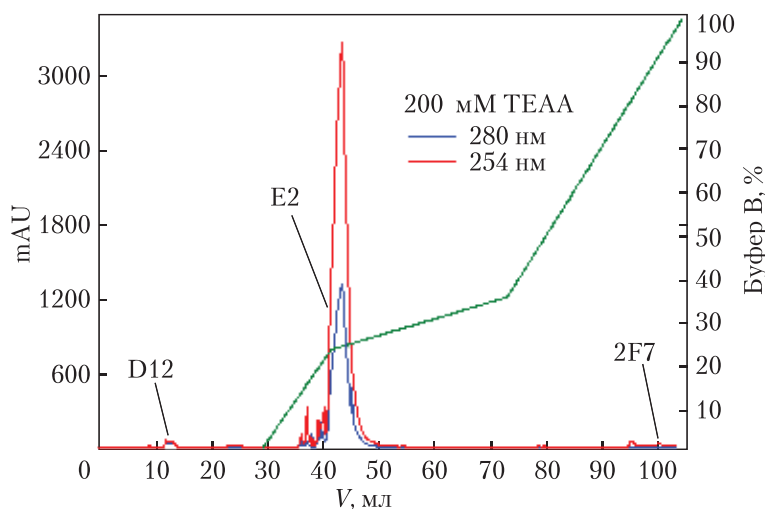


Рис. 3. Хроматограма сумарної дріжджової РНК: червона лінія — оптична густина при 254 нм, синя — при 280 нм

ли, віднімаючи від значення m/z однозарядженого іона одиницю (молекулярна маса H^+ становить 1,007 Да). Проводили калібрування приладу з використанням калібрувальних сумішей залежно від діапазону m/z OCS LMW (#217028) та OCS (#206200) від виробника мас-спектрометра (Bruker Daltonics).

Матричний реагент готували, розчиняючи 18 мг ТНАР, 5 мг цитрат амонію двоосновний в 1 мл розчину ацетонітрил : вода 50 : 50. Для нанесення брали 0,5–1 мкл суміші розчинів досліджуваного зразка й реагента (1 : 1). Використовували лінійний режим роботи часопролітного детектора. Спектри обробляли в програмі Flex Analysis 3.3.

Результати та обговорення. Значною перешкодою для отримання мас-спектрів РНК з якісним розділенням є висока здатність РНК до утворення аддуктів з іонами калію та натрію. Наявність таких аддуктів призводить до зменшення сигналу та уширення піків, що, у свою чергу, ускладнює визначення молекулярної маси олігорибонуклеотидів з високою точністю [12]. Додавання цитрату амонію двоосновного під час приготування зразків зумовлює зменшення здатності РНК утворювати комплекси з лужними металами [13]. Показано, що для ефективної іонізації олігонуклеотидів з молекулярною масою до 7 кДа найбільше підходить матриця ТНАР з додаванням цитрату амонію двоосновного [14]. Для покращення якості сигналу матричний реагент та аналіт наносили на підкладку AnchorChipTM (рис. 1, а) з гідрофобними лунками, що дає можливість концентрувати зразок в її центрі і, відповідно, забезпечує більш рівномірну кристалізацію зразка на всій поверхні, з якої детектується сигнал (див. рис. 1, б). Діаметр кристалізованого зразка становив порядку 0,3–1 мм.

Застосування даної методики для дослідження сумарної дріжджової РНК дало змогу отримати мас-спектр (рис. 2, а) достатньої інтенсивності. Спроби використання інших матриць та інших методик нанесення зразків на підкладку були менш вдалимими. Як видно з рис. 2, а отриманий мас-спектр характеризується наявністю піків в області від 600 до 2100 Да. Велика кількість піків значно утруднює аналіз даних, зокрема ідентифікацію піків, які належать власне РНК чи її аддуктам з іонами лужних металів.

Для покращення роздільної здатності мас-спектрів РНК було використано додаткову процедуру знесолення РНК перед її нанесенням на підкладку за допомогою C18ZipTip. Як і очікувалося, це дало можливість покращити якість отриманого спектра (див. рис. 2, б).

Таким чином, мас-спектр досліджуваної РНК містить шість груп піків з молекулярною масою від 600 до 2100 Да, які належать коротким олігорибонуклеотидам різного скла-

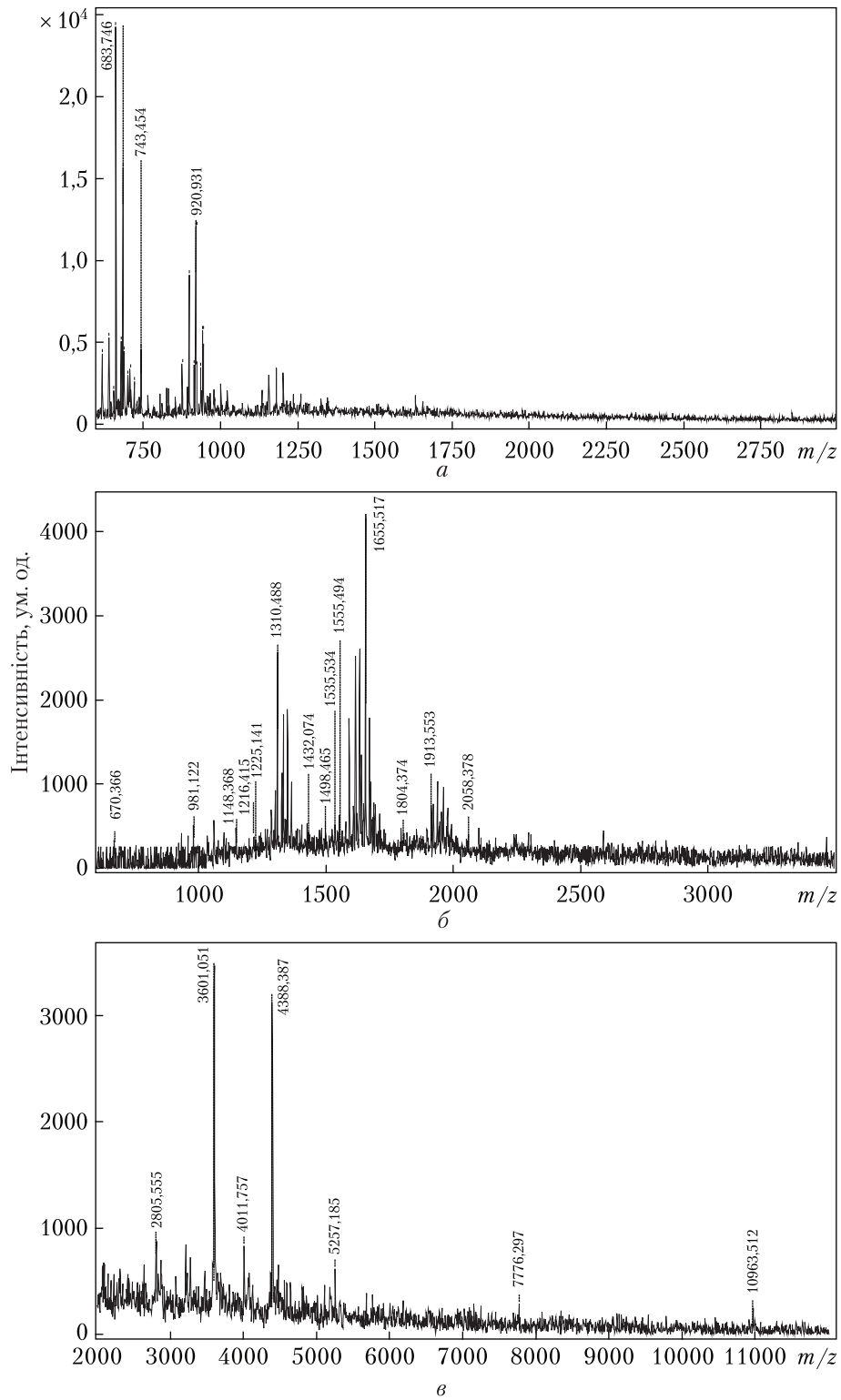


Рис. 4. MALDI-ToF-ToF мас-спектри фракцій РНК D12 (а), E2 (б) і 2F7 (в)

ду завдовжки від 2 до 8 ланок. Фрагменти більшої молекулярної маси за допомогою методу MALDI-ToF-ToF зафіксувати не вдалося.

Для підвищення ефективності препарату необхідно дослідити залежність противірусної активності від довжини олігорибонуклеотидів. З цією метою насамперед необхідно їх розділити за масою та впевнитися, що таке розділення відбулося. Для досягнення даного завдання було поєднано методи рідинної хроматографії та мас-спектрометрії.

Для розділення сумарної дріжджової РНК на олігорибонуклеотиди різної маси застосували високоефективну рідинну хроматографію. Як буфер використовували триетиламоніум ацетат з рН 7, який одночасно підходить і для розділення РНК, і для подальшого мас-спектрометричного аналізу.

Після розділення хроматограма містить три основних піки (рис. 3). Фракції з кожного піка були відібрані для подальшого аналізу за допомогою мас-спектрометрії. Відібрані фракції концентрували та висушували шляхом вакуумного центрифугування при температурі 20 °С протягом 4–5 год.

Також була спроба розділити олігорибонуклеотиди з дріжджової РНК з використанням як рухомої фази розчину HFIP (гексафлюороізопропанол), проте аналіз отриманих мас-спектрів показав, що всі зібрані фракції незалежно від часу їх елюції містили олігорибонуклеотиди завдовжки від 2 до 15 ланок.

Перед мас-спектрометричним аналізом перевірялася чистота фракцій, отриманих з РНК на спектрофотометрі NanoDrop за співвідношення A_{260}/A_{280} . Для всіх відібраних фракцій значення A_{260}/A_{280} варіювалося в межах 1,77–2,28.

На рис. 4, а зображено мас-спектр фракції РНК з першого піка — D12. Як видно з рисунка, дана фракція містить лише низькомолекулярні фрагменти з молекулярною масою в діапазоні m/z від 670 до 1200, що в середньому відповідає олігорибонуклеотидам завдовжки порядку 2–4 ланок. Фракції E2 та 2F7 містять фрагменти дріжджової РНК завдовжки від 4 до 7 та від 10 до 15 ланок відповідно (див. рис. 4, б, в).

Висновки. За допомогою мас-спектрометрії підтверджено ефективність розділення досліджуваної РНК за довжиною олігорибонуклеотидів, що входять до її складу. Результати аналізу MALDI-ToF-ToF мас-спектрів свідчать про те, що піки на хроматограмі належать олігорибонуклеотидам різної довжини, а саме: від 2 до 4 ланок (фракція D12), від 4 до 7 (фракція E2) та від 10 до 15 (фракція 2F7).

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Sullenger B.A., Gilboa E. Emerging clinical applications of RNA. *Nature*. 2002. **418**. P. 252–258. <https://doi.org/10.1038/418252a>
2. Biesecker G., Dihel L., Enney K., Bendele R.A. Derivation of RNA aptamer inhibitors of human complement C5. *Immunopharmacology*. 1999. **42**, № 1-3. P. 219–230. [https://doi.org/10.1016/s0162-3109\(99\)00020-x](https://doi.org/10.1016/s0162-3109(99)00020-x)
3. Sundaram P., Kurinawan H., Byrne M.E., Wower J. Therapeutic RNA aptamers in clinical trials. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013. **48**. P. 259–271. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.10.014>
4. Burnett J.C., Rossi J.J. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem. Biol.* 2012. **19**. P. 60–71 <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.12.008>
5. Multiantivirus compound, composition and method for treatment of virus diseases: Pat. 8722642 B2 US. Publ. 13.05.2014.
6. Keefe A.D., Pai S., Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010. **9**. P. 537–550. <https://doi.org/10.1038/nrd3141>

7. Thomas B., Akoulitchev A.V. Mass spectrometry of RNA. *Trends Biochem. Sci.* 2006. **31**, № 3. P. 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.01.004>
8. Banoub J.H., Newton R.P., Esmans E., Ewing D.F., Mackenzie G. Recent developments in mass spectrometry for the characterization of nucleosides, nucleotides, oligonucleotides, and nucleic acids. *Chem. Rev.* 2005. **105**, № 5. P. 1869–1916. <https://doi.org/10.1021/cr030040w>
9. Chiang C.-K., Yang Z., Lin Y.-W., Chen W.-T., Lin H.-J., Chang H.-T. Detection of proteins and protein–ligand complexes using HgTe nanostructure matrixes in surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2010. **82**, № 11. P. 4543–4550. <https://doi.org/10.1021/ac100550c>
10. Jiménez C.R., Huang L., Qiu Y., Burlingame A.L. Sample preparation for MALDI mass analysis of peptides and proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2001. Chapter 16, Unit 16.3. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1603s14>
11. Apffel A., Chakel J.A., Fischer S., Lichtenwalter K., Hancock W.S. Analysis of oligonucleotides by HPLC–electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1997. **69**, № 7. P. 1320–1325. <https://doi.org/10.1021/ac960916h>
12. Huth-Fehre T., Gosine J.N., Wu K.J., Becker C.H. Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of oligodeoxythymidylic acids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1992. **6**, № 3. P. 209–213. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290060312>
13. Nordhoff E., Ingendoh A., Cramer R., Overberg A., Stahl B., Karas M., Hillenkamp F., Crain P.F., Chait B. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of nucleic acids with wavelengths in the ultraviolet and infrared. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1992. **6**, № 12. P. 771–776. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290061212>
14. Pielec U., Zürcher W., Schär M., Moser H.E. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 1993. **21**, № 14. P. 3191–3196. <https://doi.org/10.1093/nar/21.14.3191>

Надійшло до редакції 17.02.2021

REFERENCES

1. Sullenger, B.A. & Gilboa, E. (2002). Emerging clinical applications of RNA. *Nature*, 418, pp. 252-258. <https://doi.org/10.1038/418252a>
2. Biesecker, G., Dihel, L., Enney, K. & Bendele, R.A. (1999). Derivation of RNA aptamer inhibitors of human complement C5. *Immunopharmacology*, 42, № 1-3, pp. 219-230. [https://doi.org/10.1016/s0162-3109\(99\)00020-x](https://doi.org/10.1016/s0162-3109(99)00020-x)
3. Sundaram, P., Kurinawan, H., Byrne, M.E. & Wower, J. (2013). Therapeutic RNA aptamers in clinical trials. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 48, pp. 259-271. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.10.014>
4. Burnett, J.C. & Rossi, J.J. (2012). RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem. Biol.*, 19, pp. 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.12.008>
5. Pat. 8722642 B2 US, Multiantivirus compound, composition and method for treatment of virus diseases, Tkachuk, Z. Publ. 13.05.2014.
6. Keefe, A.D., Pai, S. & Ellington, A. (2010). Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9, pp. 537-550. <https://doi.org/10.1038/nrd3141>
7. Thomas, B. & Akoulitchev, A.V. (2006). Mass spectrometry of RNA. *Trends Biochem. Sci.*, 31, № 3, pp. 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.01.004>
8. Banoub, J.H., Newton, R.P., Esmans, E., Ewing, D.F. & Mackenzie, G. (2005). Recent developments in mass spectrometry for the characterization of nucleosides, nucleotides, oligonucleotides, and nucleic acids. *Chem. Rev.*, 105, № 5, pp. 1869-1916. <https://doi.org/10.1021/cr030040w>
9. Chiang, C.-K., Yang, Z., Lin, Y.-W., Chen, W.-T., Lin, H.-J. & Chang H.-T. (2010). Detection of proteins and protein–ligand complexes using HgTe nanostructure matrixes in surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 82, № 11, pp. 4543-4550. <https://doi.org/10.1021/ac100550c>
10. Jiménez, C.R., Huang, L., Qiu, Y. & Burlingame A.L. (2001). Sample preparation for MALDI mass analysis of peptides and proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, Chapter 16, Unit 16.3. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1603s14>

11. Apffel, A., Chakel, J.A., Fischer, S., Lichtenwalter, K. & Hancock, W.S. (1997). Analysis of oligonucleotides by HPLC-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 69, № 7, pp. 1320-1325. <https://doi.org/10.1021/ac960916h>
12. Huth-Fehre, T., Gosine, J.N., Wu, K.J. & Becker, C.H. (1992). Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of oligodeoxythymidylic acids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 6, № 3, pp. 209-213. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290060312>
13. Nordhoff, E., Ingendoh, A., Cramer, R., Overberg, A., Stahl, B., Karas, M., Hillenkamp, F., Crain, P.F. & Chait, B. (1992). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of nucleic acids with wavelengths in the ultraviolet and infrared. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 6, № 12, pp. 771-776. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290061212>
14. Pielies, U., Zürcher, W., Schär, M. & Moser, H.E. (1993). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, 21, № 14, pp. 3191-3196. <https://doi.org/10.1093/nar/21.14.3191>

Received 17.02.2021

Z.Yu. Tkachuk, S.M. Levchenko

Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, Kyiv

E-mail: ztkachuk@bigmir.net

MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES OF TOTAL YEAST RNA

To find out the composition of oligoribonucleotides of total yeast RNA ingredient that is present in antiviral drug Nuclex with multiple actions and immunomodulator Nucleinat, are liquid chromatography and mass spectrometry MALDI-Tof-Tof methods were used for ribonucleotides analysis. It was shown that the total yeast RNA contains three main fractions: the first one – from 2 to 4 nt, the second one – from 4 to 7 nt and the third one – from 10 to 15 nt. It is shown that the total yeast RNA contains different oligoribonucleotides with lengths from 4 to 15 nt.

Keywords: yeast RNA, ribonucleotides, liquid chromatography, MALDI-Tof-Tof mass spectrometry.