

Note

Säulenchromatographie von 5'-Nukleotiden am Anionenaustauscher Sephadex A-25 mit einem Lineargradienten aus Ammoniumbicarbonat und Ammoniumcarbamid

HANS-DIETER HUNGER und HORST REINBOTH

Sektion Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Wissenschaftsbereich Biochemie (Pflanzenbiochemische Abteilung), Neuwerk 1, 402 Halle (Saale) (D.D.R.)

(Eingegangen am 25. Februar 1974)

In einer früheren Mitteilung¹ berichteten wir über eine einfache und schnelle Methode zur Trennung von 5'-Nukleotiden an dem Anionenaustauscher DEAE-Sephadex A-25 mit Hilfe eines LiCl-Lineargradienten. Zur Weiterverarbeitung der Eluatfraktionen muss jedoch eine Entsalzung durchgeführt werden. Diese erfolgt nach dem Aufräumen der Proben auf Dünnschichten durch Einlegen der Platten in Methanol². Die Entfernung grösserer LiCl-Mengen durch Behandlung der Fraktionen mit ZnSO₄ (ref. 3) stösst aber auf Schwierigkeiten⁴. Von Nachteil bei dieser Methode ist auch die erforderliche Befreiung des zu chromatographierenden Nukleotidgemisches von Purin- und Pyrimidinbasen und ihren Nukleosiden. Bei der Analyse von biologischen Proben können wir die Fraktion der 5'-Nukleotide durch Säulenchromatographie an Sephadex G-10 gewinnen⁵⁻⁷, mit der wir Basen und Nukleoside trennen, oder wir müssen eine Vortrennung⁸ durch Ligandenaustauschchromatographie⁹ vorschalten.

Wünschenswert erschien daher die Entwicklung einer Methode der Trennung von 5'-Nukleotiden, die den durch die Vortrennung bedingten separaten Arbeitsgang vermeidet, und bei der die umständliche Entsalzung der Proben entfällt.

Die vorgestellte Methode erfüllt bei Beibehaltung der prinzipiellen Vorteile der Gradientenelution mit LiCl diese Forderungen. In einem Arbeitsgang erfolgt zunächst eine Vorfraktionierung der Gemische mit aqua bidest. und dann die Elution mit einem Lineargradienten aus (NH₄HCO₃ + NH₂COONH₄) bei einem pH-Wert von 7-9. Die Eluatfraktionen werden ohne Entsalzungsprozedur nach Einengen im Rotationsverdampfer bei 30° sofort der Dünnschichtchromatographie zugeführt.

Bicarbonatpuffer-Gradienten wurden zur Trennung von einzelnen Nukleotiden an DEAE-Cellulose benutzt¹⁰.

MATERIAL UND METHODEN

Die Adsorbenzien und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden); Cellulosepulver MN 300 UV₂₅₄ (Cellulose mit Fluoreszenzindikator; Macherey, Nagel & Co., Düren, B.R.D.); Cellulose-Ionenaustauscher PEI-TLC (mit Polyäthylenimin imprägnierte Cellulose:

Serva, Heidelberg, B.R.D.); Nukleotide, Nukleotidzucker, Nukleoside, Purine und Pyrimidine (C. F. Boehringer, Mannheim, B.R.D.; Serva, Heidelberg, B.R.D.; Ferak, Berlin, B.R.D.; Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.; Calbiochem, Luzern, Schweiz; Reanal, Budapest, Ungarn; VEB Arzneimittelwerk, Dresden, D.D.R.); $(\text{NH}_4\text{HCO}_3 + \text{NH}_2\text{COONH}_4)$ (POCH, Polen).

Der Anionenaustauscher DEAE-Sephadex A-25 (Kapazität 3.5 ± 0.5 Äquiv./g; Partikelgrösse 40–120 μm) wurde zur Äquilibrierung 2 h mit 200 ml 0.07 M $(\text{NH}_4\text{HCO}_3 + \text{NH}_2\text{COONH}_4)$ -Lösung gerührt, nach dem Füllen der Säule wurde mit 50 ml derselben Lösung gespült und schliesslich wurde mit aqua bidest. neutral gewaschen. Diese Arbeitsoperationen wurden bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 42 ml/h durchgeführt. Der Austauscher kann mit 0.5 M NaOH regeneriert werden.

Durchschnittlich wurden 0.1–1.0 μMol der Reinsubstanzen chromatographiert. In diesem Konzentrationsbereich sind die Fraktogramme praktisch identisch. Die Stoffgemische der authentischen Substanzen wurden an einer Sephadex-Säule K9/60 (60 \times 0.9 cm) bei Zimmertemperatur getrennt. Nach einer vorgesetzten Elution mit aqua bidest. wurde mit einem Lineargradienten aus 600 ml 0.3 M $(\text{NH}_4\text{HCO}_3 + \text{NH}_2\text{COONH}_4)/600$ ml aqua bidest. eluiert. Die Pumpgeschwindigkeit betrug konstant 42 ml/h.

Die Transmission wurde im Durchflussphotometer Uvicord II (LKB) bei 254 nm gemessen. Die Eluatfraktionen wurden bei konstanter Elutionsgeschwindigkeit in Abständen von 15 min aufgefangen (UltraRac-Faktionensammler, LKB). Die Fraktionen wurden im Rotationsverdampfer (30°) eingeengt, auf definiertes Volumen gebracht und der Dünnschichtchromatographie¹ zugeführt.

Die Verbindungen wurden anhand ihrer Absorptionsspektren (Beckman-Spektrophotometer DB-G) und durch Dünnschichtchromatographie auf PEI-Celulose-Schichten (ein- und zweidimensionale Gradientenentwicklung), DEAE-Celulose und MN 300 UV₂₅₄-Cellulose mit verschiedenen mobilen Phasen identifiziert¹. Durch diese Methoden ist zugleich eine Trennung der säulenchromatographisch nicht oder schlecht getrennten Substanzen möglich. Die Verbindungen werden auf den Dünnschichten im UV-Licht bei 254 nm (Quarzlampe "Fluotest Universal", Original Hanau, B.R.D.) lokalisiert.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Elutionsvolumina (V_e) von 38 Verbindungen sind in der Tabelle I zusammengestellt. Der relative Fehler der V_e -Wertbestimmung lag bei 2–3%. Die Gesamtanalysenzeit beträgt 21 h. Die Stabilität der Pyrophosphatbindungen erscheint unter den gewählten Trennbedingungen gewährleistet. Purin- und Pyrimidinbasen und ihre Riboside haben V_e -Werte von < 415 ml und werden vor den 5'-Nukleotiden fraktioniert. Lediglich Xanthin und Xanthosin fallen in den Elutionsbereich der 5'-Nukleotide. Mit dem Verfahren können getrennt werden: Cytidin, Cytidin-5'-mono-, -di- und -triphosphat; Uridin, Uridindiphosphat-Glucose, Uridin-5'-mono-, -di- und -triphosphat; Thymin, Thymidin, Thymidin-5'-mono- und -diphosphat; Adenin, Adenosin, Adenosin-5'-mono-, -di- und -triphosphat; Guanosin, Guanosin-5'-mono-, -di- und -triphosphat; Hypoxanthin, Inosin, Inosin-5'-mono-, -di- und -triphosphat; Xanthin, Xanthosin und Xanthosin-5'-monophosphat. Während im Falle von Adenosin, Inosin und Xanthosin das Ribosid und sein N-heterozy-

TABELLE I
ELUTIONSVOLUMINA (V_e) DER GEPRÜFTEN VERBINDUNGEN*

<i>Verbindung</i>	<i>V_e (ml)</i>
Cytosin	32
Cytidin	32
Cytidin-5'-monophosphat	415
Cytidin-5'-diphosphat	545
Cytidin-5'-triphosphat	615
Uracil	120
Uridin	120
Uridin-5'-monophosphat	500
Uridin-5'-diphosphat	625
Uridin-5'-triphosphat	695
Uridin-5'-diphosphat-Glucose	525
Thymin	71
Thymidin	55
Thymidin-5'-monophosphat	490
Thymidin-5'-diphosphat	590
Adenin	230
Adenosin	55
Adenosin-5'-monophosphat	500
Adenosin-5'-diphosphat	650
Adenosin-5'-triphosphat	750
Guanin	235
Guanosin	230
Guanosin-5'-monophosphat	615
Guanosin-5'-diphosphat	755
Guanosin-5'-triphosphat	840
Hypoxanthin	380
Inosin (Hypoxanthosin)	315
Inosin-5'-monophosphat	655
Inosin-5'-diphosphat	785
Inosin-5'-triphosphat	870
Xanthin	500
Xanthosin	435
Xanthosin-5'-monophosphat	805
Zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat	390
Riboflavin	59
Flavinmononukleotid	490
Flavin-adenin-dinukleotid	560
Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid	290

* Mittelwerte aus fünf bis zehn Bestimmungen.

klischer Bestandteil gut voneinander getrennt werden, ist das im Falle von Cytidin, Uridin, Thymidin und Guanosin nicht möglich. Zu ihrer Trennung eignet sich die von uns beschriebene^{5,11} Säulenchromatographie von Nukleinsäurebausteinen an Sephadex G-10, das für die genannten Stoffpaare von N-Heterozyklus und Ribosid ein hohes Auflösungsvermögen besitzt. Die Fig. 1 zeigt die Trennung von 20 Verbindungen bei Verwendung von 1.0 μ Mol pro Substanz. FMN wurde wegen der exakten Reproduzierbarkeit seines V_e -Wertes und seiner Gelbfärbung als Marker-

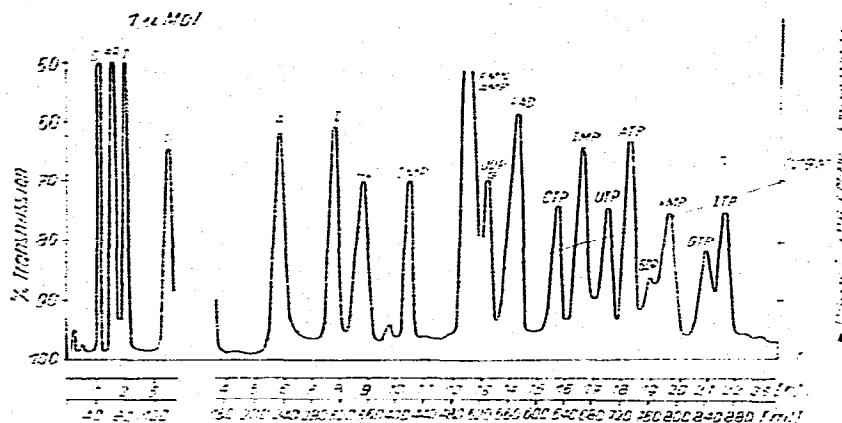


Fig. 1. Trennung von 5'-Nukleotiden an DEAE-Sephadex A-25. Abkürzungen: A = Adenin; AMP = Adenosin-5'-monophosphat; AR = Adenosin; ATP = Adenosin-5'-triphosphat; C = Cytosin; CMP = Cytidin-5'-monophosphat; CTP = Cytidin-5'-triphosphat; FAD = Flavin-adenin-dinukleotid; FMN = Flavinmononukleotid; GDP = Guanosin-5'-diphosphat; GTP = Guanosin-5'-triphosphat; Hx = Hypoxanthin; I = Inosin; IMP = Inosin-5'-monophosphat; ITP = Inosin-5'-triphosphat; T = Thymin; U = Uracil; UDP-G = Uridin-5'-diphosphat-Glucose; UTP = Uridin-5'-triphosphat; XMP = Xanthosin-5'-monophosphat. Die Gradientenelution beginnt mit der 4. Stunde.

substanz verwendet. Nicht oder nur unvollständig gelingt die Trennung der folgenden Verbindungen: Cytidin-5'-triphosphat-Guanosin-5'-monophosphat-Uridin-5'-diphosphat und Adenosin-5'-diphosphat-Inosin-5'-monophosphat.

Die vorgestellte Methode gestattet eine relativ schnelle Trennung von 5'-Nukleotiden (Mono-, Di- und Triphosphaten) synthetischer oder biologischer Herkunft. Vorsfraktionierungen mit separater Methodik und Entsalzung entfallen. Das Verfahren wird zur Zeit für die quantitative Bestimmung von Pool-Komponenten und Ausscheidungsprodukten der flavinogenen Hefe *Candida guilliermondii* erprobt. Das bei der Fraktionierung der Nährösung von Eisenmangelkulturen¹² störende Riboflavin wird vollständig in den ersten Fraktionen eluiert. Riboflavin, FMN und FAD können mit der Methode getrennt und quantitativ bestimmt werden¹³.

LITERATUR

- 1 G. Krauss, C. Wasternack und H. Reinbothe, *J. Chromatogr.*, 76 (1973) 248.
- 2 K. Randerath und E. Randerath, *J. Chromatogr.*, 16 (1964) 111.
- 3 K. Daneck, G. Weimann und F. Cramer, *Experientia*, 21 (1965) 1.
- 4 G. Krauss, unveröffentlicht.
- 5 C. Wasternack und H. Reinbothe, *J. Chromatogr.*, 48 (1970) 551.
- 6 C. Wasternack, *Pharmazie*, 27 (1972) 67.
- 7 C. Wasternack und H. Reinbothe, *J. Chromatogr.*, 73 (1972) 135.
- 8 G. Krauss, unveröffentlicht.
- 9 G. Goldstein, *Anal. Biochem.*, 20 (1967) 477.
- 10 V. Wylie und M. Smith, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 42 (1964) 1347.
- 11 C. Wasternack, *J. Chromatogr.*, 71 (1972) 67.
- 12 D. Schlee, K. zur Nieden, W. Fritsche und H. Reinbothe, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 161 (1970) 459.
- 13 G. Uhlmann, D. Schlee und H. Reinbothe, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 166 (1974) 1.