

Verfahren zur Gewinnung von Nucleotiden¹⁾

VON FRIEDRICH FISCHER UND MARTIN THIELE

Inhaltsübersicht

Es wird ein Verfahren zur Gewinnung der Nucleotide Adenylsäure, Guanylsäure, Uridylsäure und Cytidylsäure unter Umgehung der Isolierung von Hefe-Ribonucleinsäure durch direkte Hydrolyse des Hefeextraktes beschrieben.

Im Rahmen unserer Arbeiten über Nucleotide der Hefe-Ribonucleinsäure wurden die üblichen Wege zur Gewinnung von Hefe-Ribonucleinsäure überprüft. Diese Verfahren, soweit sie technische Bedeutung erlangt haben, beruhen auf der Extraktion der Hefe mit wäßrigen Alkalien²⁾³⁾ oder wäßrigen Lösungen von Natriumacetat bzw. Natriumchlorid⁴⁾.

Da sich die Abtrennung der Hefe von den Extrakten als recht schwierig erwies, wurde versucht, die Nucleinsäure an Ionenaustauscher zu binden, aus denen die Hefe leicht auszuwaschen ist. Zu diesem Zwecke wurde Hefe eine Stunde mit einprozentiger Natronlauge behandelt, danach mit Wofatit KPS (H^+ -Form) bis zur neutralen Reaktion versetzt und vom Austauscher dekantiert. Die neutrale Hefesuspension wurde mit Wofatit L 150 (OH^- -Form) bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt und abermals dekantiert. Beide Austauscher wurden mit Wasser hefefrei gewaschen und mit verdünntem Ammoniak eluiert. Die Ausbeute blieb jedoch unter der in der Literatur angegebenen. Auch durch Anwendung von Austauschersäulen konnte dieses Ergebnis nicht verbessert werden.

Die Nucleotide aus Hydrolysaten von Hefe-Ribonucleinsäure dagegen lassen sich mit gutem Erfolg an Ionenaustauscher binden. Deshalb haben wir versucht, den Hefeextrakt ohne vorherige Isolierung der Ribonucleinsäure zu hydrolysieren. Entsprechend der Arbeitsweise von SMITH und ALLEN⁵⁾, die Ribonucleinsäuren zu Nucleotiden hydrolysierten, wurde

¹⁾ DDR-Patent angemeldet.

²⁾ P. A. LEVENE u. L. W. BASS, *Nucleic Acids* (New York, 1931).

³⁾ P. A. LEVENE, *J. Amer. chem. Soc.* **22**, 329–331 (1900).

⁴⁾ A. CH. WALDSCHTEJN u. CH. F. BASS, *UdSSR. P.* 122254 (1959).

⁵⁾ K. C. SMITH u. F. W. ALLEN, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 2131 (1953).

Trockenhefe 24 Stunden bei Raumtemperatur mit n-Natronlauge behandelt. Nach Verdünnen mit Wasser wurde die Suspension auf eine Säule gegeben, die Wofatit KPS (H⁺-Form) enthielt. Der Durchlauf reagierte stark sauer. Um die hierdurch mögliche Zersetzung der Adenyl- und Guanylsäuren in engen Grenzen zu halten, passierte die Hefeaufschlammung unmittelbar nach der KPS-Säule eine weitere Austauschersäule, die mit Wofatit L 150 (OH⁻-Form) gefüllt war. Um eine gleichmäßige Durchlaufgeschwindigkeit zu erzielen, mußte an die erste Säule ein leichtes Vakuum angelegt werden. Die zweite Säule wurde glatt durchlaufen. In der neutralen Hefeaufschlammung konnten nach Passieren beider Säulen papierchromatographisch in keinem Fall Nucleotide nachgewiesen werden.

Nachdem beide Säulen mit Wasser hefefrei gewaschen waren, wurde mit zweiprozentigem Ammoniak eluiert. Auf die Elution der KPS-Säule kann aber verzichtet werden. Ammoniak wie auch andere wäßrige Alkalien sind zwar ungeeignet, um gleichzeitig eine Trennung des Nucleotidgemischs zu erreichen, sie gestatten jedoch, mit einem relativ kleinen Volumen den weitestgrößten Teil der Nucleotide zu eluieren. Aus dem Extrakt wurde nach Einengen im Vakuum ein brauner, zäher Rückstand erhalten, aus dem durch mehrmaliges Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol ein kristallines Gemisch der Nucleotide Adenylsäure, Guanylsäure, Uridylsäure und Cytidylsäure erhalten werden konnte.

Besser ließ sich das Eluat analog der Angabe von DIMROTH, JAENICKE und HEINZEL⁶⁾ in folgender Weise aufarbeiten: Durch kurze Vakuumdestillation wurde die Hauptmenge des Ammoniaks entfernt, die Lösung mit etwas Salzsäure neutralisiert und eine wäßrige Zinksulfatlösung zugesetzt. Die flockig ausfallenden Zinksalze wurden mehrmals dekantiert und mit 5proz. Ammoniak gelöst. Durch langsames Verdunsten des Ammoniaks kristallisierten die Zinksalze in gut filtrierbarer Form aus. Nach Zerlegen mit Schwefelwasserstoff wird eine wäßrige Lösung der reinen Nucleotide erhalten.

Es empfiehlt sich, eines dieser Reinigungsverfahren in den Herstellungsgang einzuschalten, da danach die Trennung des Nucleotidgemischs übersichtlicher erfolgt.

Versuche, die Adsorption der Nucleotide aus der Hefeaufschlammung an Wofatit L 150 in der Formiatform durchzuführen und eine chromatographische Trennung zu erzielen, schlugen fehl. Stets konnten in der Hefesuspension, auch nach Passieren langer Säulen, Nucleotide nachgewiesen werden.

⁶⁾ K. DIMROTH, L. JAENICKE u. D. HEINZEL, Liebigs Ann. Chem. 566, 206 (1950).

Die papierchromatische Trennung der Nucleotide wurde nach G. PARKER⁷⁾ mit einer gesättigten Lösung von Ammoniumsulfat, der 2% Isopropanol zugesetzt waren, als mobile Phase durchgeführt. Die Detektion erfolgte nach der Angabe von R. M. RIGUERA und J. ASIMOW⁸⁾ durch Besprühen mit einer 2proz. Silbernitrat-, danach mit 0,5proz. Kaliumchromatlösung und Eintauchen in 0,5 n-Salpetersäure. Die Adenyl- und Guanylsäuren zeigen sich als rote, Uridyl- und Cytidylsäure als orangefarbene Flecken.

Beschreibung der Versuche

A. Versuche zur Isolierung von Hefe-Ribonucleinsäure

1. 100 g Trockenhefe wurden mit 200 ml 1proz. Natronlauge angeteigt und eine Stunde bei 15°C gerührt. Nach Verdünnen mit 800 ml destilliertem Wasser wurden 60 ml Wofatit KPS (H⁺-Form) zugegeben und 10 Minuten gerührt. Die Suspension hatte hiernach pH 6 erreicht und wurde vom Ionenaustauscher abdekantiert. Zur Hefeaufschlammung wurden 500 ml Wofatit L 150 (OH⁻-Form) zugesetzt und 10 Minuten gerührt. Nach Dekantieren und Auswaschen der Hefe wurden beide Austauscher nacheinander mit 200 ml 3proz. Ammoniak eluiert. Das gelbliche Eluat wurde im Vakuum bei 30°C Badtemperatur auf 20 ml eingengt und mit der Mischung von 50 ml Äthanol und 0,5 ml-konz. Salzsäure versetzt. Es fielen nur wenige Flöckchen aus, die abdekantiert und mit Alkohol gewaschen wurden. Die Hydrolyse nach SMITH und ALLEN mit einigen Tropfen n-Natronlauge und papierchromatographische Prüfung des Hydrolysats ergab die Anwesenheit der vier Nucleotide Adenylsäure, Guanylsäure, Uridylsäure und Cytidylsäure.

2. 400 g Trockenhefe wurden wie unter 1. beschrieben behandelt und nach Verdünnen über eine Säule Wofatit KPS (H⁺-Form) gegeben.

Abmessungen der Säule: 20 cm/38,5 cm².

Der Durchlauf passierte danach eine Säule gleicher Abmessung mit Wofatit L 150 (OH⁻-Form) mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 20 ml/Min.

Nach Auswaschen der Hefe wurden beide Austauscher mit 2000 ml 3proz. Ammoniak eluiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 1. beschrieben und ergab 50 mg einer Fällung, die durch Hydrolyse und papierchromatographische Prüfung als Ribonucleinsäure nachgewiesen wurde.

Nach den herkömmlichen Verfahren wurden aus 400 g Trockenhefe 2,8 g Ribonucleinsäure erhalten.

B. Versuche zur direkten Gewinnung von Nucleotiden aus Hefe

3. 10 g Trockenhefe wurden mit 20 ml n-Natronlauge angeteigt und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde mit 50 ml destilliertem Wasser verdünnt und 20 ml Wofatit KPS (H⁺-Form) zugegeben. Nach 10 Minuten Rühren hatte die alkalische Suspension pH 6 erreicht und wurde dekantiert. Der Austauscher wurde mit 2 mal 10 ml Wasser gewaschen. Zur Hefeaufschlammung einschließlich der Waschwässer wurden 70 ml Wofatit L 150 (OH⁻-Form) gegeben. Nach 10 Minuten Rühren hatte die Mischung pH 8 angenommen und wurde dekantiert. Der ausgewaschene Austauscher L 150 wurde in einer Säule mit 200 ml 2proz. Ammoniak eluiert. Das gelbliche Eluat, im Vakuum bei einer

⁷⁾ G. PARKER, Biochem. J. **51**, 356 (1952).

⁸⁾ R. M. RIGUERA u. J. ASIMOW, J. Amer. chem. Soc. **72**, 5781 (1950).

Badtemperatur von 40°C eingengt, ergab einen zähen, braunen Rückstand. Mehrmalige Umkristallisation aus 30proz. Alkohol ergab 32 mg eines Nucleotidgemisches, in dem papierchromatographisch die vier Komponenten Adenylsäure, Guanylsäure, Uridylsäure und Cytidylsäure nachgewiesen wurden.

4. 10 g Trockenhefe wurden wie unter 3. beschrieben verarbeitet. Nach Dekantieren des Wofatits L 150 wurde nochmals mit einigen Millilitern Wofatit KPS auf pH 6 gebracht und ein zweites mit 70 ml Wofatit L 150 versetzt. Nach Elution mit 300 ml 2proz. Ammoniak und Einengen wurden 380 mg Rückstand erhalten, die nach Umkristallisation 48 mg des unter 3. erwähnten Nucleotidgemischs ergaben.

5. 400 g Trockenhefe wurden wie unter 3. beschrieben verarbeitet. Das Hydrolysat wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 3000 ml aufgefüllt und über die unter 2. beschriebenen Säulen gegeben. Die Elution erfolgte mit 3000 ml 2proz. Ammoniak. Vom Eluat wurden im Vakuum bei 40°C Badtemperatur etwa 1000 ml abdestilliert. Die verbleibende Lösung wurde mit wenigen Millilitern n-Salzsäure neutralisiert und eine Lösung von 70 g Zinksulfat in 100 ml Wasser zugegeben. Die weiße, flockige Fällung wurde dekantiert, mit Wasser auf 2000 ml aufgefüllt und nochmals dekantiert.

Der Rückstand wurde mit 250 ml 5proz. Ammoniak gelöst, die Lösung filtriert und in einer offenen Schale mehrere Tage stehengelassen. Hierbei kristallisierten die Zinksalze aus. Diese wurden nach Absaugen und Auswaschen in 100 ml Wasser suspendiert und die Mischung mit Schwefelwasserstoff gesättigt. Nach Stehen über Nacht im verschlossenen Gefäß wurde abgesaugt und das farblose Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand kristallisierte rasch und wurde in 25 ml Wasser bei 50–60°C gelöst. Nach Zusatz von 10 ml Alkohol kristallisierte das Gemisch der Nucleotide aus. Ausbeute 2,4 g.

Tharandt und Rudolstadt, Institut für Pflanzenchemie der Technischen Universität Dresden und VEB Ankerwerk Rudolstadt.

Bei der Redaktion eingegangen am 21. Oktober 1963.