

CHROM. 3689

Quantitative Dünnschichtchromatographie von ^{14}C -markierten Nukleotiden

Die Untersuchung enzymkatalysierter Reaktionen des Nukleotidstoffwechsels erfordert zuverlässige Trennungen sowie empfindliche quantitative Bestimmungen der Nukleotide, besonders wenn die eingesetzten Enzymaktivitäten relativ gering sind. Da bei Enzymtesten in der Regel eine grössere Anzahl von Proben unter identischen Bedingungen untersucht wird, werden einfache und zeitsparende Methoden bevorzugt. Daher ist die Ionenaustauschchromatographie auf der Säule für diesen Zweck wenig geeignet. Die Trennung von Nukleotiden auf der mit PEI-Cellulose beschichteten Platte bzw. Folie jedoch, wie sie K. RANDEATH UND E. RANDEATH eingeführt haben¹, erwies sich uns als zuverlässige Methode. Voraussetzung allerdings war, dass störende Salzeffekte, die aus der biologischen Probe herrührten, bei der Chromatographie vermieden wurden und dass wir eine empfindliche und wegen der grossen Probenzahl relativ einfache Methode zur quantitativen Bestimmung der ^{14}C -markierten Nukleotide verwenden konnten.

Material und Methoden

Dünnschichtchromatographie auf Polygramfolien CEL 300 PEI der Fa. Macherey und Nagel, Düren. Alle Reagentien waren p.A. und stammten von der Fa. Merck, Darmstadt, die Nukleotide von der Fa. Boehringer und Söhne, Mannheim, die Desoxyribosenukleotide von Sigma Chemical Company, St. Louis. Die ^{14}C -markierten Nukleotide wurden von NEN—Chemicals GmbH, Dreieichenhain, gekauft. Die Trennung der Nukleotide führten wir nach den Angaben von K. RANDEATH² durch. Zur Radioaktivitätsmessung wurden der Dünnschichtscanner der Fa. Berthold, Wildbad, mit dem Messplatz LB 242 K und der Tricarb 3365 der Fa. Packard benutzt. Für die Messung im Flüssigszintillationsspektrometer wurden die Proben wie folgt gewonnen: (a) die Celluloseschicht wurde von der Folie dem Chromatogramm entsprechend in 2–3 mm breiten Zonen abgeschabt und in die Zählgläser überführt, und (b) die Folie wurde dem Chromatogramm entsprechend in 2–5 mm breite Zonen geschnitten und auf den Boden der Zählgläser mit der Schicht nach oben gelegt. Die Messung erfolgte in einem Dioxanzintillatormischung mit PPO und Dimethyl-POPOP.

Ergebnisse und Diskussion

Die Bestimmung der Aktivität der CTP-Ribosereduktase³ im Knochenmark der Ratte⁴ setzt die Trennung von CTP und dCTP voraus*. Da aber im Ansatz ein Teil des CTP in CDP umgewandelt wird, ist auch mit der Bildung von dCDP zu rechnen. Die dünnschichtchromatographische Trennung dieser vier Verbindungen stösst jedoch auf Schwierigkeiten und wird daher nach saurer Hydrolyse als CMP und dCMP durchgeführt (Entwickler: 3% H_3BO_3 –2 M LiCl (2:1, v/v)). Diese Trennung war auch im biologischen Ansatz ohne Schwierigkeiten möglich, nachdem es uns gelungen war, durch Zusatz von EDTA zum neutralisierten Überstand störende Salzeffekte bei der Chromatographie zu beseitigen. Bei Anwendung des Methanolbades

* Verwendete Abkürzungen: CMP = Cytidinmonophosphat; CDP = Cytidindiphosphat; CTP = Cytidintriphosphat; dCMP = Desoxycytidinmonophosphat; dCDP = Desoxycytidindiphosphat; dCTP = Desoxycytidintriphosphat; EDTA = Äthylendiamintetraacetat.

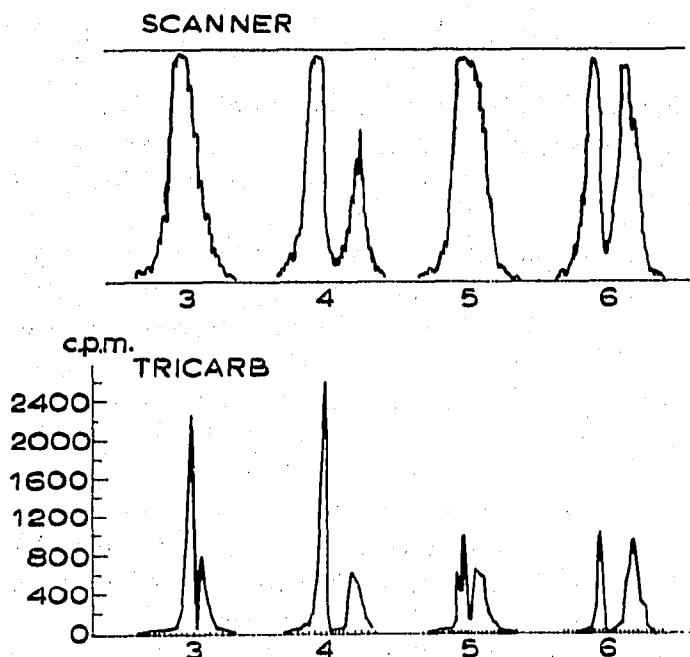


Fig. 1. Kritische Trennung von CMP und dCMP. Abstand der im U.V.-Licht sichtbaren Flecken 2 mm. Untere Reihe: (3) und (4) geschnittene Folie, (5) und (6) abgeschabte Cellulose, Messung im Tricarb. Obere Reihe: die gleichen Proben mit dem Scanner gemessen.

nach K. RANDEATH UND E. RANDEATH¹ war es zu unregelmässigen Verlusten an Radioaktivität gekommen.

Auf der Suche nach einer empfindlichen und relativ einfachen quantitativen Bestimmungsmethode der ¹⁴C-markierten Nukleotide standen wir vor folgenden Fragen:

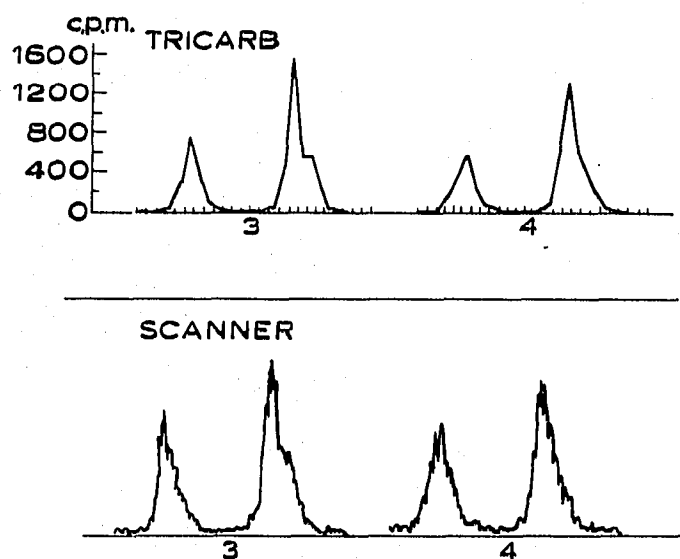


Fig. 2. Gute Trennung von CMP und dCMP. Abstand der im U.V.-Licht sichtbaren Flecken mehr als 2 mm. Obere Reihe: (3) geschnittene Folie, (4) abgeschabte Cellulose, Messung im Tricarb. Untere Reihe: die gleichen Proben mit dem Scanner gemessen.

(1) Ist die Methode des Scannens der Dünnschichtplatte mit dem 2π -Zählrohr für unsere Zwecke empfindlich und genau genug?

(2) Wie weit beeinflussen Selbstabsorption, geometrische Faktoren und Quencheffekte die Zuverlässigkeit der Messung im Flüssigszintillationsspektrometer, wenn die Proben als abgeschabte Cellulose bzw. als ausgeschnittene Folie in das Zählglas gebracht werden?

Die Impulsraten lagen bei beiden Methoden (des Abschabens der Cellulose und des Ausschneidens der Folie) praktisch gleich hoch. Der einfacheren Handhabung wegen bevorzugten wir die Methode des Ausschneidens der Folie und haben hierbei auch keine Abweichungen durch geometrische Faktoren gefunden, die ihre Ursache im Verschieben der Folie am Boden des Zählglases beim Probentransport im Tricarb hätten haben können. Die Zählausbeute dieser Methode lag bei 85%, wenn wir die Impulsraten der gleichen ^{14}C -Aktivität in Lösung als 100% setzten. Ein Versuch durch Zugabe von Wasser bzw. Trichloressigsäurelösung verschiedener Konzentrationen die 2π -Geometrie unserer Messanordnung in eine 4π -Geometrie umzuwandeln, brachte keine wesentliche Steigerung der Zählausbeute. Die Zählausbeute der im Tricarb gemessenen Proben war zehn mal so hoch wie die des Scannens.

In Fällen einer schwierigen Trennung mit einem Abstand der im U.V.-Licht lokalisierten Nukleotide von nur 2 mm brachten die Methoden des Abschabens und des Ausschneidens noch eine Auflösung der Peaks (Fig. 1). Bei guten Trennungen

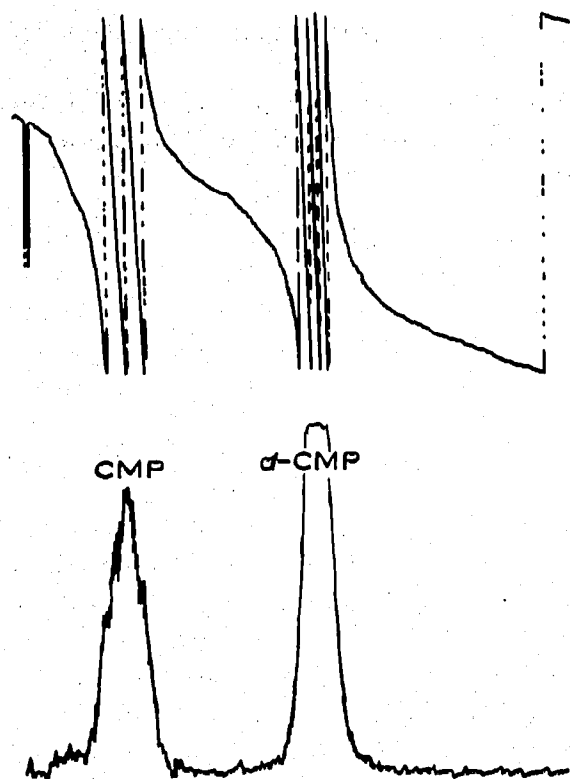


Fig. 3. Scanner Diagramm (DS-Scanner, Fa. Berthold, Wildbad). Vorschubgeschwindigkeit 120 mm/Std.; integrierender Bereich 1000 Impulse, engste Blende. Gleichzeitige Registrierung der Peak-Lokalisation (unten) und der Integration (oben). Trennung von CMP und dCMP.

jedoch mit einem Abstand der Nukleotide von 2 mm und mehr gab auch die Auswertung im Scanner zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse (Fig. 2 und 3).

Damit bietet sich die Methode des Scannens der Dünnschichtplatte bzw. Folie dem Enzymlabor, das eine grosse Probenzahl auszuwerten hat, als Methode der Wahl an, da sie weniger aufwendig ist als die Methode des Abschabens und des Ausschneidens mit der anschliessenden Auswertung im Flüssigszintillationsspektrometer. Doch wird man bei geringen Impulsraten sowie schlechten Trennungen auf diese Methoden zurückgreifen müssen.

Herrn Prof. K. D. VOIGT (II. Med. Klinik UK. Hamburg-Eppendorf) danke ich, dass er mir die Messung auf dem DS-Scanner ermöglichte. Fr. G. SCHMIDT danke ich für wertvolle technische Mitarbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung der Untersuchung durch Gewährung einer Sachbeihilfe.

*Physiologisch-Chemisches Institut
der Universität Hamburg, Hamburg (Deutschland)*

EBERHARD KÖNIGK

- 1 K. RANDEATH UND E. RANDEATH, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 111.
- 2 K. RANDEATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 76 (1963) 622.
- 3 M. GOULIAN UND W. S. BECK, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 4233.
- 4 E. KÖNIGK, Manuskript in Vorbereitung.

Eingegangen den 9. Juli 1968

J. Chromatog., 37 (1968) 128-131