

CHROM. 3632

GELCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER NUCLEINSÄUREBAUSTEINE AN SEPHADEX G-25 FINE, G-15 UND G-10

G. GORBACH UND J. HENKE

*Institut für Biochemische Technologie, Lebensmittelchemie und Mikrochemie, Technische Hochschule,
8010 Graz (Österreich)*

(Eingegangen den 31. Mai 1968)

SUMMARY

Gel chromatographic separation of nucleic acid components on Sephadex G-25 fine, G-15 and G-10

After a brief reference to publications which deal almost exclusively with qualitative separations of nucleic acid components on Dextran gels, elution diagrams and tables are used to show which factors are responsible for the quantitative separation of complicated mixtures. The lower as well as narrower fractionation range of dextran gels G-15 and G-10 at a bed volume 1.3×150 cm permits the separation of molecules which differ in their chemical molecular or steric structure.

In addition the drop rate as well as the pH value and the ionic strength of the eluent influence the elution more or less strongly retardable purine and pyrimidine bases and their sugar derivatives.

Separations carried out in the μg range, show that in quantitative evaluation of the elution diagrams the losses are only minimal. Thus this type of gel chromatography is not only a rapid but also an accurate method for the quantitative estimation of very small amounts of components of nucleosides present in nucleic acid hydrolysates.

Schon PORATH¹ und GELOTTE² beobachteten bei niedermolekularen Verbindungen eine zum Teil recht unterschiedliche Retardierung derselben an der Gelmatrix, die in der Gelchromatographie als "reversible Adsorption" bezeichnet wird. GELOTTE² bestimmte eine grosse Zahl von K_a -Werten solcher niedermolekularer aromatischer und heterocyclischer Verbindungen und deutete die Erscheinungen mit den Wechselwirkungen zwischen gelöstem Stoff und Gelgerüst. Dieselben Beobachtungen konnten ZADRAZIL, SORMOVA UND SORM³ sowie HOHN UND POLLMANN⁴ bei der Trennung von Nucleinsäurebausteinen an Sephadex G-25, machen; ein Gel mit relativ hohem Fraktionierungsbereich im Vergleich zum Molekulargewicht dieser Verbindungen. Weiters erschien im Novemberheft 1967 dieser Zeitschrift ein Beitrag von DE BERSAQUES⁵ über Trennung von Nucleinsäurebausteinen an den stärker quervernetzten Sephadex-Typen G-25 superfine, G-15 und G-10. Nach eigenen Erfahrungen kann an der von DE BERSAQUES eingesetzten Säule ($1,5 \times 25$ cm) nur eine

qualitative Trennung sehr unterschiedlich retardierbarer Purin- bzw. Pyrimidin-derivate erreicht werden.

METHODIK

Mit einem der in dest. Wasser gequollenen Dextrangele G-25 fine, G-15 oder G-10 wurde ein Chromatographierrohr mit den Abmessungen $1,3 \times 153$ cm bis zu einer Höhe von 150 cm gefüllt und mit 200 ml der Elutionsflüssigkeit (0,01 M Ammoniumkarbonatlösung⁴) äquilibriert. Die Probelösungen (nur Gemische der reinen Substanzen) betragen, bei einer Konzentration von 1–2 mg/ml und Substanz, 150 μ l. Die Elutionsflüssigkeit wurde mittels Schlauchpumpe der Säule zugeführt und das Eluat in 5 ml Fraktionen aufgefangen. Die Eluate wurden bei den für die einzelnen Bausteine charakteristischen Absorptionsmaxima im U.V.-Bereich gemessen (PMQ II von Zeiss; Spalt 0,15 und 2 cm Quarzküvetten).

ERGEBNISSE UND DEREN DISKUSSION

In den folgenden Versuchen soll die Möglichkeit der quantitativen Trennung eines komplexen Gemisches von Nucleinsäurebausteinen an den Gelen G-15 und G-10 aufgezeigt werden. Für den ersten Versuch wurde das gleiche Gemisch unter gleichen Bedingungen an G-25 fine und G-15 chromatographiert (Fig. 1 und 3). Der relativ

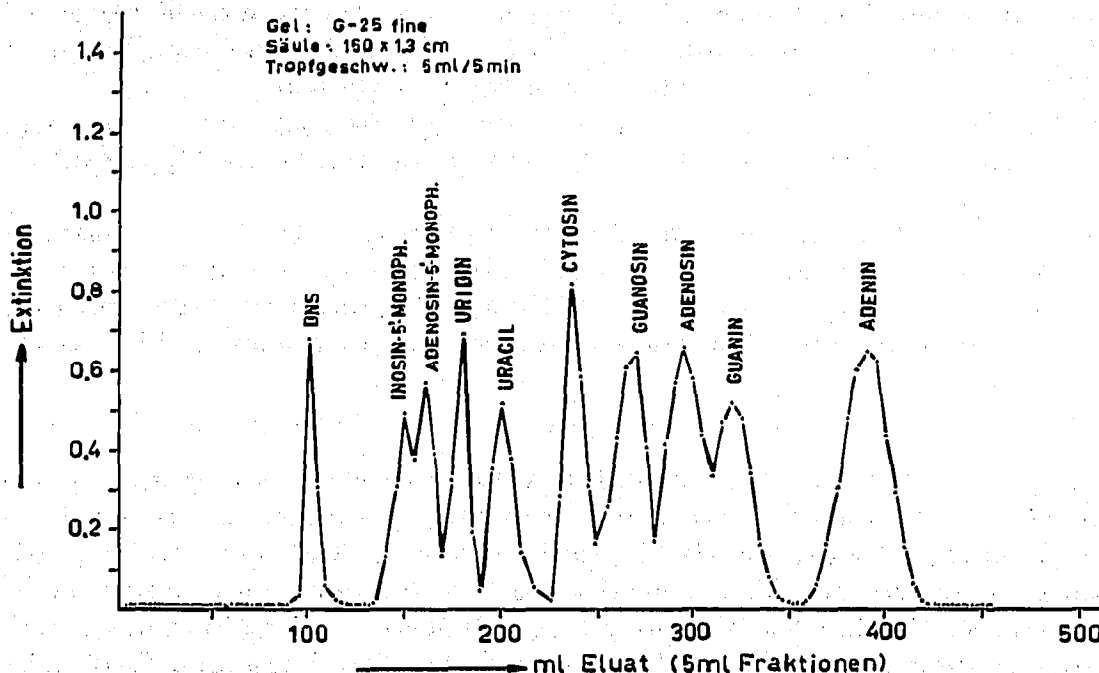


Fig. 1. Fraktogramm eines komplexen Gemisches von Nucleinsäurebausteinen, getrennt an G-25 fine.

weite und hohe Fraktionierungsbereich des G-25 fine erlaubt nur teilweise eine quantitative Trennung. Die Wechselwirkungen zwischen gelöstem Stoff und Gelmatrix sind bei dem relativ weitporigen Gel noch nicht so ausgeprägt wie bei den viel stärker quervernetzten Typen G-15 und G-10. An der G-15-Säule wurde das gleiche

Gemisch, bis auf Adenosin-Guanin, quantitativ aufgetrennt. Dass es sich hier nicht um eine reine Gelfiltration handelt, beweisen die viel höheren Elutionsvolumina der Purinbasen gegenüber den Pyrimidinbasen mit niederm Molekulargewicht. Diese Tatsache macht sich noch bei den Nucleotiden derselben (Adenosin-5'-monophosphat

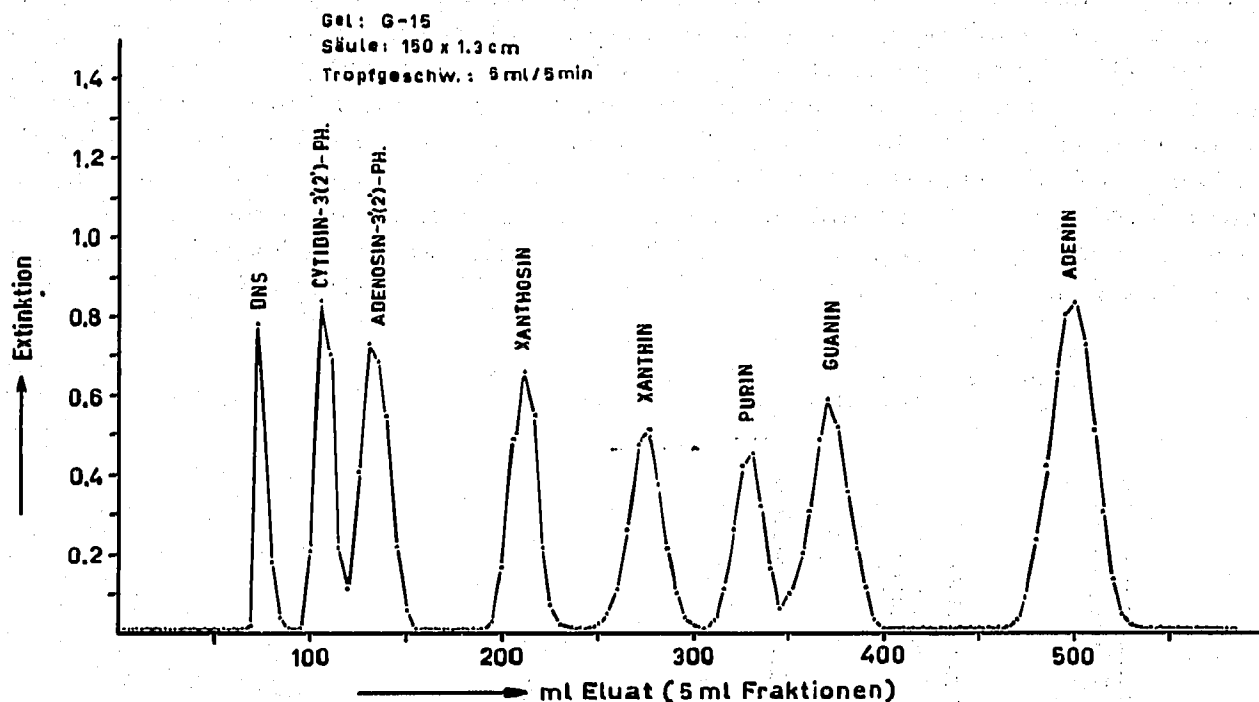


Fig. 2. Fraktogramm eines Gemisches verschiedener Purinbasen. Unterschiedlicher Einfluss der NH_2 - und phenolischer O-Gruppen auf die Retardierbarkeit des Moleküls.

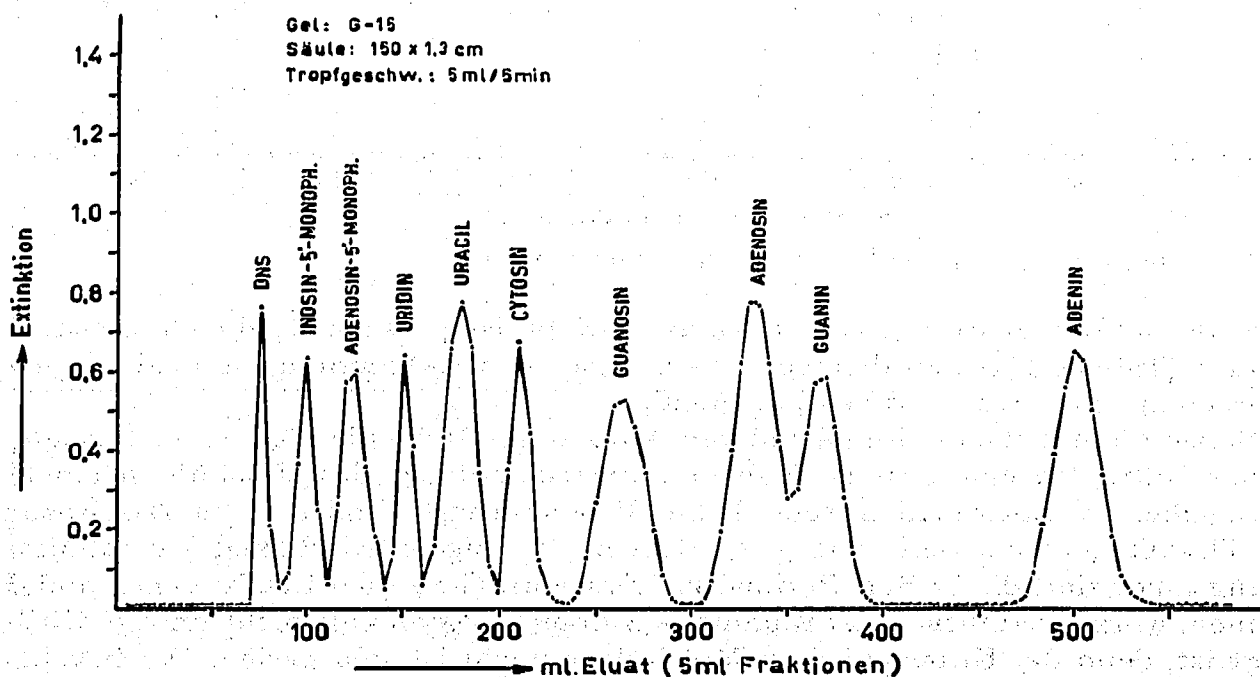


Fig. 3. Fraktogramm des gleichen Gemisches wie in Fig. 1, diesmal an G-15 aufgetrennt. Der engere Fraktionierungsbereich des G-15 ist deutlich zu erkennen.

und Cytidin-3'(2')-phosphat, Fig. 2 und 3) deutlich bemerkbar; eine qualitative Trennung der beiden Nucleotide ist durchaus möglich. Abgesehen von der unterschiedlichen Retardierbarkeit der Purin- und Pyrimidinabkömmlinge sind spezielle Merkmale der Moleküle untereinander von grosser Bedeutung für eine quantitative Trennung bei nur geringfügigem Unterschied in den Molekulargewichten. Am deutlichsten ist der Einfluss der Aminogruppe im Molekül (Fig. 2). 6-Aminopurin (Adenin), das nur um die NH_2 -Gruppe gegenüber Purin "schwerer" geworden ist, wird um 34 Fraktionen (= 170 ml) später aus der Säule eluiert. Der Ersatz der Aminogruppe durch eine phenolische (Hypoxanthin) setzt die Retardierbarkeit des Moleküls deutlich herab (Fig. 4). Das gleichzeitige Vorhandensein einer Amino- und einer phenolischen Gruppe (2-Amino-hydroxypurin = Guanin) bestätigt den grösseren Einfluss des ersteren auf das Elutionsverhalten des Moleküls (Fig. 2). Noch deutlicher wird dies beim Vergleich der Elutionsvolumina von Uracil (2,6-Dihydroxy-pyrimidin) und Cytosin (2-Hydroxy-

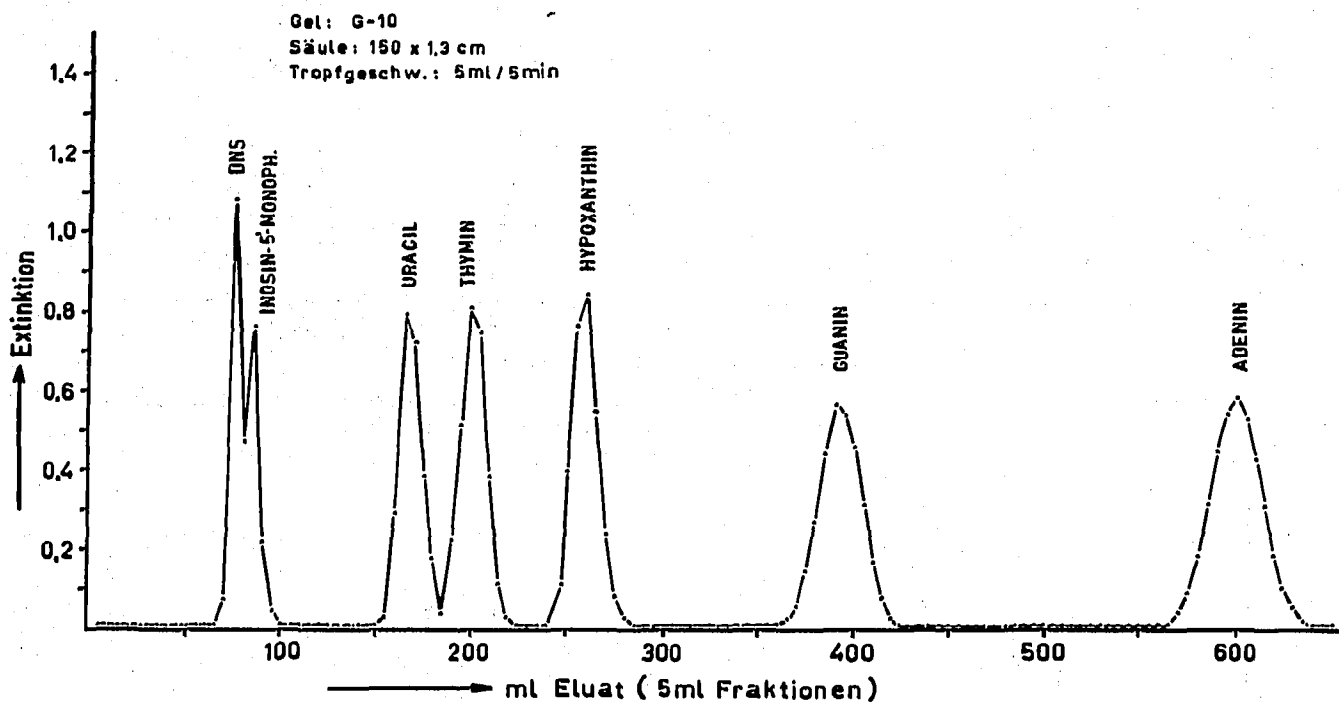


Fig. 4. Trennung des Basenpaares Uracil-Thymin and Gel G-10.

6-amino-pyrimidin) in Fig. 3. Im Molekulargewicht ist praktisch kein Unterschied vorhanden (Tabelle III) und dennoch ist eine quantitative Trennung der beiden Pyrimidinbasen an einer Säule mit G-15 möglich.

Neben diesem chemisch-molekularen Aufbau der Moleküle können auch solche sterischer Natur für eine unterschiedliche Aufenthaltsdauer des Moleküls in einem Dextrangelbett verantwortlich sein. Diese Beobachtung konnte beim Basenpaar Uracil-Thymin gemacht werden (Fig. 4). Bei einer Tropfgeschwindigkeit von ml/Min. oder langsamer sind die beiden Pyrimidinderivate an G-10 quantitativ voneinander zu trennen, woran vermutlich der räumliche Aufbau der Moleküle nicht unwesentlich beteiligt ist, denn der Unterschied im Molekulargewicht ist sehr gering. Der beachtliche Unterschied im Elutionsverhalten (Separationsvolumen = 35 ml) ist somit auf eine Diffusionsbehinderung des Thymins zurückzuführen. In der schematisierten

Wiedergabe der Elutionsvolumina der Nucleinsäurebausteine in Fig. 5 fällt auf, dass beim Übergang zu den stärker quervernetzten Dextrangelen die Basen Adenin und Guanin sowie das Nucleosid Adenosin viel stärker retardiert werden als die anderen Basen und Nucleoside; letztere erscheinen mit zunehmenden Vernetzungsgrad des

TABELLE I

PROZENTUELLE VERLUSTE DER AN G-15 CHROMATOGRAPHIERTEN NUCLEINSÄUREBAUSTEINE

<i>Nucleinsäurebausteine</i>	<i>Aufgetragene Menge (μg)</i>	<i>Prozentuelle Verluste (Mittelwert von 6 Bestimmungen)</i>
Adenin	150	-3.15 %
Adenosin	150	-2.95 %
Adenosin-5'-monophosphat	150	-2.70 %
Guanin	150	-2.25 %
Guanosin	150	-0.70 %
Guanosin-5'-monophosphat	150	-1.70 %
Cytosin	150	-2.60 %
Cytidin	150	-2.35 %
Cytidin-3'(2')-phosphat	150	-2.40 %
Uracil	150	-2.50 %
Uridin	150	-2.00 %
Uridin-5'-monophosphat	150	-2.15 %
Thymin	150	-2.85 %
Thymidin	150	-2.20 %
Thymidin-5'-monophosphat	150	-2.00 %

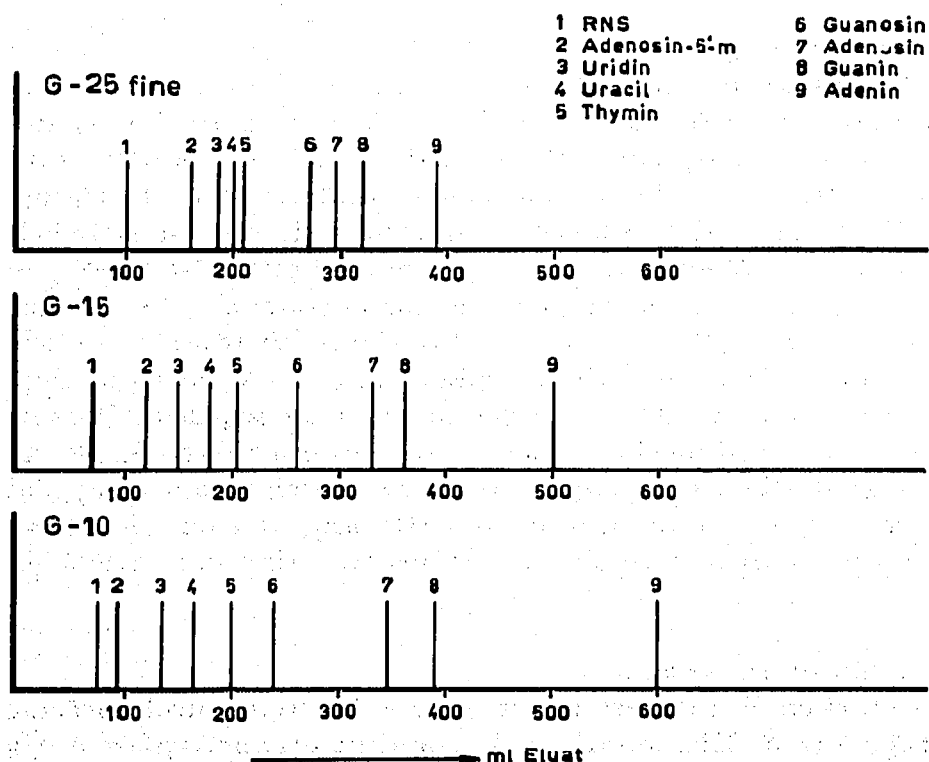


Fig. 5. Schematische Wiedergabe der Peakelutionsvolumina. Einfluss des Vernetzungsgrades der Gele auf das Elutionsverhalten der Nucleinsäurebausteine.

Dextrangels immer früher im Eluat. Das bedeutet aber, dass sämtliche Pyrimidinbasen, deren Nucleoside sowie die Purin- und Pyrimidinnucleotide samt Guanosin beim Übergang zu G-15 und G-10 mehr und mehr ausgeschlossen werden bzw. nimmt ihre Retardierbarkeit immer stärker ab.

Einfluss der Tropfgeschwindigkeit auf die Trennung

Nicht unwesentlich ist die Tropfgeschwindigkeit des Elutionsmittels gerade bei diesen zum Teil recht beachtlich retardierbaren Verbindungen. Eine Erhöhung der Tropfgeschwindigkeit von 5 ml/5 Min. auf 5 ml/1 Min. 30 Sec. hat nur auf die stärker adsorbierten stickstoffhaltigen Heterocyclen wie Adenin, Guanin, Adenosin, Guanosin und Adenosin-5'-monophosphat einen Einfluss; diese Purinderivate werden bei der erhöhten Tropfgeschwindigkeit zum Teil wesentlich früher aus der Säule eluiert, womit aber die quantitative Trennung ein und desselben Gemisches nicht beeinträchtigt wird. So wird Adenin bei sonst gleichen Bedingungen um 24 Fraktionen (120 ml), Guanin um 5, Adenosin um 4, Guanosin um 2 und Adenosin-5'-monophosphat um 2 Fraktionen früher im Eluat erscheinen. Alle anderen in den Diagrammen bzw. der Tabelle III angeführten Purin- und Pyrimidinderivate weisen bei der erhöhten Tropfgeschwindigkeit ein unverändertes Elutionsverhalten auf. Wesentlich ist die Tropfgeschwindigkeit – wie schon oben erwähnt – bei der quantitativen Trennung der Pyrimidinbasen Uracil und Thymin. Ob eine Tropfgeschwindigkeit des Elutionsmittels von 5 ml/5 Min. oder 5 ml/1 Min. 30 Sec. gewählt wird, die Peakelutionsvolumina (= Elutionsvolumen, bei welchem die Substanz im Eluat in maximaler Konzentration erscheint) der beiden Pyrimidinderivate bleiben unverändert, nur ist bei der höheren Tropfgeschwindigkeit keine quantitative Trennung möglich.

Einfluss des pH-Wertes auf die Trennung

Sowohl pH-Wert wie Ionenstärke des Elutionsmittels beeinflussen die Retardierbarkeit der Nucleinsäurebausteine (Fig. 6). So beobachtet man beim Übergang von 0.01 M zu 0.03 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Lösung eine erhöhte Adsorption für Adenin und Guanin und eine gleichzeitige Zunahme des Separationsvolumens. Die Elutionsbanden werden breiter; die Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes ist sichtlich gestört. In diesem Fall wurde der pH-Wert nur um 0.5 erhöht, aber um so mehr die Ionenstärke des Elutionsmittels, woraus die erhöhte Retardierbarkeit der Purinderivate resultiert. 0.01 N HCl und dest. Wasser vermindern die Adsorptionsfähigkeit sämtlicher Purin- und Pyrimidinderivate erheblich, wobei die 0.01 N HCl nur eine qualitative Trennung der Basen Adenin und Guanin gestattet, wogegen dest. Wasser gerade noch eine quantitative Auftrennung des Basenpaares an einer G-10 Säule ermöglicht. Ähnlich verhalten sich die Zuckerderivate dieser Purinbasen (Fig. 6). Lediglich beim Übergang zur 0.03 M Ammoniumkarbonatlösung werden sie etwas schwächer adsorbiert, womit die quantitative Trennung des Guanins von Adenosin erst möglich ist.

Quantitative Auswertung der Elutionsdiagramme

Auf Grund der relativ starken Retardierbarkeit einiger Nucleinsäurebausteine stellt sich die berechtigte Frage, ob die Elution dieser Verbindungen auch quantitativ erfolgt. Für die Auswertung solcher Fraktogramme gibt es bekanntlich mehrere Methoden. In der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Punkte der Elutions-

TABELLE II

PROZENTUELLE VERLUSTE DER AN G-10 CHROMATOGRAPHIERTEN NUCLEINSÄUREBAUSTEINE

<i>Nucleinsäurebausteine</i>	<i>Aufgetragene Menge (μg)</i>	<i>Prozentuelle Verluste (Mittelwert von 6 Bestimmungen)</i>
Adenin	150	-3.50%
Adenosin	150	-2.20%
Adenosin-5'-monophosphate	150	-3.25%
Guanin	150	-2.40%
Guanosin	150	-2.00%
Guanosin-5'-monophosphat	150	-2.35%
Cytosin	150	-2.90%
Cytidin	150	-2.25%
Cytidin-3'(2')-phosphat	150	-2.00%
Uracil	150	-2.35%
Uridin	150	-2.20%
Uridin-5'-monophosphat	150	-2.25%
Thymin	150	-2.35%
Thymidin	150	-1.90%
Thymidin-5'-monophosphat	150	-1.85%

TABELLE III

 K_d UND K_{av} -WERTE DER NUCLEINSÄUREBAUSTEINEElutionsmittel: 0.01 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Lösung

<i>Nucleinsäurebausteine</i>	<i>G-25 fine</i>		<i>G-15</i>		<i>G-10</i>		<i>MG</i>
	K_{av}	K_d	K_{av}	K_d	K_{av}	K_d	
Adenin	2.90	3.51	3.30	4.62	4.20	6.56	135
Adenosin	1.95	2.15	2.00	2.79	2.16	3.37	267
Adenosin-5'-monophosphate	0.60	0.80	0.42	0.58	0.16	0.25	347
Guanin	2.20	2.70	2.30	3.22	2.52	3.93	151
Guanosin	1.70	1.90	1.50	2.09	1.36	2.21	283
Guanosin-5'-monophosphate	0.60	0.80	0.30	0.43	0.12	0.18	363
Uracil	1.00	1.20	0.84	1.18	0.72	1.12	112
Uridin	0.80	1.00	0.61	0.85	0.48	0.75	244
Uridin-5'-monophosphate	0.50	0.70	0.07	0.10	0.08	0.12	324
Cytosin	1.35	1.55	1.07	1.50	0.96	1.50	111
Cytidin	1.05	1.25	0.84	1.18	0.68	1.06	243
Cytidin-3'(2')-phosphate	0.55	0.75	0.27	0.37	0.08	0.12	323
Thymin	1.10	1.30	1.03	1.45	1.00	1.56	126
Thymidin	0.90	1.10	0.73	1.02	0.48	0.75	242
Thymidin-5'-monophosphate	0.55	0.75	0.18	0.26	0.20	0.31	322
Purin	—	—	2.00	2.79	2.16	3.37	120
Xanthin	—	—	1.57	2.20	1.44	2.31	152
Xanthosin	—	—	1.07	1.50	0.84	1.94	284
Hypoxanthin	—	—	1.57	2.20	1.48	2.31	136
Inosin	—	—	1.10	1.50	0.85	1.95	268
5-Methylcytosin	—	—	1.10	1.60	1.00	1.56	125
RNS	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	—
DNS	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	—

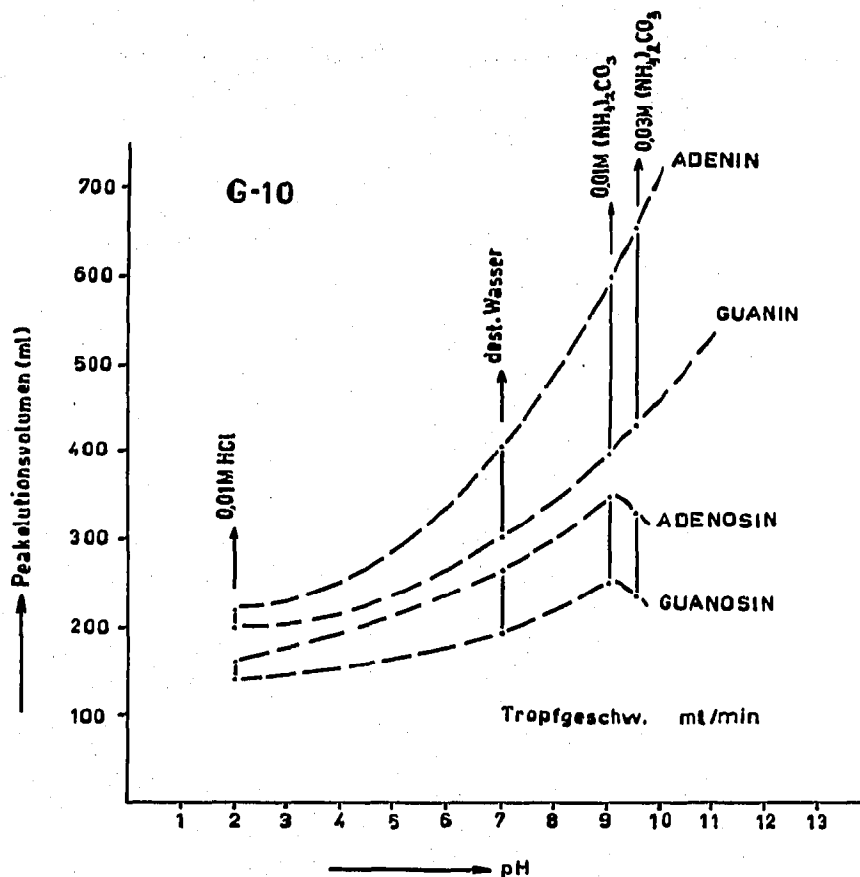


Fig. 6. Änderung des Peakelutionsvolumens durch den pH-Wert sowie Ionenstärke des Elutionsmittels.

banden mit denen einer entsprechenden Eichgeraden verglichen und daraus die Gesamtmenge des eluierten Bausteines ermittelt. Die in den Tabellen I und II angeführten Mittelwerte (Verluste in %) stellen das Mittel aus 6 Einzelwerten dar, wobei die Streuungen um den Mittelwert mit rund $\pm 0.5\%$ angegeben werden können.

Damit ein Vergleich mit anderen Arbeiten möglich ist, bedarf es der Angabe von K_{av} - bzw. K_d - Werten. Die Unsicherheit der Methoden zur Bestimmung des "inneren" Volumens V_i bedeutet, dass andere Parameters gesucht werden müssen um das Elutionsverhalten der Substanzen zu beschreiben. Geeigneter erscheint es den K_{av} -Wert ($K_{av} = V_e - V_0 / V_i - V_0$) nach LAURENT UND KILLANDER⁶ anzugeben, ein Wert in dem das "innere" Volumen V_i nicht berücksichtigt wird. Die in der Formel aufscheinenden Größen (Volumina) sind wesentlich einfacher zu messen. In der Tabelle III sind zum Vergleich beide Konstanten angeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach einem kurzen Hinweis auf Veröffentlichungen, die fast ausschliesslich qualitative Trennungen der Nucleinsäurebausteine an den Dextrangelen beinhalten, wird an Hand von Elutionsdiagrammen und Tabellen demonstriert welche Faktoren für eine quantitative Trennung eines komplizierteren Gemisches verantwortlich sind. Der niedere sowie engere Fraktionierungsbereich der Dextrangele G-15 und G-10 bei

einem Gelbettvolumen von 1.3×150 cm, erlauben es Trennungen von Molekülen vorzunehmen deren Unterschiede im chemisch-molekularen wie im sterischen Aufbau liegen. Auch die Tropfgeschwindigkeit sowie der pH-Wert und die Ionenstärke des Elutionsmittels beeinflussen das Elutionsverhalten der mehr oder minder stark retardierbaren Purin- und Pyrimidinbasen bzw. deren Zuckerderivate. Die im μg -Bereich durchgeführten Trennungen lassen erkennen, dass bei einer quantitativen Auswertung der Elutionsdiagramme nur mit minimalen Verlusten zu rechnen ist. Somit ist diese Art der Gelchromatographie nicht nur eine schnelle sondern auch eine recht genaue analytische Methode um noch kleinste Mengen der in einem Nucleinsäurehydrolysat vorkommenden Basen bzw. Nucleoside auch quantitativ zu erfassen.

LITERATUR

- 1 J. PORATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 193.
- 2 B. GELOTTE, *J. Chromatog.*, 3 (1960) 330.
- 3 S. ZADRAZIL, Z. SORMOVA UND F. SORM, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 26 (1961) 2643.
- 4 TH. HOHN UND W. POLLMANN, *Z. Naturforsch.*, 18b (1963) 919.
- 5 J. DE BERSAQUES, *J. Chromatog.*, 31 (1967) 222.
- 6 T. C. LAURENT UND J. KILLANDER, *J. Chromatog.*, 14 (1964) 317.

J. Chromatog., 37 (1968) 225-233