

CHROM. 7517

## AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AN STATIONÄR GEBUNDENEN OLIGONUKLEOTIDEN

### I. SYNTHESE UND ANWENDUNG VON DESOXYOLIGOTHYIMIDIN-5'-PHOSPHAT-DEAE-CELLULOSE\*

H. SCHOTT

Chemisches Institut der Universität, 1. Auf der Morgenstelle, 74 Tübingen (B.R.D.)

(Eingegangen am 13. März 1974)

#### SUMMARY

*Affinity chromatography on immobilized oligonucleotides. I. Synthesis and application of oligodeoxythymidine 5'-phosphate-DEAE-cellulose*

Poly(vinyl alcohol), when substituted with oligodeoxythymidine 5'-phosphate, undergoes irreversible binding with DEAE-cellulose via the base-pairing mechanism. It is thus possible to separate preparatively synthetic oligonucleotide mixtures using this PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-cellulose using the principle of affinity chromatography. Low-molecular-weight oligomers are specifically separated and fractionated uniformly via the base-pairing theory of Watson and Crick. Pyrophosphate derivatives compete with linear products in the base-pairing process and thus reduce the specificity of the system.

High-molecular-weight oligomers are not separated on this material according to increasing chain length as they form base pairs that have large and overlapping melting ranges. The base-pairing increases with increasing chain length but decreases in the presence of high salt concentrations.

#### EINLEITUNG

Oligonukleotidgemische werden an Oligonukleotid-Cellulosen<sup>1-3</sup> und Nukleosidgelen<sup>4</sup> nach Nukleotid-Sequenzen getrennt. Stationär gebundene Nukleosid- bzw. Oligonukleotidreste treten unter Bedingungen der Basenpaarung mit gelösten Nuklein-

\* Bei Abkürzungen werden prinzipiell IUPAC-IUB Regeln befolgt (*Eur. J. Biochem.*, 15 (1970) 203). Das Präfix d (für Desoxy) entfällt, da in dieser Veröffentlichung nur Desoxyribonukleotide behandelt werden. A<sub>260</sub>-Einheit = Nukleotid-Menge in 1 cm<sup>3</sup> Solvens, die bei 260 nm die Absorption 1 ergibt (Schichtdicke 1 cm). TPS = Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid; PVOH = Polyvinylalkohol; HMPT = Hexamethylphosphorsäuretriamid; TEAB = Triäthylammoniumcarbonat-Puffer (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose = Desoxyoligothymidin-5'-phosphat-DEAE-Cellulose.

säurebausteinen in Wechselwirkung. Polymergebundene Nucleosidreste adsorbieren über einen unspezifischen Stapelkontakt Purinnucleotide stärker als Pyrimidinnucleotide, dagegen bilden polymer gebundene Oligonucleotide nur mit im Sinne von Watson und Crick komplementären Partnern der mobilen Phase spezifische Basenpaare. Aufgrund dieser unterschiedlichen Basenpaarungsmechanismen werden Oligonucleotide an Nucleosidgelen nach Purin- und Pyrimidinmonomereinheiten, an Oligonucleotid-Cellulosen in komplementäre und nicht komplementäre Verbindungen getrennt. Trennungen im präparativen Massstab sind bislang an Oligonucleotid-Cellulosen nicht möglich, da eine chemische Synthese der hierzu erforderlichen Sorbensmenge mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden ist.

Wir haben gefunden, dass löslicher, mit Desoxyoligothymidin-5'-phosphaten hoch substituierter PVOH als Polyanion an dem Anionenaustauscher DEAE-Cellulose irreversibel adsorbiert wird<sup>5,6</sup>. DEAE-Cellulose kann ohne Minderung guter Laufeigenschaften mit polymergebundenen Oligonucleotiden so hoch beladen werden, dass präparative Trennungen von Oligonucleotidgemischen über den Basenpaarungsmechanismus nach Watson und Crick möglich sind, wie in der vorliegenden Arbeit anhand von Beispielen gezeigt wird.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

Reagenzien: technisches Pyridin 1:1 über KOH destilliert, Triäthylamin 1:1 destilliert, Äther 1:1 über Na destilliert, HMPT über Molekularsieb getrocknet, PVOH (C. Roth, Karlsruhe, B.R.D.), MGN 70 000, DEAE-Cellulose (Whatman DE 23), Nucleotide (Waldhof, Mannheim, B.R.D.), TPS (EGA-Chemie, Steinheim, B.R.D.) wie geliefert verwendet, Enzyme (Böhringer, Mannheim, B.R.D.).

#### Synthese von $PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose

Die Darstellung der  $PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose erfolgt in drei Stufen. Aus käuflichem Desoxythymidin-5'-phosphat werden nach einer modifizierten Methode von Khorana<sup>7</sup> mit Hilfe von TPS Oligothymidin-5'-phosphate mit bis zu maximal zwölf Monomereinheiten kondensiert und an DEAE-Cellulose säulenchromatographisch in nieder- und hochmolekulare Oligonucleotidfraktionen getrennt. Die hochmolekularen Oligonucleotide kondensiert man mit Hilfe von TPS in HMPT-Pyridin an freie Hydroxylgruppen des  $PVOH^{5,6}$ .  $PV(pT)_n$  wird in wässriger Lösung mit DEAE-Cellulose gebatcht und in einer Chromatographiesäule vor dem Gebrauch von Verunreinigungen und schwach adsorbierten Oligomeren befreit.

Synthese von  $Poly(pT)_n$ . 20 mMol (176 000  $A_{260}$ -Einheiten) pT (Pyridiniumsalzform) werden in wasserfreiem Pyridin suspensiert, durch wiederholtes Abrotieren mit trockenem Pyridin im Öl-Vakuum absolutiert und in 40 ml Pyridin in 20 mMol (6 g) TPS für 10 h bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluss und Schütteln kondensiert. Mit 40 ml Wasser bricht man die Kondensationsreaktion ab, lässt den Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur stehen und verdünnt das Reaktionsgemisch mit Wasser auf eine 0.04 M Lösung, die auf eine 1000 ml DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen wird. Mit Wasser wird die Säule pyridinfrei gewaschen. Im anschließenden 0.3 M TEAB verlassen niedermolekulare Oligomere (ca. 80% der Kondensationsprodukte)  $Poly(pT)_{-5}$  die Säule, während im 1 M TEAB höher molekulare Komponenten (ca. 20% der Kondensationsprodukte)  $Poly(pT)_{-5}$  eluiert werden. Die ver-

einigten niedermolekularen Nukleotidfraktionen werden unter Zusatz von Pyridin im Vakuum von TEAB befreit, auf absolutes Pyridin gebracht und erneut polykondensiert. In vier Kondensationsreaktionen erhält man aus 80 mMol pT *ca.* 64 mMol Poly(pT)<sub><5</sub> und *ca.* 16 mMol Poly(pT)<sub>>5</sub>. Die vereinigten Fraktionen der höhermolekularen Nukleotide (140 000 *A*<sub>260</sub>-Einheiten) werden in absolutem Pyridin zur Spaltung von Pyrophosphatderivaten, die sich neben linearen und zyklischen Verbindungen bilden, mit Essigsäureanhydrid behandelt<sup>6</sup> und anschliessend auf einer 1000 ml DEAE-Cellulose-Säule nachgetrennt. Die Säule wird mit 0.3 *M* TEAB von niedermolekularen Verbindungen befreit und anschliessend im linearen Gradienten (5 l 0.3 *M* TEAB im Mischgefäss, 5 l 0.7 *M* TEAB im Vorratsgefäss) eluiert. Poly(pT)<sub>>7</sub> (37 000 *A*<sub>260</sub>-Einheiten) werden vereinigt, von TEAB befreit, auf absolutes Pyridin gebracht, mit Essigsäureanhydrid in 3'-Stellung acetyliert und aus Äther gefällt. Nach dem Trocknen erhält man 1.5 g Poly(pT(Ac))<sub>>7</sub>, die an PVOH kondensiert werden.

*Synthese von PV(pT)<sub>n</sub>*. 300 mg gepulverter, getrockneter PVOH wird in 10 ml trockenem HMPT eingerührt, in der Wärme gelöst und mit 10 ml Pyridin versetzt. 1.4 g acetyliertes, trockenes Poly(pT(Ac))<sub>>7</sub> wird bei Raumtemperatur in 10 ml trockenem Pyridin suspensiert, mit 600 mg TPS (2 mMol) versetzt und unter Feuchtigkeitsabschluss nach *ca.* 30 min der warmen Polymerlösung zugegeben. Nach *ca.* 3 h Schütteln bei Raumtemperatur wird der hochviskos gewordene Ansatz mit 8 ml HMPT/10 ml Pyridin versetzt, weiter 12 h kondensiert und anschliessend aus Äther gefällt. Der abzentrifugierte Niederschlag wird unter leichtem Erwärmen in Wasser gelöst, die Lösung mit *ca.* 2 ml konz. NH<sub>4</sub>OH zur hydrolytischen Entfernung der Acetylschutzgruppen versetzt und nach 12 h mit Kohlendioxyd-Gas neutralisiert.

*Beladung von DEAE-Cellulose mit PV(pT)<sub>n</sub>*. Bei Raumtemperatur werden in die neutrale PV(pT)<sub>n</sub>-Lösung 100 ml gequollene DEAE-Cellulose langsam eingerührt. Die Suspension wird weitere 4 h gerührt und anschliessend in einer, mit Fritte (D<sub>1</sub>) und Kühlmantel versehenen Chromatographie-Säule (30 × 2 cm) mit 0.04 *M* TEAB-20% Methanol pyridinfrei gewaschen. Im linearen TEAB-Gradienten (2 l 0.04 *M* TEAB im Mischgefäss, 2 l 0.7 *M* TEAB im Vorratsgefäss) entfernt man niedermolekulare Verbindungen, spült die Säule mit Wasser TEAB-frei und eluiert mit 0.5 *M* NaCl-Puffer bei 60° so lange, bis die Extinktion des Eluats auf *ca.* 0.2 *A*<sub>260</sub>-Einheiten sinkt. Von *ca.* 30 000 *A*<sub>260</sub>-Einheiten Poly(pT)<sub>>7</sub>, die zur Kondensation an PVOH eingesetzt werden, bleiben nach der Kondensation und Elution *ca.* 8000 *A*<sub>260</sub>-Einheiten PV(pT)<sub>n</sub> irreversibel gebunden.

#### *Synthese von Poly(pA)<sub>n</sub>*

In Analogie zur Synthese von Poly(pT)<sub>n</sub> werden 11 mMol (201 000 *A*<sub>280</sub>-Einheiten) N-Benzoyl-desoxyadenosin-5'-phosphat (ref. 7) kondensiert und an einer 1000 ml DEAE-Cellulose-Säule in Fraktionsbereiche vorgetrennt. Die Fraktionsbereiche werden nach dem Einrotieren 3 Tage zur hydrolytischen Entfernung der N-Benzoylschutzgruppen in Methanol, das mit Ammoniak gesättigt ist, bei Raumtemperatur belassen und anschliessend an einer 400 ml DEAE-Cellulose-Säule im steigenden TEAB-Gradienten rechromatographiert, wobei die in Fig. 1-3 gezeigten Elutionsprofile erhalten werden.

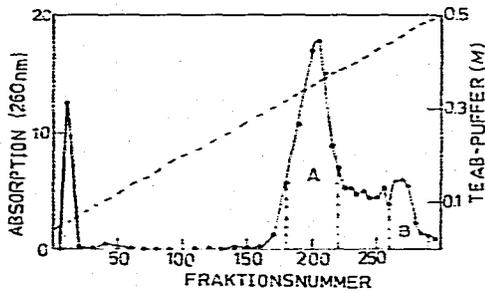


Fig. 1. Säulenchromatographische Nachtrennung eines niedermolekularen Fraktionsbereichs der N-Benzoyl-desoxyadenosin-5'-phosphat-Polykondensation nach hydrolytischer Entfernung der N-Benzoylschutzgruppen an DEAE-Cellulose. Säulenmasse: 58 · 3 cm. Die Elution erfolgt im linearen TEAB-Gradienten. 3 l 0.04 M TEAB im Mischgefäß, 3 l 0.5 M TEAB in 10% Methanol im Vorratsgefäß. Fraktionen zu 20 ml/20 min werden gesammelt und innerhalb der senkrechten Strichelung unter Peak A und B vereinigt.

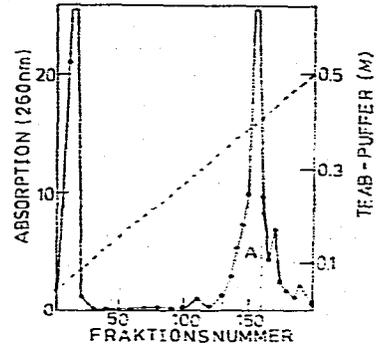


Fig. 2. Säulenchromatographische Nachtrennung eines niedermolekularen Fraktionsbereichs der N-Benzoyl-desoxyadenosin-5'-phosphat-Polykondensation nach hydrolytischer Entfernung der N-Benzoylschutzgruppen an DEAE-Cellulose. Säulenmasse: 58 · 3 cm. Die Elution erfolgt im linearen TEAB-Gradienten. 2 l Wasser im Mischgefäß, 2 l 0.5 M TEAB in 20% Methanol im Vorratsgefäß. Fraktionen zu 20 ml/20 min werden gesammelt und innerhalb der senkrechten Strichelung unter Peak A vereinigt.

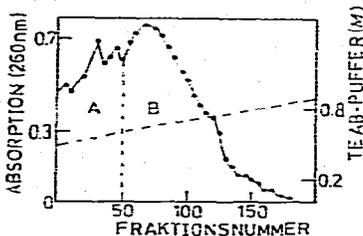


Fig. 3. Säulenchromatographische Nachtrennung eines hochmolekularen Fraktionsbereichs der N-Benzoyl-desoxyadenosin-5'-phosphat-Polykondensation nach hydrolytischer Entfernung der N-Benzoylschutzgruppen an DEAE-Cellulose. Säulenmasse: 58 · 3 cm. Die Elution erfolgt im linearen TEAB-Gradienten: 2 l 0.5 M TEAB im Mischgefäß, 2 l 0.9 M TEAB im Vorratsgefäß. Fraktionen zu 20 ml/20 min werden gesammelt und innerhalb der senkrechten Strichelung unter Peak A und B vereinigt.

#### Affinitätschromatographie an $PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose

$PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose, durch Elutionsprozesse auf ca. 70 ml geschrumpft, wird mit einer 2 cm hohen Schicht unbeladbarer DEAE-Cellulose überdeckt. Probegemische (1000  $A_{260}$ -Einheiten/ml) trägt man in 0.5–1.0 M NaCl/0.01 M  $Na_2HPO_4$ -Puffer pH 6.8 bei 40° auf, lässt die Lösung einsinken und eluiert die auf 0° gekühlte Säule im Salzpuffer. Der Elutionsvorgang wird mit Hilfe eines UV-Messgerätes automatisch registriert. Fraktionen zu 20 ml/h werden gesammelt. Der Temperaturgradient erfolgt mittels Thermostaten stufenweise, wobei die Elutionsgeschwindigkeit bis auf 40 ml/h gesteigert wird. Extinktionswerte der einzelnen Fraktionen werden an

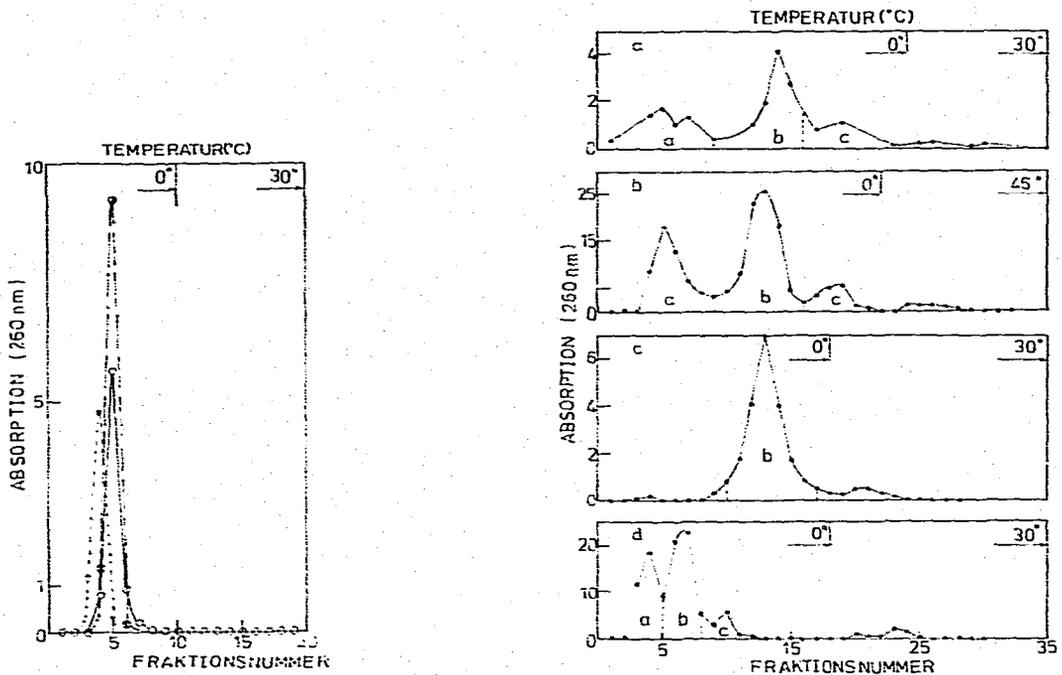


Fig. 4. Affinitätschromatographie von  $pA_1$  (—),  $pA_2$  (---) und  $(pT)_8$  (●---●) an  $PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose in 0,5 M NaCl bei 0 bis 30°. Säulenmasse: 23 × 2 cm. Fraktionen zu 20 ml/h werden gesammelt.

Fig. 5. (a) Affinitätschromatographie von 600  $A_{260}$ -Einheiten aus Peak A der Fig. 1 an  $PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose in 0,5 M NaCl-Puffer bei 0 bis 30°. Säulenmasse: 23 × 2 cm. Fraktionen zu 20 ml/h werden gesammelt und innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt. (b) Affinitätschromatographie von 3600  $A_{260}$ -Einheiten aus Peak A der Fig. 1 bei 0 bis 45° unter analogen Bedingungen. (c) Affinitätschromatographie von 350  $A_{260}$ -Einheiten aus den vereinigten Peaks b der Fig. 5a, b, d unter analogen Bedingungen. (d) Affinitätschromatographie von 2400  $A_{260}$ -Einheiten aus Peak A der Fig. 1 in 1 M NaCl-Puffer unter analogen Bedingungen. In Peak a werden nicht hybridisierfähige Verbindungen, in Peak b  $pA_3$  und in Peak c ein Pyrophosphatderivat eluiert.

einem Spektralphotometer bestimmt und sind in den Fig. 1–8 grafisch gegen Fraktionsnummern aufgetragen. Vereinigte Peakfraktionen entsalzt man säulenchromatographisch an Sephadex G-10 oder an DEAE-Cellulose.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Unter Bedingungen der Basenpaarung weist DEAE-Cellulose wegen der hohen Salzkonzentration des Puffers keine Anionenaustauschereigenschaften auf, so dass die synthetischen Oligonukleotide, Poly(pA)<sub>n</sub> und Poly(pT)<sub>n</sub>, das Sorbens ohne Retardierung passieren.  $PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose zeigt unter diesen Bedingungen ebenfalls keine Austauscherwirkung, da die kovalent an PVOH gebundenen Oligothymidin-5'-phosphate als Polyanionen funktionelle Gruppen der DEAE-Cellulose irreversibel blockieren, und die hohe Salzkonzentration des Puffers zusätzlich eine ionische Ad-

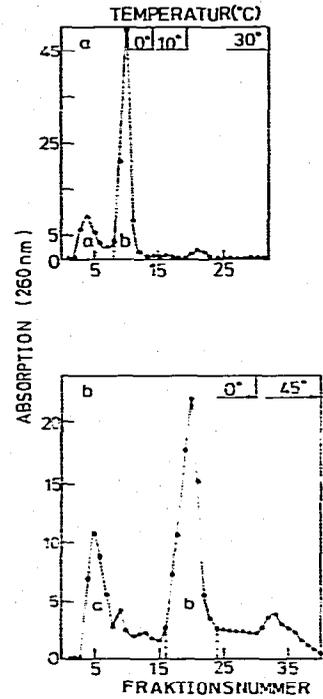
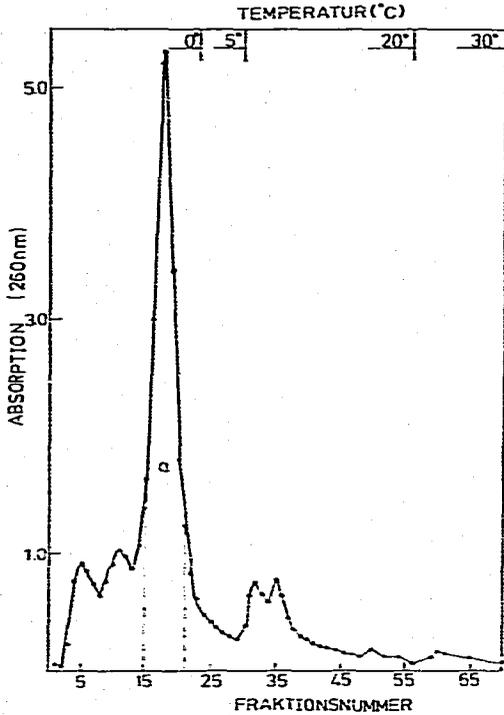


Fig. 6. Affinitätschromatographie von 980  $A_{260}$ -Einheiten aus Peak B der Fig. 1 an PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose in 0.5 M NaCl-Puffer bei 0° bis 30°. Säulenmasse: 23 × 2 cm. Fraktionen zu 20 ml/h werden gesammelt und innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt. In Peak a wird pA<sub>4</sub> eluiert.

Fig. 7. (a) Affinitätschromatographie von 2600  $A_{260}$ -Einheiten aus Peak A der Fig. 2 an PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose in 1 M NaCl-Puffer bei 0° bis 30°. Säulenmasse: 23 × 2 cm. (b) Affinitätschromatographie von 4000  $A_{260}$ -Einheiten aus Peak A der Fig. 2 in 0.5 M NaCl-Puffer bei 0° bis 45°. Fraktionen zu 20 ml/h werden gesammelt und innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt. In Peak b werden Pyrophosphatderivate eluiert.

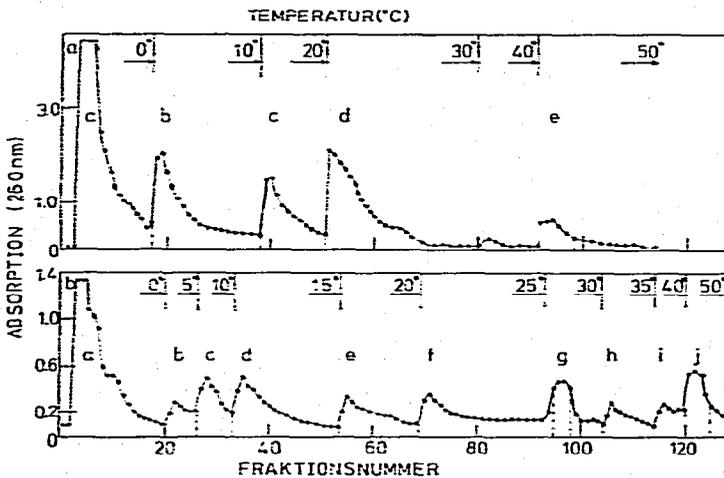


Fig. 8. (a) Affinitätschromatographie von 2400  $A_{260}$ -Einheiten aus Peak A der Fig. 3 an PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose in 1 M NaCl-Puffer bei 0° bis 50°. Säulenmasse: 23 × 2 cm. (b) Affinitätschromatographie von 800  $A_{260}$ -Einheiten aus Peak B der Fig. 3 unter analogen Bedingungen. Fraktionen zu 20 ml/h werden gesammelt. In Peak b-j wird pA<sub>4</sub> eluiert.

sorption ausschliesst. Trotzdem werden synthetische Oligonukleotide an PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose unterschiedlich stark adsorbiert, wobei Poly(pT)<sub>n</sub> keine Retardierung erfahren, während Poly(pA)<sub>n</sub> mit zunehmender Monomereinheit stärker adsorbiert werden. In Tabelle I sind die Ergebnisse dieser Trennung zusammengestellt.

Fig. 4 zeigt, dass Poly(pT)<sub>>8</sub> schwächer als pA und pA<sub>2</sub> an PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose retardiert werden. Dieser Befund zeigt eindeutig, dass dieses Sorbens keine ionischen Adsorptionseffekte aufweist, da an einem Anionenaustauscher höhermolekulare Nukleotide unabhängig vom Basenrest stärker als niedermolekulare adsorbiert werden. Stationär gebundene Oligothymidin-5'-phosphate treten über den Basenpaarungsmechanismus nur mit den im Sinne von Watson und Crick komplementären Oligoadenosin-5'-phosphaten in Wechselwirkung, wenn die Oligomeren der mobilen Phase mindestens drei Monomereinheiten aufweisen, wie das folgende Trennbeispiel zeigt.

Die Komponenten (600 A<sub>260</sub>-Einheiten) des Elutionsgipfels A aus Fig. 1 werden in 0.5 M NaCl-Puffer bei 0° zu 70% in drei Peaks a, b, c eluiert, während 10% nach Temperaturerhöhung (bis 30°) eluiert werden (vgl. Fig. 5a). Eine Auftrennung von

TABELLE I

DATEN DER AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE VON OLIGONUKLEOTIDGEMISCHEN AN PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-CELLULOSE

Nukleotid/ Peakfraktion aus Fig. (No.)	A <sub>260</sub> -Einheiten		Eluiert in Peak (a-j)	Nukleotid	Fig.
	Aufgetragen	Isoliert			
pA	260	240	240 (a)	pA	4
pA <sub>2</sub>	140	148	148 (a)	pA <sub>2</sub>	4
(pT) <sub>&gt;8</sub>	140	147	147 (a)	(pT) <sub>8</sub>	4
A (1)	600	530	190 (a)	X*	5a
			180 (b)	pA <sub>3</sub>	5a
			50 (c)	X**	5a
A (1)	3600	3200	1200 (a)	X*	5b
			1380 (b)	pA <sub>3</sub>	5b
			410 (c)	X**	5b
A (1)	2400	2200	670 (a)	X*	5d
			950 (b)	pA <sub>3</sub>	5d
			310 (c)	X**	5d
b (5a, b, d)	350	336	330 (b)	pA <sub>3</sub>	5c
B (1)	980	840	420 (a)	pA <sub>2</sub>	6
A (2)	2600	2420	1620 (b)	X**	7a
A (2)	4000	3700	2300 (b)	X**	7b
A (3)	2400	1940	540 (a)		
			230 (b)		
			160 (c)		
			300 (d)		
			50 (e)		
B (3)	800	830	280 (a, b)		
			150 (c, d)		
			160 (e, f, g)		
			120 (h, i, j)		

\* Nicht identifizierte Verbindung.

\*\* Pyrophosphatderivat.

Komponenten, die an DEAE-Cellulose gemeinsam eluiert werden, zeigt, dass  $PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose Verbindungen nicht nach Anionenladung, sondern hybridisierfähige von weniger hybridisierfähigen trennt. Die Fraktionen unter Peak a sind gelb gefärbt und weisen keine pA entsprechenden Extinktionsverhältnisse bei 250/260 und 280/260 auf. Der papierchromatographische Test zeigt, dass Peak a mehrere Verbindungen enthält, die aufgrund von Bandenbildung nicht identifizierbar sind. Da diese Produkte auch bei späteren Trennungen auftreten, werden in diesen Fraktionen vermutlich nicht hybridisierfähige Produkte eluiert, die sich in erheblichem Prozentsatz bei einer chemischen Polykondensation als Nebenprodukte bilden und an DEAE-Cellulose gemeinsam mit hybridisierfähigen Nukleotiden eluiert werden. In Peak b wird reines  $pA_3$  eluiert, während im Peak c eine schwach verunreinigte Verbindung enthalten ist, die aufgrund ihres  $R_F$ -Wertes und der enzymatischen Hydrolyse ein Pyrophosphatderivat vermuten lässt. Die  $R_F$ -Werte aller chromatographierten Verbindungen sind in Tabelle II zusammengestellt. Fig. 5b zeigt das Elutionsdiagramm einer sechsfach größeren Nukleotidmenge (3600  $A_{260}$ -Einheiten) aus Peak A der Fig. 1, die unter gleichen Bedingungen an  $PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose chromatographiert wird. Peak a ist unaufgelöst, wird aber deutlich von b und c getrennt eluiert, so dass 3600  $A_{260}$ -Einheiten die Trennkapazität der Säule nicht erschöpfen.

Wie Fig. 5d zeigt, sinkt die Trennleistung der  $PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose, wenn die Elution im 1 M NaCl-Puffer erfolgt. Steigende Salzkonzentration wirkt sich negativ auf den Basenpaarungsmechanismus aus, so dass die Komponenten schwächer adsorbiert und daher früher und schlechter aufgelöst eluiert werden. Die Trennungen sind reproduzierbar, wie eine Rechromatographie der vereinigten Fraktionen aus den b-Peaks der Fig. 5a, b, d in 0.5 M NaCl-Puffer beweist (vgl. Fig. 5c).

In folgenden Beispielen werden Aliquote der Verbindungen des Elutionsgipfels B der Fig. 1 in 0.5 M NaCl chromatographiert. Diese Verbindungen weisen gegenüber den Komponenten aus Peak A eine höhere Anionenladung auf, da sie an DEAE-Cellulose stärker retardiert werden. Wie Fig. 6 zeigt, wird auch an  $PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose die Hauptmenge der aufgetragenen  $A_{260}$ -Einheiten eindeutig stärker retardiert. Ein Teil der aufgetragenen Komponenten wird bei 0° vor Peak a, 50° im Peak a und der Rest bei Temperaturerhöhung (30°) eluiert. Peak a liegt im Elutionsdiagramm (Fig. 6) etwa an der Stelle, die Peak c in Fig. 5a, b einnimmt. Im Papierchromatogramm und durch enzymatische Hydrolyse werden Verbindungen unter Peak a als  $pA_2$  identifiziert. Das Pyrophosphatderivat (Peak c) und  $pA_3$  (Peak a) werden sowohl an DEAE-Cellulose als auch an  $PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose mit annähernd gleicher Stärke adsorbiert. Beide Verbindungen bilden bei gleicher Anionenladung gleich starke Basenpaare. Die Basenpaarung ist daher nicht auf lineare Verbindungen beschränkt, sondern tritt auch bei Pyrophosphatderivaten auf. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Auftrennung synthetischer Oligonukleotidgemische in molekulareinheitliche Verbindungen bei Anwesenheit von Pyrophosphatderivaten erheblich erschwert ist. Dieser Befund bestätigt sich durch die Chromatographie der Komponenten aus Peak A der Fig. 2, die an DEAE-Cellulose an der Stelle eluiert werden, die Peak B in Fig. 1 einnimmt. Peak b (Fig. 7a, b), in dem 60% der aufgetragenen Nukleotide eluiert werden, enthält ein Pyrophosphatderivat, das mit dem Produkt aus Peak c in Fig. 5a, b, d identisch ist.

Die eindeutigen Ergebnisse, die bei der Trennung niedermolekularer Oligonukleotidgemische erzielt werden, wiederholen sich nicht bei der Trennung höher-

TABELLE II

## PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE IDENTIFIZIERUNG DER PEAKFRAKTIONEN AUS FIG. 5-8

Laufmittelsysteme: (A) Äthanol-1 M Ammoniumacetat (pH 7.5) (7:3); (B) *n*-Propanol-NH<sub>2</sub>OH (konz.)-Wasser (55:10:35); (C) Isobuttersäure-NH<sub>2</sub>OH (konz.)-Wasser (66:1:33).

Peak (Fig. No.)	<i>R<sub>F</sub></i> -Wert			Nukleotid
	A*	B*	C**	
a (5a-d)	Bande	Bande		X <sup>§</sup>
b (5a-d)	0.16	0.60	--	pA <sub>3</sub>
	0.06***	0.44***	--	pA <sub>4</sub> ***
c (5a-d)	0.46	0.85	--	Pyrophosphat
	0.17***	0.67***	--	X <sup>§</sup>
a (6)	0.06	0.44	--	pA <sub>4</sub>
a (7a, b)	Bande	Bande	--	X <sup>§</sup>
b (7a, b)	0.46	0.85	--	Pyrophosphat
	0.17***	0.67***	--	X <sup>§</sup>
b (8a)			0.94	
			0.36***	
c (8a)			0.89	
			0.28***	
d (8a)			0.80	
e (8a)			0.46	pA <sub>4</sub>
g (8b)			0.86	
			0.34***	
j (8b)			0.94	
			0.36***	

\* Relativ zu pA.

\*\* Relativ zu pA<sub>4</sub>.

\*\*\* Spuren.

§ Nicht identifizierte Verbindungen.

molekularer Nukleotidgemische aus den Peakfraktionen A und B in Fig. 3. Diese Komponenten sind papierchromatographisch nicht zu charakterisieren, da ihre zu heterogene Zusammensetzung im Papierchromatogramm zu unaufgelösten Banden führt. Ein grosser Prozentsatz der aufgetragenen Nukleotide aus den Fraktionen A und B wird an PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose nicht retardiert, während die restlichen Oligomeren stärker als niedermolekulare Verbindungen adsorbiert werden. Die adsorbierten Produkte werden bei höherer Temperatur in asymmetrischen Peaks eluiert. Die Elutionsdiagramme (vgl. Fig. 8a, b) lassen eine Auftrennung der Nukleotidgemische nach Kettengliederzahl vermuten, da sie mit Diagrammen übereinstimmen, die für analoge Trennungen in der Literatur<sup>1,2</sup> beschrieben werden. Ein papierchromatographischer Test zeigt aber, dass die Fraktionen unter Peak b-j der Fig. 8a, b zwar aufgelockerte Banden, aber keine identifizierbaren Flecken bilden, deren *R<sub>F</sub>*-Werte keinen Zusammenhang zwischen Elutionstemperatur und Molekülgrösse der Nukleotide erkennen lassen. Diese unerwarteten Trennergebnisse sind folgendermassen zu deuten: Synthetische Nukleotidgemische enthalten lineare und Pyrophosphatderivate, die bei der Basenpaarung in Konkurrenz treten und dadurch die Selektivität des Basenpaarungsmechanismus herabsetzen, wie die Trennungen niedermolekularer Nukleotidgemische zeigen. Ausserdem hängt die Schmelztemperatur der Basen-

paare sowohl von der Länge der mobilen als auch der stationär gebundenen Oligonukleotide ab<sup>3</sup>. Beispielsweise wird pA<sub>8</sub> an Cellulose pT<sub>9</sub> bei 26°, an Cellulose pT<sub>12</sub> bei 20.5° eluiert<sup>3</sup>. An PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose sind hochmolekulare Thymidin-5'-phosphat-Oligonukleotide mit breiter Molekulargewichtsverteilung stationär gebunden, die mit komplementären Adenosin-5'-phosphat-Oligomeren Basenpaare unterschiedlicher Stabilität bilden. Bei Temperaturerhöhung dissoziieren diese Basenpaare in breiten, sich überlappenden Schmelzintervallen. Hierdurch ist eine scharfe Trennung der Nukleotidgemische in molekulareinheitliche Fraktionen nicht mehr möglich. Oligonukleotid-DEAE-Cellulose, an der molekularuneinheitliche Oligomere fixiert sind, eignet sich somit nur zur Trennung niedermolekularer Nukleotidgemische, die unter diesen Bedingungen scharfe Schmelzpunkte bilden.

Durch Partialhydrolyse von DNA- und RNA-Molekülen sind lineare niedermolekulare Oligonukleotidfragmente leicht zugänglich. Aufgrund der hier gezeigten Trennergebnisse sollten diese Fragmente an Oligonukleotid-DEAE-Cellulose spezifisch im präparativen Massstab zu trennen sein. Auf diesem Wege wären kurze Oligonukleotidblöcke definierter Sequenz bedeutend einfacher als durch chemische Synthese zu erhalten.

#### DANK

Herrn Prof. Dr. E. Bayer danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Mit Oligodesoxythymidin-5'-phosphatresten substituierter Polyvinylalkohol wird an DEAE-Cellulose unter Bedingungen der Basenpaarung irreversibel adsorbiert. PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose ermöglicht synthetische Oligonukleotidgemische im präparativen Massstab nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie zu trennen. Lineare niedermolekulare Oligomere werden über den Basenpaarungsmechanismus nach Watson und Crick spezifisch in molekulareinheitliche Fraktionen getrennt. Pyrophosphatderivate treten bei der Basenpaarung mit linearen Oligomeren in Konkurrenz. Hochmolekulare Oligonukleotidgemische werden an diesem Sorbens nicht nach steigender Kettengliederzahl getrennt, da sie mit den molekularuneinheitlichen stationär gebundenen Partnern Basenpaare bilden, die in breiten, sich überlappenden Schmelzintervallen dissoziieren. Die Basenpaarung verstärkt sich mit zunehmender Kettengliederzahl und nimmt in hoher Salzkonzentration ab.

#### LITERATUR

- 1 P. T. Gilham, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86 (1964) 4982.
- 2 P. T. Gilham und W. E. Robinson, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86 (1964) 8985.
- 3 C. R. Astel, M. T. Doel, A. Jahnke und M. Smith, *Biochemistry*, 12 (1973) 5068.
- 4 H. Schott und G. Greber, *Makromol. Chem.*, 149 (1971) 253, 261.
- 5 H. Schott, *Angew. Chem.*, 85 (1973) 263; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 12 (1973) 246.
- 6 H. Schott, F. Brandstetter und E. Bayer, *Makromol. Chem.*, 173 (1973) 247.
- 7 K. L. Agarwal, A. Yamazaki, P. J. Cashion und H. G. Khorana, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 11 (1972) 451.
- 8 S. A. Narang, J. J. Michniewicz und S. K. Dheer, *J. Amer. Chem. Soc.*, 91 (1969) 936.