

CHROM. 8525

## TEMPLATE-CHROMATOGRAPHIE AN STATIONÄR GEBUNDENEN OLIGONUKLEOTIDEN

### SYNTHESE UND ANWENDUNG VON OLIGODESOXYADENOSIN-5'-PHOSPHAT-DEAE-ZELLULOSE\*

J. SCHOTT

Chemisches Institut der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, Tübingen (B.R.D.)

(Eingegangen am 16. Juni 1975)

---

#### SUMMARY

*Template chromatography on immobilized oligonucleotides. Synthesis and application of oligodeoxyadenosine-5'-phosphate-DEAE-cellulose*

Oligomers of deoxyadenylic acid, obtained by polycondensation, were covalently attached to polyvinyl alcohol. These polymer-bound oligonucleotides undergo very strong adsorption on DEAE-cellulose such that at neutral pH and with 1 M NaCl, partial desorption occurs only above 60°. The use of this PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-cellulose for the column chromatographic separation of deoxythymidylic acid oligomers obtained by polycondensation, according to the principle of base-pairing, is discussed.

Linear oligomers and also pyrophosphate derivatives of thymidylic acid which contain more than five monomer units undergo strong retardation under the conditions of base-pairing. Cyclic oligonucleotides do not show any noticeable interaction with the stationary phase. Thus, through the use of a temperature gradient, it is possible to fractionally separate the polycondensate, giving an average degree of polymerisation of 6-10.

---

#### EINFÜHRUNG

Die Template-Chromatographie ist ein säulenchromatographisches Verfahren zur selektiven Trennung von Oligonukleotidgemischen an stationär gebundenen Oligonukleotiden definierter Sequenz<sup>1</sup>. Die stationäre Fixierung von Nukleotiden durch kovalenten Einbau in eine Zellulosematrix, wie sie bisher in der Literatur<sup>2-9</sup> be-

---

\* Bei Abkürzungen werden prinzipiell IUPAC-IUB Regeln befolgt (*Eur. J. Biochem.*, 15 (1970) 2-3). Das Präfix d (für Desoxy) entfällt, da in dieser Veröffentlichung nur Desoxyribonucleotide behandelt werden. E<sub>260</sub>-Einheit = Nukleotidmenge in 1 cm<sup>3</sup> Solvens, die bei 260 nm die Extinktion 1 ergibt (Schichtdicke 1 cm). TPS = Triisopropylbenzoesulfonsäurechlorid; PVOH = Polyvinylalcohol; HMPT = Hexamethylphosphorsäuretriamid; TEAB = Triäthylammoniumhydrogencarbonatpuffer, (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-Zellulose = Oligodesoxythymidin-5'-phosphat-DEAE-Zellulose; PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose = Oligodesoxyadenosin-5'-phosphat-DEAE-Zellulose.

geschrieben wird, erfordert grossen, experimentellen Aufwand, verläuft in geringen Ausbeuten, kann zu unerwünschten Nebenreaktionen führen und begünstigt sterische Hinderung.

Wir haben daher ein neues Konzept entwickelt, um Oligonukleotide über Nebervalenzbindungen an DEAE-Zellulose irreversibel zu binden<sup>10</sup>. Durch Veresterung von Oligonukleotiden mit löslichem PVOH<sup>11,12</sup> erhält man Polyanionen, die an DEAE-Zellulose bedeutend stärker als freie Oligonukleotide adsorbiert werden. Unter Bedingungen der Basenpaarung bleiben polymergebundene Oligonukleotide irreversibel an der DEAE-Zellulose-Matrix adsorbiert und treten mit komplementären Partnern der mobilen Phase in unterschiedlich starke Wechselwirkungen, während nicht komplementäre Oligonukleotide die Säule ohne merkliche Retardierung passieren. Durch die Nebervalenzbindungen sind die stationär gebundenen Oligonukleotide für die Verbindungen der mobilen Phase leicht zugänglich, da sterische Hinderungen weitgehend ausgeschlossen sind.

Im Gegensatz zur Synthese von Oligonukleotid-Zellulose<sup>2,3,7,8</sup>, die nur in analytischen Ansätzen praktikabel ist, kann man Oligonukleotid-DEAE-Zellulose in präparativen Mengen darstellen. Gerade für die von uns angestrebte, präparative Isolierung von definierten Oligonukleotiden aus leicht zugänglichen RNA- und DNA-Hydrolysaten, ist die Darstellung von Oligonukleotid-DEAE-Zellulose im präparativen Massstab eine wesentliche Voraussetzung. Die Verwirklichung unseres Vorhabens hängt aber ausserdem entscheidend von der Spezifität des Basenpaarungsmechanismus im chromatographischen System ab. Zu dieser bisher nur teilweise untersuchten Frage<sup>7,8,10,13</sup> versuchen wir in der vorliegenden Arbeit durch Trennungen von Oligodesoxythymidylsäuregemischen an PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose einen weiteren Beitrag zu leisten.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### Reagenzien

Die folgenden Reagenzien wurden verwendet: technisches Pyridin 1 × über KOH destilliert; Triäthylamin 1 × destilliert; Äther 1 × über Na destilliert; HMPT über Molekularsieb getrocknet; PVOH (C. Roth, Karlsruhe, B.R.D.) Mg ≈ 72 000; DEAE-Zellulose (Whatman DE-23; W. & R. Balston, Maidstone, Grossbritannien); Nukleotide (Waldhof, Mannheim, B.R.D.); TPS (EGA-Chemie, Steinheim, B.R.D.), wie geliefert verwendet; Enzyme (Boehringer, Mannheim, B.R.D.).

### Synthese von PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose

Die Synthese von PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose erfolgt in Analogie zu der früher von uns beschriebenen Darstellung der PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose in drei Stufen. Käufliches Desoxyadenosin-5'-phosphat(pA) wird nach einer modifizierten Vorschrift von Ralph und Khorana<sup>14</sup> in geschützter Form mit TPS polykondensiert. Die Polykondensate [(pbz A)<sub>n</sub>, n = 1-12] trennt man anschliessend an DEAE-Zellulose säulenchromatographisch in nieder- und hochmolekulare Oligomere. Die hochmolekularen Oligomeren (pbz A<sub>>6</sub>) werden mit Hilfe von TPS an freie Hydroxylgruppen von PVOH über Phosphorsäurediesterbindungen kovalent gebunden. Nach hydrolytischer Abspaltung der Benzoylschutzgruppen werden die polymergebundenen Oligodesoxyadenylsäuren durch Ultrafiltration gereinigt. Anschliessend belädt man

DEAE-Zellulose mit den polymergebundenen Oligonukleotiden in einem batch-Verfahren.

#### Synthese von $(pbz A)_n$ , $n = 6-12$

11 mMol (5.64 g, 118 000  $E_{260}$ -Einheiten) N-Benzoyldeoxyadenosin-5-phosphat<sup>14</sup> werden in wasserfreiem Pyridin suspendiert. Die Suspension wird durch mehrmaliges Abrotieren mit trockenem Pyridin im Ölvakuum absolutiert und zum Schluss auf ca. 40 ml konzentriert. Unter Feuchtigkeitsausschluss gibt man 10 mMol (3 g) TPS zu und lässt den gut verschlossenen Ansatz 10 h bei Raumtemperatur leicht schütteln. Man bricht die Polykondensation mit ca. 40 ml Wasser ab und lässt den Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Zur säulenchromatographischen Reinigung der Polykondensate wird das Reaktionsgemisch mit Wasser auf eine 0.04 M Lösung verdünnt, die dann auf eine DEAE-Zellulose-Säule (50 × 5 cm) aufgetragen wird. Nachdem die Säule durch Elution mit Wasser von Pyridin befreit ist, eluiert man mit 0.4 M TEAB in 20% Methanol niedermolekulare Oligomere der N-Benzoyldeoxyadenylsäure ( $pbz A_{<6}$ ), während noch auf der Säule adsorbierte höhermolekulare Oligomere  $pbz A_{>6}$  mit 0.8 M TEAB-Puffer in 20% Methanol gemeinsam eluiert werden. Man vereinigt die Fraktionen mit  $pbz A_{>6}$  und entfernt unter Zusatz von Pyridin den flüchtigen Puffer am Rotationsverdampfer im Wasserstrahlvakuum bei 40–60°. Die gefriergetrocknete Lösung ergibt ca. 800 mg (21 000  $E_{260}$ -Einheiten; Mittelwert aus vier Ansätzen)  $pbz A_{>6}$  als gelbbraunes Pulver, das bei –20° über  $P_2O_5$  im Vakuum aufbewahrt wird.

#### Synthese von $PV(pA)_n$

600 mg gepulverter, getrockneter PVOH werden in 30 ml HMPT eingerührt, in der Wärme gelöst und mit 30 ml trockenem Pyridin versetzt. Zu der auf Zimmertemperatur abgekühlten Lösung gibt man 1.6 g  $pbz A_{>6}$  gepulvert zu. Zur destillativen Entfernung eventuell vorhandener Wasserspuren wird die Suspension mit ca. 10 ml trockenem Pyridin versetzt, die anschliessend im Vakuum abgezogen werden. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt. Anschliessend gibt man unter Feuchtigkeitsausschluss 1 g (3.3 mMol) TPS zu und schüttelt die Suspension gut verschlossen 15 h bei Raumtemperatur. Nach ca. 0.5 h bildet sich eine dunkelrote, klare Lösung, die im Laufe der Zeit hochviskos wird. Die Kondensation wird durch Zugabe von Wasser abgebrochen und der Ansatz mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Die braune Lösung wird zur Entfernung niedermolekularer Verbindungen in einer Ultrafiltrationszelle über eine XM 50 Membran (Amicon) so lange bei 4 atü ultrafiltriert, bis das Eluat pyridinfrei ist (ca. 48 h). Zur hydrolytischen Entfernung der N-Benzoylschutzgruppen versetzt man die ultrafiltrierte Lösung mit dem vierfachen Volumen an Methanol, das mit  $NH_3$  bei 0° gesättigt ist, und lässt den Ansatz verschlossen drei Tage bei Raumtemperatur stehen. Anschliessend wird das Methanol am Rotationsverdampfer weitgehend aus der Lösung entfernt und der viskose Rückstand erneut der Ultrafiltration so lange unterworfen, bis das Eluat nur noch 0.9  $E_{260}$ -Einheiten aufweist. Aus zwei Ansätzen erhält man ca. 21 000  $E_{260}$ -Einheiten der polymergebundenen Oligodesoxyadenylsäuren.

#### Ladung der DEAE-Zellulose mit $PV(pA)_n$

In die neutrale, ultrafiltrierte  $PV(pA)_n$ -Lösung werden bei Raumtemperatur

ca. 100 ml in Wasser gequollene DEAE-Zellulose langsam eingerührt. Hierbei nimmt das Quellvolumen der DEAE-Zellulose stark zu. Die Suspension wird 5 h langsam bei Raumtemperatur gerührt. Anschliessend füllt man die  $PV(pA)_n$ -DEAE-Zellulose in eine, mit Fritte (D1) und Kühlmantel versehene Chromatographiesäule ( $40 \times 2$  cm). Die schwach absorbierten Polymere werden zunächst mit 1 M TEAB, dann mit 1 M NaCl-Puffer bei Raumtemperatur ausgewaschen. Hierbei schrumpft die Säulenfüllung auf das ursprüngliche Volumen vor der Beladung. Von den ca. 21 000  $E_{260}$ -Einheiten der polymergebundenen Oligodesoxyadenylsäure bleiben nach dem Waschprozess 5600  $E_{260}$ -Einheiten irreversibel gebunden.

#### *Template-Chromatographie an $PV(pA)_n$ -DEAE-Zellulose*

Die  $PV(pA)_n$ -DEAE-Zellulose wird mit einer ca. 2 cm hohen Schicht unbeladener DEAE-Zellulose überdeckt, um eventuelle Verunreinigungen aus den Proben abzufangen. Probegemische, 500–1500  $E_{260}$ -Einheiten/ml, trägt man in 0.5 M NaCl/0.01 M  $Na_2HPO_4$ -Puffer, pH 6.8, bei 40° auf, lässt die Lösung einziehen und eluiert die auf 0° gekühlte Säule mit dem gleichen Salzpuffer. Während der Elution wird die Wassertemperatur im Kühlmantel der Säule stufenweise mittels eines Thermostaten (Haake) erhöht. Fraktionen zu 20 ml/h werden gesammelt. Bei allen Läufen wird der Elutionsvorgang mit Hilfe eines UV-Messgerätes (LKB Uvicord II) automatisch registriert. Falls die Extinktionswerte der obere Erfassungsgrenze der automatischen Registrierung überschreiten, werden sie an einem Spektrophotometer (Zeiss PMQ II) nachgemessen. Diese UV-Messwerte sind in Fig. 1, 2a, 3a, 5, 6a, 6b und 7 graphisch gegen die Fraktionsnummer aufgetragen, während in den übrigen Abbildungen (Fig. 2b, 2c, 3b, 4, 8) die automatisch aufgezeichneten Elutionsdiagramme wiedergegeben sind (der Masstab der Fraktionsnummer ist hierbei stark gestaucht). Die vereinigten Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung werden zur Entfernung des Salzpuffers an einer UM 2 Membran (Amicon) bei 4 atü ultrafiltriert. Bei diesem schnellen, einfachen Verfahren gehen mitunter vermutlich durch unbekannte Enzymaktivitäten bis zu 20% der Oligodesoxyadenylsäuren verloren. Die Komponenten der Peakfraktionen werden papierchromatographisch und enzymatisch identifiziert. Die meisten Trennungen werden mehrmals wiederholt, so dass die Angaben in Tabelle I Mittelwerte sind.

#### *Enzymatischer Abbau mit alkalischer Phosphatase aus *E. coli**

Zur Entfernung der terminalen 5'-Phosphatschutzgruppe werden ca. 30  $E_{260}$ -Einheiten der entsalzten Oligodesoxythymidylsäuren im Vakuum zur Trockene einrotiert und anschliessend in 50  $\mu$ l Wasser gelöst. Die Lösung wird mit 10  $\mu$ l 1 M Tris-Puffer pH 8.1 und 20  $\mu$ l käuflicher Enzymlösung versetzt, mit Wasser auf 120  $\mu$ l aufgefüllt und 6–12 h bei 37° inkubiert. Anschliessend wird der Ansatz papierchromatographisch aufgearbeitet.

#### *Enzymatische Spaltung mit Phosphodiesterase aus Schlangengift*

Zur enzymatischen Spaltung der dephosphorylierten Oligodesoxythymidylsäuren werden ca. 30  $E_{260}$ -Einheiten nach der papierchromatographischen Reinigung vom Papier eluiert und im Vakuum zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wird in 50  $\mu$ l Wasser gelöst, mit 10  $\mu$ l 1 M Trispuffer pH 8.1, 10  $\mu$ l 0.1 M  $MgCl_2$ -Lösung und 50  $\mu$ l käuflicher Enzymlösung versetzt, auf 120  $\mu$ l mit Wasser aufgefüllt und 12–24 h

bei 37° inkubiert. Die Spaltprodukte T und pT werden papierchromatographisch im System 1 M Ammoniumacetat-Äthanol (3:7) getrennt. Aus dem Verhältnis der  $E_{260}$ -Einheiten von pT/T errechnet sich die Kettenlänge der ursprünglichen Oligodesoxythymidylsäure.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose erhält man in Analogie zur Darstellung von PV-pT)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose<sup>10</sup> aus höhermolekularen Oligodesoxyadenylsäuren auf folgendem Weg. Zunächst werden Oligoadenylsäuren über ihre terminalen 5'-Phosphatgruppen mit freien Hydroxylgruppen des PVOH verestert. Nach der Veresterung, die in guten Ausbeuten verläuft, entfernt man niedermolekulare Verunreinigungen und nicht gebundene Adenylsäuren weitgehend durch Ultrafiltration. Anschliessend werden durch Zugabe von DEAE-Zellulose alle noch verbliebenen Anionen an der Zellulosematrix adsorbiert. Die so erhaltene PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose wird schliesslich in einer Säule im Salzpuffer von schwach adsorbierten Polymeren und Verunreinigungen befreit und kann dann zur Template-Chromatographie verwendet werden.

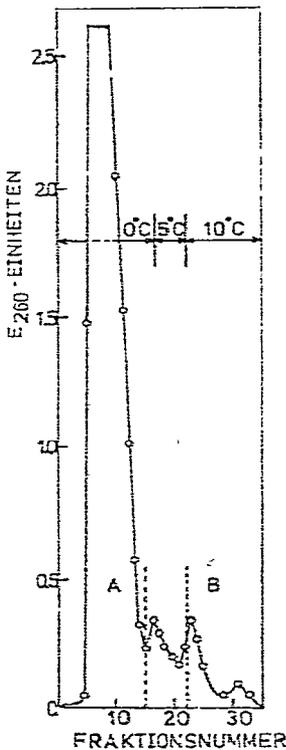


Fig. 1. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Trennung von 2600  $E_{260}$ -Einheiten einer Oligodesoxythymidylsäuremischung [(pT)<sub>n</sub>,  $n = 4-6$ ] an PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose. Säulenmasse: 30 × 2 cm. Während der Elution, die im 0.5 M NaCl-Puffer erfolgt, wird die Temperatur stufenweise von 0° auf 5° und 10° erhöht. Fraktionen zu 20 ml/h werden gesammelt. Die Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung bei 0° (A) und 10° (B) werden vereinigt.

Die Trenneigenschaften der  $PV(pA)_n$ -DEAE-Zellulose testen wir mit synthetischen Polykondensaten der 5'-Desoxythymidylsäure. Bei der chemischen Polykondensation der 5'-Desoxythymidylsäure bilden sich neben linearen auch zyklische Oligothymidylsäuren sowie Pyrophosphatderivate und eine Vielzahl unbekannter Verbindungen<sup>15</sup>. An DEAE-Zellulose, die Oligonukleotide vorwiegend nach Ladungsunterschieden trennt, werden die Kondensationsprodukte bei steigendem Salzgradienten in mehr oder weniger gut aufgelösten Peaks eluiert. Für die Trennungen an  $PV(pA)_n$ -DEAE-Zellulose wählen wir drei Thymidylsäuregemische aus, die an DEAE-Zellulose nicht aufgetrennt werden und somit vermutlich Verbindungen gleicher Ladung aber unterschiedlicher Struktur enthalten. Im papierchromatographischen Test, bei dem wir definierte, lineare Vergleichssubstanzen mitlaufen lassen, zeigt sich, dass die drei Testgemische Oligomere der Desoxythymidylsäure mit vier bis sechs (Mischung I), fünf bis acht (Mischung II) oder mehr als acht Ketten-

TABELLE I

DATEN DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG VON OLIGODESOXYTHYMIDYLSÄUREGEMISCHEN AN  $PV(pA)_n$ -DEAE- (P) UND DEAE-ZELLULOSE (Z)

Fig.	Nukleotidmischung bzw. vereinigte Fraktionen aus Peak No. (Fig.)	$E_{250}$ -Einheiten			Säule			
		Aufgetragen	Isoliert	%	Pro Peak			
					Peak	Isoliert	%	
1	$(pT)_n, n = 4-6$	2600	2430	93.5	A	2370	91.2	P
2a	$(pT)_n, n = 5-8$	3600	3460	96.0	B	60	2.3	P
					A	2640	73.3	
					A <sub>1</sub>	590	16.4	
3a	$(pT)_n, n \geq 8$	500	480	96.0	B	160	4.4	P
					C	70	1.9	
					A	120	24.0	
					C	200	40.0	
3b	C (2a, 3a)	900	270	30.0	D	160	32.0	P
					III	190	21.1	
					IIIa	80	8.9	
4	B (1, 2a), II (3b)	1000	750	75.0	I	120	12.0	P
					Ia	80	8.0	
					Ib	160	16.0	
5	I (2b, c; 3b, 4)	2300	695	30.2	II	390	39.0	Z
					I <sub>1</sub>	15	0.7	
					I <sub>2</sub>	20	0.9	
					I <sub>3</sub>	190	8.3	
					I <sub>4</sub>	120	5.2	
					I <sub>5</sub>	120	5.2	
6a	Ia (2b, c; 4)	600	430	71.7	I <sub>6</sub>	230	10.0	Z
					Ia <sub>1</sub>	190	31.7	
					Ia <sub>2</sub>	120	20.0	
6b	Ib (4)	160	105	65.7	Ia <sub>3</sub>	120	20.0	Z
					Ib <sub>1</sub>	35	21.9	
					Ib <sub>2</sub>	70	43.8	
7	II (3b, 4)	200	120	60.0	II <sub>1</sub>	120	60.0	Z
	III (3b)	90	50	55.6	III <sub>1</sub>	50	55.6	Z
	IIIa (3b)	70	40	57.2	IIIa <sub>1</sub>	40	57.2	Z
8	D (3a), IV (3b)	80	45	56.3	IVa	45	56.3	Z

gliedern (Mischung III) aufweisen, wobei lineare neben zyklischen und Pyrophosphatderivaten vorliegen. Da die Gemische in Papierchromatogramm Banden bilden, ist die Identifizierung der einzelnen Komponenten nur bedingt möglich. Anhand derartig komplex zusammengesetzter Mischungen, die weder an DEAE-Zellulose, noch papierchromatographisch aufzutrennen sind, lassen sich Möglichkeiten und Grenzen der Template-Chromatographie besonders deutlich aufzeigen.

Die Elutionsprofile der drei Testmischungen (Fig. 1-3) zeigen signifikante Unterschiede. Aus Mischung I  $[(pT)_n, n = 4-6]$  wird nur ein ganz geringer Anteil adsorbiert, während aus den Mischungen II und III, die höhermolekulare Verbindungen enthalten, deutlich mehr Substanz gebunden wird. Die Daten der säulenchromatographischen Trennungen sind in Tabelle I zusammengestellt. Im ersten Lauf (Fig. 1) werden von 2600  $E_{260}$ -Einheiten der niedermolekularen Oligodesoxythymidylsäuren nur 60 (2.3%)  $E_{260}$ -Einheiten an der  $PV(pA)_n$ -DEAE-Zellulose

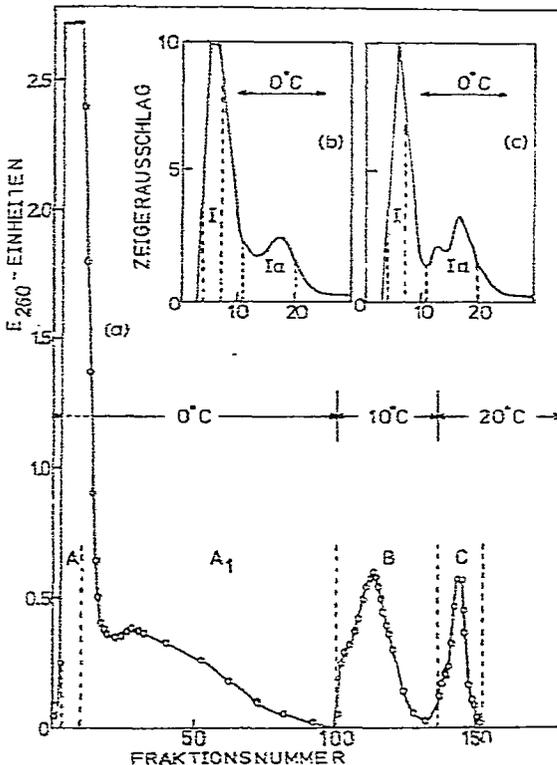


Fig. 2. (a) Elutionsprofil der säulenchromatographischen Trennung von 3600  $E_{260}$ -Einheiten einer Oligodesoxythymidylsäure-Mischung  $[(pT)_n, n = 5-8]$  an  $PV(pA)_n$ -DEAE-Zellulose. Säulenmasse:  $1 \times 2$  cm. Während der Elution, die im 0.5 M NaCl-Puffer erfolgt, wird die Temperatur stufenweise von 0° auf 10° und 20° erhöht. Fraktionen zu 20 ml/h werden gesammelt. Die innerhalb der senkrechten Strichelung gelegenen Fraktionen bei 0° (A,  $A_1$ ), 10° (B) und bei 20° (C) werden vereinigt. (b) Automatisch registriertes Elutionsprofil der Nachreinigung von 640  $E_{260}$ -Einheiten aus den vereinigten Fraktionen unter Peak A (Fig. 2a). (c) Automatisch registriertes Elutionsprofil der Nachreinigung von 360  $E_{260}$ -Einheiten aus den vereinigten Fraktionen unter Peak  $A_1$  (Fig. 2a). Die Elution erfolgt in (b) und (c) unter den in (a) genannten Bedingungen bei 0°. Die Fraktionen (I und  $I_a$ ) in Fig. 2b und c werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt.

retardiert, während 2370 (91.2%)  $E_{260}$ -Einheiten die Säule ohne Retardierung passieren. Im zweiten Lauf (Fig. 2a) steigt der retardierte Anteil bereits auf 720  $E_{260}$ -Einheiten (22.7%) und im dritten Lauf werden sogar 72% (360  $E_{260}$ -Einheiten) der aufgetragenen Nukleotidmischung adsorbiert. Ausserdem beobachtet man bei allen drei Trennungen einen deutlichen Temperatureffekt. Die Verbindungen aus der ersten Testmischung werden bereits bei 10° vollständig eluiert, die der zweiten Mischung bei 20° und die Oligothymidylsäuren der dritten Mischung verlassen erst bei 30° vollständig die Säule. Die Trennergebnisse zeigen, dass Oligothymidylsäuregemische die man an DEAE-Zellulose nicht trennen kann, an  $PV(pA)_n$ -DEAE-Zellulose im Temperaturgradient in verschiedene Peaks getrennt werden.

Die Trennkapazität der  $PV(pA)_n$ -DEAE-Zellulose lässt sich aus dem zweiten Lauf (Fig. 2a) ermitteln. Die Verbindungen aus Peak A (Fig. 2a), welche die Säule ungehindert passieren, werden bei der Nachtrennung teilweise retardiert (Ia, Fig. 2b), so dass die Säule im zweiten Lauf überladen und damit die Trennkapazität voll aus-

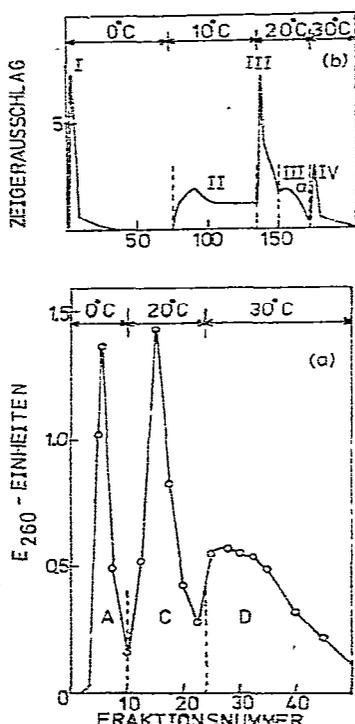


Fig. 3. (a) Elutionsprofil der säulenchromatographischen Trennung von 500  $E_{260}$ -Einheiten einer Oligodesoxythymidylsäuremischung  $[(pT)_n, n \geq 8]$  an  $PV(pA)_n$ -DEAE-Zellulose. Säulenmasse  $30 \times 2$  cm. Während der Elution, die im 0.5 M NaCl-Puffer erfolgt, wird die Temperatur stufenweise von 0° auf 20° und 30° erhöht. Fraktionen zu 20 ml/h werden gesammelt. Die innerhalb der senkrechten Strichelung gelegenen Fraktionen bei 0° (A), 20° (C) und bei 30° (D) werden vereinigt. (b) Automatisch registriertes Elutionsprofil der Nachtrennung von 900  $E_{260}$ -Einheiten aus den vereinigten Fraktionen unter Peak C (Fig. 2a und 3a). Die Elution erfolgt unter den in (a) genannten Bedingungen. Die Temperatur wird stufenweise von 0° auf 10°, 20° und 30° erhöht. Die Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung bei 0° (I), 10° (II), 20° (III und IIIa) und bei 30° (IV) werden vereinigt.

geschöpft ist. Die Rechromatographie von Peak A<sub>1</sub> (Fig. 2a), die zu einer deutlichen Peakaufspaltung führt (Ia, Fig. 2c) spricht ebenfalls für eine Überladung der Säule im zweiten Lauf. Da im zweiten Lauf 720 E<sub>260</sub>-Einheiten (0.082 mMol pT-Monomer) oder Oligodesoxythymidylsäuremischung adsorbiert werden, beteiligen sich somit 23% oder 5600 E<sub>260</sub>-Einheiten (0.36 mMol pA-Monomer) an der Basenpaarung, falls 1:1-Komplexe gebildet werden.

Der Temperatureffekt erklärt sich aus dem Basenpaarungsmechanismus. Das Bestreben gelöster, komplementärer Oligonukleotide Basenpaare zu bilden nimmt bekanntlich mit der Anzahl ihrer komplementären Basen zu. Temperaturerhöhung wirkt der Basenpaarung entgegen, da die Nebervalenzbindungen zwischen gepaarten Basen instabil werden. Oberhalb einer sogenannten "Schmelztemperatur" liegen kurze, komplementäre Oligonukleotide bereits ungepaart vor, während bei derselben Temperatur längere Oligomere noch basengepaart sind. Bei der Template-Chromatographie "schmelzen" adsorbierte Oligonukleotide je nach der Anzahl ihrer gepaarten Monomereinheiten im Temperaturgradienten nacheinander ab. Die Peakauflösung hängt somit entscheidend von der Höhe der gewählten Temperaturstufen ab. So führt die Nachtrennung der vereinigten Verbindungen aus Peak C, die in Fig. 2a und 3a bei 20° einheitlich laufen, bei einem flacheren Temperaturgradienten zu fünf teilweise aufgelösten Peaks (Fig. 3b). Ebenso erfahren die vereinigten Produkte (1000 E<sub>260</sub>-Einheiten) aus Peak B (Fig. 1 und 2a) und Peak II (Fig. 3b), die bei 10° zunächst in einem einheitlichen Peak eluiert werden, bei der Nachtrennung eine deutliche Auflösung (Fig. 4). Den hohen Anteil nicht oder nur schwach retardierter Substanzen, der bei den Nachtrennungen in Peak I, Ia und Ib (Fig. 3b und 4) auftritt, führen wir darauf zurück, dass sowohl höhermolekulare Oligodesoxythymidylsäuren als auch Pyrophosphatderivate bei der Aufarbeitung teilweise depolymerisieren und dann nicht mehr retardiert oder bereits unterhalb von 10° eluiert werden.

Die gepunktete Kurve in Fig. 4 zeigt das Elutionsprofil einer Desoxyadenylsäuremischung [(pA)<sub>n</sub>, n = 3-7] an PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose. Die Adenylsäuren werden ebenso stark wie Thymidylsäuren aus Peak Ia retardiert. Mischungen, in denen

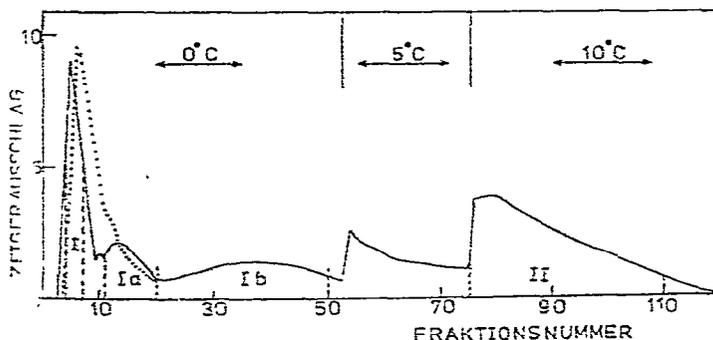


Fig. 4. Automatisch registriertes Elutionsprofil der Nachtrennung von 1000 E<sub>260</sub>-Einheiten einer Mischung, in der alle Produkte, die in den übrigen Läufen bei 10° eluiert werden, vereinigt sind (Peak B Fig. 1 und 2a; Peak II, Fig. 3b). Während der Elution, die im 0.5 M NaCl-Puffer an PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose erfolgt, wird die Temperatur stufenweise von 0° auf 5° und 10° erhöht. Fraktionen zu 20 ml/h werden gesammelt. Die Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung bei 0° (I, Ia und Ib) und bei 10° (II) werden vereinigt. Das gepunktete Elutionsprofil (· · · · ·) zeigt den Elutionsverlauf einer Oligodesoxyadenylsäuremischung [(pA)<sub>n</sub>, n = 3-7] unter analogen Bedingungen.

TABELLE II

DATEN DER PAPIERCHROMATOGRAPHISCHEN UNTERSUCHUNGEN VON PEAK-FRAKTIONEN AUS FIG. 5-8.

Laufmittelsysteme: (A) Äthanol-1 M Ammoniumacetat (pH 7.5) (7:3); (B) *n*-Propanol-NH<sub>4</sub>OH (konz.)-Wasser (55:10:35), absteigend. Papier: Schleicher und Schüll 2043b.

Peak	Fig. No.	System	Anzahl der Flecken	$R_F$ -Werte relativ zu			Oligonukleotid	
				$pT$	$pT_4$	$pT_6$		
I <sub>1</sub>	5	A	1	0.47	2.06	—	$pT_4^*$	
		B	1	0.85	—	—		
I <sub>2</sub>	5	A	1	0.26	1.14	—	$pT_4$	
		B	1	0.69	—	—		
I <sub>3</sub>	5	A	1	0.12	0.53	—		
		B	1	0.52	—	1.32	$pT_3$	
I <sub>4</sub>	5	B	1	—	0.66	1.08		
I <sub>5</sub>	5	B	1	—	0.63	0.97		
I <sub>6</sub>	5	B	1	—	—	0.17		
I <sub>21</sub>	6a	B	1	0.40	—	1.02	$pT_6$	
I <sub>22</sub>	6a	B	1	—	—	0.75		
I <sub>23</sub>	6a	B	1	—	—	0.49		
Ib <sub>1</sub>	6b	B	1	—	—	1.44	$pT_5^*$	
Ib <sub>2</sub>	6b	B	1	—	—	0.84	$pT_5^*$	
II <sub>1</sub>	7	B	1	—	—	0.65	$pT_7$	
III <sub>1</sub>	7	B	3	1.	—	—	0.82	$pT_8^*$
				2.	—	—	0.44	
				3.	—	—	0.13	
III <sub>21</sub>	7	B	2	1.	—	—	0.72	
				2.	—	—	0.35	$pT_8^*$
IV <sub>1</sub>	8	B	2	1.	—	—	0.62	$pT_{12}^*$
				2.	—	—	0.18	

\* Vermutlich Spaltprodukt eines Pyrophosphatderivates der Desoxythymidylsäure.

beide Verbindungen gemeinsam enthalten sind, werden an PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose nicht getrennt, während sie an PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose ohne weiteres zu trennen sind, da Oligothymidylsäure an PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose nicht retardiert werden<sup>10</sup>. Die starke Retardierung von Oligoadenylsäuren an PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose beruht möglicherweise auf einer Eigenassoziation zwischen gelösten und stationär gebundenen Adenylsäuren. Wir nehmen aber an, dass Adenylsäuren vor allem mit der DEAE-Zellulose-Matrix in zusätzliche Wechselwirkungen treten, da bekanntlich Polyadenylsäuren an Zellulose unter bestimmten Bedingungen adsorbiert werden<sup>16,17</sup>.

Zur Klärung, welche Verbindungen die verschiedenen Elutionspeaks enthalten werden die Fraktionen gleichnamiger Peaks vereinigt und an DEAE-Zellulose nachgetrennt. Hierbei erhält man Elutionsprofile (Fig. 5-8) mit mehr oder weniger gut aufgelösten Peaks. Die Verbindungen der einzelnen Peaks werden papierchromatographisch mit Hilfe von Vergleichssubstanzen charakterisiert und falls möglich durch enzymatischen Abbau identifiziert. In Tabelle II und III sind die Daten dieser Untersuchungen zusammengestellt.

Die Elutionsprofile der Nachtrennungen zeigen besonders deutlich, dass die PV(pA)<sub>n</sub>- und DEAE-Zellulose nach unterschiedlichen Mechanismen trennen. Beispielsweise werden die vereinigten Produkte aus Peak I (Fig. 2b, 2c, 3b und 4), die an PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose nicht retardiert werden, an DEAE-Zellulose in sechs

Hauptpeaks  $I_{1-6}$  (Fig. 5) eluiert. Während die DEAE-Zellulose Oligonukleotide vorwiegend nach ihrer Anionenladung unterscheidet, trennt PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose beispielsweise Oligothymidylsäuren in hybridisierfähige und nicht hybridisierfähige Verbindungen. Zyklische Oligomere der Thymidylsäure werden an PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose nicht retardiert, da man sie ausschliesslich unter den Komponenten in Peak A (Fig. 1-3) findet. Dagegen gehen lineare Oligothymidylsäuren ebenso wie ihre Pyrophosphatderivate mit den stationärbundenen Adenylsäuren unterschiedlich starke Wechselwirkungen ein. Entscheidend für die Stärke der Wechselwirkung ist die Zahl komplementär gepaarter Basen.

Die Identifizierung der Produkte aus den Peaks  $I_{1-6}$  ist nur teilweise möglich und zeigt zum Beispiel, dass in Peak  $I_3$  pT<sub>5</sub> enthalten ist. Das bedeutet, Oligothymidylsäuren mit fünf und weniger Monomereinheiten werden an PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose nicht retardiert, bilden somit keine Basenpaare mit der stationären Phase. Dieses Ergebnis lässt sich nicht mit den Trennungen von Oligoadenylsäuren an PV(pT)<sub>n</sub>-

TABELLE III

*R<sub>F</sub>*-WERTE DER PEAKFRAKTIONEN NACH ENZYMATISCHER ENTFERNUNG DER TERMINALEN PHOSPHATGRUPPEN MIT ALKALISCHER PHOSPHATASE UND ERGEBNISSE DER ENZYMATISCHEN SPALTUNG MIT PHOSPHODIESTERASE AUS SCHLANGENGIFT

Peak	Fig. No.	Fleck aus Tabelle II	Flecken		<i>R<sub>F</sub></i> -Werte relativ zu pT	System*	Hydrolyse- produkte T:pT	Oligo- nukleotid	
			Anzahl	%					
$I_1$	5	1.	1	95	0.83	A	1:2.87	TpT <sub>3</sub> **	
$I_2$	5	1.	2	1.	80	0.92	A	1:2.87	TpT <sub>3</sub>
				2.	20	0.67	A		
$I_3$	5	1.	2	1.	68	0.78	A	1:3.86	TpT <sub>4</sub>
				2.	32	0.40	A	—	—
$I_4$	5	1.	3	1.	25	0.89	A	—	—
				2.	54	0.62	A	—	—
				3.	24	0.19	A	—	—
$I_5$	5	1.	2	1.	35	0.49	A	—	—
				2.	65	0.19	A	—	—
$I_6$	5	1.	Bande		—	A, B	—	—	
$Ia_1$	6a	1.	1	95	0.44	A	1:5.40	TpT <sub>5</sub>	
$Ia_2$	6a	1.	Bande		—	A	—	—	
$Ia_3$	6a	1.	Bande		—	A	—	—	
$Ib_1$	6b	1.	1	95	0.58	A	1:4.20	TpT <sub>4</sub> **	
$Ib_2$	6b	1.	2	1.	80	0.58	A	1:4.18	TpT <sub>4</sub> **
				2.	20	0.20		—	—
$II_1$	7	1.	1	95	0.30	A	1:6.2	TpT <sub>6</sub>	
$II_1$	7	1.	1	95	0.19	B	1:6.7	TpT <sub>7</sub> **	
			2.	1	95	0.25	B	—	—
			3.	2	1.	0.12	B	—	—
			2.		0.26	B	—	—	
$IIa_1$	7	1.	1	95	0.16	B	—	—	
				1	95	0.19	B	1:6.7	TpT <sub>7</sub> **
$V_1$	8	1.	1	95	0.10	B	1:12.9	TpT <sub>13</sub>	
			2.	1	95	Bande	B	—	—

\* Siehe Tabelle II.

\*\* Vermutlich Spaltprodukt eines Pyrophosphatderivates der Desoxythymidylsäure.

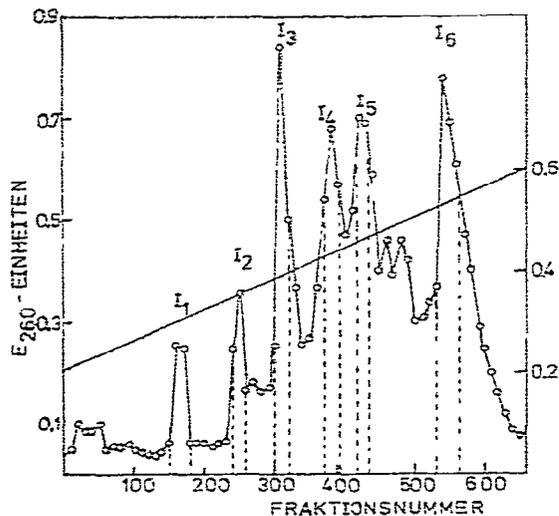


Fig. 5. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung von 2300  $E_{260}$ -Einheiten einer Oligodesoxythymidylsäure-Mischung an DEAE-Zellulose. Säulennasse:  $40 \times 5$  cm. In der Mischung sind alle Produkte vereinigt, die bei  $0^\circ$  an  $PV(pA)_n$ -DEAE-Zellulose nicht retardiert werden (Peak I, Fig. 2b, 2c und 3b und 4). Die Elution erfolgt im linear steigenden (TEAB) Gradienten. Hierbei wird die Säule zunächst mit  $51\ 0.2\ M$  TEAB im Mischgefäß,  $51\ 0.5\ M$  TEAB im Vorratsgefäß, dann mit  $1.51\ 0.5\ M$  TEAB im Mischgefäß,  $1.51\ 0.6\ M$  TEAB im Vorratsgefäß eluiert. Fraktionen zu  $20\ ml/10\ min$  werden gesammelt und innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt. Die Produkte aus Peak  $I_{1-6}$  werden papierchromatographisch identifiziert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen II und III zusammengefasst.

DEAE-Zellulose vereinbaren, in denen Oligomere der Desoxyadenylsäure mit nur drei Monomereinheiten bereits deutlich retardiert werden<sup>10</sup>. Diese unterschiedlichen Trennergebnisse werden vermutlich nicht durch einen unterschiedlichen Basenpaarungsmechanismus bedingt. Wir nehmen daher an, dass niedermolekulare Oligoadenylsäuren im Gegensatz zu Oligothymidylsäuren mit der Zellulosematrix in zusätzliche Wechselwirkungen treten, die eine Basenpaarung vortäuschen. Für unsere Annahme spricht, dass einerseits Zellulose, wie bereits erwähnt, unter bestimmten Bedingungen Polyadenylsäuren adsorbiert<sup>16,17</sup> und dass andererseits komplementäre Oligomere der Adenyl- und Thymidylsäure mit nur fünf oder weniger Monomereinheiten in Lösung nicht basengepaart auftreten<sup>18</sup>.  $600\ E_{260}$ -Einheiten der Oligothymidylsäuren aus Peak Ia (Fig. 2b, 2c und 4) und  $160\ E_{260}$ -Einheiten aus Peak Ib (Fig. 4), die an  $PV(pA)_n$ -DEAE-Zellulose bei  $0^\circ$  retardiert werden, erfahren bei der Nachtrennung an DEAE-Zellulose (Fig. 6) eine deutliche Auftrennung in mehrere Elutionspeaks. Die  $R_F$ -Werte, sowie der enzymatische Abbau (Tabelle II und III) zeigen, dass die Produkte aus Peak  $Ia_{1-3}$  und  $Ib_{1,2}$  neben  $pT_6$  vor allem symmetrische und asymmetrische Pyrophosphatderivate mit über sechs Monomereinheiten aufweisen.

Die Nachtrennung der vereinigten Produkte aus Peak II (Fig. 3b and 4) führt an DEAE-Zellulose zu einem fast einheitlichen Peak ( $II_1$ , Fig. 7). Papierchromatographisch und nach enzymatischer Entfernung der terminalen Phosphatgruppen sind die Produkte im Peak  $II_1$  einheitlich und werden als  $pT_7$  identifiziert. Aus der Elu-

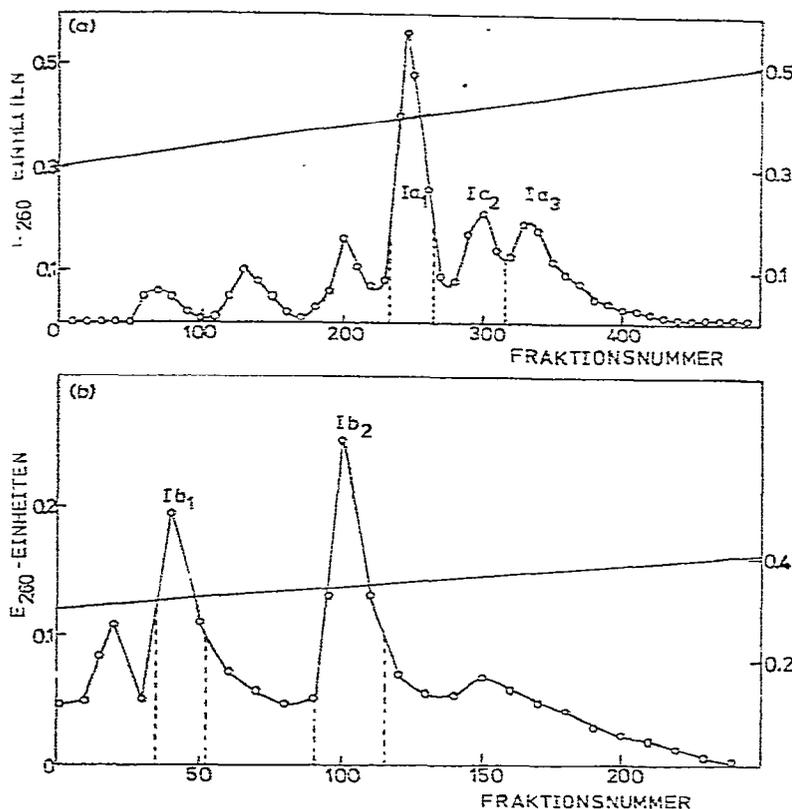


Fig. 6. (a) Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachreinigung von 600  $E_{260}$ -Einheiten einer Oligodesoxythymidylsäuremischung an DEAE-Zellulose. Säulenmasse:  $20 \times 5$  cm. In der Mischung sind alle Produkte vereinigt, die bei  $0^\circ$  an  $PV(pA)_n$ -DEAE-Zellulose geringfügig retardiert werden (Peak Ia in Fig. 2b, 2c und 4). Die Elution erfolgt im linear steigenden (TEAB) Gradienten, der 5 l 0.3 M TEAB im Mischgefäß und 5 l 0.5 M TEAB im Vorratsgefäß aufweist. Fraktionen zu 20 ml/10 min werden gesammelt und innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt. Die Produkte aus Peak Ia<sub>1-3</sub> werden papierchromatographisch identifiziert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen II und III zusammengefasst. (b) Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachreinigung von 160  $E_{260}$ -Einheiten der Oligodesoxythymidylsäuremischung aus Peak Ib (Fig. 4) an derselben DEAE-Zellulose-Säule. Die Elution erfolgt mit 2.5 l 0.3 M TEAB im Mischgefäß und 2.5 l 0.4 M TEAB im Vorratsgefäß. Fraktionen zu 20 ml/10 min werden gesammelt und die innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt. Die Produkte aus Peak Ib<sub>1</sub> und Ib<sub>2</sub> werden papierchromatographisch identifiziert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen II und III zusammengefasst.

konstantemperatur ergibt sich, dass  $pT_7$  an der  $PV(pA)_n$ -DEAE-Zellulose bei  $10^\circ$  "abschmilzt", während kürzere Oligothymidylsäuren und Pyrophosphatderivate mit kürzeren Segmenten bereits unterhalb  $10^\circ$  eluiert werden.

Die Verbindungen aus Peak III und IIIa (Fig. 3b), werden bei der Rechromatographie an DEAE-Zellulose (Fig. 7) nicht aufgetrennt, obwohl papierchromatographisch in Peak III<sub>1</sub> drei und in Peak IIIa<sub>1</sub> zwei verschiedene Produkte nachzuweisen sind (Tabelle II und III). Der enzymatische Abbau dieser Oligonukleotide zeigt, dass in Peak III<sub>1</sub> und IIIa<sub>1</sub> wiederum lineare neben Pyrophosphatderivaten eluiert werden, die vermutlich Segmente bis zu acht Monomereinheiten aufweisen.

Die Nachtrennungen zeigen deutlich, dass DEAE-Zellulose zur Trennung

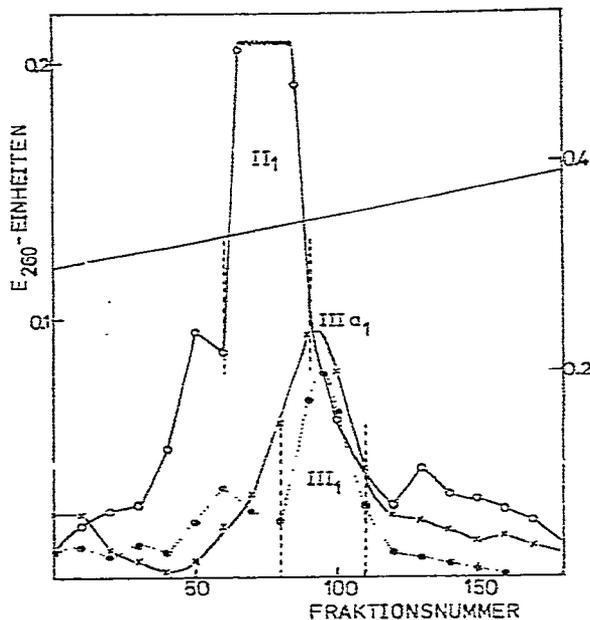


Fig. 7. Elutionsprofile der säulenchromatographischen Nachtrennungen von Oligodesoxythymidylsäuregemischen an DEAE-Zellulose. Säulenmasse:  $20 \times 5$  cm. ○—○, 200  $E_{260}$ -Einheiten aus Peak II (Fig. 3b und 4) die bei  $10^\circ$  eluiert werden; ●···●, 90  $E_{260}$ -Einheiten aus Peak III (Fig. 3b); ×—×, 70  $E_{260}$ -Einheiten aus Peak III<sub>a</sub> (Fig. 3b), die alle bei  $20^\circ$  die PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose-Säule verlassen. Die Elution erfolgt im linear steigenden (TEAB) Gradienten, der in allen drei Läufen 2 l 0.3 M TEAB im Mischgefäß und 2 l 0.4 M TEAB im Vorratsgefäß aufweist. Fraktionen zu 20 ml/10 min werden gesammelt und innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt. Die Produkte aus Peak II<sub>1</sub>, III<sub>1</sub> und III<sub>a1</sub> werden papierchromatographisch identifiziert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen II und III zusammengefasst.

höhermolekularer Oligonukleotide nur bedingt geeignet ist. An DEAE-Zellulose werden Gemische der Produkte aus Peak II, III und III<sub>a</sub> nicht mehr aufgetrennt, da die Elutionsprofile der Einzelläufe (Fig. 7) überlagert sind. Dagegen kann man an PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose diese Mischungen teilweise trennen. Im Temperaturgradient schmelzen die Produkte am Peak II bei  $10^\circ$  ab, während die Produkte aus Peak III und III<sub>a</sub> erst bei  $20^\circ$  eluiert werden. Die Oligothymidylsäuren aus Peak II können somit quantitativ von den Verbindungen aus Peak III und III<sub>a</sub> abgetrennt werden. Die Trennung der Verbindungen aus Peak III und III<sub>a</sub> ist aber selbst an PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose nur beschränkt möglich.

Die Nachtrennung der vereinigten Verbindungen aus Peak D (Fig. 3a) und Peak IV (Fig. 3b) führt zwar an DEAE-Zellulose zu teilweise aufgelösten Fraktionsbereichen (Fig. 8), aber Peak IV<sub>1</sub> ist bereits so schlecht aufgelöst, dass seine Komponenten papierchromatographisch Banden bilden und nicht näher zu identifizieren sind. Der enzymatische Abbau dieser Oligothymidylsäuregemische zeigt, dass die Oligomeren im Schnitt über dreizehn Monomereinheiten aufweisen. Die unbefriedigenden Ergebnisse bei der Template-Chromatographie höhermolekularer Oligothymidylsäuregemische an PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose sind im Basenpaarungsmechanismus begründet. Die Schmelzbereiche komplementär gepaarter Oligonukleotide ver-

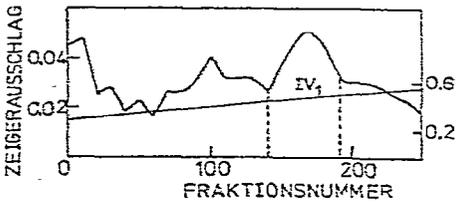


Fig. 8. Automatisch registriertes Elutionsprofil der Nachtrennung von 80  $E_{260}$ -Einheiten einer Oligodesoxythymidylsäure-Mischung an DEAE-Zellulose. Säulenmasse: 20 × 5 cm. In der Mischung sind alle Produkte vereinigt, die bei 30° die PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose verlassen (Peak D in Fig. 3a und Peak IV in Fig. 3b). Die Elution erfolgt im linear steigenden (TEAB) Gradienten, der 2 l 0.3 M TEAB im Mischgefäß und 2 l 0.5 M TEAB im Vorratsgefäß aufweist. Fraktionen zu 20 ml/10 min werden gesammelt und innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt. Die Produkte aus Peak IV<sub>1</sub> werden papierchromatographisch identifiziert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen II und III zusammengefasst.

schieben sich zwar bei zunehmender Zahl gepaarter Basen zu höheren Temperaturen, rücken aber gleichzeitig enger zusammen. Im Temperaturgradient "schmelzen" daher hybridisierte Oligonukleotide mit steigender Monomereinheit in immer stärker überlappten Schmelzbereichen ab, so dass Elutionsprofile resultieren, die nur teilweise oder nicht aufgelöst sind. Zusätzlich verbreitern sich die Schmelzbereiche vermutlich dadurch, dass die Oligonukleotide der stationären Phase molekularuneinheitlich bzw. unterschiedlich gut zugänglich sind. Hierdurch wird eine Teilhybridisierung zwischen mobilen und stationärgebundenen, komplementären Oligonukleotiden begünstigt. Partiiell hybridisierte Oligonukleotide schmelzen niedriger als im vollständig hybridisierten Zustand. Diese Teilhybridisierungen können dazu führen, dass höhermolekulare Oligonukleotide, die nur teilweise hybridisieren, gemeinsam mit niedermolekularen, vollständig hybridisierten Oligonukleotiden eluiert werden. Selbst wenn die stationäre Phase ausschliesslich molekular einheitliche Oligonukleotide aufweist, ist vermutlich aus sterischen Gründen eine partielle Hybridisierung nicht ganz auszuschliessen. Der grosse Aufwand, den der kovalente Einbau molekular einheitlicher Oligonukleotide in die Trägermatrix erfordert, zahlt sich unserer Ansicht nach nicht in besseren Trennergebnissen aus. Für unsere Ausnahme spricht, dass Astell und Smith<sup>7</sup> und Astell *et al.*<sup>8</sup> bei analogen Trennungen an Oligonukleotidzellulosen, die mit einheitlichen Oligonukleotiden substituiert sind, Schmelzbereiche finden, die sich kaum von unseren Werten unterscheiden.

Aus den Trennergebnissen an PV(pT)<sub>n</sub>- und PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose sieht man, dass es mit Hilfe der Template-Chromatographie möglich ist, aus Polykondensaten der Thymidyl- und Adenylsäure, die weder an DEAE-Zellulose noch papierchromatographisch aufzutrennen sind, definierte Nukleotide mit drei bis zehn Monomereinheiten selektiv im präparativen Masstab zu isolieren. Besonders die von uns geplante Isolierung definierter Oligonukleotide aus DNA- und RNA-Hydrolysaten, die beispielsweise nur lineare, niedermolekulare Nukleinsäurefragmente enthalten, sollte mit Hilfe der Template-Chromatographie realisierbar sein.

DANK

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

## ZUSAMMENFASSUNG

Polykondensate der Desoxyadenylsäure werden kovalent mit Polyvinylalkohol verknüpft. Diese polymergebundenen Oligonukleotide werden an DEAE-Zellulose so stark adsorbiert, dass eine teilweise Desorption bei neutralem pH mit 1 M NaCl erst oberhalb von 60° erfolgt. Die Verwendbarkeit dieser PV(pA)<sub>n</sub>-DEAE-Zellulose zur säulenchromatographischen Trennung synthetischer Polykondensate der Desoxythymidylsäure nach dem Prinzip der Basenpaarung wird anhand von Beispielen diskutiert.

Sowohl lineare, als auch Pyrophosphatderivative der Thymidylsäure mit über fünf Monomereinheiten werden unter Bedingungen der Basenpaarung unterschiedlich stark retardiert, während zyklische Oligonukleotide keine nachweisbaren Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen. Daher gelingt es im steigenden Temperaturgradienten Polykondensate der Desoxythymidylsäure mit einem mittleren Polymerisationsgrad von 6–10 an PV(pA)<sub>n</sub> fraktioniert zu trennen.

## LITERATUR

- 1 H. Schott, H. Eckstein und E. Bayer, *J. Chromatogr.*, 99 (1974) 31.
- 2 P. T. Gilham, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86 (1964) 4982.
- 3 P. T. Gilham und W. E. Robinson, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86 (1964) 8985.
- 4 P. T. Gilham, *Biochemistry*, 7 (1968) 2809.
- 5 B. Alberts und G. Herrick, *Methods Enzymol.*, 25 (1972) 198.
- 6 M. S. Podnian, A. J. Schlabach und A. Weissbach, *Biochemistry*, 10 (1971) 424.
- 7 C. R. Astell und M. Smith, *Biochemistry*, 11 (1972) 4114.
- 8 C. R. Astell, M. T. Doel, A. Jahnke und M. Smith, *Biochemistry*, 12 (1973) 5068.
- 9 A. Panet und H. G. Khorana, *J. Biol. Chem.*, 16 (1974) 5213.
- 10 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 96 (1974) 79.
- 11 H. Schott, *Angew. Chem.*, 85 (1973) 263; *Angew. Chem., Intern. Ed. Engl.*, 12 (1973) 246.
- 12 H. Schott, F. Brandstetter und E. Bayer, *Makromol. Chem.*, 173 (1973) 247.
- 13 H. Schott, *FEBS Lett.*, 41 (1974) 203.
- 14 R. K. Raiph und H. G. Khorana, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83 (1961) 2926.
- 15 H. G. Khorana und J. P. Vizsolyi, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83 (1960) 677.
- 16 P. A. Kitos und H. Amos, *Biochemistry*, 12 (1973) 5086.
- 17 P. A. Kitos, T. Fuller, G. S. King und R. T. Hersh, *Biochim. Biophys. Acta*, 353 (1974) 362.
- 18 R. Naylor und P. T. Gilham, *Biochemistry*, 5 (1966) 2722.