

CHROM. 14,564

PRÄPARATIVE ISOLIERUNG VON OLIGOTHYMINIDINPHOSPHATEN AUS PARTIALHYDROLYSATEN CHEMISCH ABGEBAUTER DNA MIT HILFE DER TEMPLATE-CHROMATOGRAPHIE*

H. SCHOTT

Chemisches Institut der Universität, Auf der Morgenstelle 18, 7400 Tübingen (B.R.D.)
(Eingegangen am 20. November 1981)

SUMMARY

Preparative isolation of oligothymidine phosphates from partial hydrolysates of chemically degraded DNA using template-chromatography

Herring sperm DNA (500 g) is chemically degraded to oligothymidine phosphates which are subsequently fractionated on a QAE-Sephadex column according to the increasing charges of their phosphate groups. The final fraction contains a mixture (1.5 g) of long-chain oligothymidine phosphates. Chromatographically pure, single substances (1-4 mg) of the (dT)₃₋₁₂ series are separated from the mixture using template chromatography and rechromatography on QAE-Sephadex. Sequence and purity of the isolated oligothymidine phosphates are checked using paper chromatography, high-pressure liquid chromatography and homochromatography as well as the two-dimensional fingerprint method.

EINLEITUNG

Desoxyribonucleinsäure (DNA) lässt sich unter bestimmten Bedingungen chemisch zu Gemischen von Oligothymidinphosphaten abbauen. Mit bekannten chromatographischen Trennmethoden sind aus dem erhaltenen Gemisch bisher nur Oligothymidinphosphate mit bis zu 7 Monomereinheiten in präparativen Mengen zugänglich¹. Mit Hilfe der Template-Chromatographie², in der die Spezifität des Basenpaarungsmechanismus nach Watson und Crick zur Trennung genutzt wird, ist es inzwischen möglich, chromatographisch reine Oligothymidinphosphate mit bis zu 12 Monomereinheiten in präparativen Mengen aus dem Partialhydrolysat zu isolieren, wie im folgenden gezeigt wird.

* Bei Abkürzungen werden prinzipiell IUPAC-IUB Regeln befolgt [*Eur. J. Biochem.*, 15 (1970) 203].
A₂₆₀-Einheit = Nucleotid-Menge in 1 cm³ Solvens, die bei 260 nm die Absorption 1 ergibt (Schichtdicke 1 cm). PVp(dA)_n-DEAE-Cellulose = Desoxyoligoadenosin-5'-phosphat-DEAE-Cellulose. Tris = a,a,a-Tris(hydroxymethyl)methylamin.

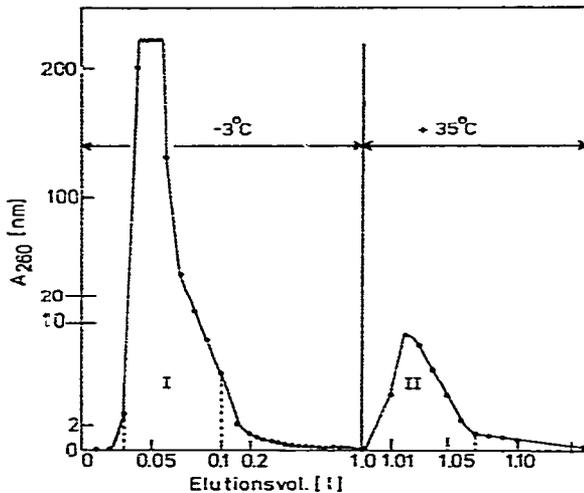


Fig. 1. Elutionsprofil der Template-Chromatographie von 650 mg (10320 A_{260} -Einheiten) einer Oligothymidinphosphatmischung ("1 M Fraktion") an PVp(dA)_n-DEAE-Cellulose. Säulenmasse: 20 × 2 cm; Fließgeschwindigkeit: 350 ml/h. Die Elution erfolgt mit 1.0 M NaCl-0.01 M Na₂HPO₄ (pH 6.5) in der 1. Stufe (-3°C) mit 1 l. in der 2. Stufe (+35°C) mit 150 ml. Fraktionen zu 10 ml werden gesammelt und innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt. Ergebnisse siehe Tabelle I.

EXPERIMENTELLES

Reagenzien

QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden); Enzyme (Boehringer, Mannheim, B.R.D.); Membranen (Amicon, Lexington, MA, U.S.A.); [³²P]ATP (Amersham Buchler, Braunschweig, B.R.D.); Nucleosil 5 μm C₁₈ (Macherey-Nagel, Düren, B.R.D.); (dT)₆ sowie PVp(dA)_n-DEAE-Cellulose⁵ wurden in unserem Labor synthetisiert. Die höhermolekularen Oligothymidinphosphate ("1 M Fraktion") werden auf dem früher beschriebenen Weg^{1,3} aus dem Partialhydrolysat der depurinierten Heringsspermen-DNA gewonnen.

Template-Chromatographie der Oligothymidinphosphate "1 M Fraktion" an PVp(dA)_n-DEAE-Cellulose (vgl. Fig. 1)

Die in der folgenden Trennung verwendete PVp(dA)_n-DEAE-Cellulose Säule (20 × 2 cm) ist mit einem Kühlmantel versehen, der mit einem Thermostaten verbunden ist. Die Elution der Säule erfolgt mit 1 M NaCl, 0.01 M Na₂HPO₄ (pH 6.5) bei einem Durchfluss von ca. 350 ml/h.

Die unterschiedlichen Proben (vgl. Tabelle I) werden jeweils in 2 ml Elutionspuffer gelöst und bei +35°C auf die Säule aufgetragen. Nachdem die Probenlösung in das Gelbett eingezogen ist, wird die Säule auf -3°C gekühlt und anschliessend so lange bei dieser Temperatur eluiert, bis die Absorption des Eluats nach einem steilen Anstieg (Peak I der Fig. 1) unter 0.04 A_{260} -Einheiten fällt. Dieser Wert wird spätestens nach 1 l erreicht. Dann stoppt man die Elution und erwärmt die Säule auf +35°C. Anschliessend wird die Elution fortgesetzt, bis die Absorption nach einem zweiten Anstieg (Peak II der Fig. 1) wieder auf 0.04 A_{260} -Einheiten gesunken ist.

TABELLE I

ERGEBNISSE DER TEMPLATE-CHROMATOGRAPHIE VON OLIGOTHYMINIDINPHOSPHATEN ("1 M FRAKTION") AN PVp(dA)_n-DEAE-CELLULOSE (VGL. FIG. 1)

Aufgetragene Probenmengen		Eluierte Mengen in A ₂₆₀ -Einheiten (%)	
mg	A ₂₆₀ -Einheiten	Peak I bei -3°C	Peak II bei +35°C
(a) "1 M Fraktion"			
100	1480	1360 (91.89)	95 (6.42)
300	4360	4020 (92.20)	240 (5.50)
500	7520	6990 (92.95)	390 (5.19)
650	10320	9610 (93.12)	510 (4.94)
(b) Rechromatographie von Peak I			
500	10650	10480 (98.40)	50 (0.47)
(c) Rechromatographie von Peak II			
-	310	80 (25.81)	225 (72.58)

Hierzu werden ca. 150 ml Elutionspuffer benötigt. Fraktionen zu 10 ml werden gesammelt und photometrisch bei 250, 260, 280 nm gemessen. Die Auftragung der bei A₂₆₀ erhaltenen Messwerte gegen das Elutionsvolumen führt zu den in Fig. 1 und 2 abgebildeten Elutionsprofilen. Die Fraktionen von Peak I und II werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, an einer UM 2 Membran entsalzt und anschliessend lyophilisiert. Die Lyophilisate von Peak II werden aus allen Läufen vereinigt und zur Entfernung terminaler Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase behandelt¹. Anschliessend wird der Ansatz mit 30 ml 7 M Harnstoff versetzt und wie folgt an einer QAE-Sephadex Säule fraktioniert.

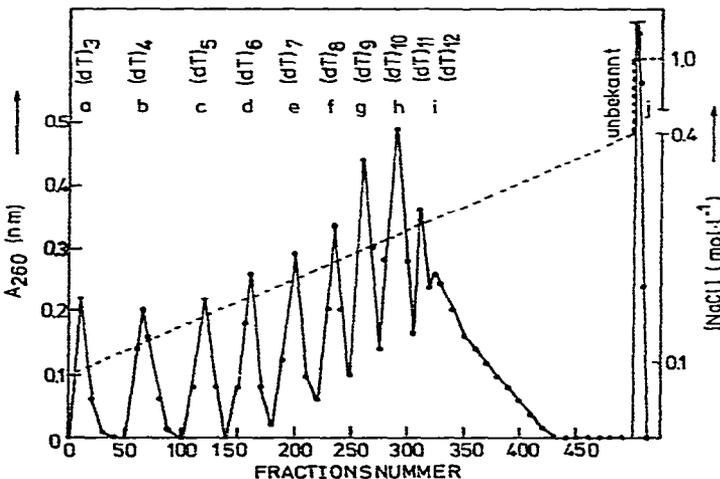


Fig. 2. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung von ca. 1300 A₂₆₀-Einheiten einer dephosphorylierten Oligothymidinphosphatmischung (Peak II, Fig. 1) an QAE-Sephadex. Säulenfüllung: 50 × 2 cm. Die Säule wird bei Raumtemperatur im steigenden NaCl Gradienten eluiert, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert und mit 7 M Harnstoff versetzt ist. Fließgeschwindigkeit ca. 300 ml/h. Ergebnisse siehe Tabelle II.

TABELLE II

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN NACHTRENNUNG AN QAE-SEPHADEX (VGL. FIG. 2) VON OLIGOTHYIMIDINPHOSPHATEN (CA. 1300 A_{260} -EINHEITEN), DIE VON DER $PV_{P(dA)}_+$ -DEAE-CELLULOSE SÄULE IN PEAK II BEI $+35^{\circ}\text{C}$ (VGL. FIG. 1) ELUIERT WERDEN

Vereinigte Fraktionen		Isolierte Oligothymidinphosphate		
Peak	Nr.	Bezeichnung	A_{260} -Einheiten	%
a	1-25	(dT) ₃	41	3.2
b	50-80	(dT) ₄	56	4.4
c	100-140	(dT) ₅	74	5.9
d	145-170	(dT) ₆	58	4.6
e	185-210	(dT) ₇	65	5.1
f	220-245	(dT) ₈	72	5.7
g	255-270	(dT) ₉	82	6.5
h	280-300	(dT) ₁₀	102	8.1
i	310-370	(dT) _{11,12}	166	13.1
j	1 M Fraktion	Unbekannt	181	14.3
Zwischenfraktionen			367	29.0

Säulenchromatographische Fraktionierung der dephosphorylierten Produkte aus Peak II der Fig. 1 an QAE-Sephadex A-25 (vgl. Fig. 2)

Die Reaktionslösung (ca. 1300 A_{260} -Einheiten) wird auf eine mit 0.1 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5), 7 M Harnstoff äquilibrierte QAE-Sephadex A-25 Säule (50 × 2 cm) aufgetragen. Die Säule wird bei Raumtemperatur zunächst mit 200 ml 7 M Harnstoff, dann mit 600 ml 0.1 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5), 7 M Harnstoff eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit wird mit einer Schlauchpumpe auf ca. 300 ml/h eingestellt. Anschliessend wird die Elution in einem steigenden NaCl-Gradienten fortgesetzt, 5 l 0.1 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Mischgefäß; 5 l 0.4 M

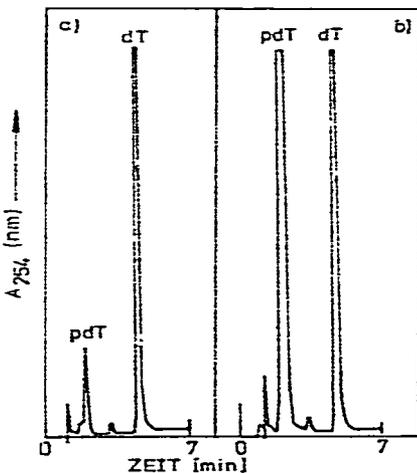


Fig. 3. Elutionsprofile der HPLC an reversed-phase nach Totalhydrolyse der Lyophilisate von (a) Peak h, (b) Peak i mit Phosphodiesterase aus Schlangengift. Einzelheiten siehe Experimentelles.

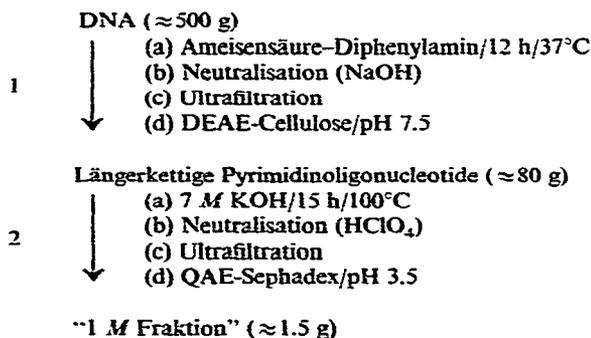
NaCl, 0.05 M Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Vorratsgefäß. Nach dem Gradienten wird die Säule mit ca. 400 ml 1 M NaCl eluiert. Fraktionen zu 20 ml werden gesammelt. Fraktionen von Peak a-i der Fig. 2 werden nach den Angaben in Tabelle II vereinigt, durch Ultrafiltration an einer UM 2 Membran entsalzt und anschliessend lyophilisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengefasst.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) der enzymatisch hydrolysierten Produkte aus Peak e-i der Fig. 2

1–5 A_{260} Einheiten des jeweiligen Oligothymidinphosphats werden in 20 μ l Wasser, 5 μ l 1 M Tris-HCl (pH 8.1), 5 μ l 0.1 M $MgCl_2$ gelöst und mit ca. 5–10 μ l der käuflichen Phosphodiesterase aus Schlangengift 6 h bei 37°C inkubiert. Anschliessend wird der Reaktionsansatz an einer Nucleosil 5 μ m C_{18} -Säule (0.46 \times 11.25 cm) mittels eines Waters Assoc. Hochdruckflüssigkeitschromatographen mit folgendem linear steigenden Puffergradienten bei Raumtemperatur fraktioniert. Puffer A = 0.1 M Ammoniumacetat (pH 7.5); Puffer B = 60% CH_3OH , 40% H_2O . Innerhalb von 10 min steigt Puffer B von 0 auf 45%, bei einem Durchfluss von 1 ml/min. Der Elutionsvorgang wird automatisch bei 254 nm registriert, wobei die Trennungen von Peak h und i zu den in Fig. 3 wiedergegebenen Elutionsprofilen führen, die stellvertretend für die übrigen Trennungen abgebildet sind.

ERGEBNISSE

DNA aus Heringsspermen wird nach dem in Schema 1 skizzierten und in früheren Arbeiten^{1,3} ausgeführten Weg in zwei Schritten zu Oligothymidinphosphaten abgebaut.



Schema 1. Chemischer Abbau einer DNA zu Oligothymidinphosphaten

Im 1. Hydrolyseschritt³ werden nach der Methode von Burton⁴, die wir in den präparativen Massstab übertragen haben, mit Ameisensäure in Anwesenheit von Diphenylamin die Purinbausteine der DNA zerstört. Das anfallende Partialhydrolysat wird mit NaOH neutralisiert, von Salz und niedermolekularen Bruchstücken durch Ultrafiltration befreit und schliesslich säulenchromatographisch an DEAE-Cellulose bei pH 7.5 fraktioniert. Auf diesem Weg werden die kurzen Fragmente, die den Hauptanteil des Partialhydrolysats bilden, von den längerkettigen Pyrimidinoligonucleotiden getrennt, die nur ca. 16% der zur Spaltung eingesetzten DNA ausmachen.

Im 2. Hydrolyseschritt¹ werden die länger-kettigen Fragmente mit 7 M KOH zu Oligothymidinphosphaten abgebaut. Durch die alkalische Hydrolyse werden bevorzugt die Cytidylateinheiten der Pyrimidinoligonucleotide zerstört, während die intakten Thymidylatsegmente aus dem Molekülverband freigesetzt werden. Das neutralisierte und ultrafiltrierte Partialhydrolysat wird anschliessend säulenchromatographisch an QAE-Sephadex bei pH 3.5 im steigenden Salzgradienten fraktioniert, wobei zum Schluss mit 1 M NaCl ein Gemisch von Oligothymidinphosphaten mit mehr als 7 Monomereinheiten eluiert wird. Von dieser Mischung, die im folgenden als "1 M Fraktion" bezeichnet wird, erhält man beim Abbau von ca. 500 g Heringsspermen-DNA ca. 1.5 g. Mit herkömmlichen Trennmethode ist uns bisher keine weitere Auftrennung der "1 M Fraktion" gelungen. Erst mit Hilfe der Template-Chromatographie² und nachfolgender Fraktionierung an QAE-Sephadex ist es möglich, definierte Oligothymidinphosphate aus der "1 M Fraktion" zu isolieren, wie im folgenden ausgeführt wird.

Zunächst wird die "1 M Fraktion" an PVp(dA)_n-DEAE-Cellulose⁵ in zweistufigen Temperaturgradienten in zwei Fraktionen getrennt (vgl. Fig. 1). Die 1. Fraktion (Peak I) enthält Verbindungen, die mit den immobilisierten Oligodesoxyadenylsäuren keine Wechselwirkungen eingehen, während die Komponenten der 2. Fraktion (Peak II) an der stationären Phase adsorbiert werden. Bei der nachfolgenden Auftrennung der 2. Fraktion (Peak II), die an QAE-Sephadex durchgeführt wird (vgl. Fig. 2), werden Oligothymidinphosphate mit 3–12 Monomereinheiten erhalten.

Bei der PVp(dA)_n-DEAE-Cellulose, deren Struktur in Fig. 4 schematisch dargestellt ist, handelt es sich um DEAE-Cellulose, an der kovalent an Polyvinylalkohol (PV) gebundene Oligomere der Desoxyriboadenylsäure p(dA)_n, über Nebenwirkungskräfte immobilisiert sind. Dieses Trennmateriale haben wir früher zur präparativen Trennung synthetischer Oligothymidylsäuren verwendet⁵.

Die Auftrennung der "1 M Fraktion" an PVp(dA)_n-DEAE-Cellulose wird wie folgt durchgeführt. Unterschiedliche Mengen (100, 350, 500, 650 mg) werden in vier Läufen chromatographiert. Das Lyophilisat wird jeweils im Elutionspuffer gelöst und auf die auf +35°C erwärmte PVp(dA)_n-DEAE-Cellulose aufgetragen. Anschliessend wird die Säule auf -3°C gekühlt und zunächst bei dieser Temperatur eluiert. Unter diesen Bedingungen bilden die im Lyophilisat enthaltenen Oligothymidinphosphate mit den stationär gebundenen Oligodesoxyadenylsäuren Basenpaare im Sinne von Watson und Crick aus. Die Folge ist, dass die hybridisierten DNA-Fragmente retardiert bleiben, während alle Substanzen, die bei -3°C keine Basenpaare eingehen, eluiert werden. Der Elutionsvorgang wird photometrisch verfolgt. Alle vier Trennungen zeigen praktisch die gleichen Elutionsprofile. Stellvertretend für die übrigen Trennungen ist daher in Fig. 1 das Elutionsprofil der Trennung abgebildet, in der 650 mg der "1 M Fraktion" chromatographiert werden. Nachdem die bei -3°C nicht adsorbierten Produkte in Peak I die Säule verlassen haben, werden anschliessend die hybridisierten DNA-Fragmente bei +35°C gemeinsam in Peak II eluiert. Aus zwei Gründen wählen wir als Elutionstemperatur +35°C. Aus anderen Arbeiten^{2,6} ist bekannt, dass Oligothymidinphosphate mit bis zu 12 Monomereinheiten ab ca. +30°C mit stationär gebundenen Oligoadenylsäuren keine stabilen Basenpaare mehr ausbilden. Andererseits sind im Partialhydrolysat einer natürlichen DNA präparative Mengen an Oligothymidinphosphaten mit über 12 Monomereinheiten sicherlich nicht zu erwarten. Eine Elutionstemperatur über +35°C erscheint daher nicht zweck-

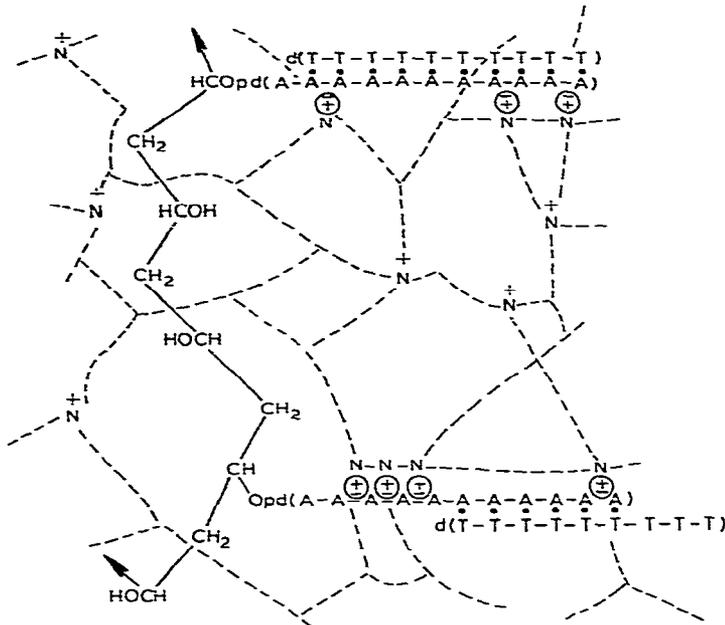


Fig. 4. Schematischer Aufbau der PVp(dA)_n-DEAE-Cellulose.

mässig, zumal DNA-Fragmente mit steigender Temperatur instabiler werden. Die Trennergebnisse sind in Tabelle I zusammengefasst.

Von der aufgetragenen "1 M Fraktion" verlassen bei -3°C bereits ca. 93% die Säule, während ca. 5–6% hybridisieren und dann bei $+35^{\circ}\text{C}$ eluiert werden. Die Menge an adsorbiertem Material nimmt bei Erhöhung der aufgetragenen Probenmenge zu und strebt gegen einen Sättigungswert, der schätzungsweise bei ca. 80 A_{260} -Einheiten/ml PVp(dA)_n-DEAE-Cellulose liegt. Berücksichtigt man, dass die verwendete Säule seit fast 6 Jahren in Gebrauch ist, so beweist die noch vorhandene Kapazität eine beachtliche Stabilität des Materials. Aus allen Läufen werden die Fraktionen von Peak I und II vereinigt, durch Ultrafiltration entsalzt und anschliessend lyophilisiert. Bei der Entsalzung tritt ein Verlust von ca. 20% auf, den wir vorallem darauf zurückführen, dass bei der Ultrafiltration Oligothymidinphosphate teilweise abgebaut werden und dann die Membran passieren.

Die Ergebnisse der folgenden zwei Versuche legen nahe, dass die PVp(dA)_n-DEAE-Cellulose nach dem Basenpaarungsmechanismus trennt. Zunächst werden 500 mg (10650 A_{260} -Einheiten) des Lyophilisats von Peak I, das keine hybridisierfähigen Verbindungen enthalten soll, unter identischen Bedingungen an der PVp(dA)_n-DEAE-Cellulose rechromatographiert. Hierbei werden nur 0.47% bei $+35^{\circ}\text{C}$ eluiert (vgl. Tabelle I). Bei der Rechromatographie des Lyophilisats aus Peak II, in dem Oligothymidinphosphate zu vermuten sind, die mit der stationären Phase Basenpaare ausbilden, werden dagegen nur 25.81% bei -3°C aber 72.58% bei $+35^{\circ}\text{C}$ eluiert (vgl. Tabelle I). Ausserdem zeigen die Absorptionsverhältnisse von A_{250}/A_{260} bzw. A_{280}/A_{260} , die bei pH 7 für Peak I 0.90 bzw. 0.76 für Peak II 0.73 bzw. 0.65 ergeben, bereits deutlich, dass beide Fraktionen unterschiedlich zusammengesetzt sind.

Zur Isolierung definierter Einzelsubstanzen werden die in Peak II eluierten

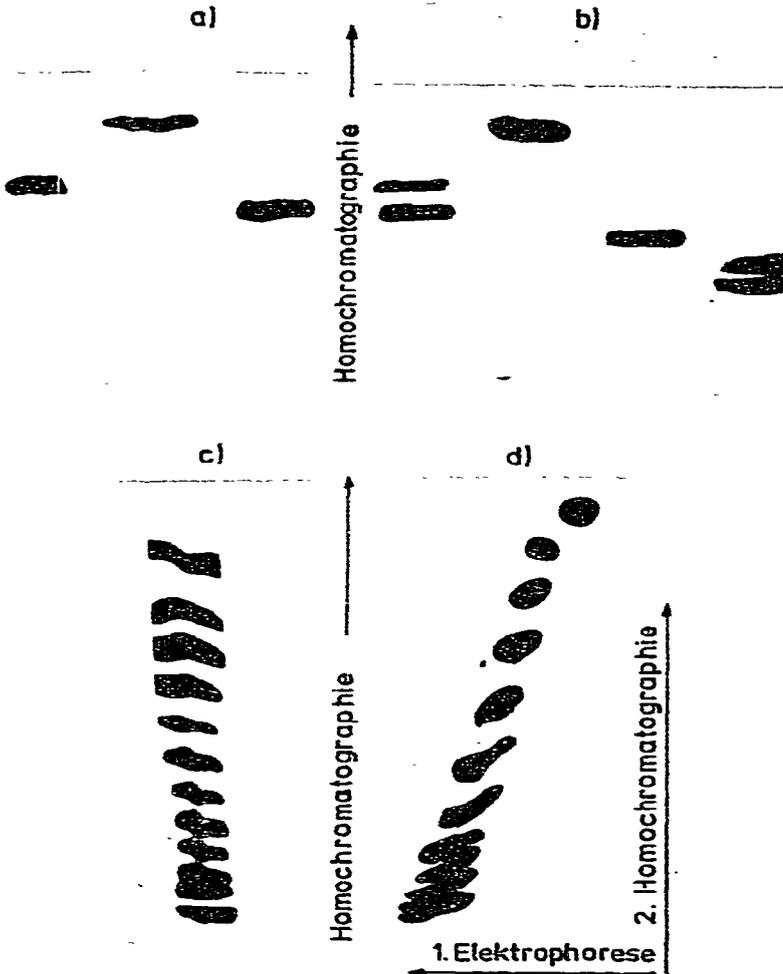


Fig. 5. Autoradiogramme der $[^{32}\text{P}]$ markierten Oligothymidinphosphate aus Peak f-i der Fig. 2. (a) Nach der Homochromatographie von Peak f, g; (b) von Peak h, i; (c) Auftrennung des Partialhydrolysats von Peak i in der Homochromatographie; (d) in der zweidimensionalen Chromatographie. In (a) und (b) entsprechen die Flecken der Autoradiogramme von links nach rechts folgenden Oligothymidinphosphaten: Peak f, $(\text{dT})_5$; Referenz $(\text{dT})_6$; Peak g, $(\text{dT})_9$; Referenz $(\text{dT})_{8,9}$; Referenz $(\text{dT})_6$; Peak h, $(\text{dT})_{10}$; Peak i, $(\text{dT})_{11,12}$.

Produkte aller Läufe anschliessend gemeinsam an QAE-Sephadex fraktioniert. Um die Trennung zu erleichtern, werden zunächst die terminalen Phosphatgruppen der Oligothymidinphosphate enzymatisch mit alkalischer Phosphatase entfernt¹. Nach der enzymatischen Dephosphorylierung resultiert eine Mischung homologer Oligothymidinphosphate $(\text{dT})_n$ (ca. 1300 A_{260} -Einheiten), die sich problemlos an QAE-Sephadex wie folgt auftrennen lässt (vgl. Fig. 2 und Tabelle II).

Die Lösung der dephosphorylierten Oligothymidinphosphate wird auf eine QAE-Sephadex Säule aufgetragen und bei Raumtemperatur im linear steigenden NaCl-Gradienten eluiert, der mit Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert und mit 7 M

Harnstoff versetzt ist. Unter diesen Bedingungen verlassen Peak a-i der Fig. 2 die Säule. Nach dem Gradienten werden mit 1 M NaCl nicht näher untersuchte Produkte gemeinsam in Peak j eluiert. Die Peakfraktionen werden wie in Tabelle II aufgeführt vereinigt, die Menge der darin enthaltenen Oligonucleotide photometrisch bestimmt, durch Ultrafiltration entsalzt und lyophilisiert. Bei dieser Aufarbeitung gehen wiederum bis zu 30% der in den einzelnen Peaks enthaltenen Produkte verloren.

Die Identifizierung der in Peak a-d enthaltenen Oligothymidinphosphate (vgl. Tabelle II) nach dem bereits früher beschriebenen Weg¹ zeigt, dass (dT)₃, (dT)₄, (dT)₅, (dT)₆ nacheinander von der Säule eluiert werden.

Die Produkte von Peak e-i werden nach den in der Oligonucleotidsynthese üblichen Methoden identifiziert. Zunächst werden die Lyophilisate einzelner Peaks auf Papier gemeinsam mit (dT)₆ als Referenzsubstanz chromatographiert. Im Papierchromatogramm bilden alle Lyophilisate einheitliche Flecken, die zwar unterschiedlich schnell aber langsamer als (dT)₆ wandern.

Die Absorptionsverhältnisse der vom Papier eluierten Produkte entsprechen den für Thymidinphosphate charakteristischen Werten von $A_{250}/A_{260} = 0.65 \pm 0.02$ (pH 7), 0.63 ± 0.02 (pH 2) bzw. $A_{280}/A_{260} = 0.71 \pm 0.02$ (pH 7), 0.71 ± 0.02 (pH 2). Aliquote der vom Papier eluierten Produkte werden nach der Totalhydrolyse mit Phosphodiesterase aus Schlangengift an einer Nucleosil 5 μ m C₁₈-Säule chromatographiert (vgl. Fig. 3). Hierbei zeigt sich, dass über 99% des Hydrolysats aus pdT und dT besteht. In den Hydrolysaten von Peak h und i werden vernachlässigbare Spuren von pdC gefunden. Aus dem Verhältnis von dT zu pdT, das sich aus den Peakflächen der HPLC-Trennung errechnet, lässt sich die Kettenlänge des hydrolysierten Oligothymidinphosphates in unserem Fall aus folgendem Grund nicht ermitteln. Wir verwenden einen grossen Überschuss an Enzym und inkubieren bis zu 6 h, um eine vollständige Hydrolyse mit Phosphodiesterase sicherzustellen. Unter diesen Bedingungen kann die in der Enzympräparation als Verunreinigung geringfügig enthaltene Phosphatase pdT weiter zu dT abbauen. Der resultierende erhöhte dT-Gehalt täuscht eine verkürzte Oligonucleotidkette vor.

Die exakte Bestimmung der Kettenlänge wird daher wie folgt durchgeführt. Zunächst werden die Produkte aus Peak e-i mit T₄-Polynucleotid-Kinase in der 5'-Position mit [³²P]ATP phosphoryliert und anschliessend der Homochromatographie^{7,8} unterzogen wobei [³²P](dT)₆ bzw. [³²P](dT)_{7,8} als Marker verwendet werden (vgl. Fig. 5). Aufgrund der R_F-Werte werden den Oligothymidinphosphaten, die in Peak e-i der Fig. 2 enthalten sind, die dort aufgeführten Kettenlängen zugewiesen. Die Homochromatogramme der Produkte von Peak f-i (vgl. Fig. 5) zeigen ausserdem, dass oberhalb der jeweiligen Hauptprodukte Oligothymidinphosphate wandern, die jeweils um eine Monomereinheit verkürzt sind. Es liegt nahe, dass diese Nebenprodukte, deren Anteil unter 5% liegt, bei der Aufarbeitung bzw. Lagerung der vereinigten Peakfraktionen gebildet werden, da Oligonucleotide bekanntlich leicht depolymerisieren. Für unsere Annahme spricht, dass als Nebenprodukte immer nur kürzere aber keine längeren Fragmente gefunden werden. Bei Peak i liegt dagegen eine Mischung von (dT)_{11,12} vor, was aufgrund der ungenügenden Peakauftrennung an QAE-Sephadex (vgl. Fig. 2) nicht anders zu erwarten ist.

Kettenlänge und Sequenz des in Peak i der Fig. 2 enthaltenen längsten Oligothymidinphosphats werden zusätzlich nach der Fingerprintmethode^{7,8} exakt ermittelt und bestätigt. Die Homochromatographie (vgl. Fig. 5c) beweist das Vorliegen eines

zwölfen DNA-Fragmentes, das aufgrund des Fingerprints (Fig. 5d) als $(dT)_{12}$ identifiziert wird.

Die Oligothymidinphosphate sind auf dem hier beschriebenen Weg in Mengen zugänglich, die auch bei der chemischen Synthese von Genfragmenten angestrebt werden. Den Vorteil dieser Methode sehen wir darin, dass die Isolierung weitaus einfacher zu praktizieren ist, als die komplizierte Synthese, die Spezialisten vorbehalten ist. Allerdings ist die chromatographische Isolierung auf DNA-Sequenzen begrenzt, die einerseits in natürlicher DNA gehäuft vorkommen und andererseits mit chemischen Abbaumethoden aus dem Molekülverband unversehrt freigesetzt werden können. Trennleistung und Effektivität der chromatographischen Verfahren in der hier praktizierten Kombination sind bemerkenswert, wenn man bedenkt, dass bspw. die erhaltenen *ca.* 4 mg an chromatographisch reinem $(dT)_{11,12}$ aus dem äusserst komplex zusammengesetzten Partialhydrolysat isoliert werden müssen, das bei chemischem Abbau von 500 g DNA anfällt.

DANK

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

ZUSAMMENFASSUNG

DNA aus Heringsspermen (500 g) wird chemisch zu Oligothymidinphosphaten abgebaut, die anschliessend an QAE-Sephadex in Verbindungen steigender Phosphatladungen fraktioniert werden. In der letzten Fraktion wird ein Gemisch (1.5 g) längerkettiger Oligothymidinphosphate erhalten. Aus dem Gemisch werden mit Hilfe der Template-Chromatographie und anschliessender Nachtrennung an QAE-Sephadex homologe Oligothymidinphosphate (1–4 mg) der Reihe $(dT)_{3-12}$ chromatographisch rein isoliert. Sequenz und Reinheit der isolierten Oligothymidinphosphate werden mittels Papier-, Hochdruckflüssigkeits- und Homochromatographie sowie der zweidimensionalen Fingerprintmethode bestimmt.

LITERATUR

- 1 H. Schott, *Makromol. Chem.*, 182 (1981) 2015.
- 2 H. Schott und E. Bayer, *Advan. Chromatogr.*, 17 (1979) 187.
- 3 H. Schott und M. Schwarz, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 358 (1977) 949.
- 4 K. Burton, *Methods Enzymol.*, 12a (1967) 222.
- 5 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 115 (1975) 461.
- 6 C. R. Astell, M. T. Doel, A. P. Jahnke und M. Smith, *Biochemistry*, 12 (1973) 5068.
- 7 E. Jay, R. Bambara, R. Padmanabhan und R. Wu, *Nucleic Acids Res.*, 1 (1974) 331.
- 8 J. E. Donelson, B. G. Borell, H. L. Weith, H. Kössel und H. Schott, *Eur. J. Biochem.*, 58 (1975) 383.