

CHROM. 16,355

## PRÄPARATIVE ISOLIERUNG VON TETRA-, PENTA- UND HEXAPURIN-OLIGONUCLEOTIDEN AUS PARTIALHYDROLYSATEN DEPYRIMIDI-NIERTER HERINGSSPERMEN-DNA

HERBERT SCHOTT\* und HERBERT SCHRADER

*Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, 7400 Tübingen (B.R.D.)*  
(Eingegangen am 3. Oktober 1983)

---

### SUMMARY

*Preparative isolation of tetra-, penta- und hexapurine oligonucleotides from partial hydrolysates of depyrimidinated herring sperm DNA*

Herring sperm DNA is chemically degraded to a complex mixture of purine nucleotides. The oligonucleotides are separated from the partial hydrolysates by column chromatography. The resulting mixture of trimer to hexamer purine oligonucleotides is subsequently fractionated on QAE-Sephadex into different mixtures of sequence-isomeric purine oligonucleotides. In a final separation, which uses reversed-phase (Nucleosil C<sub>18</sub>) high-performance liquid chromatography, these mixtures are separated under isocratic conditions into 35 pure defined purine oligonucleotides with four to six monomer units, 14 defined mixtures of sequence-isomeric purine oligonucleotides and several unidentified products. Purity and sequence of the isolated oligonucleotides are determined by the "fingerprint" method. The results of the high-performance liquid chromatographic and the "fingerprint" methods of the isolated oligonucleotides are discussed.

---

### EINLEITUNG

DNA kann bekanntlich durch Hydrazin depyrimidiniert und anschliessend durch Basen in Purinoligonucleotide gespalten werden<sup>1-6</sup>. Dieser Weg der chemischen Partialhydrolyse einer DNA wird heute vorallem im analytischen Massstab zur DNA Sequenzierung genutzt<sup>7,8</sup>. Der chemische Abbau einer DNA bietet aber auch die Möglichkeit zur präparativen Darstellung von definierten Purinoligonucleotiden, wenn die Partialhydrolyse und Auftrennung des komplexen Hydrolysats im präparativen Massstab gelingt.

In früheren Arbeiten haben wir die chemische Partialhydrolyse einer DNA zu Purinoligonucleotiden im 40-100 g Ansatz beschrieben<sup>9-11</sup> und aus dem Partialhydrolysats definierte Mono- bis Tripurinnucleotide präparativ isoliert<sup>12</sup>. Der hierbei verwendete Trennungsgang wurde inzwischen weiter ausgearbeitet, so dass jetzt auch Tetra- bis Hexapurinnucleotide entweder als definierte Gemische von Sequenziso-

meren oder als Einzelsubstanzen aus dem Partialhydrolysat einer depyrimidinierten DNA in präparativen Mengen erhältlich sind, wie im folgenden gezeigt wird.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### Reagenzien

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Ammoniumacetat, konz. Salzsäure werden "p.a.", die übrigen Chemikalien in "chemisch reiner" Form verwendet. Methanol "für die Chromatographie" (Merck, Darmstadt, B.R.D.). QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden); DNA (PWA Waldhof, Mannheim, B.R.D.); alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (E.C. 3.1.3.1.), Phosphodiesterase aus Schlangengift (E.C. 3.1.4.1.) (Boehringer, Mannheim, B.R.D.); Ultrafiltrationsmembranen (Amicon, Lexington, MA, U.S.A.); Nucleosil C<sub>18</sub>, 7.0 µm (Machery, Nagel & Co., Düren, B.R.D.); und Chromatographiepapier Nr. 2316 (Schleicher & Schüll, Dassel, B.R.D.) Bogengröße 58 × 60 cm, werden verwendet.

### Laufmittel für die Papierchromatographie

System A: Ethanol-1 M Ammoniumacetat (pH 7.5) (7:3); System B: 1-Propanol-konz. Ammoniak-Wasser (55:10:35).

### Pufferlösungen

1 M Tris-HCl (pH 7.5): 121 g (1 M) Tris werden in 900 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird mit konz. HCl (< 50 ml) auf pH 8.1 bzw. 7.5 eingestellt und dann mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

1 M NaHCO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9.6): 65.3 g (0.78 M) NaHCO<sub>3</sub> und 23.5 g (0.22 M) wasserfreies Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> werden in 1000 ml Wasser aufgenommen.

1 M Ammoniumacetat (pH 7.5): 77 g Ammoniumacetat werden in 1000 ml Wasser aufgenommen. Der pH-Wert wird überprüft und falls erforderlich auf pH 7.5 eingestellt.

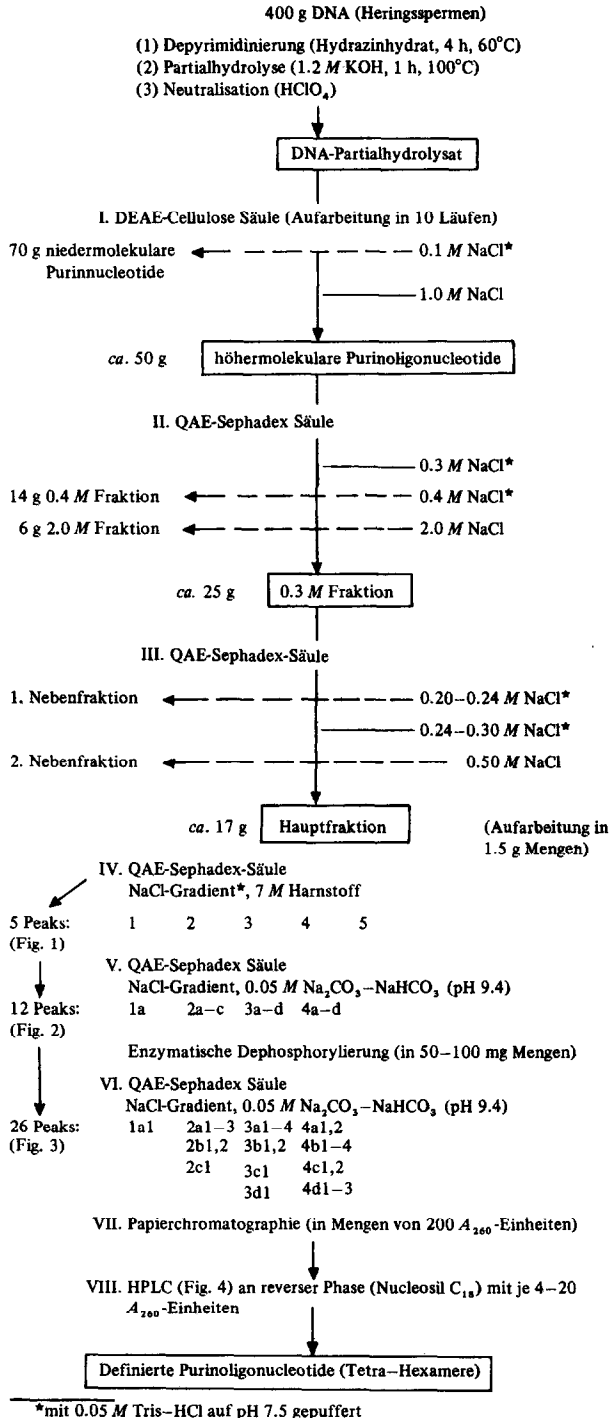
### Säulenchromatographie

Alle präparativen säulenchromatographischen Trennungen erfolgen bei Raumtemperatur an QAE-Sephadex A-25. Der Durchfluss wird mit einer Schlauchpumpe geregelt. Fraktionen zu ca. 20 ml werden gesammelt. Die Absorption jeder 10., bei Bedarf jeder 5. Fraktion wird photometrisch bei 260 nm gemessen und graphisch gegen das Elutionsvolumen aufgetragen, wobei die abgebildeten Elutionsprofile erhalten werden. Vereinigte Peakfraktionen werden an einer UM 2 oder UM 05 Membran durch Ultrafiltration entsalzt.

### Trennungsgang (Schema 1)

(A) II. Schritt: Säulenchromatographische Fraktionierung des höhermolekularen Purinoligonucleotidgemisches

50 g des höhermolekularen Purinoligonucleotidgemisches werden, in 1.2 l Wasser gelöst, auf eine QAE-Sephadex Säule gepumpt. Die Säulenfüllung beträgt 70 × 8 cm I.D. und ist mit 0.2 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) äquilibriert. Nach der Elution der Säule mit 10 l des gleichen Puffers folgt ein dreistufiger NaCl-Gradient,



Schema 1. Trennungsgang zur Isolierung von Purinnucleotiden aus dem Partialhydrolysat der chemisch depyrimidinieren Heringsspermen-DNA. Die nach dem VIII. Schritt isolierten Purinoligonucleotide werden mit der "Fingerprint"-Methode sequenziert (vgl. Fig. 5, 6). Die Ergebnisse sind in Tabelle VI zusammengefasst.

der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist. Nach 60 l 0.3 M NaCl folgen 30 l 0.4 M NaCl und abschliessend 5 l 2 M NaCl. Der Durchfluss beträgt 800 ml/h. Die Fraktionen, die mit 0.3 M, 0.4 M und 2 M NaCl die Säule verlassen, werden am Rotationsverdampfer konzentriert, an einer UM 2 Membran entsalzt und anschliessend lyophilisiert. Hierbei entfallen auf die "0.3 M Fraktion" ca. 25 g (50%), auf die "0.4 M Fraktion" ca. 14 g (28%) und auf die "2 M Fraktion" ca. 6 g (12%), die jeweils als hellgelbe Pulver erhalten werden.

(B) III. Schritt: Säulenchromatographische Nachtrennung der "0.3 M Fraktion"

25 g (ca. 545,000  $A_{260}$ -Einheiten) der "0.3 M Fraktion" werden, in 500 ml Wasser gelöst, auf eine QAE-Sephadex Säule gepumpt. Die Säulenfüllung beträgt  $70 \times 8$  cm I.D. und ist mit 0.2 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) äquilibriert. Die Säule wird mit folgendem fünfstufigen NaCl-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist, mit 800 ml/h eluiert: (1) 10 l 0.20 M NaCl, (2) 50 l 0.24 M NaCl, (3) 20 l 0.27 M NaCl, (4) 10 l 0.30 M NaCl und (5) 8 l 0.50 M NaCl. Die 10 l der ersten Stufe sowie die ersten 10 l der zweiten Stufe (0.24 M NaCl) bilden zusammen die "1. Nebenfraktion" (30,400  $A_{260}$ -Einheiten, 5.6%), die nicht untersucht wird. Die nachfolgenden Eluate der zweiten bis vierten Stufe "Hauptfraktion" werden vereinigt, während die 8 l der letzten Stufe (0.50 M NaCl) als "2. Nebenfraktion" (100,500  $A_{260}$ -Einheiten, 18.4%) ebenfalls verworfen werden. Die vereinigten Eluate der "Hauptfraktion" (414,000  $A_{260}$ -Einheiten, 76%) werden konzentriert, an einer UM 2 Membran entsalzt, lyophilisiert und ergeben ca. 17 g (68%) eines hellgelben Pulvers, das in den folgenden Trennungen weiter aufgearbeitet wird.

(C) IV. Schritt: Säulenchromatographische Nachtrennung der "Hauptfraktion" aus (B) unter Zusatz von 7 M Harnstoff (vgl. Fig. 1)

1.5 g (ca. 36,000  $A_{260}$ -Einheiten) der "Hauptfraktion" aus (B) werden, in 50 ml 7 M Harnstoff gelöst, auf eine mit 0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5), 7 M Harnstoff äquilibrierte QAE-Sephadex Säule ( $65 \times 5$  cm I.D.) aufgetragen. Die Säule

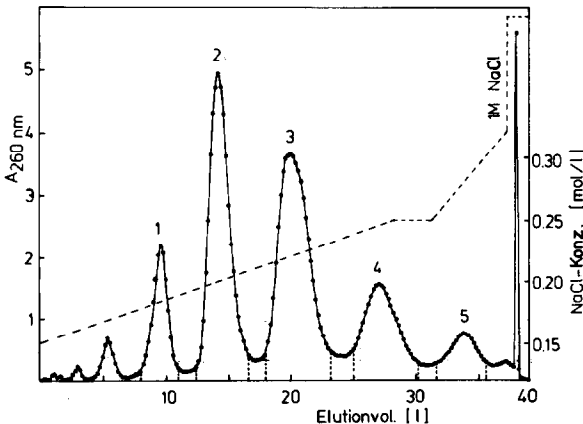


Fig. 1. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Trennung (IV. Schritt in Schema 1) von 1.5 g der "Hauptfraktion" des III. Schritts in Schema 1 an QAE-Sephadex ( $65 \times 5$  cm I.D.). Die Elution erfolgt bei einem Durchfluss von 800 ml/h im steigenden NaCl-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert und mit 7 M Harnstoff versetzt ist. Die Fraktionen von Peak 1-4 werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt und im V. Schritt (Schema 1) einzeln nachgetrennt (vgl. Fig. 2).

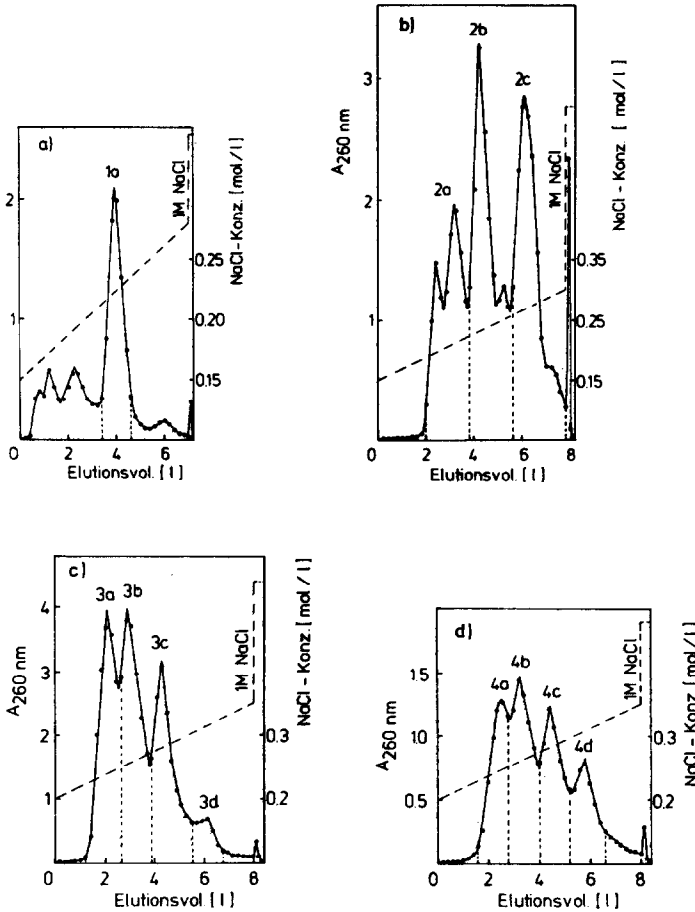


Fig. 2. Elutionsprofile (a-d) der säulenchromatographischen Nachtrennung (V. Schritt in Schema 1) der vereinigten Fraktionen von Peak 1-4 der Fig. 1 an QAE-Sephadex. Die Rechromatographie erfolgt unter den Bedingungen der Tabelle I im steigenden NaCl-Gradienten, der mit 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> auf pH 9.4 gepuffert ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefasst. Die Fraktionen von Peak 1a, 2a-c, 3a-d, 4a-d werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. Die Lyophilisate werden enzymatisch dephosphoryliert und säulenchromatographisch nachgetrennt (vgl. Fig. 3).

wird mit folgendem vierstufigen NaCl-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert und mit 7 M Harnstoff versetzt ist, mit 800 ml/h eluiert: (1) 14 l 0.15 M NaCl im Mischgefäß, 14 l 0.25 M NaCl im Vorratsgefäß; (2) 3 l 0.25 M NaCl; (3) 3 l 0.25 M NaCl im Mischgefäß, 3 l 0.32 M NaCl im Vorratsgefäß; (4) 2 l 1 M NaCl. Fraktionen von Peak 1-4 (Fig. 1) werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt und im nächsten Schritt aufgearbeitet, während die von Peak 5 nicht weiter verwendet werden. Die Ergebnisse des IV. Trennschrittes sind in Tabelle III zusammengefasst.

(D) V. Schritt: Säulenchromatographische Nachtrennung der vereinigten Fraktionen von Peak 1-4 der Fig. 1 bei pH 9.4 (vgl. Fig. 2)

Die vereinigten Peakfraktionen aus (C) werden mit Wasser auf das dreifache

TABELLE I

BEDINGUNGEN DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN NACHTRENNUNG DER VEREINIGTEN FRAKTIONEN VON PEAK 1-4 (FIG. 1) AN QAE-SEPHADEX IM STEIGENDEN NaCl-GRADIENTEN, DER MIT 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> AUF pH 9.4 GEPUFFERT IST (V. SCHRITT IN SCHEMA 1)

Fraktionen von Peak	Säulenmasse Länge × I.D. (cm)	NaCl-Gradienten				Elutions- profil Fig. 2
		Mischgefäß		Vorratsgefäß		
		Vol. (l)	NaCl-Konz. (M)	Vol. (l)	NaCl-Konz. (M)	
1	20 × 2	3.5	0.15	3.5	0.28	a
2	45 × 2	4.0	0.15	4.0	0.30	b
3	50 × 2	4.0	0.20	4.0	0.35	c
4	45 × 2	4.0	0.20	4.0	0.35	d

Volumen verdünnt auf QAE-Sephadex Säulen aufgetragen. Hierbei wird Harnstoff und teilweise auch NaCl eluiert, während die Purinolonucleotide adsorbieren. Die adsorbierten Nucleotide werden nach den in Tabelle I angegebenen Bedingungen im steigenden NaCl-Gradienten, der mit 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> auf pH 9.4 gepuffert ist, fraktioniert. Der Durchfluss beträgt jeweils 400 ml/h. Abschliessend wird jeweils mit ca. 200 ml 1 M NaCl noch adsorbiertes Material eluiert. Peakfraktionen (vgl. Fig. 2) innerhalb der senkrechten Strichelung werden vereinigt, am Rotationsverdampfer konzentriert, an einer UM 2 Membran entsalzt und schliesslich lyophilisiert. Die Ergebnisse des V. Trennschritts sind in Tabelle III zusammengefasst.

(E) VI. Schritt: Säulenchromatographische Nachtrennung der enzymatisch dephosphorylierten Lyophilisate von Peak 1a, 2a-c, 3a-d, 4a-d der Fig. 2 bei pH 9.4 (vgl. Fig. 3)

50-100 mg des jeweiligen Lyophilisats von Peak 1a, 2a-c, 3a-d, 4a-d, die aus (D) erhalten werden, werden in 0.4 ml Wasser gelöst, mit 0.05 ml 1 M Tris-HCl (pH 8.1), 100 U alkalischer Phosphatase versetzt und 12 h bei 37°C inkubiert. Anschliessend werden die einzelnen Ansätze mit Wasser auf 10 ml verdünnt und unter den Bedingungen der Tabelle II säulenchromatographisch fraktioniert. Die Säulenfüllungen sind jeweils mit dem Elutionspuffer der 1. Gradientenstufe äquilibriert. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 400 ml/h. Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung (vgl. Fig. 3) werden vereinigt, am Rotationsverdampfer konzentriert, an einer UM 05 Membran entsalzt und lyophilisiert. Die Ergebnisse des VI. Trennschrittes sind in Tabelle IV zusammengefasst.

(F) VII. Schritt: Papierchromatographie der Lyophilisate aus (E)

Ca. 200 A<sub>260</sub>-Einheiten der Lyophilisate von Peak 2a<sub>1-3</sub>; 2b<sub>1,2</sub>; 2c<sub>1</sub>; 3a<sub>3,4</sub>; 3b<sub>2</sub>; 3c<sub>1</sub>; 3d<sub>1</sub>; 4a<sub>1,2</sub>; 4b<sub>1-4</sub>; 4c<sub>1,2</sub>; 4d<sub>1-3</sub> werden jeweils auf einen Bogen Chromatographiepapier aufgetragen und im System B absteigend chromatographiert. Die Purinolonucleotide werden anschliessend vom Papier eluiert und lyophilisiert.

(G) VIII. Schritt: Säulenchromatographische Nachtrennung der Lyophilisate aus (F) mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an reversed Phase (vgl. Fig. 4)

Von den lyophilisierten Peakfraktionen aus (F) wird jeweils soviel in 0.5 ml

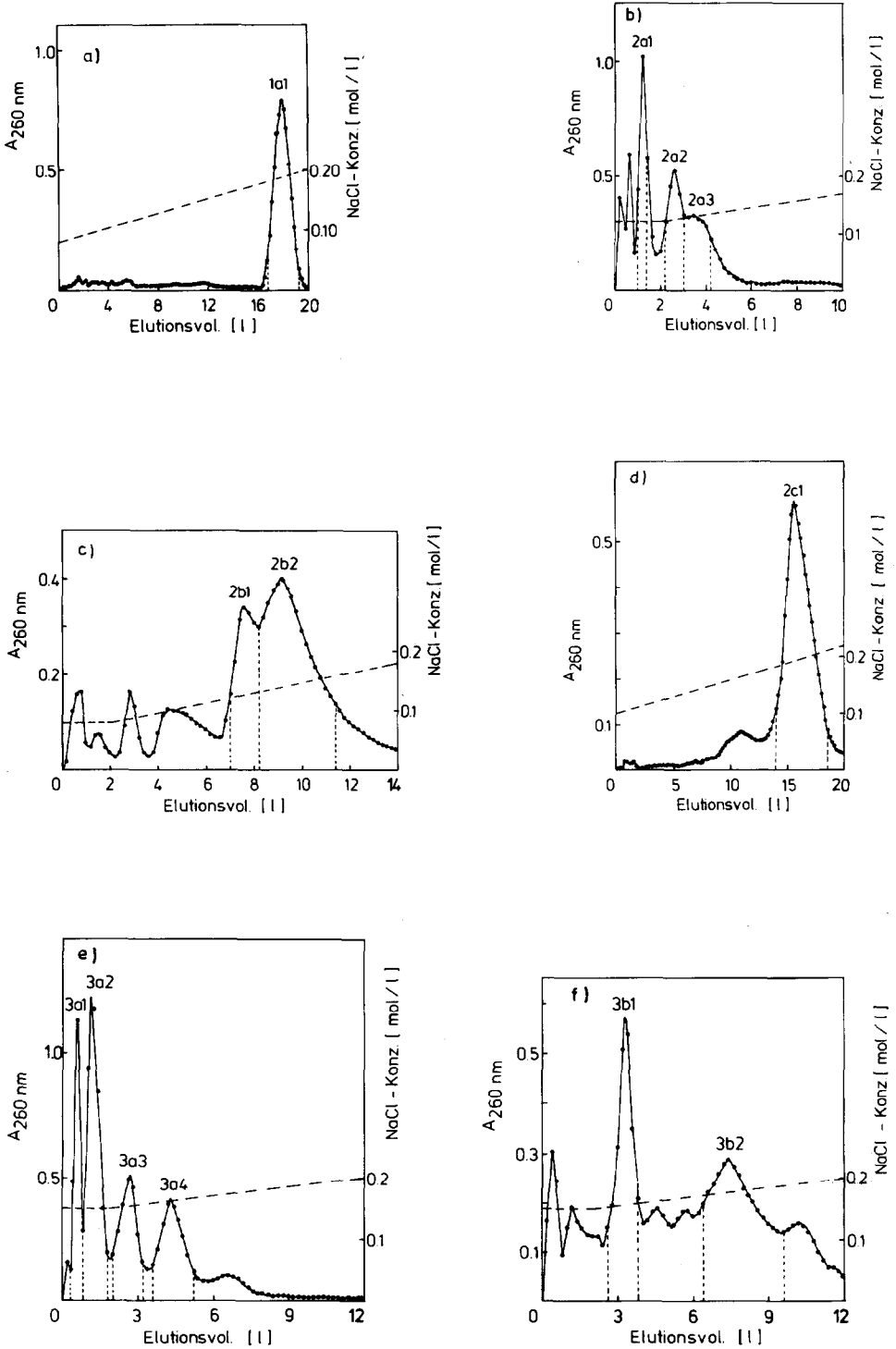


Fig. 3.

(Fortsetzung S. 388)

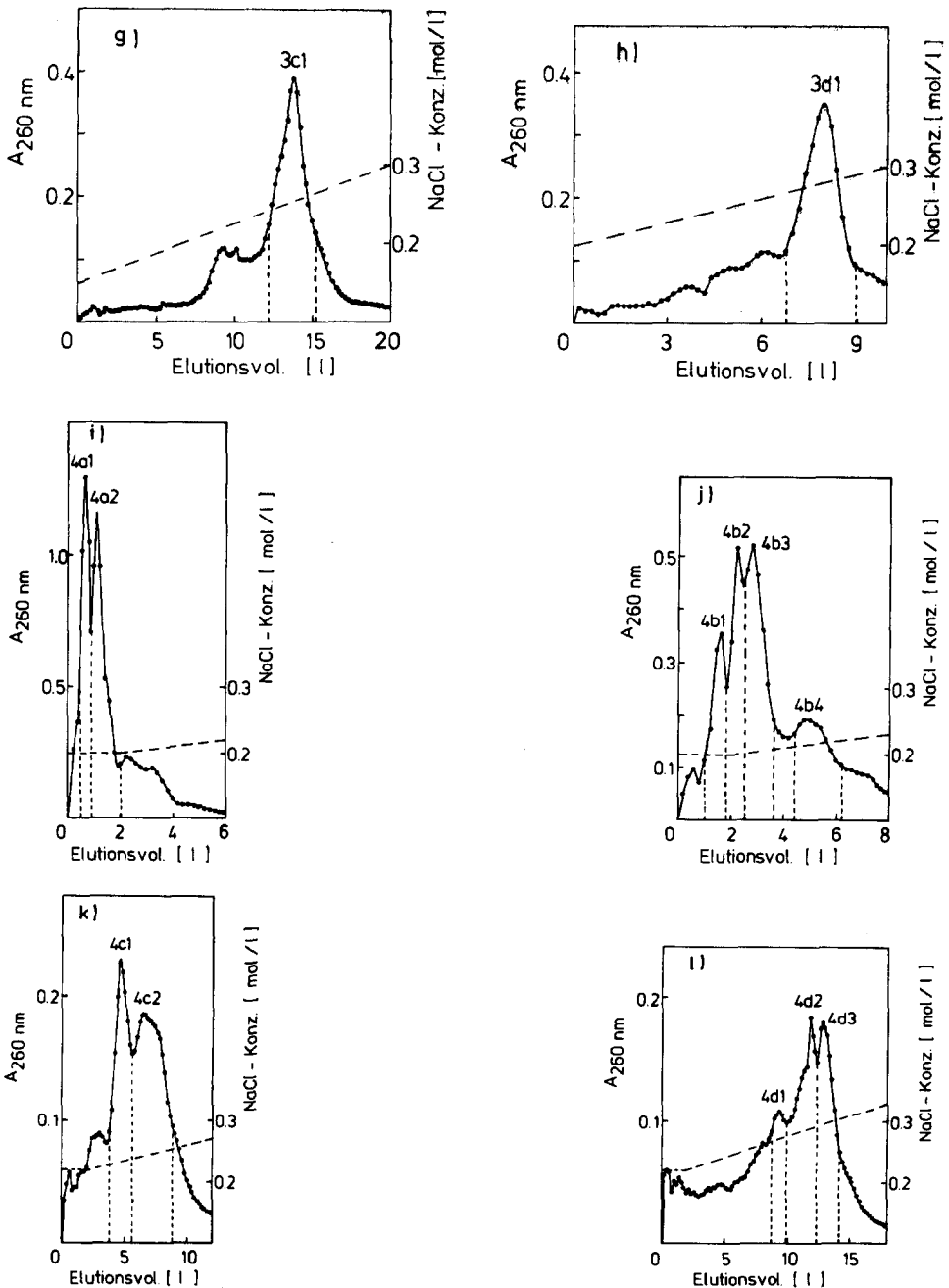


Fig. 3. Elutionsprofile (a-l) der säulenchromatographischen Nachtrennung (VI. Schritt in Schema 1) der dephosphorylierten Lyophilisate von Peak 1a, 2a-c, 3a-d, 4a-d aus Fig. 2 an QAE-Sephadex. Die Rechromatographie (50-100 mg) erfolgt unter den Bedingungen der Tabelle II im steigenden NaCl-Gradienten, der mit 0.05 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  auf pH 9.4 gepuffert ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengefasst. Peakfraktionen werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. Die Lyophilisate von Peak 1a1, 3a1, 3a2, 3b1 enthalten chromatographisch reine Purintrinucleosiddiphosphate (siehe Tabelle V). Die übrigen Lyophilisate werden auf Papier chromatographiert und anschließend mit Hilfe der HPLC säulenchromatographisch nachgetrennt (vgl. Fig. 4).



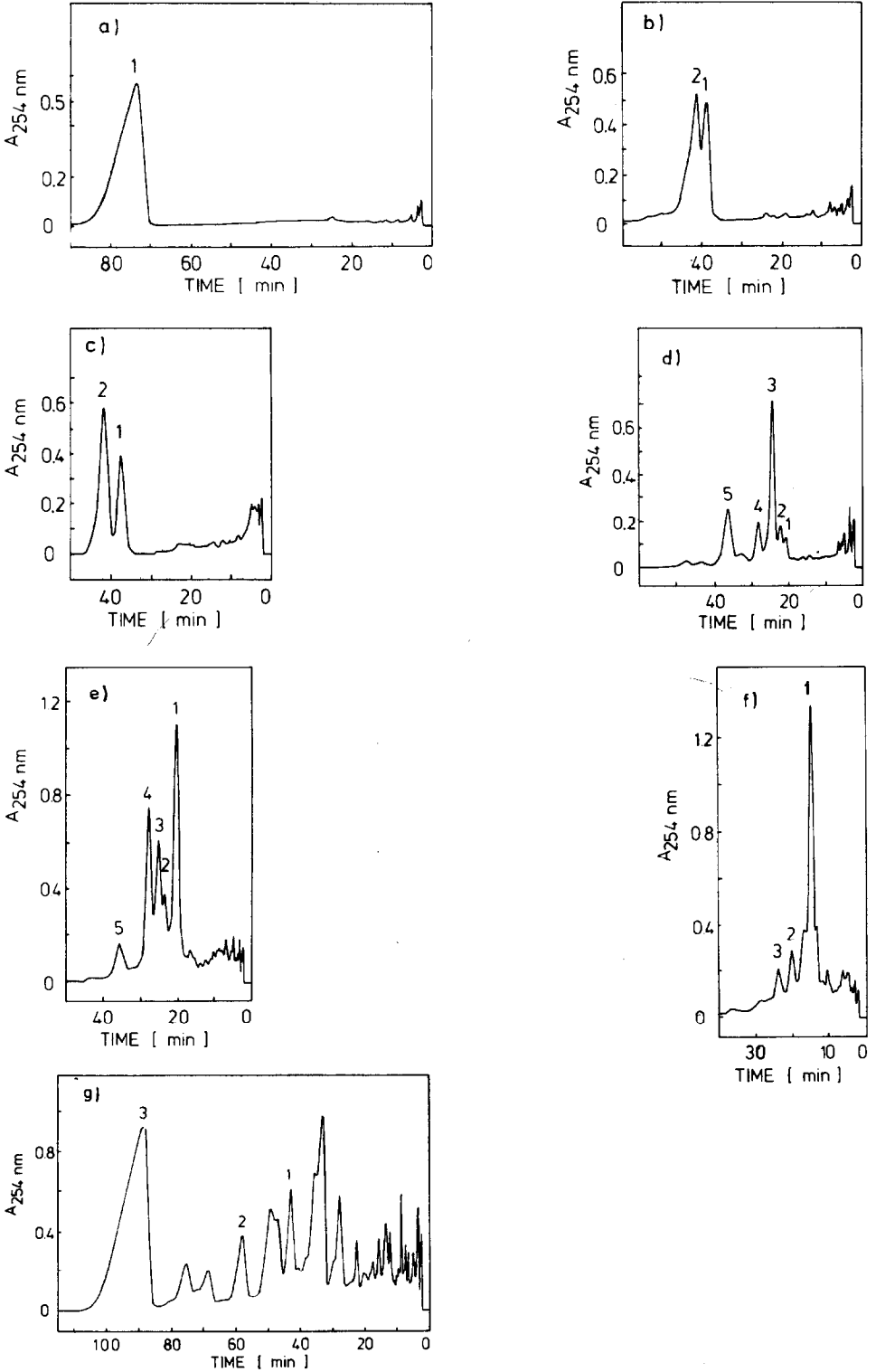


Fig. 4.

(Fortsetzung S. 390)

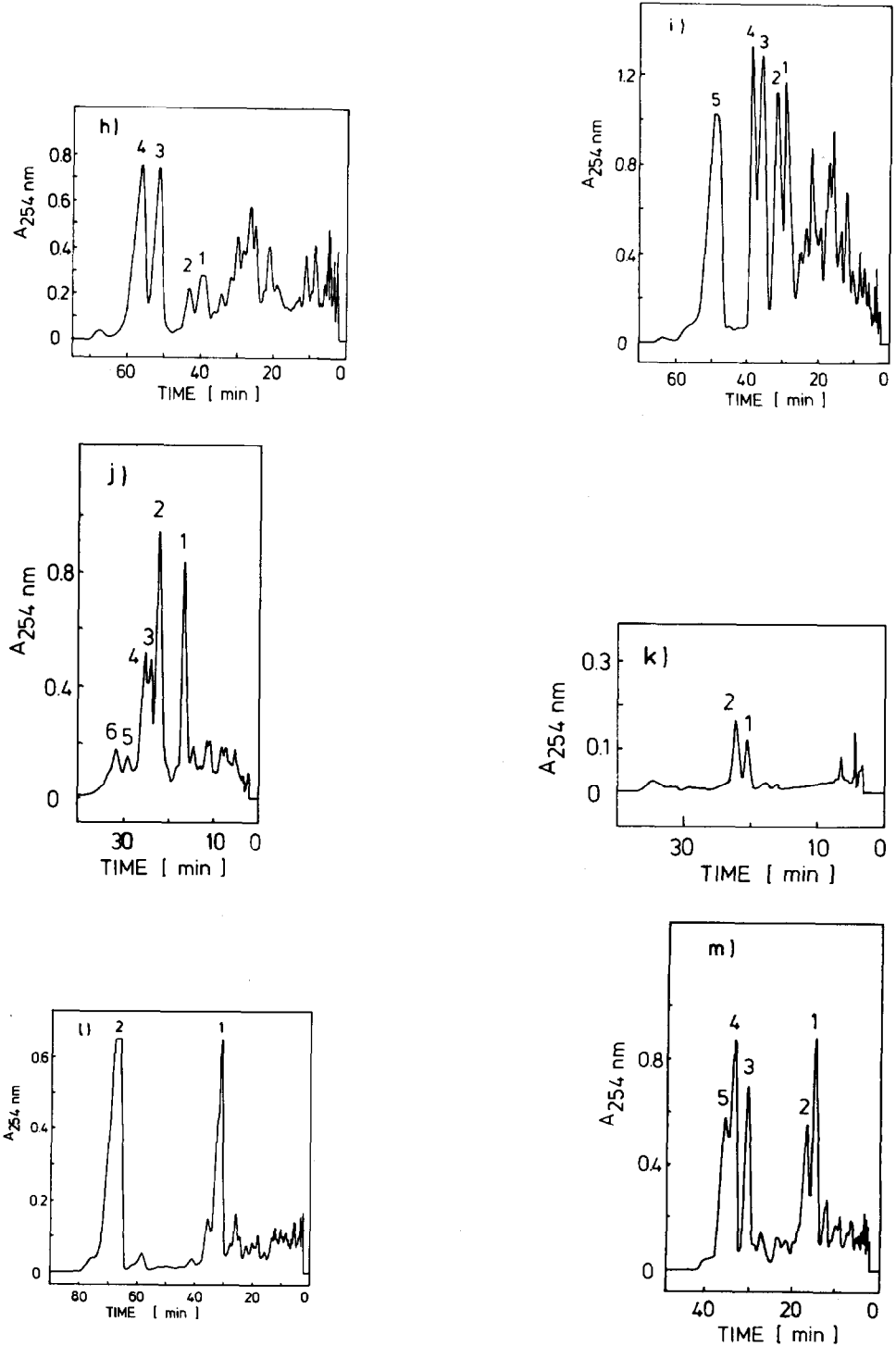


Fig. 4.

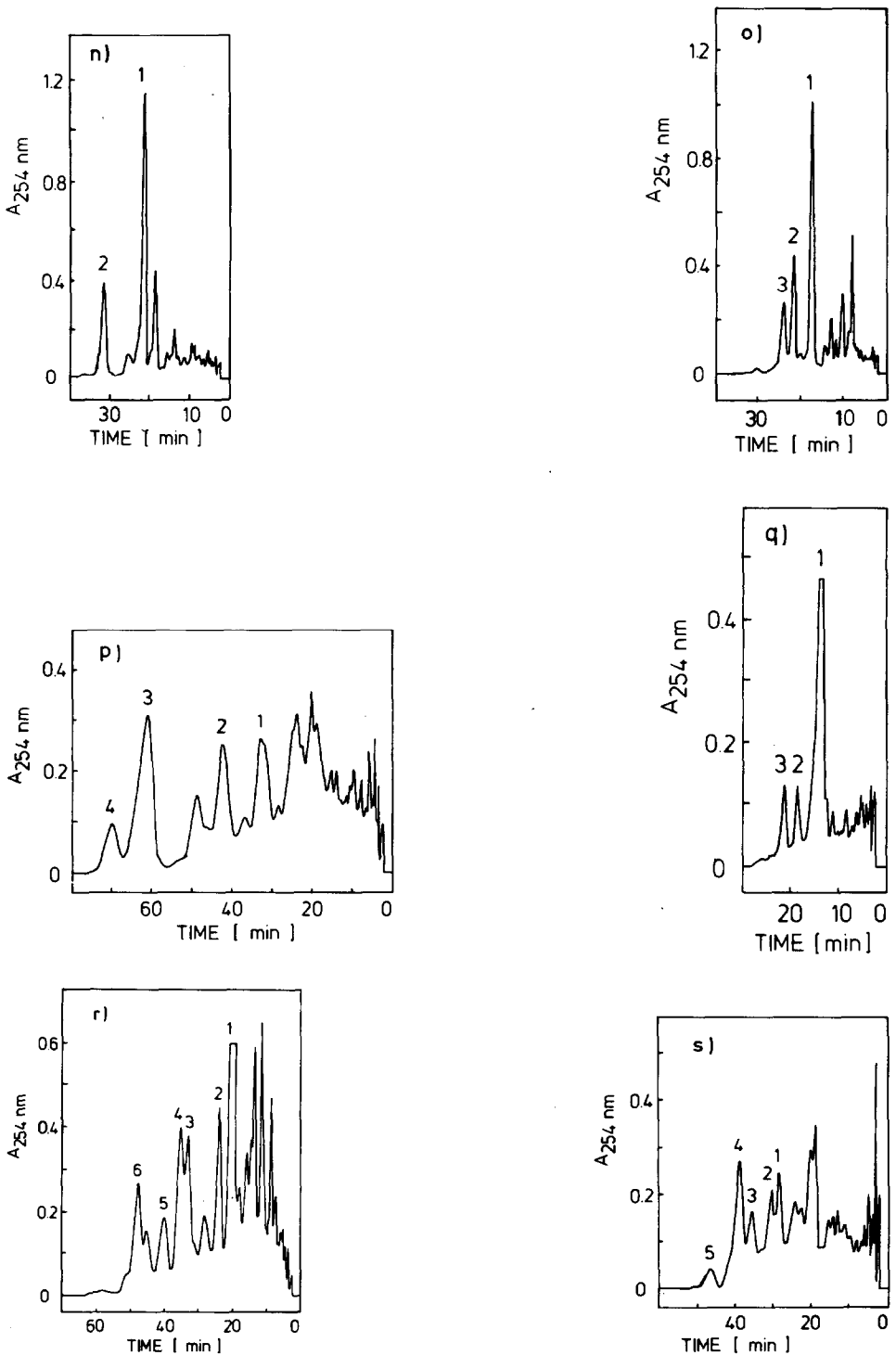


Fig. 4.

(Fortsetzung S. 392)

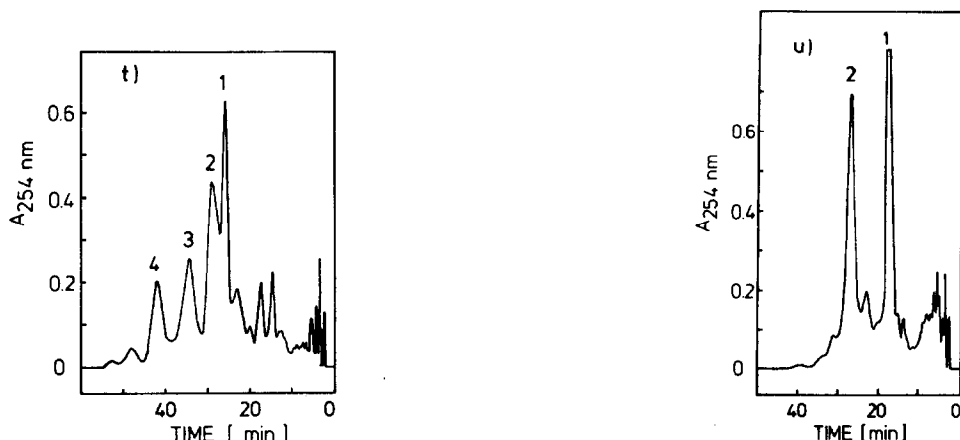


Fig. 4. Elutionsprofile (a–u, VIII. Schritt in Schema 1) der säulenchromatographischen Nachtrennung der papierchromatographisch gereinigten Lyophilisate von Peak 2a1–3; 2b1,2; 2c1; 3a3,4; 3b2; 3c1; 3d1; 4a1,2; 4b1–4; 4c1,2; 4d1–3 der Fig. 3 mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer Nucleosil C<sub>18</sub> Säule (250 × 4.6 mm I.D.). Die Rechromatographie (< 20 A<sub>260</sub>-Einheiten) erfolgt mit einer Mischung aus 75% A (A: 0.1 M Ammoniumacetat pH 7.5); 25% B (B: Methanol-Wasser, 60:40) bei Raumtemperatur mit 1 ml/min. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI zusammengefasst. Die isolierten Peakfraktionen werden lyophilisiert und mit Hilfe der "Fingerprint"-Methode sequenziert (vgl. Fig. 5, 6).

TABELLE II

BEDINGUNGEN DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN NACHTRENNUNGEN DER DEPHOSPHORYLIERTEN LYOPHILISATE (CA. 50–100 mg) VON PEAK 1a, 2a–c, 3a–d, 4a–d AUS FIG. 2 AN QAE-SEPHADEX IM STEIGENDEN NaCl-GRADIENTEN, DER MIT 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> AUF pH 9.4 GEPUFFERT IST (VI. SCHRITT IN SCHEMA 1)

Peak Nr.	Säulenmasse, Länge × I.D. (cm)	Molare NaCl-Konzentrationen der Gradienten				Elutionsprofil Fig. 3		
		1. Stufe		2. Stufe				
		Vol. (l)	Konz. (M)	Mischgefäß	Vorratsgefäß			
			Vol. (l)	Konz. (M)	Vol. (l)	Konz. (M)		
1a	35 × 2	—		10	0.08	10	0.20	a
2a	35 × 2	2	0.12	4	0.12	4	0.17	b
2b	45 × 2	2	0.12	6	0.12	6	0.18	c
2c	45 × 2	—		10	0.12	10	0.22	d
3a	45 × 2	2	0.15	5	0.15	5	0.20	e
3b	45 × 2	2	0.15	5	0.15	5	0.20	f
3c	45 × 2	—		10	0.15	10	0.30	g
3d	35 × 2	—		5	0.20	5	0.30	h
4a	45 × 2	2	0.20	2	0.20	2	0.22	i
4b	45 × 2	2	0.20	3	0.20	3	0.23	j
4c	35 × 2	2	0.22	5	0.22	5	0.27	k
4d	35 × 2	2	0.22	8	0.22	8	0.33	l

Wasser gelöst, dass eine Konzentration von ca. 200  $A_{260}$ -Einheiten/0.5 ml erreicht wird. Zwischen 10–50  $\mu$ l dieser Lösungen werden pro Lauf an einer Nucleosil  $C_{18}$  (7.0  $\mu$ m) Säule (250  $\times$  4.6 mm I.D.) mit Hilfe eines Hochdruckflüssigkeitschromatographen (Waters: Pumpen 6000 A, Programm M 660, Injektor U6K) bei Raumtemperatur fraktioniert. In allen Läufen wird als Eluent ein Gemisch aus 75% A (A = 0.1 M Ammoniumacetat pH 7.5) und 25% B (B = Methanol-Wasser, 60:40) verwendet. Die Elution wird mit einem UV-Detektor (DuPont Modell 836) bei 254 nm verfolgt. Der Durchfluss beträgt 1 ml/min, der Papiervorschub 2 mm/min. Fraktionen werden 15 cm hinter dem UV-Detektor (Auslass: 0.23 mm) gesammelt, in einer Vakuumzentrifuge bei  $<40^{\circ}C$  zur Trockene gebracht, anschliessend in 0.1 ml Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI zusammengefasst. Aliquote der Lyophilisate (0.01  $A_{260}$ -Einheiten) werden radioaktiv markiert und mit der "Fingerprint" Methode sequenziert<sup>13</sup> (vgl. Fig. 5).

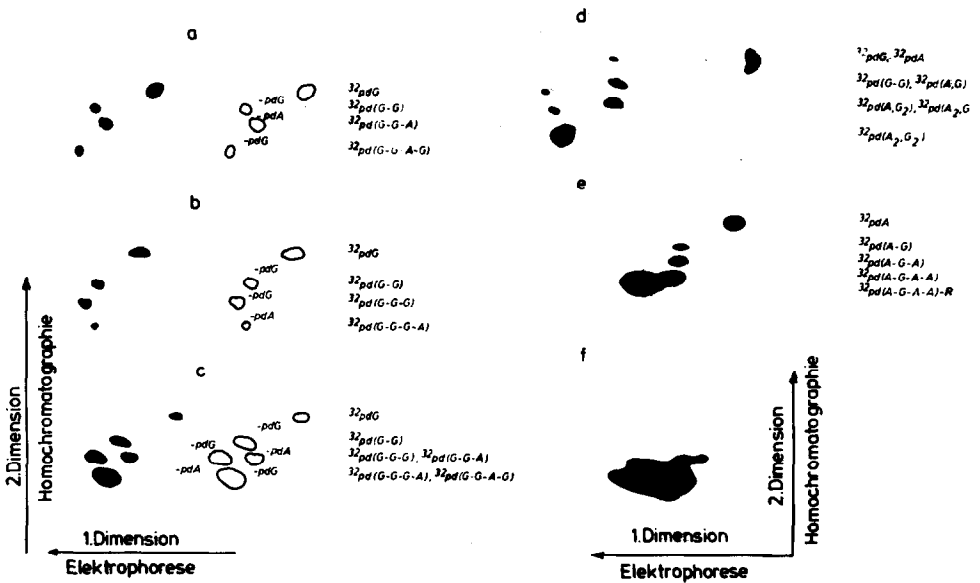


Fig. 5. Charakteristische Autoradiogramme (a–f) und deren Interpretation von  $^{32}P$ -markierten Purinonucleotiden, die mit Phosphodiesterase aus Schlangengift partialhydrolysiert und zweidimensional chromatographiert werden. In der 1. Dimension werden die Partialhydrolysate auf Celluloseacetatstreifen durch Elektrophorese bei pH 3.5, in der 2. Dimension auf DEAE-Cellulose Platten durch Homochromatographie getrennt. (a, b) "Fingerprint" der sequenzisomeren Tetranucleotide [ $^{32}P$ ]d(G-G-A-G) und [ $^{32}P$ ]d(G-G-G-A); (c) "Fingerprint" einer Mischung der sequenzisomeren [ $^{32}P$ ]d(G-G-G-A) und [ $^{32}P$ ]d(G-G-A-G); (d) "Fingerprint" einer Mischung sequenzisomerer Tetranucleotide der Bruttosequenz [ $^{32}P$ ]d(A<sub>2</sub>G<sub>2</sub>); (e) "Fingerprint" des Tetranucleotids [ $^{32}P$ ]d(A-G-A-A)-R, das am 3'-Ende eine unbekannte, teilweise abgebaute Monomereinheit "R" trägt. (f) "Fingerprint" eines nicht identifizierbaren Oligonucleotids, das mit Phosphodiesterase nicht partialhydrolysiert wird. Bezeichnung:  $^{32}pdG = [^{32}P]dG$  etc.

TABELLE III

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN NACHTRENNUNGEN AN QAE-SEPHADEX IM STEIGENDEN NaCl-GRADIENTEN VON (a) 1.5 g DER "HAUPTFRAKTION" DES III. TRENNSCHRITTS; (b) DER VEREINIGTEN FRAKTIONEN VON PEAK 1-4 AUS (a)

Eluiert bei NaCl-Konzentration			Isolierte Mengen		Bezeichnung
(M)	Mengen (A <sub>260</sub> -Einh.)	(%)	(g)	(%)	
<i>(a) Der NaCl-Gradient ist mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert und mit 7 M Harnstoff versetzt</i>					
0.18	3140	8.7	—	—	Peak 1, Fig. 1
0.19-0.21	10,050	27.9	—	—	Peak 2, Fig. 1
0.21-0.23	11,330	31.5	—	—	Peak 3, Fig. 1
0.24-0.25	5040	14.0	—	—	Peak 4, Fig. 1
0.25-0.30	2140	5.9	—	—	Peak 5, Fig. 1
—	4320	12.0	—	—	Zwischenfraktionen
<i>(b) Der NaCl-Gradient ist mit 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> auf pH 9.4 gepuffert</i>					
0.22	1400	47.2	0.06	4.0	Peak 1a, Fig. 2a
—	1560	52.8	—	—	Zwischenfraktionen
0.19-0.22	2430	27.1	0.1	6.7	Peak 2a, Fig. 2b
0.22-0.26	2970	33.2	0.155	9.0	Peak 2b, Fig. 2b
0.26-0.29	3130	35.0	0.13	8.7	Peak 2c, Fig. 2b
—	420	4.7	—	—	Zwischenfraktionen
0.23-0.25	3570	33.7	0.15	10.0	Peak 3a, Fig. 2c
0.25-0.27	3470	32.7	0.15	10.0	Peak 3b, Fig. 2c
0.27-0.30	2610	24.6	0.11	7.3	Peak 3c, Fig. 2c
0.30-0.32	650	6.1	0.03	2.0	Peak 3d, Fig. 2c
—	210	2.9	—	—	Zwischenfraktionen
0.23-0.25	1020	22.1	0.045	3.0	Peak 4a, Fig. 2d
0.25-0.27	1390	30.2	0.06	4.0	Peak 4b, Fig. 2d
0.27-0.30	1150	25.0	0.05	3.3	Peak 4c, Fig. 2d
0.30-0.32	830	18.0	0.04	2.7	Peak 4d, Fig. 2d
—	210	4.6	—	—	Zwischenfraktionen

## ERGEBNISSE

Für die chemische Partialhydrolyse wird DNA aus Heringsspermen verwendet, die "technisch rein" in Kilogramm-Mengen im Handel erhältlich ist und ohne zusätzliche Reinigung eingesetzt wird. Der Abbau der DNA zu Purinoligonucleotiden erfolgt in zwei Stufen. Zunächst werden 400 g der DNA nach dem beschriebenen Verfahren<sup>10</sup> in einem entsprechend vergrößerten Ansatz durch Hydrazinolyse deprimidiniert. Anschliessend werden aus der deprimidinierten DNA durch Einwirken von Kalilauge die intakten Purinnucleotidsegmente freigesetzt. Der Ansatz wird mit Perchlorsäure neutralisiert und der hierbei ausfallende Niederschlag abgesaugt. Das erhaltene Filtrat wird dann nach dem in Schema 1 zusammengefassten Trennungsgang chromatographisch aufgearbeitet.

Im I. Schritt, der in einer früheren Arbeit beschrieben ist<sup>9</sup>, werden mit Hilfe eines Anionenaustauschers (DEAE-Cellulose) die langkettigen Purinnucleotide von den kurzkettigen getrennt. Die 400 g partialhydrolysierte DNA werden portionsweise

in 10 Läufen aufgearbeitet und ergeben *ca.* 50 g langkettige Purinnucleotide.

Im II. Schritt werden diese Purinoligonucleotide an dem stark basischen Anionenaustauscher QAE-Sephadex fraktioniert. Hierzu wird die Säule im dreistufigen NaCl-Gradienten bei pH 7.5 eluiert. Mit 0.3 *M* NaCl werden im 1. Elutionsbereich *ca.* 50% der aufgetragenen Mischung eluiert. Mit 0.4 *M* NaCl verlassen *ca.* 28% des Gemisches die Säule und mit 2 *M* NaCl werden nochmals 12% eluiert. Die "0.3 *M* Fraktion" (*ca.* 25 g) des 1. Elutionsbereichs wird anschliessend nochmals an QAE-Sephadex nachgetrennt, während die Fraktionen, die mit 0.4 *M* und 2 *M* NaCl eluiert werden, nicht näher untersucht werden.

Die Nachtrennung der "0.3 *M* Fraktion" erfolgt im III. Schritt mit einem fünfstufigen NaCl-Gradienten bei pH 7.5. *Ca.* 76% der aufgetragenen Purinnucleotide verlassen die QAE-Sephadex Säule in einer "Hauptfraktion", die mit 0.24–0.30 *M* NaCl eluiert und durch Ultrafiltration entsalzt und anschliessend lyophilisiert wird. Bei der Aufarbeitung gehen *ca.* 8% der eluierten Produkte verloren, so dass von 25 g Lyophilisat der "0.3 *M* Fraktion" *ca.* 17 g verbleiben. Ausserdem erhält man zwei Nebenfraktionen, die nicht aufgearbeitet werden. In der ersten Nebenfraktion werden niedermolekulare Purinnucleotide bis zu einer Kettenlänge von 3 Monomereinheiten eluiert, die bei der Vortrennung an DEAE-Cellulose nicht vollständig von den hochmolekularen Nucleotiden abgetrennt werden. Die zweite Nebenfraktion enthält vermutlich Produkte der 0.4 *M* Fraktion.

Im IV. Schritt wird diese "Hauptfraktion" in 1.5 g Portionen nochmals an QAE-Sephadex rechromatographiert, wobei dem NaCl-Gradienten 7 *M* Harnstoff zugesetzt wird. 7 *M* Harnstoff setzt unspezifische Wechselwirkungen herab, so dass die Stärke der Adsorption von Purinnucleotiden an einem Anionenaustauscher im neutralen Medium im wesentlichen von der Anzahl der Phosphatladungen abhängt. Das Elutionsprofil dieses Trennschritts (vgl. Fig. 1) weist fünf gut voneinander getrennte Hauptpeaks auf, in denen zusammen *ca.* 88% der aufgetragenen Purinnucleotidmischung eluiert werden. Die Fraktionen von Peak 1–5 werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt. Fraktionen, die zwischen den einzelnen Peaks und mit 1 *M* NaCl die Säule verlassen, werden als Zwischenfraktionen bezeichnet und nicht untersucht. Die Ergebnisse dieses Trennschrittes sind in Tabelle III zusammengefasst. Die vereinigten Fraktionen von Peak 1–4 werden auf das dreifache Volumen verdünnt und anschliessend aufgearbeitet, während die von Peak 5 nicht näher untersucht werden.

Im V. Schritt werden die verdünnten Peakfraktionen einzeln auf eine QAE-Sephadex Säule aufgetragen, wobei Harnstoff und der grösste Teil des NaCl eluiert werden, während die Oligonucleotide adsorbieren. Dann wird die Säule im steigenden NaCl-Gradienten bei pH 9.4 eluiert, wobei adenyssäurereiche vor guanyssäurereichen Purinoligonucleotiden die Säule verlassen. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefasst. Die Elutionsprofile sind in Fig. 2a–d abgebildet. Die Nachtrennung von Peak 1 der Fig. 1 führt zu einem Hauptpeak (1a, Fig. 2a) während Peak 2 der Fig. 1 in drei Hauptpeaks (2a–c, Fig. 2b) aufgetrennt wird. Peak 3 und 4 der Fig. 1 ergeben bei der Nachtrennung jeweils vier Hauptpeaks (3a–d, Fig. 2c; 4a–d, Fig. 2d). Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung werden vereinigt, durch Ultrafiltration entsalzt und anschliessend lyophilisiert. Hierbei gehen durchschnittlich 10% einer Purinoligonucleotidmischung verloren. Die erhaltenen Lyophilisate können prinzipiell Oligonucleotide mit terminalen Phosphatgruppen enthalten, die nach unserer

TABELLE IV

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN NACHTRENNUNGEN DER DEPHOSPHORYLIERTEN LYOPHILISATE (CA. 50-100 mg) VON PEAK 1a, 2a-c, 3a-d, 4a-d AUS FIG. 2 AN QAE-SEPHADEX IM STEIGENDEN NaCl-GRADIENTEN, DER MIT 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> AUF pH 9.4 GEPUFFERT IST

Aufgetragene Purin-nucleotidmischung				Getrennte Purinoligonucleotide							
Lyophilisat		Mengen (A <sub>260</sub> -Einh.)	mg	Eluiert bei NaCl-Konz.			Mengen		Isolierte Mengen		
Peak	Fig.			(M)	Peak	Fig.	(A <sub>260</sub> -Einh.)	(%)	(mg)	(%)	
1a	2a	1630	80	0.18-0.19	1a1	3a	1230	75.5	54	68	
2a	2b	1750	80	0.12	2a1	3b	310	17.7	11	14	
				0.12-0.13	2a2	3b	370	21.1	14	18	
				0.13	2a3	3b	370	21.1	14	18	
				Zwischenfraktionen			700	40.0	-	-	
2b	2b	2090	90	0.12-0.13	2b1	3c	360	17.2	12	13	
				0.13-0.16	2b2	3c	990	47.4	38	42	
				Zwischenfraktionen			740	35.4	-	-	
2c	2b	2250	100	0.18-0.20	2c1	3d	1580	70.2	62	62	
				Zwischenfraktionen			670	29.8	-	-	
3a	2c	2290	100	0.15	3a1	3e	470	20.5	19	19	
				0.15	3a2	3e	650	28.4	23	23	
				0.15-0.16	3a3	3e	410	17.9	15	15	
				0.16-0.17	3a4	3e	440	19.2	15	15	
				Zwischenfraktionen			320	14.0	-	-	
3b	2c	2280	100	0.15-0.16	3b1	3f	420	18.4	16	16	
				0.17-0.19	3b2	3f	720	31.6	29	29	
				Zwischenfraktionen			1140	50.0	-	-	
3c	2c	1540	70	0.24-0.26	3c1	3g	740	48.1	31	44	
				Zwischenfraktionen			800	51.9	-	-	
3d	2c	990	50	0.27-0.29	3d1	3h	470	47.5	20	40	
				Zwischenfraktionen			520	52.5	-	-	
4a	2d	1490	70	0.20	4a1	3i	400	26.8	17	24	
				0.20	4a2	3i	640	43.0	26	37	
				Zwischenfraktionen			450	30.2	-	-	
4b	2d	1540	70	0.20	4b1	3j	210	13.6	8	11	
				0.20	4b2	3j	290	18.8	10	14	
				0.21	4b3	3j	410	26.6	16	23	
				0.21-0.22	4b4	3j	240	15.6	9	13	
				Zwischenfraktionen			390	25.3	-	-	
4c	2d	1210	60	0.21-0.22	4c1	3k	300	24.8	12	20	
				0.22-0.25	4c2	3k	490	40.5	22	37	
				Zwischenfraktionen			420	34.7	-	-	
4d	2d	1260	60	0.27	4d1	3l	120	9.5	5	8	
				0.27-0.29	4d2	3l	310	24.6	14	23	
				0.29-0.30	4d3	3l	240	19.0	9	15	
				Zwischenfraktionen			590	46.8	-	-	



Erfahrung die weitere Auftrennung dieser Gemische erschweren. Durch enzymatische Hydrolyse mit alkalischer Phosphatase werden die terminalen Phosphatgruppen daher vor dem nächsten Trennschritt entfernt, so dass anschliessend Purinoligonucleotidgemische fraktioniert werden, deren Komponenten freie terminale Hydroxylgruppen aufweisen.

Jeweils 50–100 mg der 12 Lyophilisate von Peak 1a, 2a–c, 3a–d, 4a–d werden mit alkalischer Phosphatase inkubiert und im VI. Schritt unter den Bedingungen der Tabelle II an QAE-Sephadex im steigenden NaCl-Gradienten bei pH 9.4 einzeln fraktioniert (vgl. Fig. 3). Die Rechromatographie der zwölf Lyophilisate führt zu 26 Hauptpeaks, die alle bei einer niedrigeren NaCl-Konzentration die Säule verlassen als die zugehörigen Ausgangsprodukte. Hieraus folgt, dass die ursprünglichen 12 Mischungen Oligonucleotide enthalten, die terminale Phosphatgruppen tragen. Die Trennergebnisse sind in Tabelle IV zusammengefasst. Bei der Aufarbeitung der vereinigten Peakfraktionen gehen durchschnittlich 15% verloren. Die Lyophilisate der isolierten Peakfraktionen enthalten je nach der Auflösung der betreffenden Elutionsprofile zwischen 40–70% der  $A_{260}$ -Einheiten der aufgetragenen Gemische. Aufgrund des säulenchromatographischen Verhaltens werden Peak 4a<sub>2</sub> und 4b<sub>1</sub> vereinigt und im folgenden als Peak 4a<sub>2</sub>/b<sub>1</sub> bezeichnet.

Bei der Charakterisierung der 26 Lyophilisate zeigt sich, dass in 4 Lyophilisaten Trinucleosiddiphosphate enthalten sind, während die restlichen 22 Lyophilisate Gemische längerkettiger Purinnucleotide enthalten. Aufgrund der UV-Absorptionsverhältnisse, der papierchromatographischen  $R_F$ -Werte sowie der Ergebnisse des enzymatischen Abbaus (vgl. Tabelle V) folgt, dass Peak 1a1 d(G-G-G), Peak 3a1 d(A-A-A), Peak 3a2 d(A<sub>2</sub>,G) und Peak 3b1 d(A,G<sub>2</sub>) enthalten. Die Gemische der sequenzisomeren Trinucleosiddiphosphate verhalten sich wie die bereits früher isolierten Gemische gleicher Zusammensetzung<sup>12</sup>. Die Lyophilisate der übrigen 22 Peaks werden vor dem VIII. und letzten Trennschritt, der Rechromatographie mittels HPLC, papierchromatographisch gereinigt. Durch die Papierchromatographie sollen eventuell noch vorhandene Salzspuren und bei der Aufarbeitung entstandene Nebenprodukte entfernt werden. In den Papierchromatogrammen tritt jeweils nur ein Fleck auf, der aber meist einen relativ grossen Bereich der Trennstrecke einnimmt. Da eine Verminderung der aufgetragenen Substanzmenge keine Verbesserung der Trennung ergibt, enthält der grösste Teil der untersuchten Lyophilisate offenbar eine Mischung von Produkten, die sich in ihrem papierchromatographischen Verhalten geringfügig unterscheiden. Die Angabe von  $R_F$ -Werten ist daher nicht sinnvoll.

Die Purinoligonucleotidgemische werden vom Papier eluiert und in Mengen von jeweils <20  $A_{260}$ -Einheiten an einer analytischen HPLC-Säule fraktioniert, die mit Nucleosil C<sub>18</sub>, 7.0  $\mu$ m gefüllt ist. Bei den Trennungen der 22 Proben, die alle unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden (vgl. Tabelle VI), treten meist neben mehreren Hauptpeaks zahlreiche Nebenpeaks auf, die bis auf einige Ausnahmen nicht isoliert werden. Die Elutionsprofile sind in Fig. 4 abgebildet. Die Elutionslösungen nummerierter Peaks werden zur Entfernung des Elutionspuffers lyophilisiert. Die Lyophilisate werden anschliessend nach der Fingerprintmethode untersucht, wozu jeweils nur 1/100–1/1000 der isolierten Mengen benötigt werden. Da experimentelle Details der Fingerprintmethode ausführlich beschrieben sind<sup>13</sup>, werden im folgenden nur die wesentlichen Schritte des Verfahrens zusammengefasst.

Aliquots der einzelnen Lyophilisate werden zunächst enzymatisch mit Hilfe

TABELLE V

UV-ABSORPTIONSVERHÄLTNISSE,  $R_F$ -WERTE UND ERGEBNISSE DER ENZYMATISCHEN SPALTUNG DER ISOLIERTEN PURIN-TRINUCLEOSIDDIPHOSPHATE

Purintrinucleosiddiphosphat		Absorptionsverhältnisse (pH 7.0)				$R_F$ -Werte* relativ zu pdA	Spaltung mit Phosphodiesterase aus Schlangengift Spaltprodukte	Verhältnisse der Spaltprodukte	
Bezeichnung	Isoliert aus	250/260 nm	280/260 nm	Berech.	Beob.			Erwartet	Gefunden
Peak	Fig.	Berech.	Berech.	Berech.	Beob.				
d(G-G-G)	1a1	1.11	1.10	0.68	0.63	0.29	dG, pdG	1:2	1:2.05
d(A-A-A)	3a1	0.79	0.84	0.14	0.23	0.56	dA, pdG	1:2	1:1.94
d(A <sub>2</sub> G)	3a2	0.88	0.92	0.29	0.33	0.46	dA, pdA, } dG, pdG }	2**:1	1.86:1
d(A <sub>2</sub> G <sub>2</sub> )	3b1	0.98	1.03	0.47	0.50	0.38	dA, pdA, } dG, pdG }	1**:2	1:1.97

\* im Laufmittelsystem A = Ethanol-1 M Ammoniumacetat (pH 7.5) (7:3).

\*\* Das Verhältniss von (dA + pdA):(dG + pdG).

TABELLE VI

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN NACHTRENNUNGEN DER PAPIERCHROMATOGRAPHISCH GEREINIGTEN LYOPHILISATE DES VI. TRENNSCHRITTES (SCHEMA 1) AN EINER NUCLEOSIL C<sub>18</sub> SÄULE (250 × 4.6 mm I.D.) MIT HILFE DER HPLC

Aufgetragene Purin-nucleotidmischung, < 20 A <sub>260</sub> - Einheiten von		Getrennte Purinoligonucleotide Eluiert nach Retentionszeit			Isolierte Purinoligonucleotide	
Peak	Fig. 3	min	Peak	Fig. 4	Bezeichnung	Identifiziert aus "Fingerprint" Fig. Nr.
2a1	b	70	1	a	d(A-A-A-A)	6.1
2a2	b	38	1	b	d(A-A-G-A)	6.2
		41	2		d(A-G-A-A)	6.3
2a3	b	35	1	c	d(G-A-A-A)	6.4
		38	2		d(A-A-A-G)	6.5
2b1	c	20	1	d	d(G-A-G-A)	6.6
		22	2		d(A <sub>2</sub> ,G <sub>2</sub> )	—
		23	3		d(A-G-A-G)	6.7
		27	4		Verunreinigung	—
		34	5		d(A-G-G-A)	6.8
2b2	c	20	1	e	d(G-A-G-A) } d(G-A-A-G) }	6.9
		23	2		d(A <sub>2</sub> , G <sub>2</sub> )	5.d
		24	3		d(G-G-A-A)	6.10
		27	4		d(A-A-G-G)	6.11
		34	5		d(A-G-G-A)	6.8
2c1	d	14	1	f	d(G-G-A-G)	5.a
		19	2		Verunreinigung	—
		23	3		d(A-G-G-G)	6.12
3a3	e	43	1	g	Verunreinigung	—
		58	2		Verunreinigung	—
		88	3		d(A-A-A-A-A)	6.13
3a4	e	39	1	h	d(A-A-G-A)-R	6.14
		42	2		d(A-G-A-A)-R	5.e
		50	3		d(A-A-G-A-A)	6.15
		55	4		d(A-G-A-A-A)	6.16
3b2	f	28	1	i	d(G-A-G-A-A)	6.17
		31	2		d(A-A-G-A-G)	6.18
		35	3		d(A-G-A-A-G)	6.19
		37	4		d(A-G-A-G-A)	6.20
		48	5		d(A-G-G-A-A)	6.21
3c1	g	17	1	j	d(G-A-G-A-G)	6.22
		21	2		d(G-G-A-A-G) } d(G-G-A-G-A) }	6.23
		23	3		d(G-A-G-G-A)	6.24
		25	4		d(A-G-A-G-G)	6.25
		30	5		d(A-G-G-A-G)	6.26
		39	6		Verunreinigung	—
3d1	h	17	1	k	d(G-A-G-G-G)	6.27
		19	2		d(G-G-G-A-G)	6.28
4a1	i	31	1	l	Verunreinigung	—
		70	2		d(A-A-A-A)	6.1

(Fortsetzung S. 400)

TABELLE VI (fortgesetzt)

Aufgetragene Purin-nucleotidmischung, < 20 A <sub>260</sub> - Einheiten von		Getrennte Purinoligonucleotide Eluiert nach Retentionszeit			Isolierte Purinoligonucleotide	
Peak	Fig. 3	min	Peak	Fig. 4		
4a2/b1	i/j		1	m	Verunreinigung	—
			2		Verunreinigung	—
		35	3		d(G-A-A-A)	6.4
		38	4		d(A-A-G-A)	} 6.29
					d(A-A-A-G)	
	41	5	d(A-G-A-A)	6.3		
4b2	j	23	1	n	d(A-G-A-G)	6.7
		34	2		d(A-G-G-A)	6.8
4b3	j	20	1	o	d(G-A-G-A)	6.6
		24	2		d(G-G-A-A)	6.10
4b4	j		3	p	Verunreinigung	—
			1		Verunreinigung	—
		42	2		d(A-G-A-G-A-A)	6.30
		61	3		d(G-A-A-A-A-A)	} 6.31
					d(A-G-A-A-A-A)	
	69	4	d(A-A-A-A-A-G)	6.32		
4c1	k	14	1	q	d(G-G-A-G)	5.a
		19	2		d(G-G-G-A)	} 5.c
					d(G-G-A-G)	
4c2	k	23	3	r	d(A-G-G-G)	6.12
		21	1		d(G-A-G-A-G-A)	6.33
		24	2		d(G <sub>3</sub> ,A <sub>3</sub> )	—
		32	3		d(G <sub>3</sub> ,A <sub>3</sub> )	—
		35	4		d(A-G-A-G-G-A)	6.34
		40	5		d((A-G-G-A-G-A)	6.35
4d1	l	47	6	s	d(A-A-A-A-G-G)	6.36
		29	1		d(G-G-A-A-G-A)	6.37
		31	2		d(G <sub>3</sub> ,A <sub>3</sub> )	—
		37	3		Verunreinigung	—
		40	4		d(A-A-A-G-G-G)	6.38
4d2	l	48	5	t	d(G <sub>3</sub> ,A <sub>3</sub> )	—
		26	1		Verunreinigung	—
		29	2		d(G <sub>4</sub> ,A <sub>2</sub> )	—
		35	3		d(G <sub>4</sub> ,A <sub>2</sub> )	—
4d3	l	42	4	u	Verunreinigung	—
		18	1		d(G-G-A-G-A-G)	6.39
		27	2		d(G <sub>4</sub> ,A <sub>2</sub> )	—

von T<sub>4</sub> Polynucleotidkinase und [<sup>32</sup>P]ATP am 5'-Ende radioaktiv markiert. Die markierten Oligonucleotide werden dann mit Hilfe der Phosphodiesterase aus Schlangengift vom 3'-Ende partialhydrolysiert. Das erhaltene Partialhydrolysat wird anschliessend zweidimensional chromatographiert, wobei in der 1. Dimension eine Elektrophorese auf Celluloseacetat, in der 2. Dimension eine Homochromatographie auf DEAE-Cellulose Dünnschichtplatten durchgeführt wird. Zur Homochromatographie wird Homomix VI verwendet, der nach dem Verfahren von Jay *et al.*<sup>14</sup> dargestellt wird. Das Ergebnis der zweidimensionalen Chromatographie, der "Finger-

print", wird durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Aus der Anzahl und Lage der im Autoradiogramm auftretenden Flecken lässt sich die Reinheit und Sequenz des untersuchten Oligonucleotids ersehen. Die Struktur der 5'-terminalen Monomereinheit eines Oligonucleotids lässt sich aus dem "Fingerprint" nicht ermitteln. Hierzu wird das markierte 5'-Mononucleotid isoliert und zusammen mit einer Mischung der vier verschiedenen unmarkierten Mononucleotide papierelektrophoretisch aufgetrennt. Zunächst stellt man die Position der unmarkierten Nucleotide unter der UV-Lampe fest, anschliessend wird die Radioaktivität lokalisiert. Als 5'-terminaler Baustein des untersuchten Oligonucleotids wird dasjenige Monomer identifiziert, dessen UV-Position mit der Position der Radioaktivität übereinstimmt.

Autoradiogramme, die von synthetischen Oligonucleotiden erhalten werden, sind in der Regel eindeutig interpretierbar, da man die Sequenz kennt, nach der gesucht werden muss. Weitaus komplizierter ist dagegen die Interpretation der Autoradiogramme, die von Oligonucleotiden resultieren, die aus Hydrolysaten chemisch abgebauter DNA isoliert werden. Nach dem letzten Trennschritt erhält man nämlich nicht nur Einzelsubstanzen, deren Sequenz unbekannt ist, sondern auch mehr oder weniger komplex zusammengesetzte Gemische, die nicht weiter aufgetrennt werden können sowie Oligonucleotide, die teilweise zerstörte Monomereinheiten im Molekülverband aufweisen. In Fig. 5 sind daher als Beispiele einige typische Autoradiogramme abgebildet, die bei der Untersuchung der isolierten Peakfraktionen auftreten und die Situation verdeutlichen sollen. Charakteristisch für ein definiertes Oligonucleotid ist, dass der "Fingerprint" keine Verzweigung zeigt. Die Anzahl der radioaktiven Hydrolyseprodukte entspricht der Kettenlänge und es gibt jeweils nur ein einziges Partialhydrolyseprodukt jeder möglichen Kettenlänge. Beispielsweise liefert die Partialhydrolyse eines markierten Tetranucleotids neben dem markierten Ausgangs-

TABELLE VII

PURINOLIGONUCLEOTIDE, DIE AUS DEM PARTIALHYDROLYSAT DER CHEMISCH DE-PYRIMIDINIERTEN HERINGSSPERMEN-DNA PRÄPARATIV ISOLIERT WERDEN

<i>Oligomere (Anzahl gefunden, erwartet)</i>	<i>Sequenz der isolierten Purinoligonucleotide</i>
Dimere* (4,4)	d(A-A), d(G-G), d(A-G), d(G-A).
Trimere (6,8)	d(G-G-G), d(A-A-A)*, d(A-G-A)*, d(A-A-G)*, d(G-A-A)*, d(G-A-G)*.
Tetramere (12,16)	d(A-A-A-A), d(A-A-G-A), d(A-G-A-A), d(G-A-A-A), d(G-A-G-A), d(A-G-A-G), d(A-G-G-A), d(G-G-A-A), d(A-A-G-G), d(G-G-A-G), d(A-G-G-G), d(A-A-A-G).
Pentamere (14,32)	d(A-A-A-A-A), d(A-A-G-A-A), d(A-G-A-A-A), d(G-A-G-A-A), d(A-A-G-A-G), d(A-G-A-A-G), d(A-G-A-G-A), d(A-G-G-A-A), d(G-A-G-A-G), d(G-A-G-G-A), d(A-G-A-G-G), d(A-G-G-A-G), d(G-A-G-G-G), d(G-G-G-A-G).
Hexamere (9,64)	d(A-G-A-G-A-A), d(A-A-A-A-A-G), d(G-A-G-A-G-A), d(A-G-A-G-G-A), d(A-G-G-A-G-A), d(A-A-A-A-G-G), d(G-G-A-A-G-A), d(A-A-A-G-G-G), d(G-G-A-G-A-G).

\* Die Isolierung erfolgt nach einem früher beschriebenen Trennungsgang<sup>12</sup>.

produkt jeweils ein markiertes Tri-, Di- und Mononucleotid. Beim Partialabbau der sequenzisomeren Tetranucleotide  $[^{32}\text{P}]\text{d}(\text{G-G-A-G})$  bzw.  $[^{32}\text{P}]\text{d}(\text{G-G-G-A})$  erhält man somit eine Mischung von  $[^{32}\text{P}]\text{d}(\text{G-G-A-G})$ ,  $[^{32}\text{P}]\text{d}(\text{G-G-A})$ ,  $[^{32}\text{P}]\text{d}(\text{G-G})$  und  $[^{32}\text{P}]\text{dG}$  bzw.  $[^{32}\text{P}]\text{d}(\text{G-G-G-A})$ ,  $[^{32}\text{P}]\text{d}(\text{G-G-G})$ ,  $[^{32}\text{P}]\text{d}(\text{G-G})$ , und  $[^{32}\text{P}]\text{dG}$ . Die zweidimensionale Auftrennung der jeweils vier Produkte führt zu den in Fig. 5a,b abgebildeten Autoradiogrammen. Wie erwartet stimmen die beiden "Fingerprints" weitgehend miteinander überein. Der einzige Unterschied tritt bei den Trinucleotiden auf, da die elektrophoretische Wanderungsstrecke von  $[^{32}\text{P}]\text{pd}(\text{G-G-G})$  grösser als die von  $[^{32}\text{P}]\text{pd}(\text{G-G-A})$  ist. Wird eine Mischung der beiden Tetranucleotide mit Hilfe der Fingerprinttechnik untersucht, dann erhält man eine Autoradiogramm, das eine Verzweigung aufweist (Fig. 5c). Generell liegt bei "Fingerprints" mit einer Verzweigung eine Mischung von zwei Oligonucleotiden vor, deren Sequenzen eindeutig bestimmt werden können. Dagegen lässt sich ein "Fingerprint" mit mehr als einer Verzweigung nicht exakt interpretieren. Das in Fig. 5d abgebildete Autoradiogramm mit drei Verzweigungen kann beispielsweise von einer Mischung von zwei  $-\text{d}(\text{G-G-A-A})/\text{d}(\text{A-G-A-G})-$  bis fünf  $-\text{d}(\text{G-G-A-A})/\text{d}(\text{A-G-A-G})/\text{d}(\text{G-A-G-A})/\text{d}(\text{A-G-G-A})/\text{d}(\text{G-A-A-G})-$  Komponenten herrühren. Aus diesem Grund wird bei Oligonucleotidmischungen, die zu mehrfach verzweigten "Fingerprints" führen, nur die Bruttozusammensetzung der Ausgangsprodukte angegeben, die hier bspw.  $\text{d}(\text{A}_2\text{G}_2)$  lautet. Fig. 5e,f zeigen Autoradiogramme von DNA-Fragmenten, die am 3'-Ende vermutlich eine unvollständig abgebaute Mononucleotideinheit tragen. Die Kettenlänge solcher Oligonucleotide kann mit Hilfe von Referenzsubstanzen

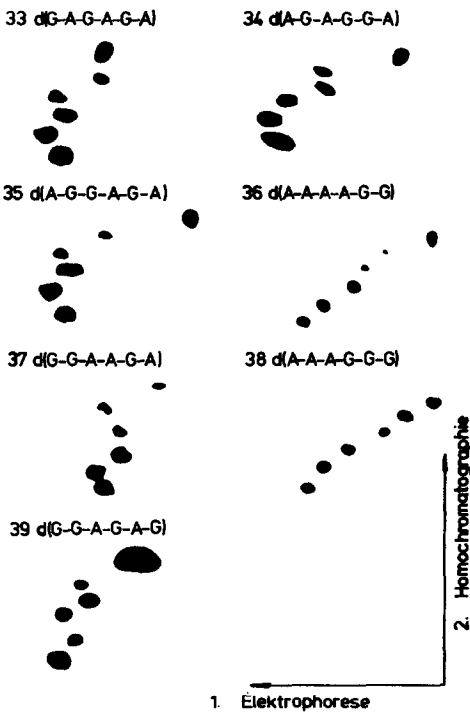


Fig. 6.

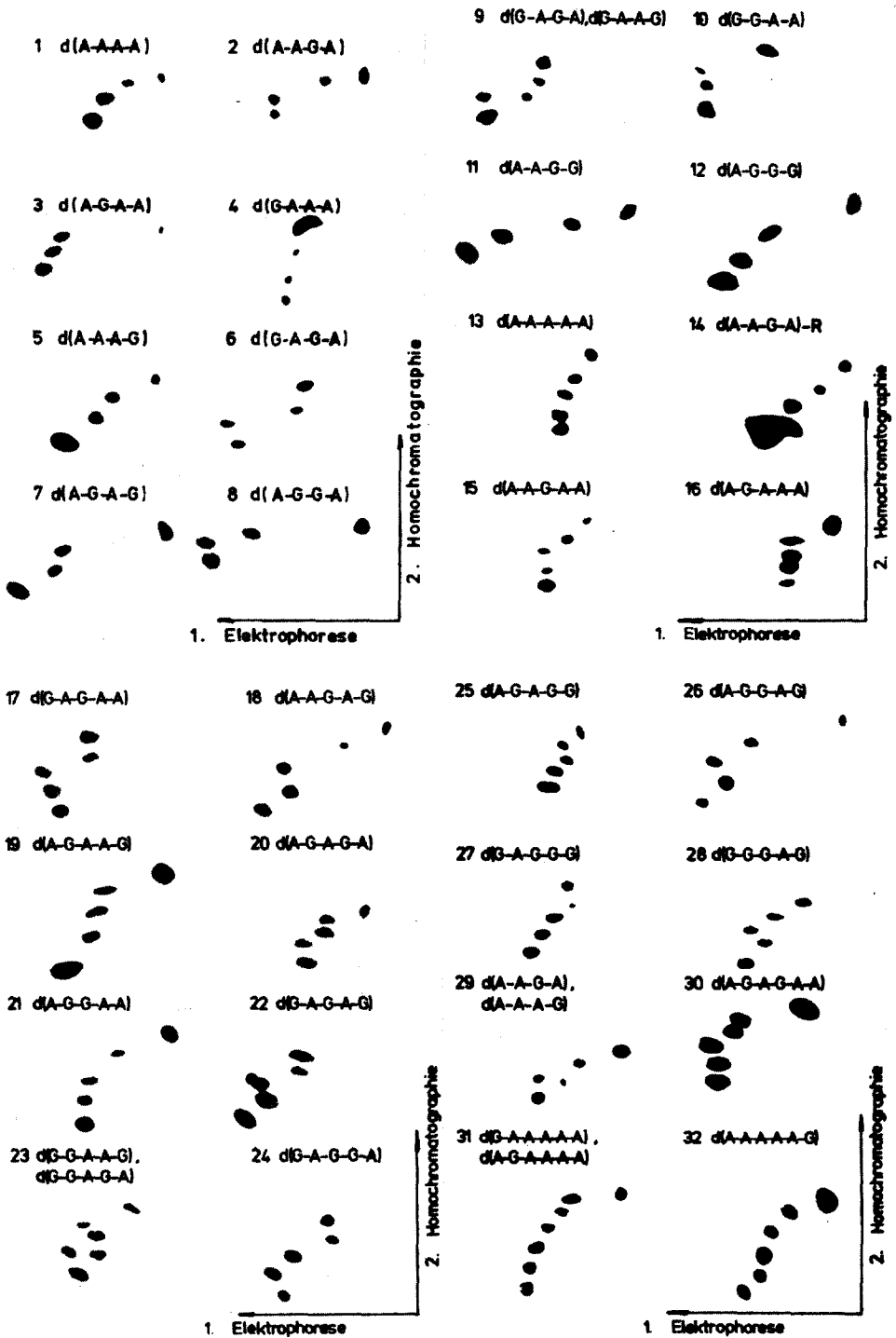


Fig. 6. Autoradiogramme nach der zweidimensionalen Auftrennung der Purinoligonucleotide, die nach dem VIII. Trennschritt (Schema 1) isoliert (vgl. Tabelle VI), mit  $^{32}\text{P}$  markiert und mit Phosphodiesterase aus Schlangengift partialhydrolysiert werden. Die zweidimensionale Chromatographie erfolgt nach den Angaben der Fig. 5.

ermittelt werden. Meistens verhindert der defekte 3'-terminale Baustein die enzymatische Partialhydrolyse, so dass nach der zweidimensionalen Auftrennung des Reaktionsansatzes nur ein ausgedehnter Fleck im Autoradiogramm auftritt (Fig. 5f). In Fig. 5e ist der "Fingerprint" eines Oligonucleotids abgebildet, dessen blockierende 3'-terminale Gruppe "R" enzymatisch teilweise abgespalten wird. Da neben dem Startfleck eine Reihe partialhydrolysierter Oligomere auftritt, lässt sich die auf den defekten Baustein folgende Sequenz vom 3'- zum 5'-Ende hin bestimmen.

Die Untersuchung von 73 Peaks, die nach der HPLC isoliert werden, zeigt, dass aus dem Partialhydrolysat einer depyrimidinierten DNA auf dem beschriebenen Weg 35 definierte Purinoligonucleotide mit vier bis sechs Monomereinheiten in präparativen Mengen erhältlich sind, wobei verschiedene Oligonucleotide gleicher Sequenz in unterschiedlichen Peaks auftreten (vgl. Tabelle VI und VII). Ausser diesen Einzelsubstanzen werden noch 14 Gemische von Sequenzisomeren bestimmbarer Zusammensetzung sowie 2 Oligonucleotide mit zerstörten terminalen 3' Monomereinheiten isoliert. Die mit Hilfe der Fingerprintmethode untersuchten Lyophilisate der isolierten Peakfraktionen sowie die identifizierten Einzelsubstanzen und Gemische sind in Tabelle VI aufgeführt. "Fingerprints" aus denen Reinheit und Sequenz der isolierten Purinoligonucleotide eindeutig hervorgehen, sind in Fig. 6 abgebildet. Dagegen wird auf die Abbildung von Autoradiogrammen verzichtet, die komplex zusammengesetzte Gemische oder Oligonucleotide mit teilweise zerstörten Monomereinheiten zeigen.

Nach dem früher beschriebenen Weg<sup>12</sup> können zusätzlich zu den hier isolierten Oligonucleotiden weitere 9 definierte di- und trimere Purinoligonucleotide aus dem Partialhydrolysat isoliert werden, so dass in wenigen Trennschritten insgesamt 45 definierte Purinoligonucleotide erhältlich sind.

## DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals die präparative Isolierung von Tetra- bis Hexapurinoligonucleotiden aus dem Partialhydrolysat einer chemisch depyrimidinierten DNA beschrieben. Dies wird dadurch möglich, dass die Fraktionierung des Partialhydrolysats nicht, wie in analytischen Trennungen, in einem Schritt, sondern schrittweise nach einem Trennungsgang durchgeführt wird. Dieser Trennungsgang ist allgemein anwendbar und nicht auf die Aufarbeitung eines Partialhydrolysats einer bestimmten DNA beschränkt. Anstelle der DNA aus Heringsspermen, die in dieser Arbeit verwendet wird, könnte sicherlich auch DNA eingesetzt werden, die bspw. bei biotechnischen Prozessen in grossen Mengen als bislang kaum verwertbares Nebenprodukt anfällt.

Die Reihenfolge der einzelnen chromatographischen Schritte, aus denen der Trennungsgang aufgebaut ist, ermöglicht die Fraktionierung des sehr komplex zusammengesetzten Partialhydrolysats in folgenden Etappen. Die ersten drei Schritte dienen der groben Vortrennung des Gemisches in Komponenten gleicher Ladung bzw. Kettenlänge. Nach dem IV. Schritt ist das Partialhydrolysat bereits soweit fraktioniert, dass in den 5 Peaks der Fig. 1 folgende Gemische von Purinoligonucleotiden nacheinander die Säule verlassen. Peak 1 enthält Trinucleotide, in Peak 2 werden Tetranucleotide eluiert, denen in Peak 3 eine Mischung aus Pentanucleotiden und Trinucleotidphosphaten folgt, während in Peak 4 Hexanucleotide gemeinsam mit



Tetranucleotidphosphaten die Säule verlassen. Peak 5, der in dieser Arbeit nicht untersucht wird, enthält eine Mischung von Heptanucleotiden und Pentanucleotidphosphaten. Der V. Schritt, der bei pH 9.4 durchgeführt wird, fraktioniert die vorgetretenen Gemische so, dass Purinoligonucleotidgemische deren Komponenten überwiegend Adenylsäureeinheiten aufweisen von denen getrennt werden, die Oligonucleotide mit überwiegend Guanylsäureeinheiten enthalten. Hierbei beobachtet man, dass Purinoligonucleotidgemische umso später von der Säule eluiert werden, je höher die Anzahl der Guanylsäurereste der Komponenten einer Mischung ist (vgl. Peak 3a-d der Fig. 2c). Peak 3a, der bspw. eine Mischung aus  $pd(A_3)p$ ,  $pd(A_2,G)p$ ,  $pd(A_5)$ ,  $pd(A_4,G)$  enthält, verlässt vor Peak 3b die Säule, der ein Gemisch aus  $pd(A, G_2)p$  und  $pd(A_3, G_2)$  aufweist. In Peak 3c wird dann die Mischung der Sequenzisomeren  $pd(A_2, G_3)$  eluiert, der in Peak 3d das Gemisch  $pd(A, G_4)$  folgt, dessen Komponenten den höchsten Anteil an Guanylsäureeinheiten aufweisen. Nach der enzymatischen Dephosphorylierung werden die Gemische im VI. Schritt dann soweit aufgetrennt, dass die einzelnen Peaks, die anschliessend isoliert werden, entweder nur ein Gemisch von Sequenzisomeren oder einen bestimmten Anteil aus einem Sequenzisomeregemisch enthalten. Im letzten Schritt des Trennungsganges, der mit Hilfe der HPLC an reversed Phase durchgeführt wird, werden diese Gemische teilweise oder vollständig in ihre jeweiligen Komponenten getrennt, so dass zahlreiche Tetra- bis Hexapurinnucleotide definierter Sequenz erhältlich sind. Der Trennungsgang liesse sich sicherlich wesentlich verkürzen, wenn man das Partialhydrolysat vor der chromatographischen Aufarbeitung dephosphorylieren würde. Diese Möglichkeit ist derzeit nicht praktikabel, da die erforderlichen Enzymmengen nicht bezahlbar sind.

Die Neben- und wenigen Hauptpeaks, die in den Elutionsprofilen der HPLC nicht untersucht werden, enthalten vermutlich die sequenzisomeren Purinoligonucleotide, die in den isolierten Hauptpeaks nicht gefunden werden. Die Vermutung ist berechtigt, da bei der Untersuchung von Partialhydrolysaten depuriniertes DNA aus Heringsspermen, von einer Ausnahme abgesehen, alle theoretisch denkbaren sequenzisomeren Pyrimidinoligonucleotide mit 2-5 Monomereinheiten nachgewiesen bzw. isoliert werden<sup>15</sup>. Aufgrund der Komplementarität der beiden Einzelstränge einer DNA sollten demnach im Partialhydrolysat einer depyrimidinierten Heringsspermen-DNA die den Pyrimidinoligonucleotiden entsprechenden Purinoligonucleotide auftreten. Es ist allerdings nicht auszuschliessen, dass die Depyrimidinierung einer DNA auch zur teilweisen Zerstörung von Purinsegmenten führen kann. Ausserdem ist unklar, welche technische Vorbehandlung die verwendete Heringsspermen-DNA erfahren hat. Da diese Purinoligonucleotide entweder in geringer Konzentration (Nebenpeak) auftreten oder vermutlich nur als Gemische (Hauptprodukt mit Schulter; Doppelpeak) isolierbar sind, erscheint eine Aufarbeitung und aufwendige Untersuchung dieser Peaks im Rahmen einer präparativ ausgerichteten Isolierung nicht sinnvoll. Aus dem gleichen Grund wird auch nicht versucht, isolierte Oligonucleotidgemische durch Rechromatographie mit Hilfe der HPLC weiter aufzutrennen.

Vergleicht man den Trennungsgang, nach dem Pyrimidinoligonucleotide aus dem Partialhydrolysat einer depurinierten DNA isoliert werden, mit dem hier beschriebenen Trennungsgang zur Isolierung von Purinoligonucleotiden, so fällt folgender wesentliche Unterschied auf. Die verschiedenen Mischungen sequenzisomerer Pyrimidinoligonucleotide werden in den aufeinanderfolgenden Stufen zwar vonein-

ander getrennt aber weder teilweise noch ganz in ihre einzelnen Komponenten getrennt. Die Auftrennung der Sequenzisomeren erfolgt erst im letzten Trennschritt mit Hilfe der HPLC. Dagegen werden bei der Fraktionierung der Purinoligonucleotide bereits im Verlauf des Trennungsganges verschiedene Sequenzisomerengemische teilweise oder ganz in ihre einzelnen Komponenten getrennt. Dabei lässt sich nicht ohne weiteres feststellen, an welcher Stufe des Trennungsganges Sequenzisomere einer Mischung in Zwischenfraktionen und Nebenpeaks verloren werden.

Die präparative Isolierung von Oligonucleotiden aus Partialhydrolysaten einer DNA stellt eine einfach zu praktizierende Alternative zur komplizierten chemischen Synthese dar. Mit verhältnismässig geringem Aufwand können die Oligonucleotide in den Mengen isoliert werden, die normalerweise auch bei der chemischen Synthese angestrebt werden.

Die "Reversed-Phase" HPLC, die erstmals zur Trennung von Mischungen sequenzisomerer Purinoligonucleotide eingesetzt wird, führt zu einigen bemerkenswerten Ergebnissen. Da die Rechromatographie mittels der HPLC unter konstanten Elutionsbedingungen erfolgt, können die Ergebnisse aller Trennungen zueinander in Beziehung gesetzt werden. Vergleicht man die Retentionszeiten von Oligonucleotiden gleicher Kettenlänge, dann zeigt sich, dass unter den gegebenen Elutionsbedingungen Purinnucleotide einer bestimmten Bruttozusammensetzung innerhalb charakteristischer Retentionszeitbereiche eluiert werden. Mit zunehmendem Anteil an Guanylsäurebausteinen verschieben sich die Bereiche zu insgesamt kürzeren Retentionszeiten, wobei geringfügige Überschneidungen auftreten können. Während zum Beispiel für  $d(A)_4$  eine Retentionszeit von ca. 70 min gefunden wird, werden im Bereich zwischen 35 und 41 min Purinoligonucleotide der Bruttozusammensetzung  $d(A_3,G)$  eluiert. Zwischen 20 und 34 min verlassen Produkte der Zusammensetzung  $d(A_2,G_2)$  die Säule, Purinnucleotide der Zusammensetzung  $d(A,G_3)$  weisen Retentionszeiten zwischen 14 und 23 min auf. Im Gegensatz zur Bruttozusammensetzung hat die Kettenlänge der Oligonucleotide einen geringen Einfluss auf die Retentionszeit. Enthalten die Purinoligonucleotide einen zusätzlichen Adenylsäurebaustein, so erfolgt eine Verschiebung der Retentionszeiten zu höheren Werten, dagegen bewirkt ein zusätzlicher Guanylsäurebaustein kürzere Retentionszeiten. Während beispielsweise die Purintetranucleotide  $d(A_2,G_2)$  zwischen 20 und 34 min eluiert werden, verlassen Pentanucleotide der Zusammensetzung  $d(A_3,G_2)$  zwischen 28 und 48 min und der Zusammensetzung  $d(A_2,G_3)$  zwischen 17 und 30 min die Säule. Entsprechend verhalten sich auch Einzelsubstanzen. Während ein zusätzlicher Adenylsäurebaustein in 3'-Stellung die Retentionszeit bezogen auf das ursprüngliche Oligonucleotid erhöht, führt ein zusätzlicher Guanylsäurebaustein in 3'-Stellung zu kürzeren Retentionszeiten. Für  $d(A-A-G-A)$  wird z.B. eine Retentionszeit von 38 min gefunden,  $d(A-A-G-A-A)$  bzw.  $d(A-A-G-A-G)$  weisen dagegen Retentionszeiten von 50 min bzw. 31 min auf. Nach den vorliegenden Ergebnissen haben die 5'-terminalen Monomerbausteine keinen entsprechenden Einfluss. Eine umfassende Systematik, die gestattet, die Elutionsreihenfolge verschiedener Komponenten vorherzusagen, lässt sich bisher nicht erkennen.

DANK

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

## ZUSAMMENFASSUNG

Heringspermen DNA wird chemisch zu einem komplex zusammengesetzten Gemisch von Purinnucleotiden abgebaut. Die Oligonucleotide werden säulenchromatographisch von dem Partialhydrolysat getrennt. Die erhaltene Mischung von trimeren bis hexameren Purinoligonucleotiden wird anschliessend nach einem Trennungsgang an QAE-Sephadex in verschiedene Gemische von sequenzisomeren Purinoligonucleotiden fraktioniert. In einer abschliessenden Trennung, die mit Hilfe der "Reversed-Phase" (Nucleosil C<sub>18</sub>) Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) erfolgt, werden diese Gemische unter isokratischen Bedingungen in 35 reine, definierte Purinoligonucleotide mit vier bis sechs Monomereinheiten, in 14 definierte Gemische sequenzisomerer Purinoligonucleotide und in verschiedene, nicht identifizierte Produkte getrennt. Reinheit und Sequenz der isolierten Oligonucleotide werden mit der "Fingerprint" Methode bestimmt. Die Ergebnisse der HPLC sowie die "Fingerprints" der isolierten Oligonucleotide werden diskutiert.

## LITERATUR

- 1 S. Takemura, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 32 (1959) 920.
- 2 C. R. Bayley, K. W. Brammer und A. S. Jones, *J. Chem. Soc.*, (1961) 1903.
- 3 V. Habermann, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 28 (1963) 510.
- 4 B. F. Vanyushin und Ya. I. Bur'yanov, *Biokhimiya*, 34 (1969) 546; *ibid.* 718.
- 5 H. Türler und E. Chargaff, *Biochim. Biophys. Acta*, 195 (1969) 446.
- 6 H. Türler, J. Buchowicz und E. Chargaff, *Biochim. Biophys. Acta*, 195 (1969) 456.
- 7 A. M. Maxam und W. Gilbert, *Methods Enzymol.*, 65 (1980) 499.
- 8 C. M. Rubin und C. W. Schmid, *Nucleic Acids Res.*, 8 (1980) 4613.
- 9 H. Schott und M. Schwarz, *J. Chromatogr.*, 157 (1978) 197.
- 10 H. Schott und H. Watzlawick, *J. Chromatogr.*, 196 (1980) 435.
- 11 H. Schott und H. Watzlawick, *J. Chromatogr.*, 243 (1982) 57.
- 12 H. Schott und H. Schrade, *J. Chromatogr.*, 265 (1983) 257.
- 13 R. Frank und H. Blöcker, in H. G. Gassen und A. Lang (Herausgeber), *Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments*, Verlag Chemie, Weinheim, 1982, p. 225.
- 14 E. Jay, R. Bambara, R. Padmanabhan und R. Wu, *Nucleic Acids Res.*, 1 (1974) 331.
- 15 H. Schott, H. D. Meyer und E. Bayer, *J. Chromatogr.*, 280 (1983) 297.