

Eine quantitative Bestimmungsmethode des Uracilgehaltes biologischen Materials im Nanogramm-Bereich mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigchromatografie

A Method for the Quantitative Estimation of Uracil Content in Biological Materials in the Nanogramme-Range Using High-Pressure Liquid Chromatography

Hans-Joachim Breter, Marianne Schnaus *, Werner E. G. Müller und Rudolf K. Zahn

Physiologisch-Chemisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz und
Laboratory for Marine Molecular Biology, Institut Ruđer Bošković, Rovinj

(Z. Naturforsch. **29 c**, 139–141 [1974]; eingegangen am 19. Dezember 1973)

Uracil, High-pressure Liquid Chromatography, Sea Urchin Embryos, Rat Tissues

A method is described for the estimation of the uracil content in biological materials by means of high-pressure liquid chromatography. Hydrolysis of the tissues and total liberation of RNA bases are carried out in 70% perchloric acid. Less than 1 mg of the materials are needed for analysis. A pre-purification of the hydrolyzates is carried out by anion-exchange chromatography. Recoveries are estimated by isotope dilution analysis with [2-¹⁴C]labelled uracil.

The method is highly sensitive — about 6000 pmol of uracil content can at least be estimated quantitatively — and analysis time is short. In routine analysis a single sample needs 4 hours to be completed. When preparing several samples at a time an analysis is completed every 45 min.

Im Rahmen der Untersuchung biologischen Materials auf seinen Nucleinsäuregehalt entwickelten wir ein Verfahren zur gaschromatografischen¹ und hochdruckflüssigchromatografischen² Thyminbestimmung.

Zur Ergänzung dieser Methodik wurde ein Verfahren zur hochdruckflüssigchromatografischen Uracilbestimmung entwickelt. Da ein Gewebsaufschluß mit vollständiger Freisetzung der RNA-Basen eine Perchlorsäurehydrolyse erfordert^{3, 4}, mußten Methoden insbesondere zur Vorreinigung der Hydrolysate entwickelt werden, die ausreichende Ausbeuten zwischen 30 und 50% zulassen. Denn die bei der Perchlorsäurehydrolyse entstehenden Bräunungsprodukte interferieren bei der hochdruckflüssigchromatografischen Trennung des Uracils vom begleitenden Thymin zum Teil mit der Uracilbande, was zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Analysengenauigkeit führen kann.

Durch Chromatografie der Hydrolysate an Dowex-Anionenaustauscher 1 X 8 und geeignete Wahl der Puffermolarität im Hochdrucksystem wurde eine einwandfreie Abtrennung des Uracils aus der Analysenlösung unter Erzielung hoher Ausbeuten erreicht.

Materialien und Methoden

Organisches Material zur Uracilbestimmung:

1. Jungen Albinoratten wurden in Äthernarkose Nieren, Milz, Herz und Thymus mit einer in Aceton-Trockeneis auf -60°C tiefgekühlten Gefrierstoppzange entnommen. Die Organe wurden im eisgekühlten Mörser fein zerrieben und sofort für 24 Stunden in eine Gefriertrocknungszentrifuge verbracht. Die erhaltenen Trockenpulver wurden luftdicht verschlossen bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2. Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde gefriergetrocknet und entsprechend den Rattenorganen verwahrt.

3. Seeigel (*Sphaerechinus granularis* Lam.) wurden im Canale di Leme bei Rovinj, Istrien, gefangen. Die Gewinnung der Eier und die Aufzucht der Embryonen erfolgte entsprechend der von Müller *et al.*⁵ beschriebenen Methode. In jeweils 30-minütigem Abstand wurden den Ansätzen Aliquots mit ca. 10^5 Embryonen entnommen, in Hydrolyseröhrchen abzentrifugiert und seewasserfrei auf -30°C eingefroren aufbewahrt.

Perchlorsäure, Ammoniak, Ameisensäure und Uracil (für biochemische Zwecke) wurden von der Fa. Merck, D-6100 Darmstadt, bezogen. [2-¹⁴C]markiertes Uracil (spezifische Aktivität: 7,21 mCi/

* Diese Arbeit enthält wesentliche Teile der Dissertation von Marianne Schnaus, eingereicht an der Medizinischen Fakultät in Mainz.

Sonderdruckanforderungen an Dr. H.-J. Breter, Physiologisch-Chemisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität, D-6500 Mainz, Postfach 3980.



mmol, entsprechend 15,5 mg/mCi, Lot-number: 80-235) stammte von New England Nuclear Chemicals, Boston, Mass. (USA). Als Szintillator diente eine Mischung von 75 mg Dimethyl-POPOP, 4 g PPO und 120 g Naphthalin, gelöst in 1 l Dioxan. Zur Zählung wurde ein Packard-Szintillation-Counter (Tri-Carb) verwendet.

Dowex Anionenaustauscher, Typ 1 X 8, wurde von der Fa. Serva, D-6900 Heidelberg, bezogen, stark saurer Kationenaustauscher aus sulfoniertem Styropolymer, Typ M 71, Partikeldurchmesser 10–12 μ , von der Fa. Beckman, D-8000 München. Die Hochdruckflüssigchromatografie wurde mit einem HPL-Chromatografen, Typ LCS 1000, ausgerüstet mit einem 254 nm UV-Detektor, der Fa. Varian, D-6100 Darmstadt, durchgeführt.

Die Rattenorgane, Hefe, und die Seegeleier und -embryonen, letztere zuvor für 6 h bei 100 °C getrocknet, wurden in einem Hydrolyseröhrchen mit jeweils 0,5 ml 70% Perchlorsäure und [2-¹⁴C]markiertem Uracil (ca. 10⁵ cpm in 10 μ l H₂O) versetzt, für 1 h bei 100 °C im Wasserbad gehalten und anschließend mit 7 M KOH neutralisiert. Die Hydrolysate wurden dann scharf abzentrifugiert, die Überstände abgezogen und – nach zusätzlicher Extraktion des Rückstandes mit H₂O und nachfolgender Zentrifugation – mit dem zweiten Überstand vereinigt. Der extrahierte Niederschlag wurde verworfen.

Die vereinigten Überstände wurden im Sandbad (90 °C) unter N₂-Strom auf etwa 1,5 ml eingedampft und anschließend auf eine 0,6 × 13 cm Dowex 1 X 8-Säule aufgegeben. Die Elution erfolgte bei Zimmertemperatur in einem 0,1 M Ammoniumformiat-System, pH 4,6. Das Eluat – zu jeweils 20 Tropfen fraktioniert – wurde auf Radioaktivität geprüft (50 μ l pro Fraktion + 100 μ l H₂O + 5 ml Szintillator). Fraktionen mit einer Aktivität über 500 cpm wurden vereinigt und zur Trockene in Eppendorf-Reaktionsgefäßen eingedampft. Der Rückstand wurde in 200 μ l 0,01 M Ammoniumformiatpuffer, pH 4,6, aufgenommen.

Von dieser Lösung wurden Volumina zwischen 0,5 und 2,0 μ l auf eine 0,18 × 300 cm-Säule eingebracht und in einem 0,01 M Ammoniumformiat-System, pH 4,6, bei 80 °C und einer Durchfließgeschwindigkeit von 15 ml · h⁻¹ (Druck etwa 350 atm) aufgetrennt.

Die Uracilmenge jeder Fraktion wurde durch Peakflächenintegration unter Verwendung eines Uracilstandards ermittelt. Die Berechnung der Ausbeute erfolgte durch Isotopenverdünnungsanalyse (10 μ l Analysenlösung + 100 μ l H₂O + 5 ml Szintillator).

Ergebnisse und Diskussion

In Abb. 1 ist ein typisches Elutionsdiagramm der Hochdruckflüssigchromatografie dargestellt, das neben Uracil und Thymin drei weitere, nicht identifizierte Substanzen nachweist. Uracil und Thymin werden unabhängig von der Puffermolarität stets mit jeweils gleichen Volumina eluiert, während die Elutionsvolumina begleitender Verunreinigungen mit steigender Molarität zwischen 10⁻³ und 10⁻¹ M

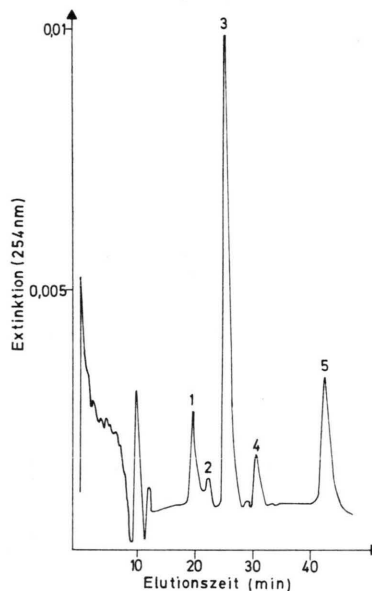


Abb. 1. Elutionsdiagramm eines vorgereinigten Perchlorsäurehydrolysats. Material: Seegelembryonen (Entwicklungszeit 9,5 h), Gesamtvolumen der Probe: 200 μ l, Injektionsvolumen: 2 μ l, Trennbedingungen siehe Text, 1, 2 und 5: unidentifizierte Begleitsubstanzen, 3: Uracil, 4: Thymin.

abnehmen. Lediglich bei Verwendung eines 10⁻² M Ammoniumformiat-Puffers, pH 4,6, läßt sich das Uracil mit Ausbeuten zwischen 30 und 50% sauber von den Begleitsubstanzen abtrennen.

Abb. 2 gibt den Uracilgehalt sich entwickelnder Seegelembryonen von der Befruchtung bis zum Stadium geschlüpfter Blastulae wieder.

In Tab. I sind die für die Rattengewebe und die Bäckerhefe ermittelten Uracilkonzentrationen aufgeführt. Sie decken sich z. T. mit in der Literatur angegebenen Werten⁶ (Herzmuskel, Bäckerhefe), andererseits finden sich jedoch erhebliche Abweichungen. Dabei darf allerdings der für die Beurteilung wichtige Zustand des Gewebes (Alter, Ernährungszustand, Wachstum) nicht vernachlässigt werden. Auch große individuelle Unterschiede sind so zu erklären.

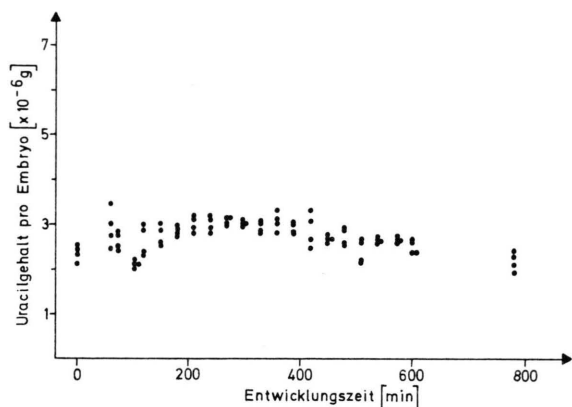


Abb. 2. Uracilgehalt in Seeigelembryonen (*Sphaerechinus granularis* Lam.) verschiedener Entwicklungsstadien.

Tab. I. Uracilgehalt in Bäckerhefe und verschiedenen Rat-
tenorganen [$\mu\text{g}/\text{mg}$ Lyophilisat].

| Gewebeart | Menge | Referenz ^a |
|----------------|-----------------|-----------------------|
| Hefe | $4,25 \pm 0,20$ | 4,0 ⁶ |
| Herzmuskulatur | $0,48 \pm 0,02$ | 0,35 ^{b 6} |
| Milz | $1,49 \pm 0,11$ | |
| Niere | $0,94 \pm 0,07$ | 3,45 ⁶ |
| Thymus | $1,82 \pm 0,16$ | |

a. Der Uracilgehalt der RNA wurde gleich 10% gesetzt

b. Für Skelettmuskulatur.

Hydrolyse, Vorreinigung an Dowex und hochdruckflüssigchromatografische Bestimmung der Uracilkonzentration einer Probe lassen sich in weniger als 4 Stunden durchführen. Bei gleichzeitiger Bearbeitung mehrerer Analysenansätze kann nach jeweils 45 min eine Analyse abgeschlossen werden. In jeder Analyse können in 2–10 μl Injektionsvolumen noch 300 pmol Uracil quantitativ chromatografisch erfaßt werden.

Das Verfahren eignet sich somit insbesondere zum routinemäßigen Einsatz, z.B. zur Erfassung der Änderungen im Nucleinsäuregehalt (RNA) tierischer Gewebe unter der Entwicklung oder unter der Beeinflussung durch Therapeutika.

¹ F. D. Gauchel, K. Beyermann u. R. K. Zahn, FEBS Letters **6**, 141–144 [1970].

² G. Gauchel, F. D. Gauchel, K. Beyermann u. R. K. Zahn, Z. analyt. Chem. **259**, 183–187 [1972].

³ G. R. Wyatt, The Nucleic Acids (E. Chargaff and J. N. Davidson, eds.), **Bd. 1**, p. 243, Academic Press, New York 1955.

⁴ H. N. Munro u. A. Fleck, Methods of Biochemical Analysis (D. Glick, ed.), **Bd. XIV**, p. 113–176, Interscience Publishers, London-New York-Sydney 1966.

⁵ W. E. G. Müller, W. Forster, G. Zahn u. R. K. Zahn, Roux' Arch. Entwicklungsmechan. Organismen **167**, 99–117 [1971].

⁶ H. Bielka, Nukleinsäuren. Molekulare Biologie der Zelle (H. Bielka, ed.), p. 58, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart 1969.