

213. H. Löppert, E. B.: Bestimmung von Nucleotiden durch Chromatographie und Isotopenverdünnung. VI. Internationales Symposium für Mikrochemie, Graz 1970, Bd. E, 143-147.

BESTIMMUNG VON NUCLEOTIDEN DURCH CHROMATOGRAPHIE  
UND ISOTOPENVERDÜNNUNG

H. LÖPPERT und E. BRODA

Institut für Biologie, Reaktorzentrum Seibersdorf, und  
Institut für physikalische Chemie,  
Radiochemische Abteilung, Universität Wien

Um die Veränderungen im Spiegel der freien Adenin-Nucleotide im Zusammenhang mit dem aktiven Transport von Ionen durch die Zellmembran von Pflanzenzellen - am Beispiel von *Chlorella fusca*, einer einzelligen Grünalge - zu untersuchen, müssen diese Nucleotide sehr empfindlich bestimmt werden. Dies kann auf Grund des Phosphorgehaltes der Nucleotide nach einer radiochemischen Methode geschehen, nachdem die Algen biosynthetisch mit  $^{32}\text{P}$  als  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  markiert wurden. Wesentliche Zeitersparnis, Vereinfachung der Trennmethode und bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse brachte die Anwendung der Isotopenverdünnung mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Nucleotid bei der Abscheidung und Chromatographie der Nucleotide. Die Nucleotide mußten nicht mehr quantitativ isoliert werden, sondern es genügte die Abtrennung eines Bruchteils der ursprünglich vorhandenen Nucleotidmenge in reiner Form.

Markierung der Algen und Extraktion der Nucleotide

Die Nucleotide wurden durch Inkubieren der Algen in  $10^{-5}$  M  $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$  (spezifische Aktivität: 2 mCi/ $\mu\text{M}$ ) markiert. Nach 3 Stunden war konstante spezifische Aktivität der Nucleotide erreicht, wie besondere Versuche zeigten. Zur Extraktion der Nucleotide wurde die Methode von BLIGH und DYER (1959) verwendet, durch die Pigmente und Lipide zu einem großen Teil entfernt werden. Die Methode gewährleistet eine Tötung der Algen innerhalb 0,25 Sek. (BASSHAM und KIRK, 1964). Zur Isotopenverdünnung wurde dem chloroform-methanolischen Extrakt eine Standardlösung der  $^{14}\text{C}$ -markierten Nucleotide ATP, ADP



617.917

und AMP zugefügt. Das Methanol wurde nach Abtrennung des Chloroforms im Vakuum bei  $10^{\circ}$  abgedampft.

#### Chromatographische Trennung

Die Adenin-Nucleotide wurden von anderen phosphorhaltigen Verbindungen durch Ionenaustausch-Säulenchromatographie abgetrennt. Als Anionenaustauscher diente Polyäthylimin-Cellulose, die RANDERATH (1962) für die Dünnschichtchromatographie von Nucleotiden eingeführt hat.

PEI-Cellulose für Säulenchromatographie (Schuchardt) wurde durch Behandeln mit 0,5 M NaOH und anschließend 0,5 M Ameisensäure im Aufschlemmverfahren in die Formiatform gebracht. Mit dem Austauscher wurden 6 Chromatographieröhre (0,9 x 15 cm) zur gleichzeitigen Benützung parallel gefüllt. Nach Auftragen der wässrigen Lösung der Nucleotide wurde mit 2 aufeinanderfolgenden, linearen Gradienten eluiert:

1. Gradient:  $H_2O$  gegen 0,4 M Ammoniumformiatpuffer pH 4 (0,4 M Ammoniumformiat/ 0,4 M Ameisensäure, 2:1)
2. Gradient: 0,4 M Ammoniumformiatpuffer pH 4 gegen 1M Ammoniumformiat.

Im Vorratsgefäß und im Mischgefäß befanden sich je 240 ml Lösung. Eine Vielfach-Schlauchpumpe (Desaga) versorgte die 6 Säulen gleichmäßig mit Pufferlösung. Da die Chromatogramme gut reproduzierbar waren und die nämlichen Substanzen in verschiedenen Chromatogrammen immer in den gleichen Fraktionen aufschienen, genügte es, das Eluat einer einzigen Säule kontinuierlich qualitativ zu kontrollieren. Fallweise wurden vor der Auftrennung der Proben inaktive Nucleotide als Standards zugesetzt; die Transmissionskurve bei 260 nm ermöglichte dann eine rasche Zuordnung der Peaks. Die Messanordnung ist aus Abb. 1 zu ersehen.

#### Messung und quantitative Auswertung

Die Messung von  $^{14}C$  und  $^{32}P$  erfolgte im "Tricarb- $\beta$ -Spektrometer" (Packard). Dazu wurde jedem Peak des ADP und ATP eine im Kollektor erhaltene Fraktion entnommen und bei  $70^{\circ}$  eingeeignet. Das AMP wurde nach RANDERATH (1962) rechromatographiert, da sonst seine Abtrennung vom Orthophosphat ungenügend war. Eine Szintillatorflüssig-

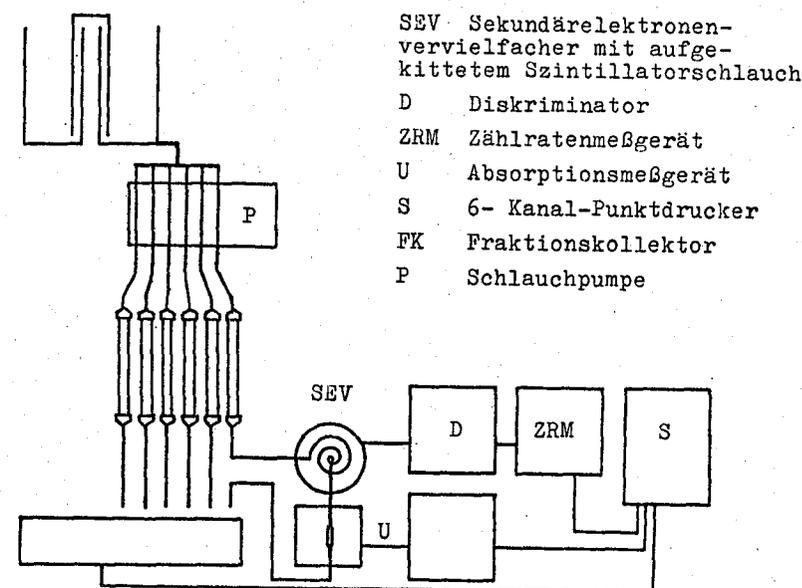


Abb. 1

keit (JEFFAY und ALVAREZ, 1961) wurde modifiziert, sodaß sie imstande war, die saure Salzlösung aufzunehmen: 3 g PPO und 0,3 g POPOP wurden in einer Mischung von 75 ml Äthanolamin, 250 ml Methylcellosolv, 250 ml Triton-X und 250 ml Toluol aufgelöst. Auf Grund der  $\beta$ -Spektren von  $^{14}C$  und  $^{32}P$  wurde die günstigste Geräteeinstellung zur Trennung der beiden Nuclide gefunden.

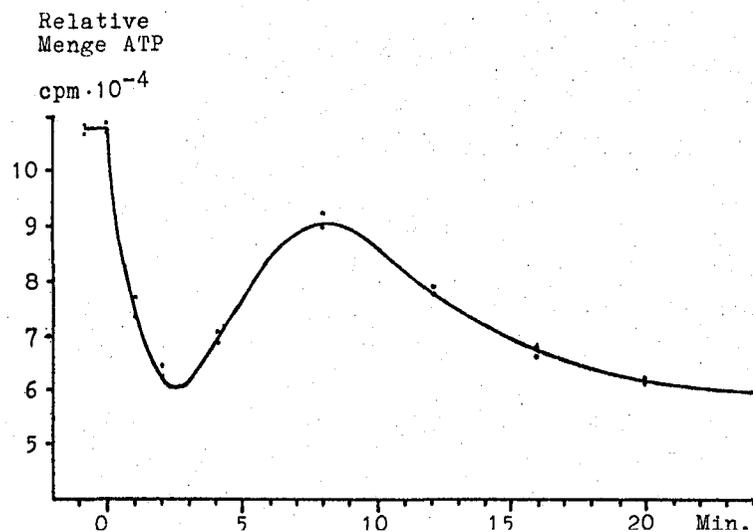
Die Aktivitäten der eingesetzten Radionuclide  $^{14}C$  und  $^{32}P$  wurden so gewählt, daß sie in den Nucleotiden größenordnungsmäßig übereinstimmten. Dann genügte rechnerische Korrektur der  $^{14}C$ -Aktivität der Nucleotide auf Grund des  $^{32}P$ -Meßwertes der gleichen Proben bei höherer Energie.

Die Berechnung der in der Probe vorhandenen absoluten Nucleotidmenge erfolgte aus der bekannten spezifischen Aktivität des  $^{32}P$  der Algen-Nucleotide und der Aktivität der zugesetzten  $^{14}C$ -Nucleotide. Wenn aber nur die Änderung der Nucleotidmenge - etwa bei kinetischen Versuchen während des aktiven Eintransportes von Ionen durch die Zellmembran - interessiert, muß der Absolutwert der ersteren Größe nicht bekannt sein. Die Bestimmung des

ADP und AMP nach der gleichen Methode setzt natürlich voraus, daß nicht während der Aufarbeitung weitere Substanz durch Zersetzung von ATP gebildet wird, was unter den beschriebenen Arbeitsbedingungen gewährleistet ist. Unter größeren Bedingungen könnte man z.B. im Fall des ADP sich von einem durch Zersetzung hervorgerufenen Fehler durch Dreifachmarkierung befreien. Dazu setzt man von vornherein zwar  $^{14}\text{C}$ - ATP, statt des  $^{14}\text{C}$ - ADP aber  $^3\text{H}$ - ADP zu, bestimmt dann das durch Zersetzung gebildete  $^{32}\text{P}$ - ADP gesondert auf dem Weg über das gefundene  $^{14}\text{C}$ - ADP, und zieht es vom gesamten  $^{32}\text{P}$ - ADP ab.

Bei der bisher verwendeten spezifischen Aktivität des  $^{32}\text{P}$  ist eine Bestimmung von Nanomolen Nucleotid mit einer Reproduzierbarkeit von etwa 3% möglich. Mit höheren spezifischen Aktivitäten des eingesetzten  $^{32}\text{P}$  läßt sich die Empfindlichkeit weiter steigern. Auch kann man andere Nucleotide als die Adenin-Nucleotide bestimmen, da sie bei der beschriebenen chromatographischen Methode gesondert erhalten werden können.

Zur Illustration der Methode sei als Beispiel die Verfolgung des ATP- Spiegels in suspendierter Chlorella (dunkel) in 0,1 M KCl nach dem Salzzusatz angeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots der Suspension in die siedende Chloroform-Methanol-Mischung eingespritzt und wie beschrieben aufgearbeitet.



### Summary

A method for the determination of  $^{32}\text{P}$ - nucleotides, especially ATP and ADP, in nanomole quantities or better in plant material is described. After extraction, the nucleotides are separated by ion exchange column chromatography and measured with a liquid scintillation counter. Yields are determined through isotope dilution with  $^{14}\text{C}$ - nucleotides. The method is rapid and suitable for routine work. Reproducibility is better than 3%.

### Literatur

- E.C. BLIGH, W.J. DYER, *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911 (1959)  
 J.A. BASSHAM, M. KIRK, *Rapid Mixing and Sampling Techniques in Biochemistry*, Academic Press, London 1964, 326  
 K. RANDEPATH, *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 852 (1962)  
 K. RANDEPATH, *Angew. Chemie*, **74**, 484 (1962)  
 H. JEFFAY, J. ALVAREZ, *Anal. Chem.* **33**, 612 (1961)

