

## **$\Delta$ -pH-Sensortechnik**

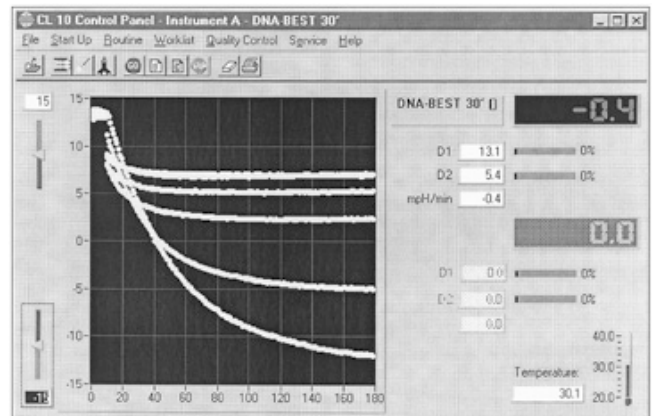
### **Eine neue Methode zur Bestimmung von Nucleinsäuren**

Zur Routinebestimmung von Nucleinsäuren in biologischen Proben dienen mitunter chemische Veränderungen die durch Einwirkung von Enzymen hervorgerufen werden. So z.B. alkalische Phosphatase hydrolysiert die 5'-terminale Phosphatgruppe ab und der Phosphatrest wird durch die Molybdat/Essigsäure-isopropylester-Methode der Bestimmung zugeführt. Methodenbedingt erweist sich dabei der hohe Bedarf an Nucleinsäuren und zeitraubende Aufarbeitung von entscheidendem Nachteil. Die pH-stat-Methode nützt die enzymatische Spaltung der Diphosphat-Bindung durch Nucleasen aus, in dem die  $H^+$ -Entwicklung potentiometrisch kontrolliert, d.h. durch Titrieren bei konstantem pH-Wert, erfaßt wird. Da bei pH-stat-Messungen normale Glaselektroden verwendet werden, sind relativ große Volumenmengen einzusetzen. Auch die Messung von kleinen pH-Änderungen und damit niedrigen Analytkonzentration sind bei der Methode nicht möglich. Wegen solcher Schwierigkeiten, jedoch unter Beibehaltung des enzymatisch-hydrolytischen Prinzips, wurde zur Routineanalytik von Nucleinsäuren das semiautomatische  $\Delta$ -pH-Meßgerät CL 10 eingesetzt.

Die angewendete  $\Delta$ -pH-Sensortechnik ist auf der entsprechenden Seite unter [www.schlag.de](http://www.schlag.de) ausführlich beschrieben. Die Meßmethodik basiert auf Parallelschaltung von zwei miniaturisierten pH-Elektroden mit deren Hilfe pH-Änderungen, bis hinunter 0,001 pH-Einheiten, meßbar werden. Zur Analyse wurden verschiedene Nucleinsäuren und Nucleasen eingesetzt. Die graphisch dargestellten  $\Delta$ -pH-Kurvenverläufe, die sich während der nucleotidischen Hydrolyse resultieren, wurden aufgezeichnet und ausgewertet.

#### **Die Ergebnisse der Nucleinsäure-Analytik durch $\Delta$ -pH-Sensortechnik lassen sich wie folgt zusammenfassen :**

1. Werden Verdünnungsreihen von Heringspermien-DNA mit *Serratia*-Nuclease wie NucA hydrolysiert, so sind die pH-Differenzen, zwischen vor und nach der Hydrolyse, der DNA-Konzentration direkt proportional (Endpunkt-Methodik).



$\Delta$ -pH-Verlauf vs. Zeit bei Hydrolyse einer Verdünnungsreihe von Heringspermien-DNA nach Zugabe von *Anabaena*-Nuclease

2. Die quantitativen Ergebnisse werden noch dadurch erhärtet, daß in wachsenden Mengen zugesetzter *Anabaena*-Nucleaseinhibitor (verhindert DNA-Spaltung und bildet einen 1:1 stöchiometrischen Komplex mit *Anabaena*-Nuclease), zu DNA/Nuclease-Mischungen, verhindert die durch *Anabaena*-Nuclease hervorgerufene Hydrolyse zunehmend, bis bei 1:1 Verhältnis die DNA-Spaltung ganz unterbleibt. Dementsprechend werden die gemessenen  $\Delta$ -pH-Werte kleiner, bzw. bei 1:1 Stöchiometrie sich keine signifikante pH-Differenz zeigt.

3. Aus vergleichenden Messungen mit  $\Delta$ -pH-Meßgerät und  $OD_{260}$ -Methode (Hydrolyse von unterschiedlichen Heringspermien-DNA-Einwaagen mit NTnucA) resultiert die Gleichwertigkeit der beiden Methoden. Die bei der  $OD_{260}$ -Methode ausgeprägte lag-Phase ist bei der  $\Delta$ -pH-Kurven nicht zu sehen.

4. Hydrolysate von gleichen Mengen verschiedener Nucleinsäuren wie native Heringspermien-DNA, denaturierte Heringspermien-DNA, tRNA und Oligonucleotid-NucA1-A, produziert durch *Serratia*-Nuclease, haben etwa die gleiche Meßgröße (in  $\Delta$ -mpH-Einheiten), d.h. die Methode er-

weist sich von der Sequenz und Sekundärstruktur der NA unabhängig .

5. Da die Bestimmung von Nucleinsäuren durch  $\Delta$ -pH-Technik prinzipiell durch (hohe) Eiweiß-Belastung nicht gestört wird, war deren Einsatz zur Analyse von Nucleinsäurerückständen in rekombinanten Proteinprodukten naheliegend. Um dies zu prüfen wurde eine 59  $\mu\text{g/ml}$ -DNA-Lösung, ausgehend von 0 mit bis 2,5  $\text{mg/ml}$  BSA aufgestockt und die Hydrolyse mit *Serratia*- bzw. *Anabaena*-Nuclease gestartet. Deutliche  $\Delta$ -pH-Abnahmen weisen den DNA-Gehalt nach. Bei hohem BSA-Überschuß nimmt die Signalgröße etwas ab, dies kann zur leichten Unterbewertung des DNA-Gehalts führen.

In Laufe der Nucleinsäure-Analytik erweist sich das  $\Delta$ -pH-Meßgerät CL 10 als ein einfaches, bequemes und robustes Instrument bei dem die Empfindlichkeit und Genauigkeit in  $\mu\text{g/ml}$ -Bereich liegt. Damit ist die Vergleichbarkeit mit der UV-Methode gegeben. Zur Analysenausführung braucht die Art und Sequenz der Nucleinsäure nicht bekannt zu sein. Die Sekundärstruktur des Materials ist unerheblich. Die Methode ist auch dann anwendbar, wenn Protein/NA-Mischungen vorliegen, funktioniert sogar in Gegenwart von  $\text{mg}$ -Mengen Protein. Standardmäßig zur Analyse benötigtes Probenvolumen ist 15  $\mu\text{l}$ , die Meßzeiten liegen zwischen 180-240 s. Moderater Anschaffungspreis.

## Denkbare Einsatzgebiete der $\Delta$ -pH-Sensortechnik

- Enzymatische Analytik von stark fremdbelasteten, trüben Proben (z.B. mit Protein)
- Monitoring von DNA- und RNA von genmanipulierten Mikroorganismen
- Monitoring von Bildung und Abbau von Phosphorsäureestern
- Monitoring von Bildung und Abbau von Nucleotidmono-, -di-, -tri- und -oligo-phosphaten

- Monitoring von  $\text{ATP} \Leftrightarrow \text{ADP} \Leftrightarrow \text{AMP}$ -Übergängen
- Monitoring von Vorgängen wo Phosphat-(End)Gruppe frei oder gebunden wird.
- Monitoring bei (De)Polymerisationen von DNA und RNA
- Bestimmung von Nucleotidasen im Blut
- Aktivitätsbestimmung von DNA-, RNA-Nucleasen und -Inhibitoren, Phosphodiesterasen und -Inhibitoren, Phosphomonoesterasen, Phospholipasen usw.

## Vertrieb des $\Delta$ -pH-Meßgerätes CL 10

Dr. Berthold G. Schlag

Wissenschaftliche Meßinstrumente

Nachf. Im- und Export GmbH

Am Mühlenberg 19

51465 Bergisch Gladbach

Tel. 0 22 02 - 3 50 50

Fax 0 22 02 - 3 96 36

E-Mail: [info@schlag.de](mailto:info@schlag.de)