

ISOLEMENT D'OLIGORIBONUCLÉOTIDES RICHES EN GUANINE A PARTIR DE PRÉPARATIONS D'ACIDES NUCLÉIQUES DE LEVURE.

Gianni PIPERNO (*) et Giorgio BERNARDI (*).

Centre de Recherches sur les macromolécules, Strasbourg.

(Mémoire reçu le 4 juin 1970).

Résumé. — Des oligoribonucleotides contenant environ 73 p. 100 de guanine ont été isolés à partir de préparations d'acides nucléiques de levure par chromatographie sur colonnes d'hydroxyapatite. Ces oligoribonucleotides ont été étudiés dans leurs propriétés de sédimentation et de dénaturation thermique avant et après chromatographie sur colonnes d'hydroxyapatite en présence d'urée 7 M.

Si l'on chromatographie sur colonnes d'hydroxyapatite des préparations de DNA de *Saccharomyces cerevisiae* obtenues par la méthode de MARMUR [1] légèrement modifiée [2] on obtient [2, 3] : 1) du matériel élué à des molarités de tampon phosphate de sodium, pH 6,8 (NaP), comprises entre la molarité de charge et environ 0,23 M ; ce matériel est formé par des ribooligonucleotides de taille et composition différentes et se présente comme une série de pics assez bien séparés les uns des autres ; sa quantité diminue avec le nombre de précipitations à l'éthanol et à l'isopropanol ; des exemples de profils d'éluion de ce matériel sont montrés dans la fig. 1 et dans les références 2 et 3 ; 2) une fraction qui est éluee par du NaP 0,25 M, et qui est formée par du DNA nucléaire ; 3) une fraction éluee par du NaP 0,30 M, et qui est formée par du DNA mitochondrial ; 4) une fraction éluee par du NaP 0,35 - 0,45 M ; cette fraction est pratiquement absente dans les préparations de DNA ayant subi un grand nombre de précipitations à l'éthanol et à l'isopropanol [2], ou n'ayant pas subi de traitement à la ribonuclease pancréatique. La molarité d'éluion de cette fraction est la plus élevée qu'on ait trouvé jusqu'à présent pour un polynucleotide naturel.

Nous présenterons très brièvement ici les résultats d'une étude dont le but était d'éclaircir le comportement chromatographique ainsi que l'origine de cette fraction. Une description détaillée des données sera publiée ultérieurement.

Le matériel, facilement purifié par une succession de deux chromatographies sur hydroxyapatite (fig. 2 A et B), a été caractérisé.

(*) Adresse actuelle : Institut de Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences, Paris 5^e.

Son spectre ultraviolet présente un maximum à 255 m μ , un minimum à 227 m μ et un rapport $A_{280} : A_{260}$ égal à 0,52 (en 0,15 M NaCl - 0,015 M citrate de sodium pH 7,2). Il ne contient pas de désoxyribose. Il n'est pas dégradé par la RNase pancréatique, la RNase acide de la rate [4] et l'exonucléase acide de la rate [5] dans des conditions expérimentales dans lesquelles le s-RNA est digéré très rapidement. Après chauffage à 100° pendant 10 minutes, l'exonucléase acide digère entièrement ce matériel.

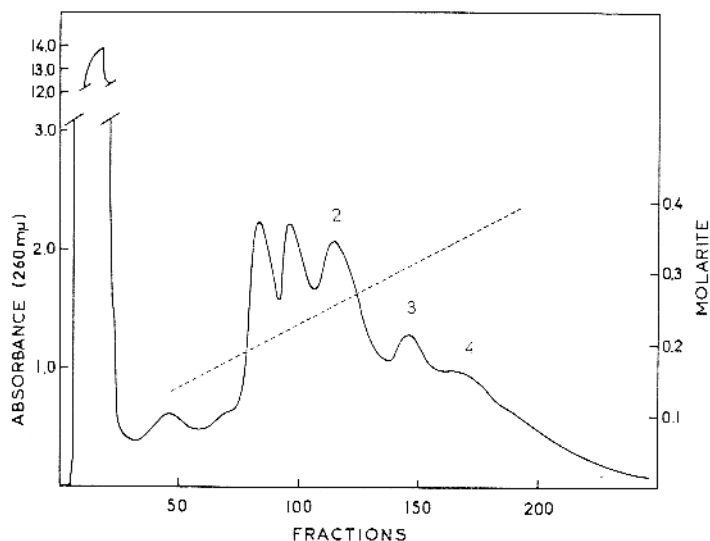


FIG. 1. — Chromatographie d'une préparation de DNA de *S. cerevisiae* (souche DM₁ ; 2) préparé selon MARUM (1), mais non précipité à l'isopropanol. 4 400 unités d'absorbance à 260 m μ (250 ml en NaP 0,1 M) ont été chargées sur une colonne de 2 \times 40 cm. Après la charge, la colonne a été rincée avec 150 ml de NaP 0,1 M. L'éluion a été faite avec un gradient de molarité de NaP (0,1 - 0,5 M ; 900 ml). Le volume des fractions 1-25 était égal à 20 ml ; les fractions suivantes avaient un volume de 4 ml. La vitesse d'écoulement était égale à 50 ml/hr. La récupération était égale à 96 p. 100. Les pics indiqués par 2, 3 et 4 représentent, respectivement, le DNA nucléaire, le DNA mitochondrial et les ribooligonucléotides riches en guanine.

La composition en base obtenue par chromatographie sur colonne de gel de polyacrylamide P2 [6] des nucléosides obtenues par digestion enzymatique avec l'exonucléase et la phosphatase acide de la rate [7] est donnée dans le Tableau I. La formule minimale trouvée pour les ribooligonucléotides venant de différentes souches de levure est $G_{17}A_4C_2U_1$; il peut être intéressant de noter que dans un cas les quantités relatives de C et U sont échangées.

Le produit présente à la sédimentation une seule frontière, ayant un coefficient de sédimentation de 3 S. Par contre, si le matériel est préalablement chauffé et refroidi rapidement, on peut observer des composantes plus lentes que le produit natif ainsi que des agrégats.

Chauffé, le produit présente une courbe de fusion biphasique s'étalant entre 40° et 90°. L'effet hyperchromique est de 23 p. 100.

La courbe de fusion du produit ainsi que son comportement à la sédimentation après chauffage suggère une hétérogénéité. Aussi, la rechromatographie sur hydroxyapatite (fig. 2 B) du produit montre, à côté de la fraction principale, une série de petits pics qui semblent dérivés d'elle.

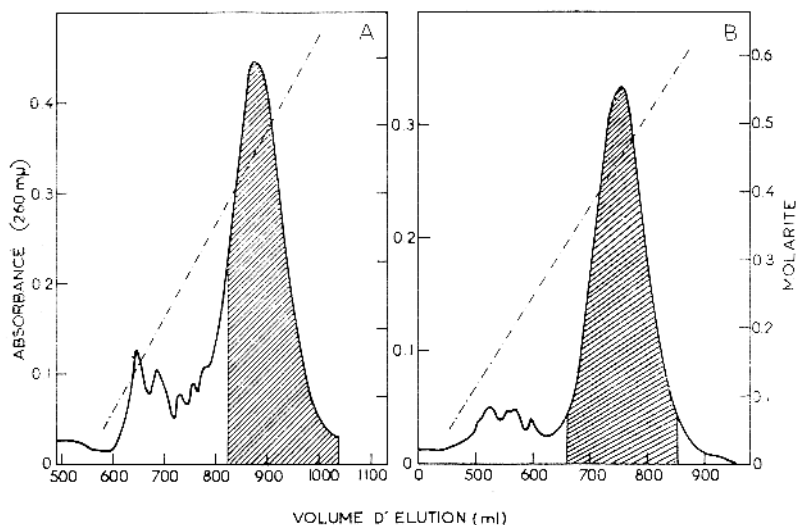


FIG. 2. — (A) Chromatographie des ribooligonucléotides riches en guanine provenant de *S. cerevisiae* (souche a_1 ; 3). 87 unités d'absorbance à 260 mμ (250 ml en NaP 0,05 M) ont été chargées sur une colonne de 2×45 cm. Après la charge, la colonne a été rincée avec 190 ml de NaP 0,05 M. L'éluion a été faite avec un gradient de molarité de NaP (0,05-0,89 M; 630 ml). La vitesse d'écoulement était égale à 50 ml/hr. La récupération était égale à 95 p. 100.

(B) Chromatographie des fractions correspondantes à la partie hachurée de la chromatographie précédente. 46 unités d'absorbance à 260 mμ (245 ml en NaP 0,05 M) ont été chargées sur une colonne 2×40 cm. Après la charge, la colonne a été rincée avec 100 ml de NaP 0,05 M. L'éluion a été faite comme la chromatographie précédente. La récupération était égale à 107 p. 100.

Si l'on chromatographie le produit sur hydroxyapatite en présence d'urée 7 M [10], ce phénomène est encore plus évident : une série de pics élués entre 0,07 et 0,27 M est suivie par un pic principal élué à environ 0,4 M (fig. 3). A la rechromatographie, la fraction principale donne lieu à nouveau à une série de petits pics (mais en quantité moindre que la première fois) suivis d'un pic principal. Après quatre autres chromatographies le produit est pratiquement élué comme un pic unique à environ 0,4 M.

Le produit ainsi isolé présente une courbe de dénaturation unique ; après chauffage à 100° et refroidissement rapide il sédimente comme le produit natif. Sa composition en bases est la même que celle du produit de départ ; on peut donc penser que l'hétérogénéité observée dans le

TABLEAU I.

Analyse des ribooligonucléotides riches en guanine obtenue de différentes souches de levure. Les résultats sont donnés en fractions molaires. Les souches de *S. cerevisiae* sont décrites en détail ailleurs [3].

Souche	G	A	U	C
A.....	71,5	15,3	4,0	9,2
a ₁	71,3	15,8	4,6	8,3
B.....	73,7	13,8	3,9	8,5
b.....	73,2	14,1	8,5	4,2

produit initial tient à l'existence dans un certain pourcentage de molécules de coupures latentes, qu'on révèle en chromatographiant le produit sur hydroxyapatite en présence d'urée 7 M.

Sur la base de ces résultats, il semble possible de conclure que la molarité d'éluion très élevée du produit pourrait tenir à une très haute densité de groupements phosphates disponibles pour l'interaction avec

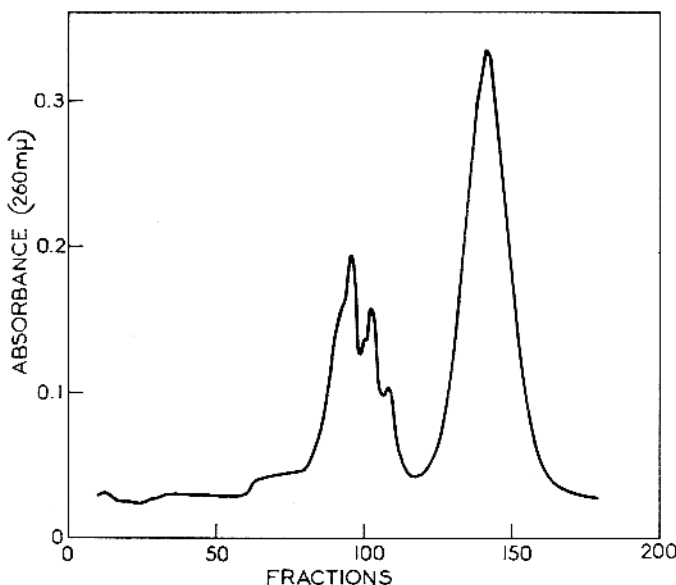


FIG. 3. — Chromatographie des fractions correspondantes à la partie hachurée de la chromatographie 2 (B). 35 unités d'absorbance à 260 mμ (400 ml en NaP 0,05 M - urée 7 M) ont été chargées sur une colonne de 2 × 40 cm, équilibrée avec NaP 0,05 M - urée 7 M. Après la charge, la colonne a été rincée avec 120 ml de NaP 0,05 M - urée 7 M. L'éluion a été faite comme dans les chromatographies 2 (A) et (B), le tampon contenant toutefois de l'urée 7 M. Le volume des fractions 1-66 était égal à 8 ml ; les fractions suivantes avaient un volume de 4 ml. La récupération était égale à 82 p. 100.

l'hydroxyapatite [8, 9], densité qui serait liée à une structure particulièrement compacte due à la teneur en guanine.

Quant à l'origine du produit il est vraisemblable qu'il soit constitué par un fragment de RNA, probablement ribosomique, libéré par la RNase pancréatique.

SUMMARY.

Oligoribonucleotides containing about 73 p. 100 guanine were isolated from nucleic acid preparations obtained from yeast cells by chromatography on hydroxyapatite columns. These oligoribonucleotides were investigated in their sedimentation and thermal denaturation properties before and after chromatography on hydroxyapatite columns in the presence of 7 M urea.

ZUSAMMENFASSUNG.

Es wurden aus Hefenukleinsäuren, durch Chromatographie auf Hydroxyapatit, Oligoribonukleotide die etwa 73 p. 100 Guanin enthalten, abgetrennt. Diese Oligoribonukleotide wurden durch Ultracentrifugation und Wärmedenaturierung nach und vor der Chromatographie auf Hydroxyapatit in 7 M Harnstoff charakterisiert.

BIBLIOGRAPHIE.

1. MARMUR, J. — *J. Mol. Biol.*, 1961, 3, 208.
2. BERNARDI, G., CARNEVALI, F., NICOLAIEFF, A., PIPERNO, G. et TECCE, G. — *J. Mol. Biol.*, 1968, 37, 493.
3. BERNARDI, G., FAURES, M., PIPERNO, G. et SLONIMSKI, P. P. — *J. Mol. Biol.*, 1970, 48, 23.
4. BERNARDI, A. et BERNARDI, G. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 129, 23.
5. BERNARDI, A. et BERNARDI, G. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 155, 360.
6. CARRARA, M. et BERNARDI, G. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 155, 1.
7. BERNARDI, G., CHERSI, A. et BERNARDI, A. — Manuscrit en préparation.
8. BERNARDI, G. — *Nature*, 1965, 206, 779.
9. BERNARDI, G. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 174, 449.
10. MUNDY, K. W. — *Z. Vererbungslehre*, 1965, 97, 281.