

SÉPARATION DES OLIGONUCLÉOTIDES DU DNA APURINIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR COUCHES MINCES DE GEL DE SILICE

D. LANDO, J. DE RUDDER ET M. PRIVAT DE GARILHE

Centre de Recherches S.I.F.A.-Diamant, 93, La Plaine Saint Denis (France)

(Reçu le 8 mars 1967)

INTRODUCTION

Un grand nombre de travaux est consacré chaque année aux études de séquences des nucléotides des acides nucléiques notamment du DNA. Un préliminaire utile à ces difficiles recherches est l'établissement des proportions relatives des oligonucléotides pyrimidiques provenant de l'hydrolyse partielle du DNA (DNA apurinique).

Les premiers travaux dans cette voie sont dus à COHN ET VOLKIN¹ puis CHARGAFF et ses collaborateurs²⁻⁷. SPENCER ET CHARGAFF⁴⁻⁵ ont obtenu des résultats importants par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose et chromatographie bidimensionnelle sur papier. HALL ET SINSHEIMER⁸ réalisèrent la séparation des oligonucléotides pyrimidiques selon la longueur des chaînes (isoplithes) par chromatographie sur colonne de DEAE Sephadex.

Dans un autre ordre d'idées, BURTON ET PETERSEN⁹⁻¹⁴ ont pu séparer de nombreux oligonucléotides pyrimidiques par chromatographie bidimensionnelle sur papier d'une part, ainsi que par la combinaison de la chromatographie et de l'électrophorèse sur papier d'autre part selon la méthode décrite originellement par RUSHIZSKY ET KNIGHT¹⁵ et appliquée par ces auteurs au fractionnement d'hydrolysats enzymatiques de RNA.

Des séparations par chromatographie sur plaque de dérivés d'acides nucléiques ont été réalisées par RANDEATH ET RANDEATH¹⁶⁻¹⁸ sur couches de celluloses substituées.

L'apparition récente sur le marché de couches de silice¹⁹ sur support inerte pour la chromatographie en couche mince, nous a incités à essayer ce matériel. Les résultats obtenus nous paraissent intéressants à rapporter. Nous avons pu ainsi obtenir la séparation d'une vingtaine de taches dont seize ont pu être identifiées par leur spectre dans l'ultra violet et d'après leurs positions respectives.

MATÉRIEL

Matériel pour chromatographie en couches minces

Nous avons utilisé des couches Kodak¹⁹ de gel de silice toutes préparées, pourvues d'un indicateur de fluorescence (Kodak ECS.K.301.R, dimensions 20 × 20 cm). La chromatographie s'est déroulée dans des cuves "sandwich" Kodak No. 1367.

Acide désoxyribonucléique

Nous avons utilisé plusieurs types de DNA, dont notamment un DNA de thymus de veau préparé selon la méthode de KAY, SIMMONS ET DOUNCE²⁰.

Phosphodiesterase

La phosphodiesterase de venin Worthington a été utilisée pour l'identification des deux dinucléotides isomères CpT et TpC.

MÉTHODES

Préparation du DNA apurinique

On a employé la méthode de BURTON ET PETERSEN¹⁰ à l'acide formique. Les purines ont été éliminées par chromatographie sur une colonne de Dowex AG 50 WX, 50-100 mesh¹⁰. Avant d'être utilisé, le Dowex a subi de nombreux cycles de lavages à la soude normale et à l'acide chlorhydrique normal jusqu'à ce que la densité optique du filtrat mesurée à 260 m μ soit inférieure à 0.010.

Déphosphorylation des oligonucléotides

Les groupements phosphorylés terminaux des oligonucléotides ont été ensuite éliminés par action de la phosphatase alcaline de *Escherichia coli* Worthington, selon HALL ET SINSHEIMER⁸. Cette déphosphorylation s'est montrée rigoureusement indispensable à la résolution ultérieure du mélange par chromatographie bidimensionnelle.

Désalification des nucléotides par traitement au charbon

Il s'agit d'un temps important et délicat. On a utilisé le charbon Charcoal 196, Barnebey Cheney Co., Columbus, Ohio. Avant d'être utilisé, le charbon est préparé selon les indications de COHN²¹. Dans un bécher le charbon est lavé très soigneusement avec de l'acide chlorhydrique normal trois fois en décantant les particules les plus fines. Puis on rince à l'eau jusqu'à neutralité du surnageant. Le charbon est ensuite désactivé par traitement avec du toluène à 1 % dans l'isopropanol contenant de l'ammoniaque à 50 %. On lave ensuite avec une solution d'alcool ammoniacal (H₂O-EtOH-NH₄OH conc., 2:2:1, v/v) et enfin on lave à l'eau.

Le charbon ainsi traité est introduit dans une microcolonne de diamètre 0.5 cm. A cet effet, on utilise environ 100 mg de charbon et 20 mg de Célite 535 pour une quantité de nucléotides correspondant à une absorption à 260 m μ de 14. Avant d'utiliser la microcolonne de charbon, on la lave abondamment avec la solution d'alcool ammoniacal pour abaisser la densité optique jusqu'à 0.010. On rince à l'eau puis à l'acide chlorhydrique normal et enfin à l'eau distillée jusqu'à neutralité. Le matériel est adsorbé sur la colonne à pH < 6 à très faible vitesse.

On lave par 100 ml d'eau distillée puis 200 ml d'ammoniaque millimolaire pour bien éliminer les sels minéraux et les impuretés. On élue au moyen d'une solution d'alcool ammoniacal (H₂O-EtOH-NH₄OH conc., 2:2:1, v/v). De 25 à 50 ml d'alcool ammoniacal sont nécessaires pour désorber tous les nucléotides.

L'éluat est concentré puis évaporé à sec dans un très petit récipient pour pouvoir le récupérer quantitativement avec facilité dans un très petit volume 10 μ l.

Chromatographie bidimensionnelle

On applique la solution d'oligonucléotides apuriniques à l'aide d'un capillaire à 2.7 cm du bord de deux côtés adjacents.

On peut mettre plusieurs prises de 2 μ l en prenant la précaution de sécher entre chaque prise et de faire une tache aussi petite que possible. La quantité de matériel doit correspondre à une absorption à 260 m μ d'environ 14.

Les solvants suivants sont utilisés:

1er sens. Isopropanol-eau distillée (75:25, v/v).

Le temps de développement est variable selon la température ambiante de 10 à 14 h en moyenne.

2ème sens. Alcool butylique primaire-acide acétique glacial-solution aqueuse de gaz ammoniac à 0.5 %-eau distillée (90:30:40; v/v/v).

Durée: 8 à 10 h. On fait migrer les solvants en utilisant toute la surface de la feuille.

Elution des taches

Les taches sont localisées avec une lampe à rayonnement ultra violet Chromatolux-Pleuger munie d'un filtre 258 m μ . On peut cerner les taches par un trait de crayon. Il est ensuite possible de les découper avec des ciseaux comme s'il s'agissait de papier. On élue chaque tache dans 2 ml d'acide chlorhydrique 0.03 M. Quatre heures d'élution à température ordinaire sont suffisantes pour avoir une récupération quantitative.

Les spectres sont beaucoup moins perturbés que par élution à partir de papier et on peut lire directement l'absorption contre une cuve témoin contenant une solution d'acide chlorhydrique 0.03 M.

Identification des oligonucléotides par spectrophotométrie

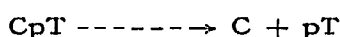
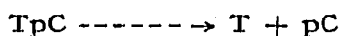
Les spectres ont été lus au spectrophotomètre Zeiss dans des microcuvettes en quartz. On en a également effectué l'enregistrement automatique au spectrophotomètre Cary.

Des mélanges artificiels de désoxycytidine et de thymidine ont servi d'étalons. Les rapports 280 m μ /260 m μ , les maximas, les positions relatives des taches ont servi de critères à l'identification des séquences.

Identification des deux isomères CpT et TpC (Fig. 2)

Les taches correspondant aux dinucléotides CpT et TpC sont éluées dans 2 ml d'eau distillée. On réunit les taches correspondant à la chromatographie de trois feuilles Kodak.

Les deux éluats sont évaporés à sec et repris dans une goutte d'eau ajustée à pH 8.6 avec de la soude normale. On incube 30 min à 37° avec 20 μ g de phosphodiesterase de venin Worthington en présence de traces de chlorure de magnésium 0.1 M. La phosphodiesterase de venin libère spécifiquement des nucléoside-5'-phosphates, ce qui donne pour les deux isomères:



Le dinucléotide TpC libère de la thymidine et de l'acide désoxycytidylique-5'-phosphate.

Le dinucléotide CpT isomère libère de la désoxycytidine et de l'acide thymidylique-5'-phosphate.

Les produits de la réaction sont isolés par chromatographie unidimensionnelle sur les mêmes couches de silice Kodak dans le système isopropanol-eau distillée (75:25).

RÉSULTATS

Ils sont présentés dans le Tableau I et les Fig. 1 et 2.

TABLEAU I

ANALYSE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE DIVERS OLIGONUCLÉOTIDES PYRIMIDIQUES

No.	Taches identifiées	<i>E</i> 280/ <i>E</i> 260		<i>Maxima</i>	
		Valeurs trouvées	Mélanges synthétiques	Valeurs trouvées	Mélanges synthétiques
1	T	0.70	0.69	267	267
2	TpT	0.69	0.69	267	267
3	TpTpT	0.70	0.69	265	267
4	TpTpTpT	0.77	0.69	268	267
5	TpTpTpTpT	0.64	0.69	267	267
6	C	1.90	2.10	279	280
7	TpC	1.16	1.25	274	274
8	CpT	1.14	1.25	274	274
9	p ² (C, T ₂)	1.04	1.07	271	270
10	p ³ (C, T ₃)	1.05	0.95	269	270
11	p ⁴ (C, T ₄)	0.88	0.90	267	269
12	p ⁵ (C, T ₅)	0.82	0.83	268	268
13	p ⁶ (C, T ₆)	0.73	0.84	265	268
14	CpC	2.05	2.10	278	280
15	p ² (C ₂ , T)	1.47	1.46	273	276
16	p ³ (C ₂ , T ₂)	1.33	1.28	275	274

DISCUSSION

Les avantages de la chromatographie en couche mince sur la chromatographie sur papier en ce qui concerne la séparation de mélanges d'oligonucléotides sont d'une façon générale ceux apportés par la chromatographie en couche mince:

Séparations nettes, taches arrondies, bien limitées, rendues extrêmement visibles par l'indicateur de fluorescence,

Excellente reproductibilité permettant l'identification des nucléotides par leur position. La supériorité sur le papier est ici considérable.

Simplicité: aucune préparation préalable de la couche n'est nécessaire.

Rapidité: (24 heures au total pour les deux dimensions au lieu de près d'une semaine).

Utilisation de très petits échantillons: la prise de départ correspond à 300 ou 400 μ g de DNA (au lieu d'au moins 2 mg sur papier).

Élution quantitative très facile.

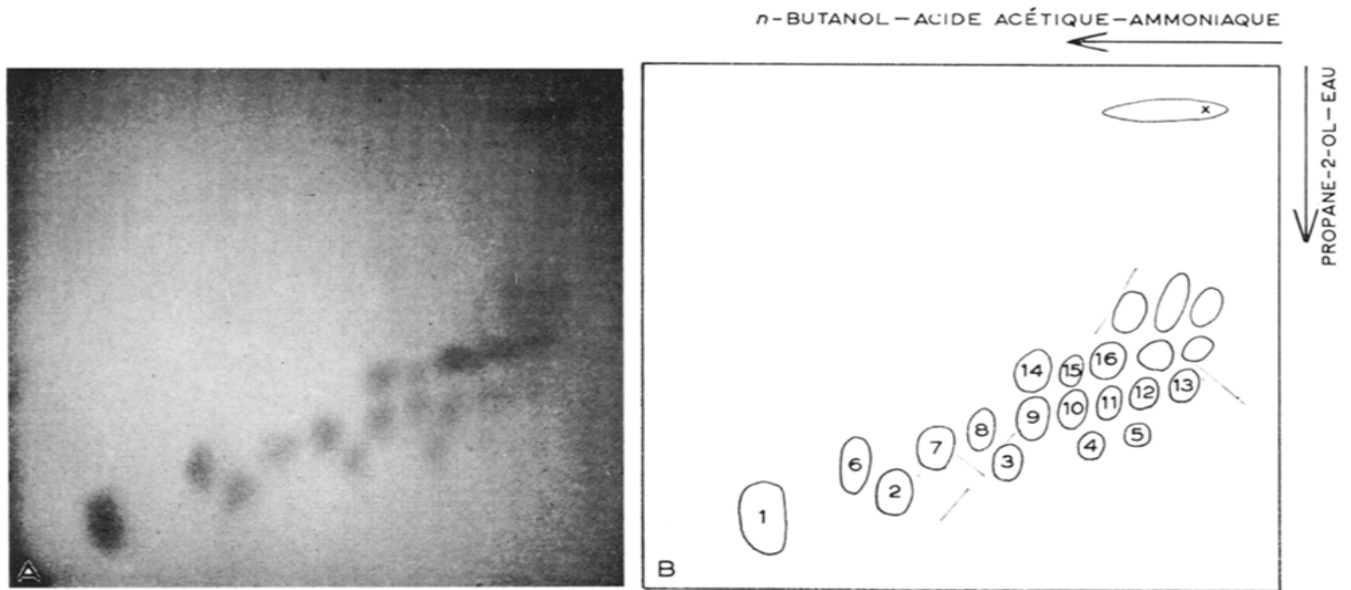


Fig. 1. Chromatographie bi-dimensionnelle sur couche de gel de silice des oligonucléotides pyrimidiques provenant de l'hydrolyse du DNA de thymus de veau. Solvants: (1°) propane-2-ol-eau (75:25, v/v); (2°) *n*-butanol-acide acétique-solution aqueuse de gaz ammoniac à 0,5% (90:30:40, v/v/v). Une prise de départ ayant une densité optique à 260 m μ de 14 a été appliquée au point de départ. En fin de résolution, les taches suivantes ont été identifiées (voir texte et Tableau I). Les numéros indiqués sur la Fig. 1B correspondent aux nucléosides et nucléotides décrits dans le Tableau I. Photographies prises par éclairage de la couche au moyen d'une lampe à rayons ultra-violetes munie d'un filtre à 258 m μ .

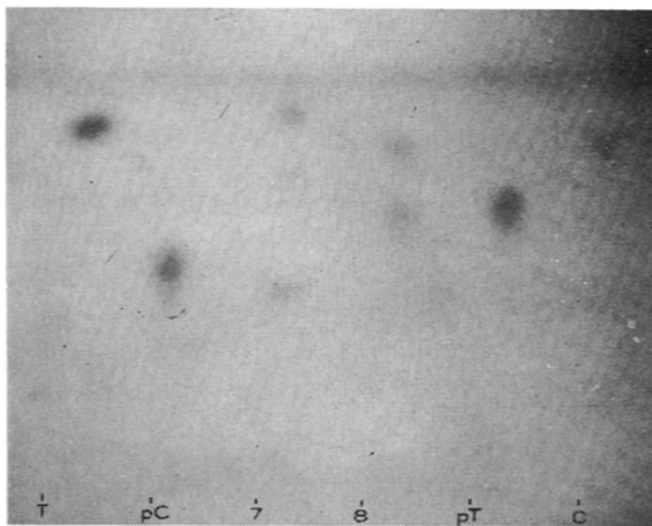


Fig. 2. Identification par chromatographie à une dimension sur couches de gel de silice des deux dinucléotides isomères CpT et TpC après leur hydrolyse par la phosphodiesterase de venin. De gauche à droite: T représente la thymidine; pC représente la désoxycytidine-5'-phosphate; pT représente la thymidine-5'-phosphate; C représente la désoxycytidine. La tache No. 7 fournit après hydrolyse pC + T, il s'agit donc de TpC. La tache No. 8 fournit après hydrolyse pT + C, il s'agit donc de CpT.

Aucune perturbation du spectre U.V. après élution. Cet avantage est particulièrement précieux pour l'identification et le dosage de nucléotides par spectrophotométrie.

La sensibilité de cette méthode rend cependant nécessaires certaines précautions, il est indispensable en particulier d'éliminer soigneusement les impuretés et les sels minéraux qui perturberaient la chromatographie et feraient traîner les taches. Ceci est obtenu commodément par le traitement au charbon.

Il est évidemment possible de travailler avec du DNA marqué par le phosphore ^{32}P . La radioactivité des taches peut être lue directement sur la plaque sans élution. La localisation des taches peut être faite par autoradiographie (à l'exception, bien entendu, des mononucléotides qui ont été déphosphorylés). On s'assure de cette façon de l'absence complète de radioactivité parasite provenant de substances phosphorées non nucléotidiques (expériences non encore publiées).

RESUMÉ

La séparation complète des oligonucléotides pyrimidiques correspondant à une prise de départ n'excédant pas 300 à 400 μg de DNA a pu être réalisée grâce à la chromatographie en couches minces bidimensionnelle sur couches de silice Kodak. De cette façon seize nucléotides ont été identifiés en utilisant la spectrophotométrie et les méthodes enzymatiques.

SUMMARY

An excellent resolution of the pyrimidine oligonucleotides corresponding to a sample not exceeding 300 to 400 μg of DNA, was achieved by means of two-dimensional thin-layer chromatography on commercially available Kodak silica gel sheets. In each experiment some sixteen nucleotides were identified by using spectrophotometry and enzymatic methods.¹

BIBLIOGRAPHIE

- 1 W. E. COHN ET E. VOLKIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 359.
- 2 H. S. SHAPIRO ET E. CHARGAFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 62.
- 3 H. S. SHAPIRO ET E. CHARGAFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 76 (1963) 1.
- 4 J. H. SPENCER ET E. CHARGAFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 68 (1963) 9.
- 5 J. H. SPENCER ET E. CHARGAFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 68 (1963) 18.
- 6 H. S. SHAPIRO ET E. CHARGAFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 91 (1964) 262.
- 7 H. S. SHAPIRO ET E. CHARGAFF, *Biochemistry*, 5 (1966) 9.
- 8 J. B. HALL ET R. L. SINSHEIMER, *J. Mol. Biol.*, 6 (1963) 115.
- 9 K. BURTON, *Biochem. J.*, 77 (1960) 547.
- 10 K. BURTON ET G. B. PETERSEN, *Biochem. J.*, 75 (1960) 17.
- 11 K. BURTON, M. R. LUNT, G. B. PETERSEN ET J. C. SIEBKE, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28 (1963) 27.
- 12 G. B. PETERSEN, *Biochem. J.*, 87 (1963) 495.
- 13 K. BURTON, *Essays Biochem.*, 1 (1965) 57.
- 14 G. B. PETERSEN ET J. M. REEVES, *Biochim. Biophys. Acta*, 129 (1966) 438.
- 15 G. W. RUSHIZSKY ET C. A. KNIGHT, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.*, 46 (1960) 945.
- 16 K. RANDEATH, *Thin-Layer Chromatography*, Verlag Chemie, Weinheim et Academic Press, New-York, 1963.
- 17 E. RANDEATH ET K. RANDEATH, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 126.
- 18 K. RANDEATH, *Experientia*, 20 (1964) 406.
- 19 *Catalogue Kodak*.
- 20 E. R. M. KAY, N. S. SIMMONS ET A. L. DOUNCE, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 1724.
- 21 W. E. COHN, communication personnelle.