

CHROM. 3349

RÉSOLUTION DES OLIGONUCLÉOTIDES DU DNA APURINIQUE MARQUÉ AU PHOSPHORE [³²P] PAR CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR COUCHES MINCES DE CELLULOSE

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 27 novembre 1967)

SUMMARY

Two-dimensional chromatographic resolution of [³²P] apurinic DNA oligonucleotides, on cellulose thin layers

The resolution of a mixture of pyrimidine oligonucleotides obtained by acidic hydrolysis of a DNA previously labelled with [³²P] in tissue culture was performed by two dimensional chromatography on commercially available cellulose thin layers. Sixteen nucleotides were identified and their amounts determined. This method does not require the elimination of terminal phosphoryl groups. Combined with a previously described method involving chromatography on silica gel thin layers, it permits the evaluation of 20 oligonucleotides from sheep embryo kidney apurinic DNA.

Dans un travail précédent¹ nous avons décrit la résolution rapide d'un mélange d'oligonucléotides pyrimidiques, résultant de l'hydrolyse partielle du DNA, au moyen de la chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice.

Cette méthode de séparation exige l'élimination préalable des groupements phosphoryles terminaux sous l'action de la phosphatase alcaline d'*Escherichia coli*. Il en est ainsi également dans la méthode de BURTON ET PETERSEN²⁻⁴ utilisant la chromatographie bidimensionnelle sur papier, ainsi que dans celle de HALL ET SINSHEIMER⁵ qui réalisent la séparation des nucléotides isoplithes sur colonne de DEAE Sephadex. Un court article de PETERSEN ET REEVES⁶ signale la possibilité d'obtenir une séparation d'isoplithes non déphosphorylés par chromatographie sur DEAE Séphadex en opérant l'éluion au moyen d'un très grand volume d'un gradient de NaCl en présence d'urée 7 M. Cependant ici encore on n'obtient que des mélanges d'isoplithes et leur résolution ultérieure pose les mêmes problèmes liés à l'existence des phosphoryles terminaux.

La déphosphorylation est surtout gênante lorsqu'on opère sur du DNA marqué par [³²P], puisqu'on perd une fraction importante de la radioactivité et donc de la précision des dosages, et surtout parce que les mononucléotides échappent à l'analyse quantitative.

Nous avons donc cherché à éviter cette déphosphorylation préalable. Malgré

* Adresse actuelle: Institut Pasteur, Service des Virus, 25, Rue du Docteur Roux, Paris (15^e).

bien des tentatives, les couches de silice ne nous ont pas permis d'aboutir parce qu'elles ne tolèrent pas les solvants aqueux. Nous avons par contre obtenu satisfaction en utilisant des couches minces de cellulose que l'on trouve depuis peu toutes préparées dans le commerce. Le présent travail décrit cette nouvelle méthode ainsi que les résultats que nous avons obtenus par la combinaison des deux techniques dans l'analyse du DNA de reins de fœtus de mouton marqués par [³²P] en culture cellulaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Culture des cellules et marquage du DNA

Les reins de fœtus de mouton prélevés à l'abattoir sont disséqués pour éliminer les parties fibreuses, hachés finement aux ciseaux et soumis à l'action d'une solution de trypsine Serpasteur à 0.20 p. 100 dans du PBS* de DULBECCO ET VOGT⁷ suivant les méthodes habituelles.

Les cellules ainsi obtenues sont mises en suspension à 1 p. 1000 (v/v) dans un milieu de culture comprenant 5 g de TC Lactalbumin Hydrolysate Difco, 1 g de TC Yeastolate Difco et 50 ml de sérum de veau préalablement inactivé à 56° pendant 30 min, dans Q.S.P. 1 l de soluté isotonique tamponné de EARLE⁸. La suspension cellulaire est répartie dans deux boîtes pour culture cellulaire de 3.500 l de capacité, du modèle en usage au service des Virus de l'Institut Pasteur, à raison de 0.500 l par boîte, et incubée à 37°.

Lorsque le 1/3 environ de la surface des boîtes est couvert par la nappe cellulaire (en moyenne après 48 h), le milieu est éliminé, la nappe lavée trois fois au PBS, et le milieu est remplacé par un volume égal de milieu frais de même composition sauf qu'il a été préparé avec du liquide de EARLE sans phosphore et que le sérum de veau qu'il contient a été dialysé au préalable 24 h contre du sérum salé isotonique pour en éliminer les phosphates. On ajoute à chaque boîte 2 millicuries de [³²P] neutre sans entraîneur (phosphate de sodium en solution isotonique stérile, 2 mC/ml, pH 7, provenant du Département des Radioéléments du C.E.A., Saclay).

Les cellules sont soumises à l'incubation à 37° jusqu'à ce que la nappe cellulaire soit continue (2 à 3 jours).

Le milieu est alors éliminé et la nappe cellulaire est lavée à plusieurs reprises au PBS. On introduit dans chaque flacon de culture 50 ml de solution à 0.02 p. 100 d'éthylène diamine tétraacétate (EDTA) dans du PBS privé de Ca²⁺ et Mg²⁺ et on reporte à 37° jusqu'à ce que la nappe cellulaire soit détachée du verre. Les cellules sont recueillies par centrifugation à faible vitesse et lavées à plusieurs reprises dans du PBS.

Isolement du DNA

Le DNA marqué est isolé selon la méthode de MARMUR⁹. On ajoute avant l'extraction 8 mg de DNA de thymus** de veau non marqué comme entraîneur.

Préparation du DNA apurinique

Nous avons suivi la méthode de BURTON ET PETERSEN²⁻⁴. Après hydrolyse du DNA par l'acide formique et la diphénylamine, les purines sont éliminées sur une colonne de Dowex 50 H⁺ et la désalification des nucléotides pyrimidiques s'effectue par traitement sur colonne de charbon, selon les indications précédemment publiées¹.

* PBS = "Phosphate buffered saline".

** DNA de thymus Worthington.

Chromatographie bidimensionnelle sur couches minces de cellulose

Nous avons utilisé des couches minces de cellulose du commerce prêtes à l'emploi, de dimensions 20×20 cm*.

On applique le solution de DNA apurinique avec un capillaire près d'un coin à 3 cm des côtés de la plaque. 500 μ g sont nécessaires pour obtenir une très bonne séparation des divers nucléotides tout en gardant la possibilité de les localiser au moyen d'une lampe à rayonnement ultra violet.

La chromatographie est pratiquée dans la cuve sandwich Kodak.

Les solvants utilisés sont:

Dans le premier sens: Propane-2-ol-acide chlorhydrique 0.2 N (50:50, v/v). Le temps de développement est d'environ 8 h.

Dans le deuxième sens: Sulfate d'ammonium saturé-propane-2-ol-eau distillée (79:2:19, v/v/v). 3 à 4 h permettent la migration du solvant sur toute la surface de la couche.

(Ce second solvant a été recommandé par PATAKI¹⁰.)

Chromatographie bidimensionnelle sur couches minces de gel de silice

Cette méthode exige la déphosphorylation préalable des nucléotides terminaux et a été décrite dans un travail précédent¹.

Lecture des radiochromatogrammes

Les taches, repérées sous une lampe à rayonnement ultraviolet *Chromatolux* Pleuger muni d'un filtre à 260 m μ , sont cernées par un trait de crayon. On les limite à l'aide d'un diaphragme fait de 4 pièces rectangulaires en acier inoxydable de 60 \times 30 \times 5 mm. Un compteur G.M. Philips 13.514, dont la fenêtre a un diamètre de 35 mm est posé sur l'ouverture ainsi ménagée et est raccordé à une échelle de comptage Philips PW 4.035. Ce dispositif très simple donne toute satisfaction et laisse les chromatogrammes intacts.

Autoradiographie des chromatogrammes

Elle est utile pour localiser très exactement les taches, plus particulièrement les taches faibles peu visibles en lumière U.V. en l'absence d'indicateur de fluorescence.

On met en contact dans une cassette la couche chromatographique et un film radiographique** pendant un temps variable selon la radioactivité des taches et l'intensité recherchée.

En pratique, le temps de pose doit être calculé pour fournir environ 10^6 coups par tache. Il peut être nécessaire d'utiliser des temps différents pour les taches faibles et pour les taches fortes.

Identification des taches

Les taches observées sous la lampe à rayonnement ultraviolet sont entourées d'un trait de crayon, découpées et éluées dans une solution d'acide chlorhydrique 0.03 N pendant 15 h à température du laboratoire. On centrifuge 10 min à 3,500 tours/min.

* Couches de cellulose Kodak No. 6.064 (sans indicateur de fluorescence).

** Films radiographiques Regulix Kodak.

La densité optique du surnageant est mesurée à 260 m μ et à 280 m μ au spectrophotomètre Zeiss PMQ II.

Calculs

Les activités mesurées pour chaque oligonucléotide sont, après décomptage du bruit de fond, transformées en quantités proportionnelles aux nombres de moles de pyrimidines par 100 atome-gramme de phosphore en les multipliant par $n/(n + 1)$ pour les expériences sans déphosphorylation et par $n/(n - 1)$ pour celles précédées de déphosphorylation, n étant le nombre de mononucléotides de l'oligonucléotide considéré. Cette correction est négligée pour les taches non identifiées ou d'identification incertaine, l'erreur ainsi commise étant négligeable, d'une part parce que $n \geq 5$ et d'autre part parce que la radioactivité totale de ces taches est faible.

On fait la somme des activités ainsi corrigées pour toutes les taches visibles sur les autoradiogrammes, y compris la tache de départ et on effectue les pourcentages par rapport à cette somme égalée à 50 p. 100, puisqu'il manque les purines.

Toutefois pour établir les pourcentages des expériences sur gel de silice on a identifié les valeurs de T_2 avec celles obtenues par la séparation sur couche de cellulose et calculé les pourcentages de tous les nucléotides par rapport à T_2 . Les résultats sont du reste identiques si on prend pour base la somme des taches identifiées à la fois dans les deux méthodes.

RÉSULTATS

Identification

Les résultats sont présentés dans le Tableau I où les rapports E 280/E 260 à pH

TABLEAU I
ANALYSE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE DIVERS OLIGONUCLÉOTIDES PYRIMIDIQUES

Taches identifiées	$\frac{E\ 280}{E\ 260}$ à pH 2.5	Mélanges étalons
$T_4P_5 + T_5P_6 + \dots^*$	0.69	0.69
T_3P_4	0.71	0.69
T_2P_3	0.69	0.69
TP_2	0.71	0.69
$CT_4P_6 + CT_3P_7 \dots^{**}$	0.89	0.88
CT_3P_5	0.97	0.95
CT_2P_4	1.04	1.07
CTP_3	1.23	1.25
Cp_2	2.10	2.10
$C_2T_3P_6 \dots$	1.11	1.20
$C_2T_2P_5$	1.20	1.25
C_2TP_4	1.42	1.46
C_2P_3	1.89	2.10
$C_3T_2P_6 + C_3T_3P_7$	1.21	1.25
C_3TP_5	1.57	1.65
C_3P_4	1.93	2.10
$C_4P_5^{***}$		2.10
$C_4TP_6^{***}$		1.75

* Cette tache est un mélange de T_4 et des oligonucléotides supérieurs T_n ($n > 4$).

** Cette tache est un mélange de CT_4 et des oligonucléotides supérieurs CT_n ($n > 4$).

*** Identification seulement probable.

2.5 des divers oligonucléotides sont comparés à ceux de mélanges étalons élués dans les mêmes conditions.

Les autoradiographies représentées sur les Fig. 1 et 2 permettent de comparer la séparation sur couche mince de cellulose à celle précédemment décrite¹ sur gel de silice. Dans celle-ci les mononucléotides ne sont pas visibles. Dans la première leur séparation et leur mise en évidence sont au contraire excellentes. En outre les nucléotides cytidyliques plus longs que C₂, situés dans une région étroite et compacte dans la méthode sur silice sont très bien isolés jusqu'à C₄ sur cellulose. Il en est de même pour C₂T, C₃T et même C₄T. Parmi les thymidyliques, T₂ et T₃ donnent les mêmes résultats

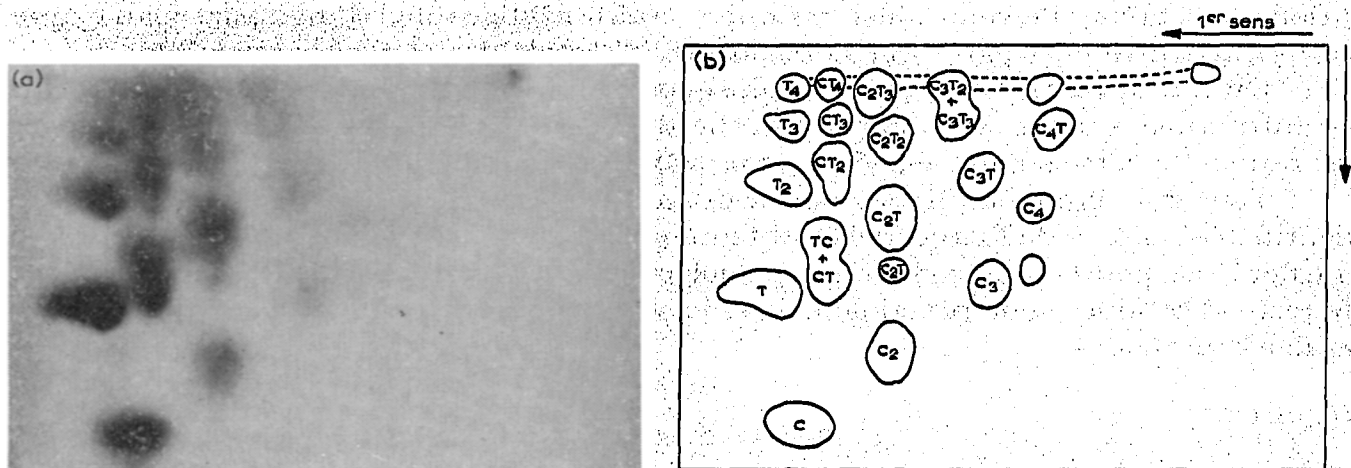


Fig. 1. Autoradiographie d'une chromatographie bidimensionnelle sur couche de cellulose des oligonucléotides pyrimidiques provenant de l'hydrolyse acide du DNA de mouton marqué par du phosphore [³²P]. Solvants: (1) Propane-2-ol-acide chlorhydrique 0.2 N (50:50, v/v); (2) Propane-2-ol-sulfate d'ammonium saturé-eau (2:79:19, v/v/v). Les taches sur la ligne horizontale supérieure sont en réalité des mélanges de nucléotides.

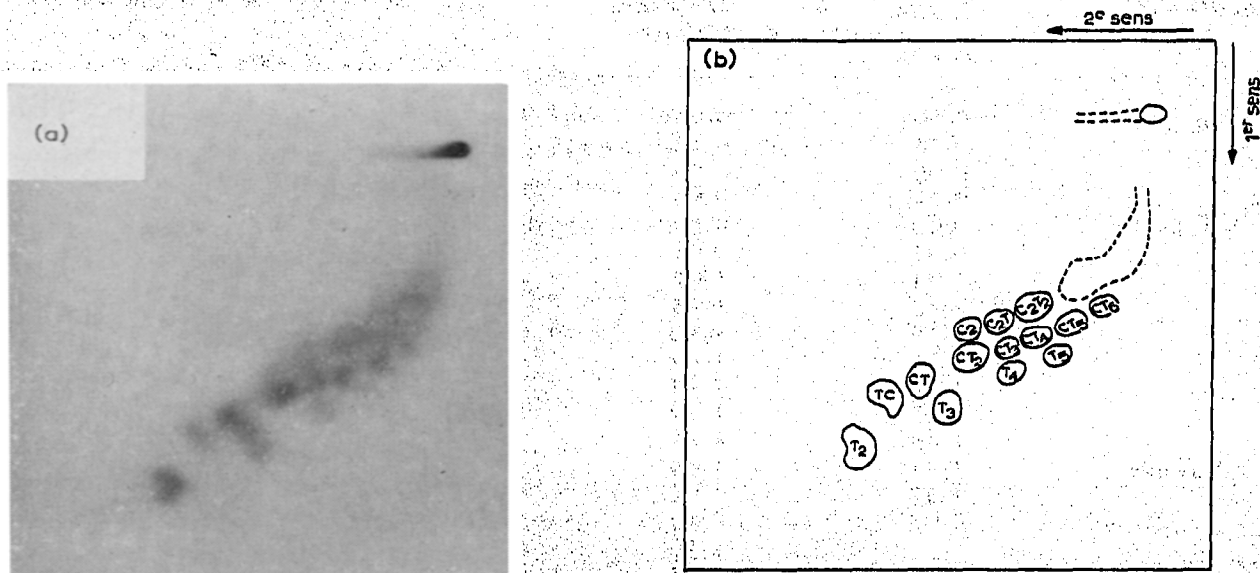


Fig. 2. Autoradiographie d'une chromatographie bidimensionnelle sur couche de gel de silice des oligonucléotides pyrimidiques provenant de l'hydrolyse acide du DNA de mouton marqué par du phosphore [³²P]. Solvants: (1) Propane-2-ol-eau (75:25, v/v); (2) N butanol-acide acétique-ammoniaque à 5 %-eau (90:30:20:20, v/v/v/v).

dans les deux méthodes. Par contre, T₄ et T₅ très bien séparés sur silice (qui à la rigueur donnerait même T₆) sont mélangés sur cellulose avec les T_n supérieurs. De même CT₄, CT₅ et CT₆ bien visibles sur silice sont confondus avec les CT_n supérieurs sur cellulose. Enfin, C₂T₃ et C₃T₃ sont indiscernables des nucléotides supérieurs C₂T_n et C₃T_n.

On voit que les deux méthodes se complètent et se contrôlent mutuellement et qu'elles permettent l'isolement et l'identification de 20 oligonucléotides comportant notamment tous les mono-, di-, tri- et tétranucléotides et 3 pentanucléotides sur cinq.

Analyse quantitative

Le Tableau II donne la composition du DNA apurinique de rein de fœtus de mouton marqué par [³²P] tel qu'il résulte de la combinaison des deux méthodes décrites plus haut. On peut y lire les pourcentages de 20 nucléotides représentant environ 84 p. 100 de l'ensemble des oligonucléotides pyrimidiques. Ces pourcentages ont été comparés à ceux que l'on pourrait attendre d'une distribution au hasard.

Les résultats obtenus sur gel de silice représentent la moyenne de six expériences, ceux obtenus sur cellulose la moyenne de trois expériences. Les déviations standards ont été inscrites à côté de chaque valeur. Dans ces conditions le test t de Student

TABLEAU II
COMPOSITION DU DNA APURINIQUE DE REIN DE FŒTUS DE MOUTON
(Moles de pyrimidines pour 100 atomes-grammes de phosphore du DNA)

Nucléotides	Sur gel de silice	Sur cellulose	Distribution au hasard*
C	—	4.68 ± 0.04	5.35
T	—	6.56 ± 0.12	7.07
T ₂	3.33 ± 0.14	3.33 ± 0.14	4.00
CT	3.92 ± 0.60	5.98 ± 0.23	3.02
TC	2.50 ± 0.32		3.02
C ₂	1.92 ± 0.59	1.69 ± 0.17	2.29
T ₃	2.05 ± 0.16	2.04 ± 0.02	1.70
CT ₂	3.54 ± 0.80	3.23 ± 0.22	3.85
C ₂ T ₂	2.64 ± 0.28	3.77 ± 0.06	2.92
C ₃	—	0.74 ± 0.09	0.76
T ₄	0.73 ± 0.09	—	0.64
CT ₃	1.56 ± 0.33	2.29 ± 0.35	1.94
C ₃ T ₁	—	1.18 ± 0.13	1.11
C ₂ T ₂	2.59 ± 0.57	2.63 ± 0.22	2.20
C ₄	—	0.42 ± 0.05	0.21
T ₅	0.27 ± 0.10	—	0.23
CT ₄	0.94 ± 0.14	—	0.86
C ₄ T	—	0.33 ± 0.02	0.39**
C ₂ T ₃ + C ₂ T ₄ ...	—	2.96 ± 0.5***	1.30
CT ₅	0.92 ± 0.20	—	0.35
C ₃ T ₂ + C ₃ T ₃ ...	—	1.91 ± 0.14***	0.68**
CT ₆	0.37 ± 0.15	—	0.14**

* Valeurs de BURTON ET PETERSEN³⁻⁴ pour le DNA de thymus de veau dont la composition en bases n'est pas significativement différente de celle du DNA de mouton (CHARGAFF ET DAVIDSON¹⁵).

** Valeurs calculées par la formule:

$$C_p T_{n-p} = \frac{n}{4} \frac{n!}{p!(n-p)!} c^p t^{n-p}$$

c et t = fractions molaires de C et T dans le DNA.

*** C₂T₃ et C₃T₂ sont probablement des mélanges de nucléotides.

montre que seules les répartitions de C, T, T₂, C₂T, C₄ et CT₅ sont significativement différentes de la répartition la plus probable, en admettant un intervalle de confiance 95 p. 100. Pour C₂ la probabilité de distribution aléatoire est inférieure à 1 p. 100. C, T et T₂ sont en défaut par rapport à la répartition la plus probable alors que C₂T, C₄ et CT₅ sont en excès.

Les activités totales observées sur une plaque ont été dans la méthode avec déphosphorylation de 50,000 à 100,000 c.p.m. et dans la méthode sans déphosphorylation de 100,000 à 150,000 c.p.m.

Les taches les plus radioactives ont fourni plus de 10⁶ c.p.m. et les plus faibles environ 10² c.p.m.

DISCUSSION

Dans cet article essentiellement méthodologique nous ne ferons pas l'étude critique des résultats obtenus, qui seront l'objet d'une analyse statistique complète dans un travail ultérieur. Notons seulement que le DNA de rein de fœtus d'agneau comme celui de thymus de veau étudié par BURTON ET PETERSEN²⁻⁴ et par SPENCER ET CHARGAFF¹¹⁻¹³ montre une tendance à former des séquences pyrimidiques, et par suite puriques, plus longues que celles attendues dans le cas d'une distribution strictement aléatoire. En outre, le rapport CT/TC toujours significativement supérieur à 1 (moyenne 1.59; déviation standard ± 0.08) indique avec évidence une répartition non aléatoire. Il semble pourtant à première vue que la distribution des nucléotides dans ce DNA soit, dans l'ensemble, plus proche de la répartition la plus probable que celle de thymus de veau. Un nombre plus grand d'expériences est nécessaire pour l'affirmer et il n'est pas douteux que l'on puisse notablement réduire les fluctuations expérimentales.

A bien des égards le marquage par [³²P] qui évite l'élution nous paraît avantageux. Les composés cytidyliques notamment s'éluent plus difficilement que les thymidyliques de la cellulose. L'élution est par contre rapide et quantitative à partir des plaques de silice.

Mais le grand avantage de l'emploi de [³²P] est le marquage du DNA des virus qui se multiplient dans le système cellulaire intéressé. Nous avons notamment appliqué cette méthode à l'analyse du DNA du virus de l'herpès en culture cellulaire de reins de fœtus de mouton (sous presse).

Une variante intéressante consiste à marquer le DNA après chromatographie directement sur la plaque par activation neutronique (RUSHIZKY ET MILLER¹⁴, MURRAY ET OFFORD¹⁶). De très petites quantités de DNA peuvent alors être utilisées mais on peut évidemment pas ajouter d'entraîneur.

RÉSUMÉ

La résolution d'un mélange d'oligonucléotides pyrimidiques provenant de l'hydrolyse acide du DNA marqué par [³²P] en culture cellulaire a été réalisée par chromatographie bi-dimensionnelle sur couches minces de cellulose. Seize nucléotides ont été identifiés et dosés. Cette méthode n'exige pas l'élimination préalable des groupements phosphoryles terminaux. Associée à une méthode précédemment publiée, utilisant des couches de gel de silice, elle a permis le dosage de 20 oligonucléotides pyrimidiques du DNA de rein de fœtus de mouton.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 D. LANDO, J. DE RUDDER ET M. PRIVAT DE GARILHE, *J. Chromatog.*, 30 (1967) 143.
- 2 K. BURTON, *Biochem. J.*, 77 (1960) 547.
- 3 K. BURTON ET G. B. PETERSEN, *Biochem. J.*, 75 (1960) 17.
- 4 G. B. PETERSEN, *Biochem. J.*, 87 (1963) 495.
- 5 J. B. HALL ET R. L. SINSHEIMER, *J. Mol. Biol.*, 6 (1963) 115.
- 6 G. B. PETERSEN ET J. M. REEVES, *Biochim. Biophys. Acta*, 129 (1966) 438.
- 7 R. DULBECCO ET M. VOGT, *J. Exptl. Med.*, 99 (1954) 167.
- 8 W. R. EARLE ET E. L. SCHILLING, *J. Natl. Cancer Inst.*, 4 (1943) 165.
- 9 J. MARMUR, *J. Mol. Biol.*, 3 (1961) 208.
- 10 G. PATAKI, *J. Chromatog.*, 29 (1967) 126.
- 11 J. H. SPENCER ET E. CHARGAFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 68 (1963) 9.
- 12 J. H. SPENCER ET E. CHARGAFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 68 (1963) 18.
- 13 H. S. SHAPIRO ET E. CHARGAFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 91 (1964) 262.
- 14 G. W. RUSHIZSKY ET W. W. MILLER, *Anal. Biochem.*, 20 (1967) 181.
- 15 E. CHARGAFF ET J. N. DAVIDSON, *The Nucleic Acids*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1955, p. 356.
- 16 K. MURRAY ET R. E. OFFORD, *Nature*, 211 (1966) 376.

J. Chromatog., 34 (1968) 202-209