

CHROM. 6619

## Note

### Séparation des nucléosides-3'-monophosphates sur couche mince d'échangeur d'ions

La séparation des mononucléotides par chromatographie sur couche mince de polyéthylènimine-cellulose (PEI-cellulose) a fait l'objet de nombreux travaux. La technique de chromatographie monodimensionnelle proposée par RANDEATH ET RANDEATH<sup>1</sup> et les méthodes bidimensionnelles décrites<sup>2-5</sup> pour la séparation des mononucléotides-3' ont été mises au point sur des couches minces de PEI-cellulose préparées en laboratoire<sup>6</sup>.

Avec les systèmes d'éluion précédemment décrits, il ne nous a pas été possible de séparer les quatre constituants majeurs des RNA sur les échangeurs d'ions commerciaux. La technique présentée dans cette note décrit la séparation des ribonucléotides en une seule dimension sur des couches minces de PEI-cellulose commerciales.

#### Matériel

Les cuves à chromatographie Gelman et les couches minces de PEI-cellulose sur support d'aluminium sont vendues par Brinkman Instruments Ltd., Toronto. Les couches ont une épaisseur de 0.1 mm et renferment un indicateur fluorescent. Elles sont conservées à - 20°\*.

#### Technique chromatographique

Les dépôts des quatre ribonucléotides en solution aqueuse sont effectués à 2.5 cm du bord de la plaque par fraction de 0.2  $\mu$ l à l'aide d'une microsiringue Hamilton et séchés sous courant d'air froid. La couche mince est introduite, avec une languette de papier Whatman No. 1 à son origine, dans la cuve chromatographique préalablement tapissée de papier imprégné de solvant. Après 30 min, le solvant est ajouté par une ouverture située dans le couvercle jusqu'à ce qu'il atteigne le papier. Trois solvants chromatographiques ont été utilisés:

(A) formiate d'ammonium 0.45 M, pH 2.6 - *tert.*-butyl alcool - isoamyl alcool (96:2:2);

(B) formiate d'ammonium 1.5 M, pH 3.6 - *tert.*-butyl alcool - *tert.*-amyl alcool (96:1:3);

(C) formiate d'ammonium 2.5 M, pH 3.6 - *tert.*-butyl alcool (50:50).

Lorsque le solvant a atteint le sommet de la plaque, celle-ci est séchée sous courant d'air froid.

L'emplacement des nucléotides est repéré à l'aide d'une lampe ultraviolette dont le maximum d'émission est à 254 nm.

#### Hydrolyse enzymatique des tRNA

Un échantillon de 5 à 15  $\mu$ g de tRNA est incubé dans 15  $\mu$ l de solution 0.05 M

\* Nous avons noté une altération des propriétés séparatrices de ces plaques au cours du temps.

d'acétate d'ammonium de pH 4.5 contenant 2 unités/ml de ribonucléase  $T_2$  et 0.05 mg/ml de ribonucléases A et  $T_1$ . L'hydrolyse s'effectue dans un tube capillaire à 37° pendant 2 h (ref. 7).

### Résultats et discussion

Les solvants A et B permettent la séparation des quatre ribonucléotides en 2 h (Fig. 1). L'ordre d'élué, exprimé par les valeurs de  $R_F$  décroissantes (Tableau I)

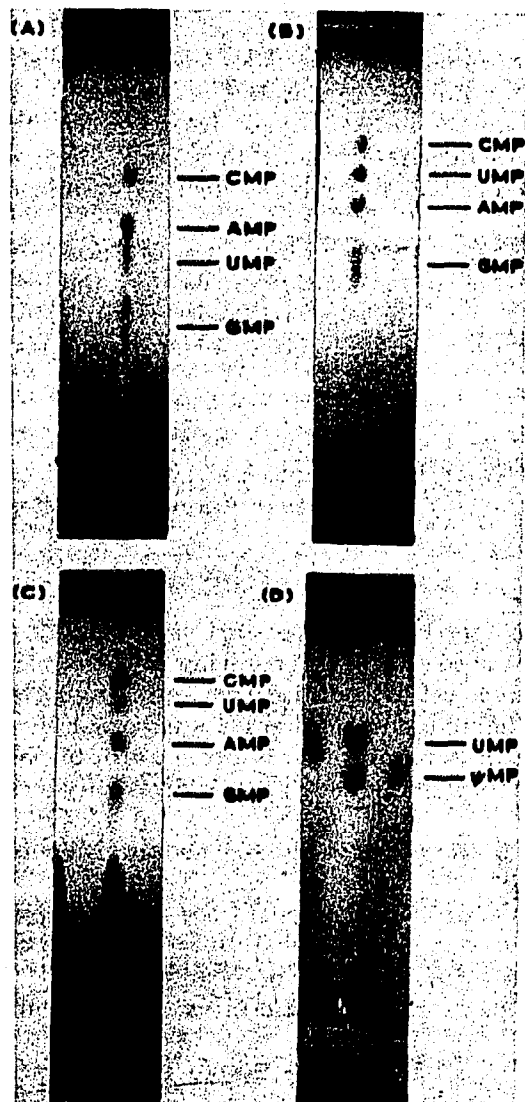


Fig. 1. (A) Chromatographie d'un mélange des quatre ribonucléotides-3' par le solvant A. (B) Chromatographie d'un mélange des quatre ribonucléotides-3' par le solvant B. (C) Chromatographie d'un hydrolysate enzymatique de 10 µg de  $tRNA_{F}^{Mot}$  d'*Anacyctis nidulans* par le solvant B. (D) Chromatographie d'un mélange de  $\psi MP$  et UMP par le solvant C. Les chromatogrammes ont été photographiés en lumière incidente ultraviolette.

est CMP, AMP, UMP, GMP (solvant A) et CMP, UMP, AMP, GMP (solvant B)\*.

Cette technique est applicable à la séparation des nucléosides-3'-monophosphates, produits par l'hydrolyse des RNA par la ribonucléase T<sub>2</sub>. La chromatographie d'un hydrolysats du tRNA<sup>Met</sup> d'*Anacystis nidulans* est illustrée par la Fig. 1.

TABLEAU I

VALEURS DES R<sub>F</sub> DES NUCLÉOTIDES DANS LES TROIS SYSTÈMES DE SOLVANT

Nucléotides	Valeur des R <sub>F</sub>		
	Solvant A	Solvant B	Solvant C
3'-CMP	0.68	0.76	—
3'-UMP	0.46	0.70	0.72
3'-AMP	0.56	0.62	—
3'-GMP	0.30 <sup>a</sup>	0.48	—
3'-ψMP	0.46	0.71	0.63

<sup>a</sup> Tache chromatographique allongée.

Nous avons étudié également le comportement du nucléotide modifié, ψMP, présent dans les tRNA. UMP et ψMP ne sont pas résolus dans les systèmes chromatographiques A et B. La séparation des deux nucléotides est obtenue avec le solvant C en 12 h (Fig. 1 et Tableau I).

La technique que nous décrivons offre les avantages suivants: (1) les couches minces commerciales de PEI-cellulose sont utilisées; (2) la séparation s'applique aux nucléosides-3'-phosphates produits par l'hydrolyse enzymatique des RNA; (3) la chromatographie est effectuée en une seule dimension, donc plusieurs échantillons peuvent être analysés simultanément; et (4) la méthode est très sensible et permet de déceler 0.2 μg d'un nucléotide après chromatographie, en lumière ultraviolette.

Département de Biochimie,  
Université de Montréal,  
Case Postale 6128,  
Montréal 101, Québec (Canada)

BRIGITTE ECAROT  
R. J. CEDERGREN

- 1 K. RANDEATH ET E. RANDEATH, *Anal. Biochem.*, 13 (1965) 575.
- 2 H. RAAEN ET F. E. KRAUS, *J. Chromatogr.*, 35 (1968) 531.
- 3 G. SANTINI ET V. ULRICH, *J. Chromatogr.*, 49 (1970) 560.
- 4 E. RANDEATH ET K. RANDEATH, *J. Chromatogr.*, 16 (1964) 126.
- 5 K. RANDEATH, *Experientia*, 20 (1964) 406.
- 6 K. RANDEATH ET E. RANDEATH, *J. Chromatogr.*, 22 (1966) 110.
- 7 B. G. BARRELL, dans G. L. CANTONI ET D. R. DAVIES (Editeurs), *Procedures in Nucleic Acid Research*, Vol. 2, Harper et Row, New York, 1971, p. 751.

Reçu le 22 décembre 1972

\* Les abréviations utilisées sont: CMP = cytidine-3'-phosphate; AMP = adénosine-3'-phosphate; UMP = uridine-3'-phosphate; GMP = guanosine-3'-phosphate; ψMP = pseudouridine-3'-phosphate.