

CHROM. 15,024

Note

Séparation des principaux nucléotides puriques et de quelques analogues de synthèse par une chromatographie simple, sur une résine échangeuse d'anions

CLAUDE WODON

Laboratoire de Biochimie et de la Nutrition, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, Bld. de Waterloo 115, 1000 Bruxelles (Belgique)

(Reçu le 10 mai 1982)

De très nombreuses techniques de séparation des nucléotides, ont été décrites depuis quelques années¹⁻⁵.

Récemment, Hsu et Chen⁶ ont publié dans ce journal une technique qui permet de séparer les AMP, cAMP, ADP, ATP; nous utilisons depuis plus d'un an une technique analogue qui sépare bien d'autres nucléotides; et même des analogues de synthèse des nucléotides dont l'usage en biologie moléculaire se répand de plus en plus.

Notre technique, d'une méthodologie très facile, élimine la dérive de la ligne de base, ne nécessite pas l'utilisation de pression élevée, ni de changement de température, elle utilise un éluant volatil et non organique et est très rapide. Ces qualités la rend compétitive avec les dernières techniques parues^{7,8}.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

La plupart des nucléotides proviennent de chez Boehringer (Mannheim, B.R.D.); l'ATP de chez Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). Le GDP (S) est un don généreux de F. Eckstein (Mzx Planck Institut für Experimentelle Medizin).

La résine est de l'Aminex A-25 (Bio-Rad Labs., Richmond, CA, U.S.A.), taille des particules $17.5 \pm 2 \mu\text{m}$ (copolymère de styrène et divinylbenzène à 8% de liaison). Cette résine s'utilise normalement en chromatographie liquide à haute performance, mais nous donne de bons résultats à une pression raisonnable de (± 100 p.s.i.) pour une hauteur de colonne de 9 cm.

La colonne est un tube en Pyrex de diamètre intérieur 0.6 cm entouré d'un manchon chauffant. A la base de la colonne est introduit un petit bouchon, traversé par un fin tube de PTFE (diamètre inférieur à 1 mm) qui sera le plus court possible (± 30 cm) afin que l'éluat sortant de la colonne passe devant le détecteur à UV le plus rapidement possible. Sur le bouchon est déposé une ou deux rondelles de tissu de nylon. L'écoulement étant obturé et la colonne contenant 1 à 2 cm d'HCl 0.5 M, elle sera remplie avec une suspension de résine (dans HCl 0.5 M) que l'on laisse déposer pendant environ 30 min avant d'ouvrir l'écoulement et d'imposer la pression avec la pompe.

La résine a été traitée 20 min par un mélange d'un volume d'HCl concentré et de 2 volumes d'éthanol, selon la méthode de Khym⁹. La pompe contiendra de l'HCl \pm 0.5 M.

Avant de faire le premier chromatogramme, on fera passer au travers de la colonne un gradient complet.

Éluant

Les éluants sont réalisés par dilution d'HCl concentré (densité 1.19); soit un gradient en HCl de 0 à 0.2 M. La colonne est régénérée par de l'HCl 0.2 M puis de l'eau distillée pendant 15 min avant la mise de l'échantillon. Si la colonne n'a pas été utilisée pendant un certain temps avant de la régénérer, il est bon de faire passer de l'HCl 0.5 M pendant 5 à 10 min à travers la colonne.

Après que l'échantillon a pénétré dans la colonne, le dessus de la colonne est rempli d'eau distillée.

Le bouchon de la colonne est traversé par un très fin tube de PTFE qui amène l'éluant juste au-dessus (1 à 3 mm) de la surface de la résine, ce qui élimine un volume mort et une deuxième chambre de mélange. Au début du chromatogramme, la pompe et les tubes (PTFE diamètre intérieur \pm 1 mm, longueur \pm 150 cm) qui mènent du gradient à la résine, sont pleins d'eau distillée. Un gradient convexe est obtenu en utilisant un flacon mélangeur de volume constant de 60 ml d'eau. Différents gradients ont été utilisés afin d'avoir la meilleure séparation des nucléotides étudiés ou la plus rapide (voir Fig. 1 et 2).

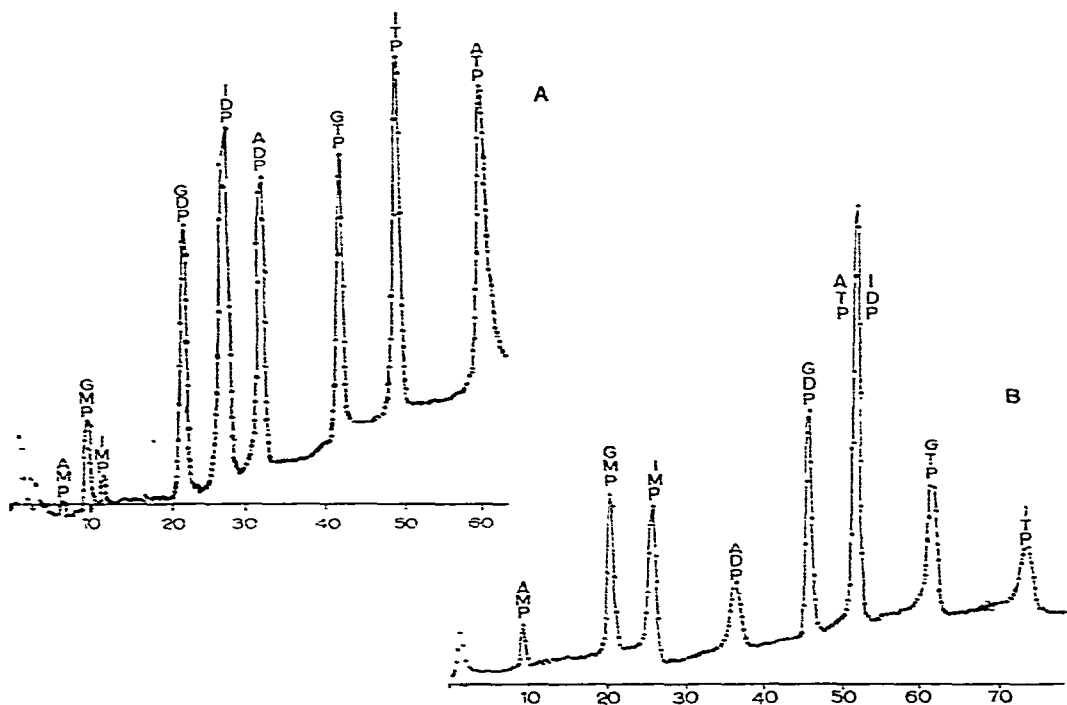


Fig. 1.

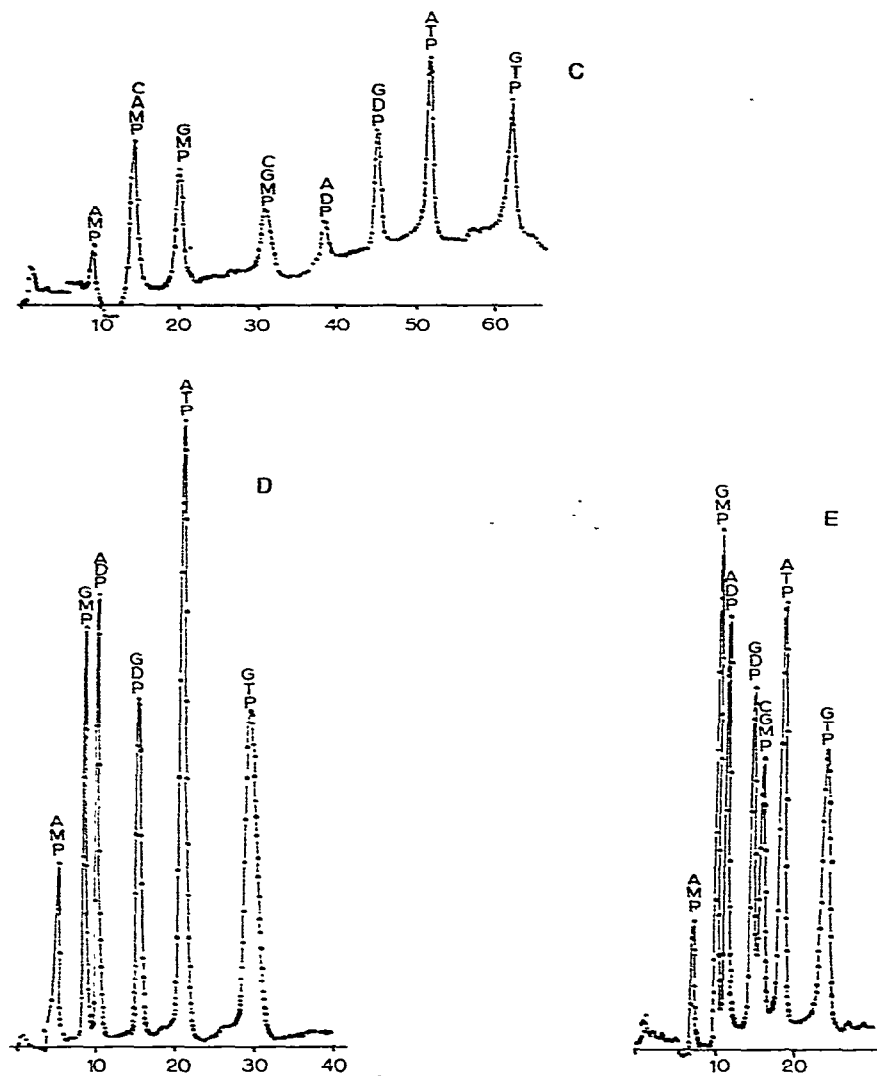


Fig. 1. Séparations obtenues à 70°C. Le débit de l'éluant est de 125 ml à l'heure, la pression passe de ± 120 p.s.i. au début du chromatogramme à ± 60 p.s.i. à la fin. En modifiant le volume initial du gradient (V_0) qui est de l'eau, la dilution de la solution concentrée (HCl concentré, $d = 1.19$) et le temps pendant lequel chacune de ces solution est aspirée vers le flacon mélangeur, on obtient des séparations différentes. Les conditions de chromatographie sont les mêmes en A et en B; la seule différence est que en A la colonne a été traitée entre deux chromatographies par H_2O 5 min; NH_4Cl 0.1 M (additionné de NH_4OH pour que le pH soit entre 7 et 8) pendant 10 min; puis encore pendant 10' par H_2O avant de placer l'échantillon qui sera aussi amené à pH entre 7 et 8 par NH_4OH .

	$V_0 (H_2O)$	Dilution HCl concentré	Durée	Dilution HCl concentré	Durée
A-B-C	100 ml	HCl/200	0 min \rightarrow 30 min	HCl/50	30 min \rightarrow fin
D	50 ml	HCl/50	0 min \rightarrow fin		
E	30 ml	HCl/200	0 min \rightarrow 4 min	HCl/50	4 min \rightarrow fin

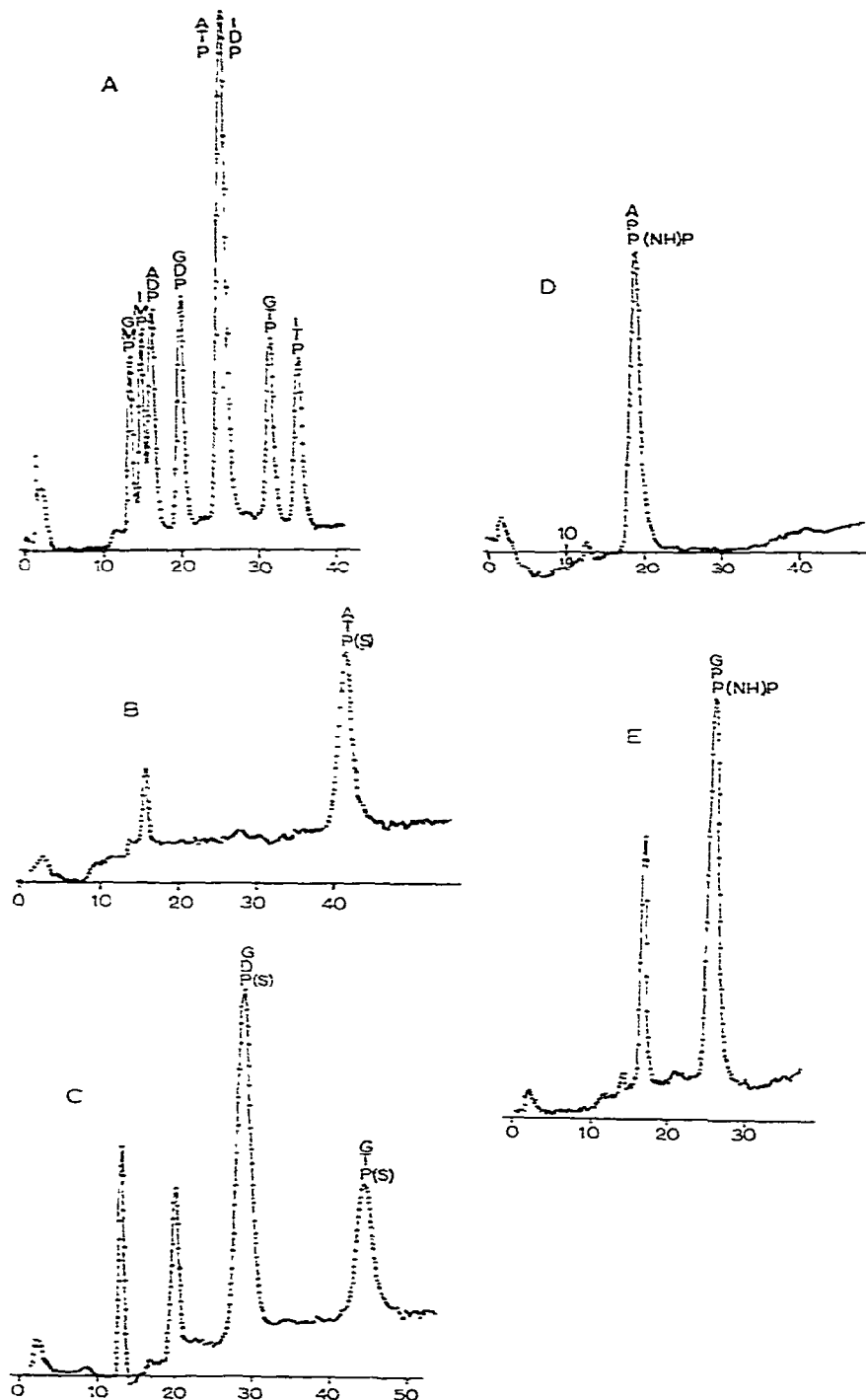


Fig. 2. Séparation d'analogues de nucléotides sur la même colonne que pour la Fig. 1 mais à 26°C. Le volume initial d'eau est 60 ml qui recevra pendant 5 min de l'HCl concentré dilué 200 fois puis pendant 27 min de l'HCl concentré dilué 50 fois puis jusqu'à la fin de l'HCl concentré dilué 20 fois. L'échantillon contient AMP-GMP-IMP-ADP-GDP-ATP-IDP-GTP-ITP (A), ATP(S) (B), GDP(S) et du GTP(S) (C), P(NH)PPA (D), P(NH)PPP (E).

Détection et quantification

La détection se fait par absorption dans UV. Nous avons utilisé un Uvikord (type 4701 A; LKB, Stockholm, Suède) absorption à 2537 Å. La quantification se fait par triangulation dont la précision est améliorée par l'utilisation d'un enregistreur à points (Honeywell, Minneapolis, MN, U.S.A.; un point toutes les deux secondes et un papier qui se déroule à 6 inches à l'heure) ce qui permet une très bonne mesure de la largeur à demi hauteur de ces pics qui sont très étroits.

RÉSULTATS

La pression faible (60 à 100 p.s.i. due à l'acidité de l'éluant ne nécessite pas une installation spéciale. De plus, cet éluant (HCl) supprime presque complètement la dérive de la ligne de base.

Chaque nucléotide étant élué dans un petit volume d'éluant volatil, le nucléotide peut être récupéré pour un usage ultérieur, par exemple identification.

L'éluat peut, au sortir du photomètre, être dirigé vers une fractionneuse; chaque fraction étant alors additionnée de liquide scintillant et comptée pour la radioactivité (nous avons récolté directement dans des pots Packard, sur une fractionneuse Technicon, en faisant des fractions de 1 min). Si l'on désire une séparation totale de tous les nucléotides et que la durée du chromatogramme importe peu, on choisira une méthode lente (Fig. 1A). Le chromatogramme et la régénération de la colonne prend 2 h. L'adénine est séparée de l'adénosine mais sont presque superposées respectivement à la guanine et à la guanosine et elles sont éluées pendant les cinq premières minutes.

Si la séparation de l'IDP et de l'ATP n'est pas nécessaire, une grosse heure suffira (Fig. 1B); et l'on aura une belle séparation des nucléotides cycliques (Fig. 1C).

Si on veut séparer exclusivement les dérivés de l'adénosine et de la guanosine en une demi-heure le résultat sera atteint et la quantification sera beaucoup plus facile que dans les chromatogrammes longs; en effet, dans les chromatogrammes qui prennent une demi-heure, la durée de sortie des pics varie entre une minute au début du chromatogramme à 3 min à la fin; ce qui fait en volume 2 ml pour les pics du début et 6 ml pour le GTP. La Fig. 2A montre la séparation des nucléotides naturels, le chromatogramme étant fait à 26°C pour éviter la destruction des analogues de synthèses. La Fig. 2B à 2E permet d'identifier, par comparaison avec la Fig. 2A, l'identité des contaminants trouvés lors de la chromatographie d'analogues de synthèse.

L'identification des "contaminants" des Fig. 2D et 2E sera étudiée lors de la discussion.

DISCUSSION

Les analogues de nucléotides étant beaucoup utilisés, nous nous sommes attachés à rechercher leur degré de pureté. En effet, bien souvent, une impureté en quantité infime, peut conduire à des conclusions erronées. Heureusement, notre colonne peut supporter une assez grande quantité d'un analogue ce qui permet d'apprécier la présence d'une petite quantité d'impureté (par exemple de GTP); il faudra cependant choisir le gradient qui sépare suffisamment le petit pic d'impureté de l'énorme masse du pic principal. Même les nucléotides naturels en solution aqueuse, même au freezer,

se dégradent à la longue; une solution de GDP finira par ne plus contenir que du GMP. Khym⁹ a étudié l'insensibilité relative des nucléotides naturels à une température de 70°C pendant 2 h. Les analogues de synthèse sont eux très sensibles, même à des températures peu élevées, comme 37 ou 45°C. Johnson et Welden¹⁰ indiquent dans leurs notes la dégradation non enzymatique des nucléotides imidés. Les analogues chromatographiés donnent rarement un seul pic, et la proportion des pics de "dégradation" va rapidement croissant.

p(NH)ppG maintenu 2 h à 37°C (dans l'eau ou dans un tampon citrate 0.2 M, pH 4.25) perd environ 25% au profit d'un pic qui élué avant le GDP, et qui est plus que probablement (NH₂)ppG; à 45°C il perd près de 70%. Du (NH₂)ppG synthétisé par Boehringer élué au même endroit dans nos conditions. Penningroth *et al.*¹¹ signalent entre autre contaminant dans du P(NH)ppA 10% de (NH₂)ppA.

Maintenu à 25°C pendant 2 h, la proportion relative des pics est la même que si le chromatogramme est fait immédiatement après la sortie de la solution du freezer. Nous avons donc tenté, pour la séparation des analogues, de faire une chromatographie à 25°C. Quoique la pression soit évidemment plus élevée, c'est parfaitement réalisable à condition de diminuer le cas échéant le débit et de se contenter de pics plus larges.

Les dérivés soufrés semblent stables; le GDP (S) chromatographié à 70°C ne montre qu'un seul pic.

En travaillant à 26°C et en modifiant un peu le gradient (Fig. 2), la séparation des GDP(S) GTP(S) et ATP(S) est bonne. Elle permettra de déceler de petites quantités d'impureté telle que GTP dans ATP(S). On trouvera toujours dans les solutions d'ATP(S) de l'ADP et un peu d'AMP et de l'adénosine.

Les dérivés imidés sont beaucoup plus fragiles, ils perdent très vite le troisième phosphore. Ce qui fait que, sur un chromatogramme de "P(NH)PPA" on identifiera un pic de P(NH)PPA, un petit pic qui est probablement du (NH₂)PPA et un pic à 2 min qui est de l'adénosine. Ce dernier pic devenant très grand si la solution (dans l'eau) du P(NH)PPA est restée 1 h à 30°C! Il en est de même pour le P(NH)PPG. Ces pics de "décomposition" apparaissent, que l'on élué la colonne avec du citrate, du chlorure d'ammonium ou de l'HCl.

La "décomposition" n'est pas due à l'absorption sur la résine car une même solution placée immédiatement sur colonne aura de beaucoup plus petits pics de "décomposition" que si cette même solution reste sur la table une heure avant d'être chromatographiée.

CONCLUSIONS

La méthode décrite est simple, rapide et très maniable. Grâce à cet éluant (HCl) la dérive de la ligne de base est très faible; de plus son acidité induit une pression basse. Par cette chromatographie il est possible (en 30 min et une seule étape) de suivre les modifications de proportion de chaque nucléotide dans un milieu d'incubation.

Comme il est indispensable pour certaines recherches que l'on soit sûr de l'absence de contaminants des nucléotides de synthèse et que l'on puisse exclure la possibilité de formation de dérivés au cours des manipulations nous avons vérifié la résolution de nos chromatogrammes.

La détermination de la présence de petites quantités de contaminants peut être faite facilement et rapidement soit dans les produits commerciaux, soit dans ceux formés lors de l'incubation ou de la conservation de nucléotides naturels ou de synthèses. La décomposition des analogues de nucléotides étant inévitable, il y a lieu de rechercher les "impuretés" et de penser à leurs effets propres.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. A. Hartwick et P. R. Brown, *J. Chromatogr.*, 112 (1975) 651.
- 2 J. X. Khym, J. W. Bynum et E. Volkin, *Anal. Biochem.*, 77 (1977) 446.
- 3 J. X. Khym, *J. Chromatogr.*, 151 (1978) 421.
- 4 B. Bakay, E. Nissinen et L. Sweetman, *Anal. Biochem.*, 86 (1978) 65.
- 5 J. T. Axelson, J. W. Bedley et T. F. Walseth, *Anal. Biochem.*, 116 (1981) 357.
- 6 D. S. Hsu et S. S. Chen, *J. Chromatogr.*, 192 (1980) 193.
- 7 M. Zakaria et P. R. Brown, *J. Chromatogr.*, 226 (1981) 267.
- 8 G. H. R. Rao, J. D. Peller et J. G. White, *J. Chromatogr.*, 226 (1981) 466.
- 9 J. X. Khym, *Clin. Chem.*, 21 (1975) 1245.
- 10 R. A. Johnson et J. Welden, *Arch. Biochem. Biophys.*, 183 (1977) 216.
- 11 S. M. Penningroth, K. Olehnik et A. Cheung, *J. Biol. Chem.*, 255 (1980) 9545.