

REFERENCES

1. HALEY, E. E. and LAMBOOY, J. P. — *J. Am. Chem. Soc.*, **76** : 2926 (1954).
2. SMITH, L. H., Jr. and YATES, P. — *J. Am. Chem. Soc.*, **76** : 6080 (1954).
3. WEED, L. L. and WILSON, D. W. — *J. Biol. Chem.*, **189** : 435 (1951).
4. WILLIAMS, D. L. and RONZIO, A. R. — *J. Am. Chem. Soc.*, **74** : 2407 (1952).
5. SMITH, L. H., Jr. — *J. Am. Chem. Soc.*, **77** : 6691 (1955).
6. LIEBERMANN, I. and KORNBERG, A. — *J. Biol. Chem.*, **207** : 911 (1954); **212** : 909 (1955).
7. RATUSKY, J., TYKVA, R. and SORM, F. — *Czechosl. Patent Appl.*, PV-7048-65.
8. RATUSKY, J., TYKVA, R. and SORM, F. — *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **32** : 1719 (1967).
9. RATUSKY, J. — *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, in press.
10. RATUSKY, J. and SORM, F. — *Chem. Ind.*, **1966** : 1798.
11. RATUSKY, J. and TYKVA, R. — *Czechosl. Patent Appl.*, PV-6222-66.
12. RATUSKY, J., TYKVA, R. and SORM, F. — Second International Conference on Methods of Preparing and Storing Labelled Compounds, Brussels, 1966 in press.
13. TYKVA, R. — *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **29** : 680 (1964).

Isolement et purification d'acide désoxyribonucléique de radioactivité spécifique élevée obtenu par incorporation de thymine tritiée par *escherichia coli*

Reçu le 15 novembre 1966

Parmi les systèmes vivants susceptibles d'incorporer un précurseur porteur d'un radioélément dans leur acide désoxyribonucléique (DNA), les cellules de mammifères (tumeur d'Ehrlich, intestin ou rate de souris : Paoletti, Lamonthezie ⁽⁴⁾) présentent l'avantage de permettre d'extraire aisément des quantités assez importantes de DNA. Mais, avec ces systèmes, seule une petite partie du précurseur est incorporée et la radioactivité spécifique du DNA est faible; de plus, on n'est pas assuré d'obtenir un polymère marqué de façon homogène. On peut éviter ces inconvénients en s'adressant à des souches bactériennes mutantes incapables d'effectuer la synthèse de la thymine. En cultivant un tel mutant dans des milieux contenant une quantité limitée de thymine méthyle (³H), on obtient une incorporation rapide et presque totale de ce précurseur spécifique du DNA.

Les méthodes, données par la littérature, d'isolement et de purification du DNA des bactéries ne nous ont pas conduit à des résultats satisfaisants et nous inspirant de travaux antérieurs effectués dans notre laboratoire ^(1, 2), nous avons mis au point une technique où l'on traite successivement par la papaïne et par le phénol les corps bactériens.

Les bactéries (*E. Coli*, souche CR 34) sont obtenues par culture à 37 °C dans un milieu liquide contenant 1 mg/l de thymine de radioactivité spécifique

40 mCi/mM environ. Elles sont recueillies par centrifugation, lavées et remises en suspension; les membranes bactériennes sont lysées par action du dodecyl sulfate de sodium à la concentration de 5 mg/ml, et les nucléoprotéines libérées sont traitées par la papaïne (1 mg/ml) pendant 15 heures à 45 °C. On achève la déprotéinisation par action du phénol à pH = 9 pendant 1 heure à la température du laboratoire; après élimination du phénol par centrifugation et dialyse exhaustive, on hydrolyse l'acide ribonucléique par la ribonucléase. L'enzyme est éliminé par un nouveau traitement par le phénol et les produits d'hydrolyse par dialyse; on effectue finalement une précipitation sélective du DNA par l'isopropanol selon la technique de Marmur ⁽³⁾.

La contamination par les protéines et par l'acide ribonucléique du DNA préparé dans ces conditions est inférieure à 1 % et la constante de sédimentation, déterminée par ultracentrifugation analytique est d'environ 22 s, ce qui correspond à un poids moléculaire proche de 10⁷ Daltons.

Par cette technique, on obtient à partir de 5 l de milieu de culture 15 g environ de bactéries humides contenant 75 % de la radioactivité introduite dans le milieu de culture. On en extrait (avec un rendement de 65 %) 25 mg environ de DNA purifié de radioactivité spécifique 10 mCi/mM (exprimé en P-DNA) soit 14 000 cpm/μg si on effectue les comptages avec un rendement de 20 %. La comparaison de la radioactivité spécifique du DNA synthétisé avec celle du précurseur montre qu'il n'y a pas de dilution isotopique de celui-ci et que par conséquent, la distribution du tritium sur les molécules est uniforme.

Cette méthode permet donc une préparation biosynthétique de DNA bactérien dans laquelle 50 % du tritium introduit dans le milieu de culture est finalement retrouvé sous forme de produit purifié; sa radioactivité spécifique peut être rigoureusement contrôlée d'après celle de son précurseur, et théoriquement, avec la thymine actuellement disponible, on pourrait atteindre une activité spécifique de 2 Ci/mM soit près de 3.10⁷ cpm/μg de DNA si on effectue le comptage avec un rendement de 20 %.

Une communication détaillée sera publiée dans les Comptes Rendus de la « Seconde Conférence Internationale sur les méthodes de préparation et de conservation des composés marqués » ⁽⁵⁾.

Nous remercions le Dr Devoret (Laboratoire des faibles radiations du C N R S à Gif-s-Yvette) qui a mis à notre disposition la souche mutante CR 34 d'*E. Coli*.

Ce travail a été effectué dans le cadre du contrat Euratom n° 080 64 11 RISF.

J. M. SAUCIER
D. TOUTAIN

Unité de Biochimie et Enzymologie
Institut Gustave-Roussy, Villejuif 94, France

BIBLIOGRAPHIE SOMMAIRE

1. AUBIN, G., CHENAILLE, P., LAMONTHEZIE, N. et PAOLETTI, C. — *Biochimica Biophysica Acta*, **72** : 456 (1963).
2. LAMONTHEZIE, N. et GUERINEAU, M. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **5** : 47 (1965).
3. MARMUR, J. — *J. Mol. Biol.*, **3** : 208 (1961).
4. PAOLETTI, C. et LAMONTHEZIE, N. — Proceedings of the Conference on Methods of preparing on storing marked molecules, 855 (1963).
5. En cours de publication par le Centre d'Information et de Documentation d'Euratom, Bruxelles.

Synthesis of Geranylgeraniol-2-¹⁴C

All *trans* geranylgeraniol, III (3, 7, 11, 15-tetramethyl-2, 6, 10, 14-hexadecatetraene-1-01) has been implicated as a precursor in biosynthesis of carotenoid pigments in a number of systems as the pyrophosphate ester (¹). We became interested in using the ¹⁴C labelled alcohol to study biosynthesis in the intact tomato fruit and tomato plastids. Consequently it was necessary to devise a method of synthesis for this alcohol. The synthesis described herein provides a relatively simple scheme to obtain isoprenoid alcohols of high specific radioactivity.

Several methods have been used for the synthesis of isoprenoid alcohols (^{2, 3, 4}). These methods are not entirely suitable for the synthesis of ¹⁴C isoprenoid alcohols either, because the label must be introduced relatively early in the procedure (^{2, 3}) or the stereochemical course of the reaction sequence is not favorable (⁴).

Recently isoprenoid alcohols have been prepared (^{5, 6}) by using a modified Wittig type reaction (⁷). Although this procedure is especially suited to synthesis of ¹⁴C labelled isoprenoid alcohols, it has not been used previously. Using it, the label can be introduced near the end of the reaction sequence, and a high *trans-cis* ratio can be obtained.

Thiophene free reagent grade benzene was dried over calcium hydride and passed through a silica gel column before use. Ethyleneglycol dimethyl ether was distilled from calcium hydride before use. Triethyl phosphite, ethyl acetate and ethyl acetoacetate were purified by fractional distillation. Ethyl bromoacetate, nerolidol (Aldrich*), phosphorus tribromide (practical), lithium aluminum hydride and sodium hydride (58.9% in oil) were used without further purification. Methyl bromoacetate-2-¹⁴C (Nuclear Chicago) had a specific activity of 4.44 mC/mM.

A sample of all-*trans* geranylinalool (Hoffman La Roche and Co., Basel, Switzerland) was converted to III by bromination of the alcohol and hydrolysis of the rearranged bromide (²).

* Use of trade names of specific material does not constitute a recommendation by the U. S. Department of Agriculture to the exclusion of others which may also be available.