

NOTIZEN

Hybridisierungsversuche mit einer niedermolekularen DNA-Fraktion aus embryonalen Rattenzellen

Hybridisation Experiment with a Low-molecular Weight DNA from Embryonic Rat Cells

G. HILLER und W. FRANK

Max Planck Institut für Virusforschung, Abteilung für physikalische Biologie, Tübingen

(Z. Naturforsch. 28 c, 223-224 [1973]; eingegangen am 22. Dezember 1972)

Low-molecular weight DNA, hybridisation, rat cells

Aus Kulturen embryonaler Rattenzellen, die durch Inkubation in serumfreiem Medium in der G_1 -Phase des Zellzyklus gestoppt worden waren¹, konnte eine niedermolekulare DNA-Fraktion isoliert werden². Diese sedimentiert in der Ultrazentrifuge mit einer Sedimentationskonstanten $S_{20} = 11$ und bandet in alkalischen CsCl-Gradienten bei einer höheren Dichte als die übrige Zell-DNA. SMITH u. VINOGRAD haben kürzlich über die Isolierung einer DNA mit ähnlichen Eigenschaften aus HeLa-Zellen berichtet³; die Funktion dieser Nukleinsäure im Zellstoffwechsel ist gegenwärtig noch unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Hybridisierungsverhalten der niedermolekularen DNA-Komponente aus Rattenzellen untersucht. Die Isolierung erfolgte wie kürzlich beschrieben²: Embryonale Rattenzellen (Sekundärkulturen) wurden am Beginn der S-Phase durch 15stdg. Inkubation in $2 \cdot 10^{-3}M$ Hydroxymethyluracil synchronisiert und nach Entblockung für 2 Stdn. mit Methyl-³H-Thymidin (NEN 1 $\mu Ci/ml$; spez. Akt. 5 Ci/mMol) bzw. ¹⁴C-Thymidin (0,1 $\mu Ci/ml$; spez. Akt. 44 mCi/mMol) markiert. Dann wurden die Zellen weitere 6 Stdn. in nicht radioaktivem sowie 20 Stdn. in serumfreiem Medium inkubiert und mit alkalischer EDTA-Lösung lysiert. Die DNA-Fractionen wurden durch Zentrifugation in alkalischen Saccharosegradienten (5-20%), RNase- und Pronaseverdauung sowie isopyknische Zentrifugation in CsCl isoliert; die Hauptmenge der Zell-DNA, die in den alkalischen Saccharose-Gradienten rasch sedimentiert, wird im folgenden als s-DNA, die langsam sedimentierende Fraktion ($S_{20} = 11$) als l-DNA bezeichnet.

Zur Isolierung der Gesamt-DNA wurden logarithmisch wachsende Zellen 24 Stdn. mit Methyl-³H-Thymidin (1 $\mu Ci/ml$; spez. Akt. 5 mCi/mMol) bzw.

¹⁴C-Thymidin (0,1 $\mu Ci/ml$; spez. Akt. 44 mCi/mMol) markiert, von den Kulturgefäßen abtrypsinisiert, in $1 \times SSC/EDTA$ suspendiert und durch Zusatz von SDS (Endkonzentration 0,5%) lysiert. Die weitere Reinigung erfolgte durch Verdauung mit Pronase und RNase, Extraktion von Chloroform/Isoamylalkohol mit anschließender Zentrifugation in CsCl-Gradienten². Die Schmelztemperatur der DNA wurde in $1 \times SSC$ bei pH 6,8 zu 86 °C ermittelt.

Für die Hybridisierung der DNA auf Nitrozellulosefiltern wurden die Verfahren nach DENHARDT⁴, LEGAULT-DENARE⁵ sowie nach WARNAAR u. COHEN⁶ geprüft. Hierbei erwies sich die Technik von WARNAAR u. COHEN den beiden anderen überlegen, da die unspezifische Hybridisierung geringer war und außerdem stärker verdünnte DNA-Lösungen eingesetzt werden konnten. Die mit ³H- oder ¹⁴C-Thymidin markierte DNA wurde in der gewünschten Konzentration in $0,1 \times SSC/EDTA$ durch Zugabe von NaOH bei pH 12,6-12,8 denaturiert; anschließend wurde die Lösung neutralisiert, auf $6 \times SSC$ gebracht und durch Nitrozellulosefilter (Millipore HAWP, Porenweite 0,45 μ , 1 Stde. mit $6 \times SSC$ vorbehandelt) mit einer Geschwindigkeit von max. 5 ml/min gesaugt. Nach dem Waschen mit $6 \times SSC$ (insgesamt 50 ml) wurden die Filter mit der immobilisierten Einzelstrang-DNA 14 Stdn. bei Raumtemperatur und 2 Stdn. in Vakuum bei 80 °C getrocknet. Zur Hybridisierung wurden die Filter 24 Stdn. bei 65 °C in 1 ml einer Lösung inkubiert, welche 1 μg der zu testenden, mit ¹⁴C- bzw. ³H-Thymidin markierten DNA in $2 \times SSC/0,1\%$ SDS enthielt; diese DNA war zuvor mit Alkali denaturiert und 6 mal mit einer Geschwindigkeit von mehr als 1 ml/5 sec durch eine 16er-Injektionskanüle gezogen worden. Die Filter wurden mit 3 mM Tris-puffer, pH 9,2, gewaschen, bei 80 °C getrocknet und mit Toluol-Szintillator im Packard-Flüssigkeitszähler 3375 die ³H- sowie ¹⁴C-Aktivitäten bestimmt.

Abb. 1 zeigt die Hybridisierung von Gesamt-DNA aus embryonalen Rattenzellen, wobei steigende Mengen von ³H-DNA auf den Filtern immobilisiert wurden. Im Sättigungsbereich wurden etwa 25% der angebotenen ¹⁴C-DNA von den Filtern gebunden.

Für die Hybridisierungsversuche mit den DNA-Fractionen (l-DNA und s-DNA), die aus embryonalen Rattenzellen in der G_1 -Phase isoliert worden waren, wurden jeweils 5 μg ¹⁴C-DNA auf den Filtern immobilisiert und mit 1 μg der entsprechenden ³H-DNA hybridisiert. Nach Tab. I hybridisiert die rasch sedimentierende DNA-Fraktion (s-DNA) mit sich selbst am besten; unter optimalen Bedingungen wurden hier über 9% der in der Lösung angebotenen DNA an die Filter gebunden. Nicht signifikant verschieden davon ist das Hybridisierungsverhalten zwischen rasch und langsam sedimentierender DNA (s-DNA mit l-DNA), wobei gleichgültig ist, ob die

Sonderdruckanforderungen an Dr. WERNER FRANK, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung für physikalische Biologie, D-7400 Tübingen, Spemannstraße 35/I.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

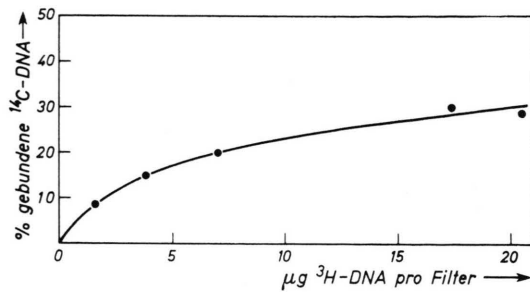


Abb. 1. Hybridisierung von Gesamt-DNA aus embryonalen Rattenzellen. Auf den Nitrozellulosefiltern waren steigende Mengen ³H-DNA immobilisiert (spez. Akt. 31700 Imp/min · µg), in 1 ml Lösung wurde 1 µg denaturierte l-DNA angeboten (spez. Akt. 5000 Imp/min · µg). Die Hybridisierung erfolgte durch 24 stdg. Inkubation bei 65 °C in 2 x SSC/0,1 % SDS.

Tab. I. Hybridisierungsverhalten von s-DNA und l-DNA (s. Text) aus embryonalen Rattenzellen. Auf den Filtern wurden jeweils 5 µg der entsprechenden DNA immobilisiert. Zur Hybridisierung wurde je 1 µg DNA in 1 ml 2 x SSC/0,1 % SDS angeboten.

Spez. Akt.: l-³H-DNA 4650 Imp/min · µg; l-¹⁴C-DNA 300 Imp/min · µg; s-³H-DNA 12200 Imp/min · µg; s-¹⁴C-DNA 1250 Imp/min · µg.

| Immobilisierte | DNA DNA in Lösung | Prozent der DNA in Lösung, die auf Filtern gebunden wurde ± SD |
|-----------------------|----------------------|--|
| ¹⁴ C-l-DNA | ³ H-l-DNA | 9,2 ± 0,9 |
| ¹⁴ C-l-DNA | ³ H-s-DNA | 5,7 ± 0,4 |
| ¹⁴ C-s-DNA | ³ H-l-DNA | 8,7 ± 0,5 |
| ¹⁴ C-l-DNA | ³ H-s-DNA | 8,3 ± 0,5 |

s-DNA oder die l-DNA auf den Nitrozellulosefiltern immobilisiert wird. Ganz erheblich schlechter hybridisiert dagegen die l-DNA mit sich selbst, obwohl diese eindeutig als Doppelstrang in den Zellen vorkommt und hieraus isoliert werden konnte².

Diese Ergebnisse erlauben folgende Aussagen:

1. Da unter den angewandten Bedingungen nur DNA-Stränge mit repetitiven Sequenzen hybridisieren^{7, 8}, müssen solche sowohl in der s-DNA als auch in der l-DNA vorhanden sein.
2. s-DNA und l-DNA müssen identische oder zumindest sehr ähnliche Sequenzen enthalten.
3. Die Selbst-Hybridisierung der l-DNA muß sterisch behindert sein. Elektronenmikroskopische Aufnahmen (unveröffentlichte Ergebnisse) haben ergeben, daß die l-DNA zumindest teilweise in Ringform vorliegt.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

¹ W. FRANK, H.-J. RISTOW u. S. ZABEL, Eur. J. Biochem. **14**, 392 [1970].

² R. MANSO MARTINEZ u. W. FRANK, Z. Naturforsch. **27b**, 1507 [1972].

³ C. A. SMITH u. J. VINOGRAD, J. molecular Biol. **69**, 163 [1972].

⁴ D. T. DENHARDT, Biochem. biophys. Res. Commun. **23**, 641 [1966].

⁵ J. LEGAULT-DÉMARÉ, B. DESSEAUX, T. ALYNAN, S. SÉROU u. G. P. RESS, Biochem. biophys. Res. Commun. **28**, 550 [1967].

⁶ S. O. WARNAAR u. J. A. COHEN, Biochem. biophys. Res. Commun. **24**, 554 [1966].

⁷ P. M. B. WALKERIN, Progr. Nucleic Acid Res. and Mol. Biol. **9** 304 [1969].

⁸ B. J. MCCARTHY u. B. R. CHURCH, Annu. Rev. Biochem. **39**, 131 [1970].