

Short Communications

Extraction d'un acide desoxyribonucleique transformant par le dodecyl sulfate de sodium et le phenol

Il est difficile de préparer à partir de tissus ou de bactéries infectés par des virus de l'ADN ne contenant pas de virus résiduel. Dans le cas des ARN biologiquement actifs, préparés par la méthode de GIERER ET SCHRAMM¹ à partir de matériaux contenant des virus divers en quantité variable, on ne détecte pas de virus infectieux.

En préparant l'ARN par cette méthode à partir de tissus, nous avons observé que l'extrait final contenait parfois des quantités appréciables d'ADN. Nous avons cherché à augmenter le plus possible le rendement en ADN. Dans ce but, nous avons essayé d'ajouter aux préparations du dodecyl sulfate de sodium avant le traitement au phénol. Ceci pour les raisons suivantes: KIRBY² a montré que l'addition de certains anions avant le traitement par le phénol permet à l'ADN de rester avec l'ARN dans la phase aqueuse. SREENIVASAYA ET PIRIE³ ont utilisé le SDS pour dissocier la nucléoprotéine de la mosaïque du tabac et MARKO ET BUTLER⁴ ont développé une méthode de préparation des acides nucléiques avec ce détergent.

Pour avoir un contrôle des qualités biologiques de l'ADN ainsi préparé nous avons utilisé la transformation du pneumocoque R36A vers la résistance à la streptomycine.

La souche de pneumocoque est cultivée en milieu 1 indiqué par EPHRUSSI-TAYLOR⁵. En fin de croissance, la culture est divisée en deux parties. Un lot sert à la préparation des acides nucléiques selon la méthode de MCCARTHY ET AVERY⁶: on lyse les cellules par le désoxycholate en présence de citrate, on déprotéinise selon la technique de SEVAG⁷ puis on précipite les acides nucléiques par l'éthanol.

L'autre partie est centrifugée. Les bactéries sont lavées et diluées dans un tampon phosphate 0.02 M-éthylènediaminetétraacétate 0.01 M pH 7.2, de manière à avoir $5 \cdot 10^8$ à $2 \cdot 10^8$ bactéries/ml (le rendement en ADN diminue si la concentration bactérienne est plus élevée). On ajoute du SDS (solution à 20 % dans du tampon phosphate 0.2 M, pH 7.3) pour avoir une concentration finale de 0.4 %. On agite 3-5 min dans l'appareil de MICKLE⁸; on ajoute un volume égal de phénol saturé d'eau (phénol BDH Analar). On agite 5 min. Après centrifugation, on prélève la phase aqueuse sur laquelle on répète le traitement au moins deux fois, parfois plus, suivant le degré de purification désiré.

La phase aqueuse est finalement lavée à l'éther (5-6 fois).

Les acides nucléiques sont précipités rapidement par 2 vol. d'éthanol froid, en présence de 2 % d'acétate de sodium. Le précipité est tout de suite séparé par centrifugation pour éviter d'entraîner du SDS (ce dernier précipitant dans l'alcool plus lentement que les acides nucléiques).

Abbreviations: ADN, acide deoxyribonucleique; ARN, acide ribonucleique; SDS, dodécyl sulfate de sodium.

Les précipités sont lavés 4 fois par un mélange éthanol (2 vol.) NaCl 0.14 *M* (1 vol.) puis dissous dans du NaCl 0.14 *M*-glycocolle 0.01 *M*.

L'activité transformante a été testée sur des bactéries compétentes congelées suivant la technique indiquée par FOX ET HOTCHKISS⁹.

L'ADN a été dosé selon la méthode de KECK¹⁰ et de DISCHE¹¹ et les acides nucléiques totaux déterminés par l'absorption à 258 m μ ; les protéines ont été déterminées par la méthode de LOWRY¹².

Le Tableau I donne la moyenne des résultats obtenus sur 6 préparations.

TABLEAU I

	Extraction par SDS et phénol	Extraction selon MC CARTHY
Rendement en ADN rapporté à une quantité de bactéries correspondant à 10 mg de poids sec (μ g)	250	200
Pourcentage d'ADN par rapport aux acides nucléiques totaux	12.3	19
Protéine en pour cent d'acide nucléique total après 3 déprotéinisations	< 1	2.5
Viscosité réduite ($\frac{\eta_{sp}}{c}$)	3000	5790
Spectre u.v.		
ϵ_{max} (258 m μ)	2.37	2.02
ϵ_{min} (230 m μ)		
$\epsilon_{258 m\mu}$	2.18	2.02
$\epsilon_{280 m\mu}$		
Nombre de transformations par μ g d'ADN (par extrapolation de la partie linéaire)	$6.2 \cdot 10^5$	$4.5 \cdot 10^5$

Nous avons ajouté aux bactéries avant l'extraction des quantités déterminées de virus afin de vérifier leur élimination.

Le Tableau II donne les résultats pour 3 phages et 1 virus animal.

TABLEAU II

	Nombre de bactéries-phages survivants sur 10^{10} ajoutés initialement
T ₂ r après 3 extractions au phénol	0
Après 6 Sevag	10^5
T ₃ après 3 extractions au phénol	0
Phage 167 après 3 extractions au phénol	10
Après 4 extractions au phénol	0
Après 3 Sevag	$2 \cdot 10^8$
Après 5 Sevag	$5 \cdot 10^5$
Avec le virus de l'encéphalomyocardite, pour $5 \cdot 10^8$ PFU au départ, il reste:	
Après 3 extractions au phénol	0
Après 3 Sevag	$5 \cdot 10^5$

Nous avons essayé différents milieux pour faire l'extraction: NaCl 0.14 *M*, NaCl 1 *M*, tampon citrate 0.1 *M*, milieu de EARLE et nous avons aussi suivi l'effet de la température (4°, 22°, 37°). Nous n'avons pas constaté de différences significatives

dans le produit final. Le résultat le plus constant a été obtenu en opérant à 4°. Le milieu de EARLE¹³ a parfois permis d'obtenir un rendement plus élevé.

L'activité transformante spécifique est en moyenne supérieure de 33 % à celle des extraits préparés par la méthode MCCARTHY. La viscosité, environ deux fois plus faible, indique un poids moléculaire plus bas. Nous n'avons pas assez de données pour discuter ici une relation éventuelle entre l'augmentation de l'activité spécifique et la faible viscosité.

La marqueur Sm, qui n'occupe qu'une partie de la molécule¹⁴, n'est peut-être pas un critère suffisant pour juger de l'intégrité de l'ADN étudié. La même méthode a permis néanmoins, de préparer, à partir de bactéries infectées, un ADN capable de reproduire des phages¹⁵.

La technique est rapide et permet facilement de manipuler de petits échantillons. Elle permet d'obtenir, avec un bon rendement, de l'ADN de toutes sortes de tissus normaux et tumoraux. Toutefois, il est nécessaire de choisir, dans chaque cas, la dilution du matériel initial la mieux adaptée au tissu utilisé car une trop forte concentration empêche la séparation de l'ADN.

Institut Pasteur, Paris (France)

JOSEPH HUPPERT

Institut du Radium, Laboratoire Pasteur, Paris (France)

NICOLE REBEYROTTE

¹ A. GIERER ET G. SCHRAMM, *Nature*, 177 (1956) 702.

² K. S. KIRBY, *Biochem. J.*, 66 (1957) 495.

³ M. SREENIVASAYA ET N. W. PIRIE, *Biochem. J.*, 32 (1938) 1707.

⁴ A. M. MARKO ET G. G. BUTLER, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 165.

⁵ H. EPHRUSSI-TAYLOR, *Exptl. Cell Research*, 2 (1951) 589.

⁶ J. MCCARTHY ET O. T. AVERY, *J. Exptl. Med.*, 83 (1946) 105.

⁷ M. G. SEVAG, D. B. LACKMAN ET J. SMOLENS, *J. Biol. Chem.*, 124 (1938) 425.

⁸ H. J. MICKLE, *J. Roy. Microscop. Soc.*, 48 (1948) 10.

⁹ M. FOX ET R. D. HOTCHKISS, *Nature*, 179 (1957) 1322.

¹⁰ K. KECK, *Arch. Biochem. Biophys.*, 63 (1956) 446.

¹¹ Z. DISCHE, *Mikrochemie*, 8 (1930) 4.

¹² O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.

¹³ W. R. EARLE, E. L. SCHILLING, T. H. STARK, N. P. STRAUS, M. F. BROWN ET E. SHELTON, *J. Natl. Cancer Inst.*, 4 (1943) 165.

¹⁴ R. LATARJET, H. EPHRUSSI-TAYLOR ET N. REBEYROTTE, *Radiation Research Suppl.*, 1 (1959) 417.

¹⁵ R. WAHL, J. HUPPERT ET L. EMERIQUE-BLUM, *Compt. rend.*, 250 (1960) 4227.

Reçu le 21 juillet, 1960

Biochim. Biophys. Acta, 45 (1960) 189-191