

BBA 65846

PURIFICATION ET QUELQUES PROPRIÉTÉS DE LA SÉRYL-tRNA SYNTHÉTASE DU FOIE DE RAT

MARIANNE ROUGE*

(Reçu le 6 septembre, 1968)

Laboratoires Biologiques du Département Pharmaceutique de CIBA Société Anonyme, Bâle, Suisse.

SUMMARY

Purification and some properties of rat liver seryl-tRNA synthetase

Seryl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.11) has been purified approx. 600-fold from homogenates of rat liver by precipitation at pH 4.9, ammonium sulphate fractionation, DEAE-cellulose chromatography and sucrose gradient centrifugation. The optimal conditions for the reaction and some of the properties of the purified liver enzyme have been described. The Michaelis constants for reaction with serine and ATP were, respectively, $5 \cdot 10^{-4}$ M and $4 \cdot 10^{-5}$ M, and the molecular weight of the enzyme was about 90 000.

INTRODUCTION

L'aminocacylation du tRNA est une des étapes intermédiaires de la biosynthèse d'une chaîne polypeptidique; son importance réside dans la grande spécificité de l'interaction de l'enzyme catalysant cette réaction, l'aminocacyl-tRNA-synthétase, qui conduit à l'incorporation d'un acide aminé déterminé à un tRNA spécifique correspondant. Le système responsable de l'incorporation de la sérine dans la chaîne polypeptidique possède, en outre, des propriétés qui lui confèrent un intérêt particulier: la sérine a été trouvée dans un certain nombre de protéines en position terminale de la chaîne¹, son incorporation est donc peut-être en relation avec le système permettant l'initiation de la chaîne polypeptidique. D'autre part, le tRNA^{Sér}, qui a été isolé de différentes espèces, est formé de composants multiples, correspondant à un nombre particulièrement élevé de codons différents: 6 combinaisons peuvent diriger l'incorporation de la sérine, et aucune des 3 bases n'est commune, en même position, à ces 6 codons. De plus, pour l'hémoglobine, par exemple, selon le tRNA^{Sér}, auquel l'acide a été incorporé, la sérine sera intégrée à un point défini de la chaîne polypeptidique².

Pour pouvoir étudier le mécanisme de l'incorporation de sérine à la chaîne polypeptidique, il est nécessaire de disposer de la séryl-tRNA synthétase (EC 6.1.1.11) et du tRNA sous une forme purifiée, et c'est dans ce but qu'a été entrepris ce travail.

* Adresse actuelle: Dept. of Biochemistry, Michigan State University, East Lansing, Mich., U.S.A.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Détermination de la concentration des protéines. Elle est effectuée selon la méthode de LOWRY *et al.*³ avec de l'albumine sérique comme standard, ou par mesure de l'absorption dans l'ultraviolet selon la méthode de WARBURG ET CHRISTIAN⁴.

Détermination de la concentration du RNA. Elle est mesurée photométriquement par lecture de l'absorption à 260 nm dans une solution aqueuse et pour un trajet du rayon lumineux de 1 cm à travers la solution. On admet que, dans ces conditions, 1 mg de RNA a une absorbance de 25 unités.

Préparation du tRNA. Le tRNA est extrait de levure de bière selon la méthode de MONIER, STEPHENSON ET ZAMECNIK⁵, et des foies de rat selon la méthode de DELIHAS ET STAEHELIN⁶.

Détermination de l'activité enzymatique. L'activité enzymatique est déterminée par mesure de l'incorporation de L-[¹⁴C]sérine (4.66 mC/mole, du Radiochemical Centre, Amersham) au RNA de levure. La solution dans laquelle a lieu cette réaction contient, par ml: 100 μ moles de solution tampon Tris-HCl, (pH 8.0), 5 μ moles d'ATP (neutralisé par KOH), 0.5–1 mg de RNA (brut) de levure, et l'extrait enzymatique, dans un volume final de 0.2 ml. La solution est incubée 15 min à 37° et la réaction est stoppée par addition de HCl 2 M (0°). Après quelques minutes à 0°, le précipité est recueilli sur un filtre (Whatman, glasspaper GF/C), lavé plusieurs fois avec quelques ml de HCl 0.2 M, et séché. Le filtre est alors placé dans un récipient contenant 10 ml de solution de scintillateur (butyl-PBD) et la radioactivité est mesurée dans un compteur (Packard Tri-Carb, série 3000) avec un rendement de 87%.

Unités. Une unité d'activité enzymatique représente la quantité d'enzyme qui permet l'aminoacylation de 1 nmole de tRNA en 1 min dans les conditions définies plus haut. L'activité spécifique de l'enzyme représente les unités d'activité enzymatique par mg de protéines, et elle est exprimée en nmole de sérine incorporée au tRNA par mg de protéines.

Gradient de saccharose. Le gradient consiste en 5 ml d'une solution de saccharose 5–20% contenant également du phosphate de potassium (0.02 M et pH 7.2), du KCl (0.1 M) et du mercaptoethanol (0.01 M). La solution est centrifugée pendant 15 h à 38 000 tours/min (Spinco L-2, rotor SW 65), puis répartie en 37 fractions de 4 gouttes chacune.

Dosage de la deshydrogénase lactique. L'activité de cette enzyme (deshydrogénase lactique de muscle de lapin, Boehringer) est déterminée par lecture de l'absorption à 340 nm de la solution dans laquelle a lieu la réaction d'oxydation du NADH qui accompagne la transformation du pyruvate en lactate en présence de l'enzyme⁷.

Dosage de la phosphatase alcaline. L'activité de la phosphatase alcaline (d'*Escherichia coli*, Worthington) est déterminée selon la méthode décrite par TORRIANI⁸.

RÉSULTATS

Purification de l'enzyme

Au cours de la préparation de l'enzyme, la température des extraits enzymatiques est toujours maintenue voisine de 0°.

Homogénéisation et précipitation. 450–500 g de foie de rats congelé (les foies ont été prélevés au cours des semaines précédant la préparation de l'enzyme, congelés

immédiatement dans de l' N_2 liquide et conservés à -18°) sont homogénéisés au moyen d'un mixer, avec 900–1000 ml de KCl 0.05 M. L'homogénat est centrifugé 10 min à $23\,000 \times g$ (centrifugeuse réfrigérée Servall, rotor GSA), et le surnageant (1200 ml) est centrifugé 120 min à $36\,000 \times g$ (Spinco L-2, rotor 19). Le pH du surnageant est abaissé jusqu'à une valeur de 4.9 par addition d'acide acétique 1.5 M, et la solution est centrifugée 10 min à $12\,000 \times g$. Le précipité est dissous dans une solution (450 ml) de tampon Tris 0.1 M (pH 7.5), et centrifugé 5 min à $12\,000 \times g$. Le pH du surnageant est abaissé jusqu'à une valeur de 4.9, et le précipité est recueilli après 10 min de centrifugation à $12\,000 \times g$. Il est dissous dans du tampon phosphate 0.08 M (400 ml) (pH 7.5). Cette solution est l'extrait brut (enzyme pH 5) employé dans un certain nombre d'expériences; il contient environ 65% de l'activité présente dans le surnageant obtenu après la centrifugation à $36\,000 \times g$.

Fractionnement par le sulfate d'ammonium. Du sulfate d'ammonium est lentement ajouté—sous forme de sel solide—à la solution enzymatique (pH 5), jusqu'à 25% de saturation; lorsque la précipitation est achevée, la solution est centrifugée 20 min à $14\,000 \times g$. Par nouvelle addition de sulfate d'ammonium, la concentration dans le surnageant est amenée à 52% de saturation, et le précipité est éliminé comme précédemment. Par une troisième addition de sulfate d'ammonium, on amène la concentration dans le surnageant à 60% de saturation; la solution est centrifugée 20 min à $17\,500 \times g$, et le précipité est dissous dans un petit volume de solution de tampon phosphate de potassium 0.08 M (pH 7.5) (25 ml). Cette solution contient approximativement 50% de l'activité et 3–4% des protéines de l'extrait pH 5.

Première colonne de DEAE-cellulose. Pour éliminer le sulfate d'ammonium et abaisser la concentration du phosphate, l'extrait enzymatique est passé sur une colonne de Sephadex (G-75), dans une solution de tampon phosphate 0.005 M (pH 7), contenant de l'EDTA 0.002 M. La solution enzymatique est ensuite mise sur une colonne de DEAE-cellulose (Serva) (1.7 cm \times 3.5 cm), équilibrée avec cette même solution tampon. La protéine enzymatique est adsorbée à la cellulose, et après le passage de 15 ml de la solution phosphate 0.005 M, elle est éluée par du tampon phosphate 0.1 M (pH 7), contenant de l'EDTA 0.002 M. Dans ces conditions, environ 50% des protéines sont éluées en même temps que l'enzyme.

Deuxième colonne de DEAE-cellulose. L'enzyme ainsi obtenue est immédiatement passée sur une colonne de Sephadex (G-75) dans du tampon phosphate 0.005 M (pH 7), et EDTA 0.002 M, puis mise sur une deuxième colonne de DEAE-cellulose (1.1 cm \times 11 cm), équilibrée avec ce même tampon. Après passage de 20 ml de la solution tampon 0.005 M, les protéines sont éluées par un gradient linéaire de concentration du tampon phosphate obtenu à partir de 120 ml de tampon 0.005 M et de 120 ml de tampon 0.15 M; ces deux solutions ont un pH de 7 et contiennent de l'EDTA 0.002 M. La protéine enzymatique est éluée à une concentration du tampon de 0.03–0.05 M. Les fractions contenant l'enzyme sont réunies, les protéines sont concentrées par précipitation par le sulfate d'ammonium, et le précipité est dissous dans du tampon phosphate 0.08 M contenant 30–40% de glycérol. Cette étape de la purification permet d'obtenir une purification de 4–6 fois, et le rendement de l'activité est voisin de 35%. La Fig. 1 donne un exemple d'une telle chromatographie.

Gradient de saccharose. Pour évaluer le degré de purification de l'extrait enzymatique obtenu après la deuxième colonne de DEAE-cellulose, l'enzyme est appliquée sur un gradient de saccharose. Le glycérol de l'extrait enzymatique est d'abord

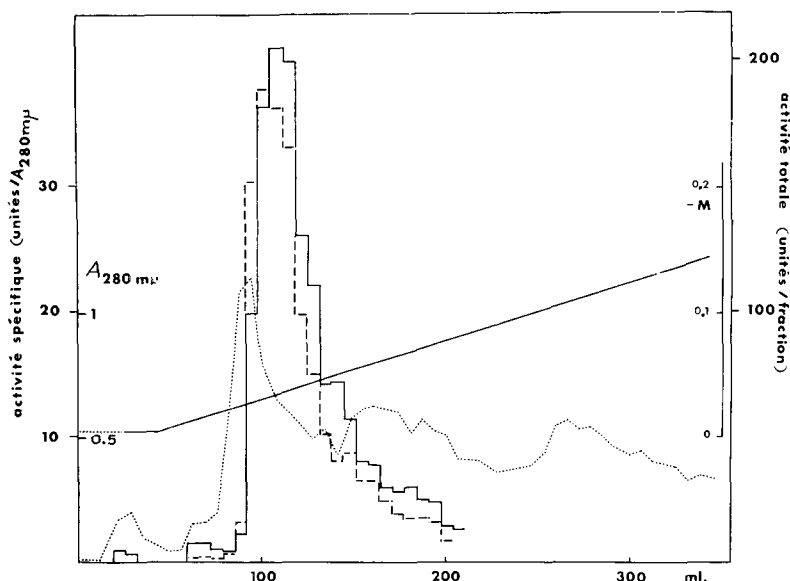


Fig. 1. Chromatographie sur une colonne de DEAE-cellulose (1.1 cm \times 13 cm) de 276 mg de protéines ayant une activité spécifique de 6.6 unités par mg, éluées par un gradient linéaire de concentration de phosphate (échelle intérieure droite) 0.005 M à 0.15 M (pH 7.2), (320 ml) contenant de l'EDTA 0.002 M. Les fractions ont un volume de 6.6 ml., Absorption à 280 nm; —, activité spécifique; — — —, activité totale.

éliminé par passage sur une colonne de Sephadex, et 0.08 ml de la solution enzymatique (0.56 mg) sont soumis à l'ultracentrifugation. Après fractionnement de la solution centrifugée, l'activité enzymatique est déterminée pour chaque fraction ainsi que la concentration des protéines (selon la méthode de LOWRY *et al.*³). 55% des protéines et 50% de l'activité enzymatique initiales sont réparties dans les 37 fractions: 65% des protéines recueillies se trouvent dans les 9 fractions contenant toute l'activité enzymatique obtenue après la centrifugation. Pour les trois gradients centrifugés

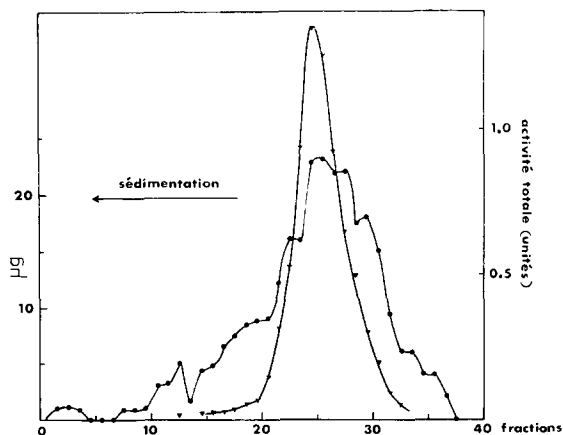


Fig. 2. Fractionnement de 0.56 mg de protéines dans un gradient de saccharose 5-20%. ▲—▲, activité enzymatique (unités par fraction); ●—●, concentration des protéines (μ g par fraction).

TABLEAU I

PURIFICATION DE LA SÉRYL-tRNA SYNTHÉTASE

Fraction	Protéines totales (mg)	Activité totale (unités)	Activité spécifique (unités/mg)	Activité/g de foie (unités/g)	Rende- ment (%)	Purifi- cation
I. Surnageant 36 000 × g	32 200	2860	0.0886	5.72	100	1
II. Extrait pH 5	7 600	1800	0.237	3.60	63	2.7
III. Sulfate d'ammonium 52-60%	250	885	3.540	1.77	31	40
IV. DEAE-cellulose I	108	779	7.200	1.56	27.2	81.4
V. DEAE-cellulose II	6.6	220	33.300	0.44	7.7	380
VI. Gradient de saccharose	1.07	57.3	53.300	0.115	2	600

simultanément, les fractions centrales du pic contiennent 25.5-28.6% de l'activité initiale et 14.1-15% des protéines. La fraction la plus active a une activité spécifique de 580 unités.

Le Tableau I résume les différentes étapes de la purification de la séryl-tRNA synthétase. Pour le gradient de saccharose, 1.68 mg de la Fraction V ont été soumis à l'ultracentrifugation (3 tubes à 0.56 mg) et les valeurs reportées sont calculées pour les 6.6 mg de protéines de la Fraction V.

Stabilité de l'enzyme

La stabilité des différentes aminoacyl-tRNA synthétases qui ont été isolées varie beaucoup d'une enzyme à une autre, de même que les facteurs permettant de stabiliser ces enzymes. Comme d'autres aminoacyl-tRNA synthétases, la séryl-tRNA synthétase devient de plus en plus instable au cours de la purification. L'extrait pH 5, par exemple, peut être conservé pendant plusieurs semaines à -8° ou plusieurs mois

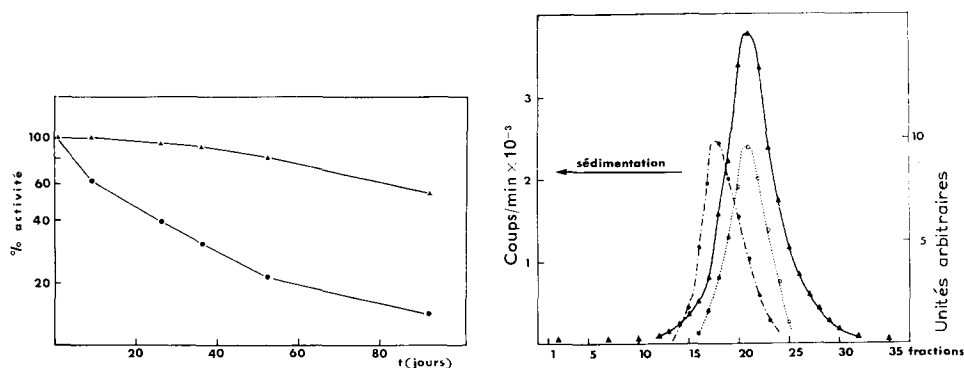


Fig. 3. Stabilité de l'enzyme en fonction du temps. La solution enzymatique (partiellement purifiée par passage sur colonne de DEAE-cellulose) a une activité spécifique initiale de 16 unités/mg et est conservée à -15° en présence de tampon phosphate 0.04 M (●—●); de tampon phosphate 0.04 M et de glycérine (50%) (▲—▲).

Fig. 4. Fractionnement d'une solution contenant 0.150 mg d'extrait enzymatique purifié (31 unités/mg), 0.250 mg de déshydrogénase lactique et 0.125 mg de phosphatase alcaline, dans un gradient de saccharose (5-20%). ▲—▲, activité de la séryl-tRNA synthétase, en coups/min par 2 μ l; ●—●, activité de la déshydrogénase en unités arbitraires; ○...○, activité de la phosphatase en unités arbitraires.

dans l'air liquide sans perdre son activité, mais après passage sur la colonne de DEAE-cellulose II, l'enzyme purifiée est beaucoup plus instable et perd jusqu'à 40% de son activité après 1 jour à -8° . L'addition d'EDTA, de mercaptoéthanol ou de glutathion ne stabilise pas l'enzyme pendant la conservation; de même, l'addition d'albumine sérique, qui préviendrait une inactivation due à la dilution, reste sans effet. La présence de glycérol, par contre, permet de stabiliser l'enzyme purifiée; comme le montre la Fig. 3, l'enzyme peut être conservée pendant plusieurs semaines dans une solution contenant 35% de glycérol à -18° sans grande perte d'activité. À 37° , température à laquelle a lieu l'incorporation de sérine, l'enzyme pH 5 est stable, alors que l'enzyme purifiée perd environ 70% de son activité en 15 min. À la température de l'incubation, l'addition d'albumine sérique ou de composants protégeant les groupes $-SH$ n'empêche pas non plus l'inactivation de l'enzyme. Cependant, dans les conditions auxquelles a lieu l'aminocyclation du tRNA, les composants de la solution incubée, en particulier le Mg^{2+} , stabilisent l'enzyme, qui ne perd alors que quelques % de son activité.

Détermination du poids moléculaire

Pour évaluer le poids moléculaire de la seryl-tRNA synthétase, l'extrait enzymatique obtenu après passage sur la deuxième colonne de DEAE-cellulose est centrifugé dans un gradient de saccharose en même temps que deux autres protéines de poids moléculaires connus et dont le dosage est simple: la déshydrogénase lactique et la phosphatase alcaline (Fig. 4). Calculé à l'aide de la formule établie par MARTIN ET AMES⁹, le poids moléculaire de la seryl-tRNA synthétase a les valeurs suivantes: 104 000 avec la déshydrogénase lactique, et 80 000 avec la phosphatase.

La seryl-tRNA synthétase a un poids moléculaire voisin de celui déterminé par MAKMAN ET CANTONI¹⁰ pour la seryl-tRNA synthétase isolée de la levure: 89 000 ou 114 000 selon les deux méthodes qu'ils ont employées.

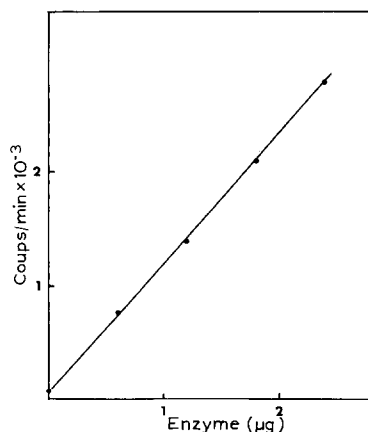


Fig. 5. Incorporation de sérine en fonction de la concentration d'un extrait enzymatique partiellement purifié.

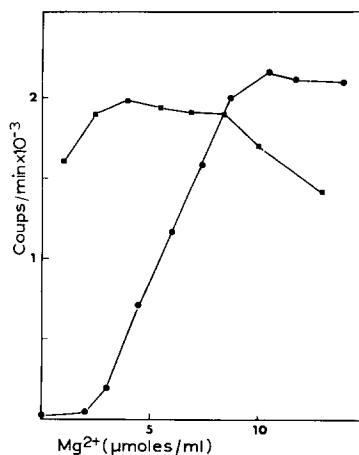


Fig. 6. Incorporation de sérine en fonction de la concentration du Mg^{2+} en μ moles/ml, en présence d'enzyme purifiée et de 9.4 unités d'A de tRNA dialysé (foie) (●—●) ou 6.6 unités d'A de tRNA non dialysé (foie) (□—□).

Conditions de la réaction

La réaction d'incorporation de sérine au tRNA est fonction de la concentration de l'enzyme, jusqu'à saturation du tRNA. En présence d'un excès de tRNA, elle dépend linéairement de la concentration de l'enzyme, et dans ces conditions elle permet la mesure de l'activité spécifique de l'extrait enzymatique (Fig. 5). La réaction est également fonction du temps, mais elle ne permet l'aminocyclation totale du tRNA que lorsque la quantité d'enzyme présente est suffisante pour pouvoir aminocycler tout le tRNA en 15 min environ; l'instabilité de l'enzyme et celle de l'aminocycl-tRNA formé empêchent la réaction d'être complète en présence d'une plus faible quantité d'enzyme.

TABLEAU II

CONCENTRATIONS DU MAGNÉSIUM DANS LE tRNA AVANT ET APRÈS DIALYSE

Les solutions de tRNA ont été dialysées pendant 14 h à 6° contre une solution contenant du MgCl_2 0.01 M, du Tris-HCl 0.02 M (pH 7.5) et de l'EDTA 0.005 M.

tRNA	A/ml	$\mu\text{moles Mg}^{2+}/\text{ml}^*$	$\mu\text{moles Mg}^{2+}/100 \mu\text{moles RNA-P}$
Levure, non dialysée	500	2	3.1
Levure, dialysée	50	5	78
Foie, dialysé	50	5	78

* Les concentrations de Mg^{2+} ont été déterminées spectrophotométriquement, et nous tenons à remercier là le Dr. H. G. HAAS (Bâle), qui a effectué ces déterminations.

La présence de Mg^{2+} est indispensable à la réaction (Fig. 6); ce cation ne peut être que très partiellement remplacé par le manganèse, qui inhibe la réaction en présence de magnésium. La concentration optimale de magnésium dépend de la concentration de tRNA et de celle d'ATP. La courbe obtenue en présence de tRNA préalablement dialysé contre une solution contenant du MgCl_2 0.01 M, du Tris 0.02 M (pH 7.5), et de l'EDTA 0.001 M, montre que le tRNA réagit avec le magnésium: le

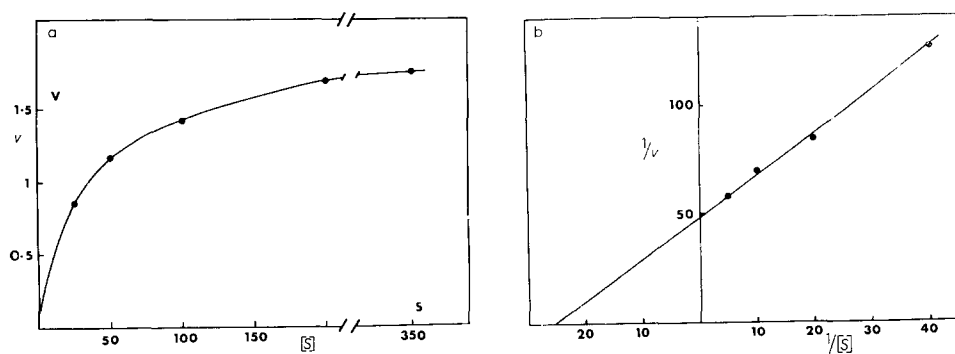


Fig. 7. a. Incorporation de sérine en fonction de la concentration d'ATP. La vitesse de la réaction est exprimée en coups/min $\times 10^{-3}$ et la concentration de l'ATP en μM . b. Incorporation de sérine en fonction de la concentration d'ATP. L'inverse de la vitesse de réaction est exprimé en $(\text{coups/min})^{-1} \times 10^3$ et l'inverse de la concentration en nM^{-1} .

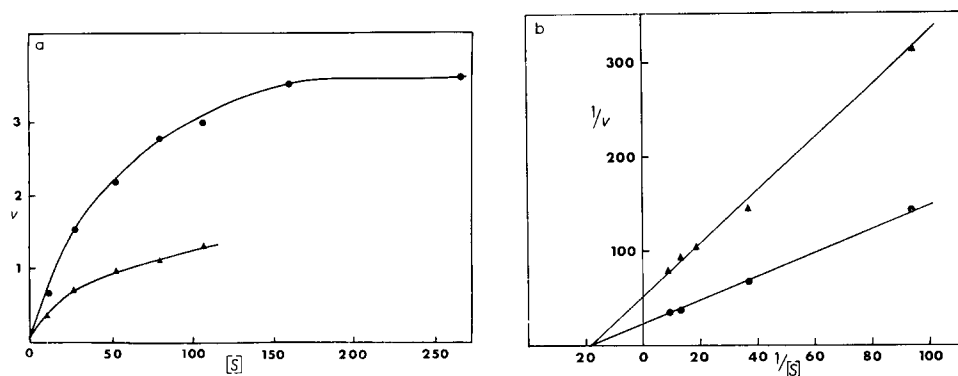


Fig. 8. a. Incorporation de sérine en fonction de la concentration de sérine en présence de $51 \mu\text{g}$ d'enzyme (pH 5) (\blacktriangle — \blacktriangle) et de $7.8 \mu\text{g}$ d'enzyme fractionnée par le sulfate d'ammonium (\bullet — \bullet). La vitesse de la réaction est exprimée en coups/min $\times 10^{-3}$ et la concentration de sérine en μM . b. Incorporation de sérine en fonction de la concentration de sérine en présence de $51 \mu\text{g}$ d'enzyme (pH 5) (\blacktriangle — \blacktriangle) et de $7.8 \mu\text{g}$ d'enzyme fractionnée par le sulfate d'ammonium (\bullet — \bullet). L'inverse de la vitesse de réaction est exprimée en (coups/min) $^{-1} \times 10^3$ et l'inverse de la concentration en nM^{-1} .

tRNA a fixé une grande quantité de Mg^{2+} (Tableau II) et le début de la courbe sigmoïdale est supprimé. D'autre part, lorsque l'influence de la concentration du Mg^{2+} est déterminée en présence de différentes concentrations de tRNA (non dialysé), la courbe est déplacée vers la droite lorsque la concentration de tRNA augmente (de 1.2 – $1.8 \mu\text{moles Mg}^{2+}$ par ml pour 100 unités d'A/ml); et l'addition de différentes quantités de tRNA non dialysé a un effet inhibiteur sur l'aminocacylation du tRNA dialysé en présence d'une faible concentration de MgCl_2 .

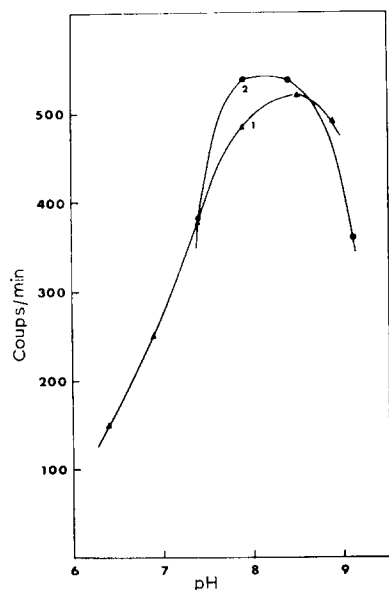


Fig. 9. Influence du pH sur l'incorporation de sérine en présence de $37 \mu\text{g}$ d'enzyme non purifiée, et d'une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M (1) ou de phosphate de sodium 0.04 M (2).

La Fig. 7 montre que l'ATP est indispensable à la réaction. Le rapport des concentrations de MgCl_2 et d'ATP doit être supérieur à 1, et la concentration de l'ATP modifie aussi l'influence de différentes concentrations de Mg^{2+} sur l'activité enzymatique. L'affinité de l'ATP et du Mg^{2+} est très grande¹¹ et l'effet inhibiteur d'une trop forte concentration d'ATP peut être expliqué par la diminution de la concentration du Mg^{2+} non lié à l'ATP nécessaire à la réaction. La Fig. 7 permet de déterminer la constante de Michaelis pour l'ATP, elle a la valeur de $4 \cdot 10^{-5}$ M.

La Fig. 8 montre l'effet de la variation de la concentration de la sérine sur la réaction d'aminocyclation, et la constante de Michaelis pour ce substrat est $5 \cdot 10^{-4}$ M.

Le pH optimum de la réaction a été déterminé en présence de solutions tampons de phosphate ou de Tris. La Fig. 9 montre que le pH optimum est voisin de 8.4. Pour déterminer le pH optimum de l'enzyme, il faut tenir compte de la stabilité du complexe intermédiaire et du produit final de la réaction; or, la stabilité du seryl-tRNA diminue lorsque le pH augmente; on peut estimer que le pH optimum de l'enzyme est voisin de 9, pH où la grande instabilité de l'aminocycl-tRNA ne permet plus d'obtenir des valeurs optimales lorsqu'on considère la réaction globale d'aminocyclation.

DISCUSSION

La purification de la seryl-tRNA synthétase du foie de rat décrite ici représente un enrichissement de l'extrait de 600 fois par rapport au surnageant de la fraction centrifugée à $36\,000 \times g$. Cette même enzyme a été partiellement isolée du pancréas de bœuf par WEBSTER ET DAVIE¹² et a été purifiée à partir de la levure par MAKMAN ET CANTONI¹⁰. La centrifugation de l'extrait purifié (Fraction V) dans le gradient de saccharose a montré que cet extrait enzymatique contient aussi d'autres protéines: 35% des protéines recueillies sont contenues dans des fractions qui ne possèdent pas d'activité enzymatique. La fraction ayant l'activité spécifique maximale est aussi celle dans laquelle se trouvent le plus de protéines, mais cette fraction est aussi contaminée par d'autres protéines (d'après le profil d'élution des protéines).

On peut comparer l'activité spécifique de l'extrait purifié, qui peut incorporer 53.3 nmoles/min par mg, avec la valeur obtenue par MAKMAN ET CANTONI¹⁰ pour l'enzyme de levure pure: 84 nmoles/min par mg, ou encore avec des valeurs obtenues pour d'autres enzymes isolées du foie de rat: 108 nmoles/min par mg pour l'arginyl-¹³ et 111 nmoles/min par mg pour la thréonyl-tRNA synthétase¹⁴.

Dans l'évaluation de l'activité spécifique des extraits purifiés, il faut tenir compte du fait que la détermination de l'activité est basée sur la mesure de l'incorporation de sérine au tRNA à 37° pendant 15 min; or, les expériences concernant la stabilité de l'enzyme ont montré que l'enzyme purifiée n'est pas stable dans de telles conditions: les valeurs représentant l'activité spécifique de ces extraits sont donc inférieures aux valeurs réelles. Ces expériences ont aussi conduit à modifier les conditions d'aminocyclation en présence de l'extrait purifié, notamment à abaisser la température et diminuer le temps d'incubation.

Comme cela a aussi été remarqué pour d'autres aminocycl-tRNA synthétases^{15,16}, l'extrait enzymatique brut est beaucoup plus stable que l'extrait purifié, et la diminution de la stabilité est parallèle à la diminution de la teneur en acides nucléiques de l'extrait. L'enzyme pH 5, ou même l'enzyme fractionné par le sulfate d'ammonium,

qui contiennent 5.5–6.5% d'acides nucléiques, sont des extraits stables qui peuvent être conservés plusieurs jours à -8° sans perte d'activité. Mais après passage sur colonne de DEAE-cellulose, l'enzyme ne contient que très peu d'acides nucléiques (0–1.5%) et est très instable, même congelée elle est rapidement inactivée.

L'effet stabilisateur de glycérol dans la solution enzymatique a été mis en évidence pour d'autres enzymes; dans le cas de la séryl-tRNA synthétase, il va permettre de conserver l'enzyme purifiée, et ainsi de pouvoir étudier ses propriétés, notamment son comportement en présence de différentes fractions de tRNA spécifiques de la sérine homologues ou hétérologues.

REMERCIEMENTS

Ce travail fait partie d'une thèse de doctorat présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, et je tiens à remercier ici le Dr. M. STAEHELIN, des Laboratoires Biologiques du Département Pharmaceutique de la CIBA, sous la direction de qui cette thèse a été préparée, et dont les conseils, tout au long de ce travail, ont été extrêmement appréciés.

RÉSUMÉ

1. La séryl-tRNA synthétase (EC 1.1.1.11) a été isolée du foie de rat et purifiée environ 600 fois par rapport à l'homogénat de foie, par précipitation à pH 4.9, précipitation fractionnée par du sulfate d'ammonium, chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose, et centrifugation sur un gradient de saccharose.

2. L'influence du pH sur la réaction d'aminocacylation, et celle de la concentration du Mg^{2+} , de la sérine, et de l'ATP (les constantes de Michaelis pour ces deux substrats sont, respectivement, $5 \cdot 10^{-4}$ et $4 \cdot 10^{-5}$ M) ont été déterminées.

3. Quelques propriétés de l'enzyme ont été étudiées: elle a un poids moléculaire voisin de 90 000, et la solution enzymatique peut être stabilisée par la présence de glycérol.

RÉFÉRENCES

- 1 J. HARRIS, *Biochem. J.*, 71 (1959) 451.
- 2 F. GONANO, *Biochemistry*, 6 (1967) 977.
- 3 O. H. LOWRY, M. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 4 O. WARBURG ET W. CHRISTIAN, dans S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. 3, Academic Press, New York, 1962, p. 453.
- 5 R. MONIER, M. L. STEPHENSON ET P. C. ZAMECNIK, *Biochim. Biophys. Acta*, 43 (1960) 1.
- 6 N. DELIHAS ET M. STAEHELIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 119 (1966) 385.
- 7 H. U. BERGMAYER, *Methoden der Enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, 1962, p. 736.
- 8 A. TORRIANI, dans G. L. CANTONI ET D. R. DAVIES, *Procedures in Nucleic Acid Research*, Harper and Row, New York, 1966, p. 224.
- 9 R. MARTIN ET B. AMES, *J. Biol. Chem.*, 236 (1960) 1372.
- 10 M. MAKMAN ET G. L. CANTONI, *Biochemistry*, 4 (1965) 1434.
- 11 W. J. O'SULLIVAN ET D. D. PERRIN, *Biochemistry*, 3 (1964) 18.
- 12 L. T. WEBSTER ET E. W. DAVIE, *Federation Proc.*, 18 (1959) 348.
- 13 C. C. ALLENDE ET J. E. ALLENDE, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 1102.
- 14 C. C. ALLENDE, J. E. ALLENDE, M. GATICA, J. CELIS, G. MORA ET M. MATAMALA, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 2245.
- 15 R. W. HOLLEY ET J. GOLDSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1765.
- 16 P. HELE, *Biochim. Biophys. Acta*, 87 (1964) 449.