

CHROM. 4699

Microméthode pour la détermination de la composition nucléotidique des ADN

Nous avons publié en 1967 (bibl. 1) une méthode de séparation des désoxyribomononucléotides sur couche mince de PEI-cellulose. Depuis, notre technique a été améliorée et appliquée au fractionnement des hydrolysats enzymatiques des ADN, en vue de la détermination de leur composition nucléotidique. Les dosages des nucléotides sont effectués par spectrophotométrie directe des plaques et les résultats sont précis et reproductibles.

Chromatographie

Nous utilisons des plaques de PEI-cellulose F⁺ Merck (réf. 5725/0025). Les dépôts sont effectués à 2 cm du bord inférieur de la plaque sur 1 cm de longueur et 3 mm de largeur. Quatre dépôts espacés de 2,5 cm peuvent être effectués sur une plaque. Le solvant chromatographique est une solution de formiate d'ammonium 0,5 M de pH 6,2-6,5 que l'on fait migrer jusqu'au sommet de la plaque.

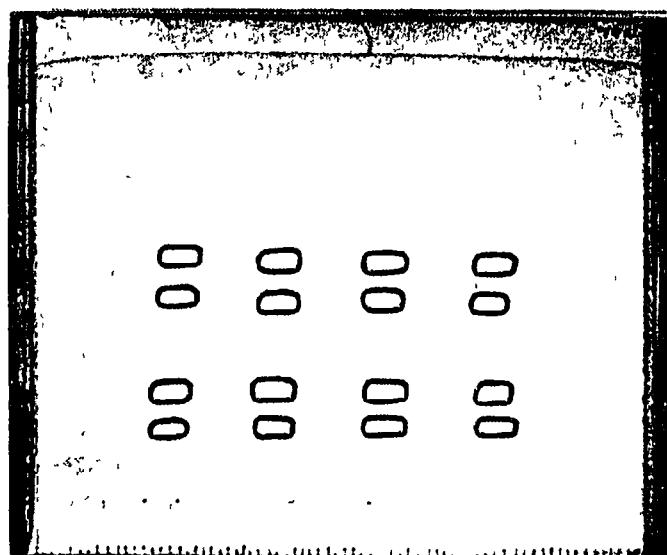


Fig. 1 Séparation des quatre désoxyribonucléotides sur couche mince de PEI-cellulose. De bas en haut dGMP, dAMP, dCMP, dTMP.

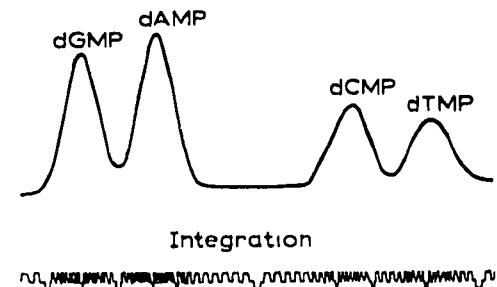


Fig. 2. Diagramme obtenu après enregistrement d'une chromatoplaque au spectrophotomètre intégrateur Vernon.

Après séchage sous un courant d'air froid, l'emplacement des nucléotides est repéré en lumière UV à 254 m μ (lampe Camag) (Fig. 1). Les chromatoplaques sont lues au spectrophotomètre enregistreur intégrateur Vernon en transparence (source UV; largeur de fente maximum 5; hauteur de fente 2 cm; sensibilité maximum; vitesse d'avance R; densité 0,3; filtre jaune; absorption rapide).

Le diagramme obtenu (Fig. 2) permet de connaître les surfaces des pics des différents nucléotides, et de calculer les quantités de chacun de ces nucléotides.

Étalonnage du spectrophotomètre

Dans un premier temps nous avons vérifié que les surfaces des pics sont proportionnelles aux quantités des différents nucléotides.

Préparation de solutions titrées de nucléotides. 10 mg environ de chaque nucléotide* sont dissous séparément dans 5 ml d'eau distillée. La concentration exacte de ces solutions en μ moles/ml est déduite des dosages de phosphore effectués en triple exemplaire sur 1 ml de chaque solution. Les dosages de phosphore sont effectués selon une modification de la méthode d'ALLEN²:

minéralisation de 1 ml de la solution nucléotidique par 2 ml de mélange destructeur $\text{SO}_4\text{H}_2\text{-ClO}_4\text{H}$ (3:2) pendant 2 h sur une rampe électrique;

hydrolyse des polyphosphates par 30 ml d'eau distillée à l'étuve à 80° pendant 2 h;

addition d'eau distillée qsp 50 ml;

dosage du phosphore sur 10 ml (en tube jaugé de 15 ml); addition de 1 ml de molybdate d'ammonium à 8.3% et 1 ml de solution d'amidol à 1% préparée extemporanément dans du sulfite de sodium à 20%. On ajoute de l'eau distillée pour compléter à 15 ml.

La coloration bleue se développe pendant 30 min à l'obscurité et les lectures sont faites à 650 m μ en cuve de 1 cm au spectrophotomètre (Jobin et Yvon). L'étalonnage préalable de l'appareil a été effectué avec des solutions de phosphate monopotassique.

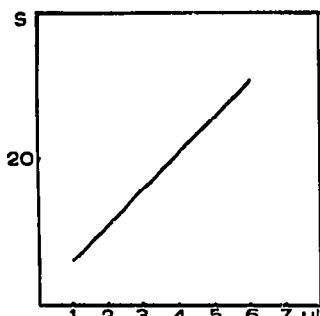


Fig. 3

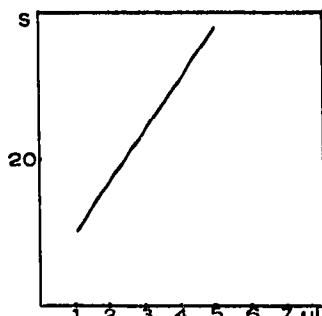


Fig. 4

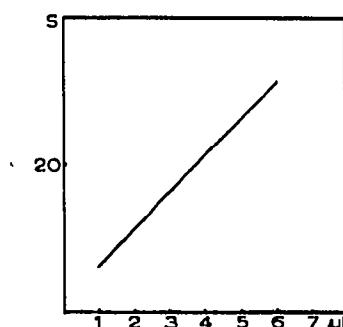


Fig. 5

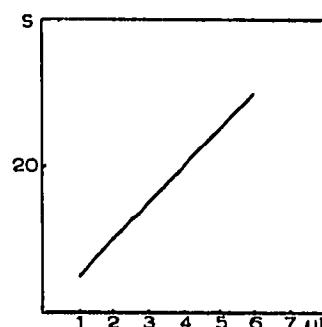


Fig. 6

Fig. 3-6. Relation entre la surface des pics et le nombre de nanomoles déposées. Fig. 3: 1 μ l dGMP = 3.966 nmoles; Fig. 4: 1 μ l dAMP = 5.384 nmoles; Fig. 5: 1 μ l dCMP = 5.904 nmoles; Fig. 6: 1 μ l dTMP = 4.880 nmoles.

* Sels sodiques ou ammoniques de désoxyribonucléotides purs (Sigma).

TABLEAU I

DÉTERMINATION DU COEFFICIENT K DE L'ACIDE DÉSOXYGUANOSINE-5'-MONOPHOSPHATE

Dépôts (en μl)	Nanomoles ^a	Surface des pics ^b	K^c
1	3.966	6	1.260
2	7.932	11	1.260
3	11.898	16	1.260
4	15.864	21	1.260
5	19.830	26	1.260
6	23.796	31	

^a Valeurs déduites des dosages de phosphore^b Les nombres de la colonne correspondent aux indications fournies par l'intégrateur du spectrophotomètre Vernon^c Ce coefficient (voir texte plus haut) est calculé pour chaque portion de courbe comprise entre deux points expérimentaux successifs.

$$\text{Exemple: } \frac{11-6}{3.966} = 1.260.$$

Préparation des plaques de chromatographie en couches minces. Nous avons effectué, sur couche mince de PEI-cellulose, à l'aide d'une micropipette (Glassfilm) des dépôts de 1, 2, 3, 4, 5 et 6 μl de chaque solution de nucléotide pur.

Après la migration du formiate d'ammonium et séchage, l'enregistrement est effectué, comme nous l'avons décrit plus haut. Nous avons tracé les courbes des surfaces des pics en fonction du nombre de nanomoles déposées pour chacun des quatre nucléotides. Ceci nous a permis de déterminer la quantité minimale à déposer pour obtenir un résultat valable; ceci nous a permis aussi d'évaluer un coefficient (K) qui relie la surface des pics au nombre de nanomoles pour chaque nucléotide (voir Fig. 3-6 et Tableaux I-IV), coefficient qui dépend très étroitement des conditions expérimentales décrites dans ce texte. Le coefficient K de chaque nucléotide pour tous les intervalles expérimentaux étudiés (voir Tableaux) est toujours constant.

TABLEAU II

DÉTERMINATION DU COEFFICIENT K DE L'ACIDE DÉSOXYADÉNOSINE-5'-MONOPHOSPHATE

Dépôts (en μl)	Nanomoles	Surface des pics	K
1	5.384	10	1.300
2	10.768	17	1.300
3	16.152	24	1.300
4	21.536	31	1.300
5	26.920	38	

TABLEAU III

DÉTERMINATION DU COEFFICIENT K DE L'ACIDE DÉSOXYCYTIDINE-5'-MONOPHOSPHATE

Dépôts (en μl)	Nanomoles	Surface des pics	K
1	5.904	6	0.846
2	11.808	11	0.846
3	17.712	16	0.846
4	23.616	21	0.846
5	29.520	26	0.846
6	35.424	31	

Hydrolyse enzymatique des ADN

L'hydrolyse des ADN est effectuée par la désoxyribonucléase I (3-I-4-5) et la phosphodiesterase de venin de serpent (3-I-4-1) selon le protocole suivant: 2 mg d'ADN sont dissous dans 0.2 ml de tampon Tris/HCl 0.002 M , de pH 7.2 contenant du chlorure de magnésium 0.01 M , dans un tube à hémolyse, à la température du laboratoire. On ajoute 0.1 ml d'une solution de DNase I* (correspondant à 1200 unités) et on porte à 37° pendant une nuit. Le lendemain, le pH est ajusté à 9 avec de la NaOH 0.1 N et on ajoute 0.1 ml d'une solution de phosphodiesterase de venin de serpent** (5 mg/0.5 ml eau). Après incubation à 37° pendant 2 h, l'hydrolyse de l'ADN est totale et on peut procéder au fractionnement des désoxyribonucléosides 5'-phosphate sur couche mince de PEI-cellulose selon la technique décrite plus haut (dépôt de 5 μl sur 1 cm).

TABLEAU IV

DÉTERMINATION DU COEFFICIENT K DE L'ACIDE DÉSOXYTHYMIDINE-5'-MONOPHOSPHATE

Dépôts (en μl)	Nanomoles	Surface des pics	K
1	4.880	5	1.024
2	9.760	10	1.024
3	14.640	15	1.024
4	19.520	20	1.024
5	24.440	25	1.024
6	29.280	30	

* DNase I (DNEP) de Sigma Chemical Company, 3500 Dekalb Street, St.-Louis, Mo. 63118, U.S.A.

** Phosphodiesterase de venin de serpent (activité spécifique 0.3) Schwarz représenté en France par BD-Mérieux, Marcy-l'Étoile (69), France

Dans un premier temps, il est préférable de faire migrer de l'eau distillée sur la plaque pour vérifier l'absence de nucléosides, qui ne sont pas fixés sur la PEI-cellulose et sont entraînés par l'eau et pour éliminer les cations qui peuvent gêner la chromatographie.

Cette technique a été mise au point sur l'ADN de thymus de veau; son application aux ADN des virus et des ADN des mitochondries de foie de cobaye est actuellement en cours d'étude.

*Université de Lille,
Laboratoire de Chimie Biologique,
Place de Verdun, Lille (France)*

P. DERUMEZ
G. BISERTE*

- 1 P. DERUMEZ ET G. BISERTE, *J. Chromatog.*, 31 (1967) 598.
2 R. J. L. ALLEN, *Biochem. J.*, 34 (1940) 858.

Reçu le 6 mars 1970

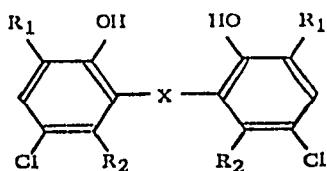
* Avec la collaboration technique de Mademoiselle A. HEMEZ.

J. Chromatog., 49 (1970) 563-567

CHROM. 4696

The use of acid dissociation constants in selecting buffers to effect the electrophoretic separation of bithionol, fenticlor, hexachlorophene, bromchlorophene, dichlorophene, tetrachlorophene and 4-hexylresorcinol

Halogenated *o,o'*-dihydroxydiphenyl sulphides and methanes are important compounds pharmaceutically, and hexachlorophene in particular has found widespread use in medicated soaps, shampoos and toothpastes. Other compounds, including bithionol and fenticlor, are available commercially for use as bacteriostats, fungicides, spermicides and anthelmintics.



Dichlorophene	X = CH ₂ ;	R ₁ , R ₂ = H
Tetrachlorophene	X = CH ₂ ,	R ₁ = Cl, R ₂ = H
Bromchlorophene	X = CH ₂ ,	R ₁ = Br, R ₂ = H
Hexachlorophene	X = CH ₂ ,	R ₁ , R ₂ = Cl
Fenticlor	X = S;	R ₁ , R ₂ = H
Bithionol	X = S,	R ₁ = Cl; R ₂ = H