

Isolierung und Charakterisierung der ribosomalen RNA des Phycomyceten *Allomyces arbuscula*

Isolation and Characterization of Ribosomal RNA from the Phycomycete *Allomyces arbuscula*

P. Fähnrich, H. H. Rothe und M. Trapp

Institut für Botanik und Mikrobiologie der Kernforschungsanlage Jülich

(Z. Naturforsch. 30 c, 302–303 [1975]; eingegangen am 6. Dezember 1974)

Allomyces arbuscula, Ribosomal RNA, Base Composition

The ribosomal RNA of the gametophyte of *Allomyces arbuscula* contains two components with sedimentation coefficients of approximately 25S and 18S. The percent base composition of 25S rRNA is 31/28/24/17 (U/G/A/C), that of 18S rRNA 34/28/22/16.

Im Verlauf von Untersuchungen über RNA-Synthesen während der Differenzierung des Gametophyten von *Allomyces arbuscula*¹ (Blastocladiales) haben wir die Sedimentationskoeffizienten und die Basenzusammensetzung der rRNA bestimmt. Die mit der Methode der PAA-Gel-Elektrophorese erhaltenen S-Werte für die *Allomyces*-rRNA sind 25S und 18,3S (Abb. 1), die entsprechenden Molekulargewichte $1,3 \cdot 10^6$ und $0,72 \cdot 10^6$. Diese Werte stim-

men gut überein mit den nach der gleichen Methode von Lovett und Leaver² gewonnenen Werten für die rRNA von *Blastocladiella emersonii*. Zur Bestimmung der Basenzusammensetzung der Gesamt-rRNA wurde zunächst nach der von Kirby³ entwickelten Isolierungsmethode für rRNA gearbeitet. Die so erhaltenen Präparate von *Allomyces*-rRNA enthielten jedoch noch weitere RNA-Fraktionen, wie PAA-gelelektrophoretische Auftrennungen zeigten. Diese RNA-Fraktionen waren auch dann vorhanden, wenn dem Extraktionsmedium als Ribonuclease-Inhibitor Diäthylpyrocarbonat zugesetzt wurde, oder die Extraktion bei pH 9 und Zusatz von 10^{-3} M CuCl₂ vorgenommen wurde. Unter der letztgenannten Bedingung lässt sich die Aktivität der *Allomyces*-Ribonucleasen fast völlig hemmen⁴. Als Ausgangsmaterial für die Basenbestimmungen wurde gelelektrophoretisch gereinigte rRNA aus isolierten Ribosomen genommen. Die rRNA von *Allomyces arbuscula* zeichnet sich durch einen relativ hohen Gehalt an GU und annähernd gleiche Anteile von Purin- und Pyrimidinnukleotiden aus (Tab. I). Der relativ geringe C-Gehalt und ein Verhältnis von G + C : A + U < 1 („AU-Typus“) scheint für die rRNA der bisher untersuchten Blastocladiales^{5–7} charakteristisch zu sein.

Tab. I. Basenzusammensetzung der rRNA von *Allomyces arbuscula*. Die Werte sind als Mol% Nucleotid \pm Standardabweichungen von jeweils 3 Bestimmungen angegeben.

Nucleotid	rRNA		
	25S + 18S	25S	18S
UMP	30,7 \pm 0,79	31,2 \pm 0,47	34,2 \pm 1,08
GMP	26,9 \pm 0,43	27,5 \pm 0,43	28,0 \pm 0,46
AMP	24,2 \pm 0,59	24,1 \pm 0,58	21,7 \pm 0,57
CMP	18,2 \pm 0,83	17,3 \pm 0,44	15,9 \pm 0,42
G + C/A + U	0,82	0,81	0,79
G + U/A + C	1,36	1,42	1,65
Pu/Py	1,04	1,06	0,99

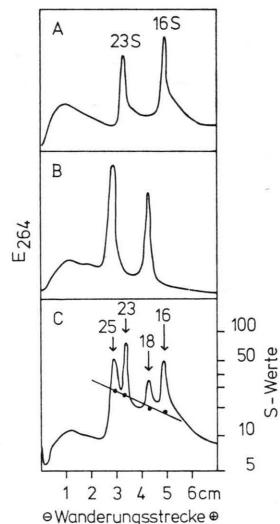


Abb. 1. Charakterisierung phenolextrahierter rRNA aus Gametangien von *Allomyces arbuscula*. A. *E. coli* rRNA, B. *A. arbuscula* rRNA, C. Coelektrophorese von *E. coli* rRNA (10 µg 23S RNA, 20 µg 16S RNA) mit *A. arbuscula* rRNA (50 µg Gesamtnukleinsäuren). PAA-Gel-Elektrophorese: 4 Stunden bei Raumtemperatur, 5 mA/Gel, PAA-Gel Konzentration 2,4%.

Sonderdruckanforderungen an Dr. P. Fähnrich, Institut für Botanik und Mikrobiologie der Kernforschungsanlage Jülich, D-5170 Jülich, Postfach 365.

Experimentelles

Allomyces arbuscula BUTL. wurde nach einer bereits beschriebenen Methode⁸ angezogen.

RNA-Extraktion aus Ribosomen: Zur Isolierung der Ribosomen wurde von 15 g Pilzmycelien (Feuchtgewicht) ausgegangen, die in 90 ml Extraktionspuffer (0,02 M Tris, 0,015 M MgSO₄ · 7 H₂O, 0,1 M KCl, 0,006 M Mercaptoäthanol; pH 7,8) mit einem Sorvall-Omnimixer homogenisiert wurden. Das Homogenat wurde bei $5000 \times g$ zentrifugiert, der Überstand mit Polyvinylsulfat (5 µg/ml) und Triton X (Endkonzentration 1%) versetzt und bei $30000 \times g$ zentrifugiert. Der ribosomenhaltige Überstand wurde mit gepufferter 1 M Saccharose

unterschichtet und die Ribosomen 150 min bei $100000 \times g$ sedimentiert. Die gallertigen, klaren Sedimente wurden in Puffer (0,001 M Tris, 0,004 M MgCl₂; pH 7,5) resuspendiert und nochmals bei $5000 \times g$ zentrifugiert. Danach erfolgte eine Fällung mit Äthanol, der Niederschlag wurde in 0,1 M Trispuffer (pH 9) aufgenommen und mit einem mit 0,1 M Trispuffer gesättigtem Chloroform-Phenolgemisch (1:1) zweimal deproteinisiert. Die rRNA wurde mit Äthanol gefällt.

Polyacrylamidgel-Elektrophorese: Die PAA-Gel-Elektrophorese erfolgte nach Loening⁹. Die Sedimentationskoeffizienten der rRNA von *Allomyces arbuscula* wurden durch Coelektrophorese mit 23S und 16S RNA von *Escherichia coli* (rRNA aus RNase I-freien *E. coli*, Miles Laboratories, Inc.) ermittelt. Die Nucleinsäuren von *Allomyces arbuscula*

und *Escherichia coli* wurden entweder im gleichen Gel oder parallel in verschiedenen Gelen in der gleichen Kammer getrennt.

Basenbestimmung: Die rRNA-Fraktionen wurden nach der Densitometrie bei 264 nm (Joyce-Loebl Chromoscan) aus den Gelen herausgeschnitten, mit 2 ml 0,1 SSC/cm³ Gel (0,1 SSC = $1,5 \cdot 10^{-2}$ M NaCl, $1,5 \cdot 10^{-3}$ M Natriumcitrat) eluiert und mit Äthanol gefällt. Die Hydrolyse der Nucleinsäuren (500–600 µg) erfolgte 18 Stunden in 0,3 N KOH bei 37 °C. Die Basenbestimmungen wurden nach Katz und Comb⁵ ausgeführt, die Trennung der Nucleotide erfolgte an Austauscherharz Dowex 50 Wx8, 200–400 mesh (H⁺-Form), und wurde mit einem Uvicord-Monitor mit angeschlossenem Schreiber kontinuierlich registriert.

¹ P. Fähnrich, Arch. Microbiol. **99**, 147 [1974].

² J. S. Lovett u. C. J. Leaver, Biochim. Biophys. Acta **195**, 319 [1969].

³ K. S. Kirby, Biochem. J. **96**, 266 [1965].

⁴ P. Fähnrich u. H. H. Rothe, unveröffentlicht.

⁵ S. Katz u. D. G. Comb, J. Biol. Chem. **238**, 3065 [1963].

⁶ G. Turian, Path. Microbiol. **28**, 58 [1965].

⁷ S. A. Bruce u. J. P. Mascarenhas, J. Cell Biol. **59**, 36 a [1973].

⁸ P. Fähnrich, Arch. Microbiol. **98**, 85 [1974].

⁹ U. E. Loening, Biochem. J. **102**, 251 [1967].