

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

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

P. Fährnich, H. H. Rothe und M. Trapp

Institut für Botanik und Mikrobiologie der Kernforschungs-
anlage 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 (Blastocladales) 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-

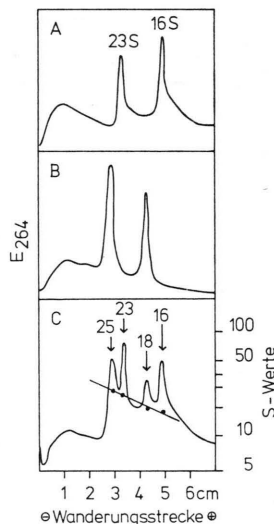


Abb. 1. Charakterisierung phenolextrahierter rRNA aus Gametangien von *Allomyces arbuscula*. A. *E. coli* rRNA, B. *A. arbuscula* rRNA, C. Coelektrophorese von *E. coli* rRNA (10 µg 23S RNA, 20 µg 16S RNA) mit *A. arbuscula* rRNA (50 µg Gesamtnucleinsäuren). PAA-Gel-Elektrophorese: 4 Stunden bei Raumtemperatur,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

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

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 GesamtrRNA wurde zunächst nach der von Kirby³ entwickelten Isolierungsmethode für rRNA gearbeitet. Die so erhaltenen Präparate von *Allomyces*-rRNA enthielten jedoch noch weitere RNA-Fractionen, wie PAA-gelelektrophoretische Auftrennungen zeigten. Diese RNA-Fractionen 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 Pyrimidinnucleotiden 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 Blastocladales^{5–7} charakteristisch zu sein.

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

Nucleotid	rRNA		
	25S + 18S	25S	18S
UMP	30,7 ± 0,79	31,2 ± 0,47	34,2 ± 1,08
GMP	26,9 ± 0,43	27,5 ± 0,43	28,0 ± 0,46
AMP	24,2 ± 0,59	24,1 ± 0,58	21,7 ± 0,57
CMP	18,2 ± 0,83	17,3 ± 0,44	15,9 ± 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

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 × g zentrifugiert, der Überstand mit Polyvinylsulfat (5 µg/ml) und Triton X (Endkonzentration 1%) versetzt und bei 30000 × 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 $MgCl_2$; 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-Fractionen 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. Fährnich, 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. Fährnich 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. Fährnich, Arch. Microbiol. **98**, 85 [1974].

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