

降解 DNA 为 5'-脱氧单核苷酸的菌种筛选*

上海市第十二制药厂
上海市鱼品加工厂
上海市工业微生物研究所

从土壤样品中分离到 1000 余株霉菌、放线菌和细菌。测定它们降解热变性 DNA 能力的结果指出, 5 株霉菌和 14 株放线菌降解能力较强, 其中 *M₁₁₁* 霉菌降解能力最强, 经鉴定为烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus* Fresenius)。这株菌降解 DNA 的产物经过纸电泳、纸层析、离子交换柱层析和特异性酶分析, 证明为 dAMP、dGMP、dCMP 和 dTMP。

脱氧单核苷酸及其衍生物是生物学研究中常用的重要试剂, 近年来又普遍用于制取药物^[1]。脱氧尿嘧啶核苷酸和脱氧胞嘧啶核苷酸的衍生物是一类抗病毒药物^[2-4]。脱氧核苷酸注射液用于医治白血球细胞减少症, 在临床上对再生障碍性贫血、血小板减少、肝炎等病症也有一定疗效。用微生物降解 DNA 制取脱氧单核苷酸的方法为大量制取这类药物创造了条件。本文报道降解 DNA 为脱氧单核苷酸的菌种筛选方法和结果。

降解 DNA 菌种的筛选

一、培养基

分离霉菌用的固体培养基组分(%): 蔗糖 5, 黄豆粉 1, 可溶性淀粉 1, 玉米浆 0.1, NaNO_3 0.2, KCl 0.1, KH_2PO_4 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, 琼脂 2, pH 6.0—6.5。分离放线菌用的固体培养基组分(%): 葡萄糖 3, 淀粉 1, 黄豆粉 2, 蛋白胨 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, CaCO_3 0.6 (单独灭菌), 琼脂 2, pH 7.8—8.0。分离细菌用的固体培养基组分

(%): 葡萄糖 5, 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.4, K_2HPO_4 0.05, KH_2PO_4 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 琼脂 2, pH 6.5。以上三种培养基在 121°C 灭菌 20 分钟。

将分离的霉菌移接入察氏琼脂培养基斜面上, 30°C 培养 7 天后备用; 放线菌移接入高氏培养基斜面上 (培养基成分增加葡萄糖 0.03% 及酪朊 0.05%), 30°C 培养 7 天后备用; 细菌接入牛肉膏—酵母膏培养基斜面上 (培养基成分增加玉米浆 0.5%、尿素 0.2 及 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%), 30°C 培养 1 天后备用。

发酵培养基组分同固体培养基, 减去琼脂。

本文于 1975 年 5 月 30 日收到。

* 本文所用缩写符号:

- DNA 脱氧核糖核酸
- DNase 脱氧核糖核酸酶
- DNase I 脱氧核糖核酸酶 I
- rNA 核糖核酸
- dAMP 5'-脱氧腺嘌呤核苷酸
- dGMP 5'-脱氧鸟嘌呤核苷酸
- dTMP 5'-脱氧胸腺嘧啶核苷酸
- dCMP 5'-脱氧胞嘧啶核苷酸
- 3'CMP 3'-胞嘧啶核苷酸
- 5'CMP 5'-胞嘧啶核苷酸
- CR 胞嘧啶核苷

二、发酵及酶液的制备

在 500 毫升三角瓶中盛发酵培养基 70 毫升, 接入斜面种子一环。霉菌和放线菌在旋转式摇床(频率 224 次/分)、细菌在往复式摇床(振幅 7.5 厘米、频率 124 次/分), 30°C 振荡培养 72 小时。霉菌和放线菌的发酵液用双层纱布滤去菌体, 细菌发酵液于 3000 转/分离心分离菌体。除菌后的清液即作为酶液。

三、酶降解试验

1. DNA 的热变性处理: 取小牛胸腺 DNA (上海牛奶公司综合厂) 或鱼精 DNA (上海市鱼品加工厂) 配成 1% (W/V) 溶液, 在沸水浴中煮 15 分钟, 然后投入冰浴中迅速冷却。

2. DNA 含量的测定: 用光谱法测定 DNA 含量。我们所选择的二个常数 ($M-327, \epsilon(p)-6650$) 用于 DNA 的计算, 其结果与定磷法和 Lacks 等^[5] 报道的 50 微克/毫升的 DNA 在 260 毫微米测定光密度等于 1, 近乎一致。

用于光谱测定的公式依据 Chargaff 和 Zamenhof 的假定:

$$\epsilon(p) = \frac{A^{[6]}}{c \cdot d}$$

A —紫外测定的消光总值, 一般计算式为: $A = OD_{\lambda} \cdot D \cdot V_{\lambda}$ (OD_{λ} —特定波长测定的消光值, D —稀释倍数, V_{λ} —测定溶液的总体积)。

d —紫外测定比色杯厚度, 通常为 1 厘米。

c —每升中磷的克原子数, 即克分子浓度 W_1 克/M, 代入

$$\epsilon(p) = \frac{A}{W_1 \text{ 克/M}} = A \cdot M / W_1 \text{ 克}$$

$$W_1 \text{ (克)} = A \cdot M / \epsilon(p)$$

$$W_1 \text{ (微克)} = \frac{A \cdot M \cdot 10^6}{\epsilon(p)}$$

每毫升测定溶液所含 DNA 微克数:

$$W_1 \text{ (微克)} = \frac{A \cdot M \cdot 10^6}{\epsilon(p)} / 10^3 \\ = \frac{A \cdot M}{\epsilon(p) \times 10^{-3}}$$

如 A 值包括测定溶液的总值, 则 DNA 总微克数:

$$W_1 \text{ (微克)} = \frac{OD_{\lambda} \cdot M \cdot D \cdot V}{\epsilon(p) \times 10^{-3}}$$

3. 酶解反应与酸溶性核苷酸类物质的

测定: 取 1% (W/V) 热变性处理 DNA 0.25 毫升, 加 0.5M pH7.5 Tris 缓冲液 1.25 毫升, 酶液 0.5 毫升, 37°C 保温 2 小时, 加入 UPCA (0.25% 醋酸铀在 2.5% 过氯酸中) 2 毫升, 迅速摇匀, 混和物在冰浴中静置 10 分钟, 离心 (3000 转/分) 除去沉淀, 取上清液 0.2 毫升, 用 0.01N 盐酸稀释至 3 毫升, 测定酸溶性核苷酸类物质在 260 毫微米的光密度。空白对照则先加 UPCA 后加酶液, 其他相同。用二者之差表示酶反应结果。以生成酸溶性核苷酸的多少表示各菌株所产 DNase 的降解效果。我们也曾采用测定 DNase 活力的方法^[7] 与之比较, 结果一致。

四、筛选结果

用上面叙述的几种培养基和方法对从我国一些地区的土壤中所分离到的霉菌、放线菌和细菌进行试验。结果发现在 1000 株分离菌中, 霉菌的 15%、放线菌的 20% 能产生 DNase。降解热变性 DNA 效果较好的有 19 株, 属于放线菌的有 14 株, 属于霉菌的有 5 株 (表 1)。而在约 400 余株细菌中未发现对热变性 DNA 降解效果较好者。

为了筛选把热变性 DNA 降解为 4 个脱氧单核苷酸的菌种, 我们用纸层析法对 19 株菌的降解产物进行了分析。取酶液

表 1 降解热变性 DNA 的微生物

菌株编号	类 群	紫 外 吸 收		纸层析 斑点数	
		最高吸收峰 (pH 2.5) (毫微米)	O. D (260毫微米)		
9	放	260	0.95	5	
590		252	0.82	3	
637		260	0.88	5	
730		260	0.74	5	
780		260	0.96	5	
892		260	0.93	5	
1081		线	265	0.87	4
1093			260	1.02	5
1094			260	0.92	5
1095			260	0.83	7
1123	菌	260	0.78	4	
1127		260	0.86	7	
1199		260	0.94	5	
1756		260	1.02	6	
104		霉	273	0.90	—
108	260		0.95	6	
996	260		0.95	4	
1030	菌		260	0.83	4
1101		260	0.93	5	

表 2 把热变性 DNA 降解成 4 个脱氧核苷酸的菌株

菌 株	纸层析斑点及其紫外吸收		
	斑点比移值 (Rf)*	最高紫外吸收峰 (pH 2.0) (毫微米)	
放 线 菌	H ₁₀₈₁	0.217	262
		0.325	250
		0.460	268
		0.580	280
	H ₁₁₂₃	0.183	262
	0.294	255	
	0.420	268	
	0.550	280	
霉 菌	M ₉₉₆	0.288	262
		0.408	265
		0.530	268
		0.650	280
	M ₁₀₃₀	0.304	260
	0.44	253	
	0.550	268	
	0.740	279	

* 4 种脱氧核苷酸的文献比移值^[2]: dAMP 0.22, dGMP 0.37, dTMP 0.51, dCMP 0.66.

0.1—0.2 毫升, 点样于新华滤纸, 然后在脲和硫酸铵、0.1M 醋酸铵 (pH 6.2)、异丙醇 (79:19:2) 溶剂系统中, 于 18—20℃ 上行展层 12—15 小时。在紫外光灯下确定紫外吸收斑点的位置和数目。

结果如表 2 所示。降解产物仅为 4 个斑点的有 2 株放线菌 (H₁₀₈₁ 及 H₁₁₂₃) 和 2 株霉菌 (M₉₉₆ 及 M₁₀₃₀)。根据酶解试验, 证明 M₉₉₆ 菌株所产生的酶液降解热变性 DNA 所形成的酸溶性核苷酸量最多。此外, 还发现 M₉₉₆ 也能降解 RNA 生成 5'-核苷酸, 但降解温度超过 50℃ 时, 此酶就丧失活力。M₉₉₆ 菌株的发酵液中至少包括 DNase 和磷酸二酯酶两种核酸降解酶, 否则它不可能也降解 RNA 成单核苷酸^[3]。

五、M₉₉₆ 菌株的鉴定

以察氏琼脂培养基及麦芽汁琼脂培养

基对 M₉₉₆ 菌进行培养。菌落生长较快, 绒状, 烟绿色, 背面浅棕红色; 分生孢子头短柱状, 长 40—85 微米, 宽 14—43 微米; 分生孢子梗短, 壁光滑, 长 140—420 微米, 宽 4—5.5 微米; 顶囊烧瓶形, 直径 11—19 微米; 小梗单层, 5—7 × 2—2.5 微米。分生孢子球形, 绿色, 有细刺, 直径 2—3 微米。经鉴定, 确认 M₉₉₆ 菌为烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus* Fresenius)^[9]。

M₉₉₆ 菌降解热变性 DNA 的产物分析

一、纸电泳法

将 M₉₉₆ 菌降解热变性 DNA 的酶解液点在滤纸的 $\frac{1}{2}$ 处, 点样处放在近负极端, 点样量 10 微升 (含 100 微克脱氧核苷酸), 电泳槽样品泳距 16 厘米, 两极电压 500 伏特, 在

0.1M 柠檬酸缓冲液(pH 3.5)中,电泳 2—3 小时,取出,干燥,在紫外灯下观察,结果是降解产物由负极向正极泳动,显示出 4 个紫外吸收斑点。由其位置判明,从负极到正极依次为 dCMP、dAMP、dTMP、dGMP。

二、纸层析法

同前“降解 DNA 菌种的筛选”所述方法。

三、脱氧核糖的鉴定

经纸层析或纸电泳所分离获得的四个紫外吸收斑点用半胱氨酸法^[10]显色,呈粉红色反应,证明为脱氧核糖。

四、产物的紫外吸收光谱

酶解样品经纸层析或纸电泳分离后,于紫外灯下标出斑点位置,算出比移值(Rf),然后将斑点剪下,用 0.01N 盐酸室温浸泡 2 小时,在 200—350 毫

微米的紫外光波长区域中作全波扫描(图 1)。

根据图 1 紫外吸收光谱计算得到的数据列于表 3。

表 3 说明,实测值符合文献值。

另外,根据 pH2 各脱氧单核苷酸紫外吸收峰的克分子消光系数计算含量^[11]。

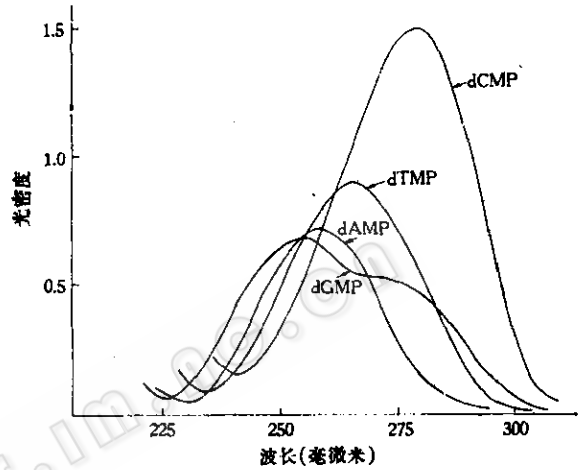


图 1 DNA 降解产物的紫外吸收曲线

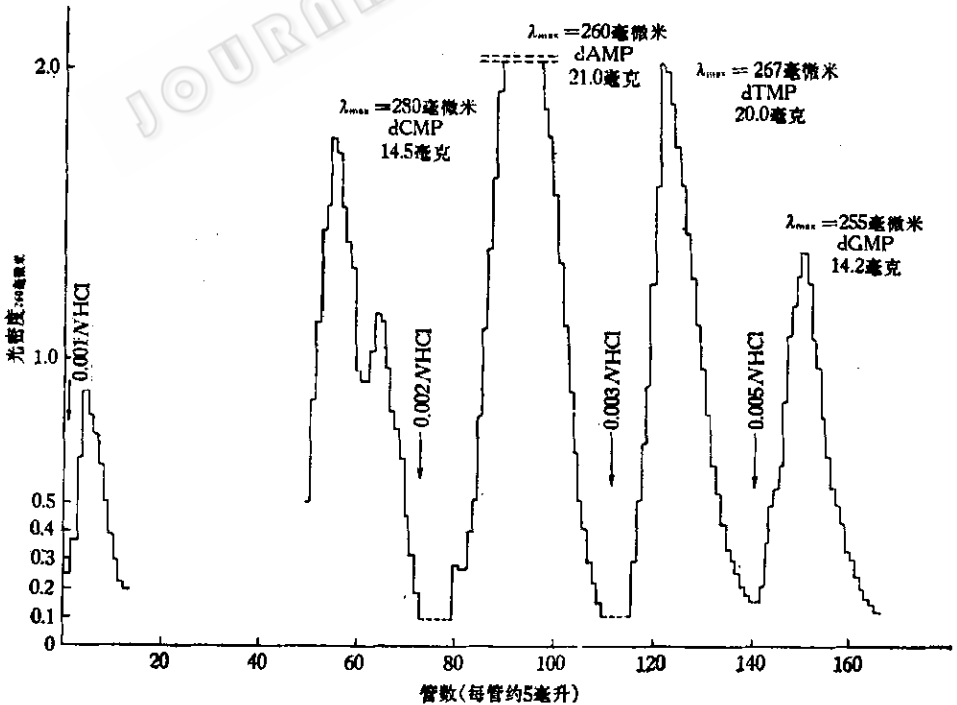


图 2 DNA 降解液离子交换树脂的层析图

表 3 4种脱氧单核苷酸的紫外吸收特性 (pH 2)

名 称	实测值或文献 ^[11] 值	最高吸收峰 (毫微米)	最低吸收峰 (微毫米)	250/260	280/260	290/260
dAMP	实 测 值	260		0.84	0.21	
	文 献 值	258		0.82	0.23	
dGMP	实 测 值	255		1.00	0.72	0.44
	文 献 值			1.03	0.70	0.46
dTMP	实 测 值	267		0.62	0.71	0.22
	文 献 值	267		0.65	0.72	0.23
dCMP	实 测 值	280	240	0.43	1.97	1.41
	文 献 值	280	241	0.46	2.12	1.55

五、离子交换树脂柱 分析法^[12]

将酶解液加热使酶失活, 离心弃去沉淀, 用氨水调 pH 9.3—9.5, 上强碱性阴离子交换树脂(201 × 7, 150—250 目, 氯型)柱, 然后用与树脂等体积的水洗, 再以 0.01N NH₄Cl 洗脱, 直至 pH 下降到 7.5 左右, 开始用 0.001N、0.002N、0.003N、0.005N 的稀盐酸分步洗脱, 则可分别洗下 4 个脱氧单核苷酸(图 2)。

由图 2 的 4 个峰形的紫外吸收特性, 分别被鉴别为 dCMP、dAMP、dTMP 及 dGMP。

六、四种单核苷酸的比例

根据多次试验, 脱氧单核苷酸的产量为:

$$dAMP \cong dTMP > dCMP \cong dGMP$$

其中 dCMP 与 dGMP 之和占总脱氧单核苷酸的 40% 左右。具体数据列于表 4, 这些数值不仅符合 DNA 的结构模式^[13], 而且证实了酶降解的完全程度。

七、d-5'-核苷酸的 酶法鉴定

1. 菌种: 用上海工业微生物研究所保

表 4 M₉₉₆ 菌降解 DNA 所得各脱氧单核苷酸数量

数量 (毫克)	产物			
	dCMP	dAMP	dTMP	dGMP
试验次数				
1	14.5	21	20.4	14.2
2	5.2	13.4	11.9	4.9
3	6.3	11.5	9.7	7.8

藏的青霉菌 (*Penicillium* sp.) M₇₁ 号。

2. 培养基(%): 蔗糖 5, 蛋白胨 0.5, KH₂PO₄ 0.05, K₂HPO₄ 0.05, MgSO₄·7H₂O 0.04, ZnSO₄·7H₂O 0.02, CaCl₂ 0.04, 灭菌前用 6N NaOH 调节 pH 6.0。

3. 发酵及 d-5'-核苷酸的鉴定: 500 毫升三角瓶装 70 毫升培养基, 在 121℃ 灭菌 20 分钟, 接 M71 菌斜面孢子一环, 在旋转式摇床, 频率 224 次/分, 30℃ 培养 72 小时, 用双层纱布过滤, 除去菌体的清液即酶液。此酶液在 pH 5.0, 70—75℃ 能专一地降解 3'-核苷酸成核苷与无机磷, 而对 5'-核苷酸则无作用。对其酶降解液测无机磷或进行纸层析(正丁醇: 0.6N 氨水=6:1)鉴定, 即可确认是 3'-单核苷酸或是 5'-单核苷酸。

由结果可知, 青霉菌 M₇₁ 酶液不能分解 M₉₉₆ 菌降解 DNA 的产物 dCMP 为 CR 和无机磷酸, 从反面证明 M₉₉₆ 菌降解热变

性 DNA 所生成的 4 个脱氧单核苷酸均为 5'-核苷酸。

结 束 语

总之,通过以上几方面的分析鉴定,肯定了烟曲霉 *M₉₉₆* 降解 DNA 的产物是 d-AMP、dGMP、dCMP 和 dTMP。试验还证明该菌对热变性 DNA 的降解效率达 90% 左右,同文献报导的黄柄曲霉 (*Aspergillus flavipes*)^[14] 和栎曲霉 (*Aspergillus quercinus*)^[7] 的 60—70% 和 82% 的降解效率相比,该菌是优越的。而且该菌具有发酵稳定、不易污染杂菌、酶降解产物重复性良好的特点。经试验,对鱼精组织直接进行降解,也取得了一定效果。

参 考 资 料

- [1] Shen, T. Y.: *Angewandte Chemie*, 9 (9): 678—688, 1970.
- [2] Kavfman, H. E. et al.: *Boston Arch. Ophthalmol.*, 68: 235—239, 1962.
- [3] Kavfman, H. E. and Heidelberger, C.: *Science*, 145: 585, 1964.
- [4] Shen, T. Y. et al.: *J. Med. Chem.*, 9: 366—369, 1966.
- [5] Lacks, S. and Greenberg, B.: *J. Biol. Chem.*, 242 (13): 3108—3120, 1967.
- [6] Chargaff, E. and Davidson, J. N.: *The Nucleic Acid Chemistry and Biology*, Vol. 1, Academic Press, Inc. Publishers, New York, 1955, 黄德民译: 核酸(第一卷), P. 577, 北京, 科学出版社, 1963.
- [7] Nakao, Y. and Ogata, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 27 (7): 491—498, 1963.
- [8] McDonald, M. R.: *Methods of enzymology II*, pp. 437—447, McCollum Pratt Institute, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, 1955.
- [9] Raper, K. B. and Fennell, D. I.: *The Genus Aspergillus*, pp. 242—246, Baltimore, The Williams & Wilkins Co., 1965.
- [10] Stumpe, P. K.: *J. Biol. Chem.*, 169: 367—371, 1947.
- [11] Dawson, R. M. C. et al. ed.: *Data for Biochemical Research*, (2nd. Ed.) pp. 169—179, Oxford At The Clarendon Press, 1969.
- [12] Shemin, D.: *Biochemical Preparations*, Vol. 5 pp. 40, New York, John Wiley and Sons. Inc. London, Chapman and Hall. Limited, 1957.
- [13] Watson, J. D. and Crick, F. H. C.: *Nature*, 171: 737—738, 1953.
- [14] 绪方浩一等: 特许公报, 7780, 1964.

THE SCREENING OF MICROORGANISMS DEGRADING DNA TO 5'-DEOXYRIBONUCLEOTIDES

SHANGHAI No. 12 PHARMACEUTICAL PLANT

SHANGHAI FISH PRODUCTS PLANT

SHANGHAI INSTITUTE OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

(Shanghai)

Among 1000 strains of molds, actinomycetes, and bacteria, 5 strains of molds and 14 strains of actinomycetes were found to be capable of degrading heat-denatured DNA. The most active one (*M₉₉₆*) has been identified as *Aspergillus fumigatus* Fresenius. The de-

gradation products of DNA by this strain were analysed by paper electrophoresis, paper chromatography, ion-exchange chromatography and specific enzymatic assay and have been proved to be dAMP, dGMP, dCMP and dTMP.