

北京棒状杆菌等五种细菌的 DNA 中 G-C 含量的测定*

周 慧 玲

(中国科学院微生物研究所, 北京)

1. 利用核酸的增色性测定了属于四个属五个种的细菌 G-C 克分子百分数含量, 其中包括一个过去尚未测定 G-C 含量的菌种, 即北京棒状杆菌 ($GC=52.4$)。所有的测定结果表明 G-C 含量是与传统分类允许的范围一致的。
2. 在提取核酸前破坏细胞壁时采用了前人较少使用的超声波法破坏细胞壁。
3. 本试验在比色时小杯上没有加盖, 任其自由蒸发。为此, 本文中提出了一个校正蒸发量的公式。

在 DNA 分子中腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)的克分子数相同, 而鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)的克分子数也相同, 即 $A = T$, $G = C$, 它们之间两两成对地维持着 DNA 分子的双螺旋结构, 一般称为碱基对。不同生物种的 DNA 中两种碱基对的数量或比例可能是相同的, 也可能是不相同的; 而碱基对的数量或比例不相同的生物种肯定其亲缘关系较为疏远^[1,2]。DNA 中核苷酸碱基对的数量和比例在细胞中是稳定的, 不受菌龄、外界环境条件的影响。因此可以利用 G-C 克分子百分比来判别生物系统发育中的亲缘关系。目前, 推算 DNA 中 G-C 克分子百分数含量的方法有用紫外分光光度计测定 T_m (解链温度) 值, 梯度密度离心, 化学分析等方法。本文采用紫外分光光度计测定 T_m 值法, 使双螺旋的 DNA 经加温变性后解离成单链。由于 G 与 C 之间有三个氢键, A 与 T 之间只有两个氢键, 因此 DNA 中 G-C 碱基对含量百分比高的必然其 T_m 值也较高。根据碱基对分开后的增色性就能由 T_m 值计算出 G-C 含量。近年来人们广泛使用 G-C 含

量作为一项重要的分子生物学的指标去检查传统细菌分类划分的合理性。

本文以五株细菌作为材料, 对它们的 G-C 克分子百分数作了测定。现将实验结果分述如下:

材 料 和 方 法

材料

应用的菌种共四个属包括五个种, 它们是:

1. 北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense* AS 1.299) 是一株尚未报道过 G-C 含量的种^[3]。
2. 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* AS 1.88) 取自本所菌种保藏组, 作为检验 G-C 测定方法的参比种。
3. 恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 是本组自行分离鉴定的种。
4. 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 这株菌也是本组自行分离鉴定的种。
5. 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 取自本所, 用

本文于 1977 年 10 月 7 日收到。

* 承本所细胞生物学组对本工作给予大力协助, 其中校正蒸发量的公式由徐浩同志提示后采用; 中国科学院化学研究所惠借仪器; 本所余永年同志提出意见。

作参比种。

方法

(一) DNA 的提取: 刮取生长在牛肉汁琼脂平皿培养基上的菌体, 用溶菌酶或超声波破碎细胞壁。基本上依照 Marmur 氏法^[4,5] 提取核酸。

提取步骤见流程 1、2。其中第 2、3、4 三个菌种是用溶菌酶破壁后提取(见流程 1)。第 1、5 二个菌种, 因为溶菌酶对它们的破壁作用效率不高, 故采用超声波破壁(见流程 2)。

流程 1 用溶菌酶破坏细胞壁提取核酸

湿细胞 (1—2 克)

- 离心、洗涤, 悬于 0.15 M NaCl-0.1 M EDTA (pH 8.0) 溶液中 (约 10—20 毫升)。
- 加溶菌酶 10 毫克, 置 37°C 30—60 分钟。
- 加 SDS¹⁾ (25%) 2 毫升, 60°C 10 分钟。
- 加 5 M 的 NaClO₄ (至终浓度为 1 M)。
- 加等体积氯仿-异戊醇 (24:1 V/V), 振摇 20 分钟。
- 离心 (3000 × g, 5 分钟)。

水层

蛋白层

氯仿层

重复 2 次

- 加 2 倍体积乙醇 (95%) 于水层中。
- 用玻棒卷出 DNA 丝。
- 溶于 SSC²⁾ 溶液中。

- 加 RNase (50 微克/毫克) [预先溶于 0.15 M NaCl 溶液 (pH 8.0) 中, 80°C 加热 10 分钟, 以除去可能含有的 DNase], 置 37°C, 30 分钟。
- 加等体积氯仿-异戊醇振摇 15 分钟。
- 离心 (3000 × g, 5 分钟)。

水层

蛋白层

氯仿层

- 加 2 倍体积乙醇 (95%) 于水层中。
- 用玻棒卷出 DNA 丝。

核酸

- 溶于 SSC 溶液中。
- 加 1 毫升 3 M NaAc-0.001 M EDTA (pH 7.0)。
- 边搅边滴加 0.54 体积的异丙醇。
- 用玻棒卷出 DNA 丝。

核酸

- 溶于 SSC 溶液中。

注: 1) SDS: 十二烷基磺酸钠。

2) SSC: 0.15 M NaCl-0.015 M 柠檬酸钠溶液。

G-C 含量有着直线关系。

利用 DNA 双键熔析时出现的增色性测定 DNA 的 T_m 值方法基本上依照 Marmur^[6] 等的报告。将所得的光密度 (A_{t_2}) 除以开始测定时的光密度 (A_{t_1}) 作为纵座标读数, 对着 A_{t_2} 的温度的横座标绘成曲线。取曲线的线性部分的中点定为 T_m 值的点, 依 Marmur 氏的公式:

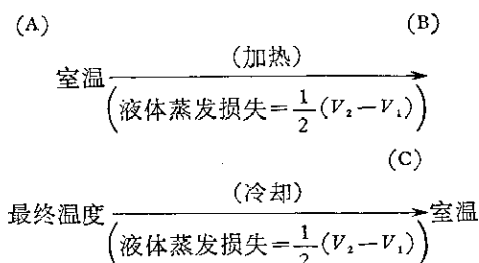
$$T_m = 69.3 + 0.41 (G + C)$$

计算 G-C 的克分子百分数。

在使双链核酸溶解而加温的过程中所记录下来的温度均经标准温度计校正过。

在 T_m 值的测定中, 由于所用的加热器附件是电力直接加热型的, 当采用光通径为 1 厘米的比色杯, 加液量为 3.5—3.6 毫升, 并加盖以防止水分蒸发时, 常常在测定过程中, 比色液有因局部过热而溢出的现象, 为此本实验不能采取加盖的方式。不加盖时, 在加温过程中, 虽可免除液体溢出, 但蒸发损失量较大, 在测定终了, 再冷却到室温测量体积时, 液体损失量达 0.5—0.7 毫升, 即高达 $\frac{0.6}{3.6} = 16\%$ 左右。为此必须在测定终了时加以校正, 即求出测定过程中各个温度时的真正体积, 以校正光密度。本文提出的校正公式只校正蒸发损失量, 而忽略未计热膨胀效应以及蒸发时液体局部浓度改变的可能有的影响, 以此得出了近似的校正值。

本实验过程是先定量地加入比色液, 然后在加热过程中由仪器自动记录其光密度。到实验加温达到最终时, 冷却至室温, 再测出液体的实际损失量 $V_2 - V_1$, 图解如下:



实验过程中测定的损失值是在 (A) 点和 (C) 点做的, 但测定 OD 值时则是在 (A) 及 (B) 之间的, 这一点在校正公式中已考虑到。

公式的推导如下:

在约 100℃ 以下, 液体的蒸发量随温度的不

断上升而匀速增加, 体积 V 随温度 T 而变化, 即

$$\frac{dV}{dT} = -KT$$

而温度 T 又是随时间 t 而变化的, 即有

$$\frac{dT}{dt} = B$$

因此体积的变化应为

$$\frac{dV}{dt} = \frac{dV}{dT} B = \frac{dV}{dT} \frac{dT}{dt} = -KT$$

而

$$\frac{dV}{dT} B = -KT$$

即

$$dV = -\frac{K}{B} T dT = -\frac{K}{2B} dT^2 \quad (1)$$

将 (1) 积分得

$$\int_{V_1}^{V_2} dV = -\frac{K}{2B} \int_{T_1}^{T_2} dT^2$$

得

$$V_2 - V_1 = -\frac{K}{2B} (T_2^2 - T_1^2) \quad (2)$$

由于 T_1 是开始实验的温度 (相当于零点的温度), 它是在体积为 V_1 的条件下决定的起点, 相当于:

$$T_2^2 - T_1^2 = T^2$$

因此 (2) 式应为

$$V_2 - V_1 = -\frac{K}{2B} T^2$$

在实验工作中要先测出损失率 L 即:

$$L = -\frac{K}{2B} = \frac{V_2 - V_1}{T^2}$$

而在计算中则在由上面图解 (A) 到 (B) 的过程里的任何温度时的体积 V_x 应为:

$$V_x = V_1 - \frac{1}{2} L (T_x - T_1)^2$$

求出 V_x 以后再校正因体积减小造成的光密度上升。所求的在校正体积后的光密度 OD_y 应为

$$OD_y : OD_{\text{实验值}} = V_x : V_1$$

亦即

$$OD_y = \frac{OD_{\text{实验值}} \cdot V_x}{V_1}$$

以上是校正公式及校正值。

结 果

用溶菌酶破坏细胞壁提取出的核酸分子较大, 可以用玻璃棒卷出, 在偏光显微镜

下,在起偏振片和偏震分析片正交条件时可以看到发亮的长丝,视野背景全部黑暗(图版 I-1)。反之用超声波破壁取得的核酸断片,在正交条件下也呈双折射现象(图版 I-2)。

当测定核酸增色性时,一般由 60℃ 开始均匀升温,由紫外分光光度计自动记录测定结果,并标出温度。本试验每个菌株的核酸测定在 3 次以上,现将记录曲线的形状以北京棒状杆菌为例示出如下:

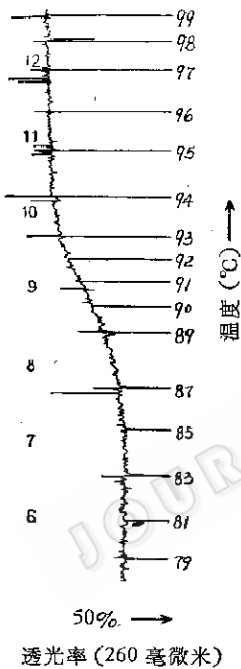


图 1 核酸增色性曲线图

根据增色曲线的数据,经校正及计算后得到显示 T_m 值的特性曲线,见图 2。

曲线的线性部分的中点所对温度即为 T_m 值,本试验计算的各菌种 DNA 的 G-C 克分子百分数含量见表 1。

由表 1 结果看出测定的 G-C 克分子百分数含量与文献报道基本一致^[6-9]。其中北京棒状杆菌的 G-C 含量是第一次报道。前人所测的 G-C 比有许多是用浮力密度法测得的,可参阅引用的有关参考资料。

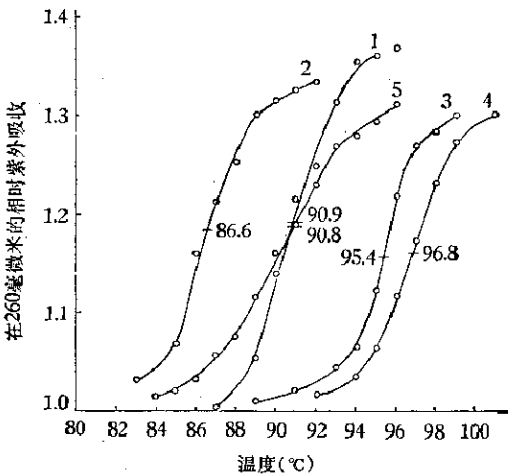


图 2 五个菌种 DNA 增色性曲线(数字示 T_m 值)
曲线号码: 1.北京棒状杆菌,2.枯草芽孢杆菌,3.恶臭假单胞菌,4.铜绿假单胞菌,5.大肠杆菌。

表 1 五种细菌的 DNA 中 G-C 克分子百分数

菌 名	T_m (°C)		% (G-C)		参 考 文 献
	测定值	文献值	测定值	文献值	
北京棒状杆菌	90.8		52.4		
	86.6		42.2		
枯草芽孢杆菌				42—43	[7]
		88.9		47.7	[8]
		87.5		43	[6]
恶臭假单胞菌	95.4		63.7		
				约60—63	[7]
		95.4		63.5	[8]
铜绿假单胞菌		93.4		58.7	[9]
	96.8		67.1		
				约 67	[7]
大肠杆菌		96.7		66.8	[8]
		97.0		66.0	[6]
	90.9		52.7		
大肠杆菌				50—51	[7]
		90.9		52.5	[8]
		90.5		50	[6]

参 考 资 料

- [1] Davidson, J. N.: *The Biochemistry of the Nucleic Acids* Sixth edition, 1969. 中国科学院, 微生物研究所病毒组, 生物物理研究所核酸组译: 核酸的生物化学, 第五章, 科学出版社, 1973.
- [2] Bradley, S. G.: *Adv. Appl. Microbiol.*, 19: 59—61, 1975.
- [3] 陈琦、张震元、李玲阁: 微生物学报, 13: 1—6, 1973.
- [4] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3: 203—218, 1961.
- [5] 微生物学实验法(微生物研究法恳谈会编), pp. 258—261, 397—399, 昭和 51 年。
- [6] Marmur, J. & Doty, P.: *J. Mol. Biol.*, 5: 109—118, 1962.
- [7] Buchanan, R. E. & Gibbons, N. E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. chapter 1, pp. 602, 222, 533, 293.
- [8] De Ley, J., I. W. Park, R. Tijtgat & J. van Ermengem: *J. Gen. Microbiol.*, 42: 43—47, 1966.
- [9] Colwell, R. R., R. V. Citarella & I. Ryman: *J. Bacteriol.*, 90: 1148, 1965.

DETERMINATION OF THE G-C CONTENT OF *CORYNEBACTERIUM PEKINENSE* AND OTHER BACTERIAL SPECIES

Zhou Hui-ling

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

1. Using thermal denaturation method to measure the hyperchromic shift of the double stranded DNA; the author determined the G-C content of *Corynebacterium pekinense*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Ps. aeruginosa* and *Escherichia coli* as follows: 52.4, 42.2, 63.7, 67.1 and 52.7. The G-C content of *C. pekinense* has not been reported previously. As a molecular biological evidence to bacterial taxonomy, the results obtained showed the validity of this method.

2. Using care taking sonic vibration method to disrupt the bacterial cell wall and to determine the G-C content of the extracted DNA, the results obtained are in good agreement with the results obtained by other authors.

3. A new volume, hence O.D., correction formula for the free surface evaporation of the unlidded cuvette during heating for the spectrometric work was proposed and its results obtained were discussed.