

高压液相色谱在测定细菌 DNA 中 G + C 克分子百分数方面的应用

潘星时 韦业成 芦耀波 张宪武

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

应用高压液相色谱对七株不同种的细菌 DNA 中 G + C 克分子百分数进行了测定。试验结果表明, 用 Nucleosil C₁₈ 作固定相, 以反相分配色谱法测定核酸碱基组分, 具有快速简便、灵敏精确的优点。用本法测定 DNA 水解物中 G + C 克分子百分数时, 每种碱基的进样量只需 0.2—1.0 微克, 测定时间仅为 8 分钟, 方法的精确度为 $\pm 1.5\%$ 。

鉴于不同来源的 DNA 中碱基组成的比例各不相同, 而且不同种微生物的 DNA, 其 G + C 克分子百分含量各有恒定值^[1], 它已成为细菌分类鉴定中一项重要的指标^[2]。因此, 研究一种快速、灵敏、准确地测定这一指标的方法, 对提高微生物分类学的研究水平十分重要。现有的测定方法有纸层析法^[3], DNA 的热解链温度 (T_m 值) 测定法^[3], 浮力密度法^[4] 等。这些方法虽有一定的可靠性, 但有的灵敏度较低, 有的操作麻烦, 分析时间长, 有的对仪器设备条件要求高, 不易满足。高压液相色谱是在七十年代初发展起来的新技术, 它克服了经典色谱的弱点, 是快速、灵敏、准确的近代仪器分析方法。1977 年, Ko 等^[5]在用高压液相色谱测定微生物 DNA 中 G + C 克分子百分数时, 采用阳离子交换色谱柱 (Zipax-Scx) 分离, 但胸腺嘧啶 (T) 和尿嘧啶 (u) 两色谱峰未能分开, T 克分子数的测定受到干扰。本文采用 Nucleosil C₁₈ 作固定相, 用反相分配色谱法层析, 克服了 T、u 两峰不易分离的缺点, 而且分析时间较短, 重复性也较好。

材料与 方法

(一) 实验菌株

1. *Bacillus subtilis* 168 枯草芽孢杆菌

2. *Escherichia coli* K₁₂ 大肠杆菌 K₁₂

3. *Azotobacter vinelandii* op 维涅兰德固氮杆菌

4. *Pseudomonas chlororaphis* 绿针假单胞菌

5. *Bacillus megaterium* 巨大芽孢杆菌

6. *Bacillus pumilus* 短小芽孢杆菌

7. *Sarcina lutea* 藤黄八叠球菌

除枯草芽孢杆菌 168 及大肠杆菌 K₁₂ 以外, 其余均为本所菌种组保存。

(二) DNA 样品的制备

培养基成份(克/升): 牛肉膏 3 克, 蛋白胨或多胨 10 克, NaCl 5 克, pH7.0—7.2。固氮菌用修改的 Burk's 培养基。

培养条件: 培养温度为 30℃, 平皿培养或液体振荡培养 14—16 小时。

按照齐藤日向^[6]和阿部美穗子^[7]介绍的方法, 进行细菌 DNA 的抽提。离心收集生长对数期菌体, 用 pH8.0 EDTA-NaCl 溶液洗涤并制成

本文于 1980 年 4 月 1 日收到。

参加本项工作的还有姚志红同志。

菌悬液,按每克湿菌体加 2—3 毫克的比例加入溶菌酶,于 37℃ 水浴处理 20 分钟,移入 -15℃ 冰浴冷冻 10 分钟后加入 SDS 溶液,使溶液中 SDS 最终浓度为 2%,放 60℃ 水浴保温 10 分钟,取出再次冷冻,此时加入等体积冷的水饱和酚 (pH8.0),振荡 15 分钟,于 3500 转/分离心 15 分钟,小心吸取上清液,缓缓加入二倍体积的 95% 冷乙醇,用玻棒卷取 DNA,依次在 70%, 80%, 90% 乙醇中洗涤后,溶于稀的柠檬酸三钠-氯化钠溶液中,即为 DNA 粗制品。将上述 DNA 粗制品的浓度调至约 500 微克/毫升,加入适量事先经 80℃, 10 分钟预处理的 RNA 酶,在 37℃ 水浴保温 1 小时,再重复二次脱蛋白操作后,即是 DNA 结晶。

实验用鲑鱼精子 DNA (含量为 40—50%) 系上海东海制药厂生产。

(三) 色谱分析条件

所用仪器为日立 635 型高压液相色谱仪,配有溶剂梯度装置。色谱条件如下:

色谱柱: 25 × φ0.4 厘米不锈钢柱,带加热套;

固定相: Nucleosil C₁₈, 5 微米 (Germany, Macherey-Nagel + Co.);

流动相: A 液 0.01M 醋酸钠 (AR, 国产), pH3.71; B 液: 甲醇 (AR, 国产);

梯度: 以 12% B 液洗脱 1 分钟,然后线性程序升至 35%,程序速度为每分钟 4%;

流速: 0.8 毫升/分;

柱温: 55℃;

检测器: uV 254 毫微米, 0.04AuFS;

压力: 120 公斤/平方厘米;

纸速: 1 厘米/分;

进样量: 5 微升。

(四) RNA 样品的水解

用微量天平称取 1 毫克 DNA 样品,放入 10 × φ0.4 厘米的水解玻璃管中,准确加入 100 微升 70% 高氯酸 (AR, 70—72%, 国产),用氧化焰封口;在沸水浴中水解 1 小时;冷却后,打开水解管,加入 200 微升蒸馏水,摇动混合均匀,离心 (2000 转/分) 10 分钟,吸取上清液,供液相色谱分析用。

(五) 碱基物相对克分子校正因子的测定及

G + C 克分子百分数的计算。

1. 相对克分子校正因子 (f_m) 的测定

采用相对校正因子进行色谱定量分析,其优点是准确简便,分析结果不受操作条件如柱温、流速、仪器稳定性、试样浓度及进样重复性等因素的影响。我们用标准胞嘧啶 (C)、尿嘧啶 (U)、鸟嘌呤 (G)、胸腺嘧啶 (T)、腺嘌呤 (A) (均为生化试剂,英国 L. Light 产品) 配成一定浓度的混合溶液,在上述色谱条件下层析,测量每个峰的峰面积 (峰高乘半峰宽),按下式计算 C、G、T、A 的相对克分子校正因子 (f_m):

$$f_m(i) = \frac{A_i m_i M_i}{A_1 m_1 M_1}$$

式中 A 为峰面积, m 为进样量, M 为分子量;下标 s 为内标物 [本实验以胸腺嘧啶 (T) 为内标物], i 为待测碱基。经六次重复取其平均值,测得 f_m 值分别为: C = 1.39, G = 0.67, T = 1.00, A = 0.62。

2. G + C 克分子百分数的计算

1977 年, Ko 等人^[1]根据 DNA 中碱基对克分子数相等 (C = G, T = A) 的原则,提出 G + C 克分子百分含量的计算式。采用这种计算方法,只要准确测得 DNA 四种碱基中任何三种的克分子数,就能准确地算得 G + C 克分子百分数。他们用这种计算方法,克服了由于 T、U 两个峰相重叠所带来的计算上的困难。在我们的实验条件下,虽然五种碱基物的色谱峰获得很好的分离,但第一个峰 (C) 常受到杂质峰的干扰,定量的结果受到一定影响;所以,采用后三个峰 (G、T、A) 进行定量计算。在定量分析时,先测出各个峰面积,将上述相对克分子校正因子 (f_m) 乘上相应碱基物的峰面积,然后归一化,即得其克分子百分数。最后按下列公式计算 G + C 克分子百分数:

$$G + C\% = \frac{A}{A + G} \quad (1)$$

$$G + C = \frac{2G}{2G + T + A} \quad (2)$$

以绿针假单孢菌和鲑鱼精子 DNA 一次测定的计算为例:

绿针假单孢菌

	峰 高 (毫米)	半峰宽 (毫米)	峰 面 积 (毫米 ²)	校正后的 克分子数
C	118.2	1.75	220.3	306.2
G	154.5	2.65	436.1	292.2
T	65.0	2.30	159.2	159.2
A	65.2	4.25	295.1	183.0

鲑鱼精子

C	88.5	2.10	197.9	275.1
G	80.5	4.80	411.5	275.7
T	81.8	4.50	392.0	392.0
A	67.2	7.70	624.9	387.4

根据碱基 G、T、A (在我们的色谱条件下, C 碱基峰常受某些杂质峰的干扰, 故计算中不采用)校正后的克分子数, 按上述公式 (1) 或 (2) 计算, 绿针假单孢菌和鲑鱼精子 DNA 的 G + C 克分子百分数分别为 61.5 和 41.6 或 63 和 41.4。

结 果

(一) 标准碱基及各种 DNA 样品的分离

在上述色谱条件下, 五种标准碱基均得到很好的分离, 见图 1。图 2 至图 5 是四种细菌的 DNA 水解物的色谱图。图 6 为鲑鱼精子 DNA 水解物的色谱图。

(二) 各种细菌 DNA 的 G + C 克分子百分数测定结果 (见表 1)

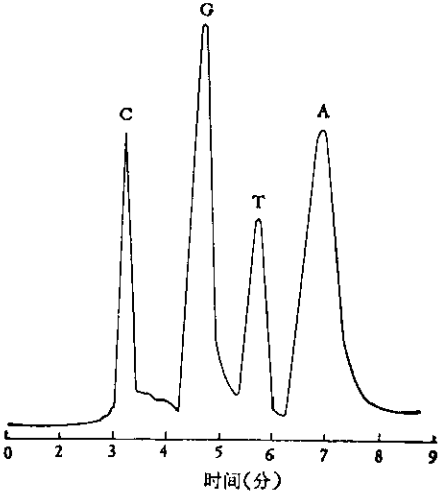


图 2 *Bacillus subtilis* 168 DNA 水解物中碱基组分液相色谱图

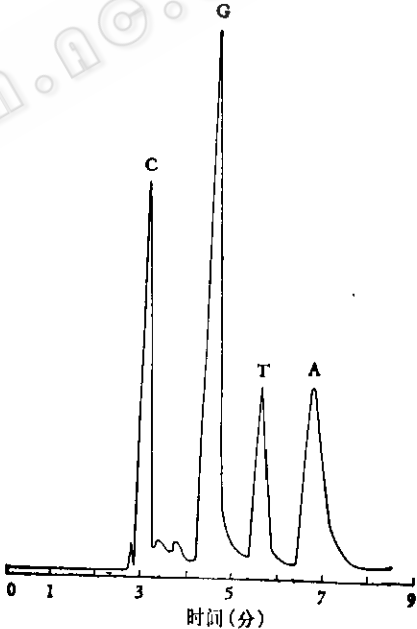


图 3 *Azotobacter vinelandii* op DNA 水解物中碱基组分液相色谱图

由表 1 结果可以看出, 采用高压液相色谱法所计算得到的 G + C 克分子百分数与文献报道^[2,8] 基本一致。

讨 论

用高压液相色谱 (HPLC) 测定 DNA

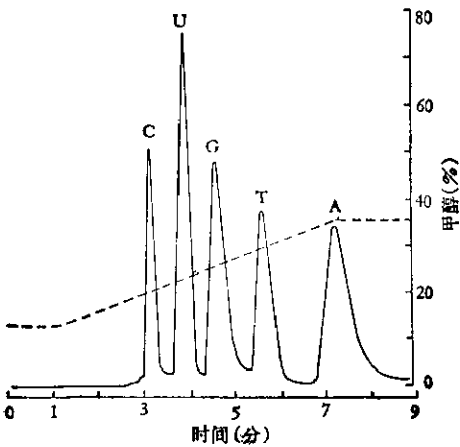


图 1 五种标准碱基混合物色谱图
虚线为梯度洗脱曲线

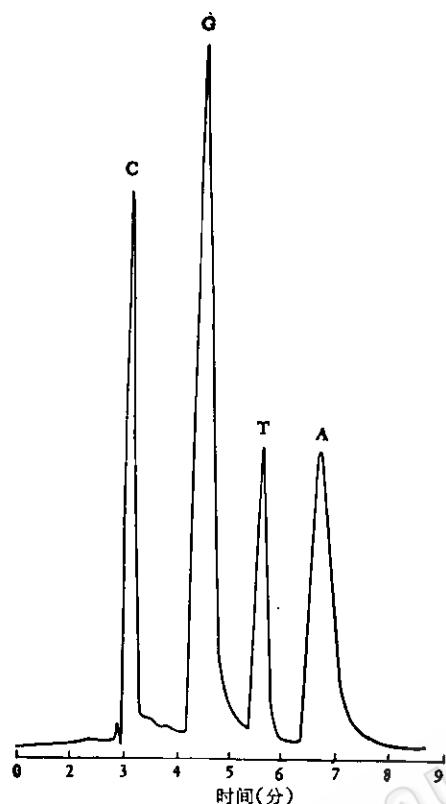


图4 *Pseudomonas chlororaphis* DNA 水解物中碱基组分液相色谱图

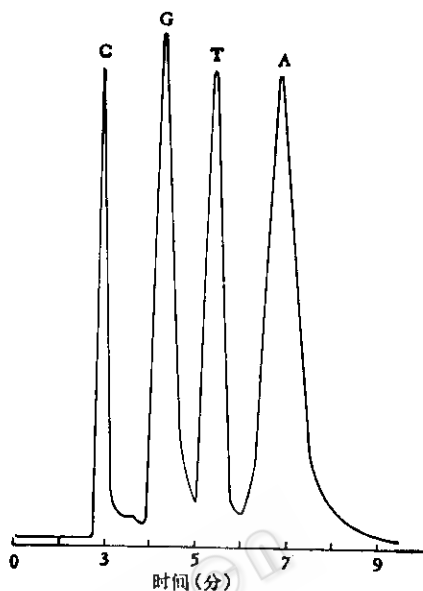


图6 鲑鱼精子 DNA 水解物中碱基组分液相色谱图

表1 七种细菌的 DNA 中 G + C 克分子百分数

菌 名	Mole% G + C*	文献值 ^[3,11]
<i>Bacillus megaterium</i>	40.0	36.0—38.0
<i>Bacillus pumilus</i>	42.3	41.2—43.4
<i>Bacillus subtilis</i> 168	48.1	43.6—46.6
<i>Escherichia coli</i> K ₁₂	51.3	49.8—51.5
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	62.7	61.6—64.2
<i>Azotobacter vinelandii</i> op	66.9	64.9; 66.0
<i>Sarcina lutea</i>	76.5	66.0—75.0

* 为用本法测定 3 至 8 次的平均值。

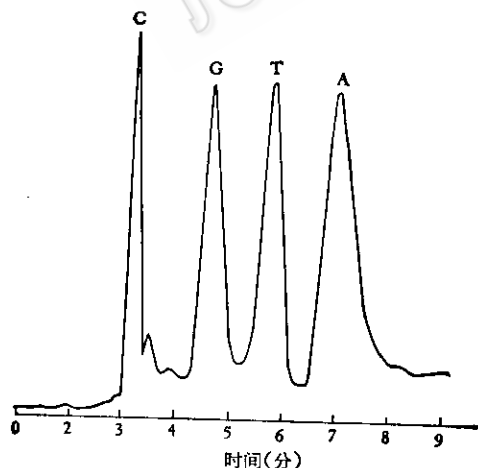


图5 *Bacillus pumilus* DNA 水解物中碱基组分液相色谱图

中四种碱基,具有快速,简便,灵敏度高(可检测低达 800pmole 碱基物)定量准确等优

点。通过上述试验证明,采用反相分配色谱法能很好分离 DNA 及 RNA 中五种碱基物;与此同时,曾用上述方法对鲑鱼精子 DNA 作三次水解、七次测定,其结果表明,本方法的重复性好,相对标准偏差为 $\pm 1.5\%$,能满足定量分析的要求;因此我们认为本法适用于定量测定 DNA 中的碱基组成及计算其 G + C 克分子百分含量,并可扩大应用于测定 RNA 病毒和 RNA 噬菌体的 RNA 中各种碱基的组成。

参 考 文 献

- [1] Spirin, A. S. et al.: *Biochimya*, **22**, 744—754, 1957.
- [2] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp. 255, 479, 537, 1974.
- [3] Marmur, J. & P. Doty: *J. Mol. Biol.*, **5**: 109—118, 1962.
- [4] Schildkraut, C. L. et al.: *J. Mol. Biol.*, **4**: 430—443, 1962.
- [5] C. Y. Ko. et al.: *Anal. Biochem.*, **80**: 183—192, 1977.
- [6] 齊藤日向: 蛋白质、核酸、酵素, **9**:102—105, 1964.
- [7] 阿部美穂子: 蛋白质、核酸、酵素, **10**:793—795, 1965.
- [8] Gerald, D., Ph. D. Fasman: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* 3rd Edition Nucleic Acid-Volume II, 69—184, 1976, CRC press Cleveland.

DETERMINATION OF MOLE PERCENT OF GUANINE + CYTOSINE IN BACTERIAL DNA BY MEANS OF HPLC

Pan Xingshi Wei Yecheng Lu Yaobo Zhang Xianwu

(Institute of Forestry and Pedology, Academia Sinica, Shenyang)

Mole percent of G + C values of 7 different bacterial species were estimated by means of high performance liquid chromatography on Nucleosil C₁₈. The results showed that HPLC method can be used to determine the Mole percent of G + C values in DNA preparations after hydrolyzed in 70% perchloric acid rapidly, simply, sensitively and accurately.

0.2—1 μ g injecting amount of each base of DNA is enough for this analysis and the time needed for analysis is only 8 min.

The results can be repeated with satisfaction. In addition the possibility of using HPLC method to determine the Mole percent of various base in RNA were also discussed.