

北京棒状杆菌 AS1.299 噬菌体 Z_p 脱氧核糖核酸的分离及其分析

赵志山 王 森 单志萍

(东北师范大学生物系, 长春)

目前, 我国用来生产谷氨酸的生产菌北京棒状杆菌 AS 1.299 的某些噬菌体已进行了核酸的分离、鉴定及其物理化学特性的研究^[1]。本文对噬菌体 Z_p 的核酸进行分离和分析, 鉴定这种噬菌体核酸的类型及其某些特性, 从而搞清这种噬菌体与已报道过的噬菌体在核酸上的区别。

材料和方法

(一) 菌株与噬菌体

北京棒状杆菌 AS 1.299 和噬菌体 Z_p 同前文^[1]。

(二) 培养基和培养条件

见前报^[1]。

(三) 噬菌体大量培养

按平板法进行培养, 然后将此培养物挤压过滤, 离心, 上清液即为裂解液。

(四) 噬菌体浓缩与提纯

按那淑敏等^[1]和参照 Sinsheimer 方法^[2]进行。

(五) 噬菌体核酸分离

按那淑敏^[1]和参照 Kaiser 方法^[3]进行。

(六) 脱氧核糖核酸测定

采用二苯胺法^[4]测定。

(七) DNA 中磷酸含量测定

按 King 方法^[4]进行。

(八) DNA 碱基组分测定

采用高氯酸水解液纸层析法^[5]。用已知碱基作标准样, 同样品一起层析, 以无斑点滤纸作对照, 然后用匈牙利产 195 型紫外分光光度计测定全波吸收曲线。

(九) 葡萄糖基测定与验证

采用 Takahashi 方法^[6]并参照那淑敏报道的方法^[1]进行。

(十) DNA 解链温度及其 G + C 克分子百

分数测定

按 Marmur 方法^[7]进行 DNA 解链温度测定。经紫外分光光度计测定不同浓度样品在 260nm 波长(在室温)下的吸光度, 及每一温度下吸光度的增长。将吸收的相对增长值对液体温度作图, 求出解链温度 T_m 值, 再按 Marmur 公式 $G+C = \frac{T_m - 69.3}{0.41}$ 计算碱基比例。

结果和讨论

(一) 噬菌体 Z_p 核酸类型及其特征

经酚法脱蛋白提取的核酸, 利用二苯胺法分析, 结果呈蓝色反应。这说明样品中有脱氧核糖核酸与二苯胺作用。由此证明噬菌体 Z_p 含脱氧核糖核酸。用紫外分光光度法测定 DNA 含量为

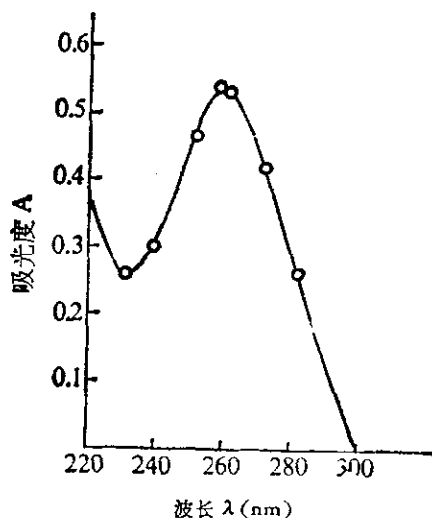


图1 噬菌体 Z_p DNA 紫外吸收曲线

本文于 1984 年 12 月 13 号收到。

本研究承中国科学院微生物研究所 余茂效教授指导, 并审阅此文, 在此深表感谢。

54%, 含磷量为 8.73, DNA 260nm/280nm 的比值是 1.92。从比值上也证明该噬菌体核酸是 DNA。测定溶解在 SSC 缓冲液中的 DNA 在不同波长下的吸光度 (A), 其最大值为 259.3 nm (0.54), 最小值为 233nm (0.26) (图 1 和表 1)。

表 1 噬菌体 Zp DNA 含量及其特性

DNA	波长 (nm)		260 230	260 280	P%	DNA%
	最大值 Max.	最小值 Min.				
	259.3	233	2.01	1.92	8.73	54

从以上结果发现, 噬菌体 Zp DNA 的特征与那淑敏等^[1]报道的有一定相似之处, 但该噬菌体 DNA 的波长最大和最小吸收值, 以及 260nm/280nm、260nm/280nm 的比值与已报道过的噬菌体有差别。核酸的百分含量也高于其他噬菌体。这可能由于噬菌体蛋白含量少, 而核酸显得稍高。到目前为止, 已发现的北京棒状杆菌 AS1.299 噬菌体的核酸均为 DNA。

(二) 葡萄糖基测定和验证

核酸样品经处理后, 在层析纸上显示出蓝灰色斑点, 结果如图 2。

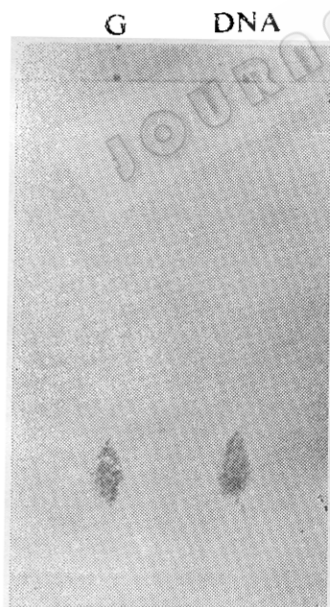


图 2 噬菌体葡萄糖基的纸层析图

层析后, 测得样品中葡萄糖 Rf 值为 0.642, 标准葡萄糖的 Rf 值为 0.644, 两者基本一致。将

葡萄糖氧化酶加入噬菌体 Zp 核酸液和标准葡萄糖液中, 再按上述方法层析显色, 结果都无蓝灰色斑点出现; 直接用葡萄糖氧化酶处理蓝灰色斑点, 斑点亦全部消失。进一步证明, 噬菌体 ZpDNA 上联结葡萄糖基, 这是某些噬菌体具有的特点^[10]。

(三) DNA 解链温度及 G + C 克分子百分数

不同浓度的 SSC 噬菌体 ZpDNA 液, 经紫外分光光度计测定后, 将吸收的相对增长值对液体温度作图, 即为 DNA 解链温度曲线 (图 3)。

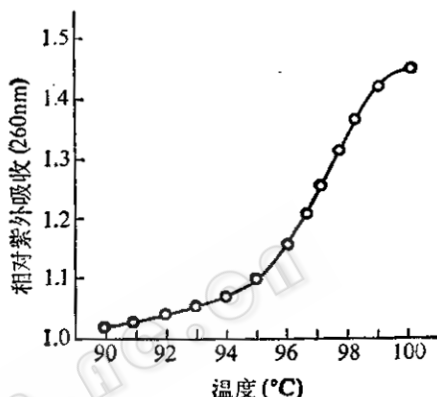


图 3 噬菌体 Zp DNA 的解链温度测定

上图曲线的线性部分中点所对温度为 DNA 的解链温度, 测得 T_m 值为 96.8。依 Marmur 公式计算, G + C 克分子百分数为 67%。从 T_m 值和 G + C 克分子百分数可知, 噬菌体 Zp 与已报道的噬菌体 A2、A3 和 A133 属于不同类型。因为生物细胞中核苷酸碱基对的数量和比例是稳定的, 由它们的 DNA 中 G + C 克分子百分比就可判断噬菌体间的亲缘关系。由于 G 与 C 间有三个氢键, A 与 T 间只有二个氢键, DNA 中 G + C 克分子百分比高的, 其 T_m 值也必然高。因此, 噬菌体 Zp 对热的耐受力也比噬菌体 A2、A3 强。

(四) DNA 碱基组分测定

把标准碱基腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶与待测液进行纸层析后, 在紫外层析灯下观察, 发现待测样有四个斑点与各标准碱基的位置相应, 由此, 进一步可知, 噬菌体 Zp 核酸含有腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶四种碱基的 DNA。

参 考 文 献

- [1] 那淑敏等: 微生物学报, 19(1): 41—44, 1979。
- [2] 赵志山等: 微生物学报, 25(4): 334, 1985。

- [3] Sinsheimer, R. L.: *J. Mol. Biol.*, 1: 37—42, 1959.
- [4] Kaiser, A. D. and D. S. Hogness: *J. Mol. Biol.*, 2: 392—415, 1960.
- [5] Dische, Z.: *The Nucleic Acids*, Eds. by E. Chargaff and J. N. Davidson, Academic press Inc., N. Y., 1: 285—305, 1955.
- [6] King, E. J.: *Biochem. J.*, 26: 292—297, 1932.
- [7] Marshak, A. and H. J. Vogel: *J. Biol. Chem.*, 189: 597—605, 1951.
- [8] Takahashi, I. and J. Marmur: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10: 289—292, 1963.
- [9] Marmur, J. and P. Doty: *J. Mol. Biol.*, 5: 109—118, 1962.
- [10] Lunt, M. R. and E. A. Newton: *Biochem. J.*, 93: 717, 1965.

JOURNALS.IM.AC.CN