

降解性质粒 DNA 的裂解气液色谱分析

朱湘民 赵姬勇 罗清修 王志通

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

用 GC-9A 气相色谱仪和 PYR-2A 管式炉裂解器, 对四种降解性质粒 DNA 进行了裂解气液色谱鉴别, 通过对指纹图的分析, 较好地地区分了不同降解性质粒 DNA 间的差异。证明了裂解气液色谱法分析质粒的可行性。

另外, 对分析质粒 DNA 的色谱柱、进样量、裂解温度和时间等色谱条件也进行了试验。

关键词 裂解气液色谱; 降解性质粒

由 Oyama 提出的裂解气液色谱法 (Pyrolysis Gas Liquid Chromatography, PGLC), 用于鉴定微生物^[1-3]和分析鉴别化学成分和结构极为复杂的生物大分子^[9,10]是近 20 年发展起来的一项新技术, 它具有快速、灵敏和特异性强等优点。通过对裂解色谱图 (亦称“指纹图”) 彼此间特异性的分析, 通常可将微生物鉴定到属、种、亚种和血清型, 也可区分被测生物大分子在化学组成和结构上的微小差别。Emswiler^[11] 用 PGLC 对沙门氏菌及染色体 DNA 就其百分相似性进行过鉴定。然而, 对携带有降解基因的细胞染色体外遗传因子 (质粒) 进行 PGLC 分析, 迄今国内外均未见报道。为探索降解性质粒的同源性, 本研究从裂解质粒 DNA 得到的指纹图, 分析、鉴别不同降解功能的质粒 DNA 的差异。

材料和方 法

(一) 试验菌株

供试的 4 株降解菌: 气单胞菌 (*Aeromonas* sp. H15A); 假单胞杆菌 (*Pseudomonas putida* paW1); 假单胞杆菌 (*Pseudomonas* sp. S13) 和接合子 CON1 (由供体菌 S13 的质粒 pWE2 通过接合转移至假单胞菌 T9, *Pseudomonas* sp. 得到的接

合子)。它们相应的质粒名称和降解底物列于表 1。

(二) 生化及色谱分析试剂

电泳纯琼脂糖、SDS、Gas Chrom Q (系 Serva 产品); Tris (Fluka); 溴化乙锭 (中国科学院生物物理研究所); 蛋白胨 (日本); 胰蛋白胨 (英国); Na₂EDTA、苯酚 (重蒸)、冰乙酸、无水乙醇、异戊醇、氯仿和硼酸均为国产分析纯试剂; 固定液 Carbowax-20 M (日本进口分装, 上海化学试剂厂)。

(三) 仪器

岛津 GC-9A 气相色谱仪及附件 PYR-2A 管式炉裂解器; 岛津 UV-300 分光光度计。

(四) 质粒 DNA 的制备

基本按 Kado^[12] 等人方法进行。用于质粒分析的菌株, 经活化接种于 10 ml LB^[13] 培养液中, 30℃ 摇床培养 12—14 小时, 取 0.4 ml 离心收集菌体, 用 45 μl E 缓冲液 (40 m mol/L Tris-乙酸, 2 m mol/L Na₂EDTA, pH 7.9) 悬浮菌体, 加入 200 μl 裂解液 (3% SDS, 50 m mol/L Tris, pH 12.6) 混匀后于 58℃ 水浴保温 25 分钟, 加入 240 μl 抽提液 (苯酚: 氯仿: 异戊醇 = 25: 24: 1) 摇匀、离心, 取 70 μl 上清液进行电泳。用 1BE 缓冲液 (89 m mol/L Tris, 89 m mol/L 硼酸, 2 m

本文于 1985 年 9 月 25 日收到。

本研究得到中国科学院科学基金的资助。

裂解色谱分析得到武汉大学化学系达世禄副教授指导, 夏祥明参加部分工作, 特此致谢。

表 1 降解性质粒的种类及特性

Table 1 The degradative plasmids and their characters

质粒名称 Name of plasmid	菌株 Strain	降解底物 Degradative substrate	来源 Source	文献 Reference
pWE 2 (萘质粒)	<i>Pseudomonas</i> sp. S 13	萘	本实验室	
pWE 2 (萘质粒)	<i>Pseudomonas</i> sp. T 9	萘	同上	
TOL (甲苯质粒)	<i>Pseudomonas putida</i> paW1	甲苯, 甲基苯甲酸	本室赖林翰引自英国	[14]
BHC (666 质粒)	<i>Aeromonas</i> sp. II5A	666 (BHC)	本实验室	[12,13]

TOL 质粒的系统命名为 pWWO。

TOL plasmid is nomenclatured pWWO according to systeme.

BHC 质粒的系统命名为 pWE1。

BHC plasmid is nomenclatured pWE1 according to systeme.

666: 六氯苯 Benzene hexachloride.

mol/L Na₂EDTA) 配制的琼脂糖凝胶浓度为 0.7%。以 TBE 为电泳液, 在 100—120 V、30—32 mA 下泳动 4 小时。用溴化乙锭染色, 在紫外灯下切下含有质粒带的凝胶块, 浸泡于无菌的二次蒸馏水(4℃)中过夜。捣碎凝胶块, 离心, 小心取出上清液, 加入 2 倍体积冷无水乙醇和 1/10 体积的 2.5 mol/L 乙酸钠, 置 -25℃ 过夜。4℃, 16,000r/min 离心 30 分钟, 沉淀(质粒 DNA) 用无菌二次蒸馏水溶解。测定 E₂₆₀ 的消光值, 根据 DNA 溶液的比消光系数法^[12], 求出 DNA 溶液的浓度, 此溶液供色谱分析用。

(五) 色谱分析条件

根据 DNA 溶液的浓度, 用微量进样器取 DNA 溶液 16—25 μl (约相当于 DNA 2.8 μg), 注入裂解器的铂舟中, 置 12 cm 距离经热风吹干 5 分钟。裂解炉温度预先稳定在 740℃, 进样前, 样品舟先在裂解炉进样口处停留 1 分钟, 裂解时间 12 秒, “PIPE” 置 4.5 处, 进样口温度 270℃。色谱柱: 长 2.1 m, 内径 3.2 mm 玻璃柱; 固定相: 涂 3% Carbowax-20 M 的 Gas Chrom Q(80—100 目)。程序升温: 开始 50℃, 保持 3 分钟, 以 7℃/min 升至 190℃, 保持 20 分钟。氮气: 50 ml/min; 氢气: 50 ml/min; 空气: 500 ml/min。双氢火焰离子化检测器, 灵敏度 10', 记录仪衰减 1/4。按上述步骤, 每个样品至少重复测定 3 次。

结果和讨论

在样品制备规范化和色谱条件恒定情

况下, 经多次实验表明, 分析同一质粒样品均可得到重复性较好的指纹图, 从每个质粒样品的三张重复指纹图中选出一张, 用数字标出特征峰, 用指纹图中色谱峰的保留时间(计算机打印值, RT±0.05 分视为同一值), 峰高比值(同一指纹图中, 任意两个不同峰号的峰高比值, 它由样品的性质决定, 不取决于进样量), 分析彼此间的异同, 经分析表明, 不同质粒 DNA 的指纹图, 既有峰形的特异性, 亦有特征峰高比值的特异性。依其特征, 将四种质粒得到的指纹图分为三大类型:

1. 相应峰(编号相同的色谱峰, 下同)有相同保留时间和相等峰高比值。pWE 2 (S 13) 和 pWE 2 (CON 1) 质粒 DNA 指纹图的峰形极为相近(图 1, 2), 除第 22 号峰高 (H₂₂ 表示, 下同)稍有不同外, 其他许多相应峰的峰高比值均相等。

pWE 2 (S 13) 指纹图中: H₁₁/H₁₅ = 2.0, H₁₈/H₁₉ = 1.285, H₁₉/H₂₀ = 2.15; pWE 2 (CON 1) 指纹图中: H₁₂/H₁₅ = 2, H₁₈/H₁₉ = 1.285, H₁₉/H₂₀ = 2.15。

第 23 号峰至第 30 号峰高值较小, 其相应峰的峰高比值也趋于相同(表 2)。指纹图分析表明, CON 1 中的质粒 pWE 2 与 S 13 中的质粒 pWE 2 是两个完全相

同的质粒。这与我们研究过的 CON 1 中的质粒是由 S 13 中的萘降解性质粒转移过来的结果以及用 DNA-DNA 分子杂交的实验结果是一致的。

2. 相应峰有相同保留时间和不同的峰高比值(图 1, 3)。

在 pWE 2 (S 13) 指纹图中: $H_{12}/H_{15} = 2.07$, $H_{18}/H_{19} = 1.285$,

$H_{19}/H_{20} = 2.15$, 第 27、28、30 号峰都很低, 23 号峰明显。

在 TOL (paW 1) 指纹图中: $H_{12}/H_{15} = 4.86$, $H_{18}/H_{19} = 2.14$, $H_{19}/H_{20} = 1.31$, 第 27、28 号峰尤其高 (是第 30 号峰的 5.17 倍), 无明显的第 23 号峰。

以上两指纹图, 有保留时间完全相同的相应峰, 只是峰高比值不同(表 2), 表明

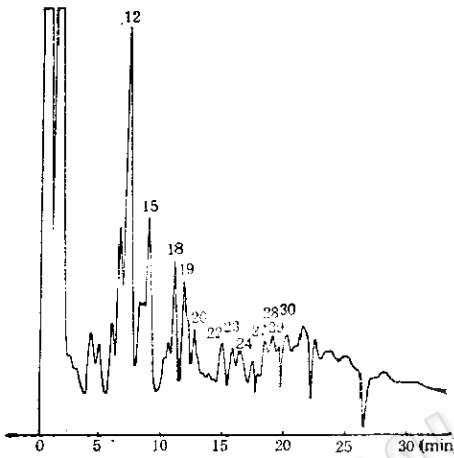


图 1 pWE 2 (S 13) 质粒 DNA 裂解色谱图
Fig. 1 Pyrochromatogram of pWE2 (S13) plasmid DNA

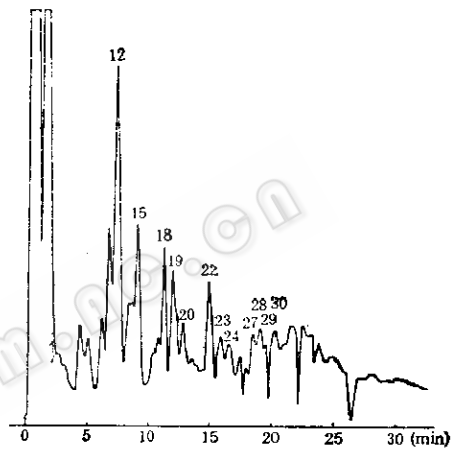


图 2 pWE 2 (CON 1) 质粒 DNA 裂解色谱图
Fig. 2 Pyrochromatogram of pWE2 (CON1) plasmid DNA

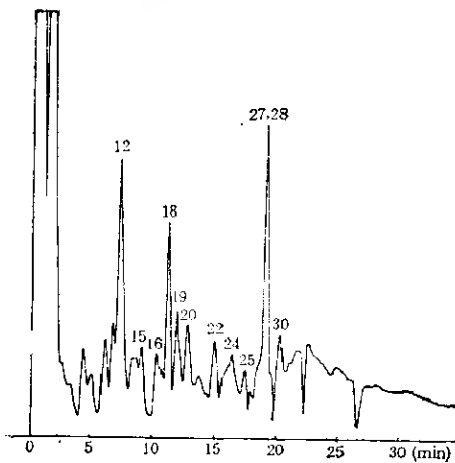


图 3 TOL (paW 1) 质粒 DNA 裂解色谱图
Fig. 3 Pyrochromatogram of TOL (paW1) plasmid DNA

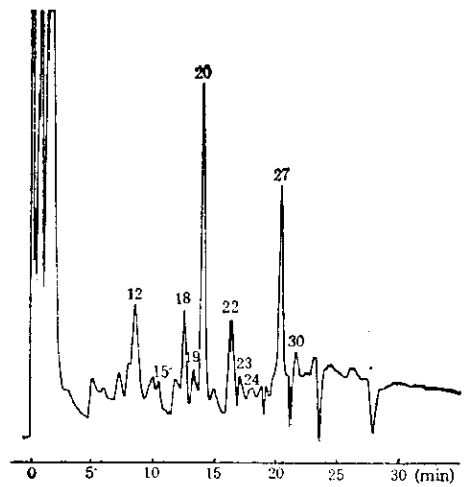


图 4 BHC (II 5 A) 质粒 DNA 裂解色谱图
Fig. 4 Pyrochromatogram of BHC (II 5 A) plasmid DNA

表 2 四种降解性质粒色谱数据比较

Table 2 Comparison of chromatographic data of four degradative plasmids

峰号 Peak	样品 Sample	pWE2 (S13)		pWE2 (CON1)		TOL (paW1)		BHC (II5A)	
		RT (min)	H (cm)	RT (min)	H (cm)	RT (min)	H (cm)	RT (min)	H (cm)
12		7.52	11.00	7.52	9.70	7.54	6.80	8.97	2.55
15		9.31	5.30	9.33	4.90	9.29	1.40	10.86	0.50
18		11.43	3.60	11.41	3.60	11.47	5.55	12.93	2.70
19		12.15	2.80	12.15	2.80	12.10	2.50	13.65	0.75
20		13.08	1.30	13.04	1.30	13.03	1.90	14.47	10.25
22		15.25	1.30	15.26	2.90	15.28	1.90	16.70	2.95
23			0.70		0.80				0.80
24		16.12	0.70	16.13	0.75	16.15	2.35		0.35
27		17.82	0.70	17.72	0.70	17.77	9.30		7.40
28			0.55		0.55		9.30		
29			0.70		0.80				
30			1.15		1.15		1.80		1.40

RT: 保留时间(分), 计算机 CR 2 A 打印值, RT \pm 0.05 视为同一值。

RT: Retention time (min), computer print value, RT \pm 0.05 could be considered as the same value.

H: 峰高 (cm), 以峰底两拐点连线的中点量取峰高值。

H: Height of peak is measured at mid-point of line linking two reverse point at bottom of the peak.

这两个质粒有一定的同源性。从能被这两个质粒降解的底物(萘、甲苯)看, 均属 sp^2 杂化的大 π 键化合物, 苯环均是通过间位途径降解^[4]。另外, 我们用限制性内切酶图谱分析和分子杂交实验也证明甲苯质粒和萘质粒有一定的同源性。

3. 指纹图的峰形和相应峰高比值各不相同(图 1—4): BHC (II 5 A) 的指纹图与 pWE 2 (S13)、TOL(paW1) 及 pWE 2 (CON1) 相比是根本不同的, 如果将 BHC (II 5 A) 的指纹图与后三者的任何一张指纹图重叠放在透光玻璃板上观察, 均可见多处不能重合, 说明 BHC 质粒的裂解产物与它们不同, 因而 BHC (II 5 A) 相应峰出峰的时间也不同(表 2)。BHC (II 5 A) 的第 20 号峰尤其高, 它与相邻第 22 号峰高比值分别是后三者相应峰峰高比值的 3.5 倍和 7.8 倍。另外, BHC(II 5 A) 低沸

点挥发性组分峰数较 pWE 2 (S13)、TOL (paW1) 及 pWE 2 (CON1) 多。

造成这种特异性的原因可能是它们的菌属不同。能被 BHC (II 5 A) 质粒降解的底物是六氯苯 (BHC), 是一类不具有大 π 键的 sp^3 杂化有机氯化物, 其质粒 DNA 分子的组成和结构理应与 pWE 2 和 TOL 质粒不同。指纹图分析结果与我们用限制性内切酶图谱对 BHC (II 5 A) 和 TOL (paW1) 的分析结果相符。说明 BHC 质粒与 TOL 质粒、pWE 2 质粒没有同源性或同源性很小。

本实验先后选用色谱条件如下: (1) 5% SE-30, Chromosorb W AW DMCS (80—100 目); (2) Porapak Q (80—100 目); (3) 10% Carbowax-20M, Gas Chrom Q (80—100 目)。(1)和(2)为非极性柱, 对质粒 DNA 裂解的许多组分选择性不

好,指纹图谱峰数甚少;(3)极性柱,对高沸点组分的分离度和柱效差。经多次分析实验,这三根柱子均得不到满意的指纹图。改用低配比的固定相(3% Carbowax-20 M 涂 Gas Chrom Q, 80—100 目),能使质粒 DNA 的裂解产物得到分离度和选择性都较好的实验结果。如果配用检测器的高灵敏度档和记录仪的低衰减,可使只有 3 μg 左右的 DNA 样品得到大小适宜的指纹图谱(图 1—4)。对于高沸点组份第 30 号峰以后出现的一些分离度差的峰,通过空白对照的裂解分析,初步判断,可能是由于二次蒸馏水中微量杂质引起的。

裂解色谱会受到诸色谱条件和裂解条件的影响。我们发现,裂解色谱分析的成败关键在于固定相的选择。裂解温度、时间、进样量和载气流速只在一定范围内对峰形、峰数、峰高比值及半峰宽无影响。因此,在本文通过实验确定的色谱条件下,每次样品制备方法不变,质粒 DNA 的裂解均可得到重复性较好的指纹图。

本裂解器的最高使用温度限定在 800 $^{\circ}\text{C}$,在其他色谱条件不变时,对裂解温度进行逐个分析,发现 720—800 $^{\circ}\text{C}$ 都可以得到稳定的指纹图,720 $^{\circ}\text{C}$ 以下裂解峰数减少。以 740 $^{\circ}\text{C}$ 裂解时间 12 秒得到的指纹图最好。另外,程序升温最后温度低于 180 $^{\circ}\text{C}$,分析时间延长,高于 190 $^{\circ}\text{C}$,不利于高沸点组份的分离。

本研究首次对降解性质粒 DNA 进行了裂解气液色谱分析的尝试,结果初步表明,它可作为鉴别降解性质粒同源性的方

法之一。并同目前用于测定其他 DNA 活性生物大分子的 G + C 克分子百分比法、DNA-DNA 杂交和限制性内切酶图谱法可相媲美。这一分析微生物学方法,将为用户提供现代技术对质粒进行快速自动鉴定和结构研究提供新的分析手段。

参 考 文 献

- [1] Reiner, E.: *Nature* (London), 206: 1272—1274, 1965.
- [2] Reiner, E.: *J. Gas Chromatogr.*, 5: 65—67, 1967.
- [3] Reiner, E. et al.: *Am. Rev. Respir. Dis.*, 99: 750—759, 1969.
- [4] Reiner, E. and W. H. Ewing: *Nature*, 217: 191—194, 1968.
- [5] Reiner, E. et al.: *Anal. Chem.*, 44: 1058—1061, 1972.
- [6] 周方等: *中华微生物学和免疫学杂志*, 2(1): 16, 1982.
- [7] 周方、朱厚础译:“气相色谱法在微生物学和医学中的应用”,科学出版社,北京, p. 43, 1984.
- [8] 李兆麟等: *微生物学报*, 21(4): 457—463, 1981.
- [9] Merriitt, C. J. and C. Di Pietro: *J. Chromatogr. Sci.*, 12(11): 668—672, 1974.
- [10] Merriitt, C. J. and D. H. Robertson: *J. Gas Chromatogr.*, 5(2): 96—98, 1967.
- [11] Emswiler, B. S. and A. W. Kotula: *Appl. Environ. Microbiol.*, 35(1): 97—104, 1978.
- [12] 王春生等: *环境科学学报*, 4: 325—332, 1984.
- [13] 罗清修、陆娟子: *环境科学学报*, 4(2): 193—196, 1984.
- [14] Willams, P. A. et al.: *J. Bacteriol.*, 120: 416, 1974.
- [15] Kado, C. I. and S. T. Liu: *J. Bacteriol.*, 145: 1365—1373, 1981.
- [16] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p. 68, 1982.
- [17] 沈仁权等编:“基础生物化学”,上海科学出版社, p. 143, 1980.
- [18] Philip, R. L. et al.: *Plasmid*, 10: 164—174, 1983.

ANALYSIS OF DEGRADATIVE PLASMIDS BY PYROLYSIS GAS LIQUID CHROMATOGRAPHY

Zhu Xiangmin Zhao Jiyong Luo Qingxiu Wang Zhitong

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan*)

Four degradative plasmids, pWE2 (*Pseudomonas* S13), pWE2(*Pseudomonas* CON1), TOL (*Pseudomonas* paW1), BHC (*Aeromonas* H5A), were examined by pyrolysis Gas-Liquid Chromatography (PGLC). And with the fingerprinting-analysis their differentiation were better distinguished. It was shown that to analyse plasmid with PGLC is feasible.

The analysis were performed on a Shimadzu gas chromatograph fitted with a PYR-2A pyrolyzer. Pyrolysis temperature 740°C, time 12 sec. Dual glass column operation

was used, column 2.1 m long by 3.2 mm (ID) were packed with Gas Chrom Q 80—100 mesh coated with 3 per cent Carbowax-20M, and two hydrogen flame ionization detectors.

In this paper, column, weight of sample, pyrolysis temperature condition were also discussed.

Key words

Pyrolysis gas Liquid chromatography;
Degradative plasmid