

用热变性温度法测定细菌 DNA 中 GC 含量*

林万明 郭兆彪 高树德

(中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京)

刘聿太 梁家骥 洪俊华

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用热变性温度法测定细菌 DNA 中 GC 含量, 是一种重复性高, 仪器较易解决, 操作较简便的方法。本文介绍此方法中所用仪器的改装, 测定操作过程和应注意事项。

一、仪器

Unicam SP 700 型紫外分光光度计。安放比色杯的小室内装有加热器 (电热或循环水加热, 亦可用高沸点溶剂如乙二醇加热), 比色杯厚度为 1 厘米, 带有密封性能好的塞子。比色杯内样品的温度用经校准的半导体点温度计直接测量 (如放比色杯的小室可同时放置 4 个比色杯, 则可将水银温度计由小室盖上的小孔直接插到一空白杯内测量温度), 点温度计的热敏电阻器通过比色杯塞上小孔直接插到比色杯内样品液的上部, 以不影响光路为准 (见图 1)。样品加热过程中, 热敏电阻器始终放在样品液中,



图 1 插有半导体点温度计的比色杯

随时可以读出样品的温度。比色杯塞最好是磨口玻璃塞, 也可用聚四氟乙烯塞。热敏电阻器与塞孔间用环氧树脂密封。

比色杯用温和的去污剂 (如乙醇) 浸泡清洗, 烘干, 或用待测液的溶剂冲洗后使用。

二、DNA 的提取^[1-4]

(一) 试剂

1. SE 溶液: $0.15M$ $NaCl$ + $0.1M$ $EDTA$, $pH 8.0$ 。
2. 25% SDS 溶液。
3. 溶菌酶 (上海市禽类蛋品公司禽蛋二厂)。
4. $5M$ 过氯酸钠溶液。
5. 氯仿-异戊醇: 以 24:1 的体积比混合贮存于冰箱中。
6. 95% 乙醇。
7. $NaCl$ -柠檬酸钠溶液, (SSC): $1.5M$ $NaCl$ + $0.15M$ 柠檬酸三钠 $pH 7.0-7.2$, 为 $10SSC$ 溶液, 稀释后为 $1SSC$ 和 $0.1SSC$ 。
8. RNA 酶 (中国科学院生物化学研究所): 溶于 $0.15M$ $NaCl$ ($pH 5.0$) 中, $80^{\circ}C$ 维持 10 分钟, 使可能混杂其中的 DNA 酶灭活。
9. 醋酸盐 $EDTA$ 溶液: $3.0M$ 醋酸钠 + $0.001M$ $EDTA$, $pH 7.0$ 。
10. 异丙醇。

(二) 提取操作

用生理盐水洗下在培养基上对数生长期的菌体, 离心收集菌体, 用 SE 溶液洗涤 1—2 次, 收集湿菌体 2—3 克, 悬浮在 20 毫升 SE 溶液中, 盛于磨口三角瓶中。加入 10 毫克溶菌酶和

* 郑集声、方挺、李文忠等同志为使用紫外分光光度计提供方便, 特此致谢。

2 毫升 SDS, 在 37℃ 水浴中振荡 30 分钟 (若粘度不增加, 可再延长 30 分钟), 再在 60℃ 水浴中 10 分钟, 不时振荡, 如粘度太高, 可适当补加 SE 液。SDS 可在溶菌酶作用后再加^[3]。加入 5M 过氯酸钠溶液使终浓度为 1M。再加入等体积的氯仿-异戊醇振荡 20—30 分钟, 5000—10000 转/分离心 5—10 分钟, 溶液分成三层 (上层为水层, 中层为蛋白质, 下层为氯仿-异戊醇层)。用移液管取上层到刻度烧杯中, 沿壁缓缓加入两倍体积的 95% 冷乙醇, 用玻棒搅出呈纤维状的核酸, 在壁上挤干, 小心溶于相当水层体积 1/2—3/4 的 0.1SSC 中, 完全溶解后, 用 10SSC 调节至约 1SSC。加入等体积的氯仿-异戊醇, 振荡 10—15 分钟, 重复以上离心分层, 搅出 DNA 的步骤, 直至离心后中层液体蛋白质含量很少为止。也可以不用 95% 乙醇沉淀核酸, 直接于移出的水相中加入氯仿-异戊醇除去蛋白质^[5]。然后加入 RNA 酶, 使终浓度为 50 微克/毫升左右, 37℃ 水浴中保温 30 分钟, 不时振荡。再加入等体积的氯仿-异戊醇, 振荡 5—10 分钟, 重复脱除蛋白质操作 1—2 次。将搅出的 DNA 溶于 9 (或 18) 毫升 0.1SSC 中, 待 DNA 完全溶解后, 加入 1 (或 2) 毫升醋酸盐 EDTA 溶液, 边搅拌边慢慢滴加 5.4 (或 10.8) 毫升异丙醇 (最好是冷的) 选择性沉淀 DNA。如搅不出纤维状 DNA, 可适当补加异丙醇。若 DNA 多, 可重复一次异丙醇沉淀处理。最终得到的 DNA 溶于 5—10 毫升 1SSC 中, 贮存在冰箱中。纯化的样品在 260, 230, 280 毫微米波长处的吸光率比为 1:0.450:0.515^[1,6]。

三、热变性温度 (T_m) 值的测定和 GC 含量的计算

用 1SSC 适当稀释上述纯化 DNA, 使溶液的吸光率 (260 毫微米) 为 0.20—0.40, 充分混匀, 除去任何微小的凝絮, 备测定用。

待测定溶液放入比色杯内, 先记录 25℃ 时的 260 毫微米吸光率, 迅速升温至 50℃ 左右, 如比色杯内有气泡, 轻弹池壁除去之。继续加热至低于热变性温度 3—5℃, 停止加热 5—10 分钟, 待比色杯内液体不再升温后、再慢慢加

热, 每升高 1℃ 停顿一定时间 (5 分钟即可), 保证杯内温度充分均匀, 并能在给定温度下彻底完成 DNA 的变性。记录在每个温度下溶液的吸光率, 整理成表。表 1 是部分数据举例。

表 1 大肠杆菌 K12 菌株 DNA 的热变性测定值

温 度 (°C)	吸 光 率	校正膨胀体积后的吸光率	相对吸光率
25°	0.295	0.2950	1.0000
84.2	0.295	0.3035	1.0288
89.4	0.322	0.3324	1.1268
94.4	0.397	0.4113	1.3942
96.1	0.398	0.4129	1.3997

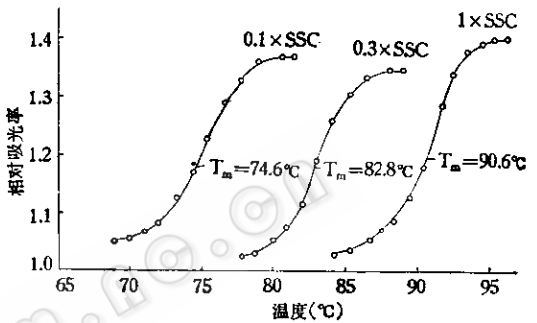


图 2 在三种离子强度溶液中大肠杆菌 K12 的 DNA 热变性曲线

由于液体升温后体积会膨胀, 必须将各温度时溶液的吸光率校正为 25℃ 时的, 用校正值除以 25℃ 时的吸光率, 得出各温度下的相对吸光率。25℃ 对不同温度水的相对膨胀体积可由表 2^[6] 查得。

根据表 1 绘成热变性曲线。如图 1。曲线的中点相对应的温度即为 T_m 值。根据 Marmur 和 Doty^[7] 的经验公式, 可求得 GC 含量。

$$GC = (T_m - 69.3) \times 2.44 \tag{1}$$

四、几点说明

(一) 结果的准确性

用上述方法在不同离子强度的溶剂中测定 T_m 值, 与文献报道^[7] 完全一致。

(二) 高 GC 含量的 DNA 样品的 T_m 值测定

根据公式 (1), GC 含量为 75% 的 DNA, 其 T_m 值应为 100℃, 此时, 必须将样品温度升到 104℃ 才能完成 T_m 值的测定。但是一般比色杯当温度升至 100℃ 时, 塞子会发生位移。因

表 2 25° 水对不同温度水的相对膨胀体积

温 度 (T)	相对体积 (V_T/V_{25})	温 度 (T)	相对体积 (V_T/V_{25})	温 度 (T)	相对体积 (V_T/V_{25})
25	1.0000	75	1.0228	91	1.0336
60	1.0141	76	1.0234	92	1.0343
61	1.0146	77	1.0240	93	1.0351
62	1.0152	78	1.0247	94	1.0358
63	1.0157	79	1.0253	95	1.0365
64	1.0162	80	1.0260	96	1.0373
65	1.0168	81	1.0266	97	1.0380
66	1.0174	82	1.0273	98	1.0388
67	1.0180	83	1.0280	99	1.0396
68	1.0185	84	1.0287	100	1.0404
69	1.0191	85	1.0293	101	1.0411
70	1.0197	86	1.0300	102	1.0419
71	1.0203	87	1.0308	103	1.0426
72	1.0209	88	1.0314	104	1.0433
73	1.0215	89	1.0321	105	1.0441
74	1.0221	90	1.0329		

此在测定高 GC 含量的 DNA 的 T_m 值时,需要采用能使 T_m 值降低的溶剂。根据我们的试验,在各种降低 T_m 值的溶剂中,以用 0.1SSC 最方便。Schildkraut 和 Lifson^[8] 曾考察过 DNA T_m 值与一价阳离子的离子强度的关系,提出了表示 GC 含量、 T_m 值与一价阳离子离子强度之间关系的理论公式, Mandel^[9] 曾提出用 0.1SSC 作溶剂时的经验公式。

由于考虑到较低离子强度的溶剂中 DNA 较不稳定,我们希望找到一个既能测定含 GC 较高的 T_m 值,又较稳定的条件。为此,我们根据 Schildkraut 和 Lifson^[8] 的数据,选择 0.1, 0.3 和 1.0SSC 三种不同离子强度的溶剂进行测定,结果表明,测定值与文献值相符;6 株不同种的细菌在 0.3SSC 中的 T_m 值比在 1SSC 中降低 7.7—8.1℃;在 0.1SSC 中降低 15.7—16℃。于是得出以下经验公式:

在 0.1SSC 中:

$$GC = (T_m - 53.5) \times 2.44 \quad (2)$$

在 0.3SSC 中:

$$GC = (T_m - 61.4) \times 2.44 \quad (3)$$

这一经验公式希望得到读者的核对。

(三) 操作注意事项

1. 用带塞的比色杯测定,在最终温度达

98℃ 时,杯内液体损失约 1.5%,在计算 GC 含量时可忽略不计。如果比色杯不加塞子而覆以用水洗过的矿油,也可防止液体蒸发。

2. 提取 DNA 时,1) 收集的菌体应先试验能否被 SDS 或溶菌酶溶菌,若二者均可,最好用 SDS,因为 SDS 可抑制 DNA 酶并较廉价。若需用溶菌酶,应加入 SDS 促进溶菌。如 60℃ 处理时溶菌过程很缓慢,可将温度提高到 70—75℃。如果上述二者均不能溶菌,可试用脱氧胆酸盐,也可在培养菌体过程中在培养基中加青霉素,收集菌体后用 SDS 破碎细胞。如仍不满意,可用超声波处理,或用氧化铝和玻璃粉研磨。2) 要特别注意溶菌液浓度,浓度过低,用乙醇沉淀 DNA 时损失较大;浓度太高,则第一次除蛋白质的混悬液中出现凝块,离心后会沉入中间层而丢失。3) 有的细菌含大量多糖,溶菌液粘度特别高,可在脱蛋白前用异丙醇除去,也可在 DNA 提取的最后一步除去。4) 如提取过程必须暂时中断,最好在脱蛋白质时将未离心的混悬液放冰箱中。5) 纯化 DNA 溶液如不澄清,可借助离心,长期存放可加入几滴氯仿防腐。6) 菌体量增多时,所用试剂应相应增加。

参 考 文 献

- [1] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3: 208—218, 1961.
- [2] Chandra, P. and W. Appel: *Methoden der Molekularbiologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1973, 李申德译:《分子生物学方法》,科学出版社,北京,1977 年。
- [3] 周慧玲: *微生物学通报*, 5:39, 1978.
- [4] 周慧玲: *微生物学报*, 18:134, 1978.
- [5] Hill, L. R.: *The Determination of Deoxyribonucleic Acid Base Composition and Its Application to Bacterial Taxonomy, Identification Methods for Microbiologists* (ed. by Gibbs, B. M. and D. A. Shapton), Part B, Academic Press, London, New York, pp. 177—186.
- [6] Mandel, M. and J. Marmur: *Use of Ultraviolet Absorbance Plus Cytosine Content of DNA, Methods in Enzymology*, Vol. 12B (ed. by Grossman, L. and K. Moldave), Academic Press, New York, 1968, pp. 195—206.
- [7] Marmur, J. and P. Doty: *J. Mol. Biol.*, 5: 109—118, 1962.
- [8] Schildkraut, C. and S. Lifson: *Biopolymers*, 3: 195, 1965.
- [9] Mandel, M.: *J. Mol. Biol.*, 5:485, 1962.