



## 用高压液相色谱法测定链霉菌细胞 DNA G-C 克分子百分比\*

丁 鉴 张忠泽 杨志勇 黄雅丽  
孙慧君 苏风岩 徐卿德 李维光

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

在测定细胞 DNA G-C 克分子百分比的诸多方法中, 以 Ko 等<sup>[1]</sup>建立的高压液相色谱法较为先进, 灵敏度更高, 速度快, 重复性好, 计算方便。我们在研究链霉菌 G-C 克分子百分比测定方法时, 对方法作了一些改良, 现将结果报告如下。

### 测定方法

#### 一、菌体的培养

用葡萄糖-天冬素培养基<sup>[2]</sup>, 28℃ 在旋转式摇床上振荡培养至对数生长期, 收集菌体。

#### 二、DNA 的分离

取湿菌体 1g, 悬浊于 2ml NaCl-EDTA 溶液 (pH8.0, 0.15:0.1, M/M), 超声波破碎细胞壁。将破碎物稀释至 20ml, 在 60℃ 水浴中, 加 2ml 25% SDS 溶液, 作用 10 分钟使菌体的 DNA 酶失活。待溶液冷却后, 加入高氯酸钠溶液使终浓度为 1M, 以利 DNA 析出。用氯仿-异戊醇 (24:1, V/V) 反复萃取使蛋白质被完全脱除<sup>[3]</sup>。最后将收集的核酸溶于氯化钠-柠檬酸钠溶液 (0.15:0.015, M/M), 加 1N NaOH 使溶液中浓度达 0.3N, 在 37℃ 作用 1 小时使 RNA 水解。这样分离出的 DNA 较为纯净。每克湿菌体可得 DNA 约 2mg。

#### 三、游离碱基的制备

取 0.5 mg DNA, 溶于 1ml 72% 高氯酸中, 完全溶解后移入安瓿中, 熔封管口, 在沸水浴中水解 40 分钟<sup>[4]</sup>。冷却后, 取水解物用蒸馏水稀释 2 倍, 备用。

#### 四、高压液相色谱测定

采用日立 635 型高压液相色谱仪, 柱为不锈钢制, 4×250 mm; 填充料为 Nucleosil C<sub>18</sub>, 5 μm。填充料装柱时与二氯六环和三氯化碳混成浆状, 用高压泵压入柱中。柱效试验理论塔板数为 11616。流动相为甲酸钠 0.1M, pH3.9, 流速 0.8ml/min, 压力 120 Kg/cm<sup>2</sup>, 柱温 40℃。检测器为 UV254nm, 0.08AuFs。

#### 五、结果的计算

1. 标准溶液的配制: 分别准确称取如表 1 所示的四种核酸碱基 (英国 BDH 产品), 加数滴磷酸<sup>[4]</sup>, 定容为 10ml。取 5ml 注入高压液相色谱仪, 其分离情况、检出时间, 峰型和面积如图 1 和表 2 所示。

2. 样品中四种碱基的毫克分子数的计算:

\* 本工作承张宪武教授热情指导并审查文稿, 谨致谢忱。

表 1 标准溶液的配制

碱基	重量(mg)	毫克分子浓度 (10ml 溶液中)	混合液(定容为 10ml)	
			取样毫升数	毫克分子浓度
鸟嘌呤	4.2	2.779	2	0.5558
胞嘧啶	4.3	3.870	2	0.7740
胸腺嘧啶	5.7	4.520	2	0.9040
腺嘌呤	4.4	3.256	2	0.6512

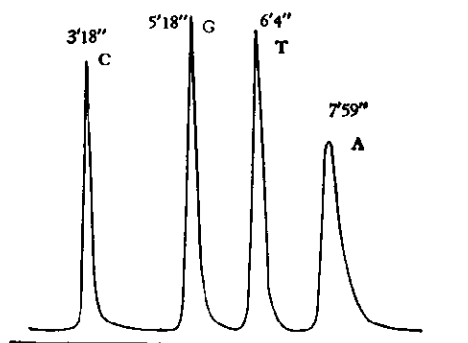


图 1 标准溶液的柱色谱分离图谱

表 2 四种碱基在高压液相色谱分离时的峰面积及其对应的毫克分子数

碱基	毫克分子浓度	注入量 ( $10^{-3}$ mM)	峰面积 <sup>[1]</sup> ( $\text{cm}^2$ )	K 值(单位面积 的毫克分子数) ( $\times 10^{-2}$ )
鸟嘌呤	0.5558	2.779	0.16	1.737
胞嘧啶	0.7740	3.870	0.22	1.759
胸腺嘧啶	0.9040	4.570	0.25	1.828
腺嘌呤	0.6512	3.256	0.40	0.8140

表 3 18 株链霉菌 DNA 的 G-C 克分子百分比测定结果

菌 株	各种碱基含量 ( $\text{mM} \times 10^{-3}$ )			G-C 克分子百分比*
	胞嘧啶	鸟嘌呤	腺嘌呤	
黄色直丝链霉菌 ( <i>Streptomyces flavorectus</i> ) (250-5)	1.32	1.30	0.54	70.8
	1.41	1.37	0.58	70.6
	1.39	1.34	0.56	70.9
黄色长孢链霉菌 ( <i>S. longisporoflavus</i> ) (标 2)	1.56	1.52	0.63	71.0
	1.44	1.46	0.60	70.7
	1.56	1.59	0.65	70.8
华美链霉菌 ( <i>S. splendens</i> ) (39-5)	1.61	1.60	0.64	71.5
	1.16	1.10	0.45	71.5
	1.20	1.26	0.49	71.5
华美链霉菌 ( <i>S. splendens</i> ) (标 4)	0.77	0.79	0.31	70.9
	0.78	0.80	0.31	71.8
	0.78	0.80	0.31	71.8

在仪器测定后求出各峰的面积,乘以各种碱基的 K 值即得。

3. G-C 克分子百分比的计算:按以下公式计算<sup>[1]</sup>:

$$\text{G-C}\% = \frac{\text{G} + \text{C}}{\text{G} + \text{C} + 2\text{A}}$$

G, C, A, 分别表示鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤的毫克分子数。

## 测定结果和讨论

按上述方法测定了由土壤中分离的链霉菌和 9 个类群的标准菌株(由中国科学院微生物研究所提供)各 9 株。结果见表 3。

由表 3 结果可见,所得结果与用  $\text{CsCl}$  密度梯度离心法<sup>[6,7]</sup>测得的数值相近。由于采用不同方法所得结果有时可相差很大,为避免麻烦,应尽量用同一种方法。用高压液相色谱法测定,重复性好,可以广为采用。

我们在提纯 DNA 时,用碱水解 RNA 的方法代替了惯用的酶水解法,结果与酶水解法一致(见表 4)。用碱水解法更为方便和经济,但应控制样品的浓度、碱液浓度和作用时间。据我们的试验,以 1—2 mg/10ml 样品,0.3N NaOH 浓度, RNA 水解时间 60 分钟,温度 37℃,得到较理想的结果。

续表 3

菌 株	各种碱基含量 ( $\text{mM} \times 10^{-3}$ )			G-C 克分子百分比*	
	胞嘧啶	鸟嘌呤	腺嘌呤		
红色长孢链霉菌 ( <i>S. longispororuber</i> ) (标 7)	1.64	1.56	0.64	71.4	71.4
绿色产色链霉菌 ( <i>S. viridochromogenes</i> ) (32-10)	1.74	1.67	0.75	69.5	
	0.64	0.64	0.275	70.0	69.7(70)
	1.84	1.84	0.80	69.7	
青色链霉菌 ( <i>S. glaucus</i> ) (标 9)	1.61	1.58	0.68	70.1	
	1.22	1.61	0.52	69.6	69.8
	1.17	1.13	0.50	69.7	
浅灰链霉菌 ( <i>S. griseolus</i> ) (22-3)	1.22	1.24	0.54	69.5	
	1.25	1.21	0.54	69.5	69.5(70.5)
	1.25	1.21	0.54	69.5	
赭灰链霉菌 ( <i>S. cinereogriseus</i> ) (标 10)	0.99	0.97	0.43	69.5	
	0.95	0.95	0.41	69.9	69.8
	0.90	0.87	0.38	70.0	
孔雀石绿直丝链霉菌 ( <i>S. malachitoretus</i> ) (204-17)	1.14	1.18	0.46	71.6	
	1.22	1.06	0.44	71.2	
	1.38	1.32	0.53	71.8	71.5
	1.12	1.05	0.43	71.6	
孔雀石绿链霉菌 ( <i>S. malachiticus</i> ) (标 11)	1.21	1.20	0.48	71.5	
	1.20	1.12	0.46	71.6	71.5
	1.29	1.22	0.50	71.5	
天蓝色链霉菌 ( <i>S. coelicolor</i> ) (40-7)	0.67	0.65	0.28	70.2	
	1.08	1.06	0.46	70.0	70.1
	1.21	1.19	0.51	70.2	
天蓝色链霉菌 ( <i>S. coelicolor</i> ) (标 12)	0.87	0.85	0.32	70.5	
	1.01	0.97	0.41	70.0	70.1
	0.98	0.92	0.41	69.9	
李色螺旋链霉菌 ( <i>S. prunispiralis</i> ) (43-20)	1.57	1.54	0.66	70.2	
	1.42	1.45	0.63	69.5	69.8
	1.46	1.45	0.63	69.8	
紫色直丝链霉菌 ( <i>S. violaceoretus</i> ) (标 13)	1.89	1.87	0.80	70.1	70.1
灰色产色链霉菌 ( <i>S. griseochromogenes</i> ) (10-10)	0.40	0.39	0.15	72.4	
	0.22	0.21	0.08	72.8	72.5
	0.28	0.26	0.104	72.2	
黑化链霉菌 ( <i>S. nigrificans</i> ) (标 17)	0.89	0.87	0.33	72.7	
	0.85	0.84	0.32	72.5	72.5
	0.91	0.89	0.345	72.3	
吸水链霉菌 ( <i>S. hygroscopicus</i> ) (10-6)	0.79	0.83	0.32	71.7	
	0.76	0.77	0.28	72.4	72.1
	0.83	0.79	0.31	72.3	

\* 后一数字是平均值,括号内是文献中用 CsCl 密度梯度离心法测得的结果。

(下转第 90 页)

表 4 碱水解和酶水解法所得测定结果

菌 株	G-C%	
	碱水解法	酶水解法*
链霉菌 ( <i>Streptomyces</i> sp.) 236—23	71.8	72.1
灰链霉菌	69.8	70.6

\* 所用酶制剂是中国科学院上海生物化学研究所产品。

此外,测定时应严格控制样品的 pH。当 pH 大于 4.0 时,胞嘧啶和鸟嘌呤分离不好; pH 小于 3.2 时,胸腺嘧啶和腺嘌呤分离不好。因此用高压液相色谱法测定,流动相应保持 pH3.9。待测样品应适当稀释,一般高氯酸水解液稀释 2 倍后,即不致于干扰分离系统的 pH。

## 参 考 文 献

- [1] Ko C. Y., J. L. Johnson and L. B. Barnett et al.: *Anal. Biochem.*, 80: 183—192, 1977.
- [2] Okanish, M. and K. F. Gregory: *J. Bact.*, 104: 1086—1094, 1970.
- [3] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3: 208—218, 1961.
- [4] Brijm. Mitruka, M. S.: *Gas Chromatographic Application in Microbiology and Medicine*, John Wiley and Sons, New York, 1975, p. 181.
- [5] 吉林化学工业公司研究院编: 气相色谱实用手册, 化学工业出版社, 北京 1977, 第399页。
- [6] Tewfik, E. M., et al.: *J. Bacteriol.*, 94: 1994—2001, 1967.
- [7] Hill, J. R.: *J. Gen. Microbiol.*, 44: 419—439, 1966.