

# 微生物培养液中几类含氮有机化合物的定量分析程序

谈家林 徐冠珠 王世卓·徐纯锡

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文探讨了微生物培养液中各类含氮有机物质的分离和测定方法, 拟定了系统的定量分析程序。

## 材 料 和 方 法

### 一、材料

1. 牛血清蛋白: ① Koch-Light Lab., Ltd. ②上海牛奶公司综合厂生产的产品。
2. RNA: ① 酵母 RNA, 西德产品。② 酵母 RNA, 上海酵母厂产品。③ 由中国科学院生物物理研究所提供。

3. DNA: ① 小牛胸腺 DNA, 西德产品。② 上海东海制药厂产品。

4. 杆菌肽: ① 本所刘肃同志赠送。② 卫生部药品生物制品检定所提供。

5. 氨基酸、二肽、三氯醋酸 (TCA) 等其它试剂均为国产试剂。

### 二、方法

1. 三氯醋酸溶液的配制: 将 TCA 溶液用比重计调至所需浓度, 用百分浓度表示。
2. 蛋白质的测定: ① Lowry 等的福林酚

法<sup>[1]</sup>。② 微量双缩脲法<sup>[2]</sup>。③ 双缩脲法<sup>[3]</sup>。

3. 多肽的测定：① 浊度法<sup>[4]</sup>。② 微量双缩脲法<sup>[2]</sup>。③ 福林酚法<sup>[1]</sup>。

4. DNA 的测定：Giles 等的二苯胺法<sup>[5]</sup>。

5. RNA 的测定：Schjeide 的地衣酚法<sup>[6]</sup>。

6. 氨基酸的测定：Lee 等茚三酮法<sup>[7]</sup>。

7. 培养基成份：① 丰富培养基(%)：葡萄糖 2、蛋白胨 0.5、酵母浸出汁 0.5。② 合成培养基(%)：葡萄糖 2、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1、酵母浸出汁 0.5、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05、NaCl 0.01、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01。

8. 培养方法：500ml 三角瓶装液量为 50ml，接种后在旋转式摇床(220 r. p. m.，偏心距 2.5cm) 上于 28—30℃ 培养 4 天。

## 结果和讨论

### 一、测定方法的比较

1. 蛋白质的测定：在三种方法中<sup>[1-3]</sup>，以福林酚法灵敏度最高，微量双缩脲法次之，双缩脲法灵敏度较低。福林酚法测定中，凡含有酚基

的化合物都能显色，但干扰因素较多(见表 1)。

表 1 说明，所测样品要高度纯化，不含其他物质，即必须将蛋白质与 RNA、DNA 和多肽等物质分开才能测定。用微量双缩脲法以同一波长的两个吸收值之差对蛋白质定量，可以消除 RNA、DNA 的干扰，因此可在 RNA 和 DNA 存在的情况下定量测定蛋白质。双缩脲法干扰因素少，但灵敏度低，不宜作精确的定量。

综合上述结果，福林酚法和微量双缩脲法可用于样品溶液中蛋白质的精确定量，而双缩脲法仅能用于蛋白质的定性和粗定量。

2. 多肽的测定：多肽的分子量比蛋白质小，一般可用福林酚法和微量双缩脲法作精确定量，而用浊度法作多肽的定性或粗定量。

3. 氨基酸的测定：用茚三酮显色法。但作定量分析时，需将反应液 pH 调至 5—7 时方能进行。

4. DNA 和 RNA 的测定：DNA 的定量测定用 Giles 的二苯胺法。RNA 的定量测定用 Schjeide 的地衣酚法。蛋白质、多肽和氨基酸对

表 1 各种分析方法的干扰因素

结果 方法和 项目 试剂名称	蛋白质和多肽的测定方法						RNA 的测定方法		DNA 的测定方法	
	福林酚法		双缩脲法		微量双缩脲法		地衣酚法		二苯胺法	
	浓度*	O. D.	浓度	O. D.	浓度	O. D.	浓度	O. D.	浓度	O. D.
牛血清蛋白							500	0.048	175	0
RNA	290	0.049	553	0	341	0.001			9.24	0.001
DNA	314	0.119	123	0.004	314	0.01	180	0.03		
杆菌肽	341	0.382	700	0.112	290	0.147	10.7	0	10.7	0
多粘菌素	280	0.755					11.2	0	11.2	0.004
甘氨酸 酪氨酸	326	1.75			163	0.093	65.2	0	16.3	0
亮氨酸 酪氨酸	205	0.80								
甘氨酸 色氨酸			695	0.005			481	0.009	121	0
酪氨酸	233	0.755	584	0						
亮氨酸			973	0	435	0.317				
丝氨酸									157.8	0
半胱氨酸							496	0.005	129	0.005
甲硫氨酸							427	0.005	107	0
精氨酸							764	0	191	0
羧基脯氨酸							690	0	172.5	0
测定范围	500 以下				1000 以下		90 以下		50 以下	

\* 单位均为 (μg/ml)。

这两种方法干扰很小。但从培养液中直接测定 RNA 和 DNA 是不可能的。误差较大(见表 2)。所以必须将 RNA 和 DNA 从培养液中分离出来,方能测定。

测定中发现:所用玻璃管以橡皮塞为盖测得的吸收值,为以玻璃塞为盖的 1/4。其原因

表 2 DNA 加入培养基中的测定结果

结果 样品名称	项目	测定值	相对误差
		(mg/ml)	(%)
DNA		9.80	0
合成培养基		0.01	0
合成培养基 + DNA		11.50	+17.2
丰富培养基		3.50	0
丰富培养基 + DNA		12.80	-3.8

有待探讨。

## 二、不同含氮物质的分离

采用不同浓度的 TCA 沉淀各类含氮物质,结果如下。

1. 蛋白质、RNA、DNA 的沉淀分离:用上海牛奶公司综合厂生产的牛血清蛋白,上海东海制药厂生产的 DNA,中国科学院生物物理所提供的 RNA 分别制成标准溶液,作三种物质的单独沉淀试验,结果见表 3。

表 3 说明, TCA 的终浓度在 3—5% 时, 95% 以上的蛋白质可从溶液中沉淀出来, TCA 浓度低于 3% 或高于 5% 都不能将蛋白质沉淀完全。TCA 浓度在 2—10% 都能较好地

表 3 不同浓度的 TCA 对三种物质的沉淀结果\*

结果 TCA 浓度 (%)	项目	蛋 白 质				RNA				DNA	
		第一次		第二次		第一次		第二次		浓 度	相对误差
		浓 度	相对误差	浓 度	相对误差	浓 度	相对误差	浓 度	相对误差		
对 照		220	0	228	0	852	0	29.1	0	20.0	0
1		85	-61.0	103	-55.0	698	-18.1				
2		200	-9.1	205	-10.1			27.2	-6.5	19.7	-1.5
3		215	-2.3	219	-4.0	850	-2.35	28.7	-1.4	20.5	+2.5
5		210	-4.5	219	-4.0	700	-17.8	26.8	-7.9	20.2	+1.0
7						685	-19.6				
10				165	-27.6			24.1	-17.2	19.1	-4.5
15		140	-36	165	-27.6						

\* 已知浓度蛋白质、RNA、DNA 溶液分别加入 50% 的 TCA 溶液, 4°C 放置 30 分钟, 室温 4000rpm. 离心 20 分钟, 去上清液用 0.1N NaOH 溶解沉淀。定容至原体积再测定。蛋白质测定用福林酚法。以不加 TCA 沉淀的原溶液测定的结果为对照。计算 TCA 沉淀后测定的相对误差。浓度单位为  $\mu\text{g/ml}$ , 相对误差以百分数表示。

表 4 三种物质加入无菌培养基的沉淀试验

结果 处理**	项目	蛋 白 质		RNA		DNA	
		浓 度	相对浓度*	浓 度	相对误差	浓 度	相对误差
对照(加入量)		313		34.5		12.5	
3%TCA①		320	+2.2	34.8	+0.9	11.9	-4.8
水浴处理②		291	-1.3	34.8	+0.9	11.7	-6.4
无菌培养基③		未 检 出		未 检 出		未 检 出	

\* 以加入量为对照计算误差。浓度和相对误差的表示同表 3。 \*\* ① 丰富培养基中加入已知量的蛋白质, RNA、DNA 后, 取混合液 10ml, 加 0.64ml 50%TCA, 使 TCA 浓度达 3%, 4°C 放置 30 分钟, 室温、4000rpm. 离心 20 分钟, 去上清液, 沉淀用 3%TCA 溶液洗涤二次, 再用 0.1N NaOH 溶解并定容 10ml, 定量测定蛋白质。② 如①操作沉淀用 3%TCA 溶液洗涤后, 悬浮于 10ml 3%TCA 溶液中, 沸水浴中加热 15 分钟, 溶解 RNA 和 DNA, 室温 4000rpm. 离心 20 分钟, 上清液测定 RNA、DNA, 沉淀用热的 3%TCA 溶液洗涤二次后, 用 0.1N NaOH 溶解, 定容至 10ml 测定蛋白质质量。③ 丰富培养基如①操作测定蛋白质、RNA、DNA。

液中沉淀 DNA。沉淀 RNA 的最适 TCA 浓度为 3%，所以 TCA 浓度在 3% 时，可以从溶液中将蛋白质、RNA 和 DNA 有效地沉淀出来。相对误差在 4% 以下。

将蛋白质、RNA、DNA 加入无菌丰富培养基中进行沉淀试验(见表 4)。沉淀量与三种物质的加入量相近，相对误差在 5% 以下，这就证明 3% 的 TCA 同时沉淀这三种物质是有效的，不需将它们作进一步分离，即可分别定量，但对蛋白质定量只能用微量双缩脲法。

RNA 和 DNA 溶解于热的 3% TCA 溶液，经水浴加热 15 分钟后可将 RNA、DNA 与蛋白质分开。沉淀再用热的 3% TCA 溶液洗涤

二次，得纯度较高的蛋白质，可用福林酚法定量。无菌培养基经沉淀处理未检出蛋白质、RNA、DNA。试验中发现，蛋白质在 3% TCA 溶液中放置 6 小时以上，会使测定结果偏低。这可能是蛋白质发生不可逆变性，在 0.1N NaOH 溶液中溶解度下降，影响测定结果。

2. 多肽的分离：我们用杆菌肽，试验了不同浓度的 TCA 对多肽的沉淀效果，结果见表 5。

表 5 说明，TCA 浓度在 12—16% 之间，测定的相对误差在 5% 以下。用不同浓度的杆菌肽溶液控制最后 TCA 浓度 14.5% 作沉淀试验，发现随杆菌肽浓度的降低，测定误差增大。

表 5 不同浓度的 TCA 对杆菌肽的沉淀效果

结果 / 项目 \ TCA 终浓度 (%)	0 (对照)	5	10	12	14	15	16	18	20	30
测定值*(mg/ml)	1.00	0.360	0.735	0.955	1.038	1.025	1.00	0.860	0.5±2	0
相对误差**(%)		-64	-26.5	-4.5	+3.8	+2.5	0	-14	-45.8	100

\* 浊度法测定。 \*\* 试液浓度用 1.00 mg/ml，以此为对照计算相对误差。

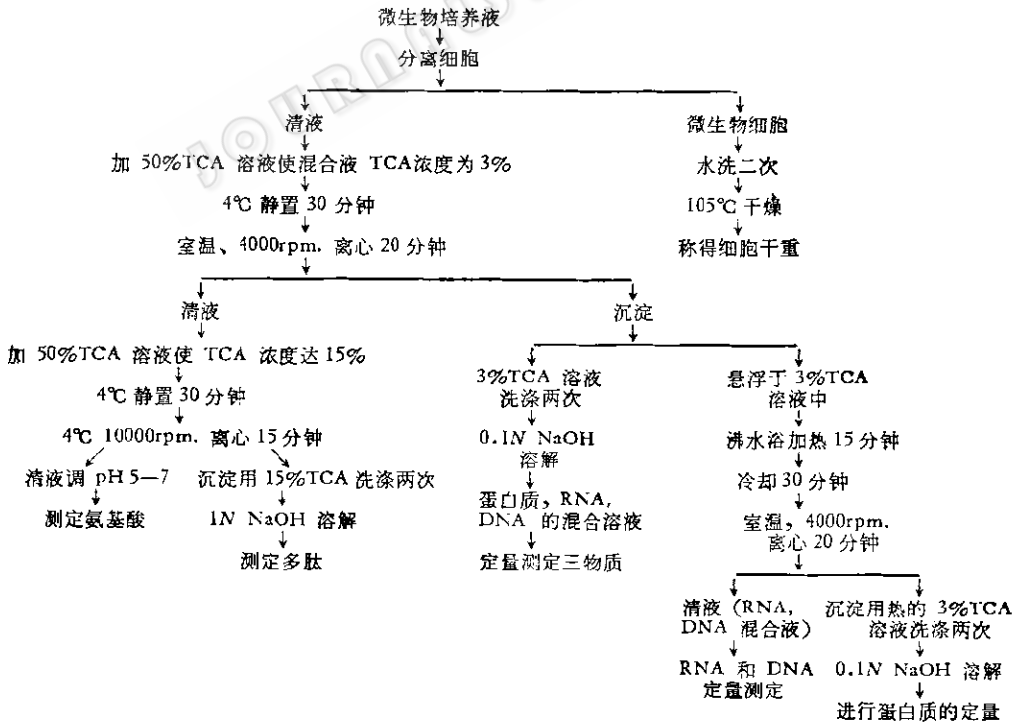


图 1 微生物培养液中含氮有机物质分离程序

表 6 丝孢酵母 2.498-N-47 培养液的分离和测定结果\*

细胞外蛋白质 ( $\mu\text{g/ml}$ )			细胞外多肽 ( $\mu\text{g/ml}$ )			细胞外氨基酸 ( $\mu\text{g/ml}$ )			细胞外 RNA ( $\mu\text{g/ml}$ )		
测定值	平均值	相对误差** (%)	测定值	平均值	相对误差 (%)	测定值	平均值	相对误差 (%)	测定值	平均值	相对误差 (%)
112		-5.1	133		-0.8	260		-4.1	78.2		+3.0
118		0	133		-0.8	282	271	+4.1	68.9		-9.2
119	118	+0.8	129	134	-3.7	289		+6.6	78.3	75.9	+3.2
123		+4.2	140		+4.5	254		-6.3	78.1		+2.9

\* 为合成培养基的培养液。 \*\* 以平均值为标准计算相对误差。

一般情况下,相对误差低于 10%。

试验表明,在低温沉淀(0—4℃)、高速离心(10000rpm.)可得到较好的结果。根据上述结果确定培养液中含氮物质的分离程序(见图1)。

### 三、微生物培养液分离测定的应用举例

用本程序对丝孢酵母 2.498-N-47 的同一培养液作重复分离测定,结果见表 6。

表 6 说明,培养液按上述程序分离后测定结果重复性好。相对误差在 10% 以下。细胞

外 DNA 均未检出,说明本程序是可行的。

### 参 考 文 献

- [1] Lowry, O. H.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- [2] Itzhaki, R. F.: *Anal. Chem.*, **9**: 401, 1964.
- [3] 潘家秀等编: 蛋白质化学研究技术, 12 页, 1973 年, 科学出版社, 北京, 1962 年第一版。
- [4] Smith, R. F.: *Anal. Abst.*, **30**: 3F, 11, 1976.
- [5] Giles, K. W.: *Nature*, **206**, (4979): 93, 1965.
- [6] Schjeide, O. A.: *Anal. Biochem.*, **27**: 473, 1969.
- [7] Lee, Y. P.: *Anal. Biochem.*, **14**: 71—77, 1966.