在自由蒸发条件下测定DNA碱基对解链温度时溶液膨胀效应的校正*

王 修 垣

（中国科学院微生物研究所，北京）

DNA 中 G-C 含量已作为一项重要的分子生物学指标应用于微生物分类。在确定 DNA 中 G-C 克分子百分数含量时，用紫外分光光度法测定 T_m 值（解链温度）[1]是应用较广的一种方法。周慧玲和徐浩[2]提出的校正溶液蒸发量公式，使 T_m 值得以在自由蒸发条件下测定。我们在采用此法时发现，由计算所得数值绘出的图形有时难以确定出 T_m 值。

上述作者[2]指出，在蒸发量校正公式中忽略未计热膨胀效应的影响。鉴于在依温度为转移的光学特性的测定中都必须校正溶液的膨胀效应，当温度从 20℃ 上升到 90℃ 时，水体积的膨胀约为 4%，而在采用密闭比色小杯进行测定时亦需消除膨胀的影响[3]，所以，未消除膨胀效应的影响很可能是导致难以确定 T_m 值的主要因素之一。我们在结果计算中消除了它的影响，现将结果报道如下。

材 料 和 方 法

一、菌株

铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）AS 1.204 和鲑色诺卡氏菌（*Nocardia salmonicolar*）AS 4.1040。均为本所菌种保藏室保藏菌株。

二、方法

为提取 DNA，铜绿假单胞菌 AS 1.204 用溶菌酶破壁，鲑色诺卡氏菌AS 4.1040 用超声波破壁。核酸的提取及结果的计算均参照文献[2]中所列的程序进行，只是在他们拟定的体积校正公式中加上了热膨胀体积的校正：

$$V_x = \left[V_1 - \frac{1}{2} L(T_x - T_1)^2\right] \times V_{tx.exp.}$$

式中 $V_{tx.exp.}$ 为所测温度下水的实际体积，此值可由物理化学手册[4]中查得。

结 果 和 讨 论

曾用 3 株已鉴定的和 7 株未鉴定的细菌菌株分别在 SSC 溶液和 PO_4^{3-} 溶液[5]中进行了 60 多次核酸增色性曲线的测定。本文仅以两

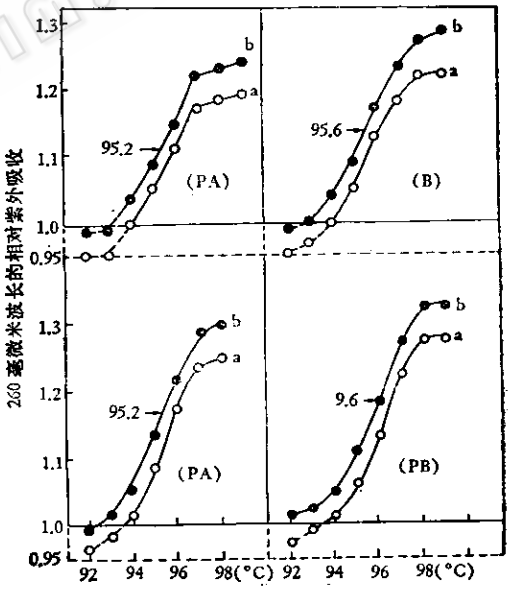

图 1 铜绿假单胞菌 AS 1.204（上）和鲑色诺卡氏菌 AS 4.1040（下）的 DNA 增色性曲线

数字示 T_m 值；a：未校正；b：校正；虚线部分表示未校正膨胀校应时对结果的影响

* 参加部分工作的还有油田微生物研究组的同志们，在工作中与徐浩、周慧玲进行了有益的讨论，我院化学研究所惠借仪器，特致谢意。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

株细菌在 SSC 溶液中测定的结果为例，说明热膨胀体积校正的必要性。

图 1 表示铜绿假单胞菌 AS 1.204 和鲑色诺卡氏菌 AS 4.1040 的 DNA 增色曲线。其中 PA，PB 和 B 分别为试验菌株重复试验的样品号。每个样品分别绘出两条曲线：曲线 a 按照未校正膨胀效应的计算结果绘出，曲线 *b* 按照校正了膨胀效应的计算结果绘出。比较各图中的曲线 *a* 和 *b*，可以明显地看出，按照曲线 *a*，若不绘出 OD_{tx}/OD_{to} 的比值小于 1.0 的虚线部分，难以断定出 T_m 值；若从 $OD_{tx}/OD_{to}=1.0$ 处确定 T_m 值，可能有较大的误差。而按照曲线 *b*，在图 1（下）的情况下，容易确定出 T_m 值；在图 1（上）的情况下，确定 T_m 值也比较容易，而且对实际值几乎没有影响。因为此时，曲线起始点的 OD_{tx}/OD_{to} 的比值距 1.0 只差 0.01。若不校正膨胀，误差最高为 5%；校正膨胀，误差最高为 1%。

我们采用此法，对这两株细菌重复进行了 DNA 的提取和增色曲线的测定各四次，把得到的 T_m 值进行了统计学处理，结果列于表 1。

从表 1 看出，我们得到的数值低于文献值。正如 Powell[7] 所指出，在把不同实验室所得的 G-C 资料作比较时必须很慎重。鉴于此法的测定结果受到离子强度、所用仪器的灵敏度等的影响，参比菌株的使用是很必要的。

表 1　两株细菌 DNA 中 G-C 克分子百分数

菌　株	T_m(℃)		%G＋C	
	测定值	文献值	测定值	文献值
铜绿假单胞菌AS 1.204	95.5±0.26	96.7—97.0[2]	63.9±0.61	66.0—67.1[2]
鲑色诺卡氏菌AS 4.1040	94.6±1.21		61.71±2.95	66—68[6]

参　考　文　献

[1] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, **3**: 203—218, 1961.

[2] 周慧玲：微生物学报，**18**(2):134—139，1978。

[3] Felsenfeld, G.: Analysis of Temperature-dependent Absorption Spectra of Nucleic Acids. *Procedures in Nucleic Acid Research* (edsby Cantoni, G. L. et al.), Vol. 2, New York, Harper and Row, 1971, 233—244.

[4] Weast, R. C.: *Handbook of Chemistry and Physics*, 51st., The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ochio, 1970—1971, F-5.

[5] Prontali, C. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **38**: 243—250, 1965.

[6] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th, ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974, p. 726—727, 741.

[7] Powell, E. O.: *J. Gen. Microbiol.*, **15**: 492, 1956.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn