岡山医学会雑誌

第77巻4号(第845号)

昭和40年4月30日発行

545.84:547.963.3

DNA塩基定量法の吟味

カラム・クロマトグラフ法について

岡山大学医学部微生物学教室(主任:村上 栄教授)

大 熊 晴 男

金 政 泰 弘

〔昭和40年4月1日受稿〕

緒 言

DNAの性質を知るための方法としてDNA中の核酸塩基比を求めることが広く行われている。そのため多くの研究者によつて種々の方法が報ぜられているが、方法としてはできるだけ精密な結果を与えてくれるものが望ましい。ここではイオン交換樹脂を用いるカラム・クロマトグラフ法についてその定量法を吟味し、注意すべき事項についてのべた。

実験材料及び方法

1. イオン交換樹脂: Dowex 1 及び Dowex 50 (×2, メッシュ; 200~400)。
2. 試料: ミノファーゲン社製子牛胸腺 DNA 10 mg に 7.2N 過塩素酸 (PCA) 0.2ml を加え 100°C 水浴中で1時間分解した。
3. カラム: Cohnの方法にならつたり、但し、カラムの高さは Dowex 1 では 8.5cm, Dowex 50 では 18cm とした。
4. 溶離液: Dowex 1 の場合には Cohn の記載による 0.2M $\text{NH}_4\text{OH}\cdot\text{NH}_4\text{Cl}$ 緩衝液¹⁾を、Dowex 50 の

場合には 0.5N 塩酸を用いた。

5. 島津分光光度計により、紫外部吸光度より求め、吸光定数は Benedich²⁾の値を用いた。A: 12.6 (262.5m μ), G: 11.1 (249m μ), C: 10.0 (276m μ), T: 7.95 (265m μ)。いずれも 0.1~0.5N の HCl 濃度で測定した。

実験成績並びに考 按

1. Cohn の方法の吟味

Dowex 1 を使用した場合、Cohn の原法¹⁾により、原法のままの分離結果を得た。Dowex 50 を使用した場合は原法では分離は不十分であり、カラム高を 18cm とし溶離液、HCl 濃度の 0.5N 液を用いて満足な分離をみた。溶出順序は Cohn の報告と一致する。

2. 塩基を試料とした場合の回収率

市販アデニン、グアニン、ウラシルを用い有効4桁まで秤量し 6N 塩酸溶液とし、定量ずつ混合し、0.5N 塩酸濃度に稀釈したのち実験方法でのべた方法で Dowex 50 を用いて分離し、定量した。試料 10ml 中には A: 489 γ , G: 130 γ , U: 577 γ を含む様にした。

表 1 回収塩基定量値

	$E_{\max}$ による 定量値	回収率	E_{260} による 定量値	回収率
Adenine	487γ	99.5%	495γ	102%
Guanine	126γ	97.5%	126γ	97.5%
Uracil	561γ	97.5%	561γ	98.5%

使用せる塩基量 A : 489γ G : 130γ U : 577γ

使用せる吸光係数 A : 12.6 G : 11.1 U : 8.15
 A : 12.4 G : 8.0 U : 8.15
 ($E_{\max}$)
 (E_{260})

結果は表 1 に示す如く、満足すべき回収成績が得られた。

なお、Dowex 1 についてはグアニンはアンモニウム緩衝液にほとんど不溶であり、回収実験は行なわなかった（後述）。

3. DNA 試料調製法の検討

DNA を PCA にて分解した後、次の 2 法によって定量を行つて成績を比較した。

A. PCA 分解資料を 5 倍に蒸留水で希釈、黒色残渣を遠心除去し上清をそのまま試料とし使用した（Benedict 法²⁾）。カラムは、Dowex 50 を使用、試料はそのまま吸着。

B. PCA 分解試料に 0.3N KOH を加え中和し不溶の過塩素酸カリを除き試料とした（Smith 法³⁾）。試料は更に 0.2M pH 10.6 のアンモニウム緩衝溶液として Dowex 1 に吸着、分離。

表 2 各方法によつてえられた塩基比の比較
 (T : チミン, C : シトシン, G : グアニン,
 A : アデニン)

	T	C	G	A	回収率%
Dowex 50	27.9	22.2	22.1	27.8	101
	27.6	22.6	21.8	28.0	102
Dowex 1	26.8	25.5	19.7	28.0	98
	29.7	31.2	13.4	25.7	100
	25.5	33.8	14.6	26.1	95

表 3 核酸塩基の溶解性

	aq. dest. 100ml	Conc. NH ₄ OH 10ml	NH ₄ Cl -NH ₄ OH 100ml	N-HCl 10ml	3~6 N HCl 10ml	N-NaOH 10ml	中和時の沈澱
Guanine 15mg	不溶	殆ど不溶	不溶	難溶	溶	溶	+
Adenine 15mg	難溶	難溶	難溶	溶	溶	溶	-
Cytosine 15mg	溶	溶	溶	溶	溶	溶	-

定量結果は表 2 のごとく、Dowex 50 を用いたものでは 2 回の実験で塩基比はほぼ同一の値を示し、又対応塩基の比も殆ど 1 であるが Dowex 1 を用いたものでは 3 回の実験で塩基比の一致はみとめられず、特にグアニンの値が著しく低く表われている。これは次にのべるように試料作成課程でグアニンが析出し過塩素酸カリの沈澱と共に除かれるためであろう。

4. 核酸塩基の溶解性

実験 3 の疑問を検討するため、数種の核酸塩基の溶解度を検討した。

表 3 に示すようにグアニンは著しく難溶性であり、又 1 規定塩酸に溶解されたグアニンも中和された後には速かに析出する。

以上により、核酸分解物を試料とする場合分離試料作成の際、濃厚な分解物の pH を中性附近にもたらしことはグアニンの析出除去を来すおそれがあることが示された。

5. Dowex 1 を用いての変法

以上のような Dowex 1 を用いた場合の不確かさを防ぐため、試料及び吸着条件をかえてクロマトグラフィーを行つた。PCA 分解試料を蒸留水で 6 倍に希釈後、黒色沈澱を除き、1N KOH の等量を加え、アルカリ性として生ずる KClO₄ を除き、上清の一部を 50 倍に蒸留水で希釈、約 50ml を吸着、以下は、Cohn の原法に従つた。

その結果えられた成績は；アデニン；28.0、グアニン；22.0、シトシン；22.4、チミン；27.6 であり、Dowex 50 を用いて得られた結果とよく一致した。尚、この変法では塩基の溶出順序は変わらないが、溶出位置が後方にかなり遅れて出てくる。又、この方法では分離試料を酸性側にもたらし定量する必要があるため（核酸塩基の紫外吸光度は中性附近では著しく不安定である）全体として操作が繁雑である。

小 括

1. Dowex 1 及び Dowex 50 を用いるカラムクロマトグラフ法により DNA 塩基比定量法を吟味した。定量性においてはいずれの場合も満足すべき結

果がえられた。しかし、Dowex 1 を用いる場合は操作が Dowex 50 の場合に較べてやや繁雑である。

2. 核酸分解による核酸塩基溶液の pH を中性附近にもたらしことはグアニンの不溶性のため結晶を析出し定量結果を誤らせるおそれがある。

参 考 文 献

- 1) COHN, W. E.: Science, 109, 377, 1949.
- 2) COLOWICK, S. P. & N. P. KAPLAN: Methods in Enzymology, pp. 722, 1957.
- 3) CHARGAFF, E. & J. N. DAVIDSON: The Nucleic Acids, pp. 277, 1955.

Analytical Studies on the Column Chromatographic Determination
of DNA Base Composition with Ion Exchange Resins.

by

HARUO OHKUMA YASUHIRO KANEMASA

Department of Microbiology, Okayama University Medical School.
(Director: Prof. S. MURAKAMI)

1. Many type of methods has been designed for determination of nucleic acid base composition. In this paper the accuracy of the results obtained using ion exchangers were tested about calf thymus DNA. The column chromatographic methods yield satisfactory results.

2. In the course of the operation, neutralization of acidic solution of nucleic acid bases must be carried out carefully to avoid precipitation of purine bases.