

双链多核苷酸 poly I:C 的制备

靳传富 李生广 刘永谦 焦有烈
(中国科学院生物物理研究所) (中国人民解放军 59175 部队)

蒋巧云
(中国科学技术大学生物物理教研室)

自 1957 年 Issacs 发现干扰素以来,人们对于干扰素进行了广泛的研究。由于外源性干扰素在来源、提纯、长期保存方面遇到很大困难,因此,研究工作较多地转向内源性干扰素及其诱导物。

干扰素是一种分子量较小、较耐酸碱的蛋白质,是宿主天然抵抗力的一个组成部分。它可以由病毒 RNA 诱导产生,也可以由天然的或人工合成的其他物质诱导产生;后者统称为干扰素诱导物。很多物质都可以诱导干扰素。除病毒外,细菌、寄生动物、多糖、细菌内毒素、微生物提取物、合成塑料等人工聚合物均可作为诱导物,但是有研究价值和前途的为数极少。多聚核苷酸类化合物是引人注目的干扰素诱导物。在近 30 种已研究的这类化合物中,双链多核苷酸 poly I:C[注]是最有效的干扰素诱导物。它具有使用剂量小、诱导效价高等特点,并已开始临床试用,是干扰素诱导物研究的重点对象之一。

poly I:C 不仅具有抗病毒作用,而且能刺激吞噬作用,增强抗体的形成,具有抗肿瘤及细菌、原虫感染等多重保护作用。

poly I:C 抗病毒作用的特点是具有广普性。在细胞培养及动物体内对多种病毒(例如,肺炎病毒、脑心肌炎病毒、疱疹性口腔炎病毒及某些副流感病毒等)感染,均有良好的保护作用。poly I:C 对几种转移性肿瘤有显著的抗性,对 L 1210 腹水肿瘤的抗性尤其明显;对于多种网状细胞肉瘤、S 91 黑瘤、乳腺癌、纤维肉瘤等具有不同程度的抑制作用。此外,对某些病菌及原虫感染也具有保护活性。poly I:C 的临床应用尚在初步试验阶段,但已有少数成功的例子。从国内外有限的临床报告来看, poly I:C 对预防感冒、治疗疱疹性角膜炎和疱疹性口腔炎等病毒性疾病效果显著;抗肿瘤等疾病的效果尚需进一步临床观察。

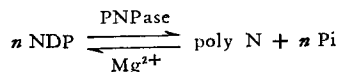
目前,人们对许多病毒性疾病还缺乏有效的防治方法。干扰素及其诱导物的研究,为今后防治某些病毒性疾病及肿瘤提供了新的途径。因此,开展高效诱导物 poly I:C 的研究,不仅具有重要的实际意义,而且对于联系生产实际开展核酸结构与功能的理论研

究,也具有一定意义。

关于干扰素及其诱导物 poly I:C 的生物学功能已有很多报道;本文着重介绍大分子 poly I:C 的制备方法。

原 理

多核苷酸磷酸化酶(PNPase)催化各种核糖核苷二磷酸(NDP)的聚合反应,产生多核苷酸及无机磷。其反应式是:



单链多核苷酸聚合物 poly I 和 poly C,在一定条件下等克分子混合后,按碱基配对原理形成双链多核苷酸 poly I:C。

材 料 和 方 法

1. CDP 的制备

CDP 有两种来源。一种是 Moffatt-Khorana 法,使用二环己基碳二亚胺(DCCI)缩合剂进行有机合成,经柱层析分离纯化(图 1);产率约 50%,异丁酸系统纸层析鉴定为纯品(图 2)。

一种是北京市首都啤酒厂光合磷酸化法生产 CTP 的副产物,经离子交换柱层析法分离纯化:柱床体积 $\phi 100 \times 400$ 毫米,聚苯乙烯季胺型强碱性阴离子交换

[注] 本文所用核苷酸的缩写如下:

ADP——腺嘌呤核苷二磷酸
AMP——腺嘌呤核苷一磷酸
ATP——腺嘌呤核苷三磷酸
CDP——胞苷二磷酸
CMP——胞苷一磷酸
CTP——胞苷三磷酸
IDP——次黄嘌呤核苷二磷酸
NDP——任一核苷二磷酸
poly C——多聚胞嘧啶核苷酸
poly I——多聚次黄嘌呤核苷酸
poly N——某种多聚核苷酸
poly I:C——双链多聚次黄嘌呤核苷酸胞嘧啶核苷酸

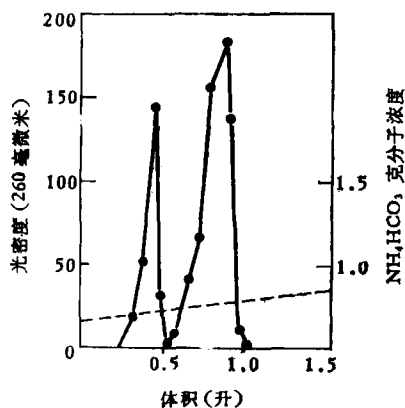


图1 有机合成 CDP 柱层析图谱

Zerolit FF 阴离子交换树脂(Cl^- 型), 柱床体积 $\phi 35 \times 300$ 毫米, $0.3-1.5 \text{ M}$ NH_4HCO_3 线性梯度洗脱, 流速 120 毫升/小时
(虚线表示盐浓度梯度)

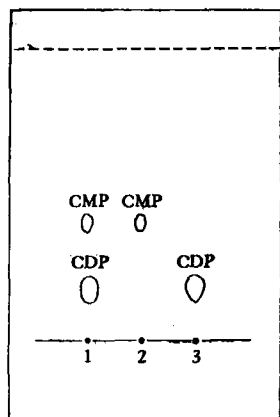


图2 纸层析图谱(上行)

溶剂: 异丁酸: 1 M NH_4OH : 0.1 M EDTA = $100:60:1.6$

1——上柱液; 2——峰 I; 3——峰 II

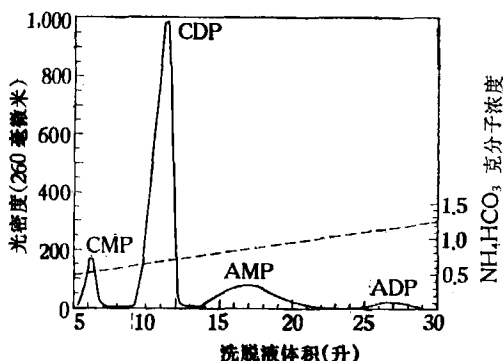


图3 光合磷酸化法制备 CDP 的柱层析图谱
(虚线表示盐浓度梯度)

树脂(华东化工学院产), 200—400 目(HCO_3^- 型); 上柱量 1.9×10^6 OD_{260} [光密度(260 毫微米)], 上柱液浓度 1%, pH 9, 流速 1,000 毫升/小时; $0.3-1.5 \text{ M}$ NH_4HCO_3 (各 20 升) 线性梯度洗脱, 流速 1,000 毫升/小时, 分部收集体积 200 毫升。结果见图 3、表 1。收集 CDP 峰 3,000 毫升, 减压浓缩至约 500 毫升, 调至 pH 2.5, 加四倍体积 95% 乙醇, 4°C 放置过夜; 沉淀加数次无水乙醇脱水, 研碎, 用乙醚洗三次, 减压除去乙醚得洁白干粉 89.8 克。纸电泳鉴定(图 4)为电泳纯, 含量 90%。

表 1 CDP 柱层析收率

名 称	体 积 (毫升)	OD_{260}
CMP	4,120	1.36×10^5
CDP	3,000	1.55×10^6
AMP	9,000	2.9×10^5
ADP	7,900	6×10^4

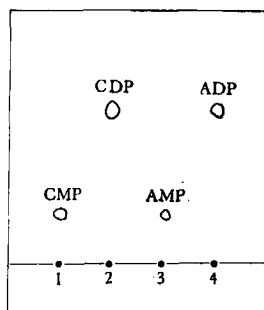


图4 CDP 柱层析各峰电泳图谱

溶剂: 0.05 M 柠檬酸缓冲液, pH 3.0; 600 伏, 2 小时

2. IDP 的制备

IDP 由 ADP 脱氨制备。ADP 由首都啤酒厂光合磷酸化法生产 ATP 的副产物制备, 分离纯化条件与 CDP 的相同。将 40 克 ADP 溶于 2,000 毫升水, 加 60 克固体 NaNO_2 , 冰醋酸调至 pH 3.5, 室温反应

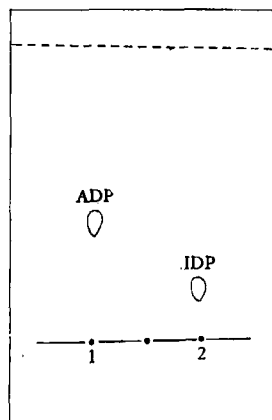


图5 纸层析图谱(上行)

溶剂同图 2。1——脱氨前; 2——脱氨后

3—4 小时;异丁酸系统纸层析检查(图 5)。待 ADP 完全脱氨后,用饱和 LiOH 调至 pH 7.0,加 2—3 倍体积 95% 乙醇,4℃ 静置过夜;沉淀,按上述制备 CDP 的方法制成干粉,含量约 90%。

3. poly I 的制备

反应体系每毫升含:IDP 20—30 毫克, $MgCl_2$ 6 微克分子, EDTA 1 微克分子, 尿素 300 微克分子, Tris-HCl (pH 8.5) 150 微克分子, *E. Coli* 多核苷酸磷酸化酶* 2 单位。在 35℃ 保温 10—12 小时。反应过程中粘度增加, OD_{248} 下降, 无机磷增加。反应 4 小时出现明显合成点, 4—6 小时减色效应最明显, 11 小时无机磷仍有明显增加。适时终止反应, 按 Gierer-Schramm 法分离聚合物。聚合反应终止时加入 1.5 倍体积的 85% 重蒸酚, 剧烈振荡 10 分钟, 静置分层。除去酚层, 加少量水反抽提酚层。合并两次水相, 如上重复处理一次。水相加入等体积乙醚, 萃取水相残余酚, 重复 2—3 次。减压除去水相残余乙醚, 对 0.05 M NaCl-0.004 M 柠檬酸钠在 4℃ 透析三次, 对重蒸水透析至外液无紫外吸收; -20℃ 保存, 最大制备量 1.2 克, 产率见表 2。

表 2 poly I 产率

起始反应 OD_{248}	终止反应 OD_{248}	产物 OD_{248}	产率(%)
28.8×10^3	25.6×10^3	12.0×10^3	53
28.8×10^3	24.5×10^3	10.8×10^3	52.3

4. poly C 的制备

除底物改用 5'-CDP 外, 反应条件和聚合物分离步骤与 poly I 制备法相同。最大制备量 1.2 克, 产率见表 3。

表 3 poly C 产率

起始反应 OD_{248}	终止反应 OD_{248}	产物 OD_{248}	产率(%)
24.0×10^3	16.7×10^3	9.36×10^3	69.5
24.0×10^3	19.3×10^3	10.4×10^3	63

5. poly I:C 的制备

在上述条件下, 由 IDP 和 CDP 制备 poly I 和 poly C 的减色效应约 30%。按减色效应 30%、聚合物链节分子量计算, IDP 残基分子量 330.22, 毫克分子消光系数 (λ_{248}) 7,600; CDP 残基分子量 305.21, 毫克分子消光系数 (λ_{248}) 6,300。实验表明, 按此数据计算的 poly I 和 poly C 比例接近等克分子比。

在 0.1 M NaCl, 0.005 M $MgCl_2$, 0.006 M (pH 7.0) 磷酸缓冲液中, 将 poly I 和 poly C 配制相同克分子浓度的溶液; 等体积混合, 40℃ 保温 10 分钟, poly I 和 poly C 即形成具双螺旋结构的双链多核苷酸 poly I:C。-20℃ 保存。产物减色效应**为 33—35%。本次实验制备 poly I:C 共 1,793 毫克。

产品的鉴定

我们对所制备的 poly I:C 进行了一般的理化性质鉴定。紫外吸收光谱用 SV-50 型紫外分光光度计测定; 熔化曲线用 QR-50 型紫外分光光度计测定; 荧光光谱用 Optica 荧光分光光度计测定。所用荧光染料菲啉溴红是中国科学院生物物理研究所合成的产品。

1. 紫外吸收光谱

按上述 poly I:C 制备条件, 配制适当浓度的 poly I 和 poly C, 分别测定其吸收光谱; 然后各取 2 毫升溶液混合, 于 40℃ 保温 10 分钟, 冷却至室温测定其吸收光谱, 结果见图 6。在 240—260 毫微米出现显著的减色效应, 表明两种单链聚合物已聚合为双链聚合物。

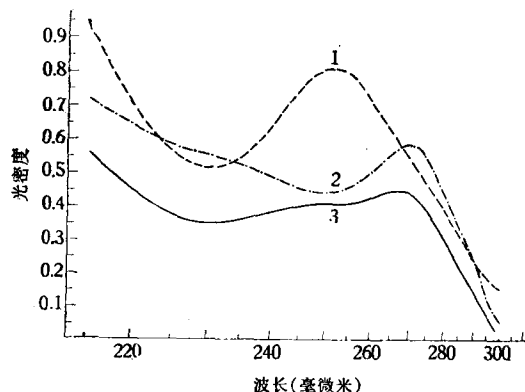


图 6 紫外吸收光谱

1——poly I; 2——poly C; 3——poly I:C

2. 熔化曲线的测定

上述 poly I:C 制品用同种溶剂稀释至 0.42 OD_{248} /毫升, 以同种溶剂作对照, 在不同温度下测定 OD_{248} , 结果见图 7。曲线最大高度 $h_{\text{最大}} = 1.71$, 据公式,

$$h = \frac{1}{2} (h_{\text{最大}} + 1) = 1.355$$

由图查得曲线高度 h 时的溶解温度 $T_m = 72.5^\circ\text{C}$ 。另外熔化前、后的温度为 $T_A = 70^\circ\text{C}$, $T_B = 75^\circ\text{C}$, 按另一公式计算:

$$T_m = \frac{1}{2} (T_A + T_B) = 72.5^\circ\text{C}$$

熔化曲线及 T_m 值表明, poly I:C 具有很规则的双螺旋结构。

* 由中国科学院生物物理研究所制备

** 减色效应值 = $\frac{A_I + A_C - 2A_{IC}}{A_I + A_C} \times 100\%$

式中, A_I ——poly I 的 OD_{248} 数;

A_C ——poly C 的 OD_{248} 数;

A_{IC} ——poly I:C 的 OD_{248} 数

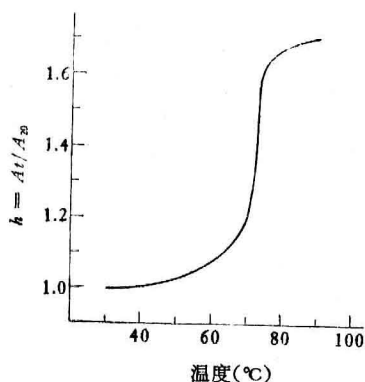


图7 poly I:C 的熔化曲线

A_t —— t °C 时的 OD_{248} 数;
 A_{20} ——20°C 时的 OD_{248} 数

3. 荧光发射光谱

荧光染料菲啉溴红 (EB) 与双链 poly I:C 具有特异的结合能力。菲啉溴红本身仅能发出很微弱的荧光, 但与 poly I:C 结合后形成 EB-poly I:C 络合物, 其荧光强度显著增大。单键及三链聚合物则无荧光增强效应。

将 poly I:C 和 EB 分别溶于 0.1 M NaCl 和 0.1 M (pH 7.7) Tris-HCl 缓冲液; 将两种溶液等体积混合, 使 poly I:C 浓度为 22 微克/毫升, EB 浓度为 8 微克/毫升, 然后测定其荧光发射光谱。结果见图 8, 荧光强度显著增强。

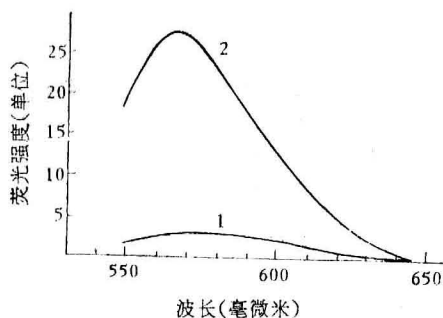


图8 荧光发射光谱(激发光波长 526 毫微米)

1——EB; 2——EB-poly I:C

4. 分子量测定*

poly I:C 的分子量对其诱导干扰素的能力及抗病毒效果有很大影响。分子量低于 1,000 时无诱导作用, 超过 20,000 时诱导能力大大提高。为此, 我们测定了 poly I, poly C 及 poly I:C 的分子量。

(1) 聚丙烯酰胺凝胶电泳法:

凝胶浓度为: 2.4% (丙烯酰胺: 双丙烯酰胺 = 20:1), 3% (丙烯酰胺: 双丙烯酰胺 = 33:1), 3.5% (丙烯酰胺: 双丙烯酰胺 = 31:1); 电泳缓冲液为: 0.02 M NaAc, 0.001 M EDTA, 0.04 M (pH 7.4) Tris-

HAc; 每管电流 5 毫安, 指示剂溴酚蓝到终止为止 (约 3.5—4 小时)。

样品 (含 0.5% 蔗糖) 15—20 微升 (约 50 微克); 标准样品为: 大肠杆菌 23 S RNA, 16 S RNA, 酵母 4 S tRNA; 0.2% 次甲基蓝-0.2 M HAc-0.12 M NaAc 染色 6—8 小时, 水脱色 24—36 小时。结果见图 9, poly I 主要成分 16—23 S, poly C 主要成分大于 23 S, poly I:C 基本上在起点, 大于 23 S。

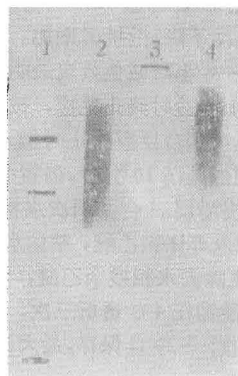


图9 凝胶电泳图谱

1——23 S RNA, 16 S RNA,
4 S RNA; 2——poly I; 3——
poly I:C; 4——poly C

(2) 葡聚糖凝胶过滤法:

G-100 交联葡聚糖 (40—120 微米), 柱床体积 $\phi 5 \times 1,150$ 毫米, 0.2 M NaCl 洗脱, 流速 7.5 毫升/小时; 紫外监测计自动记录, 波长 260 毫微米, 记录纸速度 60 毫米/小时; 标准样品为: 烟草花叶病毒 28 S RNA, 大肠杆菌 23 S RNA 和 16 S RNA, 酵母 4 S tRNA。结果见图 10, poly I:C 分子量大于 28 S, 均一性也较好。

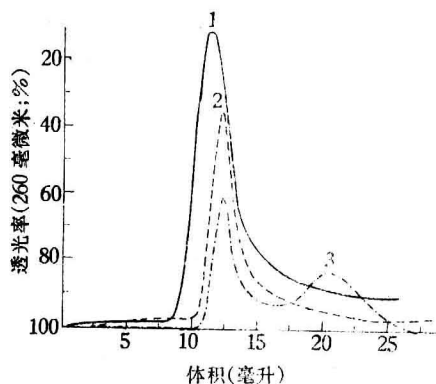


图10 凝胶过滤图谱

1——poly I:C; 2——烟草花叶病毒 28 S RNA;
3——大肠杆菌 23 S RNA 和 16 S RNA, 酵母 4 S tRNA

* RNA 标准样品由中国科学院微生物研究所提供

(下转第 30 页)

质的切片有较好的强度和稳定性, 可以不用支持膜而直接捞在载网上。

结果和讨论

细胞结构的细节是否保存得好, 除了固定作用的因素之外, 与所选用的包埋介质也有一定的关系。Ito (1962) 曾报道过, 在采用环氧树脂 Epon 812 包埋组织材料之后, 才发现原来认为是因固定不及时而引起的死亡后变化, 是由甲基丙烯酸酯包埋介质产生的假象。为了说明邻苯二甲酸二丙烯酯的性能, 我们用 Epon 812 进行了初步对照观察。

图版 XII 和图版 XIII 所示的鼠肝细胞图片, 除了所用的包埋介质不同之外, 其它过程完全相同。从图片中细胞器的细节结构和反差情况来看, 两者的差别并不显著。细胞核与胞质也比较丰满。这说明邻苯二甲酸二丙烯酯在聚合时对细微结构的影响并不严重。

与 Epon 812 比较的结果表明: 在组织包埋块的性能方面, Mets 等的配方稍逊于 Epon 812。Epon 812 的包埋块在切割时呈韧性, 而邻苯二甲酸二丙烯酯则呈脆性。我们改变配方, 增加二丁酯的含量, 发脆的程度有所改善, 但仍不能达到 Epon 812 那样的韧性。这方面的缺点有待于今后进一步摸索解决。可切得的薄

片一般在 500 埃左右。

我们在实践过程中, 曾发生过包埋块脆裂和聚合不匀的现象。我们推测, 除了 Mets 等在报告中提到的与邻苯二甲酸二丙烯酯的纯度有关之外, 与过氧化苯甲酰的含量也有关系。我们采用现在的配比, 则从未发生过包埋块开裂的现象。搅拌均匀也是一个重要因素, 因为往往由于粘度不大, 而忽视了过氧化苯甲酰的溶解是否完全和均匀。

邻苯二甲酸二丙烯酯含有一种油状物质, 尤其在未经减压重蒸处理的材料中特别明显, 聚合后可以清楚地看到有油状物溢出。经减压重蒸处理后这种现象得到了改善, 所以是否有必要进行重蒸处理, 需视商品的质量而定。

一般来说, 这种包埋材料粘度低、配比简便, 能观察到清晰的图象。更重要的是这些材料完全立足于国内, 为今后开展超显微结构的研究工作提供了一个有利的物质条件。

参 考 资 料

Mets, M. et al: *J. Ultrastructure Research*, 42, 337, 1973.

[本文于 1975 年 3 月 20 日收到]

(上接第 28 页)

poly I:C 的生物功能实验*

1. 在细胞上诱导干扰素的能力

用三种不同浓度的 poly I:C, 对人胚肺细胞诱导干扰素。攻击病毒: 水泡性口炎病毒 (VSV); 染料摄入法测定结果, 见表 4 (表中, DU_{50} 单位是: 被保护细胞摄入中性红的量为正常细胞的 50% 时, 其干扰素稀释度的倒数的对数。下同)。

表 4 poly I:C 在人胚肺细胞诱导干扰素的能力

poly I:C 剂量 (微克/毫升)	诱导干扰素能力 (DU_{50} 单位/毫升)
100	20
10	10
1	1

2. 在小白鼠体内诱导干扰素的能力

用三种不同剂量的 poly I:C 在体重 14—16 克的小白鼠体内诱导干扰素, 取其血清处理第二代鼠胚细胞, 以 VSV 病毒作为攻击病毒, 染料摄入法测定结果, 见表 5。

3. 抗病毒效果

用浓度为 1 微克/毫升的 poly I:C 作用于人胚细胞, 能保护 50% 以上的细胞免受 210 TCD₅₀ 副流感 (仙台株) 病毒的攻击; 65.7% 的细胞免受 40—231

表 5 poly I:C 在小白鼠体内诱导干扰素的能力*

poly I:C 剂量 (微克/只)	诱导干扰素能力 (DU_{50} 单位/毫升)
100	675.1
25	206.4
2.5	38.9

* 每组 10 只小白鼠, 三次实验的平均值

TCD₅₀。VSV 病毒攻击; 74.6% 的细胞免受 31 TCD₅₀ 冠状病毒的攻击。

小 结

利用大肠杆菌多核苷酸磷酸化酶, 将不同方法得到的 CDP 和 IDP 分别聚合成 poly C 和 poly I, 在本实验条件下制备 poly I:C。经测定, poly I:C 具有规则的双螺旋结构, 分子量大, 均一性好, 产率较高。对于细胞和在生物体内有较高的诱导干扰素的能力, 对某些病毒感染有明显的保护作用。

参 考 资 料

中国科学院微生物研究所: 核苷酸类物质的生产和应用资料汇编, 1, 1971。

[本文于 1975 年 5 月 12 日收到]

* 实验是由中国人民解放军 59175 部队进行的