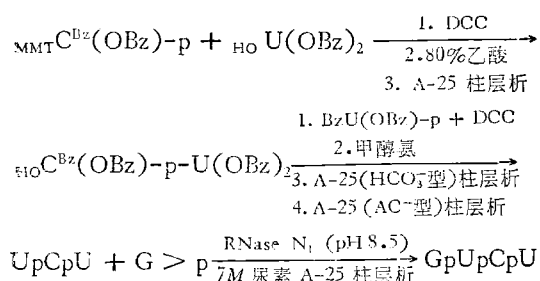


四核苷三磷酸 Gp Up Cp U 的合成

中国科学院生物物理研究所二室核酸合成组

GpUpCpU 是酵母丙氨酸转移核糖核酸额外区的一个四核苷酸片段。我们采用的合成路线为:



材料方法

3'-胞苷-磷酸, 3'-尿苷-磷酸为上海试剂二厂产品, 尿苷为瑞士 Fluka 公司和上海东风厂产品。单对甲氧三苯甲基氯 (MMT-Cl) 为上海东风厂产品。DCC 为上海余山化工厂产品。牛胰 RNase 为英国 BDH 公司出品, DEAE-Sephadex A-25 为 Pharmacia 出品。三苯氯甲烷 (Tr-Cl) 和咪唑重结晶后使用。RNase N₁ 从粗糙链孢霉诱变菌株中提纯^[1]。RNase T₁ 从高峰淀粉酶中提纯^[2]。T₄ 多核苷酸激酶按 Richardson^[3] 方法提取。γ-[³²P] ATP 按 Schendel 方法制备^[4]。G > p 按 C. A. Dekker 方法^[5] 用 DCC 缩合方法制备。RNase N₁ 酶失活剂是含有 0.04M 二巯基丙醇的 0.6M 氨水溶液。化学合成反应过程中所用各试剂均经过无水条件处理, 其它试剂均用分析纯级。

电泳和层析用新华一号或 Whatman 1 号滤纸, 纸层析展层溶剂为异丙醇: 浓氨水: 水 (7: 1: 2, V/V), 聚酰胺薄膜层析展层溶剂 I 为甲酸: 水 (7: 93, V/V) 和溶剂 II 95% 乙醇: 1M 甲酸铵: 甲酸: 水 (55: 2: 3.5: 39.5, V/V)。纤维素薄层层析的展层溶剂为 95% 乙醇: 1M 乙

酸铵 (4: 6) 高压电泳在英国 Shandon 电泳仪上进行。电泳缓冲液为 0.03M pH7.2 磷酸缓冲液, 电压 6000 伏, 时间 40 分钟, 常压电泳的电泳液为 0.02M pH3.0 的柠檬酸缓冲液 (溶剂 I) 和 0.05M pH4.0 的柠檬酸缓冲液 (溶剂 II)。电压 400 伏, 3.5—4.5 小时。

HO U (OBz)₂ 的制备: 参考 Rammner 和 Khorana^[6] 方法首先制备 T₁U, 尿苷 5 克, 溶于 100 毫升无水吡啶, 减压蒸去一半溶剂, 冰浴中加 6 克三苯氯甲烷, 加热回流 2.5 小时。冷却后, 于搅拌下缓缓倾入 750 毫升的冰水中, 析出的沉淀抽滤后用水洗 3—4 次, 再用石油醚洗 2—3 次。抽干后研磨成粉。再将它溶入 250 毫升氯仿中, 用 100 毫升浓 NaCl 溶液洗两次, 分去水相, 氯仿相中加无水 Na₂SO₄ 干燥过夜。滤液减压浓缩至干。最后在苯中结晶、抽干得 7.7 克 T₁U; 产率 77.3%; m.p. 115°—116°C。T₁U 结晶溶于 23 毫升无水吡啶, 冰浴中滴加 4.43 克苯甲酰氯 (溶于 12.51 毫升的无水吡啶), 室温放置 4—5 小时, 然后倒入 700 毫升冰水中, 用氯仿抽提 10 次, 合并的氯仿用无水 Na₂SO₄ 干燥过夜, 减压蒸去氯仿, 抽干后研磨成粉。再把它溶于 180 毫升 80% 的醋酸中, 加热回流 30 分钟, 脱去 5'-T₁, 浓缩至干, 用无水乙醇带去醋酸。最后在无水乙醇中结晶, 经乙醇和乙醚洗涤后, 抽干得 3.3 克 HO U (OBz)₂。母液经环己烷重结晶又得产品 1.9 克, 总产率 72%; m.p. 196°—197°C。纸层析 R_f 0.79, 聚酰胺薄膜层析 R_f 为 0 (溶剂 I) 和 R_f 0.75 (溶剂 II)。

MMTCp 制备: 参考 Lohrmann 等人^[7] 和上海生化所^[8] 的方法, 6 克 3'-CMP 吡啶盐与 20 克 MMT-Cl 反应制备得到 MMTCP₀。重结晶后得 5 克 MMTCP 纯品。纸层析 R_f 0.57。

$\text{MMT}^{\text{C}^{Bz}}(\text{OBz})\text{-p}$ 的制备: 参考上海有机所的方法^[9] 用 6 克 MMT^{Cp} 最后得 6.5 克 $\text{MMT}^{\text{C}^{Bz}}(\text{OBz})\text{-p}$ 。

$_{Bz}U(\text{OBz})\text{-p}$ 的制备: 参考上海生化所^[10] 方法稍加修改。10 克 3'-UMP 钠盐换成四乙胺盐, 加 66 克苯甲酸四乙胺盐, 80 克苯甲酸酐和 20 毫升无水 DMF。50°C 溶解后室温反应三天, 经后处理得 9.9 克 $_{Bz}U(\text{OBz})\text{-p}$ 。高压电泳 R_m 0.56。

产物鉴定: 纯度鉴定除一般电泳层析外, 参照 Brownlee 方法^[11] 四核苷酸用多核苷酸激酶在 5'-末端标记上 ^{32}P 后, 在 DEAE-纤维素薄层上用同系混合物 C 进行展层, 然后作放射性测定。产物 RNase T_1 酶酶解测定条件: 2—3 个 A_{260} 单位的四核苷酸产物溶于 15 微升的蒸馏水中, 调 pH 到 7.5 左右, 加入 5—6 个单位的 RNase T_1 酶, 37°C 下保温 1.5 小时, 水解样品经电泳分离后, 紫外点用 0.1N HCl 1.2 毫升浸泡, 间歇振荡过夜, 测光谱比值和酶解产物的克分子比值。硷解条件为 0.3 N KOH 溶液中, 37°C 保温 18 小时, 水解后各单核苷酸经电泳分离后, 用 1.2 毫升 0.1 N HCl 浸泡, 然后测定其紫外吸收并计算其克分子比值。

结 果

$_{\text{HO}}\text{C}^{Bz}(\text{OBz})\text{-p-U}(\text{OBz})_2$ 的制备: 按 Lohrmann 等人的方法^[7] 840 毫克的 $\text{MMT}^{\text{C}^{Bz}}(\text{OBz})\text{-p}$

和 770 毫克的 $_{\text{HO}}U(\text{OBz})_2$ 在 2 克 Dowex-50 吡啶型树脂存在下, 用 2.4 克 DCC 缩合, 80% 醋酸溶液脱去 5'-MMT, 然后用 DEAE-Sephadex A-25 (AC^- 型) 作柱层析分离(见图 1)。

分离纯化得到的 $_{\text{HO}}\text{C}^{Bz}(\text{OBz})\text{-p-U}(\text{OBz})_2$ 经甲醇-氨封管, 37°C 20 小时保温后脱去保护基, 高压电泳制备得到的 CpU , 测定其紫外吸收(见表 1)。硷解测得组份为 $\text{Cp:Ur} = 1.13:1$ 。高压电泳的 R_m 为 0.28、(Up 的 R_m 定为 1)。

UpCpU 的制备: 按 Lohrmann^[7] 方法, 400 毫克的 $_{\text{HO}}\text{C}^{Bz}(\text{OBz})\text{-p-U}(\text{OBz})_2$ 和 932 毫克的 $_{Bz}U(\text{OBz})\text{-p}$ 在 1.2 克 Dowex-50 吡啶型树脂存在下, 用 1.2 克的 DCC 于 25°C 暗处密封振荡缩合反应 4 天, 经处理得保护的三核苷酸。加氨饱和的无水甲醇溶液 37°C 封管氨解 17 小时, 抽去甲醇和氨, pH 调至 8.5, 用 DEAE-Sephadex A-25 (HCO_3^- 型 1.9×70 厘米) 作柱层析分离。上柱量为 23040 A_{260} 单位, 上柱后, 光用 pH 8.5 的水洗柱到流出液无紫外吸收为止, 然后改用 0—0.5 M 浓度 NH_4HCO_3 的直线梯度进行洗脱。图 2 为柱层析分离图。

收集 UpCpU 主峰, 减压浓缩反复脱盐, 得 UpCpU 232 毫克, 得率 74.6%。高压电泳 R_m 为 0.58, 常压电泳 (pH 3.0 柠檬酸缓冲液) R_m 为 0.67 (均以 Up 的 R_m 为 1 计算) 纯度 95%。进一步纯化 UpCpU 时可用 DEAE-Sephadex A-25 pH 3.5 的酸柱分离。样品上柱后, 先用 0.05

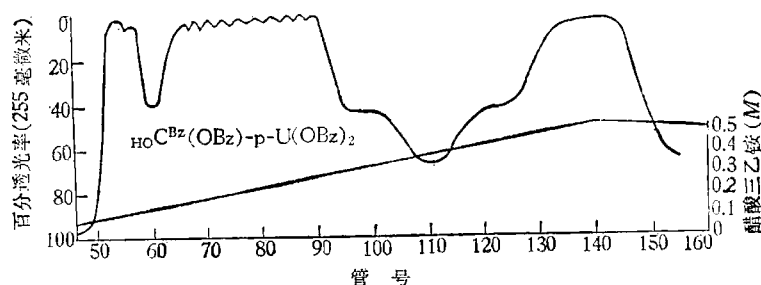


图 1 $_{\text{HO}}\text{C}^{Bz}(\text{OBz})\text{-p-U}(\text{OBz})_2$ 的制备和分离

DEAE-Sephadex A-25 (AC^- 型, 1.2×70 厘米, 柱经 95% 乙醇平衡), 24600 A_{260} 单位样品上柱后, 先用 95% 乙醇洗脱至无紫外吸收后, 再用 0—0.5 M 醋酸三乙胺 95% 乙醇的浓度直线梯度洗脱, 最后用 0.5 M 醋酸三乙胺 95% 乙醇洗脱。流速 1.2 毫升/分, 每 15 分钟收集一管, LKB Uvicord II Type 8300 紫外检测仪记录

表 1 CpU 和 UpCpU 的光谱数据

化 合 物	pH	$\lambda_{\text{最大值}}$ 毫微米	$\lambda_{\text{最小值}}$ 毫微米	光 谱 比 值			
				A_{250}/A_{260}	A_{270}/A_{260}	A_{280}/A_{260}	A_{290}/A_{260}
Cp U	2	270		0.66	1.06	0.90	0.51
UpCpU	1	267	234	0.66	1.07	0.78	0.42
NH ₄ HCO ₃	6	264	231	0.76	0.94	0.57	0.18
柱纯化	13	265	246	0.84	0.98	0.60	0.18
UpCpU	1	266.5	235.5	0.67	1.04	0.75	0.39
醋酸三乙胺	7	263	232.5	0.78	0.91	0.52	0.13
柱纯化	13	263.5	245	0.86	0.92	0.52	0.41

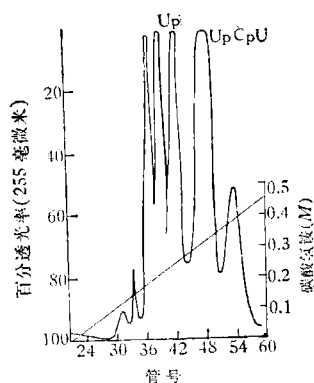


图 2 UpCpU 碳酸氢铵柱分离图

DEAE-Sephadex A-25 柱 (HCO₃⁻ 型, 0.8×50 厘米) 1695 A₂₆₀ 单位样品上柱, 先用 pH 8.5 水洗至无紫外吸收, 再用 0—0.5M 的碳酸氢铵 (各 250 毫升) 直线浓度梯度洗脱, 流速 1.2 毫升/分, 每 10 分钟收集一管, 记录仪同图 1

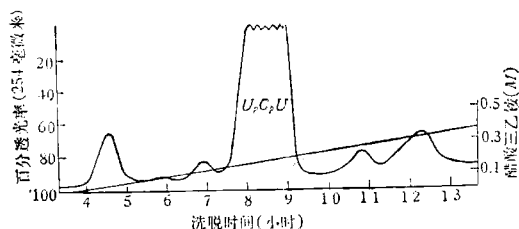


图 3 UpCpU 醋酸三乙胺柱纯化分离图

DEAE-葡聚糖凝胶 A-25 柱 (AC⁻ 型, 2.2×34 厘米, 经 0.05M pH 3.5 醋酸三乙胺平衡), 先用 0.05M pH 3.5 醋酸三乙胺洗至无吸收后, 再用 0.05—0.5M pH 3.5 醋酸三乙胺 (贮存瓶和混合瓶各 500 毫升) 直线梯度洗脱, 流速 1.25 毫升/分

M 醋酸三乙胺 (pH 3.5) 洗脱, 然后用 0.05—0.5 M 浓度的醋酸三乙胺直线梯度洗脱 (见图 3)。

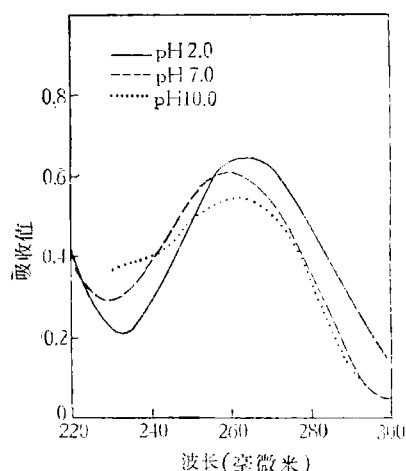


图 4 UpCpU 的紫外吸收光谱

收集 UpCpU 峰, 减压浓缩脱盐, 得电泳和同系层析为单点的纯品。能为牛胰核糖核酸酶完全酶解, 酸解后常压电泳溶剂 II 分离测定碱基组成成为 Up:Cp:Ur = 1:0.97:0.95。紫外吸收光谱见图 4。

GpUpU 的酶促合成和分离, 10 微克分子的 G > p 和 35 微克分子的 UpCpU 溶于 120 微升的 0.2 M pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液中, 加入 38 单位的 RNase N₁ 酶, 反应混合物在 0℃ 下反应 20 小时, 然后加 44 微升的二巯基丙醇氨水溶液中中止反应, 37℃ 保温 15 分钟。减压抽干后, 溶于 3—5 毫升的 7M 尿素 0.01M pH 7.6 Tris-HCl 缓冲液中, 上样于 DEAE-Sephadex A-25 的 7M 尿素柱上 (1.2 × 55 厘米)。加样结束后, 先用 100 毫升的起始缓冲液 (含有 7M 尿素

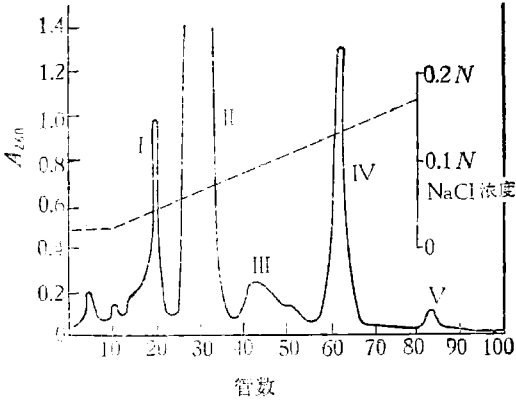


图5 RNase N_i 酶促合成 GpUpCpU 反应
物柱分离图

7M 尿素 DEAE-Sephadex A-25 (Cl⁻型) 柱(1.2×55 厘米)
流速: 48 毫升/小时分部收集: 12 毫升/管

图中各峰: I: G>p II: UpCpU III: GpGp
(GpG>p) IV: GpUpCpU V: GpGpUpCpU

和 0.05N NaCl 的 0.02M pH 7.6 的 Tris-HCl
缓冲液)淋洗,再用 0.05M--0.2M NaCl 的浓度
直线梯度洗脱,层析图谱见图 5。

由图所示, I 峰和 II 峰分别为原料 G>p
和 UpCpU, IV 峰为 GpUpCpU。合并产物后,
用 DEAE-Sephadex A-25 小柱进行浓缩脱盐脱
尿素。反应产率为 35%。

产物 GpUpCpU 的鉴定: 纯度鉴定采用纤
维素薄层层析和 ³²P 在产物 5' 端标记后作同系
层析,以 UpCpU 作为对照。图 6 和图 7 分别
为纤维素薄层层析图谱和同系层析放射自显影
图谱。

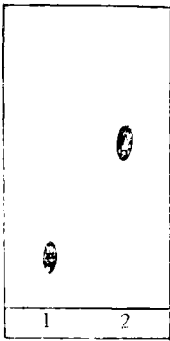


图6 产物的纤维素薄层层析图
1: GpUpCpU 2: UpCpU

酸,产物经 RNase T₁ 酶酶解后,经高压电泳分
离可还原得到 G>p 和 UpCpU,酶解产物紫
外点经洗脱后测定它们的光谱比值,并计算得
到酶解克分子比值为 UpCpC:G>p = 1:1.12。

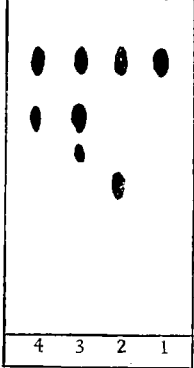


图7 产物 GpUpCpU 的同系层析鉴定
1. γ-³²P-ATP 2. ³²P GpUpCpU 3. GpUpCpU 用
RNase N_i 酶解后再标记 4. ³²P UpCpC

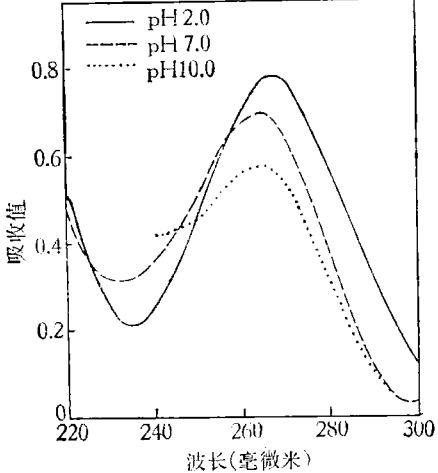


图8 GpUpCpU 的紫外吸收光谱

产物经酶解后经电泳分离测得光谱比值,
为 Gp:Up:Cp:Ur = 0.88:1.0:1.03:1.12。

产物 GpUpCpU 的紫外吸收光谱见图 8。
与 UpCpU 的紫外吸收光谱(图 4)比较,联接
上一个 Gp 后,吸收高峰略向短波方向迁移。

讨 论

利用 RNase 酶促合成寡核苷酸,迄今已有
不少报道,上海生化所二室利用了 RNase N_i 酶

合成了八核苷酸 CpUpCpGpUpCpCpA^[22]。但由于应用这类酶合成寡核苷酸时,产物经 DEAE-Sephadex A-25 柱层析分离后会带有少量的 RNase N₁,若不把它除去,产物在放置过程中容易产生降解。在我们实验中,摸索了各种除酶方法,例如用 Sephadex G-50 柱分离、酸性电泳和 DEAE-Sephadex A-25 在 pH 3.5 左右的柱层析分离,均有一定效果。在我们制备 GpUpCpU 时,摸索并采用了在 pH 3.0 和低离子强度条件下将产物通过一个 CM-Sephadex C-25 的小柱,得到的产物在 37°C, pH 为 7.5 的条件下保温二小时后,与对照相比没有见到有任何降解发生,产物在低温下封管保存半年也没有明显的降解产生,与其他方法相比,此法的优点是方法简便,经过一个小柱后,产物直接流出,收集体积较小,而 RNase N₁ 则被紧密地吸收在柱上,产物回收率可达 90% 以上,并可省去脱盐的步骤。

参 考 文 献

- [1] 张其玖,刘增印等:待发表。
- [2] 生物物理研究所二室:工作报告。
- [3] Richardson, C. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **54**, 158, 1965.
- [4] Schendel, R. F. et al.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 8319, 1973.
- [5] Dekker, C. A. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 3522, 1954.
- [6] Brumler, D. H.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 3112, 1962.
- [7] Lohmann, R. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 819, 1966.
- [8] 上海生化所二室:《生物化学与生物物理学报》,1978 年,10 期,143 页。
- [9] 上海有机化学研究所核酸化学组:待发表。
- [10] 上海生物化学研究所二室:《生物化学与生物物理学报》,1978 年,10 期,165 页。
- [11] Brownlee, G. G.: *Determination of sequence in RNA*, North-Holland Publishing Company.
- [12] 上海生物化学研究所二室:《生物化学与生物物理学报》,1978 年,10 期,129 页。

[本文于 1979 年 9 月 20 日收到]

荧光标记法测定核糖核酸片段的核苷酸序列

韩玉珏 魏西平

辜祥荣 刘望夷

(中国科学院生物物理研究所) (中国科学院上海生物化学研究所)

核糖核酸一级结构的研究,近十几年有了很大进展。继 1965 年 Holley^[1] 用紫外吸收法,首次测定了酵母丙氨酸 tRNA 的一级结构之后, Sanger 等人^[2] 用灵敏度更高的放射性同位素体内标记的方法,测定了其它小分子量核糖核酸的一级结构。近几年, Randerath 等^[3] 用高碘酸和磷酸单酯酶(或磷酸二酯酶)同时作用于 RNA 小片段,然后用 [³H]-Na BH₄ 还原标记所产生的二醛的方法,从 3' 末端测定了 RNA 小片段的核苷酸序列,从而完成了酵母亮氨酸 tRNA 的一级结构的测定^[4]。 Keith 和 Gilham 等^[5] 使用试管内连续 β-消去法,从 3' 末端测定寡聚腺苷酸的序列也得到成功。上海生化所二室结构组^[6,7] 发展了一种以高碘酸氧化并结合荧光标记的方法,从 3' 末端测定 RNA 小片段

的核苷酸序列。最近由于两种新的 DNA 序列快速分析技术^[8,9] 的广泛应用,不但大大加速了 DNA 序列的研究,而且也促进了 RNA 序列的分析。下面报道我们测定酵母丙氨酸 tRNA 中的一个九核苷酸片段的部分核苷酸序列的实验结果。我们的工作依据上海生物化学研究所的荧光标记法,并参考 Gilham 等人的方法。

材料和方法

材料: 酵母丙氨酸 tRNA 的一个九核苷酸片段、用牛胰核糖核酸酶全水解酵母丙氨酸 tRNA, 经 DEAE-Sephadex A-25 柱层析分离得到, 大肠杆菌碱性磷酸单酯酶系生物物理所二室制备。DNS-甘氨酸肼, 四种 DNS-甘氨酸核苷腺, 红酵母核糖核酸酶皆为上海生物化学研