

用双向薄层层析技术确定 RNA 中的修饰成分

曹功杰 李文琴 祁国荣*

(中国科学院上海生物化学研究所)

RNA 中含有大量修饰成分^[1]。Nishimura 首先建立了双向薄层层析技术测定 RNA 中的修饰成分^[2]，其后为人们广泛应用。由于该技术具有好的重复性和可靠性，因而可从相对位置判断修饰成分^[3,4]。我们在测定蓖麻蚕后丝腺体 tRNA^{Gly} 的全核苷酸顺序时，就采用了该技术测定酶解片段中包括修饰成分的核苷酸组成^[5]。此外，我们还测定了蓖麻蚕后丝腺体 tRNA^{Ala} 中的部分修饰成分以及 rRNA 中包括假尿苷酸 (ϕ_p) 的核苷酸组成。本文报道这一技术的应用和结果。

一、材料和方法

1. 微晶纤维素薄板的制备 15克微晶纤维素(上海试剂四厂产品)悬浮于 100 毫升蒸馏水中。用组织捣碎器快速匀浆 1 分钟，水泵抽去气泡，将 30—35 毫升匀浆液平铺到 18 × 18 厘米的干净玻璃板上。室温或 40℃ 温箱干燥。

2. 层析系统 第一向：异丁酸:0.5N NH₄OH (5:3V/V)。第二向，异丙醇:浓 HCl:H₂O (70:15:15V/V/V)^[2]。异丁酸为 Fluka 产品，异丙醇为上海试剂一厂产品。

3. 样品制备与鉴定 ³²P 全标记蓖麻蚕后丝腺体 tRNA^{Gly} 和 tRNA^{Ala} 的制备及其 RNase T₁ 和 RNase A 全酶解双向指纹图谱参看文献 [6]。将指纹图谱中各点剪下，用 1.5M 碳酸氢三乙胺缓慢流动洗脱至指纹管里，洗脱体积约 100—200 微升。洗脱液放入真空干燥器中(干燥剂为浓硫酸和氢氧化钠)，用水泵小心抽干(注意样品跳出管外)，干后反复加二次水，再抽，以除去残留的碳酸氢三乙胺。然后，样品用 RNase T₂ 降解(条件:20 微升反应体积中含

0.05M 醋酸缓冲液，pH4.6，0.1 单位 RNase T₂，37℃ 保温过夜)。酶解样品及常量 4 个单核苷酸点在微晶纤维素薄板左下角(离边各 2 厘米)进行双向层析，干燥薄板，放射自显影，根据常量紫外点与自显影点的相对位置确定其核苷酸成分。用硝基纤维素的乙醇—乙醚溶液剥落与自显影点相应位置的纤维素，于晶体闪烁计数器上测量，便可得到样品中的核苷酸组成。

³²P 全标记的蓖麻蚕后丝腺体大分子 RNA，经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离纯化，并从胶中抽提其 26SrRNA，17SrRNA，和 5SrRNA。这些样品用上述方法进行 RNase T₂ 降解和双向薄层层析鉴定其核苷酸组成。

二、结果和讨论

图 1—8 是蓖麻蚕后丝腺体 tRNA^{Gly} 和

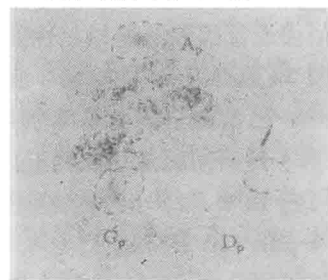


图 1 tRNA^{Gly} 中的 D_p

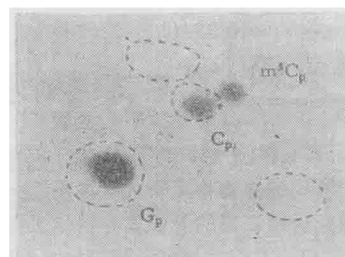


图 2 tRNA^{Gly} 中的 m⁵C_p

* 吴仁龙(本所)，钱微(第四军医大学)曾参加部分工作。

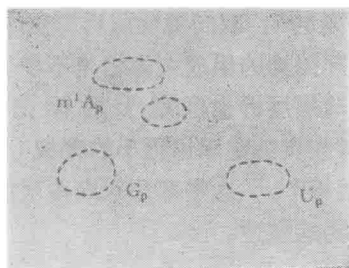


图3 tRNA^{Gly} 中的 m¹A_p

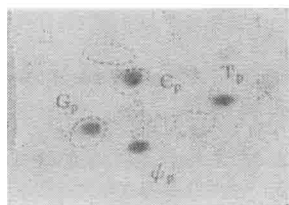


图4 tRNA^{Gly} 中的 T_pφ_p



图5 tRNA^{Gly} 中的 U_mC_p

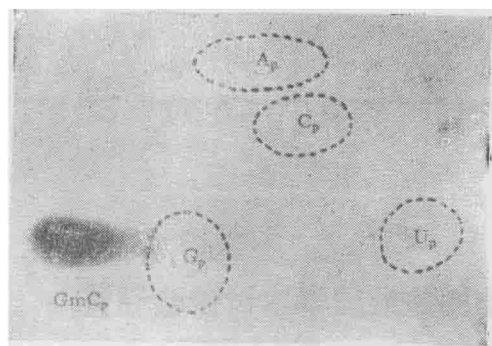


图6 tRNA^{Ala} 中的 G_mC_p

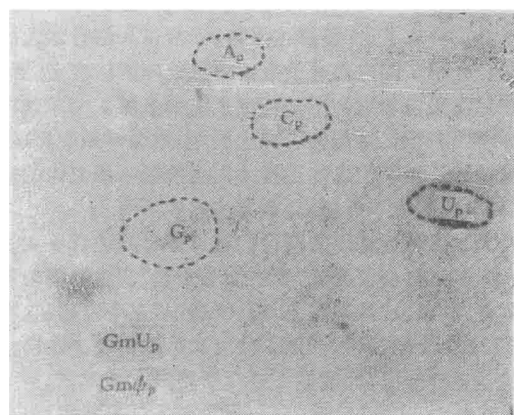


图7 tRNA^{Ala} 中的 G_mU_p 或 G_mφ_p

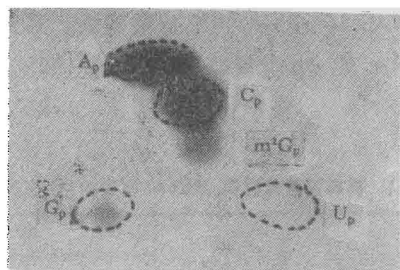


图8 tRNA^{Ala} 中的 m²C_p

tRNA^{Ala} 有关含有修饰成分的酶解片段和 5' 末端片段的核苷酸组成图。可见该方法可以分离很多 tRNA 的修饰成分。图 9 是这些修饰成分的汇总示意图，表示这些修饰成分的相对位置。但这个方法对于某些修饰成分，如 I_p 不能与 G_p 区分，需用其他方法分离鉴定。

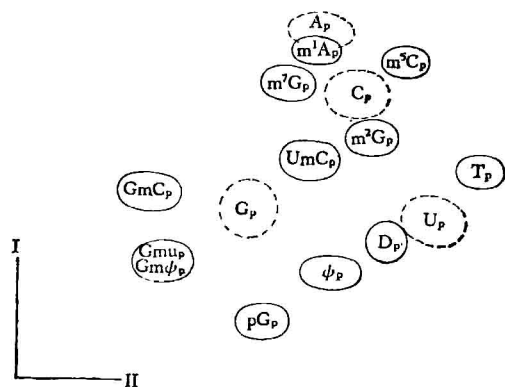


图9 修饰成分分布示意图

双向薄层层析也可用于鉴定 RNA 中的碱稳定二核苷酸^[7]。例如图 5、6、7 中的 U_mC_p, G_mU_p, G_mφ_p, G_mC_p。rRNA 中含有较丰富的这种二核苷酸，在蓖麻蚕后丝腺体 26SrRNA, 17SrRNA 中，除了 A_p, G_p, C_p, U_p 和 φ_p 的点外，还有很多稍淡的放射自显影点，这很可能为这类成分（待鉴定）。

双向薄层层析还可用于酶促合成寡核苷酸片段接头的修饰成分的分析。用我所梁镇和，汤锦炎提供的合成片段，鉴定过 m²G_p, D_p 等修饰成分。

rRNA 除了含有较丰富的碱稳定的二核苷酸外，存在一定量的 φ_p。表 1 是我们用双向薄层层析测定的蓖麻蚕后丝腺体 5SrRNA,

17SrRNA, 26SrRNA 的核苷酸组成。17SrRNA, 26SrRNA 的 ϕ p 含量略高于 Hela 细胞中的相应的 rRNA^[8]。蓖麻蚕后丝腺体 5SrRNA 的全

表 1 蓖麻蚕后丝腺体 rRNA 核苷酸组成(%)*

	26S	17S	5S	
			实验值	实验值
Ap	22.8(~1145)	23.4(~468)	20.9(~25)	(25)
Cp	25.5(~1275)	23.5(~470)	27.0(~32)	(33)
Gp	31.1(~1555)	27.1(~542)	31.1(~36)	(34)
Up	19.0(~950)	24.1(~482)	21.0(25)	(26)
ϕ	1.5(~75)	1.9(~38)	无	无
NmNp	有	有	无	无
5' 末端	—	—	—	pGp
3' 末端	—	—	—	U _{OH}

* 从各组分的放射量计算。
括号内为可能的核苷酸数, 26S, 17S, 5S 的链长分别以 5000, 2000, 120 核苷酸计算。
— 表示未测。

结构已经测定^[9], 双向薄层层析测定的核苷酸组成与实际结构的组成大体相差不多。

双向薄层层析也可用于后标记组成分析^[10]。有些实验室采用更小的薄板(5 × 5 厘米)进行层析^[11]。这些都为双向薄层层析的应用开辟广阔的前途。

参 考 文 献

[1] 祁国荣等:《生物化学与生物物理进展》, 1980 年, 第 3 期, 第 26 页。
[2] Nishimura, S., *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.*, 12, 49, 1972.
[3] Garel, J. P. et al.: *Biochemistry*, 16, 3618, 1977.
[4] Sprague, K. U. et al.: *Cell*, 11, 561, 1977.
[5] 李文琴等:《生物化学与生物物理学报》(待发表)。
[6] 李文琴等:《生物化学与生物物理进展》, 1981 年, 第 4 期, 第 58 页。
[7] Hashimoto, S. et al.: *Biochemistry*, 14, 1956, 1957.
[8] Hughes, D. G. et al.: *FEBS Lett.*, 72, 304, 1976.
[9] 曹功杰等:《第四次全国生化会议摘要汇编》。
[10] Tanaka, Y. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 8, 1259, 1980.
[11] Watanabe, K. et al.: *J. Biochem.*, 86, 893, 1979.

[本文于 1981 年 12 月 4 日收到]

学术动态

生物系统信息加工及生物信号、生物图象处理学术讨论会召开

中国生物物理学会生物信息论与生物控制论专业委员会和中国自动化学会生物控制论专业委员会联合召开的“生物系统信息加工及生物信号、生物图象处理学术讨论会”, 1982 年 4 月 1 日至 5 日在杭州举行。会议以综述报告和讨论为主, 讨论的重点是神经系统、视觉系统等的信息加工原理和机制, 以及生物信号、图象的处理方法。

参加本次讨论会的有 58 个单位、102 位代表。与会代表的专业不仅有生物学和医学, 还有农林、数学、物理学和计算机。会议共收到研究论文、综述报告 50 余篇。提交会议的研究论文, 其水平与深度较前均有所提高。其中, 有的论文是提交给国际学术会议的, 有的工作在实际应用中得到了良好结果, 有的工作在国内是初创性的和探索性的, 更可喜的是有些工作是不

同专业的专家共同合作的结果。
会议听取了 14 篇综述报告。报告人结合本人的工作, 介绍了国内外有关生物信息处理的研究进展。这些综述报告着重介绍了视觉系统信息加工的原理和脑的学习与记忆功能的研究进展, 生物医学图象处理、计算技术、光学信息加工技术在生物医学研究中的应用, 脑电的研究与分析, 泛系方法的应用等。
为了使相近课题的同行们有更多时间进行深入讨论, 加强了解, 会议分成“生物信号处理”、“生物图象和模式处理”以及“基础理论与系统辨识”三个专题组, 提出了 34 个专题报告, 开展了交流和热烈讨论。在自由讨论会上和会下, 代表们还进行了更深入的交流。
[王谷岩]