

# RNA 的 3' 端 荧 光 标 记

江 鹏 蒋志伟 刘望夷

(中国科学院上海生物化学研究所)

## 提 要

本文报道荧光标记的微量示踪法用于天然 RNA 分子,合成了两种相当灵敏的荧光试剂异硫氰基荧光素的衍生物,并成功地将之连接在 RNA 的 3' 端,其产率、示踪灵敏度以及物理化学性质均较满意,可应用在核酸研究中。

进行 RNA 的顺序分析,国内外常采用放射性同位素的末端标记直读法<sup>[1,2]</sup>。因放射性标记有其局限性,因此有些实验室也尝试用荧光标记法来代替它。我们曾设计和合成过一种荧光试剂 DNS-Gly-NHNH<sub>2</sub> 并将它用于寡核苷酸的标记及顺序测定<sup>[3]</sup>。荧光标记法的优点是不需贵重的试剂和仪器,便于一般实验室使用。最近,美国的科学家发明了一种用四种荧光试剂取代 [<sup>32</sup>P] 标记的 DNA 顺序分析法<sup>[4]</sup>,并由此而研制成一种 DNA 顺序自动分析仪。我们认为用荧光染料取代 [<sup>32</sup>P] 标记,结合凝胶直读法发展 RNA 顺序测定法,这是一项很有意义的工作。我们合成了两种相当灵敏的荧光试剂——异硫氰基荧光素 (FITC, fluorescein isothiocyanate) 的衍生物,并成功地将之连接到 RNA 分子的 3'-端。

## 一、材 料

异硫氰基荧光素为上海第二军医大学朝晖制药厂产品。对氨基苯丙氨酸和酵母 tRNA 为上海东风生化试剂厂产品。 $\gamma$ -谷氨酸苄酯由生化所沈金焕同志赠送。85% 水合肼为向阳化工厂产品。过碘酸钠为英国 BDH 化学试剂公司产品。柞蚕 5SRNA 和 NaB(CN)H<sub>2</sub> 分别按文献 [5] 和 [6] 方法自制。

## 二、荧光素衍生物的合成

### 1. $\gamma$ -谷氨酰胺的制备

$\gamma$ -谷氨酰胺的制备如图 1 所示。 $\gamma$ -谷氨酸苄酯 237mg (1mmol) 溶于 2ml 85% 水合肼,室温下振荡过夜。经减压干燥,加入 3ml 水溶解残留物后再抽干。残留物用乙醇和水混合溶剂结晶。母液经浓缩回收产物。总得率为 85%。

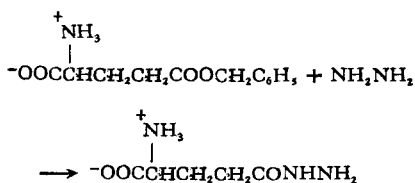


图 1  $\gamma$ -谷氨酰胺的制备

### 2. 荧光素乙内酰脲氨基酸衍生物 (Fluorescein-thiohydantoin of Amino Acids) 的制备

参照 Kawauchi 等的方法<sup>[7]</sup>。0.3 mmol 的氨基酸衍生物溶于 10ml 0.2mol/L NaHCO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 缓冲溶液 (pH9.0), 加入 0.03mmol 异硫氰基荧光素 (预先溶于 0.6ml 丙酮, 内含少量吡啶)。室温下反应 4 小时后, 加入乙酸使反应液的 pH 值降至 4.5。用等体积的乙酸乙酯抽提三次。抽提液浓缩至干后加入 2ml 丙酮和 2ml

6N 的盐酸。室温下反应 6 小时后,加入饱和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液中和至 pH4.5。用等体积乙酸乙酯抽提三次,抽提液浓缩至干。用硅胶柱分离产物,洗脱的混合溶剂为氯仿:甲醇:吡啶:乙酸=10:1:1:1 (体积比),产率为 41%。整个反应过程见图 2。表 1 为异硫氰基荧光素及其衍生物在硅胶薄板上的层析行为。

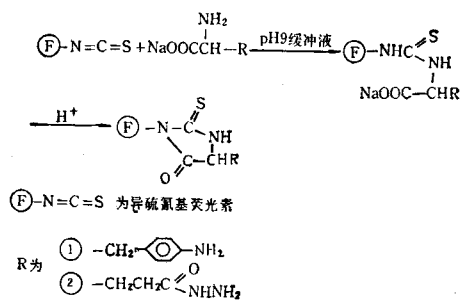


图 2 荧光素乙内酰硫脲衍生物的制备

表 1 异硫基荧光素及其衍生物在硅胶薄板上的  $R_f$  值

| 化合物                      | 层析溶剂系统* |      |      |
|--------------------------|---------|------|------|
|                          | I       | II   | III  |
| 异硫基荧光素                   | 0.73    | 0.87 | 0.75 |
| 荧光素对氨基苯乙内酰硫脲             | 0.53    | 0.77 | 0.40 |
| 荧光素- $\gamma$ -酰肼乙基乙内酰硫脲 | 0.51    | 0.10 | 0.31 |

\* 层析溶剂系统 (二氯甲烷:吡啶:乙酸:甲醇) 体积比:  
 I. 10: 1: 1: 1 II. 15: 3: 1:0 III. 10: 1: 2:0

### 三、RNA 的荧光标记

首先将 RNA 分子,如酵母 tRNA (其中含酵母 5SRNA)或柞蚕 5SRNA 等,进行过碘酸氧化,其操作如下<sup>[8]</sup>:

在柞蚕 5SRNA(2.3nmol) 或酵母 tRNA(18 nmol) 中加入过量 100—200 倍的新配制的  $\text{NaIO}_4$  水溶液 (100nmol/ $\mu\text{l}$ ),在室温下暗处放 1 小时,然后加入相当于  $\text{NaIO}_4$  的克分子数 5 倍量的  $\text{NaAsO}_2$  (100nmol/ $\mu\text{l}$ ),置室温下暗处 1 小时。用两倍体积的乙醇沉淀后,用 95% 乙醇洗涤沉淀一次,将沉淀放在干燥器内真空干燥。用 75 $\mu\text{l}$  水溶解沉淀,加入等体积的 0.15mol/L

醋酸钠缓冲液 (pH5.8),混匀后等分成两份,一份中加入 0.5 倍体积的荧光素- $\gamma$ -酰肼乙基乙内酰硫脲 (Fluoresceinthiohydantoin of  $\gamma$ -Glutamic hydrazide) 的乙醇溶液 (50mg/ml),另一份中加入 0.5 倍体积的荧光素对氨基苯乙内酰硫脲 (Fluorescein-thiohydantoin of p-amino-Phenylalanine) 的乙醇溶液 (50mg/ml),在黑暗处 37°—40°C 置 2—3 小时,再各自加入固体  $\text{NaB}(\text{CN})\text{H}_3$  0.2mg,溶解后置室温过夜。用两倍体积乙醇沉淀后,再用 95% 乙醇洗涤一次,真空干燥之。溶于少量重蒸水后,各取一部分用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶平板电泳 (PAGE) 进行分析,电泳结果在紫外光照射下显示 (见图 3)。

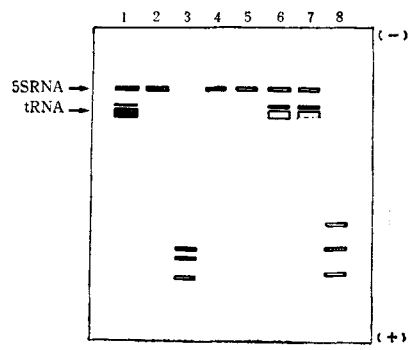


图 3 荧光标记产物的凝胶电泳图谱 (示意图)

样品迁移方向自上而下;实心带为紫外吸收带谱;空心带为荧光发射带谱; 1.酵母 tRNA 及 5SRNA; 2.柞蚕 5SRNA; 3.荧光素- $\gamma$ -酰肼乙基乙内酰硫脲 (I); 4.柞蚕 5SRNA 与 I 的连接物; 5.柞蚕 5SRNA 与荧光素对氨基苯乙内酰硫脲 (II) 的连接物; 6.酵母 RNA 与 I 的连接产物; 7.酵母 RNA 与 II 的连接物; 8. II

### 四、讨 论

经过多种连接反应条件的尝试,最后获得分别含芳香胺和酰肼的两种荧光试剂与 RNA 分子的连接产物。我们曾合成过两种含脂肪胺的荧光素衍生物并用它们标记 RNA 分子,均没有成功。此外,酰肼的标记率比芳香胺的高。发生标记反应程度大小的顺序为:酰肼>芳香胺>脂肪胺。这可能是因为亲核试剂的碱性越强越容易发生  $\beta$ -消除反应,使磷酸二酯键

断裂,无法得到连接产物。

实验表明,在氧化反应中,NaIO<sub>4</sub> 过量 150—200 倍时比过量 10—100 倍时标记产率高。在氧化反应后去除剩余的 NaIO<sub>4</sub> 时,用 NaAsO<sub>2</sub> 比用 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 作还原剂(还原 NaIO<sub>4</sub>) 时标记率高得多。这可能是残余的 HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> 易同氧化产生的醛基发生可逆的加成反应,使后来的标记反应难以进行。

在进行连接反应时,曾试验了不同的 pH 和温度条件。结果表明,在中性或碱性 pH 条件下,几乎得不到标记产物,而在 pH4、pH5 和 pH5.8 等酸性条件下,有标记产物生成,其中以 pH5.8 时的产率为最高。这说明偏酸性条件较利于酰肼和芳香胺的亲核反应。在低温(4℃ 或 15℃) 时,连接产物较难形成,而在较高温度(37°—40℃) 时产率明显增加。

标记产物在 PAGE 中比未标记的相应 RNA 分子的迁移速度略慢一点(大约相差一个核苷酸链长的位置),这是因为标记后的 RNA

其分子量相当于增加了一个核苷酸的缘故。在上述的实验条件下, RNA 的标记率可达 80% 以上。

RNA 的荧光标记成功为 RNA 顺序测定的非同位素标记化方法打下了基础。此外,荧光标记的 RNA 也可以作为探针使用。

## 参 考 文 献

- [1] Peattie, D. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1760, 1979.
- [2] Donis-Keller, H., et al.: *Nucl. Acids Res.*, **4**, 2527, 1977.
- [3] Liu, W., et al.: *Scientia Sinica*, **23**, 1296, 1980.
- [4] Smith, L. M., et al.: *Nucl. Acids Res.*, **13**, 2399, 1985.
- [5] 辜祥荣等:《昆虫学报》, **24**, 349, 1981.
- [6] 张伊平、潘家秀:《生物化学与生物物理学报》, **14**, 165, 1982.
- [7] Kawachi, H., et al.: *J. Biochem.*, **66**, 783, 1969.
- [8] Reines, S. A., et al.: *Nucl. Acids Res.*, **1**, 767, 1974.

[本文于 1986 年 8 月 30 日收到]

## 简讯

## 武汉生物物理学会成立

在武汉市科协和中国生物物理学会的关心支持下,武汉生物物理学会于 1987 年 3 月 29 日在武汉大学召开成立大会,到会代表 183 人。中国生物物理学会副秘书长吕克定同志、武汉市科协李沼湘同志和武汉大学副校长齐民友教授到会讲了话。老一辈科学家吴熙载教授为大会题写了“群策群力发展生物物理攀登科学高峰”的贺词。武汉数学学会、武汉生物医学工程学会、武汉生理学会、武汉生化学会、湖北省原子能农学会等兄弟学会都来人或来信祝贺。

有 227 位科技工作者向筹委会递交了入会申请书,他们来自理工农医等不同方面,反映了生物物理学科的兴旺发达和各方面对本学科的关注。

大会审议通过了学会章程。一致同意吸收部分生物物理专业及其有关专业的研究生作为学生会员。代表们经民主协商,选举产生了第一届理事会。会上还制定了 1987 年的工作任务,着重商议了开展学术活动和促进科技成果产生社会 and 经济效益的问题。

会议进行了学术交流。武汉大学曹连欣教授,并代表何海平、吴熙载二位教授作了“生物液晶和液晶病的研究”的报告。华中农业大学的王海婴同志介绍了“美、加生物物理发展概况”。同济大学张三才同志和武汉大学姚新民同志分专题传达了中国生物物理学会第五届学术会议情况。中南民族学院周金才同志报告了他获得的国内第一张完整的人体心磁图。华中农业大学兰盛银同志报告了他作的花粉离子剥离的结果,展示了大量扫描电镜照片。华中工学院林家瑞同志作了“诱发电位处理技术进展”的报告。湖北大学刘旭阳同志介绍了“生物数学在我国的发展”。他们的报告引起了与会者的很大兴趣,起到了学科间互通讯息的作用。

会上还传达了武汉市科协三大精神,转发了中国生物物理学会的“1987 年活动计划”,“专业委员会名单”,“科普作品有奖征文通知”等有关文件。

[武汉生物物理学会 冯胜彦]