

四核苷酸 Ap Gp Ap Gp 的合成

中国科学院生物物理研究所二室核酸合成组

本文报道了酵母 tRNA^{ala} 分子中第 42—45 核苷酸片段——四核苷酸 AGAGp 的合成。首先我们化学合成了 N,2',5'-全乙酰化腺苷-3'-磷酸 N, N-二甲氨基甲叉鸟苷-3'-磷酸的二环己基吗啉胍盐,经 DCC 缩合、脱保护得到 Ap Gp, 然后通过氯甲酸乙酯环化形成 ApG > p, 再经 RNaseN₁ 酶促合成为四核苷酸 AGAGp。

材料和方法

3'-核苷酸为上海试剂二厂产品, DCC 为上海佘山化工厂产品, DEAE-Sephadex A-25 为 Pharmacia 产品, DEAE-纤维素滤纸和 3# 滤纸为 Whatman 产品, Dowex 50W × 8 (100—200 目) 为 BDH 产品。二甲基 DMF 缩醛按 Arnold^[1] 方法制备。RNase N₁ 从粗糙链孢霉诱变株中提取^[2], RNase T₁ 从高峰淀粉酶中提取, 硷性磷酸单酯酶从 *E. coli* K-12 中提取, T₄ 多核苷酸激酶按 Richardson^[3] 方法提取, γ -[³²P]-ATP 按 Schendel^[4] 方法制备。

纸层析展层溶剂: I_a 为乙醇: 1M 乙酸铵 = 7:3 (V/V), I_b 为乙醇: 1M 乙酸铵 = 5:2 (V/V); II_a 为异丙醇: 浓氨水: 水 = 7:1:2 (V/V), II_b 为异丙醇: 浓氨水: 水 = 65:10:25 (V/V), II_c 为正丙醇: 浓氨水: 水 = 55:10:35 (V/V); III 为甲醇: 乙醇: 浓盐酸: 水 = 50:25:6:19 (V/V), IV 为 100 毫升 0.1M 磷酸缓冲液 (pH7.0) 加 40 克硫酸铵。

纸电泳缓冲液: pH1.9 为甲酸(2%)及乙酸(8.7%); pH2.35 为乙酸稀溶液(将乙酸稀释至所需 pH); pH3.5 为 0.03M 柠檬酸-柠檬酸钠; pH7.5 为 0.03M 磷酸钠缓冲液。

高压电泳用英 Shandon 高压电泳仪, 中压电泳用国产 DY-9 中压电泳仪。

试剂制备和处理: 有机合成所有溶剂和试剂均经无水处理。反应样品经 P₂O₅ 真空干燥, 添加溶剂、试剂均在放有 P₂O₅ 的密封干燥箱中进行。无水核苷酸单体干粉制备, 一般是将含水的核苷酸产品或溶液, 加入无水吡啶减压浓缩至干, 再加入无水吡啶浓缩, 如此反复多次得到无水物, 然后溶于适量无水吡啶中, 边摇动边滴加到大量无水乙醚中, 离心, 沉淀, 用无水乙醚洗二次后, 真空干燥。

DMF 经 P₂O₅ 干燥后, 倾出再减压蒸馏, 加入分子筛(4A)密封保存备用。无水吡啶先经氯磺酸处理, 蒸馏, 再用氢氧化钾回流, 倾出吡啶, 蒸馏, 加入分子筛(4A)密封保存备用。无水氨-甲醇溶液的制备是将无水甲醇在 -10℃ 左右冷却下缓慢通过干燥氨到饱和(约 15N), 然后分管封装, 低温保存备用。酰基保护基的脱除是将样品用无水氨-甲醇溶液封管, 室温氨解 24 小时或 37℃ 氨解 18 小时。

寡核苷酸 5'-³²P 标记和同系层析分析, 参照 Browlee^[5] 方法。

实验方法和结果

N, 2', 5'-全乙酰化腺苷-3'-磷酸的制备: 按 Lapidot 等人方法^[6]。从 7 克腺苷-3'-磷酸制得 10.5 克 N, 2', 5'-全乙酰化腺苷-3'-磷酸。产品经电泳、层析鉴定为均一。R_f = 0.44 (溶剂 I_a, 12℃), 电泳 R_{AMP} = 1.36 (pH3.5), 紫外光谱 pH1 λ_{min} = 237.5 毫微米, λ_{max} = 282 毫微米, pH17 λ_{min} = 232 毫微米, λ_{max} = 273

毫微米, $\text{pH} 13 \lambda_{\min} = 234$ 毫微米, $\lambda_{\max} = 260.5$ 毫微米。

N, N-二甲氨基甲叉鸟苷-3'-磷酸二环己基吗啉胍盐: 按 Ohtsuka^[7a, b] 等人方法制备。从 12 克鸟苷-3'-磷酸二钠盐制得 13 克鸟苷-3'-磷酸二环己基吗啉胍盐。 $R_f = 0.28$ (溶剂 I_b , 15°C), 纯度 95%。

3 克鸟苷-3'-磷酸二环己基吗啉胍盐真空干燥, 加 30 毫升无水 DMF, 摇至鸟苷酸盐全部溶解。然后加入新蒸的 3 毫升二甲基 DMF 缩醛, 生成大量白色沉淀。室温暗处密封振荡反应 24 小时, 得黄色清液, 停止反应, 减压蒸发除去过量 DMF, 加乙醚研磨, 得 N, N-二甲氨基甲叉鸟苷-3'-磷酸二环己基吗啉胍盐 2.5 克, 层析鉴定均一, $R_f = 0.45$ (溶剂 II_a , 15°C)。

AGp 的制备: 5 克 N, 2', 5'-全乙酰化腺苷-3'-磷酸吡啶盐, 8 克 N, N-二甲氨基甲叉鸟苷-3'-磷酸二环己基吗啉胍盐, 溶于 400 毫升 50% 吡啶水溶液, 过 Dowex 50 吡啶型阳离子交换柱 (3.5×29 厘米) 用等体积 50% 吡啶水溶液洗, 流出液同洗液合并, 减压浓缩至小体积, 再加无水吡啶减压浓缩脱水数次得干粉, 真空干燥。然后加 14 克 Dowex 50 吡啶型干树脂, 14 克 DCC, 90 毫升无水吡啶, 玻璃球数粒, 于室温暗处密封振荡反应 5 天, 加 50% 吡啶水中止反应, 滤去絮状沉淀, 用正戊烷抽提数次, 弃去正戊烷, 减压浓缩至干。加无水吡啶减压浓缩数次得无水物, 在干燥箱内用适量无水吡啶溶解, 乙醚沉淀。离心, 沉淀用无水乙醚洗二次, 干燥得 $\text{Ac}_2\text{A}(\text{OAC})_p \text{ G}(\text{OH})_p$ 吡啶盐粗产物 8 克

取粗产物 800 毫克放安瓶中, 干冰冷却, 加氨-甲醇溶液 15 毫升, 冷冻封管, 氨解、减压抽去氨和甲醇, 冰冷, 加 0.1 N 盐酸至 $\text{pH} 1-1.5$, 室温放置 4 小时, 冰冷, 加 0.1 N 氢氧化钾至 $\text{pH} 8-8.5$, 滤去不溶物, 用少量水洗沉淀。合并滤液及洗液, 上 DEAE-Sephadex A-25 柱 (HCO_3^- 型 2×70 厘米) 先用 0.2 M NH_4HCO_3 3,000 毫升淋洗, 再用 0.2-0.5 M NH_4HCO_3 溶液直线梯度洗脱 (贮瓶与混合瓶各 1800 毫升), 分管收

集, 根据光谱比值确定 AGp 峰, 合并浓缩脱盐得 AGp 铵盐 87 毫克。产物用酸解 (1 N HCl, 100°C 1 小时) 溶剂 III 展层测定硷基比 $\text{Ap} : \text{Gp} = 1 : 1.03$, $R_f = 0.23$ (溶剂 II_b , 12°C), $R_f = 0.18$ (溶剂 IV, 12°C), 电泳 $R_{AMP} = 1.26$, 产物被桔青霉核酸酶完全水解。

AGp 的纯化: 有时经 NH_4HCO_3 柱层析产物在酸性电泳显示少量杂点, 需再通过 $\text{pH} 3.5$ DEAE-Sephadex A-25 (CH_3COO^- 型) 分离。先用醋酸三乙胺平衡柱, 再依次用 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M, 0.5 M 醋酸三乙胺分步洗脱, 进一步纯化, 下柱液浓缩脱盐后, 换成铵盐。产物电泳均一, 纯度 90% 以上。

图 1 给出的是小样 AGp 的柱分离图谱, 在多次实验中, 大量制备分离图谱与小样一致。

AG > p 的制备。AGp 须先将末端磷酸环化成为 AG > p 才可作为 RNase N_1 底物, 环化方法基本按 Taylor^[8]。环化产率为 75-90%, 反应混合物通过 DEAE-Sephadex A-25 柱纯化, 用 0.35 M NH_4HCO_3 洗下 AG > p, 产物电泳纯 ($\text{pH} 7.0$) 经 RNase T_1 作用完全开环变回 AGp。

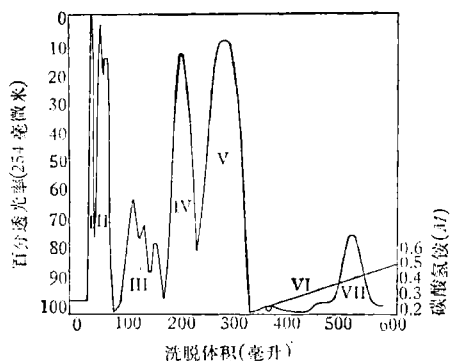


图 1 AGp 产物分离

RNase N_1 反应混合物中四核苷酸的测定, AG > p 经 RNase N_1 作用后, 反应混合物中含有至少四种主要成份 AG > p, AGp, AGAG > p, AGAGp 我们采用以下三种方法进行分离并测定四核苷酸产率

1) 开环、去末端磷后电泳: 反应物经酸开环, 酶除去末端磷酸 (方法见后文), 变为两种主

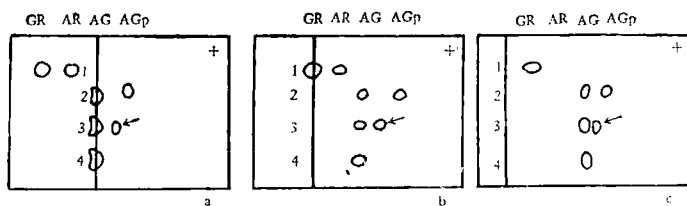


图2 RNase N_1 反应物经开环,去末端磷后在不同 pH 进行电泳的情况

a. pH 2.35 b. pH 3.5 c. pH 7.5

样品 1. 标准 AR 和 GR 2. AGp 和 AG, 3. 酶反应物开环,去末端磷后电泳
4,3. 用 RNase T_1 处理后再去末端磷,电泳。
箭头处为 AGAG 产物

要成份 AG 和 AGAG, 在 pH2.35、pH3.5 和 pH 7.0 电泳均可得到良好分离,如图 2。

2) DEAE-纤维素纸电泳,将反应物直接点在 DE-81 纸条上立即高压电泳 (pH 1.9), 产物和底物可完全分开,如图 3a。

3) 纸层析: 硷性正丙醇系统 (II_c) 可将四种主要成份完全分开如图 4b, 反应物也不须进行预处理。

如须进行产率测定则可将纸上各点剪下用 0.01N HCl 洗脱, 测定紫外吸收值 (OD_{260nm}), DE-81 纸须用 0.2 M NaCl-0.1 N HCl 洗脱。

AGAGp 合成条件实验: RNase N_1 酶促合成 AGAGp 基本按 Koike 等^[11], 我们工作中发现最适反应时间为 3—6 天, 最适酶量也与文献不同, 图 4 表示一次实验结果, 四核苷酸最高产率为 30.2%。

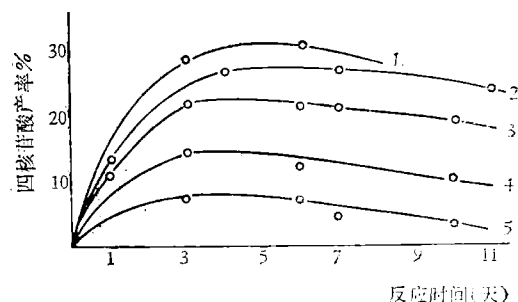


图4 RNase N_1 量及反应时间与产率关系

反应体积 15 微升, 含 2.7 微克分子 (μmole) AG > p.
0.1M 磷酸缓冲液 (pH 7.0) - 0.1% 明胶, -5°C 保温。
产率用 DEAE 纸电泳测定样品 1、2、3、4、5 分别加有
RNase N_1 0.45 单位, 1.8 单位 4.5 单位 9 单位和 18
单位

AGAGp 的分离及除去 RNase N_1 : 按文献方法^[9] 用酚处理后柱层析分离得到的 AGAGp 中常杂有微量 RNase N_1 , 保存期间很易降解。

我们试用硷性正丙醇系统 (II_c) 纸层析分离产物, 经多次实验证明效果较好, 遂作为正式方法。酶反应物用 1—2 体积 II_c 系统中止反应, 在 Whatman 3[#] 纸上划线点样, 上样量 20 OD_{260} /厘米左右, 室温下行层析 24 小时后, 剪下产物区带, 重蒸水洗脱, 减压浓缩干燥后得到黄色产品粉末。此制品在 pH 7.0 磷酸缓冲液中 37°C 保温 1 小时完全没有降解, 证明基本不含 RNase N_1 , 纸层析结果如图 5。

AGAGp 和 AGAG 的制备: 纸层析分离得到产物大部分是 AGAG > p, 较少部分是 AGAGp, 前者在 0.1N HCl 37°C 保温 3—4 小时即全部转化为后者, 此过程并无显著降解。开环后应立即调回中性。为保证纯度, 可再经一次纸层析。

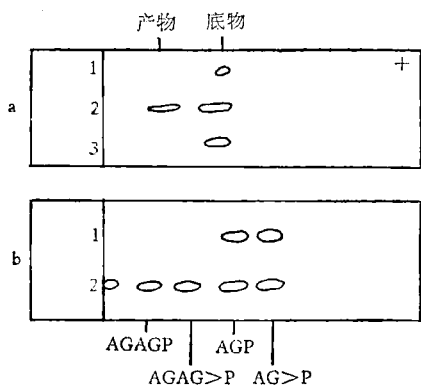


图3 RNase N_1 反应物分离情况

a. DEAE 纸电泳, 3000 V 千小时, pH 1.9 缓冲液。
6. 纸层析, 7. 行 24 小时, 溶剂 II_c 。样品 1. 为 AG > p
和 AGp, 2. 为 RNase N_1 酶反应产物, 3. 为 2,
用 RNase T_1 处理后电泳

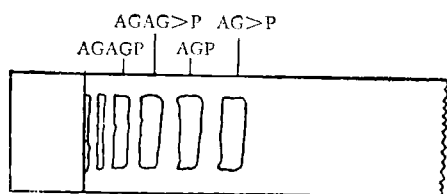


图5 纸层析制备四核苷

Whatman 3rd 纸 18×57 厘米, 划线点样长 14 厘米, 点样 300 OD₂₆₀, 溶剂 II_c 室温下行层析 24 小时

AGAGp 用酶除去末端磷即得 AGAG, 400 OD₂₆₀ AGAGp 溶于 pH8.0 tris-HCl 缓冲液 (0.1 M, 0.5 毫升), 加入 80 单位硷性磷酸单酯酶, 37℃ 保温 2 小时即可将末端磷全部去除, 再经一次纸层析 (II_c), 纯化 AGAG 及除去单酯酶, 产品带黄色, 低温贮存稳定。

AGAGp 产物性质及鉴定: 四核苷酸 AGAGp 受 RNase T₁ 作用可降解变回 AGp。硷基组成 (去掉末端磷后) 为 Ap:Gp:Gr = 2.00 : 0.99 : 1.11。纸层析纸电泳及同系层析均为一个点。

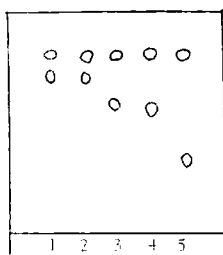


图6 AGAGp 等同系层析图

图示放射性点位置 1, 2, 3, 4, 5 分别为 ³²pAG, ³²pAG>p, ³²pAGp, ³²pAGAG 和 ³²pAGAGp。上端为 γ-[³²P]-ATP

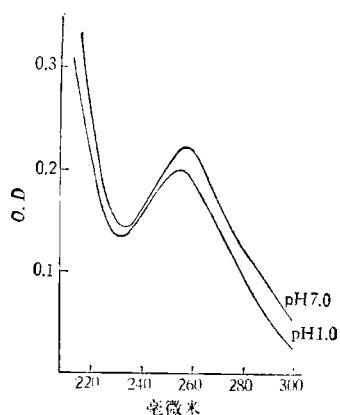


图7 AGAGp 紫外光谱

AGAGp, $R_f = 0.11$, $AGAG > p R_f = 0.19$ (溶剂 II_c), 纸电泳 $R_{AMP} = 1$ (pH 7.0), 同系层析行为见图 7。AGAGp 的紫外光谱见图 7。

讨 论

除前文所述方法外, 我们还用 N, 2', 5'-全苯甲酰化腺苷-3'-磷酸和 N, 2', 5'-全异丁酰化腺苷-3'-磷酸与 N, N-二甲氨基甲叉鸟苷-3'-磷酸吗啉酯二环己基吗啉胍盐缩合, 以及用 2', 3'-环化鸟苷酸与 N, 2', 5'-全乙酰化腺苷-3'-磷酸缩合制备 AGp, 均得到相似结果。

从 AGAGp 中除去 RNase N₁ 颇困难, 我们曾试用酚处理^[9], 硷性巯基试剂处理^[10], CM-Sephadex C-25、pH1.9 DEAE 纸电泳和 DEAE-Sephadex A-25^[9] 等方法均未奏效, 可能由于此完全由嘌呤组成的四核苷酸性质较为特殊, 与酶结合较牢之故。后改用硷性正丙醇纸层析法, 此时酶蛋白不为有机溶剂所推动, 停留原点而与核苷酸分开, 纸层析方法优点是简单、分离有把握, 没有柱层析配溶剂, 洗脱去盐等麻烦。缺点是容量有限, 产品含色素较多。

T₄ 多核苷酸激酶由制备组及上海生化所二室提供, 谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] Arnold, Z. and Kornilic, M.: *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, **29**, 645, 1964.
- [2] 刘增印等: 《生物化学和生物物理学报》, 待发表。
- [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] Browlee, G. G.: *Determination of Sequence in RNA* (North-Holland Publishing Company), 1972.
- [6] Lapidot, Y. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 3852, 1963.
- [7] (a) Ohtsuka, F. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 3445, 1970.
(b) Moffatt, J. G. et al.: *ibid.*, **83**, 649, 1961.
- [8] Taylor, P. R. et al.: *J. Org. Chem.*, **29**, 1708, 1964.
- [9] Koike, T. et al.: *J. Biochem.*, **70**, 55, 1971.
- [10] 内田庸子: 《核酸的化学》, Vol 2, p67, 1976 日本生化学会编, 东京化学同人。

【本文于 1979 年 9 月 20 日收到】