

3'-端标记的 RNA 中鸟嘌呤、腺嘌呤、嘧啶顺序直读法

魏西平 赵 鼎 程振起 赵 林*

(中国科学院生物物理研究所)

近年来, RNA 序列直读技术有很大发展, 其中包括使用各种不同碱基专一的核糖核酸酶, 分别对一端用同位素标记的 RNA 分子作部分水解^[1], 用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离各水解产物, 经放射自显影后, 即可从放射自显影图上读出 RNA 序列。

新的序列分析技术, 大都需用末端标记的样品。常用的方法是用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 和 T_4 多核苷酸激酶标记 RNA 分子的 5' 端^[2]。但近年来 3'-末端标记的方法也已有应用, 例如有人用 $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{-pCp}$ 和 T_4 RNA 连接酶标记各种 RNA (如 5S RNA, tRNA 以及大分子 RNA^[3])。但将 3'-端标记的 RNA 分子用于序列分析的报道^[4]尚不多。

本文采用 3'-端标记的样品, 分别经特异性的核糖核酸酶 T_1 (特异地水解 GpX 的磷酸二酯键), U_2 (主要水解 ApX 的磷酸二酯键) 的有限水解及有限的碱水解 (随机水解核苷间的磷酸二酯键), 由此确定核苷酸链中鸟嘌呤 (G), 腺嘌呤 (A) 以及嘧啶的排列顺序。我们以已知序列的蕃茄叶 5S RNA^[5] 为材料, 建立了这个序列分析技术。为今后开展植物 5S RNA 的一级结构和分子分类和植物的系统演化研究^[7] 提供一定的条件。

(一) 材 料

腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP), 纯度为 99% (上海东风生化试剂厂); 3'-胞嘧啶核苷一磷酸 (3'-CMP), $[\text{H}^+]$ 型, 纯度为 98%; 牛血清蛋白, tRNA (上海东风生化试剂厂)。 T_4 多核苷酸激酶, T_4 RNA 连接酶 (中国科学院生物物

理所生化厂), 核糖核酸酶 T_1 (西德 Boehringer mannheim GmbH) 核糖核酸酶 U_2 (日本 Sankyo CO., LTD)。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (英国 Amersham), 比强 15.24 $\mu\text{Ci}/\text{nmole}$ 。 丙烯酰胺 (天津化学试剂一厂) 含量为 98.5%, 甲叉双丙烯酰胺 (匈牙利 Reanal)。 DTT (西德 Serva), Hepes (瑞士 Fulka)。 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) (四川自贡化工研究院试剂厂)。 其它试剂均为北京化工厂分析纯制剂。 豚在使用前经过 DEAE-纤维素柱过滤, tRNA 用酚法除蛋白。 蕃茄叶采自北京四季青公社, 品种为强力米寿 $\times 201$ 。

(二) 方 法

1. 蕃茄叶 5S RNA 的纯化: 从新鲜蕃茄叶中分离, 纯化 5S RNA 的方法另见报道^[6]。

2. 5S RNA 3'-末端标记方法: 5S RNA 3'-末端标记方法分两步:

(1) $[5'\text{-}^{32}\text{P}]$ pCp 的制备: 反应混合物总体积为 200 μl , 包括以下组分: 3'-CMP 20 μl (30 nmol/ μl), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 62.5 μCi (比强 15.24 $\mu\text{Ci}/\text{nmole}$, T_4 多核苷酸激酶 80 u., $2 \times 5'$ -末端标记缓冲液 100 μl (50 m M Tris-HCl, pH 7.5, 20 m M MgCl_2 , 10 m M DTT)。在 37°C 水浴保温 30 分钟后, 置沸水浴煮 3 分钟。在 4°C 保存备用。

(2) 5S RNA 的 3'-末端标记: 反应混合物总体积为 124 μl , 包括以下组分: 蕃茄叶 5S RNA 100 μg , $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{pCp}$ 40 μl (上述反应混合物), ATP 10 μl (60 μM), T_4 RNA 连接酶

* 中国科学院、武汉病毒研究所

21 u., 2 × 3'-末端标记缓冲液 60 μl (50 m M Hepes, pH 7.5, 20 m M MgCl₂, 牛血清蛋白 10 μg/ml, DTT 3.3mM)。37℃ 保温 30 分钟后, 4℃ 保温过夜。

3. 核糖核酸酶 T₁ 和 U₂ 部分水解条件: 取两份 10 μl 的 5S RNA 3'-末端标记反应混合物(含有 8 μg [3'-³²P] 5S RNA), 分别与 2.5 μl 水解缓冲液(20 m M 柠檬酸钠, pH 5.0, 7 M 脲, 1 m M EDTA, 0.25 mg/ml tRNA, 0.025% 溴酚蓝和 0.025% 二甲苯蓝)混合后, 50℃ 水浴中保温 5 分钟, 冰浴冷却, 然后分别加入 T₁ 酶和 U₂ 酶, 酶量各为 0.2 u. 和 0.4 u. 再置 50℃ 水浴保温 15 分钟, 放冷浴骤冷后, 分别点样于凝胶板的样品槽中。

4. 有限的部分碱水解: 取 10 μl 5S RNA 3'-末端标记反应混合物(含有 8 μg [3'-³²P] 5S RNA) 与 15 μl 碱解缓冲液 (50 m M NaHCO₃/Na₂CO₃, pH 9.0, 1 m M EDTA, 0.25 mg/ml tRNA) 混合后, 试管加盖封住, 置 90℃ 水浴中加热 3 分钟, 置冰浴骤冷。然后加 7 μl 染料缓冲液(20 m M 柠檬酸钠, pH 5.0, 7 M 脲, 1 m M EDTA, 0.25 mg/ml tRNA, 0.025% 溴酚蓝和 0.025% 甲苯蓝), 点样于凝胶板的样品槽中。

5. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 碱解及酶解产物在 20% 聚丙烯酰胺(丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺=29:1) 板状凝胶上电泳分离。制胶缓冲液含有 50 m M Tris-硼酸, pH 8.3, 1 m M EDTA, 7 M 脲。电泳缓冲液除不含有 7 M 脲外, 其他成分与制胶缓冲液相同。胶板尺寸为 40 厘米×20 厘米×0.1 厘米, 样品槽的大小是 1 厘米×1 厘米×0.1 厘米。加样前, 胶板需在 1200 伏电压下, 预电泳 2 小时以上。

降解的样品分两次点样, 第一次点样后, 剩

余部分保存于干冰中。电泳 2—3 小时之后, 在另外的样品槽内平行地作第二次点样。电泳电压为 2000 伏。整个电泳过程要使板胶保持温热为宜。全部电泳时间大约为 8 小时。

6. 放射自显影: 电泳后, 除去一块凝胶板上的玻璃, 用含有 ³²P 的墨水标记电泳指示染料的位置, 用塑料薄膜将胶包好, 在暗室压上两张 X 光底片, 在 0℃ 条件下, 曝光约 2 天。

(三) 结果和讨论

以往我们用 T₄ 多核苷酸激酶和 [γ-³²P]·ATP 标记 RNA 分子的 5'-末端时, 常常由于激酶中杂酶污染而造成 RNA 分子的严重降解。现在利用国内纯度较高的 T₄ RNA 连接酶来标记 RNA 分子的 3'-末端, 然后用这种 [3'-³²P] RNA 作降解, 不仅避免了上述的问题, 而且得到了较好的结果。经我们实验所读出的约 50 几个核苷酸的一段蕃茄叶 5S RNA 序列(A, G 和嘧啶核苷酸)基本上与 Payne^[5] 发表的一致(图 1)。

[5'-³²P]pCp 制备和 RNA [3'-³²P] 标记, 两种产物在我们的实验中均未进一步纯化, 而是将反应混合物直接用于下一步实验。我们提取的 5S RNA 在存放期间稍有降解(电泳图未显示), 3'-末端标记后(见图 2), 从其水解的结果看, 仍可得到较好的谱带(图 3)。核糖核酸酶 T₁ 和 U₂ 在 7 M 脲的条件下, 可以获得较为一致和重复的结果, 其酶解的特异性也较明显, 但在我们的实验中发现 T₁ 酶也部分切腺嘌呤核苷酸和微量的嘧啶核苷酸, 其中 89 位腺嘌呤核苷酸和 102、106 位的嘧啶核苷酸就较明显, 其原因可能由于我们使用的样品在标记前已有部分降解造成(如 88 位的带), 也可能 T₁ 酶被污

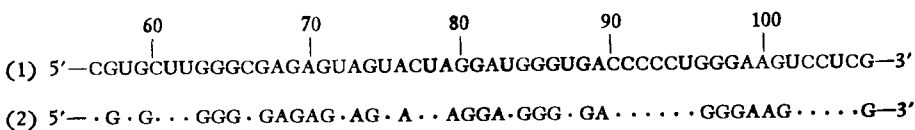


图 1 蕃茄叶 5S RNA 分子部分序列图

(1) 为 Payne (1976) 发表的序列 (2) 为我们测定的一段序列。【●】代表胞嘧啶核苷酸或尿嘧啶核苷酸

染所致。

我们使用这种酶降解确定腺嘌呤核苷酸，鸟嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸顺序的方法，虽然不能区别胞嘧啶和尿嘧啶，但如配合其他的序列测定方法，全序列的测定是易达到的，因此把它作为一种序列分析的基本方法也有一定的意义。

李楠茜同志对本工作曾提出过很多宝贵意见,特此志谢。

图2 蕃茄叶 [3'-³²P] 5S RNA 放射自显影图

番茄叶 5S RNA 3'-端标记反应后, 取出 10 μ l [3'- 32 P] 5S RNA 反应混合物, 点样于 8% 聚丙烯酰胺 (7M 脲) 板状凝胶上, 电泳在 600 伏, 进行 1.5 小时, 放射自显影压片 2 小时

参 考 文 献

- [1] Helen Donis-Keller et al.: *Nucleic Acids Res.* **4**, 8, 2527, 1977.
- [2] Efstratiadis, A. et al.: *Nucleic Acids Res.* **4**, 4165, 1977.
- [3] England, T. E., et al.: *Nature* **275**, 560, 1978.

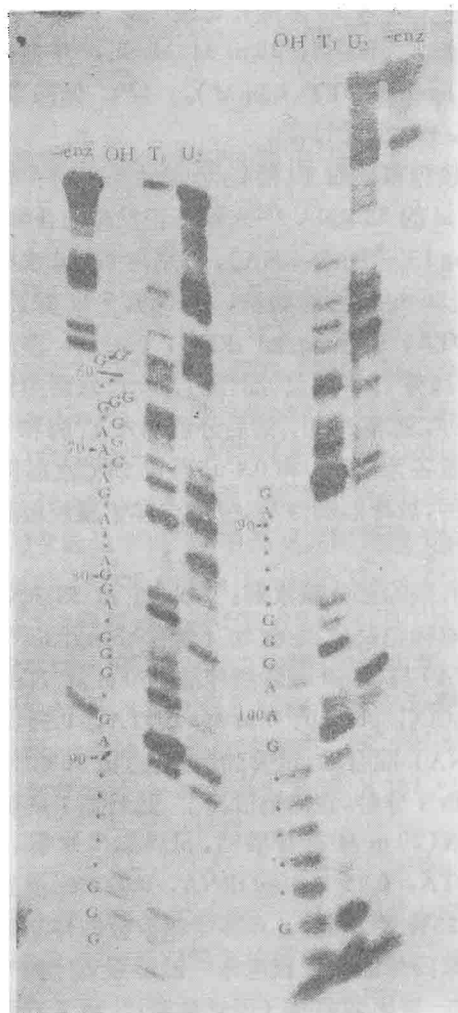


图3 蕃茄叶 5S RNA 酶部分降解序列
分析放射自显影图

T₁ 核糖核酸酶 T₁ 部分降解 U₂ 核糖核酸酶 U₂ 部分降解 OH 有限碱降解 -enz 不加酶或碱处理的对照样品详细方法见“方法”

- [4] Baer, E. J. et al., *Nucleic Acids Res.* 8, 16, 3603, 1980.
- [5] Payne, P. I.: *Eur. J. Biochem.*, 71, 33, 1976.
- [6] 赵鼎等“植物叶子 5S RNA 的提取及纯化(待发表), 植物学报 1982。
- [7] Hori, H., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (1), 381, 1979.

[本文于 1981 年 4 月 20 日收到]