

多核苷酸合成的研究

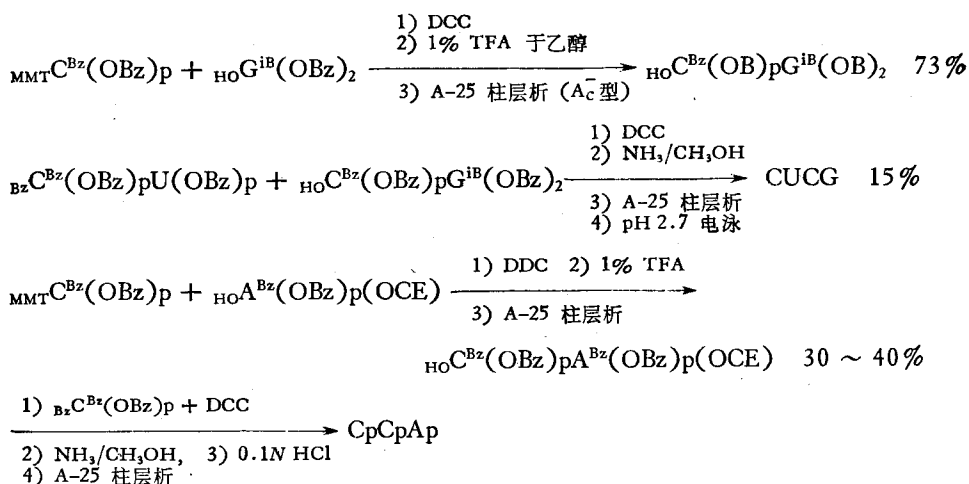
——CUCG 和 CCAp 的合成

彭 渤 吴仁龙 高 翔 汤锦炎 冯晓黎 陈常庆

(中国科学院生物化学研究所二室)

我们在前文中曾经报道由 CUCG > P 和 UCCA 用核糖核酸酶 N₁ 酶促合成了 CUCG-UCCA 八核苷酸的工作^[1]。由于 T₄-RNA 连接酶在连接短片段方面的成功^[2,3], 本文将继续报道用 RNA 连接酶酶促合成酵母丙氨酸转移核糖核酸 3'-端顺序 CUCGUCCACCA 所必需的两个片段 CUCG 和 CCAp 的化学合成。CCA_p

中的 3'-磷酸的存在, 可防止在用 RNA 连接酶连接时的自身聚合和环化反应, 并可降低受体比: 供体的比例。CUCG 和 CCA_p 合成路线如下所示, 纯化后的 CUCG 和 CCA_p 均能为牛胰核糖核酸酶完全水解, 并得到预期的核苷酸组成比例。



实 验 部 分

(一) 材料和方法:

3'-CMP、3'-AMP、3'-UMP 和鸟苷由上海试剂二厂提供。纸层析溶剂 I 为异丙醇: 浓氨水: 水 (7:1:2, v/v), 溶剂 II 为正丙醇: 浓氨水: 水 (55:10:35 v/v)。pH2.7 电泳 (0.1M 甲酸缓冲液) 是在本所自制小电泳仪上进行, 电压 ~ 25 伏/厘米, pH 3.5 电泳 (0.05M 柠檬酸缓冲液) 和 pH 7.5 电泳 (0.05M 磷酸缓冲液) 是在

Shandon 高压电泳仪上进行, 电压 ~ 80 伏/厘米。硅胶板层析是用黄岩荧光化学厂出品的硅胶自己铺板; 展层溶剂为甲醇: 氯仿 (9:1 和 19:1)。无水吡啶等反应溶剂按前文^[4]处理。

MMT^{C^{Bz}}(OBz)p、B_zC^{Bz}(OBz)p 和 B_zC^{Bz}(OBz)-pU(OBz)p 按前文制备^[4]。

MMT^{A^{Bz}}(OBz)p 按文献方法^[5]制备。

注: 本文所用简称: HOA^{Bz}(OBz)p(OCE) 代表 N, 2'-二苯甲酰腺苷-3'-磷酸酐, HO^{C^{ib}}(OBz) 代表 N-异丁酰 2', 3'-二苯甲酰鸟苷; A-25 柱层析为二乙氨基-葡聚糖凝胶 A-25 柱层析, 其余见前文^[4]。

(二) $\text{HO}^{\text{G}^{\text{IB}}}(\text{OBz})_2$ 的制备:

1) G^{IB} 取 5 克鸟苷溶于 45 毫升 10% 四乙基氢氧化铵和少量吡啶中, 减压浓缩, 再用吡啶共浓缩去水三次, 残留固体放干燥器中, 用油泵抽真空干燥 5 小时。加入 100 毫升新蒸馏的异丁酸酐和 100 毫升无水吡啶, 振摇溶解后, 于室温振摇反应三天。再在冰浴冷却下加入 50 毫升甲醇, 1 小时后, 减压蒸去约 1/3 体积的溶剂, 将反应溶液于搅拌下缓慢倾入到 300 毫升饱和 NaHCO_3 溶液中, 并加入固体 NaHCO_3 中和异丁酸。析出的油状物用乙酸乙酯抽提 2 次, 乙酸乙酯溶液合并用水洗 2 次后, 加无水 Na_2SO_4 干燥, 减压蒸去溶剂, 最后真空干燥, 得泡状物, 重 10 克。将其溶于 400 毫升甲醇中, 冷至 0°C , 加入预冷的 2N NaOH 125 毫升, 在 0°C 反应 20 分钟, 迅速加入吡啶型阳树脂中和到 pH7.0 (约 300 毫升)。过滤, 用 50% 甲醇水溶液洗, 滤液和洗液合并, 减压浓缩去溶剂, 产物用水重结晶, 得 5 克 (80%), 熔点 $116^\circ-118^\circ$ 。硅胶板层析均一 (甲醇: 氯仿 = 1:9)。元素分析按 $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_6$ (353.33) 计算, C47.95, H5.42, N19.82, 实测值为 C47.95, H5.73, N19.56, UV (pH2): $\lambda_{\text{最大}}$ 259nm, 278nm (肩)。

2) $\text{MMT}^{\text{G}^{\text{IB}}}$ 取 9.7 克 G^{IB} , 用无水吡啶共浓缩去水三次, 最后减压抽干成泡状物。加入 10.2 克 MMT-Cl , 真空干燥过夜。在干燥箱中加入 80 毫升无水吡啶, 摇溶后室温反应过夜。将反应液倾入到 150 毫升饱和 NaHCO_3 溶液中, 用氯仿抽提三次, 氯仿液合并, 用水洗 2 次, 加无水 Na_2SO_4 干燥后, 减压浓缩去溶剂, 得油状物。加入 500 毫升沸乙酸乙酯将油状物溶解, 很快即析出结晶, 冰箱放置过夜。过滤, 乙酸乙酯洗涤, 干燥后, 得 14 克产物 (79%), 熔点 $188-189^\circ\text{C}$, 硅胶板层析均一 (甲醇: 氯仿, 1:9), 元素分析: 按 $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (643.68) 计算, C63.44, H5.79, N10.88, 实测值 C63.26, H5.89, N10.35。

3) $\text{HO}^{\text{G}^{\text{IB}}}(\text{OBz})_2$ 8.4 克 $\text{MMT}^{\text{G}^{\text{IB}}}$ 溶于无水吡啶中, 共浓缩去水 3 次, 加入 84 毫升无水吡啶和 8.4 毫升苯甲酰氯反应 1 小时。加入 300

毫升冰水, 用氯仿抽提 3 次; 氯仿层合并, 水洗 2 次; 加无水 Na_2SO_4 干燥后, 减压浓缩去溶剂, 加乙醚研磨, 得粉状物, 重 9.3 克, 然后加入 200 毫升 1% TFA 的 80% 乙醇溶液, 于 37°C 振摇至溶解, 并保温 2.5 小时; 冷却, 加入 10 毫升 2.5% 氨水中和。减压浓缩去乙酸, 析出的油状物用乙酸乙酯抽提 2 次; 乙酸乙酯层加无水 Na_2SO_4 干燥后, 减压浓缩至干, 得泡状物。用少量氯仿溶解, 上硅胶柱 (2×27 厘米), 用 1% 的甲醇-氯仿液洗脱, 先出现 MMT 显色的峰以后, 即出现产物峰。收集产物峰, 减压浓缩去溶剂, 加乙醚沉淀, 得粉状物, 重 4 克 (54%), 硅胶板层析均一 (甲醇: 氯仿 5:95)。元素分析: 按 $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_8$ (561.56) 计算, C59.89, H4.85, N12.11; 实测值, C59.62, H4.83, N12.46。

(三) $\text{HO}^{\text{C}^{\text{Bz}}}(\text{OBz})_p\text{G}^{\text{IB}}(\text{OBz})_2$ 的制备: 将 $\text{MMT}^{\text{C}^{\text{Bz}}}(\text{OBz})_p$ 吡啶盐 280 毫克和 $\text{HO}^{\text{G}^{\text{IB}}}(\text{OBz})_2$ 220 毫克溶于无水吡啶中, 用吡啶共浓缩去水三次。在无水物中加 600 毫克 DCC 和 2.5 毫升无水吡啶, 溶解, 暗处室温振摇 5 天。加入 6 毫升吡啶和 8 毫升水, 室温放置过夜。用戊烷抽提三次除去未反应的 DCC。戊烷层和析出的二环己基脲弃去。吡啶水溶液减压浓缩至干, 加吡啶共浓缩三次后, 滴入大量无水乙醚中, 沉淀离心收集, 乙醚洗, 干燥后得粉状产物, 重 500 毫克。将其溶于 16 毫升 95% 乙醇中, 加水 4 毫升, 再加 0.2 毫升 TFA, 有白色沉淀产生; 在 37°C 水浴中振摇至溶解, 并继续保温至 3 小时。减压浓缩, 加无水乙醇共浓缩三次, 用无水乙醚沉淀, 离心。将离心所得沉淀用 70% 乙醇溶解, 上 A-25 柱 (醋酸型, 2×17 厘米)。用 70% 乙醇洗至无紫外吸收后再用 0.075—0.15M 醋酸三乙胺缓冲液 (各 400 毫升) 梯度洗脱。将很快洗下的产物峰合并, 减压浓缩去溶剂, 加吡啶共浓缩至无水, 滴入乙醚中沉淀, 离心, 乙醚洗, 干燥后, 得产物 260 毫克 (73%)。产物用 $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 氨解后得 CpG, 纸层析 (溶剂 I) 和电泳 (pH7.5) 均一, 能为牛胰核糖核酸酶完全酶解并得到 Cp: G = 1.05:1。

(四) CUCC 的合成:

将 203 毫克 $BzC^{Bz}(OBz)pU(OBz)p$ 三乙铵盐和 90 毫克 $HO^{C^{Bz}}(OBz)pG^{ib}(OBz)_2$ 溶于 10 毫升 50% 吡啶中, 通过吡啶型阳离子交换柱 (1×26 厘米), 用 50 毫升 50% 吡啶水溶液洗, 流出液同, 洗液合并, 减压浓缩, 加吡啶共浓缩后, 得无水物。加入 300 毫克 DCC 和 2.5 毫升无水吡啶, 于室温暗处振摇反应 5 天。滤去 DCU, 用约 10 毫升吡啶洗, 滤液和洗液合并, 加入 10 毫升水和 40 毫升 50% 吡啶水溶液, 用正戊烷抽提三次。吡啶水层离心除去少量不溶物后, 减压浓缩至干, 加吡啶共浓缩去水, 滴入大量乙醚中沉淀, 离心干燥后重 250 毫克, 约用 15 毫升 NH_3/CH_3OH 溶液 $37^\circ C$ 封管氨解 16 小时, 减压抽去 NH_3 和甲醇, 用 30 毫升水溶解, 上 A-25 柱, 收集 CUCG 峰(峰 VII) 见图 1, 共 408 A_{260} 单位 (15%)。再经 pH2.7 电泳, 除去少量脱氨副产物后得层析(溶剂 II) 和电泳 (pH7.5) 均一的产物, $Rf0.63$ (G_p 为 1), $Rm0.58$ (U_p 为 1), 光谱比值为: $A_{250}/A_{260} = 0.78$, $A_{270}/A_{260} = 1.08$, $A_{280}/A_{260} = 1.02$, $A_{290}/A_{260} = 0.68$, 并能为牛胰核糖核酸酶完全水解得到 C_p : $U_p:G = 1.94:1:1.09$ 。

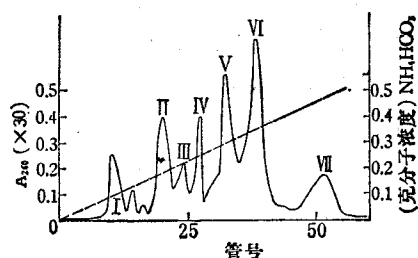


图 1 CUCG 的柱层析分离

DEAE-葡聚糖凝胶 A-25 柱 (1.5×20.5 厘米, HCO_3^- 型), $0.5M NH_4HCO_3$ (各 500 毫升) 梯度洗脱, 每管收集 18 毫升。峰 VI 为 C_pUp , 峰 VII 为 CUCG。

(五) $HO^{A^{Bz}}(OBz)p(OCE)$ 的制备:

5.05 克 $MMT^{A^{Bz}}(OBz)p$ 吡啶盐溶于 30 毫升无水吡啶中, 加入 10.5 克 DCC 和 20 毫升酞乙醇, 于室温暗处反应四天。加入 10 毫升水, 过滤除去二环己基脲。滤液加水使成 50% 吡啶溶液, 放置过夜, 用戊烷抽提三次。再用氯仿抽提 (4×100 毫升), 氯仿液减压浓缩至干。

用 100 毫升 80% 醋酸 $37^\circ C$ 保温 3.5 小时, 以脱去 MMT, 再减压浓缩至干, 残留物溶于 70% 乙醇 (约 500 毫升), 滤去少量不溶物, 稀释到 1000 毫升, 上 A-25 柱, 用 $0.1-0.3M$ 醋酸三乙胺梯度洗脱, 先洗出一小峰后即出现产物主峰。将主峰合并浓缩, 加吡啶共浓缩去水后滴入大量乙醚中沉淀, 得 $HO^{A^{Bz}}(OBz)p(OCE)$ 2.7 克 (73%)。

(六) $HO^{C^{Bz}}(OBz)pA^{Bz}(OBz)p(OCE)$ 的制备:

将 $MMT^{C^{Bz}}(OBz)p$ 吡啶盐 660 毫克 (0.69 毫克分子) $HO^{A^{Bz}}(OBz)p(OCE)$ 690 毫克 (1.04 毫克分子), DCC 1.42 克 (6.9 毫克分子) 在无水吡啶溶液中室温暗处反应 4 天。然后按前面的缩合反应类似处理, 并用 1% TFA 的 70% 乙醇溶液脱去 MMT 后得 $HO^{C^{Bz}}(OBz)pA^{Bz}(OBz)p(OCE)$ 粗品 1 克。再经 A-25 柱层析分离 (醋酸型), 用 $0.3M$ 醋酸三乙胺的 70% 乙醇溶液洗脱, 收集峰 2, 得 185 毫克产物 (纯度 52—74%)。

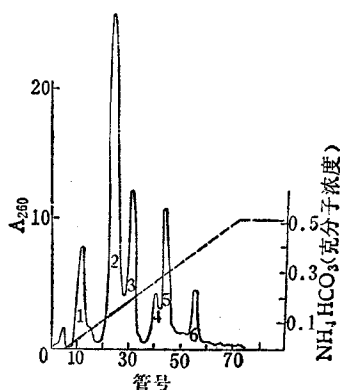


图 2 脱保护后的 CCAp 粗产物层析分离

DEAE-葡聚糖凝胶 A-25 柱 1.2×22 厘米 HCO_3^- 型, $0-0.5M NH_4HCO_3$ (各 500 毫升) 梯度洗脱, 每管收集, 14 毫升/21 分钟, 峰 1 为 $C > P + A > P$ (少量), 峰 2 为 C_p , 峰 3 为 A_p , 峰 4 为 $CpCp$, 峰 5 为 $CpAp$, 峰 6 为 $CpCpAp$ 。

(七) CCAp 的合成:

将 $HO^{C^{Bz}}(OBz)pA^{Bz}(OBz)p(OCE)$ 吡啶盐 180 毫克, $BzC^{Bz}(OBz)p$ 吡啶盐 250 毫克, DCC 660 毫克在无水吡啶中反应五天, 然后按前面的缩合反应类似处理, 得保护粗产物沉淀。再

经 $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 脱保护基后, 并经 0.1N HCl 37°C 1 小时开环, 最后用 A-25 柱层析分离(图 3), 峰 6 为 CCAp, 共 201 A_{260} 单位 (9.4%, 纯度 90% 以上), 微量杂质可用 pH3.5 电泳纯化除去。所得的 CCAp 层析 (溶剂 II) 和电泳 (pH3.5) 均一, $R_f 0.56$ ($A_p = 1$), $R_{m1.1}$ ($A_p = 1$), 并能为牛胰核糖核酸酶完全酶解得 Cp: $A_p = 2:0.88$ 。光谱比值 (pH ~ 2): $A_{250}/A_{260} = 0.69$, $A_{270}/A_{260} = 1.12$, $A_{280}/A_{260} = 1.02$, $A_{290}/A_{260} = 0.70$, $\lambda_{\text{最大}} 271 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{最小}} 238 \text{ nm}$ 。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院上海生物化学研究所二室核酸合成组:《生物化学与生物物理学报》, 1978 年, 10 期, 127 页。
- [2] 人工合成核酸协作组: 中国科学, 1978, 679, *Scientia Sinica* 21, 687, 1978.
- [3] 中国科学院上海生物化学研究所二室核酸合成组:《生物化学与生物物理学报》, 1980 年, 12 期。
- [4] 中国科学院上海生物化学研究所二室核酸合成组:《生物化学与生物物理学报》, 1978 年, 10 期, 143 页。
- [5] Lohrmann, R. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 819, 1966.

[本文于 1979 年 12 月 25 日收到]

聚 肌 胞 的 制 备*

(一) 适于工厂生产的大肠杆菌多核苷酸磷酸化酶的提取纯化方法

李楠茜 李幼华 黎高沃

(中国科学院生物物理研究所二室)

雷珍妮 宋穗梅 刘同昌**

(广东江门甘蔗化工厂生化制药车间)

1967 年 A. K. Field 等^[1]首次合成双链多聚肌苷酸:多聚胞苷酸 (polyI: C, 简称聚肌胞)。这种人工合成的双链核糖核酸, 在培养细胞或动物体内可以诱生干扰素, 是一种高效、广谱的干扰素诱导剂。它比干扰素易于得到, 价格低廉, 可以治疗许多种病毒病。

为了使一般生化厂、药厂能批量生产聚肌胞, 我们将 1973 年生物物理所二室核酸组建立的可用于合成聚肌胞的多核苷酸磷酸化酶 (PNPase) 的提取纯化方法^[2], 做了一些改进。现介绍如下:

材 料

一、大肠杆菌 大肠杆菌 1.183 (中国科学院微生物研究所菌种保藏组编号) 在牛肉膏、蛋白胨、琼脂斜面, 37°C, 14—16 小时生长。经活化数次的菌体接种到三角烧瓶摇床培养。

培养液为: 0.5% 蛋白胨、0.3—0.5% 牛肉膏、0.5% 酵母膏、0.5% NaCl, 用 6N NaOH 调 pH 至 7.2—7.4, 15 磅 30 分钟灭菌。14—16 小时后, 接种到种子罐 (50 立升)。培养液同上。通风量 14 升/分钟, 培养 10 小时后转入 700 立升大罐, 培养条件同种子罐。全部培养均在 37°C 进行。

培养的时间长短很重要, 因为这关系菌体生长情况, 而菌体的生长健壮与否直接影响 PNPase 的活力。实验结果表明, 以生长对数前期的菌体最好。工厂所用的检查办法是: 在培养过程中, 每隔二小时取样, 涂片, 染色做镜检。当培养到 16 小时左右, 终止培养。

发酵液经 3000 转/分钟离心, 400 公升发

* 本工作获得中国科学院 (1978—1979) 科技成果二等奖。——编者

** 参加这项工作的还有周润、蔡金盛、伍雪萍同志。