谈我国酵母丙氨酸转移核糖核酸人工全合成

王 贵 海

（中国科学院生物物理研究所）

酵母丙氨酸转移核糖核酸（简称酵母 $tRNA^{ala}$）人工全合成，经过十三年的艰苦努力，终于在去年11月底获得成功。这一重要的基础理论研究成果是中国科学院上海生物化学研究所、上海细胞生物学研究所、上海有机化学研究所、中国科学院生物物理研究所、北京大学生物系、上海化学试剂二厂近一百多名的科研工作人员，在党的领导下，通力协作，团结互助、坚持不懈的努力所取得的。在今年1月13日至18日在北京召开的“中国科学院人工合成酵母丙氨酸转移核糖核酸学术报告会”上报告的22篇论文指出，我国人工合成的酵母 $tRNA^{ala}$ 分子具有与天然分子相同的化学结构和完整的生物活性。它除了含有天然分子所含有的四种常见核苷酸外，还含有全部九个七种稀有核苷酸，具有接受丙氨酸的活力和将接受的丙氨酸转移到蛋白质中去的活力，这在世界人工合成 RNA 的研究领域中还是首创。

酵母 $tRNA^{ala}$ 分子的结构是 1965 年美国科学家 Holley 提出的。这是世界上发表的第一个核酸分子的一级结构，并按碱基最大配对原理，描绘出其二级构形，为此他获得了 1968 年诺贝尔奖金。后来，这个结构根据 Merril Penswick 和我们国内的工作加以修正，确定下来。它是由 76 个核苷酸组成的，分子量为 26,600 道尔顿。除含四种正常的核苷酸外，还含有九个七种稀有核苷酸（分别为 T_p，ψ_p，m^1G_p，$m_2^2G_p$，m^1I_p，D_p 和 I_p）。目前核酸的结构研究，包括 RNA，特别是 DNA，获得突飞猛进的发展，单就 tRNA 的结构截止去年年中就发表了近二百个，发现它们具有极其相似的二级结构。但 1968 年我国在成功地合成牛胰岛素蛋白质以后，开始合成核酸研究的时候，当时唯一结构清楚的酵母 $tRNA^{ala}$ 成了当然的合成工作对象。应该说 $tRNA^{ala}$ 分子是较小的一种核酸分子，但是无论就当时国际上化学合成的水平和我国核酸研究的基础来看，选择这个课题实在是一个雄心勃勃的尝试。

工作坚持十三年　七年用于打基础

在六十年代，核酸的研究自 1953 年 Watson-crick DNA 双螺旋结构发表以后进入了一个崭新的阶段，同时它也成为分子生物学的中心课题。当时人们主要致力于核酸结构的研究，而在化学合成方面仍处于方法的探索阶段。有机化学核糖核苷酸片段和脱氧核糖核苷酸片段的合成主要采用二酯法，合成的多是低聚寡核苷酸片段。特别是由于 RNA 比 DNA 在核糖 2 位上多一个活泼羟基，在化学合成中需要保护，工作难度就更大。美国的诺贝尔奖金获得者 Khorana 教授一组实力雄厚的小组曾试图合成 tRNA 分子中的有序核苷酸片段，但因困难，在合成了六核苷酸后下马，转向合成酪氨酸 tRNA 的基因。当时我国核酸研究基础是十分薄弱的，主要有上海生物化学研究所王德宝教授和医学科学院梁植权教授等少数试验室进行 tRNA 结构及其功能和其他方面的研究。可以说着手这样一个难度大的课题一切必须从头做起。回顾这一工作的全过程，我们用了将近七年的时间，才打下了坚实的基础。其中包括制备四种常见核糖核苷 3′ 磷酸、核糖核苷 5′ 磷酸原料和以后陆续制备的七种稀有核苷酸，以及化学合成所需的全保护核苷酸单体，其中有的已制成结晶体，以保证大量合成原料的自给；2-5

核苷酸长度片段的有机合成，加上有机化学和酶促合成相结合方法共合成近40多核苷酸片段，使用的片段约20个，最长片段是八核苷酸；先后制备合成中所需的合成酶和分析用核糖核酸酶类共约10种以上，其中有的酶如核糖核酸连接酶（RNA ligase）、多核苷酸激酶（PNKase）、核糖核酸酶 N_1 的制备，都具有相当高的水平。有的同志把合成工作比做一座"金字塔"，应该说这座"金字塔"的底层的工作量是非常繁重的。我们依靠所厂结合，发挥各所长处。取长补短共同协作的精神较好地解决了这个问题。

在合成 $tRNA^{ala}$ 研究中，许多问题是没有国外的现成经验可供借鉴，而需要自己去反复实践和大胆的探索。首先，当合成了低聚寡核苷酸片段以后，如何将它们连结成大的寡核苷酸片段，我们是经过了许多艰苦的努力才逐步解决的。上海生化所开始使用生物物理所提供核糖核酸 N_1 酶将两个四核苷酸制成八核苷酸，有机所也试图采用有机化学法进行。但是前者只能在特殊情况下实施，后者产率很低。我们在工作初期设想应用 DNA 连接酶在有 DNA 片段互补模板存在下连接核糖核苷酸片段。为此制备了高纯度的 DNA 连接酶和有序的 DNA 十三核苷酸片段，尽管这种设想在理论上是有价值的，但在实践上有许多困难。直到 1972 年 Silber 等人发现了 RNA 连接酶以后，我们经过大量的试验和反复摸索，才真正解决了长的寡核苷酸片段的合成问题。现在可以说我们使用 RNA 连接酶比较得心应手，基本上掌握了核苷酸片段的接点，核苷酸组成，含稀有碱基片段的特殊性，供受比，反应温度等一系列反应的规律性，并根据实际要求设计理想的接点和获得很高的连接率。

另外，根据牛胰岛素合成的成功经验，我们设计了分两阶段进行的合成方案，即先合成两个半分子，然后再合成全分子。为此先完成了纯天然酵母 $tRNA^{ala}$ 的拆合研究，证明天然分子经拆合处理后，仍能保持生物活力。为 $tRNA^{ala}$ 分子全合成提供了有效的途径。我们还对大肠杆菌、麦胚和兔网织红细胞裂解液等蛋白质合成体系进行了长时间的研究。建立了一种高灵敏（5—7 微微克分子水平）的丙氨酸 tRNA 测活方法。对全合成 tRNA 分子的接受活力和转移活力进行测定，结果证明：合成产物不仅在结构上，而且在功能上都具有天然分子特性。

回顾十三年的漫长时间，其中有十年受动乱的干扰。但是大家始终坚持不懈，在探索过程中，经历了无数曲折、挫折和失败，终于取得全合成的最后胜利。

我国合成工作的水平与特点

核酸的合成是世界上一个十分活跃的研究课题，美、日、苏、加、英、荷、西德等都投入一定的人力和物力，并且取得了很大的成果。其中不少试验室是着重研究脱氧核苷酸基因的合成，象美国 Khorana 教授小组 1978 年发表了 *E. coli* 酪氨酸 tRNA 前体基因共 207 个核苷酸碱基对 DNA 的全合成。在合成方法上逐步发展了较比二酯法缩合效率高、副产物低的三酯合成法。目前在 RNA 合成方面，已达到全分子水平的工作只有日本的大坂大学医物系池原森男（Ikehara）和大塚荣子（Ohtsuka）试验室和我国。在这里我们就两者的水平做简单的比较。日本合成的对象是大肠杆菌甲酰甲硫氨酸 tRNA，含 77 个核苷酸，具有六个六种稀有核苷酸。这个分子是原核生物细胞中蛋白质合成中起始的 tRNA。1980 年 5 月在西德汉堡（埃格斯多夫）举行的国际核酸化学合成讨论会上，他们报告了最后全合成的结果。但应指出的是：其一，他们合成的全分子不含有稀有核苷酸，而全部由相应的正常核苷酸代替了。所以严格地说合成的产物只是天然分子的类似物。其二报道合成的分子经测定仅具有接受甲硫氨酸的活力（10% 的 ^{32}P 标记的合成产物有接受能力）。因此说它不具备有完整的生物活性。就这两点而言，我国合成的酵母 $tRNA^{ala}$ 不仅结构上与天然分子相同，而且具有较高的接受活性和转移活性（分别为天然酵母丙氨酸分子的 60% 和 90% 以上）。同时稀有核苷酸的制备是

有一定难度的，含有稀有核苷酸的片段的合成及片段之间的连接也有其特殊规律。另外，接受活力不是一个完整分子的专一指标，两个配对但未经连接起来的半分子可具有充分的接受活力，即便3/4分子或某些不完整的分子也具有一定的接受氨基酸能力。因此衡量一个tRNA分子的合成成功与否，测定其将氨基酸掺入到蛋白质中去的转移活性是十分必要的指标。

此外，在合成方法学上我国的工作具有明显的特点。第一，采取了有机化学和酶促连接相结合的方法。由于化学合成二酯法的限制，合成较长的寡核苷酸片段相当困难，最长的化学合成片段是六核苷酸，日本的工作利用三酯法最长合成到17核苷酸。但是我们应用多核苷酸磷酸化酶，核糖核酸酶 N_1 及连接酶等酶促反应合成，并大量制备了低聚寡核苷酸片段，为长的寡核苷酸（10—19核苷酸）合成提供了原料。利用上述方法合成的片段占总片段数目的1/3以上。第二，用RNA连接酶连接寡核苷酸片段的技术具有较高的水平。例如，10—19核苷酸的六个大核苷酸片段的各步连接反应产率都高于50%，大部分在80—90%左右。而日本的产率大部分低于50%，一般在30—50%左右。半分子合成中，大核苷酸片段间的连接产率，我国的为70--90%，而日本的为12—31%。两个半分子连接成完整分子的产率，日本仅为17%，我们在50%以上。同时在合成中，供体片段被多核苷酸激酶作用5′-磷酸化的反应，大多数也都达到90%以上。以上高产率产物的取得不仅反映了我们研制的酶制剂的质量优良，而且也说明对这些酶促反应的规律掌握较全面、较深入。例如我们在研究降低受体片段与供体片段数量比例，采用0℃或5°—7℃RNA连接酶反应提高产率，利用二核苷一磷酸片段作受体（国际上报道最短的受体是二核苷二磷酸或三核苷二磷酸），利用高温处理，降低富含鸟便嘌呤核苷酸片段自身聚结以提高产率和某些含有稀有核苷酸（如含 D_p 及 m^1I，ψ 等）片段的连接的特殊性等等方面都有不少创新和独到之处。在大片段和半分子合成中，我们经常采用多途径探索，以期获得最佳合成方案。从而为核糖核酸的合成积累了极其丰富的经验。

结　　语

我国首次成功地合成了RNA和人工合成蛋白质——牛胰岛素一样具有十分重要的理论意义，它证明了恩格斯关于生命物质"必然是通过化学途径实现的"这一预见的正确性。同时，在核酸的结构及其功能的研究中，特别是对揭示核酸与蛋白质相互作用这一当前十分引人注目的研究方面，核酸合成的工作也将起重要的推动作用。某些特定序列核酸（DNA或RNA）的合成及对它们的修饰，是核酸研究领域不可缺少的手段。人们一旦掌握了这个手段就可以主动地"复制"或改造核酸，研究其作用规律或者通过生物过程（如基因工程）为人类造福。很显然，在我国，实现酵母 $tRNA^{ala}$ 人工合成的过程和最后成功，不仅为今后核酸研究提供了许多经验，也培养了一支科研队伍，他们现在已经或者将要在基因工程、核酸的结构（包括一级核苷酸序列和高级结构）、结构与功能的关系和核酸在工、农、医等方面的应用等方面发挥作用。顺便在这里值得一提的是，在人工合成酵母 $tRNA^{ala}$ 的同时，我国核苷酸类制剂和药物的研制，也取得了进展。例如，长期依赖进口的腺苷三磷酸（ATP），去年国内生产已达二吨，投产并用于临床的还有医疗脑震荡良药胞二磷胆碱，抗癌药物5-氟脱氧尿嘧啶核苷，治疗病毒病的干扰素诱导剂一聚肌胞（polyI:C）等等。可以相信，随着核酸研究的进一步开展，这类药物的研制也将不断取得新的成果。

[本文于1982年2月4日收到]