

表 2 π^- 介子辐射作用理论计算出的 RBE 与 OER^[10]

π^- 介子微剂量测量参数			二元作用理论		δ 射线理论	
深度克/厘米 ²	$\int_{.50}^{\infty} d(Y)dy$	$\bar{Y}_D$	RBE	OER	RBE $s = 0.89$	OER $s = 0.89$
2	0.012	6.7	0.90	1.8		
11	0.010	7.5	0.97	1.8	1.3	2.1
17	0.013	7.9	0.99	1.7		
18.75	0.055	33.0	3.4	1.5		
20.0	0.068	38.0	3.7	1.5	3.7	1.3
21.3	0.098	56.0	5.4	1.5		
21.8	0.10	57.0	5.5	1.7	5.9	1.3
24	0.025	17.0	1.9	1.9		

π^- 介子束日益方便。利用 π^- 介子开展化学、生物、医学研究,将为丰富这些学科的理论作出贡献,而关于 π^- 介子的辐射生物物理特性研究将可能为放射治癌提供一种新手段。

参 考 文 献

- [1] Davies, H. et al.: *Nucl. Phys.*, **78**, 673, 1966.
- [2] Fowler, P. H. et al.: *Proc. Phys. Soc.*, (London) **92**, 377, 1967.
- [3] Raju, M. R. et al.: *Current Topics in Radiation, Res.*, **8**, 159, 1974.
- [4] Raju, H. R. et al.: *Phys. Med. Biol.*, **15**, 4, 599, 1971.
- [5] Dideilo, J. F., et al.: *Radiation Research* **62**, 562, 1975.
- [6] Tisljar—Lentulis, G. M. et al.: *Radiation Research*, **46**, 16, 1971.
- [7] Sullivan, A. H. et al.: *Phys. Med. Biol.*, **13**, 435,

- 1968.
- [8] Blattmann, V. H.: *Atomkernenergie*, **27**, 3, 173, 1976.
- [9] Gabriel, K. Y. et al.: *Phys. Med. Biol.*, **23**, 4, 768, 1978.
- [10] Amols, H. I. et al.: *Fifth Symposium on Microdosimetry*, 911, 1975.
- [11] Amols, H. I. et al.: *Radiology*, **116**, 183, 1975.
- [12] Dideilo, J. F. et al.: *Sixth Symposium on Microdosimetry*, 469, 1978.
- [13] Henkelman, R. M. et al.: *ibid.*, 497, 1978.
- [14] Perris, A. G. et al.: *ibid.*, 589, 1978.
- [15] Richman, S. P. et al.: *Radiation Res. Suppl.*, **7**, 182, 1967.
- [16] Raju, M. R. et al.: *Brit. J. Radiol.*, **45**, 178, 1972.
- [17] Kollerer, A. M. et al.: *Rad. Res. Quart.*, **8**, 85, 1972.
- [18] Katz, R. et al.: *Rad. Res.*, **47**, 402, 1971.

[本文于 1979 年 9 月 15 日收到]

RNA 序列分析新方法

赵 昂 魏西平

(中国科学院生物物理研究所)

自从 Maxam, Gilbert 和 Sanger 分别建立了化学法及“加”、“减”法等 DNA 序列分析技术之后,使核酸结构与功能方面的研究取得了重大的进展,同时,也推动了 RNA 序列分析新技术的发展。开始,是结合凝胶电泳技术,利用一系列碱基专一性核糖核酸酶分别部分降解 RNA,而建立了所谓酶法直读技术^[1]。后来,又创造了 RNA 的化学修饰^[2,3]以及化学修饰与酶相结合的^[4]直读技术。这些新技术的发展,使人们得以直接迅速地确定各种 RNA 分子的一级结构,为 RNA

结构与功能的研究打开了新的局面。

在此,我们仅就几个 RNA 序列分析的最新方法简介如下:

一、酶法凝胶直读技术^[1]

1. 基本原理 用几种碱基专一性核糖核酸酶分别对一端用同位素标记的 RNA 作部分水解,获得一端标记的,另一端以特异碱基为末端的、长短不齐的几组酶解产物。然后,利用板状聚丙烯酰胺凝胶电泳,将

上述几组酶解产物,在凝胶板上分别按长度分离(凝胶电泳的灵敏度可以分辨相差一个核苷酸的寡核苷酸片段)。最后从放射自显影图谱上即可直接读出 RNA 的序列。

常用的碱基专一性核糖核酸酶有 T_1 核糖核酸酶(特异地水解 G), U_2 核糖核酸酶(特异地水解 A > G), 牛胰核糖核酸酶(特异地水解 C, U)。为了区分 C 和 U, 有人曾应用 Phy_1 核糖核酸酶(水解 U > C), *N. crassa* 核糖核酸酶, *S. aureus* 核糖核酸酶和 *B. cereus* 胞外核糖核酸酶; 还有人结合使用双向凝胶电泳区分 C 和 U。

至于各个核苷酸的顺序位置是对照非特异性部分降解获得的“阶梯”而确定的。这种“阶梯”可以用非特异性酶解、碱解、酸解或热甲酰胺处理样品而获得,从效果来说以后者为好。

2. 本方法的优缺点 反应温和,易控制,操作简单。但是,如果 RNA 分子中存在强的二级碱基配对时,酶对这种区域就不能作用,即使在变性(7M 脲)或 50°C 加热的条件下也如此。因此,在放射自显影图谱中会造成一些谱带的缺失。另外,对于 U 和 C 的区分,在实际操作和阅读中仍有一定的困难,因此,需要配合其他序列分析方法,彼此验证所确定的序列。

二、甲酰胺非特异性有限降解法^[2]

1. 基本原理 一般核酸序列分析的方法,首先对片段进行末端标记,随后降解。然而这个方法却是在 5' 端标记之前,先用甲酰胺对 RNA 进行有限水解,得到一组 5' 为 -OH, 有共同 3' 端(带-P)的,片段长度连续的水解产物,随后利用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 和 T_4 多核苷酸磷酸激酶对这组水解产物的 5' 端进行 ^{32}P 标记。通过变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳及放射自显影之后,就可以得到分布相当均匀的谱带。把凝胶上各带分别切下,将样品从中洗脱和碱全水解之后,用纸电泳的方法即可检出 5' 末端有 ^{32}P 标记的核苷二磷酸的成分。根据检出的 5' 端的碱基种类与凝胶电泳的放射自显影图谱中各带的对应关系,即可读出 RNA 的序列。

方法的关键是控制甲酰胺水解 RNA 的程度,使甲酰胺对每个 RNA 分子切二次的机率比切一次的要小得可以忽略不计。因此需要摸索甲酰胺水解的最佳条件。

2. 本方法的优缺点 优点是它可以提供一个完全的、而且相当匀称的产物图谱,可以避免酶水解时因二级碱基配对而抗酶水解引起的图谱中某些带缺失的情况。但是在凝胶电泳分离时,随着产物片段的增大,两带之间的间距就越来越小,造成以后切带的困难和分析上的混乱。因此该方法较适用于小分子 RNA 的

序列分析。另外,水解产物需用较高比强的 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ 进行标记,才便于以后的分析。

三、化学修饰法^[3]

1. 基本原理 Debra 1979 年发表了 RNA 序列分析的化学修饰法。其特点是将四种不同的碱基特异性化学反应,用于分析 3' 端 ^{32}P 标记的 RNA 序列。反应分二步进行。第一步,用硫酸二甲酯对鸟苷,焦磷酸二乙酯对腺苷(对鸟苷也有弱反应)、肼对尿苷,无水肼加上 3M NaCl 对胞苷等作部分修饰。第二步,经苯胺催化反应,使 RNA 链上已修饰碱基处断开,由此获得四组特异的部分裂解产物,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳将其分离,从它们的放射自显影图谱即可读出 RNA 的序列。

2. 本方法的优缺点 化学修饰法是一种样品用量少(P mole)、快速、准确的序列分析方法,其优点在于(i)它的裂解不受 RNA 二级结构的影响。(ii)省去了一系列纯度要求很高的酶制剂。(iii)也适用于体外合成的 RNA。但所使用的化学试剂均系毒品,操作应注意,反应后的废品需要妥善处理。

四、化学修饰和酶法结合的分析技术^[4]

Ma 20 等 1979 年提出的这个方法基本与上述酶法凝胶直读技术相同;不同的只是在用特异性核糖核酸酶有限水解 RNA 分子之前,先用甲氧胺-亚硫酸氢盐混合物处理核酸,对胞苷进行选择性的修饰,使胞苷上带有 SO_2 基团,由此破坏了 G-C 碱基对中的氢键,使 RNA 二级结构解开,有利于随后核糖核酸酶的水解。但修饰的胞苷与 3' 端核苷酸之间的磷酸二酯键对酶的水解却具有抗性,因此,这种修饰了的核糖核酸在核糖核酸酶的作用下,只能在 U, A, G 之后切断 RNA 链,缺失以修饰胞苷为末端的部分水解产物。这样通过与未修饰 RNA 酶水解产物的比较,不仅能获得比单纯酶法更多的信息,而且最重要的是可以区分 U 和 C。

参 考 文 献

- [1] Krupp, G. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **6**, 11, 3481—3490, 1979.
- [2] Stanley, J. et al.: *Nature*, **274**, 5666, 87—89, 1978.
- [3] Peattie, D. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**(4), 1960—1964, 1979.
- [4] Mazo, A. M. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **7**, 8, 2469—2482, 1979.

[本文于 1979 年 10 月 15 日收到]