

一种改进的 RNA 序列双向测定直读技术

赵 昂 吕俊宜* 程振起 韩恒湘

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

Stanley 和 Vassilenko^[1] 1978 年提出一种不同于酶法和化学法的 RNA 序列分析方法, 它首先用甲酰胺对 RNA 分子作有限的降解, 得到一组 5' 端带 OH 基的寡核苷酸片段, 接着用 ³²P 标记它们的 5' 末端, 并通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离形成放射性阶梯, 然后依次切下各带, 经碱全水解之后于 3mm 纸上电泳, 分析各片段 5' 末端的 3', 5'-二磷酸核苷, 从而直接读出分子的碱基顺序。不久 Gupta 和 Randerath^[2] 以及 Tanaka, Dyer 和 Brownlee^[3] 相继提出了改进方法, 他们把放射性阶梯转移到带有离子交换基团的纤维素薄层上, 原位酶解之后, 前者采用层析, 后者采用电泳来识别碱基顺序。这样, 步骤精简了, 进程更快了。

我们根据实验室的现有条件, 综合应用了后两者所述的条件并作某些改进, 建立了这种方法, 并用已知序列的番茄叶 5S RNA 分子^[4]来检验方法的可靠性。

一、材料和方法

(一) 材料

[γ -³²P] ATP, 比强 3000 居里/毫克分子 (Ci/mmole) (英国, Amersham); T₄ 多核苷酸激酶 (PKase) 6.5 单位/微升 (中国科学院生物物理所生化厂); 牛胰核糖核酸酶 (RNase A), 核糖核酸酶 T₁ 和 T₂ (RNase T₁ 和 RNase T₂) (西德, Boehringer mannheim GmbH); 3'-AMP, 3'-GMP, 3'-CMP, 3'-UMP (上海东风试剂厂); 丙烯酰胺 (天津市化学试剂一厂, 化学纯); 甲叉双丙烯酰胺 (匈牙利, Reanal); 三羟基氨基甲烷 (Tris) (四川自贡化工研究院试剂厂); 二硫苏糖醇

(DTT) (西德, Serva); 聚乙烯亚胺 (PEI) 50% 水溶液 (英国, BDH); 纤维素 MN300 (西德, Machereg Negel + Co₅₁₆ Düren); X 光乳胶片 (上海感光材料厂)。其他一些常用试剂均为北京化工厂分析纯产品。

(二) 方法

1. 番茄叶 5S RNA 按文献[5]提取和纯化对存放过一段时间的样品按 Tanaka 等^[3]的方法再纯化一次, 浸泡的步骤改为 37℃ 浸泡 1 小时, 之后换新的浸泡液再浸泡 1 小时。

2. 5'-³²P 标记的四种主要的 3', 5'-二磷酸核苷的制备 3'-AMP (或 3'-GMP, 3'-CMP, 3'-UMP) 25 μ l (14.4mmole/ml), 加入已减压抽干的 [γ -³²P] ATP (10 μ Ci) 试管内, 再加激酶标记缓冲液 (100mM Tris-HCl, pH 8.0, 20mM MgCl₂, 20mM DTT) 25 μ l, PKase 7.5 μ l。37℃ 水浴保温 30 分钟。反应结束后在沸水浴中煮 1.5 分钟。

3. 5S RNA 的有限水解和水解片段的 5' 末端标记 5 微克纯化的 5S RNA, 用 10 微升重蒸水溶解, 然后用微量注射器吸出, 再注入用硅烷处理过的毛细管内, 用火焰密封毛细管两端。为摸索合适的水解时间, 可以在 80℃ 水浴分别保温 3, 4, 5, 6 分钟。水解后的样品分别吹入硅烷处理过的小试管, 并减压真空干燥。5' 末端标记时, 用 15—20 微升 40mM Tris HCl, pH 8.7; 13mM MgCl₂, 10mM DTT 标记缓冲液溶解, 转移到已抽干的 [γ -³²P] ATP (20 μ Ci) 试管内, 加 1—1.5 微升 PKase, 37℃ 保温 5—10

* 现在中国农业科学院畜牧研究所

分钟。最后加入 1/4 体积的电泳指示染料 (0.05% 溴酚蓝, 0.05% 二甲苯蓝溶于 180mM Tris-180mM 硼酸-2mM EDTA 及 10M 脲的缓冲液中)。

4. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 将标记的样品加到一块 12% 的聚丙烯酰胺-7M 脲凝胶板上, 板的大小为 59×18×0.06cm (制胶与电泳缓冲液均为 90mM Tris, 90mM 硼酸, 1mMEDTA, 使用前预电泳 8 小时以上)。每管样品可以点两个样品孔 (1×1×0.06cm)。可以在电泳 0, 3, 6 小时先后加样。电泳电压 1500—2000 伏, 电流 20 毫安左右, 时间 8 小时。电泳结束除去一块玻板, 在胶上点上放射性标志, 用塑料薄膜复于胶面, 压上 X 光胶片, 曝光 1—3 小时。

5. 放射性阶梯胶条的制备及向 PEI- 纤维素薄层的转移 根据自显影图谱确定凝胶上放射性阶梯位置, 然后切取 0.5—0.8cm 宽的纵向胶条, 揭去塑料薄膜, 取一条宽 1.5—2.0cm 相应长度的废 X-光片, 用丙酮擦拭干燥后贴于切开的胶条上, 随后轻轻提起一端, 胶条即随之而起。将它们一起贴到已经用 1.0M NH₄Ac 弄湿的 PEI- 纤维素薄层的基线上 (离底边 2.5 厘米), 用塑料薄膜包好, 上压一块玻板, 再压上约 1 公斤的重物。室温放置 15—24 小时。放射性阶梯胶条能上所含标记物质即可转移到 PEI 纤维素薄层上。

PEI- 纤维素薄层的制备, 参照 Randerath 等^[6]的方法, 将 PEI-纤维素悬液铺于经热碱溶液除去药膜并洗净的 X 光片基上。先将 X 光片基敷在水平的玻板上, 用酒精擦净表面, 然后将 1% PEI-纤维素悬液倒在上面, 用两端 (宽度稍小于所需的薄层宽度) 扎有直径为 0.06cm 粗的漆包线的有机玻璃条, 将悬液从一头推赶到另一头, 如果一次不均匀可以再重复推一次。然后任其在室温下干燥。使用前在 10% NaCl 溶液中浸泡 2 分钟 (以一头缓缓地浸入), 室温干燥后, 再在蒸馏水中浸泡 5 分钟, 换水再浸 10 分钟 (两次水浸之间不必干燥)。室温干燥待用。暂不用的薄层冰箱保存。300 毫升的 PEI-纤维素悬液可铺 38×25cm 的薄层 4 张。

5. 原位酶解和层析 转移后, 移去胶条, 在甲醇中把 PEI- 纤维素薄层浸泡 5—10 分钟, 晾干或凉风吹干, 沿基线点上混合酶 (RNase A 0.1 μg/μl, RNase T₁ 0.2 单位/μl, RNase T₂ 0.2 单位/μl 于 0.1M NH₄Ac, pH 4.5 缓冲液中), 每 40 cm 长度点 100—120μl 的酶液已足够。然后用塑料薄膜包好, 以免蒸发太快, 在 37℃ 保温 2 小时。

层析前薄层再用甲醇浸泡 5—10 分钟, 凉风吹干, 用蒸馏水上行推至基线, 然后置于密闭容器内的 0.55M (NH₄)₂ SO₄ 溶剂中上行层析 4—6 小时。热风吹干, 点放射性标志, 压上 X 光胶片, 视放射性强弱可曝光两天到数天。

二、结果和讨论

方法的整个步骤见图 1, 它除了聚丙烯酰胺凝胶电泳之外, 还需要一次层析分离, 从层析图谱上可以直接读出 RNA 的序列, 所以我们称此为 RNA 序列双向直读技术。从原理上讲, 这种方法不仅可以不要碱基专一的酶或化学试剂, 而且可以比较精确地测定出分子内的稀有碱基或分子内某些位置上核苷酸的不均一性^[2], 这就是此方法的优点。

电泳 5 小时的部分放射性阶梯转移到一张 38×25cm 的 1% PEI- 纤维素薄层上, 经酶解、层析之后, 可以读出 5S RNA 的从 68 位到 109 位的 40 多个碱基顺序:

```

              70              80              90
          .....AGAGUAGUACUAGGAUGGGUGA C
                        100              110
          CCCCUGGGA AGUCCUCGUGU U.....
  
```

(图 2 显示了它的其中一部分)。如果放射性阶梯带间的距离合适, 则可以一次测出分子的大部分序列。这个方法要求样品的纯度较高, 要求无降解的片段, 所以水解之前纯化一次是很有必要的, 否则会干扰后面的序列分析。在水解的时间方面也应严格控制, 时间过长会在某些位置出现不应有的层析点, 如图 2 的层析图谱上 106 位 C 残基位置还有很浅的 U 点, 说明某些分子有两个以上位点发生水解。因此水解

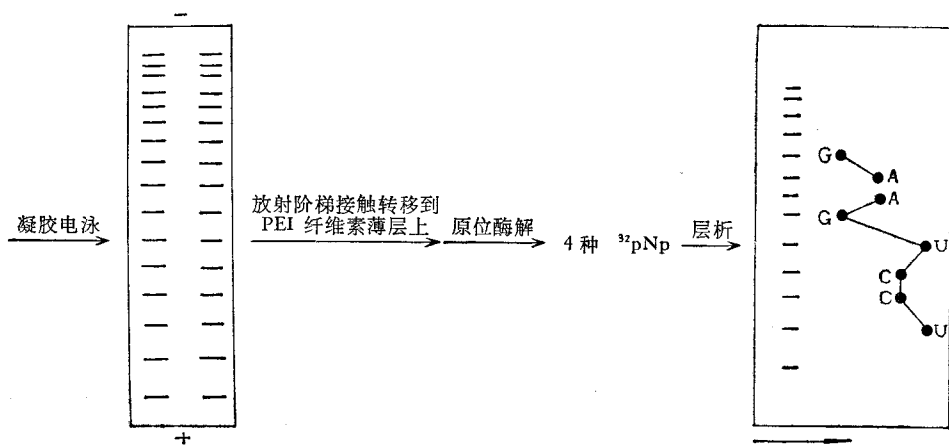
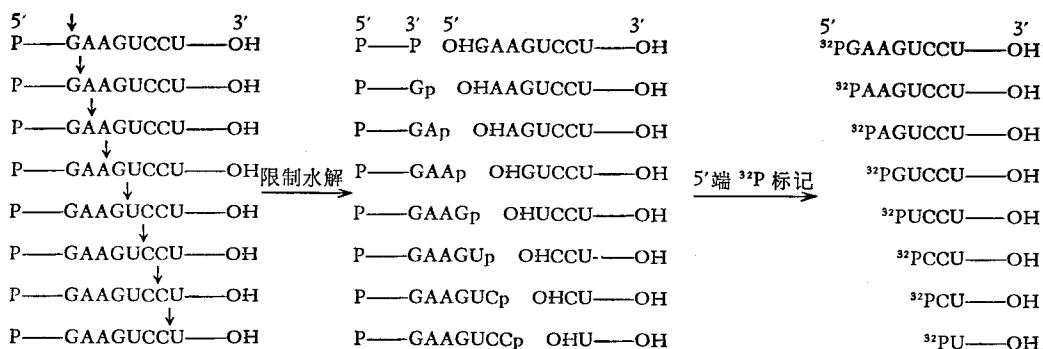


图 1 RNA 序列双向直读技术步骤示意图

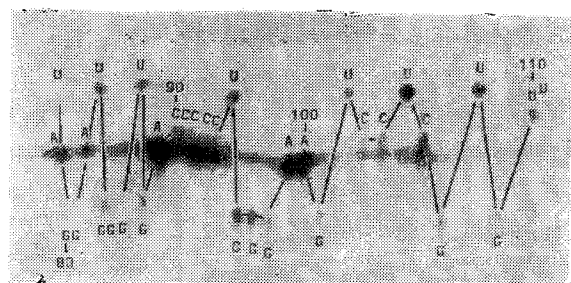


图 2 片段 78—109 5' 末端碱基层析图谱

放射性阶梯转移至 PEI-纤维素薄层,经原位酶解得到四种 5'-32p 标记的 pNp 核苷酸,然后在 0.55M(NH₄)₂SO₄ 中上行层析 4—6 小时,放射自显影 2 天至数天

时间还应缩短。另外,水解片段 5' 端 ³²P 标记步骤中,所使用的激酶的纯度很关键。我们使用的 PKase,在作完整分子 5' 端标记时,按常规在 37℃ 保温 30 分钟,电泳结果显示 5S RNA 分子已发生部分降解。所以在实验时应减少酶量和缩短反应时间来避免上述情况的发生。但是, pAp 的层析位置背景很深,并且相对于每条带都有 pAp 的层析点。对这种现象, Tanaka 等

有一种解释,但番茄叶 5S RNA 5' 末端的碱基并非 A,而是 G,看来在我们的实验中不是末端脱磷所致,很可能是由于激酶中杂酶对 RNA 降解引起的。

电泳分离所形成的阶梯中(图 3 见封 2),带间距离的大小直接影响层析结果的分析,带间距离大于 3 毫米比较合适,否则会造成误读,尤其相邻的碱基是相同的时候,层析图谱上往往合并成一点,如图 2 中 80, 81 位两个 G, 85, 86 两个 G, 90, 91 位两个 C,这在大片段阶梯处经常出现,因为它们的带间距离较小。对此,在电泳时可以隔一段时间点一次样,点几次,延长电泳时间或用浓度较低的聚丙烯酰胺凝胶,就可以在同一块板上取得大小片段带间距离合适的放射性阶梯。至于不同碱基,由于标记效率不同或二级结构影响造成强度不够的问题,可以加大同位素用量或延长曝光时间来解决。

放射性阶梯转移到 PEI-纤维素薄层上的效率,较大片段一般低于 50%,较小的片段可

超过 50%，这对于下一步层析分析是足够了。但是，不仅在转移而且在酶解时均需防止薄层过早干燥，否则会影响效果，所以这两步最好用塑料薄膜将薄层包好，压紧。

0.55 M(NH₄)₂SO₄ 的层析系统，对于分离四种主要的 pNp 是比较好的（见图 4），但是 pAp 和 pCp 之间的距离还不够大，不过还可以清楚的区分（图 2）。

用 X 光片基代替玻璃板所铺的纤维素薄层，无论其强度还是其均匀程度和分离效果，都优于用玻璃板。

参 考 文 献

[1] John Stanley 和 Stanislav Vassilenko: *Nature* 274, 87, 1978.
[2] Ramesh, C. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 6(11), 3443, 1979.
[3] Tanaka, Y. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 8(6), 1259, 1980.
[4] Payne, P. I.: *Eur. J. Biochem.*, 71, 33, 1976.
[5] 赵昂等:《植物学报》, 24(1), 54, 1982.

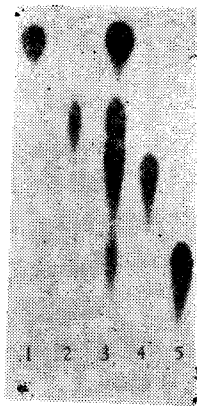


图 4 5'-³²P 标记的四种普通的 pNp 在 PEI-纤维素薄层上的层析图谱

在 0.55M(NH₄)₂SO₄ 溶剂中上行层析 4—6 小时，放射自显影 1 天，
1. 为 *pUp 2. *pCp 3. 四种 *pNp 的混合样品，4 *pAp 5. *pGp

[6] Randerath, E. et al.: *J. Chromatog.*, 31, 485, 1967.

【本文于1982年8月24日收到】

薄层（0.5 毫米）聚丙烯酰胺和琼脂糖等电聚焦技术

郭 尧 君

（中国科学院生物物理研究所六室，北京）

分析等电聚焦是蛋白质分析中高分辨的技术之一。它是利用蛋白质的等电点的不同，在一个稳定的、连续的，线性的 pH 梯度中进行蛋白质分离分析的一种新技术。近年来发展的平板等电聚焦，具有操作简便，可在相同条件下同时比较样品，分辨率高等优点，深受分析工作者欢迎。胶层的厚度直接影响到电泳的时间、分辨率、胶的保存等问题，所以目前的趋势是向着薄层和超薄层的发展方向。这里介绍薄层聚丙烯酰胺和琼脂糖凝胶的毛细管灌制、电泳、固定、染色、脱色、保存等一整套方法。其优点是：

- 1. 节省试剂 分析一个样品只需十到数十微升两性载体电解质。
- 2. 胶板大 可在一块板上同时分析几十个

- 样品，便于在相同条件下比较。
- 3. 样品用量少 少至 1—2 微升的样品即可进行分析。
- 4. 电泳时间短 1—2 小时。
- 5. 分辨率高 一般可分辨 0.01pH。在 α₁-抗胰蛋白酶的研究中，分辨率高达 0.0025pH^[1]，是迄今为止报道的最高分辨率。
- 6. 可用表面电极直接在胶板上测定 pH，快而精确地测定蛋白质的等电点。
- 7. 很容易制成永久保存的胶板。

一、薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦方法^[2]

利用 LKB 公司多用电泳仪（或其它可作等