

核糖核酸的化学

王德宝 著

高等教育出版社

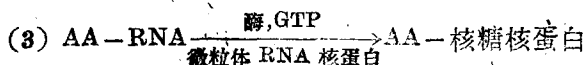
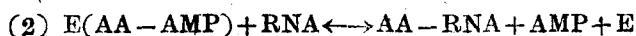
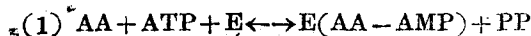
核糖核酸的化学

王德宝

(中国科学院生物化学研究所, 上海)

以核酸为中心的专题讨论会在我国恐怕还是第一次, 我个人非常高兴能够参加这个讨论会, 首先应当感谢党的正确科学政策, 否则象这样纯理论性的工作, 不会受到象今天这样的重视。其次应该感谢北京大学, 中国生理科学会北京分会和沈同教授等, 他们在百忙中为这个会做了很好的安排, 使我们今天能够围绕核酸这个问题进行讨论。

核酸的化学结构是非常复杂的, 无论核糖核酸或脱氧核糖核酸都还没有弄清楚, 但由于两种原因, 今天拟单就 RNA* 的化学作一介绍。第一, 比较起来, 我们对于 RNA 的化学还是了解得多一点, 特别对有关的酶系知道得更多。第二, 核酸的功能繁复异常, 无论对蛋白质生物合成、遗传变异、肿瘤病毒等等都有关系, 但究竟起着什么作用, 大都不很清楚, 但比较知道得多一点的是 RNA 和蛋白质生物合成的关系, 特别是近年来从氨基酸参与作用的研究, 知道 RNA 在里面起着重要的作用^[1]:



在(2)(3)两步骤中都非有 RNA 不可, 在(2)式中的 RNA 系可溶性的, 能在 pH5 时沉淀下来, 它的末端第一个核苷必须是腺嘌呤核苷酸, 第二个必须是胞嘧啶核苷酸, 否则不能和氨基酸连接, 为什么有这样的结构要求? 不同的氨基酸是不是要和不同的 RNA 连接? 要回答这类问题, 必须对 RNA 的化学结构有所了解。式(3)不是一个化学方程式, 只表示和可溶性 RNA 连接的氨基酸参与到微粒体核糖核蛋白的一些必要条件, 在这个作用中, 微粒体上 RNA 起着重要的样板作用, 但它究竟怎样起作用, 也必须首先解决 RNA 结构的问题, 因此今天对 RNA 结构的了解是非常迫切的。

一、RNA 的组成成分。

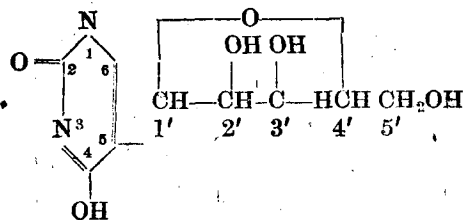
核酸的发现已有九十年的历史, 它的组成成分总以为已经知道得很清楚了, 但由于近年来分析技术的进步, 特别通过柱层析、纸层析等方法的运用, 除已知成分外又发现了一些新的碱和新的糖(见表一)因为这些新成分的量一般都比较少, 所以过去都被忽略了。在嘌呤碱中除了腺嘌呤和鸟嘌呤外, 酵母、大肠杆菌、产气杆菌、金黄色葡萄球菌等的 RNA 还含有少量的 2-甲基腺嘌呤、6-甲基腺嘌呤、6-二甲氨基嘌呤^[2]。Adler 等^[3]又在酵母 RNA 里面找到少量 N²-甲基鸟嘌呤和 1-甲基鸟嘌呤, 他们同时也发现 6-甲基腺嘌呤是酵母 RNA 成分之一。在嘧啶碱方面, 一般认为 RNA 含有尿嘧啶和胞嘧啶, 而脱氧核糖核酸不含尿嘧啶, 但含有胸腺嘧啶, 因此常常用胸腺嘧啶的有无来区别这两种核酸,

但 Littlefield & Dunn^[2]也在酵母和一些細菌的 RNA 里面找到胸腺嘧啶, Amos & Korn 还在大腸杆菌的 RNA 里发现有 5-甲基胞嘧啶^[3a]。此外除核糖外 Smith & Dunn^[4]还在麦胚、鼠肝和一些植物叶中的 RNA 里发现 2(或 3)-O-甲基核糖。随着方法不断的改进,在其他来源的 RNA 里找到目前尚未发现的新成分,是毫不为奇的。

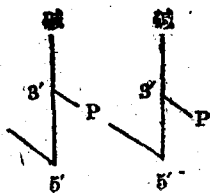
表 1. 核糖核酸的組成成分

成 分	来 源
嘧啶 腺嘌呤	
鳥嘌呤	
2-甲基腺嘌呤	酵母細菌等
6-氨基嘌呤	
6-二甲氨基嘌呤	
N ² -甲基鳥嘌呤	酵母
1-甲基鳥嘌呤	
嘧啶 尿嘧啶	
胞嘧啶	
胸腺嘧啶	酵母細菌等
5-甲基胞嘧啶	大腸杆菌
糖 核糖	
2(或 3)-O-甲基核糖(3)	麦胚, 鼠肝等
磷酸	

无论嘌呤或嘧啶, 都不直接和磷酸连接, 而是和核糖相连成核苷, 在嘧啶核苷里, 嘧啶的第一 N 原子和核糖的第一 C 原子相连, 苷的结合构型是 β 型, 糖基的构造是呋喃环式, 在嘌呤核苷里是第九 N 原子和核糖的第一 C 原子相连, 苷也是 β 型, 糖也是呋喃环式。为了区别起见, 碱环上的位置以 1, 2, 3 标出, 糖基上的原子以 1', 2', 3'……标明。最近一二年来好几个实验室发现水解酵母 RNA 可以得到一个新的核苷酸^[5-8], 水解胰脏 RNA 也是这样^[9], 最初以为是一个新的嘧啶碱^[9]但最近则证明不是新碱, 而是核糖和碱的结合地方改变了, 在这个核苷里核糖是和尿嘧啶的第五 C 原子相连^[10-12]如下图:



核苷加磷酸就成核苷酸, 上面说过磷酸不直接和碱连接, 而是和糖基上的羟基相接成磷酸酯, 因为糖基第二第三或第五 C 原子上的羟基都可以酯化, 所以核苷酸也就有 2', 3' 或 5'-核苷酸的不同。在多核苷酸或核酸分子里, 核苷酸和核苷酸之间通过磷酸相连接, 磷酸一方面和一个核苷酸糖基的第三羟基相连, 一方面又和另一核苷酸糖基的第五羟基相连, 如左图:



至于 RNA 里面有没有枝鏈呢? 过去一般人比較倾向于有, 但近一二年来多数人又倾向于没有。

二、测定 RNA 化学结构的一些方法

(一) 酶的方法: 我們現在知道在 RNA 里核苷酸和核苷酸之間是通过 3', 5'-磷酸二酯相連接, 这个結論主要是經過酶解作用而得到的, 因为核酸或多核苷酸經過某些酶水解以后, 所得到的单核苷酸不是 3'-核苷酸就是 5'-核苷酸, 不仅如此, 有些酶对于测定核酸或多核苷酸內核苷酸的排列次序, 也还有很大可以利用的潛力, 現在把有关的一些工具酶, 列如表二, 以供参考。

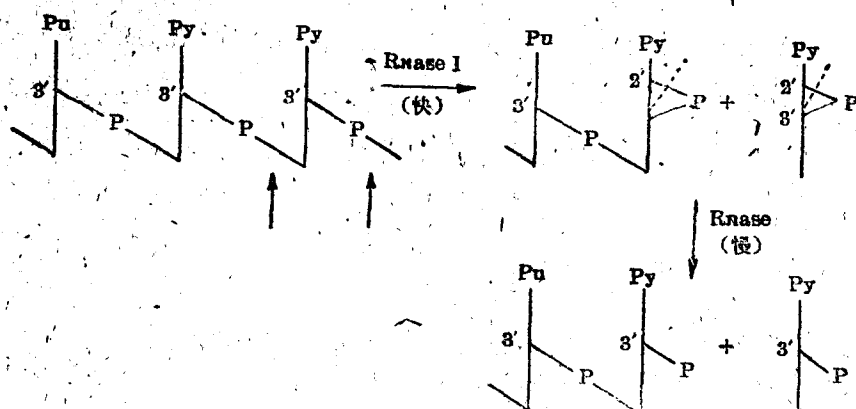
表 2. 测定核糖核酸结构的一些工具酶

酶	底 物	产 物
牛胰 RNase (RNase I)	RNA	3'-嘧啶核苷酸及嘧啶多核苷酸, 末端为嘧啶核苷酸 ^[13]
	嘧啶环状核苷酸	3'-嘧啶核苷酸 ^[13]
牛胰 RNase B	RNA	3'-嘧啶核苷酸及 10—14% 3'-鳥便嘧啶核苷酸 ^[14]
猪胰 RNase	RNA	同牛胰 RNase ^[15]
牛肝 RNase	RNA	3'-嘧啶核苷酸 ^[16]
牛脾 RNase	RNA	同牛胰 RNase ^[16]
	嘧啶环状核苷酸	3'-嘧啶核苷酸 ^[16]
牛脾 RNase	RNA	3'-嘧啶核苷酸及 3'-嘧啶核苷酸 ^[17,18]
	嘧啶环状核苷酸	2'-嘧啶核苷酸 ^[17,18]
	嘧啶环状核苷酸	2'-嘧啶核苷酸 ^[17,18]
鼠肝酸性 RNase	嘧啶环状核苷酸	2'-嘧啶核苷酸 ^[19]
	嘧啶环状核苷酸	2'-嘧啶核苷酸 ^[19]
豌豆叶 RNase	RNA	嘧啶环状核苷酸, 嘧啶环状核苷酸及 3'-嘧啶核苷酸 ^[20,21]
发芽黑麦 RNase	RNA	3'-嘧啶核苷酸及 3'-嘧啶核苷酸 ^[22]
牛胰 RNase	RNA	5'-嘧啶核苷酸及 5'-嘧啶核苷酸 ^[23]
曲霉制剂 RNase T ₁	RNA	3'-鳥便嘧啶核苷酸 ^[24-26]
曲霉制剂 RNase T ₂	RNA	3'-腺嘧啶核苷酸 ^[24-26]
蛇毒磷酸二酯酶 I	多核苷酸	5'-嘧啶核苷酸及 5'-嘧啶核苷酸 ^[27-29]
牛脾磷酸二酯酶	多核苷酸	3'-嘧啶核苷酸及 3'-嘧啶核苷酸 ^[30]
牛胰磷酸二酯酶	嘧啶环状核苷酸	3'-嘧啶核苷酸 ^[30]
	嘧啶环状核苷酸	3'-嘧啶核苷酸 ^[30]
发芽大麦 3'-核苷酸酶	3'-核苷酸	核苷及磷酸 ^[31]
牛精 5'-核苷酸酶	5'-核苷酸	核苷及磷酸 ^[32]
蛇毒 5'-核苷酸酶	5'-核苷酸	核苷及磷酸 ^[32]
细菌 5'-核苷酸酶	5'-核苷酸	核苷及磷酸 ^[33]
酸性磷酸单酯酶	核苷酸	核苷及磷酸 ^[34]
骨磷酸单酯酶	核苷酸	核苷及磷酸 ^[35]

有几个酶的作用, 需要做一些补充說明, 例如牛胰 RNase (RNase I) 分解 RNA 时, 只能分解和嘧啶核苷 C_{5'} 上羟基連接的磷酸二酯, 作用过程又可分为两步, 第一步是轉磷酸

作用,使 $C_{3'}-O-P-O-C_{5'}$ 变为 $\begin{matrix} C_{2'}-O \\ | \\ C_{3'}-O \end{matrix} P$, 这个作用比较快,生成的产物为 2',3'-嘧啶

环状核苷酸。第二步是水解作用,从 $C_{2'}-O-P$ 处水解而得 3'-嘧啶核苷酸及嘌呤低级多核苷酸,其最后一个核苷酸总是 3'-嘧啶核苷酸,如下图所示:



牛胰 RNase I 在 1940 年即已被提纯结晶^[36], 多年来都认为是一个纯酶, 但 1953 年 Hirs 等^[39]用离子交换剂 Amberlite IRC-50 又把它分为 RNase A 和 RNase B 两份, RNase B 分解 RNA 时不但生成 3'-嘧啶核苷酸, 而且产生 10—14% 的 3'-鸟嘌呤核苷酸, 但因为在 RNase I 中 RNase B 的含量较少, 所以当 RNase I 分解 RNA 时, 生成的 3'-鸟嘌呤核苷酸为量极少, 一般方法不容易检查出来。

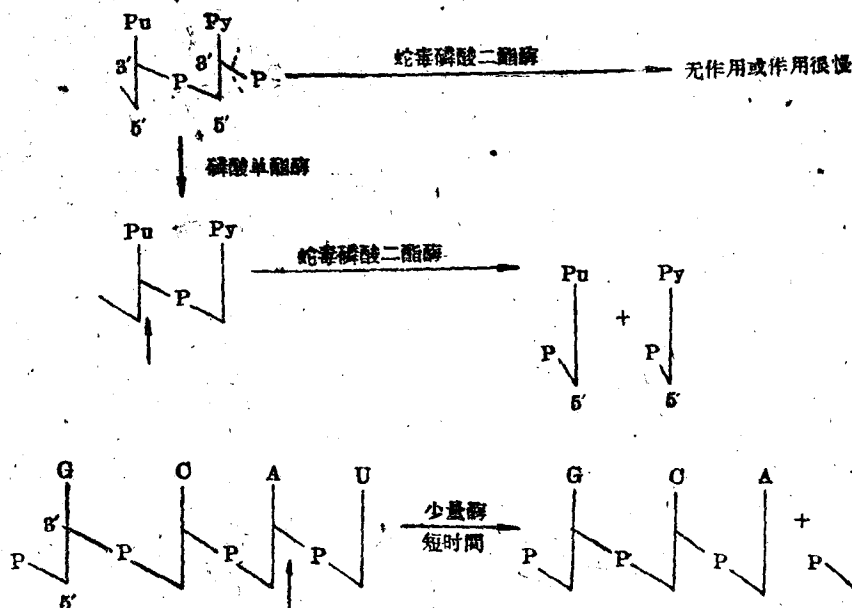
牛脾和猪胰含有和牛胰 RNase I 作用相似的 RNase。在牛脾中还有另一种 RNase, 它分解 RNA 除了生成 3'-嘧啶核苷酸外, 还生成 3'-嘌呤核苷酸, 此外它分解环状核苷酸时, 产物不是 3'-核苷酸而是 2'-核苷酸, 因此, 它分解 RNA 时, 和牛胰 RNase I 不同, 不经过环状核苷酸这一阶段, 否则产物应该是 2'-核苷酸而不是 3'-核苷酸了。

豌豆叶的 RNase 作用于 RNA 时, 主要产物为嘧啶和嘌呤的环状核苷酸, 部分嘌呤环状核苷酸又可继续水解而产生 3'-嘌呤核苷酸, 但嘧啶环状核苷酸则不再被酶作用, 因此, 这个酶对于制备环状核苷酸、特别是嘧啶环状核苷酸很有用处。

上述各酶分解 RNA 都产生 3'-核苷酸, 发芽的黑麦含有 RNase, 它分解 RNA 产生 5'-核苷酸, 牛肠也含有分解多核苷酸生成 5'-核苷酸的酶。江上不二夫等^[24-26]从麴霉制剂中分解出两种 RNases, T₁ 分解 RNA 生成 3'-鸟嘌呤核苷酸, 也经过环状核苷酸这一中间物阶段; T₂ 分解 RNA 生成 3'-腺嘌呤核苷酸。这两个酶如果对嘧啶核苷 C_{3'}-羟基连接的磷酸酯没有作用, 对解决 RNA 的结构将有很大的用处, 有待进一步的研究。

此外有些磷酸二酯酶也很有用处, 特别值得提起的有蛇毒磷酸二酯酶, 末端为 3'-磷酸单酯的多核苷酸不能为这个酶分解或分解很慢, 当这个单酯被除去后, 即可以被它分解, 从 C_{3'}-O-P 处作用, 产生 5'-核苷酸。

还有一个特性, 就是蛇毒磷酸二酯酶作用时, 总是从离 5'-磷酸单酯最远的地方开始, 如果用很少量的酶或者限制作用的时间, 有可能使多核苷酸次第降价如:



和蛇毒磷酸二酯酶相反,牛脾磷酸二酯酶不能分解(或分解很慢)带有末端为5'-磷酸单酯的多核苷酸,而且分解产物都是3'-核苷酸。

还有一些磷酸单酯酶,有的作用专一性高,如3'-核苷酸酶,5'-核苷酸酶等,有的对任何一种磷酸单酯都有作用,在核酸化学上应用最多的是男人前列腺的酸性磷酸单酯酶,不但可作用于任何一种单核苷酸,也能分解多核苷酸上的磷酸单酯。

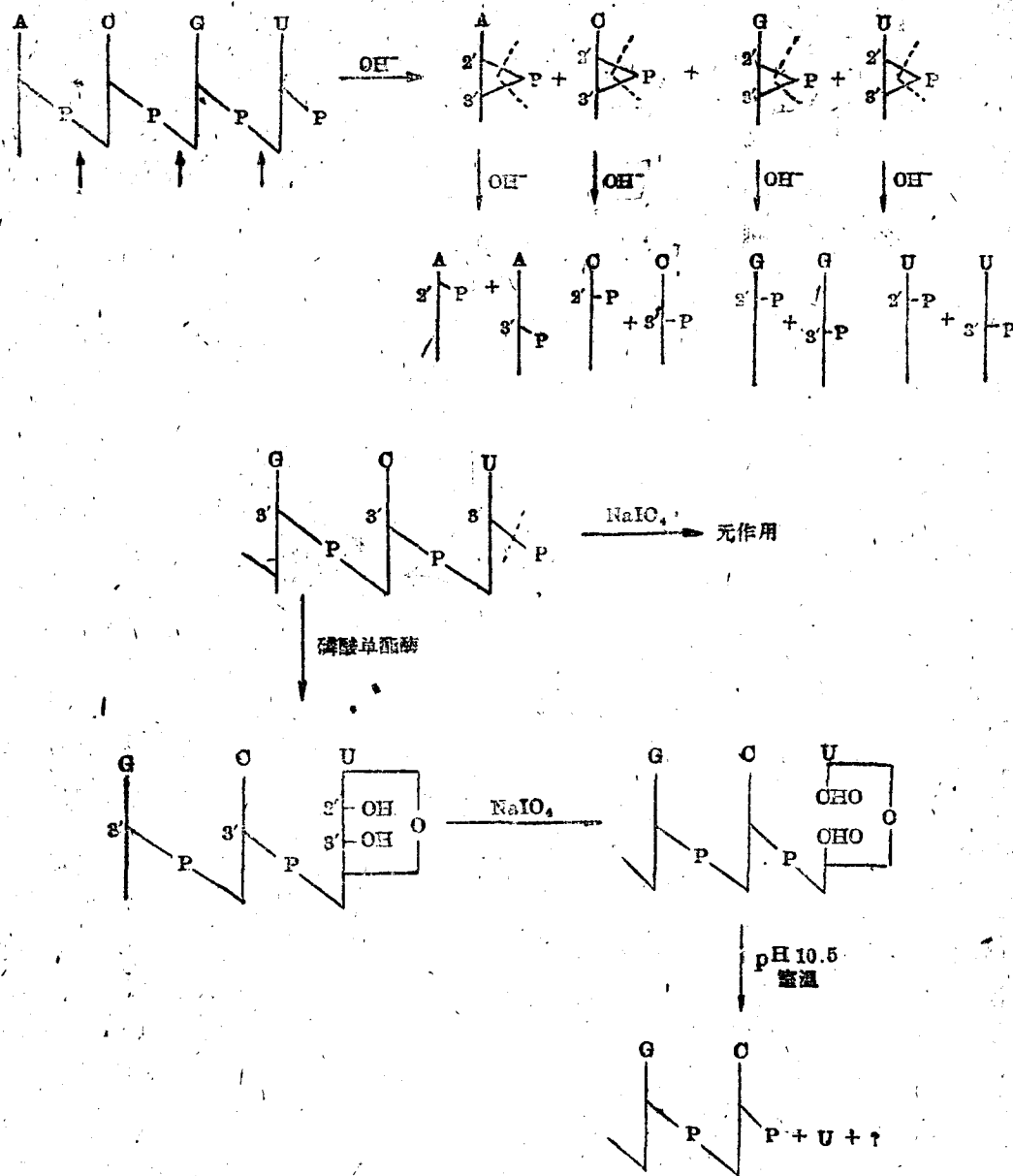
(二)化学方法: 用化学方法处理核酸时,条件不能太剧烈,否则可使鹼糖之間和糖及磷酸之間的连接完全打散,比較常用的有如表三的一些方法。用1N. 酸在100°水解RNA时,由于嘌呤和糖之間的连接比較不稳定,所以都被分解成游离鹼,又由于磷酸根在酸性溶液內可从C_{3'}移至C_{2'},所以产物除了3'-嘧啶核苷酸外还有2'-嘧啶核苷酸。用1N. 鹼水解核酸,和牛胰RNase I有些相象,也经过环状核苷酸这一阶段,但有两点不同之处:第一,它沒有特异性,对嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸同样作用;第二,环状核苷酸繼續为鹼水解时,C_{2'}-O-P和C_{3'}-O-P拆断的机会均等,因此主要产物可有八种。

表 3. 分解核糖核酸的化学方法

分解条件	产 物
1N. HCl, 100°, 1小时	游离嘌呤、2'-嘧啶核苷酸及3'-嘧啶核苷酸
1N. NaOH, 20°, 18小时	2'-及3'-嘧啶核苷酸2'-及3'-嘌呤核苷酸
0.1M NaIO ₄	如RNA有3'-磷酸单酯末端无作用; 除去磷酸单酯則氧化
NH ₂ NH ₂ , 60°, 1小时	无嘧啶酸 ^[38]

当核糖上C_{2'}及C_{3'}二順位羥基均系游离状态时,可以为过碘酸钠氧化成二醛基,如任何一羥基为磷酸酯化时,必須先行除去,然后才能为过碘酸钠作用。

氧化生成之二醛基化合物在pH10.5时非常不稳定,随即分解使最末端一核苷,成为

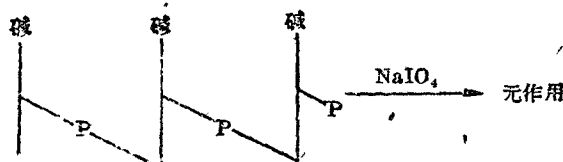
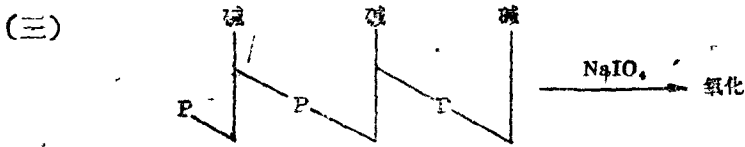
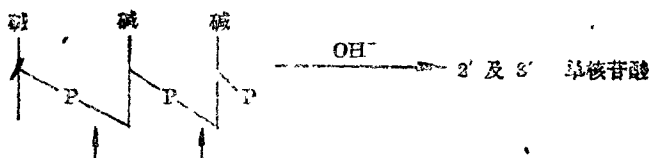
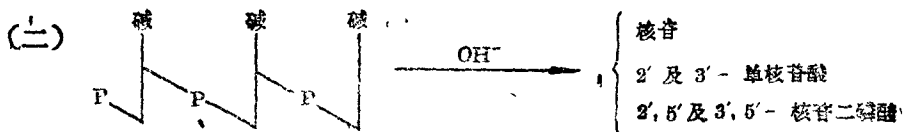
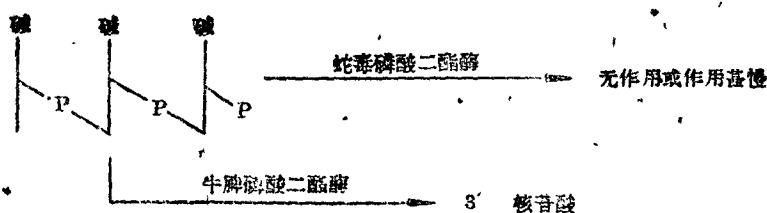
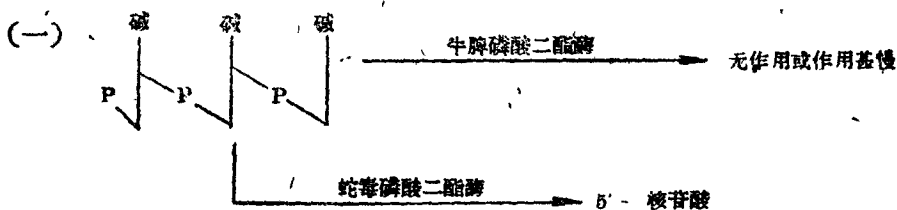


游离碱及一未知物,因此这个方法可用以测定多核苷酸的末端,因为从游离碱的性质,可以肯定最后一个核苷酸是那种^[39]。

用胍处理 RNA 可使嘧啶碱除去而得无嘧啶酸,它不能为牛胰 RNase I 分解,但核苷酸之间的关系仍然和原来的 RNA 一样,如果能解决这个化合物的结构, RNA 的结构也就解决了,由于它只含有嘌呤碱,比原有的 RNA 要易于处理一点,也未可知。

三、3'-磷酸单酯末端和 5'-磷酸单酯末端鉴别方法蛋白质分子有 C 端和 N 端,作为一个链状分子,核酸或多核苷酸也同样有二个末端,就是一端带 3'-磷酸单酯,一端带 5'-磷酸单酯,当然也可能两端都不带或仅一端带有磷酸单酯。天然状态的核酸是不是两端

同时具有磷酸单酯,或者仅一端具有磷酸单酯(或3'或5')或者两端均不具磷酸单酯,现在还不清楚。目前有些方法,可以鉴别一个多核苷酸是具有3'-磷酸单酯末端抑或5'-磷酸单酯末端,简单的介绍在下面:



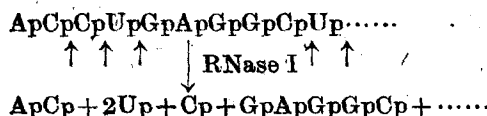
(四)具有5'-磷酸单酯末端的多核苷酸可作为多核苷酸磷酸化酶的引物,而具有3'-磷酸单酯末端的多核苷酸则否^[293]。

(五)在有多核苷酸磷酸酶存在时,具有5'-磷酸单酯末端的多核苷酸可以磷酸解成为

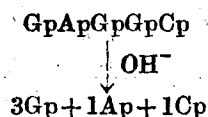
核苷二磷酸而具有 3'-磷酸单酯末端的多核苷酸則不能^[40]。

四、核酸或多核苷酸结构的测定方法:

前面介绍了一些方法,把这些方法综合运用,有可能解决 RNA 部分的結構問題,現在举一个例子說明如下:

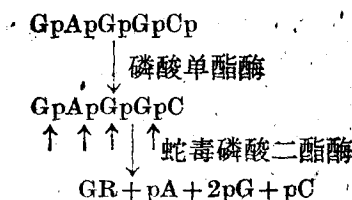


由于 RNase I 只能从嘧啶核苷酸处分解,所以产物有上面这些化合物,現在试图解决 GpApGpGpCp 内核苷酸排列次序的問題,用鹼水解



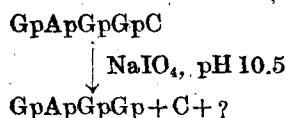
得到三种核苷酸而其比例为 鳥:腺:胞 = 3:1:1, 因此可以知道这是一个五核苷酸(不可能是五核苷酸的倍数,因为 RNase I 的产物只可能有一个嘧啶单核苷酸在末端)。

其次可用前列腺的酸性磷酸酯酶除去磷酸单酯,然后一部分用蛇毒磷酸二酯酶作用

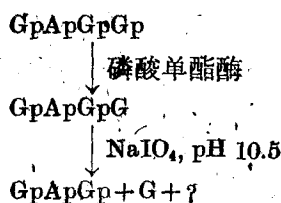


生成四个 5'-核苷酸和一个鳥便嘌呤核苷,因此原来五核苷酸上最左的一个末端必須是鳥便嘌呤核苷酸。

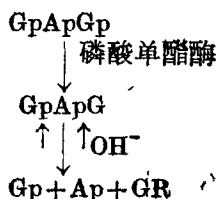
另一部分可以过碘酸钠氧化,然后調节 pH 至 10.5,則最右的一个末端,分解成游离的胞嘧啶



同时得到四核苷酸 GpApGpGp, 再經磷酸单酯酶处理,用过碘酸钠氧化, pH 調节至 10.5, 則得到游离的鳥便嘌呤鹼(原五核苷酸右端第二个核苷酸的性質由此肯定)



和一个三核苷酸 GpApGp, 再用磷酸单酯酶除去 3'-磷酸单酯,然后用鹼水解,除核苷酸外得鳥便嘌呤核苷



只有最右的鹼可以成核苷,因此鳥便嘧啶必須在最右端,已知最左一核苷酸為鳥便嘧啶核苷酸(見前),因此在这个三核苷酸中,腺嘧啶必然在中間,而原有的五核苷酸的排列次序必然是 GpApGpGpCp。

目前由于工具不够,还不能完全解决 RNA 內核苷酸排列次序的問題,譬如虽然上述五核苷酸的化学結構是清楚了,但它在 RNA 內的原来位置还是无法肯定,这有待新方法的建立和新工具酶的发现。此外还有一个困难問題就是如何提純一个核酸,必須首先解决,否則就是有了完善的方法,也无济于事的。

附注* 核糖核酸 RNA, 核糖核酸酶 RNase, 嘧啶 Pu, 嘧啶 Py, 腺嘌呤 A, 鳥便嘧啶 G, 尿嘧啶 U, 胞嘧啶 C, 鳥便嘧啶核苷 GR, 腺三磷 ATP, 鳥三磷 GTP, 焦磷酸 PP, 腺一磷 AMP, 氨基酸 AA, 激活酶 E。

参 考 文 献

- [1] M. B. Hoagland, Preprint No. 2, Symposium No. 8, The 4th Int. Congr. Biochemistry, Vienna, 1958.
- [2] J. W. Littlefield & D. B. Dunn, Biochem. J. 70, 642 (1958).
- [3] M. Adler, B. Weissmann & A. B. Gutman, J. Biol. Chem. 230, 717 (1958).
- [3a] H. Amos & M. Korn, Biochim. Biophys. Acta 29 444 (1958).
- [4] J. D. Smith & D. B. Dunn, Biochim. Biophys. Acta 31, 573 (1959).
- [5] F. F. Davis & F. W. Allen, J. Biol. Chem. 227, 907 (1957).
- [6] W. E. Cohn, Federation Proc. 16, 166 (1957).
- [7] W. E. Cohn, Federation Proc. 17, 203 (1958).
- [8] W. E. Cohn, Abstracts, The 4th Int. Congr. Biochem., Pergamon Press Ltd., 29 (1958).
- [9] J. W. Kemp & F. W. Allen, Biochim. Biophys. Acta, 28, 51 (1958).
- [10] C. T. Yu & F. W. Allen, Biochim. Biophys. Acta, 32, 393 (1959).
- [11] J. P. Scannell, A. M. Crestfield & F. W. Allen, Biochim. Biophys. Acta, 32, 406 (1959).
- [12] W. E. Cohn, Biochim. Biophys. Acta, 32, 569 (1959).
- [13] R. Markham & J. D. Smith, Biochem. J. 52, 552 (1952).
- [14] A. A. Hakim, J. Biol. Chem. 228, 459 (1957).
- [15] 祁国荣、王德宝, 生化学报 1, 239 (1958).
- [16] H. S. Kaplan & L. A. Heppel, J. Biol. Chem. 227, 907 (1956).
- [17] M. E. Maver & A. E. Greco, J. Nat. Cancer Inst. 17, 503 (1956).
- [18] L. A. Heppel, P. J. Ortiz & S. Ochoa, J. Biol. Chem. 229, 679 (1957).
- [19] J. Zytko, G. DeLaurande, O. Allard & A. Cantero, Biochim. Biophys. Acta 27, 405 (1958).
- [20] M. Holden & N. W. Pirie, Biochem. J. 60, 39 (1956).
- [21] R. Markham & J. L. Strominger, Biochem. J. 64, 46 (1956).
- [22] L. Sauer, H. G. Khorana & L. A. Heppel, Biochim. Biophys. Acta, 33, 452 (1959).
- [23] W. E. Cohn & E. Volkin, Nature 167, 483 (1951).

- [24] K. Sato & F. Egami, *J. Biochem. (Japan)* 44, 753 (1957).
- [25] K. Sato & F. Egami, *C. R. soc. Biol.* 151, 1792 (1957).
- [26] F. Egami, M. Naoi & K. Asano, Abstracts, The 4th Int. Congr. Biochem., Pergamon Press Ltd., 40 (1958).
- [27] G. O. Butler, *Methods in Enzymology* (Colowick & Kaplan, ed.) Vol. II, 561 (1955).
- [28] H. G. Khorana, G. M. Tener, W. E. Razzell & R. Markham, *Federation Proc.* 17, 253 (1958).
- [29] M. F. Singer, R. J. Hilme, & L. A. Heppel, *Federation Proc.* 17, 312 (1958).
- [30] L. A. Heppel & R. J. Hilme, *Methods in Enzymology* (Colowick & Kaplan, ed.) Vol. II, 565 (1955).
- [31] L. Shuster & N. O. Kaplan, *Methods in Enzymology* (Colowick & Kaplan, ed.) Vol. II, 551 (1955).
- [32] L. A. Heppel & R. J. Hilme, *Methods in Enzymology* (Colowick & Kaplan, ed.) Vol. II, 548 (1955).
- [33] T. P. Wang (王德宝), *J. Bact.* 68, 128 (1954).
- [34] G. Schmidt, *Methods in Enzymology* (Colowick & Kaplan, ed.) Vol. II, 523 (1955).
- [35] E. Valko, *Methods in Enzymology* (Colowick & Kaplan, ed.) Vol. II, 539 (1955).
- [36] M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.* 24, 15 (1940).
- [37] O. H. W. Hirs, S. Moore & W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 200 493 (1953).
- [38] S. Takemura, Abstracts, The 4th Int. Congr. Biochem., Pergamon Press Ltd., 34 (1958).
- [39] P. R. Whitfield, *Biochem. J.* 53, 390 (1954).
- [40] M. F. Singer, *J. Biol. Chem.*, 232, 211 (1958).

