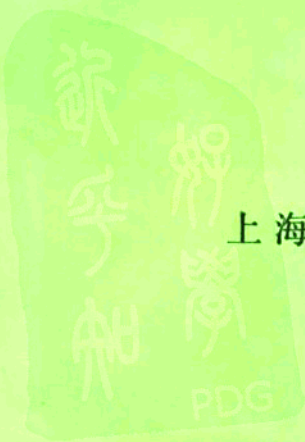


内部资料

1973—1975
研究工作成果汇编
(三)

上海实验生物研究所

1977年



毛主席语录

中国人民有志气,有能力,一定要在不远的将来,赶上和超过世界先进水平。

人类总得不断地总结经验,有所发现,有所发明,有所创造,有所前进。

目 录

多聚核苷酸的合成与研究

IV. 脱氧核糖六核苷酸 $dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{Bz}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}$ 的化学合成.....核酸研究组 (1)

多聚核苷酸的合成与研究

V. 脱氧核糖十核苷酸 $dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}pTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz}_{OH}$ 的化学合成.....核酸研究组 (11)

多聚核苷酸的合成与研究

IV. 脱氧核糖十三核苷酸的化学合成.....核酸研究组 (16)

脱氧核糖核酸组份的柱层析分析.....核酸研究组 (27)

尿素柱层析分离和纯化寡聚脱氧核糖核苷酸.....核酸研究组 (31)

胞嘧啶核苷二磷酸胆碱的制备.....核酸研究组 (34)

一种简易分离胞二磷胆碱的方法.....胡兆庆 王建业 朱邦宰 邢根生 曾 和 (42)

小牛胸腺染色质的组成分析.....细胞研究所 (48)

小牛胸腺染色质的电镜观察.....细胞研究组 (50)

重组小牛胸腺核组蛋白的初步研究.....细胞研究所 (55)

小牛胸腺组蛋白的紫外吸收光谱分析.....细胞研究组 (61)

鼠肝、小牛胸腺染色质非组蛋白的提取及对模板活力的激活作用.....细胞研究组 (67)

小牛胸腺脱氧核糖核酸的提取和分析.....细胞研究组 (73)

大肠杆菌中依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶的提取.....细胞研究组 (78)

坚持“两个服务”、“一个结合”把基础理论研究科研工作搞上去.....细胞研究组 (82)

8 位³H 标记的脱氧腺嘌呤核苷 5'-磷酸的制备.....连秉钧 戎佩民 朱 青 (84)

试用邻苯二甲酸二丙烯酯作包埋介质的一些经验.....技术室电镜组 (90)

电子微量泵.....工厂 技术室电子组 (93)

多聚核苷酸的合成与研究

IV. 脱氧核糖六核苷酸 $dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}$ 的化学合成与抽提分离

核酸研究组
(第三研究室)

引言

具有一定碱基顺序的双链 DNA(基因), 用化学和酶促相结合的技术来进行人工合成, 这在方法学上已经可行 (Agarwal 等, 1970; Caruthers 等, 1973)。它可分为三步: 第一, 将要合成的双链 DNA, 分成若干相互具有四个或四个以上碱基互补的片段, 然后用化学方法合成这些片段, 它们的长度一般为八个到十二个核苷酸; 第二, 将这些片段的 5' 端用多核苷酸激酶和 $[\gamma-^{32}P]ATP$ 进行标记; 第三, 按照预先设计的顺序, 将这些片段相互配对成双链的 DNA 分子, 用多核苷酸连接酶连接成完整的分子 (Agarwal 等, 1972)。在这三步中, 工作量最大、时间最费、问题最多要算第一步的化学合成。然而, 在化学合成中产物的分离又是最关键的一步。目前, 二酯法的合成产物, 通常是采用离子交换柱层析 (Köster 和 Kaiser, 1974), 亲和层析 (Cashion 等, 1973) 和溶剂抽提分离 (Agarwal 等, 1971)。在这三种分离方法中, 溶剂抽提分离是最理想的一种, 因为它具有分离速度快, 制备量大, 试剂用量少和设备条件简单等特点。本文报道的脱氧核糖六核苷酸 $dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}$ 的合成是采用抽提分离方法。

实验材料与方法

本实验所用的试剂、药品、一般方法和缩写符号等见以前的报道 (上海实验生物研究所核酸研究组, 1973a, 1973b, 和 1973c)。dM-TrG^{Bz}、dpA^{Bz}_{OAc} 和 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz} (1973b), dpC^{An}_{OAc} 和 dpC^{An}pG^{Bz}_{OAc} (1973a), dpA^{Bz}pG^{Bz}_{OAc} 和 dpG^{Bz}_{OAc} (1973c), 它们的制备在前几篇文章都已报道。本实验所用的 dpA^{Bz}pG^{Bz} 合成方法与 dpG^{Bz}pA^{Bz} 相似。一般的缩合反应、脱保护基和产物的鉴定方法在前几篇文章里也已叙述过 (1973a 和 1973b)。

结果与讨论

(一) 脱氧核糖六核苷酸 $dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}$ 的化学合成

$dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}$ 的化学合成途径见图 1。首先, dMMTrG^{Bz}(I) 和 dpA^{Bz}_{OAc}(II) 经 MS 缩合, 用溶剂抽提方法分离, 最后皂化, 得到产品 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}(V)。然后 (V) 与 dpC^{An}pG^{Bz}_{OAc}(VI) 经 MS 缩合, 用溶剂抽提方法分离, 皂化后, 得产品 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}(VIII)。最后, (VIII) 与 dpA^{Bz}pG^{Bz}_{OAc}(IX) 经 MS 缩合, 用溶剂抽提方法分离, 皂化后, 得产品 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}。

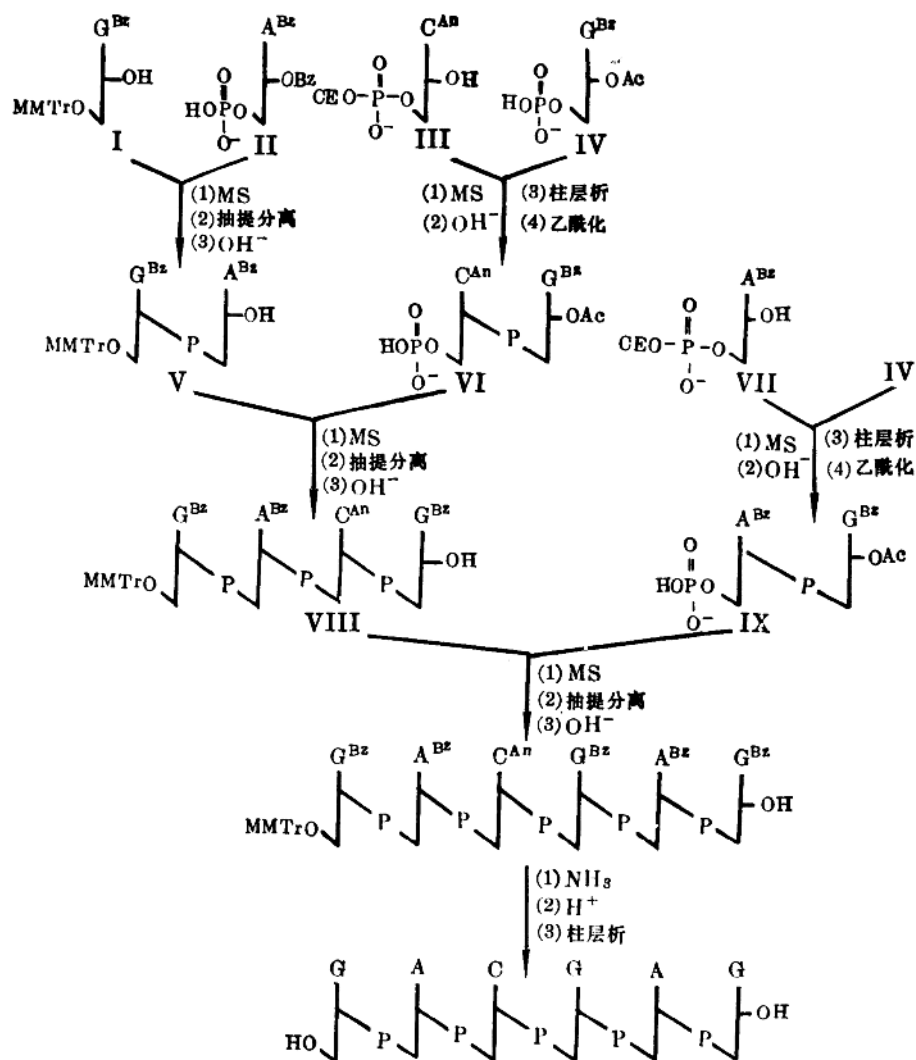


图1 $dMMTrG^{Bz}_pA^{Bz}_pC^{An}_pG^{Bz}_pA^{Bz}_pG^{Bz}$ 的化学合成途径

表1 缩合反应的条件*与产率

产 物	反 应 底 物		B/A (克分子比)	MS/B (克分子比)	反应 时间 (小时)	产物 分离 方式	分离 产率 (%)	纯度** (%)
	A	B						
$dMMTrG^{Bz}_pA^{Bz}$	$dMMTrG^{Bz}$	dpA^{Bz}_{OBz}	2	2	2.5	抽提	44	95
$dMMTrG^{Bz}_pA^{Bz}_pC^{An}_pG^{Bz}$	$dMMTrG^{Bz}_pA^{Bz}$	$dpC^{An}_pG^{Bz}_{OAc}$	2	2.8	2.5	抽提	38	90
$dMMTrG^{Bz}_pA^{Bz}_pC^{An}_pG^{Bz}_pA^{Bz}_pG^{Bz}$	$dMMTrG^{Bz}_pA^{Bz}_pC^{An}_pG^{Bz}$	$dpA^{Bz}_pG^{Bz}_{OAc}$	5	3.28	3	抽提	31	85

* 反应溶液为无水吡啶,反应温度为室温(约25℃)。

** 脱保护基后用纸电泳或柱层析检查的纯度(见图8、11、14)

p(^{Bz}(X))。各步的缩合反应条件和经抽提分离所得的产率见表1。

(二) 产物的抽提分离

1. dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}的抽提分离(见图2)

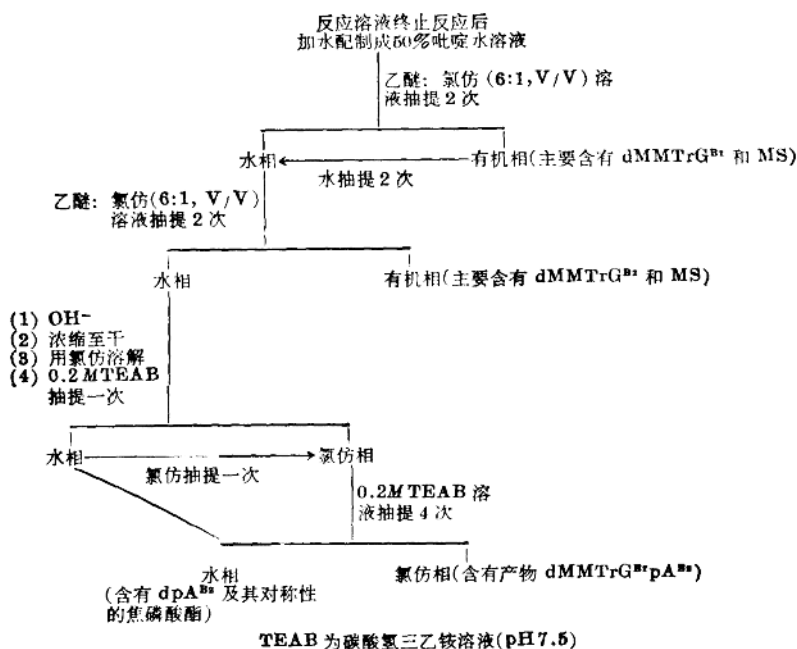


图2 合成产物 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}的抽提分离

上述各溶剂相用纸层析分析鉴定(见图3)。纸层析烘干后,用半胱氨酸显色剂(3N H₂SO₄溶液内含有0.5%的半胱氨酸盐酸盐)进行显色,紫外斑点1、2和3,显黄色后逐渐变橙红色;斑点4和5只显红色。由此可知,斑点1、2和3是带有MMTr基团的

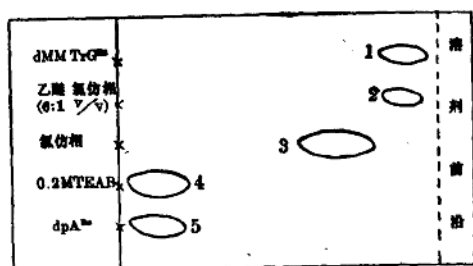


图3 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}抽提分离的各溶剂相纸层析鉴定

溶液为水饱和的正丁醇:浓氨水(100:1, V/V)。

新华1号滤纸,上行,室温18小时。

脱氧核糖衍生物;斑点4和5是不带MMTr基团的脱氧核糖衍生物。斑点1和5分别是标准的dMMTrG^{Bz}和dpA^{Bz}。根据层析斑点的位置、半胱氨酸的显色反应和紫外吸收光谱特征,能够确定斑点2为dMMTrG^{Bz},斑点4为dpA^{Bz}及其对称性焦磷酸酯,斑点3为产物dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}(含有痕迹量dMMTrG^{Bz})。经溶剂抽提分离后,纯度可达95%,产率为44%。

2. dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}的抽提分离(见图4)

合并水相(1)和(2)以及有机相(1)和(2),用纸层析鉴定(见图5)。

纸层析图谱用半胱氨酸显色剂显色,紫外吸收点1、2、3和4先变黄色,后变橙红色,说明它们是含有MMTr基团的脱氧核糖衍生物;斑点5和6只显红色,说明它们是不含

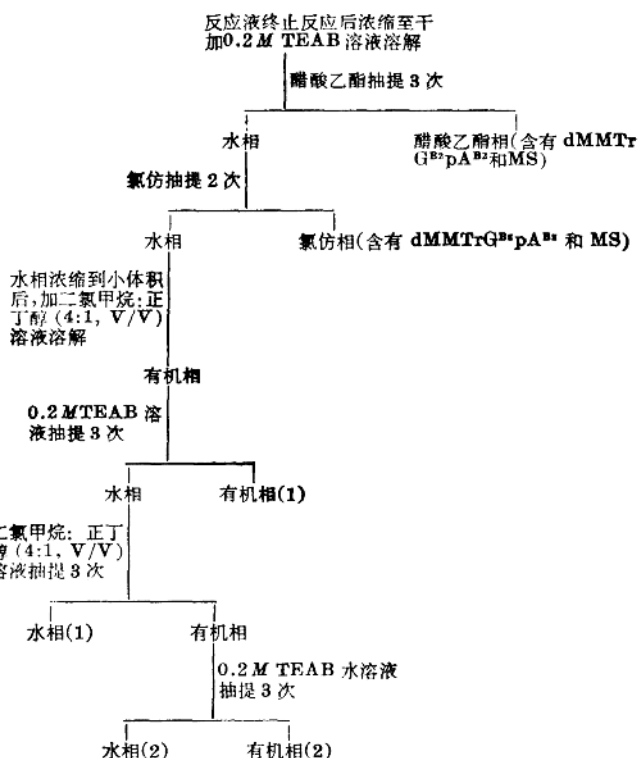


图 4 合成产物 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz} 的抽提分离

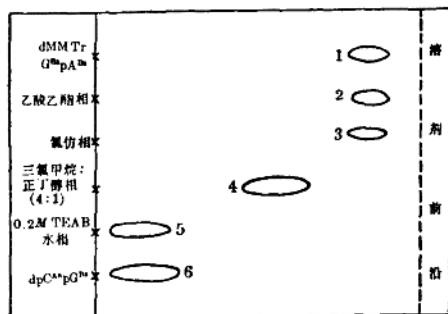


图 5 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz} 抽提分离的各溶剂相纸层析鉴定

溶剂为异丙醇:浓氨水:水(7:1:2, V/V);

新华 1 号滤纸,上行,室温 18 小时。

MMTr 基因的脱氧核糖衍生物。斑点 1 和 6 分别是标准的 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz} 和 dpC^{An}pG^{Bz}。根据层析斑点的位置,半胱氨酸显色试剂的显色特征,以及紫外吸收光谱比值(见表

2),可以确定斑点 2 和 3 为 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}, 斑点 5 为 dpC^{An}pG^{Bz} 及其对称性焦磷酸酯, 斑点 4 为产物 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}。

将上述的有机相(1)和(2)合并后,浓缩至干,皂化,然后上 DEAE-纤维素(HCO₃⁻型)浓缩柱,经过 0.1 M TEAB 40% 乙醇溶液洗涤之后,用 1 M TEAB 40% 乙醇洗脱下来,得产物 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}, 纯度为 90% 左右,产率为 38%。

3. dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz} 的抽提分离(见图 6)

合并水相 (1)和 (2)以及有机相 (1)和 (2),用纸层析鉴定(见图 7)。

纸层析图谱用半胱氨酸显色剂显色,紫外吸收点 1,2,3 和 4 先变黄色,后变橙红色,说明它们是带有 MMTr 基团的脱氧核糖衍生物;斑点 5 只显红色,说明它们是不带 MM-

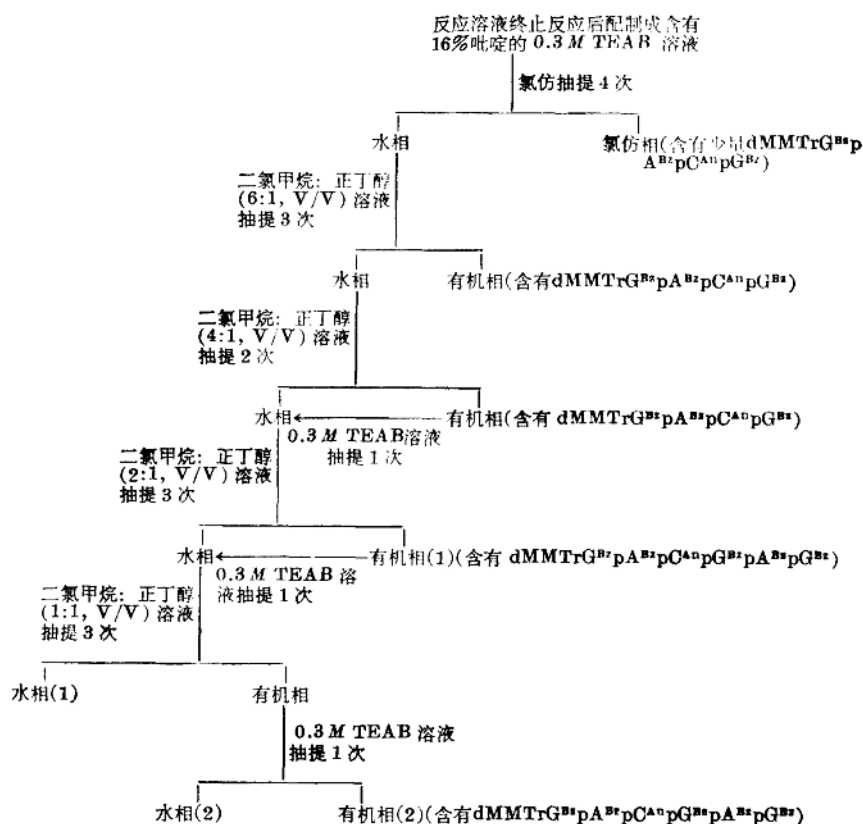


图 6 合成产物 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz} 的抽提分离

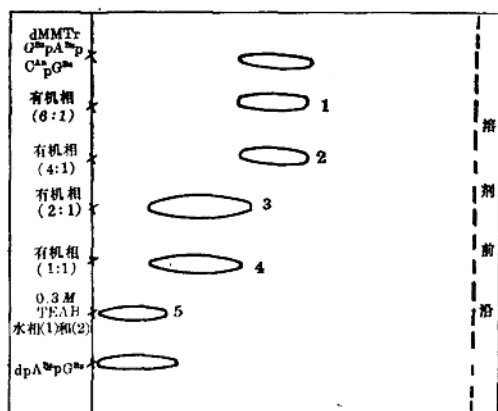


图 7 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz} 抽提分离的各溶剂相纸层析鉴定

条件与图 6 相同。有机相为二氯甲烷: 正丁醇混合液。

Tr 的脱氧核糖衍生物。根据层析斑点的位置,

半胱氨酸显色试剂的显色特征,以及紫外吸收光谱比值(见表 2),可以确定斑点 1 和 2 为 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz};斑点 5 为 dpA^{Bz}pG^{Bz}及其对称性焦磷酸酯,斑点 3 和 4 为产物 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}。

将上述有机相(1)和(2)合并后,浓缩至干,皂化,上 DEAE-纤维素(HCO₃⁻型)浓缩柱,用 0.15 M TEAB 40%乙醇溶液洗涤之后,用 1 M TEAB 40%乙醇洗脱下来,得产物 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz},纯度为 85%左右,产率为 31%。

(三) 脱保护基后的产物分析

1. dGpA 的分析

dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}经氨解和酸解脱去保护基后,变成 dGpA,用纸电泳来鉴定它的纯度

表2 带保护基产物的分析

产 物	光 谱 性 质*								纸层析**
	$\lambda_{\min}$ (nm)	$\lambda_{\max}$ (nm)	A250/A260 实验值 计算值		A280/A260 实验值 计算值		A290/A280 实验值 计算值		
dMMTrG ^{Bz} pA ^{Bz}	260	280	1.14	1.07	1.24	1.21	1.07	1.05	0.8
dMMTrG ^{Bz} pA ^{Bz} pC ^{An} pG ^{Bz}	255	282	1.03	0.96	1.21	1.18	1.15	1.16	0.4
dMMTrG ^{Bz} pA ^{Bz} pC ^{An} pG ^{Bz} pA ^{Bz} pG ^{Bz}	257	280	1.03	0.91	1.20	1.20	1.10	1.14	0.2

* 样品溶解在 TEAB 溶液内 (pH 7.5), 以水作对照测紫外吸收。

** 层析滤纸为新华 1 号, 溶液为异丙醇: 浓氨水: 水 (7:1:2, V/V), 室温, 上行。

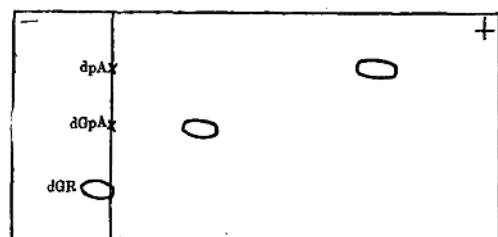


图8 dGpA 的纸电泳鉴定

电泳缓冲液为 0.05 M TEAB 溶液 (pH 7.5), 新华 1 号滤纸, 纸长 49 厘米, 电压 3,000 V, 电流 7 mA, 电泳时间 1 小时 15 分。

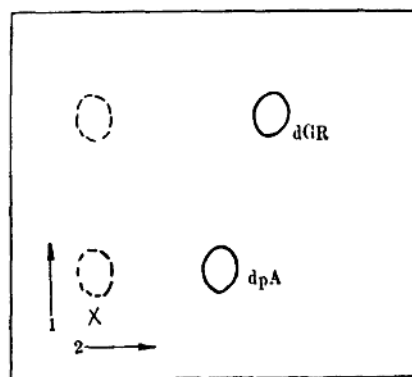


图9 dGpA 的枯青霉磷酸二酯酶解产物的双向纸层析图谱 (28 × 28 厘米)

① 为第一向, 在 70% 异丙醇水溶剂系统展层 15 小时, 虚线斑点代表第一向展层后的紫外吸收点;

② 为第二向, 在饱和硫酸铵溶液系统展层 6 小时, 实线斑点代表第二向展层后的紫外吸收点。

(见图 8)。然后从滤纸上洗下来, 测紫外光谱和进行酶解分析 (见表 3)。

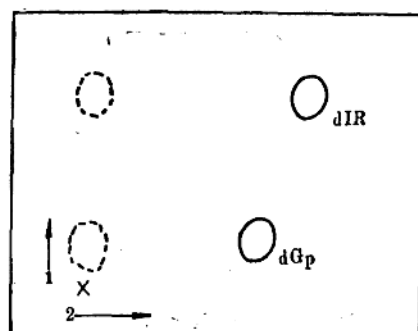


图10 dGpA 的牛脾磷酸二酯酶解产物双向纸层析图谱 (28 × 28 厘米)

层析条件与图 9 相同。牛脾磷酸二酯酶含有腺嘌呤(脱氧)核苷的脱氢酶 (上海实验生物研究所核酸研究组, 1973b), 使 dAR 变成 dIR。

2. dGpApCpG 的分析

dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz} 经氨解和酸解脱去保护基后变成 dGpApCpG, 用 DEAE-葡聚糖 A-25(HCO₃⁻型) 柱层析来鉴定它的纯度 (见图 11), 然后进行酶解分析 (见图 12 和 13)。它的光谱性质和酶解分析结果见表 3。

3. dGpApCpGpApG 的分析

dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz} 经氨解和酸解脱去保护基后变成 dGpApCpGpApG, 用 DEAE-葡聚糖 A-25(HCO₃⁻型) 来鉴定纯度 (见图 14), 然后进行酶解分析 (见图 15 和 16)。它的光谱性质与酶解分析结果见表 3。

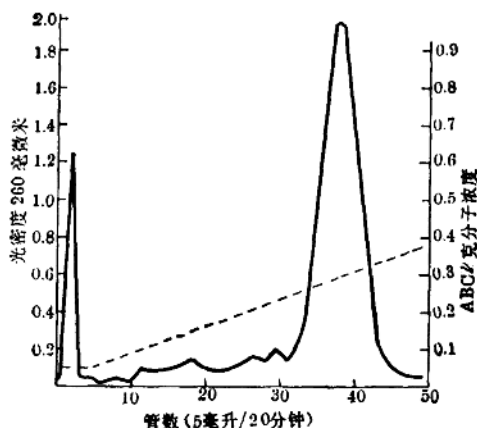


图 11 dGpApCpG 在 DEAE-葡聚糖 A-25 (HCO_3^- 型) (0.32×65 厘米) 柱上的层析图谱
柱用 0.05 M ABC 溶液 ($\text{pH } 8.5$) 平衡。上样后
用上述平衡溶液洗, 然后接梯度 $0.05 \sim 0.5 \text{ M}$ ABC
C 溶液 ($150 \sim 180$ 毫升) 洗脱 (ABC 溶液为碳酸
氢铵)。

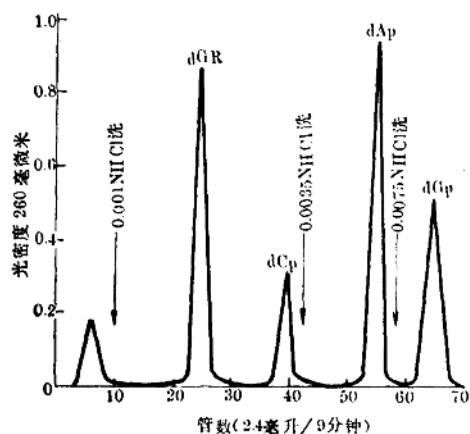


图 13 dGpApCpG 的牛脾磷酸二酯酶解产
物在强碱性阴离子交换树脂 (交联度为 2, Cl^- 型,
 0.3×5 厘米) 柱上的分离图谱
洗脱条件与图 12 相同。

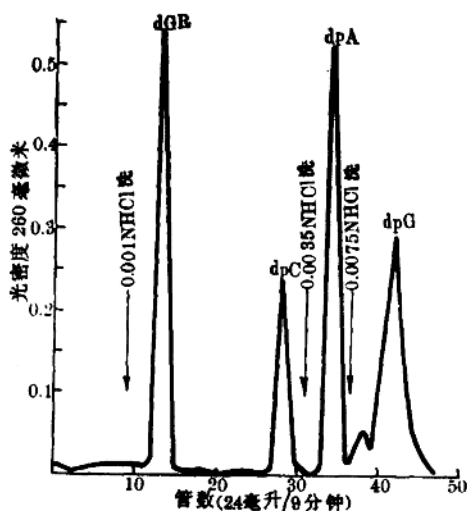


图 12 dGpApCpG 的枯青霉磷酸二酯酶解
产物在强碱性阴离子交换树脂 (交联度为 2, Cl^-
型, 0.3×5 厘米) 柱上的分离图谱
图中的箭头表示分级洗脱的 HCl 浓度变换。

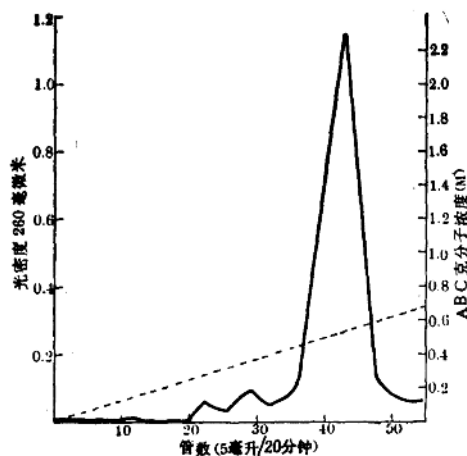


图 14 dGpApCpCpApG 在 DEAE-葡聚糖
A-25 (HCO_3^- 型, 0.32×50 厘米) 柱上的层析图谱
柱用 0.05 M ABC 溶液 ($\text{pH } 8.5$) 平衡。上样后
用上述平衡液洗, 然后接梯度 $0.1 \sim 0.7 \text{ M}$ ABC
溶液 ($200 \sim 200$ 毫升) 洗脱。

二酯法合成的长片段寡聚核苷酸, 一般是采用 MMTr 基团来保护寡核苷酸的 5' 端羟基, 以便向 3' 方向延伸 (Weber and Khorana, 1972)。由于 MMTr 基团的亲脂性, 故而

使带有 MMTr 基团的寡核苷酸能在某些有机溶剂内溶解, 随着链的增长, MMTr 基团在整个分子内所占的比重越来越小, 因而寡核苷酸在某些有机溶剂内的溶解度也就越来越低。根据这一性质的变化, 用有机溶剂抽提方法可将一些带有 MMTr 基团的寡核苷

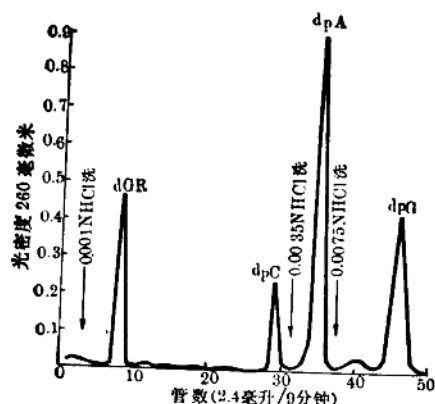


图 15 dGpApCpGpApG 的枯青霉磷酸二酯酶解产物在强碱性阴离子交换树脂(交联度为 2, Cl⁻型 0.3×5 厘米)柱上的分离图谱
分离条件与图 12 相同。

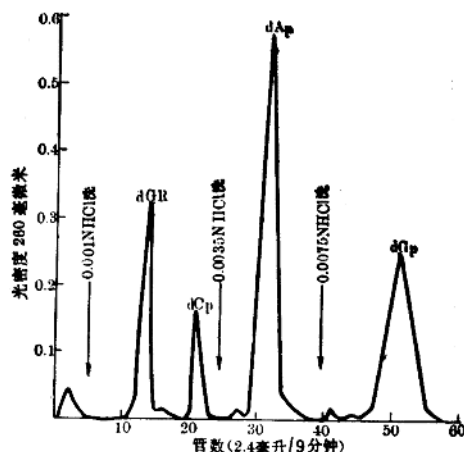


图 16 dGpApCpGpApG 的猪脾磷酸二酯酶解产物在强碱性阴离子交换树脂(交联度为 2, Cl⁻型, 0.45×7 厘米)柱上的分离图谱
分离条件与图 12 相同。

表 3 脱保护基产物的光谱性质与酶解分析结果

脱保护基产物	光 谱 性 质*						酶解分析(碱基的克分子比例)									
	$\lambda_{\min}$ (nm)	$\lambda_{\max}$ (nm)	A250/A260		A280/A260		A290/A260		枯青霉磷酸二酯酶				脾磷酸二酯酶**			
			实验值/计算值		实验值/计算值		实验值/计算值		dGR:dAp:dCp:dGp				dGR:dAp:dCp:dGp			
dGpA	282	255	1.01	0.96	0.44	0.40	0.19	0.15	1.00	1.01			1.00			1.05
dGpApCpG	230	255	1.02	0.98	0.60	0.61	0.27	0.26	1.01	0.92	1.00	1.00	1.06	1.00	1.01	1.00
dGpApCpG pApG	235	255	1.02	0.98	0.49	0.48	0.21	0.18	1.04	2.00	1.03	1.98	1.10	2.00	1.06	1.89

* 样品溶解在 ABC 溶液内, 以水作对照测定紫外吸收光谱。

** dGpA 和 dGpApCpG 用牛脾磷酸二酯酶酶解, 因为这个酶含有腺嘌呤(脱氧)核苷脱氨酶, dGpA 分析时的核苷为 dIR, dGpApCpGpApG 用猪脾磷酸二酯酶酶解。

酸进行有效的分离, 从而避免烦琐的费时的和制备量受到一定限制的离子交换柱层析。目前, 用溶剂抽提方法可将所有带 MMTr 基团的二核苷一磷酸进行分离。有人也曾对带 MMTr 基团的三核苷酸 (Weber and Khorana, 1972) 和五核苷酸 (Caruthers and Khorana, 1972) 进行溶剂抽提分离, 但因纯度不高, 后用 DEAE-纤维素柱层析来纯化。

我们合成的 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}, dMMTrGq^{Bz}A^{Bz}pC^{An}pG^{Bz} 和 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz} 三个片段都是采用抽提法分离, 它们的纯度经脱保护基后用电泳, DEAE-葡聚糖 A-25 离子交换层析鉴定, 分别能达

到 95%, 90% 和 85%。为了检查带保护基的六核苷酸纯度, 我们使用含有 3 M 尿素的 DEAE-葡聚糖 A-25 柱层析来分离抽提之后的 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz} (见图 17)。抽提分离的产品主要为一个洗脱峰, 抽提分离产品未经纯化, 可直接用于九核苷酸的合成 (dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}pTpC^{An}pC^{An}) (上海实验生物研究所三室核酸研究组, 1976)。

溶剂抽提分离带 MMTr 基团的寡核苷酸, 有以下几个优点: (1) 避免烦琐的和费时的离子交换柱层析, 使产品分离步骤大大简化, 从而缩短了化学合成的实验周期; (2) 合

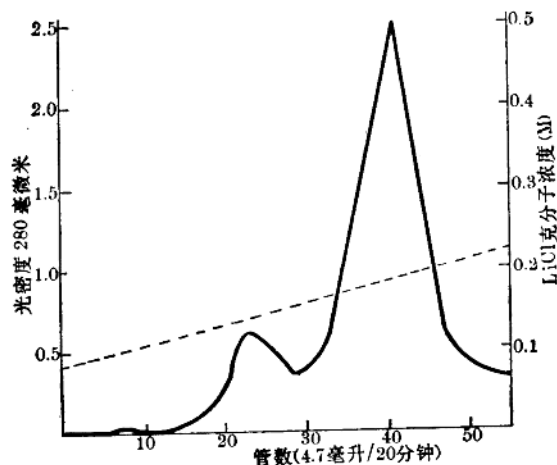


图 17 $dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pC^{Bz}$ 在 DEAE-葡聚糖 A-25(Cl⁻型)(0.44×60 厘米)柱上的层析图谱
柱用 0.05 M LiCl 3 M 尿素 0.02 M Tris-HCl(pH 7.5) 40% 乙醇溶液平衡。上样后用上述平衡液洗, 然后接
梯度 0.08~0.28 M LiCl 3 M 尿素 0.02 M Tris-HCl(pH 7.5) 40% 乙醇溶液(200~200 毫升)洗脱。

成的量不受离子交换柱的体积限制, 适用于大量制备; (3) 分离的条件设备简单, 而且又可节省树脂、试剂和药品。如果将溶剂抽提和三苯甲基纤维素亲和层析或其他亲和层析方法结合起来使用, 有可能将更长的片段进行分离。

(1975 年)

参考资料

- 上海实验生物研究所核酸研究组, 1973a。多聚核苷酸的合成与研究, I. 脱氧核糖四核苷酸 $dpTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz}_{OH}$ 的化学合成, 上海实验生物研究所, 1969~1972 研究工作成果汇编 108~124。
- 上海实验生物研究所核酸研究组, 1973b。多聚核苷酸的合成与研究, II. 脱氧三核苷二磷酸 $dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{Bz}_{OH}$ 的化学合成, 上海实验生物研究所, 1969~1972 研究工作成果汇编 125~136。
- 上海实验生物研究所核酸研究组, 1973c。多聚核苷酸的合成与研究, III. 脱氧核糖三核苷酸 $dpG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}_{OH}$ 的化学合成, 上海实验生物研究所 1969~1972 年研究工作成果汇编 137~143。
- 上海实验生物研究所三室核酸研究组, 1977。多聚核苷酸的合成与研究, VI. 脱氧核糖十三核苷酸 $dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}pTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz}pG^{Bz}pA^{Bz}pA^{Bz}$ 的化学合成, 见本汇编 11~15 页。
- Agarwal, K. L., H. Büchi, M. H. Caruthers, N. Gupta, H. G. Khorana, K. Kleppe, A. Kumar, E. Ohtsuka, U. L. Rajbhandary, J. H. van de

- Sande, V. Sgaramella, H. Weber, and T. Yamada, 1970. Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Nature*, **227**, 27~34.
- Agarwal, K. L., A. Yamazaki, P. J. Cashion, and H. G. Khorana, 1972. Chemical synthesis of polynucleotides. *Angew. Chem. internat. Edit.*, **11**, 451~459.
- Agarwal, K. L., A. Yamazaki, and H. G. Khorana, 1971. Studies on polynucleotides. XCVIII. A convenient and general method for the preparation of protected dideoxyribonucleotides containing 5'-phosphate end groups. *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 2754~2762.
- Caruthers, M. H., K. L. Agarwal, P. Besmer, P. J. Cashion, M. Fridkin, E. Jay, A. Kumar, P. Loewen, R. Miller, K. Minamoto, B. Rama Moorthy, A. Panet, J. H. Vande Sande, T. Sekiya, N. Siderova, H. G. Khorana, 1973. Synthesis of the gene for the precursor of E. Coli tyrosine suppressor transfer RNA Ninth International Congress of Biochemistry, Stockholm, Abstract 3010, p. 194.
- Cashion, P. J., M. Fridkin, K. L. Agarwal, E. Jay, and H. G. Khorana, 1973. Use of trityl- and 2-Naphthylcarbamoyl cellulose derivatives in oligonucleotide synthesis. *Biochemistry*, **12**, 1985~1990.
- Weber, H. and H. G. Khorana, 1972. CIV. Total synthesis of the structural gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Chem.*

- cal synthesis of an leosadeoxynucleotide corresponding to the nucleotide sequence 21 to 40., *J. Mol. Biol.*, **72**, 219~219.
- Caruthers, M. H. and H. G. Khorana, 1972, CNI, Total synthesis of the structural gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. Synthesis of a dodecadeoxynucleotide and a heptadeoxynucleotide corresponding to the nucleotide sequence 66 to 77, *J. Mol. Biol.*, **72**, 407~426.
- Köster, H., W. Kaiser, 1974. Note on an improved chromatographic Separation of oligonucleotides, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **2**, 336~341.

多聚核苷酸的合成与研究

V. 脱氧核糖十核苷酸 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}pTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz}_{OH} 的化学合成

核酸研究组
(第三研究室)

引言

带保护基的脱氧核糖十核苷酸 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}pTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz}_{OH} 的化学合成途径为: 先将 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}与 dpC^{An}pG^{Bz}_{OH} 缩合成四核苷酸; 然后与 dpA^{Bz}pG^{Bz}_{OH} 缩合, 分离得到六核苷酸, 即 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}_{OH}, 最后再与 dpTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz}_{OH} 以同样方法制备成脱氧十核苷酸片段, dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}pTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz}_{OH}, 如图 1 所示。

材料和方法

合成中所用的各种小片段核苷酸均为本

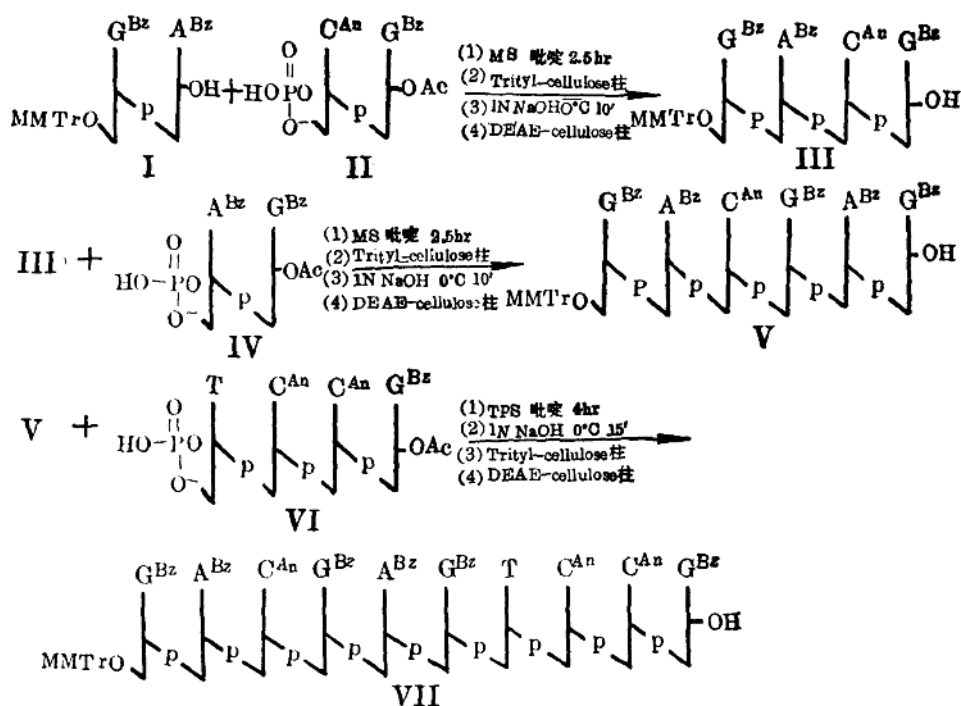


图 1 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}pTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz}_{OH} 的化学合成途径

研究组自己制备(上海实验生物研究所核酸研究组,1973a, 1973b),三苯甲基纤维素(上海实验生物研究所核酸研究组, 1973c)及桔青霉磷酸二酯酶(上海实验生物研究所核酸研究组,1973a)皆系本组制备。

一般方法及缩写符号等详见本文第一篇(上海实验生物研究所核酸研究组,1973a)。

结果和讨论

(一) $dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG_{OH}^{Bz}$ 的合成

二核苷酸 $dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}$ (0.1 毫克分子)和 $dpC^{An}pG_{OH}^{Bz}$ (0.3 毫克分子)反复用无水吡啶带到无水,最后溶于 4 毫升无水吡啶,加 MS(0.8 毫克分子),密封,避光,室温振荡 2.5 小时后,加入 1 M 二异丙基乙基胺(1.6 毫克分子)的吡啶溶液,数分钟后,再加 5.3 毫升水,室温放置过夜。反应液减压浓缩到糖浆状,加 500 毫升 0.05 M TEAB 的 10% 乙醇溶液,于 4°C 左右进行三苯甲基纤维素柱(3.3×13 厘米)分离(方法主要参考 Khoran a,1973a)。上样后,先用三倍柱体积的 0.05 M TEAB-10% 乙醇溶液洗,再用 0.05 M TEAB-30% 乙醇溶液洗至 280 毫微米吸收接近基数,最后用 0.3 M TEAB-95% 乙醇溶液洗脱,收集得到 280 毫微米吸收为 3623。减压浓缩至小体积,用 50% 吡啶水稀释到 20 毫升,在 0°C 加 20 毫升 2 N NaOH 皂化 10 分钟,加入过量吡啶型阳树脂中和,过滤,用 40% 乙醇反复洗涤树脂,合并滤液。在 10°C 上 DEAE-纤维素柱(HCO₃⁻型)(1.8×88 厘米)分离(柱预先用 0.02 M TEAB-40% 乙醇溶液平衡),用 0.02~0.3 M TEAB (内含 40% 乙醇)(2 升/2 升)梯度洗脱,流速为 14 毫升/25 分钟,洗脱图形见图 2。峰 III 经鉴定为四核苷酸, $dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG_{OH}^{Bz}$ 。280 毫微米吸收为 1297,分离产率为 20.4%。减压浓缩脱盐,溶于无水吡啶或用乙醚沉淀成干

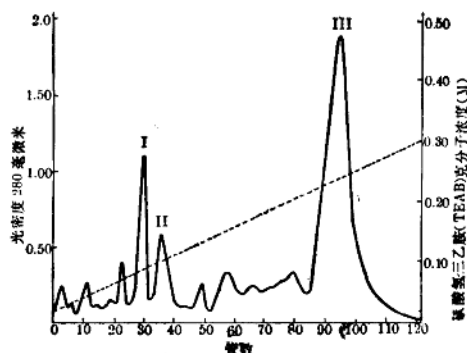


图 2 $dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG_{OH}^{Bz}$ 在 DEAE-纤维素柱层分离图

柱(1.8×88厘米) 0.02 M TEAB 含 40% 乙醇平衡,样品上柱后,继续用 0.02 M TEAB-40% 乙醇洗约两个柱体积,接 0.02 M~0.03 M TEAB (含 40% 乙醇) 各 2 升梯度洗脱,流速 14 毫升/26 分钟 1 管,峰 III 为四核苷酸。

粉,低温保存。

(二) 六核苷酸 $dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG_{OH}^{Bz}$ 的合成

四核苷酸 $dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG_{OH}^{Bz}$ (0.10 毫克分子)和 $dpA^{Bz}pG_{OH}^{Bz}$ (0.51 毫克分子)用无水吡啶 2.5 毫升溶解,加 MS(1.83 毫克分子),室温反应 2.5 小时,按常规停止反应和浓缩。糖浆状样品用 0.05 M TEAB 溶液 500 毫升溶解,在 4°C 用三苯甲基纤维素柱(1.7×20 厘米)分离(预先用 0.05 M TEAB 溶液平衡),上样后,继续用平衡液洗 3 个柱体积,然后改用 0.1 M TEAB-40% 乙醇溶液洗。在流出液的 280 毫微米吸收接近基数后,用 0.5 M TEAB-80% 乙醇溶液洗脱,收集得到 280 毫微米光吸收为 12,020。浓缩,皂化(条件同四核苷酸),用醋酸型 DEAE-纤维素柱(2.5×112 厘米)进一步分离。柱预先在 10°C 左右用 0.05 M TEAA(醋酸三乙胺)-47.5% 乙醇溶液平衡,上样后,接 0.1~0.454 M TEAA(内含 47.5% 乙醇)(5 升/5 升)梯度洗脱,流速 1 毫升/1 分钟,洗脱图形见图 3。峰 II 为所需的六核苷酸 $dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG_{OH}^{Bz}$, 280 毫微米光吸收为 4473,产率

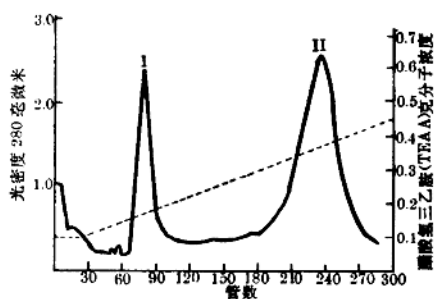


图3 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}C^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}的柱层析分离

DEAE-纤维素(Ac-型),柱(2.5×112.5厘米);柱须先用0.05 M TEAA,47.5%Alc平衡,样品上柱后,接0.1 M~0.454 M TEAA,47.5%乙醇,各5500毫升梯度洗脱,流速15.5毫升/15分钟/管,每三管测一数据作图。峰I为dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz},峰II为所需要的六核苷酸dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}。

47.3%,纯度87%。浓缩,脱盐,溶于无水吡啶,低温保存。

(三) 脱氧核糖核苷酸 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}pTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz}的合 成

将 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz} (280 毫微米光吸收为 1147 单位, 12 微克分子) 和 dpTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz} (47.5 微克分子) 混溶于吡啶水溶液中, 加计算量的三正丁胺使样品转变为三正丁胺盐以增加样品溶解度。然后用无水吡啶反复减压浓缩至无水。最后溶于 1 毫升无水吡啶, 加入事先经重结晶和干燥的 TPS (0.228 毫克分子)。密封, 避光, 反应 3.5 小时, 干冰冷却至 -20°C, 加入含有 0.456 毫克分子的 1 M 二异丙基乙基胺的吡啶溶液, 约 5 分钟后, 再加 1.5 毫升水, 室温放置过夜。反应液用 20% 吡啶水稀释到 9 毫升, 加 2 N NaOH 9 毫升, 0°C 皂化 15 分钟。加吡啶型阳树脂中和, 过滤, 用 30% 吡啶水反复洗涤树脂, 合并滤液。在 25°C 以下减压浓缩至 3 毫升左右, 加 0.05 M TEAB 溶液稀释到 500 毫升。在 4°C 条件下, 上三苯甲基纤维素柱 (0.3×14 厘米)。上柱后, 继续用

0.05 M TEAB 溶液洗涤三个柱体积, 然后, 改用 0.1 M TEAB-40% 乙醇溶液洗至 280 毫微米光吸收接近基数, 最后用 0.5 M TEAB-80% 乙醇溶液洗脱, 各部分洗脱液的纸层析鉴定结果见图 4。第 II 部分 280 毫微米光吸

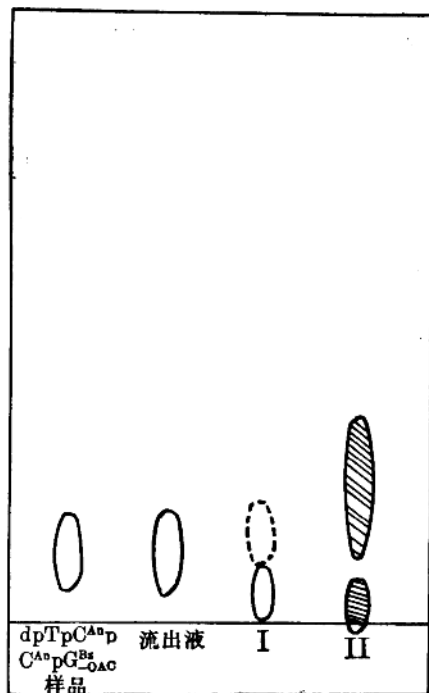


图4 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}pTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz} 三苯甲基纤维素柱分离所得各部分的纸层析图谱

溶剂系统: 异丙醇-浓氨水-水(7:1:2V/V)上行;
○ 紫外光下呈紫色吸收, 半胱氨酸显色法变红色;

● 紫外光下呈黄色光, 半胱氨酸显色法先桔黄后变橙红。

流出液主要是 dpTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz};

I. 为 0.1 M TEAB-40% 乙醇洗出部分, 纸层析分析为 dpTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz} 及其焦磷酸;

II. 为 0.5 M TEAB-80% 乙醇洗出部分, 为含有 MMTr 的六核苷酸及十核苷酸。

收为 1055。25°C 以下反复加吡啶水减压浓缩, 残渣溶于 0.05 M TEAB-60% 乙醇溶液 300 毫升。在 4~7°C 进行 DEAE-纤维素柱(碳酸氢型) (1.2×85 厘米) 柱层析分离。

上样后,继续用 0.05 M TEAB-60% 乙醇溶液洗三个柱体积,接第一梯度,0.15~0.5 M TEAB 溶液内含 60% 乙醇(500 毫升/500 毫升)洗脱,峰 I(图 5)出来后,改接第二梯度,0.45~1 M TEAB-60% 乙醇溶液(500 毫升/500 毫升),流速 0.7 毫升/1 分钟,(在整个柱层析过程中,洗脱液混合瓶中不断通入 CO_2 气体,以维持 TEAB 的 pH 在 7.5 左右)。峰 II 主要含十核苷酸,280 毫微米光吸收为 157.5,产率 13%。25°C 以下反复加吡啶浓缩峰 II,除去 TEAB。最后,溶于无水吡啶于低温冰箱保存。

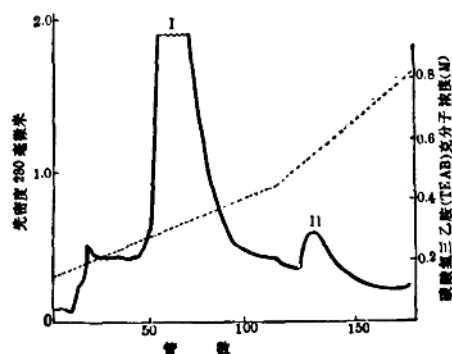


图 5 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}G^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}pTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz} 的柱层析分离图

DEAE-纤维素(CO_3^-)柱(1.22×85厘米);先接 0.15 M~0.45 M TEAB 内含 60% 乙醇各 500 毫升梯度洗脱,再接 0.45 M~1.04 M TEAB, 内含 60% 乙醇,各 500 毫升梯度洗脱,流速 14 毫升/20 分钟/管,分离温度 3°~5°C,峰 II 主要含十核苷酸。

(四) 三苯甲基纤维素在分离产物中的应用

三苯甲基纤维素的特点是能选择性地吸附带单甲氧三苯甲基(简称 MMTTr)的寡核苷酸片段。因此,在合成反应混合液中,不带 MMTTr 的片段及其自身所形成的对称性焦磷酸酯与三苯甲基纤维素树脂的亲和力较弱,可用较低的盐浓度和醇浓度的溶液先洗掉,然后再用高浓度的盐及乙醇溶液把与树脂亲和力强的带 MMTTr 的片段洗脱下来,

为产物在 DEAE 纤维素柱上进一步分离纯化创造较好的条件。在十核苷酸合成反应混合液中,原料、产物及各种付产物十分复杂,经上三苯甲基纤维素柱后,先用 0.1 M TEAB-40% 乙醇溶液洗去 dpTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz} 及其对称性焦磷酸酯,和一些不带 MMTTr 基的付产物,再用 0.5 M TEAB-80% 乙醇溶液洗下带 MMTTr 的片段,主要是 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz} 和 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz}pTpC^{An}pC^{An}pG^{Bz} 这样使十核苷酸的分离简单化了。另外,由于三苯甲基纤维素树脂对苯甲酰基、对甲氧苯甲酰基也有一定的亲和力,根据片段中含这些基团的多寡,从树脂上洗脱不带 MMTTr 的寡核苷酸所需的盐和醇的浓度也有差别。例如,四核苷酸上样后、先用 0.05 M TEAB-30% 乙醇溶液洗脱,在六核苷酸是用 0.1 M TEAB-35% 乙醇溶液洗脱,而在十核苷酸,则要用 0.1 M TEAB-40% 乙醇溶液洗脱。

三苯甲基纤维素柱层析,整个过程要在 2°~4°C 进行,温度高会影响树脂对样品的吸附,对分离不利。

四核苷酸、六核苷酸经上三苯甲基纤维素柱后,再用 DEAE-纤维素柱进行分离,可使产物纯度提高。

对带 MMTTr 及不带 MMTTr 基团的寡核苷酸纸层析斑点的鉴定:我们采用 0.5% 半胱氨酸配置在 3 N H_2SO_4 中进行喷雾,加温后,凡含 MMTTr 的产物先显示桔黄再变成橙红,不含 MMTTr 的则只显示红色、此法简便,灵敏可靠。

(五) 产物的酶解分析

六核苷酸 dMMTrG^{Bz}pA^{Bz}pC^{An}pG^{Bz}pA^{Bz}pG^{Bz} 按常规氨解,酸解脱去保护基后,上碳酸氢型 DEAE-Sephadex A-25 柱(0.3×80 厘米),室温进行分离,产品比较单纯,详见图 6,峰 I 是保护剂,峰 II 为 dGpApCpGpApG。峰 II 经枯青霉磷酸二酯酶酶解和阴离子交换树脂柱层析,得碱基组成的克分子比例