

RNA 3'-末端 ³²P 标记及其核苷酸简易测定

程振起 赵林¹⁾ 赵冕 魏西平 李楠茜

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

近几年来,遗传的物质基础,即脱氧核糖核酸(DNA)序列分析技术,有了重大突破^[5,7]。对核酸的结构与功能、基因表达、调控等研究起了巨大的推动作用。核糖核酸(RNA)序列分析工作,在经典方法的基础上,借鉴于DNA序列分析方法,也得到了迅速的发展^[2,6]。简易直读技术也广泛应用于RNA序列研究中。DNA或RNA序列分析,多采用体外放射性同位素标记示踪法,其中用放射性磷 [³²P] 标记核酸的5'-或3'-末端,是研究核酸结构必不可少的手段。

若在RNA分子的3'-末端装上多聚腺嘌呤核苷酸,利用逆转录酶将其反转录成cDNA,测定cDNA序列,需要专一性引物,合成专一性引物也需要知道RNA分子的末端一个核苷酸。

本文介绍了利用RNA连接酶标记RNA(包括双链RNA)分子的3'-末端简易技术和RNA分子末端核苷酸的简易测定方法。

材料与 方法

(一) 材料 蕃茄叶 5SRNA、银杏树叶 5SRNA 和国内家蚕多角体病毒双链 RNA (CPV RNA) 均由本实验室制备。T4 多核苷酸激酶、T4 RNA 连接酶,为中国科学院生物物理所生化厂生产。核糖核酸酶 T1 (RNase T1)、核糖核酸酶 T2 (RNase T2)、牛胰核糖核酸酶 (RNase A),由西德 Boehringer Mannheim GmbH 进口。[γ -³²P]-ATP 系由生物物理所二室合成,比强 5Ci/mMole。丙烯酰胺,为天津化学试剂厂产品。甲叉双丙烯酰胺,匈牙利 Reanol 产品。DEAE-纤维素纸(以下简称 DEAE-纸)、Wha-

tman No. 3 滤纸,为英国 Whatman 公司产品。

(二) 方法

1. 植物 5SRNA 和家蚕多角体病毒双链 RNA 的纯化 从蕃茄叶及银杏树叶中分离纯化 5SRNA 和从家蚕细胞质多角体病毒中分离纯化双链 RNA 的简单方法参见文献[1]。

2. RNA 3'-末端标记^[3] 分两步进行。

(1) [³²P] pCp 的制备: 反应混和物总体积为 100 μ l, 其组分为 60nMole 3'-CMP, 100 μ Ci (5'-³²P) ATP (约 20nMole), T4 多核苷酸激酶 40 单位。反应缓冲系统为 25mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl₂, 5mM DTT。37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟,沸水浴煮 3 分钟,0 $^{\circ}$ C 保存备用。

(2) RNA 3'-末端标记: 反应混合物总体积为 100 μ l, 其组分为 5SRNA (或 CPV RNA) 50 μ g, [³²P] pCp 40 μ l (上述反应混合物), ATP 60mM, T4 RNA 连接酶 10 单位。反应缓冲系统为 25mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl₂, 牛血清蛋白 10 μ g/ml, 3.3mM DTT。4 $^{\circ}$ C 保温 24 小时。

3. 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离与放射自显影在标记 RNA-X³²pCp²⁾ 的反应液中,加入 1/3 体积的饱和蔗糖-溴酚兰溶液,混合均匀,加至聚丙烯酰胺板状凝胶样品槽内(10% 凝胶用于分离 5SRNA, 3% 凝胶用于分离 CPV RNA)。丙酰胺:甲叉双丙烯酰胺 = 19:1, 板胶尺寸

Cheng Zhenqi et al.: Labelling RNA at 3'-end and a Simple Method for Determination of Nucleotide at 3'-end of RNA

1) 中国科学院武汉病毒所。

2) RNA-X³²pCp 中的 X 为 RNA 3'-末端核苷酸, ³²pCp 为标上胞嘧啶核苷 5', 3'-二磷酸。

为 $20 \times 10 \times 0.1$ 厘米, 600 伏, 电泳 3 小时。电泳后取下凝胶板的上层玻璃板, 用含有 ^{32}P 的红墨水标出染料带的位置, 用塑料膜将凝胶连同下层玻璃板包好, 在暗室中用 X-光底片曝光。

4. 标记的 5S RNA- $X^{32}\text{pCp}$ 从凝胶向 DEAE-纸转移 按照凝胶放射自显影谱带的位置, 切下凝胶上含标记物的胶条(约 10×1 毫米), 置于一张 DEAE-纸上, 在胶条上加一滴转移溶液 ($1\text{M NH}_4\text{Ac}$, $\text{pH}4.5$, 0.1mM EDTA), 覆盖上一块用过的 X-光底片, 再压上一块玻璃板(见图 1)。 37°C 过夜。

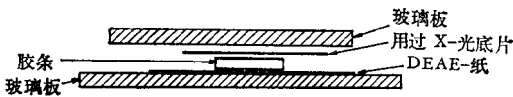


图 1 3'-端标记 5S RNA 从凝胶向 DEAE-纸转移方法

5. DEAE-纸上原位酶解 标记物从胶条向 DEAE-纸充分转移后, 取走胶条, 在 DEAE-纸的转移位置上滴加 $10\mu\text{l}$ 混合酶液 ($1.0\text{ml } 0.1\text{M NH}_4\text{Ac}$, $\text{pH}4.5$, 含 RNase T1 500 单位, RNase T2 200 单位, RNase A $500\mu\text{g}$), 立即用塑料薄膜包好, 37°C 保温 5—6 小时。

6. 纸电泳分离鉴定 原位酶解后, 剪下酶解位置的 DEAE-纸片 (10×1 毫米), 加上 $2\mu\text{l}$ 含有非放射性标记的 4 种核苷-3'-单磷酸混合液 (AMP、CMP、GMP、UMP, 浓度为 1mg/ml) 作为标准物, 用胶水将纸片贴在 Whatman No. 3 滤纸基线上, 于 0.02M 柠檬酸钠缓冲系统 ($\text{pH}3.5$) 电泳, 500 伏, 5 小时。在紫外灯下划出 4 种单核苷酸的位置, 在暗室中对 X-光底片曝光。

结果与讨论

我们采用较简单的方法, 从 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ 开始, 经 T4 多核苷酸激酶作用, 在 3'-CMP 的 5' 端标记上 ^{32}P (即 ^{32}pCp)。未经分离, 即应用上述标记混合物, 又经 T4 RNA 连接酶的作用, 将 ^{32}P 标记物连接到 RNA 的 3'-末端(即 RNA- $X^{32}\text{pCp}$)。用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 从上述标

记的混合物中分离纯化出 RNA- $X^{32}\text{pCp}$ (见图 2)。

为了测定标记 RNA 的 3'-末端产物, 我们建立了方便的 DEAE-纸转移方法, 测定了蕃茄叶 5S RNA (已知序列) 的 3'-末端核苷酸和银杏树叶 5S RNA (未知序列) 的 3'-末端核苷酸。结果证明这两个 3'-末端核苷酸均为尿嘧啶核苷酸(见图 3)。

在制备 $[5\text{-}^{32}\text{P}] \text{pCp}$ 标记物和 RNA 3'-末端标记过程中, 为了简化操作步骤, 反应充分, 缩短实验周期, 我们采用如下措施:

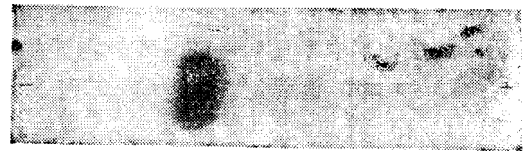
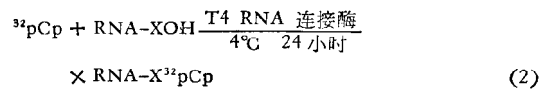
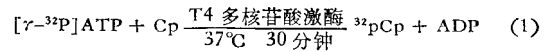


图 2 10% 聚丙烯酰胺凝胶分离蕃茄叶 5S RNA- $X^{32}\text{pCp}$ 的放射自显影图谱

第一, 在反应(1)中, 反应物 Cp 的量超过 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ 量的 3—5 倍(按克分子比), 使 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ 得到充分利用。转化率可达 80% 以上。所得产物 ^{32}pCp 的比强与 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ 原比强相同。第二, 反应(1)结束后, 于 100°C 水浴煮 3 分钟, 使 T4 多核苷酸激酶失活, 无需分离产物 ^{32}pCp 。在反应液中, 残留的 ATP 和 Cp 均对下一步标记无影响, 可直接应用原反应液。第三, 反应(2)中, 使用 RNA 连接酶的突出优点, 是此酶制剂中无杂酶污染, 催化反应可在较低温度(4°C)下进行。连接产率大于 50%。以上优点均可避免在反应过程中 RNA 被降解的可能性, 连接产物呈单一带(见图 2)。

我们利用 T4 RNA 连接酶和 ^{32}pCp , 进行双链 RNA 分子的 3' 端标记, 空间障碍无影响, 标记却很容易。图 4 是 CPV RNA 3'-末端 ^{32}P 标记后经 3% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后的放射自显影图谱。它与非 ^{32}P 标记的 CPV RNA 凝胶电泳分离染色图谱^[4] 完全一致。强放射性

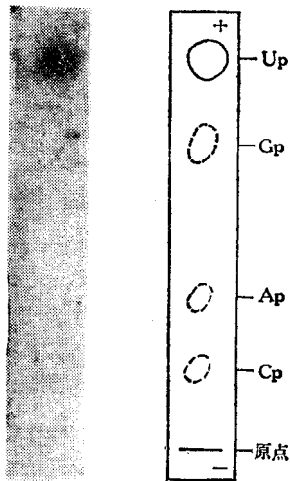


图3 pH3.5 纸电泳分离鉴定4种单核苷酸图谱

^{32}P 标记双链 RNA 的末端,能为分析双链 RNA 分子的序列,研究其结构与功能关系及其病毒致病机理,提供方便途径。

3'-末端标记 5S RNA 产物经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后(见图2),向 DEAE-纸转移的转移率较高,可达 70% (测量纸片与胶条放射性,计数后计算)。若转移效果不好,可用同样方法,对原胶条进行二次或三次转移。转移后,含有 RNA 标记物的 DEAE-纸片,经混合酶解后,可得到 3'-末端标记的单核苷酸 X^{32}P 产物。由于 DEAE-纸带有 DEAE 基团,因此转移的 RNA 或降解的单核苷酸都不会产生扩散现象。

pH3.5 纸电泳分离鉴定 4 种单核苷酸是有效的经典方法,电泳分离过程中尽管被分离物有从 DEAE-纸向一般滤纸的转移过程,但由于 DEAE-纸片很窄,对分离效果无影响(见图3)。

我们采用的测定 RNA 末端核苷酸简易方

法与目前常用的方法(包括从凝胶上抽提 RNA、离心、透析、冷冻、干燥等步骤)相比较,具有操作简便、节省人力、灵敏度高等优点,对于小分子 RNA 混合物中某一 RNA 末端核苷酸,可不用预先纯化分离,只要将混合物末端标记电泳分离,即可选择性地转移其中的某一 RNA 分子带,进行末端测定。本文介绍的简易方法,为探讨由蛇毒二酯酶部分降解的 RNA 片段进行 3' 端标记,直接测定其序列的可能性,提供了条件。

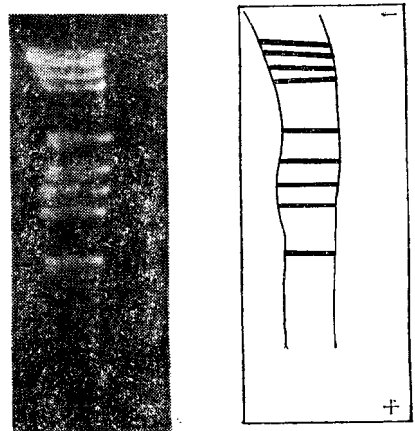


图4 3'端 ^{32}P 标记 CPV 双链 RNA 凝胶电泳分离放射自显影图谱(曝光时间 8 小时)

参 考 文 献

- [1] 赵累等: 1982. 植物学报, 24(1): 54.
- [2] Donis-Keller. H. et al.: 1977. *Nucleic Acids Res.*, 4: 2572.
- [3] England. T. E. et al.: 1980. *Methods in Enzymology*, 65: 65.
- [4] Iko Fujii-kauata. et al.: 1970. *J. Mol. Biol.* 51: 247.
- [5] Maxam. A. M. et al.: 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 560.
- [6] Peattie, D. A.: 1979. *ibid.*, 76: 1760.
- [7] Sanger, F. et al.: 1977. *ibid.*, 74: 5463.

(上接第 21 页)

参 考 文 献

- [1] 李懋学等: 1981. 遗传, 3(2): 31—33.
- [2] —————: 1981. 园艺学报, 8(4): 49—55.
- [3] —————: 1982. 植物学报, 24(1): 17—20.
- [4] Dark, S. O. S.: 1936. *J. Genet.*, 32: 353—372.
- [5] Giles. N.: 1941. *Torrey Bot Club* 68: 207—221.
- [6] Haga, T. and T. Ogata: 1956. *Cytologia*, 21: 11

—20.

- [7] Sax, K.: 1932. *J. Arnold Arb.*, 13: 375—384.
- [8] Stebbins, G. L.: 1938. *Genetics*, 23: 83—110
- [9] Stewart, R. N. et al.: 1943. *Amer. J. Bot.*, 30: 1—7.
- [10] Sunderland, N.: 1978. *Proceeding of Symposium on Plant Tissue Culture*, Science Press, Peking, pp. 65—86.