

DNA 化学合成

基因是由具有特定的核苷酸顺序的核酸组成的功能单位，它携有特定的遗传信息，在染色体上按一定的顺序排列。基因的基本单位为核苷酸，每个核苷酸包含三种成分：碱基、戊糖和磷酸。DNA 的单体单位为脱氧核苷酸，其中戊糖是 D-2-脱氧核糖。四种碱基分别为腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)。

在核苷酸中两类杂环化合物嘧啶和嘌呤具有明显的芳香族特性。嘌呤本身可以认为是嘧啶的 1 种衍生物，它是 1 个嘧啶环和咪唑环耦合在一起组成的。在大多数细胞中，碱基只有少数呈游离或不结合形式存在，而且它们通常是酶水解核苷酸的产物。游离嘧啶和嘌呤碱基在水中是相对难溶解的，是弱碱性化合物，随 pH 不同能以两种或多种互变异构的形式存在。嘧啶碱基的第九氮原子或嘧啶碱基的第一氮原子与戊糖的第一碳原子形成 β -N 糖苷键通称核苷。核苷按所含糖的不同分为：D-核糖核苷类和 2-脱氧-D-核糖核苷类。在大多数细胞中只有微量的游离核苷存在。核苷比相应的碱基易溶于水，在不同 pH 条件下存在与碱基类似的互变异构，N-糖苷键对酸不稳定。核苷的磷酸酯称核苷酸。核糖有 3 个游离羟基，所以核糖核苷酸有 2'、3' 和 5' 核苷酸。脱氧核糖只有 2 个羟基可以酯化，故脱氧核糖核苷酸只有 3' 和 5' 核苷酸。核酸分子是由核苷酸通过 3' $\rightarrow$ 5' 磷酸二酯键连接而成。

DNA 的化学合成研究始于 50 年代。1952 年阐明核酸大分子是由许多核苷酸通过 3' $\rightarrow$ 5' 磷酸二酯键连接起来的这个基本结构以后，化学家们便立即开始尝试核酸的人工合成。英国剑桥大学 Todd 实验室于 1958 年首先合成了具有 3' $\rightarrow$ 5' 磷酸二酯键结构的 TpT 和 pTpT，此后，Khorana 等人对基因的人工合成作出了划时代的贡献，不仅创建了基因合成的磷酸二酯法，而且发展了一系列有关核苷酸的糖上羟基、碱基的氨基和磷酸基的保护基及缩合剂和合成产物的分离、纯化方法。到目前为此，使用的 DNA 合成方法有磷酸三酯法、亚磷酸酯法及亚磷酸酰胺法。此后又发展了固相化技术，实现了 DNA 合成的自动化。

由于合成技术的迅速发展，具有特定顺序的核酸合成取得了丰硕的成果。1972 年 Khorana 等人合成了相当于酵母内丙氨酸 tRNA 结构基因的 DNA 双链，1979 年完成了包括启动和调节顺序在内的共有 207 个碱基对的大肠杆菌酪氨酸校正 tRNA 基因。一系列蛋白和多基因，如胰岛素、生长激素、 α -和 β -干扰素、胸腺素和脑啡肽等相继合成并得到表达。我国科学工作者于 1981 年完成了酵母丙氨酸 tRNA 的全合成，这是世界上第一个人工合成的具有全部生物活性的 RNA 分子。DNA 的人工合成正在分子生物学和医学等许多领域中发挥越来越多的作用。

DNA 合成的含义是将核苷酸单体按 3'、5' 磷酸二酯键连接，使其具有天然的 DNA 分子的全部生物学活性和特定的排列顺序。由于核苷酸是一个多官能团的化合物，在连接反应中除了特定的基团会发生反应外，其它如核糖和磷酸羟基、碱基上的氨基等基团也会参加反应产生错接等，从而真正需要的产物的产率降低并且影响产物的分离纯化。因此，在 DNA 的化学合成中总是将暂时不需要的基团保护起来，并且在下一轮缩合反应之前将这些保护基有选择地除去，这样不断迅速形成专一的 3' $\rightarrow$ 5' 磷酸二酯键的特定核苷酸排列。

固相亚磷酸酰胺法是目前绝大部分 DNA 自动合成仪所使用的方法，合成的原理及步骤：首先将欲合成的寡核苷酸链 3' 末端核苷(N1) 以其 3' OH 通过 1 个长的烷基臂与固相载体(不溶性的高分子物质，常用的有硅胶 S、交联的聚苯乙烯、特殊孔径的多孔玻璃珠等)耦联、N1 的 5' OH 以二甲氧基三苯甲基(DMT)保护。然后从 N1 开始逐步地接长寡核苷酸链。1 个合成循环包括 4 步。第一步为去保护(deprotection)以苯磺酸(或三氯醋酸)处理带有保护基的核苷，去除 5' 末端的 DMT，暴露出 5' OH，经洗涤后进行下一步反应。第二步为耦联反应(coupling)：加入经四唑作用(激活)的核苷 N2，使之与核苷 N1 上的 5' OH 起耦联反应，乙腈洗涤。第三步为加帽反应(capping)：加入醋酐及二甲基氨基吡啶，使未参加反应的寡核苷酸链(2%以下)乙酰化，乙酰化的链不参加下一步反应，如此有利于纯化所需全长的 DNA 片段。第四步为氧化反应(oxidation)：加入经四唑作用(激活)的核苷 N2，使之与核苷 N1 上的 5' OH 起耦联反应，乙腈洗涤。第三步为加帽反应(capping)：加入醋酐及二甲基氨基吡啶，使未参加反应的寡核苷酸链(2%以下)乙酰化，乙酰化的链不参加下一步反应，如此有利于纯化所需全长的 DNA 片段。第四步为氧化反应(oxidation)，加入碘，使三价的亚磷酸转变为更稳定的五价磷酸。上述循环完成之后进行第二个合成循环。每经历一轮循环，接长 1 个核苷酸。接长的链始终被固定在不溶的固相载体上，过量的未反应物或分解物则通过过滤

或洗涤除去。当整个链达到预定的长度后，从固相载体上切下，脱去保护基(氨解)，并经过分离纯化得到所需要析最后产物。

DNA 的合成、纯化及鉴定

由于现代科学技术的发展，DNA 合成已广泛采用 DNA 自动合成仪，仅有少数特殊情况下采用人工合成。目前，主要有 ABI(Applied Biosystem Inc.)、Pharmacia、Backman 等几家公司生产 DNA/RNA 合成仪，其中以 ABI 公司的仪器占我国及世界市场的 80~90%。由于合成技术的现代化，人们已从繁重的劳动中得到解脱。输入合成仪的 DNA 序列，可以在数小时之内得到完成。我们所要做的工作只是合成柱取下，进行 DNA 切落和去保护基以及纯化，并进行量鉴定和计算合成率。

1. DNA 合成仪的操作(略)

2. DNA 原切落及去保护

取下 DNA 合成柱，置适量浓氨水(氢化铵，28%)中浸泡，一般为 1ml 氢氧化铵密封后 55℃保温：~15 小时，或 70℃保温 2 小时，使合成的寡核苷酸片段从载体上切落并去除 β-胍乙基磷酸保护基。

3. 寡核苷酸片段的纯化

1) .NAP 柱纯化：由 Pharmacia 公司生产，主要成分为 Sephadex G-25，经特殊处理后装成的不同体积的小柱常用的有 NAP-10。含寡核苷酸片段的氨水溶液，调整体积为 1ml 加样于 NAP-10 柱上(使用前，以 15ml 双蒸水平衡柱子)以 1ml 双蒸水洗脱，收集洗脱下的液体，即为纯化的寡核苷酸，NAP-10 柱可以纯化长度在 10mer 以上的寡核苷酸，产率在 90%以上。经 NAP-10 柱纯化后样品中盐的含量少于 3%，完全可以满足实验的需要。

2) .丙烯酰胺凝胶电泳纯化，从合成柱上洗脱的寡核苷酸片段，冰冻、干燥、去氨水，溶于适量水中后，占样于 15~20%丙烯酰胺凝胶制备胶上，按 10V/cm 条件电泳，过夜。电泳完毕后，取下凝胶于 EB 染色后观察，或直接将含寡核苷酸片段的凝胶置于硅胶荧光板上(CMC 板)紫外线灯下，根据分子量的标准切下所需的区段

(呈黑色)，将胶块置少量缓冲液(10mmol/L Tris·HCl, pH8.0, 1mmol/L EDTA 300mmol/L NaCl)，捣碎胶块，25~42℃浸泡过夜(4~24 小时)，或将胶块置于有少量缓冲液的透析袋中，通电下，寡核苷酸片段即进入透析袋中。洗脱的寡核苷酸核片段以酒精沉淀、洗涤，真空抽干后即可应用。

浸泡法简单，成本低，易操作。电泳法较快，回收产率高，但需鉴定。此外还有 HPLC(高效液相层析)，及寡核苷酸纯合柱(OPC, ABI 生产)等方法可以纯化寡核苷酸片段。可以根据手头的材料，仪器及使用习惯而加以选择。

4. 寡核苷酸片段的鉴定

可以采用 PAGE、HPLC、FPLC 等方法对合成的寡核苷酸进行鉴定。对于 10~100mer 的寡核苷酸，可以用 20%浓度的丙烯酰胺凝胶电泳，观察电泳区带即可判断合成片段的纯度及片段大小。如果结合 5' 或 3' 末端核素标记放射自显影技术则结果更加可靠。采用 FPLC 和 HPLC 鉴定合成片段的纯度，速度快，精确度高，但需昂贵的仪器设备。合成片段最精确的鉴定方法是采用 Maxam-Gilbert 化学法测定核苷酸序列。

5. 合成产物中 DNA 含量的测定

4 种碱基的平均最大吸收波长为 260nm。一般选用该波长测定 DNA 含量。测定前，稀释样品，使光吸收在 0.2~1.2OD 范围内。在石英比色杯中测定样品溶液光密度。

表 14-1 合成寡核苷酸片段粗产量

合成柱规格(m mol)	粗产量(OD ₂₆₀)
0.2	20~25
1.0	100~125
10.0	800~1000

产量=OD₂₆₀×25=OD₂₆₀ 实测值×稀释倍数×体积×25(m g/ml)一般认为对单链寡核苷酸片段，1OD₂₆₀=25mg/ml。
不同规格合成柱产量均不一样。

DNA 化学合成的应用

随着 DNA 合成技术的发展，特别是自动化合成技术的引入，人们能简便、快速、高效地合成其感兴趣的 DNA 片段。目前，DNA 合成技术已成为分子生物学研究必不可少的手段，并且已在基因工程、临床诊断和治疗、法医学等各个领域中日益发挥重要的作用。

1. DNA 合成在基因工程和分子生物学研究中的应用

1.1 合成基因

目前有许多基因和蛋白质的核苷酸和氨基酸序列已得到阐明，人们已经可以根据需要合成出具有实际应用和研究价值的多肽和蛋白质基因。已报道的合成基因有人生长激素、干扰素、胰岛素、表皮生长因子、白细胞介素 II、集落刺激因子等，这些基因均已被克隆，绝大多数已在原核和真核系统中获得表达。我国上海生物化学研究所等单位于 1984 年首次在上合成了具有生物学活性的酵母丙氨酸转移核糖核酸，为人类文明作出了应用的贡献。

目前，合成基因的方式有 2 种。①全基因合成：一般对于分子较小而又不易得到的基因采用该方式。可将双链基因分成若干寡核苷酸单链片段(尤其待合成基在在 100 个核苷酸以上时)，每个片段长度控制在 40~60 个碱基，并使每对相邻互补的片段之间有~6 个碱基交叉重叠。在体外将除基因两端末端外的所有片段磷酸化。混合退火后加入 DNA 连接酶，即可得到较大的基因片段。如果需连接亚克隆的方法，最后将亚克隆的较大片段重组为完整的基因。采用分步连接、亚克隆的方法时，为便于亚克隆中回收基因片段。应在片段两侧设计合适的酶切位点，由于每个亚克隆可以分别鉴定，从而可减少顺序错误的可能性。②酶促合成：此法又称基因的半合成。全基因，特别是较大的基因的全部化学合成成本昂贵，使用半合成的方法可以降低成本，从而利于普及使用。首先合成末端之间有 10~14 个互补碱基的寡核苷酸片段，退火后以重叠区作为引物，在 4 种 dNTP 存在的条件下，通过 DNA 聚合酶 I 大片段(Klenow 酶)或反转录酶的作用，获得两条完整的互补双链。在合成基因的结构中，应包括有克隆和表达所需要的全部信号及 DNA 顺序，基因密码的阅读框架也应该同表达体系相适应。此外，由于不同种类的生物体或密码子的使用都具有明显的选择性，在基因合成和克隆时必须考虑这个问题。选择合适的密码子，以获得高效表达。

1.2 合成探针

基因的克隆和分离已成为现代分子生物这研究必不可少的手段。DNA 合成技术在其中起着越来越重要的作用。它不仅使得过去颇费周折的基因筛选与鉴定成为常规技术，而且使得

克隆载体的构建及克隆基因和载体的连接变得更加容易和准确。蛋白质的结构可以通过 mRNA 的结构间接地得出。相反，如果已知某个肽段的氨基酸顺序，也可根据密码简并的原则推导出所有可能的 mRNA 序列密码。人工合成的具有特定顺序的寡聚 DNA 片段，已应用于筛选和鉴定重组质粒或 λ 噬菌体。实验证明用合成的寡核苷酸片段，即使只有 1 对碱基错配采用严谨条件杂交也能与完全互补的双链相区别。因此，使用作探针的寡核苷酸，应将密码的简并度调至最高限度时，可减少假阳性，增加筛选的准确率。

1.3 合成引物

1. 合成 PCR 引物进行基因扩增：PCR 技术是 80 年代中期发展起来的一种体外扩增特异 DNA 片段的技术。该法操作简便，可在短时间内在试管中获得数百万特异 DNA 序列拷贝。PCR 技术的特异性取决于所用引物和模板 DNA 结合的特异性。合成引物在 PCR 反应中的使用。

2. 序列测定用引物：DNA 序列测定是分子生物学中最重要和最精细的研究技术，其中最常使用的是末端终止法，即是一种依赖于特异 DNA 引物的序列测定方法，此外该法对模板的需要量较大，这就要求待测 DNA 片段尤其是拷贝数少的片段首先克隆到适合的载体中经过扩增后进行序列测定。常用的克隆载体如 M13、pUC19、PBR322 等均可购到有商品出售的公用测序引物。

3. 合成导入突变用的引物：利用寡核苷酸引导的突变，可在目的 DNA 序列的任何部分产生点突变、插入和缺失，从而使得基因编码的蛋白质在结构和功能上发生改变。

1.4 合成连接子和接头

在 DNA 重组中常需要将外源 DNA 片段插入某些载体 DNA 中。如果载体或外源 DNA 上没有合适的限制性内切酶位点，为提高插入效率或实现定向克隆，可采用合成连接子(linker)和接头(adaptor)的方法。使用连接子和接头需要插入片段是平末端，否则，首先需要用 DNA 聚合酶 I 大片段补齐或者用核酸酶 S1 或 Bal₃₁ 处理得到平末端后才可同连接子或接头连接。

具有多酶切点的接头(polylinker)还广泛应用于构建某些运载体，使之带有多个新的酶切位点。这在质粒 pUC 系列及用于序列分析的 M₁₃mp 噬菌体系统中都得到了广泛的应用。接头片段带用来调整表达载体的读码框架，用于基因表达及功能的研究。

2 合成基因在医学中的应用

随着科学技术的发展，人们对疾病的认识已逐步从整体和器官的水平深入到细胞分子水平。医学家发现，许多严重危害人类健康的疾病，如遗传性疾病、肿瘤、心血管疾病等可在基因结构上找到某些变化，如基因的缺失、突变、转位或致病左因的存在，以此作为证据亦可对这些疾病作同相应的判断。例如镰刀状细胞贫血症即是由于 A→T 突变造成 β -珠蛋白第六位谷氨酸变为缬氨酸，从而造成珠蛋白结构异常，并引起红细胞形态及对氧的亲合力发生改变。通过人工合成的 19 个核苷酸作为探针即可明确区别正常人、杂合和纯合的病人。目前，合成 DNA 探针已广应用于临床，成为一种有效的诊断手段。

2.1 用于遗传病的诊断

过去仅有少数遗传性疾病可以凭借蛋白质和酶学方面的异常作出判断，随着分子生物这的发展，对遗传病的诊断有了巨大的进步，出现了基因诊断法。医学上使用基因诊断法最早成功的报道是 1985 年 Saiki 等人对镰刀状红细胞贫血的诊断。另外，对于以突变为主的 β -地中海贫血，以合成 DNA 片段为探针，亦可得同满意的结果。

2.2 用于传染病的诊断

临床上对传染性疾病的传统诊断程序常常是检测病原体及其抗体，需时较长，达不到早期诊断的目的。合成探针在传染病特别是由病毒感染性所致的传染病检测中，已得到广泛应用，尤其是结合 **PCR** 方法使诊断的灵敏度可进一步提高，目前国内已制出检测乙肝病毒、艾滋病病毒(**HIV**)、轮状病毒和疱疹疾病等多种基因探针诊断试剂盒。

人工合成核酸在医学上不仅可以作为一种手段，而且在某些疾病的治疗上显露了端倪。寡核苷酸及其衍生物对肿瘤的治疗已经取得可喜的进展。作为蛋白质翻译抑制剂的寡核苷酸现称为反义 **RNA** 或反义 **DNA**。其作用原理可能有以下几种：①反义 **RNA** 与体内靶 **mRNA** 结合形成双螺旋，使 **mRNA** 不能成为翻译蛋白质的模板。②反义 **RNA(DNA)** 与 **DNA** 结合。影响 **DNA** 复制。③反义 **RNA** 能阻止 **mRNA** 与核蛋白体结合，降低蛋白质合成效率。

反义 **RNA** 或反义 **DNA** 最近年来国际上研究课题的热点，人们寄希望它在抗病毒，尤其是对艾滋病和肿瘤基因治疗上发挥重要，为征服这两类严重威胁人类健康的疾病作出贡献。