



纪念创刊 60 周年

# 中国科学家首次合成一个完整的核酸分子 ——酵母丙氨酸转移核糖核酸的人工全合成

祁国荣

(中国科学院上海生命科学研究院, 生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

“酵母丙氨酸转移核糖核酸(酵母丙氨酸 tRNA)人工全合成”研究结果先后发表在 1982 年的《科学通报》<sup>[1]</sup>和 1983 年的《中国科学》<sup>[2]</sup>上. 本工作启动于 1968 年, 完成于 1981 年 11 月, 是继我国 1965 年在世界上首次人工合成蛋白质——结晶牛胰岛素后, 又在世界上首次人工合成一个核酸分子, 其组成、序列和生物功能与天然的酵母丙氨酸 tRNA 完全相同. 人工合成酵母丙氨酸 tRNA 历时 13 年. 1982~1984 年, 本研究的主要负责人之一王德宝以“酵母丙氨酸 tRNA 人工全合成”为题先后在国际 tRNA 学术研讨会, 以及在美国、加拿大、英国、日本和西德等国的大学、研究所做过报告, 获得了重视和赞扬.

核酸和蛋白质对生命有机体的基本重要性从上世纪较早时期已为科学家发现, 到 20 世纪中叶, 这类分子的精确化学结构陆续被阐明. 但在当时, 所有的天然核酸分子都直接产生于有机体, 人们还不能通过非生物学途径产生核酸分子. 1982~1983 年, 中国科学家在《科学通报》和《中国科学》报道了“酵母丙氨酸转移核糖核酸的人工全合成”, 这是在国际上首次报道通过非生物学途径全合成一个具有完全生物活性的完整核酸分子. 在半个世纪前的中国历史环境和条件下, 中国科学家历尽艰难取得这一科学成就, 至今回忆起来仍使人感到振奋.

## 项目的启动

1965 和 1966 年, “人工全合成结晶牛胰岛素”的研究工作分别在《科学通报》<sup>[3]</sup>和《中国科学》<sup>[4]</sup>上发表, 这一在世界上首次“人工合成蛋白质”的科研成果, 在国内外引起了强烈反响. 从 1967 年初起, 中国科学院生物物理研究所、微生物研究所、遗传研究所、动物研究所等(以上为北京地区)和上海生物化学研究所、上海实验生物研究所(后改名为上海细胞研究所)、上海有机研究所等单位的年青学者开始进行多次座谈“人工合成核酸”问题, 因为那时已知蛋白质和核酸是两类非常重要的生物大分子. 经过反复讨论和论证, 1968 年秋, 中国科学院批准立项开展研究. 经过调整, 中国科学院全过程参加这项工作的是: 上海生物化学研究所、上海细胞研究所、上海有机物研究所和位于北京的中国科学院生物物理研究所, 其间北京大学生物系和上海试剂二厂也参加了这项工作. 因此, 为本研究做出贡献的有 4 个研究所、1 个大学和 1 个工厂. 不完全统计, 先后参加工作的有 180 人之多. 历时约 13 年. 1981 年 11 月, 与天然完全相同的核酸分子——酵母丙氨酸 tRNA 合成成功了.

## 合成对象的确定

要合成一个分子, 首先必须了解该分子的精确化学结构. 对一个核酸大分子而言, 就是必须了解其一

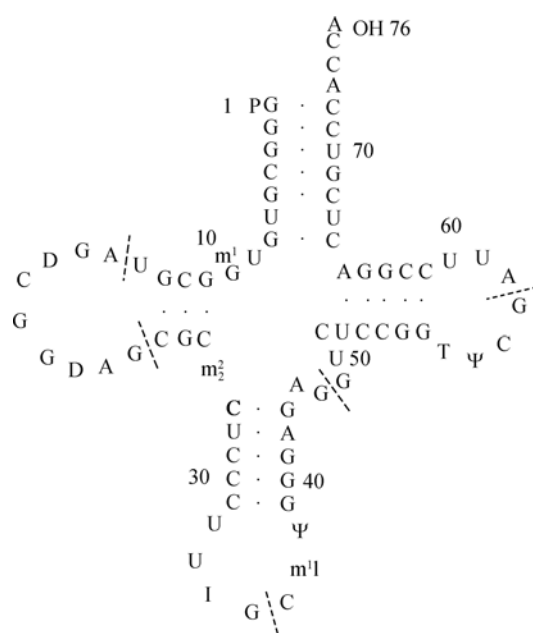


图1 tRNA<sup>Ala</sup> 一级结构示意图

级结构,即组成核苷酸的排列顺序.当时已被测定全部序列的第1个核酸(核糖核酸或脱氧核糖核酸)分子是1965年美国Holley R W等人<sup>[5]</sup>报道的酵母丙氨酸tRNA.虽然该序列后来有两处被其他实验室所修正,Holley还是因此贡献于1968年获得了诺贝尔生理学或医学奖.由此,该核酸分子被确定为合成对象.酵母丙氨酸tRNA由76个核苷酸组成,含9个7种修饰核苷酸(也称稀有核苷酸),其二级结构呈三叶草形状.

### 合成路线的选择

对具有特定排列顺序的生物大分子来说,片段连接合成是首选路线.作为第一步,首先经过对天然酵母丙氨酸tRNA分子的拆合实验,证实“半分子合成方案”是可行的,即通过先合成两个半分子:5'-半分子(35核苷酸,位于1~35)和3'-半分子(41核苷酸,位于36~76),然后连接成整分子(76核苷酸).而为了合成两个半分子,需要合成6个大片段寡核苷酸,从分子的5'端到3'端分别是:13,9,13,10,12和19核苷酸,再分别连接得到5'-半分子(13+9+13=35核苷酸)和3'-

半分子(10+12+19=41核苷酸).这条合成路线是经过反复探索和无数次实验而建立起来的.

### 原料和酶的制备

6个大片段寡核苷酸的合成则采用化学合成和酶促合成相结合方法进行.合成所需原料和酶包括:(1)化学合成所需的核苷酸单体的制备,包括4种普通的A,C,G和U核苷酸,以及7种修饰核苷酸:D,I,m<sup>1</sup>G,m<sup>1</sup>I,m<sup>2</sup>G,T和Ψ(正是这些修饰核苷酸的存在,使中国合成的酵母丙氨酸tRNA具有很高的活性,它远远高于国外合成的不含修饰核苷酸的tRNA分子).所有这些单体因用量很大,在当时也不可能进口,因而都是上海试剂二厂和上海生化所附属东风生化试剂厂生产的;(2)化学合成方法主要是采用国际通用的“磷酸二酯法”或“磷酸三酯法”,这些方法所需的各类基团保护剂和缩合剂等,也都是在实验室和工厂制备的;(3)酶的制备.整个合成工作需要10多种酶,包括多核苷酸激酶、磷酸单酯酶、几种核糖核酸酶(如核糖核酸酶T<sub>1</sub>和核糖核酸酶N<sub>1</sub>),以及体现本工作特色的用于大、小片段酶促合成所需的T<sub>4</sub>RNA连接酶.绝大部分高纯度的酶都是项目组自己制备的.

### 合成工作曲折前进

由于中国当时所处的特殊历史环境,开展科学研究的条件十分困难,这项工作在1978年之前的进展是缓慢的.工作初期,大家对具体方案有一个探索的过程,有时也产生分歧,结果是只制备了一个长度为8核苷酸的片段——CpUpCpGpUpCpCpA,在当时这已是一个不错的成果.1977年,为了协调各参加单位的工作并加强领导,中国科学院成立人工合成酵母丙氨酸tRNA协作组,1978年又成立3个会战组——合成会战组、总装会战组和测活会战组,以解决关键性问题.此后在3年多一点的时间里,便分别合成了6个大片段寡核苷酸,进而连接成两个半分子和整分子——酵母丙氨酸tRNA.后期工作之顺利主要归功于思想统一和严谨的科学态度;工作坚持化学合成与酶促合成相结合的方针,对每步合成的产物进行全面的科学鉴

定. 这里特别要提到的是对 T<sub>4</sub> RNA 连接酶的催化性质进行了深入和大量的研究, 才得以保证整个合成工作的顺利完成.

## 一个核酸分子的首次全合成

酵母丙氨酸 tRNA 在 1981 年完成全合成, 主要研究论文先后发表在 1982 年《科学通报》和《中国科学》上. 人工合成得到的酵母丙氨酸 tRNA 具有与天然分子完全相同的组成(包括 9 个 7 种修饰核苷酸)、序列和生物活性——能接受丙氨酸, 并将其带到核糖体上合成蛋白质. 这是我们在世界上合成的第一个完整的核酸分子. 20 世纪 80~90 年代, 日本、加拿大和法国科学家也报道了人工合成 tRNA 分子, 如大肠杆菌甲酰甲硫氨酸 tRNA、大肠杆菌丙氨酸 tRNA 等, 但这些实验室得到的只是 tRNA 类似物, 因为其中不含有修饰核苷酸, 不是完整的天然分子, 所以生物活性很低.

“酵母丙氨酸 tRNA 的人工全合成”获得了 1984 年中国科学院科技成果一等奖、1987 年国家自然科学一等奖和 1991 年陈嘉庚生命科学奖. 本研究的主要负责人之一王德宝由于领导该工作取得突出成果, 1996 年获何梁何利基金的科学与技术进步奖.

1982~1984 年, 王德宝曾以“酵母丙氨酸 tRNA 人工全合成”为题向第 10 届国际 tRNA 学术研讨会, 以及在美国、加拿大、英国、日本和西德等国的大学、研究所做报告, 获得了重视和赞扬. 众多海外媒体和刊物报道了中国在特殊条件下取得的这一科研成果. 如 1982 年美国 *Scientific American* 以“All the tRNA in China”为题进行报道, 提到“tRNA 已经首次被中华人民共和国的一组生物化学家直接合成”. 1982 年 5 月, 美国 *Chemical and Engineering News* 登载了一篇采访王德宝文章, 题目是“Chinese Synthesize Biologically Active tRNA”, 并刊有王德宝的大幅照片, 文中写道“中国的丙氨酸 tRNA 合成必须从原料、保护剂和各种酶与试剂的制备开始, 从零开始. 这就是中国的丙氨酸 tRNA”. 1983 年 3 月, 日本《读卖新闻》采访参加会议的王德宝, 报道了我国的 tRNA 人工合成工作, 指出“中国首次在上世界上对生命奥秘解析迈进了一步”. 1983 年, 西德 *Naturwissenschaften*(自然科学)提到“中国学者合成丙氨酸 tRNA 是第一个合成有生物活性的 tRNA”. 1983 年 8 月, 英国 *Nature* 刊登“Nucleic Acid Synthesis, Pinyin tRNA(拼音 tRNA)”一文, 报道了 1983 年 5 月《中国科学》(英文版)发表的有关人工合成酵母丙氨酸 tRNA 工作, 指出“人工合成有生物活性的、与天然提取物一致的 tRNA 分子, 这在世界上是第一次”.

历时 13 年的酵母丙氨酸 tRNA 人工全合成工作结束了. 参加者(最后工作者大约 20 人左右)都回到各自的单位从事新的工作. 唯有上海生物化学研究所对 tRNA ‘情有独钟’, 1982 年起继续开展一系列 tRNA 的结构与功能研究, 特别是有关修饰核苷酸与 tRNA 活性关系的研究, 得到不少较突出的结果. 上海生物化学研究所(2000 年 5 月与上海细胞生物研究所被整合为上海生物化学与细胞生物研究所, 简称: 上海生化与细胞所)已成为中国和世界上的 tRNA 研究中心之一.



图 2 王德宝(中)与协作组部分成员

## 参考文献

- 1 中国科学院上海生物化学研究所, 等. 酵母丙氨酸转移核糖核酸的全合成. 科学通报, 1982, 27: 106
- 2 王德宝, 郑可沁, 裘慕绥, 等. 酵母丙氨酸转移核糖核酸(酵母丙氨酸 tRNA)人工全合成. 中国科学: B 辑, 1983, 26: 385—398
- 3 龚岳亭, 杜雨苍, 黄惟德, 等. 结晶牛胰岛素的全合成. 科学通报, 1965, 10: 941
- 4 Kung Yueh-ting, Du YU-CANG, HUANG WEI-TEH, et al. Total synthesis of crystalline insulin. Sci Sin, 1966, 15: 544—560
- 5 Holley R W, Apgar J, Everett G A, et al. Structure of a ribonucleic acid. Science, 1965, 147: 1462—1465