

用发酵法制备脱氧腺嘌呤核苷三磷酸及脱氧鸟嘌呤核苷三磷酸

中国科学院上海实验生物研究所核酸研究组

在发酵法制备成腺嘌呤核苷三磷酸的基础上,我们以脱氧腺嘌呤核苷酸(dAMP)和脱氧鸟嘌呤核苷酸(dGMP)为底物,发现该体系也能用于制备脱氧腺嘌呤核苷三磷酸(dATP)和脱氧鸟嘌呤核苷三磷酸(dGTP)。

具体步骤同发酵法制备 ATP 一样,但是以 dAMP (或 dGMP) 作为底物。由于脱氧核糖的糖苷键对酸不稳定,容易脱嘌呤,因此在发酵反应结束后应冷却反应液,加冷高氯酸调 pH 至 4,然后在冷冻离心机中离心,得上清液,迅速用 KOH 调至中性,上清液上柱。层析分离时先用 0.01M NaCl 洗柱后用 2M NaCl 洗脱 dATP (或 dGTP)。所得产品经纸电泳鉴定(柠檬酸—柠檬酸钠缓冲液 0.02 M pH 5)表明,其电泳迁移率分别与 ATP 和 GTP 相似。用脱氧核糖显色剂半胱氨酸显色 (Buchanan, 1951), 均呈红色,说明产品是 dATP 和 dGTP。其它特性见下表:

底 物	产 物	转化率	光谱特性 (pH7)		酸不稳定磷酸 总 磷
			250mμ/ 260mμ	280mμ/ 260mμ	
dAMP	dATP	>90%	0.79	0.16	2.20/3.11
dGMP	dGTP	>80%	1.13	0.61	2.17/3.26

自从 Kornberg 发现在 DNA 生物合成时 DNA 聚合酶需要四种 dNTP 作为底物之后, dNTP 的制备就为人们所重视。

dNTP 的制备法有化学合成(Hoard等, 1965 和 Ott 等, 1967)及酶促合成两种。有机合成方法对试剂规格要求高,操作繁琐,得率较低。关于酶促合成, Sable 等(1954)利用肌肉抽提液,

最早发现 ATP 的磷除了能转移到核糖核苷及核苷酸外,还能转移到 dAMP, 产生 dATP。Canellakis 第一次用 *E. coli* 抽提液合成了 dNTP (1960, 1962)。Kawaguchi 等人用面包干酵母发酵法获得 dATP 及 dGTP (1970)。这些方法,操作仍较繁琐,得率也不够理想。

用发酵法制备 dATP 及 dGTP, 方法简便,材料容易得到,对酵母不必进行干燥,免除了严格控制水份含量的困难,转化率也较 Kawaguchi 等获得的为高。但此方法对 dCMP 和 dTMP 的磷酸化,从我们的初步实验结果来看,效果不好。

根据我们多次的实践经验证明,只要将本方法微量化,并用化学方法合成的 ^{32}P 标记的 5'-AMP 或 5'-dAMP 为原料,就能很方便地制备出研究工作中经常用到的高比放射性的 (3000 cpm/nmole) α - ^{32}P -ATP 或 α - ^{32}P -dATP。

参 考 资 料

- Buchana, J. G.: *Nature*, **168**, 1091, 1951.
 Canellakis, E. S., Gottesman, M. E. and Kammen, H. O.: *Biochim et Biophys. Acta*, **39**, 82, 1960.
 Canellakis, E. S., Gottesman, M. E. and Kammen, H. O.: *Biochem. Preparation*, Vol. **9**, 120, 1962.
 Hoard, D. E. and Ott, D. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1785, 1965.
 Kawaguchi, K., Ogata, K. and Tochikura, T.: *Agr. Biol. chem.*, **34**, 908, 1970.
 Ott, D. C., Vernon, N., Hansbury, E. and Hayes, F. N.: *Anal. Biochem.* **21**, 469, 1967.
 Sable, H. Z., Wilber, B. B., Cohen, A. E. and Kane, M. R.: *Biochim. et Biophys. Acta*, **13**, 156, 1954.