

8 位 ^3H 标记的脱氧腺嘌呤核苷 5'—磷酸的制备

连秉钧 朱青* 戎佩民

(上海实验生物研究所)

前 言

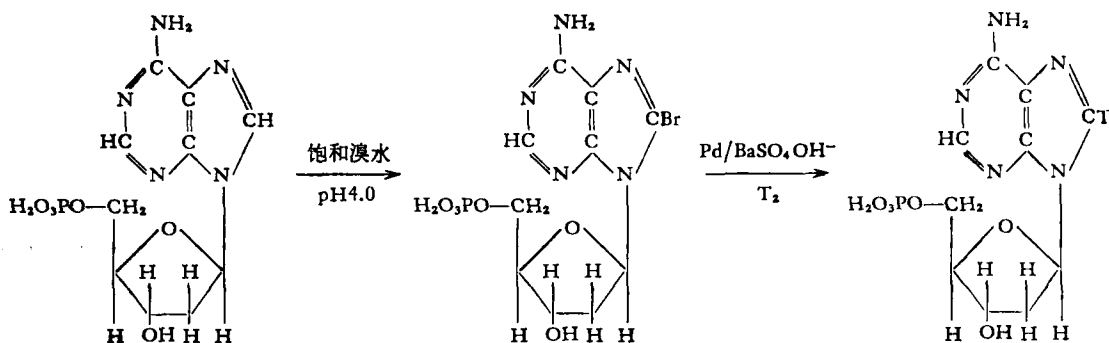
8 位氚标记脱氧腺嘌呤核苷 5'—磷酸(以下简称为 ^3H -dAMP) 可用于脱氧核糖核酸结构分析及代谢研究, 还可以转变成脱氧腺三磷(^3H -dATP)。

我们遵照毛主席“独立自主, 自力更生”的

教导, 用卤氚交换法标记, 成功地制备了高比度 ^3H -dAMP。

dAMP 8 位的氢比较活泼, 在一定的条件下, 能把它溴化为 8 位溴代的 dAMP (即 Br-dAMP), Br-dAMP 在碱性介质中, 用钯钡催化剂氚化脱溴得 ^3H -dAMP。

反应途径:



实验材料和分析方法

1. 实验材料

脱氧腺嘌呤核苷 5'—磷酸是钠型的。氚化催化剂是 5% 钯/硫酸钡 (Pd/BaSO₄), 我们参照 Augustine 方法制备。氚源和氚化装置系原子能所自制。

2. 分析方法

Br-dAMP 的碱基上有溴, 故其光谱性质与 dAMP 明显不同。它的亲脂性较大, 故在所选的溶剂体系中有较大的 R_f 值。 ^3H -dAMP 除了有放射性之外, 其光谱和化学性质与 dAMP 一致。根据这些性质来分离分析 Br-dAMP 和 ^3H -dAMP。

(1) 光谱性质 测 220—290 毫微米波长范围的紫外吸收光谱, 并求出 240 毫微米的光

密度/260 毫微米的光密度, 250 毫微米的光密度/260 毫微米的光密度和 280 毫微米的光密度/260 毫微米的光密度的比值。借此作比较鉴定。

(2) 层析 纸层析用新华 I 号层析滤纸。薄板层析用 25 克微晶纤维素加 100 毫升水搅拌, 均匀铺于干净玻璃板上, 凉干。两种层析的溶剂均用正丁醇: 冰醋酸: 水 = 5:2:3 (v/v)。

(3) 电泳 新华 I 号纸, 电泳液 0.05M 碳酸氢三乙胺, pH7.5, 电压 500 伏。

制 备

1. dAMP 的溴化

称 dAMP 260 毫克, 置入 100 毫升磨口三

* 中国科学院原子能研究所同位素处标记车间

角烧瓶,加 40 毫升 1M 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH4.0),样品溶解后加 7.15 毫升饱和溴水。盖瓶塞,避光,在 5—10℃ 搅拌 12 小时。反应液呈淡金黄色, pH3.8。加 59 毫克亚硫酸氢钠除去多余的溴,终止反应,此时溶液呈淡黄色。分次加入少量乙醇,在 25℃ 水浴上用迴旋减压蒸发器浓缩,淡黄色鳞状结晶附于瓶壁。用 50 毫升水溶解结晶,纸层析点样分析。结果见图 1。与原料 R_i 相同的紫外吸收点是没有溴化

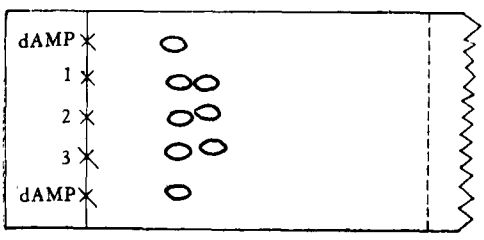


图1 反应物与原料 dAMP 纸层析下行 10 小时, 1,2,3 为反应物

的 dAMP,居前的点是 Br-dAMP。剪下这些紫外吸收斑点,用 pH7.0 的水浸泡几小时,测波长 260 毫微米的紫外吸收,求溴化率,结果见表 1。

表 1 反应物溴化率计算

紫外吸收 反应物 产品	1	2	3
dAMP	0.093	0.092	0.102
Br-dAMP	0.150	0.178	0.188
产 率 (%)	62	66	65

将上述溶液上 Dowex 1 × 8 甲酸型柱分离 (1.5 × 15.0 厘米,树脂处理: 2N 氢氧化钠,水; 2N 盐酸,水; 3N 甲酸钠-6N 甲酸; 浓甲酸,水,无氯离子)。层析柱经 280 毫升水淋洗后,先用 0.025N 甲酸-0.025N 甲酸钠洗脱。第 50 管起换 0.05N 甲酸-0.1N 甲酸钠洗下峰 I (图 2 的 NO. 68—132 管),第 180 管起换 0.05N 甲酸-0.5N 甲酸钠洗下峰 II (图 2 的 NO. 204—280 管)。三种洗脱液的 pH 均为 3.8。流出液用部分收集器收集,测各管的 260 毫微米的紫外吸收,收集光密度大于 2 者 (见图 2)。

合并峰 I,总紫外吸收为 3500 A₂₆₀ 单位,峰 II 总紫外吸收为 7100 A₂₆₀ 单位,经自动扫描分光光度计分析,峰 I 为没有溴化的 dAMP,峰 II 为 Br-dAMP。将峰 II 上粗颗粒活性碳柱 (2.5 克, 1.2 × 7.5 厘米) 脱盐纯化。柱经 500 毫升水洗后,用含 2% 氨,50% 的乙醇洗脱,收集光密度在 2 以上的洗脱液 (约 145 毫升)。经浓缩,再用甲醇-水调到 5 毫升,加 10 倍体积丙酮,得白色沉淀,抽滤,用丙酮洗两次,最后得淡黄色粉状结晶。真空干燥得 192 毫克 Br-dAMP,保存于干燥器中。

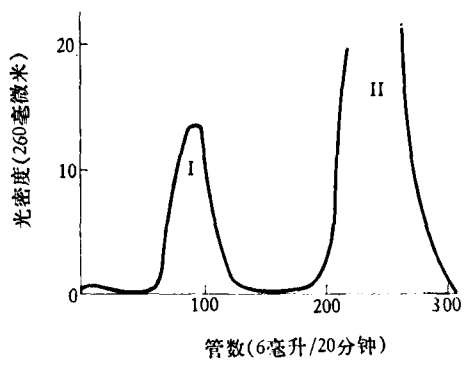


图 2 Br-dAMP 的 Dowex 1×8 (甲酸型) 柱层析分离
峰 I: dAMP; 峰 II: Br-dAMP, 流速 6 毫升/管/20 分

2. 溴化产品的鉴定

(1) 光谱测定 取少量 dAMP 样品和 Br-dAMP 产品分别溶于水中,在 751 型分光光度计上测紫外吸收光谱,见图 3。产品的吸收高峰和谷明显右移;几个波长的紫外吸收比值见

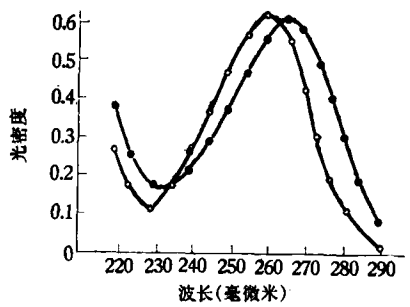


图 3 dAMP 样品和 Br-dAMP 产品的全波吸收
○——○ dAMP 全波;
●——● Br-dAMP 全波, pH7

表 2, $\epsilon_{250}/\epsilon_{260}$ 下降, 而 $\epsilon_{280}/\epsilon_{260}$ 急剧上升。这些趋势与 Ikehara 和 Uesugi 报道的腺苷 5'-磷酸的溴化产物 (Br-AMP) 一致。

表 2 有关样品与产品的紫外光谱性质

光谱性质 产品	H ₂ O $\lambda_{\max}$ (毫微米)	H ₂ O $\lambda_{\min}$ (毫微米)	$\frac{\epsilon_{240}}{\epsilon_{260}}$	$\frac{\epsilon_{250}}{\epsilon_{260}}$	$\frac{\epsilon_{270}}{\epsilon_{260}}$	$\frac{\epsilon_{280}}{\epsilon_{260}}$
样 品 dAMP	260	229	0.40	0.79	0.73	0.18
Br-dAMP	265	235	0.36	0.67	1.02	0.49
H-dAMP*	260	229	0.45	0.77	0.73	0.23
³ H-dAMP	260	229	0.41	0.78	0.73	0.19
资 料 dAMP**	—	230	0.42	0.80	0.66	0.14

* H-dAMP; Br-dAMP 通氢气还原的冷试验产品
 ** Handbook of Biochemistry selected data for Molecular Biology

(2) 纸层析 把 dAMP 和 Br-dAMP 分别在层析滤纸上, 中间为二者的混合点, 结果见图 4。与预期结果相符。

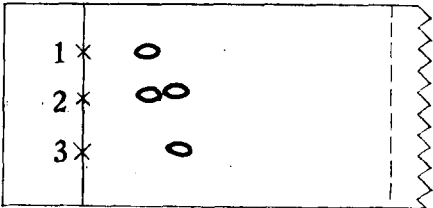


图 4 dAMP 和 Br-dAMP 的纸层析(下行)
 1. dAMP; 2. dAMP 加 Br-dAMP; 3.Br-dAMP

(3) 产品中含溴量 做焰色反应, Br-dAMP 呈草绿色, 表示其中含溴, 而 dAMP 则无此现象。

经定量分析, 含溴量为 16.60% 及 16.65%, 含溴率与理论计算值 17.28% (算法参照 Ikehara) 相近。

以上分析证明该产品是 Br-dAMP。

3. Br-dAMP 的氟化

我们先做 Br-dAMP 氢化脱溴的冷试验, 分析结果见表 2。然后进行 Br-dAMP 的氟化还原。

反应装置见图 5。在小反应瓶中加入 11.2 毫克 Br-dAMP。20.8 毫克钨钼催化剂, 电磁搅拌珠及 1 毫升 0.1N 氢氧化钠溶液。把反应瓶接

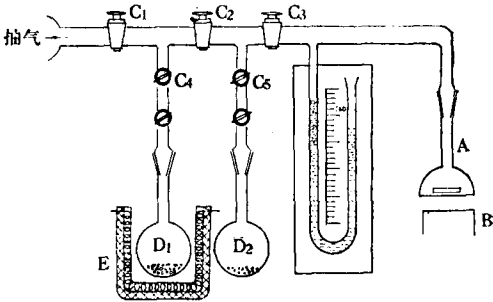


图 5 氟化装置示意图

A. 小反应瓶; B. 电磁搅拌器; C. 磨口活塞; D. 铀粉瓶; E. 电炉

到装置上, 用液氮冰冻反应混合物。打开活塞 C₁、O₂ 及 C₃, 反应体系抽真空到 10⁻³ 毫米汞柱, 关闭 C₃, 开 C₄、C₅, 抽掉铀粉瓶中氟的裂变产物³氩。然后再关闭 C₁、C₅, 打开 C₃。用电炉加热铀粉瓶 D₁ 至 350℃ 左右, 释放氟气, 引入反应瓶, 体系的氟压约 688 毫米汞柱负压, 关闭 C₃。铀粉瓶降温, 吸回管道中的氟, 关闭 C₂、C₄。解冻反应物, 搅拌, 直到反应平衡, 氟气不再消耗, 氟压维持平衡, 共 1 小时半, 终止反应。再冰冻反应物, 打开 C₃、C₅, 用铀粉瓶 D₂ 回收多余的氟。关闭 C₅, 体系排两次气, 反应瓶转入通风橱进行后处理。

过滤反应液除去催化剂, 用 6 毫升 50% 乙醇分次洗涤。用磨口圆底烧瓶收集滤液, 并用它进行冷冻除氟。将滤液减压浓缩至小体积, 加少量 50% 乙醇重复操作 2—3 次, 以进一步除去活性氟。最后待溶液近干时, 加 2.0 毫升 50% 乙醇, 定量取样稀释, 用 0.5% PPO、0.05% POPOP 二氧六圈闪烁液, 进行液体闪烁测量。直到连续两次溶液的放射性强度相近, 说明溶液中活性氟已除净。

继续抽去乙醇溶液, 加 20 毫升用甲酸调节至 pH3.5 的水, 上预先准备好的粗颗粒活性碳柱 (1 × 1 厘米)。流速 1 毫升/3 分钟, 柱用 40 毫升水洗后, 用 30 毫升含 2% 氨的 50% 乙醇洗脱, 得标记产品 ³H-dAMP。将收集液减压浓缩, 如上述操作用乙醇抽两次。最后用 50% 乙醇稀释到 320 毫升, 使每毫升约含 1 毫居里的放射性, 放入 2℃ 中保存。

4. 氟化产品 ^3H -dAMP 的分析鉴定

(1) 全波测定 取一定体积 ^3H -dAMP 乙醇溶液,用水稀释,以相同浓度乙醇作对照,测紫外吸收光谱和比值,结果分别见图 6 和表 2。 ^3H -dAMP 的光谱性质与 dAMP 一致。

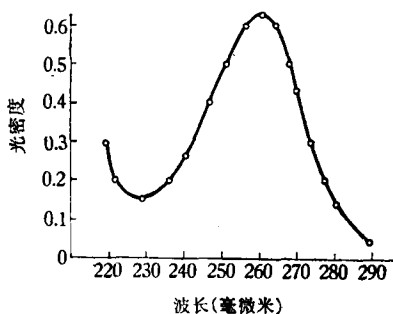


图 6 ^3H -dAMP 的紫外吸收光谱

(2) 层析 用 ^3H -dAMP 稀释前的溶液点纸层析和薄板层析,见图 7、8。紫外吸收为一点,产品层析纯。 ^3H -dAMP 的 R_f 值与样品 dAMP 相同。

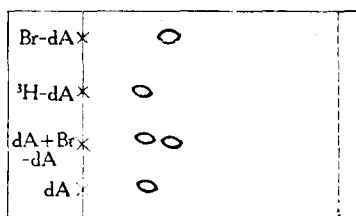


图 7 ^3H -dAMP 纸层析(上行)
dA 即 dAMP; ^3H -dA 即 ^3H -dAMP

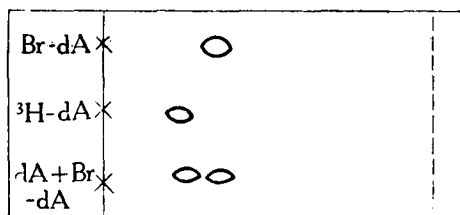


图 8 ^3H -dAMP 薄板层析(上行)
说明同图 7

分析结果证明 Br-dAMP 氟化还原的 ^3H -dAMP 与 dAMP 性质一致。

(3) 放射性比强度 产品用内标准法测定,内标准源氘水,闪烁剂同上,测试效率 8.2%,总强度 373 毫居里。水溶液中 dAMP 在波长 260 毫微米的克分子消光系数为 $15.3 \times$

10^3 , 产品 ^3H -dAMP 在 260 毫微米的总吸收为 307.5, 相当于 0.0201 毫克分子。所以,产品 ^3H -dAMP 的比强度为 18.5 居里/毫克分子。

几天后又用氘标记正十六烷作内标准测量,结果与上一致。

(4) 化学产率 定量取 Br-dAMP 配成不同浓度,测波长 265 毫微米的紫外吸收,作图 9。

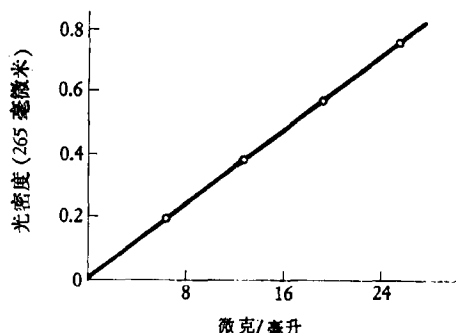


图 9 Br-dAMP 紫外消光曲线

从该曲线查得 Br-dAMP 投料总光密度 340。Br-dAMP 和 Br-AMP 碱基结构相同,两者的光谱性质应基本一致,故可采用 Ikchara 报道的 Br-AMP 的克分子消光系数 $15100 (\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O, OH}^-} 264.8 \text{ 时})$ 。求出 Br-dAMP 的投料量为 0.0225。所以, ^3H -dAMP 的化学产率为 89.3%。

(5) 放化纯度 用放射层析纸片法鉴定。在有载体 dAMP 的层析纸上点 ^3H -dAMP 做上行层析。把层析纸从原点到前沿分成若干块,每块一厘米见方,紫外斑点及附近再剪小一半,用液体闪烁测量,结果见图 10。经计算放化纯度为 92%。

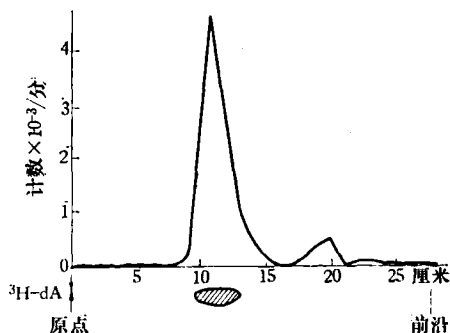


图 10 ^3H -dAMP 放射层析图谱
 ^3H -dA 即 ^3H -dAMP

三个半月后,我们又做纸电泳分析。电泳液 0.05M 碳酸氢三乙胺, pH7.5。在此电泳液中,核苷与核苷酸反向泳动,结果见图 11。测核苷部分的放射性占 11.6%,核苷酸即 ^3H -dAMP 占 88.4%。产品的主要杂质是腺嘌呤核苷,这与上面的纸层析相符,在该层析体系中,核苷比核苷酸走得快,故出现小的杂质前峰。如果用下行层析,核苷将走得更快。

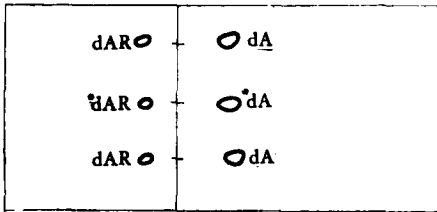


图 11 ^3H -dAMP 纸电泳分析

500 伏两小时,新华 I 号纸,
dA-dAMP, dAR-脱氧腺嘌呤核苷,
有*者为 ^3H -dAMP 与 ^3H -dAR

5. 第二次 Br-dAMP 氟化

我们加 8.9 毫克 Br-dAMP, 21.9 毫克钼催化剂, 0.8 毫升 0.1N 氢氧化钠溶液, 反应氟压 643 毫米汞柱, 其他操作同上。第二批 ^3H -dAMP 的比度为 22.7 居里/毫克分子, 放化纯度为 91%, 化学纯度为层析纯, 化学产率为 87.2%。

讨 论

dAMP 的溴化率一般均大于 60%, 有时可达 80%。制备 Br-dAMP 的关键是分离与结晶。分离的洗脱液浓度太低, 洗脱时间长, 且不能洗下溴化峰。洗脱液浓度过高又不利于二者

的分离。经过试验, 上述浓度还较理想。当然若用梯度洗脱效果可能更好些。Br-dAMP 一定要在低温干燥条件下结晶。

我们在冷冻除氟装置中加两只冷阱, 用真空泵减压浓缩同时, 不断摇动容器, 这样大大缩短除去活性氟的时间。用活性炭柱纯化产品, 整个制备过程只需两天, 效果也较好。

^3H -dAMP 的吸附现象严重, 放化分析前, 容器和层析纸需用载体处理, 以减少器皿壁与滤纸的吸附, 提高分析的精确性。

第二次氟化时, 我们减少了溶剂体积, 降低反应瓶液面, 扩大氟气与反应液的接触, 且搅拌也较均匀, 使卤氟交换更完全。所以, 得到的产品比度比第一次还高。

dAMP 本身很不稳定, 在酸性介质中易脱嘌呤或断磷酸键。我们虽在制备过程中控制各种溶液 pH3.5—3.8, 但分离时间较长, 难免产生脱嘌呤或脱磷现象。不过其量甚微, 用比层析灵敏的放化分析才得以检出。若设法缩短整个制备时间, 可望减少 dAMP 或 Br-dAMP 的分解, 得到更纯的标记产品。

此外, 产品比强度高, 也会引起放化裂解。把 ^3H -dAMP 存放在弱碱性乙醇溶液 (含 NH_4HCO_3 1%), 再降低放化浓度, 严格控制贮存温度, 可减少放化裂解。若需要, 经纸层析或电泳可除去杂质, 提高产品放化纯度。

本产品的制备过程中曾受到中国科学院上海生物化学研究所及上海第二医学院同位素室同志的大力支持, 深表感谢。

[本文于 1976 年 6 月 4 日收到]

(上接第 48 页)

- [6] 施玉梁等: 科学论文及技术总结资料汇编(1966—1974), 3: 30—32, 上海生理研究所, 1974, 10。
[7] Simpson, L. L.: *Neuropharmacol.* **10**, 673, 1971。

- [8] Simpson, L. L.: *Neuropharmacol.* **12**, 165, 1973。
[9] Chang, C. C.: et al: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **282**, 129, 1974。
[10] Simpson, L. L. et al: *Neurochem.* **18**, 1751, 1971。