

生化制备

S-腺苷-L-[甲基-³H]-蛋氨酸的制备

郭子丽 唐国忠

(中国科学院上海原子核研究所)

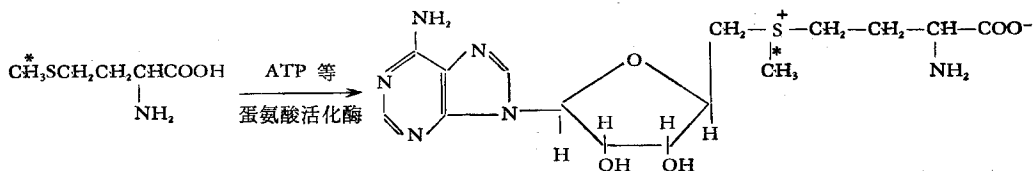
采用高比度的 S-腺苷-L-[甲基-³H]-蛋氨酸(以下简称 ³H-SAM) 和各种甲基转移酶可以快速测定组织或血浆样品中的多种磷苯二酚类胺,灵敏度为 15—25pg^[1,2]。国内许多单位在针麻原理,计划生育药理以及心血管和活血化瘀等研究工作中都迫切需要快速而又灵敏地测定体液中去甲肾上腺素某物质的含量,为此我们制备了 ³H-SAM。

³H-SAM 可以通过从兔肝中提取的蛋氨酸活化酶由 L-[甲基-³H]-蛋氨酸制备得到,而特定在甲基上标记的蛋氨酸一般都采用标记的碘甲烷与相应的去甲基化合物——高半胱氨酸在液氨溶液中反应而得^[3]。

我们用硫酸铵分级沉淀法从新鲜兔肝中提取蛋氨酸活化酶^[4],再将自制的 L-[甲基-³H]-蛋氨酸(比度为 12.5Ci/mM,放化纯度为 95%) 和腺嘌呤核苷三磷酸二钠盐等一起在 pH7.6 的 Tris-HCl 溶液中进行酶反应,37℃ 温育 3 小时,产率约 10%,生成的 S-腺苷-L-[甲基-³H]-蛋氨酸经纸层析纯化后比度为 12Ci/mM,放化纯度大于 95%。

产品由上海第一医学院等有关单位使用,证明具有生物活性,其活力与进口产品相似,可用于放射酶法测定。

反应式:



现将制备过程介绍如下:

1. 蛋氨酸活化酶的制备 取两只兔子,剥取新鲜兔肝,洗净,剪成小片,用 2.5 倍体积的冰冷的 0.01N 醋酸匀浆,离心 (15,000×g) 30 分钟后,取上清液,缓缓加入 2℃ 的硫酸铵饱和溶液(其量按每 100ml 0.01N HAC 溶液加入 56ml (NH₄)₂SO₄ 饱和溶液计算),放入冰箱,20 分钟后,离心 (12,000×g) 20 分钟,弃去沉淀,取上清液,再按最初体积每 100ml 补加 2℃ 饱和的 (NH₄)₂SO₄ 溶液 36ml,冰箱内放置 20 分钟后再离心 (12,000×g) 20 分钟,收集沉淀,呈淡黄色,共 10 克,冷藏于 -20℃ 冰箱中待用。

使用时,取 1 克酶加 3.3ml 0.1M pH 为 6.7 的磷酸盐缓冲液,溶解后加入透析袋中,用 100 倍 0.02M pH 为 6.7 的磷酸盐缓冲液透析两次,每次 4 小时。

2. ³H-SAM 的制备 在 10ml 的离心管内放入自制的 L-[甲基-³H]-蛋氨酸 53mg (比度: 12.5Ci/mM,放化纯度: 95%),腺嘌呤核苷三磷酸二钠盐 66mg,谷胱甘肽 9mg,及氯化镁 590mg,加入 3.5ml pH 为 7.6 的 0.5M Tris-HCl 溶液,待反应物溶解后用 1N KOH 调 pH 为 7.6。

另取经两次透析的 1 克蛋氨酸活化酶的酶液,离心后上清液用 1M KHCO₃ 小心调 pH 到

7.6。

将调好 pH 的酶液倒入上述反应管中,混合后于 37℃ 恒温水浴中温育 3 小时,冷却,逐滴加入 30% 的高氯酸调 pH 至 3,离心。取上清液用 1N KOH 调 pH 至 7,再离心除去高氯酸钾沉淀,然后冷冻干燥至 1ml 左右。将清液点在制备性硅胶纸上,以正丁醇:醋酸:水 (60:15:25V/V) 为展开剂,层析后放射性扫描显示只有两个放射性峰, R_f 值分别与标准的 SAM 和 L-蛋氨酸一致,即 $^3\text{H-SAM}$ 和未反应的氘标记蛋氨酸。根据两个峰的面积之比可见酶反应的产率约 10% (图 1),剪下含有 $^3\text{H-SAM}$ 的纸带,用 30ml pH 为 3 的硫酸灭菌水溶液浸泡,提取 $^3\text{H-SAM}$ 。

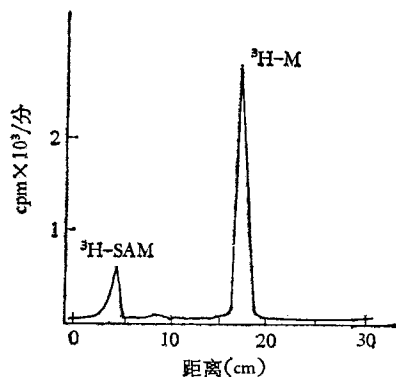


图 1 酶反应产物的放射性层析扫描图谱

3. $^3\text{H-SAM}$ 的分析鉴定 取部分提取液进行放射性强度测定及紫外光谱分析, $\lambda_{\max}$ 为 257m μ , 250/260=0.88, 280/260=0.23 (文献值: $\lambda_{\max}$ = 258m μ , 250/260 = 0.90, 280/260 = 0.20), 产品的比度为 12Ci/mM。

放化纯度的鉴定采用上行法纸层析,溶剂系统为 (1) 正丁醇:1NHCl:乙醇 (50:50:20V/V) 和 (2) 异丙醇:乙醇:9% HCl (75:75:50V/V), 展开后用甲烷气流式无窗正比计数器进行放射性扫描,放化纯度均大于 95%。(图 2, 3)

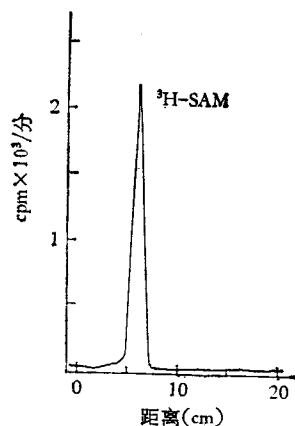


图 2 $^3\text{H-SAM}$ 的放射性层析扫描图谱
溶剂系统: 正丁醇:1N HCl:乙醇 (50:50:20)

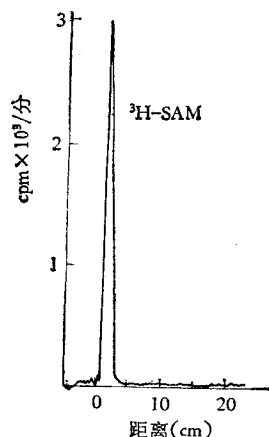


图 3 $^3\text{H-SAM}$ 的放射性层析扫描图谱
溶剂系统: 异丙醇:乙醇:9% HCl (75:75:50)

参 考 文 献

- [1] David, P. H. et al.: *Life Sciences*, **16**, 375, 1975.
- [2] Charles, F. S. et al.: *Life Sciences*, **23**, 1117, 1978.
- [3] Dolphin, D. et al.: *Analytical Biochem.*, **36**, 338, 1970.
- [4] Cantoni, G. L.: *Biochem. prep.*, **5**, 58, 1957.

[本文于 1981 年 9 月 7 日收到]