

一种用于检测 5'-核苷酸磷酸二酯酶的 荧光底物合成方法

韩 刚 毅

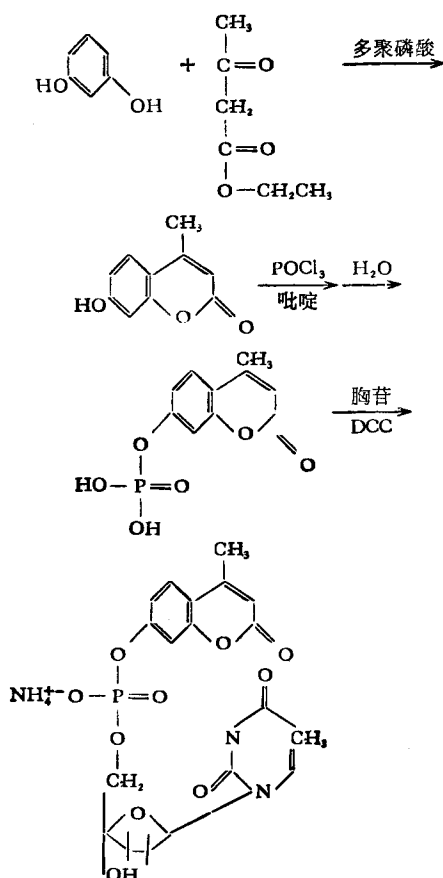
(济南军区军事医学研究所)

提 要

本文利用间苯二酚为原料合成 4-甲基伞形酮,继而经过磷酸酯化,缩合等反应过程合成 4-甲基伞形酮-5'-胸腺嘧啶核苷磷酸二酯。反应过程中对胸腺嘧啶核苷的 3' 位羟基未加任何保护,缩合反应特异地发生在核苷的 5' 位羟基上。产品经过 DEAE-葡聚糖凝胶柱层析分离纯化。利用纸层析、吸收光谱和酶学反应特征鉴定都证明合成的产品对于 5'-核苷酸磷酸二酯酶具有专一性,可以用于 5'-核苷酸磷酸二酯酶活性测定以及其同工酶谱分析。

5'-核苷酸磷酸二酯酶 (5'-NPDase) 是一种降解单链 DNA 的外切酶,广泛地存在于哺乳动物的组织或血液中^[1]。现已发现人血清中 5'-NPDase 同工酶谱变化与肝癌的发生有关。配合检测甲胎蛋白检测 5'-NPDase,可使肝癌的检出率由 80% 提高到 94% 以上。这能减少检测甲胎蛋白诊断原发性肝癌时存在的假阴性问题,具有重要的临床实用意义^[2-3]。

国外曾有人报道使用单核苷酸与对硝基苯基、5'-碘吲哚基、 α -萘酚基和 4-甲基伞形酮基等呈色基团相结合生成磷酸二酯衍生物。衍生物受酶作用后,可分解出呈色基团。用此法可做酶的定量测定或显示同工酶谱^[4,6]。国内已有报道 5'-(5-碘吲哚酚-[3]) 胸腺嘧啶核苷酸 (5'-IIT) 合成方法^[4]。本文利用间苯二酚为起始原料,经几步反应,制备出能够快速检测 5'-NPDase 的荧光底物 4-甲基伞形酮-5'-胸腺嘧啶核苷磷酸二酯 (MUT)。并对产品的结构和性质进行了研究。合成反应原理:



一、材料与 MUT 合成

胸腺嘧啶核苷: Sigma 产品; 蛇毒磷酸二酯酶: 西德 Boehringer 产品 (1mg/ml); 猪脾磷酸二酯酶: 上海细胞生物研究所产; 5'-IIT: 上海科华生化实验所产品。

利用 Koo (1955)^[5] 的方法以间苯二酚为原料合成 4-甲基伞形酮 (MU), 重结晶一次, mp, 184—186℃。

参照 Hawley (1981)^[6] 的方法略加改进后制备 MUT, 其简要过程是: 称取 1g (5.7 m mol) Mu, 用 10ml 新鲜蒸馏的吡啶溶解。冰浴冷却条件下缓慢滴加入 0.5ml (5.5 m mol) POCl₃, 继续搅拌反应 1 小时。加入 30—50ml 冰水中中止反应。油泵减压蒸馏去除溶剂, 再加入吡啶反复减压蒸馏以便去除所含水份。加入 10ml 含有 242mg (1m mol) 胸腺嘧啶核苷的吡啶和 2g (9.7 m mol) N, N-二环己基碳二亚胺 (DCC)。室温反应 20 小时后, 加入 50ml 蒸馏水, 减压蒸馏去除溶剂, 再加 40ml 蒸馏水, 用 1M NH₄OH 调 pH 至 8。过滤, 用少量 pH8 的氨水洗涤滤渣 3—5 次, 与滤液合并。用已平衡好的 DEAE-葡聚糖凝胶柱 (2 × 25

cm) 层析纯化。用 0.05—0.3M NH₄HCO₃ 梯度洗脱, 流速 5ml/10 分。用纸层析监测洗脱组份, 收集具有 273, 317nm 紫外吸收峰的成份。减压蒸馏去除水份。加入少量甲醇反复减压浓缩蒸去溶剂, 收集所得白色干粉。测定其 Rf 值, 吸收光谱和酶学性质。

二、MUT 鉴定和讨论

产物的光谱性质: 称取 5mg 产品, 用双蒸水溶解后稀释适应倍数, 用东德产 Specord UV vis 分光光度计扫描 200—360nm 紫外吸收光谱。波形如图 1。

MUT 在 273nm 和 317nm 处有最大吸收峰, OD₂₇₃/OD₃₁₇ = 1.418, 与文献报道相符合^[7,8]。

1. 纯度鉴定: 经 DEAE-葡聚糖凝胶柱层析纯化后的产品, 采用新华 1 号定性滤纸 (5 × 30cm) 分别在 A 系统; 正丙醇: 水: 氨水 (7: 1: 2) 和 B 系统; 正丙醇: 1M 乙酸氨 pH7.2 (8: 2) 中下行层析。在两种展开系统中都只观察到一个斑点, 说明产品为单一化合物。其 Rf 值见表 1。表中数据与 Hauley 报道有差异。这可能与层析条件控制不同有关^[6]。

表 1 原料和产品的层析 Rf 值 ± SD

样品	MUT	MUP	T	MU
A 系统	0.671 ± 0.018	0.397 ± 0.035	0.698 ± 0.012	0.798 ± 0.014
B 系统	0.434 ± 0.016	0.165 ± 0.012	0.666 ± 0.012	0.834 ± 0.014

注: MUP-4-甲基伞形酮磷酸酯

T-胸腺嘧啶核苷

MU-4-甲基伞形酮

表中各组数据均不少于 6 次实验, 层析环境温度 25—28℃

2. 元素分析: 实测: C, 48.01; H, 4.83; N, 8.85。C₂₀N₃H₂₄O₁₀P: C, 48.27; H, 4.86; N, 8.45。

3. 酶学鉴定: 取 10μM MUT 2 份 (1ml/份), 分别加入 10μl PDEI (蛇毒磷酸二酯酶, 1mg/ml) 或 10μl PDE II (猪脾磷酸二酯酶, 1mg/ml)。溶剂系统分别为 50mM Tris pH

9.12 或 50mM 乙酸氨 pH5.6。37℃ 保温 3 小时。观察各管荧光变化后发现, 加入 PDEI 的试管在 37℃ 保温 2 分钟即可见到有强荧光出现。而加入有 PDE II 的试管在 37℃ 保温 3 小时仍与对照管相同。PDEI 是作用于 5'-核苷酸磷酸二酯, 使 5'-核苷酸游离出来, 而 PDE-II 是作用于 3'-核苷酸磷酸二酯。此结果说明产

品中的 Mu 是通过磷酸二酯键特异地缩合在胸腺嘧啶核苷的 5' 位置,产品中无 3' 位缩合物存在^[1,4,9]。

使用上海第三分析仪器厂 930 型荧光光度计(激发光路置带通型 360nm 滤光片,发射光路置截止型 450nm 滤光片)。测定 MUT 经酶

催化分解的反应进程。PDEI 缓冲系统为 50 mM Tris pH 9.12。PDE II 缓冲系统为 50 mM 乙酸氨 pH 5.6。所得结果也说明,合成的 MUT 能够用于检测 5'-核苷酸磷酸二酯酶的活性。结果见图 2。

4. 酶电泳区带显色: 采用连续缓冲体系的

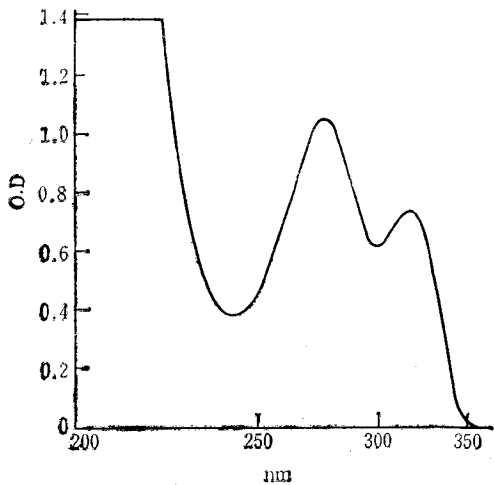


图 1 4-甲基伞形酮-5'-胸腺嘧啶核苷磷酸二酯的紫外吸收光谱

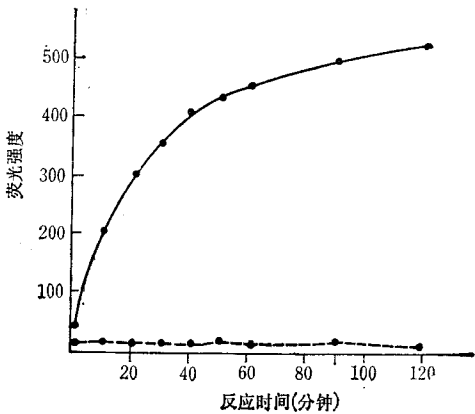


图 2 MUT 与 PDEI (—●—) 或 PDEII (---●---) 反应进程曲线
MUT 浓度: 2 μ M; PDEI: 1 μ g/ml; PDEII: 2 μ g/ml; 37 $^{\circ}$ C 水浴。

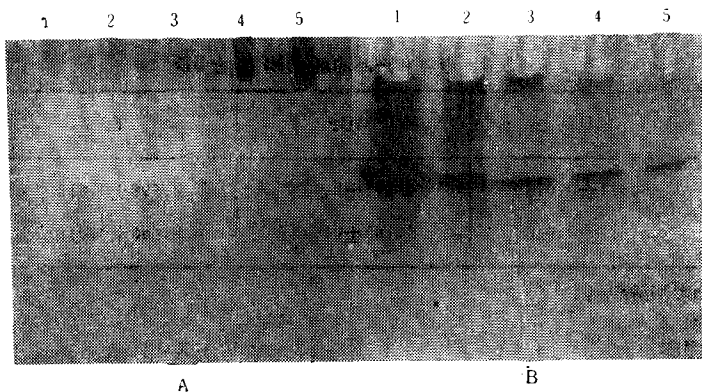


图 3 PDEI 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

A: 示 MUT; B: 示 5'-IIT; 1—5 槽内 PDEI 量分别为 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 μ g。

聚丙烯酰胺凝胶平板电泳 (T = 7%, C = 5%)。每个样品槽内分别加入适量酶和 10 μ l 含 0.01% 溴酚蓝的饱和蔗糖溶液。电极缓冲液为 90mM Tris-硼酸缓冲液 (pH 9.0)。电泳完毕取出凝胶, 用 1mg MUT/ml 50mM Tris-

1mM MgCl₂ pH9.0 溶液浸湿一段与凝胶片相同大小的滤纸。将滤纸贴在凝胶片上一同放在 37 $^{\circ}$ C 保温 10—30 分钟。在紫外灯下 (360nm) 观察酶分解 MUT 的情况,同时采用 5'-IIT 显色作为对照,结果见图 3。

从图3可以看出,在显示 PDEI 的平板电泳区带上, MUT 与 5'-IIT 都能检出加样量少于 0.01 μ g 的 PDEI。此结果较 Lo (1981)^[7]报道的数据 (5 μ g) 灵敏度高。这个差别是否是由于所用 PDEI 的活性不同,需进一步研究。

据国外文献报道,在目前已知的 PDEI 底物中, 4-甲基伞形酮与单核苷酸定位结合的产物用于检测 5'-核苷酸磷酸二酯酶, 具有成本低、用量少、显色快并且易溶于多种溶剂等特点^[6]。其缺点是分解生成的 MU 扩散快。实验结果除照相记录外,不易长久保存等。尽管如此,使用 MUT检测 5'-NPDase, 对于需要快速获得实验结果的工作,仍是十分有用的^[7]。MUT 的合成成为 5'-NPDase 及其同工酶谱的研究工作提供了简便快速的检测底物^[8,9]。有助于推动利用 5'-NPDase 同工酶谱分析检测原发性肝癌工作。

本文实验过程中曾得到唐超、邢念义等同志的支持,科学院上海细胞生物所王应魁同志提供了 PDEI 和 PDEII, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Razzell, W. E. in "Methods in Enzymology" Vol. VI, p 236, Academic press, New York, 1963.
- [2] Lu, H. M.: *Int. J. Cancer*, 26, 31 1980.
- [3] 林克敏等:《广西医药》, 6(4), 191, 1984.
- [4] 潘禄兴等:《生物化学与生物物理学报》, 17(4), 544, 1985.
- [5] Koo, J.: *Chem. and Ind.*, 445, 1955.
- [6] Hawley, D. M. et al.: *Anal. Biochem.*, 117, 18, 1981.
- [7] Lo, K. W. et al.: *Anal. Biochem.*, 117, 24, 1981.
- [8] Lo, K. W. et al.: *Anal. Biochem.*, 47, 609, 1972.
- [9] Khorana, H. G.: *The Enzymes* (P. D. Boyer, H. A. Lardy, et al) 2nd ed., Academic Press New York, Vol. 5, p. 79, 1961.

[本文于 1986 年 6 月 12 日收到]

科技消息

“发光分析与医学”学习班简报

上海生物物理学会于 1986 年 11 月 7—15 日在上海第二军医大学举办了一期全国性的“发光分析与医学”学习班,邀请华东师大、第二军医大学、复旦大学、中科院上海分院、市中医研究所的专家分别主讲:生物和化学发光的物理和化学原理、发光探测器、萤火虫荧光素酶发光体系测 ATP、发光细菌发光体系、吞噬细胞吞噬相伴随的化学发光、血清发光、发光免疫分析法、时间分辨荧光免疫分析法、体表发光与医学诊断、血卟啉药物光敏作用和光动力学疗法等专题,其中穿插了十个有关的实验。参加的学员来自全国 11 个省市五十多人,大部分是医学科研、教学工作者及临床医生和检验师,其中有十多名研究生。还邀请了五个生产发光计和有关器材的厂家参加演示和展销产品。

生物和化学发光分析技术是近二十年来发展起来的一项新技术,它以快速、灵敏、简便,仪器设备价格相对便宜著称,尤其是发光免疫分析法和时间分辨荧光免疫分析法可与示踪原子法争雄,是一项正在发展的,

很有前途的分析技术。但是我国刚刚起步,利用本技术开展研究的单位还不多。已开展研究的单位,存在的问题也不少。所以本期学习班学员们求知欲甚切,通过学习交流,解决了一部分研究中存在的问题,培养了人材,扩大了队伍,它对我国发光分析技术医学应用的研究将有促进作用。

目前开展发光分析医学应用的限制因素是仪器和试剂,从学习班的信息知道,我国已有十几家工厂试制出各种型号发光计的样机,并已有萤光素酶,黄嘌呤氧化酶、发光细菌制剂及 ABEI 等试剂的研制和供应,这给学员以极大的鼓舞,增强了发光分析医学应用研究的信心。

学员们反映,本次学习内容既有理论又有实验,新的信息较多,建议有关的学会再办同类学习班,以期扩大发光分析的队伍。

[华东师范大学生物系 胡天喜]