

氚标记胸腺嘧啶脱氧核糖核苷的制备

中国科学院上海生物化学研究所氚标记化合物合成小组

上海第二医学院同位素实验室

用酶法由氚标记胸腺嘧啶制备它的脱氧核糖核苷^[1,2]比较方便¹⁾。近年来国外也多采用这个方法。



但国外报道的方法较繁琐。

毛主席说：“我们不能走世界各国技术发展的老路，跟在别人后面一步一步地爬行。”遵照毛主席这一教导，从实际出发，通过不断试验，摸索出了一种简便易行的酶合成法。转换率比较满意。产品胸腺嘧啶脱氧核糖核苷的比放射性，与原料氚标记胸腺嘧啶一致。现将该方法介绍如下：

实 验 部 分

酶液制备：

对胸腺嘧啶转化为它的脱氧核糖核苷的酶制剂的制备^[1,2]，作了适当的改进：从健壮大白鼠中，取出肝脏，加入4倍于肝重的磷酸盐缓冲液（pH 8，0.1 M，预冷至4℃）。用高速组织捣碎机匀浆3—4分钟。经冷冻高速离心机离心45—60分钟（23400 g）。上清液即为反应所采用的酶液。用氚标记胸腺嘧啶作示踪剂，酶转换率为60%，而国外报道，酶转换率为50—55%（表1）。

表1 提取脱氧核糖转移酶条件比较

	本实验提取酶条件	资料[1]提取酶条件
缓冲液	pH 8 磷酸盐 (0.1M)	含 6% 蔗糖、pH8 磷酸盐和 Tris
离心速度	23400g, 0℃	114000g, 0℃
酶转换率	60%	50—55%

反应条件：

底物溶于少量水中，氚标记胸腺嘧啶（比放

射性为3.7居里/毫克分子和1.9居里/毫克分子）和脱氧尿嘧啶核苷的克分子比为1:2。在此溶液中每毫克氚标记胸腺嘧啶加酶液5毫升。在38℃水浴中振荡保温60分钟。

产物的分离：

保温后于反应液中加预冷的高氯酸，至最终浓度为0.2 N使酶蛋白沉淀以终止反应。离心（3000 转/分）10分钟，去沉淀。上清液用碳酸钾调 pH 至中性。再用同样速度离心10分钟，上清液于五氧化二磷干燥器中浓缩至3—5毫升。用3号滤纸（51 × 16 厘米²）纸层析二次上行层析分离：先在正丁醇：水：氨水 = 172:18:10（体积比）系统层析，层析结束后，在紫外灯下能看到二条紫外吸收带（图1）。从原点起第一条带含 UdR、U 等，第二条带含 T*dR 和 T* 等。沿此二条带中间剪开，在第二条带下边接上一小段（约5—7 厘米）层析滤纸，再用乙酸乙酯：甲酸：水 = 60:5:35（体积比）系统，取有机相进行层析。层析结束后，又可见二条紫外吸收带（图2）。第一条为 T*dR，第二条为 T*。分别剪下，用双蒸馏水洗脱，即得到氚标记胸腺嘧啶脱氧核糖核苷和待回收的氚标记胸腺嘧啶的水溶液（各约100 毫升）。置五氧化二磷干燥器中浓缩至所需体积，加入少量乙醇，进行120℃/30 分钟灭菌处理，贮藏于2—4℃冰箱中备用。

产品的鉴定：

用液体闪烁计数器纸片法进行测定。将第

1) 本文采用简写如下：T 胸腺嘧啶，U 尿嘧啶，UdR 脱氧尿嘧啶核苷，TdR 脱氧胸腺嘧啶核苷，* 表示含有放射性的化合物，TP 三甲苯，Tris 三羟甲基氨基甲烷

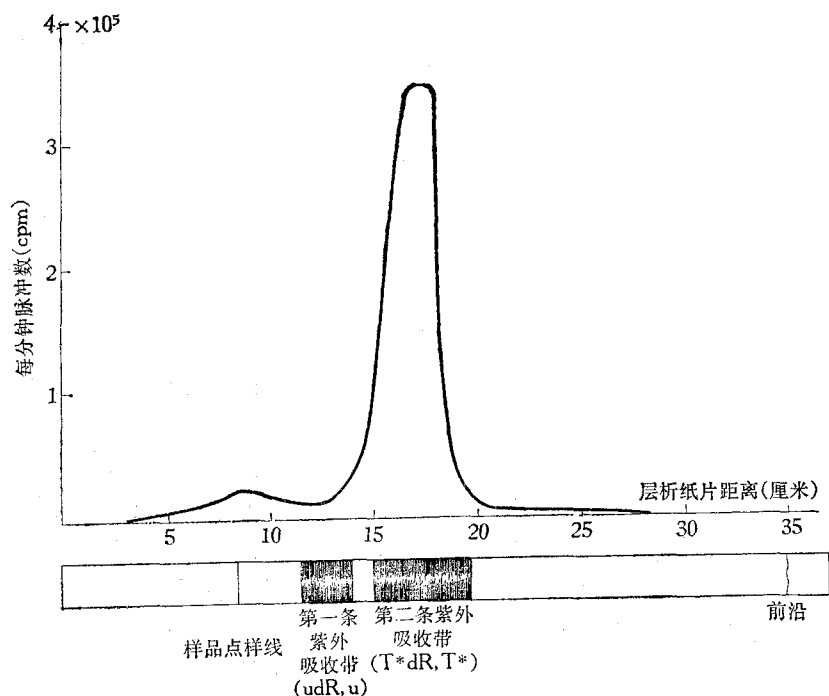


图 1 氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷、胸腺嘧啶和脱氧尿嘧啶核苷、尿嘧啶的分离

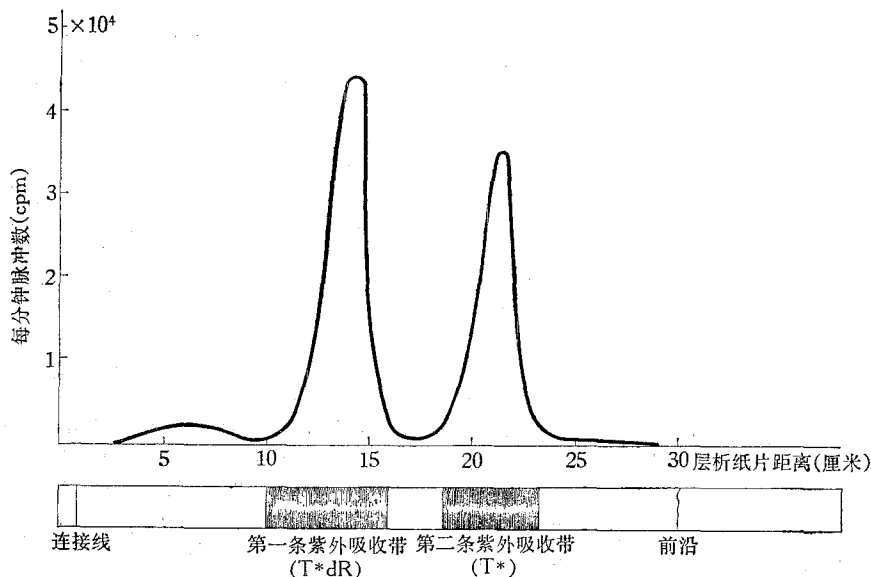


图 2 氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷与胸腺嘧啶分离

二次层析后的滤纸，按间隔 1 厘米长分成 25—30 等分，宽度取 1 厘米，以 5 毫升 TP-二甲苯闪烁液用液体闪烁计数器进行测定，并以此计算转换率和放化纯度(图 2)(我们的实验表明，纸片法测量结果与经水洗脱所得产物作均相测量的结果是平行的)。

产物在碱性介质中的紫外吸收光谱(见表 2)。

用液体闪烁计数方法测得放射强度和紫外吸收数值，计算得产品的比放射性为 3.7 居里/毫克分子和 1.9 居里/毫克分子。

表2 氚标记胸腺嘧啶脱氧核糖核苷紫外吸收光谱测定

	pH	$\lambda_{\text{最大}}$ (毫微米)	$\lambda_{\text{最小}}$ (毫微米)	250/260	280/260	290/260
测定值	碱性 0.1N NaOH	267	240	0.73	0.686	0.146
理论值	12—13	267	240	0.75	0.67	0.16

几点体会

(一) 制备氚标记胸腺嘧啶脱氧核糖核苷, 既可用酶合成法^[1,2], 也可用化学合成法^[3]。酶合成法较为方便, 转换率可达50%以上。产品比放射性和原料氚标记胸腺嘧啶一致。

(二) 国外资料报告^[1,2], 要在含蔗糖的磷酸盐和 Tris 二种缓冲液中通过冷冻超速离心(114000 g), 分离制备脱氧核糖转移酶制剂。这个方法不仅由于存在蔗糖给以后层析分离带来一定的麻烦(因糖浆十分粘稠, 样品总在滤纸上不易干), 而且对离心机的设备要求较高, 不能广泛推广。能否用不含糖的缓冲液? 能否降低离心速度而改用普通冷冻高速离心机? 我们遵照毛主席关于“一切真知都是从直接经验发源的”的教导, 进行了多次对照实验, 证明是完全可以的。

制备酶液所需的缓冲液, 国外资料报告要同时使用 pH 8 磷酸盐和 Tris 二种缓冲液^[1]。单用其中任一种是否行? 我们做了三组对照实验, 一组用 pH 8 磷酸盐缓冲液(0.1 M); 另一组用 pH 8 Tris 缓冲液(0.1 M); 第三组二种缓冲液同时使用。用同一只大白鼠肝组织, 分别使用这三组缓冲液以相同条件制备酶液, 在同一条件下进行酶反应, 结果都一样。重复了几次, 都得同样结果。实践表明单用其中一种缓冲液完全能满足酶反应的进行。从勤俭节约原则出发, 选用磷酸盐缓冲液是适当的。

De Verdier 等^[2]和 M. Winand 等^[1]认为酶

反应液除底物和酶液外, 还必须加入氯化钾、氯化镁、苹果酸钾、谷氨酸钾和三磷酸腺苷以及蔗糖等物质。这些附加的物质是否为酶反应所必需? 我们曾反复做了两组对照实验, 一组完全按照 De Verdier 等所提出的反应条件配制反应液; 另一组反应液中仅含底物和酶液。两组反应液在相同条件下进行反应, 结果对酶转换率没有明显的影响。

(三) 在产品分离提纯步骤中, 我们采用了一张滤纸连续走二个溶剂系统层析的办法, 简化了资料上所报道的分离方法^[1]。实践表明这个简化的层析方法既可达到分离提纯的目的, 也可以提高放射性物质的回收率。

(四) 在制备实验过程中, 我们采用了塑料离心杯作为反应、离心的容器, 使保温、沉淀、离心都在同一容器中进行。减少了溶液转移手续, 使放射性物质损失尽量减少。

(五) 采用高氯酸沉淀蛋白比用热变性除去蛋白好, 有较高的回收率。

由于采用了以上几点措施, 使本实验放射性物质回收率达90%以上。

参 考 资 料

- [1] Winand, M. et al.: Proceedings of the Conference on Methods of Preparing and Storing Marked Molecules, European Atomic Energy Community, 1147, 1963.
- [2] De Verdier et al.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **24** (1), 13, 1960.
- [3] Pichat, L.: *Bull Inform. Sci. Techn. (Paris)*, **178**, 73, 1973.

[本文于1975年9月9日收到]