

氚标记聚腺苷酸的制备

江善根 匡达人 朱心良 张孝勇

(中国科学院上海原子核研究所) (中国科学院上海细胞生物学研究所)

在现代生物科学研究中,许多课题,都需要对核酸的结构、功能及其改造作深入探讨。而在核酸研究中,所用试剂(包括一系列工具酶)中,核酸水解酶的含量必须降低到不致影响所要研究的核酸量。因为所要研究的核酸来源困难,所以常采用放射性同位素技术来提高检测灵敏度,以降低核酸用量,同位素技术与常量操作相比,可以把核酸用量降低几个数量级。因此核酸研究工具酶中的杂酶(主要是核酸水解酶)含量也要随之降低,以适应近代核酸研究的微量操作。

核酸水解酶按其底物专一性,分为两大类,即核糖核酸水解酶(RNase)和脱氧核糖核酸水解酶(DNase),有时要求无前者或无后者,有时

要求二者均无。但由于过去没有灵敏的检测方法,不能有效地去除这些杂酶。

为了提高检测 kNase 的灵敏度,需要有放射性同位素标记的底物。标记的方法:可以在体内,也可以在体外。体内标记往往由于放射性同位素本身具有毒性及射线的辐射损伤,不仅达不到要求的比放射性,并且给操作带来很多麻烦。体外标记可用天然核糖核酸(RNA)在其胞嘧啶上碘化(^{125}I 或 ^{131}I)^[1],或在5'端磷酸化(^{32}P)^[2],或氚化(^3H)。 ^{125}I , ^{131}I 及 ^{32}P 的共同缺点是半衰期短,末端标记的另一缺点是比放射性低。RNA 氚标记克服了半衰期短及比放射性低的缺点。

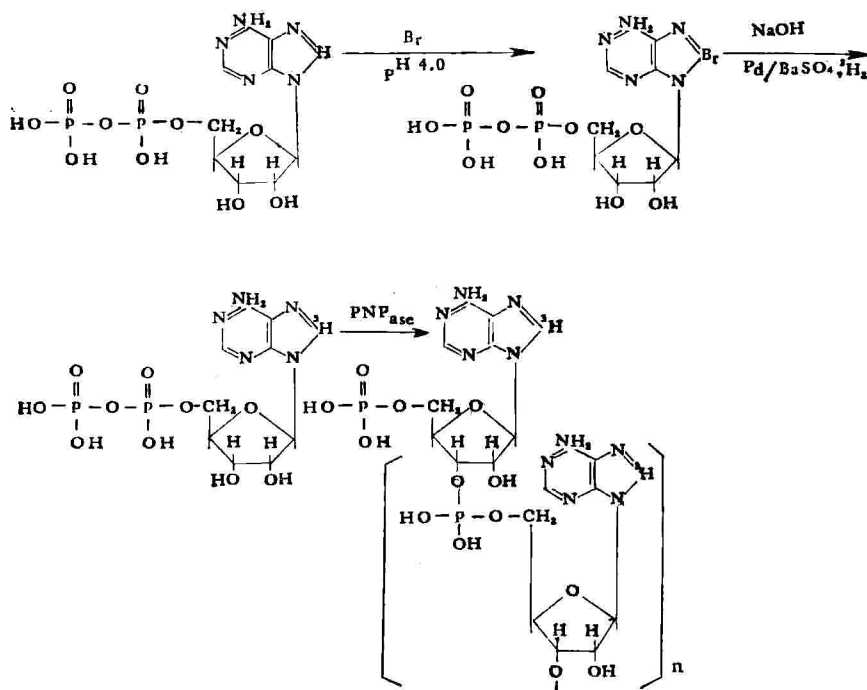


图1 ^3H -poly A 的制备流程

氚标记的方法近年来国外采用氚水交换法^[3],比放射性最高只有 13.6×10^5 Cpm/微克分子。对我们提取纯化 RNA 连接酶和 DNA 连接酶来说,这样的比放射性还不够,而且还发现 RNA 连接酶和 DNA 连接酶中的杂酶没有明显的碱基专一性,因此我们采用了氚标记聚腺苷酸 (^3H -poly A) 来代替。其方法是使 5'-ADP (腺苷二磷酸) 溴化得 [8-Br] 5'-ADP, 以 Pd/BaSO₄ 为催化剂, 使 [8-Br] 5'-ADP 氚化脱卤, 得到 [8- ^3H]5'-ADP。经多核苷酸磷酸化酶 (PNPase) 聚合, 用 HClO₄ 沉淀、分离, 制得 ^3H -poly A。比放射性为 1.4 毫居里/A₂₆₀¹¹⁴⁰ (pH7), 放化纯度达 98% 以上。制备流程见图 1。

一、材 料

氚源丰度 98% 以上, 由中国科学院原子能研究所供给, 分装后保存在铀粉瓶中。5% Pd/BaSO₄ (含 5% 钯的硫酸钡) 是自制的。PNPase 是中国科学院上海生物化学研究所提取的。“201×8”阴离子交换树脂, DEAE-纤维素及其它试剂都是国产的。

二、实 验

1. [8-Br]5'-ADP 钠盐的制备^[4]

100 微克分子 5'-ADP 钠盐溶于 5 毫升水中, 加入 4 毫升 1 M 醋酸-醋酸钠缓冲溶液 (pH 4.0) 及 0.94 毫升饱和溴水, 室温下放置过夜。次日加入 10 毫克 NaHSO₃, 待反应液由淡黄色变成无色, 加入 10 毫升乙醇, 于 50℃ 水浴中水泵抽干, 反复加入乙醇抽干数次, 以除去残余溴。残渣溶于 100 毫升水中, 将它吸附在“201×8” (100—200 目) Cl⁻ 型阴离子交换树脂柱上 (柱高 16 厘米; 直径 0.9 厘米), 经水洗后, 用 0.05 M NaCl + 0.001 N HCl 洗脱 ADP 及其杂质, 再用 0.08 M NaCl + 0.001 N HCl 洗脱 [8-Br] 5'-ADP, 流速 50 毫升/小时, 分部收集, 每管 10 毫升。分离曲线见图 2。第一、二个峰是 5'-ADP 及杂质。第三个峰是 [8-Br] 5'-ADP (A₂₆₀¹¹⁴⁰ 1140)。体积为 530 毫升, 然后用 0.01 M NH₄HCO₃ 稀释至 2,500 毫升 (pH8—9),

将它吸附在预先用 0.01 M NH₄HCO₃ 平衡过的 DEAE-纤维素柱 (柱高 34 厘米; 直径 2.3 厘米)。先用 0.01 M NH₄HCO₃ 淋洗至无 Cl⁻, 然后用 2 M NH₄HCO₃ 洗脱, 流速 80 毫升/小时。洗脱液在 50℃ 水浴中用水泵抽干, 反复加水抽干数次, 直至 NH₄HCO₃ 全部除去为止, 收率为 86.3%。

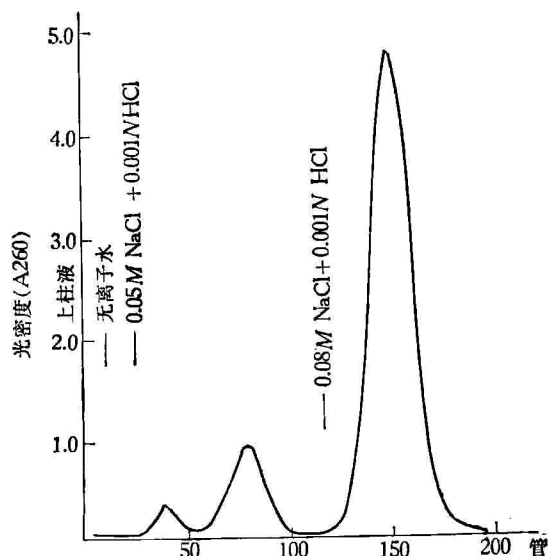


图 2 离子交换柱层析分离 [8-Br] 5'-ADP

2. [8-Br]5'-ADP 的鉴定

上行纸层析 (25℃) 比移值测定结果见表 1。紫外吸收光谱测定结果见表 2。

3. [8-Br]5'-ADP 的氚化

在约 2 毫升反应瓶内放入 50 微克分子 [8-Br] 5'-ADP, 加 1.0 毫升 0.2 N NaOH 溶液和 65 毫克 5% Pd/BaSO₄, 将反应瓶连至氚化装置, 见图 3。外用干冰-丙酮浴冷却, 使反应混合物冻结。然后打开所有活塞, 将装置的压力减至 1×10^{-3} 毫米汞柱, 关闭活塞 H. F. E. C。加热氚源铀粉瓶, 到 200℃ 以上氚气渐渐放出, 使水银压力计的压差达 250 毫米汞柱, 移去电炉, 同时转动活塞 B, 使反应瓶与刻度贮气管连通, 移去冷浴, 使反应混合物解冻至室温, 逐渐升高水银压力球, 待平衡后开始读体积, 接着电磁搅拌, 借水银压力球中的水银柱升降读氚气体积变化。反应半小时, 耗氚 1.0 毫升, 以后氚气体积不再变化, 说明反应已经终止。再用干冰-

表 1 5'-ADP 与 [8-Br] 5'-ADP 纸层析比移值的比较

比移值 样 品	溶剂系统	正丁醇:36%醋酸 = 1:1 (体积比)	异丁酸:0.5M 氨水 = 5:2(体积比)
5'-ADP		0.14	0.31
[8-Br] 5'-ADP		0.20	0.37

表 2 5'-ADP 与 [8-Br] 5'-ADP 紫外吸收的比较

	λ 最大 (毫微米)		250/260		280/260	
	pH 2.0	pH 7.0	pH 2.0	pH 7.0	pH 2.0	pH 7.0
5'-ADP	257	259	0.85	0.78	0.21	0.16
[8-Br] 5'-ADP	263	265	0.69	0.75	0.45	0.56

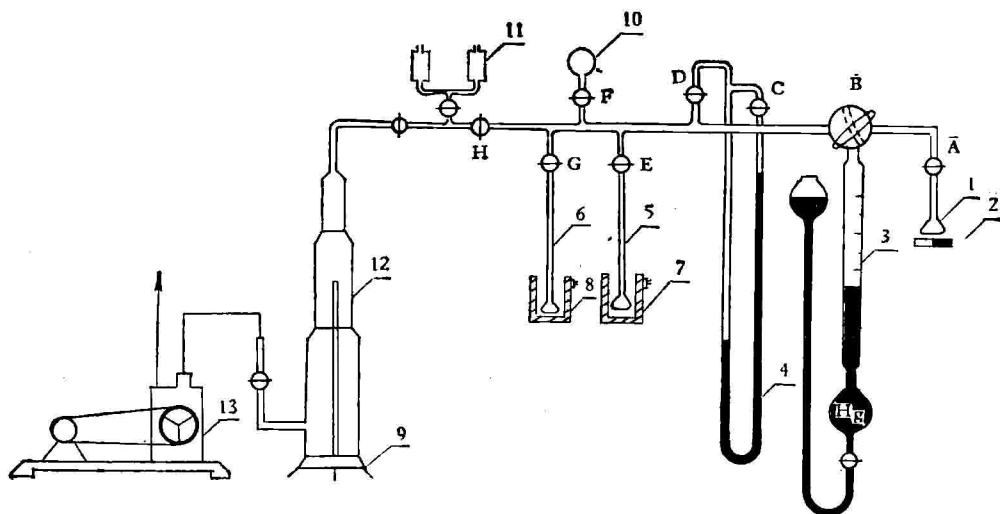


图 3 氟化装置

1——反应瓶 2——磁力加热搅拌器 3——贮气管 4——水银压力计 5——氟回收铀粉瓶 6——氟源铀粉瓶 7,8,9——电炉 10——缓冲泡 11——真空规 12——油扩散泵 13——真空机械泵

表 3 [8-Br] 5'-ADP 氟化

[8-Br] 5'-ADP (微克分子)	5% pd/BaSO ₄ (毫克)	反应时间 (分钟)	耗 氟 量 (毫升)	化学产率 (%)	放化产率 (%)	放化纯度 (%)	比放射性 毫居里/微克分子
50	65	30	1.0	90	28	85	15.6

丙酮浴冷却反应混合物至冻结,转动活塞 B, 用回收铀粉瓶将剩余的氟气回收, 打开所有的活塞, 装置抽真空, 关闭活塞 A, 取下反应瓶。反应混合物离心 5 分钟 (3500 转/分), 取出清液, 用稀 HCl 将清液调 pH 至 7, 在 45℃ 水浴中用水泵减压抽干, 用 2 毫升水溶解后再抽干, 重复

三次, 以除去产物中不稳定位置的氟原子, 结果见表 3。

4. [8-³H] 5'-ADP 的分析鉴定

在溶剂系统为异丁酸: 0.5M NH₄OH = 5:2 (体积比) 的上行纸层析图谱上有二个紫外吸收点, 其比移值分别与标准 5'-ADP 和 5'-AMP 相

同。经纸层析扫描仪测定, $[8-^3\text{H}] 5'-\text{ADP}$ 的放化纯度为 85%, 结果见图 4。

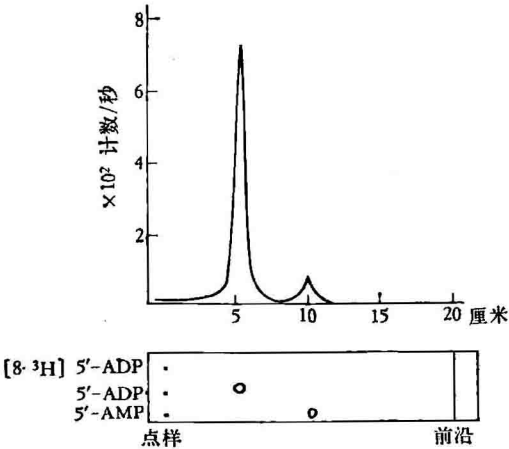


图 4 $[8-^3\text{H}] 5'-\text{ADP}$ 放射纸层析图谱

$[8-^3\text{H}] 5'-\text{ADP}$ 的紫外吸收性质与 $5'-\text{ADP}$ 一致。

比放射性的测定是用液体闪烁计数器和紫外吸收光谱, 分别测定 $[8-^3\text{H}] 5'-\text{ADP}$ 的放射性及浓度, 其比放射性为 15.6 毫居里/微克分子。

5. $^3\text{H-poly A}$ 的制备

在离心试管中加入 20 微克分子 $[8-^3\text{H}] 5'-\text{ADP}$ (放化纯度 85%); 0.1 毫升 1M Tris-HCl (pH 8.5); 0.1 毫升 0.1M MgCl_2 ; 30 微升 PNPase (0.6 单位), 最后用水稀释至 1.0 毫升, 37°C 温育, 6 小时后加入 5% HClO_4 , 反应液出现乳白色沉淀。低温离心 5 分钟 (3500 转/分), 弃

去清液, 沉淀物用 0.1 N NaOH 溶解并调 pH 至 7。

6. $^3\text{H-poly A}$ 的分析鉴定

在溶剂系统为 0.4 M 甲酸铵的上行纸层析图谱上与标准 poly A 一致, 位于原点。经纸层析扫描仪测定, 放化纯度达 98% 以上。结果见图 5。

比放射性测定是用液体闪烁计数器和紫外吸收光谱, 分别测定 $^3\text{H-poly A}$ 的放射性及浓度, 其比放射性为 1.4 毫居里/ $\text{A}_{260}^{\text{H}_2\text{O}}$ 。

三、结果与讨论

$^3\text{H-poly A}$ 用于提取纯化 RNA 连接酶、DNA 连接酶及碱性磷酸单酯酶。使这三种酶都符合寡核苷酸的连接与分析之用。但在提取有些核酸工具酶时, 如其中含有专一性的核酸水解酶而不能水解多聚腺苷酸时, 那么 $^3\text{H-poly A}$ 作为底物就无法检测这种杂酶。为此我们又合成了氚标记人工杂聚 RNA。这样对检测 RNase 就更具有普遍应用意义。其方法只是在 PNPase 聚合时, 底物用 25 微克分子 $[8-^3\text{H}] 5'-\text{ADP}$ (比放射性 15.6 毫居里/微克分子; 放化纯度 85%) 外, 还加 2.3 微克分子 $5'-\text{CDP}$ (胞苷二磷酸), 2.4 微克分子 $5'-\text{GDP}$ (鸟苷二磷酸), 2.3 微克分子 $5'-\text{UDP}$ (尿苷二磷酸), 其它步骤与前者一致。氚标记杂聚产物比放射性 1.3 毫居里/ $\text{A}_{260}^{\text{H}_2\text{O}}$, 放化纯度达 98% 以上。

为了鉴定氚标记杂聚产物中是否确实含 C (胞嘧啶), U (尿嘧啶), G (鸟嘌呤)。我们采用了二种方法:

1. RNase N1 来酶解氚标记杂聚产物

这一方法的原理是 RNase N1 只能酶解含 G 的 RNA, 如果这个 RNA 不能被 RNase N1 酶解, 就表示其中无 G。在 50 微升反应系统 中含 5—10 微升 RNase N1 (2600 单位/毫升), 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH7), 底物 $^3\text{H-poly A}$ (54,000 cpm) 或氚标记杂聚产物 (44,000 cpm), 在 37°C 下温育 60 分钟, 按常规纸片法检查 10% 三氯醋酸沉淀的放射性计数, 结果发现 RNase N1 既不能酶解 $^3\text{H-poly A}$, 也不能酶解

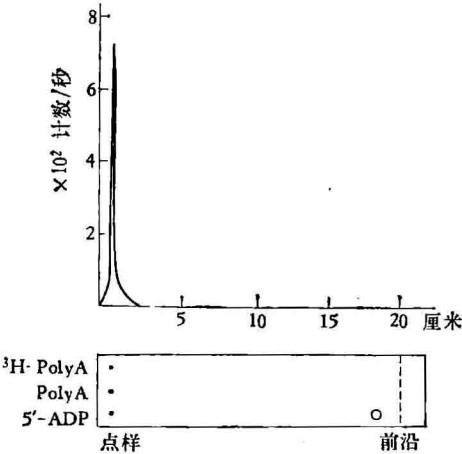


图 5 $^3\text{H-poly A}$ 放射纸层析图谱

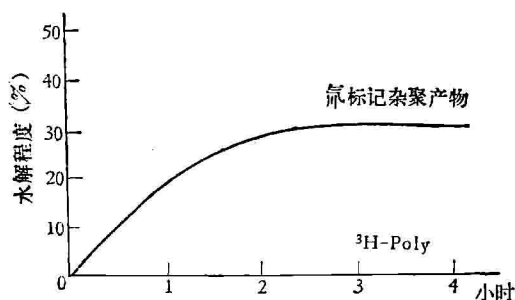


图6 比较RNase A降解 ^3H -poly A及氚标记杂聚产物的效率

氚标记杂聚产物。其原因可能有二个：(1) G被聚合进去的量极微，因此被酶解部分的链仍然很长，所以还能被10%三氯醋酸所沉淀。(2) G在 37°C 下不能被聚合进去，而必需以 Mn^{++} 代替 Mg^{++} ，温度提高到 60°C 才能聚合进去^[5]，所以在我们所用的聚合条件下，G被聚合的量极微，甚至没有。

2. 用RNase A酶解氚标记杂聚产物

这一方法的原理是：当RNase A浓度很低时，它只能酶解C、U的RNA，而酶解 ^3H -poly A的速度极慢，以致检测不出。但若提高酶量，则RNase A也能酶解 ^3H -poly A。我们的结果正是如此。在500微升反应系统中含有0.05 M Tris-HCl (pH 7.5)，0.5微克RNase A， ^3H -poly A (54,000 cpm) 或氚标记杂聚产物 (44,000 cpm)。在 37°C 下温育，按常规纸片法检查10%三氯醋酸沉淀的放射性计数，结果见

图6。从图6中可见在低酶量时， ^3H -poly A完全不能被酶解，而氚标记杂聚产物有30%被酶解，并且在2小时后就达平衡。这说明氚标记杂聚产物中含有C和/或U。

从以上二个实验可见氚标记杂聚产物中除含A(腺嘌呤)外，还含C和/或U，但G的含量极微，甚至没有，以致检测不出。

检测杂酶活力时，标记底物的比放射性与检测灵敏度关系很大，因此制备比放射性高的底物是提高检测杂酶灵敏度的关键。

[8-Br] 5'-ADP 吸附在“201×8”阴离子交换柱上，用0.08 M + 0.001 N HCl洗脱，此流出液曾直接通过“769”颗粒活性炭柱除盐，再用2% NH_4OH 的50%乙醇的水溶液洗脱，结果收率甚低，故改为DEAE-纤维素脱盐以提高收率。

参 考 文 献

- [1] Getz, M. J. et al: *Biochem. Biophys. Acta*, **287**, 485, 1972.
- [2] Richardson, C. C.: *Procedures in Nucleic Acid Research* **2**, 813, 1971.
- [3] Iida, S. et al: *FEBS. Letters*, **39**(3), 263, 1974.
- [4] Ikahara, M. et al: *Chem. Pharm. Bull.*, **17**(2), 348, 1969.
- [5] Kimhi, Y. et al: *Method Enzymol*, **12B**, 513, 1968.

[本文于1978年4月12日收到]

生物样品中 ^{14}C 的氧瓶燃烧测定法*

唐希灿 石其贤** 俞月桂 梁尤毅

(中国科学院上海药物研究所)

制备同位素生物样品进行液体闪烁测定的方法很多。氧瓶燃烧法由于操作简便，样品取量大，且最终得到的是无色液体，因而能克服一些比放射性低样品在测定时的化学淬灭；或在消化处理样品时引起 $^{14}\text{CO}_2$ 的丢失等缺点，目前

愈来愈广泛地得到重视和应用。我们在进行 ^{14}C -棉酚的吸收、分布和排泄研究时，曾采用过

* 本文曾于1975年7月26日在上海市放射性同位素医学应用交流会宣读讨论。

** 浙江人民卫生实验院药物研究所。