

# 一种合成氚标记-Y 磷酸胞嘧啶乙酰神经氨酸的简便方法

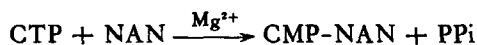
叶建南 顾天爵

(上海医科大学生物化学教研室)

## 提 要

本文介绍一种合成氚标记-磷酸胞嘧啶乙酰神经氨酸 (CMP-<sup>3</sup>H-NAN) 的有效方法。其步骤主要采用在碱性环境中使氚水中的氚元素与游离乙酰神经氨酸 (NAN) 第三位碳原子上氢元素发生交换而得放射标记物。然后在 CMP-NAN 合成酶的作用下使其与 CTP 反应而得 CMP-<sup>3</sup>H-NAN。本法的特点是流程简便, 成本低廉, CMP-NAN 合成酶的提取与保存十分方便。

在糖蛋白和糖脂等大分子的糖苷链合成中, 不同种类糖的导入是由各自的糖苷转移酶催化完成的。唾液酸一般在糖链的末端, 故它的导入在糖合成中有着特殊的含义。现已清楚催化唾液酸的糖苷转移酶是采用 CMP-NAN 为底物的, 因此要在体外对此酶进行研究就必须有足够的标记 CMP-NAN。目前, 此底物在国内尚无厂家生产, 而且在国外市场上也经常短缺和价格昂贵。这就限制了这方面的研究工作在国内开展。本法采用氚水交换的唾液酸与 CTP 在 CMP-NAN 合成酶的作用下, 按下列反应生成



标记的 CMP-NAN。其方法简便易行, 成本低廉, 在一般实验室均能完成。

## 材 料 与 方 法

### 1. 材料

CTP, 乙酰神经氨酸, 标准 CMP-NAN 均为美国 Sigma 产品; CMP-[4,5,6,7,8,9-<sup>14</sup>C] 乙酰神经氨酸美国 New England Nuclear Station 产品; 高效层析板为西德 E. Merck 产品; Dowex-1 为英国 Dow Chemical Co. 产

品。其它试剂均为分析纯的上海产品。氚水由本校同位素室提供。小牛脑来自大场牛羊部。

### 2. 方法

a. 标记唾液酸的制备: 参照 Dorland 等人的方法作了某些改进<sup>[1]</sup>。11.1mg 乙酰唾液酸溶于 0.5ml 水中, 并用 1mol/L NaOH 中和至中性, 然后冰冻干燥。干燥后的唾液酸钠盐再溶于 0.5ml 氚水中, 用碱将 pH 调到 9, 室温下反应 48 小时。反应完毕后过 Dowex-1 柱 (2 × 10cm) 以分离标记唾液酸。

b. CMP-NAN 合成酶的提取: 参照 Eijnden 方法进行<sup>[2]</sup>。新鲜小牛脑去胞膜及结缔组织, 分离脑灰质并加二倍重量体积 0.01mol/L 焦磷酸钠盐溶液用组织分散器匀浆三次, 每次 20 秒。匀浆液去泡沫, 于 15000 × g 离心 30 分钟去沉淀。上清液冰冻干燥, 干燥后的上清蛋白 4℃ 贮存至少稳定一年。临用前将此蛋白溶于水中 (30mg/ml), 用玻璃匀浆器充分匀浆, 于 12,000 × g 离心 30 分钟去上清液。沉淀溶于 0.4mol/L KCl 溶液 0.2ml 再于 12,000 × g 离心 20 分钟, 保留上清并于 200 倍体积的 5mmol/L Tris/HCl 缓冲液 (含 0.1% 巯基乙醇和 1mmol/L MgCl<sub>2</sub>) pH7.6 透析过夜。每克干

粉透析完毕的 KCl 抽提物含有 40—50 个单位的酶活性即可直接用于合成 CMP-NAN。

c. CMP-NAN 合成酶活性测定: 在 0.5ml 的反应体系中有列物质: NAN  $2.5\mu\text{mole}$ , CTP  $2.5\mu\text{mole}$ , Tris-HCl  $90\mu\text{mole}$  (pH9),  $\text{MgCl}_2$   $10\mu\text{mole}$  和酶溶液。37℃ 反应 30 分钟后加入 0.075ml  $\text{NaBH}_4$  (100mg/ml)。反应 15 分钟后加 0.075ml 丙酮,再待丙酮作用 15 分钟后按 Warren 法测结合 NAN 含量<sup>[3]</sup>。酶活性单位定为  $1\mu\text{mole}$  CMP-NAN/小时为一个单位。

d. CMP- $^3\text{H}$ -NAN 的合成: 参照 Eijnden 方法略加改良<sup>[2]</sup>。在总体积 6ml 的反应体系中含有列反应物: [ $^3\text{H}$ ] 标记 NAN 11.1mg, CTP 44mg, 乙酸镁 45mg, Tris/乙酸 pH9.0  $800\mu\text{mole}$  和 40—50 个单位酶液。在 37℃ 条件下反应 1.5 小时后再加 CTP 20mg, 酶液 20 单位使最终体积达 8ml, 继续反应 2 小时后用 8ml 冷丙酮终止。

e. 产物的提取: 上述反应液离心去蛋白后冰冻干燥。干燥物溶于 2ml 95% 乙醇/水 (1:1 V/V), 点样于 3 号 whatman 滤纸吹干。用 95% 乙醇/0.6mol/L  $\text{NH}_4\text{OH}$  (7:3 V/V) 作展开剂层析 4—6 小时, 吹干后将  $R_F$  值 0.3—0.7 的区域剪下用 0.013mol/L  $\text{NH}_4\text{OH}$  下行层析洗脱 2—4 小时, 收集洗脱液冰冻干燥后溶于乙醇/水 7:3 的溶液置  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。

## 结果与讨论

本法采用部分纯化 CMP-NAN 合成酶做酶源, 酶促合成的产物按唾液酸量计算产率高达 65% 以上, 放射性比度为  $1.5 \times 10^6 \text{dpm}/25 \text{n mole}$  标记产物。本结果与过去的方法<sup>[4]</sup>相比是令人满意的。合成 CMP- $^3\text{H}$ -NAN 的层析行为与标准品一致。经水解后此复合物分解为二种产物, 用间苯二酚 (Resocinol) 显色和紫外吸收鉴定分别为 NAN 和 CMP。结果见表 1。

表 1 合成产物及其水解产物与标准品的层析行为比较 (表中值为  $R_F \times 100$ )

| 支持物            | 鉴定方法         | 合成物<br>CMP- $^3\text{H}$ -<br>NAN | 水解物  |                     | 标准品                 |         |                                |
|----------------|--------------|-----------------------------------|------|---------------------|---------------------|---------|--------------------------------|
|                |              |                                   | CMP  | [ $^3\text{H}$ ]NAN | [ $^3\text{H}$ ]NAN | CMP-NAN | CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]<br>NAN |
| whatman<br>滤纸* | UV           | 44.8                              | 65.0 | —                   | —                   | 44.8    | 44.6                           |
|                | 放射强度测定       | 44.8                              | —    | —                   | —                   | —       | 44.6                           |
| 高效板*           | Resocinol 显色 | 35.2                              | —    | 65.0                | 65.2                | 35.0    | 35.0                           |
|                | 放射强度测定       | 35.2                              | —    | 65.0                | 65.2                | —       | 35.0                           |

\* 展开剂为: 95% 乙醇/0.6mol/L  $\text{NH}_4\text{OH}$  (7:3V/V)

用新合成的标记 CMP-NAN 做为神经节苷脂唾液酸转移酶底物的实验表明完全达到体外实验的要求。

## 参 考 文 献

[1] Dorland, L. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,

1982, 104, 1114.

[2] Eijnden, D. H. et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1972, 353, 1817.

[3] Warren, L.: *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 1971.

[4] Kean, E. L. et al.: *Method. Enzymol.*, 196C, 3, 208.

[本文于 1987 年 3 月 24 日收到]