

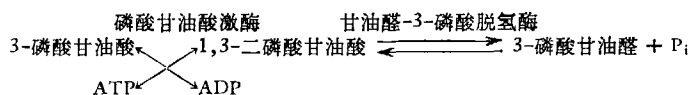
酶促合成高比放射性 γ - ^{32}P -ATP

采用一种简便的管道装置

中国科学院上海生物化学研究所三室
上海原子核研究所二室

ATP 具有高能磷酸键,在生物体能量的交换中占着中心地位。蛋白质生物合成、肌肉收缩和磷酸基的转移等重要生理过程,都必须有它参加。同位素标记的 ATP 对研究代谢过程提供了一项有效的方法,对某些可利用它来测定活性的酶,则能把测活性的灵敏度大大提高。因此, γ - ^{32}P -ATP 在生化研究中是一种很有用的试剂。

γ - ^{32}P -ATP 的制备方法主要有化学合成法^[1]、光合磷酸化法^[2]和酶促法^[3]。我们根据实验室条件,选用了在酶促条件下制备 γ - ^{32}P -ATP。其反应机理为利用非标记的 ATP 在酶的催化下,使 ATP γ -位上的磷酸与 ^{32}P 标记的无机磷酸盐之间进行交换。这样获得的产品比放射性高、纯度好。



为了适应高比放射性 γ - ^{32}P -ATP 合成的需要,我们设计了一套简便的装置,使反应、分离、浓缩等全部过程都在管道中进行,便于遥控操作。

材料与 方法

放射性磷源 ^{32}P i 以 H_3PO_4 形式贮存于 0.1N HCl 中,由北京中国科学院原子能研究所供给,使用前用计算量的 NaOH 中和。

酶制剂 兔肌磷酸甘油酸激酶按 Scops 方法分离纯化^[4],以 5 毫克/毫升浓度悬浮于含 0.04M $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 的 2.4M 硫酸铵溶液中, pH~7。兔肌甘油醛-3-磷酸脱氢酶按 Cori 等人方法制备,并重结晶二次^[5],以 30 毫克/毫升浓度悬浮于 2.5M 硫酸铵溶液中。二种酶制剂在 4℃ 贮

存,可用半年以上。

ATP 及其含量测定 ATP 系上海生化制药厂针剂。ATP 含量用上海分析仪器厂 751 型分光光度计测波长 260 毫微米的光吸收。ATP 克分子消光系数以 15×10^3 计算。

放射强度测量 用液体闪烁计数器积分外推法与 4 π 计数器进行绝对强度测定。

合成 γ - ^{32}P -ATP 的装置 根据反应条件、分离条件和浓缩要求,我们经过试验,采用一般的玻璃器皿和聚乙烯管,配上标准磨口组成了一套简便的管道系统(如图 1 所示)。操作者可在数米外借水泵进行溶液的添加和转移。此外,

本文采用简称如下:

ATP 腺嘌呤核苷三磷酸(腺三磷); ADP 腺二磷;
AMP 腺一磷; Pi 无机磷酸盐;
Tris 三羟甲基氨基甲烷。

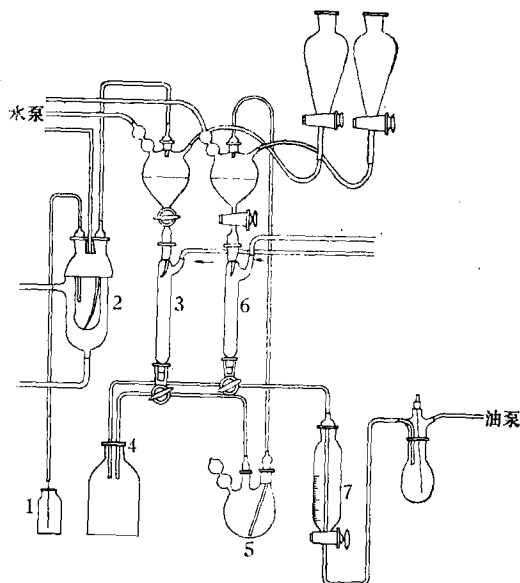


图 1

在管道系统之前用一块厚约 3 厘米的有机玻璃板屏蔽,有机板外侧的放射剂量用乙丙仪测定,放射性剂量小于 0.5 毫伦/小时。

反应液组成 基本上同Glynn和Chappell^[3]。依次由进样针(1,图1中编号,下同)将下列试剂抽进到具有保温夹套的反应容器(2)中: 1M Tris-HCl 缓冲液, pH8.0, 0.5 毫升; 1M MgCl₂ 0.06 毫升; 0.1N NaOH 1.02 毫升; 半胱氨酸 20 微克分子; ATP 20 微克分子; 3-磷酸甘油酸 10 微克分子; 磷酸甘油酸激酶 250 微克; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 3 毫克。然后抽进 ³²P 标记的无机磷酸盐,并用水使最后体积为 10 毫升,在 26°—30°C 保温 1 小时。

γ -³²P-ATP 的分离 保温结束后,直接把反应液转移到强碱性阴离子交换树脂 711(Cl⁻)

柱(3)上(0.9 × 2.0 厘米),流速通常为 1 毫升/分,如果流速太慢可借柱的支管(图1中箭头所示)加压来控制。流出液由柱下端三通活塞流到废液瓶(4)中。用 10 毫升水经过反应容器洗涤 711 柱。然后用 40 毫升含有 0.02M NH₄Cl 的 0.02N HCl,分三次从分液漏斗中加入,通过 711 柱洗去 AMP、ADP 和无机磷。再用 40 毫升水分三次通过 711 柱洗去铵离子,以上洗出液均进入废液瓶(4)。最后用 20 毫升 0.25N HCl 通过 711 柱,把 ATP 洗脱至收集瓶(5)中。

收集瓶(5)中的酸性 ATP 溶液转移到活性炭柱(6)上(0.9 × 2.0 厘米,上海活性炭厂 769 活性炭于 1N HCl 中煮沸 30 分钟活化,水洗至中性备用),用 50 毫升水分三次从另一分液漏斗加入,将活性炭柱洗至中性,以上流出液均排至废液瓶(4)中,再用 30 毫升含 0.15M NH₄OH 的 50% 乙醇水溶液洗活性炭柱,洗脱液进入收集瓶(7)中,取 0.1 毫升用水稀释至 3.0 毫升测 ATP 含量,取 0.1 毫升稀释液测放射性。收集瓶(7)中的其余部分分数次转移到浓缩瓶(8)中,于 40°C 以下用油泵快速浓缩至干。油泵和浓缩瓶中间装有外用干冰冷却的冷阱,以提高效率及保护油泵。

结果和讨论

用低比放射性的医用磷源及无载体磷源进行合成,结果如下表所示。由保温酶促反应开始把 γ -³²P-ATP 浓缩至干,约需八小时,方法是比较简便的。

磷 源	剂 量	总 ATP 量	ATP 回收	³² P 转化率	ATP 比放射性
医 用	1.2 毫居	66 微克分子	60%	80%	15 毫居/毫克分子
无 载 体	5.7 毫居	20.6 微克分子	79%	50%	180 毫居/毫克分子
无 载 体	20.6 毫居	20.6 微克分子	72%	80%	700 毫居/毫克分子
无 载 体	15 毫居	16.5 微克分子	89%	84%	770 毫居/毫克分子

得到的 γ -³²P-ATP 比放射性与加入的 ³²Pi 成正比,每次用约 6 毫居的无载体的 ³²Pi,每毫

克分子的 ATP 比放射性强度可达 180 毫居左右。当 ³²Pi 用 20 毫居时,可得比放射性约为 700

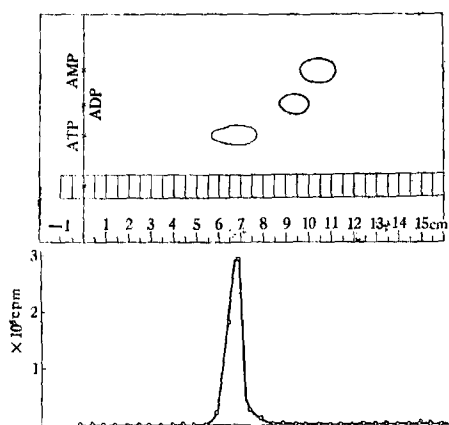


图2 γ - ^{32}P -ATP 的层析图谱和放射性测量
 Whatman No. 1 层析纸 10×18 厘米
 展层溶剂 异丁酸: 1NNH₄OH: 0.1M EDTA =
 100:60:1.6(V/V)
 放射性用 NE-8301 型液体闪烁计测定。

毫居/毫克分子 ATP。欲得到更高比放射性强度的 ATP, 可再相应地增加 $^{32}\text{P}_i$ 的剂量。

γ - ^{32}P -ATP 的化学纯度和放射纯度鉴定, 采用上行纸层析法。标准 AMP、ADP、ATP 的位置用紫外灯检出。放射样品区内的纸剪成宽 1.0 厘米, 长 0.5 厘米的小纸条, 浸入 6 毫升甲苯闪烁液中计数。纸层析和放射测定结果如图 2 所示, 除相应于 ATP 位置上有放射性外, 没有能察觉出其他的放射点 (图 2)。

Glynn 和 Chappell^[3] 在保温结束后加 5 倍体积乙醇停止酶反应, 还要用旋转蒸发浓缩等步骤, 操作比较繁琐。我们将反应液直接上柱分离, 效果也很好, 这样简化了若干步骤, 为管道化操作创造了条件。

Walsk 工作中^[6], 不采用阴离子树脂分离, 而只用活性炭柱, 这样的产品纯度较差, 含有少量 AMP、ADP 等杂质。我们在活性炭柱前增加了阴离子树脂分离, 提高了产品纯度。阴柱和活性炭柱联合使用比单用阴柱有二个优点, 第一, 活性炭柱用乙醇氨水洗脱, 洗脱液容易浓缩

至干; 第二, 这样获得的 ATP 为无盐制剂, 产品能适应各种不同的需要。而阴离子柱洗脱下来的为酸性溶液, 需加 Tris 中和后再进行浓缩, 既难浓缩又含有不少盐在内。

上述方法制备的 γ - ^{32}P -ATP, 现已应用于数项科研工作中, 效果良好。

参 考 资 料

- [1] Moffatt, J. G.: *Methods Enzymol.*, **12**, 182, 1967.
- [2] Littauer, U. Z., Kimhi, Y. and Avron, M.: *Anal Biochem.*, **9**, 85, 1964.
- [3] Glynn, I. M. and Chappell, J. B.: *Biochem. J.*, **90**, 147, 1964.
- [4] Scopes, R. K.: *Biochem. J.*, **113**, 551, 1969.
- [5] Cori, G. T., Slein, W. W. and Cori, C. F.: *J. Biol. Chem.*, **173**, 605, 1948.
- [6] Walsh, D. A.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 1971.

(上接 26 页)

(1972 年) 报告正常细胞及恶变细胞 cAMP 的水平不同, 正常细胞 3T3、3T3/Bolb 内 cAMP 水平较高, 而转变成肿瘤细胞 3T6、3T12 及病毒感染的肿瘤细胞 Py3T3、SV3T3 内 cAMP 的水平较正常为低。细胞恶变后再恢复为正常细胞时, 细胞内 cAMP 的水平也随即恢复到正常。这三类细胞对激素的反应略有不同。前列腺素能使 3T3 正常细胞内 cAMP 含量提高 6 倍, 恶变细胞只增高二倍。胰岛素对两种细胞的作用无区别。根据某些激素有抑制肿瘤细胞生长的作用, 也间接支持 cAMP 能控制细胞生长的观点, 高度恶变的细胞可能缺少 cAMP。某些物质能提高细胞内 cAMP 水平, 可能抑制细胞的生长; 另一些物质能降低 cAMP 的水平, 可能刺激细胞的生长。为了进一步了解细胞内 cAMP 的含量为何发生变化, 一些学者还比较了正常和肿瘤细胞内合成和分解 cAMP 的酶活性, 目前尚未得到系统的看法。

从大量的工作中已看到肿瘤细胞分裂速度快以及分化是不完全的, 恶变程度愈高, 分化愈低、分裂愈快; 高度分化的细胞, 则往往分裂很慢, 甚至不分裂。细胞的分裂与分化似乎是一对矛盾的事物, 从以上所举的 cAMP 对组织培养细胞的影响实验中, 可以看到 cAMP 似乎在调节这对矛盾中起着一定的作用。

电 泳

在外加电场的作用下, 混悬于液体中的电荷颗粒 (离子或分子) 向一极迁移的现象叫做电泳。由于电荷颗粒的净电荷和大小的不同就以不同的速度向一极迁移, 因而可将混合物中性质极为相似的不同颗粒进行有效的分离。此外, 电泳法还应用于测定颗粒的迁移速度, 从而算出其分子量。因此电泳法是目前普遍使用的生物学实验技术之一。

