

放射性碘化脱氧胞嘧啶核苷三磷酸的快速合成法*

朱心良 陈乐容 冯锦明 苏国富

(中国科学院细胞生物学研究所三室)(军事医学科学院)

脱氧胞嘧啶核苷三磷酸(dCTP)在三氯化铊催化下,进行碘化反应后,用Dowex 1×8(甲酸型)柱分离纯化^[1-4],然后用活性炭柱吸附去盐,产物用乙醇/氨水洗脱,再减压浓缩并溶解于乙醇/EDTA中,0℃以下保存。整个标记过程可在一天之内全部完成。实验证明,这样合成的[5-¹²⁵I]dCTP完全可以作为合成DNA的底物。

一、材料 无载体放射性同位素 Na¹²⁵I(北京原子核所),脱氧胞嘧啶核苷三磷酸(dCTP, Boehringer Mannheim GmbH)。大肠杆菌DNA聚合酶I(北京微生物所, 830单位/毫升)。反向转录酶(Avian Myeloblastosis Virus AMV美国Life Science Research Laboratory的Dr. J. Beard赠送, 6900单位/毫升)。小牛胸腺末端转移酶和小牛胸腺DNA聚合酶参照Yoneda^[5]和Chang^[6]等方法由本室制备,酶浓度分别为每毫升1870单位和155单位(将另文报道)。

二、dCTP纯化 图1说明所用dCTP不纯,为了提高产率,在标记前必须经过纯化。我们将dCTP用0.05M三乙胺/甲酸, pH4.5电泳纯化获得了预期结果。

三、[5-¹²⁵I]dCTP的制备 先将38.4微升无载体Na¹²⁵I(1.0mCi)与18微升KI(0.1328克/升)混合,加20微升dCTP(0.135μM)/100微升0.2M NaOAc, pH5/3微升65mM TiCl₃,反应总体积在200微升左右,混合后封管,在65℃温育30分钟,冷却开管后,加11微升1.8M Tris-HCl, pH8.0,继续在65℃温育15分钟。冷却后加1毫升重蒸水,上样至Dowex 1×8柱进行分离纯化(图2)。Commerford和Bhalla等报道CTP或dCTP碘化后,在波长310nm处吸收比较高,而未碘化前在此波长处几乎无吸

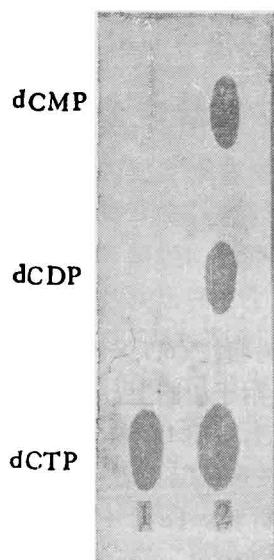


图1 用DEAE-纤维素薄层析板层析测定dCTP纯度
1.电泳纯化后dCTP样品 2.电泳纯化前dCTP样品

收。用吸收光谱法选择碘化反应最佳条件虽然是方便的,但是我们认为在用放射性同位素进行碘化反应时,可以直接测定每份洗脱液的放射性活力。如Dowex 1×8柱层析图中共有三个放射性活力峰,I峰估计为[5-¹²⁵I]dCMP,II,III峰用DEAE-纤维素薄板层析^[8]后,再作放射自显影,证明分别为[5-¹²⁵I]dCDP和[5-¹²⁵I]dCTP。碘化反应产物经纯化后普遍采用二次凝胶柱过滤法去除产品中的盐。我们也曾试用SephadexG-10(1×22厘米)凝胶柱脱盐,但是,第一,虽经二次凝胶柱过滤,产物中仍含有少量甲酸盐。第二,每次为了上凝胶柱,样品都必须浓缩为小体积,因此整个碘化过程既费时又费事。第三,反复过柱、洗脱、浓缩,产品损失也大。我们现在改用活性炭柱去盐,将766型活性炭以50%乙

* 黄圣凯(南京药学院)、张伽敏(武汉大学生物系毕业实习生)也参加部分工作。

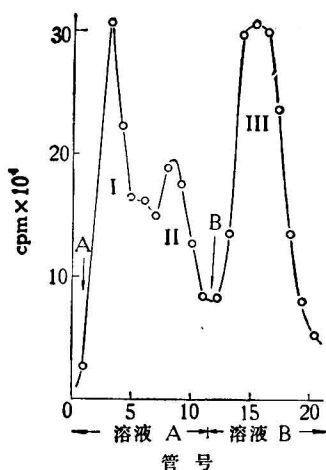


图2 Dowex 1×8 (甲酸型)柱层析分离纯化 [5-¹²⁵I]dCTP

Dowex 1×8 柱(0.5×6.5厘米)(树脂按 Hurlbert^[7]法处理成甲酸型)。以溶液 A(0.3M 甲酸铵/4M 甲酸)洗出二个放射性活力峰后,改用溶液 B(1M 甲酸铵/4M 甲酸)洗脱 [5-¹²⁵I] dCTP。流速为 2 毫升/8—10 分钟。

I 峰: [5-¹²⁵I]dCMP、II 峰: [5-¹²⁵I]dCDP、
III 峰: [5-¹²⁵I]dCTP。

醇/2% 氨水洗滌除去色素后,用 6NHCl 煮沸 30 分钟,水洗至中性备用。Dowex 1×8 柱

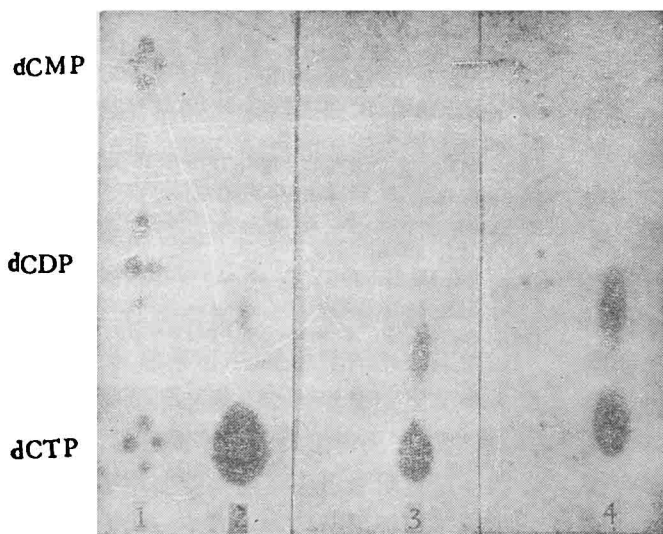


图3 DEAE-纤维素薄板检定 [5-¹²⁵I]dCTP 纯度
用 0.036 NHCl 上行层析, ³²P 墨水标记 dCTP 衍生物位置,
再以 X 光片作放射自显影

1. ³²P 墨水标记的 dCTP 衍生物位置。 2. [5-¹²⁵I] dCTP 产物。
3. [5-¹²⁵I] dCTP 溶解于 50% 乙醇/0.05 mM EDTA 水溶液中,保存 30 天后。 4. [5-¹²⁵I]dCTP 水溶液保存一周后。

[5-¹²⁵I] dCTP 峰用水稀释后可以直接被活性炭柱(0.5 × 2.5 厘米)吸附,用水淋洗至流出液计数接近本底改用浓缩时极易去除的 50% 乙醇/2% 氨水洗脱 [5-¹²⁵I]dCTP,因而减少了操作步骤,缩短了操作时间,整个方法简易快速。活性炭柱回收达到 70.2%,获得 [5-¹²⁵I] dCTP 1.2 × 10⁸cpm,比放射性可达 1.8 × 10¹³cpm/毫克分子,纯度为 98% 以上(图 3)。

四、贮存 Krish^[9] 曾报道 [5-¹²⁵I] dCTP 水溶液即使在低温下保存亦极不稳定,我们也得到了类似的结果,保存一周后几乎降解一半。Bhalla 采用冰冻干燥贮存于 -20℃ 的方法,虽然能延长保存时间,但很不方便。我们将 [5-¹²⁵I] dCTP 溶于 50% 乙醇/0.05 M EDTA 中,保存于 0℃ 以下,既使用方便,又达到延长保存时间的目的 (保存一个月后 [5-¹²⁵I]dCTP 含量仍在 75% 以上)(图 4)。

五、产品检定 Bhalla 报道用 PEI-纤维素薄板层析检定 [5-¹²⁵I]dCTP 纯度,并指出在 1M LiCl 展层时 R_f 值是 dCTP > dCDP。我们以 PEI-纤维素层析时结果与 Bhalla 相反,而与 Randerath^[10] 和 Bandendistel^[11] 等报道一致, R_f 值是 dCTP < dCDP。本文中常规使用的 DEAE-纤维素薄板层析中, R_f 值亦是 dCTP < dCDP。

六、用 [5-¹²⁵I]dCTP 为底物进行 DNA 合成的掺入试验 我们曾经用 [5-¹²⁵I]dCTP 为底物,试验反向转录酶 (AMV),大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 和小牛胸腺 DNA 聚合酶,小牛胸腺末端转移酶催化合成酸不溶产物的掺入情况。所有反应混合液均在 37℃ 中温育,除反向转录酶 (AMV) 每次取反应混合液 45 微升外,其它各反应液均取样 30 微升,点于 Whatman DE-81 层析滤纸上,用冰冷的 5% K₂HPO₄ 漂洗后,再用乙醇及乙醚洗,烘干后用井型 NaI 结晶闪烁测定器测定掺入情况。图 4—5 证明我们用放射性同位素碘化标记的 [5-¹²⁵I] dCTP

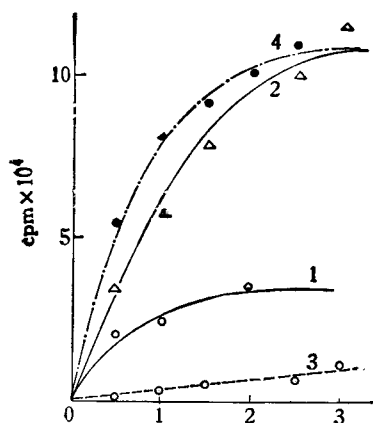


图4 $[5-^{125}\text{I}]$ dCTP 为底物, 反向转录酶 (AMV)、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I、小牛胸腺 DNA 聚合酶和小牛胸腺末端转移酶合成酸不溶产物的时间曲线

1. 反向转录酶 (AMV) 的时间曲线。200 微升反应液含 50 mM Tris-HCl, pH 8.3/8mM MgCl_2 /40mM KCl/10 mM 二硫苏糖醇/0.8 mM dATP、dGTP 和 dTTP/0.02 mM dCTP/0.05 mM oligo(dT)₇/牛血清白蛋白 20 微克/TMV RNA 128 微克/ $[5-^{125}\text{I}]$ dCTP 2.4×10^6 cpm/反向转录酶 I 微升 (●—●)。2. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的时间曲线。200 微升反应液含 50 mM Tris-HCl, pH 8.3/8mM MgCl_2 /10 mM 二硫苏糖醇/0.5mM dATP、dGTP 和 dTTP/0.2 mM dCTP/ $[5-^{125}\text{I}]$ dCTP 1.3×10^6 cpm/活化小牛胸腺 DNA^[12] 60 微克/大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 2 微升 (△—△)。3. 小牛胸腺 DNA 聚合酶的时间曲线。反应液同 2, 但加入小牛胸腺 DNA 聚合酶 5 微升 (——)。4. 小牛胸腺末端转移酶的时间曲线。200 微升反应液含 200mM 二甲胂酸钠/1mM 巯基乙醇/1mM CoCl_2 /10 μM oligo(dT)₇/0.2 mM dCTP/ $[5-^{125}\text{I}]$ dCTP 2.6×10^6 cpm/小牛胸腺末端转移酶 16 微升。

作为 DNA 合成的底物时, $[5-^{125}\text{I}]$ dCMP 掺入酸不溶高分子物质的效果都是满意的。

我们知道氡标记化合物放射性强度低, 测试效率也低。 ^{32}P 标记化合物虽然能弥补上述缺点, 但它的半衰期却短 (14 天)。 $[^{125}\text{I}]$ 标记化合物具备放射性强度高, 测试效率也高、半衰期比较长 (60 天) 等优点, 可以弥补上述 2 种标记

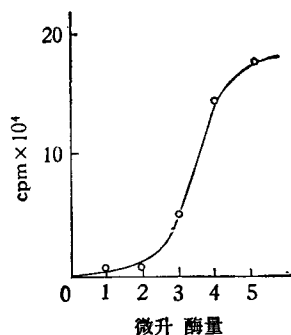


图5 $[5-^{125}\text{I}]$ dCTP 为底物, 小牛胸腺末端转移酶催化合成酸不溶产物的酶量曲线
反应液组成同图 4—4, 37°C 温育 2 小时。

化合物的不足。本文报道的 $[5-^{125}\text{I}]$ dCTP 通过 DNA 合成试验, 证明适用于 DNA 聚合酶 (大肠杆菌和小牛胸腺 2 个不同来源的)、反向转录酶 (AMV)、小牛胸腺末端转移酶底物, 因此为研究基因的重组和分离等方面工作, 提供了放射性标记底物的一个有效制备方法。

参 考 文 献

- [1] Commerford, S. L. *Biochemistry*, 10, 1993, 1971.
- [2] Bhalla, R. B. et al.: *BBRC*, 72, 513, 1976.
- [3] Scherberg, N. H. et al.: *BBA*, 340, 446, 1974.
- [4] Anderson, D. M. et al.: *Biochemistry* 15, 1022, 1976.
- [5] Yoneda, M. et al.: *J. B. C* 240, 3385, 1965.
- [6] Chang, L. M. S. et al.: *J. B. C* 246, 909, 1971.
- [7] Hurlbert, R. B. *Methods in Enzymology* III, 795, 1957.
- [8] 胡兆庆等: 《微生物学报》, 1978 年 18 期 239 页。
- [9] Krisch, R. E. *Int. J. Radiat. Biol.* 21, 167, 1972.
- [10] Randerath, K. et al.: *J. Chromatography*, 16, 111, 1964.
- [11] Baudendistel, L. J. et al.: *J. Chromatography*, 148, 500, 1978.
- [12] Setlow, P. *Methods in Enzymology* XXIX part E, 4, 1974.

[本文于 1981 年 3 月 22 日收到]