

8- $[^3\text{H}]$ -GTP 和 8- $[^3\text{H}]$ -dATP 的简便制备法

刘金富 张孝勇

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

朱 青

(中国科学院原子能研究所)

在 RNA 的转录与反转录及 DNA 复制的研究中,常常需要氚标记的核糖核苷三磷酸和脱氧核糖核苷三磷酸。这些标记物可通过化学方法^[1]或酶促方法^[2]合成。酶促方法一般较化学方法高效、省时、简便。胡兆庆等^[3]建立了面包酵母酶促磷酸化合成 ATP 的方法。此法能使前发酵啤酒酵母酶促磷酸化合成 ATP、GTP、dATP 和 dGTP。我们采用这个方法,按图 1 路

线获得了高比强高纯度的 8- $[^3\text{H}]$ -GTP 与 8- $[^3\text{H}]$ -dATP。

一、方 法

1. 单核苷酸的溴化 基本按 Ikchara 等^[4]法进行,只是溴化物的分离(见图 2 和图 4 注)与去盐^[5]有所不同。

2. 氚化 按江善根等^[6]法进行。

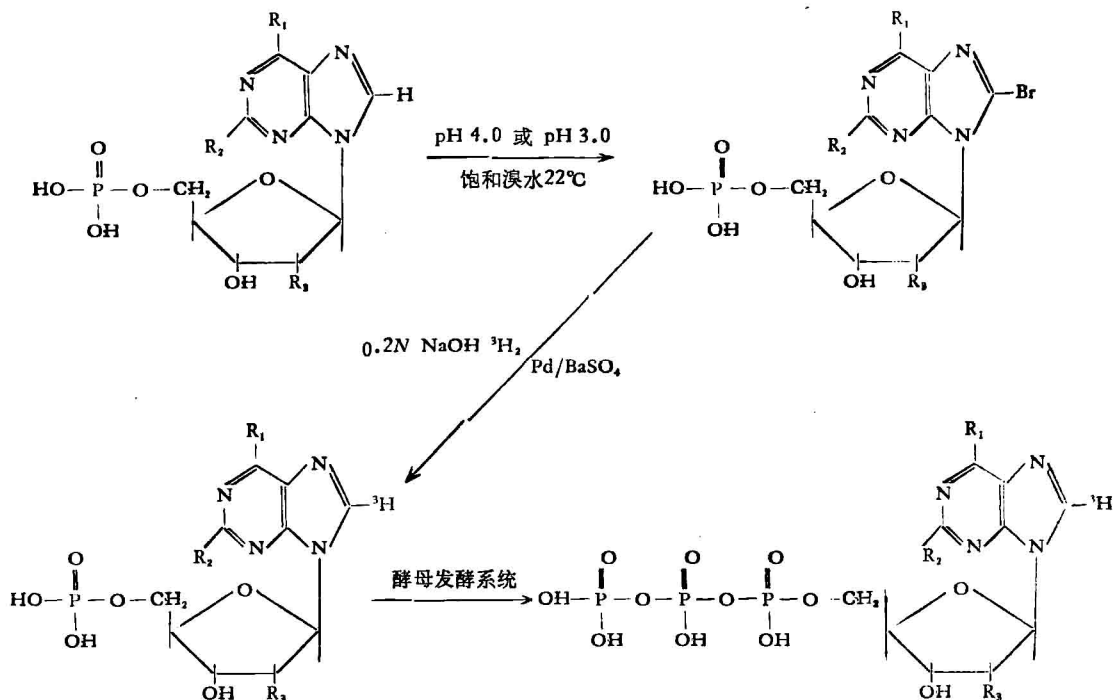


图 1 ^3H -嘌呤核苷三磷酸的制备路线

注:鸟嘌呤核苷(GR):R₁=OH; R₂=-NH₂; R₃=-OH, 脱氧腺嘌呤核苷(dAR): R₁=-NH₂, R₂=-H, R₃=-H

3. ^3H -嘌呤核苷三磷酸的转化 按照胡兆庆等^[3]法制得的粗产物用电泳法精制。电泳缓冲液为 0.03 M 柠檬酸-0.06 M 磷酸氢二钠 (50.7:49.3V/V, pH 4.8); 电压 8—9 伏/厘米。电泳 4 小时后,将滤纸用冷风吹干,然后将 ^3H -核苷三磷所在位置的滤纸剪下,在水中浸泡过夜,去除滤纸,加等体积的无水乙醇,最后使之成为每毫升含 1 毫居里、乙醇浓度为 50% 的溶液,分装后于 -20°C 保存。

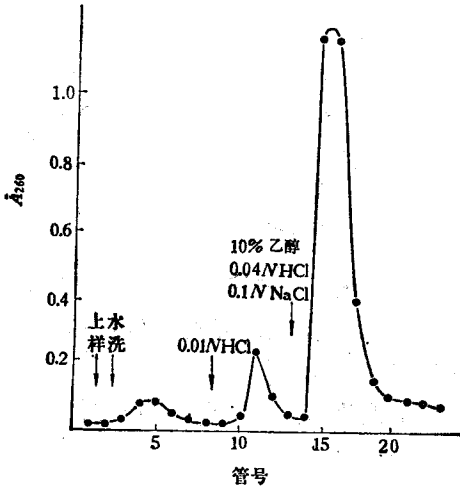


图 2 BrGMP 的分离纯化

阴离子树脂: 交联度 8%, 粒度 200—400 目, Cl^- , 柱体积 3×27 厘米

4. 纯度鉴定 样品纯度的测定仍用“方法 (3)”中的 DEAE-纤维素薄板进行。展层后,自原点一端开始,依次每隔 0.5 厘米将纤维素取下,分别测定放射性,产物的放化纯度是

$$\frac{\text{所要求的产物放射性}}{\text{被测物的总放射性}} \times 100\%$$

二、结果与讨论

BrGMP 和 BrdAMP 的柱层析纯化见图 2 和图 3。光谱性质见图 4、图 5 和表 1、表 2。它们的光吸收峰均向长波方向移动,在纸层析上的比移值均大于各自的前身物,都不能在前述酶促磷酸化系统内转变成核苷三磷酸,经氟化后,它们都回到了各自原来前身物的光谱位置 and 纸层析位置;在前述酶促磷酸化系统内十

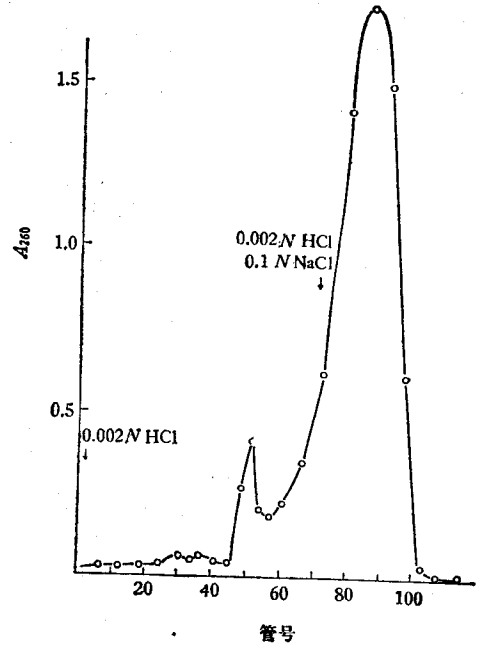


图 3 Br-dAMP 的柱层析纯化

树脂同图 2, 柱体积 1.3×32 厘米 洗脱溶液与方式如箭头所示

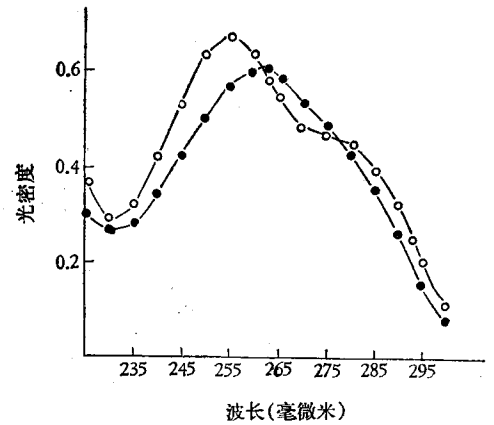


图 4 5'-BrGMP 和 5'-GMP 的吸收光谱

(在水中测定)

●—●—●—BrGMP ○—○—○—GMP

分钟后,即有 80—90% 被转化成核苷三磷酸。另外,由于纸层析系统是酸性的,所以 GMP 在紫外灯下发出蓝色荧光,但 BrGMP 则仍为紫色。BrGMP 经氟化后又与 GMP 一样。以上说明得到了所需要的溴化产物。产率为 55—60%。

根据中性 pH 时 GTP 的消光系数 $\epsilon_{260} =$

表 1 5'-GMP 和 5'-dAMP 及其衍生物的光谱比值*

	GMP	BrGMP	³ HGMP	dAMP	BrdAMP	³ HdAMP
250/260	1.16	0.87	1.15	0.83	0.79	0.79
280/260	0.66	0.76	0.66	0.13	0.37	0.15

* 在水中测定

表 2 5'-GMP 和 5'-dAMP 及其衍生物的纸层析*比值

	GMP	BrGMP	³ HGMP	$\frac{R_f \text{ BrGMP}}{R_f \text{ GMP}}$	dAMP	BrdAMP	³ HdAMP	$\frac{R_f \text{ BrdAMP}}{R_f \text{ dAMP}}$
比值	0.27	0.36	0.28	1.33	0.47	0.56	—	1.19

* 层析溶剂系统 正丁醇:冰醋酸:水=5:2:3 层析温度 ~20℃

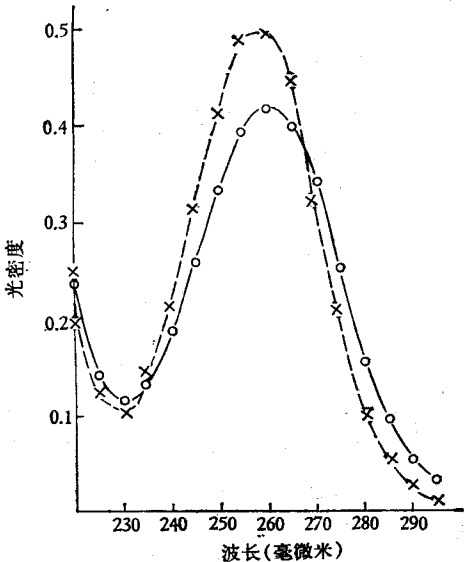


图 5 5'-BrdAMP 和 5'-dAMP 的吸收光谱
(在水中测定)

○—○—○ 5'-BrdAMP
×—×—× 5'-dAMP

11.7×10^3 和 dATP 的消光系数 $\epsilon_{260} = 15.4 \times 10^3$, 计算得本法制备的 $^3\text{H-GTP}$ 和 $^3\text{HdATP}$ 的比强可达 30 居里/毫克分子。放化纯度在 90% 以上(图 6)。它们已分别用于 RNA 聚合酶与 DNA 聚合酶的活力测定及依赖于 DNA 的 RNA 合成及 DNA 复制等研究中。

关于 $^3\text{HGTP}$ 和 $^3\text{HdATP}$ 的制备, 我们曾比较过其他几种方法^[5,7] 结果证明在我们实验条件下采用图 1 合成路线, 能获得良好的结果。

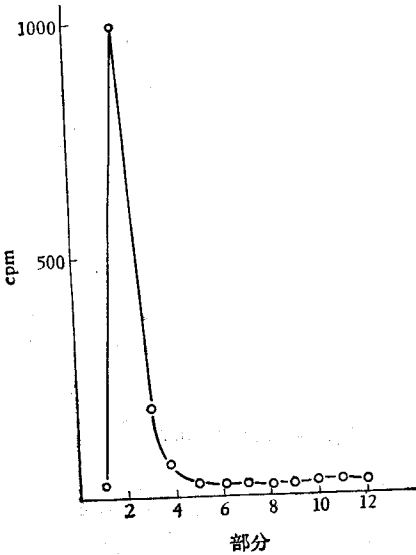


图 6 $^3\text{H-GTP}$ 的纯度测定

本法至少可适用于 ATP、dATP、GTP、dGTP 标记物的制备。它比从大肠杆菌 B 抽提的需要能量再生系统的磷酸化激酶^[8]合成标记核苷三磷酸还要简便。

本工作中, 胡兆庆、王建业同志曾提出过许多宝贵意见, 在此表示感谢。

参 考 文 献

[1] Moffatt, J. G.: *Methods in Enzymology*, 12A, 182, 1967.
[2] Symons, R. H.: *Methods in Enzymology*, 29, 102, 1974.

- [3] 胡兆庆等:《微生物学报》1978年,第18期,第239页。
- [4] Ikehara, M. et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 17, 1019, 1969.
- [5] Anthony, E. E.: *Tritum and Its Compounds*, 2d, ed, Lond. 310, 1974.
- [6] 江善根等《生物化学与生物物理进展》1979年,第5期,第69页。

- [7] Koerner, J. F.: *Ann. Rev. Biochem.*, 29, 291, 1970.
- [8] Hurlbert, R. B. et al.: *Methods in Enzymology*, 12A, 193, 1967.
- [9] Rushizky, G. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, 55, 217, 1962.

[本文于1981年6月8日收到]

人脐带透明质酸的简易制备法

张兆伟 邢蕊凝 樊绘曾

(天津市药物研究所)

一、引言

酸性粘多糖系存于结缔组织中的一类有特殊功能的胞外生物大分子^[1]。其中,透明质酸的组成、结构、聚合状态、体内合成与代谢皆有别于其他酸性粘多糖^[2]。组织中透明质酸质与量的改变与某些疾患(如动脉、关节、视网膜病变)发生有关。近年以透明质酸作为人工玻璃体已用于眼科临床^[3]。国内未见生产,而成品进口价格昂贵。因此寻找简便的制备方法,以满足国内生物医学基础研究和临床应用至为迫切。

生化分析表明,透明质酸在牛眼玻璃体、关节滑液和人脐带中含量较高^[2],其中人脐带是国际上供较大量制备的主要材料。国外从人脐带提纯透明质酸方法,手续冗长费时,需消耗大量试剂。我们则综合国外方法,去繁就简,设计了一种简易提取分离法。

二、方法与结果

1. 材料 实验所用人脐带系天津产院供给。新鲜脐带水份93.5%、采集后去血块及其他杂质,冷藏备用。

供制备用试剂 氯代十六烷基吡啶(E. Merck);助滤剂 Celite 545 (BHD 分装),胃蛋白酶(1:3000 上海产),胰蛋白酶(1:250 新疆伊

犁产)。

供分析用标准品 硫酸软骨素 A,为天津第三生化药厂提供(葡萄糖醛酸含量为30%),肝素为天津第二生化药厂提供(生物效价150 IU/mg)。

2. 制备方法 将新鲜人脐带绞碎后加入等量水,用组织捣碎机制成匀浆。加入0.5%甲苯做为防腐剂,在50℃保温自溶12小时。自溶液明显稀薄,此时调整pH至2.0,并加入胃蛋白酶(胃蛋白酶:脐带=2.5%),酶解2小时,组织块大部分液化。再调整pH至8.6,加入胰蛋白酶(胰蛋白酶:脐带=0.2%)酶解8小时后完全液化,仅存极少残渣。真空抽滤以助滤剂545,滤得澄明液体。将此溶液以水稀释一倍。在搅拌条件下加入氯代十六烷基吡啶(氯代十六烷基吡啶:脐带=1.5%),此时溶液出现絮状沉淀。真空抽滤,将分离得到的沉淀物以0.4 M 氯化钠溶液在恒温30℃搅拌条件下解离2小时。抽滤后之清液加入二倍量乙醇,冷处过夜。再以4000 R. P. M 离心分离。获透明质酸粗品。

将粗透明质酸制成0.5%水溶液。边搅拌、边缓缓加入二倍量乙醇,随后加入0.1%醋酸钠立即呈现大量而均匀沉淀。经放置后,离心收集沉淀。沉淀先后用乙醇和丙酮在组织捣碎机内粉碎脱水。再以五氧化二磷真空干燥后即