

## 酶法合成高比度 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

田桂英 楼光辉

(中国原子能科学研究院, 北京)

本文介绍了用酶促合成制备高比度 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的方法及其应用鉴定结果。该法原理是以 $l\text{-}\alpha$ -甘油磷酸为底物, 在其酶促转化为3-磷酸甘油酸过程中, ADP进行底物水平的磷酸化与外源的 $^{32}\text{P}$ 合成 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 。反应中与酵解速率相适应的 $\text{NAD}^+$ 的再生是由乳酸脱氢酶催化的反应来完成的。酶促合成转化率(相对投料的 $^{32}\text{P}$ 强度)可达90%以上。经高压液相色谱分析,  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的放化纯可达95%左右。与英国Amersham产品( $>5000\text{Ci}/\text{mM}$ )在相同条件下进行比较, 结果相同。本方法具有简便、高效、放射性操作少的特点。

**关键词**  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ,  $l\text{-}\alpha$ -甘油磷酸, ADP, 酶法,  $\text{NAD}^+$ 。

### 一、前言

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 是遗传工程研究中用于DNA和RNA的3'和5'末端标记进行序列分析的关键性标记化合物, 同时又是酶法合成其它具有重要用途的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ ,  $\text{dNTP}$ 的不可缺少的前体。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 用于遗传工程研究中要求具有高比活度, 一般为3000—5000 $\text{Ci}/\text{mM}$ 。过去由于国内没有开展这种高比活度标记物的研制, 依赖进口, 耗资很多, 且不方便。为及早解决国内需要, 我院承担了研制工作。

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 标记方法虽有一些报道<sup>[1-4]</sup>, 但比活度都较低。1979年, T.F.Walseth和R.A.Johnson<sup>[5,6]</sup>在改进P.F.Schendel等<sup>[3]</sup>的方法基础上, 成功地用酶法制备了高比活度 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 和 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 。我们参考此法进行了研制工作。

### 二、方法原理

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的制备是以 $l\text{-}\alpha$ -甘油磷酸为底物, 经过 $l\text{-}\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶, 丙糖磷酸异构酶; 乳酸脱氢酶等一系列酶促转化, 在 $l\text{-}\alpha$ -甘油磷酸转变为3-磷酸甘油酸时, 在3-磷酸甘油酸激酶, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶的催化下, ADP进行基质水平的磷酸化。通过分子内部能量的重新分配, 使底物分子中原来的低能磷酸键转变为高能键, 然后转给ADP, 与外源 $^{32}\text{P}$ 合成 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 。反应中与酵解速率相适应的 $\text{NAD}^+$ 的再生, 在无氧条件下由乳酸脱氢酶催化的反应来完成。

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 酶促反应顺序如图1所示。

1985年2月4日收到。

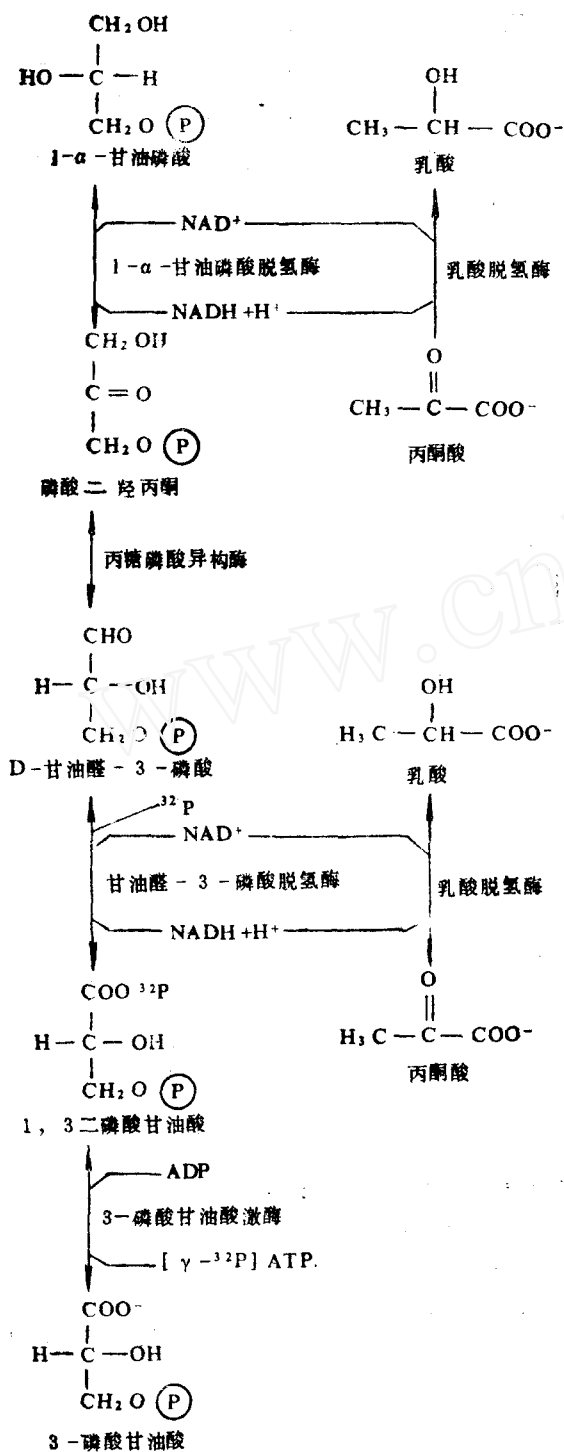


图1  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 合成途径  
 $^{32}\text{P}$ —— $^{32}\text{P}\text{O}_4^{3-}$ ; (P)—— $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ .

### 三、 材料和方法

#### 1. 材料

(1)  $^{32}\text{P}$  无载体, 无酸正磷酸盐水溶液。

(2) 酶 美国 Sigma 公司商品, 均为硫酸悬浮液: 1- $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶, 丙糖磷酸异构酶, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 乳酸脱氢酶, 3-磷酸甘油酸激酶。

(3) 试剂 Tris, 1- $\alpha$ -甘油磷酸环己胺盐,  $\beta\text{-NAD}^+$  (氧化型辅酶 I) 5'-二磷酸腺苷钠盐: 二硫苏糖醇, 丙酮酸钠盐, 1-盐酸半胱氨酸 (以上均为美国 Sigma 公司商品)。氯化镁, 碳酸氢铵, 三乙胺, 葡萄糖, 95% 乙醇 (均为国产 A.R. 级试剂), DEAE-Sephadex A-25 40-120 $\mu$ , pharmacia 商品。

#### 2. 方法

(1)  $^{32}\text{P}$  按照投料量直接取用。

(2) 酶 详见表 1, 参照酶活力适当变化。

(3) 反应试剂配置用 详见表 2。操作时需避免稳定磷及其它杂质污染, 各试剂均用重蒸无离子水配制, ADP 及丙酮酸须为新鲜溶液。

(4) 酶处理 将各种酶按要求值分别吸取后混于一具盖小离心管中, 在台式离心机 (16000rpm) 离心 15min, 弃去上层清液, 将蛋白沉淀溶于 15 $\mu$ l 50mM Tris-HCl, pH9 中备用。离心酶时, 配制盐酸-半胱氨酸溶液, 将 60mM 盐酸-半胱氨酸溶液用结晶 Tris 中和, pH 为 7.5-8.0。然后取 5 $\mu$ l 处理过的酶; 46.7 $\mu$ l 半胱氨酸盐溶液; 11.3 $\mu$ l 重蒸无离子水, 总体

表1 标记 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ 所需用酶

酶	原始混合物		酶-半胱氨酸混 合物中浓度, $\mu\text{g/ml}$
	$\mu\text{l}$	mg蛋白/ml	
1- $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶	10	1.41	476
丙糖磷酸异构酶	45	2.55	857
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	7	2.48	833
3-磷酸甘油酸激酶	3	0.08	27
乳酸脱氢酶	5.5	1.13	380

表2 标记 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP试剂配比

试剂名称	溶液浓度, mM	取用体积, $\mu\text{l}$
Tris-HCl(pH=9.0)	500	50
MgCl <sub>2</sub>	300	20
二硫苏糖醇	100	30
精胺*	36	25
1- $\alpha$ -甘油磷酸	2.4	25
$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	10	25
5-ADP	2	12.5
丙酮酸	40	12.5
总体积		200

\* 如果只标记 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, 可不加入精胺。

积为70 $\mu\text{l}$ 。

(5) 标记 将 $^{32}\text{P}$ 、反应液及酶-半胱氨酸混合物按一定比例混合, 于室温(23 $^{\circ}\text{C}$ )反应5—10min, 反应毕, 于60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴放置5min钝化酶。

(6) 分离 样品用DEAE-Sephadex A-25柱层析分离。样品经冷冻干燥处理, 溶于50%乙醇水介质中, 浓度为1mCi/ml, 在0—4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。样品用高压液相制备色谱YWG-R<sub>1</sub>NCl柱进行了分离, 其分离效果更佳。

## 四、分析鉴定

1. 酶促转化率及放化纯度测定 采用岛津LC-5A高压液相色谱仪, YWG-NH<sub>2</sub>柱(10×0.45cm), 0.2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>为流动相。测定结果见图2及图3。

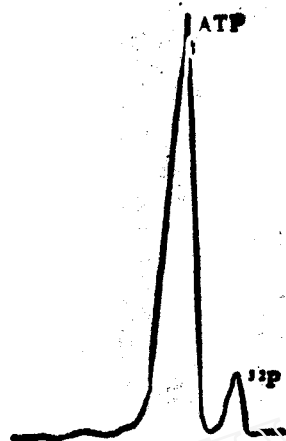


图2  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 转化率



图3  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 放化纯

2. 放射化学纯度测定 采用国产FT-3102型强度计。

3. 定位鉴定 采用50 $\mu\text{Ci}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , 50 $\mu\text{l}$ 反应液(50mM Tris-HCl, pH8); 10 $\mu\text{M}$  MgCl<sub>2</sub>; 4mM 葡萄糖; 2U酶; 37 $^{\circ}\text{C}$ , 1h。鉴定结果列入表3中。在己糖激酶催化下,  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 与葡萄糖反应形成6-磷酸葡萄糖:

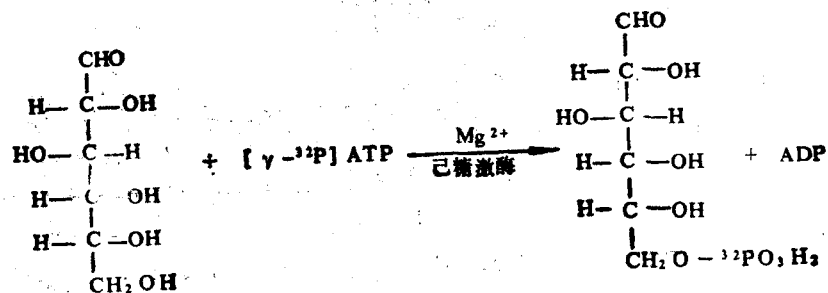


表3  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 定位鉴定结果

名称	放射性分布, %	
	未加己糖激酶	加己糖激酶
$^{32}\text{P}$	0.43	0
AMP	0.41	0
ADP	9.00	7.95
ATP	90.16	0
6-磷酸葡萄糖	0	92.05

结果表明, 绝大部分放射性分布在ATP  $\gamma$ 位上。

4. 使用鉴定 样品经中国科学院生物物理所<sup>[7]</sup>、中国医学科学院病毒所等单位试用, 与英国Amersham同类产品比较(比活度 $>5000\text{Ci/mM}$ ), 应用于RNA与DNA的末端标记及序列分析均获得满意结果(见图4、5)。

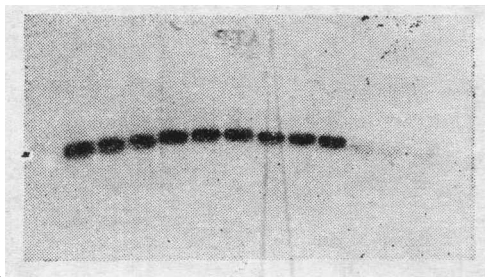


图4 国产 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 与英国同类产品对5SrRNA进行末端标记比较

X光胶片放射自显影; 黑块从左至右: 4-6为国产未纯化样品, 7-9为国产纯化样品, 10-12为英国产品。

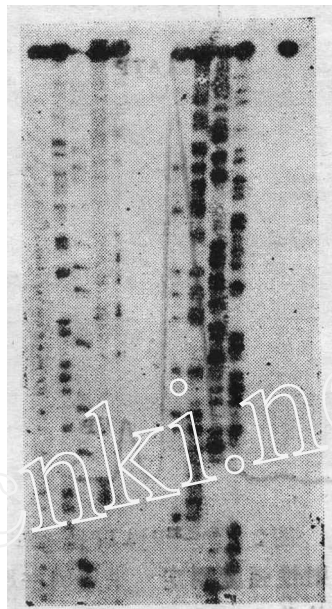


图5 5'末端标记(酶法)谱带  
经8%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, X光胶片自显影。

## 五、 结果和讨论

1. 酶法标记 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , 方法简便, 比活度高, 全部工序可在10h内完成。用于标记的 $^{32}\text{P}$ 为无载体, 无酸的正磷酸盐水溶液, 其它试剂应保证纯度, 严格操作, 减少污染。

2. 对影响标记的各因素作比较以便选择最佳值。

①时间对转化率的影响 结果示于图6中。图6表示温度为 $23^\circ\text{C}$ 时, 反应进程的时间曲线, 反应10min转化率最高, 之后稍有下降。适当提高温度可加快反应, 但时间不宜太长。

②温度、pH值对转化率的影响 结果列入表5及表6中。

③反应总体积与酶浓度对转化率的影响 结果列入表7。从表7可看出增大反应体积或减少酶量, 使酶浓度降低,  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 转化率均相应降低。当保持酶浓度不变, 反应的总体积加大, 底物浓度降低,  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的转化率仍可保持很高水平。因此, 保持反应体系中酶具有适

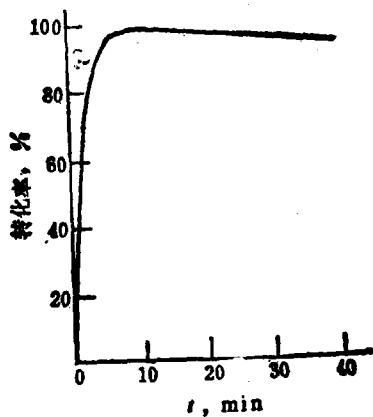


图6  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 反应时间曲线

宜浓度相当重要。当酶具有足够活性时,应尽量减少酶量,以减少杂酶污染。文献[6]中对 $^{32}\text{P}$ 、酶、反应底物配比曾指出以5:1:4为好。我们的实验表明,此比例没有严格规律,为提高比活度,反应底物量小些为好。

表5 不同温度对转化率的影响  
反应时间5min。

$T, ^\circ\text{C}$	23	36	43
转化率, %	98.20	98.70	60.60

表6 不同pH对转化率的影响  
 $T=36^\circ\text{C}$ ; 反应时间20min。

pH 值	6	8	10—11
转化率, %	18.82	91.60	0

表7 反应体积、酶浓度对转化率的影响  
 $T=23^\circ\text{C}$ , 反应时间6min。

反应体积, $\mu\text{l}$	酶浓度, $\mu\text{l}/\mu\text{l}$	[ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP转化率, %	
		5min	15min
36	0.1228	~100	99.45
45	0.1111	~100	
54	0.0930	90.64	~100
67	0.0746	91.98	85.95
72	0.0690	47.94	86.21
72	0.1388	~100	99.73

3. 初步比较了 [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP水溶液和50%乙醇水溶液介质,于4 $^\circ\text{C}$ 存放一周、二周后稳定性的变化,以放射性浓度1mCi/ml, 2mCi/ml的50%乙醇水溶液为较好。

本工作由本院张林祥、张桂萍同志负责液相色谱分析与制备分离,样品使用鉴定由中国科学院生物物理所程振起等,中国医学科学院病毒所余力同志提供结果,谨致衷心谢意。

### 参 考 文 献

- [1] Glynn I. M. et al., *Biochem. J.*, **90**, 147(1964).
- [2] Maxam, A. M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 1977, P. 560.
- [3] Schendel, P. F. et al., *J. Biol. Chem.* **248**, 8319(1973).
- [4] Anthong, E. R. et al., *Nucleic Acids Res.* **6**(1), 81(1979).
- [5] Walseth, T. F. et al., *Biochem. Biophys. Acta*, **526**, 11(1979).
- [6] Johnson, R. A. et al., *Advance in Cyclic Nucleotide Research*, Vol. 10, 1979, P. 136.
- [7] 北京生物化学会, 第五次全国生物化学学术讨论会论文摘要汇编(上册), 北京, 1984年, 第227页

## ENZYMATIC SYNTHESIS OF $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ OF HIGH SPECIFIC ACTIVITY

TIAN GUIYING LOU GUANGHUI

(*Institute of Atomic Energy, P. O. Box 275, Beijing*)

### ABSTRACT

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  adenosine triphosphate is exceedingly important substrate in the end-labeling and sequencing of nucleic acids as well as in protein kinase reactions. It can also be used in the synthesis of  $5'\text{-}^{32}\text{P}\text{-pCp}$ .  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  is prepared from  $1\text{-}\alpha\text{-glycerophosphate}$  and ADP by a series of enzymatic reactions in the presence of  $\text{NAD}^+$  which is preferably regenerated by lactate dehydrogenase and pyruvate. The product is separated by ion-exchange column chromatography on DEAE-sephadex A-25  $\text{Cl}^-$  form or by the preparation chromatography. The radio-chemical purity obtained is 96—97%. The yield of the product is  $>90\%$  relative to  $^{32}\text{P}$ . The sample prepared by this method is comparable with the Amersham product. This method is rapid, simple and convenient.

**Key words**  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  adenosine triphosphate,  $1\text{-}\alpha\text{-glycerophosphate}$ , Adenosine diphosphate, Enzymatic method,  $\beta\text{-nicotinamide adenine dinucleotide}$ .