

简报

[α - ^{32}P] dCTP的制备

沈德恒 王美中

(中国原子能科学研究院, 北京)

关键词 [α - ^{32}P]dCTP, 核苷酸, 酶法.

一、引言

^{32}P 标记核苷酸是遗传工程研究中的一个重要工具。[α - ^{32}P]dCTP在 ^{32}P 标记的核苷酸中占有重要地位。由于它在某些生物组织的DNA中有较高的克分子比,因而使研究方法上的灵敏度更高,更为使用者所欢迎。[α - ^{32}P]dCTP既可直接用于DNA序列分析上的研究,又可掺入到各种DNA中制备成探针,进行分子杂交,广泛地用于难重病症(如癌症)的研究,疾病(如爱滋病、乙肝)的诊断,疑案(如谋杀、强奸案)的鉴定等。随着科技的发展,其应用越来越广泛。

[α - ^{32}P]dCTP的制备方法有化学合成法、化学-酶法和酶法等^[1-6]。由于前两种方法的操作程序冗长、产额低、产品的放射性比度低等,满足不了研究和应用方面的要求。酶法可弥补上述缺点。在[α - ^{32}P]dCTP的制备中我们参照了Johnson等^[6]的酶法程序,并对该程序作了若干变动和改进,使方法更加合理和简便。最终获得了高比度($\sim 11.1 \times 10^{13}\text{Bq}/\text{mmol}$)和高转化率($>90\%$)的产品。经医学科学院基础研究所使用结果,产品质量达到国际同类产品水平并可替代进口产品。

二、制备原理

[α - ^{32}P]dCTP是以L- α -磷酸甘油为起始物,使用11种酶,经过一系列的酶促转化反应制备而得。合成反应总体上可分四步:第一步是由L- α -磷酸甘油经酶促后转为3-磷酸甘油酸,同时进行ADP的底物水平磷酸化,合成了[γ - ^{32}P]ATP^[6];第二步是在T₄-多核苷酸激酶作用下,把[γ - ^{32}P]ATP的 γ -位上的 ^{32}P 转移到3'-dCMP的5'-位置上,生成[5'- ^{32}P]3'-dCDP;第三步用专门水解3'-位置上的磷酸基的酶(如核酸酶P₁或3'-磷酸酶)把[5'- ^{32}P]3'-dCDP水解成[^{32}P]5'-dCMP和磷酸盐;第四步是通过丙酮酸激酶、核苷酸激酶和二磷酸核苷激酶的酶促磷酸化作用把[^{32}P]5'-dCMP转成[α - ^{32}P]dCTP。

1990年5月30日收到,1990年6月4日收到修改稿。

三、实验部分

1. 酶 第一步反应用酶列入表1, 其它各步反应用酶有 T_4 -多核苷酸激酶、核酸酶 P_1 、己糖激酶、丙酮酸激酶、核苷酸激酶、二磷酸核苷激酶。上述11种酶均为西德Boehringer/Mannheim公司产品。

表1 第一步反应用酶

酶	酶混合物		酶-半胱氨酸混合物, $\mu\text{g/ml}$	第一步反应中的最终浓度	
	μl	mg/ml		$\mu\text{g/ml}$	u/ml
L- α -磷酸甘油脱氢酶, 340u/ml	10.5	1.4	100	10	1.7
磷酸丙糖异构酶, 10000u/ml	0.07	0.014	1	0.1	3.1
3-磷酸甘油醛脱氢酶, 800u/ml	1.4	1.4	100	10	0.8
3-磷酸甘油酸激酶, 4500u/ml	0.14	0.14	10	1	0.45
乳酸脱氢酶, 2500u/ml	1.4	0.70	50	5	2.75

2. 主要试剂 第一步和第四步反应用试剂均为美国Sigma公司产品并分别列入表2和表3。无载体 $^{32}\text{P}_i$ ($^{32}\text{PO}_4^{3-}$) 为英国Amersham公司产品, 其余试剂均为A.R级。

表2 第一步反应的试剂混合物

试剂	浓度, mmol/l	使用体积, μl	第一步反应中的最终浓度, mmol/l
Tris (pH9.0)	500	50	50
MgCl_2	300	20	12
二硫苏糖醇	100	30	6
精胺	36	25	1.8
L- α -磷酸甘油	2.4	25	0.12
β -NAD $^+$	10	25	0.5
ADP	2	12.5	0.05
丙酮酸钠盐	40	12.5	1

表3 第四步反应的试剂混合物

试剂	浓度	使用体积	试剂混合物浓度	对第四步最终反应浓度的贡献
Tris-Cl(pH8.0)	500mmol/l	40 μl	50mmol/l	25mmol/l
MgCl_2	100mmol/l	40 μl	10mmol/l	5mmol/l
KCl	100mmol/l	80 μl	20mmol/l	10mmol/l
二硫苏糖醇	100mmol/l	20 μl	5mmol/l	2.5mmol/l
磷酸烯醇式丙酮酸	20mmol/l	80 μl	4mmol/l	2.0mmol/l
核苷酸激酶	1u/6mg	20mg	8u/ml	4u/ml
二磷酸核苷激酶	400u/ml	50 μl	50u/ml	25u/ml
丙酮酸激酶	400u/ml	50 μl	50u/ml	25u/ml

3. 第一步反应酶的处理配制 将各种酶按计算量移取、混合(5 μl)、离心(16000转/min) 15min, 弃去上层清液, 存放于冰箱中。在离心酶时配制60mmol/l盐酸半胱氨酸溶液, 加入

Tris碱中和至pH8.0, 取5 μ l 500mmol/l Tris-Cl(pH7.5), 40 μ l 60mmol/l盐酸半胱氨酸和5 μ l水加到离心后的酶中, 总体积为50 μ l。

4. 标记方法 (1) 将 $^{32}\text{P}_i$ 、反应液及酶按5:4:1混合, 于室温(20—25 $^{\circ}\text{C}$)反应10—15min, 放置60—70 $^{\circ}\text{C}$ 水中, 15min后取出。(2) 在(1)的体系中加入0.2体积(指第一步反应体积)含2.5—3mmol/l的3'-dCMP及10u的 T_4 -多核苷酸激酶, 反应过夜。(3) 用1mol/l HAc调反应体系到pH5—6, 在室温下放置1小时。(4) 用1mol/l NaOH调反应体系到pH8.0, 若发现反应体系有未反应完的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 可加入15 μ l 60mmol/l葡萄糖、2u的己糖激酶, 反应30min。加入1.5体积(指第一步反应体积)的试剂混合液(表3), 室温下反应45—60min。

5. 分析鉴定和分离 (1) 高效液相色谱法(HPLC): 根据需要取样, 经HPLC(ALC/GPC204液相色谱仪, Waters公司产品)分析给出结果。(2) 薄层层析色谱法(TLC): 样品用PEI-纤维素(西德Serva公司产品)薄板, 以0.2mol/l NH_4HCO_3 为展开剂进行薄层层析, 用LB-2722-2放射性色层扫描仪(西德Berthold公司产品)测量, 给出分析结果。(3) 分离: 产品经DEAE-Sephadex A-25柱层析分离, 随后经冷冻干燥处理, 溶于50%乙醇的水中, 浓度为 $3.7 \times 10^7 \text{Bq/ml}$, 产品用HPLC分离, 其效果更好。

四、实验结果与讨论

由Johnson R.A.等^[6]提出的酶法, 是一个比较好的制备 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 的方法。但整个反应路线较长、操作程序较复杂, 要用11种酶, 12种试剂。制备上要获得较高产额, 必须保证每一步的反应条件, 如pH、温度、试剂量、酶活力单位等均为最佳。我们对制备程序中几个突出问题进行了实验研究。

1. 第一步反应 文献[6]推荐条件: $^{32}\text{P}_i$ 、反应液和酶的体积比为5:4:1, 在室温下反应30min。表4, 表5分别列出不同温度、不同体积比时的实验结果。由表4, 表5可以看出, 第一步反应中反应物的比例、反应温度的范围较宽。但实验证明个别酶和金属离子浓度对反应结果影响很大。

表4 温度对反应的影响
($^{32}\text{P}_i$ 、反应液和酶的体积比为5:4:1)

反应温度, $^{\circ}\text{C}$	反应时间, min	生成 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, %
0—5	15	94
20	15	96
28	15	95

表5 反应组份的不同比例
对反应的影响 (28 $^{\circ}\text{C}$)

$^{32}\text{P}_i$: 反应液 : 酶	反应时间, min	生成 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, %
5:4:1	15	95
5.5:3.5:1	15	97
6:3:1	15	96

2. 第二步反应 表6, 表7分别列出反应温度和反应介质的pH对 T_4 -多核苷酸激酶作用的影响。从表6看出: 随着温度的升高, $[\text{5}'\text{-}^{32}\text{P}]\text{3}'\text{-dCDP}$ 含量逐渐降低。其它杂质、降解产物随着温度的升高而增加。这是因为 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 分子中有两个高能磷酸键

(-P_i), 其化学稳定性低, 高温时容易断键发生降解所致。所以低于22℃的温度对反应比较有利, 但最好为0—5℃。从表7看出, pH≥11时, 反应不进行。这表明T₄-多核苷酸激酶在此条件下失活。pH≤9时, 出现了文献[6]上没有提及的结果, 即出现了[³²P]5'-dCMP, 而且pH越低, [³²P]5'-dCMP含量越高。

表7 反应介质的pH对T₄-多核苷酸激酶作用的影响
(22℃, 反应18h)

pH	[γ- ³² P] ATP, %	[5'- ³² P]3'-dCDP, %	[³² P]5'-dCMP, %	其它, %
11—13	63			37
9.0	6	64	26	4
7.0	9	41	58	10
6.0	10		85	5
4.5—5	8		83	9

表6 反应温度对T₄-多核苷酸激酶作用的影响
(pH9.0, 反应18h)

反应温度, °C		0—5	15	22	28
反应产物, %	[5'- ³² P]3'-dCDP	86	81	64	48
	[³² P]5'-dCMP	8	13	26	31
	其它	6	6	10	21

3. 第三步反应 文献[6]要求在600μl反应液中加入10—25μg核酸酶P₁, 把[5'-³²P]3'-dCDP水解成[³²P]5'-dCMP。实验表明, 只要pH条件适合, 加入核酸酶P₁量的多少(0—100μg)对水解作用影响很小, 即在T₄-多核苷酸激酶催化反应完全后, 料液调至pH=4.5—5.5, 即使不加核酸酶P₁, 30min后测量结果表明: 3'-位置上的磷酸基全部水解下来, 将这实验扩大到其它核苷酸上也得到相同的结果(表8)。因而核酸酶P₁可以不加, 这一结果适合于所有核苷酸, 包括脱氧和不脱氧的, 嘧啶类碱基和嘌呤类碱基的核苷酸。不加核酸酶P₁而所有核苷酸3'-位置上的磷酸基也能发生水解的原因是, 所用T₄-噬菌体感染的大肠杆菌多核苷酸激酶伴有3'-磷酸酶, 该酶能水解(脱氧)核糖核酸3'-位置上的磷酸基。前者酶活性的最适合pH为6.5—8.5, 后者酶活性的最适合pH为5.9^[7]。所以在T₄-多核苷酸激酶反应后, 适当降低料液的pH, 3'-核苷酸酶即开始发生反应。

表8 有、无核酸酶P₁的水解结果的比较

反应物	反应条件	产物	转化率, %
[5'- ³² P]3'-dCDP	pH4.5 20μg核酸酶P ₁	[³² P]5'-dCMP	97
[5'- ³² P]3'-dCDP	pH4.5 不加核酸酶	[³² P]5'-dCMP	99
[5'- ³² P]3'-UDP	pH5.0 20μg核酸酶P ₁	[³² P]5'-UMP	98
[5'- ³² P]3'-UDP	pH5.0 不加核酸酶	[³² P]5'-UMP	92
[5'- ³² P]3'-dADP	pH5—6 20μg核酸酶P ₁	[³² P]5'-dAMP	94
[5'- ³² P]3'-dADP	pH5—6 不加核酸酶	[³² P]5'-dAMP	93

4. 第四步反应 这一步磷酸化反应使用三种酶: 丙酮酸激酶、核苷酸激酶和二磷酸核苷激酶。反应的关键是核苷酸激酶的用量。实验表明, 在800μl反应液中, 核苷酸激酶加入量分别为4.8mg, 9.6mg和20mg; 生成[α-³²P]dCTP的转化率分别为44%, 90%和97%。丙酮酸激酶和二磷酸核苷激酶可以多加而不影响结果。

五、结 论

根据各种因素对 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 的制备程序的实验结果,对Johnson R.A.^[6]的程序作了如下的变动和改进:在第一步反应中选好酶、金属离子的用量比;在第二步反应中控制反应温度在22℃以下,最好为0—5℃;在第三步反应中省去加核酸酶 P_1 ;在第四步中控制好核苷酸激酶的加入量。

贺佑丰、王衍真同志对本工作给予热情指导和帮助;王立新同志参加了部分工作,景烈同志帮助进行薄层分析,在此谨致衷心谢意。

参 考 文 献

- [1] Roger, A.J.et al., United States Patent 4209589, 1979.
- [2] Symos, R.H.et al., *Methods Enzymol.* 29, 102 (1974).
- [3] Fujimoto, M.et al., *Agric.Biol.Chem.*, 38, 1555 (1974).
- [4] Walbeth, T.F., et al., *Biochem.Biophys.Acta*, 526, 11 (1979).
- [5] Kenneth, M., *Biochem.J.*, 131, 569 (1973).
- [6] Johnson, R.A.et al., *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, 10, 153 (1979).
- [7] 王德宝, 祁荣国主编, 核酸(上册), 北京, 科学出版社, 1986年, 第94—97页。

THE PREPARATION OF $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$

SHEN DEHENG WANG MEIZHONG

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

ABSTRACT

Two modifications for Johnson's enzymatic method of preparation of $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ are introduced as follows: (1) temperature of reaction in the second stage is controlled at 5—22℃; (2) nuclease P_1 is eliminated from the procedure in the third stage. Owing to reduced temperature the final yield of the procedure reaches 90—97% relative to $^{32}\text{P}_i$. The product cost is reduced and the operating process is simplified as a result of eliminating nuclease P_1 .

Key words Enzymatic method, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, Nucleotide.