

高比活度 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的酶法标记

吴冯波 王翌善 仪明光

(中国原子能科学研究院同位素研究所, 北京 102413)

以 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ 作磷酸供体通过四步酶反应制备了高比活度($> 148 \text{ PBq/mol}$)的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 。用高效液相色谱法(HPLC)测定了 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 比活度, 并对影响 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 比活度的诸因素作了分析。

关键词 酶法标记 高比活度 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

随着分子生物技术的发展, 以 ^{32}P -核苷酸标记DNA、RNA作为探针的技术已得到了广泛的应用^[1-3]。在制作探针时, 总是希望 ^{32}P -核苷酸有尽可能高的比活度, 以提高检测灵敏度。目前, 尽管人们可以通过Walseth等^[4,5]人的方法制得多种高比活度($148\text{--}185 \text{ PBq/mol}$)的 ^{32}P -核苷酸, 但用这一方法制得的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 其比活度却只有 $7.4\text{--}37 \text{ PBq/mol}$; 本文在Walseth等人的酶标方法基础上, 通过改变磷酸供体, 制得比活度大于 148 PBq/mol 的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

KCl、MgCl₂、HAC均为国产试剂, 分析纯。 $^{32}\text{P}\text{i}$ (无载体、无盐酸的正磷酸盐)为英国Amersham公司产品。其它所有试剂和酶均为美国Sigma公司产品。ALC/PGC 204型HPLC色谱仪、730型数据处理机、440型紫外吸收测定仪均为美国Waters公司产品。CRC-BOBC型活度仪系美国产品。色谱柱, 自制。

1.2 标记原理

按文献[5]的酶标方法制得比活度约 $185\text{--}222 \text{ PBq/mol}$ 的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, 然后以此作磷酸供体, 在多聚核苷酸激酶催化下与 $3'\text{-}^3\text{H}\text{AMP}$ 反应得 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$, 后者的 $3'$ 磷酸基经核酸酶P1水解得 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{AMP}$, 最后 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{AMP}$ 被丙酮酸激酶和AMP激酶催化磷酸化, 制得比活度大于 148 PBq/mol 的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 。

1.3 实验方法

收稿日期: 1995-08-23 收到修改稿日期: 1995-12-04

1.3.1 标记步骤 (1)按文献[5]的方法制备磷酸供体 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ 。(2)在上述 $100\ \mu\text{L}$ 溶液中加入 $20\ \mu\text{L}\ 20\ \text{mmol/L}$ 的 $3\text{-}^t\text{AMP}$,其中含30个活力单位的多聚核苷酸激酶,于 $4\text{--}15^\circ\text{C}$ 反应 $10\ \text{h}$ 。(3)然后加入 $20\ \mu\text{g}$ 固体核酸酶P1,室温反应 $15\text{--}30\ \text{min}$ 。(4)最后加入 $80\ \mu\text{L}$ 混合溶液,其中含 $200\ \text{mmol/L}\ \text{KCl}$, $4\ \text{mmol/L}\ \text{PEP}$ (磷酸烯醇式丙酮酸)、 $4\ \text{mmol/L}\ \text{DTT}$ (二硫苏糖醇), $100\ \mu\text{g/mL}$ 丙酮酸激酶, $40\ \mu\text{g/L}\ \text{AMP}$ 激酶和 $40\ \text{mmol/L}$ 的 MgCl_2 ,室温下反应 $30\text{--}60\ \text{min}$ 。

1.3.2 分析方法与转化率 上述四步反应通过HPLC分析监控。分析过程通过一台HPLC色谱仪、一 β 探头和一台834型色谱处理机进行。各组分放射性百分比由834型色谱处理机直接得出。色层柱为 $\phi 4.6\ \text{mm} \times 200\ \text{mm}\ \text{C}_{18}$ 柱。流动相为 17% 甲醇溶液,其中含 $0.05\ \text{mmol/L}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$ 和少量离子对试剂(IPR-A)。流速为 $0.9\ \text{mL/min}$ 。压力为 $1850\ \text{Pa}$ 。上述四步反应的HPLC分析结果示于图1。

1.3.3 分离 由于标记物 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 与GTP结构十分相似,而且GTP的量远大于标记物的量,所以,必须选择有效的分离体系并控制好分离条件。实验采用DEA E-Sephadex色谱柱进行分离:在 $\phi 8\ \text{mm} \times 30\ \text{mm}$ 的DEA E-Sephadex柱上(HCO_3^- 型)上样后,用二次蒸馏水淋洗 $5\ \text{min}$,然后用 $0.15\ \text{mol/L}$ 的 NH_4HCO_3 溶液洗脱 $^{32}\text{P}\text{i}$ 和低分子量核苷酸,标记物用 $0.3\ \text{mol/L}$ 的 NH_4HCO_3 洗脱并收集约 $6\text{--}10\ \text{mL}$ 溶液。分离后的标记物通过冷冻干燥除去水和 NH_4HCO_3 ,然后用 50% 乙醇水溶液配制成 $3.7 \times 10^7\ \text{Bq/mL}$ 溶液,于 -20°C 贮存。

1.3.4 比活度的测定 在感量为 $0.01\ \text{mg}$ 的天平上准确称取 $2.02\ \text{mg}\ \text{ATP}$ 钠盐,用二次蒸馏水配制 $1000\ \text{mL}\ 4\ \mu\text{mol/L}$ 的标准溶液。在HPLC色谱仪上作4次分析,进样量分别为 $2.5\ \mu\text{L}$ ($10\ \text{pmol}$), $5\ \mu\text{L}$ ($20\ \text{pmol}$), $7.5\ \mu\text{L}$ ($30\ \text{pmol}$), $10\ \mu\text{L}$ ($40\ \text{pmol}$),选择波长 $254\ \text{nm}$,在440型紫外吸收光谱仪上分别得到4个紫外吸收值:1254、2573、3755、4918;作紫外吸收值-ATP量标准曲线并示于图2。

精确移取标记物溶液 $200\ \mu\text{L}$,在CRC-BOBC型活度计上测得放射性活度为 $85.1\ \text{MBq}$,故 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的放射性活度为 $79.57\ \text{MBq}$ ($85.1 \times 93.5\%$),溶液的放射性浓度为 $0.3979\ \text{MBq}/\mu\text{L}$ 。

取 $10\ \mu\text{L}$ 此溶液作HPLC分析,图谱(图3)显示ATP峰的紫外吸收值为2754,在ATP标准曲线上可知此 $10\ \mu\text{L}$ 溶液中ATP量约为 $22.25\ \text{pmol}$ 。故溶液中 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的比活度为:

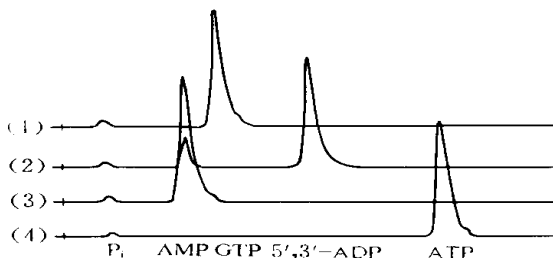


图1 四步标记反应的HPLC图谱

1—— $6\% \text{ } ^{32}\text{P}\text{i}$, $94\% [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$; 2—— $6.5\% \text{ } ^{32}\text{P}\text{i}$, $23\% [\text{ } ^{32}\text{P}]\text{AMP}$, $70.5\% [5\text{-}^t\text{ } ^{32}\text{P}]\text{ } 3\text{-}^t\text{ADP}$; 3—— $6.5\% \text{ } ^{32}\text{P}\text{i}$, $93.5\% [\text{ } ^{32}\text{P}]\text{AMP}$; 4—— $6.5\% \text{ } ^{32}\text{P}\text{i}$, $93.5\% [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

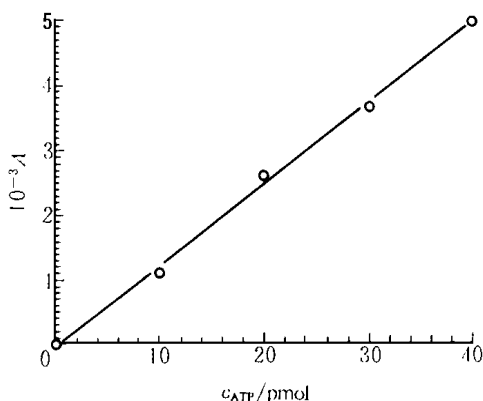


图2 ATP标准曲线

$\lambda = 254\ \text{nm}$

$$\text{比活度} = \frac{[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP 的放射性活度}}{[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP 的绝对量}} = \frac{3.979\text{MBq}}{22.25\text{pmol}} = 178.8\text{PBq/mol}$$

(a)

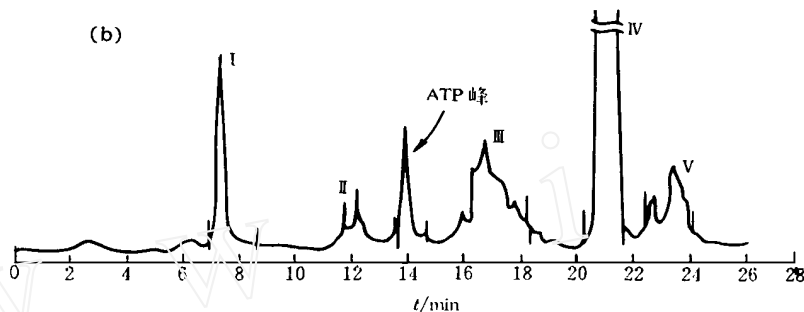
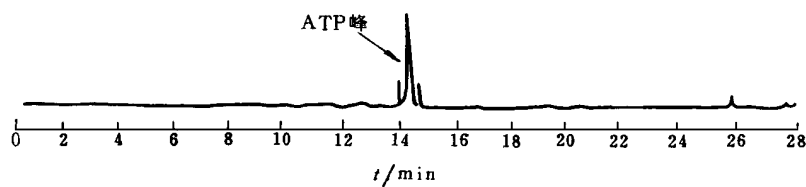


图 3 二种溶液的紫外吸收光谱图

(a) —— 纯 ATP, (b) —— 标记物溶液

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的峰位置与纯 ATP 钠盐(1 mg/L) 进行对比确定。

I、II、III、IV、V 等诸峰均为体系有紫外吸收的杂质峰。

2 结果与讨论

2.1 标记过程的动力学分析

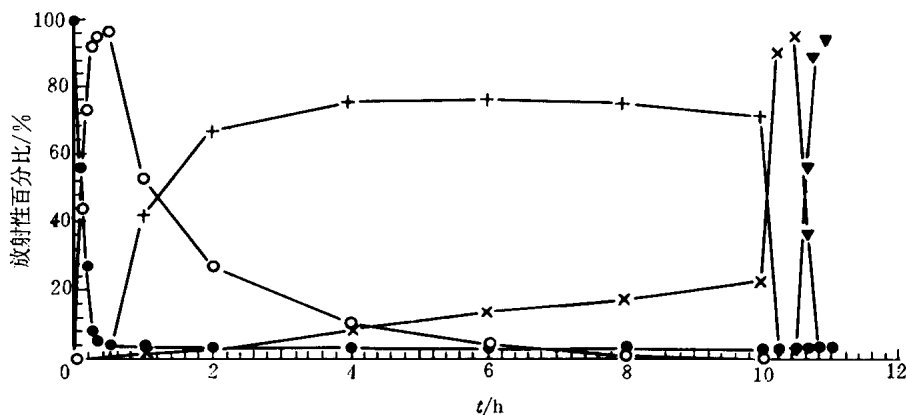


图 4 四步标记反应的转化率-时间曲线

—— $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, ● $^{32}\text{P}_i$, × $[\text{32P}]\text{AMP}$, + $[\text{5-}^{32}\text{P}]\text{3'-ADP}$, ▼ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

标记反应转化率-时间曲线示于图 4(分析条件同图 1)。从图 4 看出, 多聚核苷酸激酶催化的反应 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP} + 3\text{ }^1\text{AMP} \rightarrow \text{GDP} + [5\text{-}^{32}\text{P}]\text{3 }^1\text{ADP}$, 与文献[4]描述的反应 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP} + 3\text{ }^1\text{AMP} \rightarrow \text{ADP} + [5\text{-}^{32}\text{P}]\text{3 }^1\text{ADP}$ 具有相似的动力学曲线, 说明 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ 同样能有效地代替 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 作为磷酸供体。在标记 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的四步反应中, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ 、GDP、和 GTP 分别能良好充当多聚核苷酸激酶、丙酮酸激酶和 AMP 激酶的底物, 从而使各步标记反应得以顺利完成, 得到高转化率、高比活度的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 。这是制备高比活度 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的实验基础。

2.2 影响 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 比活度的因素分析

文献[4]以 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 作磷酸供体, 制得了比活度为 7.4—37 PBq/mol 的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 。本文介绍的标记方法制得的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 其比活度一般均大于 148 PBq/mol。这是由于采用了不同的标记反应的缘故。

文献[4]的标记反应:

步骤 1: $^{32}\text{Pi} + \text{ADP} \rightarrow [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

步骤 2: $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP} + 3\text{ }^1\text{AMP} \rightarrow [5\text{-}^{32}\text{P}]\text{3 }^1\text{ADP} + \text{ADP}$

步骤 3: $[5\text{-}^{32}\text{P}]\text{3 }^1\text{ADP} \rightarrow [^{32}\text{P}]\text{AMP} + \text{Pi}$

步骤 4: (a) $\text{PEP} + \text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{丙酮酸}$

(b) $\text{ATP} + [^{32}\text{P}]\text{AMP} \rightarrow \text{ADP} + [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$

(c) $\text{PEP} + [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP} \rightarrow [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP} + \text{丙酮酸}$

本文采用的标记反应:

$^{32}\text{Pi} + \text{GDP} \rightarrow [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP} + 3\text{ }^1\text{AMP} \rightarrow [5\text{-}^{32}\text{P}]\text{3 }^1\text{ADP} + \text{GDP}$

$[5\text{-}^{32}\text{P}]\text{3 }^1\text{ADP} \rightarrow [^{32}\text{P}]\text{AMP} + \text{Pi}$

$\text{PEP} + \text{GDP} \rightarrow \text{GTP} + \text{丙酮酸}$

$\text{GTP} + [^{32}\text{P}]\text{AMP} \rightarrow \text{GDP} + [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$

$\text{PEP} + [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP} \rightarrow [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP} + \text{丙酮酸}$

为使步骤 1 中的 ^{32}Pi 完全转化为 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 在文献[4, 5]的酶标过程中, 要求反应中加入过量的 ADP, 过量的 ADP 将通过反应(a) 形成 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的载体 ATP, 由于放射性的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的绝对量十分微小, (若转化率为 100%, 以 185 MBq 无载体 ^{32}Pi 计算, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的绝对量约为 5.56×10^{-7} mmol), 所以, 稍稍过量的底物 ADP 形成 ATP 后将大大降低 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的比活度, 这是以 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 作磷酸供体制得的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 比活度低的主要原因。即使在 ADP 不过量并刚好与 ^{32}Pi 反应完全的假设的理想状况下, 步骤 1 中形成的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 在步骤 2 中将转变为 ADP, ADP 可通过反应(a) 形成与 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 等量的非放射性 ATP, 因此, 即使在这种假设的状况下, 所得的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的比活度最大也只能达到 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 比活度的一半(约 74—111 PBq/mol); 此外, 步骤 1 底物 ADP 中的 AMP、ATP 污染(提纯步骤的不完全, 以及反应 $\text{ADP} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{ATP}$ 均可导致杂质 AMP、ATP 的存在, AMP 可通过反应(a) 形成标记物的载体 ATP), 也会不同程度地导致 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 比活度的降低; Schendel^[6]认为, ADP 和步骤 1 所用酶中的非放射性磷酸的污染也是降低 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 比活度的重要因素, 非放射性磷酸可通过与 ^{32}Pi 相同的途径形成无标记的 ATP 而导致 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 比活度降低, 进而导致 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 比活度的降低。此外, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶和 3-磷酸甘油酸激酶中含有微量杂酶 ATPase, 它能水解部分 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 也能导致标记物比活度的降低。

实验以 GDP 代替 ADP 作为底物通过步骤 1 反应制得高比活度的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, 然后以它作磷酸供体通过三步连续的反应标记制得 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$; 步骤 1 中过量的 GDP 和步骤 2 中形成的 GDP, 尽管在步骤 4 中也被磷酸化而成为 GTP, 但它们并不影响 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的比活度并

可以通过柱色谱同标记物加以分离,从而消除了Walseth等人的标记方法中降低标记物比活度的主要因素;同理,GDP中的GMP的存在以及反应所需酶中杂酶ATPase也不会对 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的比活度造成影响。但GDP中的杂质GTP以及体系中的非放射性磷酸的存在,根据它们含量的多少,也会不同程度地影响标记物的比活度。

参 考 文 献

- 1 Feinberg AP, Vogelstein BA. Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to a High Specific Activity. *Anal Biochem*. 1983, 132: 6
- 2 Davanloo P, Rosenberg AH, Dunn JJ, et al Cloning and Expression of the Gene for Bacteriophage T7 RNA Polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984, 81: 2035
- 3 Green MR, Maniatis T, Melton DA. Human β Globin Pre-mRNA Synthesized in Vitro is Accurately Spliced into Xenopus Oocyte Nuclei Cell, 1983, 32: 681
- 4 Johnson RA, Walseth TF. The Enzymatic Preparation of $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, $[\text{-}^{32}\text{P}]\text{cAMP}$ and Their Use in the Assay of Adenylate and Guanylate Cyclases and Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 1979, 10: 135
- 5 Walseth TF, Yuen PST, Moos MC. Preparation of $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -Labeled Nucleoside Triphosphates, Nicotinamide Adenine Dinucleotide, and Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Methods. *Enzymol*, 1991, 195: 29
- 6 Schendel PF, Wells RD. The Synthesis and Purification of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-Adenosine Triphosphate}$ With High Specific Activity. *J Biol Chem*, 1973, 248(23): 8319

THE ENZYMATIC PREPARATION OF $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ WITH HIGH SPECIFIC ACTIVITY

Wu Fengbo Wang Yishan Yi Mingguan

(Institute of Atomic Energy, P. O. Box 275(39), Beijing 102413)

ABSTRACT

A modified procedure for preparing $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ is described with which $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ is used as phosphate donor instead of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. The specific activity of the resulted $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in our experiments is raised greatly as to 148 PBq/mol or more, without decreasing the yield of $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ which is over 93% based on ^{32}P . The specific activity is measured by HPLC and the factors that affect the specific activity of $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ are discussed.

Key words Enzymatic preparation Specific activity $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$
HPLC