

# 一种新的末端转移酶活力测定法——荧光底物掺入法

张 华 林卓坤 张 军

(南开大学生物系, 天津 300071)

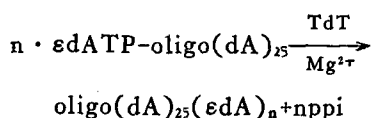
## 提 要

本文介绍了一种末端脱氧核苷酰转移酶 (TdT) 活力的荧光底物掺入测定法。本法基于合成一种荧光物质  $\epsilon$ dATP(1,N-ethenodeoxyadenosine triphosphate) 以代替放射性标记底物, 在含  $\epsilon$ dATP 与  $\text{oligo}(\text{dA})_{25}$  的反应体系中, 使 TdT 催化  $\epsilon$ dATP 加接至  $\text{oligo}(\text{dA})_{25}$  的 3'-OH 末端可得聚合产物, 经分离、酶解后, 测定游离  $\epsilon$ dATP 的荧光强度并根据  $\epsilon$ dATP 的掺入量测定 TdT 活力。方法简便、灵敏, 测定范围较宽、重现性好及无需放射性底物。适用于临床定量检测白血病患者白细胞中 TdT 酶活力及基因工程中 TdT 工具酶活力的测定。

**关键词** 荧光法, 核苷酸, 末端脱氧核苷酰转移酶, 酶活力测定

末端脱氧核苷酰转移酶 (terminal deoxy-nucleotidyl transferase, TdT) 是一种特殊的 DNA 聚合酶。不需模板可催化脱氧核苷三磷酸 (dNTP), 逐个聚合至 DNA 片段或寡聚脱氧核苷酸的 3'-OH 端上<sup>[1,2]</sup>。该酶特异分布于哺乳类动物的胸腺、骨髓及某些类型的白血病患者的恶性细胞中<sup>[3]</sup>, 可用于白血病的临床诊断, 亦是基因工程技术中的工具酶。

常用的酶活力测定法为放射性底物掺入法<sup>[3,4]</sup>, 其灵敏度虽高但受标记物质量所限, 操作过程易产生污染。本文介绍了一种荧光分析法, 其原理是采用有荧光特性的  $\epsilon$ dATP 为底物, 经 TdT 催化使其掺入到  $\text{oligo}(\text{dA})_{25}$  上, 其反应式如下



通过测定掺入到引物中的  $\epsilon$ dATP 量计算 TdT 酶活力。

## 材 料 与 方 法

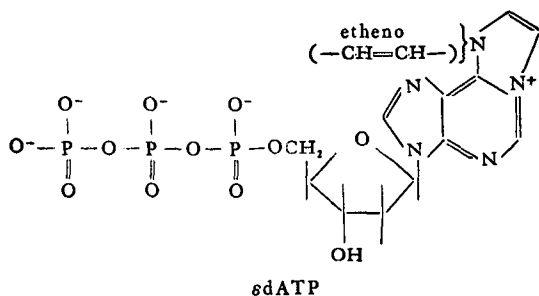
1. dATP (上海东风生化试剂厂);  $\text{oligo}(\text{dA})_{25}$  (南开大学分子生物所宗建超老师赠送); 蛇毒磷酸二酯酶 (Sigma); DEAE 52 (Whatman); 其余均为分析纯试剂。

### 2. $\epsilon$ dATP 的合成与分离纯化<sup>[5,6]</sup>

0.1mol/L dATP 与 0.5mol/L 氯乙醛于 pH4.5, 37℃ 保温反应 24h 后, 加入等体积的乙醚, 抽提除去未反应的氯乙醛, 加入二倍体积甲醇, 吹干后, 残留的白色粉末用最小体积的 0.05mol/L, pH6.4, Tris-HAc 溶解, 吸附至已经 0.05mol/L Tris-HAc 平衡的 DEAE 52 柱上, 用 0.05—0.35mol/L, pH6.4 的 Tris-HAc 梯度洗脱(流速 15ml/h), 分步收集, 洗脱流出峰依次为  $\epsilon$ dAMP、 $\epsilon$ dADP、 $\epsilon$ dATP。收集合并  $\epsilon$ dATP 高峰管, 调 pH7.2。 $\epsilon$ dATP 在 265 nm 处的消光系数为  $5.7 \times 10^3 (\text{mol/L})^{-1} \text{cm}^{-1}$ 。纯度可用纸层析方法测定 (Whatman No.1, 展

层液：异丁酸：浓氨水：水=66:3:31)。

$\epsilon$ dATP 化学结构式：



### 3. TdT 酶活力测定

酶活力测定系统含 0.2mol/L 二甲胂酸缓冲液 8mmol/L  $MgCl_2$  1mol/L 巯基乙醇, pH7.5, 15 $\mu$ mol/L oligo (dA)<sub>25</sub>, 1.0mmol/L  $\epsilon$ dATP 及一定量待测酶液, 总反应体积 100 $\mu$ l, 对照管以蒸馏水代替酶液。将反应管与对照管在 37 $^{\circ}C$  下保温 1h, 反应完毕迅速冷却, 分别取 40 $\mu$ l 反应液吸至 GF/C 滤纸上, 顺次用 5% TCA-1%  $Na_2P_2O_7$ , 5% TCA, 95% 乙醇及乙醚洗滤纸, 干燥后将滤纸剪成小条放入试管底部, 加入 0.5ml 0.01mol/L Tris-HCl (pH8.9, 含 0.01mol/L NaCl, 1.5mol/L  $MgCl_2$ , 0.10% TritonX-100) 于 37 $^{\circ}C$ , 摇动 1h 后, 将洗脱液取出, 再用 0.2ml 洗脱液将纸条洗一次, 合并洗脱液, 离心, 取上清液并加入蛇毒磷酸二酯酶 (0.33U/mg), 37 $^{\circ}C$ , 1h 后测荧光强度。

### 4. oligo(dA)<sub>25</sub>( $\epsilon$ dA)<sub>n</sub> 聚合物的消化试验

聚合物 oligo(dA)<sub>25</sub>( $\epsilon$ dA)<sub>n</sub> 的制备方法同上, 加入 0.5 $\mu$ g 蛇毒磷酸二酯酶, 于 37 $^{\circ}C$  保温, 按不同的时间间隔分别取出后, 测荧光强度。

### 5. TdT 催化底物 $\epsilon$ dATP 聚合的保温反应时间试验

反应过程及反应条件同上, 保温时间分别为 0、10、30、40、60min。

### 6. TdT 酶活力测定标准曲线的制作

精确分别吸取 0、1、2、3、4、5U 的 TdT 酶液, 在饱和引物及底物的反应条件下进行, 反应毕测荧光强度。制作荧光强度与 TdT 酶活力关系的标准曲线。

## 结果与讨论

### 1. 荧光底物 $\epsilon$ dATP 的制备

用 100mg dATP 与  $ClCH_2CHO$  反应经纯化后获  $\epsilon$ dATP 约 11.2 $\mu$ mol (以 OD<sub>265</sub> 295OD 推算)。本法制备重现性较好, 经 DEAE52 柱层析分离后基本不含  $\epsilon$ dADP 及  $\epsilon$ dAMP 的  $\epsilon$ dATP。层析图谱见图 1。

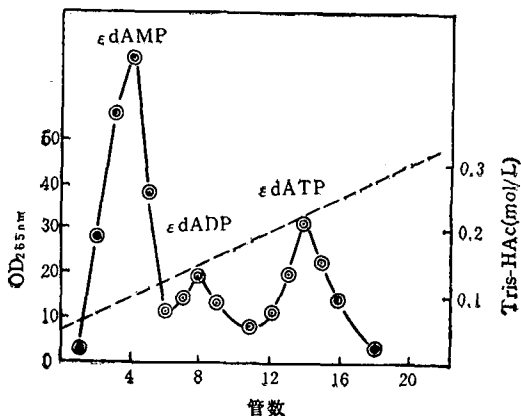


图1  $\epsilon$ dAMP,  $\epsilon$ dADP,  $\epsilon$ dATP 的 DE52 柱层析梯度洗脱曲线

DE52 柱: 1.2 $\times$ 6.5cm; 梯度洗脱液: 0.05—0.35 mol/L Tris-HAc pH6.4;  $\bigcirc$ — $\bigcirc$ : OD<sub>265nm</sub>; ----: Tris-HAc 梯度

### 2. $\epsilon$ dATP 的荧光光谱

$\epsilon$ dATP 的激发光谱最大波长为 304nm; 发射光谱最大波长为 415nm。

### 3. 不同浓度的 $\epsilon$ dATP 的荧光强度呈现线性关系, (见图 2)

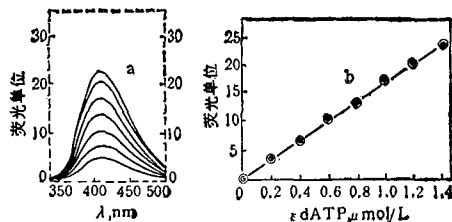


图2 不同浓度  $\epsilon$ dATP 的荧光扫描图谱

a. 扫描图谱 b. 荧光强度-浓度相关曲线

### 4. TdT 酶活力的测定

由于  $\epsilon$ dATP 经 TdT 催化掺入到引物上形成聚合物 oligo(dA)<sub>25</sub>( $\epsilon$ dA)<sub>n</sub> 后, 其荧光即

被淬灭。我们采用三氯醋酸 (TCA) 酸沉淀法, 收集聚合物并除去残留的底物后, 用蛇毒磷酸二酯酶消化以降解聚合物, 释放  $\epsilon$ dAMP, 通过测定  $\epsilon$ dAMP 的荧光强度, 得到  $\epsilon$ dATP 的掺入量, 从而计算 TdT 的酶活力单位。

蛇毒磷酸二酯酶对  $\text{oligo}(\text{dA})_{25}(\epsilon\text{dA})_n$  的消化试验, 结果见图 3, 可以看到经 20min 消化后,  $\epsilon$ dAMP 可完全被释放出来。

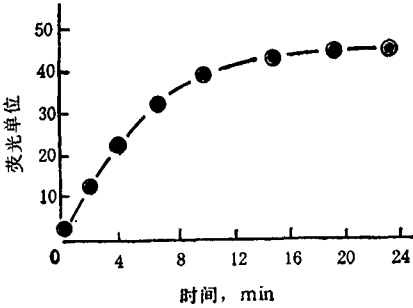


图 3 聚合物在被蛇毒磷酸二酯酶消化过程中荧光强度的变化

TdT 不同的酶促反应时间与荧光强度的关系见图 4。图中表明了有限的反应时间内二者呈现线性关系。

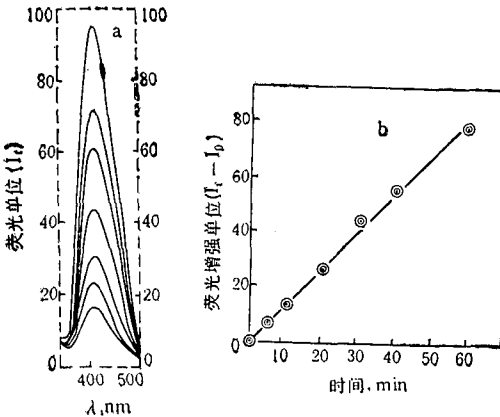


图 4 TdT 不同酶促反应时间的荧光强度扫描图

a. 扫描光谱 b. 荧光强度-时间相关曲线

### 5. TdT 酶活力测定标准曲线

本文用荧光法测 TdT 活力仍按照同位素掺入法定义酶活力单位, 即在 37℃ 保温 1h 将 1nmol 底物掺入到引物中所需的酶量定义为一个单位 (U)。图 5 所示已知酶活力单位的酶液制作的标准曲线。结果表明, 荧光强度、 $\epsilon$ dATP

掺入量及 TdT 酶活力间呈现线性关系。用本法测定 TdT 酶活力可先用标准酶液制作标准曲线。未知样品通过酶促反应等过程从其荧光强度大小查对标准曲线而测定酶活力。

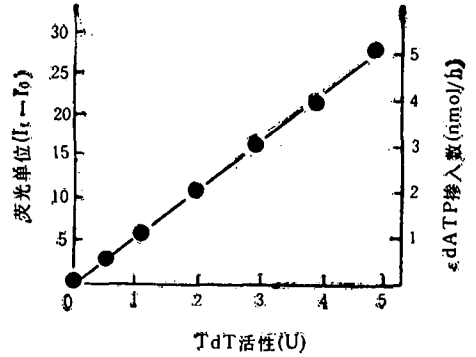


图 5 TdT 酶活力荧光测定标准曲线

我们曾用纯化的小牛胸腺 TdT (2895U/mg) 及急性淋巴细胞白血病患者白细胞抽提液, 分别用本法及放射性同位素掺入法进行平行试验, 同一样本重复四次, 结果表明有很好的重现性。

Deibel 等(1985)<sup>[5]</sup>曾采用放射性同位素标记的  $\epsilon$ dATP ( $^3\text{H}-\epsilon\text{dATP}$ ) 与  $^3\text{H}-\text{dATP}$  进行掺入比较试验, 表明了  $\epsilon$ dATP 对粗 TdT 酶液和已纯化的 TdT 酶液均可达到精确、灵敏及重现性好的要求。本文报道的  $\epsilon$ dATP  $K_m$  为 0.045mmol/L, 与文献报道较为一致。选择测活的底物浓度为 1.0mmol/L。本法可检测 0.1u 的 TdT 酶活力。

本法是一种简便、灵敏、重现性好而不需放射性操作测定 TdT 酶活力的定量方法。适用于基因工程技术、酶学基础理论研究和白血病临床诊断与愈后检测。

### 参 考 文 献

- 1 Bollum F J et al J Biol Chem, 1959;234:2733
- 2 Coleman M S et al. Arch Biochem Biophys, 1979; 183: 525
- 3 McCaffrey R S et al Proc Natl Acad Sci U S A, 1973; 70(2):521
- 4 Coleman M S et al. Nucleic Acid Res, 1977;14:4305
- 5 Deibel R M et al. Anal Biochem, 1985; 144:366
- 6 Secrist J A et al Biochemistry, 1972;11:3499

[本文于 1989 年 7 月 25 日收到]