



УДК 547.85.04:546.11.3

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ МЕЧЕННОЙ ТРИТИЕМ АТФ  
ИЗ АДЕНИНАМясоедов Н. Ф., Кузнецова О. В., Лазуркина Т. Ю.,  
Франк-Каменецкая М. Д.

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

Описаны условия ферментативного синтеза меченной тритием АТФ из аденина в одну стадию с участием ферментного препарата из клеток *E. coli*. Показано, что, изменяя потенциал АТФ-регенерирующей системы варьированием концентрации креатинфосфата, можно получать в одном эксперименте смесь аденозинмоно-, -ди- и -трифосфатов в желаемом соотношении.

АТФ, меченная радиоактивными изотопами, в частности тритием, широко используется в научных исследованиях. В последние годы существенно возросли требования к удельной радиоактивности и радиохимической чистоте получаемых препаратов. В большинстве случаев меченную тритием АТФ получают ферментативным фосфорилированием препаратов АМР киназами, выделяемыми из разных источников — от бактерий и дрожжей до клеток млекопитающих [1–4]. Меченную тритием АМР получают либо за счет реакции гидронолиза тритием галогензамещенной АМР [5, 6], либо ферментативным фосфорилированием аденозина [7] или ферментативным фосфорилированием аденина [9]. Возможно введение тритиевой метки в восьмое положение основания за счет реакции гетерогенного каталитического изотопного обмена с газообразным тритием [10].

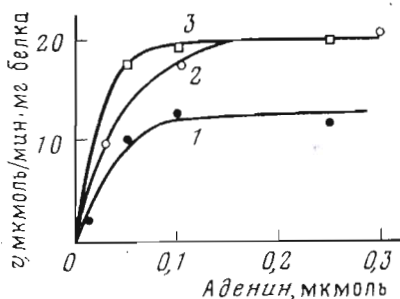
С точки зрения получения кратномеченных препаратов наиболее предпочтительным методом получения  $[2,8-^3\text{H}_2]\text{ATP}$  является энзиматическое фосфорилирование аденина с последующим превращением образующейся  $[2,8-^3\text{H}_2]\text{AMP}$  в соответствующие препараты АТФ традиционными способами. Попытки синтезировать меченную тритием АМР из аденина с участием ферментных препаратов из *Brevibacterium* и *Saccharomyces cerevisiae* дали лишь 30 и 50%-ный выход АМР соответственно [8, 9].

С учетом потерь при дальнейшем фосфорилировании полученной АМР до АТФ (выход равен 80%) киназами, выделенными из *E. coli*, степень превращения аденина в АТФ оказывается равной 20–40%.

Наряду с этим специфика работы с мечеными соединениями выдвигает требование одностадийности проводимого процесса, исключающей необходимость выделения и очистки промежуточных продуктов и снижающей тем самым потери радиоактивности. В работе исследовано получение меченной тритием АТФ непосредственно из меченого аденина без выделения АМР как промежуточного продукта.

В качестве источника ферментов были выбраны клетки *Escherichia coli*, ферментные препараты из которых успешно применяли для энзиматического фосфорилирования АМР.

Рис. 1. Скорость превращения  $[^3\text{H}]$ аденина в  $[^3\text{H}]$ АМР ( $\nu$ ) в зависимости от количества аденина при содержании фосфорибозилпирофосфата в 0,05 мл инкубационной смеси, равном 0,1 (1), 0,3 (2) и 0,5 мкмоль (3)



Известно, что аденинфосфорибозилтрансфераза у бактерий *E. coli* играет основную роль в утилизации этими клетками не только аденина [11], но и аденозина [12].

В грубых экстрактах этих клеток наблюдается заметная активность аденинфосфорибозилтрансферазы: ~0,01 мкмоль/мин [11, 13]. При получении меченой тритием АТР высокой удельной активности (~50 Ки/мкмоль) количество вводимого в реакцию аденина невелико (~10 мкмоль), поэтому отпадает необходимость в тонкой очистке этого фермента. Последнее обстоятельство важно для непосредственного превращения аденина в АТР, так как используемый ферментный препарат должен наряду с аденинфосфорибозилтрансферазой иметь и киназную активность.

Исходя из перечисленных требований, нами был получен ферментный препарат, 1 мг белка которого в 1 мл реакционной смеси обеспечивал за 20 мин превращение не менее 3 мкмоль меченого аденина.

Оптимальные условия реакции были выбраны на основании исследования степени превращения в зависимости от концентрации аденина и фосфорибозилпирофосфата. Из данных, приведенных на рис. 1, следует, что для эффективного протекания реакции требуется 2–3-кратный избыток фосфорибозилпирофосфата над аденином, а концентрация последнего для насыщения им фермента не должна быть ниже 2 мкмоль на 1 мл реакционной смеси. Скорость реакции в этих условиях пропорциональна количеству взятого фермента. Сильное разбавление фермента (начиная с 0,3 мг/мл), однако, приводит к существенному снижению выхода АМР (рис. 2).

В таблице приведены данные о составе реакционной смеси после превращения  $[^3\text{H}]$ аденина непосредственно в АТР. Выход последней не ниже 85%, остальные продукты фосфорилирования содержатся в количествах, не превышающих 10%. Удаление из реакционной смеси АТР, которую обычно добавляют в качестве донора фосфата в минимальных количествах, практически не сказывается на эффективности синтеза АТР. Подобный факт был также отмечен и в работе [14]. Последнее обстоятельство исключительно важно для получения меченой АТР, так как отсутствие немеченой АТР в реакционной смеси позволяет сохранить высокую удельную радиоактивность получаемого меченого продукта.

Использование слабоочищенного ферментного препарата имеет один недостаток: инкубация реакционной смеси свыше 20 мин приводит к некоторому уменьшению выхода АТР наряду с возрастанием количества АМР, АДФ и аденина (рис. 3), что является, по-видимому, результатом деятельности «побочных» ферментов, присутствующих в используемом препарате.

В ряде случаев оказывается необходимым получение всего набора  $[^3\text{H}]$ -меченых нуклеотидов разной степени фосфорилирования. Обычно для этих целей используют кислотный гидролиз нуклеозидтрифосфатов [15]. Мы для решения этой задачи в одном эксперименте исходили из того, что процесс ферментативного синтеза АТР из АМР идет в 2 стадии через образование АДФ.

Для увеличения выхода АДФ необходимо существенно уменьшить скорость второй стадии — превращение АДФ в АТР, т. е. сохранить АДФ в

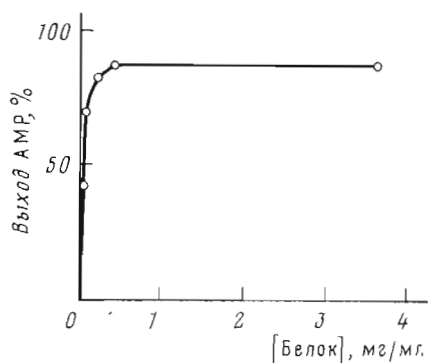


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость выхода  $[^3\text{H}]\text{AMP}$  от разведения реакционной смеси

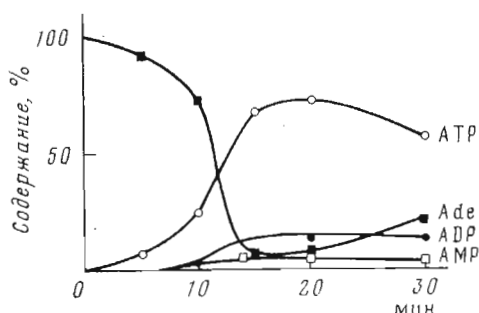


Рис. 3

Рис. 3. Изменение состава реакционной смеси при синтезе  $[^3\text{H}]\text{ATP}$  из  $[^3\text{H}]\text{аденина}$  во времени

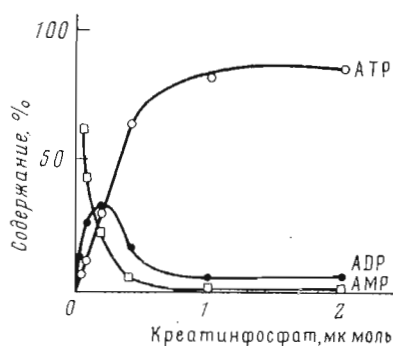


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость состава продуктов реакции при синтезе  $[^3\text{H}]\text{ATP}$  из  $[^3\text{H}]\text{аденина}$  от исходного содержания креатинфосфата в реакционной смеси. Время реакции 30 мин, объем смеси 0,05 мл

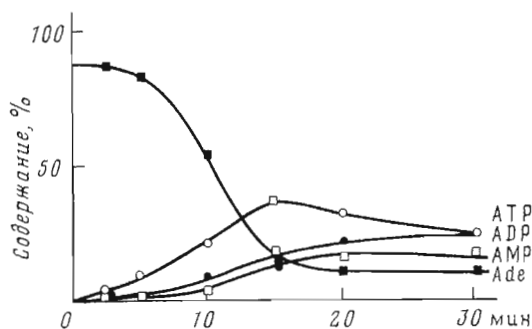


Рис. 5

Рис. 5. Ход превращения  $[^3\text{H}]\text{аденина}$  в нуклеотиды при концентрации креатинфосфата 0,2 мкмоль в 0,05 мл реакционной смеси

инкубационной среде. Кроме того, желательнее уменьшить и скорость первой реакции, т. е. расход АМР.

Как показали наши исследования, наиболее выгодным оказалось уменьшение потенциала АТР-регенерирующей системы, включающей креатинфосфат и креатинфосфокиназу.

На рис. 4 представлена зависимость выхода АМР, АДФ и АТР, образующихся из  $[^3\text{H}]\text{аденина}$ , от количества креатинфосфата в реакционной смеси. Количество АМР монотонно уменьшается по мере увеличения концентрации креатинфосфата.

Кривая, отражающая накопление АДФ в зависимости от количества креатинфосфата, имеет ярко выраженный максимум при концентрации креатинфосфата, в 5 раз меньшей той, которая необходима для максимального выхода АТР. В этих условиях в реакционной смеси оказывается практически одинаковое количество всех трех нуклеотидов.

На рис. 5 показана динамика изменения состава реакционной смеси при проведении реакции с лимитирующим количеством креатинфосфата. На начальных стадиях реакции, пока креатинфосфата достаточно, реакция идет обычным образом; по мере исчерпания креатинфосфата замедляется накопление АТР и в инкубационной системе появляются АМР и АДФ. После

Состав инкубационной смеси (%) в результате реакции превращения [<sup>3</sup>H]аденина в [<sup>3</sup>H]АТР

Компоненты смеси	Исходное содержание АТР, мкмоль/50 мкл			Компоненты смеси	Исходное содержание АТР, мкмоль/50 мкл		
	0,01	0,001	0		0,01	0,001	0
AMP	4	3	2	АТР	85	83	81
ADP	5	8	8	Аде	5	6	8

15 мин инкубации креатинфосфат, по-видимому, полностью расходуется. Слабое увеличение количества ADP, отмечаемое после этого периода, является следствием дефосфорилирования АТР за счет побочных реакций.

Таким образом весь набор [<sup>3</sup>H]нуклеотидов разной степени фосфорилирования может быть получен в одном эксперименте.

### Экспериментальная часть

*Выделение ферментного препарата.* Источником ферментов служили клетки *Escherichia coli* В, выращенные до поздней логарифмической фазы роста в полной питательной среде [1]. Отмытые от среды клетки суспендировали в 3-кратном объеме 0,02 М трис-буфера (рН 8,0) и разрушали в ультразвуковом дезинтеграторе (MSE). Неразрушенные клетки и оболочки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 10 000 g. Нуклеиновые кислоты осаждали добавлением 1/10 объема 10% стрептомицин-сульфата. К супернатанту, полученному после осаждения нуклеиновых кислот, добавляли постепенно (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до 40%-ного насыщения. Осадок отбрасывали, а супернатант насыщали сульфатом аммония до 55%. Осадок растворяли в 0,1 М трис-буфере (рН 7,8) и диализовали 18 ч против того же буфера.

*Активность аденинфосфорибозилтрансферазы* определяли по количеству образовавшейся меченой AMP с помощью колоночной (10×0,8 см) ионообменной хроматографии на дауэксе 1×8 в формиатной форме. Стандартная реакционная смесь (50 мкл) содержала 0,1 мкмоль аденина (1 мКи/мкмоль), 0,3 мкмоль фосфорибозилпирофосфата (Na-соль, Sigma), 0,3 мкмоль MgCl<sub>2</sub>, 4 мкмоль трис-HCl, рН 8,0, и фермент в количестве ~50 мкг белка (концентрацию белка определяли по Лоури). Смесь инкубировали 20 мин при 37°С, реакцию останавливали добавлением 20 мкл кипящей дистиллированной воды и выдерживанием смеси при 100°С в течение 5 мин. Белок отделяли центрифугированием на холоде, 150 мкл супернатанта наносили на колонку. Непрореагировавший аденин элюировали 27 мл воды, а AMP — 10 мл раствора 1 М формиата аммония в 1 н. муравьиной кислоте. Колонку регенерировали раствором 6 М формиата аммония в 2 н. муравьиной кислоте. Активности обеих фракций просчитывали в сцинтиляционном счетчике с эффективностью счета 12%.

При получении [<sup>3</sup>H]АТР из [<sup>3</sup>H]аденина к стандартной реакционной смеси добавляли АТР-регенерирующую систему, содержащую 1,0 мкмоль креатинфосфата (Reanal) и 5 мкг креатинфосфокиназы (КФ 2.7.3.2, Reanal).

Для получения смеси нуклеотидов разной степени фосфорилирования использовали 0,2 мкмоль креатинфосфата. Смесь инкубировали 30 мин при 37°С и далее обрабатывали как описано выше.

*Оценку эффективности превращения аденина в АТР* осуществляли с помощью ТСХ на пластинках с полиэтиленмин-целлюлозой (Merck) в 1 М NaCl. Для более точной идентификации продуктов реакции инкубационную смесь после денатурации белка (в количестве 20 мкл) наносили со свидетелями на две пластинки, на одной из которых разделение проводили в воде, на второй — в растворе 1 М NaCl. Активность пятен, проявленных в ультрафиолете, просчитывали.



*Разделение продуктов* реакции фосфорилирования проводили на колонке с DEAE-целлюлозой в  $\text{HCO}_3^-$ -форме триэтиламмонийбикарбонатным буфером (рН 8,6) в градиенте концентраций буфера 0,05–0,15 М. Скорость элюции 80 мл/ч. Объем фракций 10 мл. При получении АТФ элюцию проводили, используя градиент концентраций бикарбоната триэтиламмония 0,05–0,3 М.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Canellakis E. S., Gottesman M. E., Kammen M. O. (1960) *BBA*, **39**, 82–87.
2. Nejedly Z., Ekl J., Hybs K., Filip J. (1969) *J. Lab. Comp.*, **5**, 320–332.
3. Nejedly Z., Hruskova S., Hybs K., Filip J., Cihak A., Vesely J. (1971) *J. Lab. Comp.*, **7**, 69–79.
4. Boháček L., Filip J. (1975) *Radioisotopy*, **16**, 311–334.
5. Boháček L., Filip J. (1973) *Radioisotopy*, **14**, 783–799.
6. Вдовенко В. М., Боброва В. Н., Гордеева Л. С., Дедова В. К. (1972) *Радиохимия*, **14**, 457–462.
7. Leibach T. K., Spiess G. I., Neudecker T. J., Peschke G. J., Puchwein G., Hartmann G. R. (1974) *Puppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 328–344.
8. Nejedly Z., Skodová H., Hybs K., Skoda J. (1970) *J. Lab. Comp.*, **6**, 3–14.
9. Nejedly Z., Peč V. (1978) *Radioisotopy*, **19**, 351–405.
10. Evans E. A., Sheppard H. C., Turner J. C., Warrell D. C. (1974) *J. Lab. Comp.*, **10**, 569–587.
11. Hochstadt-Ozer J., Stadtman E. R. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 5294–5303.
12. Hochstadt-Ozer J. (1971) *Fed. Proc.*, **30**, 1062.
13. Пумпен П. П., Тауринь В. Э., Грен Э. Я. (1974) *Биохимия*, **39**, 504–511.
14. Chalykoff P., Yamazaki H. (1978) *Can. J. Biochem.*, **56**, 839–841.
15. Nejedly Z., Ekl J., Filip J. (1976) *Radioisotopy*, **17**, 265–312.

Поступила в редакцию  
17.IV.1980

#### ENZYMATIC SYNTHESIS OF TRITIUM-LABELED ATP FROM ADENINE

MYASOEDOV N. F., KUZNETSOVA O. B., LAZURKINA T. Yu.,  
FRANK-KAMENETSKAYA M. D.

*Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

One-stage enzymatic synthesis of tritium-labeled ATP from adenine involving enzyme preparation from *E. coli* cells is described. Changing the ATP-regenerating system potential by varying phosphocreatine concentration allows to obtain a mixture of adenine mono-, di- and triphosphates in one experiment in the required proportion.