

阴离子交换树脂分离制备腺嘌呤核糖核苷(3', 5'-)环磷酸(cAMP)

中国科学院上海实验生物研究所核酸研究组

腺嘌呤核苷 3', 5'-环磷酸对癌细胞在特定条件下有抑制作用, 对冠心病和牛皮癣等有缓解作用, 临床上已证明。本文所介绍的合成、分离、纯化、鉴定等方法, 简易而又可靠, 比目前国外报道的方法有很大改进, 特别是采用国产离子交换树脂, 分离简便、容量大、效果好, 为大量生产创造了有利条件。

——编者

cAMP 是与激素作用密切相关的代谢调节物。很多激素(第一信使)作用到细胞表面, 发动细胞内的 ATP 转化成 cAMP(第二信使), 细胞内 cAMP 的浓度变化又引起了细胞各种代谢的变化。cAMP 与恶性肿瘤和内分泌的关系十分密切(Riboson 等, 1971)。

研究工作和临床试验都需要大量的 cAMP。生物体内 cAMP 含量极低, 提取方法复杂。Borden (1966) 和 Smith 等(1961)分别用有机合成方法制备 cAMP, 但都需用 DEAE-纤维素柱层析。DEAE-纤维素交换容量低, 所使用的洗脱剂碳酸氢三乙胺价格昂贵, 不适于大量制备 cAMP。Krishna (1968) 用阳离子交换树脂柱层析结合硫酸锌-氢氧化钡沉淀分离 cAMP, 回收率低(28—40%)。Ramachadran (1971) 的氧化铝吸附法也不适于有机合成产物的分离。

本文采用 Smith 合成法合成 cAMP, 而对其分离方法作了改进, 即用强碱性阴离子树脂柱层析分离 cAMP。分离效果很好。

一、合成与分离原理

1. 合成 采用 Smith 合成法, 操作步骤略加修改。

5'-AMP 的磷酸基团受双环己基碳化二亚胺(dicyclohexylcarbo-diimide)活化后, 十分容

易受到糖环上 3' 位羟基亲核性攻击, 缩合成 cAMP, 反应式如图 1。

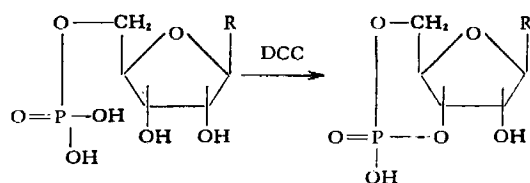


图 1

无水吡啶为溶剂。由于 5'-AMP 在无水吡啶中的溶解度很差, 故先将 5'-AMP 变成吗啡啉胍盐后进行反应(Moffatt 和 Khorana, 1961)。在常温和浓溶液中反应, 容易成焦磷酸等付产物, 所以反应时用 AMP 的吗啡啉胍盐的无水吡啶溶液滴注入迴流着的 DCC 无水吡啶溶液, 以降低 AMP 的反应浓度和维持较高的反应温度。合成产物除 cAMP 外, 还有未反应的 AMP、付产物腺嘌呤核苷(A_R)和焦磷酸等。

2. 分离 Kumler 等(1943)研究磷酸酯酸性时发现: 磷酸单甲酯的 $pK'a_1 = 1.54$, 磷酸二甲酯的 $pK'a_1 = 1.29$, 即磷酸二酯的酸性大于磷酸单酯的酸性。AMP 的磷酸是单酯形式, cAMP 的磷酸是二酯形式, 而焦磷酸含有两个二酯形式的磷酸。由此可以推断它们的酸性顺序是 AMP 最弱, cAMP 次之, 焦磷酸最强。所以当合

成产物上中性上阴柱时, A_R 在柱上不吸收首先流出, 再用盐酸洗脱, 随着 pH 的渐渐下降, 洗出的顺序应是 AMP、cAMP 和焦磷酸。这种推断与我们的实验相符。

二、合成和分离步骤

1. 合成 2 毫克分子 (694.2 毫克) 氢型的 5'-AMP 溶解于 10 毫升水中, 加少量吡啶帮助溶解。另外, 2 毫克分子 (586 毫克) 吗啡喹胍溶解于 50 毫升吡啶中, 把它在搅拌下慢慢加入上述溶液。在约 70°C 油浴下减压蒸干, 加约 50 毫升无水吡啶, 同温下减压蒸干, 以除去水分。再加 50 毫升无水吡啶重复蒸干一次(后两次蒸出的吡啶可作下次实验的普通吡啶用), 得到的白色固体溶解于 2000 毫升无水吡啶中, 滴注入迴流着的 DCC-无水吡啶溶液(DCC 2 毫克分子, 无水吡啶 2000 毫升)中。滴注在 3 小时内完成后, 继续迴流 2 小时。待反应液稍冷后减压蒸干(蒸出的吡啶可作下次实验的无水吡啶用), 得黄白色固体, 冷却后加 200 毫升水, 放冰箱过夜, 次日过滤, 除去不溶物, 并用少量水洗不溶物二次。滤出液和水洗液合并, 用氨水调 pH 为中性, 即可上柱。

2. 分离 用中国科学院上海有机化学研究所实验工厂生产的强碱性阴离子交换树脂。交联度 $\times 2$, 粒度 100—200 目, 经常规处理成氯型后使用。柱高 18 厘米, 内直径 1.5 厘米。上柱和洗脱流速约每分钟 3 毫升。上柱完后用 0.002 N HCl 洗脱 AMP, 用 0.005 N HCl 洗脱 cAMP, 最后用 0.01 N HCl + 0.3 N NaCl 顶出焦磷酸。分管收集每管 50 毫升, 以紫外分光光度计在 260 毫微米或 280 毫微米测定每管光密度值。分离图谱如图 2。

图 2 中 0.002 N HCl 未洗出 AMP 峰, 这是因为合成反应时 AMP 基本上转化成 cAMP 和焦磷酸。如转化率不高, 就会出现明显的 AMP 峰, 如图 3。

将图 2 中 34 至 60 管合并, 用 NaOH 调 pH 至中性, 70—80°C 水浴下减压蒸干, 加 6 毫升水溶解, 在冰盐浴下用 3 N HCl 调 pH 至 1—2,

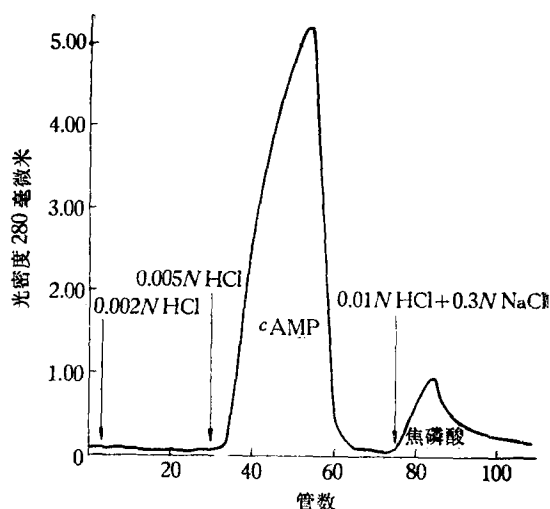


图 2

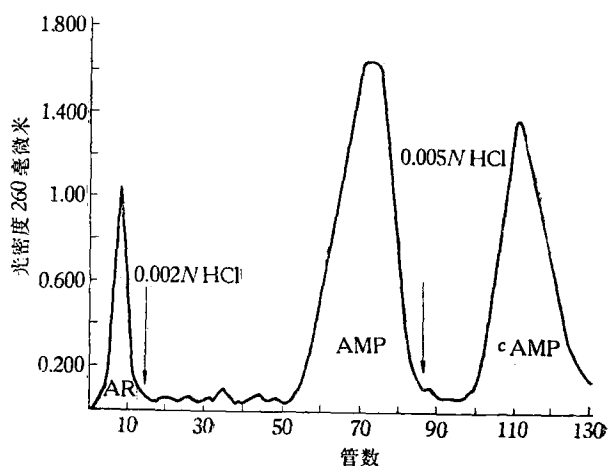


图 3

加 2 倍体积 95% 乙醇, 放冰箱沉淀、离心, 所得沉淀用无水乙醇洗一次, 用乙醚洗两次, 得白色粉末 cAMP 420 毫克, 放干燥器保存。

三、样品检定

1. 纸电泳 Whatman 1 号或新华 1 号纸。0.05 M 碳酸氢三乙胺 pH 7.5 缓冲液, 电压 15—20 伏特/厘米, 室温 25°C, 2.5 小时。结果如图 4 所示。

2. 纸层析 Whatman 1 号或新华 1 号纸。溶剂系统, 乙醇: 1M 醋酸铵 pH 7.5 (7:3V/V) 上行, 室温。结果如图 5。

从以上分析可知, 本法制备的 cAMP 为电

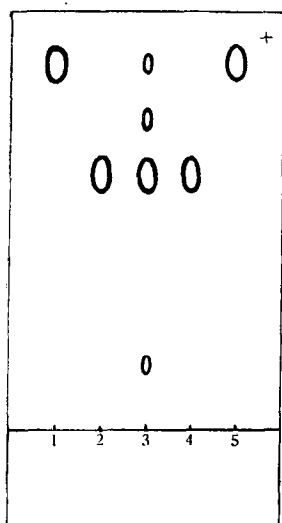


图 4

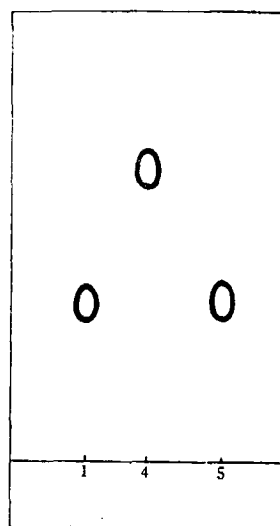


图 5

图 4 和图 5 中样品说明: (1) 标准 5'-AMP, 上海味精厂生产; (2) 标准 cAMP, 本实验室用 DEAE-纤维素柱分离得到; (3) 有机合成后的上柱液; (4) 0.005 N HCl 洗出的峰, 用 NaOH 调 pH 为中性后浓缩点样; (5) 0.002 N HCl 洗出的峰, 用 NaOH 调 pH 至中性后浓缩点样。

泳和层析纯。

四、讨 论

AMP、cAMP 和焦磷酸的 pK_a 值或酸性是不同的, 用强碱性阴离子交换树脂, 并适当选择洗脱盐酸浓度, 便能将它们分开。A_R 在阴柱上不吸, 0.002 N HCl 洗脱出 AMP, 0.005 N HCl 洗脱出 cAMP, 焦磷酸可用较浓盐酸加 NaCl 顶出来。该法的优点是所用树脂的交换容量大, 树脂用量少, 盐酸价格便宜, 阶梯洗脱方法简便, 适用于大量制备 cAMP。本法分离效果很好, 只要适当缩小分离柱, 也可作为测定生物样品 cAMP 的微量分析方法。

也曾试过, 当 AMP 被洗出后, 即使继续用较大量的 0.002 N HCl 洗脱, cAMP 不致被洗出来; 0.0035 N HCl 也能洗脱出 cAMP, 但洗出峰较平坦, 洗脱时间延长; 当 cAMP 洗出后, 用较大量的 0.005 N HCl 继续洗脱, 焦磷酸也不会洗

出来。这说明了 AMP、cAMP 和焦磷酸的 pK_a 的不同。

但是本方法的缺点是用 0.002 N HCl 洗脱 AMP 需时间较长, 适当提高洗脱 AMP 的盐酸浓度和适当降低上柱液的 pH 以缩短洗脱流程是值得考虑的问题。

参 考 资 料

- Borden, R. K., and Smith, M.: *J. Org. Chem.*, **31**, 3247—3253, 1966.
- Krishna, G., Weiss, B., and Brodie, B. B.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **163**, 379—385, 1968.
- Kumler, W. D., and Eiler, J. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 2355—2361, 1943.
- Moffatt, J. G., and Khorana, H. G.: *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 649—658, 1961.
- Ramachandran, J.: *Anal. Biochem.*, **43**, 227—239, 1971.
- Robison, G. A., and Others: *Cyclic AMP*, N. Y. Academic Press., 1971.
- Smith, M., Drummond, G. I., and Khorana, H. G.: *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 698—706, 1961.