

核酸的荧光探针——双乙啶的合成

王菊君 曹恩华*

(中国科学院生物物理研究所)

双乙啶 [Ethidium Dimer, 简称 EtDi 或 ED] 是近年来新合成的非啶衍生物之一。它与核酸结合的亲和力比非啶溴红大 1,000—100,000 倍。用它作为荧光探针,检测核酸最低浓度可达 1 毫微克/毫升。它具有高度的专一性,只能与双链核酸相结合。可用于微量核酸的测定,核酸构象分析和抗癌的研究等等。

一、双乙啶的合成

1. 合成路线(见下页)

2. 实验操作

(1) 4,4'-二硝基邻氨基联苯(II)的制备^[1]。

(2) 4,4'-二硝基邻氨基联苯苯磺酸盐(III)的制备 4,4'-二硝基邻氨基联苯的湿品加入等克分子苯磺酸[以邻氨基联苯计算]研磨得淡黄色固体。60℃ 真空干燥。熔点: 236—238℃, 收率 95% 以上。

(3) N-2-(4,4'-二硝基联苯)苯胺(IV)的制备^[2]。

(4) 3,8-二硝基-6-苯基非啶(V)的制备 将 14.6 克 N-2-(4,4'-二硝基联苯)苯胺溶于 146 毫升硝基苯中,加入 62.7 克氧氯化磷,回流 5 小时,油浴温度 210℃ 左右。最初反应激烈,放出大量氯化氢。随着反应的进行,内温逐步升高,最高可达 179—180℃。冷却后,减压蒸去硝基苯和氧氯化磷,残渣加入适量的 5 当量氢氧化钠研磨,用较大量的水稀释,过滤,氯仿重结晶,得淡黄色针晶。熔点: 266—267℃,收率 74%。

(5) 3,8-二氨基-6-苯基非啶(VI)的制备 在 14.3 克粉状 3,8-二硝基-6-苯基非啶中,依次加入 50 毫升乙醇,300 毫升水,2 毫升 5 当量盐酸,17 克铁粉,边搅拌边水浴回流 5 小时。冷

却后,用氢氧化铵溶液使成碱性。抽滤,水洗,氯仿重结晶,得黄色棱晶。熔点: 191—194℃,收率 74.6%。

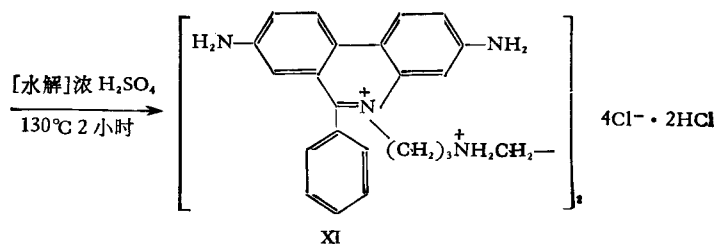
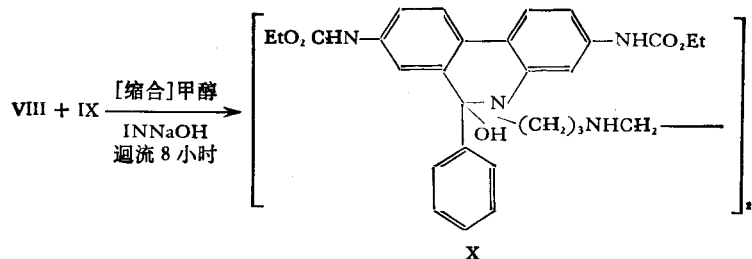
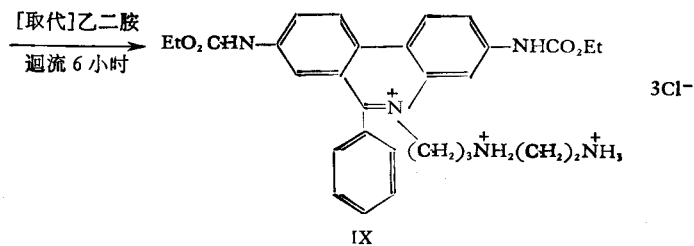
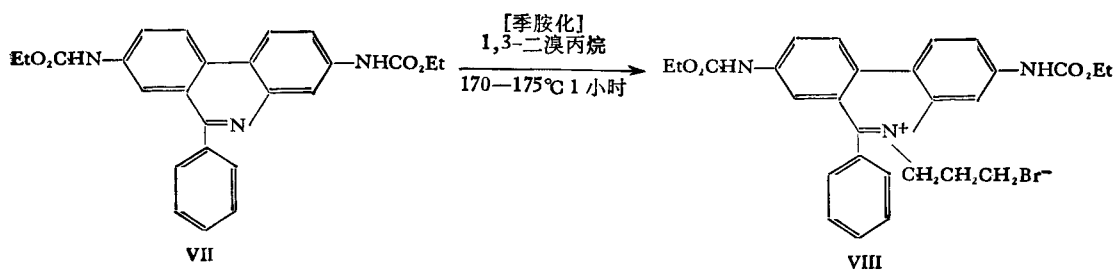
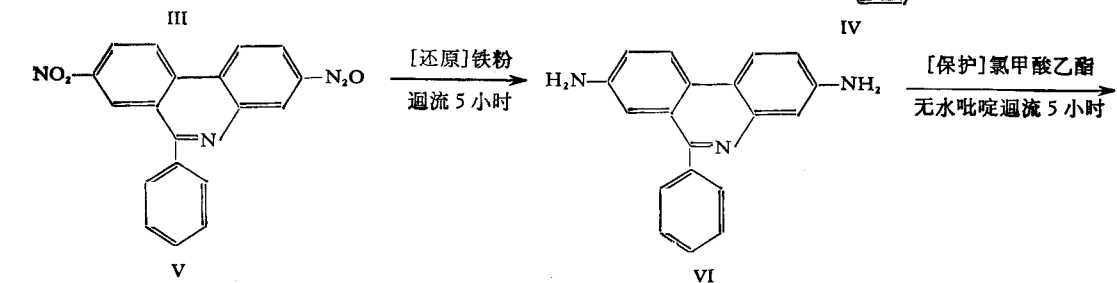
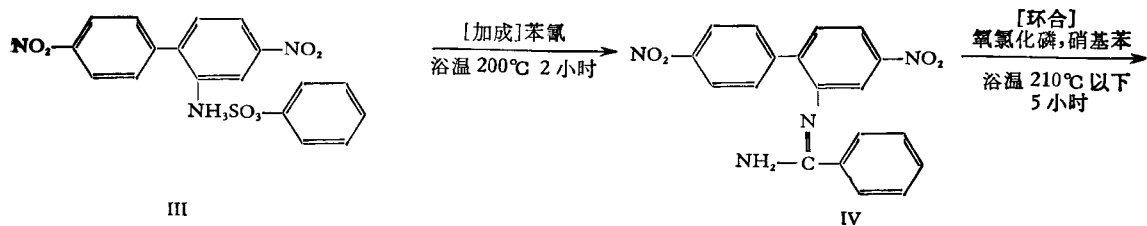
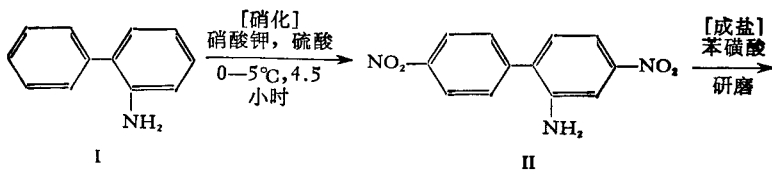
(6) 3,8-二乙氧甲酰氨基-6-苯基非啶(VII)的制备 将 8.8 克 3,8-二氨基-6-苯基非啶溶于 63.5 毫升的无水吡啶中,磁力搅拌。在 25—30℃ 下缓慢滴加氯甲酸乙酯 6.4 毫升后,在室温下继续搅拌 5 小时。结束后将反应液倾入 30 倍的水中,放置,过滤,水洗,再用少量甲醇洗涤 2 次,60℃ 干燥。熔点: 137—140℃,收率 90% 左右。

(7) 5-3'-溴丙基-3,8-二乙氧甲酰氨基-6-苯基非啶溴化物(VIII)的制备 在 6.7 克 3,8-二乙氧甲酰氨基-6-苯基非啶中,加入 19 毫升 1,3-二溴丙烷,油浴加热,浴温 170—175℃,搅拌 1 小时。搅拌开始 20 分钟左右,出现桔黄色片状物。冷却后,加入 15 毫升无水乙醚,过滤,无水乙醚洗涤,得黄色固体。熔点: 234℃ (分解),收率 75.1%。

(8) 3,8-二乙氧甲酰氨基-5-(4',7'-二吡庚基)-6-苯基非啶氯化物二盐酸盐(IX)的制备 将 2.7 克 5-3'-溴丙基-3,8-二乙氧甲酰氨基-6-苯基非啶溴化物悬浮于 160 毫升甲醇中,加入 5.7 毫升乙二胺,回流 6 小时。冷却后,加入 21 毫升水,蒸去甲醇,冰箱放置,过滤,水洗,干燥得黄色固体 2.3 克。再溶解于 197 毫升无水乙醇中,用浓盐酸酸化,(pH3—4),析出黄色结晶。熔点: 273—276℃ (分解),收率 55%。

(9) 假碱(X)的制备 于 200 毫升三角烧瓶中,依次加入 1.5 克 5-3'-溴丙基-3,8-二乙氧甲酰氨基-6-苯基非啶溴化物,1.5 克 3,8-二乙

* 黎志刚同志参加部分实验工作。



氧甲酰氨基-5-(4',7'-二吡 庚基)-6-苯基菲啶氯化物二盐酸盐, 135 毫升甲醇, 9.6 毫升 1 当量氢氧化钠, 水浴回流 8 小时, 在 2 小时后即出现米黄色沉淀。回流完, 冷却, 析出米黄色固体, 过滤, 用少量甲醇洗涤二次, 干燥得 0.4 克。

(10) 双乙啶 (XI) 的制备 于 0.4 假碱中, 加入 1 毫升浓硫酸, 油浴 130℃ 水解 2 小时。冷却后, 用 10 当量氢氧化铵使成碱性, 放置, 倾去上清液, 加入 1.5 毫升浓盐酸溶解, 再加入 3 毫升丙酮, 析出紫红色沉淀, 甲醇重结晶。熔点: 274—275℃, 收率 91%。

二、双乙啶性能测试

我们合成的双乙啶与标准样品* 性能进行比较, 结果一致。

1. 双乙啶为紫红色结晶, 能溶于水, 乙醇等。用毛细管方法测得其熔点为 274—275℃。

2. 元素分析** 分子式: $C_{46}H_{52}Cl_6N_8 \cdot 5CH_3OH$ 。

理论值: C56.20%, H6.61%, N10.28%, Cl19.56%。

测定值: C56.96%, H5.02%, N10.49%, Cl19.73%。

3. 吸收光谱 双乙啶水溶液的吸收峰分别为 290 毫微米和 500 毫微米。(图 1)

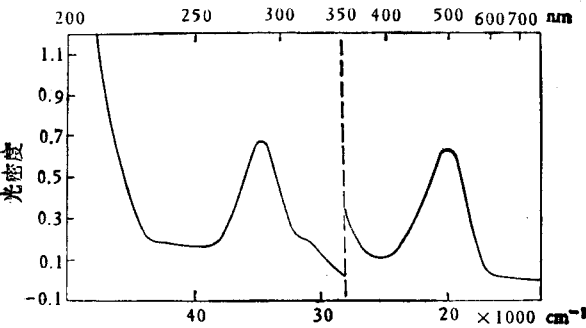


图 1 双乙啶的吸收光谱

紫外区 ED 浓度: 10 微克/毫升
可见区 ED 浓度: 100 微克/毫升
溶剂为二次重蒸水, 仪器为 Specord 分光光度计

4. 荧光发射光谱 双乙啶本身能发出很微弱的荧光, 水溶液发射光谱峰值为 630 毫微米左右, 与核酸络合后荧光显著增强, 峰值向短波

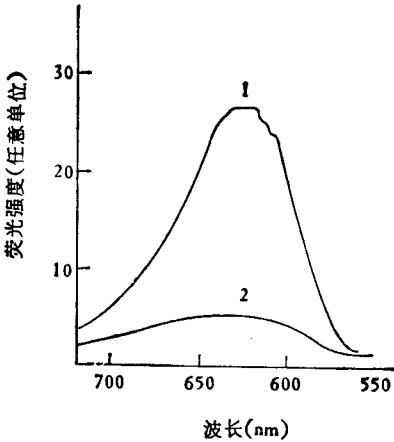


图 2 游离的和络合的双乙啶荧光发射光谱(未校正)

曲线 1——ED10 微克/毫升 +DNA8.3 微克/毫升
曲线 2——ED10 微克/毫升
溶剂: 0.05MTris-HCl 缓冲液, 0.1MNaCl, pH7.4
仪器: WFD-9 型荧光分光光度计

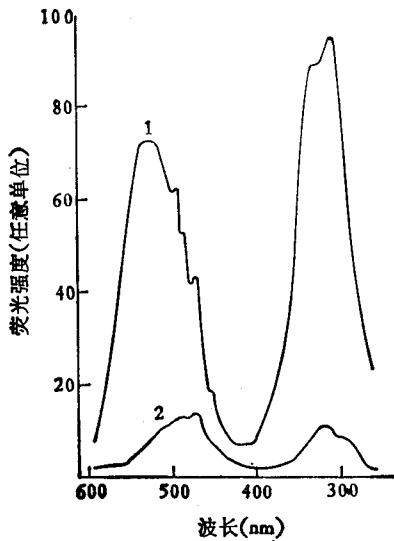


图 3 游离和络合的双乙啶的激发光谱(未校正)

曲线 1——ED (10 微克/毫升) +DNA(8.3 微克/毫升)
曲线 2——ED (10 微克/毫升) 其他条件同图 2

移动 620 毫微米 (图 2)。此外, 在双乙啶溶液中加入酵母 RNA 或 Poly I-C, 荧光强度也显著增大。

5. 荧光激发光谱 游离 ED 的荧光激发光 (下转第 26 页)

* 由 Gustave-Roussy 研究所 Le Pecq 教授赠送。

** 元素分析承中国科学院化学研究所测定。

四、选择性自由基在酶失活机理研究中的应用

由于选择性自由基与氨基酸的反应表现出一些特有的性质,所以在蛋白质尤其是酶失活机理的研究中它发挥了很大作用。一个较早的实验是对溶菌酶活性基团的判定。

在脉冲辐射离解实验中,用高能电子照射 N_2O 气饱和的含有 KCNS 的溶菌酶溶液,则溶菌酶受产生的 $(CNS)_2$ 攻击而失活。Adams 等人测定了 $(CNS)_2$ 与自由氨基酸的反应性,发现在中性 pH 下, $(CNS)_2$ 与色氨酸的反应速率比其它氨基酸至少大 50 倍^[4],又发现 $(CNS)_2$ 与溶菌酶反应产生的瞬态吸收光谱和 $(CNS)_2$ 与色氨酸反应产生的瞬态光谱一致,于是推断,溶菌酶的失活是色氨酸残基受 $(CNS)_2$ 攻击所致。Adams 又用选择性氧化方法证明,溶菌酶的色氨酸 108 是使它失活的关键靶子^[4]。

Adams 等人也用选择性自由基对核糖核酸酶的活性基团进行了鉴别^[12],发现在 pH7—11 范围, $(CNS)_2$ 与蛋氨酸和酪氨酸的反应速率高。但并未使酶明显失活,说明这二个基团与核糖核酸酶的活性关系不大。在同样 pH 范围内, Br_2 除了与蛋氨酸和酪氨酸反应外,还与组氨酸反应,同时随着 pH 的增加,前二者的反应速率增加较组氨酸快,但在 pH8—10 范围,酶失活的相对效率却下降,再次证实了酪氨酸,蛋氨酸基团与核糖核酸酶活性关系不大的观点。在 pH8—11 内, Br_2 与组氨酸反应后,使核糖核酸酶失活,说明组氨酸基团与该酶的活性是密切相关的。碳酸盐实验的结果支持这种观点: CO_3^{2-} 与组氨酸的反应性小于 Br_2 、大于 $(CNS)_2$,而 CO_3^{2-} 使核糖核酸酶的失活效率恰居二者之间。

Adams 等人也对胰蛋白酶,木瓜蛋白酶等进行了研究。在胰蛋白酶的研究中^[11],结合旋光色散,证明色氨酸、酪氨酸及组氨酸基团都与酶活性有密切关系。对木瓜蛋白酶的研究^[20]证明半胱氨酸,色氨酸及组氨酸基团与它的活性密切相关,而酪氨酸基团与酶活性关系不大。

参 考 文 献

- [1] Scholes, G. et al.: in *Pulse Radiolysis* (Ebert, M. et al. eds.), 151, 1965.
- [2] Davies, J. V. et al.: in *Pulse Radiolysis* (Ebert, M. et al. eds.), 165, 1965.
- [3] Braams, R.: in *Pulse Radiolysis* (Ebert, M. et al. eds.), 171, 1965.
- [4] Adams, G. E. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, 16, 333, 1969.
- [5] Adams, G. E. et al.: *Radiat. Res.*, 49, 278, 1972.
- [6] Anbar, M. et al.: *J. Phys. Chem.*, 68, 3829, 1964.
- [7] Cercek, B. et al.: *Science*, 145, 919, 1964.
- [8] Thomas, J. K. et al.: *Trans. Faraday Sec.*, 61, 702, 1965.
- [9] Adams, G. E. et al.: in *Pulse Radiolysis* (Ebert, M. et al. eds.) 117, 1965.
- [10] Keene, J. P. et al.: in *Pulse Radiolysis* (Ebert, M. et al. eds.) 99, 1965.
- [11] Adams, G. E. et al.: *J. Chem. Sec. Faraday Trans.*, 1, 69, 1608, 1973.
- [12] Adams, G. E. et al.: *Radiat. Res.*, 49, 290, 1972.
- [13] Keene, J. P.: in *Pulse Radiolysis* (Ebert, M. et al. eds.) 1, 1965.
- [14] Dorfman, L. M.: in *Techniques of Chemistry* (Hammes, G. G. ed.) Vol. 6, pt. 2, 463, 1974.
- [15] Klapper, M. H. et al.: *Quarterly Reviews of Biophysics*, 12, 465, 1979.
- [16] 刘蓉:《生物科学参考资料》,1977 年,第 8 集第 103 页。
- [17] 沈恂等:《生物化学与生物物理学报》, 13, 165, 1981.
- [18] Porter, G. et al.: in *Techniques of Chemistry* (Hammes, G. G. ed.) Vol. 6, pt. 2, 367, 1974.
- [19] Gressweiner, L. I. et al.: *Science*, 141, 805, 1963.
- [20] Adams, G. E. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, 25, 129, 1974.
- [21] Adams, G. E.: in *Current Topics in Radiat. Res.* (Ebert, M. et al. eds.) 3, 35, 1967.
- [22] Wardman, P.: *Rep. Prog. Phys.*, Vol. 41, No. 2, 1978.

[本文于 1981 年 4 月 20 日收到]

(上接第 69 页)

谱有二个峰(322 毫微米和 472 毫微米),当与 DNA 络合后,峰值向长波位移到 332 毫微米和 526 毫微米(图 3)。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院生物物理所一室二组:《生物化学与生物物理进展》1975 年第 1 期 28 页。
- [2] Gaugain B., et al.: *Biochemistry*, 17, 5071, 1978.
- [3] Markovits J., et al.: *Analytical Biochemistry*, 94, 259, 1979.