

渗条件下,使大量水份进入饱含甘油的细胞,胀破质膜但不影响核膜,因而克服了匀浆破膜易使核破,致使核膜污染质膜的缺点。甘油进入细胞可能是主动过程^[2],因而本法应注意尽量保持淋巴细胞活性。

目前认为两相分配法中起主要作用的因素有三:界面吸附力^[8]、静电引力^[9]和离心力。各种颗粒在两相液系内进行分配时,三种力综合地起作用,使它们以不同的比例分配停留于不同的位相,从而达到分离的目的。按照本法分配停留在两相界面上的主要是质膜,还有少量内质网。根据 Albertsson 公式^[8],两相界面吸附物的得量取决于参加分配样品的浓度、温度、分配颗粒的表面积、两相液间的亲和力,以及两相分别对分配颗粒的亲和力。样品浓度越大,分配时温度越低,分配颗粒表面积越大,两相液间及分别对分配颗粒的亲和力越小,则界面吸附量越大。所以在进行两相分配时必须注意上述诸因素。本法的质膜产物中尚有内质网污染,今后要设法扩大二者所受三种力的差别,以便

做进一步改进。

本实验所用 GPA 由中科院生化所王克夷同志提供,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Evans, W. H.: *Preparation & Characterisation of Mammalian Plasma membranes*, Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1978.
- [2] Jett, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 2134, 1977.
- [3] Kennel, S. T. et al.: *J. Mol. Biol.*, **76**, 485, 1973.
- [4] Michell, R. H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 333, 1965.
- [5] Wallach, D. J. H.: *Methods in Enzymol.*, Vol. VIII, p. 165.
- [6] Cooperstein, S. J.: *J. Biol. Chem.*, **186**, 129, 1950.
- [7] Korn, E. D.: *Methods in Membrane Biology*, Vol. III, p. 21.
- [8] Albertsson, P-A: *Partition of Cell Particles & Macromolecules*, New York: John Wiley & Sons, 1960.
- [9] Walter, H. et al.: *Biochemistry*, **15**, 2959, 1976.
- [10] Homani, B. T. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **328**, 520, 1973.

[本文于1982年2月6日收到]

溴化法制备 5-溴脱氧尿嘧啶核苷

黄 婴 陆应钰

(科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂)

5-溴脱氧尿嘧啶核苷(简称 5-BrduR)具有抗 DNA 类病毒的功能^[1,2],它被广泛用于 DNA 的遗传突变研究及 DNA 的遗传复制性状的观察,它可取代 TdR 掺入 DNA 中,以便研究 DNA 的复制和观察姐妹染色单体交换数目。也可用于测定环境诱变因子诱变活性和细胞周围动力学的研究等方面。

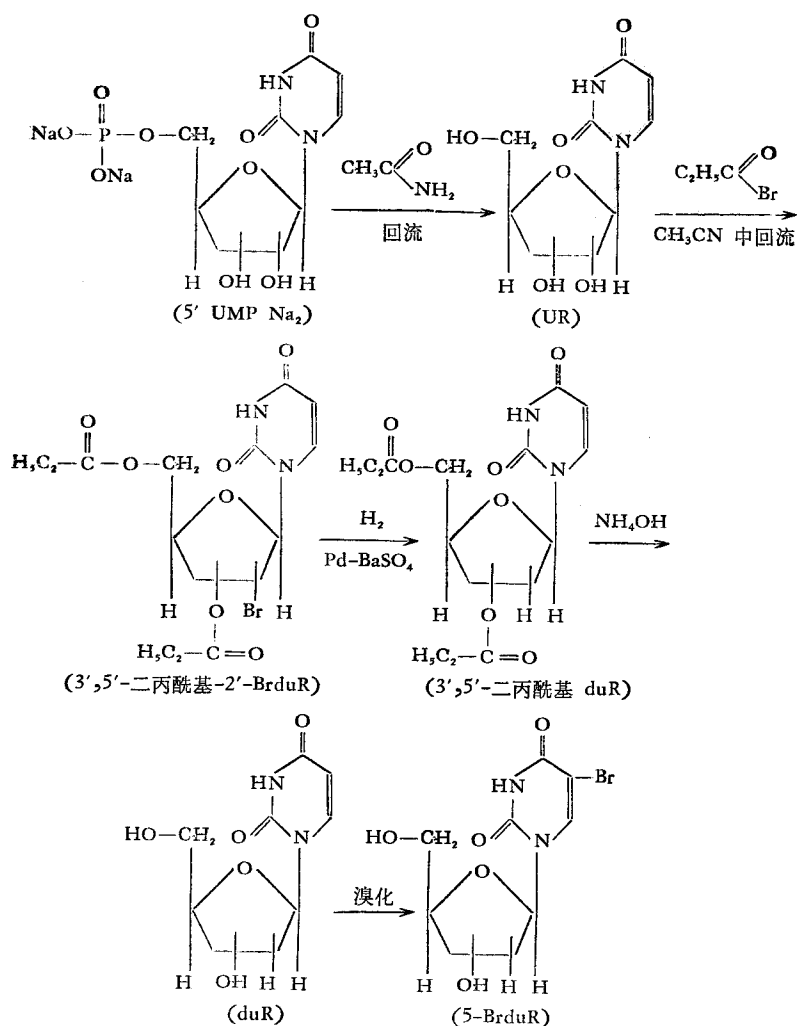
早期生产 5-BrduR 均采用 DNA 为原料,而制取 DNA 的小牛胸腺及鱼精蛋白。取材不易,加之工艺繁琐,周期长,成本高,限制了 5-BrduR 的生产。60 年代由于我国呈味核苷酸

工业的建立^[3], (5'-IMP; 5'-GMP), 为人工半合成 5-BrduR 提供了廉价的原料——尿嘧啶核苷酸(UMP)。

本文采用半合成法,以 UMP 为原料,生产 5-BrduR^[4,5]。我们对 Thomas 的溴化法加以改进^[6],用低温浓缩代替冷冻干燥,工艺简单,产率高(最后一步文献产率为 36%,本法为 66%)。

本文介绍的工艺路线比经典方法简单^[7-9],主要反应步骤从 6 简为 4 步,得率从 1% 提高到 15%,含量 99%,达到国际同类商品水平。

一、工艺流程



二、5-Brdur 的制备

1. 尿嘧啶核苷的制备(UR)

80% 5'UMPNa₂ · 2H₂O 905 克(2.24M) 用 2 立升水溶解后再加 2 立升甲酰胺及少许沸石于 120℃ 油浴回流 13—15 小时,层析检查无核苷酸紫外斑点为准,冷至室温,过滤,所得上清液用蒸馏水稀释 5 倍,用浓盐酸调 pH 为 5.0,通过 769 号活性炭柱(4 公斤活性炭(A.R)装入 φ15cm 的塑料柱)。上柱流速为 40—50 毫升/分,流出液测定 A₂₆₀ 小于 0.5 者弃去,上柱结束后用 200 立升水洗炭柱,最后用乙醇:水:氨水 = 50:50:3 洗脱,流速 80 毫升/分。弃去

最初 13—15 立升,继续收集 24 立升,再在 60℃ 以下减压浓缩至糖浆状,趁热加入少量无水乙醇,放冰箱结晶。次日抽滤结晶,并用冷无水乙醇(C.R),乙醚分别洗涤一次,干燥得白色或淡米黄色结晶 405 克,层析纯,含量 99.2%,收率为 88.5%。见图 1。

2. 3',5'-二乙酰基-2'-溴脱氧尿苷的制备

40 克(0.16 克分子)UR 加 2 立升重蒸乙醇呈悬浮液,120—125℃ 油浴回流至沸腾时开始滴加乙酰溴共 68 毫升(0.76M),1 小时内滴加完,继续回流 2 小时,停止反应,冷至室温,抽滤,滤液于 45℃ 以下减压浓缩,到浆状时加 50—60 毫升甲醇(A.R)摇匀后继续浓缩即有结



图1 5-溴脱氧尿嘧啶核苷制备过程中
各步产物的层析图谱硅胶板 GF₂₅₄

层析系统: 乙酸乙酯: 异丙醇: 水 = 8:1:4

- ① 5' UMP Na₂ ② uR: R_f = 0.16
③ duR: R_f = 0.3 ④ 5' BrduR R_f = 0.66

晶出现, 停止浓缩加 40—50 毫升甲醇摇匀置冰箱。次日过滤得结晶, 干燥得白色或微黄色粉末状物质 39.5 克, 收率 57.5%, 层析纯。

3. 脱氧尿嘧啶核苷的制备(duR)

60 克(0.143M) 3', 5'-二乙酰基-2'-溴脱氧尿苷加 382 毫升甲醇, 85℃ 加热溶解呈微混, 加 144 毫升 25% 醋酸钠, 204 毫升蒸馏水, 最终加入 15 克 Pd-BaSO₄, 约 30℃ 左右通氢气, 通氢量为 3100—3400 毫升。达到平衡时停止通氢(见图 2)。过滤, 取样层析, 滤液置 50℃ 以下减压浓缩至淡乳白色半透明状。加 170 毫升蒸馏水溶解, 有白色沉淀产生, 加 340 毫升氯仿, 沉淀全溶, 用分液漏斗抽提, 取氯仿层。水层用少量氯仿洗 3 次, 合并 4 次氯仿层, 于 40℃ 减压浓缩至淡黄色透明状。

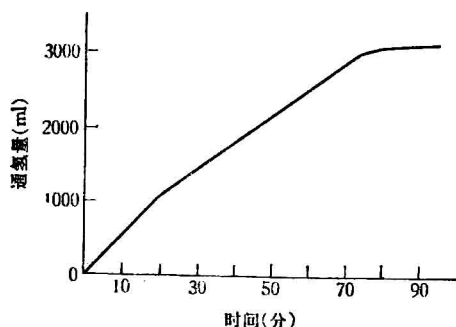


图2 3', 5'-二乙酰基-2'-溴脱氧尿苷催化氢化图

上述物质加 340 毫升甲醇溶解, 再加 340 毫升浓氨水及少许沸石, 回流 1.5 小时后补加 170 毫升氨水, 继续回流 1.5 小时。取样层析,

过滤, 滤液于 50℃ 以下减压浓缩至淡黄色胶状物, 用少量甲醇脱水二次, 再加少量甲醇, 摇匀置冰箱待结晶。次日过滤结晶, 并用冷无水乙醇, 无水乙醚分别洗涤, 干燥得白色粉末状物质 18 克, 收率为 55%, 层析纯, 含量 99%。见图 1。

4. 5-BrduR 的制备

33.5 克 duR(0.16M) 加 816 毫升蒸馏水溶解, 置冰浴中, 待冷至 0℃ 时边搅拌边滴加 958 毫升饱和溴水, 1 小时内滴完, 反应液呈微黄色透明液。真空减压法除去多余的溴, 直至反应液呈无色透明, 30℃ 减压浓缩至淡黄色胶状物, 然后加入 2320 毫升无水乙醇, 回流 15 分钟。倾出反应液, 并于 35℃ 以下减压浓缩至桔黄色胶状物, 加少量无水乙醇脱水二次后再加少量乙醇, 摇匀置冰箱待结晶。次日过滤结晶, 干燥得 25 克白色粉末 (0.0814M) 含量 99%, 按克分子计算产率为 66%, 见图 1。

结果与讨论

本法主要是采用天然核糖核酸, 经化学脱磷制得核糖核苷, 在一定反应条件下专一溴化戊糖上 2 位羟基, 然后通过催化氢化, 用氢原子取代溴原子, 生成脱氧核苷。我们曾采用水解氧氯化磷法^[10], 直接从 uR 制得 3', 5'-二乙酰基-2'-O₂ 氧桥尿苷, 然后再用乙酰溴进行 2' 位溴化的方法^[11], 工艺周期长。生产的 3', 5'-二乙酰基-2'-溴脱氧尿苷无法结晶, 对中间体无法检测, 而且 3', 5'-二乙酰基-2'-O₂ 氧桥尿苷不稳定, 给后面的合成带来困难。一步溴化法, 克服了上述的缺点。

通常用甲酸铵缓冲液水解核苷酸制备核苷, 该法有较强的脱氨作用, 而且脱磷反应达 40 小时。采用甲酰胺水解法^[12]制备 uR, 只需 13 小时, 产品容易结晶, 一般 m.p 在 162℃—163℃, 经无水乙醇重结晶的 uR m.p 可达 164℃—165℃。

3', 5'-二乙酰基-2'-溴脱氧尿苷的催化氢化采用了 Pd-BaSO₄^[13] 作催化剂。在密闭的条件下定量通氢, 以耗氢量控制氢化终点, 并建立

薄板层析(硅胶板),灵敏,快速,能跟踪分析。实践证明催化氢化一步是关键,通氢量不足影响 duR 的得率,通氢过量则嘧啶环上的双键打开^[5],产生多溴嘧啶化合物等副产品,影响产量和质量。比较钨黑和硫酸钨钨二种催化剂,发现钨黑催化活性过高,难以掌握氢化终点,而硫酸钨钨没有这一缺点。文献报道氢化温度为 25℃,本实验提高到 30—40℃,氢化时间只有原来的三分之一。

国外最早采用的尿嘧啶 5 位溴化法,需在大量冰醋酸下进行冷冻干燥,不适用于扩大生产,本文改用低温浓缩及减压除溴,结果较为满意。不但操作方便,质量也稳定。

在染色体 DNA 复制时,将本法生产的 5-ErduR 取代 dTR 掺入到 DNA 中,用荧光显微

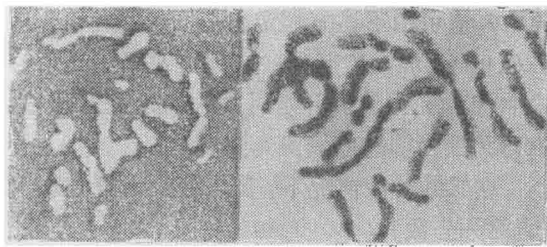


图 3 姐妹染色单体交换数目荧光显示图

科技消息

被生物学界长期忽视的近红外线显微镜可能给研究活体组织和其他有机物带来新的好处。近红外光有两个最重要的特征:一是其光子的能量很低,不会杀死活细胞,也不会使活体样品发生变异。更重要的是,光敏感细胞系统不会被激活。二是从可见光向近红外光移动时,其透射特性发生变化。因此,样品在近红外光显微镜镜检中反差特别大,不需要染色。同时,不透光的样品在红外光下变成透明或半透明,便于观察。

东京大学医学院的 Takashi Hoshino 发现,1.5 厘米厚的骨骼切片,在近红外光下呈透明状。他应用这种技术观察接骨用的金属周围矿物质沉积的情况,研究如何使这些接骨材料更为牢固。甲壳动物、蜗牛等带壳动物,在近红外光照射下也是透明或半透明的,这样就便于观察。

美国的 Richard TonKyn 发现,健康细胞与死亡细胞对近红外光的吸收率不同,因此可据此将它们区

镜或光学显微镜研究 DNA 复制并观察姐妹染色单体交换数目,在相同实验条件下,将本产品与 SERVA、Fluka 等产品比较,实验结果完全一致,见图 3。

参考文献

- [1] Bernt, T. et al.: *J. Biol. Chem.*, 249(6), 1953, 1974.
- [2] Dahlberg, J. E. et al.: *Nature*, 249 5460, 828, 1974.
- [3] 陆应钰等,《上海生化所内部资料》,1968 年。
- [4] U. S. Patent 3539550 (1968).
- [5] Ger offen 1930192 (1970).
- [6] Bardos, T. J. et al.: *J. A. C. S.*, 77, 4279, 1955.
- [7] Codington, J. F. et al.: *J. Org. Chem.*, 29, 558, 1964.
- [8] Levene, P. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 105, 419, 1934.
- [9] 特许公报: 65-12909.
- [10] 特许公报: 昭和 45-5267.
- [11] Marumoto, R. et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 22(1), 128, 1974.
- [12] 高美章等:《药学杂志》,1965 年,第 85 期,658 页。
- [13] Hayes, D. H.: *J. C. S.*, 1184—87, 1960.
- [14] Kuhn, R. et al.: *Angewandte Chemie.*, 67, 785., 1955.
- [15] Pfitzner, K. E. et al.: *J. O. C.*, 29, 1508, 1964.

[本文于 1982 年 3 月 29 日收到]

近红外显微镜

分开来。

这种显微镜的应用最具潜力的是研究光敏感细胞。美国衣阿华大学的 Edward Meck 正在研究视网膜的退变。如果用可见光照射,色素上皮细胞中的色素流动,细胞的活性就会改变。用近红外光显微镜,则无此缺点。

目前用的近红外光显微镜,多与一个影像光电转换器相连接,这种转换器和在夜间触发来复枪所使用的红外线瞄准镜差不多。最近,美国新泽西州 Berkeley 仪器研究公司生产的近红外光显微镜,其分辨率比可见光显微镜高两倍。

这种显微镜还可用于检查证件有无涂改,辨别墨水 and 颜料的性质,辨别金属种类及内部缺陷,还可用来鉴别矿物的结构。

[*Science*, Vol. 206(4421), 918, 1979.

吴奇久摘译]