

经验交流

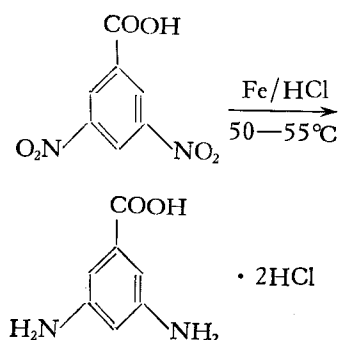
铁还原法制备3,5-二氨基苯甲酸盐及其初步应用

许力伟 姚根富 瞿永华

(上海市肿瘤研究所)

采用荧光试剂——3,5-二氨基苯甲酸盐(简称 DABA)可定量测定 DNA,灵敏度达 10^{-8} 克。在 DNA 结构损伤与修复以及基因工程等研究工作中都需要用它检测 DNA。DA-BA 以 3,5-二硝基苯甲酸为原料,用钼-碳为催化剂,在室温常压下氢化还原后,再在盐酸中制得^[1]。我们设计的是一种简便而又经济的铁粉还原法(制备每克 DABA 的成本比钼-碳法约低三分之二),可合成纯度较高的 DABA。现将合成方法和初步应用报道如下:

一、合成路线



二、制备方法

22 克(0.1 克分子)3,5-二硝基苯甲酸(上海试剂三厂产品,化学纯),100 毫升无水乙醇和 360 毫升 36% 盐酸混合后,搅拌溶解,溶液呈乳白色。然后,徐徐加入 34 克(0.6 克原子)铁粉(天津化学试剂三厂产品,分析纯)。每次加入 1—3 克(控制反应温度在 $50-55^\circ\text{C}$),约 1 小时加完。反应物颜色由乳白至草绿,最后呈棕色。用水浴维持反应温度在 $50-55^\circ\text{C}$,搅拌 2 小时,将乙醇蒸去。加入 360 毫升 6N 盐酸,生成淡黄色针状结晶。静置过夜后,抽滤、干燥,得 DABA 粗制品约 19 克,产率为 80—85%。粗制品在 6N 盐酸中重结晶两次,冰箱内静置过夜,滤出白色针状晶体,用无水乙醚洗涤 2—3 次,干燥,得纯品约 15 克,产率为 65—70%。熔点: 246°C ; 250°C 碳化完全(文献 [2] 熔点: 247°C)。

三、产品质量鉴定

外观 进口 DABA (美国 Aldrich, Chemi-

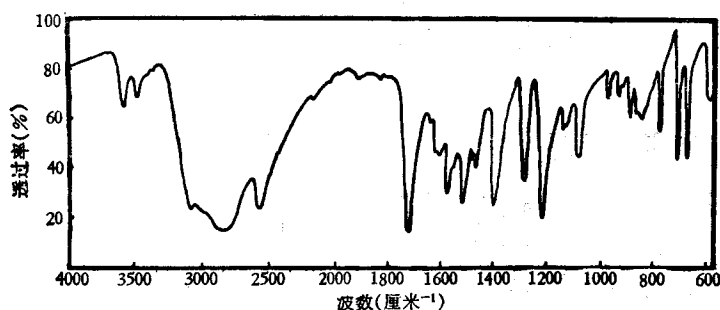


图 1 自制 DABA 红外光谱图

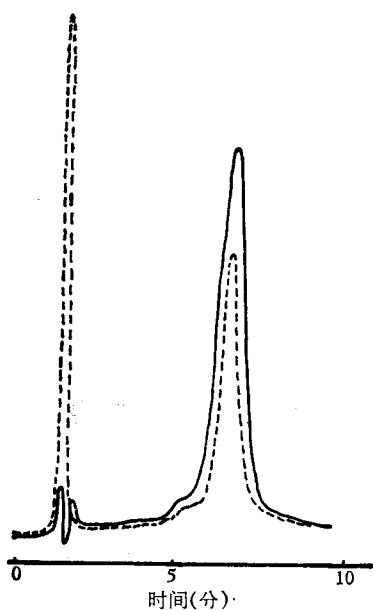


图2 DABA 高压液相色谱图
——自制 DABA进口 DABA

cal. Co. Inc. 纯度 99%) 为白色粉絮状固体, 水溶液呈微黄色; 自制 DABA 为白色针状结晶, 水溶液澄清透明。

薄层层析 进口和自制的 DABA 分别进行硅胶 HF₂₅₄₊₃₆₆ (西德 Merck 产品) 薄板层析。以正丁醇:冰醋酸:水 (4:1:2) 为展开剂。两者 Rf 值均为 0.58。

红外光谱分析 用 Perkin-Elmer 599B 型红外分光光度计, 以溴化钾压片法进行红外光谱扫描。结果在 3300 厘米⁻¹, 1800—2000 厘米⁻¹, 1650 厘米⁻¹ 及 750 厘米⁻¹ 处有特征吸收峰 (图 1), 与文献 [3] 报道一致。

高压液相色谱分析 用中国科学院药物研究所制的高压液相色谱分析仪测试, 从图 2 可见进口 DABA 主峰前的杂质峰较自制 DABA 的杂质峰大。

四、初步应用举例

2 毫克小牛胸腺 DNA (Sigma 产品)/毫升 1N 氨水, 用 1N 氨水稀释至 50—6400 毫微克 DNA/15 微升 1N 氨水。配制成各种不同浓度的 DNA 标准液及 15 微升 1N 氨水空白对照分别盛于试管内, 在 70℃ 烘箱挥干。然后,

各加入 15 微升 1.8M DABA, 振荡片刻, 于 60℃ 水浴中反应 30 分钟后, 加入 1 毫升 0.6N 高氯酸, (pH0.4), 待测。

我们曾请上海市卫生防疫站用 Shimadzu RF-502 型荧光分光光度计, 在 20℃ 下比较了进口与自制 DABA 与 DNA 反应后的荧光激发光谱、荧光光谱。结果表明其荧光激发光谱和荧光光谱的最高峰均在 420 毫微米和 510 毫微米。但限于本室条件, 以 Shimadzu UV-300 型分光光度计代之。选择 500 毫微米为其最佳荧光波长 (因缺 510 毫微米波长的滤光片), 则相应的最佳激发光波长为 395 毫微米。在 pH0.4。温度 20℃ 下, 用 Shimadzu UV-300 型分光光

表 1 两种 DABA 相对荧光空白读数的比较*

	进口 DABA	自制 DABA
空白读数%	6.2±0.54(5)	3.6±0.23(5)
P 值	<0.01	

* 实验均以 6400 毫微克 DNA 与 15 微升 1.8M DABA 反应后产生的荧光强度为 100%, 进行相对测量。括号内为实验批数。

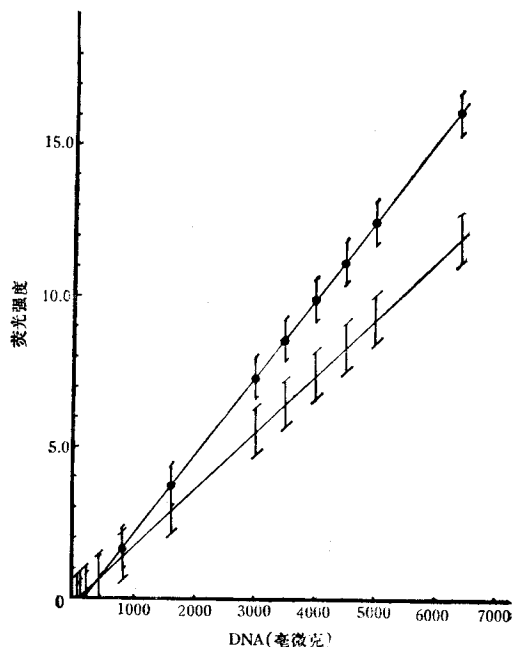


图3 DABA 与 DNA 反应的标准曲线比较*

上——自制 DABA 下——进口 DABA $p < 0.01$

* 四批实验数据的直线回归

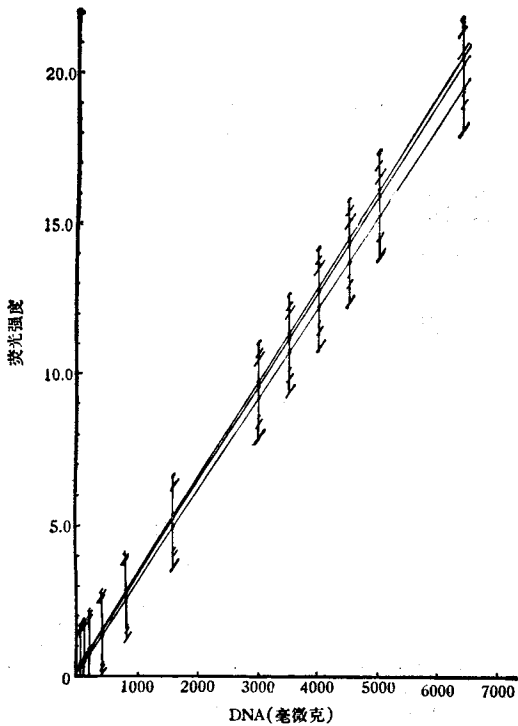


图4 RNA 和蛋白质对 DNA 含量测定的影响*

上——蛋白质 + DNA; 中——DNA;
下——RNA + DNA $p > 0.05$

* 四批实验数据的直线回归; 10 微克 RNA/毫升 DNA 样品, 200 微克蛋白质/毫升 DNA 样品。

度计比较了进口与自制 DABA 与 DNA 反应后的荧光空白读数及回归直线。从表 1 结果可见自制品较进口品荧光空白读数平均低 41.9%。并发现用 1.8M DABA 检测 DNA 含量时, DABA 取 15—20 微升为最佳量(能得到一个理想的空白读数及其与 DNA 反应后的线性关系)。与 Thomas 等报道一致^[4]。

以不同浓度(0—6400 毫微克)的 DNA 与 15 微升 1.8M DABA 作用后,用 Shimadzu UV-

300 型分光光度计, 在激发波长 395 毫微米、荧光波长 500 毫微米条件下, 分别测量其荧光强度。然后用直线回归分析法作图。两种产品均呈线性关系(图 3)。有极显著性差异 ($p < 0.01$)。说明在同样实验条件, 自制 DABA 与 DNA 反应后的荧光强度比进口产品的强, 质量较好。同时, 在每毫升含不同浓度的 DNA 样液中加入 10 微克大鼠 RNA(自制)及 200 微克小牛血清白蛋白(上海长阳制药厂产品), 看其对 DNA 含量测定的影响。RNA 加 DNA 的回归直线及蛋白质加 DNA 的回归直线与 DNA 的回归线相比(图 4), 回归系数差别均无显著意义 ($p > 0.05$), 提示 RNA 和蛋白质在这样的浓度下对 DNA 含量的测定没有明显影响。

最后, 我们还对 DABA 作了稳定性观察, 发现其在干燥、避光及低温 (0°C) 下保存近一年, 未见其荧光空白读数增高。

致谢 中国科学院药物研究所植化室周倩如同志为本文作 DABA 的高压液相色谱分析。在分离提纯大鼠 RNA 过程中, 得到本所生化室主任顾建人的指导。

参 考 文 献

- [1] Kissane, J. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 233, 184, 1958.
- [2] Heilbron, I. et al.: *Dictionary of Organic Compounds*, (Ed. by London: Eyre & Spottiswoode) Vol. 2, 854, 1953.
- [3] Sadtler Research Laboratories Inc. et al.: *The Sadtler Standard Spectra IR Prism* (Ed. by U. S. A) Vol. 46, 46034, 1974.
- [4] Thomas P. S. et al.: *Analytical Biochemistry*, 89, 35, 1978.

【本文于 1982 年 12 月 22 日收到】

科技消息

哺乳动物遗传工程的重大突破

——超级小鼠问世

1982 年底美国四家实验室的研究工作者共同报道了将大白鼠生长激素的结构基因 GH 与小白鼠金属硫蛋白基因 MT-1 的启动区融合在一起, 组装成杂交基因 MGH, 然后, 把克隆所得的 MGH 基因用显微注

射法注射到小白鼠受精卵的原核内, 重新置入养母小白鼠体内, 令其发育成幼鼠, 获得了 7 只携带着 MGH 基因的小白鼠——超级小鼠, 其中 6 只显著大于同窝正 (下转第 51 页)