

O⁶-甲基鸟嘌呤的制备

王 菊 君

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

提 要

O⁶-甲基鸟嘌呤广泛应用于 DNA 损伤修复和肿瘤研究中。本文以巯基鸟嘌呤为原料经二步反应而制备。并对其进行了元素分析、紫外吸收光谱、高压液相色谱测定和同位素鉴定。

O⁶-甲基鸟嘌呤 (O⁶mG) 是 DNA 与烷化剂(如 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍)反应生成的碱基加成物之一,一些实验表明,在 DNA 分子中鸟嘌呤第六位氧原子甲基化 (O⁶mG) 能引起 DNA 分子中碱基错误地配对,将诱导细胞变异,目前认为,它是一种潜在致癌损伤产物^[1]。用 O⁶mG 处理的细胞,引起 DNA 甲基

转移酶活性下降。因此近年来 O⁶-甲基鸟嘌呤是在化学致癌、DNA 损伤修复以及肿瘤研究中一种重要试剂^[2,3]。目前国内外尚无商品出售,作者以 Balsiger 等人的方法为基础,建立 O⁶-甲基鸟嘌呤的合成及鉴定方法。现介绍如下:

一、合成原理

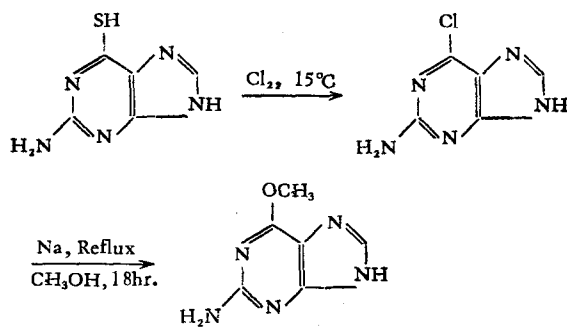


图 1 O⁶-甲基鸟嘌呤的制备原理

二、实验操作

1. 2-氨基-6-氯嘌呤盐酸盐的制备

将 500 毫克巯基鸟嘌呤悬浮于 25 毫升甲醇中,冰浴冷却到 2℃,通入干燥的氯气,维持反应温度不超过 15℃。当温度一旦开始下降,立即通入氮气以代替氯气,直至溶液基本上无色。然后过滤、浓缩、析出结晶。收集结晶,并用乙醚洗涤,五氧化二磷真空干燥。收率

65%。

2. O⁶-甲基鸟嘌呤的制备

取 550 毫克金属钠置于 20 毫升甲醇溶液中,然后向此溶液中加入 500 毫克 2-氨基-6-氯嘌呤盐酸盐,回流反应 18 小时。结束后,将反应液冷却到室温,加 1.2 毫升冰醋酸,旋转蒸发器浓缩,残存物用水重结晶,干燥器中干燥,收率 80%。

三、质量鉴定:

O⁶-甲基鸟嘌呤为白色结晶,熔点大于260℃。

1. 产品元素分析

分析结果表明与理论值基本一致。

分子式 C₆H₇N₅O C% H% N%

理论值: 43.63 4.27 42.41

实验值: 44.00 4.22 42.34

2. 紫外吸收光谱

将 O⁶-甲基鸟嘌呤配成 10 微克/毫升的水溶液,测其紫外吸收光谱如下:

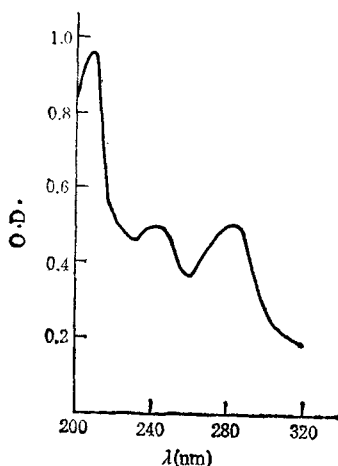


图 2 O⁶-甲基鸟嘌呤的紫外吸收光谱

$\lambda_{\max}$	210nm	240nm	280nm
log ϵ	4.07	3.89	3.90

与文献值基本一致。

3. 高压液相色谱 (HPLC)

图 3 显示了 O⁶-甲基鸟嘌呤的高压液相色谱,并将它与标准品(从其他实验室所得)作对照。从图中可见,它比标准品的纯度高。

柱: Hpcrsil ODS 3 μ m, 0.4 × 5cm

洗脱液: 20mM NH₄H₂PO₄, pH4

流速: 1ml/分 λ 254nm FS 0.16

4. 同位素鉴定

将 [³H]O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA ([³H]O⁶mG DNA) 经盐酸水解,然后用高压液相色谱分离,得到的放射性峰和高压液相色谱紫外吸收峰完

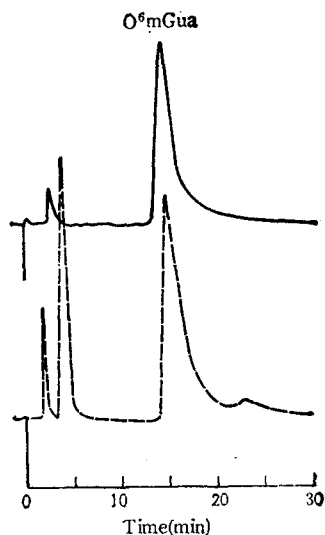


图 3 O⁶-甲基鸟嘌呤的 HPLC

— 合成样品 --- 标准样品

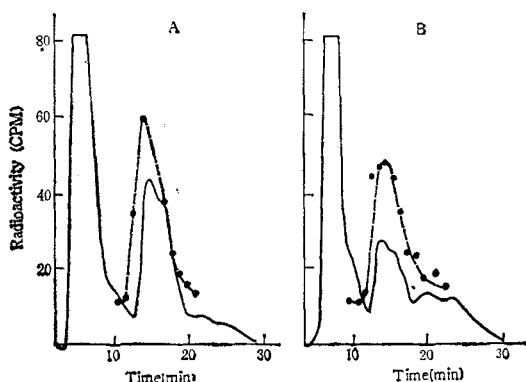


图 4 O⁶-甲基鸟嘌呤的 HPLC 鉴定

—— O⁶ mGua 吸收值 --- [³H]O⁶mGua-DNA 水解产物的放射性

A. 合成样品 B. 标准样品

第 5 分钟处吸收峰来源于水解后其它碱基

全一致。如图 4 所示。

[³H] O⁶mG DNA 50 μ l (900cpm/50 μ l)

+ 50% TCA 30 μ l

(三氯醋酸)在冰中冷却 30 分钟,离心 6 分钟,弃去上清液,于沉淀中加入 10 微升 O⁶-甲基鸟嘌呤 (1mg/ml, 分别用标准品和自制品作对照), 0.1N 盐酸水解 1 小时,维持温度 75—80℃。水解结束后,冷却,离心 6 分钟,上清液用高压液相色谱柱分离(条件同上),收集 15 管,每管 2ml,放射性计数。结果见图 4。

用上述方法合成的 O⁶-甲基鸟嘌呤,产品纯

不饱和硫酸二糖的纤维素薄板层析

张春玲 张英珊

(中国医学科学院心血管病研究所生化研究室, 北京)

提 要

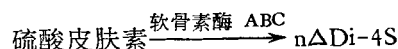
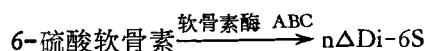
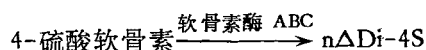
提纯的人主动脉蛋白聚糖 (PG) 经碱性氢硼化钠处理生成氨基葡聚糖 (GAG)。GAG 经软骨素酶 ABC 消化生成 Δ -4, 5 不饱和硫酸二糖, 后者以纤维素薄板层析[标准二糖为 Δ di-0S, Δ di-4S, 及 Δ di-6S; 展开剂为: 正丁醇:冰乙酸: 2M 氨水 = 2:3:1(V/V)] 可得到满意的层析谱。本法可用以鉴定 PG (或 GAG) 中硫酸基位置及有关二糖的相对含量。

蛋白聚糖(PG)是一个或多个氨基葡聚糖 (GAG) 键以共价键连接在核心蛋白上的复杂大分子。GAG 链上有带负电的硫酸根及(或)羧基, 对其中是否有硫酸根或硫酸根的位置(在 4-位或 6-位)是对 GAG 分析的重要内容之一。本室为探讨蛋白聚糖与动脉粥样硬化的发病关系, 建立了可分离不同的不饱和硫酸二糖的纤维素薄板层析法, 现简述如下。

一 原 理

提纯的 PG 样品先经碱性氢硼化钠降解为 GAG 和核心蛋白碎片后, 由重复二糖单位 [β -D-葡萄糖醛酸和 β -D-N-乙酰氨基半乳糖-4-(或-6-)硫酸酯]_n 构成的硫酸软骨素 (CS) 及 [α -L-艾杜糖醛酸和 β -D-N-乙酰氨基半乳糖-4-硫酸酯]_n 构成的硫酸皮肤素 (DS), 再经软骨素酶 ABC (Chondroitinase ABC) 消化

产生 4,5 不饱和硫酸二糖即:



由于上述 Δ Di-4S、 Δ Di-6S 在紫外光下有吸收峰(最大在 232nm), 故经层析分离后各个不饱和二糖的位置可根据紫外光(260nm)下所见层析点而检出^[1-3], 又根据不饱和硫酸二糖混合标准的层析点可确定样品中各点的种类, 另外从层析点的强弱可估计样品中不饱和硫酸二糖的相对含量。

二 试剂及材料

(1) 纤维素 (MN300, Macherey Nagel, Germany);

(2) 硅酸锌锰 K-35 (北京化工厂);

度高, 经几年来实际应用, 效果良好。

参 考 文 献

- [1] Pegg, A. E.: *Cancer Investigation*, 2(3), 223—231, 1984.
- [2] Dolan, M. E., et al.: *Cancer Research*, 45, 6413—

6417, 1985.

- [3] Karran, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 5285—5289, 1985.

- [4] Balsiger, R. W., et al.: *J. Org. Chem.*, 25, 1573—1575, 1960.

[本文于 1986 年 6 月 29 日收到]