

抗人甲胎蛋白抗体及抗人白蛋白抗体进行特异性的免疫反应,用羊抗兔 IgG 第二抗体将免疫复合物沉淀,分别测定其中放射性,在此同时再用正常兔 IgG 与第二抗体反应作为对照,减去对照后甲胎蛋白占总蛋白中掺入量的 1%,白蛋白占 6.1% (表 4)。

免疫沉淀复合物再经过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,并将凝胶切成厚度同为 2 毫米的小片,分别经 H_2O_2 消化后测定其放射性,结果表明多聚核糖核蛋白体合成的蛋白中大部分为分子量较小的产物,虽经特异性的免疫沉淀,但与标准的甲胎蛋白及白蛋白所泳动的位置不一致,测得其分子量为 40,000,均小于标准样品。这提示多聚核糖核蛋白体合成的蛋白很多都不是从头开始,而是在已有基础上延伸的结果,虽可能是不完整的分子,但已具有甲胎蛋白和白蛋白相同的抗原决定簇, Tse 等^[18] 也曾观察到在麦胚无细胞系统中,当盐浓度适合最大掺入活性时,所合成的蛋白质分子量小的现象,使多聚核糖核蛋白体在麦胚无细胞系统中新合成的蛋白质分子不完整的原因,还有待进一步实验加以说明。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组:《生物化学与生物物理学报》,1977年,第9卷,第4期,第321页。
- [2] Ruoslahti, E. et al.: *Nature*, **235**, 161, 1972.
- [3] 中国肝癌研究协作组:《肿瘤防治研究》,1974年,第4期,第12页。
- [4] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组:《生物化学与生物物理学报》,1975年,第7卷,第41页。
- [5] Ruoslahti, E. et al.: *Int. J. Cancer.*, **8**, 283, 1971.
- [6] Gitlin, D. et al.: *Nature*, **228**, 995, 1970.
- [7] Koga, K. et al.: *Biochemistry*, **13**, 3024, 1974.
- [8] Kanai, K. et al.: *Cancer Res.*, **34**, 1813, 1974.
- [9] Tamaoki, T. et al.: *Nature*, **249**, 269, 1974.
- [10] Innis, H. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 8469, 1977.
- [11] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组: (待发表)。
- [12] 中国科学院微生物研究所病毒复制组:《生物化学与生物物理学报》,1976年,第8卷,第179页。
- [13] 张光扬等:《生物化学与生物物理进展》,1974年,第2期,第36页。
- [14] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组等:《上海科研单位成果展览会技术资料》,1974年。
- [15] Weber, R. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406, 1969.
- [16] Igarashi, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 163, 1977.
- [17] Hunter, A. R. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **75**, 149, 1977.
- [18] Tse, T. P. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 1272, 1977.

[本文于 1978 年 10 月 16 日收到]

[8-³H]-鸟苷 3',5'-环磷酸钠盐的制备及鉴定

姜延林 续双城 廖家儒 顾振芳 曹德声

高月英 孙家秀 孙志伟 金德耀

(中国科学院原子能研究所)

一、引 言

自从 3',5'-环磷腺苷(cAMP)作为“第二信使”学说提出以来,通过实验不仅证实了它与某些病理过程密切相关,而且还注意到 cAMP 对肿瘤细胞也有某些影响。这是最近几年受人注意的一个研究课题^[1,2]。它不仅涉及到肿瘤发

生,发展的理论,也涉及到肿瘤治疗的一个新的研究方向。

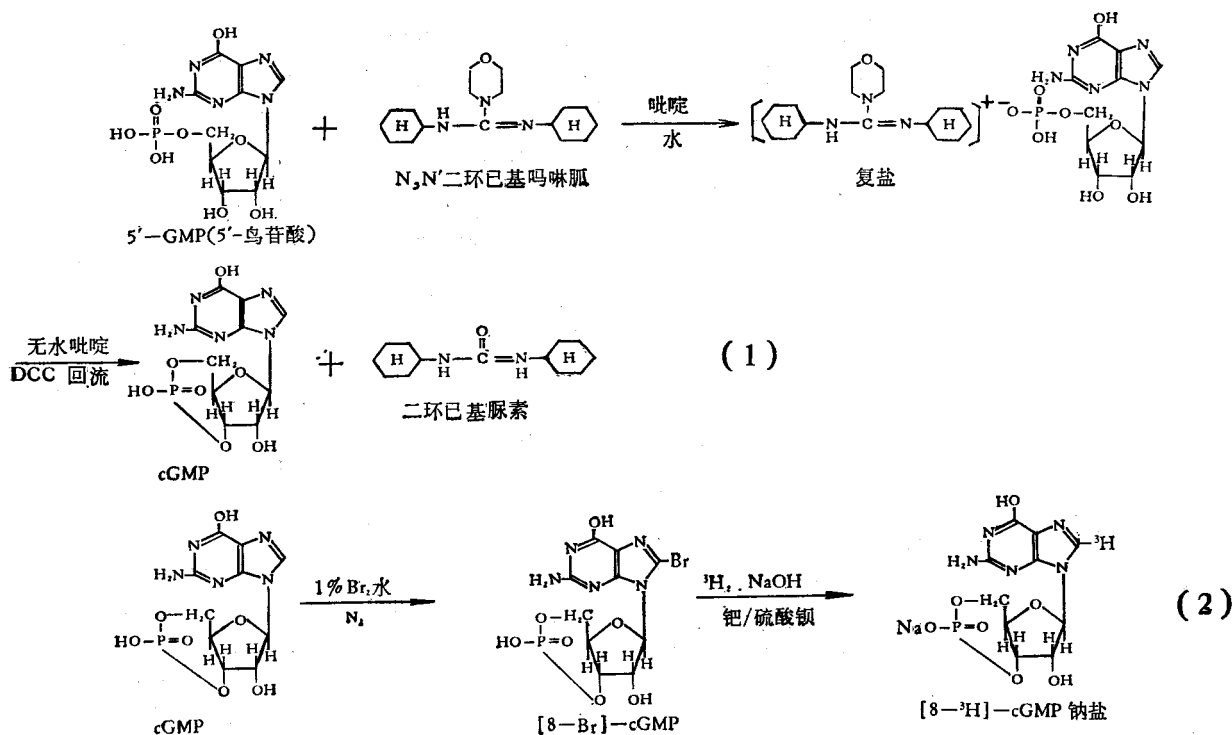
近几年来,人们在研究 cAMP 作用的同时,又对另一种核酸——鸟苷 3',5'-环磷酸(cGMP)的作用发生了浓厚兴趣。有人推测^[3],生物的细胞调节作用是受 cAMP 和 cGMP 相互影响的。这一理论有可能用实验方法加以证实,

并能解释许多生理调节现象。有人说 cAMP 属阴, cGMP 属阳^[4], 这与祖国医学中“阴阳学说”相符, 已在生物科学研究中引起了注意。

随着 cGMP 的研究工作日渐活跃, 有必要研究 cGMP^[5] 的合成方法, 并由此研制高比度氚标记的 cGMP, 以满足理论研究及临床试验的日益增长的需要。

本工作分两部分进行, 第一步是合成纯度较高的 cGMP, 在此基础上进一步合成 [8-Br]-cGMP, 第二步通过氚卤置换反应制备氚标记化合物。

二、反应式



三、合成步骤

1. 5'-GMP 复盐的制备

(1) 5'-GMP 的纯化

称取 50 克 5'-GMP (北京首都啤酒厂出品) 溶于 300 毫升去离子水中, 加入约 10 毫升 2N NaOH 溶液, 调节 pH 至 8—9, 待全溶后加入 20 毫升乙醇, 随即析出白色沉淀, 在冰箱中放置过夜, 过滤置真空干燥箱中 (低于 40℃) 烘干得 37.4 克 5'-GMP 钠盐。

(2) 5'-GMP 吡啶盐的制备

称取 48 克 Dowex 50×8 阳离子交换树脂, 用去离子水浸泡半日, 得 90 毫升湿树脂, 用 50 毫升 2N HCl 溶液处理三次, 使其转成 H⁺ 型,

用水洗至中性。

取 40 毫升经上述方式处理的树脂加入吡啶使其转成吡啶型, 然后放入 φ20 毫米柱内, 使树脂床高 15 厘米, 先用 60℃ 热水通过柱子, 流速调至 4 毫升/分。将 10 克 5'-GMP 钠盐溶于 300 毫升 60℃ 热水中, 再加入 3 毫升吡啶使 pH 至 7—8。搅拌均匀后上柱, 收集淋出液 (呈酸性) 在 60℃ 下加热浓缩至 10 毫升, 加入 20 毫升无水乙醇, 即有大量 5'-GMP 吡啶盐沉淀析出, 过滤, 置真空干燥器 50℃ 下干燥, 得 7.6 克。

(3) N, N'-二环己基吗啉胍的制备

称取 N, N'-二环己基脲二亚胺 20.5 克, 吗啡啉 (重蒸) 20 毫升, 异丁醇 (重蒸) 50 毫升,

于 150 毫升圆底烧瓶中在 140℃ 下回流 5 小时,置于冰箱中冷冻过夜,有白色结晶析出,过滤,用异丁醇、乙醚各洗三次。于真空干燥器中干燥,得 16.8 克,熔点 104—105℃。

(4) 复盐的合成

称取 1.5 克 5'-GMP 吡啶盐及 N, N'-二环己基吗啉胍 1.08 克,加入 33 毫升水及 135 毫升吡啶,过滤去掉少许不溶物,置于 250 毫升圆底烧瓶中,再于 40℃ 下真空浓缩至干,然后用无水吡啶洗四次(每次 30 毫升)脱水。于玛瑙研钵中研细得 2.3 克白色结晶,收率 90%。

2. cGMP 的合成

在装有液封搅拌器、回流冷凝器和无水氯化钙干燥管装置的 500 毫升三颈瓶内,搅拌下加入 3.36 克 N, N'-二环己基羰二亚胺(DCC)到 250 毫升无水吡啶中,并于 4 小时内逐次加完 2.3 克复盐粉末,在 130℃ 油浴温度下回流 12 小时,取样进行纸层析、电泳鉴定。反应完成后于 40℃ 以下减压蒸馏除吡啶,得淡黄色固体,加 220 毫升水溶解,过滤除去不溶物,每次用 20 毫升乙醚洗涤三次。于 40℃ 下减压浓缩至小体积,用 2N HCl 调 pH 至 2 以下,溶液变混,冰箱中放置过夜,过滤收集白色结晶,用乙醇、乙醚依次洗三次,最后得到产品 85 毫克,滤液中加入乙醇尚可得到 20—30 毫克。产率约 10% 左右。

3. [8-Br]-鸟苷 3', 5' 环磷酸^[6-8]的制备

称取 84 毫克 cGMP (H⁺型),加入 0.5 毫升 0.5 N NaOH,再逐次加入 1.5 毫升 1% 溴水。搅拌 20 分钟,通入氮气,鼓泡反应 2 小时,依次通过 Dowex 50 × 8 吡啶型及 H⁺ 型树脂柱,收集淋出液(pH 为 3—4)。用少量水洗柱子,将收集液浓缩至小体积,加入乙醇,有淡黄色结晶析出,过滤置于 P₂O₅ 干燥器中,得 60 毫克产品。

4. 合成产物的分析鉴定

对上述产物进行紫外光谱鉴定,各产物的紫外光谱示于表 1 中。此外对 cGMP 还做了红外光谱、纸层析、电泳鉴定、纯度均符合要求。

绘制的 cGMP 红外吸收光谱,其主要吸收峰如下: 3330 厘米⁻¹ 为 —OH 的伸缩振动, 1700—1600 厘米⁻¹ 为 —C=C 和 —C=N 的伸缩振动。由于分子内酯化而成环, cGMP 分子中既含有 1168 厘米⁻¹ 的 P—O—CH₂ 键的振动(较弱), 又含有一 P—O—C (芳香族) 的 1232 厘米⁻¹ (较弱) 吸收峰, 在 5'-GMP 分子中只有一 P—O—CH₂ 的振动, 显而易见, —P—O—C 键的存在是环构化成为 cGMP 的明显佐证^[9]。此外, 在 cGMP 的红外光谱图(图 1) 中, 未曾发现作为主要杂质成份的焦磷酸酯的 —P—O—P— 键的存在(970—930 厘米⁻¹)。

表 1 各产物的紫外吸收光谱

样 品	最大吸收峰毫微米	E250/ E260	E270/ E260	E280/ E260	E290/ E260
5'-GMP 标准品	254	1.13	0.81	0.67	0.26
自行纯化	254	1.13	0.81	0.66	0.26
cGMP 标准品	254	1.10	0.78	0.67	0.35
自行合成	254	1.11	0.79	0.69	0.35
[8-Br]cGMP 文献值	262	0.79	—	0.73	0.40
自行合成	262	0.78	0.89	0.73	0.44

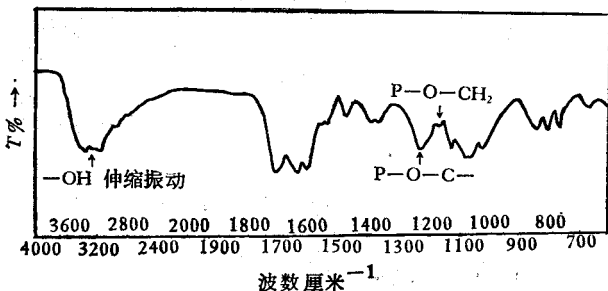


图 1 cGMP (自行合成) 的红外吸收光谱

纸层析用 Whatman 1 号滤纸, 展开后在紫外荧光灯下观察得单一点, 斑点明晰。展开剂为: 正丁醇: 冰醋酸: H₂O 为 5:2:3, 测得 cGMP 的 R_f 值为 0.37; 测得 [8-Br]-cGMP 的 R_f 值为 0.45。

在直流电压为 380 伏, 电流为 5 毫米的条件下, 以 0.1 M 碳酸氢三乙铵盐溶液为展开剂, 合成的 cGMP 的泳动距离与标准品一致。

此外尚对 [8-Br]-cGMP 产品中的溴含量进行了定量分析, 测得结合溴为 17.3%, 游离溴为

4.1%，溴含量与理论计算值 17.7% 相近。

根据上述分析，制得的 [8-Br]-cGMP 可用于制备氚标记化合物。

四、[8-³H]-鸟苷 3', 5'

环磷酸钠盐的制备

在碱性介质中以钨钼为催化剂^[10]先做氢溴取代冷试验，然后在此基础上进行了脱卤氚化。

1. [8-Br]-cGMP 的氚化

在 1.5 毫升反应瓶中，加入 0.4 毫升 0.05 N NaOH 及钨/硫酸钨 7.45 毫克，预先将催化剂通氚饱和 2 小时后，加入 3.00 毫克 [8-Br]-cGMP。反应装置参照文献^[11, 12]，反应瓶接真空系统，并用液氮冷冻，抽真空除氦，直至 6×10^{-3} 毫米 Hg 柱，将铀粉瓶加热至 400℃ (300℃ 时开始有氚释出)，放氚气到一定体积后，关闭活塞并移去液氮，解冻后在氚压为 637 毫米 Hg 负压下，于室温下搅拌反应 75 分钟。终止反应，再冰冻反应物，用铀粉瓶回收多余的氚气。

2. 去除不稳定氚及纯化产品

由真空系统取下反应瓶，待反应液在室温下溶解后，转至 G₁ 玻璃砂漏斗，过滤除去催化剂残渣，滤液收集在一桃形瓶内，反复用 50% 乙醇洗残渣(每次洗 5 毫升)，转入真空系统，冷冻干燥以除去不稳定氚，直至放射性强度稳定为止。

以正丁醇:冰醋酸:水 = 5:2:3 做为展开剂(配制成 200 毫升)。预先用展开剂将 Whatman 3 号滤纸展开一次。采用 30×25 厘米的层析纸，将样品用 50% 乙醇-H₂O 溶解成小体积，滴于层析纸带上，带长 12 厘米，带宽不超过 0.5 厘米，展开时间为 11 小时，在紫外荧光灯下 [8-³H]-cGMP 呈蓝紫色荧光 (R_f 值为 0.37) 与标准品 cGMP 的 R_f 值吻合。另有一窄带为未反应的 [8-Br]-cGMP (R_f 值为 0.44)。

将 [8-³H]-cGMP 纸带剪成小块，溶于 50% -乙醇-H₂O 中，过滤，反复洗涤，将全部溶液转至 25 毫升容量瓶中，并用 50% 乙醇-H₂O 稀释

至刻度。即为纯化的 [8-³H]-cGMP。

五、[8-³H]-cGMP 的分析鉴定

1. 紫外吸收光谱的测定

取 0.5 毫升氚化产品溶液，稀释至 4.0 毫升。在 pH7 条件下进行紫外分光测定。最大吸收峰在 254 毫微米。与标准的 cGMP 对照，结果列于表 2 中。

表 2 [8-³H]-cGMP 及有关样品的紫外吸收光谱

样 品	最大吸收峰 毫微米	两种不同波长消光值之比				
		E240/ E260	E250/ E260	E270/ E260	E280/ E260	E290/ E260
[8-H]-cGMP	254	0.71	1.03	0.83	0.71	0.36
[8- ³ H]-cGMP	254	—	1.12	0.79	0.70	0.35
cGMP 标准品	254	—	1.10	0.78	0.67	0.35
[8-Br]-cGMP 文献值	262	—	0.79	—	0.73	0.40

表 2 数据说明氢化和氚化产物的最大吸收峰及光谱性质与标准 cGMP 一致而与 [8-Br]-cGMP 不同。

2. 放射性强度的测定

用 FJ353G 1 双道液体闪烁计数器，高压 1400 伏，测量时间 60 秒。

闪烁液配制：称取 PPO 5 克；POPOP 0.5 克；萘 100 克；溶于 1,000 毫升二氧六环中作为液体闪烁剂，每次测定时取 5 毫升闪烁液。

用氚-正十六烷作内标准源对仪器效率进行了校正。

分别取 10—20 微升产品溶液，放入 5 毫升容量瓶中，稀释后再从中取 10—20 微升溶液进行测量。于不同时间在三台仪器上经 24 次取样测定，产品的比放射性为 15.9 居里/毫克分子。测量的精密度在 ±8% 以下，经数月后重新测定，结果一致。

3. 化学产率

由上述紫外光谱测定 254 毫微米处的消光值，查标准曲线或经计算得到：化学总量为 0.77 毫克，化学产率为 30%。

4. 放化纯度

用纸层析法鉴定，预先用 cGMP 载体溶液，

约 50 微升 (500 微克/毫升) 点于纸上 (新华 1 号滤纸), 再取约 4 微升的 $[8-^3\text{H}]\text{-cGMP}$ 点于同一位置上, 另在边侧点上标准的 cGMP 及 $[8\text{-Br}]\text{-cGMP}$ 做对照。上行展开。温度 20°C , 层析六小时。

结果: 产品有单一的放射峰与标准品所在的位置一致, 其放射性层析谱示于图 2 中, 经计算放化纯度为 99%。

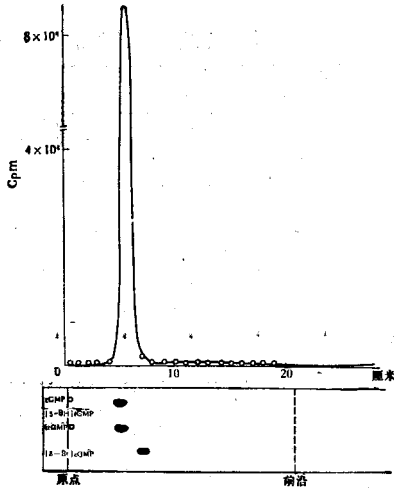


图 2 $[8-^3\text{H}]\text{-cGMP}$ 的放射层析图谱

5. 贮存条件

将 $[8-^3\text{H}]\text{-cGMP}$ 用 50% 乙醇-蒸馏水稀释到 1 毫居里/毫升, 在 $1-2^\circ\text{C}$ 冰箱中贮存, 以防止细菌的污染。

六、小 结

$[8\text{-Br}]\text{-cGMP}$ 的纯度是提高氟化产物比度

的先决条件, 经过几种溴化方法的比较, 我们选用 J. P. Müller 法^[6]。制得的溴化物的克分子消光系数较高 (16,000), 且游离溴含量较低, 有利于催化氟化反应, 并防止卤素对催化剂的毒化。

氟化过程, 预先将催化剂用氟饱和, 借以增加氟与样品的接触机会。维持样品量与催化剂的比例为 1:2, 以保证催化剂有足够高的浓度, 同时采取减少溶剂体积, 降低反应瓶液面的办法来扩大氟气与反应液的接触机会, 使氟卤置换完全。

制得的氟标记化合物的生化性能已取得初步满意的实验结果, 本工作曾得到 307 医院蒋滋慧、原子能研究所夏祖平及北京医学院张礼和同志的热心帮助, 在此深表致谢。

参 考 文 献

- [1] Ryan, W. L. et al.: *Science*, **162**, 1484, 1968.
- [2] Sheppard, J. R.: *Nature New Biology*, **336**, 1972.
- [3] Kolata, G. B.: *Science*, **182**, 149, 1973.
- [4] 张礼和: 《北医学报》, **3**, 191, 1975.
- [5] Elliott, M.: *The Pediatric clinics of North America* **22**(1), 111, 1975.
- [6] Müller, J. P.: *Biochem.*, **12**, 26, 5310, 1973.
- [7] Mian, A. M.: *J. Medichem.*, **173**, 259, 1973.
- [8] Chin Hsi Chu: *J. Medichem.*, **18**, 6, 559, 1975.
- [9] Bellamy, L. J.: *The Infrared Spectra of Complex molecules*, 257, 1958.
- [10] Filip, J.: *Czech.*, **137984**, 15 Aug. 1970.
- [11] 中国科学院上海生物化学研究所等: 《生物化学与生物物理进展》, 1975 年, 第 4 期, 第 22 页。
- [12] 朱青: 《原子能科学技术》, 1978 年, 第 1 期, 第 84 页。

【本文于 1978 年 9 月 28 日收到】

金硫代葡萄糖的合成

张友尚 崔大敷

(中国科学院上海生物化学研究所胰岛素组)

一、引 言

近年来关于糖尿病病因的研究已深入到胰岛素与其受体相互作用的分子水平。对胰岛素

具有抗性的成年型糖尿病可能是由于胰岛素的受体减少而产生。肥胖的小白鼠糖耐量不正常, 血液中的胰岛素增加, 对胰岛素的敏感性下降, 这些都和上述类型的糖尿病人很相似。因此肥