

maceutical Biotechnology, Nanjing 210093, China); Feng Ruo, Zhu Changping, Huang Jinlan, Chen Zhaohua (*Modern Acoustics Open Laboratory, Nanjing University, Nanjing 210093, China*).

Abstract Human macrophage colony stimulating factor (hM-CSF) inclusion bodies expressed in *E. coli* were dissociated successfully by high intensity ultrasound in a suspension of

4 mol/L urea instead of using 8 mol/L urea as solvent. The SDS-PAGE of suspension samples processed by ultrasound shows the same band at 17 000 as that solubilized by 8 mol/L urea. The results show the possibility of developing a new ultrasonic technique for the dissociation of inclusion bodies.

Key words inclusion bodies, high intensity ultrasound, dissociation

长臂生物素对硝基苯酯的合成

王升启 朱宝珍

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 以羰基二咪唑为催化剂, 生物素与 6-氨基己酸甲酯反应生成生物素-6-氨基己酸甲酯, 该化合物通过酸碱萃取与原料分离, 皂化后生成生物素氨基己酸. 生物素氨基己酸在吡啶存在下与三氟乙酸对硝基苯酯进行转酯反应即得生物素对硝基苯酯. 最后经光谱、色谱及核酸杂交证实了长臂生物素对硝基苯酯的化学结构和生物学活性.

关键词 生物素对硝基苯酯, 核酸杂交, 羰基二咪唑

生物素活泼酯类化合物广泛用于核酸、蛋白质等生物分子的非放射性标记. 其标记物不仅可用作各种正常、异常基因和蛋白质检测的探针或信号分子, 而且近年来还被用于特定核酸和蛋白质的亲和色谱分离或分析^[1~5]. 目前普遍采用的生物素活泼酯是长臂和短臂琥珀酰亚胺酯. 由于合成路线的限制, 这两种化合物不仅合成及纯化困难, 而且产率和反应活性也较低. 短臂生物素对硝基苯酯的合成虽然在一定程度上解决了反应活性和纯化等问题, 但由于立体位阻的原因, 其标记物检测的灵敏度不如长臂活泼酯高. 为解决上述问题, 我们合成了长臂生物素对硝基苯酯.

1 材料和方法

1.1 材料

生物素为 Fluka 公司产品; 三氟醋酐为

Aldrich 公司产品; 对硝基苯酚为北京星光化工厂产品; 6-氨基己酸为北京化工厂产品; 羰基二咪唑为 Sigma 公司产品. 除特殊说明外所用试剂均为分析纯.

元素分析仪为 CARLO ERBA 1106 型, 质谱仪为 MAT711 型, 核磁共振仪为 JNM GX-400 型. 熔点用毛细管法测定 (温度计未校).

1.2 方法

1.2.1 氨基己酸甲酯 (I) 的合成^[6]: 于 -5°C 将 8 ml SOCl_2 搅拌下滴入 60 ml 无水甲醇中, 5 min 后, 加入 13 g 6-氨基己酸, 加完后逐渐升温至 40°C , 继续反应 4 h. 反应完毕, 减压蒸去甲醇. 残留物用甲醇-乙醚重结晶得化合物 (I) 16.4 g (90.1%).

熔点 (m. p.): $124\sim 125^{\circ}\text{C}$

质荷比 (m/e): 181.5 (基峰)

元素分析 ($C_7H_{16}O_2NCl$):

理论值: C% 46.28, H% 8.82, N% 7.71

实测值: C% 45.77, H% 8.78, N% 7.31

场解吸质谱 (FD-MS): 146 ($M-HCl$)

1.2.2 三氟乙酸对硝基苯酯 (II) 的合成^[7]: 加热回流三氟醋酐 (62 g, 0.3 mol) 和对硝基苯酚 (28 g, 0.2 mol) 的无水苯 (60 ml) 溶液 6 h. 反应完毕, 减压蒸干反应液, 得化合物 (II) (定量反应).

1.2.3 生物素氨基己酸甲酯 (III) 的合成: 化合物 I (2.73 g, 15 mmol) 溶于二甲基甲酰胺 (DMF) 15 ml (含 N-甲基吗啡啉 1.67 ml, 15 mmol) 得溶液 IIIa.

生物素 (3.65 g, 15 mmol) 加热溶解于 70 ml DMF, 于 40℃ 加入羰基二咪唑 (2.43 g, 15 mmol) 室温搅拌反应至无 CO_2 气体产生 (约 40~60 min), 得溶液 IIIb.

将 IIIa 加入 IIIb, 室温搅拌反应过夜. 加入 4 倍量乙醚使产物沉淀. 沉淀溶于乙酸乙酯-异丙醇混合液 (4:1), 依次用 1 mol/L HCl (3×50 ml), 5% $NaHCO_3$ (4×50 ml) 及饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水 Na_2SO_4 干燥过夜, 滤去 Na_2SO_4 , 回收滤液至干, 甲醇-乙醚重结晶, 真空干燥得化合物 III 3.2 g (57.99%).

熔点 (m. p.): 149~150℃

质核比 (m/e): 371

元素分析 ($C_{17}H_{29}O_4N_3S$):

理论值: C% 54.99, H% 7.82, N% 11.32

实测值: C% 52.31, H% 7.65, N% 11.24

MS (m/e): 371 (M^+); 311 ($M-NHC-ONH-$); 257 [$M-HN(CH_2)_5CO-$]; 114 [$-HN(CH_2)_5CO-$]

1.2.4 生物素氨基己酸 (IV) 的合成: 化合物 III 3.15 g 溶于甲醇 20 ml, 加入 1.5 mol/L NaOH 20 ml, 室温放置 6 h, 加 1 mol/L HCl 中和至中性, 回收 MeOH, 加 1 mol/L HCl 酸化, 抽滤, 水洗, 真空干燥得化合物 IV 2.75 g (90.76%).

熔点 (m. p.): 222~224℃

质荷比 (m/e): 357

元素分析 ($C_{16}H_{27}O_4N_3S$):

理论值: C% 53.78, H% 7.56, N% 11.76

实测值: C% 53.41, H% 7.92, N% 12.46

MS (m/e): 357 (M^+); 340 ($M-OH$); 297 ($M-NHCONH-$); 114 [$-NH(CH_2)_5CO$]

1H -NMR (δ ppm): 11.99 (1H, s, $-COOH$); 7.74 (1H, t, $-CONH-$); 6.44 (1H, s, $-HNCONH-$); 6.13 (1H, s, $-HNCONH-$); 4.30 (1H, t); 4.13 (1H, t); 3.01~3.36 (3H, m); 2.80~2.84 (1H, dd); 2.47 (1H, d); 2.04 (1H, t); 2.19 (1H, t); 1.21~1.65 (12H, m)

1.2.5 长臂生物素对硝基苯酯 (V) 的合成: 在 2 ml 吡啶 (NaOH 干燥并重蒸) 中加入化合物 IV 0.9 g, 化合物 II 2.5 g, 对硝基酚 0.35 g, 50~60℃ 搅拌反应 2 h, 放置至室温, 加 10 倍量无水乙醚, $-20^\circ C$ 过夜, 抽滤, 乙醚洗, 真空干燥得化合物 VI. 化合物 VI (1 g) 加入 15 ml 95% 乙醇; 加热回流 5 min, 放冷至室温使产物析出, 抽滤, 依次用无水乙醇, 乙醚洗涤数次, 真空干燥得化合物 V 0.7 g (70%).

熔点 (m. p.): 158~159℃

质荷比 (m/e): 478

元素分析 ($C_{22}H_{31}O_6N_4S$):

理论值: C% 55.23, H% 6.28, N% 11.72

实测值: C% 52.84, H% 6.00, N% 11.72

FD-MS: 479 ($M+1$)

1H -NMR (δ ppm): 8.30 (2H, d, Ar-H); 7.44 (2H, d, Ar-H); 7.79 (1H, t, $-CONH-$); 6.42 (1H, s, $-HNCONH-$); 6.35 (1H, s, $-HNCONH-$); 4.27 (1H, q); 3.01~3.36 (3H, m); 2.80~2.84 (1H, dd); 2.63 (1H, t); 2.57 (1H, d); 2.04 (1H, t); 1.21~1.65 (12H, m)

1.2.6 5'-氨基寡核苷酸的合成^[8]: 将 Fmoc-氨基连接臂 (100 g/L 乙腈) 置 DNA 合成仪 X 碱基瓶里, 在 DNA 合成仪 (ABI 391A) 上用 β -氰乙基亚磷酸酯法, 按标准操作程序进行. 探针序列为 AGAACCTGTTGATCAACAGC, 该序列可与登革热病毒非编码区杂交.

1.2.7 5'-生物素标记寡核苷酸的合成^[9]: 5'-氨基寡核苷酸 100 μg , 溶于灭菌水 800 μl , 加入 1 mol/L NaHCO_3 - Na_2CO_3 缓冲液 10 μl , 混匀后加入 20 μl (100 g/L) 的生物素氨基己酸对硝基苯酯 (悬于乙腈), 室温反应过夜, HPTLC 纯化并扫描定量^[10,11].

1.2.8 5'-生物素标记寡核苷酸的鉴定: 斑点杂交和 DNA 印迹按文献^[12]方法进行. DNA 印迹所用模板为登革热病毒 PCR 扩增产物^[13].

2 结 果

2.1 长臂生物素对硝基苯酯的合成

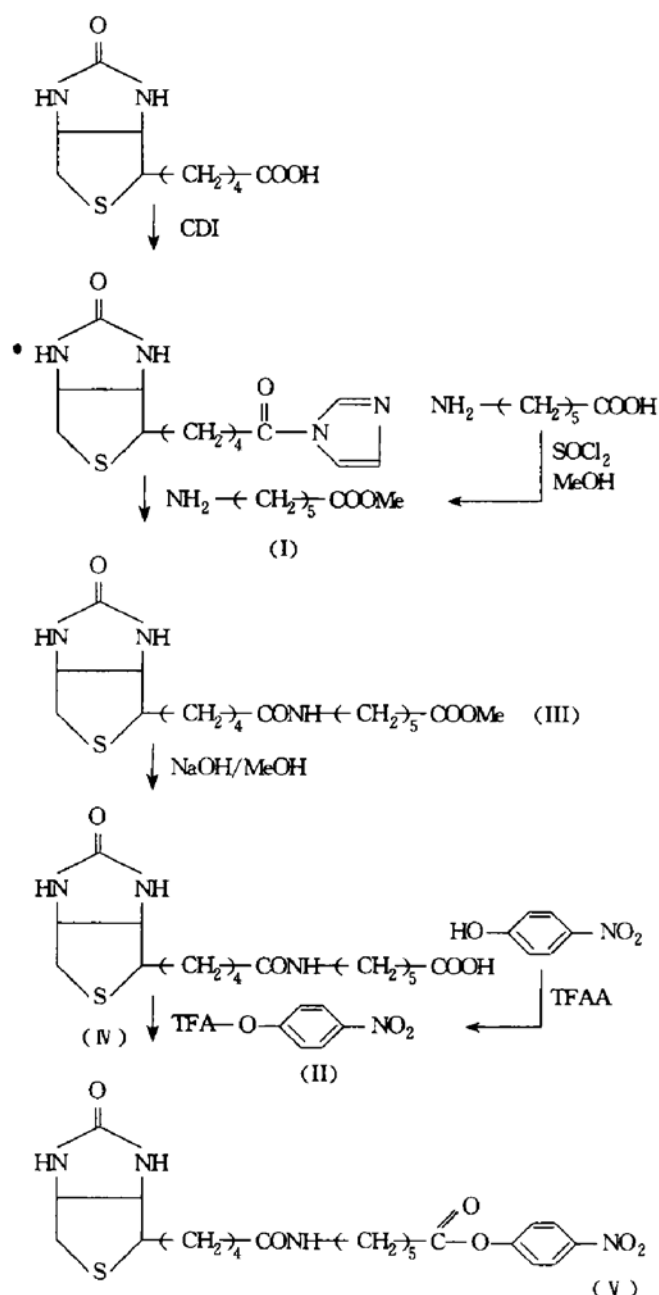


图1 长臂生物素对硝基苯酯的合成路线

如图1所示,在羰基二咪唑(CDI)催化下,生物素与6-氨基己酸甲酯反应生成生物素6-氨基己酸甲酯(II)该化合物可通过酸碱萃取与原料分离.皂化后生成生物素氨基己酸(IV),IV在吡啶存在下与三氟乙酸对硝基苯酯进行转酯反应即得生物素对硝基苯酯(V).

生物素化氨基己酸一般采用生物素活泼酯与氨基己酸反应,这一合成路程不仅要经过生物素活化这一复杂而低产率的操作,而且反应时间也较长,同时样品后处理困难.本实验采用先将生物素直接与氨基己酸甲酯反应再进行皂化的合成路线解决了现有方法的不足.此外,采用转酯反应合成目标化合物避免了二环己基碳二亚胺(DCC)催化反应副产物难以除去和产率低的问题.

2.2 5'-长臂生物素化寡核苷酸的合成和特异性分析

生物素氨基己酸对硝基苯酯与5'-氨基寡核苷酸在 pH9.6 的 0.1 mol/L NaHCO_3 缓冲液中室温反应 4~12 h 即得 5'-生物素化的寡核苷酸 (图2), 斑点显色 (图3a) 及 PCR 扩增产物 DNA 印迹 (图3b) 证明了该生物素的存在. HPTLC 上生物素化后的寡核苷酸 R_f 值增加 (图3c), 通过 HPTLC 可将其与生物素化的寡核苷酸分离.

氨基寡核苷酸的生物素标记一般是将生物素活泼酯溶解于二甲基甲酰胺(DMF)溶液,然后加入寡核苷酸的 NaHCO_3 溶液中^[3].但是,用此法标记时发现无论是生物素对硝基苯酯或琥珀酰亚胺酯标记率均较低, HPTLC 分析发现一般只有 50% 左右.为解决这一问题,我们对标记方法进行了一系列探索,发现用生物素活泼酯的乙腈悬液进行标记效率较高,一般可达 90% 以上.此外,本文采用了 HPTLC 分析方法^[10,14]不仅可以简便地监测标记反应的进程及标记率而且还可以快速地将标记物与未标记物分离.

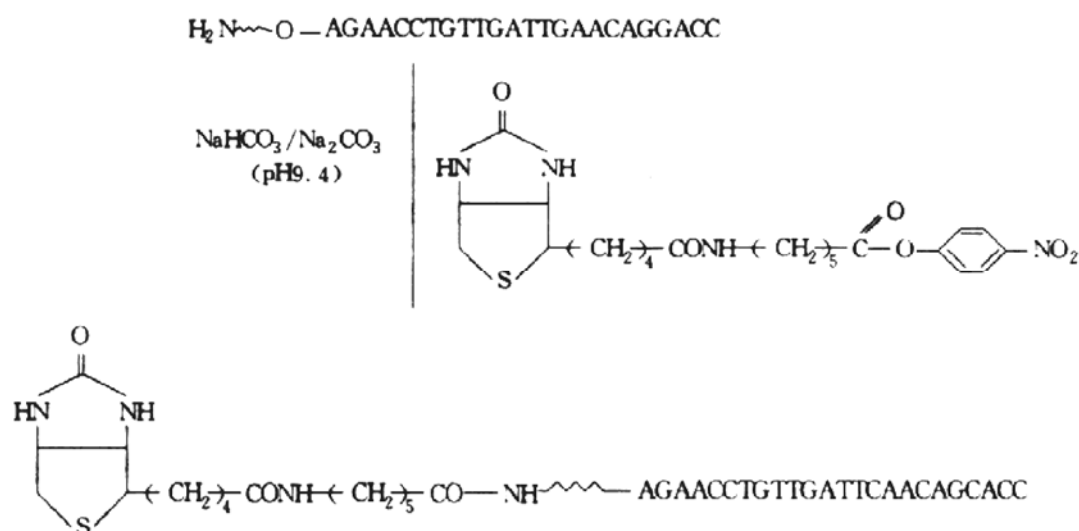


图2 5'-长臂生物素化寡核苷酸的合成路线

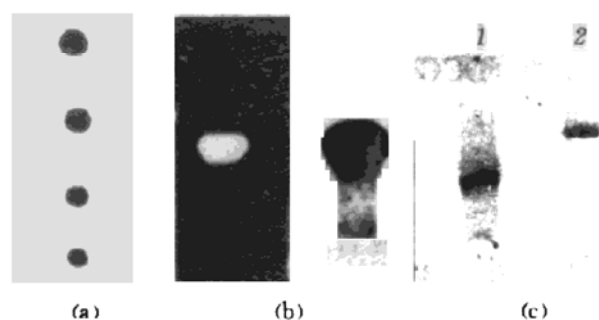


图3 生物素化寡核苷酸的鉴定

(a) 斑点显色; (b) DNA 印迹显色; (c) HPTLC.

参 考 文 献

- 1 Bayer E A, Wilchek M. *Journal of Chromatography*, 1990; **510**: 3
- 2 Al-Hakim A H, Hull R. *Nucleic Acids Research*, 1986; **14** (24): 9965
- 3 Soh J, Pestka S. *GATA*, 1990; **7** (4): 80
- 4 Hazum E. *Journal of Chromatography*, 1990; **510**: 233
- 5 Babashak J V, Phillips T M. *Journal of Chromatography*, 1989; **476** (2): 187
- 6 黄维德, 陈常庆. 多肽合成. 北京: 科学技术出版社, 1985: 47
- 7 Sakakibara S. *Bull Chem Soc*, 1964; **37**: 1231
- 8 王升启, 马立人. 军事医学科学院院刊, 1991; **15** (4): 294
- 9 Connolly B A. *Nucleic Acids Research*, 1987; **15** (7): 3131

- 10 王升启, 马立人. 生物化学与生物物理进展, 1993; **20** (3): 234
- 11 王升启, 马立人. 生物化学与生物物理进展, 1993; **20** (2): 130
- 12 萨姆布鲁克, 费里奇, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南, 第二版. 北京: 科学出版社, 1992: 474~490
- 13 王升启, 马立人. 生物化学与生物物理进展, 1992; **19** (3): 204
- 14 王升启, 马立人. 色谱, 1993; **11** (3): 146

Synthesis of Long Arm Biotin-p-Nitrophenyl Ester. Wang Shengqi, Zhu Baozhen (*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract A long arm biotin-p-nitrophenyl ester was synthesized using carbodiimidazole as condensing reagent, and 6-aminohexyl acid as linking arm. The chemical structure was established via spectroscopic, thin layer chromatographic as well as hybridization methods. The results showed that the long arm biotin-p-nitrophenyl ester was specific and the synthetic way was simple and efficient.

Key words biotin-p-nitrophenyl ester, nucleic acid hybridization, carbodiimidazole