

用国产试剂制备 5-¹²⁵I-2'-脱氧尿嘧啶核苷的方法¹⁾

王球达 张宗梁 杨松榆 章国成 王珏

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

5-¹²⁵I-2'-脱氧尿嘧啶核苷(¹²⁵I-UdR)是胸腺嘧啶核苷的类似物,在合成DNA时它能相当特异地取代胸腺嘧啶核苷参入DNA链,而利用¹²⁵I-UdR分子中¹²⁵I的放射性便可以定量测定或示踪显影。因此,¹²⁵I-UdR在生物学研究领域中,例如,细胞增殖动力学研究和肿瘤免疫研究等方面得到越来越广泛的应用。

国内现无此种试剂供应,我们根据自力更生的原则,利用国产原料和简易方法合成了质量可靠的¹²⁵I-UdR,解决了这种重要的放射性生化试剂的制备问题。现将合成与纯化方法介绍于下。

1. 反应原理

本反应是用Na¹²⁵I和尿嘧啶-2'-脱氧核苷(UdR)为合成原料,选用2NHNO₃为氧化剂。在80℃加温条件下,硝酸将¹²⁵I离子氧化为新生的¹²⁵I原子,从而使UdR的尿嘧啶环上第五位的氢被¹²⁵I所取代。硝酸的氧化作用还可以防止碘化反应时伴生的还原性很强的¹²⁵I化氢使反应逆转,保证了反应的顺利完成。而且,尿嘧啶环上电子云密度分布的情况决定了只会在5位上发生卤代反应,因此反应产物全系5-¹²⁵I-2'-脱氧尿嘧啶核苷。为了防止反应过程中产生的¹²⁵I分子散逸至大气环境中,本反应必须在密闭系统内完成。

2. 合成步骤

合成反应采用之试剂全系国产品。称取适量(5—10毫克)层析纯UdR,以2NHNO₃(分析纯)配成浓度为1%(W/V)的溶液;为防止硝酸使核苷逐渐水解的可能性,此液应于使用前

临时配制。吸取适量(0.2—0.5毫升)的Na¹²⁵I溶液(30—40毫居里/毫升,pH 7.5,保护剂含量0.8毫克/毫升,放射性纯度99%以上),放入中性硬质玻璃(九五料)安瓶内。再向安瓶内加入等体积的1%UdR硝酸溶液,立即将安瓶严密封口。迅速摇匀后将上述安瓶置于80℃水浴中温育1小时。待反应完毕,立即以浓氨水(14N NH₄OH)中和至pH 9.0。然后将反应混合物上柱分离。

3. 产物分离提纯

国产聚苯乙烯季胺类阴离子交换树脂(相当于Dowex 1×8, 200—400目)经NaOH和HAc处理后变为醋酸型,将它装填入直径1.2厘米之层析柱内,柱高12厘米。此层析柱预先经0.25M NH₄Ac—0.05M NH₄OH缓冲液充分平衡后,将上述反应混合物(一般体积不超过1毫升)全部加于柱上,以离子交换层析法进行分离(图1)。

利用自动分部收集器每管3毫升连续收集洗脱液。顺次以0.25M NH₄Ac—0.05M NH₄OH缓冲液(约80毫升)及0.5M NH₄Ac—0.05M NH₄OH缓冲液(约50毫升)洗脱,并从分部收集的各管洗脱液中抽样用紫外分光光度计测定260毫微米之光密度。洗至260毫微米光吸收为0时,表示上柱的反应混合物中剩余的UdR已全部从柱上洗下,即可改成重蒸馏水(约120毫升)洗脱,一直洗至流出液的pH呈中性。最后,以0.2N HAc(约80毫升)作为洗脱液,将

1) 严泳棠、何全品等同志参加部分工作,包永德同志提出宝贵意见,钟逸新同志协助摄影,谨致谢意。

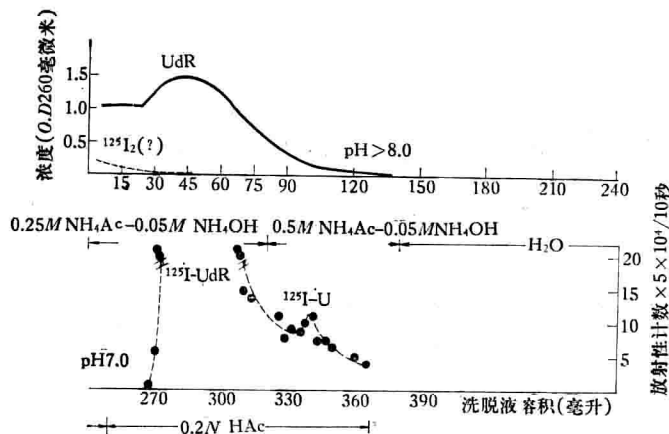


图1 反应混合物的离子交换层析洗脱流程图

柱: 12×120 毫米, 国产聚乙基季胺类阴离子交换树脂 (相当于 Dowex 1×8 , 200—400 目);
实线表示 O. D. 值; 虚线表示放射性计数值

^{125}I -UdR 从柱上洗下, 用 γ -计数测定仪测定各管洗脱液的 cpm 值, 一般在第 8 至 25 管之间为 ^{125}I -UdR 之洗脱高峰。以上洗脱过程之速度用微量泵控制在每分钟 1 毫升左右。

将 cpm 值高的各管洗脱液合并在一起, 利用活性碳柱加以浓缩。粒度适中的活性碳经 1.0 N HCl 煮沸 10 分钟活化, 再用重蒸馏水彻底漂洗后, 装入直径 1 厘米的层析柱内, 柱高 3 厘米。上述含 ^{125}I -UdR 的洗脱液通过活性碳柱时, ^{125}I -UdR 几乎全部被活性碳吸附, 流出液之 cpm 值接近本底。取 10 毫升 70% 乙醇溶液并加入数滴浓氨水配成乙醇氨水洗脱液, 以这种 pH 为 10 的洗脱液流洗活性碳柱, 柱上吸附的 ^{125}I -UdR 被洗下 60—70%。然后将含 ^{125}I -UdR 的乙醇氨水洗脱液用水泵减压浓缩至 ^{125}I -UdR 的最后浓度为 1 毫居里/毫升。此种产品贮存于 4°C 备用。

4. 产品鉴定

分离提纯的产品 (^{125}I UdR 溶液) 经纸层析 (Whatman 1 号滤纸) 鉴定和体外参入人肝癌细胞 (BEL-7402) 核 DNA 的生物鉴定, 证明其纯度很高、质量可靠。

上述产品用乙酸乙酯: 异丙醇: 水 = 8:1:4 的层析系统进行上行纸层析的结果 (图 2) 显示了合成的 ^{125}I -UdR 与标准样品 IUdR (英国 Koch-Light 出品) 的 R_f 值完全一致。在上行

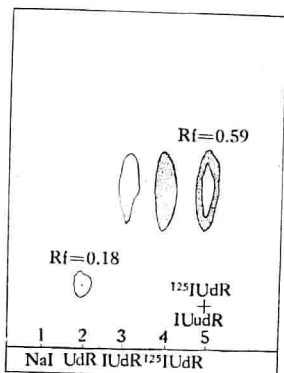


图2 提纯产品的上行纸层析图谱

溶液系统: 乙醇乙酯: 异丙醇: 水 (8:1:4); 白圈表示标准样品层析后的紫外吸收斑点; 黑圈表示提纯产品层析后的放射性显影斑点

纸层析扩展完毕后用紫外光检查层析图谱时, IUdR 及 UdR 标准样品均呈现暗斑 (IUdR 的 R_f 值为 0.59, UdR 的 R_f 值为 0.18), 但是, 在待鉴定的合成产品的层析途径上却未出现任何有紫外吸收的痕迹。由于放射性合成产物的绝对浓度很低, 必须利用 ^{125}I 衰变时发出 γ 射线的特性, 将 X 线底片与层析图谱一起夹在玻璃板内压紧曝光三天, 然后经显影来确定放射性合成产物的层析斑点位置。发现此放射性合成产品的层析斑点完全与同时进行层析的标准样品 IUdR 的层析斑点重合, 证明合成产物的化学本质确系 5- ^{125}I -2'-脱氧尿嘧啶核苷。X 线显影胶片上除 ^{125}I -UdR 层析斑点外, 未见任何其他阴

影,证明合成产品之纯度较高,无其他带有放射性的混杂成分。

将放射性合成产品按 100 微居里/ 10^6 细胞的浓度加至体外培养的人肝癌细胞(BEL-7402)的培养液中,温育 12 小时后用含载体(无放射性的 IUdR) Hank's 液充分洗涤细胞,然后利用放射自显术检查上述合成产品参入细胞的定位情况,其结果见图 3。胞核中布满致密黑点(核-4 乳胶感光后显影的银粒),而粉红色胞质中却没有这种黑点。这就充分证明合成产品确已为

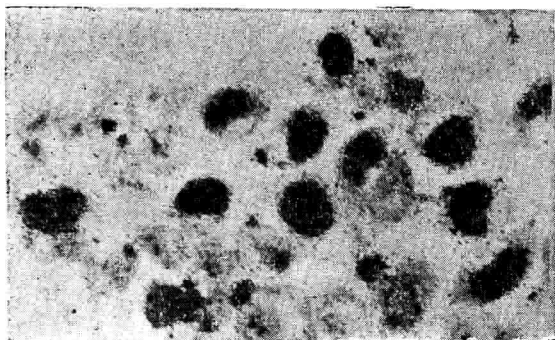


图 3 提纯产品参入体外培养的人肝癌细胞(BEL-7402)的放射自显影图 $\times 1$

胞核中布满致密的感光黑点,而胞质中没有这种黑点

细胞摄取利用,并参入细胞核的 DNA 中。因为 5- ^{125}I -尿嘧啶(^{125}I -U)不能被细胞摄取利用,从而也证明合成产品是 5- ^{125}I -2'-脱氧尿嘧啶核苷,是质量可靠的生物化学试剂。

5. 讨论

用 ^{125}I -UdR 作参入 DNA 链的放射性标记物有许多优点:

(1) ^{125}I 衰变时发出 γ 射线, ^{125}I -UdR 在计数测量技术方面要比用 ^3H 胸腺嘧啶脱氧核苷作参入实验时远为简易得多;

(2) ^{125}I 在衰变时又放出俄歇电子和内转换电子,其能量与 $^3\text{H}\beta$ 辐射的能量接近, ^{125}I -UdR 也能用于放射自显术作示踪定位;

(3) ^{125}I -UdR 和 ^3H 胸腺嘧啶脱氧核苷相比,无论在体外或体内实验都不易被细胞再利用^[1,2]。近年来在生物学研究中日益广泛应用 ^{125}I -UdR,已使它成为一种重要的放射性生化试剂^[3,4]。

W. H. Prusoff 首先利用硝酸为氧化剂使 UdR 的尿嘧啶环发生碘代反应合成了非放射性的 IUdR^[5]。我们参照 Hughes 等制备 ^{125}I -UdR 的方法^[6],根据国产的试剂和设备条件加以改进,成功地制备了高比活性和高浓度的 ^{125}I -UdR。

我们的冷试验资料表明:用等克分子 UdR 和 NaI 按本方法反应,可使 97% 的 UdR 变为 IUdR;用相当于国产 Na^{125}I 溶液中所含保护剂的还原力二倍以上的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 作模拟实验,证明了少量的还原性保护剂对合成反应没有影响;发现用普通钠玻璃安瓶作为反应容器对小体积的合成反应有不利的影 响,为了保证反应顺利必须注意安瓶玻璃的清洁和质量。

在洗脱流程图中,一开始就洗下的微量放射性物质,可能是反应中产生的不带负电荷的 ^{125}I 分子;在 ^{125}I -UdR 高峰后出现的放射性小峰是 Hughes 等所指出的 ^{125}IU 峰,分部收集时弃去这个小峰便可得到高纯度的 ^{125}I -UdR。离子交换柱中残留的放射性物质主要是带负电荷的 ^{125}I 分子。利用活性碳柱使 ^{125}I -UdR 溶液浓缩,操作非常简便,成功地克服了缺乏供浓缩放射性物质专用的设备条件,但是,有少部分 ^{125}I -UdR 不能从活性碳柱上洗脱下来。按 ^{125}I 的放射性来计算,本制备方法的产品得率约为 60%,已超过一般文献报道的产率数值。

N. M. Bui 等提出的以 ICl 为亲电取代试剂来合成 ^{131}I -UdR 的合成方法虽能制得无色针状结晶^[7],其产品中却含有很多伴生的载体(非放射性的 I-UdR)。用本制备方法合成的产品则具有几乎不含载体的优点,最适于作为使细胞核 DNA 得到较高放射性参入的生化试剂。

6. 结束语

本文介绍了用国产试剂制备高纯度 ^{125}I -UdR 的简易方法,并指出:(1) 产品得率较高,而且几乎不含载体;(2) 进行合成反应的安瓶应由中性玻璃制成;(3) 采用活性碳柱来浓缩 ^{125}I -UdR 溶液,操作简便。

参 考 文 献

- [1] Bürki, K., et al.: *Current Topics in Pathology*, **60**, p. 33—61, 1975.
- [2] Oldnam, R. K. et al.: *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **37**, p. 49—58, 1973.
- [3] Kern, D. H., et al.: *Cell Immunol.*, **24**, p. 58—68, 1976.

- [4] Ting, C. C.: *Cancer Res.*, **36**, p. 3695—3701, 1976.
- [5] Prusoff, W. H.: *Biochem. Biophys. Acta*, **32**, p. 295—296, 1959.
- [6] Hughes, W. L., et al.: *Fed. Proc.*, **23**, p. 640—648, 1964.
- [7] Bui, N. M., et al.: *Intl. J. Applied Radiation and Isotopes*, **16**, p. 337—339, 1965.

[本文于1977年10月19日收到]

血 液 粘 度 的 影 响 因 素

——血浆和血清粘度与有关生物大分子含量间关系的探讨*

施 永 德

肖 保 国

(上海第一医学院生物物理教研组)(上海第一医学院华山医院)

已发现人类很多疾病与血液粘度的变化有关^[1],而血浆和血清粘度是影响全血粘度的重要因素之一,血浆及血清粘度又受其生物大分子含量变化的影响。本文探讨人血浆和血清粘度与纤维蛋白原、 β 胆蛋白、胆固醇、甘油三酯、球蛋白、清蛋白等生物物质含量之间的关系。

方 法

1. 人血浆和血清比粘度

用玻璃毛细管粘度计测定^[2]。

2. 生物大分子定量

(1) 纤维蛋白原、 β 脂蛋白、胆固醇、甘油三酯 按已报道方法进行测定^[2,3]。

(2) 血清蛋白电泳 用新华1号滤纸,巴比妥缓冲液(pH 8.6, $\mu = 0.075$),电泳后用溴酚蓝染色,0.02N NaOH 洗脱比色;

(3) Ig G 和 Ig A 用琼脂平板单向扩散法进行。

结 果

1. 纤维蛋白原和血浆比粘度的关系

图1是不同个体纤维蛋白原及血浆比粘度的统计学分析结果,可见其血浆比粘度随纤维

蛋白原而增加,相关系数 $r = 0.65 (P < 0.01)$,直线斜率 $b = 0.0013$ [单位为(毫克%)⁻¹,下同]。

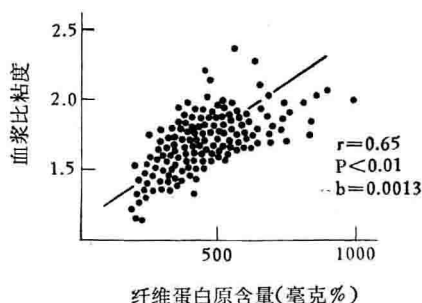


图1 血浆比粘度与血浆中纤维蛋白原含量的关系

2. IgA 和 IgG 与血清比粘度的关系

按 IgA 和 IgG 不同水平的个体分为六组,结果如表1和图2。可见血清比粘度随 IgA 和 IgG 的含量而增加。

3. 血清蛋白成分与血清粘度的关系

表2是健康人及高球蛋白血症患者电泳分析及血清粘度的测定结果,可见后者血清中白蛋白成份相对下降,球蛋白 α_1 、 α_2 、 β 和 γ 诸成份增大,个别患者还出现M带,血清比粘度比前

* 本工作受到本院中山医院内科实验室、华山医院化验室、免疫室、神经病学研究室大力支持,深表感谢。