

2.8Ω, 启动绕组电阻 4.8Ω。此时, 装配好整机即可试运转。

空载实验线路如图 2。

在未运转时, 1、2 两点闭合, 当电机转动到一定转速时, 1、2 点跳开。

再测量电流, 若启动电流为 8—9A, 运转电流约为 3.3A, 即可装入离心机。

原灌致冷剂为 F502, 现改为 F12, 高端压力为 7.5kg/cm², 低端在 0.5kg/cm² 以下。测量电流, 若满足启动电流 10A; 运转状态下, 制冷状态时为 5—6A, 制热状态时为 4—4.5A, 即可使用。

按以上介绍维修后, 运转正常, 效果良好。

[本文于 1982 年 11 月 3 日收到]

改进了的 2-溴丙酰基树脂固相多肽合成法

——[Ala]⁵[Asp]⁶-睡眠肽 (PSIP) 的合成

汪淑华 朱应麒

(中国科学院上海药物研究所)

固相多肽合成法^[1]目前已被广泛研究和应用。通常用氯甲基树脂 (1) 故为固相多肽合成

的起始物将第一个氨基酸接上去。第一个氨基酸与树脂之间的键的稳定程度是很重要的, 它

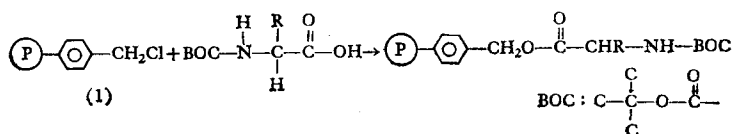


图 1

必须对脱掉α-氨基保护基时的条件稳定, 而在肽完全接好以后又能在温和的条件下使肽从树脂上脱离下来, 2-溴丙酰基树脂 (2) 做为一个较

理想的树脂曾被应用^[2,3,4,5], 但在使用中发现在第一个氨基酸接上去后, 当氨基呈游离状态时, 要发生环化生成化合物 (3), 使树脂上可供进行

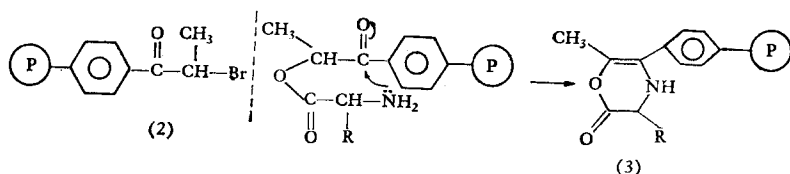


图 2

缩合反应的游离氨基减少。(3) 的形成又引起一系列副反应^[3], 当 (3) 开环时又使游离氨基增加, 生成缩短了肽和错了序列的肽, 造成分离上的困难, 从而限制了该树脂的应用。

为解决上述环化问题 Tjoeng^[3] 和 Birr^[4] 采用三肽上树脂的方法。我们设想, 当附着到树

脂上去的第一个氨基酸的 α-氨基呈游离状态

时, 分布在聚苯乙烯树脂上的这些 $\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{R})-\text{NH}_2$ 基团由于它们有着相同的构型将协同一方向很容易的生成六圆环。如果

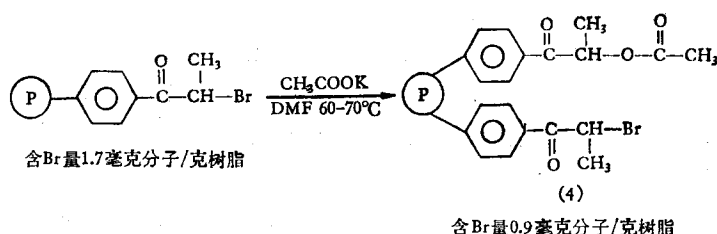


图 3

能在树脂上引入一定量的 $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \quad \text{O} \\ \parallel \quad | \quad \parallel \\ -\text{C}-\text{CH}-\text{O}-\text{C}- \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$ 基团，那末它将以它特有的构型在立体空间上阻止了六圆环的生成，这样既达到了防止环化的目的，又保留了原树脂的优点。为此，我们将含溴量 1.7 毫克分子/克的 2-溴丙酰基树脂先用醋酸钾处理，使它变为含溴量是 0.9 毫克分子/克的改良树脂(4)，这样原 2-溴丙酰

基树脂上大约有 50% 的 $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \quad \text{O} \\ \parallel \quad | \quad \parallel \\ -\text{C}-\text{CH}-\text{O}-\text{C}- \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$ 基团被引入来防止环化。用改良树脂(4)合成 $[A/a]^5[Asp]^6$ -PSIP 并将它与原树脂(含溴量 0.9 毫克分子/克)进行比较，从树脂上氨基测定^[6]结果可以看出改进后的树脂上第一个氨基酸的环化程度已大大降低，用改进后树脂合成的肽取得了满意的分析结果，它的生物活性将另行报道。

按文献[7]我们采用了BOC-氨基酸的钾盐上树脂的方法获得了较高的酯化率，残溴低于

原含量的 5%，证明钾盐法上树脂不仅适用于氯甲基树脂，也完全适用于 2-溴丙酰基树脂。

一、材料与方法

1. 改进了的 2-溴丙酰基树脂 按文献[2]方法制备含溴量为 1.7 毫克分子/克的 2-溴丙酰基树脂 1.5 克，加入 120 毫克(1.2 毫克分子)的无水醋酸钾，在 DMF 中电磁搅拌 8 小时，浴温 60—70°C 滤去 DMF，用无水乙醇洗三次，水洗至无硝酸银反应为止。测含溴量为 0.9 毫克分子/克，红外光谱 $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} 1740\text{cm}^{-1}$ 。并按文献方法制备含溴量为 0.9 毫克分子/克的树脂(2)

2. BOC-谷氨酸树脂及氨基酸衍生物的准备 按文献[7]用钾盐法分别制成树脂(2)和改良树脂(5)的 BOC-谷氨酸树脂。接肽所用氨基酸的 α -氨基用 BOC-保护。Asp 和 G/u 的侧链羧基均用苄酯基保护。所用全部氨基酸衍生物都经熔点和层析鉴定。

3. 固相接肽 各 BOC-氨基酸按表 1 的操作顺序进行接肽

表 1

操作顺序	试 剂	温 度	时 间
脱保护	4N HCl/二氧六环	30°C	45'
洗 涤	$\text{CH}_2\text{Cl}_2 \times 3$; $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \times 3$; $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \times 4$		
中 和	10% 重蒸三乙胺的二氯甲烷溶液	室 温	5'—7'
洗 涤	$\text{CH}_2\text{Cl}_2 \times 3$; $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \times 3$; $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \times 4$		
接 肽	$\left. \begin{array}{l} \text{BOC-氨基酸过量 3 倍} \\ \text{DCCI} \end{array} \right\} \text{CH}_2\text{Cl}_2 \text{ 中}$ 过量 3.3 倍	室 温	8 小时
洗 涤	$\text{CH}_2\text{Cl}_2 \times 3$ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \times 3$ > 重复三次后再用 CH_2Cl_2 洗四次		

4 水解 将保护九肽树脂置于瓶中，加入 pH = 8 的四乙基氢氧化铵水溶液，以及适量的二氧六环，甲醇，室温搅拌 3 小时过滤。树脂用 1:1 的水，二氧六环洗三次，合并滤液与洗涤液，用 0.5N 的盐酸中和至中性，减压浓缩至小体积，加入少量的水并用乙酸调至 pH = 2，用乙酸乙酯提取，减压抽去乙酸乙酯得油状物，加入少量的无水乙醚，刮出白色粉末，过滤得保

液，用 0.5N 的盐酸中和至中性，减压浓缩至小体积，加入少量的水并用乙酸调至 pH = 2，用乙酸乙酯提取，减压抽去乙酸乙酯得油状物，加入少量的无水乙醚，刮出白色粉末，过滤得保

表 2

化合物名称	分子式	熔点℃	氨基酸组成分析			U. V. (λ _{MeOH} _{max})	MS (F.D.)	Rf 值 (硅胶板)	[α] _D ²⁵ (C = 1.6, MeOH)
			名称	计算值	测定值				
[Ala] ² [Asp] ⁶ -DSIP	C ₃₃ H ₄₈ O ₁₃ N ₁₀	170℃分解	Asp	1	1.06	286	848.6	0.67(A) 0.55(B) 0.83(C)	-11
			Ser	1	0.95				
			Glu	1	0.96				
			Gly	3	2.92				
			Ala	2	2.06				
			Trp	1	不分析				

A:正丁醇:冰醋酸:水=4:1:2; B:甲醇:水=99:1; C:吡啶:醋酸:水=4:1:1.5

表 3

树 脂 名 称	原 树 脂			改进后树脂		
	氨基测定值 (毫克分子/克)	计算值 (毫克分子/克)	缩合率* 测定值: 计算值	氨基测定值 (毫克分子/克)	计算值 (毫克分子/克)	缩合率* 测定值: 计算值
OBzl NH ₂ Glu-②	0.64	0.64	100	0.73	0.73	100
OBzl NH ₂ Gly · Glu-②	0.51	0.62	80	0.63	0.69	91
OBzl OBzl NH ₂ · Ser · Gly · Glu-②	0.40	0.47	85	0.54	0.55	98
OBzl OBzl OBzl NH ₂ · Asp · Ser · Gly · Glu②	0.39	0.37	>100	0.48	0.49	98
OBzl OBzl OBzl NH ₂ · Ala · Asp · Ser · Gly · Glu-②	0.38	0.38	100	0.44	0.46	96
OBzl OBzl OBzl NH ₂ · Gly · Ala · Asp · Ser · Gly · Glu-②	0.32	0.37	82	0.39	0.43	91
OBzl OBzl OBzl NH ₂ · Gly · Gly · Ala · Asp · Ser · Gly · Glu-②	0.22	0.31	71	0.37	0.39	94
OBzl OBzl OBzl NH ₂ · Ala · Gly · Gly · Ala · Asp · Ser · Gly · Glu-②	0.27	0.22	>100	0.32	0.36	89
OBzl OBzl OBzl NH ₂ · Trp · Ala · Gly · Gly · Ala · Asp · Ser · Gly · Glu-②	0.18	0.25	72	0.26	0.30	87

* 假设缩合率为 100% 时的树脂总氨基值

护九肽干粉。

5. 氢化 将保护九肽干粉置于瓶中使溶解于甲醇中,加入新鲜制备的钯黑,边搅拌边通入干燥氢气,根据板层析的结果决定氢化的时间。滤去钯黑,将滤液减压浓缩至干,得白色粉末。

6. 纯化 取 50 毫克上述白色粉末,经 Sephadex LH-20 柱 (1.5 × 60cm) 分离纯化,上柱液为 1 毫升,用甲醇洗脱,每 15 分钟收集 3ml/管,测 280nm 紫外吸收,合并所要的管数,抽去甲醇即得纯化的九肽。

二、结果与讨论

OBzl

取 1.5 克 BOC—Glu— $\textcircled{\text{P}}$ 树脂(含 Glu 0.73 毫克分子/克)按顺序接成 BOC-Trp · Ala · Gly
OBzl OBzl OBzl

· Gly · Ala · Asp · Ser · Gly · Glu— $\textcircled{\text{P}}$ 最后得 2.7 克,增重 1.2 克。取 300 毫克保护九肽树脂,水解后得 65 毫克保护九肽,产率 70%。取 60 毫克保护九肽氢化去除全部保护基得 30 毫克九肽。再经 Sephadex LH-20 分离纯化后即得纯品。它的分析数据和物理常数列入表 2。

在多肽合成过程中曾将改进后的树脂与原树脂进行比较(树脂含溴量均为 0.9 毫克分子/克)。从表 3 的树脂上总氨基测定值可见,在原树脂(2)上第二、三肽氨基的测定值都低于计算值,接肽率比较低,仅为 80—85%,这主要是由

于树脂上第一个氨基酸的环化使得游离的氨基减少,第二个氨基酸接上去的数量也相应的减少,因此,二、三肽氨基的测定值就大大的低于计算值。同时由于树脂上第一个氨基酸的环化所引起的副反应在表中也表现出来,当接肽进行到四肽和八肽时,氨基的测定值均大于计算值,接肽率超过了百分之百,这就是由化合物(3)所引起的副反应造成树脂上游离氨基增加后出现的异常现象。经改进后的树脂上各肽氨基的测定值都接近于计算值,可见它虽不能完全克服树脂上第一个氨基酸的环化,但已大大的减少了环化的比例,而且将环化引起的副反应降到了最小程度。因此,用改进后树脂(5)合成的肽,只须经 Sephadex LH-20 柱一次层析即可得到满意的结果。

参 考 文 献

- [1] Merrifield, R. B. et al.: *J. A. C. S.*, 85, 2149, 1963.
- [2] Wang, S. S.: *J. Org. Chem.*, 41, 3258, 1976.
- [3] Tjoeng, F. S. et al.: *Int. J. Pept. Protein. res.*, 14, 262, 1979.
- [4] Birr, C. et al.: *American Peptide Symposium*, (Goodman, M.) 1977. 510, John Wiley and Sons New York.
- [5] Tam, J. P. et al.: *Tetrahedro lett.*, 46, 4001, 1977.
- [6] 邹永水、钱肖贞:《生物化学与生物物理进展》4, 12, 1978.
- [7] 中国科学院生物化学研究所多肽应用组:《生物化学与生物物理学报》7, 23, 1975.

【本文于1982年10月29日收到】

氚标记脱氧胞苷 5'-三磷酸盐的制备

林 奋 智 沈 德 福

(中国科学院,上海原子核研究所)

氚标记脱氧胞苷 5'-三磷酸盐 (^3H -dCTP) 作为一种常用的生化试剂见于许多文献报道。

^3H -dCTP 是以我们自制的溴化脱氧胞苷 5'-三磷酸钠盐为原料,经过卤氚交换而制得。

方法是:在一个玻璃反应瓶中置入 38.6mg Br-dCTPNa₃, 35mgpd/CaCO₃, 0.8ml 水和 0.2ml 2N NaOH 溶液,在真空系统上常压室温 (25℃) 通氚反应 1.5 小时。反应完毕,滤去催化剂,将粗