

的教导,为了满足科研上和生产上的需要,发展我国自己的生化试剂,我们进行了G-10的试制工作。

从G-10分子的结构来看,它的交联结构最为紧密,其基团的空间障碍和基团的斥力就比其他型号大得多,尤其是在珠状凝胶的制备中,采用二相悬浮聚合反应,Gn的碱相成珠粒分散在油相中,当加入交联剂ECH后,很快就发生交联反应,首先在珠粒表层形成一个网络屏障,阻碍了ECH分子进一步钻入珠粒内部,和里面的Gn分子交联,结果往往导致交联度达不到G-10标准和所获得的凝胶交联度不均一。因此,只有掌握好ECH的用量、碱相中Gn的浓度、反应温度和搅拌速度等,求出其最适反应条件,才能成功地制得合格的G-10产品。

二、实 验

葡聚糖,平均分子量 4×10^4 ,上海长征制药厂出品。

环氧氯丙烷,分析纯,上海试剂总厂出品。

46号透平油,上海炼油厂出品。

ECH用量和凝胶吸水量的关系

30克Gn和含0.5克硼氢化钾的30毫升6N氢氧化钠溶液混和,搅拌成均匀的糊状物,加入500毫升透平油,继续搅拌使葡聚糖碱相均匀分散在油相中,搅拌速度视所需珠粒大小而定。在40℃时加入不同量的ECH(从11毫升到17毫升),半小时后升温到70℃,继续保温5小时。停止搅拌,将反应物过滤,尽量将油抽干,70℃干燥一天。取出,用120号汽油洗涤三次,无水乙醇洗二次,干燥后,用无离子水洗至中性,无水乙醇脱水,80℃干燥,过筛,即得白色珠状交联葡聚糖凝胶,它们的吸水量测定结果如图1所示。从图1可知随着ECH用量的增加,所得凝胶的交联度也增加,但当ECH用量超过一定量时,交联度反而下降,即存在一个最适ECH用量,本系统中最适用量为12毫升,此时所得凝胶吸水量为1.4克/每克干胶。

碱相中Gn的浓度和吸水量的关系

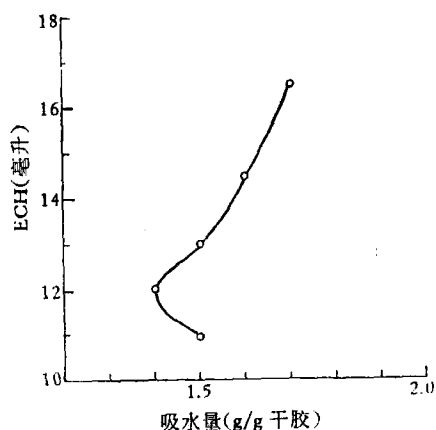


图1 ECH用量与吸水量的关系

30克Gn与含0.5克硼氢化钾和8克氢氧化钠的不同量的水混合(从25毫升到35毫升),充分搅拌均匀,成不同浓度的Gn碱相,然后分别均匀分散在500毫升透平油中,在40℃时加入12毫升ECH,进行反应,以下步骤同上。得到结果如图2所示。可知,Gn浓度的增加有利于交联度的提高,当Gn在碱相中的浓度为55%(w/w)时,得到凝胶吸水量为1.3克/每克干胶。但是这时碱相已非常粘稠,搅拌费力,要从继续提高碱相中Gn的浓度来达到G-10标准是困难的。

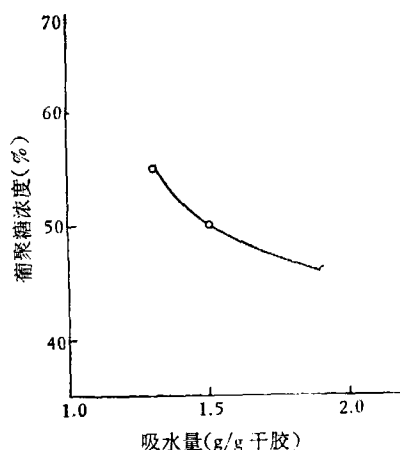


图2 Gn浓度与吸水量的关系

温度和吸水量的关系

30克Gn与含0.5克硼氢化钾的30毫升6N氢氧化钠搅拌均匀,然后均匀分散在500毫升透平油中,分别在不同温度时(从30℃到57℃)

加入 12 毫升 ECH, 进行反应, 以下步骤同上。结果如图 3 所示。显然温度是一个重要因素, 由于适当提高了反应温度, 使交联剂 ECH 分子有比较大的能量穿过珠粒外层骨架屏障, 进入内部反应, 从而提高了交联度与均一性。实验表明, 在 50℃ 时反应, 生成凝胶的吸水量显著下降, 为 1.1 克/每克干胶, 符合 G-10 的标准。

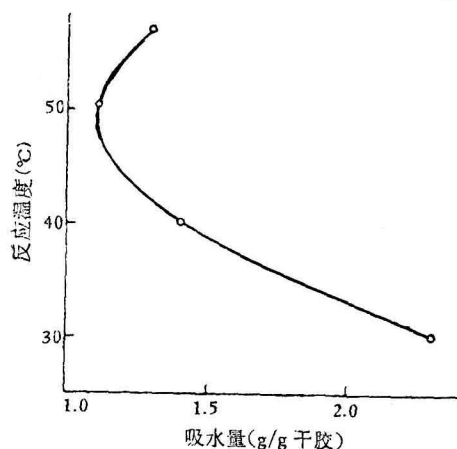


图 3 反应温度与吸水量的关系

1.0 克/每克干胶。因此, 18 毫升为最适 ECH 用量。产品见图 5。

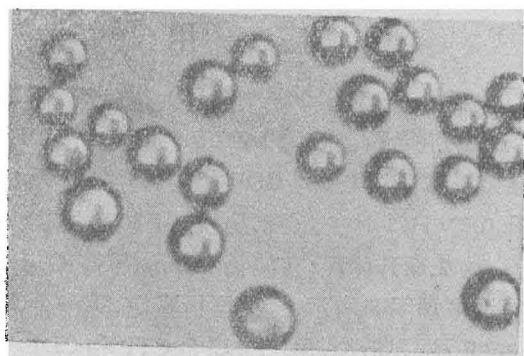


图 5 珠状凝胶的显微镜观察

三、生产条件

交联反应

取一只圆底不锈钢反应锅, 容积 30 立升。外面装水浴装置, 上面装有搅拌器, 反应锅中装有锚式不锈钢搅棒。称取 600 克 Gn 于 1 立升烧杯中, 加入含 3 克硼氢化钾的 32% 氢氧化钠溶液 500 毫升, 初步搅和后, 转移入 30 立升反应锅内, 水浴加热到 40℃, 在保温下, 以 1000 转/分速度搅拌 45 分钟, 使 Gn 与碱充分混和。加入 10 立升 46 号透平油, 搅拌 15 分钟, 使碱相均匀悬浮在油相中。水浴升至 50℃, 待反应物温度也升至 50℃ 达平衡时, 加入 370 毫升 ECH, 将搅拌速度加快至 1400 转/分, 维持 50℃ 半小时, 升温至 70℃ 反应 5 小时止。停止搅拌, 将产物吸入一只 10 立升瓶中, 凝胶很快沉入底部, 上层油轻轻倒去, 下层凝胶和油混合物用 2 号砂芯漏斗过滤, 压干, 凝胶置 80℃ 干燥 2 天。

洗涤

将烘干凝胶倒入烧杯中, 在搅拌下, 每次用 1500 毫升 120 号汽油洗涤, 去除透平油, 共洗四次, 滤干, 再用无水乙醇洗二次, 每次约 1000 毫升, 滤干, 80℃ 干燥。

将上述产品用无离子水反复洗涤至中性, 并将细颗粒彻底漂洗干净, 滤干, 用 95% 乙醇、无水乙醇脱水, 80℃ 干燥。最后约得 520 克珠状交联葡聚糖凝胶 G-10, 其中 100 目到 250 目

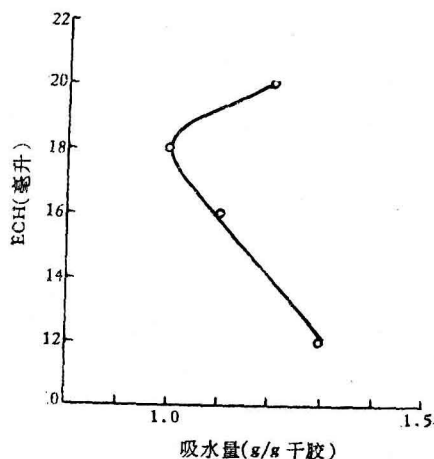


图 4 ECH 用量与吸水量的关系

占 70%，吸水量为 1.0 ± 0.1 克/每克干胶，床体积为 2.8 毫升/每克干胶。

四、应用

我们用 G-10 (100—250 目) 来分离 CTP 和 CDP 的混合物。柱为 1.2×7.5 厘米, 约 50 毫克含 55% CTP, 其余为 CDP 和盐的样品溶于 2 毫升 0.5N HCl 上柱, 用水洗脱, 每 10 分钟收集一管, 约 2 毫升体积, 在波长 $260m\mu$ 下测 O. D. 所得结果如图 6 所示, 经纸层析鉴定, 第一个峰为 CTP, 纸层析纯, 第二个峰为 CTP 和 CDP。

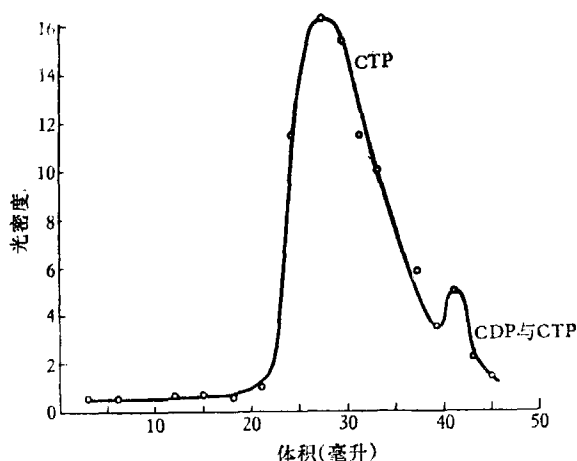


图 6 CTP 与 CDP 混合物的分离

上海生化所酶室应用我们生产的 G-10 (100—250 目) 来去除 ATP 钠盐中的无机磷。将 G-10 在 5mM Tris-HCl pH7.4 的缓冲液中膨胀后装柱 (1×150 厘米), 121mg ATP 钠盐 (含无机磷 20%) 溶于 1 毫升缓冲液中上柱, 并用此缓冲液洗脱, 分管收集, 分别测定波长 $260m\mu$ 下的 O. D.、无机磷和酸不稳定磷, 结果见图 7, 有效地去除了 ATP 钠盐中的无机磷。

上海生化所蛋白室应用我们生产的 G-10 (100—250 目) 来分离多肽混合物。将含五肽 (Val, Glu- γ OMe, Ala, Len, Tyr-OH) 2 毫克, AC-Tyr-Et 1 毫克和氯化钠 1 毫克的样品溶于 1 毫升, 1M 醋酸中上柱 (1×100 厘米), 用 1M 醋酸洗脱, 流速为 3.1 毫升/5 分钟, 分管收集,

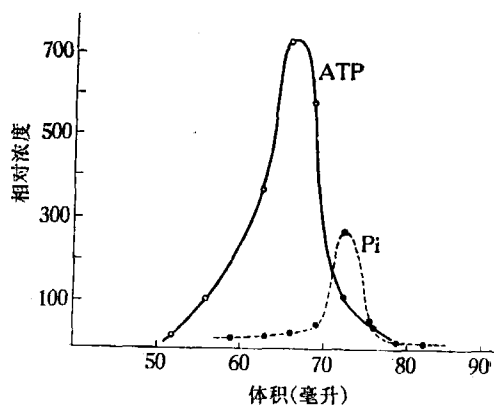


图 7 ATP 与无机磷的分离

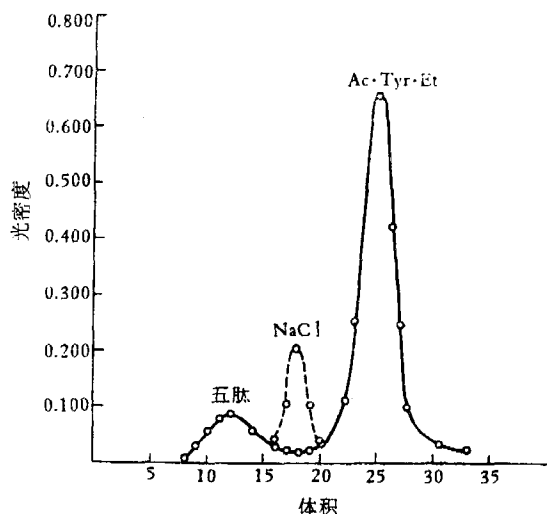


图 8 多肽混合物的分离

在 280 毫微米下测 O. D., 结果见图 8。五肽首先洗脱下来, 其次是氯化钠 (用硝酸银测定其 Cl^-), 而 AC-Tyr-Et 比盐后洗脱下来, 可能是因为它和凝胶有一定的吸附作用的缘故。国外, 应用相同类型的产品进行分离提纯等工作, 取得很好的效果, 例如:

S. F. Contractor^[5] 等应用 G-10 去除鼠和人尿中的无机盐和尿素, 从而得到回收率很高, 约 $>80\%$ 的 5-羟色氨酸和 5-羟色胺, 较之原来用尿酶处理去除尿素和电泳层析去盐的方法回收率要高得多。

H. E. Oberlander^[6] 等用 G-10 脱盐提纯 Fulvic acid, 去除其中的盐和杂质如有机铁、 $P_2O_7^{4-}$ 、氯化钠等。

Kundun^[7] 等用 G-10 来拆分顺、反式丁烯二酸及丁烯酸和异丁烯酸等异构体。

Megzasoma^[8] 等用 G-10 来分离多种核苷酸的碱基、核苷和核苷酸,其分离效果很好。

参 考 资 料

- [1] Flodin, P.: "Dextran gels and their applications in gel filtration". Pharmacia Uppsala. Sweden. 1962.
- [2] 戎积圻: "珠状交联葡聚糖凝胶 G-25 的生产" 中国科学院生化研究所东风生化试剂厂资料。
- [3] Pharmacia Fine Chemicals "Sephadex: Gel filtration in theory and practice", Sweden. 1962.
- [4] Dawson, R. M. C., Daphnee. Elliott, W. H. Elliott, K. M. Jones: "Data for Biochemical Research", Oxford. 1969.

- [5] Contractor, S. F. and Patricia Jomain: "The use of Sephadex G-10 in the removal of inorganic salts and urea from rat and human urine prior to chromatography of 5-hydroxyindole metabolites", *Clin. Chim. Acta* 14(4), 535, 1966.
- [6] Oberleander, H. E. Stadler, I. and Roth, K.: "Desalting of fulvic acid solution by gel filtration", *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 234(2), 124, 1968.
- [7] Kundun, N. Maenza, F.: "Simple method for the separation of suitable cis-trans isomers. Gel filtration with Sephadex", *Natur wissenschaften*, 57(11), 544, 1970.
- [8] Megzasoma, I. & Farina, B.: "Separation of bases, nucleosides, and nucleotides on dextran (Sephadex G-10) Columns", *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 42(20), 1449, 1966.

简 讯

无公害农药——氨基酸和脂肪酸

已发现 N-月桂酰·L-异戊氨酸可防治稻瘟病。这为研究无公害农药开辟了一个新方向。氨基酸和脂肪酸作农药,有下列优点:容易为微生物分解,无残毒,不污染环境;因为它们都是构成生物体的物质,因此无急性毒害。又因为这类物质是土壤微生物的营养物,所以,有可能改良土壤。

免疫荧光技术在兽医诊断上的应用

将已知抗体(或抗某种传染病的血清),用荧光色素处理,使它们相互结合。然后用与荧光色素结合的抗体,对未知抗原(或病原体)进行染色。如果抗原和抗体之间存在特异性,在紫外线显微镜下可观察到特殊的荧光,从而鉴别出未知抗原。

这种技术可以广泛地应用于兽医工作中,诊断由病毒、原虫和寄生虫引起的疾病。它的优点是准确、迅速、设备简单、操作不复杂,适合于大批样品的检查。