

表 3 琼脂-盐水滴-银丝电极封闭系统中电导值的变化

管 次	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均	σ_{n-1}	C. V.
电导值($\times 10^{-2} \Omega^{-1}$)	4.2	4.2	4.1	4.2	4.1	4.2	4.2	4.1	4.2	4.2	4.17	4.830×10^{-2}	1.16%

注: DDS-11 型电导仪测试;样品: 9% 蔗糖水细胞悬液

表 4 细胞电泳稳定性测试

管 次	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均	σ_{n-1}	C.V.
速度 ($\mu\text{s}/V/\text{cm}$)	4.189	4.113	4.138	4.064	4.237	4.026	3.933	4.088	3.959	4.054	4.080	0.095	2.33%

注: 2000 万醛化绵羊红细胞/ml 9% 蔗糖水;测试深度 $X = 0$;每管测 10 个细胞,显微镜放大 $20 \times 2.5 \times 1.7$ 。

径。这表明方程 (3) 的系数 a 仅与样品有关,与管深无关。方形毛细管的“静止层”在 $X_1 = 0.80$ 处^[1]。分别以 $X_1 = 0$ 和 0.80 代入方程 (3) 中,即得 $\bar{V}_{\text{中心}} = y(0) = a$, 而 $\bar{V}_{\text{壁}} = y(0.80) = 0.36a$, 因此

$$\bar{V}_{\text{壁}} = 0.36 \bar{V}_{\text{中心}}$$

故若知道其中之一,即可求出另一个。

毛细管必须密封严密,否则引起微漏,造成测试管中的细胞漂移;同时,电极密封系统的适当装配也很重要,否则会引起电学参数的波动(用电导值等参数的变化表示),影响测试的稳定性。

我们采用了琼脂-盐水滴-银丝电极封闭系统(图 2)。做法是:先制成两块厚薄均匀的琼脂板,一块厚 4 毫米,一块为 2 毫米(2% 盐水配制成 2% 的琼脂)。装满细胞悬液的毛细管,将一端先插进厚琼脂板上,装上琼脂密封,再将另一端插进薄琼脂板上,故毛细管两

端(各约进 2 毫米琼脂)被密封了。将密封的毛细管放到测试架上,将管两端滴上 2% 的盐水,银丝电极也浸泡在盐水中,然后置于显微镜上测试。

这种封闭法,因为不用塑料套管^[1],毛细管两端如有空气泡滞留,很容易被发现,便于检查密封效果。故此既保证了毛细管两端的密封效果,又保证了两端电极的良好接触。经这样密封后,电导值变化很小(表 3)。

根据我们多次实验,用塑料琼脂套管密封方形毛细管测试结果,C. V. 值可达 5% 左右。而采用了琼脂-盐水滴-银丝电极密封系统,观察层选在毛细管中心,并选择适当放大倍数的显微镜,细胞电泳测试的稳定性大大提高,C. V. 值达 3% 以下(见表 4)。

参 考 文 献

[1] 上海第一医学院生物物理教研组等:《医学科研资料》,1975 年,86—95 页。
[2] Ambrose, E. J.: Cell Electrophoresis, 1965.

[本文于 1979 年 5 月 21 日收到]

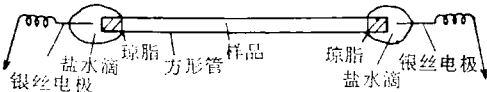


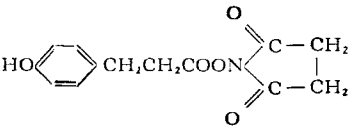
图 2 琼脂-盐水滴-银丝电极封闭系统示意图

3-(4-羟基苯基)-丙酸-N-羧琥珀酰亚胺酯的合成

王 菊 君

(中国科学院生物物理研究所生化试剂厂)

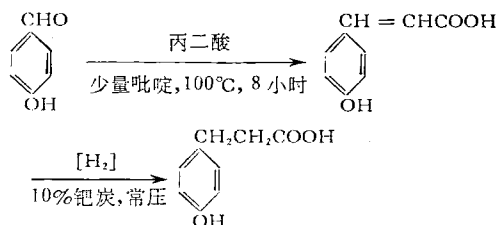
3-(4-羟基苯基)-丙酸-N-羧琥珀酰亚胺酯, [N-Succinimidyl 3-(4-Hydroxyphenyl)-Propionate, 简称 HPNS]。分子式: $C_{13}H_{13}NO_5$, 分子量: 263.25, 化学结构式:



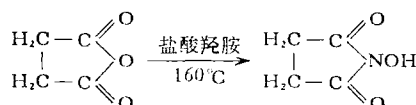
HPNS 试剂, 是一个酚类的化合物, 它可以像蛋白质中的酪氨酸一样被碘化, 作为碘化的载体与蛋白质相结合。七十年代开始, 它被应用于放射免疫测定, 在生物学和医学研究中, 受到人们重视。例如, 在临床上, 用于心肌梗塞疾病的诊断。其特点是蛋白质本身不直接与 ^{125}I 溶液或碘化反应所用的试剂接触, 从而克服了 ^{125}I 直接标记蛋白质和多肽的置换标记法产生的“碘化损伤”, 适用于标记在碘化反应时特别敏感易受损伤的蛋白质(或半抗原), 碘化那些不含酪氨酸(而含脂肪族的氨基酸)的蛋白质、多肽或半抗原, 或标记酪氨酸以外的基团。本文主要介绍此试剂的制备方法。

一、合成路线

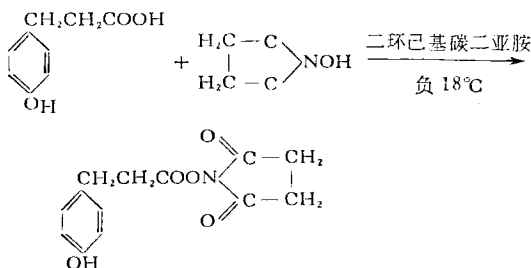
1.



2.



3.



二、合成实验操作步骤

1. 对羟基苯丙烯酸的制备 将 24.4 克对羟基苯甲醛, 24.8 克丙二酸, 2.5 毫升吡啶一起加入装有搅拌器的 250 毫升三颈瓶中, 边搅拌边水浴加热, 保持浴温 100°C , 反应 8 小时。反应完毕, 用碳酸钠水溶液中和至 pH 7—8, 继续水浴加热, 浴温 85°C 左右。稍冷后, 过滤。滤液用浓盐酸调至 pH 3 左右, 析出白色沉淀。放置, 过滤、水洗得微黄色固体。收率 76%, 熔点: $201\text{—}205^\circ\text{C}$ 。

2. 对羟基苯丙酸的制备 将 4.92 克对羟基苯丙烯酸溶于 70 毫升 95% 二氧六环和水混和溶剂中, 加入 10% 钯炭 3 克, 室温下, 进行常压氢化。磁力搅拌, 直到吸收氢气至理论值, 停止氢化, 滤去催化剂,

减压蒸去溶剂。残渣中加入适量的水(如有固体析出, 滤去固体), 冷却后用乙醚分次提取。合并提取液, 蒸去乙醚, 得粗品。用水重结晶, 活性炭脱色, 得白色结晶。收率: 40—50%, 熔点: $121\text{—}123^\circ\text{C}$ 。

3. N-羟琥珀酰亚胺合成 将琥珀酸酐 100 克与盐酸羟胺 71 克均匀混合于 1,000 毫升装有减压装置的三颈瓶中, 油浴加热, 形成挥发性产物, 抽真空排除, 收集到用干冰冷却的接受瓶中。迅速加热, 当内温升至 110°C 时开始熔化, 产生气体, 保持温度在 $110\text{—}120^\circ\text{C}$, 反应 1 小时 20 分钟。后将温度缓慢升至 160°C , 停止加热。当内温降至 125°C 时, 将此溶液倒入 400 毫升无水乙醚中, 边倒边搅拌, 放置, 澄清后, 倾去醚层。残渣加入 400 毫升正丁醇, 加热至沸, 滤去不溶物, 滤液迅速冷却到 0°C , 析出结晶。1 小时后, 将滤出结晶, 依次用正丁醇, 无水乙醚小心洗涤得白色结晶。

上述结晶用 360 毫升热的乙酸乙酯(6 毫升/克)简单处理一下, 趁热过滤, 残渣再重复处理, 滤液放置过夜, 析出白色结晶, 收率: 50% 左右。经醋酸乙酯、异丙醚重结晶, 熔点: $90\text{—}95^\circ\text{C}$ 。

4. 3-(4-羟基苯基)-丙酸-N-羟琥珀酰亚胺酯的制备

将 1.661 克对羟基苯丙酸和 1.151 克 N-羟琥珀酰亚胺溶于 7 毫升四氢呋喃中, 冷却至零下 18°C , 加入 2.475 克二环己基碳二亚胺, 保持零下 18°C , 搅拌两小时, 然后室温放置 4 小时, 加入 0.12 毫升醋酸(98%)破坏过多的碳二亚胺。1 小时后, 用 10 毫升醋酸乙酯稀释, 滤去二环己基醚(约 2.6 克), 用醋酸乙酯洗涤。合并洗液和滤液, 减压蒸去溶剂, 残渣溶于 20 毫升醋酸乙酯, 再加入适量石油醚(沸点: $30\text{—}60^\circ\text{C}$)反复重结晶, 得白色结晶。熔点: $131\text{—}132^\circ\text{C}$, 收率 27%。

三、产品的分析和鉴定

我们对合成的产品进行了一般的理化性质分析及鉴定: 3-(4-羟基苯基)-丙酸-N-羟琥珀酰亚胺酯为白色结晶; 溶于醋酸乙酯、二氧六环、苯中, 不溶于水和石油醚; 用毛细管法测得的熔点为 $131\text{—}132^\circ\text{C}$; 能够被碘化; 可以结合蛋白。

元素分析*结果表明碳、氢、氮三种元素的实际百分含量与理论值基本一致, 各元素的实际值(理论值)如下:

碳:	59.99%	(59.32%)
氢:	5.25%	(5.00%)
氮:	5.23%	(5.32%)

薄层层析见图 1 在紫外光下呈单一的紫色斑点。 R_f 为 0.67。

* 承中国科学院化学研究所协助测定。

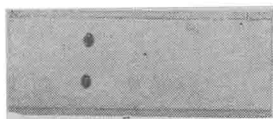


图1 HPNS (两个样品)薄层层析谱
(箭头分别为点样线和前沿线)

载体: 硅胶 GF (试销产品, 上海荧光化学厂 1960 年生产)。

溶剂系统: 醋酸乙酯、甲醇 (3:1 体积/体积)。

碘标记及与蛋白结合试验: 粗产品经 401 所同位素研究室初步试验, 碘标记比度最高为 1,600 微居里/微克。碘化酯与肌红蛋白结合, 最高结合率为 30%。

通过上述分析鉴定, 此试剂各项指标合乎要求, 质量良好, 可供有关单位试用。

四、讨 论

J. Rudinger 等人得到的初产品熔点为 120—122℃, 含有少量对羟基苯丙酸, 须用异丙醇、水混合溶剂精制, 方能得到纯品, 熔点: 129℃。本厂采用醋酸乙

酯和适量的石油醚分步结晶方法, 得到的 HPNS 白色结晶熔点为 131—132℃, 无须再用异丙醇、水精制, 手续简便, 质量较好。

N-羟基琥珀酰亚胺, 熔点为 90—95℃, 在真空干燥器中放置, 发现熔点有变化, 此现象有待进一步研究。但不影响下步合成。

氢化反应时间较长。如条件许可, 改为中压氢化, 可能效果更佳。

用对羟基苯甲醛为原料, 经四步合成 HPNS 试剂, 产品质量较好, 但总收率较低, 有待进一步改进。

主要参考文献

- [1] Pandya, K. C. et al.: *Proc. Ind. Acad. Sci.*, 4A, 140, 1936.; C. A. 30, 8149, 1936.
- [2] Schmir, G. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 81, 2228, 1959.
- [3] Anderson, G. W. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 1839, 1964.
- [4] Rudinger, J. et al.: *Biochem. J.*, 133, 538, 1973.

[本文于 1979 年 6 月 25 日收到]

定量“指印分析”用高压电泳仪

周 德 明

(中国科学院动物研究所)

A. M. Katz (1959) 采用过一种高压电泳装置, 是借助有机溶剂散热的。美国 Savant 仪器公司生产的高压电泳仪, 属于这一类型。D. Gross (1961) 等研制的强制冷却型, 散热效率好, 可用较高的电压, 适于做快速定性分析; 又因为可容纳大面积滤纸, 还适于做双向电泳分析或“指印分析”(一种纸层析和纸电泳相结合的分析法的简称)。

前些年我们自行研制了一台高压电泳仪, 工作要求是要做定量的“指印分析”。这要求电泳槽能容纳大面积的滤纸外, 还要保证电泳时滤纸的工作面积不能接触任何固体物。后一点市售的 Katz 式仪器也难做到, 因为仪器中滤纸是靠一个 A 型支架来支撑的。潘家秀等 (1962) 介绍过一种克服困难的办法, 但操作过于麻烦, 而且滤纸利用率只有 40%。此外, 因缓冲液一相高, 一相低, 往往对样品造成冲刷, 影响分离效果。针对上述问题, 我们一一采取了对策, 成功地解决了大面积滤纸的水平张挂问题, 满足了定量“指印分析”的要求。关于“指印分析”法在分子生物学研究工作中的应用, 请参见 V. M. Ingram (1963) 的著作。

此外, 我们的仪器也能用于核酸解码的研究工作。请参见 F. Sanger (1965) 的介绍。

仪器的结构与特点

仪器由高压整流器与电泳槽两个主要部件组成。

一、高压整流器:

由图 1 可见 220 伏交流电先经调压器 B_1 控制, 然后输送到升压器 B_2 , 它所输出的交流高压经四个小型二极管 (如用晶体二极管代替, 可省去图中的灯丝变压器) 所组成的桥式电路整流。最后, 经 π 形滤波后输出 0—3 千伏 100 毫安直流。满载时其脉动系数不大于 3.5%。

电路中的千伏表可以指出整流器输出的高压千伏值, 也可以用来测定工作时电泳滤纸上的电势梯度伏/厘米值。

二、电泳槽:

图 2 是工作时电泳槽的纵剖视图。由图 2 可见, 电流经馈电电极 13 输送到碳电极 4, 再经缓冲液池中