

5-碘吲哚酚 [3] 苯基磷酸酯的 合成及应用

韩刚毅

(济南军区军事医学研究所, 济南)

提 要

本文利用苯基氧氯化磷和 N-乙酰-5-碘吲哚酚 [3] 为原料, 建立了 5-碘吲哚酚 [3] 苯基磷酸酯铵盐的合成和纯化方法。并报道该产品的紫外光谱、红外光谱、元素分析等理化性质, 以及作为酶底物的应用情况。实验结果说明, 合成的产品经提取和重结晶可达到层析纯。氢、氮、碳元素分析数据与理论结构计算值相符。产品在常温条件下保存两年以上无结构变化, 受酶催化的专一性好, 能用于磷酸二酯酶分析和组织化学研究。

关键词 5-碘吲哚酚 [3] 苯基磷酸酯的合成, 5'核苷酸磷酸二酯酶, 磷酸二酯酶 I

目前应用的检测磷酸二酯酶 I (PDEI) 底物主要有三大类: 寡核苷酸类、双对硝基苯酚磷酸酯类和 5'-核苷酸衍生物类。其中寡核苷酸类合成复杂、成本高、检测效果差, 而双对硝基苯酚磷酸酯缺乏必要特异性, 不适用于区分 PDE I 和 PDE II (磷酸二酯酶 II)。5'-核苷酸与呈色基团定位缩合的衍生物类是应用较为广泛的磷酸二酯酶 I 底物^[1-3]。1975年 Kelly 等曾报道苯基磷酸单酯可以用于 PDE I 的特异性鉴定, 并认为此类底物较核苷酸类衍生物成本低, 有一定的实用价值^[4,5]。本文将介绍有关 5-碘吲哚酚 [3] 苯基磷酸单酯铵盐的合成方法及作为 PDE I 底物的应用情况。

材料与方 法

磷酸二酯酶 I (蛇毒): 西德 Boehringer

产品 (1 mg/ml); 磷酸二酯酶 II (猪脾): 上海细胞生物研究所产品(冻干品); 4-甲基伞形酮-5-胸腺嘧啶核苷磷酸二酯铵盐 (MUT) 由本实验室合成^[6]。

苯基氧氯化磷 (PhPoCl₂) 按照 Ye 等 (1962) 方法合成^[7]。bp 137—138°C/15 mm, 260—263°C/760 mm(未校正)。经水解后鉴定苯基磷酸(PhPo(OH)₂) 为层析纯, m.p 160—163°C, 红外光谱 (IU): 2727, 2226, 1438, 1145, 1017, 941, 755, 695 cm⁻¹ (KBr 池)。

N-乙酰-5-碘吲哚酚 (N-AcII) 按照 Rabiniger 等^[8] Holt 等^[9]法合成, 经一次重结晶, mp 191—193°C IU: 1713, 1673, 1455, 828, 655 cm⁻¹ (KBr 池)。

5-碘吲哚酚 [3] 苯基磷酸单酯铵盐 (5-IIPh) 的合成方法: 在 250 ml 磨口烧瓶中加入

2 王素娟等, 中国海洋湖沼学会第三届代表大会暨学术年会论文集汇编, 生物部分(植物) 1979: 401

3 Preiss J *et al.* *J Biol Chem*, 1962; 237: 309

4 Nakada H I *et al.* *J Biol Chem*, 1967; 242: 845

5 Fukuda M *et al.* *Biochem Biophys Soc*, 1968; 159: 215

6 Fukuda M *et al.* *J Biochem*, 1969; 65:2

7 中山大学生物系生化微生物教研室、生化技术导论. 北京: 人民教育出版社, 1978: 52

8 齐义鹏. 纤维素酶及其应用. 成都: 四川人民出版社, 1980: 90

9 张树政等. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1984: 626

[本文于 1989 年 5 月 20 日收到]

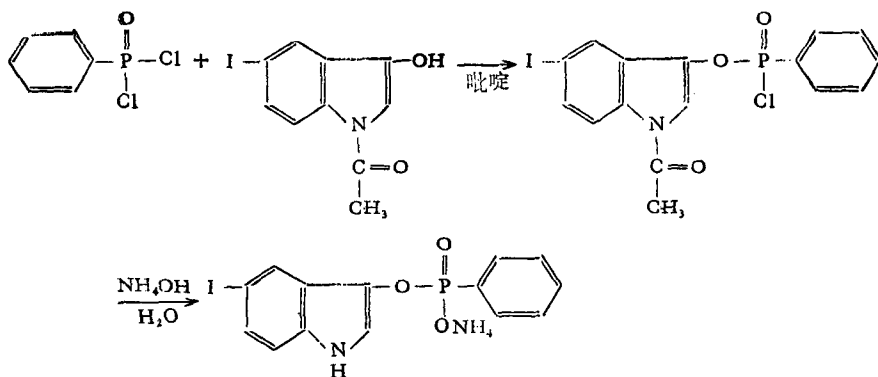
入 80 ml 干燥吡啶,冰浴和不断搅拌下滴加入 2 ml PhPOCl_2 (12 mmol/L) 和 2 ml 二甲基甲酰胺 (DMF), 搅拌 10 分钟后, 加入 2g N-乙酰-5-碘吲哚酚 [3] (6.6 mmol/L) 干粉, 撤去冰浴, 室温继续搅拌反应 10 小时以上。减压蒸馏去除溶剂, 向油状残余物中加入 100 ml 苯, 摇动片刻, 冰浴条件下逐渐加入 100 ml 冷 6 mol/L HCl 。剧烈摇动使充分混合后静止分层, 分离出苯后, 水层再用苯提取 3 次 (苯用量分别为 100, 80, 50 ml), 合并 4 次苯提取液, 过滤后减压蒸发至残余物呈油状物或结晶。冰浴条件下向其中加入 80—100 ml 冷却的 7 mol/L NH_4OH 。室温搅拌 2 小时。将黑色混浊液体

减压蒸发干, 用乙醚抽取残余物 2—3 次 (50 ml/次), 弃去醚层。再将残余物减压蒸发成结晶状, 加入 20 ml 丙酮并略加热使结晶溶解, 过滤弃去不溶物。向丙酮滤液中加入等量的乙醚至析出白色沉淀。静置 24—48 小时, 抽滤收集结晶, 用少量冷丙酮洗涤结晶 2—3 次, 室温干燥后称重。以 N-乙酰-5-碘吲哚酚 [3] 计得率约为 55—65%。

将淡黄色结晶粗产物溶解于甲醇, 用乙醚重结晶, 回收率约 80—85%。

产物鉴定

5-碘吲哚酚 [3] 苯基磷酸酯铵盐的合成反应原理为:



层析性质: 采用新华 1 号定性滤纸 (15×20 cm), 将产品及相应的原料分别经 3 种展开剂上行层析。A 展开剂: 异丙醇: 水: 浓氨水 = 80:20:0.2 (V/V)。B 展开剂: 正丙醇: 水: 浓氨水 = 70:20:10 (V/V)。C 展开剂: 乙醇: 1 mol/L 醋酸铵 (pH 7.0) = 80:20 (V/V)。各样品经 3 种展开剂层析后均为单一斑点。计算其 R_f 值见表 1。

元素分析: $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{PI}$ 的理论值为: %C 40.39, %H 3.39, %N 6.73。采用美国产 Perkin Elmer 240-C 元素分析仪实际测定数值为: %C 39.68, %H 3.31, %N 6.97。

紫外光谱: 采用日本产岛津 Shimadzu UV-3000 光谱仪测定 5-IIPh 的水溶液在 360—190 nm 区域的紫外吸收光谱见图 1, 在 238 及 290 nm 处有两个强吸收峰,

表 1 产品和原料的层析 R_f 值 $\pm SD(n)$

样 品	$\text{PhPO}(\text{OH})_2$	5-IIPh	N-AcII
A 展开剂	$0.45 \pm 0.01(8)$	$0.88 \pm 0.01(13)$	$0.94 \pm 0.02(6)$
B 展开剂	$0.39 \pm 0.02(8)$	$0.91 \pm 0.01(13)$	$0.95 \pm 0.01(6)$
C 展开剂	$0.44 \pm 0.01(7)$	$0.87 \pm 0.01(13)$	$0.93 \pm 0.01(6)$

层析环境温度: $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$

$$\frac{\text{OD}_{238}}{\text{OD}_{290}} = 2.74。$$

红外特征: 采用美国产 Nicolet 20 SX、FT-IR 傅里叶变换红外分析仪测定产物的红外特征吸收频率为: 3293 (三重峰)、2768 (扁平峰)、1438 (四重峰)、1187, 1142, 1058, 844, 603, 511 cm^{-1} 。

熔点测定: 经实际测定证明该产物无准确熔点, 加热至 170—185°C 时分解。

产品的稳定性: 产物在室温干燥环境中保存2年未发现明显的理化性质改变。溶于50 mmol/L Tris (pH 9.0) 缓冲液中, 4°C 下, 至少可保存2个月。

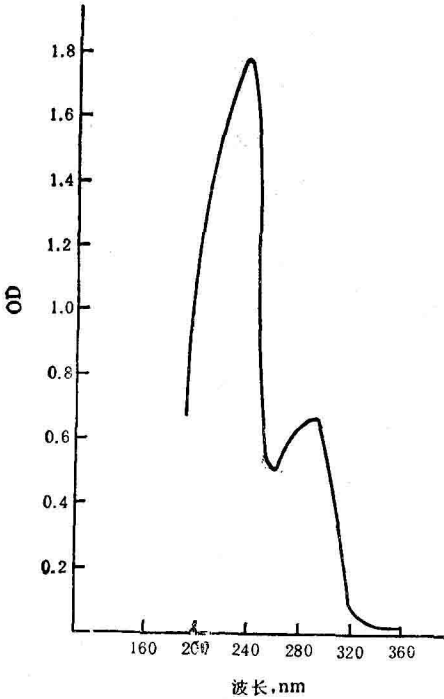


图1 5-IIpPh 水溶液的紫外吸收光谱

作为酶底物的反应特征: 将产品用双蒸水配成0.2 mg/ml 的溶液。取试管4支, 2支加入4ml 产品溶液和0.1 ml 1 mol/L Tris (pH 9.0), 另外2支加入4 ml 产品溶液和0.1 ml 1 mol/L NH₄Ac (pH 5.6)。在加有 Tris 缓冲液的一支试管内加入0.3 ml 10 μg/ml PDEI。在加有 NH₄Ac 的一支试管中加入0.3 ml 100 μg/ml PDE II。另外两支试管分别作为相应的对照管。将所有试管都于37°C 温育15分钟, 冷却后再向每一支试管中加入2ml 乙醚, 观察乙醚层中颜色变化情况。实验结果显示, 在加有 PDEI 的试管内醚层中有明显可见的蓝紫色出现, 并随着温育时间延长, 颜色逐渐加深。而加有 PDE II 的试管和其他对照管经温育12小时后仍为阴性。说明产物能被 PDE I 水解而不受 PDE II 的作用。

电泳凝胶中的 PDE I 检测: 按照文献 [8] 的方法进行连续的聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳 ($T = 7\%$ 、 $C = 5\%$)。每个样品槽内分别加入适量的酶和含0.01% 的溴酚蓝饱和蔗糖溶液。经2—3小时电泳, 取出凝胶板, 在1 mg/ml 5-IIpPh/50 mmol/L Tris-1 mmol/L MgCl₂ 显色剂中, 37°C 浸泡10小时后, 观察 PDE I 显色情况。同时以 MUT 显色剂作对照试验显色, 比较底物显色灵敏度。结果见图2。

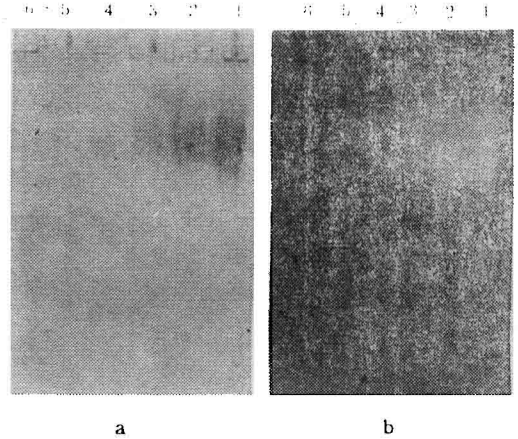


图2 PDEI 的电泳图谱

(a) 5-IIpPh 显示 (b) MUT 显示
1—6 槽内 PDEI 量分别为: 1.98, 1.33, 0.67, 0.33, 0.133, 0.066 μg

酶组织化学中的应用: 用50 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)-1 mmol/L MgCl₂ 缓冲液将产品配成5 mg/ml 浓度的显色剂。在经冷冻切片并用冷丙酮固定后的兔肾皮质切片 (3 μm) 上滴加1—2滴 5-IIpPh 底物显色剂, 37°C 湿盒温育1—2小时。即可在高倍显微镜下观察到酶底物分解出的紫罗蓝色。主要着色部位在肾小管的细胞浆中, 肾小球区域基本无着色。

讨 论

吡啶酚类苯基膦酸酯的合成及有关性质至今在国内外未见报道。本实验室利用苯基氧氯化膦和N-乙酰-5-碘吡啶酚 [3] 为原料, 建立了合成5-碘吡啶酚 [3] 苯基膦酸酯铵盐的方法,

(下转第317页)

RNA-RNA 杂交分子的稳定性高于 DNA-RNA 杂交分子,并且简便易得的 RNA 探针比寡聚核苷酸探针长得多,这就有利于使用严格的杂交条件。

垂体中 POMC mRNA 含量用杂交后放射自显影的光密度值表示。通常控制放射自显影的曝光时间(一般 1 至 4 天)使影像最大密度不超过 1.0 OD,此范围内我们所用 X 光片上的影像光密度与放射性强度成较好的线性关系。测定结果显示垂体中叶与前叶 POMC mRNA 含量之比略大于 10,比 Civelli 等^[15]用液相杂交法得到的结果偏低,主要是由于前叶影像的光密度值很低而引入的误差。

放射性同位素 ³²P 发出的硬 β 射线能量高,散射比较严重。因此用 ³²P 标记的探针得到的杂交影像分辨率低,难以达到单个细胞水平。只有使用放射性同位素 ³H 标记的探针才可以获得高分辨率的影像,才可以在单个细胞水平

上观察特异 mRNA 的分布及变化。

参 考 文 献

1. Hudson P *et al.* *Endocrinology*, 1981; 108: 353
2. Siegel R E, Young W S. *Neuropeptides*, 1985; 6(6): 573
3. Sherman T G *et al.* *J Neurosci*, 1986; 6(6): 1685
4. Chesselet M F *et al.* *J Comp Neurol*, 1987; 262(1): 125
5. Rogers K V *et al.* *Endocrinology*, 1987; 121(1): 90
6. Melton D A *et al.* *Nucleic Acid Res*, 1984; 12: 7035
7. Gee C E, Roberts J L. *DNA*, 1983, 2: 157
8. Kelsey J E *et al.* *J Neurosci*, 1986; 6: 38
9. Lewis M E *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 5419
10. Moriarty G C. *J Histochem Cytochem*. 1973; 21(10): 855
11. Moon H D *et al.* *Anat Rec*, 1973, 175(3): 529
12. Pelletier G *et al.* *Endocrinology*, 1977; 100(3): 770
13. Bloom F *et al.* *Life Sci*, 1977; 20: 43
14. Cox K H *et al.* *Dev Biol*, 1984, 101: 485
15. Civelli, O *et al.* *J Biol Chem*, 1982; 257(12): 6783

[本文于 1989 年 7 月 10 日收到]

(上接第 306 页)

并且对产品的某些理化性质及其在酶分析和组织化学中的应用价值进行了系统观察。上述实验结果说明:本实验室建立的 5-IlpPh 的合成方法稳定可靠,产品经提取和重结晶可达到层析纯标准。氢、氮、碳元素分析实际测定数据与理论结构计算值相符合。产品在常温条件下保存具有一定的稳定性。受酶催化特异性好,可以用于 PDEI 分析和组织化学研究。

目前用于检测 PDEI 的苯基磷酸单酯类底物主要有 4-硝基苯酚苯基磷酸酯(4-NPpPh)、4-甲基伞形酮苯基磷酸酯(MUpPh)和 2-萘酚苯基磷酸酯(2-NapPh)。其中 4-NPpPh 和 MUpPh 的水解产物易溶于水,因而只适用于 PDEI 的定量定性分析,不适合酶组织化学研究。2-NapPh 受酶作用分解出的 2-萘酚虽然可与固蓝 B 等结合呈色并原位沉淀。但因固蓝 B 类染料属重氮盐结构,在碱性溶液中很不稳定,易凝集而导致非特异性着色,所以其应用范围也受到限制^[11-13]。

吗啉酚是一类良好的显色基团,在氧存在

下可发生分子间偶联,形成靛蓝色沉淀。后者在光镜下呈现清晰的紫罗蓝色,在电镜下具有较高的电子密度。因此,5-碘吗啉酚[3]苯基磷酸酯铵盐的合成将为充实和发展 PDEI 的研究方法提供帮助。

参 考 文 献

1. Khorana HG. In: Boger RD *et al* eds, *The enzymes*, 2nd ed, New York: Academic Press, 1961; 5: 79—94
2. Razzell WE. In: Colowick Sp *et al* eds, *Methods in enzymology*, New York: Academic Press, 1963; 6: 236—258
3. 韩刚毅,解放军医学情报,1988;2(3): 133
4. Kelly SJ *et al.* *Biochemistry*, 1975; 14(22): 4983
5. Kelly SJ *et al.* *Biochemistry*, 1977; 16(6): 1102
6. 韩刚毅.生物化学与生物物理进展,1987;(2): 58
7. Ye ZG: *Organophosphorus monomers and polymers*. Chapter, London and New York: Academic Press, 1962: 93—140
8. Rabiger DJ *et al.* *J Heterocycl Chem*, 1970; 7: 307
9. Holt SJ *et al.* *J Chem Soci*, 1958; 4: 1217
10. 韩刚毅.中华医学检验杂志,1988;1: 8
11. Hawley DM *et al.* *Anal Biochem*, 1983; 129: 522
12. Kelly SJ *et al.* US Patent 4041111, 1977
13. 韩刚毅.化学试剂,1990;12: 42

[本文于 1989 年 6 月 16 日收到]