

5-(生物素丙烯胺基)-2'-去氧-5'-三磷酸尿嘧啶核苷的合成

北京医科大学药学院 童卫民 张礼和

北京医科大学肝病研究所 陈 萍

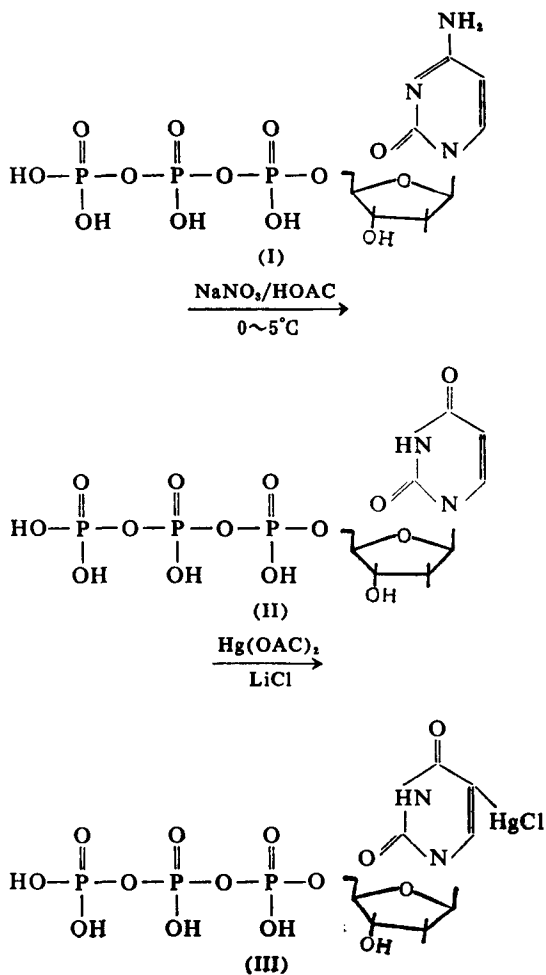
【摘要】 用 2'-去氧-5'-三磷酸胞嘧啶核苷为原料，经过四步反应合成 5-(生物素丙烯胺基)-2'-去氧-5'-三磷酸尿嘧啶核苷(Bio-dUTP)。产物结构经过紫外吸收光谱和核磁共振谱予以证明。

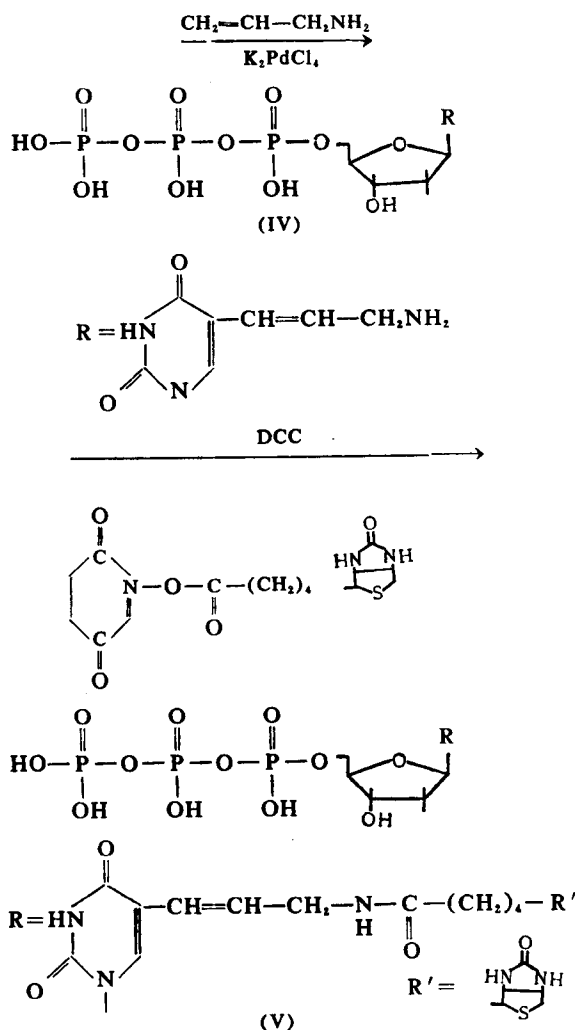
利用核苷酸的类似物作为探针组合到多聚核苷酸中去，已经成为生物医学研究和重组 DNA 研究的一个重要手段。生物素(Biotin)与抗生物素蛋白(Avidin)有很高的结合常数，因此利用含有生物素的核苷酸类似物作为探针就可以很灵敏地检测出微量的含抗生物素蛋白的核酸分子。

在肝炎基础研究中常用 ^{32}P 标记制备的 HBVDNA 探针来检测血清中的 HBVDNA。但由于 ^{32}P 半衰期短，价格昂贵，同时含有的硬 β -射线对实验者有一定的损害，使用很不方便。近年来 Leary⁽¹⁾ 利用 Bio-dUTP 为探针，创造了一种快速灵敏的酶标记反应显色技术，从而代替了 ^{32}P 标记的探针。但是目前国内还没有标准药箱。我们利用国内生产的 5'-三磷酸-2'-去氧胞嘧啶核苷为原料，参考 Langer⁽²⁾ 的方法合成了 Bio-dUTP。产物结构经光谱分析予以证明，用作探针检测血清中 HBVDNA 结果与国外进口产品一致。

合成中的关键原料 dUTP(II)，Langer 的文献中没有报道，我们用国产 dCTP(I)在醋酸溶液中，低温亚硝化脱胺基而得到，反应物中同时有部份脱磷酸产物(dUMP 和 dUDP)，dUTP 经 DEAE-纤维素柱分离纯制，dCTP(I)在 pH 2，pH 7 和 pH 12 时的紫外吸收光谱最大吸收峰分别为 280 nm，271 nm 和 271 nm，而 dUTP(II)在相应 pH 溶液中紫外光谱最大

吸收峰在 262.5 nm。用 FAB-MS 测定(II)给出 466 ($\text{M}^+ - 2\text{H}$)峰，从而确证了(II)的结构。





合成中的另一改进为化合物(IV)在 Langer 合成中用 HPLC 精制,我们改用通常的 DEAE-Sephadex A 25 柱,用三乙胺碳酸氢盐溶液梯度洗脱精制得到 (IV),经紫外吸收光谱和 ^1H NMR 予以证明,从而使得这一方法可以在一般实验室中较大量的合成。

实验部分

紫外吸收光谱用 DU-7 紫外分光光度计测出,核磁共振谱用 FT-80 A 90 兆周仪器,质谱用 VG-707 E 质谱仪测出。

1. 2'-去氧-5'-三磷酸尿嘧啶核苷 (II) 的制备:

200 毫克 (0.36 毫摩尔) 2'-去氧-5'-三磷酸胞嘧啶核苷三钠盐(I)溶于 3 毫升水中,加入

1.25 毫升冰醋酸,反应液在 -5°C 时,搅拌滴加 2.5 毫升 60% 亚硝酸钠溶液,滴加完毕后,反应液在 20°C 搅拌 4 小时,反应物低温抽干,残留物溶于水用 DEAE 纤维素柱分离 ($2.5 \times 30\text{ cm}$, HCO_3^-),用水和 0.7 摩尔三乙胺碳酸氢盐溶液梯度洗脱 (1000 毫升),在盐浓度为 0.55 当量时得到产物(II)的洗脱液,洗脱液浓缩及冷冻干燥得到 50 毫克(II),收率 25%。FAB-MS 466 ($\text{M}^+ - 2$), $\text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ (pH 2) 262.5 nm, (pH 7) 262.5 nm。

2. 5-丙烯胺基-2'-去氧-5'-三磷酸尿嘧啶核苷(IV)的制备:

50 毫克 (~ 0.1 毫摩尔) (II) 溶于 10 毫升 0.1 摩尔醋酸-醋酸钠缓冲液中 (pH 6.0), 加入 159 毫克 (0.5 毫摩尔) 醋酸汞,混合物在 50°C 搅拌 4 小时,反应液用冰冷却后,加入 40 毫克 (0.9 毫摩尔) 氯化锂,反应液用乙酸乙酯提取 10 次 (每次 10 毫升乙酸乙酯) 水层中加入过量的冷乙醇,化合物(III)即沉淀析出。冰箱放置后,沉淀离心分离,干燥后的沉淀再溶于 0.1 摩尔的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中 (pH 5) 使溶液的浓度为 200 O.D (UV 267 nm)/毫升,在以上溶液中慢慢加入丙烯胺溶液 (1.5 毫升丙烯胺加入 8.5 毫升冰醋酸中即成丙烯胺溶液,以上反应每 25 毫升反应液加入 3 毫升丙烯胺溶液),同时加入 K_2PdCl_4 溶液 (63 毫克 K_2PdCl_4 溶于 4 毫升水),反应物室温搅拌 24 小时,离心除去析出的金属,上清液用 DEAE-Sephadex A 25 柱分离, ($2.5 \times 52\text{ cm}$, HCO_3^-), 用 0.1~0.6 摩尔三乙胺碳酸氢盐溶液梯度洗脱共 1000 毫升,在盐浓度为 0.22 摩尔时得到化合物(IV) 8 毫克,收率 15%, $\text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 238, 283 nm, ^1H NMR (D_2O , δ): 2.68 (m, 2 H, $-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-$), 6.1 (s, H, C_1 , H), 8.17 (s, H, C_6H)。

3. 5-(生物素丙烯胺基)-2'-去氧-5'-三磷酸尿嘧啶核苷(Bio-dUTP)(V)的制备:

2 毫克(IV)溶在 2.5 毫升 0.1 摩尔硼酸钠缓冲液中 (pH 8.5), 加入 3.9 毫克生物素的

N-羟基琥珀酰亚胺酯和 1.5 毫升 DMF。反应物室温反应 4 小时后, 低温蒸干, 残留物用 DEAE-Sephadex A-25 柱分离(2.5×52 cm, HCO₃⁻), 用 0.1~0.9 摩尔三乙胺碳酸氢盐溶液梯度洗脱, 在盐浓度为 0.7 摩尔时的洗脱液低温浓缩后冷冻干燥得到 Bio-dUTP (V), 收率几乎定量, UV λ_{max}: 238.5 nm, 281.5 nm; ¹H NMR(D₂O, δ): 7.90(S, C₆H), 6.15(S,

C₁, H), 5.30 (m, $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ | \quad | \\ -\text{C}=\text{C}-\text{C}- \\ | \end{array}$), 3.59

(m, $\begin{array}{c} | \quad | \\ -\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2- \end{array}$) 2.20~2.0 (m, 生物素环上 H)。

参 考 文 献

1. Leary JJ, et al. Rapid and Sensitive Colorimetric Method for Visualizing Biotin-Labeled DNA Probes Hybridized to DNA or RNA immobilized on Nitrocellulose: Bio-blots. Proc Natl Acad Sci USA 1983;80:4045.
2. Langer PR, et al. Enzymatic Synthesis of Biotin-Labeled Polynucleotides: Novel Nucleic Acid Affinity Probes. Proc Natl Acad Sci USA 1981;78:6633.

THE SYNTHESIS OF 5-(3-BIOTINYLAMINO)ALLYL-2'-DEOXYURIDINE-5'-TRIPHOSPHATE (BIO-DUTP)

School of Pharmaceutical Sciences Tong Wei-min, et al

5-(3Biotinylamino) allyl-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate (Bio-dUTP) was synthesized by starting from 2'-deoxycytidine-5'-triphosphate. The structure of Bio-dUTP was identified by UV and ¹HNMR. Bioassay showed that this compound was efficient substrate for DNA polymerase.

我校郑麟蕃教授应邀参加 第一届世界预防口腔医学大会

第一届世界预防口腔医学大会于今年 7 月 6 日在巴黎举行, 三十多个国家的二百多位代表参加这次会议。代表们除口腔各学科的专家外, 还有儿童营养学和化学专家等, 这反映了预防口腔医学涉及多个学科, 具有广泛的学术领域。

应大会主席肖克博士(M. Schouker) 的热情邀请, 我校口腔病理学家、世界卫生组织专家咨询小组成员郑麟蕃教授作为我国唯一代表前往参加, 并作了“中国主要口腔疾病及其防治概况”的报告。报告中谈了我国城市和农村三级口腔保健网及各级口腔医学专门人材培养的情况, 并向代表们介绍了我校口腔医学院。代表们一致认为中国口腔保健事业的发展非常快, 今后的世界将属于中国。会下许多国家代表蕴酿, 希望第二届会议能在北京举行。大会讨论了今后口腔保健的战略问题, 一些代表还提出大量种植木糖以代替蔗糖进行防龋的建议。郑教授认为, 近几年我国口腔卫生保健事业发展很快, 但和发达国家相比, 还有一定差距, 还需要我国全体医疗卫生工作者的不懈努力。

(董维佳)