

聚(N-对丙烯酰氧基苯甲酰氧基)丁二酰亚胺的合成及其共聚物与血清蛋白的固定化*

陆承勋 顾忠伟 冯新德 王重庆 李德昌

(北京大学化学系)

(北京大学生物系)

摘 要

新的丙烯酸活性酯, N-(对甲基丙烯酰氧基苯甲酰氧基)丁二酰亚胺(MBOSu)及 N-(对丙烯酰氧基苯甲酰氧基)丁二酰亚胺(ABOSu)单体分别由对甲基丙烯酰氧基苯甲酸(MBA)、对丙烯酰氧基苯甲酸(ABA)与 N-羟基丁二酰亚胺(HOSu)在环己基羰二亚胺存在下经偶联反应合成。MBOSu及 ABOSu 容易进行均聚合及与 MBA 或 ABA 进行共聚合而得到相应的反应性聚合物。P(MBOSu-MBA)共聚物是一个较好的固定化蛋白质的载体。它极易与抗血清(驴抗人 A·B·O 混合血清)或正常人 A·B·O 混合血清反应, 形成一种具有较高免疫活性的固定化免疫吸附剂^[1]。

近十年来, 对于将反应性高聚物与具有生物活性物质如多肽、酶、抗原、抗体及核酸等之间通过共价偶联反应而得到固定化酶和固定化免疫吸附剂等的研究已有较多的报道^[2-4]。在反应性高聚物中, 关于分子中含有 N-羟基丁二酰亚胺的活性酯(简称 HOSu 的活性酯)的烯类单体的合成及聚合报道较少。Ferruti 等^[5]首先合成了甲基丙烯酸和丙烯酸的 HOSu 活性酯单体及其聚合物, 并研究了此反应性聚合物与胺化物的化学反应。Batz 等^[6]及 Winston 等^[7]分别研究了 ω -甲基丙烯酰氧氨基酸的 HOSu 活性酯类单体的合成及聚合。Batz 等还将葡萄糖氧化酶固定化至这类共聚物的载体上。我们合成了两种新的反应性烯类单体——对甲基丙烯酰氧基苯甲酸和对丙烯酰氧基苯甲酸的丁二酰亚胺的活性酯, 并研究了它们的聚合以及聚合物与胺和蛋白质的固定化。

实 验 部 分

原料

N-羟基丁二酰亚胺(HOSu): 按 Wuensch 等^[8]的方法合成, 产物经无水乙酸乙酯重结晶, 熔点 94—95.5℃(文献^[8]值: 97—98℃); 对甲基丙烯酰氧基苯甲酸(III_a, MBA): 按 Amerik 等^[9]方法合成, 粗产物的熔点为 170—176℃, 产率 64%, 经甲苯重结晶后为无色针状结晶, 熔点为 174—176℃(文献^[9]值: 167—169; 182℃^[10]), 核磁共振谱(DMSO-d₆):

* 1979年9月1日收到。

δ , 2.08 (单峰, 3H, CH_3); 5.86, 6.36 (双单峰, 2H, $\text{CH}_2=\text{C}$); 7.28, 8.10 (双偶峰, 4H, $-\text{C}_6\text{H}_4-$); 对丙烯酰氧基苯甲酸 (III_b , ABA): 参照 Amerik 等^[8] 方法合成, 粗产物的熔点为 169—184°C, 产率 62%, 先后用甲苯和无水乙醇重结晶, 得无色针状结晶, 熔点 196—198°C (文献^[10]值: 201°C), 核磁共振谱 ($\text{DMSO}-d_6$): δ , 6.12, 6.34, 6.60 (ABC 图形, 3H, $\text{CH}_2=\text{CH}-$), 7.25, 8.02 (双偶峰, 4H, $-\text{C}_6\text{H}_4-$).

单体的合成

N-(对甲基丙烯酰氧苯甲酰氧基)丁二酰亚胺 (IV_a , MBOSu)

在三口瓶中加入 5.8 克 (0.05 克分子) N-羟基丁二酰亚胺, 1.03 克 (0.05 克分子) 对甲基丙烯酰氧基苯甲酸和 150 毫升无水四氢呋喃, 搅拌使其成为均相溶液后, 用冰盐浴冷却使内温至 0—3°C, 再加入 10.3 克 (0.05 克分子) N, N'-二环己基脒二亚胺。先在 0—3°C, 后在室温下各反应 2 小时, 反应完毕, 吸滤, 除去 N, N'-二环己基脒的结晶物。将滤液倒至 630 毫升的正庚烷中, 则析出无色细微的粉末状物。经真空减压干燥后, 得熔点为 132—134°C 粗产物, 重 12.6 克。在甲苯和正庚烷的混合溶剂中重结晶后, 则得熔点为 137 的无色针状结晶物, 重 10.3 克, 产率 68%。IR (KBr): 1765 (内酰亚胺的 $\text{C}=\text{O}$ 基), 1730, 1155 (α , β -不饱和酯), 1630 ($\text{C}=\text{C}$ 双键), 1500, 1600 cm^{-1} ($-\text{C}_6\text{H}_4-$), NMR (CDCl_3): δ , 2.11 (单峰, 3H, CH_3-), 2.94 (单峰, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 7.29, 8.21 (双偶峰, 4H, $-\text{C}_6\text{H}_4-$), 5.84, 6.41 (双单峰, 2H, $\text{CH}_2=\text{C}$).

分析: $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N}$

计算值%: C, 59.41; H, 4.32; N, 4.62.

实测值%: C, 59.74; H, 4.34; N, 4.86.

N-(对丙烯酰氧甲酰氧基)丁二酰亚胺 (IV_b , ABOSu)

按合成 (IV_a) 相类似的方法, 用 9.6 克 (0.05 克分子) 对丙烯酰氧基苯甲酸及 100 毫升无水 DMF, 其余物均相同, 反应完毕后, 先过滤再真空蒸馏除去大部分 DMF, 随着将剩余物倒至氯仿及正己烷的混合溶剂中。所得无色粉末状物重 10.0 克, 熔点为 104—120°C。在氯仿和正庚烷混合溶剂中重结晶后, 则得熔点为 128 的无色透明针状结晶物, 重 7.3 克, 产率 50%。IR (KBr): 1770 (内酰亚胺的 $\text{C}=\text{O}$), 1735, 1160 (α , β -不饱和酯), 1620 ($\text{C}=\text{C}$ 双键), 1500, 1600 cm^{-1} ($-\text{C}_6\text{H}_4-$). NMR (CDCl_3): δ , 2.92 (单峰, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 6.05, 6.34, 6.68 (ABC 图形, 3H, $\text{CH}_2=\text{CH}-$), 7.36, 8.20 (双偶峰, 4H, $-\text{C}_6\text{H}_4-$).

分析: $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_6\text{N}$

计算值%: C, 58.12; H, 3.83; N, 4.84.

实测值%: C, 58.02; H, 4.02; N, 4.99.

聚合反应

在洗净烘干的, 具有进出气两个侧管的磨口聚合管中, 装入单体, 共聚单体, 引发剂及

溶剂后,通氮气约 10 分钟,再关闭进出气的侧管。将聚合管放入 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温槽中聚合 24 小时,然后开管,将聚合溶液缓慢地倒入适当的沉淀剂中,则析出相应的聚合物。聚合物经真空加热干燥至恒重 ($60-80^\circ\text{C}/15-20$ 毫米汞柱)。实验结果如表 1 所示。

表 1 MBOSu 及 ABOSu 的溶液聚合*

No.	A 单体(克)	B 单体(克)	AIBN (毫克)	DMF (毫升)	沉 淀 剂	聚合物 (克)	转化率 (%)	N(%)
7801	MBOSu (0.9997)	—	11	15	CHCl_3 -己烷	0.6710	67	4.95
7802	ABOSu (1.0000)	—	14	15	CHCl_3 -己烷	0.7356	74	4.89
7841	MBOSu (0.9989)	MBA (1.9998)	32	30	H_2O	2.8560	95	1.90
7842	MBOSu (0.9963)	MBA (0.9985)	21	20	H_2O	1.7449	87	2.34
7843	ABOSu (0.2250)	ABA (0.7515)	12	15	H_2O	0.4174	42	1.75

* 共聚合物均再经乙醇,乙酸乙酯浸泡后,再干燥至恒重。聚合温度: $60 \pm 1^\circ\text{C}$, 聚合时间: 24 小时。

胺解反应

称取 209.2 毫克的 P(MBOSu) 及 225.0 毫克的 P(ABOSu), 分别溶于 5 毫升 DMF 中, 再分别量入 1 毫升的正丁胺。在室温下反应 24 小时。然后各加入 50 毫升乙醚-正庚烷混合溶剂。前者立即析出沉淀物, 后者需放置 12 小时后才出现油状物。分离, 经真空加热干燥至恒重, 则得 125.6 毫克的聚(N-正丁基对甲基丙烯酰氧基苯甲酰胺) (VI_a), 转化率 70%; 89.8 毫克的聚(N-正丁基对丙烯酰氧基苯甲酰胺) (VI_b), 转化率 47%。

蛋白质的固定化

P(MBOSu-MBA) 与驴抗正常人 A·B·O 抗血清的偶联

取表 4 中编号为 7842 的 P(MBOSu-MBA) 共聚物 0.1 克, 加入 4 毫升抗血清(蛋白质质量 28.6 毫克/毫升), 室温下搅拌, 用 0.1N NaOH 维持反应液 pH 为 7.86, 当 pH 稳定不变时, 偶联反应完毕; 约需 2 小时。然后在低温下 (0°C) 离心分离(转速 4000 转/分), 将上清液置于容量瓶中, 稀释至刻度, 取定量的溶液进行透析后, 再测定未偶联的蛋白质质量。沉淀物先后经生理食盐水, pH2.4 甘氨酸-HCl 缓冲液和 7M 尿素洗涤离心, 洗至上清液无蛋白。合并洗涤液, 量总体积, 取定量的溶液透析, 测定其蛋白质质量。用 Folin-酚法测定抗血清之总蛋白质质量为 114.4 毫克, 未偶联蛋白质质量为 18.93 毫克, 洗涤液中的蛋白质质量为 7.66 毫克。故载体上偶联蛋白质质量为 87.81 毫克。即 1 克共聚物可结合 767 毫克蛋白质。如将本实验中所用的抗血清经相等体积的蒸馏水稀释一倍后, 则偶联蛋白质质量只有 46.50 毫克, 即 1 克共聚物只能结合 406 毫克蛋白质。

固定化免疫吸附剂对正常人 A·B·O 混合血清的免疫吸附, 洗脱及再生

(1) 吸附

取上述制取的 0.3 克固定化免疫吸附剂, 加正常人 A·B·O 混合血清 2 毫升, 在 37°C 搅拌半小时, 置冰箱过夜, 然后离心分离, 取上清液, 用双相免疫扩散法和对流免疫电泳法

测定未结合抗原的免疫活性。结果是抗原-抗体复合物所形成的沉淀线与血清在与免疫吸附剂结合前所形成的抗原-抗体复合物所形成的沉淀线相比,前者变得线而细。这说明血清中的抗原成份减少,大部分抗原被固定化免疫吸附剂所吸附。

(2) 洗脱

用每次为 10 毫升的生理食盐水洗涤固定化免疫吸附剂三次,加入 2.5 毫升 pH2.4 甘氨酸-HCl 缓冲液,在冰浴内不断搅拌半小时,离心分离,用 0.5 M Na₂HPO₄ 将上清液的 pH 调至中性。用双相免疫扩散法和对流免疫电泳法测定解脱的 A·B·O 血清中抗原成份的免疫活性。结果是抗原-抗体复合物形成的沉淀线较深。这说明此固定化免疫吸附剂具有较好的抗体活性,专一的结合了抗原,在改变 pH 值后,抗原便从固相免疫吸附剂上洗脱下来了。

(3) 再生

此免疫吸附剂的再生是依次用 7M 尿素,蒸馏水及生理食盐水洗涤数次,直至离心后,上清液已无蛋白质,即可将固相免疫吸附剂重复使用。

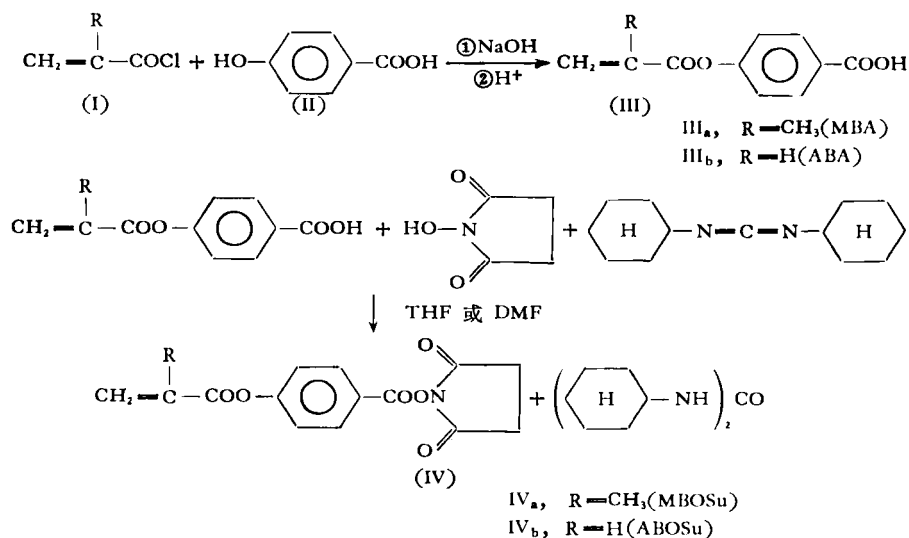
免疫活性测定系按常规的生化实验方法测定^[11]。按相类似的方法, P(MBOSu-MBA) 载体也能与正常人 A·B·O 混合血清进行共价偶联,所得的固相免疫吸附剂具有较强的抗原活性,它可用来分离、鉴定兔抗人胃癌血清中的抗体。

Sephrose-4B 与正常人 A·B·O 免疫球蛋白的溴化氰法的固定化

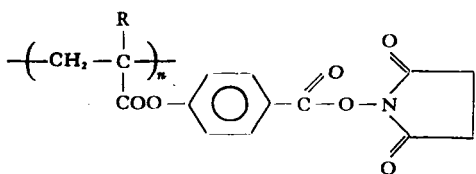
按张先扬等^[12]的方法制取。取 100 毫升 Sepharose-4B 载体,经 BrCN 活化后,加 2 克免疫球蛋白进行共价偶联。偶联率为 80%,即偶联蛋白质量为 1.6 克(W/V)。每克干重琼脂糖可偶联 0.4 克蛋白质。

结果和讨论

N-(对甲基丙烯酰氧苯甲酰氧基)丁二酰亚胺(IV_a, 简称 MBOSu)及 N-(对丙烯酰氧苯甲酰氧基)丁二酰亚胺(IV_b, 简称 ABOSu)是以对羟基苯甲酸(II)为起始原料通过下列两步反应合成:



单体 (IV_a) 及 (IV_b) 均是具有固定熔点的无色针状结晶体, 能溶于氯仿及乙酸乙酯等溶剂中, 它们的红外吸收光谱图 (IR) 见图 1 及 2。这两种单体在二甲基甲酰胺 (DMF) 中都容易进行聚合。以偶氮二异丁腈 (AIBN) 为引发剂, 在 60°C 聚合 24 小时后, 以氯



(V)

V_a, R = CH₃, P(MBOSu)V_b, R = H, P(ABOSu)

仿-正己烷混合溶剂为沉淀剂, 从 (IV_a) 和 (IV_b) 分别得到粉末状聚合物 (V_a) 及 (V_b), 两者的转化率各为 74 及 67%, 其特性粘度 $[\eta]$ 值 (在 DMF 中) 分别为 0.36 及 0.34 毫升/克 (25°C)。

聚合物 (V) 与单体 (IV) 在红外吸收光谱上的区别是: 前者在 1630 厘米⁻¹ 附近的

CH₂=CH— 及 CH₂=C< 碳碳双键吸收峰基本

上消失, 如图 1 及 2 所示。

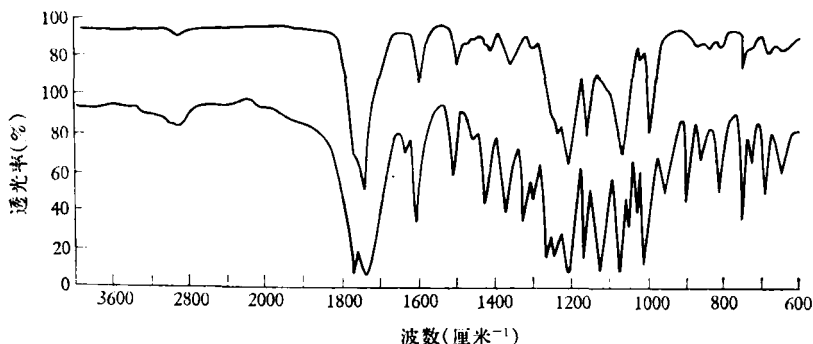


图 1 MBOSu(IV_a) 及其相应的 P(MBOSu)(V_a) 聚合物的红外吸收光谱图 (KBr)

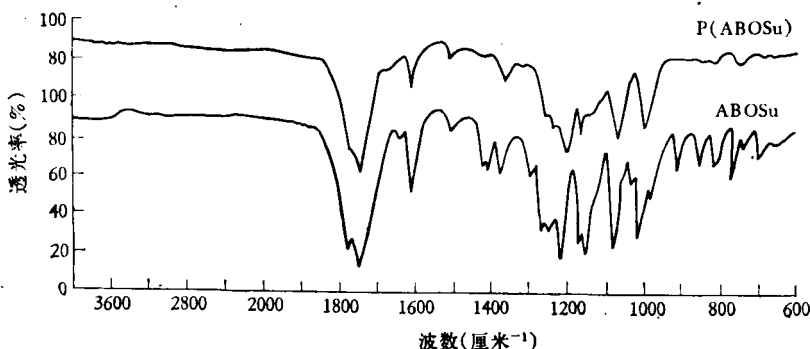


图 2 ABOSu(IV_b) 及其相应的 P(ABOSu)(V_b) 聚合物的红外吸收光谱图 (KBr)

聚合物 (V_a) 与 (V_b) 均能溶于强极性溶剂 DMF 和二甲基亚砷 (DMSO) 中, 不溶于正庚烷, 苯、甲苯、甲醇及乙醇中。不同处是 (V_a) 能溶于二氧六环而不溶于氯仿或乙酸乙酯, (V_b) 在这些溶剂中只能溶胀。

聚合物 (V) 是反应性高聚物, 其反应性是经其胺解反应产物的 IR 分析所证明; 聚合 (V_a) 侧链上的活性酯基团 (—COOSu) 在室温下极易与正丁胺反应生成相应的酰胺基团

的聚合物——聚N-正丁基对甲基丙烯酰氧基苯甲酰胺(VI),从反应物(VI)的IR图(图3)可清楚地看出在1765厘米⁻¹处的内酰亚胺的羰基特征吸收峰已消失,而在1645厘米⁻¹(第一吸收峰),1550厘米⁻¹处呈现强的—CONHR基的羰基吸收峰。

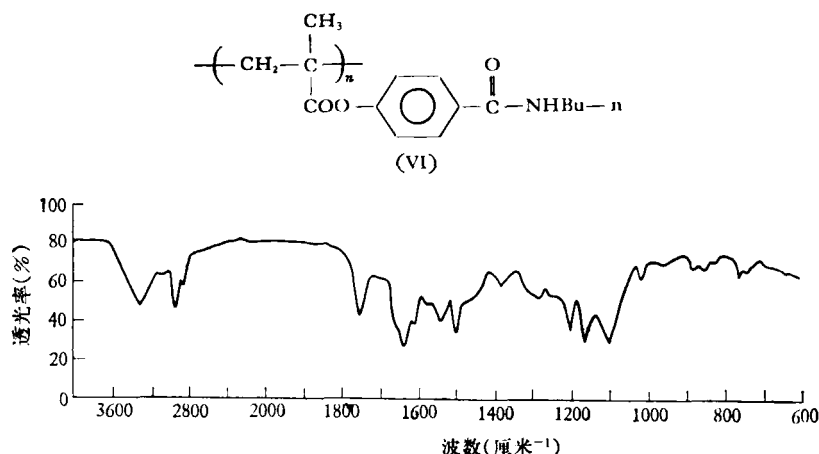
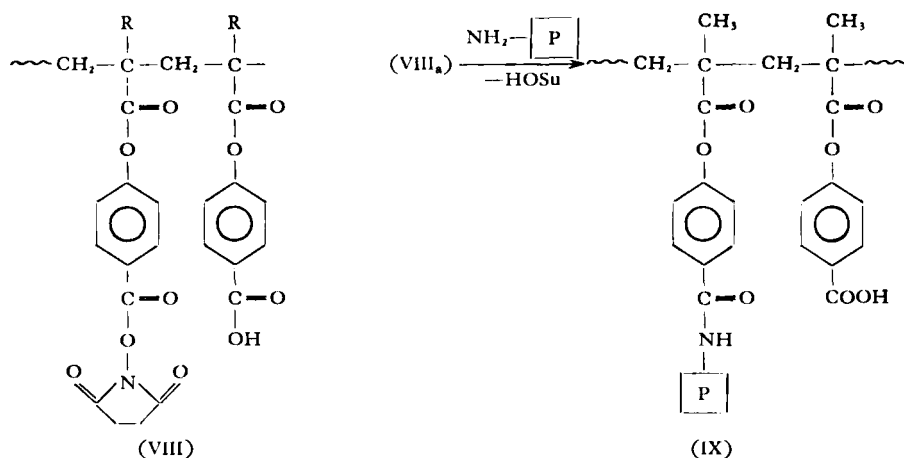


图3 聚N-正丁基对甲基丙烯酰氧基苯甲酰胺(VI)的红外吸收光谱图(KBr)

单体(IV)能与单体(III)很好地进行共聚合,从而得到具有较长而坚硬的(由苯环骨架引起的)“手臂”式高聚物(VIII)。



VIII_a, R—CH₃, P(MBOSu—MBA)

VIII_b, R—H, P(ABOSu—ABA)

共聚物(VIII_a)P(MBOSu—MBA)是一个较好的亲水性载体,在室温下其侧链上的—COOSu活性酯基团极易与蛋白质上的氨基发生偶联反应,生成相应的固定化蛋白质的高聚物(IX),当用(VIII_a)。共聚物(含氮量为2.34%,此共聚物的大分子链上MBOSu与MBA链节单元克分子比为1:2.3)与抗血清(纯化的驴抗人A·B·O血清的免疫球蛋白)或正常人血清于室温,在弱秆条件下反应后,就可通过共价偶联将这些蛋白质固定在聚合物上,得到具有(IX)结构的固定化蛋白质。实验表明,此共聚物载体的偶联蛋白质质量较大,每克干重载体可偶联0.47—0.88克蛋白质,而用Sephacrose-4B为载体时,每100毫升载

体可偶联 1.6 克蛋白质 (W/V), 即每克干重琼脂糖可偶联 0.4 克蛋白质。此外, 通过免疫电泳测定证明, 这种固定化免疫吸附剂具有很好的抗原(或抗体)的免疫活性。

致谢: 红外吸收光谱承北京大学化学系王显仑同志测定。核磁共振谱承中国科学院感光研究所俞诒、孙贤育以及北京化工研究院沈其丰、罗广荣等同志测定, 均此致谢。

参 考 文 献

- [1] 陆承勋、顾忠伟、冯新德、李德昌, 科学通报, **24**(9), 381(1979).
- [2] Dunlap, R. B., "Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography", Plenum Press, New York, 1974.
- [3] Hixon, Jr. H. F. & Goldberg, E. P. Eds., "Polymer Grafts in Biochemistry", Marcel Dekker Inc., New York, 1974.
- [4] Salmons, M., Saronio, C. & Garatini, S. Eds., "Insolubilized Enzymes, Raven Press", New York, 1974.
- [5] Ferruti, P. et al., *Polymer*, **13**, 462(1972).
- [6] Batz, Hans-Georg, et al., *Makromol. Chem.*, **177**, 683 (1976).
- [7] Winston, A. & McLaughlin, G. R., *J. Polymer Sci. Chem.*, **14**, 2155(1976).
- [8] Wuensch, E. & Jaeger, E., *Z. Physiol. Chem.*, **346**, 301(1966); C. A. 66: 104654 v.
- [9] Amerik, Yu. B. et al., *J. Polymer Sci.*, Part C, **23**, 231(1968).
- [10] Blumstein, A. et al., *Macromol.*, **9**, 243 (1976).
- [11] 北京大学生物系, "生物化学实验方法和研究技术"讲义, 第七章, 免疫化学实验, 1978.
- [12] 张先扬等, 生物化学与生物物理进展, **2**, 36(1974).

SYNTHESIS OF N-*p*-ACRYLOXYBENZOYLOXY SUCCINIMIDES AND THE USE OF ITS COPOLYMER FOR IMMOBILIZATION OF SERUM PROTEIN

Lü Chengxun, Gu Zhongwei and Feng Xinde

(Department of Chemistry, Beijing University)

Wang Chongqing and Li Dechang

(Department of Biology, Beijing University)

ABSTRACT

Two new active esters of acrylic acids monomers, N-*p*-acryloxybenzoyloxy succinimide (ABOSu) and N-*p*-methacryloxybenzoyloxy succinimide (MBOSu) have been synthesized and polymerized.

ABOSu and MBOSu were prepared by coupling of *p*-acryloxybenzoic acid (ABA) or *p*-methacryloxybenzoic acid (MBA) with N-hydroxy succinimide in the presence of dicyclohexylcarbodiimide.

High molecular weight poly (ABOSu) and poly (MBOSu) were obtained by radical polymerization of the corresponding monomers.

The reactive poly (MBOSu-MBA) copolymer was used to immobilize the serum protein. This immobilized protein was a hopeful bioactive solid immunoadsorbent.