

固相上氨基酸与多肽氨基的测定

邹永水 钱肖贞

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

液相的多肽合成方法, 已成功地用于胰岛素的合成^[1]及其衍生物的结构与功能的研究。但由于反应物与产物的分离步骤繁杂, 特别是大肽衍生物溶解度小, 产物得率下降, 分离纯化更为困难。用这种方法去合成分子量比胰岛素更大的蛋白质进展缓慢。1963年 Merrifield^[2]采用以固相载体为支持物合成多肽, 以大量过量的酰化氨基酸与结合在固相支持物(树脂)上具有游离氨基的氨基酸或多肽衍生物缩合。由于产物是在固相支持物上, 因此解决了产物与反应物的分离问题, 受到普遍的重视。Merrifield 合成多肽的方法是基于多次重复缩合反应, 如果克服枝链反应的因素, 则每次联接到固相支持物上去的只是一个氨基酸衍生物, 假定每步缩合反应的产率为90%, 则合成一个具20个氨基酸残基的肽段其总产率只有13% $[(90\%)^{20-1}]$, 其余占87%, 而彼此间仅相差一个氨基酸残基的一系列多肽杂质的分离, 无疑是十分困难的。显然, 接肽过程中各步反应力求完全。因此, 我们在固相多肽合成的初期就注意到自由氨基的测定问题, 以期把氨基测定值作为固相多肽合成的监测指标, 便于选择适当的条件, 力求每一步缩合或去除保护基的反应在可检测范围内达到完全。这样可以避免固相合成多肽的盲目性。采用片段固相接肽的改进, 减少了缩合次数, 使产物与副产物(杂质肽)的差距拉大从而有利于分离纯化^[3]。不过, 提高缩合反应率仍然是十分重要的, 也需要进行氨基的测定。

对于固相支持物上自由氨基的测定, 许多作者有过一些报道^[4,5], 但仍感不够理想。Eske等人^[4]采用 α -羟基, β -萘醛测定支持物上的自由氨基, 所用条件温和, 可以不消耗样品。但是每次分析需要12小时左右。对此, 我们曾在测

定条件上作过一些改进, 使分析时间缩短在3—4小时, 但是仍然需用二氯甲烷作为溶剂与洗涤剂, 毒性较大, 而且由于二氯甲烷比重大于树脂, 使树脂粘附于反应器皿壁上, 不利于洗去过量反应试剂。我们改用水杨醛作为反应试剂, 用无水乙醇作为反应介质。过量的水杨醛与固相上的自由氨基形成 Schiff 碱, 反应完成后用乙醇洗去过量的水杨醛; 然后用苯胺的乙醇溶液把固相上的水杨叉基置换下来, 用分光光度计测定315毫微米处的光密度值。按样品重以及克分子消光系数可以换算氨基含量。

和萘醛方法比较, 本方法具有下列优点: (1)乙醇没有毒性; (2)操作比较方便; (3)水杨醛的位阻效应比萘醛小, 反应较快; (4)水杨醛和乙醇无限互溶, 便于洗去, 污染机会较少; (5)整个分析过程可在2.5小时内完成。

材料与方法

水杨醛 化学纯, 用无水硫酸钠干燥后, 经重蒸二次贮于棕色瓶中备用。

苯胺 化学纯。无水乙醇和吡啶皆分析纯。

分析装置 见图1。A为底部有砂芯的反

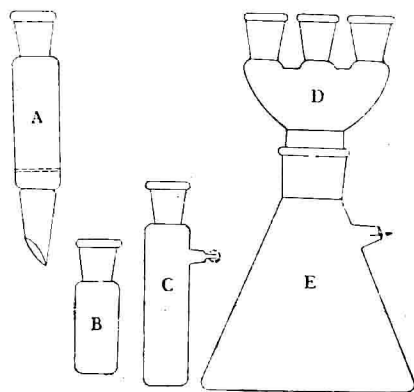


图 1

表 1 几种固相氨基酸与肽衍生物的氨基测定

样 品*	氨基含量 (微克分子/毫克)		
	I	II	平均值
Boc—Gly—②	0	0	0
H ₂ N—Gly—②	0.35	0.34	0.35
$\begin{array}{c} \text{Tos} \\ \\ \text{Boc—Arg—Gly—②} \end{array}$	0.0027	0.0029	0.0028
$\begin{array}{c} \text{Tos} \\ \\ \text{H}_2\text{N—Arg—Gly—②} \end{array}$	0.15	0.14	0.15
Dpoc—Val—②	0.0049	0.0045	0.0047
H ₂ N—Val—②	0.28	0.28	0.28
Dpoc—Phe—②	0.0056	0.0039	0.0048
$\begin{array}{c} \text{SBzl} \\ \\ \text{H}_2\text{N—Cys—Pro—Leu—Gly—②} \end{array}$	0.23	0.23	0.23
$\begin{array}{c} \text{SBzl} \\ \\ \text{H}_2\text{N—Gln—Asn—Cys—Pro—Leu—Gly—②} \end{array}$	0.15	0.15	0.15
H ₂ N—Asp—NHNH—Z—②	0.44	0.44	0.44

* 此中所用缩写符号如下: Boc—, 叔丁氧羰基; ②—, 聚苯乙烯树脂; Tos—, 对甲苯磺酰基; Dpoc—, 联苯异丙氧羰基; Bzl—, 苄基; —Z—②, 肼树脂。

表 2 水杨醛与萘醛测定值的比较

样 品*	氨 基 测 定 值	
	水杨醛/乙醇	萘醛/二氯甲烷
Boc—Leu—Gly—②	0.0039	0.0037
Dpoc—Leu—Gly—②	0.0080	0.0024
H ₂ N—Phe·Gly·Leu·Ala—②	0.23	0.22
H ₂ N—Ala—Phe—Gly—Leu·Ala—②	0.21	0.20
H ₂ N—Leu—Ala—Phe—Gly—Leu—Ala—②	0.20	0.19
H ₂ N—Gly—Leu—Ala—Phe—Gly—Leu—Ala—②	0.17	0.12
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N—Thr—Gly—Leu—Ala—Phe—Gly—Leu—Ala—②} \\ \\ \text{OTB} \end{array}$	0.17	0.086

* 缩写符号如下: —OTB, 叔丁氧; 其余有关符号同表1。

应管; B 为磨口小试管; C 为磨口支管试管; D 为抽滤接头; E 为抽滤瓶。

操作步骤 (1)称取 2—10 毫克样品(其氨基含量在 4 毫微克分子左右),直接加到反应管 A 的砂芯滤板上; (2) A 管中加 2 毫升 2%(v/v)的水杨醛—6%(v/v)吡啶的乙醇溶液, A 管加上磨口玻璃塞; (3) 60℃ 温箱中放置 30—35 分钟; (4)用接头 D 和抽滤瓶 E,抽气除去过量的水杨醛;随后用 2 毫升乙醇浸泡 2—3 分钟后抽滤,如此重复 10 次以便除去过量的水杨醛; (5)把管 B 换成管 C,支管处套以橡皮吸头,加 3 毫

升 5%(v/v)的苄胺乙醇溶液于 A 管,盖以磨口塞; (6)60℃ 保温箱中放置 30 分钟后收集滤液于 C 管并测定 315 毫米处的光吸收值。

结果与讨论

1. 水杨叉替苄胺的吸收光谱 见图2,虚线是水杨醛在乙醇中的吸收光谱,吸收峰在 325 毫微米。实线为水杨醛在 5%(v/v)苄胺的乙醇溶液中的吸收曲线,吸收高峰位移至 315 毫微米处,表明水杨叉替苄胺的形成。

2. 水杨叉替苄胺的标准曲线 称取一定量

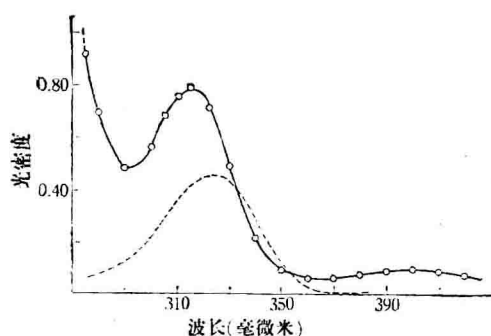


图 2

的水杨醛用 5% (v/v) 苯胺的乙醇溶液稀释, 配成一系列溶液, 并以相应的苯胺溶液为对照, 测定 315 毫微米的光吸收值。按此光吸收值对已知浓度的水杨醛微克分子/毫升作图在所选择的范围内符合 Beer 定律, 线性良好 (见图 3)。克分子消光系数为 4.36×10^3 因此, 可按下列式子计算样品中自由氨基含量:

$$\text{微克分子氨基/毫克固相样品} = \frac{3.0 \times O.D_{315}}{4.36 \times W}$$

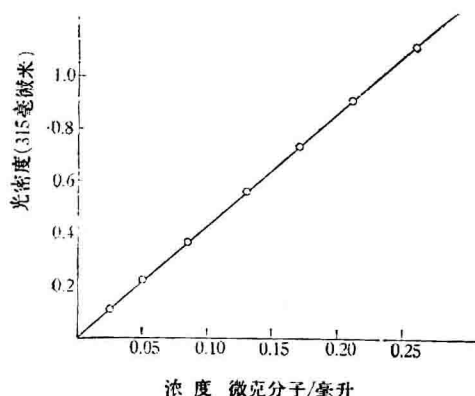


图 3

式中 $O.D_{315}$ 为 315 毫微米处的光吸收值; W 为所测定的样品重量 (以毫克计算)。

3. 定测 用水杨醛方法测定了若干以苯乙烯树脂 (交联度 1—2%) 为载体的固相氨基酸及多肽衍生物。从表 1 可以看出, 本方法可在

毫微克分子数的水平上追踪样品中氨基含量的变化; 对于氨基含量在每毫克 0.15 微克分子以上的样品相对偏差在 5% 以内。

这个方法应用于一些多肽激素的固相合成过程的监测有一定参考价值^[6]。

4. 反应性比较 水杨醛的反应性不亚于萘醛 (见表 2)。两者与氨基形成 Schiff 碱时都可能形成次级的氢键, 而氢键又有利于 Schiff 碱的稳定。实践表明, 适当提高温度都有利于加速两种醛反应过程。由于水杨醛分子小于萘醛, 反应时空间阻碍较小。水杨醛与所用的溶剂以任意比例互溶, 既有利于反应, 也便于去除过量的水杨醛。

以往, 有人报道过水杨醛与肌球蛋白、磷酸甘油醛脱氢酶以及其他蛋白质氨基之间的相互作用^[7-9], 反映了水杨醛具有突出的反应能力。根据初步试验, 我们推想水杨醛还可望应用于测定固相载体上更大的多肽、蛋白质以及固相酶类的自由氨基含量。

参 考 文 献

- [1] 龚岳亭等:《科学通报》, 1965 年, 第 11 期, 第 941 页。
- [2] Merrifield, R. B.: *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149, 1963.
- [3] 中国科学院上海生物化学研究所人工合成蛋白研究组:《生物化学与生物物理学报》, 1975 年, 第 119 页。
- [4] Esko, K. et al.: *Acta Chem. Scand.* 22, 3342, 1968.
- [5] Carden, J. H. et al.: *Anal. Biochem.* 46, 216, 1972.
- [6] 中国科学院上海生物化学研究所多肽应用组:《生物化学与生物物理学报》1975 年, 第 7 期, 第 23 页。
- [7] Muhrlad, K. A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 205, 342, 1970.
- [8] Fife, T. H. et al.: *Biochemistry* 10, 3875, 1971.
- [9] Williams, J. N. Jr. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 695, 1966.

[本文于 1978 年 2 月 25 日收到]

勘 误

年	期	页	栏	行	误	正
1978	3	21	左	14	881 克分子	8.81 克分子
1978	3	22	左	12	35°C 左右	85°C 左右
1978	3	22	左	22	500 毫升	5,000 毫升
1978	3	23	左	2	氯或二氯甲烷	氯仿或二氯甲烷