

- [5] 卢绍婉:《第一次全国液体闪烁探测技术学术会议交流资料》, 1982。
- [6] T. Florkowski, In “*Methods of Low-level Counting and Spectrometry*”, IAEA-SM-252/63. p. 335, 1982.
- [7] 中国科学院生物物理研究所, “液体闪烁谱仪”研制组, 《核电子学与探测技术》1, 1, p. 17, 1981.
- [8] 蒋汉英、卢绍婉等, 《第一次全国液体闪烁探测技术学术会议交流资料》, 1982。
- [9] 中国科学院生物物理研究所“液闪”编译组, 《液体闪烁计数及其在生物学中的应用》p. 197, 科学出版社, 1979。
- [10] Ulrich Schotterer et al., *Radiocarbon*, 22, 2, p. 505, 1980.
- [11] M. Alessio, et al., *Nuclear Instruments and Methods*, 137, p. 537, 1976.
- [12] Iwakura. T. et al., *Behaviour of Tritium in the Environment*, IAEA-SM-232/32, 1979.
- [13] Rajamae, R. et al., *Radiocarbon*, 22, 2, p. 435, 1980.
- [14] Laney, B. H., In “*Organic Scintillators and Liquid Scintillation Counting*”, p. 991, 1971.
- [15] Harley, P. E. and Church, V. E., In “*Liquid Scintillation Counting, Recent Developments*”, p. 67, 1974.
- [16] 傅培云 傅世楷, 《第一次全国液体闪烁探测技术学术会议交流资料》, 1982。
- [17] Kent Painter, In “*Liquid Scintillation Science and Technology*”, p. 283, 1976.
- [18] Calf, G. E. et al., “*Liquid Scintillation Counting of Carbon-14 in a Heavily Shielded Site*” Published in The First Australian Archaeometry Conference., 1982.
- [19] 陆杨乔、郭剑英, 《中华放射医学与防护杂志》, 1, 4, p. 58, 1981.

【本文于1983年2月10日收到】

DABITC/PITC 双偶合法在蛋白质手工固相顺序分析中的应用

徐秀璋 房月华

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

Edman 化学降解法迄今仍然是蛋白质(或多肽)顺序分析中最基本和最有效的方法。根据蛋白质(或多肽)在反应中的状态不同, 可分液相顺序分析法^[1]和固相顺序分析法^[2]。固相顺序方法, 由于操作方便, 洗涤干净, 肽不会因洗涤和抽提而受损失等优点而迅速发展。但是由于 Edman 降解反应产物 PTH-氨基酸检出的局限性, 影响了 Edman 液相和固相顺序法的灵敏度和精确度。近十年来, 发展的高灵敏的顺序方法, 主要集中于二点: 一是采用放射性同位素, 荧光基团或有色 Edman 试剂; 二是采用灵敏的鉴别手段如微量薄层层析, 气相色谱和高压液相色谱检测 PTH-氨基酸^[3]。

4N, N-二甲氨基偶氮苯-4'-异硫氰酸酯(DABITC)是改进了的 Edman 试剂, 用DABITC降解蛋白质(或多肽)产生二甲氨基偶氮苯-硫

氰酯氨基酸(DABTH-氨基酸)具有鲜明的颜色。它只要微微克分子量, 就可用聚酰胺薄膜双向层析或高压液相色谱鉴定^[4-7]。

本文主要介绍 DABITC/PITC 双偶合微量手工固相顺序方法。即用有色 Edman 试剂——DABITC 和 PITC 作二次偶合后, 再进行裂解, 转化反应直至鉴定 DABTH-氨基酸衍生物。它除了一般 DABITC/PITC 双偶合液相法的优点外, 又兼有固相法的优点, 是值得推广的一种好方法。

一 原理部分

1. 一般原理 用 DABITC 降解蛋白质(或多肽)反应相似于 Edman 反应, 简略表示如下:

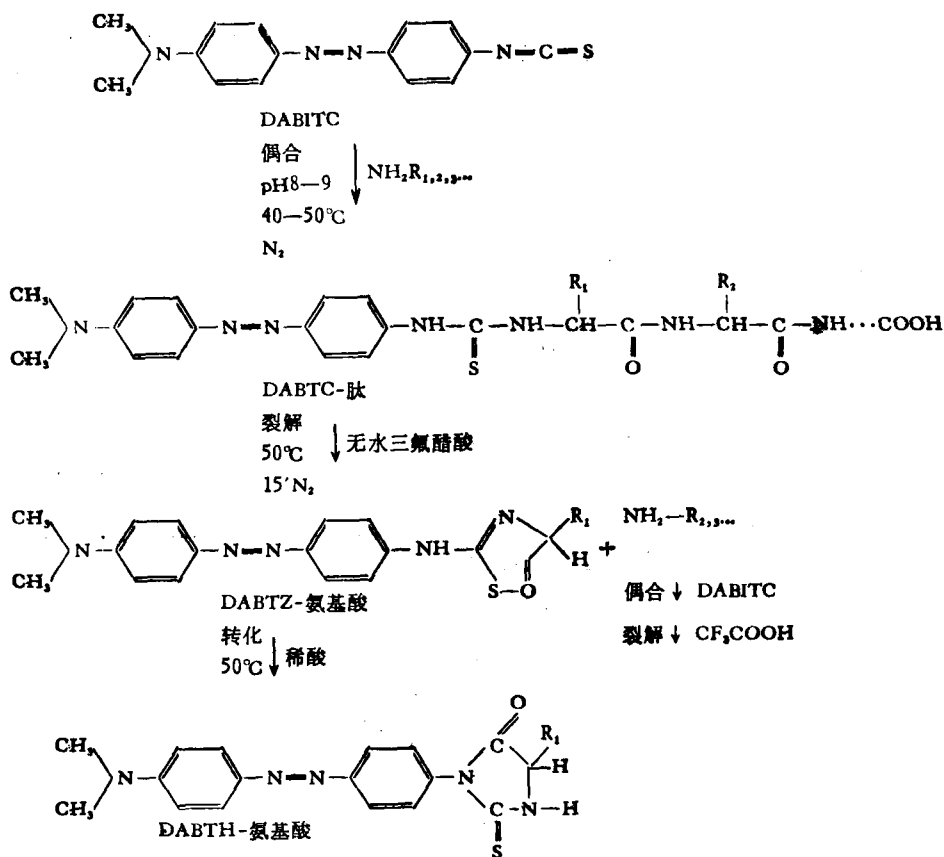
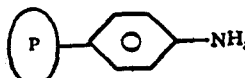
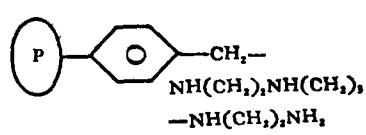
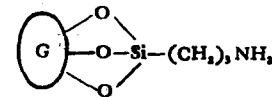
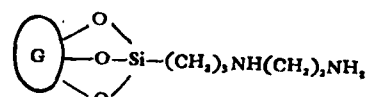


表 1

载 体	结 构	用 途
1. 聚苯乙烯树脂 氨基聚苯乙烯树脂 三乙烯四乙 氨基聚苯乙烯树脂	 	小的胰蛋白酶解的肽 小的 CNBr 和非胰蛋白的酶解肽
2. 玻璃球 3-氨基基玻璃 N-(2-氨基基), -氨基基玻璃	 	大的胰蛋白酶解肽和蛋白质 大的 CNBr 和非胰蛋白酶解肽, 蛋白质
3. 聚丙烯酰胺 N-氨基聚 丙烯酰胺	$-[\text{CH}-\text{CH}_2]_n-$ $ $ $\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	大的胰蛋白酶解肽和蛋白质

双偶合法即是在第一步没能与 DABITC 偶合的蛋白质(或多肽),再用 PITC 作第二次偶合,使偶合反应近于完善,保证下一循环不被干扰,又不影响本循环 DABTH-氨基酸的检出^[7,16]。

固相法是蛋白质(或多肽)在降解反应前先把它固定在载体上,然后再进行上述三步反应。

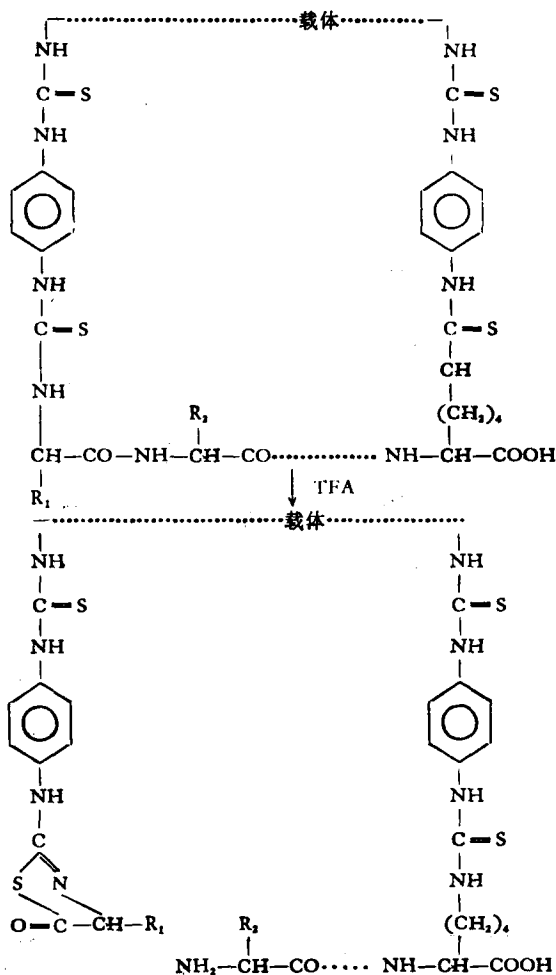
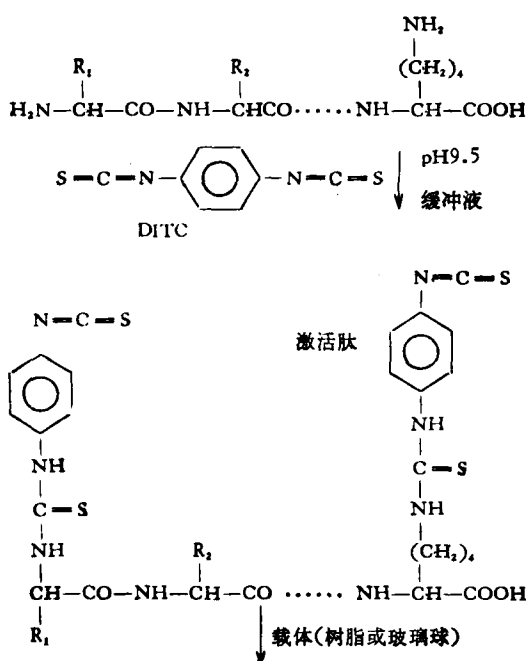
2. 载体选择和肽的固定原理 固相顺序法的关键是载体与固定方法的选择并设法使蛋白质或多肽固定到载体上去。目前用于固相上的载体有三类(见表 1)。

最常用的是前两类。一般聚苯乙烯树脂适合固定小肽,玻璃球和聚丙烯酰胺适合固定蛋白质和较大的肽。但不是绝对的,大小没有严格的界限,主要还是取决于使用者的习惯。

载体选定后,要经过活化,然后才可以固定肽。

目前固定肽(或蛋白质)的方法有三种:

(1) DITC (对苯二异硫氰酸)法^[11,12,17] 适用于 C-末端含有赖氨酸残基或精氨酸残基的多肽。原理如下:



第 1 个 N-末端残基不鉴定,裂解从第二个残基开始,固定产率在 40—95%。一般每毫克载体能固定 1 nmol 肽。

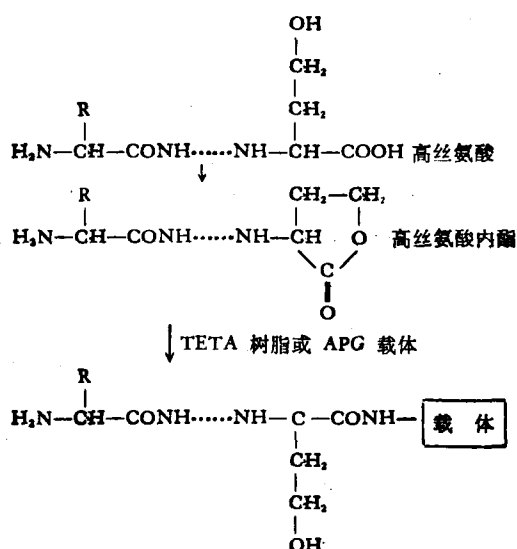
若 C-末端是精氨酸残基,应先用胍处理,转化成鸟氨酸后方可用 DITC 法固定^[12]。

(2) 高丝氨酸内酯法^[12] 用溴化氰降解蛋白质,只能在甲硫氨酸处切断,能得到的全部多肽片断中,除了本身 C-末端肽外,在 C-末端有一高丝氨酸残基,它在酸性介质中转化为内酯形式即高丝氨酸内酯,可直接固定到载体上。

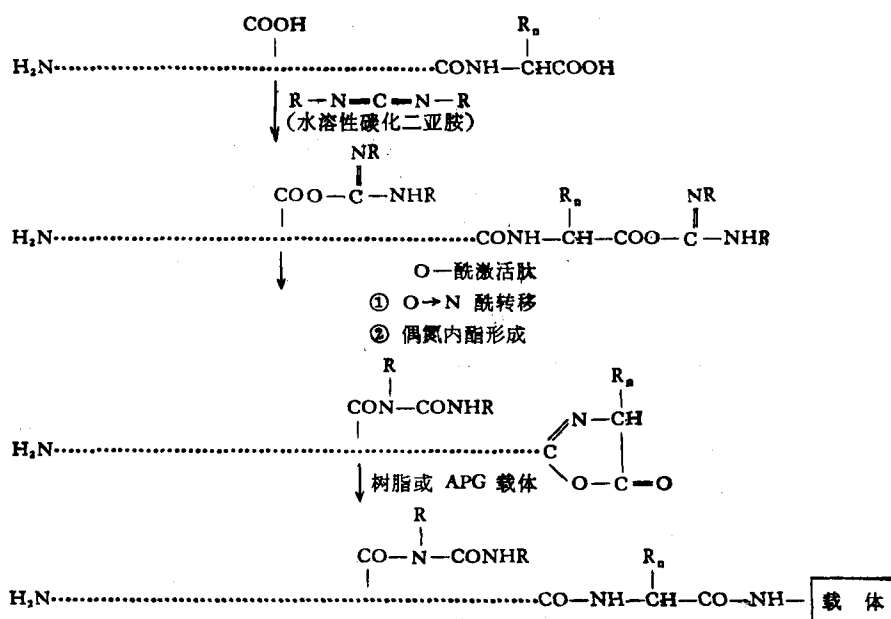
反应式见下页。

肽是通过氨基在 C-末端连接,所以含有 C-末端高丝氨酸的所有氨基酸都能被鉴定。用此法固定,产率不低于 DITC 法。

(3) EDC (水溶性碳化二亚胺)方法^[11,13] 适用于一般 C-末端残基的多肽或蛋白质分子。



固定原理是: (EDC 方法)



用 EDC 方法固定产率只有 0—60%^[10]。

二 实验部分(材料和方法)

1. 用 EDC 方法固定胰岛素 A 链 (Ins-A)

胰岛素 A 链(—S—S—CH₃ 型)由本所华庆新提供, APG 载体, MITC, N-甲基吗啉是 LKB Biochrom 产品, DMAA 缓冲液, TFA, PITC 系 Pierce U.S.A. 产品(顺序级)。其它

均为国产分析纯试剂。

(1) 制备 PTC-Ins-A 称 Ins-A 0.4 毫克于一带塞的小试管中, 加 DMAA 缓冲液 0.4 毫升, PITC 30 微升(二滴), 然后通 N₂, 盖塞, 在混合器上充分混合后, 于 50℃ 反应 30 分钟, 并随时摇动。反应后用 1ml 苯抽提过量试剂五次, 每次抽提需通 N₂, 混合, 离心 (3000 转/分) 3 分钟, 去上层液。下层(水相)真空干燥, 放置过夜。

(2) 激活 APG 称 APG 载体 120 毫克, 在烧结漏斗上分别用吡啶-盐酸缓冲液 (1M pH 5.0), 重蒸水洗五次每次各 2 毫升。DMF (二甲替甲酰胺) 2 毫升洗一次。

(3) 将 PIC-Ins-A 固定到 APG 上 从真空干燥器中取出 PTC-Ins-A, 加 0.5 毫升 DMF (内含 3 毫克 EDC), 通 N_2 , 在混合器上混合, 室温下放 5 分钟, 然后慢慢地加入激活的 APG。并随时摇动。最后于 37℃ 保温反应 3 小时, 注意时常摇动。反应后从水浴中取出并于室温下过夜。

(4) 封闭载体上剩余的氨基 分别加 0.25 毫升 MITC 和 N-甲基吗啉林于上述样品液试管内, 通 N_2 盖塞, 混合, 于 45℃ 反应 40 分钟。反应后将试管内的 APG-样品液倒入烧结漏斗中, 分别用 DMF, 甲醇每次各 5 毫升洗三次, 然后减压干燥, 供顺序分析用。

2. DABITC/PITC 双偶合手工固相法顺序测定^[8]

DABITC (Pierce U.S.A) 用沸丙酮重结晶处理, 吡啶 (LKB Biochrom. 产品), PITC, TFA 来源同上, 其它均为国产分析纯试剂。

(1) 偶合 称 APG-Ins-A 和 APG-肌红蛋白 (LKB Biochrom. 提供) 各 20—25 毫克, 分别装入带有塞盖的小试管内 (约 1 × 7 cm), 加 400 μ l 50% 吡啶/水和约 0.6mg DABITC/200 μ l 吡啶 (新鲜制备) 通 N_2 盖塞, 充分混合, 于 50℃ 反应 45 分钟后再加 50 微升 PITC, 通 N_2 盖塞, 混合, 50℃ 反应 30 分钟, 以完成双偶合反应。然后去掉原瓶塞, 换上带有沙芯的空心塞, 用减压吸去液体, 再分别用吡啶, 甲醇洗二次, 每次各 2 毫升, 减压干燥。

(2) 裂解 加 200 微升 TFA, 通 N_2 盖瓶塞, 混合, 于 50℃ 反应 15 分钟, 减压干燥后, 加 300 微升甲醇, 充分混合, 静放片刻, 见颗粒沉淀, 用吸管小心吸出上层液于另一小试管中, 通 N_2 吹干, 用于转化反应。剩下的沉淀物, 再用 2ml 甲醇洗二次, 干燥后用于下一残基的降解。

(3) 转化 吹干后的样品, 加 50 μ l 50% TFA/水, 通 N_2 , 用蜡膜封口, 充分混合后, 于

50℃ 反应 50 分钟, 真空干燥 (或通 N_2 吹干), 加 10—20 微升 (1 滴) 无水乙醇溶解, 用于鉴定。

3. 用 TLC 鉴定 DABTH-氨基酸^[4,15]

聚酰胺薄膜 (Micropolyamide F 1700) 是 pierce chemical CO. 产品, 其它材料和试剂均系国产。

用毛细管取上述转化后的乙醇-样品溶液约 1/10—1/20 点样于聚酰胺薄膜 (2.5 cm × 2.5 cm) 的一角上 (约 3mm × 3mm 处) 斑点直径约 1mm, 点样后在起点再点上标记物, 然后分别用溶剂 I (33% 乙酸) 和溶剂 II (甲苯/n-己烷/乙酸 2:1:1 (V/V/V) 进行双向层析。层析后, 吹干。用盐酸蒸气熏, 显示的红色斑点为 DABTH-氨基酸, 与标准的 DABTH-氨基酸斑点位置对照 (它们与标记点的相对位置是恒定的) 即可确认。

标记物制备 取 500 微升 50% 吡啶的双蒸水溶液于一试管中分别加 30 微升二乙胺, 30 微升乙醇胺, 300 微克 DABITC (约 1000 nmol) 通 N_2 , 用蜡膜封口, 在混合器上充分混合后, 于 55℃ 保温反应 1 小时, 真空干燥, 加 0.5 毫升无水乙醇溶解, 离心取上清液待用。

标准 DABTH-氨基酸的制备按 Chang J. Y.^[4] 的描述进行。

三、结果与讨论

1. 图 1 是胰岛素 A 链顺序 TLC 层析图谱。其中 6、7、11、20 是半胱氨酸残基, 因溶于水相, 图上不检出。第 21 残基是该链羧端连接 APG 载体上的门冬酰氨基残基。

图 2 是肌红蛋白 N-端片断 (胰蛋白酶裂解) 肽顺序 TLC 层析图谱, 因为肽链是用 DITC 方法连接, 第一残基不检出。第 27 残基应为谷氨酸, 但量太少, 层析图上显色不明, 无法确认。第 31 残基是羧端精氨酸残基, 通过它与 APG 载体连接。所以本实验一次连续降解并测定胰岛素 A 链近 20 个残基, 肌红蛋白片断肽 30 个残基, 胰岛素 A 链的用量不到一百微克, 每天能测定 2—3 个残基, 速度比手工液相法提高一倍。从所得结果说明, 本顺序法是满

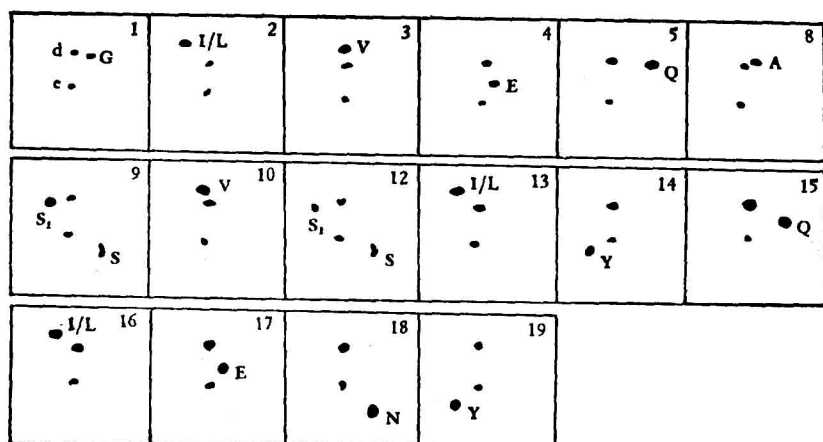


图1 胰岛素A链顺序在聚酰胺薄膜上的双相层析图谱

经盐酸蒸汽薰后, d, e (1) 为标记物 DABTC-二乙胺和 DABTC-乙醇胺, 显蓝色, 图中用英文字母标的点为降解产物 DABTH-氨基酸呈红色。

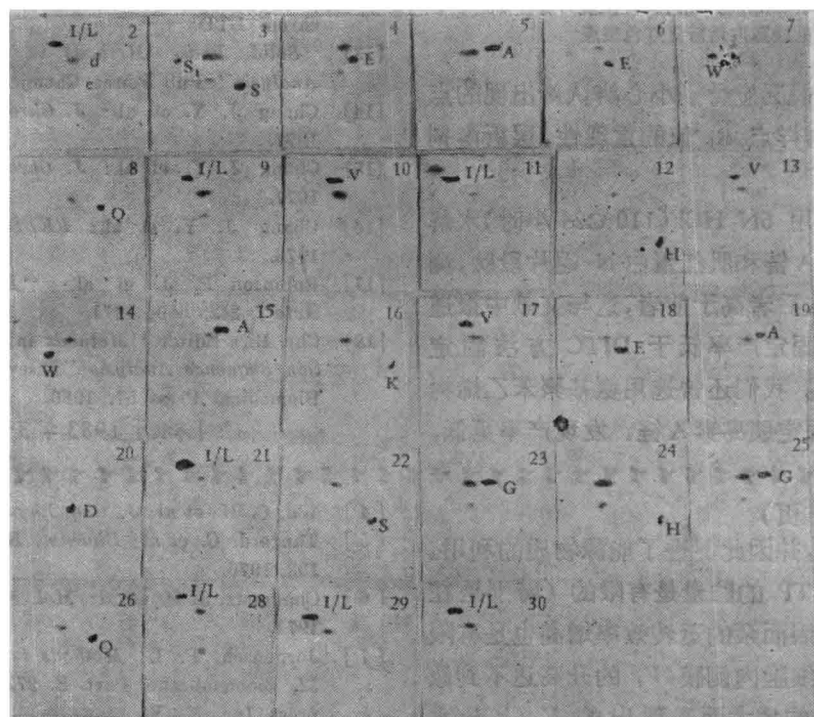


图2 肌红蛋白N-端片段肽顺序在聚酰胺薄膜上的双相层析图谱

经盐酸蒸汽薰后, d, e (2) 为标记物 DABTC-二乙胺和 DABTC-乙醇胺, 显蓝色。用英文字母标的点为降解产物 DABTA-氨基酸显红色。(本图片照相前曾加深过红点颜色)

意的。

2. 由图谱可见, 用聚酰胺薄膜层析不能分离亮氨酸和异亮氨酸。改用高效硅胶板能获得满意的分离^[4]。我们曾用硅胶板 (E. Merck 60F254), 以氯仿、甲醇 (100:4 V/V) 为层析溶剂分离 DABTH-Leu 和 DABTH-Ile 获得较

好的结果。(图3)。

3. 用聚酰胺薄膜鉴别时, 因有的点位置比较接近, 有时即使根据它们与蓝色标记点 (d, e) 的相对位置也无法确认, 这时可选点有关标准 DABTH-氨基酸鉴别。做了若干步循环后, 在 TLC 层析图上会再现样点 (在下一循环中再



图3 DABTH-Ile 和 DABTH-Leu; I
为 DABTH-Ile; I/L 为二种物质的混合物。
经盐酸蒸汽薰后显红色斑点

现),遇到这种情况应特别小心辨认新出现的点子,为保证图谱样点 R_f 值的重现性,层析溶剂应时常更新。

4. 我们曾用 6N HCl (110℃24 小时)水解 APG-胰岛素 A 链和肌红蛋白 N-端片段肽,测得氨基酸含量,后者高于前者,这与文献中报道的用 EDC 法固定产率低于 DITC 方法固定产率相一致^[15]。我们还曾选用氨基聚苯乙烯树脂作载体^[13],固定胰岛素 A 链,发现产率更低,

~~~~~

(上接第55页)

酶起激励作用,并因此促进了能源物质的利用。然而细胞内 ATP 的贮量是有限的(特别是在离体条件下),因而泵的运转效率增高也是有限的。所以极性细胞内侧膜  $V_i$  的升高达不到像外侧膜由  $g_{Na}$  的增大而表现出的  $V_o$  上升水平。这也许就是胆酸盐处理蟾蜍皮肤内表面 TEP 上升峰值较低的原因。

## 参 考 文 献

- [1] Doving, K. B. et al: *Olfaction and behaviour in Salmonid fishes*, p. 24. 1980, Institute of Zoophysiology, University of Oslo, Norway.
- [2] Kishimoto, U. et al: *J. Gen. Physiol.*, 47, 975, 1964.
- [3] Wu, C. H., *Biophys. J.* 15(2), Part 2, 263a, 1975; *Ibid.* 17, 206a, 1977.

并且不易操作。

## 参 考 文 献

- [1] Edman, P. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1, 80, 1967.
- [2] Laursen, R. A. *Eur. J. Biochem.*, 20, 89, 1971.
- [2] Chr. Birr Editor *Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis*, Elsevier/North-Holland Press 115 1979.
- [4] Chang, J. Y. et al.: *Biochem. J.*, 153, 607, 1976.
- [5] Chang, J. Y. *Biochem. J.*, 163, 517, 1977.
- [6] Chang, J. Y. et al.: *FEBS Lett.*, 78, 147, 1977.
- [7] Chang, et al.: *FEBS Lett.*, 93, 205, 1978.
- [8] Chang J. Y. *Biochimica et Biophysica Acta*, 578, 188, 1979.
- [9] John Bridgen "Science Tools" Vol. 24, No. 1, 3, 1977.
- [10] 千谷晃一等"蛋白质核酸酵素" Vol 23, No 4, 238, 1978.
- [11] LKB Application Note 251, 3, 1977.
- [12] "Solid-phase sequencing Handbook" LKB Biochrom LTD.
- [13] "Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis" Pub Peirce Chemical Co. 47, 1975.
- [14] Chang J. Y. et al.: *J. Chromatog.*, 140, 125, 1977.
- [15] Chang J. Y. et al.: *J. Chrometog.*, 132, 303, 1977.
- [16] Chang J. Y. et al.: *FEBS Letters* 91, 63, 1978.
- [17] Robinson P. J. et al.: "Biochem. Biophys. Acta" 242, 659, 1971.
- [18] Chr. Birr Editor "Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis" Elsevier/North-Holland Biomedical Press 57, 1980.

[本文于 1983 年 3 月 7 日收到]

- [4] Wu, C. H. et al: *J. Gen. Physiol.*, 76, 355, 1980.
- [5] Tanford, C. et al: *Biochim. Biophys. Acta*, 457, 133, 1976.
- [6] Changeux, J. P. et al: *Mol. Pharmacol.*, 7, 538, 1971.
- [7] Jorgensen, P. L: *Methods in Enzymology*, Vol 32, Biomembrane. Part. B. 277, 1974. Academic press. Inc. N. Y.
- [8] Ussing, H. H.: *Acta Physiol. Scand.*, 23 110, 1951.
- [9] Koefoed-Johnsen, V. et al. *Acta Physiol. Scand.*, 42, 298, 1958.
- [10] Whittembury, G.: *J. Gen. Physiol.*, 47, 795, 1964.
- [11] Helman, S. I. et al.: *J. Gen. Physiol.*, 74, 105, 1979.
- [12] Helman, S. I.: *Fed. Proc.*, 38, 2743, 1979.
- [13] Faust, R. G. et al.: *J. Cell Physiol.*, 67, 149, 1966.

[本文于 1983 年 3 月 16 日收到]