

经验交流

4-N, N-二甲胺基偶氮苯-4'-异硫氰酸酯 (DABITC) 用于多肽微量氨基酸顺序的测定

俞鹤年 张国娣

(中国科学院上海生物化学研究所)

前文^[1]曾介绍一种高灵敏度 DABITC 方法, 今已成功地应用于微量多肽激素的氨基酸顺序测定, 所取样品为猪胰岛素-B 链、促黄体生成素释放激素及未知顺序的蝮蛇毒舒缓激肽增强因子等。样品量仅为 8—30 毫微克分子 (nmol)。

一、实验部分

1. 材料和试剂 猪胰岛素-B 链、促黄体生成素释放激素 (LRH) 分别由本所胰岛素组和东风厂提供, 蝮蛇毒舒缓激肽增强因子, 由本实验室自制。DABITC 试剂本所东风厂产品, 化学试剂和溶剂的纯度, 均为分析纯, 并经重新处理^[1]聚酰胺薄膜为黄岩实验化工厂出品。

2. 实验操作 多肽激素 (8—30nmol) 置于 1×5 厘米刻度离心管, 使溶于 100 微升 50% V/V 吡啶溶液, 用 50 微升 DABITC 溶液 (0.6 毫克 DABITC 溶于 260 微升吡啶溶液) 充氮气 1 分钟。在 52℃ 水浴保温 50 分钟。然后再加 10 微升异硫氰酸苯酯, 充 N₂, 于 52℃ 反应 30 分钟。加 500 微升混合液 (正庚烷: 乙酸乙酯 = 2:1 V/V) 在微量混合器上充分混合, 2500 转/

分钟离心 3 分钟, 有机相分离后, 用细头滴管吸去, 共重复抽提 4—6 次, 如果分相较差, 可加少量 50% 吡啶促使分相。再用 N₂ 吹干, 干燥后的残留物, 以 100 微升无水三氟乙酸溶解, 充 N₂, 52℃ 水浴保温 15 分钟。然后再以 N₂ 吹干, 溶于 50 微升重蒸二次的水, 并用 200 微升乙酸丁酯抽提 4-N, N-二甲胺基-4'-噻唑啉酮-氨基酸, 肽的部份留在水相中, N₂ 吹干后, 作下一步的降解测定。

乙酸丁酯抽提物经 N₂ 吹干后溶于 100 微升 50% 三氟乙酸, 充 N₂, 52℃ 水浴保温 50 分钟, 再用 N₂ 吹干反应物, 溶于 5—30 微升无水乙醇, 在聚酰胺膜上 (3×3 厘米) 鉴定 DABTH-氨基酸。层析系统^[1,2]: 第一向: 冰乙酸: 水 = 1:2, 第二向: 甲苯: 正己烷: 冰乙酸 = 2:1:1, 以盐酸蒸气薰现 DABTH 氨基酸, 呈红色。聚酰胺薄膜层析谱置于抽真空的干燥器内, 可保存 1—2 个月。

二、结果和讨论

应用本法分析检定了猪胰岛素-B 链 17 步, 主要氨基酸层析点明显; 经焦谷氨酰胺开环^[3]去除环谷 (<Glu) 的促黄体生成素释放激素 (LRH, 10 肽, 全结构) 和蝮蛇毒舒缓激肽增强因子的全部结构。(见图 1)

在进行 Edman 降解时要尽量避免样品与空气接触, 防止 DABITC 试剂中氧硫置换而中断肽链降解, 今用氮气钢瓶直接通 N₂, 代替真空干燥器干燥样品, 此外反应管每步都必须加盖紧闭, 尽可能避免 O₂ 的干扰, 从而提高 Edman 降解反应的产率。其次经偶合后的样品, 需多次洗涤, 减少副产物、杂质及硫脲的影响。这样样品用量可降低到 8—30nmol。

蝮蛇毒舒缓激肽增强因子氨基酸顺序, 经本法测定为 <Glu · Gly · Arg · Pro · Pro · Gly · Pro · Pro Ile · Pro · Pro。此多肽中 Pro 的键较多, 不易裂解。因此用三氟乙酸裂解 (下转第 51 页)

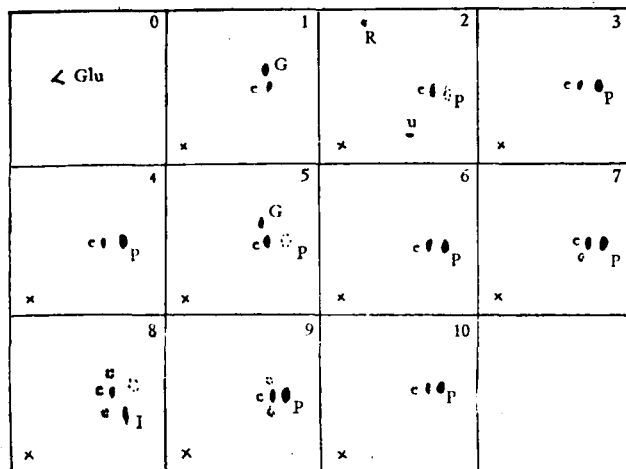


图 1 浙江蝮蛇毒舒缓激肽增强因子的氨基酸顺序
e 为 DABITC-二甲胺标记物

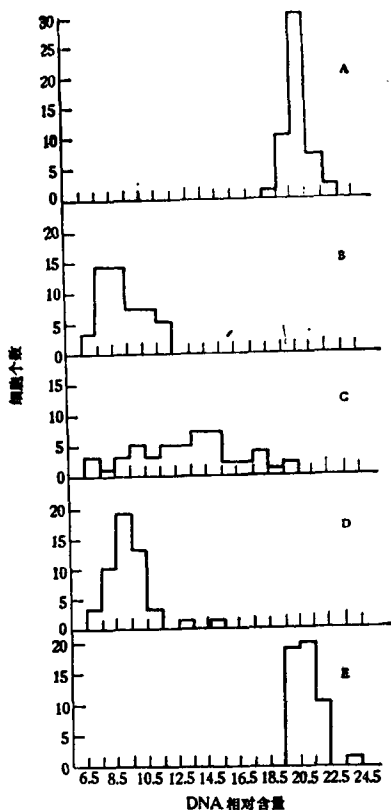


图1 全身照射 200rad 大白鼠外周血淋巴细胞核内 DNA 的含量变化

A. 正常淋巴细胞; B. 照后 24 小时; C. 照后 72 小时;
D. 照后一周; E. 照后 2 周

受到抑制性损伤,使造血机能暂时失调,一时不能补充那么多正常细胞到外周血中,因此,外周血中呈现各种损伤程度不同的细胞,此时细胞群体的 DNA 含量分布不集中。但随时间的延长这种抑制性的损伤可以消除,细胞核内 DNA 含量也趋于正常。辐射可以改变染色体的数目和结构,致使细胞在分裂时染色体的正常分离受到干扰。上述剂量照射下引起的损害是可恢复的,机体的失调是暂时的。

实验由北京市中医研究院实验中心室池旭生、庞大本等同志协助完成,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Leuchten, berger, C.: *Gen. Cytochem. Meth.*, Vol. 1 1958, 219.
- [2] Mendelsohn, M.L.: *J.B.B. C.*, 4, 407, 1958a *ibid.*, 4, 415, 1958b.
- [3] 林波海:《科学仪器》3, 501, 1965.

[本文于 1983 年 3 月 30 日收到]

(上接第 78 页)

时须重复 2—3 次。降介至第 8 步时,改用疏水肽洗涤液(庚烷:乙酸乙酯=3:1)洗涤,否则此 C 端三肽由于疏水性较强进入洗涤废液而被弃去。但是,去 Ile 后的最后 Pro·Pro 二肽又具有亲水性,再改用原来的洗涤液。因此在检定小肽顺序,特别是 C 末端的短肽时,应特别注意肽的极性,从而选择适当的洗涤液。

本工作曾得到本所戚正武教授和罗珊珊的指导,王茂音参加部分工作,一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 俞鹤年等:《生物化学与生物物理进展》,1,41,1981.
- [2] Chang, J. Y.: *J. Chromatog.*, 140, 125, 1977.
- [3] 王茂音等:浙江蝮蛇毒舒缓肽增强因子(BPP)的研究待发表。

[本文于 1983 年 1 月 8 日收到]