

蛋白质固相序列分析技术新进展

梁 宋 平

(湖南省生物研究所, 长沙 410006)

提 要

综述了近年来蛋白质与多肽固相序列测定技术的主要进展。对衍生 PVDF 膜载体, CPG 毛细管柱, SDS 与双相凝胶电泳分离的蛋白质的固相序列分析, TNBS 的应用和磷酸化修饰位点的确定, 以及第二代固相蛋白质序列分析仪等作了扼要的介绍。

关键词 蛋白质, 固相序列分析, PVDF 膜聚丙烯酰胺凝胶电泳, 毛细管柱

蛋白质与多肽的一级结构测定目前有两种方法, 一种是通过 DNA 途径测定其基因的核苷酸顺序从而推定该蛋白质与多肽的氨基酸排列顺序; 另一种则是经典的通过多肽链的逐一降解直接测定某一蛋白质或多肽的序列。虽然第一种方法有许多突出的优点, 比如更为准确与迅速, 尤其对大分子量蛋白质而言; 然而直接测定法在下述情况下仍是不可取代的: a. 需要通过直接序列测定得到蛋白质的部分序列信息, 才能合成探针从而得到 cDNA 或合成引物进行 PCR 基因扩增; b. 确定某些蛋白质的信号肽的起始与终点; c. 确定转录后被修饰加工的氨基酸的位点; d. 验证通过 cDNA 法测定的蛋白质序列的正确性; e. 对分子量较小的活性多肽, 直接序列测定更为简捷。对蛋白质与多肽进行直接序列测定的方法已经历了近半个世纪的发展, 然而目前所用方法的基本化学原理仍然是 Edman 40 年前提出的采用异硫氰酸苯酯 (PITC) 从蛋白质与多肽的 N 端逐一降解^[1], 即 Edman 降解。在后来的发展中, 根据在 Edman 降解过程中样品的处理方式和试剂输送方式的不同而出现了液相、固相和气相三种不同的 Edman 降解方式, 目前世界上主要采用的是后二者即固相法与气相法。

蛋白质与多肽的固相序列分析技术是 R.

laursen 首次提出的^[2], 距今已 25 年。该项技术曾一度开创蛋白质序列分析的新时期。以后由于在 80 年代初气相序列测定技术的发展^[3], 特别是美国应用生物系统公司 (ABI) 推出 470 系列气相序列仪以后, 由于后者的高灵敏度和样品处理简便等优点, 使得气相法成为 80 年代蛋白质序列测定技术的主流^[4]。然而, 固相分析技术仍有许多独特的优点, 特别是在 Edman 降解过程中对采用不同化学方法和新型试剂的灵活性和适应性。因而世界上仍有相当数量的实验室使用并在研究发展这一技术。当前分子生物学的迅速发展对蛋白质与多肽的序列分析技术提出了更高的要求。首先, 要求该技术有更高的灵敏度 (能测定 10 pmol 或更微量的样品的序列), 而且能较方便地对经 SDS 或双相凝胶电泳分离的微量蛋白质进行直接序列测定。其次, 要求序列测定过程更迅速, 操作更简易。第三, 要求在测定过程中能对经转录后被修饰的氨基酸残基的位点同时进行确定。80 年代中期以来, 针对上述三个方面的研究, 固相蛋白质序列测定技术已取得许多重要的进展, 下面就其主要方面加以扼要介绍。

1 固相载体上的新发展

原有固相蛋白质序列测定技术的一个不足之处是样品固相化操作过程较麻烦,使用的聚苯乙烯和多孔玻璃珠(CPG)载体在固相化操作中易造成样品的机械损失.为了能适应微量样品(100 pmol 以下)的序列分析并使固相化操作更简便,近年来在研制新型载体和改进旧有的偶联方法上有了很大的进展,其中最为突出的是衍生 PVDF(polyvinylidene difluoride,

聚偏二氟乙烯)膜载体的应用^[5]. PVDF 膜有很好的化学稳定性和机械强度,最初被应用于凝胶电泳分离的蛋白质的印迹转移^[7],其后不久美国波士顿大学和 MilliGen 公司的研究人员在 PVDF 膜上引入活性基团,制成不同类型的能与蛋白质与多肽进行共价偶联的膜载体.目前已成功地应用于固相序列分析的这类 PVDF 膜载体有两种,一种是对二异硫氰酸苯酯 PVDF 膜(DITC-PVDF)^[8],另一种是氨基苯基 PVDF 膜(AP-PVDF).这两种膜载体

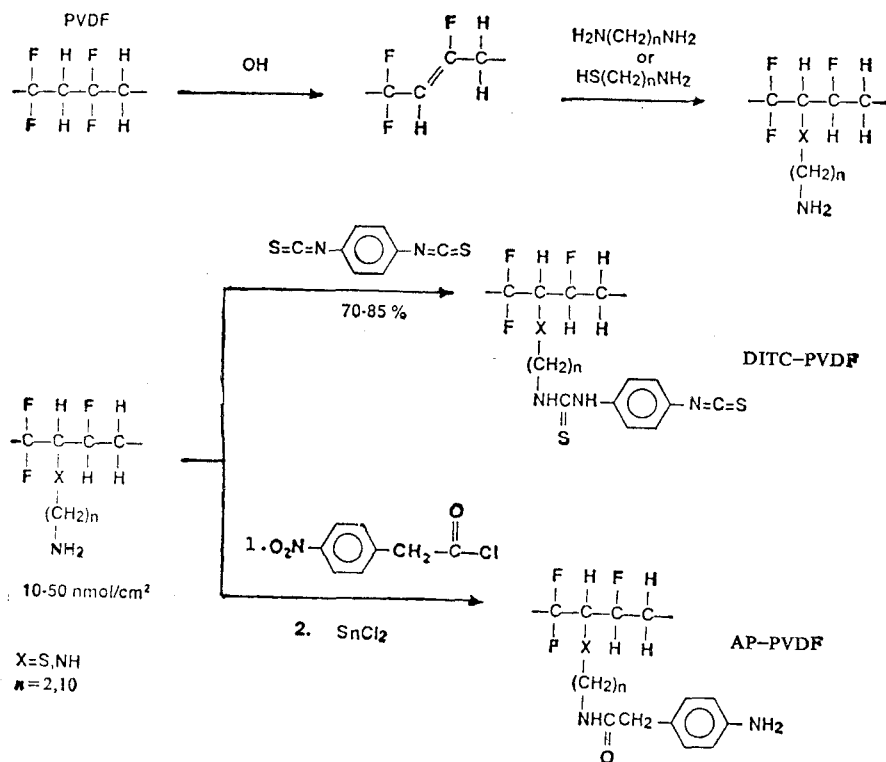


图 1 DITC-PVDF 与 AP-PVDF 膜载体的化学合成

的化学合成过程见图 1.

上述两种膜载体均已成功地应用于 Laursen 等人研制的 6600 型固相序列仪上^[7]. 两种衍生 PVDF 膜载体均制成直径 0.8cm 的小圆片,偶联时先用缓冲液湿润,样品用定量移液器加于膜上.样品通过溶剂的挥发在膜片上浓缩,并渗入疏松的膜片内层从而有与膜上活性基团充分接触并发生反应的机会.这样可增加偶联率并减少样品的机械损失.偶联后的膜片可以很方便地转入序列仪的反应器中.这种衍

生 PVDF 膜片有很好的通透性,溶剂可以对之进行充分的洗涤,使 PTH 氨基酸分析时的背景基线更为干净,从而提高了分析的灵敏度.上述 DITC-PVDF 膜片用于含有赖氨酸的多肽与蛋白质的偶联,一般蛋白质样品(10—1000 pmol)的偶联率在 90% 以上,在 6600 固相序列仪上分析的 PTH 氨基酸的重复收率在 93—97%^[6]. 重复收率 (Repetitive yield) 是检验序列测定效率的最主要指标,重复收率越高,则对一定的样品可以测定的序列越长,一般固相

法的重复收率稍高于气相法,因其在测定过程中样品的丢失极小。对于不含赖氨酸的多肽与蛋白质样品则可以用 AP-PVDF 膜片进行偶联。其固相化过程是通过水溶性的 N-乙基-3-(3-二甲基丙基)碳二亚胺(EDC)活化样品的 C-末端羧基,使之与载体上的芳胺基发生共价偶联反应。在 PVDF 膜上引入芳胺基比脂肪族胺基要好,因为芳环上的 $-NH_2$ 基团的 pK_a 值约为 4.5,用 pH 为 5.0 的缓冲液进行偶联时,上述大部分 $-NH_2$ 基呈未质子化状态,反应产率高;而在这一 pH 下样品 N-末端的 α -氨基是质子化的,不会发生反应。用 10—1000 pmol 范围的不同蛋白质与多肽样品与 AP-PVDF 膜片进行偶联,偶联率在 30—70% 之间,进行序列分析的重复收率为 89—96%。

在固相序列测定中曾被广泛使用的多孔玻璃珠(CPG)载体,有化学性能稳定,机械强度高和偶联容量大等优点。但偶联操作不便,易产生样品机械损失。为克服这一不足,最近已研制出一种一次性 CPG 毛细管柱^[8]。这种毛细管柱制作很容易,内装约 10mg 不同类型的 CPG 载体,柱两头用烧结玻璃纤维或 PVDF 封口,偶联时靠毛细作用将溶解于偶联缓冲液的样品自动吸入柱内并发生偶联反应,然后将毛细管柱转移到序列仪中进行分析。根据样品的性质,毛细管柱内可填装带有不同衍生基团的多孔玻璃珠,如 DITC 玻璃珠,AP 玻璃珠以及 AEAP(N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基)玻璃珠,后者用于经溴化氰切割的多肽的偶联。上述方法大为简化了原来用 CPG 的操作过程,基本排除了偶联过程中样品的机械损失,适合于微量样品的偶联与序列测定。

2 经 SDS 与双相凝胶电泳分离的蛋白质样品的固相序列分析

对于用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳以及双相凝胶电泳分离的微量蛋白质进行直接序列测定,是对当前蛋白质序列测定技术的一项挑战。近年来,固相序列测定技术也朝这方面进行努力,有了重要的进展。

较早的方法是采用对二异硫氰酸苯酯玻璃纤维膜片(DITC glass fiber)^[9,10],通过印迹转移把凝胶电泳分离的蛋白质转移到膜上。蛋白质偶联到 DITC-GF 膜上以后可用考马斯亮蓝显色,然后把需要的条带剪下进行序列分析。经这种处理的样品可用固相方法也可用气相方法进行序列分析,这一方法的不足之处在于 DITC-GF 膜片的制备较麻烦。由 Pappin 等人^[11]最近发展的一项方法是利用 PVDF 膜进行的。该方法是首先把凝胶板上的蛋白质通过印迹法转移到 PVDF 膜上,然后把晾干的该 PVDF 膜浸入 20% 的甲醇水溶液数秒钟,没有吸附蛋白质的膜片部分很快被甲醇浸润而颜色较深,有蛋白质的部分则显出浅色的条带。也可以用另一种更为灵敏的方法即用二氢荧光素喷洒膜片在紫外灯下观察蛋白质条带。确定了目的蛋白质条带以后,剪下带有条带的膜片,在其上先后加入 DITC 和聚乙烯胺(polyvinylamine)溶液,经 45℃ 保温使之发生偶联反应。蛋白质分子则通过 DITC 偶联到聚乙烯胺上,在 PVDF 膜上形成一有通透性的薄层,然后即可进行固相序列分析。该方法对凝胶中分子量从 6 000 到 100 000 的蛋白质样品进行了成功的序列分析,凝胶中蛋白质的回收率为 38—52%。该种方法的优点是不必对 PVDF 膜事先进行衍生处理,操作简单,不足之处是印迹转移过程中不同蛋白质的收率相差较大。另一种最近发展的对凝胶电泳分离的蛋白质进行固相分析的方法是利用前面提到的 DITC-毛细管柱^[13]。该方法是直接把经考马斯亮蓝显色的蛋白质凝胶带放入一个 1ml 的塑料移液管尖(pipet tip)中,下连一根 DITC 毛细管柱,系统内充满缓冲液(pH 8.9),然后置于电泳仪上进行电洗脱偶联(electroelution attachment),蛋白质样品在电场作用下进入毛细管中,并与其 DITC 基团发生偶联反应。通过用 ^{125}I 标记的不同分子量的样品进行测定,凝胶中蛋白质的偶联率可达 80—90%,Edman 降解的重复收率为 92—94%。该方法的优点是偶联容量大,可以富集几次凝胶电泳的蛋白质区带同时

进行电洗脱偶联。

3 固相序列测定中的新方法

固相序列测定技术相对于液相和气相方法的一个最突出的优点在于固相法中样品是共价偶联在载体上的,因而可以选用较为强烈的化学试剂和反应条件而不会使样品在 Edman 降解过程中丢失。近年的固相序列测定实践中,引进了一些新的方法,增加了该技术的效率和应用范围。

3.1 三硝基苯磺酸 (TNBS) 及荧光胺的应用 在蛋白质或较长肽段的序列测定中,当降解进行到数十个循环以后,各循环残留的杂质将超出被检出的 PTH-氨基酸。背景杂质出现的一个重要原因是 Edman 降解过程中肽链的部分断裂,从而出现新的 N 端。由于 TNBS 能与氨基反应而不与脯氨酸中的亚氨基 ($-NH-$) 反应,因而在序列测定中遇到末端是脯氨酸残基时,加入 TNBS,以封闭反应物中带有氨基的杂质 (图 2),从而使 PTH-氨基酸的分析重新出现清晰的背景。该方法可以有效地延长一个样品降解的循环数^[12]。

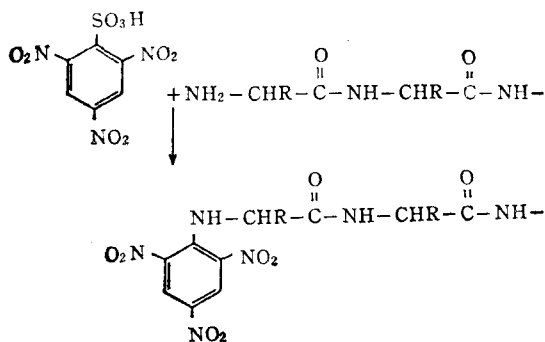


图 2 TNBS 封闭 $-NH_2$ 的反应

徐秀璋等^[13]报道在进行手工固相序列分析时,采用荧光胺作类似上述方法的处理,即在测定到脯氨酸残基时加入荧光胺以封闭杂质的氨基,可以使一个样品的降解循环数增加 10 个以上,效果非常明显。除上述两种化合物外,早先 Bhowen 等人^[14]曾用邻苯二甲醛 (OPA) 进行类似的处理,也曾获得较好的效果。但相比

之下,上述 3 种试剂中 TNBS 更好一些,因其在乙腈溶液中能长期保持稳定,能很好地与 Edman 降解的缓冲液相混合,因而更适合于固相序列仪中使用。

3.2 蛋白质序列中磷酸化修饰位点的确定 在目前的序列分析方法中,蛋白质某些残基的磷酸化这种最重要的转录后修饰基团通常很难确定。固相序列分析技术最近的发展为这一问题提供了解决的方法。Aebersold 等人^[15]的研究表明,蛋白质中的磷酸化的酪氨酸可在序列测定中与其他氨基酸残基同样地得到降解,但其 PTH 衍生物 (PTH-PY) 是一个高度极性的化合物,该化合物在气相序列仪中很容易被丢失 (因不能被非极性的溶剂有效转移)。而固相技术则可以对之进行有效的抽提和转移,PTH-PY 可以同其他 PTH-氨基酸一样进行 HPLC 分析,只需在层析缓冲液中加入 1mmol/L 的 PO_4^{3-} 和 1mmol/L 的 EDTA,以使 PTH-PY 呈现较尖的洗脱峰。PTH-PY 在 HPLC 层析图谱上的出峰位置一般在 PTH-Asp 和 PTH-Gly 之间。该实验室用 6600 固相序列仪成功地确定了脊髓碱性蛋白 (MBP) 第 67 位的磷酸化酪氨酸。

4 第二代蛋白质固相序列分析仪

由固相序列测定技术的创始人 Laursen 为首的研究组于 1989 年推出第二代固相序列分析仪即美国 MilliGen 公司的 6600 型固相微量蛋白质序列分析仪^[7]。该仪器在灵敏度,分析速度和数据处理上较旧型的固相仪有很大的改进。除采用了本文上述一些新技术外,该仪器还有以下一些特点:采用适当强化的 Edman 降解条件如裂解和转化分别在 60°C 和 80°C 下进行,使每一循环仅需 35min (包括完成 PTH 分析和数据处理)。该仪器采用微型螺杆泵推动注射器输送试剂和溶剂,用量准确,重复性好。采用联机 HPLC 对 PTH 进行分析,用 269nm 和 313nm 双波长检测,增加了 Ser, Thr 和 Cys 残基检测的准确性。对反应中的副产物和多余试剂用含有环己胺 (作为 PITC 的清

除剂)的甲醇和乙酸乙酯交替洗涤,从而使 HPLC 分析的背景非常干净,提高了检测的灵敏度。该仪器由一台 AT286 微机控制,数据处理有自动背景衰减程序,可分析出 0.2pmol 的 PTH 信号。对 100pmol 的乳球蛋白(Lactoglobulin)进行分析可以成功地测定到第 60 个残基。该仪器的很多性能已达到 477 型气相序列仪的水平,某些方面已超过后者。其不足之处仍然是样品的固相化处理较复杂,要求操作人员有一定的经验。

以上扼要地综述了固相序列测定技术近年来的一些进展。这些新的进展和该技术本身所特有的长处,恢复了人们对这一技术的兴趣。特别是该技术适合于发展更高灵敏度的新型 Edman 试剂,因而有可能使该技术在将来对更微量的蛋白质与多肽样品(1pmol 以下)的序列分析中出现新的发展前景。

参 考 文 献

1 Edman P. *Acta Chem Scand*, 1950; 4: 283

- 2 Laursen R A. *J Am Chem Soc*, 1966; 88: 5344
- 3 Hewick R M, Hunkapiller M W, Hood L E *et al.* *J Biol Chem*, 1981; 256: 7990
- 4 Hunkapiller M W, Strickler J E, Wilson K J. *Science*, 1984; 226: 304
- 5 Coull J M, Dixon J D, Laursen R A *et al.* In: Wittmann-Liebold B ed, *Methods In Protein Sequence Analysis*, Berlin: Springer-Verlag, 1989: 69—78
- 6 Pluskal M F, Przekop M B, Kavonian M R *et al.* *Biotechniques*, 1986; 4: 248
- 7 Laursen R A, Dixon J D, Liang S P *et al.* In: Wittmann-Liebold B ed, *Methods In Protein Sequence Analysis*, Berlin: Springer-Verlag, 1989: 61—68
- 8 Liang S P, Laursen R A. *Anal Biochem*, 1990; 188: 366
- 9 Walsh M J, McDougall J, Wittmann-Liebold. *Biochemistry*, 1988; 27: 6867
- 10 Aebersold R H, Teplow D B, Hood L E *et al.* *J Biol Chem*, 1989; 264: 4229
- 11 Pappin D J C, Coull J M, Koster H. *Anal Biochem*, 1990; 187: 10
- 12 Laursen R A, Lee T T, Dixon J D *et al.* In: Jornvall H ed, *Methods In Protein Sequence Analysis*, Basel: Birkhauser Verlag, 1991: 47—54
- 13 徐秀璋,张伟. *生物化学与生物物理进展*, 1988; 15: 131
- 14 Bhowan A S, Bennett J C, Morgan P H *et al.* *Anal Biochem*, 1981; 112: 158
- 15 Aebersold R H, Watts J D, Morrison H D *et al.* *Biochemistry*, 1991; in press

信息服务

专利技术、实用技术资料服务台

北京市星火技术研究所代为本刊读者检索下列技术资料,该所对检索资料的真实性负法律责任。

- 1589#《雏鸡的孵化技术》18 元
- 1592#《鸡的病疫防治技术》18 元
- 2133#《科学养鸡新技术》50 元
- 2145#《天然饮料生产技术》64 元
- 2162#《豆类制品的加工工艺与配方技术》48 元
- 2186#《肉鸽的饲养技术》56 元
- 5074#《明胶、骨胶的生产技术》18 元
- 5107#《军转民技术转让项目农业类》16 元
- 5109#《军转民技术转让医疗仪器类》10 元
- 5045#《北方养鱼高产技术》14 元
- 5026#《饲料添加剂配方 72 例》12 元
- 5162#《生化试剂类产品采购指南》48 元
- 5439#《湖泊水库渔业养殖技术》10 元
- 6005#《快速养鳖新技术》28 元
- 5233《食品添加剂发展预测》24 元
- 5232《工业水处理剂现状及发展预测》24 元

- 5083《灭蚊蝇涂料生产技术》10 元
- 5899《化肥养鱼新技术》10 元
- 5347《各种沼气池的建设》18 元
- 5438《特种水产养殖技术》40 元
- 5461《可生物降解的基因及制造技术》40 元
- 6001《砂锅栽培竹笋新技术》14 元
- 6003《蚕沙的综合利用技术》20 元
- 6034《番红花室内无土栽培技术》30 元
- 6055《猪圈提硝新技术》10 元
- 6147《高效稻田除草剂配制技术》18 元
- 6045#《米糠生产肌醇和谷维素技术》12 元
- 6080#《旱原苹果亩产 5 吨的栽培技术》7 元
- 6201#《棉秆制备木糖的生产技术》7 元
- 6432#《快速养鸡新技术》14 元
- 6438#《防治鸡传染病的综合疗方》12 元

[北京 100024, 北京 867 信箱 20816 组

李群(电话: 5762127, 5762194)]