

蛋白质顺序测定新试剂 ——4N, N-二甲氨基偶氮苯-4'-异硫氰 酸酯 (DABITC) 的合成和使用

俞鹤年 潘家秀

(中国科学院上海生化所)

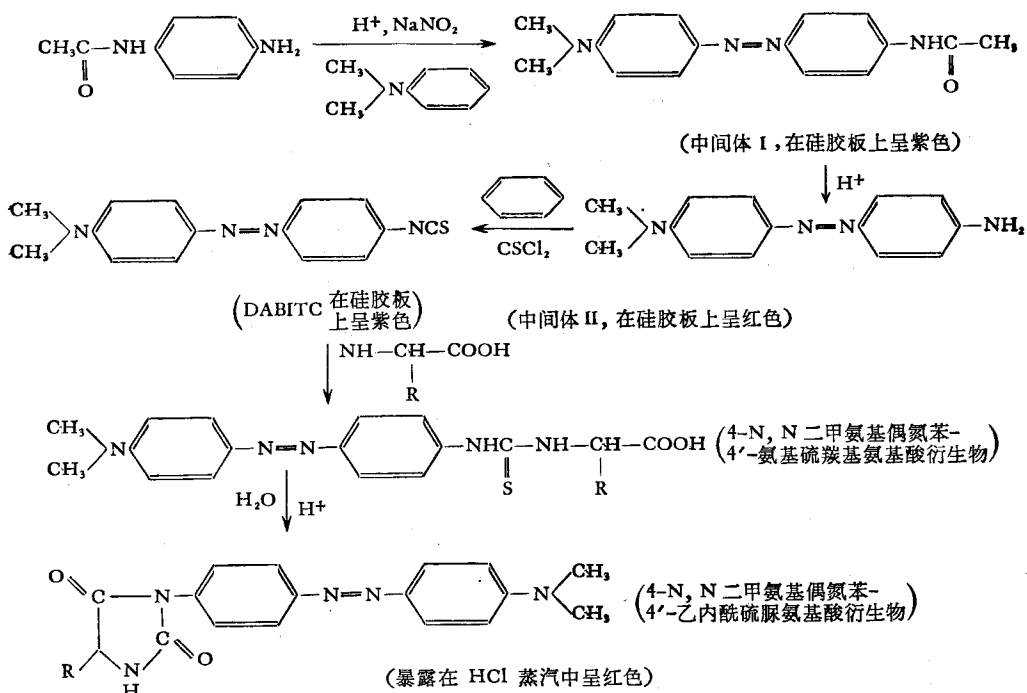
DABITC 是一种新型的有色 Edman 试剂。以此试剂测定多肽和蛋白质的顺序, 比经典的 Edman 方法灵敏25倍, 样品量仅需 2—8n mol.。标记氨基酸的检测灵敏度可达 1p mol., 较之 DNS 法优越, 能测定酸易毁坏的氨基酸如: 谷氨酰胺, 天冬酰胺、色氨酸。此方法简单、灵敏、快速, 不需要蛋白质顺序测定仪等专门仪器及同位素材料。Chang 等报道该法^[1-4]可测定蛋白质, 多肽的氨基酸顺序达 20—30 个。我们按

Chang 方法^[5]合成了此试剂, 并对标记的氨基酸聚酰胺膜层析条件和测定方法进行了摸索。

实验部分

1. 材料: L-氨基酸和促胃泌素系本所东风试剂厂产品。P-物质类似物, 胰岛素 B-链分别由本所施溥涛, 朱尚权提供。化学试剂和溶剂的纯度不低于化学纯, 并经重新处理^[1]。聚酰胺膜为黄岩实验化工厂产品。

2. DABITC 的合成路线:



(1) 中间体 I 的合成 对-乙酰胺基苯胺 3 克, 加热溶于 25 毫升水, 冷却后加入浓盐酸 5 毫升, 并以冰浴冷到 5℃ 以下。1.47 克

NaNO₂ 溶于 3 毫升水, 缓慢加到冷乙酰胺基苯胺盐酸化物溶液中, 搅拌 10 分钟 (温度不得超过 10℃)。在此重氮氯化物中加入 3.2 毫升 N,

N 二甲基苯胺, 搅拌 20 分钟, 再加入以极少量水溶解的 4 克乙酸钠溶液, 产生中间体 I 的沉淀, 过滤, 干燥。

(2) 中间体 II 的合成: 粗中间体 I (1 克) 溶解在 10 毫升甲醇, 5 毫升水, 5 毫升浓盐酸的混合液中, 回流 1 小时。冷却后, 加入 80 毫升 1M 氢氧化钠, 搅拌 20 分钟。将所产生的中间体 II 沉淀, 过滤, 干燥过夜。

(3) DABITC 的合成: 1 克中间体 II 溶于 40 毫升苯, 加入 0.12 毫升硫代光气, 回流 1.5 小时。反应液冷却, 过滤, 浓缩后, 通过 6×12 厘米硅胶干柱(上海五四农场化剂厂; 粒度 300 目), 以苯作洗脱剂, DABITC 首先被洗脱, 中间体 II 在柱顶移动较慢。含 DABITC 的洗脱液减压蒸发去苯, 用纯乙醇结晶, 得深橙色嫩叶状结晶, 熔点 169°C 。红外光谱测定在 2150cm^{-1} 有一个 $\text{N}=\text{C}=\text{S}$ 特征峰。元素分析(分子式: $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{S}$) 计算值 C63.8 N19.9 S 11.3 H5.00 实验值 63.0 20.0 10.9 5.50

3. DABTH 氨基酸的制备^[5]和聚酰胺薄膜层析

500 n mol. 氨基酸溶于 100 微升 pH 10.1 缓冲液 (2 毫升 2M 乙酸, 1.2 毫升三乙胺, 25 毫升水, 25 毫升丙酮), 加入 $2\mu\text{mol}$ DABITC/毫升丙酮溶液 100 毫升(遇赖氨酸时 DABITC 试剂需过量 12 倍), 在 50°C 保温 1 小时。然后加入 200 微升水和 400 微升氯化氢饱和的乙酸溶液, 再经 50°C 保温 50 分钟, 真空干燥, 并加 400 微升无水乙醇溶解, DABTH-氨基酸在聚酰胺膜上层析鉴定。膜为 7×7 厘米, 3.5×3.5 厘米。在有盖的层析缸中展层。以乙酸:水 = 1:2 (v/v) 为第一向展层剂, 甲苯:正己烷:乙酸 = 2:1:1 (v/v) 为第二向展层剂。在分离除亮氨酸和异亮氨酸外的 18 种 DABTH 氨基酸时, 下述 (1), (2), (3) 组 DABTH 氨基酸分离效果并不理想, 所以 (1) 分离谷氨酰胺、天冬酰胺, 丝氨酸, 苏氨酸时, 以乙酸二水:二甲基甲酰胺 = 1:2.5:0.010 (v/v) 代替原第一向溶剂展层; (2) 分离精氨酸, 组氨酸, 赖氨酸时, 以甲苯:正己烷:乙酸:三乙胺 = 2:1:1:0.015 (v/v)

代替原第二向展层剂。(3) 分离缬氨酸, 苯丙氨酸, 甲硫氨酸、亮和异亮氨酸时, 可以丙酸:癸烷:乙苯 = 1:1:2 或异辛烷:乙酸:乙苯 = 1:0.6:2 (v/v) 代替第二向层析系统。层析谱见图 1。亮氨酸和异亮氨酸的分离可采用硅胶薄层层析^[6]。层析完毕, 以盐酸蒸气熏 DABTH-氨基酸, 颜色由紫 $\rightarrow$ 兰 $\rightarrow$ 红。借助蓝色标记物 DABITC-二乙胺可确定 DABTH 氨基酸位置^[7]。它的合成可取 10—20 pmol. 二乙胺按上述 DABTH 氨基酸制备的方法进行。

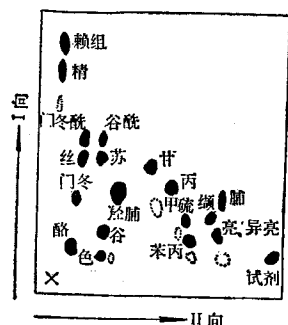


图 1 DABTH 氨基酸聚酰胺薄膜层析谱

虚线斑点为副产物; I 向展层剂 (乙酸:水:二甲基甲酰胺 = 2.5:1:0.010); II 向展层剂 (丙酸:癸烷:乙苯 = 1:1:2)

(4) 蛋白质多肽 N 端氨基酸顺序测定方法^[1]: 多肽、蛋白质 (2—8 n mol.) 置于 1×5 厘米离心管, 使溶于 80 微升 50% (v/v) 吡啶溶液, 第一次偶合反应用 40 微升 DABITC 溶液 (2.82 mg DABITC 溶于 1 毫升吡啶溶液), 充 N_2 , 10 秒钟, 以橡皮塞塞住管口。在 52°C 水浴保温 50 分钟。第二次, 再加入 10 微升异硫氰酸苯酯, 于 52°C 反应 30 分钟。过量试剂和副产物, 以 0.5 毫升混合液 (正庚烷:乙酸乙酯 = 2:1 (v/v)) 抽提 2—3 次。有机相用细滴管吸去。水相以高真空度泵蒸发, 干燥的残留物以 50 微升无水三氟乙酸溶解, 充 N_2 , 管口用橡皮塞塞住, 在 52°C 烘箱保温 15 分钟。样品再次真空干燥, 溶于 50 微升水中, 用 200 微升乙酸乙酯抽提所标记氨基酸, 肽在水相, 干燥后进行下一轮降解测定。乙酸乙酯抽提物蒸发后, 残渣溶于 20 微升水和 40 微升氯化氢饱和乙酸溶液, 于 52°C 保温 50 分钟, 真空干燥, 干燥物溶于 5—30 微

升乙醇，取 1/40—1/5 乙醇溶解物按上述 (3) 方法鉴定 DABTH 氨基酸。

本法已应用于促黄体生成素的激素(10肽)和合成带保护基七肽水解液分析，P 物质类似物(赖、脯-)，促胃泌素(β -丙、色、甲硫-)胰岛素 B 链(苯丙、缬、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸)的分析。(见图 2.3)。

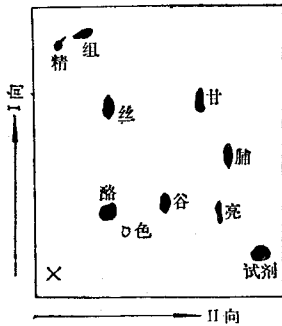


图 2 促黄体生成素的激素水解液 DABTH 氨基酸聚酰胺薄膜层析谱
焦谷、组、色、丝、酪、甘、亮、精、脯、甘氨酸(十肽)

讨 论

1. 为改进在国产聚酰胺薄膜上 DABTH 氨基酸的分离效果，我们根据薄层层析原理^[8]采

取下列措施：(1) 改变层析系统的比例，降低酸度，如在第二向层析系统中以丙酸代替乙酸，或将乙酸用量改为原来的 0.6 倍，使大部分标记的氨基酸 R_f 值下降，便于分离。在第二向层析系统中加入少量的三乙胺，吡啶使标记的组、赖、精 R_f 值增大，使其相互分开。(2) 在层析系统中加入和被分离的标记氨基酸化学结构相似的溶剂。(如加少量二甲基甲酰胺)使标记羟基氨基酸和酰胺基氨基酸分离得到改善。(3) 增长溶剂的碳链，降低极性，如乙苯。癸烷、丙酸代替甲苯、正己烷，乙酸。使标记的甲硫、苯丙、缬、亮和异亮氨酸易于分离。

2. 蛋白质，多肽的 N 端氨基酸顺序测定受被分析样品的性质，纯度，试剂的质量，反应条件的控制等因素的影响。测定过程需要充 N_2 ，避免 O_2 的干扰；尤其是偶合和裂解两步溶剂中 O_2 和过氧化物对于测定具有更大的危害性。

测定更长的肽段顺序的操作方法，尚有待改进。

上海新华医院倪蕴玉同志参加部分工作，特此致谢。

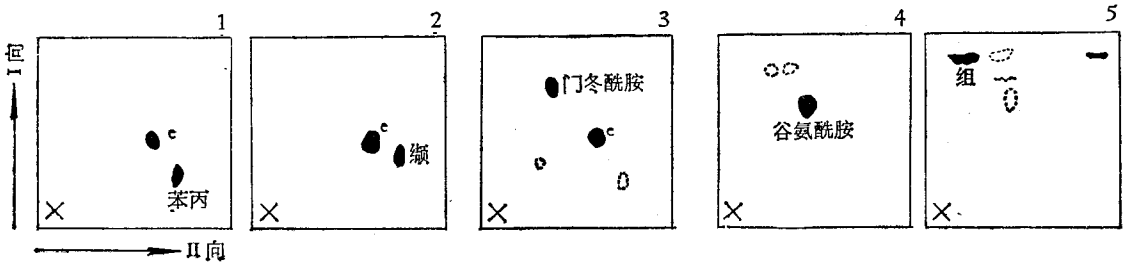


图 3 胰岛素 B 链 N 端五个氨基酸的顺序测定
“c”为 DABITC 二乙胺蓝色标记物

参 考 文 献

- [1] Chang, J. Y. et al.: *FEBS Lett.*, **93**, 205, 1978.
- [2] Pon, C. L. et al.: *FEBS Lett.*, **101**, 157, 1979.
- [3] Wittmann-Liebold, B. et al.: *FEBS Lett.*, **108**, 69, 1979.
- [4] Wittmann-Liebold, B.: *FEBS Lett.*, **108**, 75,

- 1979.
- [5] Chang, J. Y. et al.: *Biochem. J.*, **153**, 607, 1976.
- [6] Chang, J. Y.: *J. Chromatog.*, **140**, 125, 1977.
- [7] Chang, J. Y.: *Biochem. J.*, **163**, 517, 1977.
- [8] 潘家秀等:《蛋白质化学技术》，1962 年, 35 页, 科学出版社出版。

[本文于 1980 年 5 月 29 日收到]