

用化学方法降解肽链 N-末端被封闭的残基及其鉴定

徐秀璋 王少芹*

(中国科学院生物物理所, 北京)

在测定蛋白质或多肽的一级结构时, 常会遇到 N-末端被封闭的情况, 使 Edman 降解试剂失去作用, 无法用正常的降解程序进行蛋白质或多肽的一级结构的测定^[1]. N-末端受封闭的种类很多, 其中主要是乙(甲)酰化和焦谷氨酰环化. 它们大量存在于自然界的蛋白质或活性多肽中, 也有部分是在处理过程中通过化学反应形成的. 目前对 N-末端酰化的肽链结构除了用质谱法^[2]等物化方法测定外, 几乎没有别的更好的方法, 至于焦谷氨酰残基环化的肽链结构的测定, 直到 1978 年 Podell 等人^[3]发现用焦谷氨酰氨肽酶降解, 才找到一个有效的方法, 但是酶法降解反应条件苛刻, 试剂易失活, 来源困难, 操作繁琐, 使用起来有一定的局限性.

本文根据甲醇分解作用的启示^[4,11], 尝试通过化学方法, 即用 1N HCl-甲醇试剂在温和的条件下, 打开焦谷氨酰残基的吡咯烷酮环, 暴露其氨基, 使 Edman 降解试剂发挥作用, 然后按常规 Edman 方法或 DABITC/PITC 双偶合法降解.

实验证明, 用本方法降解环谷氨酰残基, 操作简便, 效率较高, 试剂价廉, 易得, 并能快速而准确的鉴别降解产物焦谷氨酸衍生物与酶降解法比较, 有一定的优越性.

材料与 方法

一、材料:

焦谷氨酸, 焦谷氨酰-组氨酸 由动物研究所董明辉提供

猪胰岛素 由生物物理所董北提供

胰岛素 A 链和胰岛素 B 链(还原型) 由生

物物理所十二室提供.

层析聚酰胺薄膜 (15 × 15cm) 浙江省黄岩化学分析材料厂

硅胶板 Art5554 (Kieselgel 60, F254, E. Merck); PITC (异硫氰酸苯酯),

DABITC (4-N, N-二甲氨基 偶氮苯-4'-异硫氰酸酯) 和 DMAA 缓冲液 (Pierce U. S. A. 序列纯);

TFA (三氟醋酸), 吡啶、无水甲醇 (LKB Biochrom, 序列纯); 其他试剂均为国产分析纯.

1NHCl-甲醇^[11]: 盐酸蒸气通入无水甲醇液中, 平衡数天.

氨基酸组份分析用日立 835-50 分析仪.

二、方法:

1. 焦谷氨酸开环后, DABTH-氨基酸衍生物的制备及在聚酰胺薄膜上的鉴定, 按 J. Y. Chang 的双偶合法^[5,6]略加改进. 具体步骤如下:

称 0.1mg 焦谷氨酸

开环 ↓ + 1NHCl/MeOH (1:11V/V) 100μl

↓ 充 N₂, 封口, 混合、35℃ 保温 48 小时

↓ 真空干燥

偶合 ↓ + 80μl 50% 吡啶/水

↓ + 40μl DABITC/纯吡啶 (0.2mg DABITC + 80μl 吡啶, 新鲜配制)

↓ 充 N₂, 混合、50℃ 45 分钟

↓ + 20μl PITC

↓ 充 N₂, 混合 50℃ 30 分

* 中国科技大学生物系研究生.

抽提↓ $4 \times 200\mu\text{l}$ 正庚烷/乙酸乙酯(2:1V/V)每次充 N_2 , 混合, 离心(3500 转/分) 3 分, 移去上层相

↓ 下层水相真空干燥

转化↓ + $100\mu\text{l}$ 50% TFA/水

↓ 充 N_2 , 混合、 50°C 50 分

↓ 真空干燥

↓ + $40\mu\text{l}$ 无水乙醇, 聚酰胺薄膜($3 \times 3\text{mm}$)层析鉴定。

层析溶剂: I 相: 33% 乙酸

II 相: 甲苯-*n*-己烷-乙酸(2:1:1V/V)

2. 焦谷氨酸开环后 PTH-氨基酸衍生物的制备及在硅胶板上的鉴定, 按 Edman 降解法^[7,8]略加改进。具体步骤如下:

焦谷氨酸样品(0.1mg)

↓ 开环 方法同上

偶合↓ + 0.2ml DMAA 缓冲液

↓ + $50\mu\text{l}$ PITC

↓ 充 N_2 , 混合, 50°C 30 分

抽提↓ $4 \times 1.5 \sim 2.0\text{ml}$ 苯、每次充 N_2 , 混合、离心(3500 转/分) 3 分, 去上层相,

↓ 水相真空干燥

转化↓ + 1NHCl 0.3ml

↓ 充 N_2 , 混合, 80°C 10 分

抽提↓ $2 \times 0.7\text{ml}$ 乙酸乙酯, 每次充 N_2 , 混合, 离心(3500 转/分) 3 分, 取上层相, 干燥

↓ + 40ml 乙酸乙酯, 硅胶板鉴定

层析溶剂:

I 相: 氯仿-乙醇(98:2V/V)

II 相: 氯仿-乙醇-甲醇(88.2:1.8:10V/V)

3. 焦谷氨酸开环后的衍生物的氨基酸组份分析鉴定

谷氨酰胺样品约 0.3mg, 均分为 3 份, 编号

1—3. 样品处理步骤如下:

2.3 号管

环化↓ + $100\mu\text{l}$ 30% TFA/水

↓ 充 N_2 , 混合、室温(26°C), 48hr.

↓ 真空干燥

3 号管开环, 具体方法同“方法 1”。

1、2、3 号管各加 2ml 柠檬酸钠缓冲液(pH 2.2)做氨基酸组份分析。

4. 焦谷氨酰-组氨酸的开环、降解实验:

焦谷氨酰-组氨酸样品

↓ 开环(同“方法 1”)

↓ DABITC/PITC 双偶合法降解, 偶合, 抽提、同“方法 1”,

裂解↓ + $50\mu\text{l}$ TFA

↓ 充 N_2 , 混合, 50°C , 15 分

↓ 真空干燥

抽提↓ $30\mu\text{l}$ 重蒸水

↓ $2 \times 50\mu\text{l}$ 醋酸丁酯, 每次充 N_2 , 混合, 离心(3500 转/分) 3 分钟, 取上层有机相干燥, 作转化、同“方法 1”

↓ 下层水相真空干燥

↓ 偶合, 抽提, 转化、鉴定(同“方法 1”)

5. 猪胰岛素样品的实验

称胰岛素 0.3mg, 用 DABITC/PITC 双偶合法(同方法 4)连续降解三步, 确信 B 链 N-末端为 Gln, A 链 N-末端为 Glu 残基, 进行 Gln 的环化(同“方法 3”), 然后开环, (同“方法 1”)再用 DABITC/PITC 双偶合法降解二步、并分别用聚酰胺薄膜层析鉴定。

结果和讨论

焦谷氨酸开环后的 DABTH-氨基酸衍生物的聚酰胺薄膜层析鉴定结果如图 1-1。鉴定点 Pyg 的位置在标记点 D 的右上方(E 为另

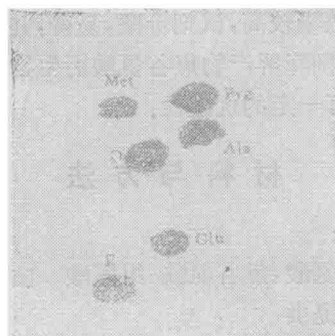


图 1-1 DABTH-氨基酸衍生物在聚酰胺薄膜上的鉴定

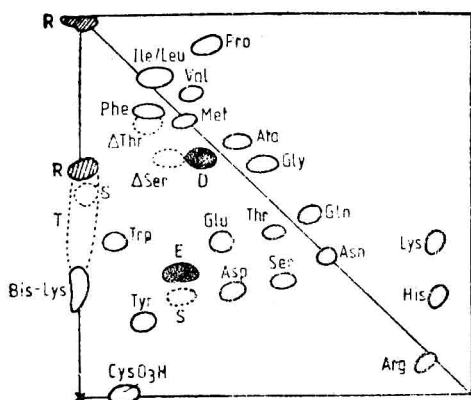


图 1-2 DABTH-氨基酸的标准层析图谱

一个标记点), 其下是丙氨酸的检出点, 其左是甲硫氨酸的检查点(参看图 1-2), 鉴定点的颜色与其他氨基酸检出点的颜色相同, 呈红色, 图 1-1 上出现的谷氨酸的检出点, 除样品本身含有谷氨酸外, 有可能是开环过程中焦谷氨酸转变成的, 文献中^[10]也有类似的报道, 谷氨酸, 谷氨酰胺和焦谷氨酸三者在一定条件下会相互转化。

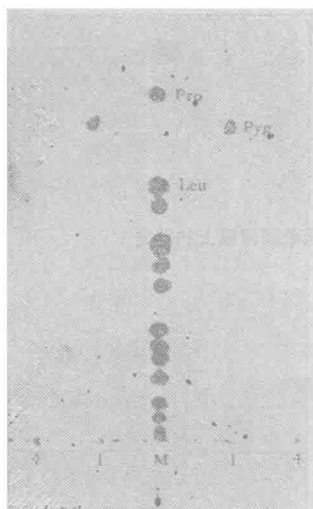


图 2 PTH-氨基酸衍生物在硅胶板上的鉴定

从图 2 可以看到, 鉴定点 Prg 在 I 相(层析溶剂为氯仿:乙醇(98:2V/V))中出现, 鉴定点的位置与其他氨基酸不同, 落在脯氨酸和亮氨酸之间的空区中, 图中“4”点的是未经开环的样品, “1”点的是经过开环的样品, “M”点的是标准 PTH-氨基酸的混合样品。

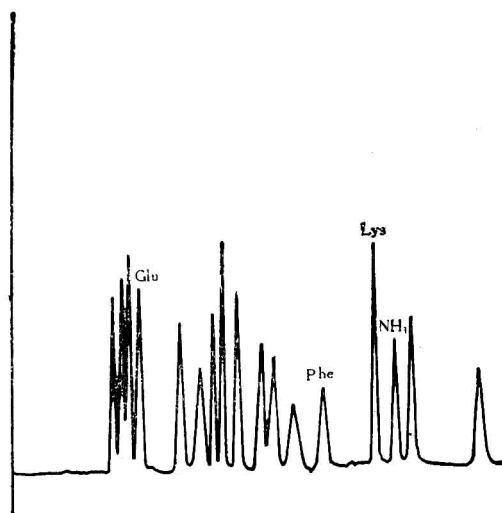


图 3-1 标准氨基酸的组分分析图谱

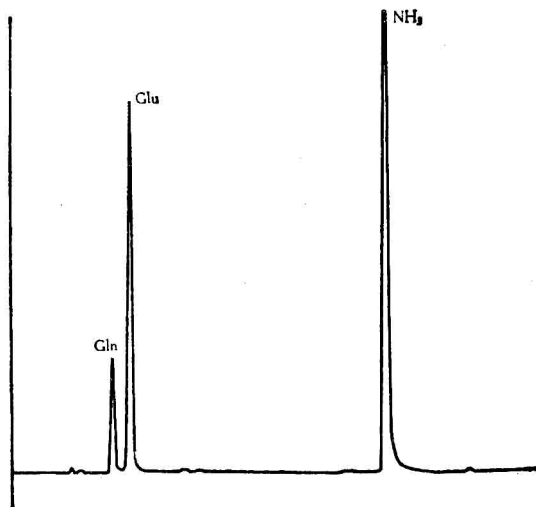


图 3-2 环化后未经开环的样品组分分析图谱

图 3-2 中第一峰是谷氨酰胺, 第二峰是谷氨酸在环化过程中由谷氨酰胺转变成的, 从图 3-3 可以看出, 焦谷氨酸开环后形成的衍生物在氨基酸组份分析的图谱中有自己独立的峰, 峰出现的时间介于苯丙氨酸(前)和赖氨酸(后)之间。图中第一峰为谷氨酸, 是环化和开环过程中形成的。

通过焦谷氨酸的开环产率实验证实其开环产率在 80% 以上, 它与 N-末端受环化的胰岛素及二肽的降解的定性结果相吻合。因此不会因为开环处理引起样品的大量损失、而影响顺

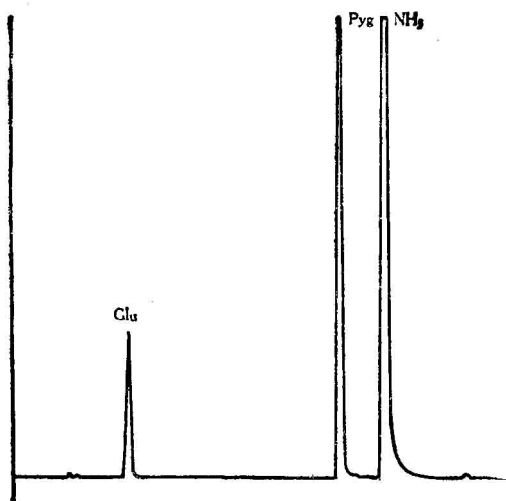


图 3-3 环化后经过开环的样品组分分析图谱

序的测定。

焦谷氨酰开环后的衍生物的降解可按一般的 Edman 方法或 DABITC/PITC 的双偶合法进行。图 4-2 是焦谷氨酰-组氨酸开环后用 DABITC/PITC 双偶合法降解的第一个氨基酸的鉴定图谱，上有谷氨酸的鉴定点是因为样品中含有谷氨酰组氨酸。图 4-1 是样品未经开环，直接用双偶合降解后，产生的 DABTH-氨基酸衍生物鉴定的结果。图 4-3 是降解开环后的二肽样品后，再用双偶合法制备 DABTH-氨基酸衍生物图谱，为组氨酸，与实际相符。

图 5-1, 5-2 是猪胰岛素用双偶合法三步降解后经环化，开环处理，然后再降解(即第四步)的 DABTH-氨基酸的鉴定图谱(见图 5-1)及第五步降解的 DABTH-氨基酸的鉴定图谱

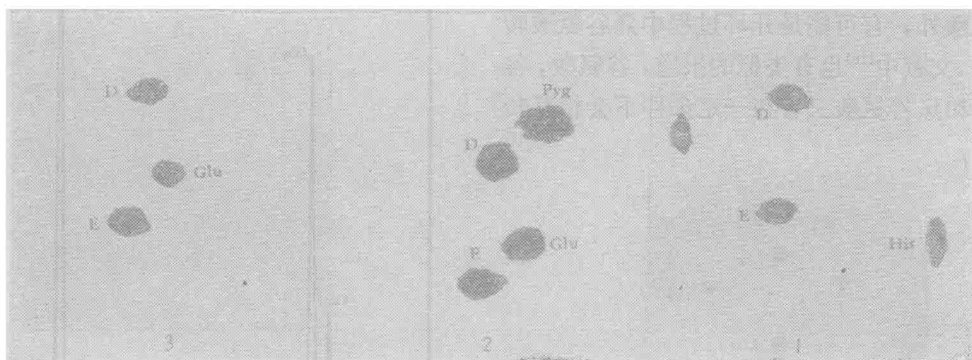


图 4 焦谷氨酰-组氨酸二肽顺序降解产物在聚酰胺薄膜上的鉴定

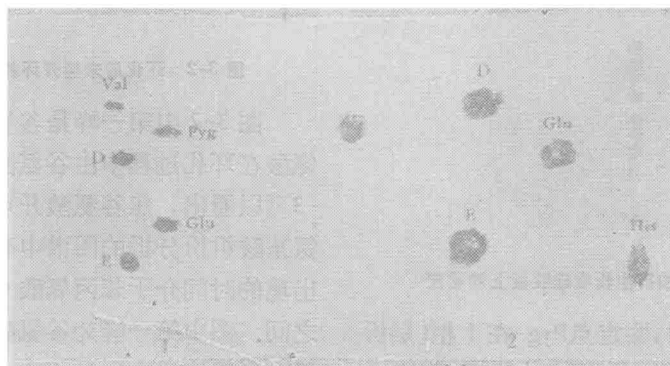


图 5 胰岛素 N-末端环化后的部分顺序降解产物在聚酰胺薄膜上的鉴定

(见图 5-2)。结果也与胰岛素顺序一致。图 5-1 中的缬氨酸是第三步降解中未抽提干净遗留下来的。

由上可以看出：用本方法降解 N-末端焦谷氨酰残基是有效的，对降解产物的鉴定是准确可靠的。

我们在尝试用化学方法开环的过程中,对反应温度及反应时间与开环的关系做了一系列的实验,发现温度越高,开环反应要求的时间越短.由于反应试剂是酸性的,温度太高或时间太长、都会引起肽链断裂,因此我们选用了反应温度 35℃、反应时间 24 小时为反应最佳条件.这样可以保证在开环过程中肽链不断裂的前提下获得高效率的开环. 我们曾选用胰岛素 A 链、胰岛素 B 链和溶菌酶等样品,按上述条件进行开环试验,均未发现肽链有断裂现象.

参 考 文 献

[1] Kennech, A. W. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 261—286, 1981.

- [2] Morris, A. R.: *Nature*, 286, 447—52, 1980.
[3] Podell, D. N., Abreham, G. N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81, 176—185, 1978.
[4] L. R. Croft.: *Handbook of Protein Sequence analysis*, (2nd. ed) Chichester, New York, Brisbane, Toronto, p. 113—116, 1980.
[5] Chang, J. Y.: *Biochem. J.*, 153, 607—611, 1967.
[6] Chang, J. Y.: *FEBS, Lett.*, 93(2), 205, 1978.
[7] Tarr, G. E.: *Methods Enzymol.*, Vol. 47, p 335—57, 1977.
[8] Peterson, J. D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 247, 4866—4871, 1972.
[9] Marshall, E.: *Methods in Protein Sequence Analysis*, Humana Press, Clifton, New Jersey, p. 40—41, 1982.
[10] Fujinami, H. et al.: *Nippon Joze Kyokai Zasshi*, 78(6), 466—474, 1983.
[11] 同文献[9], p. 189—203.

【本文于 1984 年 11 月 21 日收到】

甾体激素受体的提纯倍数与其纯度的关系

季 钟 煜 黄 均 蓉

(中国科学院上海生物化学研究所)

甾体激素受体是一类具有特殊生理功能的蛋白质. 存在于生物体内的各种甾体激素受体,各自接受其专一性甾体激素的信息,例如雌激素受体只能与雌激素相结合,与孕激素等其它甾体激素不能结合. 同时,这种受体的含量,极为稀少,据估计,靶细胞(受体含量最多的组织)匀浆内的受体只占总蛋白的十万分之一^[1]. 因此,若不经十万倍的提纯,就不能得到单一组分的纯受体,这和酶要经上千倍的纯化^[2]相比,受体的提纯就显得更加艰巨.

以上所指千倍万倍,就是生化分离技术中提纯倍数的惯用语,它说明原材料经过一系列分离后,其中所含的受体已被提纯了若干倍的意义. 但提纯倍数不能表示出受体的百分纯度. 因此,在研究提纯甾体激素受体时,必需注意这一问题.

一、比 活

甾体激素受体是用同位素甾体激素的示踪方法测定的. 一分子受体(R)只能与一分子激素(H)结合成一分子复合物(RH),以每分钟衰变值(dpm)或 p mol 表示此 RH 数量(即 R 数量). 故 dpm/mg 蛋白或 p mol/mg 蛋白称为受体比活.

二、提 纯 倍 数

组织匀浆经生化分离,测定出受体的比活,提纯倍数就是这一步与起始步的比活之比. 分离过程中,随着杂蛋白的逐渐除去,受体比活值会逐渐升高,例如牛子宫细胞液内的雌激素受体,经过两步分离后,已提纯 3,200 倍(见表 1).