

- ity relationships in drug design, New York; Alan R Liss INC, 1989; 177
- 13 Ohta M, Koga H. Three-dimensional structure-activity relationships and receptor mapping of N_1 -substituents of quinolone antibacterials. *J Med Chem*, 1991; **34**: 131
- 14 Hopfinger A J. A QSAR investigation of dihydrofolate reductase inhibition by baker triazines based upon molecular shape analysis. *J Am Chem Soc*, 1980; **102**: 7196
- 15 Sheridan R P, Nilakantan R, Dixon J S *et al.* The ensemble approach to distance geometry; application to the nicotinic pharmacophore. *J Med Chem*, 1986; **29**: 899
- 16 Cramer I R D, Patterson D E, Bunce J D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J Am Chem Soc*, 1988; **110**: 5959
- 17 Momany F A, Pitha R, Klimkowski V J *et al.* Drug design using a protein Pseudoreceptor. *ACS Symp Ser Expert Syst Appl Chem*, 1989; **408**: 82
- 18 Regan L, Degrado W F. Characterization of a helical protein Designed from first principles. *Science* 1988; **241**: 976
- 19 Erickson J, Neidhart D J, VanDrie J *et al.* Design, activity, and 2.8 Å crystal structure of 2 C₂ symmetric inhibitor complexed to HIV-1 protease. *Science*, 1990; **249**: 527
- 20 DesJarlais R J, Seibel G L, Kuntz I D *et al.* Structure-based design of nonpeptide inhibitors specific for the human immunodeficiency virus 1 protease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**: 6644

蛋白质和多肽 C 端氨基酸序列研究进展

屠红旻 夏其昌

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

提 要

C 端序列测定长期以来是蛋白质化学领域中的一大难题, 但是生物化学与分子生物学中的许多研究表明了 C 端序列的重要性. 文中介绍了 C 端测定的一些最新技术, 尤其侧重于化学降解法, 特别是运用商品化的 N 端分析仪器分析 C 端序列, 增强了仪器的通用性. 文中还推荐了几种 C 端标记进而分离 C 端肽段, 然后用 Edman 化学法测定 C 端序列的简便方法, 有一定的可行性.

关键词 C 端序列分析, C 端标记, 硫氰酸盐

随着分子生物学研究的深入, 蛋白质及多肽氨基酸序列研究的地位越来越重要. 人们往往要从几十乃至几微克蛋白质样品中获得蛋白质一级结构信息, 以研究其结构功能关系, 或更多的是由蛋白质氨基酸序列制备 DNA 探针, 筛选其 cDNA, 进而进行基因重组工作或表达蛋白质产物. 另外, cDNA 预测蛋白质序列不能完全代替经典的蛋白质分析方法, 尤其对于经过磷酸化、糖基化和酰胺化等后加工的蛋白质. 因此蛋白质的微量序列测定一直是重要研究课题.

N 端氨基酸序列测定应用 Edman 化学降解法已经能达到高度自动化、微量 (pmol) 水平, 可以分析蛋白质 N 端 20—40 或更多氨基酸残基, 小于 50 个氨基酸残基的多肽则可分析完全. 但有不少蛋白质尤其在哺乳动物及高等植物中 N 端被修饰而封闭, 且封闭的方式也不尽相同, 如焦谷氨酰化、甲酰化、乙酰化或脂肪酰化等, 给蛋白质 N 端序列测定带来了困难, 而 C 端羧基被修饰的情况除酰胺化外, 很

少有其他报道. N 端蛋白质序列能提供有价值的信息, 但人们也希望从 C 端获得更多信息, N 端及 C 端结构对于一个蛋白质来说是两个关键的片段. C 端序列研究对于研究多肽加工、DNA 重组产物质量监控都非常重要. 同时 cDNA 起始于 C 端. 因此了解 C 端氨基酸残基的序列更有助于 DNA 克隆并得到正确的基因结构. 已有许多报道证明, 一些蛋白质的 C 端和生物活性有重要关系, 如醛缩酶除去 C 端酪氨酸后, 丧失了大部分生物活性. 由此看来 C 端序列研究不只是 N 端序列的补充, 也是一个重要的研究领域.

到目前为止测定 C 端序列的方法主要有物理法、酶法和化学法.

物理法是用快原子轰击与质谱或核磁共振联用进行 C 端测定, 目前只适用于小肽, 且仪器价格昂贵. 但已有不少引人注目的研究结果表明, 质谱可能是序列测定 (包括 N 端或 C 端) 最有前途的技术之一^[1].

酶法主要通过羧肽酶作用的时间过程中, 测定反应体系中游离氨基酸的成分及含量, 推算出 C 端氨基酸释放的次序. 我们曾对一些肽进行上述分析, 同时还鉴定不同酶解时间后残余肽段的 HPLC 行为及其氨基酸组成, 作为一种补充手段用以核实羧肽酶法的可靠性. 70 年代至 80 年代由于还没有什么化学方法可以专一地标记 C 末端羧基而不和侧链羧基发生部分反应, 以及裂解引起 C 端封闭, 化学法测定 C 端序列存在诸多困难. Ambler (1972 年)^[2]和 Hayashi (1973 年)^[3]等相继发现了一些新的羧肽酶, 许多 C 端测定工作都采用新的羧肽酶酶解, 然后进行氨基酸组成分析确定序列. 但是肽键水解的速度受末端及倒数第二个残基的影响, 各不相同, 因此得出的序列是一动态过程的推演, 而不似化学法逐个测序. 如羧肽酶 A 对于 C 端第一个是非极性氨基酸其酶解速度快于其它氨基酸, 而 C 末端为脯氨酸、精氨酸则作用极慢, 同时 C 端第二个氨基酸残基有时也有影响. 羧肽酶 B 水解 C 端的精氨酸和赖氨酸大大快于其它氨基酸. 后来发现的羧肽酶

Y 作用时对氨基酸要求虽然不如羧肽酶 A 或 B 那么严格. 但仍存在对疏水氨基酸作用强, 对带电荷的氨基酸作用慢的部分选择性.

尽管仍有人致力于寻找作用更广泛的羧肽酶 (如羧肽酶 P 等), 但目前运用羧肽酶至多只能测定 3—5 个氨基酸残基, 不够制备 DNA 探针的需要, 只能作为验证氨基酸或 DNA 序列的一种手段, 而不是测定一级结构的工具. 同时羧肽酶作为一类有生物活性的蛋白质, 价格昂贵且保存活性较困难. 纯化制备乃至商品化的羧肽酶内易混有蛋白内切酶, 从而干扰分析. 由于上述原因, 羧肽酶不可能和自动化分析仪器相匹配, 因此人们转而着眼于化学降解法, 因为化学法可类似于 Edman N 端分析进行偶联及裂解, 并且容易过渡到自动化.

自从 1926 年 Schlack 和 Kumpf 发现了 (异) 硫氰酸盐试剂, 有不少用于 C 端标记及裂解的试剂报道, 如 Bergmann 等 (1936 年) 发现的叠氮化物重排; Bailey (1955 年) 报道的还原后 O—N 移位; Khorana (1952 年) 的碳化二亚胺修饰; Tarr (1975 年) 的氨基胍标记; 以及 Previero (1977 年) 报道的咪唑环化等. 但 (异) 硫氰酸盐仍为研究的主要对象, 可能因为它的作用机制与 N 端 Edman 降解的试剂有些相似, 尤其 Cromwell 和 Stark (1969 年)^[4]发现蛋白质的 C 端在乙酸酐和硫氰酸铵存在下形成乙内酰硫脲蛋白 (proteinylthiohydantoin), 以及以后的实验证明 (异) 硫氰酸盐降解可能是最有希望的 C 端序列测定的关键试剂.

(异) 硫氰酸盐 C 端测定的机制包括羧基活化, 异硫氰酸偶联, 环化形成乙内酰硫脲 (thiohydantoin, TH), 水解释放 TH-氨基酸. 其经典作用机制见图 1.

为了使 C 端羧基由亲电子的基团变成亲核基团, 在偶联反应之前加入乙酸酐 (一般为乙酸酐: 乙酸 = 1: 4) 活化, 便于与 (异) 硫氰酸基团共价结合.

偶联试剂已从原始的异硫氰酸铵经过诸多改进, 并且这些研究仍在继续中.

Inglis^[5]发现硫氰酸 (HSCN) 在丙酮溶剂

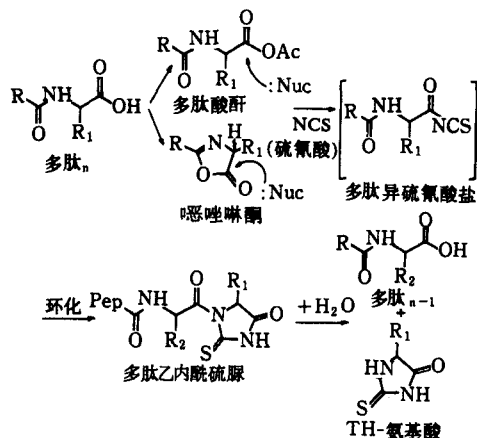


图 1 用 (异) 硫氰酸盐测定 C 端序列的机制

中的效果大于硫氰酸铵在乙酸乙酯中。如果溶剂极性小于丙酮，偶联反应效果也较差。在偶联反应时必需严格无水，否则 C 端会部分水解，下一个氨基酸暴露而提前出现，干扰测序正常进行。

Wittmann-Liebold 及她的同事^[6]比较了各种 (异) 硫氰酸盐，发现游离酸因不稳定，使用时较麻烦。异硫氰酸胍稳定性较好且可溶于有机溶剂如丙酮中，因此较适合于自动降解。但他们仍然发现偶联试剂稳定性差，反应需严格无水，由于试剂必需放在冰箱，频繁的取样，容易吸水，这样起活化作用的乙酸在有水存在下会部分裂解片段。另外脯氨酸，谷氨酰胺在活化时形成双环，因而在酸性条件下容易裂解，下一个氨基酸残基提前出现，降低了重复产率，因而影响了肽段能测定的长度。

Hawke 和 Shively^[7]认为硫氰酸或硫氰酸铵容易聚合，也对偶联试剂作了改进，他们采用三甲基硅异硫氰酸酯 (TMSITC) 进行反应，发现 TMSITC 较硫氰酸盐或硫氰酸能提高偶联效果，减少副反应，并且生成的 TH-氨基酸检测灵敏度接近 PTH-氨基酸，可达到 pmol 水平。他们用 12mol/L HCl 裂解，最初产率为 30%，但遗憾的是只测定了肌红蛋白 C 端 3 个残基后终止了。其可能原因是 TMSITC 偶联率低。预计如果过量试剂及副产物杂质清除完全，TH-氨基酸抽提更好的话，可以测定 10—20 个

氨基酸残基。

偶联后裂解一般采用碱性溶液^[5]，其中包括挥发性碱性试剂和非挥发性碱性试剂，挥发性碱性试剂应用效果较理想的有：5% 三乙胺/氯丁烷，或氯丁烷/乙腈 (70 : 30)；二异丙基乙胺 (diisopropylethylamine, pH12.5—13)；吡咯烷 (pyrrolidine, pH12.4—13) 等。这些试剂易于去除但常引起较多副产物及杂质。非挥发性碱性试剂主要有：0.5mol/L KOH 溶于 33% 甲醇，只需室温反应 3min，即可裂解完全，但此溶液易引起样品丢失；由于 TH-氨基酸在稀碱溶液中更稳定，实验证明将 0.16mol/L NaOH 溶于上述相同甲醇溶液裂解效果更好，尤其是 PVDF 膜上的样品，但还没有足够的证据证明这是最佳的裂解试剂。

Hawke^[8]改进了原来的机制，先保护某些氨基酸残基，再活化，然后用异硫氰酸苯甲酯 (BITC) 偶联反应，最后去保护基团得到 TH-氨基酸。其优点在于：提高了分析样品在有机溶剂中的溶解度；易发生副反应的侧链得到保护；并且保护基团容易去除。

他们应用 Wood Ward's 试剂 K 进行活化，因为该试剂对水不敏感，不会提前部分裂解肽键。偶联试剂 BITC 在有吡啶存在的碱性条件下 60℃ 反应 30min 基本完全，裂解效果较好的试剂为 1% 吡啶水溶液。

虽然最佳的化学试剂还没有确定，但已有一些较成功的例子，如 Inglis^[9]在 1989 年报道了测出一个疏水 10 肽的 C 端前 9 个氨基酸残基的序列。Hawke^[8]测定了亮氨酸脑啡肽 (Leucine enkephalin, YGGFL) 的 C 端序列，除共价结合在支持膜上的 N 端 Y 外，其余 4 个氨基酸残基均能分辨清楚。Wittmann-Liebold^[6]测定了核糖体蛋白 L12 C 端 8 个以上氨基酸残基。

N 端测序已有自动化仪器，并能达到较好的准确性和微量性，因此人们希望 C 端测序也像 N 端一样能完全自动化，Wittmann-Liebold, Inglis, Hawke 及 Boyd 等研究组都致力于这方面研究。Wittman-Liebold^[6]在实验中

解效果差,以及裂解后引起C端封闭,虽然成熟的C端测序技术至今尚未问世,但是人们还是在不断发现成功的趋势,尤其在化学降解方面。因为尽管质谱有其极大的吸引力,没有经验丰富的质谱专家或功能复杂齐全的计算机很难分析数据,因此许多从事蛋白质结构分析的生物化学家仍倾向于化学法能如N端序列分析一样自动、微量分析C端20—40个左右氨基酸残基的序列。但是以上两种方法,将来何者会占据上风,作者认为现在还难以预料。

参 考 文 献

- Hill R E. The widening horizons of bioanalytical mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 1990; **194** (1): 1
- Ambler R P. Enzymatic hydrolysis with carboxypeptidases. In: Hirs C H W *et al.* eds, *Methods Enzymol.* New York: Academic Press, 1972; 143
- Hayashi R, Moore S, Stein W H. Carboxypeptidase from yeast, *J Biol Chem*, 1973; **248** (7): 2296
- Cromwell L D, Stark G R. Determination of the carboxyl termini of proteins with ammonium thiocyanate and acetic anhydride with direct identification of the thiohydantoin. *Biochemistry*, 1969; **8** (12): 4735
- Inglis A S, Moritz R L, Begg G S *et al.* C-terminal sequence analysis. In: Jornvall H *et al.* eds, *Methods in Protein Sequence Analysis*. Basel: Birkhauser Verlag, 1990; 23
- Wittmann-Liebold B, Matschull L, Pilling U *et al.* Modular Berlin microsequencer for the sequential degradation of proteins and peptides from the amino- and carboxyl-terminal end. In: Jornvall H *et al.* eds, *Methods in protein sequence analysis*. Basel: Birkhauser Verlag, 1990; 9
- Hawke D H, Lahm H W, Shively L E *et al.* Microsequence analysis of peptides and proteins; trimethylsilylthiocyanate as a reagent for COOH-terminal sequence analysis. *Anal Biochem*, 1987; **166** (2): 298
- Hawke D H, Boyd V L. Chemical C-terminal sequencing. In: Jornvall H *et al.* eds, *Methods in Protein Sequence Analysis*. Basel: Birkhauser Verlag, 1990; 35
- Inglis A S, Casagrande F, Wilshire J F K *et al.* C-terminal sequencing: a new look at the Schlack-Kumpf thiocyanate degradation procedure. In: Wittmann-Liebold B ed, *Methods in Protein Sequence Analysis*. Berlin: Springer-Verlag, 1989; 137
- Johnson L, Tarr G. C-terminal sequence of proteins, rapid isolation and Edman sequencing of C-terminal peptides from digests. In: Walsh K ed, *Methods in Protein Sequence Analysis*. 1986, Clifton, NJ, USA: Humana Press, 1987; 351.
- Furka A, Dibo G, Kovacs J *et al.* An improved method for isolation of the C-terminal fragment of proteins. *Anal Biochem*. 1983; **129** (1): 14
- Rose K, Savoy L A, Simona M G *et al.* C-terminal peptide identification by fast atom bombardment mass spectrometry, *Biochem J*, 1988; **250** (1): 253
- Carles C, Gueguen P, Ribadeau-Dumas B. C-terminal labelling of β -casein, *FEBS Letters*, 1987, **212** (1): 163
- Hawke D H, Meister S M, Yuan P-M *et al.* Studies on C-terminal analysis. In: Hugli T E ed, *Techniques in Protein Chemistry*. San Diego: Academic Press, INC, 1989; 59

食品淀粉酶的特异性吸附分离提取技术研究 (925228[#])

本课题研究的食品级 α -淀粉酶提取工艺,采用高分子分离介质来提取淀粉酶,分离率平均为98.7%,酒精耗量小于0.3吨/吨成品酶。与超滤法相比,具有设备投资少,工艺简单、操作简便的特点;与酒精沉淀相比:具有酒精用量少、能耗低,从而降低成本,提高经

济效益。本工艺制备的食品级 α -淀粉酶的产品符合GB8275-87国家标准。委托检索费:单位17元,个人14元。

[北京867信箱20816组李群, 邮编:100024 电话:5762127, 5762194]