

高灵敏显色降解试剂4-N, N-二甲氨基偶氮苯-4'-异硫氰酸酯 (DABITC) 在蛋白质顺序分析中的应用

奚国良 陈润莲 张鸿良 华家桢

(中国科学院上海药物研究所)

一、序 言

Edman 降解^[1]是蛋白质顺序分析最有效的方法。它由三步反应组成,首先,异硫氰酸苯酯 (PITC) 在碱性 pH 下与肽或蛋白质的N-端氨基酸反应生成苯基氨基甲酰 (PTC) 衍生物,然后在酸性 pH 下生成比原先的肽少一个氨基酸的肽与苯基噻唑啉酮 (PTZ) 衍生物,后者在酸性条件下转化成苯基乙内酰硫脲 (PTH) 氨基酸后进行鉴定。从原理上讲任意长度的肽或蛋白质的顺序都可以通过 Edman 降解无限止地测定下去,但由于降解产率、降解产物 (PTH 氨基酸) 检出灵敏度以及副反应等一系列问题的影响,实际上是不可能的。自 Laursen^[2] 提出固相顺序测定技术以后,上述问题得到了不同程度的解决,但 PTH-氨基酸检测灵敏度仍不够理想,Edman 降解结合丹磺酰化 (DNS-) 技术^[3],虽提高了检测的灵敏度,但由于每个周期需取出一定量进行丹磺酰化与水解,既损失大量样品又不能检测水解中破坏的色氨酸,也不能区别谷氨酰胺、门冬酰胺及其相应的酸,所以也有一定的局限性。近年来,又发展了几种新技术,如放射性 Edman 试剂的应用;体内细胞培养法渗入放射活性氨基酸;用高灵敏度的 HPLC 技术测定 PTH-氨基酸,虽提高了检测灵敏度,但操作比较困难,且要用昂贵的仪器。

近年来,Chang^[4-10] 等介绍了另一种新的 Edman 降解试剂 DABITC* (4-N, N-dimethyl-

aminoazobenzene-4'-isothiocyanate), 并成功地应用于微量顺序分析,无论液相或固相技术,手工或自动方法,都获得较满意的结果。

DABITC 降解反应相似于 Edman 反应,简略表示如下(见下页)。

DABTM-氨基酸的光吸收波长为 340—580nm,消光系数 $\epsilon_{\text{mm}}^{340} = 34^{[10]}$, 约为 PTH-氨基酸 ($\epsilon_{\text{mm}}^{254} = 16$) 的两倍。因此,可以大大提高降解下来的氨基酸衍生物在薄层(硅胶或聚酰胺薄膜)或 HPLC 上的检测灵敏度。用手工方法测定顺序需用的样品量一般为 2—10 nmol, 最低检测极限为 10—100 pmol。

二、DABTH-氨基酸的合成、检测、及在顺序测定中的应用

1. DABTH-氨基酸的合成

DABTH-氨基酸作薄层检测时需有标准 DABTH-氨基酸作对照,尤其用极小的聚酰胺薄膜($\sim 3 \times 3\text{cm}$)时更感需要,但目前无商业标准品供应。我们根据 Chang^[4] 等报道,以 21 种天然氨基酸混合物(除 His, Arg, Asn, Gln, Thr, Glu, Asp 用 $20\mu\text{mol}$ 外,其余每种 $10\mu\text{mol}$) 溶在 2ml 缓冲剂(2ml 冰醋酸加 1.2ml 三乙胺加水至 25ml, 再加丙酮 25 ml, pH 10.1) 中后加入 2ml DABITC 溶液 ($2\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ 丙酮溶液) 在 50°C 下保温一小时,真空 (P_2O_5) 干燥,然后于

* 上海生化所东风厂已有生产



副产物用正庚烷/乙酸乙酯 (2:1v/v) 提取 (0.2ml × 3) 除去, 水层真空干燥后加 50 μ l 无水三氟乙酸, 通 N_2 数秒钟后, 加盖, 52℃ 加热 15 分钟, 再次真空干燥后的残渣中加入 50 μ l 水, 用 50 μ l × 二乙酸丁酯提取反应产物, 水层真空干燥后进行第二周期的测定, 有机层干燥后加入 30 μ l 40—50% 的三氟乙酸, 在 52℃ 加热 50 分钟, 真空干燥后的残渣溶入无水乙醇中 (5—30 μ l), 一般可取出 1/40—1/5 在薄膜上进行检测。

3. DABITC 在固相手工测定顺序法中的应用

无论是手工或自动的蛋白质液相顺序测定法都免不了提取时样品的损失。Laursen^[2,11] 首先提出了固相顺序测定法, 将样品肽或蛋白质首先固定于一种固相载体上, 然后从 N-端逐个降解测定, 由于蛋白质是以共价键固定于载体上, 所以不会有提取引起的损失。此外, 固相方法所需的时间也大大少于液相方法。但固相方法尚未能改进 PTH-氨基酸检测的灵敏度。自 Chang^[12,13] 等首先在固相顺序法用 DABITC 代替 PITC 后, 使微量固相顺序法得到发展。固相顺序法的关键是偶合载体与偶合方法的选择, 设法使蛋白质或肽偶合到载体上去。一般按 Bridgen^[14] 的方法进行偶合, 现以含 Lys 的肽通过苯二异硫氰酸酯 (DITC) 活化法偶合于氨基聚苯乙烯 (APS) 载体上的方法作为例子简述如下: 样品肽 (50—200nmol) 溶于 100ml 50% N-甲基吗啉中, 用三氟乙酸调节 pH 至 9.50, 然后加入 100 μ l DITC (1mg) 的 DMF 溶液, 45℃ 保温 30 分钟, 反应后将混合液加到预先泡胀的 APS 中 (40mg 在 250 μ l DMF 中), DMF 再在 45℃ 加热 40 分钟, 过剩的树脂中的氨基可加入 100 μ l 异硫氰酸甲脂/乙腈 (1:1v/v), 再加热 45 分钟 (45℃) 而封闭, 最后滤集洗净 (甲醇) 干燥即得偶合蛋白质 (肽)。

顺序测定 取约 5—10 mg 偶合后的载体 (约含蛋白质或肽 5—10 nmol) 于小试管中, 加约 400 μ l 50% 吡啶水溶液及 200 μ l DABITC 吡啶溶液 (10 nmol/ μ l, 新鲜配制), 通 N_2 后 53℃

加热 1.5 小时, 离心, 吸去上清液, 下沉玻璃以吡啶 (2 × 3ml) 及甲醇 (2 × 3ml) 洗涤后, 真空干燥, 然后加入 150 μ l 三氟乙酸, 通 N_2 数秒钟, 加盖, 53℃ 保温 10 分钟, 真空干燥后, 以 0.3 ml 甲醇提取生成的 DABT2-氨基酸, 固体玻璃干燥后进行下一周期测定。甲醇提取液干燥后加入 200 μ l 水及 400 μ l 以氯化氢饱和的乙酸, 53℃ 保温 45 分钟, 真空干燥, 残留物重新溶入 10—100 μ l 甲醇供鉴定用。

与手工液相方法比较, 固相法有三个优点: 一是提取除去副产物及过剩试剂的步骤远比前者容易, 二是缩短了每个周期所用的时间, 三是样品不因提取而损耗。与用 PITC 试剂的实验相比, 样品量大大降低。

4. DABITC 在自动液相顺序仪及固相顺序仪中的应用

Wilson^[15] 等首先将 DABITC 应用于自动液相顺序仪, 测定了十余个样品肽的顺序, 残基数从 4 至 32 个, 取得了较满意的结果。Wilson^[16] 等在周期顺序仪中使用 DABITC 代替 PITC (或用 DABITC/PITC 双偶合法), 使固相技术有了更大发展, 甚至可以鉴定 10—100 pmol 量样品的顺序。

5. DABTH-氨基酸的检测方法

(1) 聚酰胺薄膜检测

若用聚酰胺薄膜检测, 在膜上除可见到红色氨基酸衍生物外, 还可见到一系列蓝色或紫色的色点 (见图 1), 这些色点由于它们有不同的颜色与确定的位置, 所以在鉴别各别的 DABTH-氨基酸时十分有用。薄膜大小约每边为 2.5cm—4 cm, 双相层析后, 放在 HCl 气中熏数秒钟, 即可见清晰色点。其灵敏度为 5—25 pmol。

用聚酰胺薄膜鉴别时需注意: (a) Leu 与 Ile 重叠, 但可用硅胶板加以区别; (b) Leu (Ile), Val, Met, phe 几个点位置接近, 需根据它们与蓝色标记点 c 的相对位置小心鉴别; (c) Ser 一般有四个点: DABTH-Ser(S), 去氢产物 (S^{Δ}), 多聚产物 ($S^{\square}$) 及去氢水合物 (S°); (d) Thr 有二个点即 DABTH-Thr(T) 与去氢产物 (T^{Δ}),

通常能在蓝点“ μ ”左边见到 $T^{\times}$, 这是 Thr 的特征点; (e) Asn 与 Gln 通常伴随 8—15% 的相应的酸; (f) Lys 通常有三个色点: K_1 (紫色), K_2 (蓝色) 以及 K_3 (红色); (g) 若样点重现 (在下一周期中重复出现) 应小心观察新出现的点子, 尤其对于 Ser, Thr, Lys, 因颜色反应较淡, 更应小心注意分辨; (h) 为保证 R_f 值的重现性, 溶剂应时时更新。

(2) 硅胶薄层检测

使用硅胶薄层检测时只需单相层析, 各个周期所得的 DABTH-氨基酸可在同一块板上测定, 根据不同的 DABTH-氨基酸采用不同的溶剂系统, 溶剂 I 为氯仿:乙醇 (92:2 v/v), 溶剂 II 为氯仿:乙醇:甲醇 (88.2:1.8:10 v/v), 溶剂 III 为氯仿:乙酸乙酯 (90:10 v/v), 溶剂 IV 为氯仿:异丙醇 (90:10 v/v)。为得到硅胶薄层鉴定最佳结果, 操作时应选用合适的溶剂系统; 非极性 DABTH-氨基酸用溶剂系统 III; 极性衍生

物选用溶剂系统 II 或 III 均可; 有时需结合使用几种溶剂, 如先在溶剂系统 III 中层析, 随后 II 或 IV。硅胶薄层层析板高约 10cm, 展层后干燥, 用 HCl 气熏后即可见到样点。硅胶薄层层析的灵敏度约为 25—50 pmol。

(3) HPLC 法检测

降解产物经转化后, 可以 HPLC 检测。图 2 为胰岛素 B 链的测定结果。HPLC 所用的固定相为 Zorbax ODS ($5\mu\text{m}$); 柱规格为 $4.6 \times 250\text{ mm}$; 流动相 A [700ml 甲酸盐缓冲液 (5ml 甲酸加水至 1 立升, 再以氢氧化钠调节至 pH 3.0) + 300ml 1-丙醇] 与 B [500ml 甲酸盐缓冲液 (同上) + 500 ml 2-丙醇] 组成梯度洗脱。柱压 508 磅/吋², 流速: 1ml/分, 样量: 100—200 pmol; 柱温: 60°C ; 测定波长: 436 nm。

其中 DABTH-氨基酸 His_{5,10}; Cys_{7,19}; 与 Arg₂₂ 因在水相中未进行测定。Phe₁ 与 Lys₂₉ 因联结于固相载体上不能检测, 其余 DABTH-氨

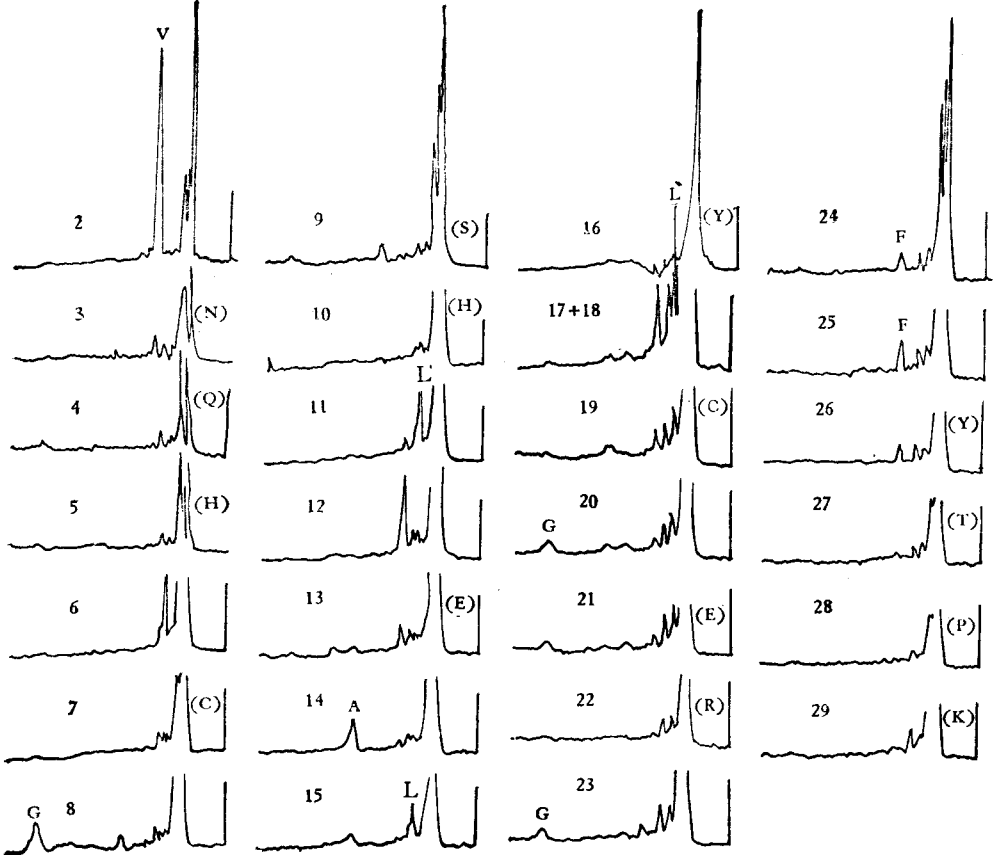


图 2 HPLC 检测胰岛素 B 链各氨基酸的 DABTH-衍生物

基酸的位置均清晰可信(图 2)。

三、小 结

Edman 降解法迄今仍是最有效的测定顺序方法,自动液相仪及固相仪的设计与应用以及 HPLC 用于检测 PTH-氨基酸等,使顺序分析技术有了很大发展,而 DABITC 试剂的引入,进一步提高 Edman 降解法的可靠性,它与 PITC 相比主要的不同在于 DABTH-氨基酸在可见光区测定,而 PTH-氨基酸在紫外光区,后者在极低浓度下无法消除一系列具有相似吸收波长的杂质背景。此外它还具有下列优点:(1)高灵敏性:使用手工顺序法样品量只需 2—10nmol,可测定 20—30 个残基,此 PITC 法所需的样品量低 10—20 倍。若用自动顺序仪则可低至 pmol 水平。(2)有效性:应用 DABITC 试剂用于手工顺序法可测定 20—30 个残基,对于研究小肽的实验室来说,无需仪器也可进行顺序研究。(3)精确性:能直接鉴定所有的氨基酸包括 Asn、Gln, Trp, 磺基丙氨酸, Ser, Thr。(4)简易性:若以手工测定,无需任何特殊仪器,只需使用极小的聚酰胺薄膜(2.5 × 2.5cm)。若应用自动顺序仪,也无需对仪器本身作任何改进。

参 考 文 献

- [1] Edman, P.: *Arch. Biochem.*, **22**, 475, 1949.
- [2] Laursen, R. A.: *Eur. J. Biochem.*, **20**, 89, 1966.
- [3] Hartley, B. S.: *Biochem. J.*, **119**, 805, 1970.
- [4] Chang, J. Y. et al.: *Biochem. J.*, **153**, 607, 1976.
- [5] Chang, J. Y. et al.: *Biochem. J.*, **153**, 77, 1976.
- [6] Chang, J. Y.: *Biochem. J.*, **163**, 517, 1977.
- [7] Chang, J. Y.: *Ph. D. Thesis*, The Australian National University, Canberra, 1977.
- [8] Chang, J. Y.: *FEBS Letters*, **91**, 63, 1978.
- [9] Chang, J. Y. et al.: *FEBS Letters*, **93**, 205, 1978.
- [10] Chang, J. Y.: *Biochem. Biophys. Acta*, **578**, 175, 1979.
- [11] Laursen, R. A.: *Acta Chem. Scand.*, **10**, 761, 1971.
- [12] Chang, J. Y. et al.: *FEBS Letters*, **78**, 147, 1977.
- [13] Chang, J. Y. et al.: *FEBS Letters*, **84**, 187, 1977.
- [14] Robinson, P. J. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **242**, 659, 1971.
- [15] Wilson, K. J. et al.: *FEBS Letters*, **108**, 98, 1979.
- [16] Wilson, K. J. & Hughes, G. J.: *International Conference on Solid-phase Methods in Protein Sequence Analysis*, **1—4**, October 1979 (Heidelberg, Germany), 1980.

[本文于 1980 年 10 月 31 日收到]

动 态 光 散 射 技 术

江 寿 平

(中国科学院上海生物化学研究所)

一、引 言

传统的光散射技术是测量分子大小和形状的重要方法之一。但随着激光的应用,能够测量大分子溶液的光散射的频率分布和微弱的散射光。这些散射光的频率位移极小,用传统的光学系统不能分辨,从而出现了一个新的光混频技术—拍频光谱学。它适合于准弹性光散射现象的研究,又称之动态光散射技术,已成功地

应用到物理、化学和生物科学研究中。对于生物高分子和其它大分子的研究,动态光散射技术是很吸引人的。利用动态光散射法不仅能获得分子大小和形状等资料,还可获得平动和转动扩散系数,某些动力学和热力学参数等静态和动态信息。同时,它比传统的光散射法更迅速、更准确,而且所需测量样品还少。但目前还没有商品仪器,它的装置要求也较高,还不普遍。本文仅就动态光散射简单原理、实验装置和它