

国产微晶纤维素薄膜用于酶解肽段的分离

张国娣 俞鹤年 杨建平*

(中国科学院上海生化所 六室)

近年来,新发展起来的微晶纤维素薄层层析法已应用于氨基酸、多肽、糖类、核酸衍生物等多种化合物的分析鉴定。其优点是灵敏、简便、分辨率高,图谱清晰,斑点密集。用双相电泳层析,结合 DABITC 方法(即有色 Edman 方法)降解。能测定多肽的氨基酸顺序^[1,2]。为微量测定蛋白质一级结构提供了重要手段。我们采用国产微晶纤维素,经特殊处理,涂于涤纶片基上,试制成 20×20 厘米大小的新型薄膜,经有关单位使用其分离效果与英国进口产品水平相当。浙江黄岩人民化工厂从 1981 年 4 月开始已批量生产。

现将此膜用于慈菇蛋白酶抑制剂和烟草花叶病毒外壳蛋白(TMVP)酶解后的肽段分离并对个别肽段进行了微量氨基酸顺序分析。

一、实验部分

1. 材料、试剂和仪器

慈菇蛋白酶抑制剂和烟草花叶病毒外壳蛋白(TMVP)是本实验室自制。微晶纤维素薄膜(20×20 厘米,0.12 毫米厚为黄岩人民化工厂产品)。化学试剂和溶剂均为分析纯,并经重新处理。荧光胺和 DABITC 试剂系本所东风生化试剂厂产品。聚酰胺薄膜为浙江黄岩实验化工厂产品,电泳仪和电泳槽为本所自制。

2. 电泳层析

(1) 试剂配制 用重蒸水配制两种不同 pH 的缓冲液: pH 4.4(吡啶:乙酸:丙酮:水=50:100:375:1975 V/V); pH 6.4(吡啶:乙酸:水=100:4:900 V/V)。层析溶剂:(吡啶:正丁醇:乙酸:水=40:60:12:48 V/V)。显色剂:(a) 0.5(W/V) 茚三酮丙酮溶液。(b) 5% 吡

啶溶液和 0.004% 荧光胺丙酮溶液。(c) 0.5% 茚三酮乙醇溶液:3 克茚三酮溶于 30 毫升三甲基吡啶和 100 毫升乙酸、870 毫升乙醇中,再将 3% 溶液用乙醇稀释至 0.5% 溶液。

(2) 样品处理:

(a) 慈菇蛋白酶抑制剂酶解 称取 10 毫克慈菇抑制剂,溶于 0.5 毫升重蒸水,用 0.1N 盐酸调节 pH 至 1.5—2.0,加入 0.4 毫克胃蛋白酶,37℃ 保温 24 小时后,调 pH 至 8.0,停止反应,置于冰箱备用。

(b) 烟草花叶病毒外壳蛋白(TMVP)酶解 称取 20 毫克 TMVP。加入 0.05M NaHCO₃ 0.5 毫升,90℃ 热变性 5 分钟,冷却后立即加入 0.4 毫克胰蛋白酶,37℃ 保温 22 小时,反应过程中维持 pH 8.0。然后取出酶解液,调节 pH 至 4—5。停止反应,离心除去沉淀(41 肽),上清液置冰箱备用。

(3) 操作方法:

电泳 (a) 准备 首先将电泳槽用水平仪校正,并接通冷却水。薄膜(20×20 厘米)。在距离底边 3 厘米处,轻轻地划一条点样线。并用电泳缓冲液浸湿后夹于滤纸中轻轻吹去多余的缓冲液,将膜的背面紧贴于电泳槽的平板上,两端搭上纸桥。

(b) 预电泳 电压 400 V, 电流 12—20 毫安, (pH 4.4 缓冲液), 5—10 毫安 pH 6.4 缓冲液, 通电 5 分钟。

(c) 点样 用定量毛细管取 5—10 微升 TMVP 酶解液或慈菇蛋白酶抑制剂酶解液(约含有 10—15 nmol 样品)。若用 pH 4.4 缓冲液电泳,

* 浙江黄岩人民化工厂。

样品点在靠左边 3 厘米处,电泳时样品只向阴极移动,用 pH6.4 缓冲液电泳,样品点在点样线的 1/3 或 1/2 位置上。点样后立即进行电泳以避免样品扩散。

(d) 电泳 电压、电流条件与预电泳相同,一般 pH4.4 缓冲液通电 3 小时左右, pH6.4 缓冲液电泳则 2 小时左右。根据不同样品选择适当的电泳时间和条件,在电泳过程中,不断地通冷却水使面板冷却。

层析:电泳后,薄膜置于 40—50℃ 下(或室温)干燥,然后放入层析缸中,进行第二相上行层析,展层时间为 6—8 小时(室温)。层析完毕将膜烘干(或室温凉干)。用荧光胺显色,先喷 5% 吡啶丙酮溶液,稍干后,再喷 0.004% W/V, 荧光胺丙酮溶液。在 366nm 紫外灯下显荧光斑点,将斑点刮下,其余再喷 0.1—0.5% 茚三酮乙醇溶液,在暗处放置 1—2 天,可见到荧光胺不显色的斑点。

3. 结合 DABITC 法测定肽斑的氨基酸顺序

取 TMVP 酶解图谱,挖下 10 张膜的同一斑点肽,放入有盖塑料离心管(1×4 厘米)中,加 200 微升 20% 吡啶(重蒸三次)或 50% 乙酸溶液。用振荡器(本所自制)将其搅匀,然后在台式高速离心机(本所自制)上离心 5 分钟,取上清液置于磨口离心管(1×7 厘米),反复洗脱三次,合并清液以 N₂ 气吹干,即可用 DABITC 法^[3,4]测定肽段的氨基酸顺序。

二、结 果

比较在同一条件下 (pH4.4 电泳层析), 0.5% 茚三酮溶液显色的酶解图谱 (见图 1, 2, 3), 国产微晶纤维素薄膜的分离效果与英国进口产品相当。

取 TMVP 酶解图谱中二个肽段 (A、B) 测得顺序如下:

A: 苏、缬、谷氨酰胺、缬、精五肽(42—46 位)

B: 门冬酰胺、精二肽 (91—92 位)

此国产膜也曾用于蛇毒血纤肽 A (16 肽) 和 B (14 肽) 的分离鉴定*, 这二种肽段性质非

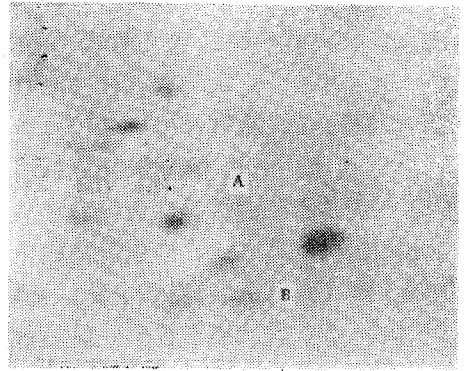


图 1 国产纤维素薄膜, TMVP 胰蛋白酶酶解样品图谱

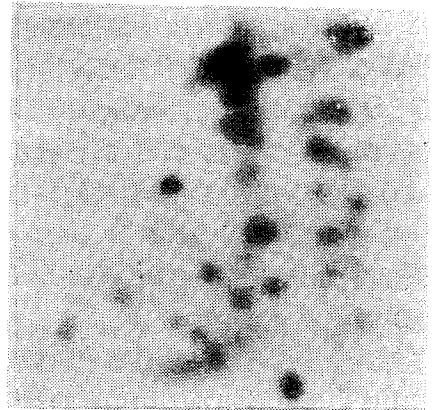


图 2 国产纤维素薄膜, 蘑菇蛋白酶抑制剂胃蛋白酶酶解样品图谱

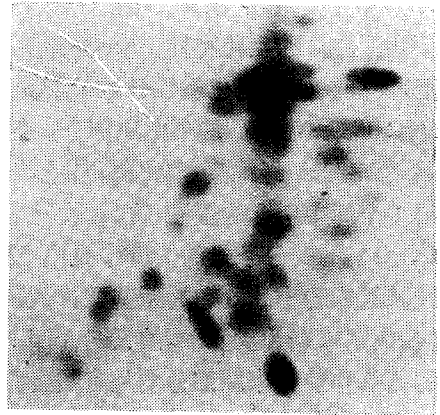


图 3 英国纤维素膜蘑菇蛋白酶抑制剂胃蛋白酶酶解样品图谱

常接近,等电点也相近,虽仅二个氨基酸之差也
(下转第 43 页)

* 本组管利丰同志研究生论文。

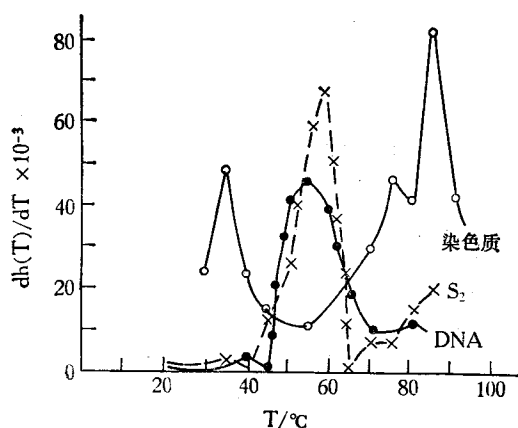


图4 小鼠肝染色质,活性染色质和 DNA 的熔点温度曲线

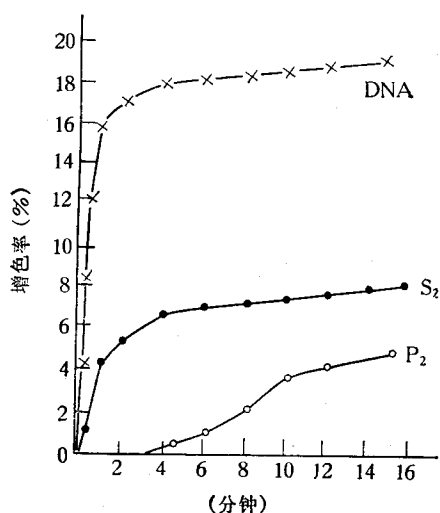


图5 DNase I 降解 DNA 和染色质的动力学曲线 (S_2 和 P_2) 的动力学曲线 (见图5) 从图5看出, S_2 对 DNase I 降解的敏感性与 DNA 相

似。即在反应进行4分钟后增色率已无明显变化。 P_2 对 DNase I 的敏感性却不同于 S_2 , 当反应进行到4分钟时几乎无增色效应。说明 P_2 对 DNase I 不敏感。然而对 DNase I 降解的敏感性差异正是区别活性与非活性染色质的特点之一。

从转录活性,组成成份、热变性和对 DNase I 的敏感性综合分析,可以看出,转录活性染色质模板活性高, RNA 和非组蛋白含量丰富,转录非活性染色质与组蛋白结合更紧密。活性染色质是一个更松散的构象,类似于 DNA。要想阐明活性染色质与非活性染色质之间的关系,尚需更进一步研究染色质构象的变化。

参 考 文 献

- [1] Higashinakagawa, T. et al.: *Exp. Cell Res.*, **71**, 65, 1972.
- [2] Widneü & Tata: *Biochim. Biophys. Acta*, **123**, 478, 1966.
- [3] Reeder, R. H. *J. Mol. Biol.*, **80**, 229, 1973.
- [4] H. Busch. *Exp. Cell Res.*, **109**, 151, 1977.
- [5] *Methods in Enzymology* Vol. XL Hormone Action part. E No. 8—No 14, 1975.
- [6] Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. **283**, 343, 1978.
- [7] Sinclair, G. D. et al.: *Exp. Cell Res.*, **111**, 1978.
- [8] Burtonk, *Biochem. J.* **62**, 315, 1956.
- [9] Schjeiele, O. A.: *Anal. Biochem.* **27**, 473, 1969.
- [10] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265, 1951.
- [11] Maria Gross-Bellard *Eur. J. Biochem.* **36**, 32, 1973.
- [12] 《分子生物方法》[西德 P. Chancelra W. Appel 1973 57--61], 李中德译, 吴曼校

(本文于1983年2月2日收到)

(上接第65页)

能彼此分开。用于其它肽段的分离也得到较满意的结果。

本工作曾得到戚正武和陈远聪、罗珊珊同志的指导, 慕见风同志参加部分工作。庄熙孟、张晋明拍摄照片, 一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Wittmann Liebold, B. 在上海有机所举办的“蛋白质微量顺序测定技术”讲习班资料, 1980, 10.
- [2] Kamp, R. et al., *FEBS Letters*, **121**, 117, 1980.
- [3] Chang, J. Y., *FEBS Letters*, **93**, 205, 1978.
- [4] 俞鹤年、泮家秀, 《生物化学与生物物理进展》, **1**, 41, 1981.

(本文于1983年1月18日收到)