

丹磺酰肽的荧光定量分析法研究

潘小平 蔡金莲 张炳海 王德岭

(上海医科大学基础医学部化学教研室)

丹磺酰氯和肽反应,得丹磺酰肽(DNS-肽),它具有很强的荧光,对酸水解十分稳定,目前广泛地应用于肽和蛋白质的N-末端氨基酸分析^[1],也用于组织中氨基酸含量的超微量定量分析^[2,3]。近几年,将此法试用于脑脊液和脑组织中小肽含量的测定^[4,5],不但灵敏度高,荧光强度稳定,而且线性关系良好,重复性也很好。现将我们试用结果介绍如后。

实验和结果

1. 肽的荧光标记

实验用的亮氨酸脑啡肽和脑新肽,由中国科学院上海生化所合成^[6]。丹磺酰氯(DNS-Cl)为BDH出品。丹磺酰肽的制备,是根据Gray的方法^[1]。称取约20 μ g的肽,置于微量玻璃试管中,加入30 μ l 0.2N NaHCO₃溶液(调pH到9.5,用无氨蒸馏水配制),再加等体积的DNS-Cl丙酮溶液(2.5mg/ml),用塞子盖紧后,在37 $^{\circ}$ C水浴中保温1小时,或避光放置过夜。加1N HCl酸化到pH4左右,以分解多余的DNS-Cl,真空干燥。

我们纯化的 α_2 M产品经SDS-梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为一条区带,与国外文献报道的电泳图谱比较结果相同^[1,3]。证明其纯度较高。可用于制备抗血清。

本文经美国国立大学医学中心王大栋教授指导,特此致谢。

2. DNS-肽的纯化

在上述干燥的DNS-肽样品中,加入少量质谱纯甲醇溶解,在硅胶G(GF₂₅₄, Type 60, Merk)薄板上(10 \times 10cm)点样,层析,以除去DNS-Cl的分解产物DNS-OH和DNS-NH₂等杂质。层析时,第I相用正丁醇:醋酸:水=4:1:1溶剂系统展开,第II相用正庚烷:正丁醇:醋酸=3:3:1溶剂系统展开。干燥后在365nm波长紫外灯下定出DNS-肽斑点的位置,将此斑点,连同硅胶吸入小层析管中,用质谱纯甲醇洗脱,洗脱液真空干燥。再用质谱纯氯仿抽提一次,真空干燥,得纯品。

3. 丹磺酰肽的激发光谱和发射光谱的测定

将纯化得到的DNS-亮-脑啡肽, DNS-脑新肽和DNS-二甘肽分别溶于甲醇中,配制成10⁻¹²M浓度的溶液,在日立MPF-4荧光分光光度计上,测定它们的激发光谱和发射光谱,结果见图1, 2, 3。

4. 丹磺酰肽溶液荧光比色测定检量标准曲线

配制不同浓度的DNS-亮-脑啡肽, DNS-

[2] Schultze, H. E. et al.: *Naturforsch.*, **10**, 463, 1955.
 [3] Bridges, M. A. et al.: *Clin. Chim. Acta.* **118**, 21-31, 1982.
 [4] Harpel, P. C.: *Meth. Enzymol.*, **45**, 639, 1976
 [5] Barrett, A. J. et al.: *Biochem. J.*, **181**, 401, 1979.
 [6] Virca, G. D. et al.: *Anal. Biochem.*, **89**, 274, 1978.
 [7] Ganrot, P. O.: *Clin. Chim. Acta.* **14**, 493, 1966.

[本文于1985年9月6日收到]

参 考 文 献

[1] Barrett, A. J. et al.: *Biochem. J.*, **133**, 709, 1973.

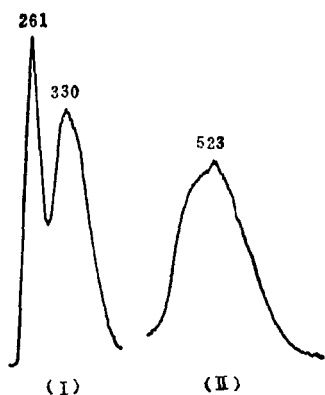


图1 DNS-亮-脑啡肽的激发光谱(I)和发射光谱(II)

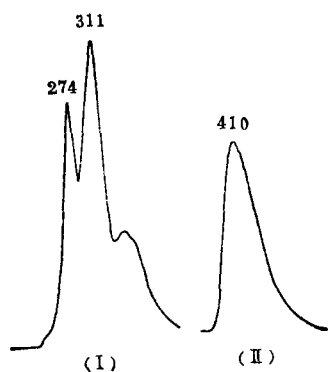


图2 DNS-脑新肽的激发光谱(I)和发射光谱(II)

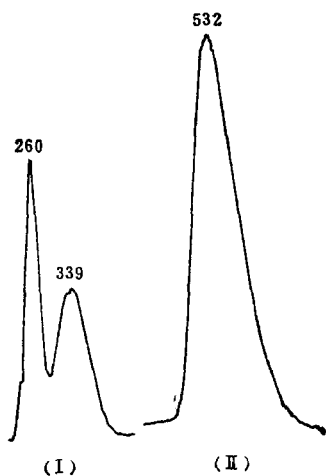


图3 DNS-二甘肽的激发光谱(I)和发射光谱(II)

脑新肽和 DNS-二甘肽的甲醇溶液, 浓度分别为 0.25×10^{-12} , 0.5×10^{-12} , 1×10^{-12} , 0.5×10^{-11} , $1 \times 10^{-11} M$, 在 3ml 比色池中进行荧光定量测定。测定用的激发波长和发射波长见表 1。测

定得到的检量标准曲线见图 4。

表 1 DNS 肽的最大激发波长和最大发射波长

	DNS-亮-脑啡肽	DNS-脑新肽	DNS-二甘肽
最大激发波长 (nm)	339	311	330
最大发射波长 (nm)	523	410	532

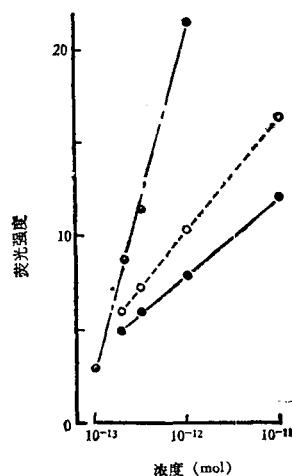


图4 DNS-肽荧光比色定量检量标准曲线

●—● DNS-脑新肽 ○—○ DNS-亮-脑啡肽
○—○ DNS-二甘肽

5. DNS-肽聚酰胺薄膜荧光斑点扫描定量检量标准曲线

配制不同浓度的 DNS-亮-脑啡肽, DNS-

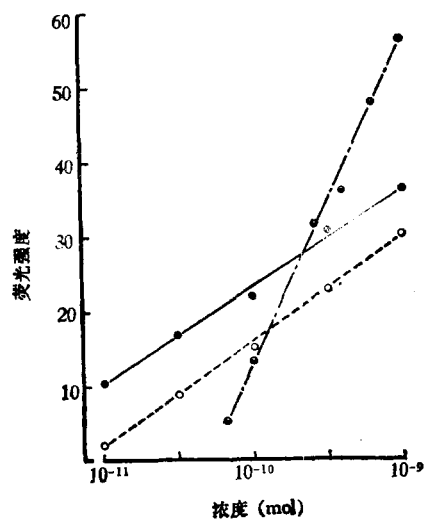


图5 DNS-肽聚酰胺薄膜荧光扫描定量检量标准曲线

●—● DNS-脑新肽 ○—○ DNS-亮-脑啡肽
○—○ DNS-二甘肽

脑新肽和 DNS-二甘肽的甲醇溶液, 浓度分别为 1×10^{-11} , 0.5×10^{-10} , 1×10^{-10} , 0.5×10^{-9} 和 $1 \times 10^{-9} M$ 。用 $1 \mu l$ 定量点样管分别在聚酰胺薄膜片上点样, 并进行双相层析。第 I 相用甲酸: 水 = 1.5:100(V/V), 第 II 相用正丁醇: 正庚烷: 醋酸 = 5:5:1 (V/V/V)。在 254nm 紫外灯下定出 DNS-肽的荧光斑点, 隔日后进行荧光定量扫描, 激发波长和发射波长见表 1, 结果见图 5。

6. 家兔脑脊液中脑新肽含量的测定

按照我们实验室的方法收集家兔脑脊液, 在家兔的第四脑室植入一直径为 0.9mm 的不锈钢套管, 术后五天开始收集脑脊液, 收集的脑脊液, 立即贮存于低温冰箱中 ($-20^{\circ}C$)^[7]。取 $20 \mu l$ 脑脊液, 真空干燥, 在干燥的样品中, 加入 $20 \mu l$ 0.2N $NaHCO_3$ 和 $20 \mu l$ 的 DNS-Cl 丙酮溶液, 进行丹磺酰化。由于脑脊液中含的蛋白质较少, 不需进行前处理, 即可进行丹磺酰化。在干燥的丹磺酰化样品中, 加入 $10 \mu l$ 质谱纯甲醇溶解, 用 $1 \mu l$ 定量点样管在聚酰胺薄膜片上点样, 并进行双相层析。方法同 5。在 254nm 紫外灯下定出 DNS-脑新肽的荧光斑点, 隔日后进行定量扫描, 激发波长为 311nm, 发射波长为 410nm。从扫描曲线的面积, 求得 DNS-脑新肽的含量。测定结果, 家兔脑脊液中脑新肽的含量, 平均为 $24.2 nmole/100 \mu l$ 。再将膜上的 DNS-脑新肽荧光斑点, 连膜挖下, 置于小层析管中, 用甲醇洗脱, 并用甲醇稀释到 3ml, 测定其含量, 得到脑新肽的含量为 $25.8 nmole/100 \mu l$ 。两者测定结果, 基本一致。

7. 回收试验

将兔脑脊液分装成 10 管, 每管 $20 \mu l$, 其中 2 管作为对照管, 其余 8 管, 组成四对复管, 分别加入 0.2, 0.4, 0.8 和 $1.6 nmole$ 的脑新肽。真空干燥后, 进行丹磺酰化, 真空干燥后, 加 $10 \mu l$ 质谱纯甲醇溶解, 然后在聚酰胺薄膜片上定量点样, 并进行双相层析, 方法同上。得到 DNS-脑新肽荧光斑点, 在荧光分光光度计上进行扫描定量, 得到脑新肽的含量。将样品管中测得的脑新肽的含量, 减去对照管中脑新肽的量, 得到加入脑新肽的回收量, 算出回收率, 结果见表

2. 实验的平均回收率为 94.33%, 符合实验要求。

表 2 脑新肽的回收率

	对照管	样品管			
		1	2	3	4
脑脊液量 (μl)	20	20	20	20	20
加入脑新肽量 (nmole)	—	0.2	0.4	0.8	1.6
回收率 (%)	—	94.85	97.70	94.00	90.75
平均回收率 (%)	94.33				

讨 论

在肽的荧光分析实验中, 常用的荧光试剂有荧光胺, 邻-苯二醛, 丹磺酰氯等。它们和小肽结合后产生的荧光强度, 以丹磺酰氯为最强, 一般情况下, DNS-肽的荧光强度, 比荧光胺标记的肽的荧光要强 100 倍。小肽在丹磺酰化时, 条件温和, 有些肽在丹磺酰化后, 还能保留原有的生物活性^[4,5], 可进行生物活性鉴定。由于丹磺酰肽对酸水解, 很稳定, 所以在定量测定后的 DNS-肽溶液或斑点, 在回收后还可进行肽的末端分析, 氨基酸组成和结构分析。

小肽和 DNS-Cl 反应生成的 DNS-肽, 它的荧光强度很稳定, 我们实验室, 曾将在聚酰胺薄膜片上的 DNS-脑新肽斑点, 避光保存一年, 荧光强度没有明显的改变。由于肽的结构不同, 每种 DNS-肽的荧光稳定性也不可能一样。

DNS-Cl 不但能和肽的末端氨基起反应, 也能和肽链中可能存在的游离羟基和氨基起反应, 因此实验时必须注意恰当地使用 DNS-Cl 的量。

DNS-肽在聚酰胺薄膜片上进行荧光定量扫描, 最小检出量为 $10 pmole$ 。在溶液中进行荧光定量比色测定, 最小检出浓度为 $0.1 pmole$ 。

将 DNS-亮-脑啡肽和 DNS-脑新肽, 分别用甲醇配制成相同浓度的溶液 ($1 nM$), 在恒温比色池中, 由低温到高温, 每上升 $5^{\circ}C$ 测定一次, 结果见图 6。

从图 6 可看到, 温度对 DNS-肽的荧光强度是有影响的, DNS-亮-脑啡肽在 $10^{\circ}-20^{\circ}C$

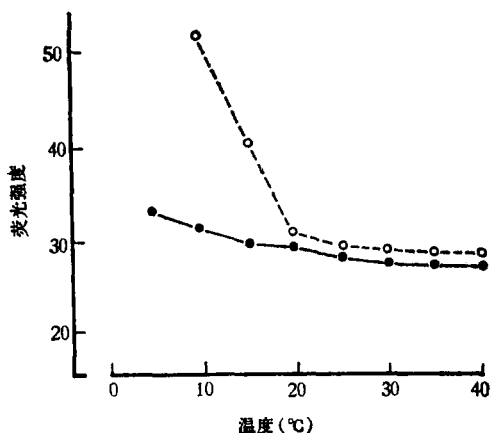


图6 温度对 DNS-肽荧光强度的影响

○—○ DNS-亮-脑啡肽
●—● DNS-脑新肽

之间的温度系数为 2, 即温度上升 1°C, 荧光减少 2%。DNS-脑新肽的温度系数较小, 只有 0.5, 即温度每上升 1°C, 荧光强度只减少 0.5%。二者在 20°—30°C 之间的温度系数均很小, 30°—40°C 之间, 温度升高时, 荧光强度, 基本不变。随着温度升高, 荧光强度降低其主要原因是由于分子内能量的转移作用, 即是将分子的激发能, 转变为基态能, 或通过碰撞, 将能量转移给溶剂分子^[8]。

表3 不同溶剂对 DNS-肽荧光强度的影响

样品	浓度 (nM)	荧光强度(%)		
		甲醇	氯仿	丙酮
DNS-亮-脑啡肽	1	100	12.3	43.0
DNS-脑新肽	1	100	75.4	10.8

将 DNS-亮-脑啡肽和 DNS-脑新肽, 分别用甲醇, 丙酮和氯仿配制成相同浓度的溶液 (1nM), 进行荧光定量测定, 结果见表 3。

从表 3 可看到, 丙酮和氯仿都有降低荧光强度的作用, 这可能与 DNS-肽在溶剂中的构象有关, 也和溶剂的吸收有关。因此, 实验时必须注意溶剂的选择, 以免影响实验的灵敏度。此外, pH 对 DNS-肽的荧光强度也有影响, DNS-脑新肽在 pH 3—4 时, 荧光强度也比较强。

本文中报道的检量标准曲线的浓度范围, 荧光比色法 10^{-13} — 10^{-11} mole, 荧光薄膜扫描法是 10^{-11} — 10^{-9} mole, 由于荧光法测定 DNS-肽溶液或斑点的灵敏度很高, 在此范围以外, 使用的仪器的灵敏度, 需要调整, 调整灵敏度后的标准曲线需要另行绘制。

参 考 文 献

- [1] Gray, WR.: *Method in Enzymology*, 11, 139, Hirs, CHW (ed.). Academic Press Inc, N. Y., 1967.
- [2] Wood, KR et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 133 369, 1967.
- [3] Lee, ML et al.: *J. Chromatography*, 116 462, 1976.
- [4] 潘小平等: 《生物化学与生物物理学报》, 14, 383, 1982.
- [5] Tamuva, Z. et al.: *Anal. Biochem.*, 52 595, 1973.
- [6] 施涛涛等: 《生物化学与生物物理学报》, 14 397, 1982.
- [7] 潘小平等: 《针刺研究》, 8, 229, 1982.
- [8] Brown, EJ. et al.: *J. Phys. Chem.*, 63 4, 1959.

[本文于 1985 年 12 月 17 日收到]