

多肽、蛋白质的固相序列分析

梁 逊 郭小丽*

(南开大学化学系,天津)

提 要

本文综述了多肽、蛋白质固相序列分析的原理及目前的研究状况。讨论了各类载体在该方法中的使用及存在问题、载体与肽的偶联方式以及对 Edman 降解产物的分析鉴定等。着重说明了新型载体的研制及其应用。

对蛋白质结构和功能的深入研究,快速简便测定蛋白质一级结构的方法已成为重要的研究课题。用化学法测定蛋白质、多肽一级结构,早在1930年就由 Abderhalden 和 Brockmann^[1] 提出。他们采用异氰酸苯酯做为降解试剂,从氨基端进行蛋白质一级结构的测定,但这种降解法特异性不好。1950年 Edman^[2] 进一步改进了这个方法,他把降解试剂改为异硫氰酸苯酯,使这方法的特异性大大提高,从而建立了从氨基端进行蛋白质、多肽一级结构测定的 Edman 降解法,并在1967年由 Edman 和 Begg 设计了自动蛋白质、多肽序列分析仪,使 Edman 方法成为很有价值的蛋白质、多肽序列测定手段。Edman 提出的液相序列分析法本身也有些难以克服的困难和不足之处,主要有以下几方面:(1)降解下来的氨基酸衍生物与母体肽链分离比较困难,这是由于采用萃取方法使降解下来的氨基酸衍生物溶于有机相,而与溶于水相的肽链分离。当肽链变短时或一些

带非极性功能基团的氨基酸的肽,在有机相中有一定的溶解度,从而造成肽链丢失,并干扰序列分析。(2)Edman 的液相降解法要求实验操作严格,否则得不到满意的结果。(3)Edman 液相序列分析仪结构比较复杂,鉴定一个氨基酸所需周期较长。

为了克服以上不足,1966年 Laursen 提出了固相 Edman 降解法^[3],并设计了固相 Edman 序列分析仪。其实验操作简便,降解下来的氨基酸与母体肽链只需通过简单过滤方法即可完全分离,固相自动序列分析仪也比液相简单,而且分析一个氨基酸只需一小时左右。下面将详细叙述固相法的原理及目前的研究状况。

一、Edman 降解法的化学过程

用 Edman 方法进行肽或蛋白质的降解过

* 现在中国科学院上海植物生理研究所工作。

- [11] Stephen, D. S.: *Trends in Neuroscience*, 1987, 10, 142.
[12] Wigström, H. et al.: *Acta Physiol. Scand.* 1985, 124, 475.
[13] Wigström, H. et al.: *Neuroscience*, 1986, 17, 1105.
[14] Huang Y. -Y. et al.: *Neuroscience*, 1987, 9, 22.
[15] Gellman, R. S. et al.: *Trends in Neuroscience*, 1985, 8, 181.

- [16] Ito, M. et al.: *J. Physiol.*, 1982, 324, 113.
[17] Ito, M.: *Neuroscience Res.*, 1986, 3, 531.
[18] Ekerot, C-F. et al.: *Brain Res.*, 1985, 342, 357.
[19] Sakurai, M.: *Neuroscience letter supp.*, 1985, 22, s26.
[20] Ekerot, C-F. et al.: *J. Physiol.*, 1981, 318, 207.

[本文于1987年5月3日收到]

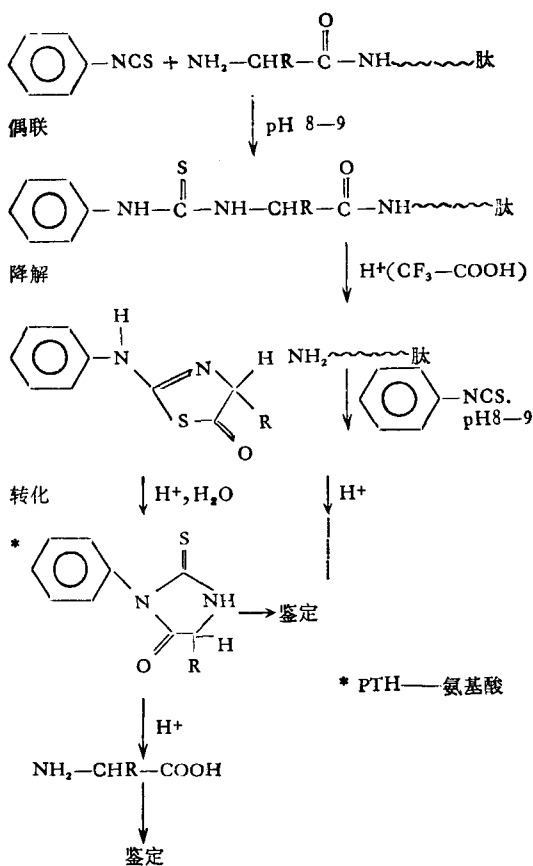


图1 Edman 降解法

程如图1所示。以上过程反复进行，可以测定任意长度的肽链。但实际上有许多干扰因素，以至测定超过40个氨基酸残基时，分析就困难了。干扰因素至少有以下三点^[4]：(1) 重叠，这是由于肽链的氨基与异硫氰酸苯酯反应以及随后降解反应不完全造成的。这是决定Edman降解法能测定多长肽链的关键因素。若这两步反应的总产率是95%，从反应开始到第15个残基时，反应总产率则为0.95¹⁵即46%，反应到此，混有前14步反应的各种残留物，势必影响分析结果。若重复收率达98%以上，则可测60—70个氨基酸残基的肽链^[5]；(2) 非特异性降解产生新的氨基端。这非特异性降解虽然产率很低，但经40—60个循环后，其积累结果就不可忽视了^[6]；(3) 氨基端的封闭，虽然对Edman降解过程中产生的副反应还了解不多，但已知一次降解后大约有4—6%的肽成为不能进行序列分析的产物。因此，对于Edman降

解反应进一步研究，有可能在肽和蛋白质序列分析方法中起一些改进作用。

二、固相 Edman 降解法

1. 概述

为把蛋白质或多肽的羧基端或侧链基团与固相载体偶联，然后进行Edman降解反应。得到的苯基乙内酰硫脲-氨基酸 (Phenylthiohydantion, 简称 PTH 氨基酸)，用过滤法即可与偶联于固相载体上的母体肽分离，也可使反应在柱中进行，用柱层析法分离 PTH 氨基酸和母体肽链。

2. 固相载体

用做固相序列分析的载体性能必须符合以下要求^[7]：(1) 对于Edman降解过程中所用试剂和溶剂是化学稳定的；(2) 应具备合适的物理特性，有较好的溶胀性，溶剂和试剂在其中易扩散；(3) 肽链易于接近载体的反应官能团，有较高的偶联效率。目前使用的一些载体还不能完全符合以上要求，但一些新型载体已具备上述性能。

凝胶型交联聚苯乙烯衍生物载体：

这是最早应用于固相序列分析的载体，它的交联度一般为1%或2%，小球的粒度为200—400目，其主要有下面几种类型。

(1) 氨基聚苯乙烯 (AP)

它与肽或蛋白质羧基端偶联反应能力低，一般只能偶联30个氨基酸残基以下的肽。原因是氨基聚苯乙烯是疏水性的，而肽或蛋白质一般为亲水性的，难以很好接近载体功能基团。同时，芳香族氨类的亲核反应能力低。目前常将含赖氨酸的肽的氨基与对二异硫氰酸苯酯反应，然后与AP载体偶联，这样极性肽增加了一个极易与氨基反应的非极性头部，有利于和非极性载体的亲和。

(2) 三乙烯基四胺聚苯乙烯 (TETA)^[8]

TETA型聚苯乙烯载体具有一个长的亲水性聚胺侧链，在甲醇等极性溶剂中也能溶胀，脂肪族的氨基比芳香族氨基亲核性强，而且在碱性条件下，1,2-二氨基的结构将根据碱催化

原理增加 NH_2 的亲核性,因此 TETA 载体与羧基活化的肽偶联效果好,常可偶联包括 60 个氨基酸的肽链。

(3) 乙烯基二氨基,氨基聚苯乙烯 (EDAA)

此载体既有芳香族氨基,又有脂肪族氨基存在,故兼有以上两种载体的特性。

(4) 对二异硫氰酸苯酯聚苯乙烯 (DITC)

这类载体用于带赖氨酸残基的肽和蛋白质的序列分析。

凝胶型聚苯乙烯载体化学性能稳定,易制成各种衍生物,但同时存在着以下的缺点:(1)其在肽或蛋白质能够溶解的极性溶剂中溶胀甚微,只有少量官能团起作用,造成与肽链偶联度较低;(2)在 Edman 降解试剂中溶胀度变化很大,装柱使用时常会引起柱沟流或堵塞现象;(3)当使用粒度很小(如 400 目)载体时,液体在柱中流速很慢,限制了快速分析;(4)对于长肽链和蛋白质,凝胶型载体偶联效果不好,一般仅适于连接 40 个氨基酸残基以下的肽^[9]。

无机型氯化玻璃载体:

1973 年,Wachter 和 Machleidt^[9] 首次将氯化玻璃应用于固相序列分析。这种载体是由可控多孔玻璃珠体(简称 CPG, 200—400 目)经硅烷化反应制成。一般孔径为 $75 \text{ \AA} - 170 \text{ \AA}$ ^[10]。氨基多孔玻璃衍生物种类较多,如氨基丙基玻璃 (ApG),氨基上取代的氨基丙基玻璃 [$\text{N}-(\beta\text{-aminoethyl}) \text{ aminopropylglass}$], 以及对二异硫氰酸苯酯多孔玻璃 (DITC-PG) 等。此类型载体的优点是:(1)在溶剂中不发生由于溶胀、收缩而产生的体积变化;(2)为刚性小球,避免了聚苯乙烯载体所产生的机械强度问题;(3)有较大表面积,反应基团都位于载体表面;(4)对于长肽链偶联效果好。但多孔玻璃的衍生物制备比较困难,并且由于玻璃表面层在碱性介质中发生溶解,因而限制了某些降解试剂的使用。

大孔聚苯乙烯衍生物:

为了克服以上两种载体的缺点,Appella 和 Inman^[11] 首次应用大孔聚苯乙烯树脂作为蛋白

质、多肽序列分析的载体。此类载体的优点为:(1)因为有较高的交联度,所以比凝胶型树脂在溶剂中的体积变化小。(2)装柱使用时,反应试剂和溶剂能以较高的流速通过。(3)大孔球体有高的比表面积,易与反应试剂接触,并且能制备有较长侧链的衍生物,应用于长肽链的分析。

目前使用的大孔型树脂载体主要是苯乙烯-二乙烯苯骨架聚合物,粒度 200—400 目,孔径 700 \AA 左右。衍生物种类很多,其中以三次乙基四胺 (TETA) 型大孔载体性能较好,使用较多。虽然大孔型载体应用于序列分析刚刚开始,特别是在物理特性方面有待进一步的研究和改善,不过它已显示出了比前两种载体优越之处。

聚丙烯酰胺类载体:

1976 年这种载体首次应用于序列分析之中。因为它是极性载体,衍生物又易于制备,所以适用于长肽链的分析。但此类聚合物在 Edman 降解条件下可被三氟乙酸水解,严重影响载体使用寿命及分析结果。

固相序列分析的成功在很大程度上依赖于肽或蛋白质与载体的偶联效果。一旦肽偶联在不溶性载体之上,通常序列分析不会有太大问题。到目前为止,尽管已有多种类型载体,但这方面的研究还差的很远,新型载体的研究将对固相法的进一步发展起决定性作用。

3. 偶联方式

羧基端偶联:

肽或蛋白质的羧基端与载体偶联之前,必须保护肽链的氨基,以防止氨基与活化羧基发生肽分子之间或分子内的缩合反应。氨基保护一般采用叔丁氧羰基 (t-BOC),它在三氟乙酸作用下即可脱除,也可采用对二异硫氰酸苯酯与氨基反应,保护氨基。

(1) 采用偶联试剂使肽与载体偶联

(a) 羰二咪唑 (Carbonyldiimidazole)

这是第一个用于羧基偶联的试剂。偶联产率高,而且副反应少,但它极易与亲核试剂反应,所以必须在严格无水,无氨条件下进行。溶剂常使用 N, N-二甲基甲酰胺 (DMF)。但并

非所有的肽,特别是长肽都能溶于 DMF 中,而且无水条件的维持造成操作上的困难。肽链中天门冬氨酸侧基将与羰二咪唑反应生成环状中间产物,影响进一步降解。

(b) 碳二亚胺类 (Carbodiimides)

目前常使用的这类偶联剂为 N, N-二环己基碳二亚胺 (DCC) 和水溶性的 1-乙基-3-(3-二甲基丙基)碳二亚胺 (EDC)。使用 EDC 偶联反应能在极性溶剂中进行。天门冬氨酸处不会产生环状中间产物。而且使用水溶性偶联剂操作方便。但偶联效率变动很大,常常比较低,是使用此类偶联剂存在的主要问题。1980 年 Laursen 提出使用 1-羟基苯并吡唑 (HOBT) 可作为催化剂增加偶联反应速率和偶联产率^[12]。

(2) 肽的羧基端形成高丝氨酸内酯与载体偶联

氰溴酸 (CNBr) 能使蛋白质或多肽的蛋氨酸 (Met) 处发生特异性断裂,产生羧基端为高丝氨酸的肽段,然后加入三氟乙酸变为高丝氨酸内酯。因其极易被脂肪胺水解,所以使用氨基型载体,使肽能选择性地以高丝氨酸内酯结尾的羧基端偶联于载体上。偶联之前不用进行氨基或侧链羧基的保护。当使用 TETA 类型载体时,偶联反应产率通常大于 80%^[13]。

近年来使用 N-溴代丁二胺,2-亚碘酰基苯甲酸,二甲亚砜/盐酸/氢溴酸等试剂能使蛋白质或多肽在色氨酸、酪氨酸、组氨酸处发生特异性裂解,产生内酯结构的羧基端^[14]。虽然这些试剂降解率不如氰溴酸,但形成内酯后的肽链与载体的偶联率很高。

侧链氨基偶联法:

对于含有赖氨酸 (Lys) 和精氨酸 (Arg) 的肽,特别是胰蛋白酶水解蛋白质所得肽段常用侧链氨基与载体偶联的方法进行肽的固定。如图 2 所示。Arg 必须进行胍解形成鸟氨酸 (Orn) 才能采用此方法偶联,但 Arg 胍解时,肽常在天门冬氨酸 (Asp) 处发生非特异性降解。若 Lys 和 Arg 在肽的羧基端,则可做全肽段序列分析。此方法偶联率高,特别适合小

肽的分析^[15]。

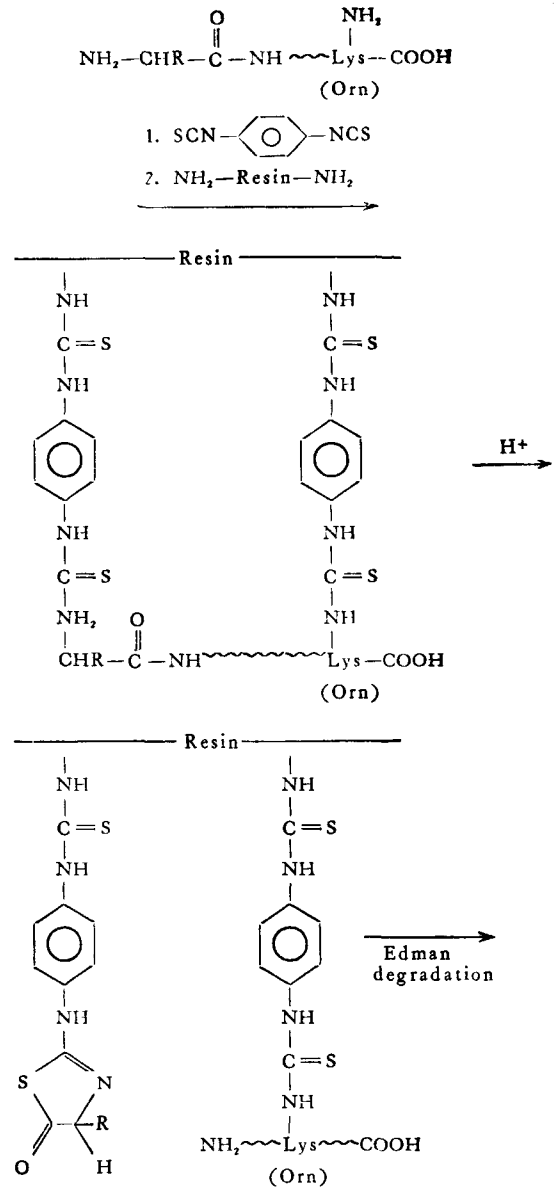


图 2 侧链氨基偶联

联合偶联法:

此方法继承了以上两种偶联方法的优点,于 1975 年由 Schittz 和 Reinbolt 提出^[16]。如图 3 所示。联合偶联对长肽链的偶联比之两者单独使用要好,而且不必预先进行肽链氨基的保护。

在肽与载体偶联后,载体上剩余氨基必须封闭起来,否则在肽第一次降解时,降解试剂异

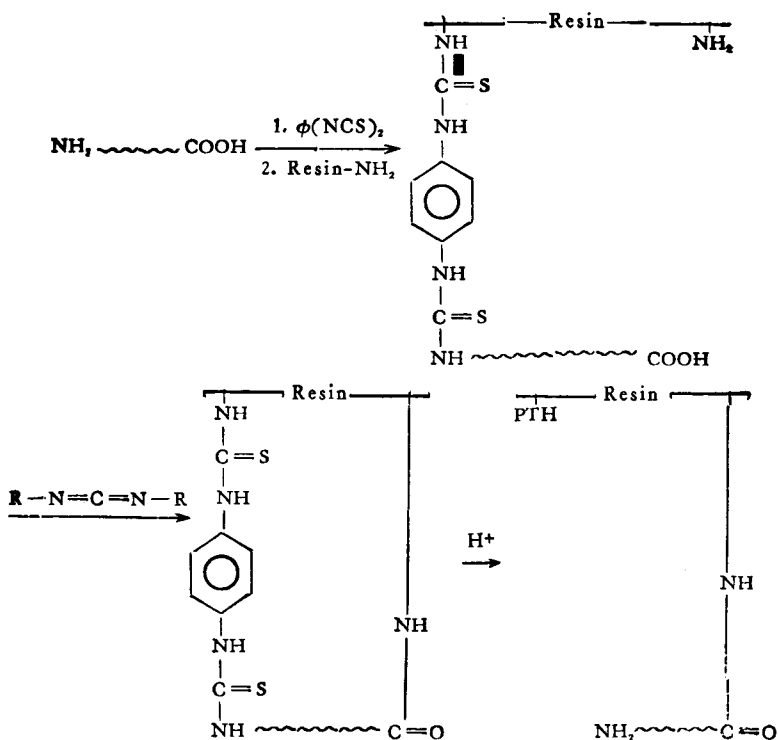


图3 联合偶联法

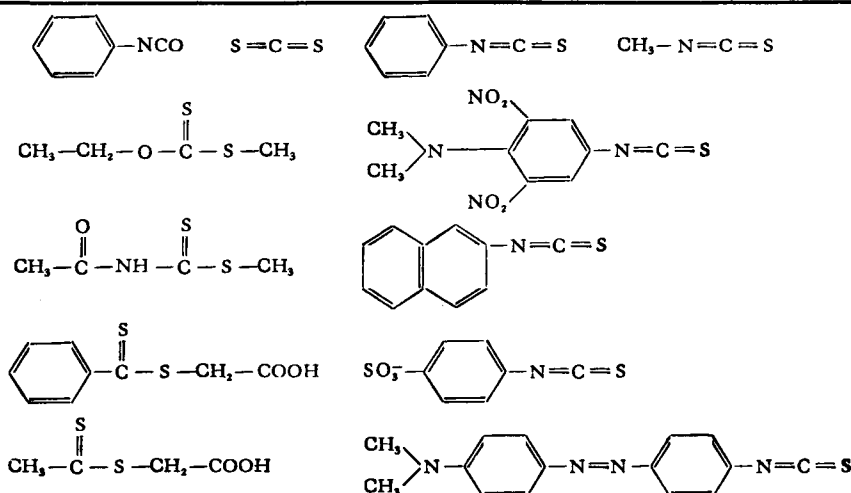
硫氰酸苯酯将与此氨基反应而降低降解效率。封闭试剂采用异硫氰酸酯类物质。但在 Edman 降解条件下,特别是使用 TETA 型载体,封闭基团可能会发生降解,在检测氨基酸衍生物时产生背景干扰。目前广泛使用的封闭剂为异硫氰酸甲酯,因为其背景干扰小些。

4. Edman 降解

这一步与液相 Edman 降解所用试剂完全相同。表 1 列出了目前使用的降解试剂。

降解试剂的逐年发展显示两个趋势:(1)向特异性高的方向发展,如异硫氰酸苯酯取代异氰酸苯酯。(2)向降解产物——氨基酸衍生物易于鉴定和高灵敏度的水平发展,如二硫代酯类,其降解后生成的氨基酸衍生物易转变为

表 1 Edman 降解试剂



游离氨基酸而易于鉴定。还有有色 Edman 降解试剂, 如 4-N, N-二甲基氨基偶氮苯-4'-异硫氰酸酯 (DABITC), 其氨基酸衍生物通过盐酸蒸气后呈红色, 仅用聚酰胺薄膜层析即可方便灵敏地鉴定^[47]。还有同位素标记的降解试剂, 应用于微量肽的序列分析。总之, 关于降解反应的研究, 目前正向着特异性高, 微量, 快速, 产物易于鉴定的方向发展。

5. 降解产物的鉴定

表 2 给出了一些 PTH-氨基酸的鉴定方法

表 2 PTH-氨基酸的鉴定方法

- | |
|-----------------------------------|
| (1) 盐酸水解成自由氨基酸 |
| (2) Ba(OH) ₂ 碱水解成自由氨基酸 |
| (3) 纸色谱 (4) 薄层色谱 |
| (5) 气相色谱 (6) 质谱 |
| (7) 反相高压液相色谱 |
| (8) 同位素标记 |

上述方法中, 酸碱水解法效果不佳。PTH-氨基酸的直接测定法比水解法方便而有效, 特别是 1973 年 Zimmerman 采用反相高压液相色谱法鉴定 PTH-氨基酸使检出灵敏度大大提高, 目前检出量可达 10picomole 以下, 而且在 10 分钟内分离所有的 PTH-氨基酸^[48]。另外, 使用 DABITC 比使用异硫氰酸苯酯作降解试剂可将灵敏度提高 25 倍^[49]。同位素标记测定也可达 picomole 级。所以现代的 PTH-氨基酸鉴定方法已接近于灵敏、准确、快速的要求了。

肽和蛋白质固相序列分析方法正在深入研究之中, 到 1982 年, 已召开过四次蛋白质固相序列分析国际讨论会。此法虽然至今未得到十分满意的结果, 但已在多肽、蛋白质序列分析的实际应用中起了一定作用, 特别适于微量序列分析和疏水肽的测定。1976 年 Bridgen 等人用此法首次测出人类白细胞抗原 A 和 B(HLA-A 和 HLA-B) 的前 16 个氨基酸的序列。1978 年, Wachter 和 Sebald 又用此方法分析大肠杆菌 (*E. Coli*) ATP 酶亚单位的 79 个残基的排列顺序。近年来还采用序列分析手段检查

固相法合成肽的纯度。各种形式的固相序列分析仪相继问世。我国有些单位也采用固相法测定一些蛋白质的序列, 并自行组装序列分析仪。目前, 国内使用的载体一般都需要进口, 而国外, 这些载体大都商品化, 并开始研制各类新型载体, 如大孔树脂、极性树脂等, 以使固相序列分析能更广泛用于各类肽和蛋白质的分析。为使固相序列分析方法在国内广泛应用, 对载体特别是新型树脂的研制将是一个很重要的研究课题。

参 考 文 献

- [1] Abderhalden, E. et al.: *Biochem. Z.*, 1930, 225, 386.
- [2] Edman, P.: *Acta Chem. Scand.*, 1950, 4, 283.
- [3] Laursen, R. A.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, 88, 5344.
- [4] Laursen, R. A.: *The Peptide*, Academic Press, New York, 1981, 4, 262—264.
- [5] 鲁子贤: 《蛋白质化学》, 科学出版社 1981, 21.
- [6] Machleidt, W.: *Solid-phase Methods in Protein Sequence Analysis*, Pierce Chem. Co., Rockford, Illinois, 1975, 17.
- [7] Aursen, R. A.: *Solid-phase Methods in Protein Sequence Analysis*, Pierce Chem. Co., Rockford, Illinois, 1975, 33.
- [8] Horn, M. J. et al.: *FEBS Letters*, 1973, 36, 285.
- [9] Wachter, E. et al.: *FEBS Letters*, 1973, 35, 97.
- [10] Bridgen, J.: *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 1977, 47, 321—335.
- [11] Inman, J. K. et al.: *Solid-phase Methods in Protein Sequence Analysis*, North-Holland, Amsterdam, 1977, 81.
- [12] Laursen, R. A.: *Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis*, North-Holland, Amsterdam, 1980, 9—20.
- [13] Laursen, R. A.: *The Peptide*, Academic Press, 1981, 4, 267.
- [14] Wachter, E. et al.: *Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis*, North-Holland Amsterdam, 1980, 21—34.
- [15] Wittmann-Liebold, B. et al.: *Solid-phase Methods in Protein Sequence Analysis*, Pierce Chem. Co., Rockford, Illinois, 1975, 81.
- [16] Schiltz, E. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1975, 56, 467.
- [17] 张国娣等: 《生物化学与生物物理进展》, 1981, (1), 41.
- [18] Zimmermann, C. L. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 55, 1220.
- [19] 俞鹤年等: 《生物化学与生物物理进展》, 1981, (1), 4.

【本文于 1987 年 3 月 24 日收到】