

## 提高蛋白质顺序测定的降解循环数的方法

徐秀璋 张伟

(中国科学院生物物理研究所)

### 提 要

该方法提高了一次性连续降解循环数,简化断裂大肽链及分离纯化小肽链的步骤,使测顺序效率提高一倍左右。是目前国内外一种最新方法。

当前测定蛋白质(或多肽)氨基酸顺序的最基本的最常用的方法仍然是 Edman 化学降解法。但此方法受到 Edman 化学反应(主要是偶合、裂解反应)本身产率的影响,使一次性连续降解的循环数限制在:手工液相法 15—25 循环(手工固相法略高);固相顺序仪 20—30 循环;改进后的液相顺序仪 40—60 循环;气相顺序仪 60—80 循环<sup>[1]</sup>。反应产率与降解循环数之间的关系是:

99% → 120 循环, 98% → 60 循环, 97% → 40 循环……

若反应产率为 97%, 按公式计算:

$$\left(\frac{97}{100}\right)^{40} \approx 30\%$$

这就是说,当降解到第 40 个循环时,前 39 个循环反应中残留下来的各种杂质夹杂在一起(占 70%)已远远超过被检出(占 30%)的物质,势必难以将结果分析清楚。所以在蛋白质顺序测定中,如何提高一次性连续降解循环数,是蛋白质顺序工作者十分关心的问题。提高了一次性连续降解循环数,将简化断裂大肽链及分离纯化小肽链的步骤,使测顺序的效率得到提高。

根据荧光胺能与氨基(NH<sub>2</sub>-)反应,而不能与脯氨酸中亚氨基(-NH-)反应的特性,在测顺序中,每当遇到末端残基是脯氨酸时,先加荧光胺与反应物作用,以封闭反应物中的所有带氨基基团的杂质,然后进行正常的 Edman 降

解反应。我们选用细胞色素 c 为材料,用常规手工固相 DABITC/PITC 双偶合微量测顺序方法测氨端顺序,一次连续降解 49 个循环,取得良好的结果。

### 一、材料和方法

**材料** *Candida Krusei* 细胞色素、c-APG、吡啶、甲醇均为 LKB 公司 Bichrom 产品、顺序纯。PITC, TFA, Fluram (荧光胺)、Micro-polyanide F1700 (聚酰胺薄膜)、DABITC 均为美国 Pierce 公司产品,顺序纯。DABITC 用沸丙酮重结晶。

#### 方法

称一份已经固定的 *Candida Krusei* 细胞色素 C-APG 45mg, 于一带塞磨口的玻璃小试管(6×10cm)中,按 J. Y. Chang<sup>[2]</sup>和 B. Wittman-Liebold<sup>[3]</sup> 手工固相 DABITC/PITC 双偶合法略加改进后进行 Edman 降解<sup>[4]</sup>, 降解产物在 2.5×2.5cm 的聚酰胺薄膜上点样鉴定,以确定脯氨酸残基在该肽链中的位置。

称取另一份 *Candida Krusei* 细胞色素 C-APG 45mg 于另一带磨口玻璃管中,按上述同样方法进行 Edman 降解,当降解到肽链的 N 末端为脯氨酸残基时,停止降解、即加荧光胺反应。

分别用吡啶(2×2ml)、甲醇(2×2ml)洗涤前一个降解循环留下的过剩试剂及杂质。干燥

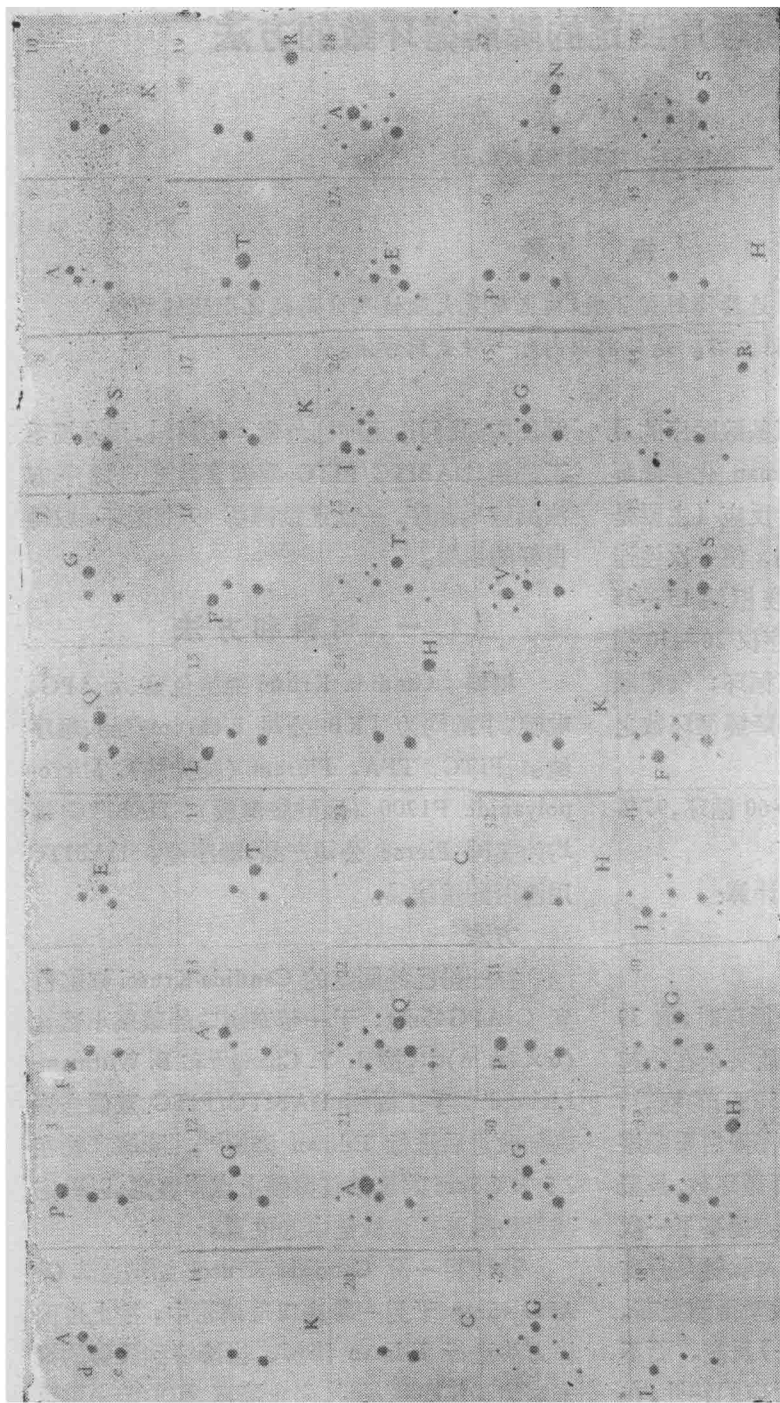


图 1 加荧光反应, 测定的细胞色素C的N端顺序。

- ① d. e. 为标记物。
- ② 本图照相前曾把各点加深加大。
- ③ Thr. Ser, Lys, Trp (His. Cys), 产率低或没有, Leu 与 Ile 点不开(需高效分离板分离)。

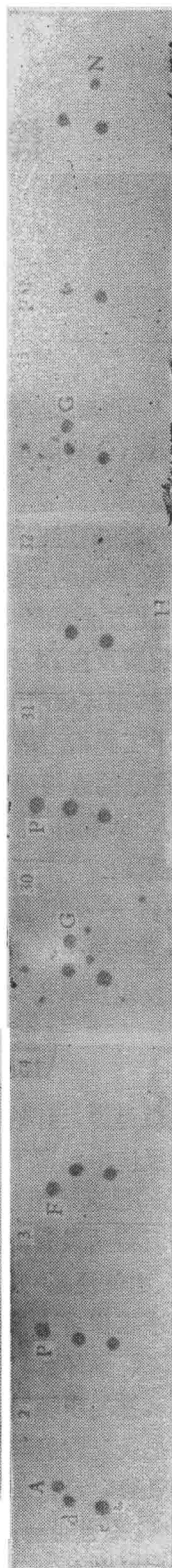


图 2 加荧光反应前, 酶解产物检出比较。

- ① d. e. 为标记物。
- ② 本图照相前曾把各点加深加大。
- ③ 32 应为 His,

后加 300ml 荧光胺/丙酮 (内含 2.6mg 荧光胺/1ml 丙酮), 吸弃上清液, 然后分别用丙酮和甲醇各洗二次, 每次 1.5ml, 经沉淀后吸弃上清液、塞砂芯塞真空抽干试管中的样品。

再进行常规的双偶合法 Edman 降解, 并分别对降解产物进行逐个鉴定。

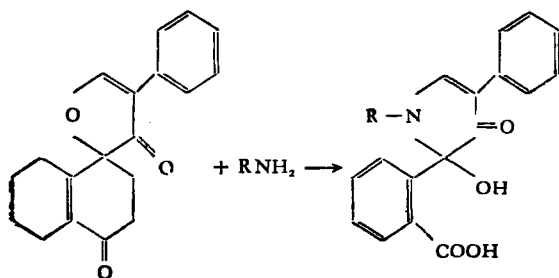
薄层 (TLC) 鉴定用的标记点 (E.D) 和标准 DABITC-氨基酸均按 Chang<sup>[5,6]</sup> 的方法制备。

## 二、结果和讨论

1. 用手工固相 DABITC/PITC 双偶合法对细胞色素 c 进行 Edman 降解, 第一次连续降解了 31 个循环, 经聚酰胺薄层层析检出, 确定脯氨酸残基在该肽链中的位置为: pro<sup>1</sup>, pro<sup>3</sup>, pro<sup>31</sup>。第二次 (另取一同样样品) 按同样方法进行顺序分析, 当降解完第 2 和第 30 循环后, 即加荧光胺试剂反应, 而后进行常规的双偶合法 Edman 降解, 这时一次连续降解 48 循环, (结果见图 1)。从图 1 中可见加荧光胺反应后降解产物在薄膜上的检出点的清晰度得到了明显的改善 (即降解背景), 从而使一次性连续降解比第一次增加十多个循环, 我们在第二次降解中, 发现肽链的第 36 位为脯氨酸残基。再取一次同样样品, 按上述方法 (即在降解完第 30, 第 35 循环后分别加荧光胺反应), 再测定它的 N 端顺序时得一次性连续降解 49 循环以上 (图 1)。

2. 选用荧光胺提高蛋白质顺序测定的降解循环数, 主要是根据荧光胺能与氨基 (NH<sub>2</sub>-) 反应而不能与亚胺基 (-NH-) 反应的特性:

它与荧光胺反应的原理:



此外, 我们曾用若干种游离氨基酸混合液

(其中含有脯氨酸) 和荧光胺反应, 反应后鉴定除脯氨酸外其他氨基酸均未检出。说明荧光胺阻断氨基的效果是十分明显的。

蛋白质顺序分析中的 Edman 降解反应, 一次性连续降解的循环数严格受到化学反应本身产率的影响。根据 Kahman<sup>[4]</sup> 估计, 当前手工技术测顺序一般得率为 90—93%; 固相顺序仪得率为 93—95%; 用改进后的液相顺序仪得率为 98%, 而它的测量灵敏度和精确度又往往表现在对降解产物 DABITC-氨基酸 (或 PTH-氨基酸) 的检出上<sup>[7]</sup>。采用本方法, 正是达到了降低背景, 提高检出灵敏度和精确度的目的。

3. 用本方法的先决条件是待测肽链中必含有脯氨酸残基, 并须处在恰当的位置。在自然界中符合这样条件的蛋白质 (多肽链) 是相当多的。因此, 本方法有普遍意义。采用这个方法, 将使用手工测顺序的一次性连续降解循环数提高一倍左右, 对于一个五十个左右残基的肽链, 将无需再断裂成小肽片段即可直接测定顺序。不仅能提高测顺序的效率, 而且将大大节约样品及其它试剂的消耗。因为, 对一个被测蛋白质 (或多肽) 分子, 在测顺序过程中往往需将大肽链断成小肽链, 经分离纯化后测定各小肽链的顺序然后拼接成大肽链, 这是一项十分繁杂的工作。如果提高了一次性连续性降解循环数, 将简化断裂大肽链及分离纯化小肽链的步骤。

4. 在测顺序过程中, 用荧光胺反应能暂时降低检出背景, 效果是明显的 (见图 2)。但有时也能发现加荧光胺反应后在降解的三个循环后又出现了较多的杂点背景, 其原因可能是: 某些肽链 (如门冬酰胺) 的非特异裂解, 载体受到机械损伤, 释放出某些氨基基团或被固定的肽链键断裂等。

5. 荧光胺试剂不太稳定, 容易分解, 因此试剂最好随用随配, 不宜存的太久。用 OPA (邻苯二醛) 代替荧光胺阻断氨基基团同样有效, 通常 OPA 较稳定, 更适用于在顺序仪上。本方法也同样适用于手工液相顺序分析。

## 参 考 文 献

[1] Wittmann-Liebold, B.: *Methods in Protein Sequence*

# 大鼠肝谷胱甘肽转硫酶的制备及其部分性质的研究

党进军 孙志贤 夏寿萱

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

## 提 要

本文通过 CM-52 纤维素柱层析分离得到六种大鼠肝谷胱甘肽转硫酶同工酶; 经 GSH-亲和层析柱进一步纯化, 得到纯酶。讨论了该酶的部分理化性质。抑制实验结果表明, 胆酸类化合物对谷胱甘肽转硫酶的抑制作用类型为非竞争性。

谷胱甘肽转硫酶 (Glutathione S-transferase, Ec2、5、1、18; 简称 GST) 是机体内一种具有重要解毒作用同工酶家族。它能催化大量带有亲电中心的疏水化合物 (包括许多致癌剂和诱变剂) 与还原型谷胱甘肽结合, 而且还能共价或非共价地与非底物配基 (如胆红素、胆酸等) 以及多种疏水化合物结合, 具有结合蛋白解毒功能<sup>[1-3]</sup>。

GST 广泛存在于动物和人体的多种组织中, 以肝脏中含量最高, 约占肝可溶性蛋白的 10%<sup>[4]</sup>。本文对大鼠肝脏 GST 同工酶进行了分离, 并对其部分性质进行了鉴定。

## 材 料 与 方 法

1. 试剂 DEAE-52 和 CM-52 纤维素为 Whatman 产品; 环氧活化 Sepharose 6B 为 Pharmacia 产品; 还原型谷胱甘肽 (GSH) 为上海酵母厂产品; 1-氯-2, 4-二硝基苯 (CDNB) 为 Baker 产品; 鹅脱氧胆酸和胆酸钠为 Serva

试剂, 脱氧胆酸钠为 Carl Roth 试剂; 牛血清白蛋白为北京红星生化制品厂生产 (电泳纯)。

2. GSH-亲和层析柱制备 见 Simons 等人方法<sup>[5]</sup>。

3. GST 同工酶制备 将大鼠 (本院动物场饲养; 雄性, 体重约 180 克) 断头活杀取出肝脏。4℃ 下生理盐水清洗后加入二倍体积缓冲液 A (10mmole/L Tris-HCl, pH8.0) 匀浆, 经 106,000g 离心 60 分钟去除沉淀及漂浮脂肪。然后按 Habig 等人<sup>[6]</sup>方法将匀浆上清液过 DEAE-52 和 CM-52 柱。层析中用 Pharmacia UV-2 紫外监测系统检测 OD<sub>280</sub> 蛋白吸收变化。最后用 GSH-亲和层析柱对 GST 同工酶进一步纯化, 在用缓冲液 B (10mmole/L 磷酸盐缓冲液, pH 6.7) 洗至流出液无蛋白吸收后, 用 20ml 50mmole/L 磷酸盐缓冲液 (含 10mmole/L GSH, pH9.6) 将 GST 洗脱下来。

4. GST 酶活性测定 采用 Habig 等的紫外吸收测定法<sup>[6]</sup>。以 CDBN 和 GSH 为底

*Analysis*, Edited by Marshall Elzinda, 1982, p27—68.  
[2] Chang J. Y.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 578, 188.  
[3] Wittmann-Liedolb, B. et al.: *Methods in peptide and Protein Sequence Analysis*, Editor by Chr Birr, Elsevier/North-Holland, 1980, p49—72.  
[4] 徐秀璋等: 《生物化学与生物物理进展》, 1982, 1, 32。  
[5] Chang J. Y. et al.: *Biochem. J.* 1976, 153. 607.

[6] Chang J. Y. et al., *J. Chromatog.* 1977, 132. 303.  
[7] Chang J. Y.: *Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis*, Editor by Chr Birr, Elsevier/North-Holland, 1980, p115—122.  
[8] Machleidt, W. et al.: *Methods in Protein Sequence Analysis*, Edited by Marshall Elzinga 1982, p 173—180.

[本文于 1987 年 5 月 27 日收到]