

多肽分子中 C-末端酰胺化氨基酸残基的鉴定

宗勤 张鸿良 奚国良 高怡生

(中国科学院上海药物研究所)

提 要

本文报道了一种新的鉴定多肽分子 C-末端酰胺化氨基酸残基的方法, 17 种酰胺化氨基酸的 DABTC 衍生物标准品在高效液相色谱上得到充分分离与鉴定, 采用上述方法对多肽激素 TRH、LHRH、SP 及 PLG 中的 C-末端酰胺化氨基酸残基的鉴定同样得到满意结果。

关键词 酰胺化氨基酸, 化学鉴定, 高效液相色谱, 多肽激素

前 言

作为多肽激素前体后加工的一种方式, 许多生物活性肽的 C-末端是酰胺化的^[1], 且此 α -酰胺在许多情况下是保持生物活性所必需的结构。目前多肽分子的氨基酸序列分析, 采用气相顺序测定方法虽已达数拾微微摩尔 (μmol) 水平, 但此方法无法确定多肽分子 C-末端是否酰胺化, 建立与之相适应的快速且高灵敏度的多肽分子 C-末端鉴定方法是十分有意义的。

Tatemoto 和 Matt^[2] 曾介绍一种通过内切酶酶解, 丹磺酰氯偶联反应, 再经薄层层析色谱检测多肽分子中 C-末端 α -酰胺化氨基酸残基来跟踪及鉴定生物活性多肽的方法。随着高效液相色谱技术 (HPLC) 的广泛应用, 出现了运用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 鉴定 α -酰胺化氨基酸的方法。近年, Bennett^[3] 等报道了运用 Pico-Tag 分离系统鉴定 α -酰胺化氨基酸的 PTC 衍生物的方法, Schmidt 等^[4] 对此方法作了进一步改进。但它的不足之处是操作烦琐, 且有一定的干扰, 影响了检测的灵敏度。

N, N-二甲氨基偶氮苯异硫脲酸酯

(DABITC) 是一有色化合物^[5,6]。作为一种改进的 Edman 试剂它可用于多肽分子的 N-末端分析^[7] 及氨基酸顺序的手工测定^[8,9]。本文介绍一种多肽分子 C-末端经酶解释放及柱前与 DABITC 偶联反应生成 DABTC- α -酰胺化氨基酸衍生物并用 RP-HPLC 鉴定的方法。该法的优点是选用羧肽酶-Y (CBP-Y) 代替内切酶 (Thermolysin) 来释放 C-末端酰胺化氨基酸残基, 然后用 DABITC 代替苯异硫脲酸酯 (PITC) 及丹磺酰氯作为 α -酰胺化氨基酸的 N-端偶联试剂, 从而克服了 α -酰胺疏水性小肽对鉴定的干扰及对高纯试剂的依赖性, 既提高了检测灵敏度, 操作也简单方便。

材 料 与 方 法

1. 材料与仪器

乙腈为 HPLC 纯, 系西德 E. Merck 公司产品。DABITC 由 Fluka 公司提供, 经热丙酮重结晶后于 -20°C 贮存待用, 使用前溶于吡啶中。羧肽酶-Y、P 物质、LHRH 及 TRH 均为 sigma 公司产品。 α -酰胺化氨基酸标准品由本研究组沈蔚雯合成, 其余试剂均为国产分析纯。

高效液相色谱仪 (HPLC) 为 Waters 公司产品, 高效液相色谱柱为反相 PTH-CYANO 柱 ($4.6 \times 250\text{mm}$, Brownlealabs 产品)。氨基酸分析采用 LKB-4400 自动氨基酸分析仪分析。

2. 多肽样品的酶解及 DABITC 偶联反应

取 $0.1-1\text{nmol}$ 多肽样品, 加入 $50\mu\text{l}$ 含适量羧肽酶-Y、 0.05mol/L pH 7.0 柠檬酸钠缓冲液, 酶与底物之比为 5% (W/W), 反应试管经 parafilm 封口后置 37°C 水浴培育 3 小时。酶解产物冷冻干燥后, 将产物溶于 $50\mu\text{l}$ 、pH7.5 的 0.05mol/L 碳酸钠缓冲液中, 加入 $10\mu\text{l}$ 浓度为 1nmol/ml 的 DABITC 吡啶溶液, 反应混和物置 53°C 水浴保温 1 小时, 然后用氮气吹干。各为 10nmol 的 α -酰胺化氨基酸标准品按同样方法与 DABITC 进行偶联反应, 偶联产物冷冻干燥后置 -20°C 保存。

3. α -酰胺化氨基酸 DABITC 衍生物的提取与鉴定

将偶联反应产物溶解于 $100\mu\text{l}$ 、 0.05% (V/V) 三乙胺水溶液中, 用各为 $50\mu\text{l}$ 的三乙胺饱和的乙酸丁酯提取三次, 合并有机相, 氮气吹干。

高效液相色谱用线性梯度洗脱, 洗脱液组分 A 为 pH7.0 的 0.02mol/L 磷酸钠缓冲液, 洗脱液组分 B 为乙腈, 由 A:B = 80:20 至 A:B = 55:45, 为 50 分钟, 流速为 1ml/min , 柱温为 30°C , 检测波长为 420nm 。取三乙胺饱和的乙酸丁酯抽提所得的 α -酰胺化氨基酸的 DABITC 衍生物 $1-20\text{p mol}$ 溶解于 $20\mu\text{l}$ 起始洗脱液中进行, 各峰的保留时间与峰面积由 Waters 公司 740 型数据处理机处理。

4. α -酰胺化氨基酸 DABITC 衍生物的确证

为确证所得的酰胺化氨基酸的 DABITC 衍生物, 经 RP-HPLC 分离所得的各峰分别收集, 冷冻干燥后, 溶解于 $200\mu\text{l}$ 含 0.5% (V/V) 苯酚的 6mol/L 盐酸中, 置 110°C 烘箱水解 24 小时, 水解产物经真空干燥后作氨基酸分析鉴定。

结果与讨论

鉴于许多生物活性肽的 C-末端是 α -酰胺化的, 显然运用一种灵敏度高且操作简便的检测方法将为分离和鉴定生物活性多肽提供重要的手段。

Tatemoto 和 Matt 的鉴定方法是通过内切酶 (嗜热菌蛋白酶, Thermolysin) 酶解释放多肽分子 C-末端的酰胺化氨基酸, 然后将其与丹磺酰氯进行偶联反应, 再经双向 TLC 鉴定。鉴于 Thermolysin 能专一性地酶解 N-端疏水性氨基酸的酰胺键, Tatemoto 和 Matt^[2] 将其运用到他们的方法中, 并成功地得到了 C-末端酰胺化氨基酸残基。但酶解率不高, 为了使 C-末端酰胺化氨基酸有足够的降解机会, 他们使用了大量的蛋白水解酶, 由此产生的大量疏水性小肽干扰了对 C-末端酰胺化氨基酸衍生物的检测。

Bennett 等报道的 Pico-Tag 分离系统已广泛应用于鉴定酰胺化氨基酸^[3], 但该分离系统对鉴定 16 种酰胺化氨基酸需采用两组分离体系, 并需通过紫外区 (254nm) 测定偶联上去的 PTC 基团的吸收来鉴定, 由于反应体系及液相色谱体系中紫外吸收物质的干扰会降低检测灵敏度。

本文采用羧肽酶-Y 作为蛋白水解酶, 在

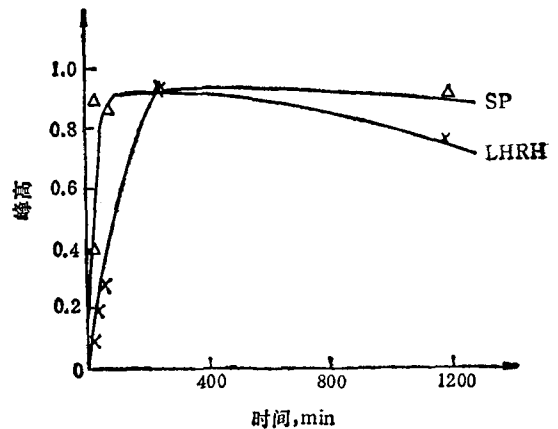


图1 酶解反应时间对 α -酰胺化氨基酸生成量的影响
取多肽激素 SP 和 LHRH 各 1nmol 加入适量羧肽酶-Y, 37°C 保温培育。酶解产物经转化为 DABITC 衍生物后, 用 HPLC 分别作定量分析。

37℃ 将羧肽酶-Y 与底物保温培育 2—4 小时后即可得到足够量的 C-末端酰胺化氨基酸,同时,我们也证实了羧肽酶-Y 对 C-末端酰胺化氨基酸没有明显的脱酰胺化作用(见图 1),因

为羧肽酶-Y 是针对 C-末端的外切酶,所以不会产生疏水性小肽的干扰。酶解释放的 C-末端酰胺化氨基酸与 DABTC 偶联反应生成有色的 DABTC-酰胺化氨基酸衍生物(见图 2)

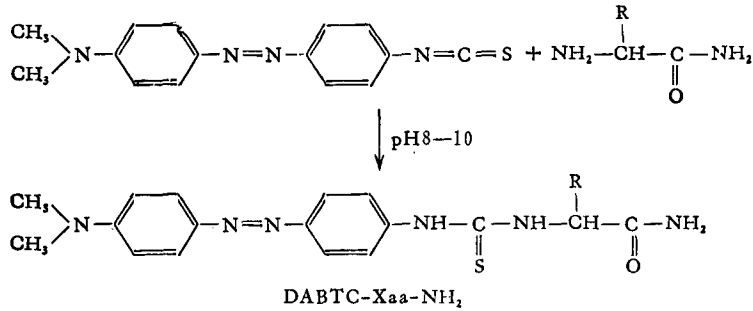


图 2 α-酰胺化氨基酸 DABTC 衍生物的生成

在 0.05% (V/V) 三乙胺水溶液中能被三乙胺饱和的乙酸丁酯有效地从水相中抽提出来,而在同样条件下非酰胺化的氨基酸的羧基接近完全解离而保留在水相中。我们曾将等量的 DABTC 酰胺化氨基酸衍生物与 DABTC 的氨基酸衍生物溶解在 0.05% (V/V) 三乙胺水溶液中,用三乙胺饱和的乙酸丁酯抽提,除

DABTC-酰胺化组氨酸在碱性条件下离解度较大而不能有效地抽提出来,其余的 DABTC-酰胺化氨基酸衍生物的回收率均大于 90%。由于目前已知的生物活性肽中,C-末端酰胺化氨基酸绝大部分是疏水性氨基酸,因而,酰胺化组氨酸提取率低对本法的应用影响不大。

RP-HPLC 鉴定所用的参照品由酰胺化氨

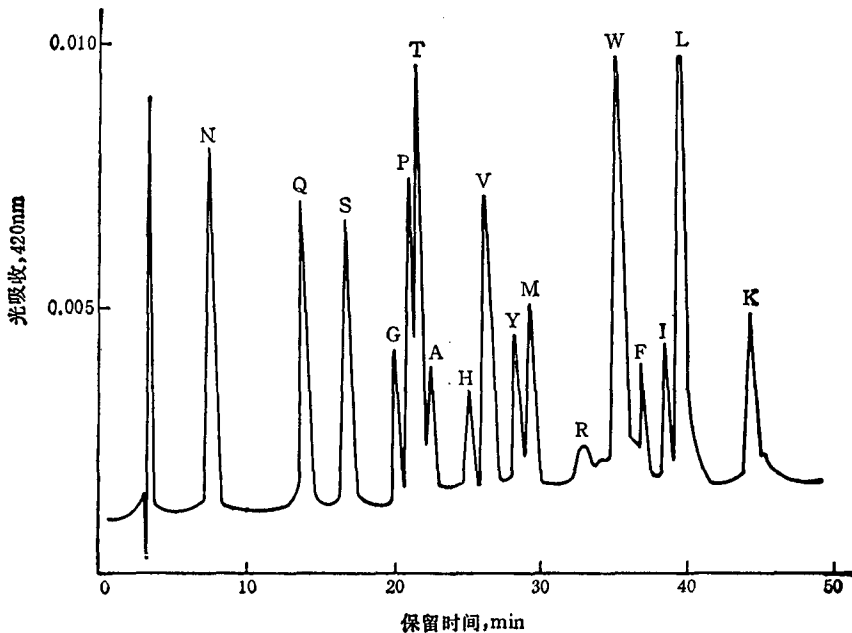


图 3 17 种 α-酰胺化氨基酸 DABTC 衍生物在反相高效液相色谱上的分离

柱: PTH-CYANO 柱 (4.6 × 250mm)
 洗脱体系: (A) 0.020 mol/L pH = 7.0 磷酸钠缓冲液,
 (B) 乙腈,洗脱梯度: 20—45% (B)/50min
 流速: 1.0ml/min。柱温: 25℃ 检测: 420nm/0.01 AuFS

氨基酸标准品与 DABITC 偶联反应并用乙酸丁酯抽提纯化而得。17 种 DABITC-酰胺化氨基酸衍生物标准品在 PTH-CYANO 柱用磷酸钠缓冲液/乙腈体系洗脱的典型图谱如图 3 所示, 各种标准品均能得到充分的分离。在此体系中各种酰胺化氨基酸的 DABITC 衍生物的保留时间见表 1, 各峰均经氨基酸分析证实。我们发现柱温对大多数的 DABITC 衍生物的保留时间和峰宽有明显影响。此外, 1-酰胺化天冬氨酸; 1-酰胺化各氨酸以及酰胺化半光氨酸未包括在我们的分离体系中, 因为至今尚未发现它们存在于天然生物活性肽的 C-末端中^[4]。

表 1 17 种 α -酰胺化氨基酸 DABITC 衍生物在反相 PTH-CYANO 柱上的保留时间

氨基酸衍生物	保留时间 (min)	氨基酸衍生物	保留时间 (min)
Asn (N)	8.2	Tyr (Y)	30.1
Gln (Q)	14.7	Met (M)	31.2
Ser (S)	17.7	Arg (R)	34.8
Gly (G)	21.4	Trp (W)	37.6
Pro (P)	22.4	Phe (F)	39.4
Thr (T)	23.0	Ile (I)	41.0
Ala (A)	24.0	Leu (L)	42.3
His (H)	26.6	Lys (K)	47.2
Val (V)	28.1		

具体分离条件见图 3

DABITC-酰胺化氨基酸衍生物在 420nm 处的摩尔吸光系数比 PTC-酰胺化氨基酸衍生物在 254nm 处的摩尔吸光系数大两倍^[7], 通过测定 DABITC-基团在可见光区的吸收来鉴定 α -酰胺化氨基酸避免了 Pico-Tag 分离系统中紫外吸收物质的干扰, 也大大减少了 HPLC 基线由于洗脱液梯度的改变而带来的变化。

作者曾对以下数种已知生物活性肽: Substance P (Met-NH₂); LHRH (Gly-NH₂); TRH (Pro-NH₂) 和 PLG (Gly-NH₂) 中的 C-末端酰胺化氨基酸经羧肽酶-Y 酶解, DABITC 的偶联反应以及 RP-HPLC 分离, 收集的样品经水解后用氨基酸分析仪证实, 均获得满意的结果 (见图 4) 从而为 C-末端酰胺化氨基酸的生物活性肽类的跟踪及鉴定提供了一个灵敏可靠, 操作简便的方法。

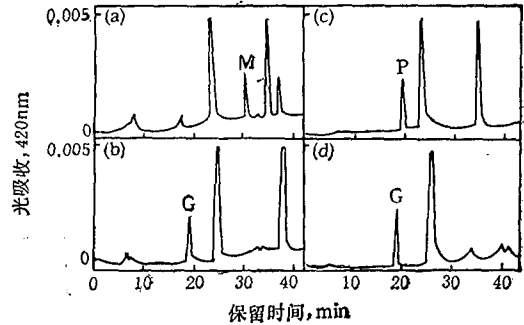


图 4 对四种 C-末端酰胺化多肽中 C-末端氨基酸残基的鉴定

(a) SP; (b) LHRH 端; (c) TRH; (d) PLG; RP-HPLC 分离条件同图 3

参 考 文 献

- 1 Mains R E *et al.* *Trends Neurosci*, 1983; 6: 229
- 2 Tatemoto K *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; 75: 4115
- 3 Bennett H P J *et al.* *J Chromatogr*, 1986; 359: 211
- 4 Schmidt W E *et al.* *Eur J Biochem*, 1987; 162: 467
- 5 Chang J-Y *et al.* *Biochem J*, 1976; 153: 607
- 6 Chang J-Y *et al.* *Biochem J*, 1977; 163: 517
- 7 Chang J-Y *et al.* *Anal Biochem*, 1980; 102: 384
- 8 Chang J-Y *et al.* *FEBS Lett*, 1978; 93: 205
- 9 Chang J-Y *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1979; 578: 188

[本文于 1989 年 1 月 30 日收到]