

多肽固相序列分析载体的合成及应用*

郭小丽 梁 逊** 何炳林

(南开大学高分子化学所、化学系,天津)

提 要

用合成的聚合物作载体,与模型 15 肽(纯品)偶联,使用 Edman 降解法进行多肽序列分析。比较了各种类型载体对肽的偶联效果。实验结果表明合成的大孔型四次乙基五胺类树脂载体已经达到国外同类产品水平。

关键词 聚合物载体,固相序列分析,Edman 降解,肽,大孔型树脂

有关多肽、蛋白质的固相序列分析,我们已做过论述^[1]。载体性能的研究对于固相序列分析方法的发展起重要作用,因为此法成功在很大程度上依赖于载体的性能以及肽链与载体的偶联程度。目前普遍使用的固相载体是凝胶型苯乙烯聚合物和无机型氨化玻璃载体,但它们在使用的中都存在一定局限性。大孔型有机载体用于多肽序列分析是由 Appella 等在 1977 年首先提出的^[2]。这种载体的孔结构可以根据需要进行调节,并且有较高的比表面积,易与反应试剂接触,对肽链的偶联程度高,并且能制备有较长间隔基因的衍生物,用于长肽链分析。目前这类载体用于序列分析的研究工作还很成熟。本文合成了一系列凝胶和大孔型聚合物载体,将已知模型肽分别与各类载体偶联,用异硫氰酸苯酯(PITC)作降解试剂进行序列分析。采用聚酰胺薄膜双相层析及高压液相色谱法鉴定苯基乙内酰硫脲-氨基酸(Phenylthiohydantion,简称 PTH 氨基酸),初步建立了一套实验室可行的多肽固相序列分析方法。

材 料 与 方 法

1. 固相序列分析载体的合成

凝胶型共聚体的制备按通常苯乙烯、二乙烯苯悬浮聚合方法进行。在搅拌速度方面作适

当调整,使珠体粒度适合固相载体要求范围。大孔型共聚物合成时,选用一定比例的液体石蜡和甲苯作混合致孔剂,与一定量单体混合均匀,采用同样方法悬浮聚合。为了进行苯乙烯、二乙烯苯共聚体的功能基反应,首先按照文献[3]方法将共聚体氯甲基化,得到不同氯含量的凝胶和大孔型氯甲基化聚苯乙烯,再依据文献[4]制备乙二胺型载体,文献[5]制备四次乙基五胺型,文献[7—9]制备聚乙二醇-乙二胺型载体。载体上自由氨基的含量分别采用水杨醛法^[6]和元素分析法测定。

2. PTH 氨基酸的制备及其聚酰胺薄层层析、高压液相色谱分离

(1) PTH 氨基酸标样的制备 使用标准氨基酸(BDH Chemicals Ltd. Poole England)作为试剂参阅文献[10, 11]制备。

(2) 聚酰胺薄层分析、鉴定 PTH 氨基酸 使用 10cm × 10cm 聚酰胺薄膜(浙江黄岩化工厂),鉴定方法见参考文献[12]。使用的荧光试剂改为 2, 5-二苯基噻唑。

(3) 高压液相色谱法鉴定 PTH 氨基酸 仪器:美国 Beckman 344 型高压液相色谱

* 国家自然科学基金资助的课题

** 联系人

谱仪, ODS-C₁₈ 层析柱。

层析溶剂: 溶剂 A 为甲醇 (A.R.), 经 G₆ 磨砂漏斗过滤后使用。溶剂 B 为 60% 醋酸缓冲液 (10mol/l pH4.6, 二次重蒸水配制) 和 40% 甲醇。

测定: 首先将 ODS 柱用 100% 溶剂 B 平衡, 分析时进样 20 μ l PTH 氨基酸的甲醇溶液 (经 0.22 μ m Millipore 滤纸过滤)。流动相采用 5% 溶剂 A 与 95% 溶剂 B, 或用梯度洗脱。

3. 模型肽与各类载体的偶联及 Edman 降解

(1) 多肽与载体的偶联

准确称取 10 μ mol 的多肽加入带反口塞的小反应瓶中, 加入 8.2mg DCC (二环己基二亚胺), 0.5ml DMF (二甲基甲酰胺, A.R 级经 KOH 处理后重蒸), 在 3—5 $^{\circ}$ C 冰水浴中搅拌反应 15 分钟, 加入预先在 DMF 中溶胀好的载体 0.8g, 37 $^{\circ}$ C 下搅拌反应 4.5 小时。反应完毕用带砂板的小漏斗过滤, 用 DMF 洗 4—5 遍, 甲醇洗三遍载体, 真空干燥、恒重。精确称取连有肽链的载体 50mg 左右, 进行全水解, 测偶联率。水解条件为 6mol/L HCl: 丙酸 = 1:1 (V/V), 110 $^{\circ}$ C, 反应 24 小时。

(2) 偶联于载体上的肽链与 PITC 反应及载体上剩余氨基的封闭

准确称偶联肽的载体 0.1g, 在带反口塞的小反应瓶中, 加入 0.5mol/l 的三乙胺/吡啶和水缓冲液 (60% V/V pH9.6) 3ml, PITC (重蒸) 1ml, 氮气保护下, 50 $^{\circ}$ C 搅拌反应 2 小时, 反应后过滤, 用 DMF 洗数遍, 用甲醇洗 2—3 遍, 真空干燥。上述步骤既完成了 PITC 与肽链上氨基的反应, 又用 PITC 封闭了载体上剩余氨基。

(3) 多肽的降解反应

依照文献[13]进行。降解下的 PTH 氨基酸通过聚酰胺薄层分析和高压液相色谱鉴定。重复上述 2, 3 两步反应即可鉴定一个氨基酸, 测出联在载体上的肽链的一级结构。

结果与讨论

1. 载体的合成及溶胀性能

合成了以苯乙烯、二乙炔苯为骨架的凝胶型 (简称 GSD, 交联度为 1% 或 2%, 粒度 180—400 目) 和大孔型 (简称 MSD, 交联度 8% 或 10%, 粒度 160—400 目, 孔径 500—800 Å 左右) 两种共聚体, 分别进行各种功能基化反应, 得到不同氨基含量 (以 NH₂ mmol/g 表示) 的载体。有乙二胺型 (GSD-AEA, MSD-AEA), 四次乙基五胺型 (GSD-TEPA, MSD-TEPA) 及聚乙二醇 (分子量 400) 乙二胺型

表 1 各类载体的溶胀度

Table 1 Extent of swelling of different resins

载体类型 Support	堆积体积 Dry volume (V ₀)	溶胀度 Extent of swelling ($\frac{V_1 - V_0}{V_0} \times 100\%$)			
		DMF	TFA	TEA	EtOH
MSD-AEA	3.50	81	80	59	—
MSD-TEPA	3.40	61	74	77	—
MSD-PEG-AEA	4.50	55	37	47	34
GSD-AEA	2.00	158	83	53	21
GSD-TEPA	2.30	100	140	100	129
GSD-PEG-AEA	3.00	51	23	117	—

V₁: Maximan swelling volume of 1g resin in solvent;

V₀: Dry volume of 1g resin;

DMF: Dimethylformamide; TFA: Trifluoroacetic acid; TEA: Triethylamine

(GSD-PEG-AEA, MSD-PEG-AEA)。分别测定了各类载体的溶胀性能,计算了溶胀度(见表1)。从表中可以看出大孔型载体在固相序列分析使用的溶剂和试剂中溶胀度变化小,在装柱使用时能克服凝胶型载体由于体积较大变化而引起的柱堵塞或沟流现象。

2. 各类载体对肽偶联率比较

本文使用的模型 15 肽一级结构为 NH₂-Ala-Glu-(Ala)₄-Lys-Ala-Ala-Arg-Ala-His-Met-Ala-AlaOH。表 2 列出了各类载体对肽的偶联效果。可以看出:(1)在功能基含量差不

多相当情况下,大孔型载体对肽的偶联率高于凝胶型的,其中 AEA 型高出约 10%,TEPA 型约高 20%。这是由于大孔型载体孔道结构的存在使得肽链更利于连接载体上的功能基,因而得到较高的偶联率。(2)无论大孔型还是凝胶型载体,其功能基与共聚体之间的极性间隔基可以提高对肽的偶联率(一般来说,在一定功能基含量范围内,TEPA 型对肽的偶联率高于 AEA 型的)。因为极性间隔基一方面可以改善肽链与载体之间的相溶性,并且也减小了共聚物骨架的空间位阻效应。(3)载体上的功

表 2 各类型载体偶联率比较
Table 2 Comparison of coupling yield of different support

载体类型 Support	功能基类型 type of function group	功能基含量 Content of NH ₂ group (mmol/g)	反应时间 Reaction time (h)	偶 联 率 Coupling yield (%)
GSD-1 ^{a)}	AEA	1.27	4.5	35.24
GSD-1	TEPA	1.30	4.5	41.68
GSD-1	TEPA	2.05	4.5	25.95
MSD-10 ^{b)}	AEA	0.95	4.5	46.68
MSD-10	TEPA	0.97	4.5	67.68
MSD-10	TEPA	1.61	4.5	42.87

a,b) Crosslinking degree of polymer support

能基含量(氨基含量)对偶联率也有影响,含量太高,偶联率反而降低。对于本文使用的 15 肽偶联结果表明,载体上功能基含量在 1.0NH₂ mmol/g 树脂比较合适。

使用 MSD-PEG-AEA 载体对模型肽进行偶联,由于功能基含量较低(NH₂ 0.4 mmol/g 载体),偶联率只达到 41.20%。如果适当提高功能基含量及使用较好的偶联试剂(如 EDC),

预期偶联率还会提高很多。

美国 Appella 和 Inman^[2] 等人使用大孔型三次乙基四胺(TEPA)载体对小肽链的偶联做了初步研究。表 3 对国内外两种同类型载体(相差一个次乙基胺)偶联结果做了对比。可以看出,我们合成的 MSD-TEPA 型载体具有较高的偶联率,对 15 肽的偶联高于大孔 TEPA 对 5 肽的偶联效果。在我们进行的偶联反应中,

表 3 国内外载体对肽偶联率比较
Table 3 Comparison of coupling yield for two supports

载体类型 Support	偶联剂 Condensating agent	催 化 剂 catalyst	偶 联 率 Coupling yield (%)	肽链长度 Length of peptide
MSD-TEPA ^{a)}	DCC	No	67.70%	Pentadecyl peptide
MSD-TETA ^{b)}	EDC	HOBT	65.00%	pentapeptide

a) Synthesized by our lab.
b) Synthesized by Inman
EDC: 1-ethyl-3-dimethylaminopropyl carbodiimide
HOBT: N-Hydroxybenzotriazole

若使用亲水性偶联试剂(如 EDC),或加入催化剂等,改善反应条件,则偶联效率会更高。

3. 模型肽的降解及 PTH-氨基酸鉴定

在比较各类型载体对肽偶联效果基础上,还对偶联于载体上的模型肽进行了 Edman 降解反应。降解下的 PTH-氨基酸除用薄层分析鉴定外,还在高压液相色谱仪上进行鉴定。图 1 为标准 PTH-氨基酸的高压液相谱图,图 2 为模型肽进行两次 Edman 降解后所生成的

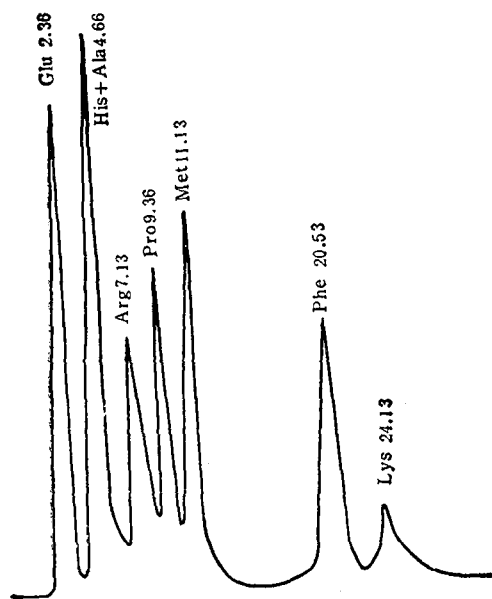


图 1 标准 PTH-氨基酸的高压液相谱图
Fig. 1 High-pressure liquid chromatography of the standard PTH amino acids

Chromatographic conditions:
Column: 4.6mm×15cm ODSC₁₈
Eluant: 5%A + 95%B Isocratic elution
UV: 262nm detection
Column pressure 2100—2400 psi
Flow rete: 1ml/min
Room temperature: 24°C

PTH-丙氨酸和 PTH-谷氨酸的谱图。使用的载体为 GSD-TEPA 和 MSD-TEPA。

从实验结果可以看出,在适宜的功能基含量情况下,大孔型载体比凝胶型载体对肽的偶联率高。从 Edman 降解的谱图看,这两类载

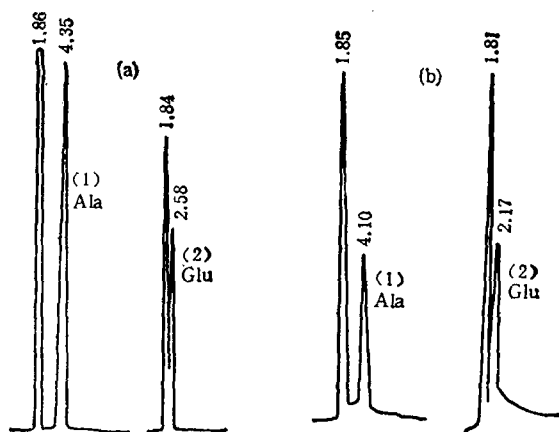


图 2 模型肽降解 PTH 氨基酸 HPLC 谱图
Fig. 2 HPLC of the PTH amino acids from two cycles of Edman degradation of model peptide

Fig. (a) GSD-TEPA support was used
(b) MSD-TEPA support was used
Chromatographic conditions as the same as Fig.1

体没有明显的差别,但由于大孔型载体在反复使用过程中体积变化小,适宜装柱使用,是一种理想的多肽序列分析载体。

参 考 文 献

- 1 梁逊,郭小丽. 生物化学与生物物理进展,1988;(2):105
- 2 Appella E, Inman J K *et al.* *Solid-phase methods in protein sequence analysis*, North-Holland: Amsterdam, 1977: 81
- 3 Gisin B F. *Helvetica Chimica Acta*, 1973; 56: 1476
- 4 Mross G A *et al.* *Advanced methods in protein sequence determination*, Spring-Verlag, 1977: 1
- 5 Fujita H *et al.* *Anal. Chem.*, 1980, 52: 869
- 6 邹永水,钱肖贞. 生物化学与生物物理进展,1978;(4): 12
- 7 Warshawsky A *et al.* *J Am Chem Soc*, 1979; 101: 4249
- 8 Yoshimura N *et al.* *Japan Kokai*, 1978; 78: 79833. *C. A.* 1978; 89: 198242j
- 9 Rajasekharan Pillai V N. *J Org Chem*, 1980; 45: 5364
- 10 袁玉荪等. 生物化学实验. 北京: 人民教育出版社, 1979: 68
- 11 Edman P. *Acta Chem Scand*, 1950; 4: 277
- 12 Summers M R *et al.* *Anal Biochem*, 1973; 53: 624
- 13 天花粉小组. 有机化学,1982;5: 384

[本文于1989年1月26日收到]

SYNTHESIS AND APPLICATION OF POLYMER SUPPORTS FOR SOLID-PHASE PEPTIDE SEQUENCE ANALYSIS

Guo Xiaoli Liang Xun He Binglin

(Institute of Polymer Chemistry and Department of Chemistry, Nankai University, Tianjin)

ABSTRACT

Several polymer supports for sequence analysis were derived from low crosslinked gelatinous and macroporous poly(styrene-divinylbenzene). Three types of functionalized supports have been compared with each other for coupling model peptide and subsequent Edman degradation.

The experimental results indicated that under suitable functional group content of about 1.0 mmol NH_2/g of resin, the attaching yields of peptide to macroporous resin were higher than that of the gel type of resin. Macroporous TEPA resin has been demonstrated to be qualified as a polymer support for solid-phase sequence analysis of peptide.

Key words polymer support, solid phase sequence analysis, Edman degradation, peptide, macroporous resin

经验交流

凝胶电泳槽的简易快速密封法

高志强

(河北省农林科学院粮油作物研究所)

关键词 凝胶电泳槽密封法, 聚甲基丙烯酸甲酯

为解决电泳槽的漏胶问题,我们在长期的电泳实践中,摸索出一种简单、快速、经济、实用的 PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)塑料密封法,经反复使用效果良好。现介绍如下:

1. PMMA 密封胶的配制及其使用方法

称 PMMA 粉末 1g (有机玻璃粉末亦可),置于具磨口塞的玻璃瓶中,然后加入 8ml 三氧甲烷,按紧瓶塞轻微摇动,完全溶解后即成为密封胶。

用 PMMA 胶密封板状槽时,先用文具铁夹将模板紧固,继之,用玻璃棒或毛笔尖蘸取胶液沿左右及底边连续涂抹,并力求快速均匀。涂好后倒立于板槽支架上至出现乳白色薄膜时即可灌胶,待电泳胶聚合后,

随即将 PMMA 膜剥下,收集起来留做重新配密封胶用。此胶也可用于管状槽的密封,方法是将玻管的一端插入胶液 3mm 左右,然后快速旋转拔出,垂直倒立风干即可。

2. PMMA 密封胶使用注意事项

(1) 此胶的溶剂是三氧甲烷,它易产生有害电光气,在其中加入其量约 1—2% 的无水乙醇则可消除;(2) 板状槽的密封条不能用有机玻璃质的,此胶易使之损坏;(3) 配制 PMMA 胶时切勿搅拌,否则易产生大量气泡,影响成膜性和密封效果。

[本文于 1989 年 1 月 27 日收到]