



УДК 577.112(34+5)

**СЕРИЙНЫЙ N-КОНЦЕВОЙ АНАЛИЗ ПЕПТИДОВ
НА ПИКОМОЛЬНОМ УРОВНЕ С ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИМ
ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ Dns-АМИНОКИСЛОТ**

Левина Н. Б., Мурадов Х. Г., Назимов И. В.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Разработана методика N-концевого анализа пептидов, содержащих до 30 аминокислотных остатков, с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и флуориметрического детектора. Полное время анализа (дансильрование, гидролиз, ВЭЖХ) составляет 2 ч, для гидрофобных последовательностей (Val-Val, Ile-Val, Ile-Leu) — 3 ч. Дансильрование в растворе карбоната лития и ацетонитрила облегчает проведение последующей ВЭЖХ, использование смеси HCl/TFA (2 : 1) при 166°С сокращает время гидролиза дансильных (Dns) производных пептидов до 50 мин (100 мин для гидрофобных последовательностей) при одновременном увеличении выхода Dns-аминокислот в среднем до 80%. ВЭЖХ Dns-аминокислот занимает 26 мин. Использование флуориметра позволяет проводить анализ на уровне 20 пмоль исходного пептида.

Определение N-концевых аминокислот в виде их дансильных (Dns) производных — один из основных способов анализа чистоты выделяемых полипептидов. Высокая чувствительность и относительная простота этого метода обеспечили его широкое применение в химии белка. Известны многочисленные варианты идентификации Dns-аминокислот, в том числе обращенно-фазовая ВЭЖХ, которая в настоящее время представляется наиболее перспективным методом разделения этих производных [1–6]. Однако до настоящего времени не удается реализовать в рутинном анализе преимущества метода ВЭЖХ из-за того, что классические условия дансильрования пептидов вносят большие осложнения в процесс последующего хроматографического разделения Dns-аминокислот. Поэтому в большинстве работ приводят результаты разделения стандартной смеси, а не рутинного анализа пикомольных количеств Dns-аминокислот, полученных в результате последовательно проведенных реакций дансильрования пептидов и гидролиза полученных Dns-производных пептидов.

Целью данного исследования являлась разработка метода скоростного количественного N-концевого анализа пептидов, содержащих до 30 аминокислотных остатков. Пептиды такой длины составляют основную массу материала, изучаемого при помощи секвенатора. Большое внимание уделялось N-концевому анализу трудногидролизуемых гидрофобных последовательностей, представляющих особую сложность при изучении первичной структуры мембранных белков.

Разделение Dns-аминокислот. Для получения воспроизводимых результатов при хроматографическом анализе сложной по составу смеси Dns-аминокислот потребовалась оптимизация условий разделения, т. е. выбор типа, молярности и pH буферного раствора.

Испытав различные буферные системы (цитрат, фосфат и трифторацетат натрия), мы обнаружили, что наиболее приемлемым является буфер на основе трифторацетата натрия, показавший ранее хорошую селективность при разделении пептидов [7, 8] и фенилтиогидантоиновых производных аминокислот [9, 10]. Для получения скоростного воспроизводимого разделения была изучена зависимость времени удерживания Dns-аминокислот от pH и молярности трифторацетата натрия и показано, что оптимальной является 25 мМ концентрации трифторацетата натрия при pH 7,6 [11].

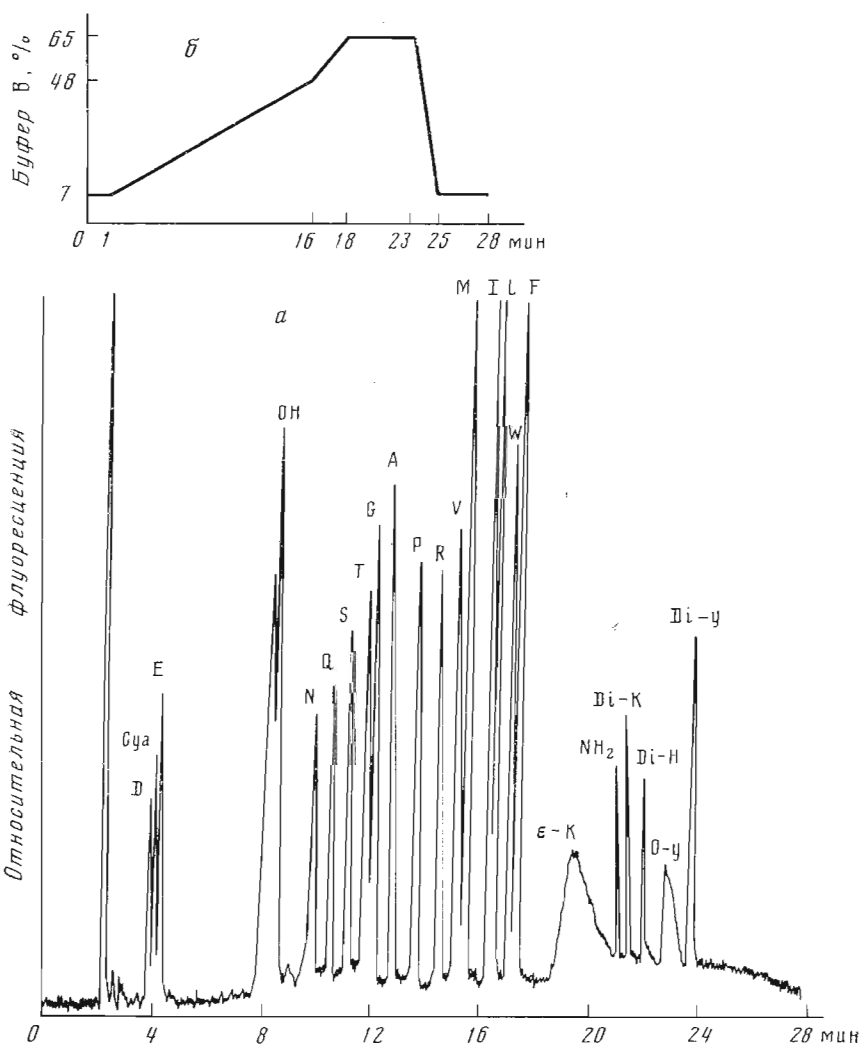


Рис. 1. Обращенно-фазовая ВЭЖХ Dns-аминокислот на колонке (4,6×250 мм) с сорбентом Ultrasphere ODS, 5 мкм. *а* — профиль элюции Dns-аминокислот; *б* — изменение концентрации буфера В. Анализируемая смесь содержит 20 пмоль моно-Dns- и 10 пмоль ди-Dns-производных. Скорость потока 1,2 мл/мин, температура колонки 39° С. Детекция флуориметрическая. Параметры флуориметрического детектора см. в «Экспер. части». Буфер А — 10% ацетонитрила и 90% трифторацетата натрия (25 мМ, pH 7,6); буфер В — 70% ацетонитрила и 30% трифторацетата натрия (25 мМ, pH 7,6), градиент В в А — от 7 до 65%. Приведены символы аминокислот для пиков соответствующих N^α-Dns-производных. ε-K — Lys(Dns), O-Y — Tyr(Dns), Di-K — Dns-Lys(Dns), Di-Y — Dns-Tyr(Dns), Cys — Dns-цистеиновая кислота, OH — Dns-сульфокислота, NH₂ — Dns-амид

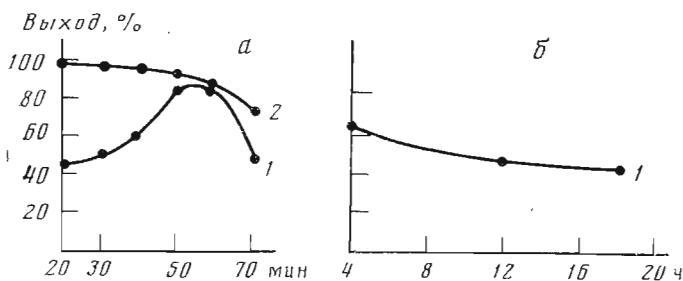


Рис. 2. Зависимость выхода Dns-Phe от времени гидролиза Dns-производного В-цепи инсулина (1) и стандарта Dns-Phe (2). Гидролиз производили смесью 5,7 М HCl и концентрированной TFA (2 : 1), 166° С (*а*) и 5,7 М HCl, 105° С (*б*)

При использовании данного буфера компоненты разделяемой смеси элюируются в виде острых симметричных пиков, что позволяет проводить скоростной высокочувствительный анализ Dns-аминокислот. На рис. 1 показано полное разделение стандартной смеси, содержащей 22 моно- и ди-Dns-производных аминокислот, а также Dns-OH и Dns-NH₂. В отличие от других производных Tyr(Dns) и Lys(Dns) дают размытые пики.

Чувствительность детектирования. УФ-фотометрия позволяет осуществлять воспроизводимый количественный анализ 60–100 пмоль Dns-аминокислот [11]. Для дальнейшего повышения чувствительности анализа нами проведено разделение смеси тех же Dns-аминокислот (20 пмоль каждого компонента) с флуориметрическим детектированием разделенных компонентов (рис. 1). При серийном анализе N-концевых Dns-аминокислот в указанных условиях уровень 20 пмоль является минимальным для получения воспроизводимых количественных результатов.

Дансилирование пептидов. В классических условиях дансилирования (натрий-бикарбонатный буфер, pH 9, соотношение ацетон — вода 2 : 1) полнота дансилирования обеспечивается использованием больших избытков дансилхлорида (Dns-Cl) вплоть до 1000-кратного [12]. Большой избыток Dns-Cl, а следовательно, и побочных продуктов его превращения (Dns-OH, Dns-NH₂) может помешать разделению Dns-производных аминокислот (рис. 1). Недавно было показано [13, 14], что при использовании литий-карбонатного буфера (pH 9,5) и отношении ацетонитрил — вода 1 : 2, т. е. обратном классическому, подавляются разложение Dns-аминокислот и образование Dns-NH₂, а избыток Dns-Cl не является обязательным условием полноты дансилирования. Изученное нами влияние избытка Dns-Cl (5–100-кратный, данные не приводятся) подтвердило независимость полноты дансилирования от избытка Dns-Cl, и в дальнейшем мы использовали 5–10-кратный мольный избыток в расчете на пептид. Мы обнаружили, что проведение реакции в микрообъеме (~5 мкл) гарантирует полноту дансилирования при минимальном образовании побочных продуктов реакции. Кроме того, дансилирование образца в постоянном объеме реакционной смеси, не зависящем от количества дансилируемого пептида, повышает воспроизводимость результатов дансилирования.

Гидролиз Dns-пептидов. Известные из литературы варианты гидролиза Dns-пептидов 5,7 М HCl требуют 4–18 ч [14, 15]. Такая продолжительность гидролиза, во-первых, приводит к значительному разрушению Dns-производных Gly, Pro, Met и, во-вторых, несовместима с требованиями скоростного анализа. Недавно для быстрого гидролиза пептидов была предложена смесь концентрированной соляной и безводной трифторуксусной кислот [16]. Для ускорения гидролиза Dns-пептидов мы использовали смесь 5,7 М HCl и безводной трифторуксусной кислот. Нами было найдено, что оптимальное время гидролиза Dns-пептидов (содержащих до 30 аминокислот) данной смесью составляет 50 мин при 166°С (рис. 2а). Снижение выхода образующегося Dns-производного N-концевой аминокислоты (Dns-Phe в случае В-цепи инсулина, кривая 1) отчасти связано с ее частичным разрушением (кривая 2).

При указанных оптимальных условиях гидролиза (166°С, 50 мин) определялась степень разрушения стандартов Dns-аминокислот. Обнаружено, что разрушение Dns-аминокислот в этих условиях незначительно (табл. 1).

Использование смеси соляной и трифторуксусной кислот позволяет не только сократить время гидролиза Dns-пептидов по сравнению с их гидролизом в 5,7 М HCl (с 4–12 ч до 50 мин), но и получить более высокий выход Dns-производного N-концевой аминокислоты (ср. рис. 2а, б). Это, в свою очередь, дает возможность проводить N-концевой анализ пептидов на пикомольном уровне (см. пример на рис. 3).

Мы изучили возможность применения указанных условий гидролиза для определения Dns-производных N-концевых аминокислот трудногидролизуемых последовательностей Val-Val, Ile-Val, Ile-Leu, часто встре-

Выход Dns-аминокислот после их гидролиза (HCl-TFA, 2:1; 166° С, 50 мин)

Производное	Выход, %	Производное	Выход, %	Производное	Выход, %
Dns-Asp	105	Dns-Val	91	Dns-Met	65
Dns-Gly	83	Dns-Ile	90	Dns-Lys(Dns)	75
Dns-Ser	75	Dns-Leu	85	Dns-Tyr(Dns)	80
Dns-Thr	80	Dns-Phe	85	Dns-His(Dns)	60
Dns-Ala	91	Dns-Pro	58	Dns-Arg	95

Таблица 2

Зависимость выхода Dns-производного N-концевой аминокислоты трудногидролизуемых Dns-дипептидов от условий гидролиза

Дипептид	Выход Dns-производного *, %			Относительное увеличение выхода (III/I)
	I	II	III	
	HCl, 105° С, 18 ч	HCl/TFA, 166° С		
		50 мин	100 мин	
Val-Val	60	70	87	1,45
Ile-Val	57	58	80	1,40
Ile-Leu	25	45	57	2,20

* Среднее арифметическое из трех определений.

чающихся в гидрофобных фрагментах белков, и показали, что оптимальное время гидролиза таких Dns-пептидов составляет 100 мин (рис. 4). При этом выход Dns-производного N-концевой аминокислоты в 1,5–2 раза выше, чем при использовании стандартных условий гидролиза (табл. 2).

Таким образом, использование скоростных методик дансирования пептидов, гидролиза Dns-пептидов и разделения Dns-аминокислот позволяет проводить быстрое количественное определение N-концевых аминокислот при анализе 20–100 пмоль исходного пептида, сокращает общее время анализа по сравнению с классическим вариантом до 2 ч (в случае фрагментов мембранных белков до 3 ч) при одновременном увеличении выхода Dns-производных N-концевых аминокислот в среднем до 80–85%.

Экспериментальная часть

В работе использовали Dns-Cl и ацетонитрил (Merck, ФРГ), Li₂CO₃ (Fluka, Швейцария), трифторуксусную кислоту (TFA) (Pierce, США), HCl х.ч.

Очистка реактивов и растворителей. Dns-Cl перекристаллизовывали из изоктана. Ацетонитрил для реакции дансирования перегоняли над Dns-Cl. 5,7 М HCl получали азеотропной перегонкой и хранили в темной стеклянной посуде не более 14 сут. Трифторуксусную кислоту перегоняли над трехокисью хрома. Для всех водных растворов использовали воду, очищенную с помощью системы Milli-Q (Millipore, США), содержащую не более 5 пмоль аминокислот в 100 мкл воды. Стеклянные ампулы промывали хромовой смесью, бидистиллированной водой и прокаливали при 400° С.

Приготовление растворов. Исходный раствор Dns-Cl в ацетонитриле (8,7 мМ) разбавляли так, чтобы в объеме 2 мкл содержался 5–10-кратный молярный избыток Dns-Cl по отношению к дансильруемому образцу. рН 40 мМ литий-карбонатного буфера доводили до 9,5 с помощью 2 М HCl.

Стандартные растворы Dns-аминокислот в метаноле (5 пмоль/мкл) хранили в темноте при –20° С. Из этих же растворов готовили стандартные смеси Dns-аминокислот.

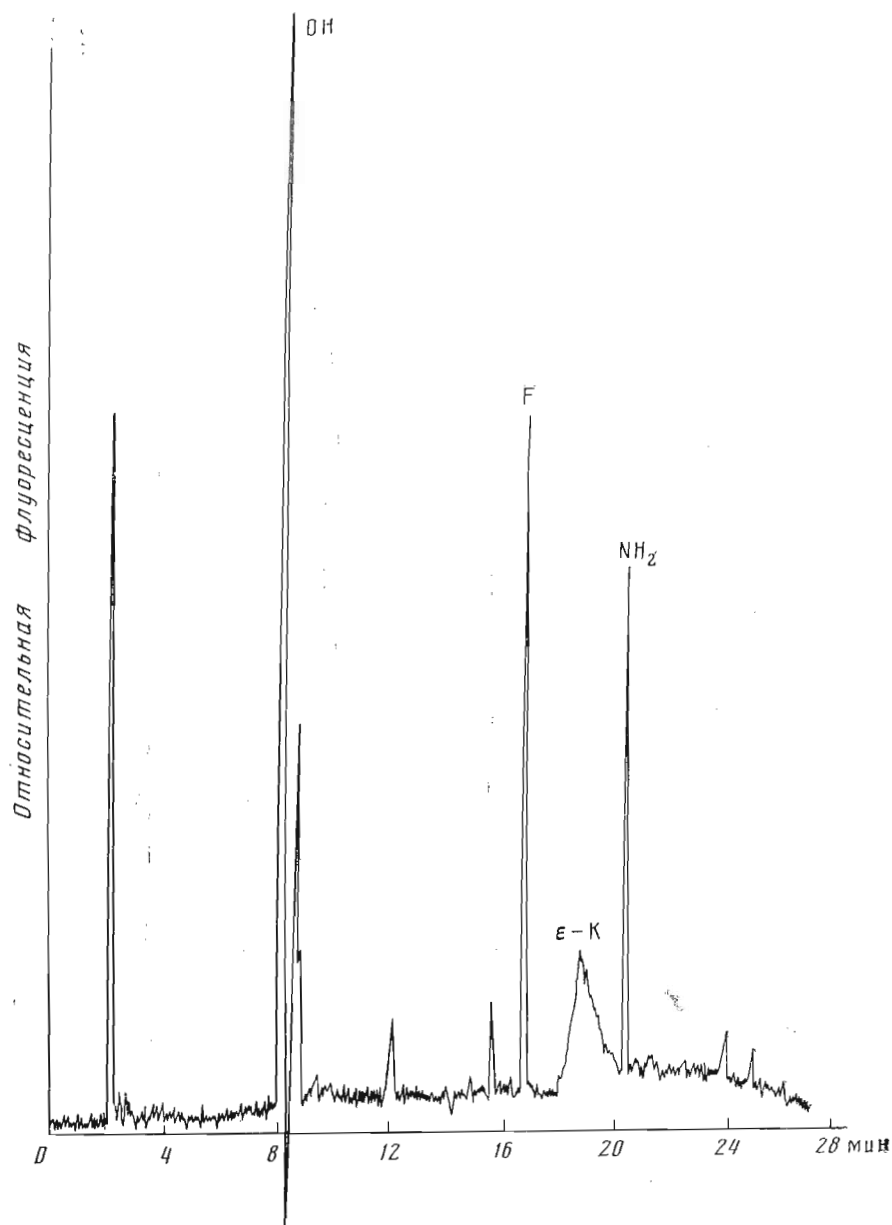


Рис. 3

Рис. 3. Определение N-концевой аминокислоты В-цепи инсулина (20 пмоль исходного пептида). Условия см. рис. 1

Рис. 4. Зависимость выхода Dns-производных N-концевых аминокислот трудногидролизуемых дипептидов Val-Val (1), Ile-Val (2), Ile-Leu (3) от времени гидролиза

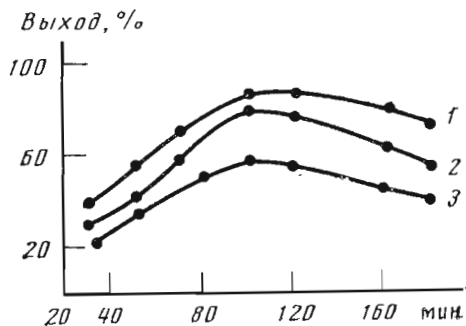


Рис. 4

Для получения буферов А и В для обращенно-фазовой ВЭЖХ готовили 25 мМ водный раствор ТФА. Кислоту и воду предварительно чистили как указано выше. 1 М NaOH доводили pH приготовленного раствора до 7,6, а затем смешивали с ацетонитрилом в соотношении натрий-трифторацетатный буфер — ацетонитрил 90:10 (буфер А) или 30:70 (буфер В).

Реакция дансирования. На дно ампулы (2×80 мм) помещали капилляром раствор 20 пмоль пептида в 5 мкл соответствующего растворителя, пептид высушивали в вакууме при 60°С, дважды упаривали с 5 мкл воды, добавляли 4 мкл карбоната лития (40 мМ, pH 9,5), 2 мкл Dns-Cl в ацетонитриле. Ампулу заворачивали в алюминиевую фольгу, смесь перемешивали на вибромешалке, центрифугировали (4000 об/мин, 1 мин, центрифуга ЦЛН-2, СССР) и помещали в темноту на 35 мин при 20°С. Полученный раствор высушивали в вакууме при 60°С. К сухому остатку добавляли 5 мкл смеси 5,7 М HCl и безводной ТФА (HCl—ТФА 2:1, по объему), замораживали раствор, вакуумировали ампулу, заполняли аргоном, вакуумировали, запаивали. Ампулу термостатировали при 166°С (50 мин), центрифугировали (4000 об/мин, 2 мин), вскрывали, высушивали в вакууме при 60°С, добавляли 4 мкл сухого метанола, упаривали в вакууме. Добавление-упаривание проводили дважды. Образец растворяли в метаноле и вводили в инжектор хроматографа.

Хроматография Dns-аминокислот. Для разделения Dns-аминокислот использовали хроматографическую систему фирмы Altek (модель 322 MP), колонку (4,6×250 мм) с сорбентом Ultrasphere ODS (5 мкм) и предколонку (4,6×40 мм) с тем же сорбентом. Температуру колонки (39°С) поддерживали с помощью термостата U-1 (ГДР). Детектором служил флуориметр (модель FS-970, Kratos, США) с объемом кюветы 5 мкл. Источник возбуждающего света — дейтериевая лампа. Возбуждение проводилось светом с длиной волны 330 нм, который выделялся дифракционным монохроматором и светофильтром Corning 7-54. Чтобы возбуждающий свет не попадал на детектор, между кюветой и фотоумножителем устанавливали светофильтр Corning-470.

5 мкл раствора, содержащего 20 пмоль Dns-аминокислоты, вводили в инжектор жидкостного хроматографа. Для полного ввода образца в петлю инжектора его вытесняли 3 мкл метанола. Разделение Dns-аминокислот проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила (рис. 1).

Для определения времени выхода пиков, площади пиков и обработки результатов анализа использовали микро-ЭВМ «Искра-226» (СССР).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bayer E., Grom E., Kaltenegger B., Uhmman R. Anal. Chem., 1976, v. 48, № 3, p. 1106–1109.
2. Wilkinson J. M. J. Chromatogr. Sci., 1978, v. 166, № 2, p. 547–552.
3. Weiner S., Tishbee A. J. Chromatogr., 1981, v. 213, № 1, p. 501–506.
4. Tapuchi Y., Miller N., Karger L. J. Chromatogr., 1981, v. 205, № 1, p. 325–337.
5. Kaneda N., Sato M., Yagi K. Anal. Biochem., 1982, v. 127, № 1, p. 49–57.
6. Gray B., Lu H. S., Gracy R. W. J. Chromatogr., 1983, v. 270, № 18, p. 253–266.
7. Mahoney W. C., Hermodson N. A. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 11, p. 199–203.
8. Benett H. P. J., Browne C. A., Solomon S. J. Liquid Chrom., 1980, v. 3, № 3, p. 1353–1365.
9. Yuan P.-M., Ponde H., Clark B. R., Shively J. E. Anal. Biochem., 1982, v. 120, № 2, p. 289–301.
10. Hawke D., Yuan P.-M., Shively J. E. Anal. Biochem., 1982, v. 120, № 2, p. 302–311.
11. Levina N. B., Nazimov I. V. J. Chromatogr., 1984, v. 286, p. 207–216.
12. Gross C., Labouesse B. Eur. J. Biochem., 1969, v. 7, № 4, p. 463–471.
13. Tapuchi Y., Schmidt D. E., Lindner W., Karger B. L. Anal. Biochem., 1981, v. 115, № 1, p. 123–129.
14. De Young C., Hughes G. J., Wieringer E. V., Wilson K. J. J. Chromatogr., 1982, v. 241, № 1, p. 345–359.
15. Gray W. R. In: Methods in Enzymology/Eds Colowick S. P., Kaplan N. O. N. Y. — L.: Acad. Press, 1967, v. 11, p. 139–151, 469–475.
16. Tsugita A., Scheffler J. J. Eur. J. Biochem., 1982, v. 124, № 3, p. 585–588.

Поступила в редакцию

15.VII.1985

После доработки

3.IX.1985

ROUTINE N-TERMINAL ANALYSIS OF PEPTIDES
AT PICOMOLE LEVEL WITH FLUORIMETRIC DETECTION
OF Dns-AMINO ACIDS

[LEVINA N. B., MURADOV Kh. G., NAZIMOV I. V.]

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A technique for the N-terminal analysis of peptides containing up to 30 amino acids involving reversed-phase HPLC and fluorimetric detectors has been elaborated. The analysis (dansylation, hydrolysis, HPLC) takes 2 hours, for hydrophobic sequences (Val-Val, Ile-Val, Ile-Leu) – 3 hours. Dansylation in the solution of lithium carbonate and acetonitrile facilitates the following HPLC, whereas the usage of HCl/TFA (2:1) mixture at 166°C reduces the hydrolysis time of Dns-derivatives to 50 min (100 min for hydrophobic sequences) and increases the yield of Dns-amino acids up to 80% on the average. HPLC of Dns-amino acids takes 26 min. Application of a fluorimeter makes possible the analysis at a 20 picomole level of the starting peptide.