



УДК 577.112.5

ПРОБЛЕМЫ ПРОВЕДЕНИЯ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ
С МИКРОКОЛИЧЕСТВАМИ ВЕЩЕСТВА НА ПРИМЕРЕ
ДАНСИЛИРОВАНИЯ ПЕПТИДОВ

Барам Г. И.*, Куснер Ю. С.*, Миргородская О. А.,
Назимов Н. В.***, Подтележников А. В.

*Институт аналитического приборостроения НТО Академии наук СССР,
Ленинград;*

** Лимнологический институт Сибирского отделения Академии наук СССР,
Иркутск;*

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

На примере дансирования брадикипина и дипептида глицина изучено влияние на степень модификации пептидов дансилхлоридом (Dns-Cl) при работе с микроколичествами пептида природы органического компонента буфера, уменьшения концентрации реагирующих веществ, соотношения Dns-Cl — пептид. Показано, что использование ацетонитрила вместо обычно применяемого ацетона существенно снижает скорость гидролиза дансилхлорида, что позволяет, во-первых, снизить избыток этого реагента, во-вторых, проводить дансирование при более высоких, чем обычно, значениях pH и, следовательно, увеличить степень дансирования пептида и сократить время реакции. Степень дансирования при отсутствии избытка Dns-Cl по отношению к пептиду зависит от концентрации пептида. Так, 90% степень модификации 10 пмоль пептида при соотношении Dns-Cl — пептид не более 10 : 1 достигается при концентрации пептида не ниже 10^{-3} М. Для дальнейшего снижения количества изучаемого материала при условии эффективного дансирования в отсутствие больших избытков Dns-Cl необходимо повышать исходную концентрацию пептида, а поэтому проводить реакцию в объемах менее 1 мкл.

Проблема эффективного и достоверного определения аминокислотной последовательности белков (пептидов) с применением минимального количества материала наиболее остра в аналитической химии белка. Для повышения чувствительности и достоверности анализов используются как новые реагенты, так и новые физические принципы детектирования продуктов специфического расщепления исходной молекулы. Наиболее успешно развиваются различные масс-спектрометрические методы, а также лазерное флуориметрическое детектирование.

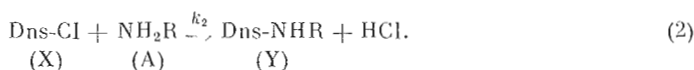
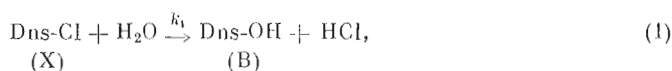
В настоящее время возможно достоверное определение последовательностей до 20 аминокислотных остатков с использованием 100—1000 пмоль исходного пептида. Такие результаты получены как традиционным путем последовательного отщепления N-концевых аминокислот с хроматографической [1, 2] или масс-спектрометрической [3] детекцией фенилтиогидантоинов аминокислот, так и путем анализа упорядоченных наборов продуктов неполного ферментативного или кислотного гидролиза пептидов [4, 5]. Развитие масс-спектрометрических методов непрерывного анализа состава жидких реакционных смесей [6, 7] обеспечивает принципиальную возможность определять аминокислотные последовательности и более длинных пептидов при тех же количествах вещества, используя неупорядоченные наборы продуктов ферментативных реакций.

Общепринятая схема определения последовательностей обычно состоит из двух стадий: а) проведение химической (ферментативной) реакции в растворе; б) анализ состава реакционной смеси чувствительными физическими методами. При уже достигнутой чувствительности, например, масс-спектрометрических методов возникает ситуация, когда дальнейшее сокращение количества исходного пептида ограничивается уже не чувстви-

тельностью детектора, а самой возможностью проведения реакций модификации пептидов контролируемым и воспроизводимым образом.

В настоящей работе на примере реакции дансильирования рассмотрены проблемы высокочувствительного количественного определения модифицированных аминокислот и пептидов. Дансильный радикал выбран потому, что он представляет собой удобную N-концевую метку для упорядочения набора продуктов не полного кислотного гидролиза при масс-спектрометрическом анализе смесей Dns *-пептидов [5, 8]. Успешное использование метода дансильирования в значительной степени определяется полнотой дансильирования пептидов, для обеспечения которой обычно применяются 5–200-кратные избытки дансильхлорида. Однако большой избыток этого реактива приводит к осложнениям, связанным с протеканием побочных конкурирующих реакций и с необходимостью удаления избытка реагента из реакционной смеси. Таким образом, возникает задача оптимального выбора концентраций реагентов и соотношения их для достижения максимально возможной степени модификации пептида.

В процессе дансильирования N-концевых аминокислот пептидов протекают две основные конкурирующие реакции:



Реакцией Dns-Cl с Dns-NHR можно пренебречь, так как, поскольку Dns-NHR — амид, а не амин, константа скорости ее существенно меньше k_2 . Эта схема типична и для других реакций модификации пептидов. В соответствии со схемой процесс описывается следующей системой дифференциальных уравнений:

$$dX/dt = -k_1X - k_2AX, \quad (3)$$

$$dA/dt = -k_2AX, \quad (4)$$

$$dB/dt = k_1X, \quad (5)$$

$$dY/dt = k_2AX, \quad (6)$$

где A, B, X, Y — концентрации реагентов и продуктов реакции, k_1 и k_2 — константы скоростей реакций. Начальные условия для системы:

$$A = A_0; \quad X = X_0; \quad Y = 0; \quad B = 0 \text{ при } t = 0. \quad (7)$$

Поскольку изменение концентрации амида по схеме обусловлено только образованием его дансильного производного, подставляя в уравнения (3) и (6) значение $A = A_0 - Y$, получаем систему уравнений

$$dX/dt = -k_1X - k_2(A_0 - Y)X, \quad (8)$$

$$dY/dt = k_2(A_0 - Y)X, \quad (9)$$

в которой легко разделить переменные:

$$dX = -\frac{[k_1 + k_2(A_0 - Y)]}{k_2(A_0 - Y)} dY. \quad (10)$$

Решая уравнение (10) с начальными условиями (7), получаем выражение, связывающее мгновенные значения концентраций X и Y в реакционной смеси:

$$X = \frac{k_1}{k_2} \ln \frac{A_0 - Y}{A_0} - Y + X_0. \quad (11)$$

Обозначив максимальную степень модификации амидокомпонента $Z = Y/A_0$ и принимая во внимание, что при $t \rightarrow \infty$ $X = 0$, получим искомое выражение, связывающее степень модификации с соотношением начальных концентраций реагентов при заданных константах скоростей реакций:

$$X_0/A_0 = Z - \frac{k_1}{k_2 A_0} \ln(1 - Z). \quad (12)$$

* 1-Диметиламинонафтил-5-сульфонил.

Как видно из уравнения (12), величина степени модификации зависит от начальной концентрации аминокомпонента A_0 , а при данном значении A_0 в зависимости от значений величин k_1 и k_2 можно выбрать необходимую максимальную концентрацию X_0 для достижения желаемого значения Z .

Продemonстрируем на конкретном примере дансилирования диглицил-глицина способы определения k_1 и k_2 по экспериментальным данным, выбор A_0 у соотношения X_0/A_0 для достижения максимального выхода Dns-аминокислоты согласно уравнению (12). Условия проведения реакции дансилирования — pH щелочного буфера, органические растворители, температура — выбирались согласно рекомендациям работ [9, 10].

Значение k_1 определим по кинетическим кривым спонтанного гидролиза Dns-Cl в смеси 0,05 М натрий-карбонатного буфера с ацетоном или ацетонитрилом (1 : 1), а также в смеси 0,04 М литий-карбонатного буфера и ацетонитрила (2 : 1) при различных значениях pH. В этом случае происходит лишь реакция (1) общей схемы дансилирования и убывает X описывается уравнением реакции первого порядка:

$$X = X_0 e^{-k_1 t}. \quad (13)$$

Для всех изученных нами буферных систем показано (рис. 1), что скорость гидролиза Dns-Cl увеличивается пропорционально увеличению концентрации гидроксила в реакционной среде. Следует отметить, что в изученном диапазоне pH значение k_1 для ацетонитрильных смесей ниже, чем в смесях с ацетоном, и не зависит от типа используемого буфера (рис. 1).

Для определения k_2 реакцию дансилирования осуществляли в присутствии 10-кратного избытка аминокомпонента по сравнению с Dns-Cl, т. е. в условиях, когда изменением концентрации аминогрупп в реакционной смеси можно пренебречь ($A = \text{const}$). В этом случае изменение концентрации X определяется уравнением

$$X = X_0 e^{-(k_1 + k_2 A_0) t} = X_0 e^{-k' t}, \quad (14)$$

где $k' = k_1 + k_2 A_0$.

Из уравнения (12) видно, что степень модификации пептида при заданных значениях X_0 и A_0 тем выше, чем меньше отношение k_1/k_2 . Из данных, приведенных на рис. 2 и в таблице, следует, что при pH ~9,5 (при этом значении обычно проводится реакция дансилирования пептида в смеси натрий-карбонатный буфер — ацетон, 1 : 1) отношение k_1/k_2 для водно-ацетонитрильных смесей меньше, чем для водно-ацетоновой, причем для первой оно остается постоянным в области pH 7,8—10,35. Это значит, что использование ацетонитрила, который сильнее, чем ацетон, подавляет гидролиз Dns-Cl (рис. 1), позволяет проводить реакцию дансилирования при меньших избытках дансилхлорида и при более высоких значениях pH, что существенно снижает ее время. На рис. 3 приведены рассчитанные

Значения k_2 для буферных смесей растворитель — карбонатный буфер *

Растворитель	pH буфера	k_2 , М ⁻¹ ·с ⁻¹	$-\lg \frac{k_1}{k_2}$
Ацетон	7,80	0,068	3,08
»	9,40	0,150	2,61
»	9,75	0,204	2,46
Ацетонитрил	7,80	0,071	3,25
»	8,90	0,095	2,93
»	9,40	0,200	3,05
»	9,75	0,381	3,08
»	7,80	0,021	3,18
»	9,60	0,481	3,28
»	10,35	0,631	3,30

* Для всех случаев 0,05 М Na₂CO₃ и отношение растворитель — буфер 1 : 1, для трех последних случаев 0,04 М LiCO₃ — ацетонитрил, 2 : 1.

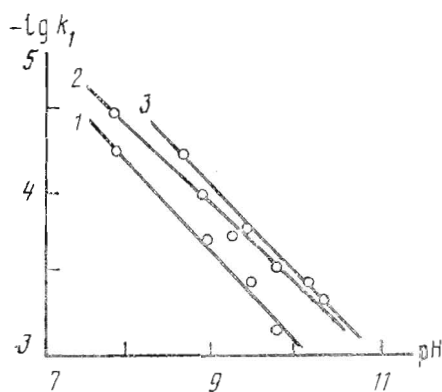


Рис. 1

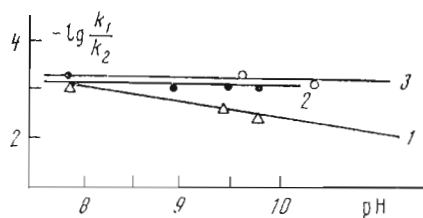


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость k_1 от pH для буферных смесей различного состава: 0,05 М карбонат натрия – ацетон, 1 : 1 (1); 0,05 М карбонат натрия – ацетонитрил, 1 : 1 (2); 0,04 М карбонат лития – ацетонитрил, 2 : 1 (3)

Рис. 2. Зависимость k_1/k_2 от pH. Состав буферов и нумерация кривых те же, что и на рис. 1

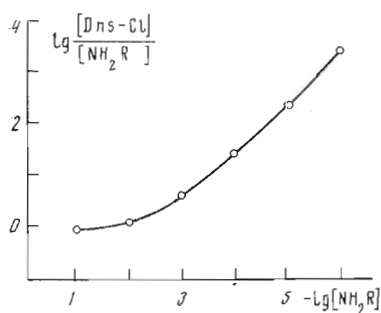


Рис. 3

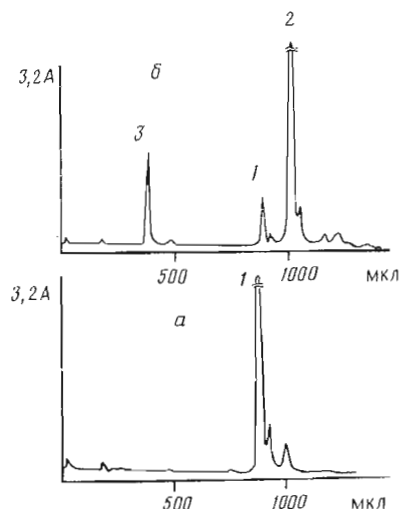


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость избытка Dns-Cl, необходимого для достижения 95% модификации пептида в 0,05 М карбонатно-ацетонитрильном буфере, от концентрации модифицируемого пептида. Зависимость рассчитана по формуле (12)

Рис. 4. ВЭЖХ-анализ реакционной смеси до (а) и после (б) проведения реакции дансильирования брадикинина. Концентрация брадикинина $1,3 \cdot 10^{-2}$ М, концентрация Dns-Cl $1,4 \cdot 10^{-2}$ М: 1 – брадикинин, 2 – Dns-брадикинин, 3 – Dns-OH

согласно уравнению (12) значения избытка Dns-Cl (по отношению к исходной концентрации пептида), необходимые для достижения степени модификации $Z=0,95$ в этих смесях, т. е. при $k_1/k_2=10^{-3}$. Как следует из расчетов, уменьшение концентрации A_0 от 10^{-2} до 10^{-6} М требует увеличения избытка реагента примерно в 3000 раз.

Соотношение (12) было проверено при дансильровании диглицилглицина и брадикинина (рис. 4) в водно-ацетонитрильных смесях. В качестве буфера при модификации диглицилглицина использовался 0,04 М карбонат лития, а для брадикинина – 0,05 М карбонат натрия в смеси с ацетоном (1 : 1). В обоих случаях концентрация Dns-Cl составляла $1,4 \cdot 10^{-2}$ М, а пептидов – $1,3 \cdot 10^{-2}$ М, т. е. $X_0/A_0=1,08$. Сопоставление исходной концентрации брадикинина (измеренной спектрофотометрическим методом с использованием значения молекулярного коэффициента поглощения $\epsilon_M^{220} = 11\,400$) с количеством брадикинина, оставшегося немодифицированным

(рис. 4), показывает, что степень модификации составляет 0,92. Это хорошо согласуется с расчетным значением $Z=0,95$. При модификации диглицилглицина было получено $Z=0,86$ при тех же соотношениях аминокомпонента и Dns-Cl.

Таким образом, экспериментальные результаты показывают, что по уравнению (12) для данной исходной концентрации пептида можно достаточно точно выбрать концентрацию Dns-Cl и по уравнению (14) оценить время реакции модификации.

Очевидно, что система уравнений (8)–(9) описывает не только рассмотренную в этой работе реакцию дансирования, но и другие реакции модификации исходных веществ при наличии конкурирующей реакции модифицирующего агента со средой. Как следует из вида окончательной формулы (12) и рис. 3, для любого заранее заданного отношения констант скоростей основной и конкурирующей реакций k_1/k_2 степень модификации исходных компонентов может оказаться близкой к единице только при высокой начальной концентрации X_0 . Это требование обуславливает необходимость проведения реакций рассмотренного типа в очень малых объемах, поскольку многие изучаемые белки и пептиды труднодоступны. Например, для отношения скоростей $k_1/k_2=10^{-3}$ и при 10-кратном избытке Dns-Cl степень модификации пептида $Z=0,90$ может быть достигнута только при начальной концентрации пептида не ниже 10^{-3} М. Это означает, что если, например, количество исходного пептида составляет 100 пмоль (а этого вполне достаточно для исследований современными чувствительными масс-спектрометрическими и флуориметрическими детекторами [1, 3–7, 11]), то для достижения указанной степени модификации объем, в котором проводится реакция, не должен превышать 0,1 мкл. Ясно, что это серьезное ограничение на условия проведения химических реакций модификации микроколичеств реагента, вызывающее настоятельную необходимость разработки соответствующих экспериментальных методов и приемов работы с микрообъемами.

Экспериментальная часть

В работе использованы брадикинин, дансилхлорид (Serva, ФРГ), диглицилглицин (Reanal, ВНР), карбонат лития (марка х.ч., СССР), трифторуксусная кислота (Pierce, США), ацетонитрил (Merck, ФРГ), ацетон (Chemapol, ЧССР), карбонат натрия (марка х.ч., СССР).

Концентрацию дансилхлорида в ходе реакции гидролиза и при взаимодействии с пептидами регистрировали по изменению поглощения при $\lambda=420$ нм на спектрофотометре СФ-26. Степень модификации пептидов определяли методом ВЭЖХ на колонке (2×62 мм), заполненной сорбентом Nucleosil C₁₈ (Machery-Nagel, ФРГ) с размером зерна 5 мкм на хроматографе «Милихром». Реакционную смесь объемом 2 мкл перед анализом разбавляли в 10 раз 0,1% трифторуксусной кислотой. Объем пробы, наносимой на колонку, составлял 3–5 мкл. В качестве элюента использовали градиент ацетонитрила (от 0 до 100%) в 0,1% растворе трифторуксусной кислоты. Скорость потока 100 мкл/мин. Детекцию элюата проводили на длине волны $\lambda=220$ нм. Образующиеся Dns-пептиды и дансил-кислоты (Dns-OH) количественно определяли по молярным коэффициентам поглощения Dns-OH и Dns-Cl (соответственно $2,4\cdot 10^4$ и $6,8\cdot 10^4$ М⁻¹·см⁻¹), установленным методом наименьших квадратов на ЭВМ «Искра-1204». Контроль продуктов реакции осуществляли на масс-спектрометре MX 3303 (Ленинград) с непосредственным вводом жидкой фазы. Метод анализа описан в работе [5], там же приведены соответствующие масс-спектры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hood L., Kent S., Smith L., Aebersold R., Terlow I., Karl-Lewis I., Lay E., Kaiser R., Konkannon P., Hunkapiller D., Sanders J., Hines W., Dodd C., Hughes P. // Abstr. of the VI Intern. Conference on protein sequence analysis. Seattle, USA, 1986.
2. Hunkapiller M. W. // Abstr. of the VI Intern. Conference on protein sequence analysis. Seattle, USA, 1986.

3. Shimonishi J., Hong J.-M., Kitagishi T., Matsuo T., Matsuda H., Katakuse I. // *Eur. J. Biochem.* 1980. V. 112. № 2. P. 251-264.
4. Hong J.-M., Takao T., Aimoto S., Shimonishi J. // *Biomed. Mass spectrometry.* 1983. № 8. P. 450-457.
5. Александров М. Л., Барам Г. И., Галль Л. Н., Грачев М. А., Кнорре В. Д., Краснов Н. В., Куснер Ю. С., Миргородская О. А., Николаев В. И., Шкуров В. А. // *Биоорг. химия.* 1985. Т. 11. № 5. С. 705-708.
6. Dixon D. J. // *High performance liquid chromatography in protein and peptide chemistry*/Eds Lottspeich F., Henschen P., Hupe K.-P. B.-N. Y., 1981. P. 125-142.
7. Александров М. Л., Кондратьев В. М., Куснер Ю. С., Миргородская О. А., Подтележников А. В., Фридляндский Г. В. // *Биоорг. химия.* 1988. Т. 14. № 6. С. 853-857.
8. Nazimov I. V., Snezhkova L., Reshetova O., Miroshnikov A. // *Chemistry of peptides and proteins*/Eds Voelter W., Wunsch E., Ovchinnikov Y., Ivanov V. B.-N. Y., 1982. V. 1. P. 127-136.
9. Levina N. B., Nazimov I. V. // *J. Chromatogr.* 1984. V. 286. № 4. P. 207-210.
10. Арутюнян А. А., Спивак В. А., Варшавский Я. Н. // *Бюхимия.* 1974. Т. 39. Вып. 6. С. 1191-1199.
11. Salnikov J. // *Abstr. of the VI Intern. Conference on protein sequence analysis.* Seattle, USA, 1986.

Поступила в редакцию
19.X.1988

MICROSCALE CHEMICAL MODIFICATION REACTIONS EXAMPLIFIED BY DANSYLATION OF PEPTIDES

BARAM G. I.*, KUSNER Yu. S.*, MIRGORODSKAYA O. A., NAZIMOV I. V.**,
PODTELEZHNIKOV A. V.

*Institute of Analytical Device Construction, Academy of Sciences
of the USSR, Leningrad;*

** Limnological Institute, Siberian Division, Academy of Sciences
of the USSR, Irkutsk;*

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

Dansyl chloride (Dns-Cl) modification of peptides on microscale was studied on glycyl-glycyl-glycine and bradikinin. The level of dansylation is affected by the nature of the buffer organic compound, concentration of reagents, DnsCl-peptide ratio. Use of acetonitrile instead of generally employed acetone substantially reduces the rate of the dansyl chloride hydrolysis, thus allowing to decrease the reagent excess and to carry out dansylation at higher than usual pH values. As a result, the dansylation extent increases and the reaction time is shortened. Without significant excess of DnsCl, the reaction yield depends on the peptide concentration. Thus 90% modification of 100 pmole of the sample (DnsCl-peptide ration not more than 10:1) can be achieved at the peptide concentration over 10^{-3} M. Further decrease in the consumption of the material under study (upon effective dansylation with moderate excess of DnsCl) requires increase in the peptide concentration, i. e. the reaction should proceed in minute volumes ($<1 \mu\text{l}$).