БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 5 * № 4 * 1979

УДК 547.96.02+543.544

ПУТИ УВЕЛИЧЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ РУЧНОГО ВАРИАНТА МЕТОДА ЭДМАНА В ДАНСИЛ-МОДИФИКАЦИИ

Ганкина Э. С., Королева Е. М., Беленький Б. Г.

Институт высокомолекулярных соединений Академии наук СССР, Ленинград

С целью повышения чувствительности определения N-концевой последовательности аминокислот в пептидах методом Эдмана с идентификацией N-концевой аминокислоты укороченного пептида в виде дансильного производного (ручной вариант метода Эдмана, дансил-модификация) были исследованы и усовершенствованы основные этапы этой методики. Тщательная очистка растворителей, силанизирование стенок реакционного сосуда, уменьшение объема реагентов при проведении реакции, двукратное дансилирование, использование высокочувствительного метода фотографической регистрации тонкослойных хроматограмм на специальный фотоматериал позволили в 5–10 раз повысить чувствительность ручного варианта метода Эдмана и определить последовательность 10 аминокислот N-конца А-цепи инсулина с использованием $2 \cdot 10^{-9}$ моль пептида.

Несмотря на большой прогресс в развитии автоматического метода деградации белков и пептидов по Эдману, ручной вариант метода Эдмана продолжает играть существенную роль при определении N-концевой последовательности аминокислот на микроуровне [1]. Использование микрометодик ручного Эдмана описано в работах [2–5], где последовательность аминокислот определяется по N-концевой аминокислоте укороченного пептида. Для этого используется дансильная методика с идентификацией Dns-аминокислот методом ТСХ на полиамидных пленках.

В описанных методиках чувствительность идентификации Dns-аминокислот составляет 10^{-11} моль. В работе [2] указывается на возможность анализа 4–6 аминокислот в 10^{-9} моль пептида, однако неясно, каким образом при отборе аликвоты, содержащей 10^{-11} моль пептида, удается определить его N-концевую аминокислоту при чувствительности ТСХ-идентификации также 10^{-11} моль. Наиболее подробно микрометодика ручного Эдмана описана в работе [5], где она используется для анализа $(0{,}5–1) \cdot 10^{-8}$ моль коротких пептидов. Особенность этой методики заключается в уменьшении объемов реагентов. Для идентификации Dns-аминокислот используется ТСХ на полиамидных пленках, чувствительность которой 10^{-11} моль. Если принять во внимание, что наивысшая чувствительность детектирования Dns-аминокислот с помощью микротонкослойной хроматографии, достигаемая в работах [4, 6, 8], составляет 10^{-12}, то видно наличие определенных резервов для повышения чувствительности определения N-концевой последовательности аминокислот в пептидах по приведенным в этих работах методикам.

Снижение общей чувствительности «ручного дансил-Эдмана» связано с присутствием в некоторых реактивах (вода, ацетон, этилацетат) микроколичеств аминокислот: глицина, серина, аланина [1], которые создают

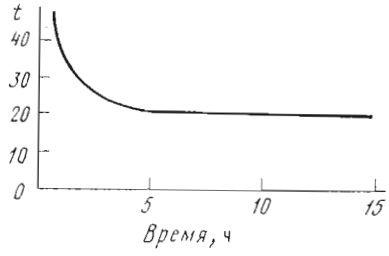

Рис. 1. Зависимость температуры реакции дансилирования от времени, обеспечивающая 75% выход Dns-А-цепи инсулина после первого шага деградации

фон, мешающий хроматографической идентификации аминокислотных остатков в виде их Dns-производных. Поэтому исключительно важное значение приобретает тщательная очистка всех используемых в работе реактивов и растворителей. Кроме этого имеются некоторые резервы повышения выхода Dns-аминокислот за счет оптимизации условий дансилирования пептидов и их гидролиза.

В настоящей работе разработана методика ультрачувствительного варианта эдмановской деградации и рассматривается возможность ее усовершенствования с целью дальнейшего повышения чувствительности.

Работа по определению последовательности аминокислот выполнялась на установке, которая обеспечивала вакуумирование пробирок и заполнение их аргоном. Все реакции проводили в круглодонных силанизированных пробирках с внутренним диаметром 1,5—2 мм и длиной 100 мм. Во избежание десульфуризации фенилизотиоцианата и фенилтиокарбамилпептида реакции присоединения, циклизации и отщепления проводили в атмосфере аргона.

Для исследования влияния фоновых аминокислот на чувствительность идентификации N-концевой аминокислоты были поставлены контрольные опыты, где все операции эдмановской деградации проводились без добавления пептида с использованием тщательно очищенных растворителей и реагентов (см. «Экспериментальную часть»). Эти опыты показали, что после первого шага деградации в 30 мкл * водного раствора укороченного пептида будет содержаться $15 \cdot 10^{-12}$ моль примеси свободного глицина, т. е. $0{,}5 \cdot 10^{-6}$ моль/л. От шага к шагу это количество увеличивается приблизительно в 1,2 раза. Таким образом, после 9-го шага в 30 мкл водного раствора укороченного пептида должно содержаться уже $\sim 6{,}5 \cdot 10^{-11}$ моль примеси глицина, который будет проявляться в виде фонового Dns-глицина при хроматографическом анализе и мешать определению N-концевой аминокислоты на этом шаге деградации.

Помимо тщательной очистки реактивов уменьшения количества фоновых аминокислот можно достичь снижением количества используемых в экспериментах реагентов и растворителей. В настоящей работе это достигалось уменьшением диаметра реакционного сосуда до 1,5 мм. Для снижения потерь пептида за счет адсорбции проводилось силанизирование внутренней поверхности сосуда. Все перечисленные меры позволили уменьшить величину отбираемой аликвоты укороченного пептида до 0,1—0,2 нмоль и увеличить чувствительность анализа.

Одна из возможностей повышения чувствительности ручного Эдмана заключается в увеличении выхода Dns-пептида при его дансилировании, в связи с чем в данной работе было предпринято исследование условий проведения этой реакции.

На рис. 1 приведена зависимость времени проведения реакции дансилирования от температуры, соответствующая 75% выхода Dns-пептида **.

---

* Объем реакционной смеси (водный слой), который берется для идентификации N-концевой аминокислоты оставшегося пептида после 9-го шага деградации.

** Полученные Dns-пептиды затем гидролизовали стандартным образом и определяли выход Dns-аминокислоты методом количественной ТСХ по размерам хроматографических пятен [7] с точностью 6—8%.

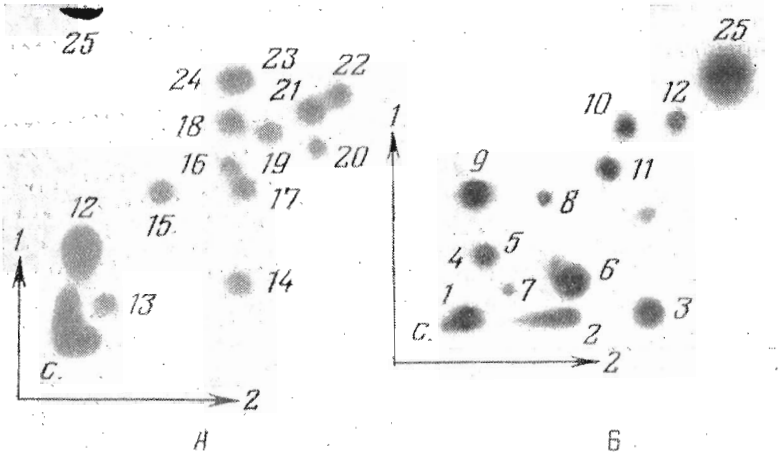

Рис. 2. Двумерная восходящая хроматография стандартной смеси Dns-аминокислот в условиях А и Б (см. «Экспер. часть»). *1* – Cys, *2* – Asp, *3* – Glu, *4* – Arg, *5* – ε-Lys, *6* – di-Cys, *7* – O-Tyr, *8* – Asn, *9* – His, *10* – Gln, *11* – Ser, *12* – Tre, *13* – OH-Pro, *14* – Pro, *15* – Gly, *16* – di-Tyr, *17* – Trp, *18* – Ala, *19* – Phe, *20* – Leu, *21* – Val, *22* – Ile, *23* – di-Lys, *24* – di-Orn, *25* – Dns-OH

В области, лежащей выше кривой, выход Dns-пептида составляет 75—85%. Поэтому при дансилировании пептида можно использовать любые условия, где температура и время реакции соответствуют точкам, лежащим выше кривой. В литературе приводятся разные условия дансилирования пептидов: при 37° в течение 1 ч [2], при 20° в течение 12 ч [4], при 45° в течение 30 мин [5]. Как видно из рис. 1, все эти режимы соответствуют максимальному выходу Dns-пептида.

В настоящей работе также изучалось влияние многократного дансилирования на выход Dns-пептида. Было установлено, что двукратное дансилирование повышает выход Dns-пептида в 1,4 раза, трехкратное — еще в 1,15 раза. Поскольку третье дансилирование повышает выход Dns-пептида лишь в малой степени, но существенно удлиняет время опыта, от него можно отказаться. Следует отметить, что важное значение имеет также правильный выбор времени гидролиза конкретного Dns-пептида [1].

Для увеличения чувствительности хроматографического детектирования Dns-аминокислот применялась микротонкослойная хроматография на тщательно фракционированном силикагеле с размером частиц 2—5 мкм, при этом использовались наиболее эффективные хроматографические системы [6]. Визуальное наблюдение таких хроматограмм позволяет обнаружить 10^{-11} моль Dns-аминокислоты, а при нанесении на пластинку пробы в большом объеме растворителя (~50 мкл), необходимом для полного растворения высушенного гидролизата, —$2 \cdot 10^{-11}$ моль. Применение фотографической регистрации тонкослойных хроматограмм позволяет повысить чувствительность до 10^{-12} моль, и, кроме того, варьируя экспозицию, т. е. получая несколько контактных отпечатков с различной интенсивностью, можно четче идентифицировать основную Dns-аминокислоту в присутствии фоновых Dns-аминокислот. Поэтому полученные хроматограммы фотографировали контактным способом с использованием специального фотоматериала для контактной люминесцентной фотографии [8]. На рис. 2 приведена хроматограмма стандартной смеси Dns-аминокислот, содержащая 10^{-12} моль каждой аминокислоты, полученная методом контактной люминесцентной фотографии.

Разработанная в настоящей работе методика ультрачувствительного варианта деградации по Эдману была использована для определения

N-концевой последовательности А-цепи инсулина и позволила определить 10 N-концевых аминокислот, исходя из $2 \cdot 10^{-9}$ моль пептида. При этом граница использования методики определялась накоплением примеси фоновых аминокислот, вносимых растворителями и реагентами. Действительно, как уже указывалось, при используемых в настоящей работе методах очистки после 9-го шага деградации в 30 мкл водного раствора содержится $6{,}5 \cdot 10^{-11}$ моль глицина. Это количество, разделенное на 3 аликвоты, вносит на каждую хроматографическую пластинку $2 \cdot 10^{-11}$ моль фонового Dns-глицина, что ограничивает чувствительность идентификации N-концевой аминокислоты именно этой величиной. Очевидно, что 10-кратное уменьшение содержания фоновых аминокислот в растворителях и реагентах или 10-кратное уменьшение количества растворителей и реагентов в реакции Эдмана, т. е. переход на «ультрамикро-Эдман», позволит приблизить чувствительность ручного варианта метода Эдмана к пределу, определяемому в настоящее время чувствительностью идентификации Dns-аминокислот с помощью микротонкослойной хроматографии в комбинации с контактной люминесцентной фотографией,— 10^{-12} моль.

Экспериментальная часть

1. Очистка растворителей. При очистке реактивов особое внимание уделяли их освобождению от солей, воды, свободных аминокислот и альдегидов. Присутствие альдегидов контролировали с помощью реакции Толленса. Степень очистки реактивов от свободных аминокислот контролировали с помощью холостого опыта (без пептида) с последующим дансилированием и определением присутствия Dns-аминокислот с помощью микротонкослойной хроматографии.

Пиридин выдерживали 16 ч над твердым KOH, кипятили над ним 8 ч и отгоняли. Отогнанный пиридин кипятили с нингидрином и снова отгоняли. Полученный пиридин перегоняли над KOH с аргоном под вакуумом и отбирали среднюю фракцию. Хранили в темноте при 0—5° до 2 мес.

Фенилизотиоцианат перегоняли под вакуумом при остаточном давлении 1 мм рт. ст., отбирали фракцию, кипящую при 55°. Хранили при 0—5° до 2 недель. *Трифторуксусную кислоту* кипятили над кристаллическим хромовым ангидридом 1—2 ч и перегоняли над ним, отбирая среднюю фракцию, кипящую при 72—73°. Хранили до 2 мес. *Этилацетат* встряхивали с 5% раствором Na_2CO_3, затем с предварительно охлажденным концентрированным раствором $CaCl_2$ ($^1/_5$ от объема этилацетата), дважды промывали дистиллированной водой. Встряхивали 2 ч на механической мешалке с кристаллическим $KMnO_4$ (1 г/л), промывали дистиллированной водой, сушили над прокаленным $MgSO_4$ в течение ночи. Перегоняли, отбирая фракцию, кипящую при 77°. Хранили до 2 мес. *Соляную кислоту* наливали в эксикатор (0,5 л 12 н. HCl, ос.ч.), на дно эксикатора ставили низкий стакан со 100 мл деионизованной воды и оставляли на 7—10 сут. Полученный раствор перегоняли со $SnCl_2$, трижды перекристаллизованным из этанола. При перегонке отбирали азеотропную фракцию при 109°. В результате получали 6,1 н. HCl. Хранили 1 мес. *Воду* перегоняли, деионизовали, пропуская через колонку (25×1000 мм) со смолой $AG^R501 \times 8(D)$ фирмы Bio-Rad со скоростью 100 мл/мин, кипятили 2 ч с $KMnO_4$ (2 г/л), отгоняли, отогнанную воду кипятили 2 ч с нингидрином, снова отгоняли. Полученную воду перегоняли под вакуумом, отбирая среднюю фракцию. Хранили 2 мес. *Ацетон* в течение суток выдерживали над прокаленным $CaCl_2$, 2 ч кипятили с $KMnO_4$ (2 г/л), отгоняли. Полученный ацетон перегоняли, отбирая среднюю фракцию.

2. Силанизирование реакционных сосудов. Тщательно промытые хромовой смесью, азотной кислотой и ополоснутые водой реакционные сосуды и ампулы выдерживали 20 мин в 10% растворе диметилдихлорсилана в бензоле, затем раствор сливали, силанизирующий раствор испаряли

в вытяжном шкафу и сосуды прогревали 2 ч при 150°. Силанизирование повторяли дважды.

3. «Ручной вариант метода Эдмана». Для определения N-концевой последовательности использовали 2 нмоль пептида. Реакцию проводили в силанизированных круглодонных пробирках 1,5×100 мм с наружными шлифами.

а) Реакция карбамилирования. К помещенному в пробирку сухому пептиду добавляли 30 мкл 50% водного пиридина и 30 мкл 5% фенилизотиоцианата в пиридине. Пробирку встряхивали для гомогенизации раствора, присоединяли к вакуумной системе и откачивали до давления $5 \cdot 10^{-3}$ мм рт.ст. Систему заполняли аргоном. Вакуумирование и заполнение аргоном производили 2—3 раза. Реакцию проводили в течение 30 мин при 60°. Затем пробирку охлаждали до 20° и высушивали в вакууме при 20° досуха, а затем еще 3—5 мин при 60°.

б) Реакция циклизации и отщепления. Трифторуксусная кислота отличается большой летучестью, которая приводит к ее значительным потерям при вакуумировании реакционного сосуда. Поэтому в реакции использовался большой избыток — 200 мкл кислоты (в работе [5] использовалось 100 мкл). На стадии циклизации в пробирку добавляли 200 мкл трифторуксусной кислоты, вакуумировали и заполняли аргоном (2 раза), выдерживали 3—5 мин при 60°. Если предполагалось, что N-концевая аминокислота — глутамин, то циклизацию проводили при 20° в течение 25 мин. Содержимое пробирки высушивали при 20° досуха, затем при 60° еще 2—3 мин.

в) Выделение укороченного пептида. В пробирку наливали 30 мкл воды и 15 мкл этилацетата *, встряхивали на вибраторе 2—3 мин, центрифугировали 5 мин при 6000 об/мин, этилацетатный слой отбирали капиллярной пипеткой. Экстракцию повторяли 2 раза. Из оставшегося водного раствора отбирали 0,1—0,3 нмоль пептида в силанизированную стеклянную ампулу, высушивали в вакууме и дансилировали. Оставшийся водный раствор укороченного пептида высушивали и подвергали дальнейшей деградации.

Если N-концевая аминокислота — глутамин, глутаминовая кислота, аспарагин или аспарагиновая кислота, то необходимо использовать прямой вариант метода Эдмана с последующей идентификацией Pth-производных аминокислот. В этом случае реакцию карбамилирования проводили 1 ч с 30 мкл 50% водного пиридина и 30 мкл 0,05% фенилизотиоцианата в пиридине при 40°. Непрореагировавший фенилизотиоцианат и пиридин дважды экстрагировали 70 мкл бензола. Водный слой высушивали 30—40 мин в вакууме при 45°. Циклизацию проводили в 1 н. HCl при 80° в течение 10 мин, реакционную смесь высушивали 20 мин в вакууме при 45°. Высушенный продукт растворяли в 30 мкл воды, отщепившиеся фенилтиогидантоины аминокислот экстрагировали 2 раза 60 мкл этилацетата. Экстракт центрифугировали, этилацетатный слой быстро отбирали капиллярной пипеткой и вносили в силанизированную ампулу, охлаждаемую жидким азотом. Этилацетатный экстракт упаривали в вакууме и с помощью ТСХ идентифицировали содержащиеся в нем фенилтиогидантоины. Водный слой высушивали в вакууме и подвергали дальнейшей деградации.

4. Идентификация N-концевой аминокислоты в укороченном пептиде.
а) Дансилирование. В ампулу с аликвотой укороченного пептида добавляли 20 мкл 0,1 н. $NaHCO_3$ и 20 мкл дансилхлорида в ацетоне (3 мг на 1 мл), термостатировали 1 ч при 37° в темноте. Реакционную смесь высушивали и проводили реакцию еще раз.

---

* В работе [5] для экстракции используется большее количество растворителя, которое, по нашим данным, приводит к значительной потере пептида. Экстракция 15 мкл этилацетата обеспечивает достаточно хорошую очистку укороченного пептида от тиозолинонов аминокислот и предохраняет его от потерь при экстракции.

б) Гидролиз Dns-пептида. К высушенному пептиду добавляли 50 мкл 6 н. HCl, вакуумировали до остаточного давления $5 \cdot 10^{-3}$ мм рт.ст. и ампулу запаивали. Гидролиз производили 16 ч при 110°. При повторной деградации, если предполагалось, что N-концевая аминокислота — валин, лейцин или изолейцин, гидролиз производили в течение 48 ч.

в) Микротонкослойная хроматография. Гидролизат высушивали, растворяли в ацетоне и хроматографировали на пластинках размером 6×6 см с закрепленным слоем силикагеля КСК с размером частиц 2—5 мкм. Для проявления применяли двухмерную восходящую хроматографию в следующих системах растворителей: А — ацетон — изопропанол — 25% водный аммиак (9 : 7 : 0,5) (направление 1, двукратно), хлороформ — бензиловый спирт — этилацетат — лед. уксусная кислота (6 : 4 : 5 : 0,2) (направление 2); Б — ацетон — изопропанол — 25% водный аммиак (9 : 7 : 0,5) и (9 : 7 : 2) (последовательно, направление 1), хлороформ — бензиловый спирт — метанол — ледяная уксусная кислота (5 : 4 : 1 : 1) (направление 2). После ТСХ пластинки высушивали и фотографировали методом контактной люминесцентной фотографии на высокочувствительный фотоматериал с защитным слоем, пропускающим свет люминесценции и экранирующим свет возбуждения с длиной волны 365 нм. Фотографии проявляли и фиксировали обычным способом. На рис. 2*а*, *б* приведены контактные люминесцентные фотографии тонкослойных хроматограмм стандартной смеси аминокислот.

ТСХ фенилтиогидантоинов аминокислот — глутамина, аспарагина, глутаминовой, аспарагиновой кислот — проводили на полиамидных пленках, насыщенных раствором флуоресцеина (0,03 г флуоресцеина на 100 мл смеси ацетон — 1 н. водный аммиак, 3 : 1). Тонкослойные хроматограммы регистрировали с помощью контактной люминесцентной фотографии при облучении УФ-излучением с λ254 нм. При этом фенилтиогидантоины обнаруживались в виде светлых пятен на темном фоне. Чувствительность такого метода идентификации составляла 10^{-9} моль. Полиамидные пленки использовали многократно после регенерации в указанном выше растворе флуоресцеина в течение 16—24 ч.

Разработанная методика была апробирована в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Институте белка АН СССР. В связи с этим авторы выражают свою признательность М. Ю. Фейгиной и Ю. Б. Алахову.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gray W. R. (1972) in: Methods in Enzymology, **25**, pp. 121–138, Acad. Press., N. Y.— London.
2. Bruton C. S., Hartley B. S. (1970) J. Mol. Biol., **52**, 165–178.
3. Weiner A. M., Platt T., Weber K. (1972) J. Biol. Chem., **247**, 3242–3251.
4. Varga S. M., Richards F. F. (1973) Anal. Biochem., **53**, 397.
5. Chen R. (1976) Z. Physiol. Chem., **357**, 873–886.
6. Беленький Б. Г., Нестеров В. В., Ганкина Э. С. (1970) в сб.: Физические и физико-химические методы анализа органических соединений, с. 80–91, «Наука», М.
7. Нестеров В. В., Беленький Б. Г., Эрастов Д. П. (1968) Биохимия, **33**, 537–541.
8. Швайштейн Э. С., Берлина С. А., Беленький Б. Г., Эрастов Д. П., Ганкина Э. С. (1976) Авт. свид. № 525912, Бюлл. № 31, 1976.

Поступила в редакцию
21.VIII.1978

После доработки
10.XI.1978

METHODS FOR INCREASING THE SENSITIVITY OF THE MANUAL EDMAN DANSYL METHOD

GANKINA E. S., KOROLYOVA E. M., BELENKY B. G.

Institute of High Molecular Weight Compounds, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

In order to enhance the sensitivity of the N-terminal amino acid sequence determination by the procedure which involves Edman degradation and subsequent identification of the N-terminal amino acid of the shortened peptide as a dansyl derivative, the main steps of this technique were scrutinized and further developed. Provided the solvents are thoroughly purified, the walls of the reaction vessel silanized, the volume of the reagents decreased, dansylation made twice, and a highly sensitive method of the photographic recording of thin-layer chromatograms on a special photographic material is used, then it is possible to increase 5-10-fold the sensitivity of the manual variation of this method. As an example, the N-terminal sequence of 10 amino acids in the insulin A-chain was determined starting from $2 \cdot 10^{-9}$ moles of the peptide.