

直接从乙酰化 N-末端测定烟草花叶病毒 外壳蛋白氨基酸序列

成久俊 巫爱珍 孙玉昆

(中国科学院上海生物化学研究所)

Narita^[1,2] 于 1958 年发现烟草花叶病毒 (TMV) 外壳蛋白的 N 端系乙酰化封闭, 目前已经报道了许多 N 端乙酰化的蛋白质, 例如: 烟草花叶病毒类^[3]、黄瓜花叶病毒^[4]、芜菁花叶病毒^[5]和长叶车前花叶病毒等的外壳蛋白^[6]。细胞色素 C^[7]、卵清白蛋白^[8]、组蛋白 IV^[9]、原肌球蛋白^[10]、脱铁蛋白^[11]、磷酸甘油激酶^[12]、钙结合蛋白^[13]等。

迄今尚无有效的方法从 N-乙酰基端开始, 直接测其氨基酸序列。本文介绍了一种从 N-末端测定烟草花叶病毒类外壳蛋白氨基酸序列的有效方法。

材 料 和 方 法

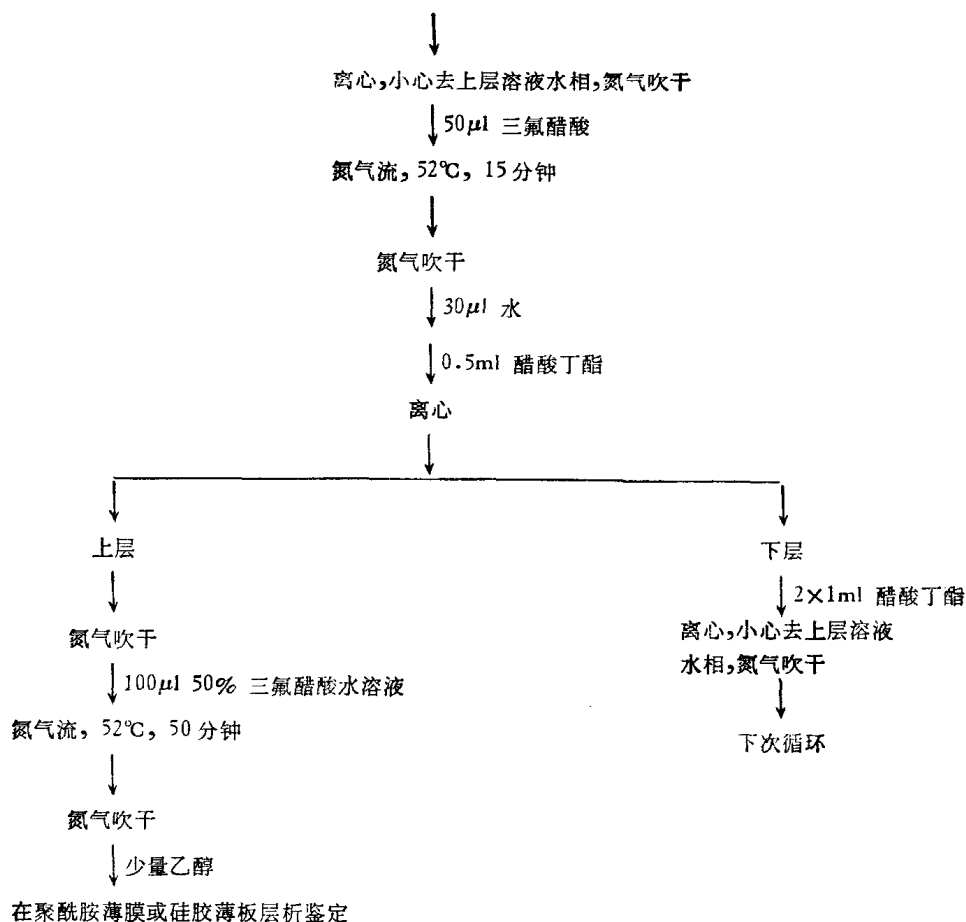
1. 材料和试剂 TOSNV (蕃茄条斑坏死病毒)、TMV (烟草花叶病毒)、YMV₁₅ (油菜花叶病毒)、HRV (长叶车前花叶病毒) 和 HRVsh (长叶车前花叶病毒上海分离株) 的外壳蛋白, 系用 66% 醋酸法^[14] 从相应的病毒制剂制备, O-苄基丝氨酸、酪氨酸甲酯和 DABITC 是中国科学院上海生物化学研究所东风生物化学试剂厂产品。三氟醋酸和薄板层析硅胶板系 Merck 产品。聚酰胺薄膜系浙江黄岩化学实验厂产品。其它有机溶剂均经过重蒸后使用。

2. N-乙酰基-O-苄基丝氨酰酪氨酸甲酯的合成 取 0.1mmol N-乙酰基-O-苄基丝氨酸, 0.1 mmol 酪氨酸甲酯和 2 mmol 二环乙基碳二亚胺溶解于 10ml 二甲基甲酰胺中, 30℃ 反应 24 小时后, 用纸层析分离反应混合物 (溶剂: n-正丁醇: 冰醋酸: 水 = 4:1:5V/V)。除原料外, 新产生的 N-乙酰基-O-苄基丝氨酰酪氨酸甲酯的斑点, 经 pauly 试剂^[15] 显色呈阳性, 而茚三酮显色呈阴性, 其 R_f 值为 0.75。

3. 氨基酸序列测定^[16]

10nmol 蛋白质干粉
↓ 80μl 50%吡啶水溶液
↓ 40μl DABITC (0.5mg) 吡啶溶液
氮气流, 52℃, 45 分钟经常摇动
↓ 10μl 异硫氰酸苯酯
氮气流, 52℃, 30 分钟经常摇动
↓ 3×1ml 正庚烷/乙酸乙酯 (3/1, V/V)

本文 1985 年 5 月 22 日收到。



结 果

1. N-乙酰基丝氨酸及 N-乙酰基丝氨酸酰胺与 DABITC 的反应 N-乙酰基丝氨酸与

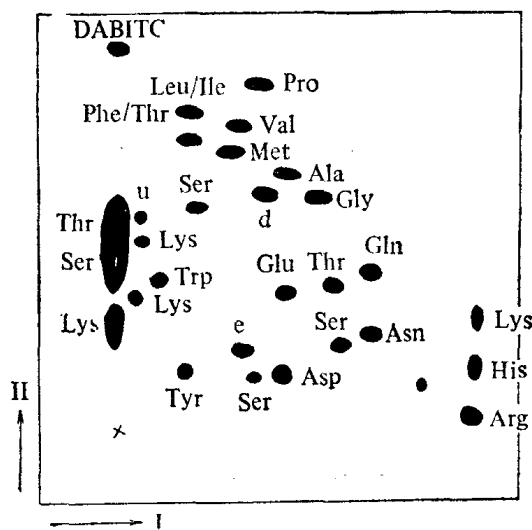


图 1 DABTH-氨基酸的聚丙烯酰胺薄膜双向层析图谱

d: DABTC-二乙胺; e: DABTC-乙醇胺.

溶剂系统: I. 冰醋酸: 水 = 1:2(V/V); II. 甲苯: 正己烷: 冰醋酸 = 2:1:1(V/V)

DABITC 反应生成的 DABTH-丝氨酸衍生物在聚酰胺薄膜上的位置与 DABTH-Ser 相同(图 1-3), 反应条件见材料与方法。N-乙酰基丝氨酸酰胺与 DABITC 的反应产物在聚酰胺薄膜上的位置与 DABTH-Ser 和 DABTH-Val 相同(图 1、3)。

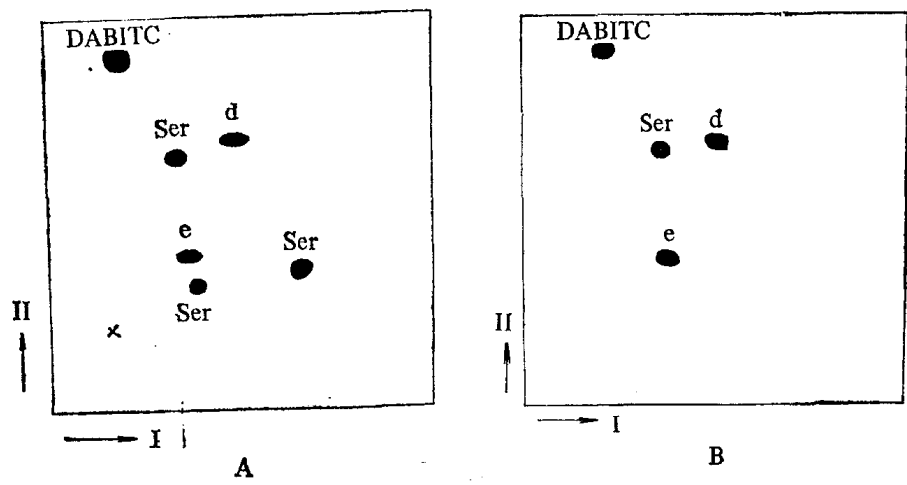


图 2 丝氨酸和 N-Ac-Ser 与 DABITC 反应的聚酰胺薄膜双向层析图谱
A. 丝氨酸; B. N-乙酰-丝氨酸

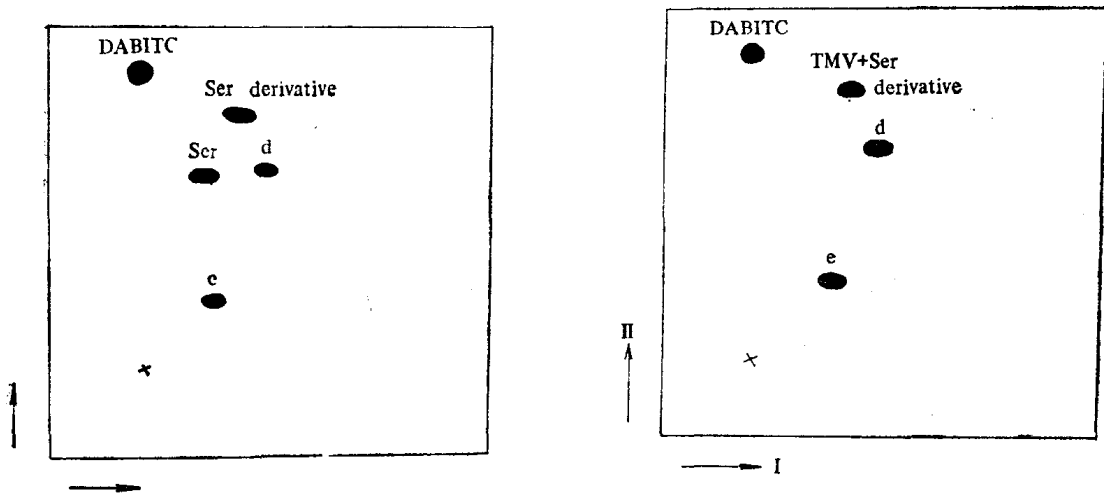


图 3 N-Ac-Ser-NH₂ 与 DABITC 反应产物在聚酰胺薄膜上的双向层析图谱

图 4 N-Ac-Ser-Tyr-OMe TMV 外壳蛋白与 DABITC 反应产物的聚酰胺薄膜双向层析图谱

2. N-乙酰基丝氨酸酪氨酸甲酯及 N-乙酰基-O-苄基丝氨酸酪氨酸甲酯与 DABITC 反应
N-乙酰基丝氨酸酪氨酸甲酯与 DABITC 反应生成的 DABTH-丝氨酸衍生物在聚酰胺薄膜上的位置与 DABTH-Val 一致(图 4)而在硅胶板上的位置与 DABTH-Met 相同(图 5)。但是经 6N HCl 105℃ 水解 20 小时后,纸层析鉴定到丝氨酸,水相经纸层析后,斑点位置与酪氨酸相同。Pauly 试剂及茚三酮呈色均呈阳性。N-乙酰基-O-苄基丝氨酸酪氨酸甲酯与 DABITC 不能反应(表 1)。

3. DABTH-Ser 在聚酰胺薄膜层析图谱位置

$$\begin{array}{c} | \\ \text{OAc} \end{array}$$
DABTH-Ser 与醋酐在醋酸丁酯溶剂

表 1 氨基封闭的 Ser 衍生物与 DABITC 的反应情况

Ac-Ser	+
Ac-Ser-NH ₂	+
Ac-Ser-Tyr-OMe	+
Ac-Ser-Tyr-OMe OBz	-
细胞色素 C	-

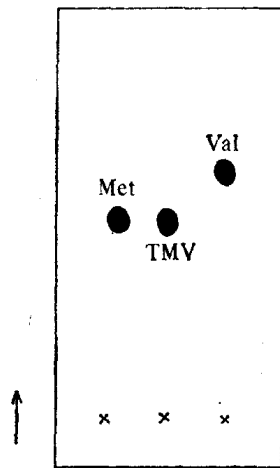


图 5 TMV 和 Ac-Ser-TyroMe 的 DABTH-Ser 衍生物在硅胶薄板上的层析图谱
溶剂: 氯仿:甲醇=50:2 (V/V)

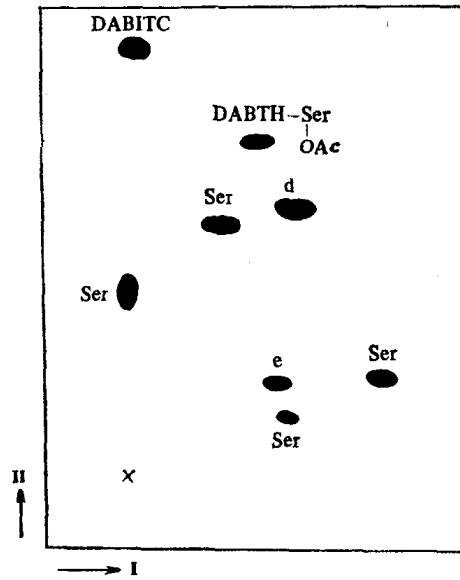


图 6 DABTH-Ser 与乙酸酐反应产物的聚酰胺薄膜双向层析图谱

中于室温反应 2 小时,除去溶剂及醋酐,将残留物溶于甲醇中在聚酰胺薄膜上进行层析,图 6 结果表示 DABTH-Ser 与 DABTH-Val 在相同位置。



4. TMV、TOSNV、YMV_{1s}、HRV、HRV_{1s} 外壳蛋白的 N-端氨基酸序列 TMV、TOSNV 的外壳蛋白与 DABITC 反应生成的 DABTH-Ser 衍生物在聚酰胺薄膜上的位置与 DABTH-Val 相同(图 4),而在硅胶薄板上的位置却与 DABTH-Met 相同(图 5),于 6N HCl 105℃ 水解 20 小时后得到丝氨酸,与 N-乙酰-丝氨酰-酪氨酰甲酯和 DABITC 反应结果相同。

烟草花叶病毒类的外壳蛋白的 N-端氨基酸序列见表 2。

表 2 TMV 株外壳蛋白质 N 端的氨基酸序列

TOSNV:	Ac-Ser-Tyr-Asn-Ile-Thr-Ser-Ser-Asn-Gln-Tyr-Gln-Tyr-Phe-Ala-Ala-Val-Trp-Ala-Glu-Pro-Thr-Pro-Met-Leu-
TMV:	Ac-Ser-Tyr-Ser-Ile-Thr-
YMV _{1s} :	Ac-Ser-Tyr-Asn-Ile-Thr-Ser-Ser-Asn-Gln-Tyr-Gln-Tyr-Phe-Ala-Ala-Val-Trp-Ala-
HRV:	Ac-Ser-Tyr-Asn-
HRV _{1h} :	Ac-Ser-Tyr-Asn-Ile-Thr-Ser-Ser-Asn-Gln-

关于从 N-乙酰-丝氨酸分子上脱去乙酰基的机制,关于用 DABITC 试剂反应从 N-乙酰-丝氨酸分子与脱去乙酰基的机制问题,从 N-乙酰-丝氨酸、N-乙酰丝氨酸多肽以及 N-乙酰-丝氨酸蛋白与试剂 DABITC 反应可以脱去乙酰基,但从 N-Ac-Ser-Tyr-OMe 分子中却不



能脱去乙酰基,表明 N-乙酰-丝氨酸的羟基必需呈自由状态。可能经过 N→O 转移机制将 N-端上的乙酰基转移至羟基上。当 DABTH-丝氨酸经过醋酐处理后部分羟乙酰化即 DABTH-Ser 在聚酰胺薄膜层析谱上与从 TMV 外壳蛋白 N-端所得的 DABTH-Ser 衍生物



表现了相同的位置,这一结果支持了上述 N→O 转移的机制。

另外还须指出,本文提供的方法仅适用于 N-乙酰-丝氨酸——多肽或蛋白,因为 N-乙酰-甘氨酸的细胞色素 C 却不能与 DABITC 反应。

致谢:感谢斐美云先生提供 YMV₁ 毒株,林楠琴同志对本工作的协助。

参 考 文 献

- [1] Naruta, K., *Biochim. Biophys. Acta*, **28**(1958), 184.
- [2] Narita, K., *Biochim. Biophys. Acta*, **30**(1958), 352.
- [3] Fraenkel-Conrat, H., *Plant viruses, Comprehensive Virology*, **1**(1974), 152.
- [4] Narita, K., *Biochim. Biophys. Acta*, **31**(1959), 372.
- [5] Harris, J. I., Hindley, J., *J. Mol. Biol.*, **3**(1961), 117.
- [6] Wittmann, H. et al., *Aminosäuresequenz des proteins tobakmosaikvirusstammes holmes rib grass*, *Z. Naturforsch.*, **B24**(1973), 877.
- [7] Kreil, G., Tuppy, H., *Nature*, **192**(1961), 1121.
- [8] Narita, K., *Biochim-iophys. Res. Commun.*, **5**(1961), 160.
- [9] Delange, R. J. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**(1968), 1145.
- [10] Alving, R. E., Moczar, E., Laki, K., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **23**(1966), 540.
- [11] Asuran, A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**(1966), 1.
- [12] Yoshida, A., *Anal. Biochem.*, **49**(1972), 320.
- [13] Nockods, C. E., Kretsinger, R. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**(1972), 581.
- [14] Fraenkel-Conrat, H., *Virology*, **4**(1957), 1.
- [15] Grimmett, M. R., Richards, E., *J. Chromatogr.*, **20**(1965), 171.
- [16] Chang, J. Y., Brauer, D. and Wittmann-Liebold, B., *Micro-sequence analysis of peptides and proteins using 4-N, N-dimethylaminoazobenzene 4'-isothiocyanate/phenylisothiocyanate double coupling method*, *FEBS Letters*, **93**(1978), 205—214.