# 蛋白质N端测序技术介绍

中科大生命学院实验中心　　　　施荣华

# 蛋白质测序的发展简史

- 自从1967年Edman本人推出的第一台自动测序仪来，经历了液相测序仪——固相测序仪——气相测序仪的发展历程。
- 液相测序：样品一直处于溶液状态，样品没有耦联到任何载体上，样品容易损失。
- 固相测序：将蛋白质共价耦联于聚苯乙烯膜，微孔玻珠或PVDF膜上再进行序列分析的方法。此方法可避免因冲洗而使样品损失，同时在序列降解及冲洗步骤采取较剧烈的条件。
- 气相测序：蛋白质通过polybrene等载体吸附在**化学惰性的玻璃滤膜上**，偶联碱和裂解酸以气相方式转运，反应副产物和ATZ氨基酸通过有机溶剂以气相方式萃取,蛋白质本身不会丢失.

# 蛋白质和DNA测序比较

表 1　　蛋白质与 DNA 顺序测定过程的比较

| 比较内容 | 蛋白质测序 | DNA 测序 |
| --- | --- | --- |
| 测序中判断的复杂性 | 20 种氨基酸且可能出现特殊的氨基酸 | 4 种核苷酸 |
| 样品的性质 | 不同蛋白质和肽片段理化性质相差很大，存在不溶性和变性的问题。 | 不同 DNA 片段理化性质相差小，基本不存在不溶性和变性的问题 |
| 对样品量的依赖性 | 常为主要限制因素 | 只要建立了克隆，样品量不成问题 |
| 测序速度 | 手工操作者一天完成约 4－5 个残基的顺序，自动测序仪一天可完成约 30 个残基的顺序 | 手工操作一天可完成数百个碱基的顺序，自动测序仪一天可完成数千碱基的顺序测定。 |
| 准确性 | 常出现拼接和辨读错误 | 准确性高 |
| 费用 | 高，对昂贵的仪器依赖性强 | 较低，手工方法可满足一般测序要求 |

# 蛋白质N-端测序优劣势

- 随着分子生物学的飞速发展，一种新的革命性的测定蛋白质顺序技术手段--**DNA测序技术**。它是根据已经测定部分氨基酸序列设计引物，扩增出其mRNA，从而推出蛋白的全序列技术.
- 从前面蛋白质测序和DNA测序比较,DNA测序比蛋白质直接测序有明显优势（蛋白测序的劣势：昂贵　费时　封闭不能测定　）
- 但是通过测定基因编码导出氨基酸序列并不完全描述蛋白质的一级结构，蛋白质的直接测序仍有DNA测序具有的优势。
- （1）确认某些蛋白质信号肽的起始和终点
- （2）确认转译后被加工的氨基酸的位点

# 蛋白质N-端测序优势

- （3）通过验证DNA测序得到蛋白质序列的正确性
- （4） 检验基因工程表达的结构，为寡聚核苷酸探针与引物合成提供依据
- （5） 测定活性多肽和小蛋白质序列更简捷
- （6） 确认S-S定位，位点的修饰如糖基化或磷酸化等

# 蛋白质，DNA 和质谱测序技术比较

- （1）蛋白质测序：　N-端测序和C-端测序，Edman不能 解决N端封闭肽的测序问题
- （２）ＤＮＡ测序：对于转译后加工所导致的氨基酸残基的修饰无能为力。
- 
- （３）质谱测序：８０年代末出现的２大技术:电喷雾（ESI, electrospray ionization)质谱和基质辅助激光解吸电离－飞行时间（MALDI-TOF ,matrix-assisted laser desorption/ionization time –of-flight),采用软“电离”的电离方式。需求样品量少，速度快，价格昂贵。

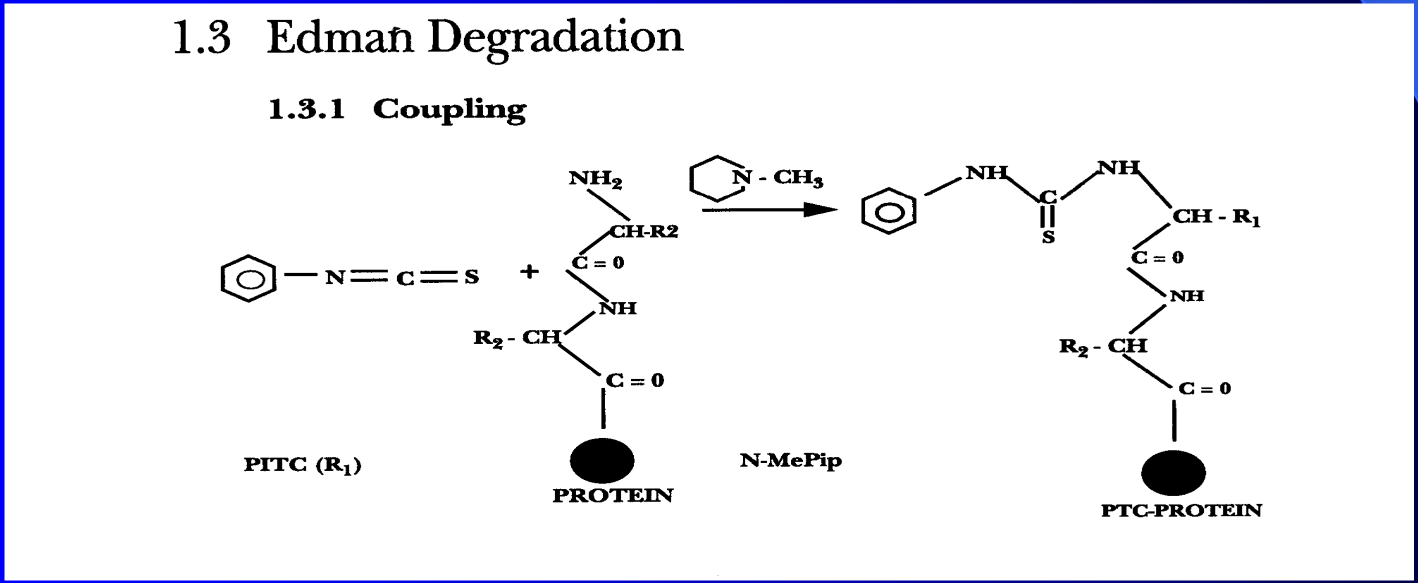
# 蛋白质N-端测序- Edman降解法

- Edman降解法：
- 蛋白质测序技术最具有意义的发展是瑞典化学家Edman发展的以他名字命名的蛋白质N-端测序方法—— Edman降解法。 可以说Edman降解堪称有机化学成功的经典，经过几十年研究，发现其耦联试剂一异硫氰酸苯酯即Edman试剂仍是最适用的。

# Edman降解的化学原理

- 一 Edman降解的化学原理
- Edman降解进行蛋白质与多肽序列分析是一个循环式的化学反应过程。包括三个主要的化学步骤 ：

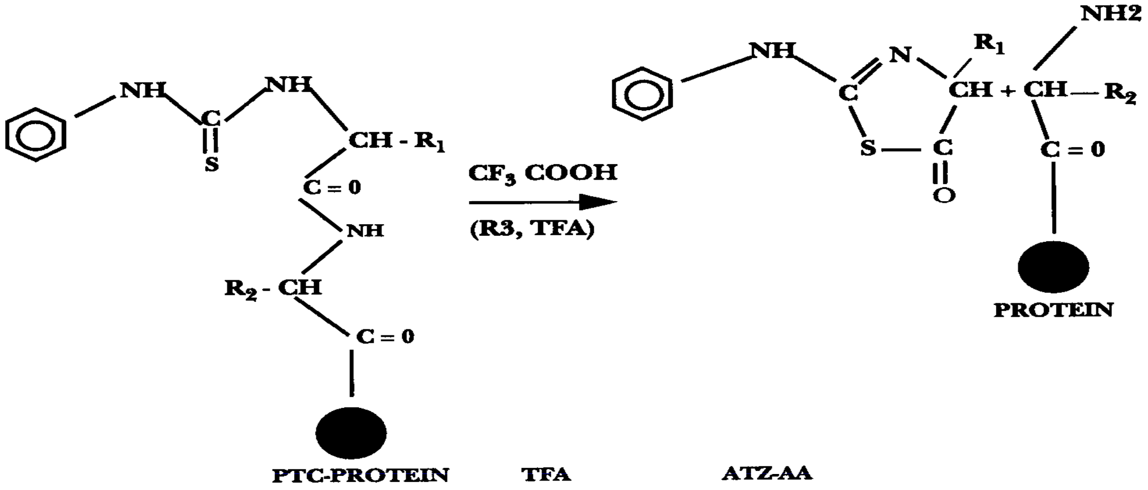
（1）偶联：异硫氰酸苯脂与蛋白质和多肽的N-端残基反应



# Edman降解的化学原理

- （2）环化裂解：苯氨基硫甲酰酞（PTC-肽）环化裂解

### 1.3.3 Cleavage




R3 (TFA) is a highly-volatile, strong organic acid. R3 cleaves the PITC-coupled amino acid residue from the amino terminus of the protein, thereby producing the anilinothiazolinone (ATZ) derivative of the amino acid. The remaining protein is left with a new amino terminus which will be coupled with PITC in the next cycle.

# Edman降解的化学原理

（3）转化：

噻唑啉酮苯氨（ATZ）转化为苯异硫尿氨基酸（PTH-氨基酸）

**1.3.5 PTH Conversion**

ATZ-AA　　TFA　　PTH-AA

**R4A (25% TFA in water – aqueous TFA)** The transferred extraction solution (S3 and/or S2B + ATZ amino acid), along with most of the initial delivery of S4B, is evaporated from the conversion flask. An aliquot of R4A is then delivered to the flask to convert the ATZ-AAs to the more stable PTH-AAs. The presence of dithiothreitol in the R4A minimizes oxidation of the ATZ amino acids. In standard sequencer cycles, conversion occurs for approximately nine minutes at 64 °C. These conditions are sufficient to give virtually complete conversion of all amino acids except glycine (about 15% of derivatized glycine remains in the intermediate PTC-glycine form).

**R5** (acetonitrile) is used to introduce an aliquot of the PTH standard mix to the flask for subsequent HPLC analysis.

# P rocise 491气相测序仪简介

- 目前蛋白质测序仪市场上90%都是有美国 ABI (Applied biosystems) 公司生产的,而491型蛋白测序仪是目前的主导型仪器.
- 基本结构:四个主要部件
- (1) 蛋白质测序仪主机
- (2) 140型微梯度运送系统
- (3) 785A型紫外检测器
- (4) 610A型数据分析软件

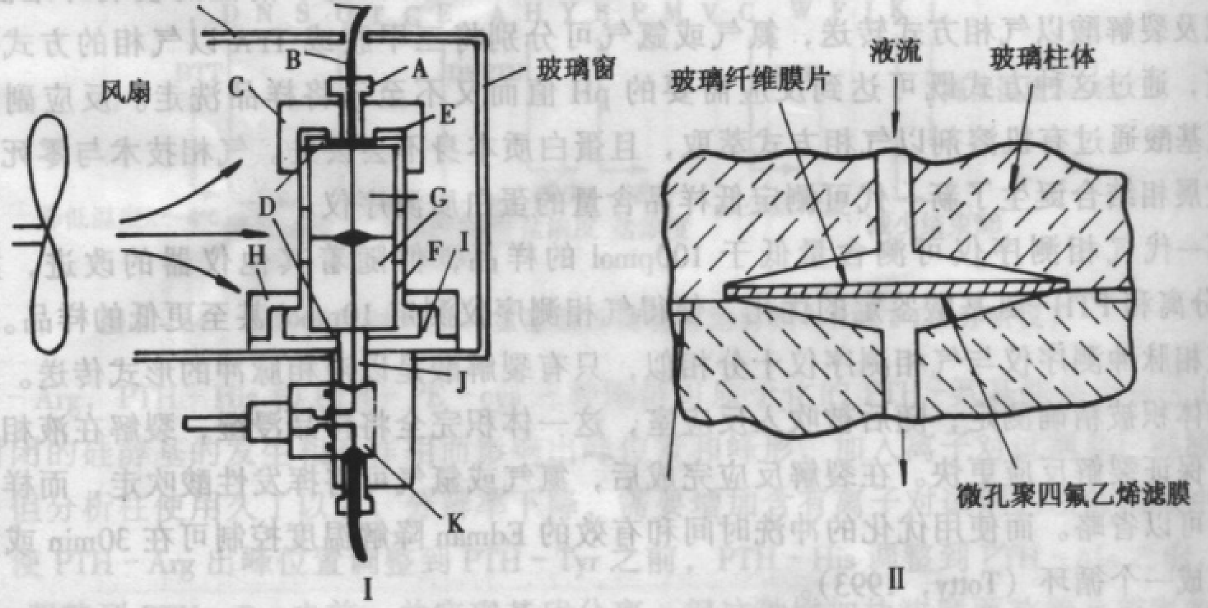
# 491型蛋白质序列仪的结构示意图

紫外检测器

溶液运送系统
（ＨＰＬＣ系统）

测序仪主机

# 序列仪反应室的结构




A. 管道螺丝　B. 特氟纶管　C. 上盖　D. 特氟纶垫圈　E. 铝垫圈　F. 不锈钢套
G. 玻璃柱体　H. 固定环　I. 铝支架　J. 底部螺丝　K. 阀门

图 4－36　气相序列仪反应室的结构（Ⅰ）和中心部放大图（Ⅱ）

# 20种PTH氨基酸HPLC图谱

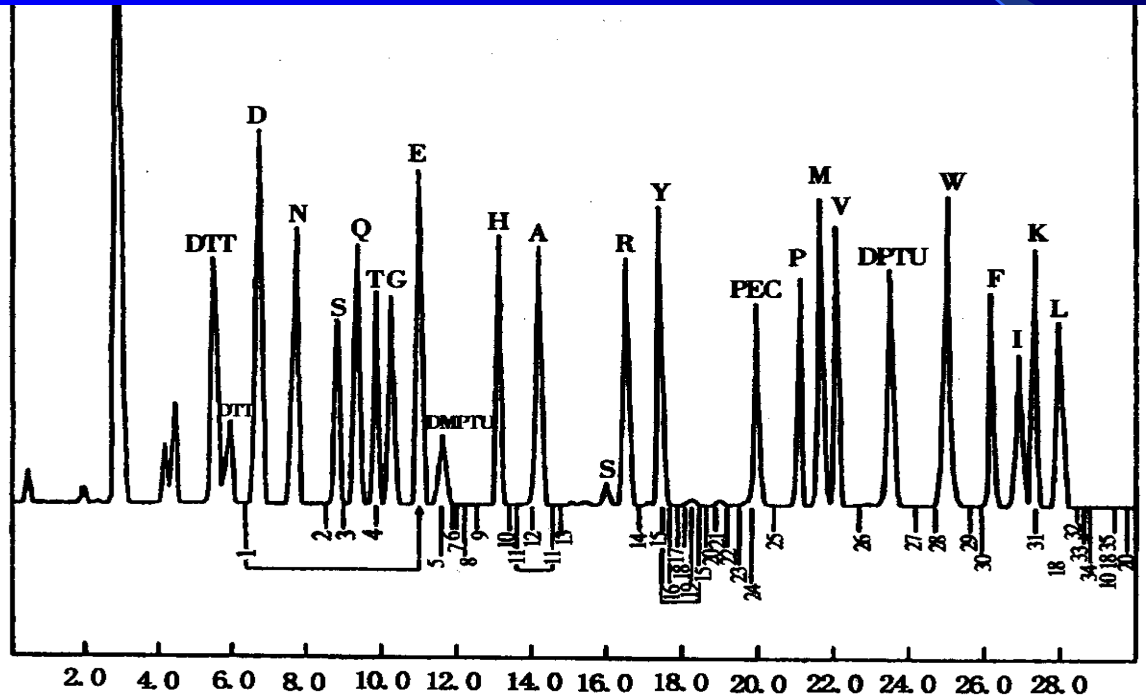
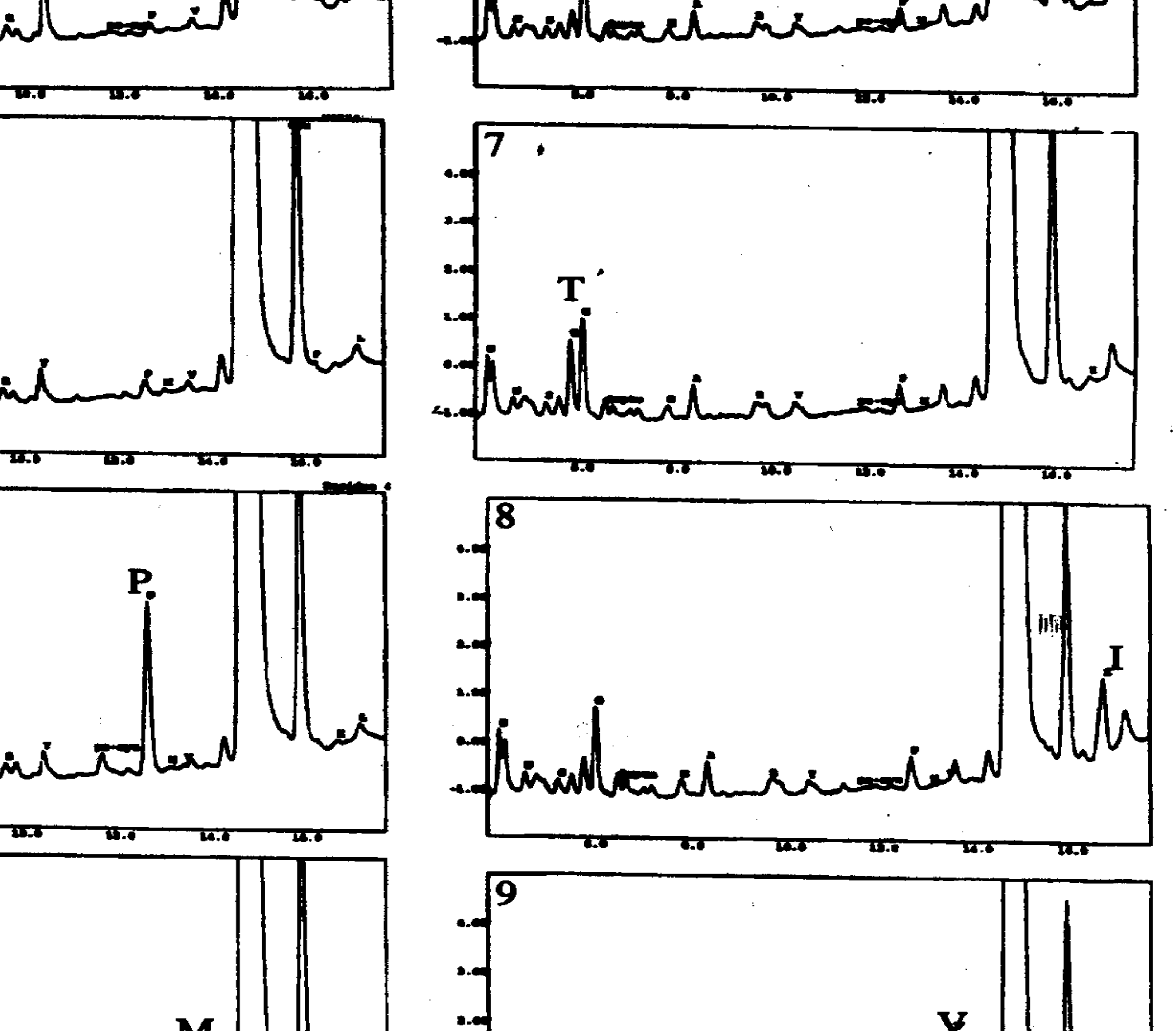



图 4－33　ABI 470－491 型测序仪标准 PTH－氨基酸 HPLC 图谱


7
T
8
I
P
9

# Polybrene结构和作用

Polybren：1,5-二甲基-1，5-二氮十一亚基聚甲溴化物，它是一种四重绒，有助于蛋白质样品粘贴到玻璃纤维或PVDF上，处理样品支持物可以减少样品洗出。

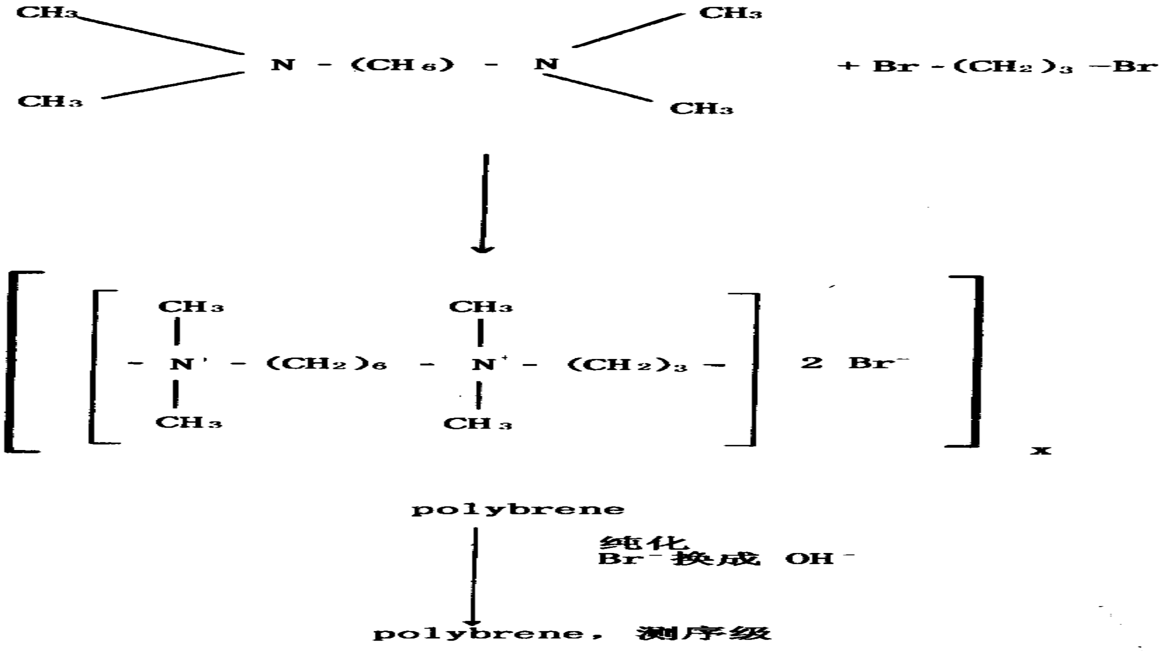



图 9.5 polybrene 的形成和结构。

# 序列测试时应注意的问题

## 一 与样品相关的因素

（1）样品纯度：>90%，盐含量在５０mmol/L内，不含变性剂（如SDS)等杂质，其N-端必须是均一的高纯样品。例如样品中含2个混合物，只有含量相差4-5倍以上才能对主序列和次序列进行分析。

纯度鉴定方法：A ： 质谱

B ： SDS-PAGE

C ： HPLC

D ： HPCE

- 一般采用2种以上的方法加以验证。

# 序列测试时应注意的问题

（2）样品量：

至少需要10Pmol,例如标准蛋白质测定：10Pmol样品可以测定20氨基酸残基。

一般样品量大于50Pmol或者更多测定序列越长。如分子量为20000的蛋白质，50Pmol约为1微克。所以蛋白质N-端测序属于常规测定。

（３）样品存在状态

A 液体：液体样品中不能含有蛋白酶以防降解，同时样品测试前不能放置太久，在－20℃以下保存，最好尽早测试。

# 序列测试时应注意的问题

B 转膜样品 ：样品经凝胶电泳分离后，应马上进行电转移至PVDF膜上面，转膜前不能放置很久以防止样品扩散。

含有样品的PVDF可以用滤纸夹住保持在密封塑料袋中，可以在冰箱保存3-6个月。

（4）如果样品没有任何信号峰，要考虑蛋白N-端封闭。具报道约50%天然蛋白质N-端被修饰如乙酰化，甲酰化，焦谷氨酸化，须经蛋白质化学降解或酶切后分离后分析。

- 有时样品在分离纯化中也会产生N-端封闭，主要由于溶液中去垢剂或化学物质与蛋白样品N-端功能基团反应，或者分离纯化中PH过高（PH›9-10）

# 序列测试时应注意的问题

转膜样品要求：

（１）为防止部分蛋白质在电泳过程被胶内杂质而封闭Ｎ末端，请预先自做预电泳。即用低电压跑空胶２－2.5h再上样电泳分离。

- （２）电泳过程中，用尽量避免条带拖尾现象，用于测序的条带用狭窄清晰。而且必须保证一定的量，测定20个氨基酸以上的蛋白质，至少需要2-3条明亮，清晰的条带。
- （３)样品转膜后请用Coomassie R—250染色１分钟，避免使用Coomassie G—250.
- (４) 含样品的PVDF膜夹在滤纸间保存在密封塑料袋中，冰箱内可以放置３-6月（－２０℃），电泳缓冲液建议使用ＣＡＰＳ缓冲液，而不要使用Ｔris-甘氨酸缓冲液。

# 序列测试时应注意的问题

## 二　　Edman降解与仪器有关的因素

（1）由于各种氨基酸残基化学或物理性质不同，因此判断其含量时PTH信号的强弱会发生变化。如：T和S因发生脱羟基而破坏，C被修饰很难有信号，H和R由于极性而难以萃取，M极易氧化而收率低。

（2）修饰残基在检测时接近或覆盖已知氨基酸时会造成氨基酸识别错误。

（3）测序用的化学试剂必须具有高的纯度，消除一切可能导致在PTH色谱中产生的假峰，所有试剂和溶剂均保证测序级。