

蛋白质N端测序仪（PPSQ）之埃德曼降解

原创 LabTotal事业部 岛津售后 LabTotal 2024-02-28 14:00 北京

精益求精 · 臻于至善

Keep Improving Strive For Perfection

PART.01

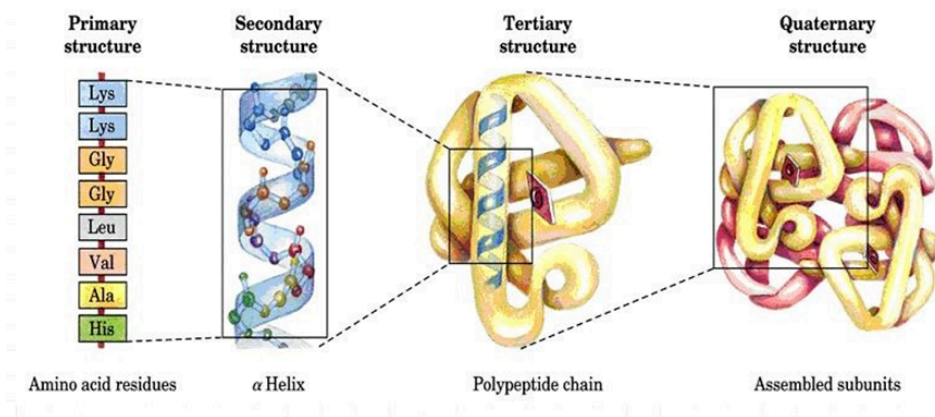
什么是蛋白质的结构？

蛋白质是由氨基酸组成的生物大分子，蛋白质的氨基酸序列和它的立体结构构成了蛋白质结构的多样性。蛋白质具有一级、二级、三级和四级结构，蛋白质的结构决定了它的功能。

PART.02

什么是蛋白质的一级结构？

蛋白质的一级结构指的是氨基酸残基在蛋白质肽链上的排列顺序。每一种蛋白质都有唯一且确切的氨基酸序列。



PART.03

如何测定蛋白质的一级结构？

采用岛津的蛋白质N端测序仪（PPSQ）可以测定蛋白的一级结构。



PART.04

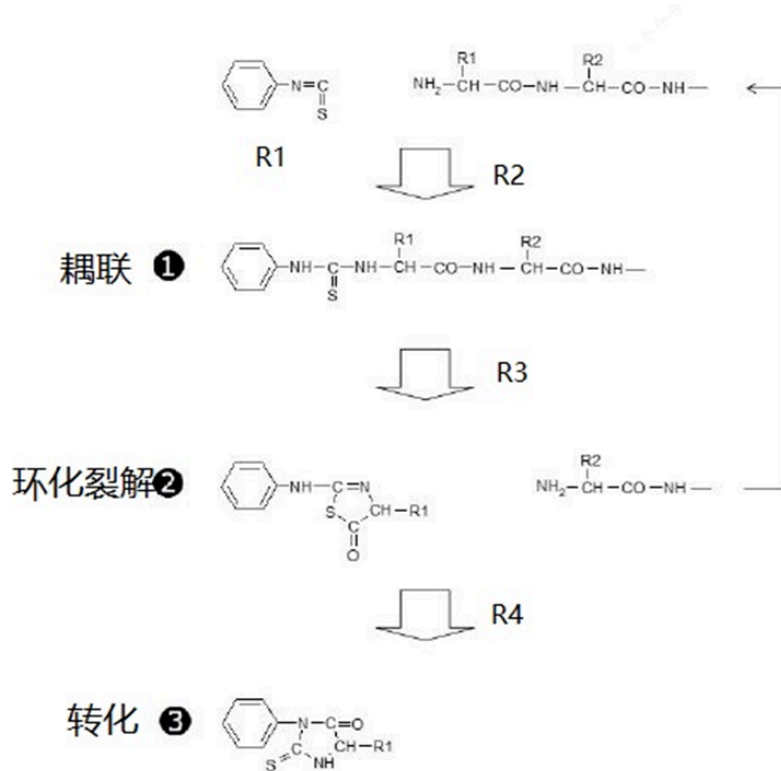
埃德曼降解的原理：

埃德曼降解是由埃德曼 (P.Edman) 在上世纪六十年代所创立并自动化。整个反应过程可分为：耦联、环化裂解、转化三个步骤。

1、耦联，即在碱性环境下，蛋白的N端与异硫氰酸苯酯 (PITC) 发生反应，生成苯氨基硫代甲酰胺 (PTC) 衍生物。

2、环化裂解，即用酸处理，环化，使肽链N端被选择性的切断，得到N端氨基酸残基的噻唑啉酮苯胺衍生物 (ATZ)。紧接着用有机试剂将ATZ氨基酸萃取下来，转移到转化仓。

3、转化，即在酸的作用下，ATZ-氨基酸不稳定，转化为稳定的苯基乙内酰硫脲 (苯基海硫因) 衍生物 (PTH-AA)，然后进行色谱分析。依据色谱的保留时间判断是哪一种氨基酸。剩余的肽链中酰胺键不受影响，进入下一个循环，继续发生降解。每发生一次反应，可鉴定一个位置的氨基酸。当全部结果测定结束后，即可得到全部的氨基酸序列结果。



PART.05

埃德曼降解法分析的优势：

- 1、可以准确分析N端氨基酸序列，特别是能辨别异亮氨酸和亮氨酸、谷氨酰胺和赖氨酸；
- 2、灵敏度高；
- 3、可靠直接，和质谱法相比较不依赖于数据库。

PART.06

埃德曼降解法分析的局限：

- 1、N端被封闭时，需要先除去这些基团，才能测序；
- 2、不能直接测试含二硫键的半胱氨酸的序列；
- 3、对于较大的蛋白，需要先切成较短肽链，再分别进行分析。

PART.07

蛋白质N端测序仪 (PPSQ) 所需的试剂及作用：

R1: 异硫氰酸苯酯 (PITC) 与蛋白的N端反应耦联到氨基上, 继而引发后续反应;

R2: 分别为12%的三甲胺 (等度) 和N-甲基吗啉 (梯度), 为耦联反应提供碱性环境;

R3: 三氟乙酸 (TFA) 为环化裂解反应提供酸性环境;

R4: 分别为25%三氟乙酸水溶液 (等度) 和25%三氟乙酸水溶液 (梯度), 为转化反应提供酸性环境;

S2: 乙酸乙酯, 用于清洗多余的化学试剂及生成的副产物;

S3: 1-氯丁烷, 萃取剂, 可将ATZ氨基酸萃取下来, 运输到转化仓进行转化反应;

S4B: 37%乙腈, 溶解PTH-AA, 进样。

Mobile Phase: 流动相与色谱柱配合使用, 液相方法固定, 同时通过保留时间检定氨基酸的种类。

