

Zakład Chemii Ogólnej. Instytut Chemii Podstawowych. Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: doc. dr habil. Stanisław Biliński

Janusz KLIMEK i Jolanta WRONSKA

### Metodyczne badania nad hydrolizą PTH-aminokwasów

Методические исследования гидролиза PTH-аминокислот

Methodical Study of PTH-aminoacids Hydrolysis

W 1950 r. Edm an opracował dla peptydów i białek technikę oznaczania N-końcowych aminokwasów (3, 4). Najogólniej polega ona na tym, że na badany substrat w środowisku słabo alkalicznym działa się fenyloizotiocyanianem otrzymując w ten sposób fenylotiokarbamylowe pochodne (PTC-pochodne), które następnie w środowisku kwaśnym uwalniają fenylotiohydantoinową pochodną N-końcowego aminokwasu (PTH-aminokwas). W naszej pracowni przeprowadzając powyższym sposobem badania nad sekwencją aminokwasową antygenów tężcowych (11), napotkano na trudności w określeniu PTH-aminokwasów. Manifestowało się to tym, iż na chromatogramach otrzymano plamy rozmyte i wzajemnie zachodzące na siebie.

Elliott i wsp. (5), Freankel i wsp. (cytat-2), Joffe i wsp. (7) oraz Klimek i wsp. (11) próbowali ominąć tę niedogodność poprzez zamianę PTH-pochodnych w wolne aminokwasy. Według naszej oceny jest to bardzo ważny szczegół uzupełniający metodę Edm ana, ponieważ identyfikacja aminokwasów w takiej formie nie stanowi problemu.

We wszystkich powyższych pracach zagadnienie hydrolizy PTH-aminokwasów jest potraktowane fragmentarycznie bez jakiegokolwiek szczegółowego opisu. Chcąc uzupełnić tę lukę postanowiono sprawdzić, czy hydroliza PTH-aminokwasów zachodzi ilościowo bez strat czy dla wszystkich aminokwasów jednakowo i czy wreszcie są takie PTH-aminokwasy, które hydrolizie nie ulegają. Odpowiedź na powyższe pytanie jest bardzo istotna nie tylko w odniesieniu do badań ilościowych, ale przede wszystkim jakościowych związanych z określeniem sekwencji aminokwasowej od strony wolnej grupy aminowej.

#### MATERIAŁ I METODY

Wzorce: zestaw aminokwasów oraz PTH-aminokwasów, uzupełniony przez: PTH-Ala, PTH-Arg, PTH-Asp, PTH-Glu, PTH-Tre, PTH-Tyr otrzymane wg Sjöquist (14). Wszystkie standardy wykazywały chromatograficzną jednorodność.

Odczynniki: pirydyna (ogrzewano 3 godziny pod chłodnicą zwrotną nad KOH i bezpośrednio przed użyciem destylowano zbierając frakcję 115—116°C), fenyloizocyjanian, 1 N NaOH, 1 N HCl, 5,7 N HCl, nasycony wodny roztwór Ba(OH)<sub>2</sub>.

Fabryczne PTH-aminokwasy oraz z własnej syntezy poddawano kwaśnej hydrolizie 5,7 N HCl (2) oraz zasadowej nasyconym roztworem Ba(OH)<sub>2</sub> (7). Ilość uwolnionego aminokwasu określano chromatograficznie wobec odpowiednich wzorców przy użyciu bibuły Whatman 3 w układzie rozwijającym: n-butanol, kwas octowy lodowaty, woda (4:1:1) v/v (8). Do uwidocznienia aminokwasów na bibule stosowano odczynnik ninhydryno-kadmowy (75 mg CdCl<sub>2</sub>, 6 ml H<sub>2</sub>O, 0,3 ml kwas octowy lodowaty, 100 ml aceton, 0,5 g ninhydryna). Barwne plamy odpowiadające aminokwasom wycinano i eluowano 70% metanolem (9, 12). Fotometrycznie barwnych eluatów przeprowadzono wobec ślepej próby, przy długości fali 570 nm, w szklanych naczynkach o grubości 1 cm, za pomocą spektrofotometru „Specol”. Dla każdego aminokwasu wyznaczano krzywą wzorcową, z której odczytywano zawartość aminokwasu w hydrolizatach. Straty zachodzące podczas hydrolizy odpowiedniej pochodnej PTH, obliczano w procentach porównując doświadczalnie określoną ilość uwolnionego aminokwasu z teoretyczną przy założeniu, że hydroliza zachodzi do końca bez żadnych ubytków.

Wszystkie wzorce i odczynniki pochodziły z Hurtowni Chemicznej — Gliwice.

#### BADANIA WŁASNE

Hydroliza kwaśna PTH-aminokwasów. 10 mg PTH-aminokwasu hydrolizowano w obecności 1,5 ml, 5,7 N HCl przy 135—150°C przez 16 godzin w zatopionych szklanych ampułkach. Składniki lotne usuwano w eksykatorze próżniowym nad stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. W części nielotnej określano ilość uwolnionego aminokwasu.

Hydroliza zasadowa PTH-aminokwasów. 10 mg PTH-aminokwasu hydrolizowano w obecności 1,5 ml nasyconego Ba(OH)<sub>2</sub> przy 105—135°C przez 16 godzin w zatopionych szklanych ampułkach. Nadmiar wodorotlenku usuwano poprzez wytrącenie niewielkim nadmiarem rozcieńczonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, po czym roztwór z osadem sączono przez lejek z wkładką szklaną. Składniki lotne roztworu usuwano w eksykatorze próżniowym nad stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. W części nielotnej określano ilość uwolnionego aminokwasu.

Analiza ilościowa aminokwasów pochodzących z hydrolizy aminokwasów

Suchą pozostałość po kwaśnej względnie zasadowej hydrolizie, rozpuszczano w 0,2 ml wody podwójnie przekroplonej. Próbkę zawierającą wolne aminokwasy наносzono na bibułę Whatman 3. Obok na tym samym arkuszu nakraplano wodne roztwory wzorcowego aminokwasu o wzrastającym gradiencie stężenia. Rozwijano w układzie: n-butanol, kwas octowy lodowaty, woda w stosunku objętościowym 4:1:1. Położenie poszczególnych aminokwasów określano przy pomocy odczynnika kadmowego. Barwne kompleksy DYDA+Cd eluowano 70% metanolem roz-

tworem i fotometrowano wobec ślepej próby. W oparciu o wzorce kreślono krzywą, z której odczytywano zawartość aminokwasu po hydrolizie, po czym porównywano z ilością aminokwasu, wyliczoną w odniesieniu do próbki wyjściowej PTH-aminokwasu, przyjmując, że ta ostatnia ulega całkowitej hydrolizie bez ubocznych reakcji. Stąd na drodze rachunkowej ustalano procent odzyskanego aminokwasu. Wyniki zamieszczono w tab. 1.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Punktem wyjścia w poznaniu białka jest określenie jego natury chemicznej. W związku z tym opracowano szereg sposobów pozwalających rozwiązać ten problem (1, 6, 10, 13). Wśród nich specjalną pozycję zajmuje technika fenyloizotiocyjanianowa (3, 4) prowadząca do otrzymywania w środowisku kwaśnym PTH-aminokwasów stanowiących N-końcowe fragmenty łańcucha polipeptydowego badanego substratu białkowego. Ta znakomita metoda pozwala na ilościową degradację końcowych fragmentów w kilku następujących po sobie cyklach. Zdaniem naszym występują jednak pewne kłopoty z rozdzieleniem i identyfikacją otrzymanych PTH-aminokwasów. Wynika to z tego, iż na chromatogramach źle rozdzielają się poszczególne pochodne, zarówno w przypadkach nośnika bibułowego jak i też żelowego. W związku z tym we wcześniejszych badaniach związanych z ustaleniem struktury toksoidu tężcowego postanowiono zrezygnować z bezpośredniego oznaczania PTH-aminokwasów, bowiem tą drogą w warunkach, w jakich prowadzono doświadczenia nie otrzymano nigdy jednoznacznej odpowiedzi. Zupełnie dobre wyniki uzyskano gdy PTH-aminokwasy poddawano kwaśnej hydrolizie, a uwolnione w ten sposób aminokwasy określano wobec wzorców przy użyciu chromatografii bibułowej (11). Trzeba jednak dodać, że zarówno własne badania jak też wcześniejsze nie dawały odpowiedzi w przedmiocie, czy powyższa hydroliza przebiega ilościowo i czy w jednakowym stopniu obejmuje wszystkie aminokwasy. Odpowiedź na to pytanie postanowiliśmy udzielić w przedstawionej pracy. Chcąc mieć pełniejszy obraz zagadnienia postanowiono rozszerzyć go o hydrolizę zasadową wykonaną przy pomocy nasyconego wodnego roztworu  $Ba(OH)_2$ .

Z przeprowadzonych doświadczeń niedwuznacznie wynika, że proces hydrolizy dotyczy wszystkich przebadanych aminokwasów i to zarówno w środowisku kwaśnym, jak i zasadowym. Tab. 1 przedstawia wyniki badań związanych z ilością uwolnionego aminokwasu z odpowiedniej odważki wzorcowego PTH-aminokwasu. Tabela została tak pomyślana, aby obok powyższego znajdowała się również teoretyczna ilość aminokwasu, obliczona przy założeniu, że hydroliza przebiega do końca bez strat. Porównanie tych wartości pozwoliło na ustalenie w procentach odzyska-

Tab. 1. Procent odzyskanych aminokwasów wynikający z zestawienia ilości aminokwasów otrzymanych z rozkładu PTH-pochodnych, wobec ilości teoretycznej zakładającej, że hydroliza przebiega do końca  
 The percentage of recovered aminoacids resulting from the comparison of the quantity of aminoacids obtained from the decomposition of PTH-derivations, as against the theoretical quantity establishing that hydrolysis proceeds to the end

Lp.	PTH-aminokwas	Odwaga PTH-amino-kwasu w mg	Kwaśna hydroliza		Zasadowa hydroliza		Ilość odzyskanego aminokwasu w %
			Ilość uwolnionego aminokwasu w mg	Ilość odzyskanego aminokwasu w %	Ilość uwolnionego aminokwasu w mg	Ilość odzyskanego aminokwasu w %	
1.	PTH-Ala	10	4,30	0,55	12,8	4,30	7,7
2.	PTH-Gli	10	3,86	0,63	16,3	3,86	21,4
3.	PTH-Leu	10	5,20	0,32	6,2	5,20	8,1
4.	PTH-Ser	10	4,70	1,57	33,4	4,70	85,0
5.	PTH-Try	10	6,20	0,40	6,4	6,20	4,0
6.	PTH-Asp	10	5,00	0,22	4,0	5,00	7,6
7.	PTH-Liz	10	5,00	0,40	8,0	5,00	9,4
8.	PTH-Glu	10	5,00	4,70	95,0	5,00	21,6
9.	PTH-Tyr	10	6,00	0,40	7,6	6,00	4,1
10.	PTH-Asp-NH <sub>2</sub>	10	5,30	0,60	11,3	5,30	6,2
11.	PTH-Pro	10	5,70	0,21	3,7	5,70	3,7
12.	PTH-Arg	10	0,72	0,55	73,3	0,72	29,0
13.	PTH-Wal	10	5,00	0,25	5,0	5,00	7,2
14.	PTH-Cys	10	4,00	0,40	10,0	4,00	8,0
15.	PTH-Met	10	5,00	0,36	7,2	5,00	5,3
16.	PTH-Tre	10	5,50	0,38	6,9	5,50	5,4

nej ilości aminokwasu. Z zestawienia wynika, że najmniejsze straty dotyczą PTH-Glu i najwyższe PTH-Pro. Równocześnie nie można odpowiedzieć czy mniejsze lub większe ubytki odnoszą się do kwaśnej, czy zasadowej hydrolizy. Sprawy te kształtują się różnie. Na przykład dla PTH-Ala mniejsze są w środowisku kwaśnym, a w przypadku PTH-Gli w środowisku zasadowym. Z tego powodu nie ma żadnych podstaw, aby preferować kwaśną lub alkaliczną hydrolizę. Jedynym argumentem wskazującym na większą użyteczność pierwszego sposobu jest to, że jest mniej kłopotliwy w wykonaniu. Uważamy także, że wykorzystanie uwolnionych aminokwasów do celów ilościowych nie może być brane pod uwagę ze względu na straty zachodzące w powyższym procesie. Z drugiej strony stwierdzono dużą użyteczność hydrolizy PTH-pochodnych, bowiem otrzymane na tej drodze aminokwasy nadają się do chromatograficznego rozdziału i identyfikacji.

### Wnio ski

1. Wszystkie badane PTH-aminokwasy ulegają zarówno kwaśnej, jak i zasadowej hydrolizie.
2. Ilość uwolnionego aminokwasu zależy od rodzaju badanej PTH-pochodnej i waha się w granicach: 3,75—95%.
3. Dla PTH-pochodnych: Ala, Arg, Asp-NH<sub>2</sub>, Cys, Glu, Met, Tre, Try i Tyr, ilość uzyskanych aminokwasów jest większa w środowisku kwaśnym niż zasadowym; dla PTH-pochodnych: Asp, Gli, Leu, Pro, Ser i Val sprawa przedstawia się odwrotnie.
4. Zaleca się stosować uwalnianie aminokwasów w środowisku kwaśnym, ponieważ wykonanie zasadowej hydrolizy stwarza wiele praktycznych trudności.
5. Do identyfikowania N-końcowych aminokwasów łańcucha polipeptydowego można zastosować technikę uwalniania aminokwasów z odpowiednich PTH-pochodnych.
6. Do analizy ilościowej proponowanej techniki nie należy stosować ze względu na nieregularne straty, jakie zachodzą zarówno podczas kwaśnej, jak i zasadowej hydrolizy.

### PIŚMIENNICTWO

1. Akabori S., Ohno K., Narita K.: Bull. Chem. Soc. Japan, **25**, 214—218, 1952.
2. Bailey J.: Techniques in Protein Chemistry, 190—207, Elsevier, Amsterdam—London—New York 1967.
3. Edman P.: Acta Chem. Scand., **4**, 277—282, 1950.
4. Edman P.: Acta Chem. Scand., **4**, 283—293, 1950.

5. Elliott D., Peart W.: *Biochem. J.*, **65**, 246—254, 1957.
6. Gray W., Hartley B.: *Biochem. J.*, **89**, 379—380, 1963.
7. Joffe K., Jermakowa J.: *Biochim.*, **19**, 561—564, 1954.
8. Klimek J.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sec. D*, **10**, 75—82, Lublin 1965.
9. Klimek J.: *Med. Dośw. Mikrobiol.*, **21**, 223—231, 1969.
10. Klimek J.: *Med. Dośw. Mikrobiol.*, **21**, 373—377, 1969.
11. Klimek J., Wrońska J.: *Med. Dośw. Mikrobiol.*, **23**, 235—239, 1971.
12. Klimek J., Wrońska J.: *Med. Dośw. Mikrobiol.*, **24**, 39—43, 1972.
13. Sanger F.: *Biochem. J.*, **39**, 507—515, 1945.
14. Sjöquist J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 20—30, 1960.

Otrzymano 25.V.1972.

### РЕЗЮМЕ

Все PTH-аминокислоты поддаются кислому и щелочному гидролизу. Количество освобожденной аминокислоты зависит от вида исследованного субстрата и колеблется в пределах 3,75 — 95%. Полученные таким образом аминокислоты можно хроматографически идентифицировать.

### SUMMARY

All PTH-aminoacids are subject to acid and alkaline hydrolysis. The quantity of liberated aminoacid depends on the type of examined substratum and fluctuate between: 3,75 — 95%. Aminoacids which are received in this way can be identified by chromatography.