中 国 科 学 (B 辑)
第 24 卷 第 4 期 SCIENCE IN CHINA (Series B) 1994 年 4 月

应用部分保护肽片段的硫酯合成 c-Myb 蛋白 (38— 89)-NH_2*

张若蘅 徐筱杰 唐有祺

(北京大学化学系, 北京 100871)

H. Hojo S. Aimoto

(Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan)

摘 要

本文研究了应用 4-甲基苄基氯选择性保护肽片段中的半胱氨酸巯基, 用部分保护肽片段的硫酯合成了 c-Myb 蛋白 (38— 89)-NH_2, 由 4-甲基苄基保护的巯基在硫酯的银离子活化条件下很稳定, 该方法可用于含半胱氨酸蛋白质的化学合成.

关键词 合成、硫酯法、c-Myb 蛋白

部分保护肽片段的硫酯法是近年来发展起来的一种多肽片段缩合方法; 片段缩合法采用预先纯化的肽片段进行缩合反应, 这种方法在大肽及蛋白质的合成方面显示出较大的优越性. 在完全保护肽的片段缩合法中由于应用较多的保护基使肽的溶解性能大大降低, 从而给肽片段的缩合反应及用反相高效液相色谱纯化带来很大困难, 并降低肽在纯化过程中的回收率; 由于肽片段的硫酯可以在银离子作用下选择性活化, 从而降低了保护基的数量. 部分保护肽片段的硫酯法与多肽的固相合成相结合已经成功地用于 Barnase 等蛋白的化学合成[1,2].

然而应用硫酯的片段缩合法进行含半胱氨酸蛋白的合成时, 半胱氨酸的巯基需要进行选择性保护; 本文研究了应用 4-甲基苄基选择性保护巯基的硫酯片段缩合法, 通过 c-Myb 蛋白 (38— 89)-NH_2 的高纯度合成, 证明该方法是一种行之有效的蛋白质化学合成法.

1 实 验 部 分

1.1 主要试剂和仪器

MBHA 树脂及各种保护氨基酸 (日本肽研究所), 固相合成的试剂及溶剂 (Applied

1992-12-24 收稿, 1993-07-19 收修改稿.

* 缩写及符号: c-Myb —— c-Myb 致癌基因产物, t-Boc —— 叔丁氧羰基, DCC —— N,N′-二环已基碳二亚胺, HOBt —— N-羟基苯骈三氮唑, NMP —— N-甲基吡咯烷酮, DMF —— N,N′-二甲基甲酰胺, Nle —— 正白氨酸, DIEA —— 二异丙基乙基胺, $(Ac)_2O$ —— 乙酸酐, TFA —— 三氟乙酸, p-Cresol —— 对甲苯酚, DMSO —— 二甲基亚砜, BocONSu —— 叔丁氧羰酰琥珀酰亚胺, Troc —— 三氯乙氧羰基, NMM —— N-甲基吗啡啉, RP-HPLC —— 反相高效液相色谱, IE-HPLC —— 离子交换高效液相色谱.

Biosystem Inc.), 分析型 HPLC 柱: Cosmosil $5C_{18}$ (4.6×250 mm), 制备型 HPLC 柱: YMC-Gel ODS(20×250 mm), L-8500 型氨基酸自动分析仪(日立公司), JMS-HX100 型质谱仪(日本 Jeol 公司).

1.2　固相多肽合成

美国 Applied Biosystem Inc. 430A 型自动多肽合成仪, 应用 1.4 版本软件, 采用 t-Boc 保护氨基酸, 带有侧链保护的氨基酸为: Boc Asp (OcHex), Boc Arg (Tos), Boc Cys (MeBz), Boc Glu (OBz), Boc His (Bom), Boc Lys (Cl-Z), Boc Thr (Bzl), Boc Trp (For), Boc Tyr (Br-Z); DCC/HOBt 法接肽, 溶剂为 NMP/DMF.

1.3　Boc-Gly-S-C$(CH_3)_2CH_2$CO-Nle-NH-MBHA 的合成

在手工固相反应器中加入 0.793 gMBHA 树脂盐酸盐 (0.66 mmol/g), 用 5%DIEA/CH_2Cl_2 溶液洗涤 2 次, 再用 CH_2Cl_2 洗涤 3 次, 加入 230 mg Boc-Nle (1 mmol), 3 ml 0.5 mol/L HOBt/CH_2Cl_2 溶液 (1.5 mmol) 及 2 ml 0.5 mol/L DCC/CH_2Cl_2 溶液 (1 mmol), 反应过夜; 分别用 DMF 及 CH_2Cl_2 洗涤 3 次后, 再用 5% $(Ac)_2O/CH_2Cl_2$ 溶液进行封闭反应, 制备了 Boc-Nle-NH-MBHA.

上述合成的 Boc-Nle-NH-MBHA 用 10 ml 55%TFA/CH_2Cl_2 溶液分别进行 5 min 及 25 min 的脱保护, 先用 CH_2Cl_2 进行洗涤, 再用 10%DIEA/CH_2Cl_2 溶液进行中和, 经 CH_2Cl_2 洗涤后, 在反应器中加入 218 mg Boc-Gly-S-C$(CH_3)_2CH_2$COOH (0.75 mmol), 1 ml 1.0 mol/L DCC/NMP 溶液及 1 ml 1.0 mol/L HOBt/NMP 溶液, 反应 2 h; 再用 5% $(Ac)_2O/CH_2Cl_2$ 溶液封闭 15 min, 经 CH_2Cl_2 洗涤得 Boc-Gly-S-C$(CH_3)_2CH_2$CO-Nle-NH-MBHA 待用.

1.4　c-Myb 蛋白 (38— 59)-S-C$(CH_3)_2CH_2$CO-Nle-NH_2 的合成

将上述反应合成的 Boc-Gly-S-C$(CH_3)_2CH_2$CO-Nle-NH-MBHA 在自动多肽合成仪上进行自动接肽反应, 得保护肽树脂 2200 mg.

取 550 mg 样品在 HF 反应器中, 加入 0.5 ml p-Cresol, 1.5 ml 1.4-丁二硫醇及 9 ml 无水 HF, 于 0°C 反应 90 min, 减压除去 HF; 无水乙醚洗涤 3 次, 加入 0.5 ml 醋酸, 4 ml 乙腈及 16 ml 水, 过滤除去树脂; 滤液冻干得 250 mg 粗肽, 应用制备型反相 HPLC 进行制备纯化得目标肽 85 mg(收率 24%, 以 MBHA 树脂取代值计算, 下同); 经分析型反相 HPLC 进行分析为单一峰, 保留时间 24 min(色谱条件: 流动相 A=0.1%TFA/水, 流动相 B=0.1%TFA/乙腈, B 组分在 30 min 由 10% 增至 40% 梯度洗脱); $[M+1]^+$ 计算值 2886.6, $[M+1]^+$ 实验值 2886.4; 氨基酸组成理论值: $Asp_2Thr_2Glu_5Gly_2Val_1Leu_3Lys_4Arg_2Trp_1$, 实验值 $Asp_{2.16}Thr_{2.00}Glu_{5.26}Gly_{2.14}Val_{0.98}Leu_{3.00}Lys_{4.10}Arg_{2.11}Trp_{0.88}$.

1.5　Boc-[Lys(Boc)^{40,50,52,53}]c-Myb 蛋白 (38— 59)-SC$(CH_3)_2CH_2$CO-Nle-NH_2 的合成

将 c-Myb 蛋白 (38— 59)-SC$(CH_3)_2CH_2$CO-Nle-NH_2 51 mg (18 μmol) 溶于 700 μl DMSO 中, 加入 17 μl$(Et)_3N$ (124 μmol) 及 36.8 mg BocONSu (180 μmol), 室温下搅拌反应 5 h, 应用分析型 HPLC 对反应进行跟踪分析, 反应结束后加入乙酸乙酯, 离心去上清液, 得粗肽 40.6 mg (收率 16%); $[M+1]^+$ 计算值 3885.8, $[M+1]^+$ 实验值 3885.0; 用分析型反相 HPLC 分析粗肽基本为单一峰.

1.6　Troc-[Cys(MBz)^{78}]c-Myb 蛋白 (60— 89)-NH_2 的合成

应用 0.806 g MBHA 树脂盐酸盐 (0.66 mmol/g), 在自动多肽合成仪上进行合成, 得 c-Myb

蛋白(60—89)-NH_2的保护肽树脂.

将1/2的肽树脂放入手工肽合成反应器中,用55%TFA/CH_2Cl_2溶液处理5和25min,经10% DIEA/CH_2Cl_2溶液中和及CH_2Cl_2洗涤后,加入220mg TrocONSu (0.75mmol)反应24h,用DMF及CH_2Cl_2洗涤后干燥得肽树脂1340mg. 取670mg保护肽树脂. 按实验1.4相同的方法进行HF切割反应,得粗肽400mg.

取上述合成的Troc-c-Myb蛋白(60—89)-NH_2粗肽86mg溶解在1.4ml DMF中,加入8.8mg 4-甲基苄基氯,分次加入共26μl $(Et)_3N$ (190μmol),用分析型反相HPLC分析反应进行情况,反应4h后,用制备型反相HPLC进行制备纯化,得目标肽20.7mg(收率20%); $[M+1]^+$计算值3943.8, $[M+1]^+$实验值3943.0; 氨基酸组成理论值: $Asp_6\ Thr_2\ Glu_4\ Ala_1\ Cys_1\ Val_3\ Ile_1\ Leu_2\ Tyr_1\ Lys_2\ His_1\ Arg_2\ Pro_2\ Trp_2$, 实验值: $Asp_{6.14}\ Thr_{2.05}\ Clu_{4.13}\ Ala_{1.06}\ Cys/Val_{2.05}\ Ile_{0.63}\ Leu_{2.00}\ Tyr_{1.06}\ Lys_{1.91}\ His_{1.13}\ Arg_{2.78}\ Pro_{2.10}\ Trp_{1.32}$.

1.7 [Cys(MBz)^{78}Lys(Boc)^{64,84}]c-Myb蛋白(60—89)-NH_2的合成

将50mg Troc[Cys(MBz)^{78}]c-Myb蛋白(60—89)-NH_2溶于435μl DMSO中,加入11μl $(Et)_3N$ (180μmol)及8.7mg BocONSu (38μmol),反应1h,加入乙酸乙酯沉淀反应物,沉淀物用氮气流干燥,再溶于2.5ml 50%醋酸水溶液中,加入锌粉125mg,超声振荡反应1h,离心得上清液,透析过夜,冻干得粗肽30.8mg(收率12%).

1.8 c-Myb蛋白(38—89)-NH_2的合成

将46.8mg[Cys(MBz)^{78}Lys(Boc)^{64,84}]c-Myb蛋白(60—89)-NH_2(14μmol)溶于880μl DMSO中,加入23mg HOSu (200μmol), 20μl6% NMM/DMSO溶液(11μmol), $AgNO_3$ 10mg (60μmol)及36.0mg Boc [Lys (Boc)^{40,50,52,53}]c-Myb蛋白(38—59)-$SC(CH_3)_2CH_2$-CO-Nle-NH_2 (10.7μmol),反应90min后再加入30.8mg Boc[Lys(Boc)^{40,50,52,53}]c-Myb蛋白(38—59)-$SC(CH_3)_2CH_2$-CO-Nle-NH_2 (9.2μmol)及40μl 6% NMM/DMSO溶液(22μmol).避光反应3天,用分析型反相HPLC对反应进行跟踪分析,加入乙酸乙酯得粗保护肽Boc[Cys(MBz)^{78}Lys(Boc)^{40,50,52,53,64,84}]c-Myb蛋白(38—89)-NH_2,用氮气流干燥.

将粗保护肽加到700μl TFA中,加入35μl 1.4-丁二硫醇,反应10min脱除Boc保护基,氮气流干燥,加到HF反应器中脱除MBz保护基,粗肽用制备型RP-HPLC进行纯化,再用制备型IE-HPLC进行纯化,最后用制备型RP-HPLC进行纯化脱盐,得目标肽c-Myb蛋白(38—89)-NH_2,在分析型RP-HPLC上为单峰,氨基酸组成理论值: $Asp_8\ Thr_4\ Glu_9\ Ala_1\ Cys_1\ Gly_2\ Val_4\ Ile_1\ Leu_5\ Tyr_1\ Lys_6\ His_1\ Arg_4\ Pro_2\ Trp_3$,分析值: $Asp_{8.62}\ Thr_{4.13}\ Glu_{9.16}\ Ala_{1.06}\ Cys/Gly_{2.27}\ Val_{3.23}\ Ile_{0.59}\ Leu_{5.00}\ Tyr_{0.95}\ Lys_{5.91}\ His_{1.15}\ Arg_{4.10}\ Pro_{2.00}\ Trp_{2.28}$;反应总收率2.4%.

2 结果与讨论

c-Myb蛋白属"螺旋-转折-螺旋"型DNA结合蛋白[3,4],该蛋白的N端是DNA结合部位,由三个52残基左右的类似序列结构组成,每个重复序列中均含有酪氨酸形成疏水折叠,对结合部位的三级结构起重要作用[5],通过结合部位片段分子的化学合成以获得高纯度样品将用于进行有关的结构研究,从而在结构基础上研究c-Myb蛋白与DNA相互作用的分子机制;本文合成的c-Myb蛋白(38—89)-NH_2是其中的"Repeat I",氨基酸顺序见图1,该蛋白片段在78位含有一半胱氨酸,可用于研究含有半胱氨酸蛋白质的硫酯法合成.本文所采用的合

38
Leu-Gly-Lys-Thr-Arg-Trp-Thr-Arg-Glu-Glu-Asp-Glu-Lys

Leu-Lys-Lys-Leu-Val-Glu-Gln-Asn-Gly-Thr-Asp-Asp-Trp

Lys-Val-Ile-Ala-Asn-Tyr-Leu-Pro-Asn-Arg-Thr-Asp-Val

89
Gln-Cys-Gln-His-Arg-Trp-Gln-Lys-Val-Leu-Asn-Pro-Glu

图 1　鼠 c-Myb 蛋白 (38—89) 的一级序列

成路线见图 2, 从第 59 位的甘氨酸将肽分成二个片段, 以降低硫酯缩合可能引起的消旋反应, 二个片段分别进行固相合成, 选择性部分保护并纯化后再进行片段缩合得到部分保护的目标蛋白分子, 经脱保护及纯化得到高纯度的 c-Myb 蛋白 (38—89)-NH_2, 以便应用 2D-NMR 进行结构研究.

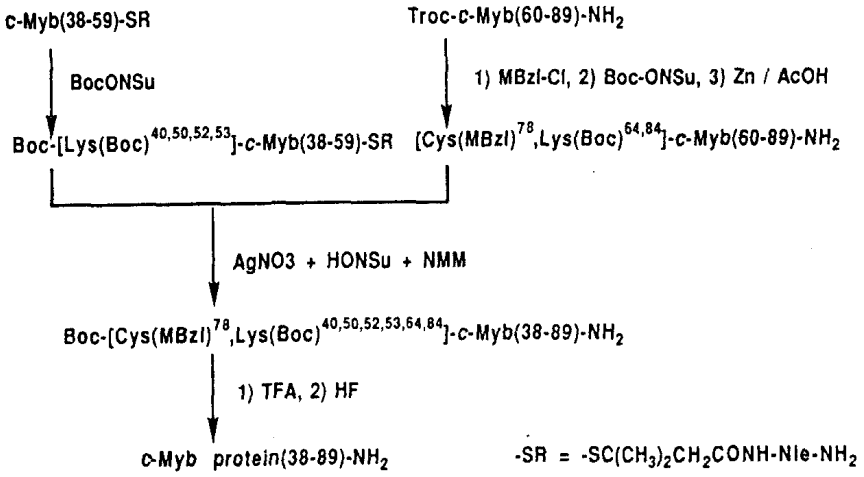


图 2　c-Myb 蛋白 (38—89)-NH_2 的片段缩合法合成路线

2.1　锚分子的应用

为了提高肽树酯的稳定性从而提高接肽反应的收率, 在制备含硫酯的 N 端肽片段时, 采用了叔碳硫酯及线性分子的 NorLeucine 作为肽与树脂间的锚分子[6]; 合成肽收率为 24%.

2.2　半胱氨酸巯基的选择性保护

采用经 HF 处理得到的 Troc-c-Myb 蛋白 (60—89)-NH_2 粗肽不经纯化直接进行第 78 位半胱氨酸巯基的选择性烷基化保护, 烷化剂为 4-甲基苄基氯. 反应液的 pH 值是影响反应的主要因素. 当 pH > 7 时, 可以观察到明显的烷化反应. 采用分批加入 $(Et)_3N$ 控制反应的 pH 以降低可能发生的其它烷化副反应. 应用 RP-HPLC 对反应进行跟踪分析并控制反应终点. 反应过程中未观察到明显的副产物峰 (见图 3). 图 3 中的杂质峰是 HF 处理后粗肽 Troc-c-Myb 蛋白 (60—89)-NH_2 中的杂质峰. 实验表明应用 4-甲基苄基氯可以较好地进行肽片段中半胱氨酸巯基的选择性保护.

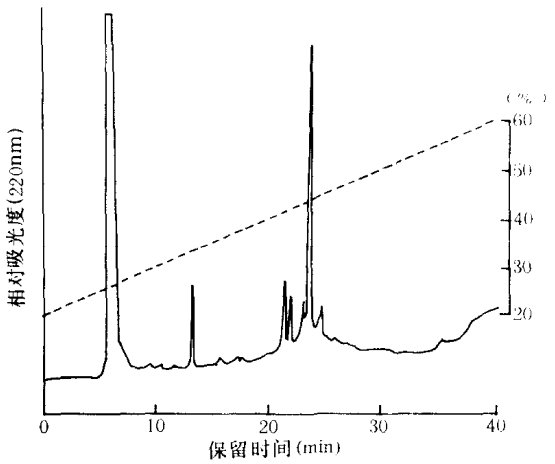


图3 N端片段第78位半胱氨酸用4-甲基苄基氯选择性保护的反相高效液相色谱图

2.3 Lys侧链ε-氨基的Boc选择性保护

采用BocONSu较顺利地进行N端及C端两个肽片段中Lys侧链ε-氨基的选择性保护；N端片段的选择性Boc保护反应进行较完全，没有观察到明显的副产物峰，主产物峰含量大于95%；但在进行C端片段的选择性Boc保护时，虽然可以控制得到较好的选择性保护结果；但随着反应时间延长或pH增加会出现明显的继续保护反应，这种继续保护的副产物峰在进行Zn/AcOH条件下脱除Troc保护基时，仍可得到目标肽.

2.4 Troc保护基的Zn/AcOH法脱除

部分保护硫酯的片段缩合法，C端肽片段的α-氨基需先进行保护以便进行侧链氨基、巯基的部分保护；另一方面，在侧链选择性保护好后，α-氨基保护基还应选择性脱除以进行片段缩合反应. 本文采用的Troc保护基在HF处理条件下有较好的稳定性，但在Zn/Ac OH条件下可以选择性脱除得到游离α-氨基；目前该保护基在采用Zn/AcOH去保护时存在约10%的副产物峰，同时脱除反应应用Zn粉并产生Zn离子都是有待于进一步改进的.

2.5 部分保护肽硫酯的片段缩合

缩合反应采用的两个肽片段分子较大，在尽可能使肽片段溶解的同时，采用高浓度进行反应可缩短反应时间并提高反应收率；反应采用RP-HPLC进行跟踪分析(见图4)，缩合反应一般需进行2—3天；反应条件下硫酯发生了某些副反应，采用大大过量的硫酯以提高C端片段的转化率，氨基酸组成分析表明：e峰为目标肽；c, d峰的氨基酸组成与N端原料片段相同，控制反应体系的pH可以大大降低c, d等副反应峰.

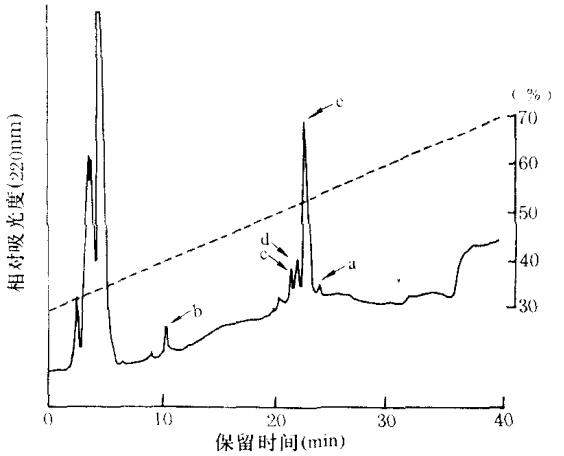


图4 N-端硫酯片段与C-端片段偶合反应的反相高效液相色谱图
e峰为产品峰

2.6 产物c-Myb蛋白(38—89)-NH_2的纯化及鉴定

缩合产物分别用TFA及HF进行脱保护，经RP-HPLC进行制备纯化，可以从反应液中很方便地纯化出纯度大于95%的目标产物，本文进一步应用IE-HPLC进行制备纯化，再用RP-HPLC进行纯化脱盐，虽然二次色谱纯化影响反应总收率，但本文得到了高纯度的目标肽c-Myb蛋白(38—89)-NH_2；氨基酸组成分析的实验值与理论值相符(图5，图6). 有关c-Myb蛋白(38—89)-NH_2结构的2D-NMR研究将另文发表.

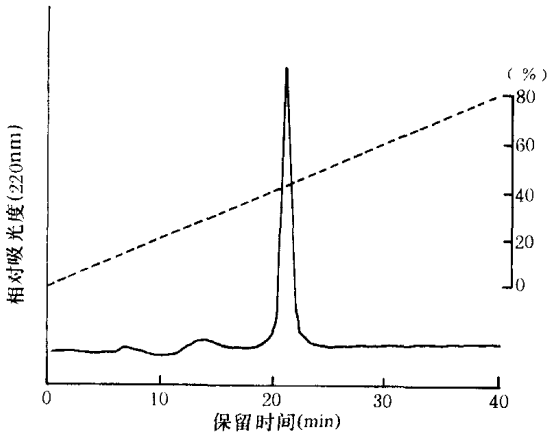


图 5　经反相高效液相色谱纯化后的 c-Myb 蛋白 (38—89)-NH_2 的离子交换高效液相色谱图

反应条件：A:0.05mol/L Na_2HPO_4/Na N_2PO_4, pH=8.0, B: A+1mol/L NaCl

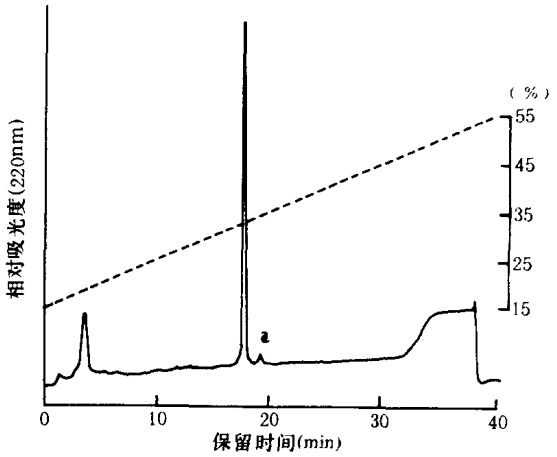


图 6　合成的 c-Myb 蛋白 (38—89)-NH_2 的反相高效液相色谱

a 峰为含胱氨酸的肽

3　结　　论

(1)将固相多肽合成与溶液法相结合，部分保护肽硫酯的片段缩合法是合成高纯度蛋白质的一种行之有效的方法.

(2)应用 4-甲基苄基氯较好地进行了肽片段中半胱氨酸巯基的选择性保护反应，4-甲基苄基保护半胱氨酸巯基的方法可用于含半胱氨酸蛋白质的硫酯片段合成法.

(3)高纯度地合成了 c-Myb 蛋白 (38—89)-NH_2 可进行有关的 2D-NMR 结构研究.

参　考　文　献

[1] Hojo, H., Aimoto, S., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1991, **64**: 111—117.

[2] Hojo, H. *et al.*, *Peptide Chemistry*, Jpn. Protein Foundation, Osaka, 1990, 23—28.

[3] Howe, K. M. *et al.*, *EMBO J.*, 1990, **9**(1): 161—169.

[4] Frampton, J. *et al.*, *Protein Engineering*, 1991, **4**(8): 891—901.

[5] Chie, K. I., Elizabeth, M. M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**: 3088—3092.

[6] Hojo, H. *et al.*, *Peptide Chemistry*, Jpn. Protein Foundation, Osaka, 1991, 115—120.