

**272. Etude de structures peptidiques à l'aide
de phénylthiocyanate V¹⁾
Sur la formation des phénylthiohydantoïnes-[³⁵S] et sur
leur chromatographie²⁾**

par **Emile Cherbuliez, Br. Baehler, J. Marszalek, A. R. Sussmann
et J. Rabinowitz**

(23 VII 63)

La détermination de la séquence d'un oligopeptide (jusqu'à 5 restes d'acides aminés) par dégradation par l'isothiocyanate de phényle selon EDMAN³⁾ peut encore être réalisée avec une quantité initiale du peptide de l'ordre de 0,1 μ mole (100 nmoles) lorsqu'on chromatographie sur papier les phénylthiohydantoïnes formées successivement avec l'acide aminé N-terminal chaque fois. Lorsqu'on remplace la chromatographie sur papier par une chromatographie sur couche mince de silice, on augmente considérablement la sensibilité de la méthode: nous avons pu établir les séquences de di- et de tri-peptides sur des quantités de l'ordre de 10 nmoles⁴⁾.

D'autre part, nous avons pu montrer que la sensibilité du procédé d'EDMAN peut être accrue par l'emploi d'un réactif radioactif (marqué au ³⁵S): avec de l'isothiocyanate de phényle d'une activité spécifique de 35–50 mC/mmole, on peut travailler encore avec 1 à 2 nmoles de peptide en utilisant la technique déjà décrite⁵⁾ 6) (identi-

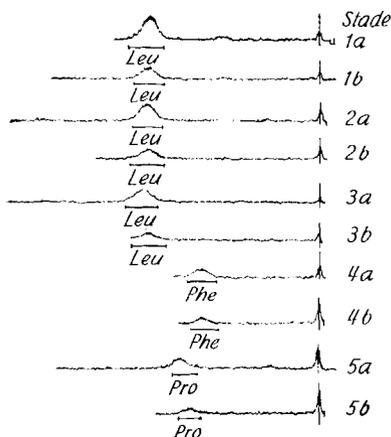


Fig. 1. Dégradation selon EDMAN du pentapeptide *H-Leu-Leu-Leu-Phe-Pro-OH* (prises: a 10 nmole, b 5 nmole; chromatographie sur papier)

¹⁾ IV^e Communication: *Helv.* 46, 1445 (1963).

²⁾ Dédié au Prof. K. BERNHARD pour son 60^e anniversaire.

³⁾ G. EDMAN, *Acta chem. scand.* 4, 283 (1950).

⁴⁾ E. CHERBULIEZ, BR. BAEHLER & J. RABINOWITZ, *Helv.* 43, 1871 (1960).

⁵⁾ E. CHERBULIEZ, BR. BAEHLER, M. C. LEBEAU, A. R. SUSSMANN & J. RABINOWITZ, *Helv.* 43, 896 (1960).

⁶⁾ E. CHERBULIEZ, A. R. SUSSMANN & J. RABINOWITZ, *Helv.* 44, 319 (1961).

Tableau I. *Dégradation selon EDMAN (réactif marqué au ³⁵S) de quelques peptides, avec identification par chromatographie sur papier*

Peptide	Quantité nmole	γ	1er stade			2e stade			3e stade			Activité spécifique du réactif mC/mmole		
			PTH Rf ^a)	Rf ^b)	Parasite Rf cpm	PTH Rf _c	Rf _r	Parasite Rf cpm	PTH Rf _c	Rf _r	Parasite Rf cpm			
H·Val-Tyr·OH	2	0,56	0,57	0,57	200	0,87	110	0,26	0,25	270	-	-	47	
	1	0,28	0,57	0,57	150	0,87	130	0,26	0,26	120	-	-		
H·Gly-Pro·OH	2	0,34	0,27	0,27	350	-	-	0,55	0,54	400	0,87	100	50	
	1	0,17	0,27	0,27	130	-	-	0,55	0,53	170	0,87	100		
H·Gly-Phé·OH	2	0,44	0,27	0,27	180	0,87	100	0,47	0,48	200	0,87	100	44	
	1	0,22	0,27	0,27	80	0,87	100	0,47	0,47	120	0,87	100		
H·Pro-Leu-Gly·OH	5	1,60	0,53	0,52	350	0,87	80	0,61	0,60	190	0,87	180	42	
	2	0,64	0,53	0,52	150	0,87	80	0,61	0,60	120	0,87	100		
H·Pro-Tyr- (N ^ε -tos)Lys·OH	5	2,80	0,52	0,52	1100	-	-	0,23	0,23	600	0,87	90	38	
	2	1,12	0,52	0,52	400	-	-	0,23	0,23	300	0,87	90		
	1	0,56	0,52	0,52	140	-	-	0,23	0,23	130	0,87	90		
H·Leu-Leu-Leu- Phé-Pro·OH	2	1,20	Pics significatifs de 120–160 cpm à tous les stades; pics parasites à Rf 0,87 (~ 90 cpm)										2	35

a) Rf_c = Rf chimique (PTH de référence) b) Rf_r = Rf des pics mesurés à l'aide de la radioactivité

fication des phénylthiohydantoïnes marquées, par comparaison de leur Rf sur papier avec ceux de substances de référence non marquées chromatographiées simultanément en des quantités permettant leur révélation chimique). Les peptides étudiés figurent dans le tableau I; pour le pentapeptide analysé nous reproduisons le graphique de la radioactivité du chromatogramme (fig. 1).

Au cours de ces déterminations, nous avons constaté toutefois que la conservation du réactif dans le diméthylformamide (solvant bien meilleur que l'éthanol ou la pyridine) laisse à désirer (apparition de pics parasites). La limite de sensibilité du procédé semble se situer autour de 1 nmole.

Pour augmenter encore la sensibilité de la méthode nous avons associé à l'emploi d'un réactif marqué, la chromatographie sur couche mince de silice.

Dans ce but, nous avons d'abord étudié les systèmes de solvants pour cette chromatographie, et nous nous sommes arrêtés aux 3 systèmes énumérés dans le Tableau II, qui se complètent assez bien pour permettre la séparation des phénylthiohydantoïnes des 17 acides aminés étudiés. Le système A nécessite l'emploi de chromatoplaques à silice réactivées par 2 h de séchage à 130–140° juste avant l'emploi (cette réactivation n'est pas nécessaire lorsqu'on utilise les systèmes de solvants B et C).

Tableau II. *Chromatographie de phénylthiohydantoïnes (PTH) de divers acides aminés sur couche mince de silice*

Solvants: A = chloroforme + isopropanol + eau (28:1:1)
 B = acétate d'éthyle + pyridine + eau (7:2:1)
 C = chloroforme + acétate d'éthyle + eau (6:3:1)

PTH	Solvants			PTH	Solvants		
	A	B	C		A	B	C
Ac. aspartique	0,00	0,17	0,00	Glycine	0,30		0,30
Ac. glutamique	0,01	0,25	0,00	Alanine	0,41		0,45
Histidine	0,01	0,58	0,00	Méthionine	0,52		0,51
Glutamine	0,02	0,65	0,02	Phénylalanine	0,56		0,53
Asparagine	0,03	0,67	0,02	Valine	0,59		0,61
Sérine	0,06	0,79	0,07	Isoleucine	0,64		0,66
Thréonine	0,11	0,83	0,14	Leucine	0,69		0,70
Tyrosine	0,19		0,35	Proline	0,75		0,61
Lysine	0,28		0,25				

La préparation des PTH des acides aminés cités a été déjà décrite¹⁾. Les chromatoplaques de Silicagel G MERCK ont été préparées selon STAHL⁶⁾ et réactivées avant leur utilisation comme suit: 2 h à 40° (à l'étuve) pour les solvants B et C; 2 h à 130–140° pour le solvant A. La révélation des taches se fait par aspersion avec le mélange: 1 vol. sol. aqueuse I₂ 0,02 M + KI 0,5 M, 1 vol. sol. aqueuse NaN₃ 0,5 M, 2 vol. sol. d'empois d'amidon à 0,5%.

Pour la dégradation nous avons remplacé le solvant diméthylformamide du réactif marqué, par du pentane pur, ce qui entraîne une diminution du nombre et des intensités des pics parasites.

Tableau III. Dégradation selon EdMAN (réactifs marqué au ³⁵S) de quelques peptides, avec identification par chromatographie sur couche mince de stice

Peptide	Quantité nmole	1er stade			2e stade			3e stade			Parasites		Activité spécifique du réactif mC/mmole		
		PTH Rf	PTH Rf	fond cpm	PTH Rf	PTH Rf	fond cpm	PTH Rf	PTH Rf	fond cpm	Stade	Rf		cpm	
H·Gly·Phé·OH	1	0,22	0,22	1900	80	0,48	1200	100				2	0,80	300	80
H·Ala·Gly·OH	1	0,15	0,38	800	100	0,28	1180	80				1	0,11	280	72
H·Pro·Leu·Gly·OH	1	0,32	0,83	1000	100	0,60	300	120	0,39	530	100	1	0,45	960	60
									0,72	400	2	0,72	400		
									0,80	280	3	0,80	280		
H·Pro·(N ^ε -tos)Lys- Asp·OH	5	2,82	0,80	1800	80	0,23	1200	80	0,17 ^{a)}	700	100	1	0,54	300	28
									0,75	300	3	0,75	300		
H·Pro·(N ^ε -tos)Lys- Asp·OH	1	0,56	0,79	1600	60	0,25	1400	100	0,23 ^{a)}	420	140	2	0,81	380	30
									0,87	220	3	0,87	220		
H·Pro·Tyr- (N ^ε -tos)Lys·OH	0,1	0,056	0,77	175	30	0,13	170	35	0,18	168	40	-	-	-	45
									0,25	1400	100	-	-	-	
H·Pro·Tyr- (N ^ε -tos)Lys·OH	1	0,56	0,84	1780	50	0,22	1300	120	0,25	1400	100	-	-	-	45
									0,25	1400	100	-	-	-	

Tous les PTH ont été chromatographiés dans le système A (v. tableau II), sauf ceux dont le Rf porte l'indice^{a)}.^{a)} Chromatographie dans le système de solvants B (v. tableau II).

Voici le mode opératoire adopté:

1° Phénylthiocarbamoyl-peptide: dans un microtube on introduit 1 à 2 μl d'une solution de phénylisothiocyanate- ^{35}S dans du pentane (5 nmoles/ μl ; activité spécifique: 80 à 30 mC/mmmole). On évapore le pentane à température ordinaire et ajoute immédiatement 2 μl de diméthylformamide. On introduit alors 2 μl d'une solution tampon (véronal sodique 0,05M) contenant en solution le peptide à étudier (2 à 1 nmole de peptide au total). Après homogénéisation du contenu du tube par agitation avec un vibreur, on bouche convenablement le tube et l'abandonne dans une étuve à 40° pendant 2 h. Après refroidissement, on ajoute 2 μl de solution de véronal sodique 0,05M et extrait l'excès de réactif par 3 fois 5 μl d'un mélange de 9 vol. de benzène avec 1 vol. de pyridine. On évapore ensuite la phase aqueuse à sec sous vide (1 à 2 Torr, à température ordinaire).

2° Cyclisation du phénylthiocarbamoyl-peptide: dans le microtube, on dissout le résidu d'évaporation par addition de 5 μl d'un mélange de 4 vol. d'acide acétique glacial et de 1 vol. de HCl conc. On bouche le tube et l'abandonne 2 h dans une étuve à 40°. On évapore à sec sous vide (1 à 2 Torr) à température ordinaire, reprend le résidu par 2 fois 2 μl d'eau et évapore chaque fois à sec sous vide.

3° Isolement de la phénylthiohydantoïne- ^{35}S (PTH) formée: on dissout le résidu dans 4 μl d'un mélange de véronal sodique 0,05M et de NaOH 0,05N (1+1 vol.) et extrait le PTH de l'acide aminé N-terminal par 4 fois 5 μl de benzène. Le PTH de l'acide aspartique est très peu soluble dans le benzène; dans ce cas, on extrait par 4 fois 5 μl d'un mélange de benzène et de méthyl-éthyl-cétone (2+3 vol.).

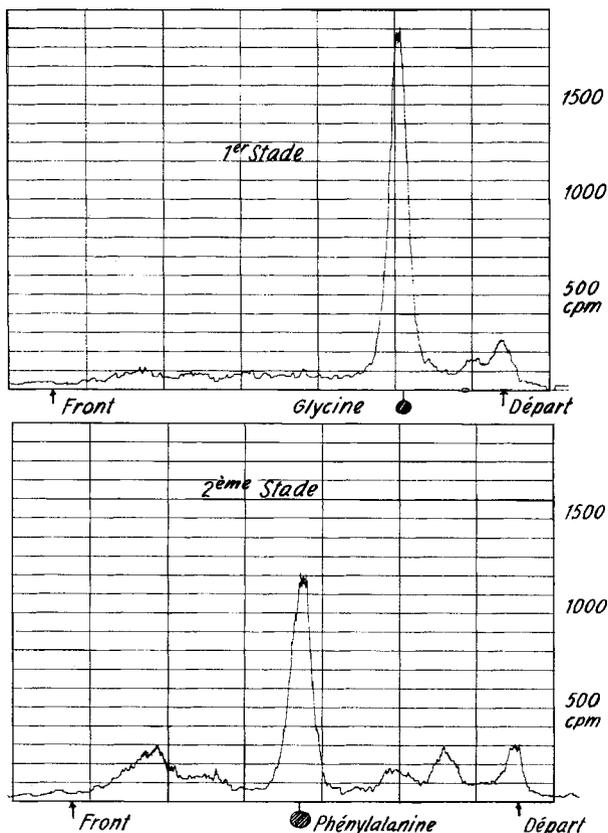


Fig. 2. Dégradation selon EDMAN du dipeptide H-gly-Phé-OH (prise: 1 nmole; chromatographie sur couche mince de silice)

4° Chromatographie des PTH: on ajoute aux extraits benzéniques réunis, les solutions des PTH de référence (dans la méthyl-éthyl-cétone) à raison de 0,5 μ l de chaque solution (0,01 M en PTH). Le tout est déposé sur les chromatoplaques de silicagel G de MÉRCK, préparées selon STAHL⁷⁾, de 5 \times 20 cm et développe dans le système de solvants approprié (A, B ou C); distance de migration: 15 cm. On sèche à l'air. Ensuite on détermine la position des taches radioactives en faisant passer les plaques dans le système détecteur et enregistreur déjà décrit⁵⁾. Les PTH de référence sont ensuite révélés chimiquement par le mélange amidon + iode + azide de Na décrit (v. Tableau II). Dans tous nos essais, les Rf radioactifs ont toujours été identiques aux Rf chimiques.

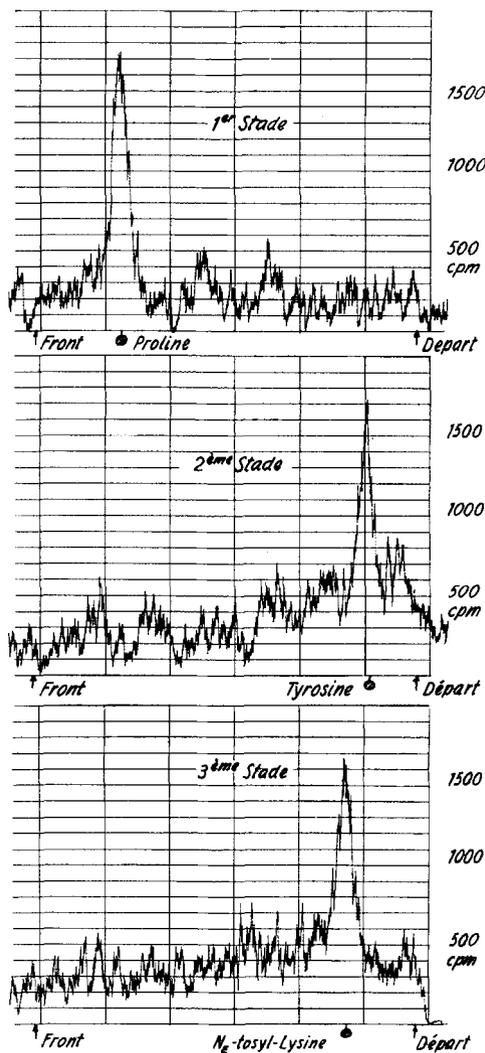


Fig. 3. Dégradation selon EDMAN du tripeptide $H \cdot Pro-Tyr-(N^\epsilon\text{-tosyl})-Lys \cdot OH$ (prise: 0,1 nmole; chromatographie sur couche mince de silice)

⁷⁾ E. STAHL, Chemiker-Ztg. 82, 324 (1958); Pharmaz. Rundschau 2 (1959).

5° La solution tampon contenant le peptide raccourci est évaporée à sec. On introduit dans le microtube la quantité voulue de phénylisothiocyanate- $[^{35}\text{S}]$ en solution pentanique, chasse le pentane, ajoute $2\ \mu\text{l}$ de diméthylformamide, $2\ \mu\text{l}$ d'eau et continue la dégradation comme décrit plus haut.

Peptides étudiés. Nous avons appliqué jusqu'à présent ce procédé de dégradation avec succès à divers di- et tri-peptides (v. Tableau III). Avec du phénylisothiocyanate- $[^{35}\text{S}]$ ayant une activité spécifique de 30 à 80 mC/mmole, nous avons pu analyser jusqu'à 0,1 nmole de peptide. Cette méthode est donc plus sensible que celle par chromatographie sur papier; en outre, les pics obtenus sont plus nets.

A titre d'exemple, nous donnons ici les courbes d'enregistrement des chromatoplaques résultant de la dégradation d'un dipeptide (glycyl-phénylalanine), fig. 2, et d'un tripeptide (prolyl-tyrosyl-N^e-tosyl-lysine), fig. 3.

Les peptides contenant un reste de sérine ou d'acide aspartique en position N-terminale ou au milieu de la chaîne peptidique, et quelquefois aussi ceux qui contiennent un reste leucyle, offrent des difficultés spéciales, au point que tout le processus de dégradation peut être arrêté par leur présence. L'étude de ce problème est en cours.

Le réactif radioactif a été préparé par le RADIOCHEMICAL CENTRE d'Amersham, que nous remercions de son obligeance. — Les auteurs remercient sincèrement la COMMISSION POUR LA SCIENCE ATOMIQUE du FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, de l'aide financière accordée pour ce travail, ainsi que M. le Professeur R. SCHWYZER (CIBA, Bâle) à qui nous sommes redevables de divers peptides synthétiques.

SUMMARY

Using a solution of $[^{35}\text{S}]$ -phenylisothiocyanate in pentane with a specific activity of 30 to 80 mC/mmole, the authors have determined the sequence of di-, tri-peptides and a pentapeptide on the following quantities: 1 to 2 nmole of peptide when the $[^{35}\text{S}]$ -phenylthiohydantoines obtained in each step of EDMAN's degradation are identified by classical paper chromatography; 0,1 to 0,2 nmole of peptide when these $[^{35}\text{S}]$ -phenylthiohydantoines are identified by silica thin layer chromatography.

In both methods, the Rf of the radioactive spots were identical with those of the reference substances which were simultaneously chromatographed and revealed chemically.

Laboratoires de chimie organique et pharmaceutique
de l'Université de Genève
