

CHROM. 4206

Révélation colorée des spots de phénylthiohydantoïne d'acides aminés*

L'analyse de la séquence des acides aminés des chaînes peptidiques selon la méthode d'Edman implique l'identification des dérivés phénylthiohydantoïne (PTH) acides aminés. Nous proposons, ci-après, une technique nouvelle d'identification de ces dérivés par révélation à la ninhydrine des spots de PTH d'acides aminés obtenus après chromatographie sur couche mince. Cette méthode est applicable sans perturbation du protocole classique d'Edman et peut permettre de réduire à un le nombre de chromatographies nécessaires à chaque stade de la dégradation.

Partie expérimentale

Matériel

Composition du réactif: 100 mg de ninhydrine (Merck ou B.D.H.), 5 ml de collidine (Merck), q.s.p. 100 ml éthanol absolu. Couche mince de gel de silice: Eastman type K 301 R. Solutions de phénylthiohydantoïne (PTH) (Mann Research) à 0.005 μ mole/ μ l dans l'acétate d'éthyle pur.

Technique de coloration

On dépose sur la couche mince, activée à 110° pendant 15 min 1 μ l de chaque PTH, soit 0.005 μ mole. Après séchage à 110° pendant 5 min, on pulvérise la solution de réactif ninhydrine-collidine. Cette pulvérisation doit être très fine mais assez abondante pour imprégner complètement la plaque**. La couche mince est ensuite portée à l'étuve à 110° pendant 15 min. On note alors des colorations qui apparaissent dans un ordre caractéristique (Tableau I).

TABLEAU I
COLORATIONS SPÉCIFIQUES DES PTH-ACIDES AMINÉS

| PTH-acides aminés | Temps d'apparition (min) | Colorations |
|------------------------|--------------------------|------------------------|
| Sérine | 1 | Rouge violacé |
| Glycine | 1.5 | Orange intense |
| Alanine | 1.5 | Rouge violacé |
| Méthionine sulfone | 2 | Brun |
| Cystine | 3 | Rose intense |
| Acide cystéique | 3 | Rose pâle |
| Asparagine | 4 | Jaune clair |
| Glutamine | 4 | Brun vert |
| Méthionine | 4.5 | Brun |
| Acide glutamique | 4.5 | Brun foncé (halo bleu) |
| Histidine | 4.5 | Jaune faible |
| Acide aspartique | 4.5 | Rose |
| Arginine | 4.5 | Jaune très faible |
| Tryptophane | 5 | Jaune intense |
| Tyrosine | 5 | Jaune paille |
| Thréonine | 5 | Brun clair |
| Lysine (ϵ -) | 7 | Rose très faible |
| Proline | 8 | Brun très faible |
| Phénylalanine | 9 | Jaune très faible |
| Leucine et isoleucine | 15 | Gris très faible |
| Valine | | Incolore |

* Contribution No. 26 du Département et du Groupe de Recherches.

** Des essais de trempage (dipping) ont été réalisés sur bandelettes Eastman. Ils ont conduit au même résultat.

Les spots atteignent leur maximum de coloration au bout de 15 min et la conservent pendant 30 min. Par la suite, les teintes pâlisent surtout à la lumière, et disparaissent au bout de quelques jours. La PTH-valine ne se colore absolument pas; les PTH de la phénylalanine (jaune), de la lysine (rose), de la leucine et de l'isoleucine (gris) sont presque imperceptibles à ce niveau de concentration. La coloration se développe également par application d'un spot de PTH acide aminé sur une plaque déjà traitée au réactif et séchée: la coloration apparaît après un nouveau passage à l'étuve.

Expériences complémentaires

Essais sur la composition du réactif. Ces essais ont été réalisés sur couche mince Eastman de la même manière que précédemment.

Ninhydrine à 0.4% dans l'acétone: les couleurs sont beaucoup plus pâles et se révèlent plus lentement.

Ninhydrine à 0.4% dans l'éthanol 95%: les couleurs sont toujours plus pâles mais leur durée d'apparition est plus réduite.

Ninhydrine à 0.4% dans l'éthanol 95% tamponnée à pH 5.5 par un tampon acétate 1 M: la variation de pH ne semble pas influencer le temps d'apparition ni les couleurs des PTH. Les résultats sont assez semblables à ceux obtenus avec une solution de ninhydrine non tamponnée.

La collidine seule ni le chauffage seul ne permettent aucune révélation.

Essais sur la composition du support. Gel de silice: Le gel est appliqué sur des plaques de verre à l'aide de l'étaleur "Camag". L'épaisseur de la couche est de 250 μ .

Gel de silice avec indicateur fluorescent et avec plâtre (Camag).

Gel de silice avec indicateur fluorescent et sans plâtre (Prolabo).

Gel de silice sans indicateur fluorescent, avec plâtre (Merck). Les colorations dans ces trois cas ne se développent que très lentement (1 h à 110° minimum), elles sont beaucoup moins intenses et plus fugaces, et évoluent rapidement, en une journée, vers une teinte uniforme jaune. Pourtant la nature et la composition du support ne semblent pas modifier l'apparition de coloration.

Papier Whatman 3 MM. Ce papier (lavé éventuellement à l'acide acétique) et séché à l'étuve pendant une heure, donne des colorations en 15 min. Les colorations sont intenses mais certaines PTH ne se différencient que très mal. Par exemple Asp, Glu, Asn, Gln, Met, Leu, Ile, Phe, Lys, sont beaucoup plus ternes que sur couches minces.

Sur ces deux types de support les résultats sont donc moins bons qu'en utilisant les couches minces Eastman.

Essais sur d'autres substances que les PTH. Les concentrations et le mode opératoire pour ces substances ont été les mêmes que ceux appliqués aux PTH-acides aminés.

Thiourée: pas de coloration.

Phénylthiourée et diphénylthiourée: pas de coloration.

Thiocyanate de sodium: pas de coloration.

Phénylisothiocyanate: légère coloration rose.

Les expériences suivantes montrent que (i) la coloration n'est pas due à l'acide aminé mais à la PTH (ii) elle se produit avec les PTH d'acides aminés issues de la dégradation aussi bien qu'avec les PTH standard.

Coloration après chromatographie de l'acide aminé libre et de la PTH qui en dérive (Essais avec Ala, Glu, Tyr, Lys)

Sur la même ligne de départ nous déposons 1 μ l de PTH à 20 μ moles/ml et 1 μ l de l'acide aminé correspondant à une concentration de 20 μ moles/ml. La couche mince est développée ensuite dans le système V de JEPSSON ET SJÖQUIST¹. Après révélation à la ninhydrine-collidine nous pouvons constater que l'acide aminé libre n'a pas migré et qu'il s'est coloré en violet alors que la PTH correspondante migre et a pris sa couleur spécifique.

Dégradation d'Edman sur deux peptides

La méthode d'EDMAN *et al.*² est appliquée à deux dipeptides de synthèse, glycylproline et glycylalanine (1 mg). Après coupure à l'acide trifluoracétique et évaporation du réactif, on n'extrait pas la thiazolinone mais on provoque sa cyclisation par HCl en présence du résidu restant. L'acide chlorhydrique est évaporé sous azote et le résidu est repris par 20 μ l d'acétate d'éthyle. 1 μ l est prélevé pour la chromatographie sur plaque Eastman dans le solvant V de JEPSSON ET SJÖQUIST¹.

Après révélation à la ninhydrine-collidine nous constatons pour le dipeptide glycylalanine: la PTH glycine a migré et s'est colorée en orange alors que l'acide aminé alanine n'a pas migré et s'est coloré en violet; pour le dipeptide glycylproline: la PTH glycine a migré et elle est orange, alors que la proline sur la ligne de départ est colorée en jaune (coloration spécifique de l'acide aminé proline par la ninhydrine).

Application à l'identification des PTH-acides aminés

L'utilisation de cette technique, conjointement à la chromatographie sur couche mince, permet une identification des PTH-acides aminés plus rapide et plus aisée dans une majorité des cas. En effet, (a) les acides aminés qui donnent lieu aux teintes les plus intenses et les plus contrastées sont parmi ceux qui se trouvent le plus abondamment dans les protéines; (b) le temps d'apparition d'une couleur contribue à l'identification du spot; (c) lors de la chromatographie des PTH-acides aminés dans les solvants IV et V (Lit. 1) on constate que l'ensemble se répartit en plusieurs groupes de R_F semblable; à l'intérieur de chaque groupe les PTH acides aminés de R_F voisins présentent des teintes différentes. Par exemple dans le solvant V on note à partir du point d'application la répartition suivante:

Groupe I ($R_F \simeq 0.05$) PTH Asn, jaune clair; PTH Gln, brun vert; PTH Ser, rouge violacé; et PTH Met O₂, brun.

Groupe II ($R_F \simeq 0.20$) PTH Glu, brun foncé; PTH Asp, rose; PTH Lys, rose très faible; PTH Tyr, jaune; et PTH Thr, brun.

Groupe III ($R_F \simeq 0.25$) PTH Try, jaune; et PTH Gly, orange intense.

Groupe IV ($R_F \simeq 0.42$) PTh Ala, rouge violacé; PTH Met, brun; et PTH Phe, jaune très faible.

Groupe V ($R_F \simeq 0.58$) PTH Leu, gris très faible; et PTH Ile, gris très faible. La proline et la valine pouvant être identifiées par leur R_F caractéristique.

On voit que dans chaque groupe une teinte identifie une PTH (d'autant mieux qu'un mélange standard est utilisé parallèlement).

La différenciation entre leucine et isoleucine reste cependant impossible par cette méthode. On peut donc adopter le protocole suivant: Après extraction de la PTH dans l'acétate d'éthyle², on dépose sur une bandelette Eastman K 301 R 1 μ l ou plus de cet extrait (correspondant à 5 nM) et on colore immédiatement. Si aucune

coloration n'apparaît, on continue l'identification de la manière classique (trois chromatographies dans trois mélanges différents). Si une coloration se développe elle permettra de sélectionner un solvant de partage. Après chromatographie en présence d'un mélange standard de PTH, la plaque est séchée puis lue sous UV courts, photographiée, enfin révélée à la ninhydrine. Cette dernière opération, si elle fournit une coloration moins bonne que la première, permet cependant de confirmer l'exactitude du résultat.

L'utilité de ce protocole est confirmée par l'exemple suivant : lors du 3ème cycle de la dégradation de la chaîne α de l'hémoglobine humaine, on a obtenu avant chromatographie un spot rouge violacé très caractéristique de la sérine ou de l'alanine. La chromatographie, en accord avec l'expérience qui montre que la réaction d'EDMAN a un très faible rendement pour la sérine, révèle à l'UV une tache extrêmement faible et qui n'aurait pas permis seule l'identification du PTH-acide aminé. L'ensemble des deux résultats permet un choix en faveur de la PTH-sérine.

Il semble donc que cette méthode de coloration, plus sensible et de mise en oeuvre plus aisée que celle au réactif de Grote³ puisse fournir une aide précieuse lors de l'étude de la structure primaire d'une protéine, tant par l'apport d'un test complémentaire que par la diminution du nombre des chromatographies nécessaires à l'identification du PTH-acide aminé.

Des tentatives d'extension de la méthode et d'interprétation du phénomène sont en cours.

Nous remercions Mr. J. F. PECHÈRE et Mr. LARS RYDÈN pour les conseils qu'ils nous ont apportés au cours de ce travail.

*Département de Biochimie Macromoléculaire (CNRS) et
Groupe de Recherches sur la Pathologie Cellulaire et
Moléculaire du Globule Rouge (INSERM), BP 1018,
34-Montpellier (France)*

GILBERT ROSEAU
PIERRE PANTEL

1 J. O. JEPSSON ET J. SJÖQUIST, *Anal. Biochem.*, 18 (1967) 264.

2 B. BLOMBÄCK, M. BLOMBÄCK, P. EDMAN ET B. HESSEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 115 (1966) 371.

3 A. LANDMANN, M. P. DRAKE ET J. DILLAHA, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 3638.

Reçu le 18 avril 1969

J. Chromatog., 44 (1969) 392-395