

CHROM. 4527

DESCRIPTION D'UNE ULTRAMICROMÉTHODE D'ANALYSE SÉQUENTIELLE DES PEPTIDES

J. M. BOIGNE, N. BOIGNE ET J. ROSA

AVEC LA COLLABORATION TECHNIQUE DE P. VIVIEN*

*Laboratoire central de Biochimie, Hôpital Saint-Vincent-de-Paul, Institut de Pathologie Moléculaire,
C. H. U. Cochin, Paris (France)*

(Reçu le 1 octobre 1969)

SUMMARY

Description of an ultra-micro method for the sequential analysis of peptides

An ultra-micro method for the routine analysis of series of peptides is described which makes it possible to work with quantities of up to 10 to 40 nmoles and to reduce the time of analysis. The phenylthiohydantoin derivatives of the amino acids (PTHAA) obtained are identified using thin-layer chromatography. This method of identification permits the number of chromatographic solvents to be kept to a minimum and allows the detection of small quantities of PTHAA of the order of 10^{-10} moles.

INTRODUCTION

Les progrès réalisés dans les méthodes d'isolement et de purification des protéines permettent maintenant d'aborder l'étude de protéines, produits de gènes mutés. Ces protéines sont souvent produites à une concentration très faible (certaines hémoglobines anormales et la plupart des enzymes) d'où la nécessité de pouvoir travailler durant toute l'analyse en ultramicrométhode. Il arrive ainsi souvent que l'on obtienne quelques dizaines de nmoles d'un peptide parfaitement pur dont la composition en acides aminés peut être déterminée mais dont la séquence reste un problème. La détermination des NH_2 terminaux par la méthode de dansylation¹ est une approche de ce problème, mais elle nécessite un équipement en électrophorèse à haute tension, ou l'utilisation de plaque pour chromatographie en couche mince en polyacrylamide de qualité extrêmement variable. Enfin, certains acides aminés sont difficilement décelables par cette technique. La méthode semi-automatique d'EDMAN, avec le "protein sequanator" (bibl. 2) nécessite des quantités trop importantes de peptide. Nous nous sommes donc attachés à adapter en ultramicrométhode la technique d'obtention des PTHAA** sur support décrite par SCHROEDER *et al.*^{3,4}, puis à identifier les PTHAA par chromatographie sur couche mince à l'aide d'une technique originale.

* Technicien de Laboratoire de la Faculté de Médecine.

** Phénylthiohydantoïne d'acide-amino.

La méthode que nous allons décrire permet de travailler sur 10 à 40 nmoles de peptides et de raccourcir de trois fois le temps utilisé couramment lorsque l'on emploie la technique d'EDMAN sur support solide.

Nous rappelons que la préparation des PTHAA sur support consiste à adsorber le peptide à étudier sur papier, à le soumettre, en milieu alcalin à $+40^{\circ}$, à l'action du phénylthio-isocyanate (PTIC), à éliminer, par le benzène, l'excès de réactif et les contaminants formés au cours de la réaction (essentiellement diphénylthiourée, DPTU), à détacher le phénylthiocarbamate d'acide-amino (PTCAA) N-terminal formé, et à le cycliser en PTHAA en atmosphère acide, puis à éluer par l'acétone ce PTHAA N-terminal.

Le peptide, amputé d'un acide-amino, demeure sur le papier et son nouvel acide aminé N-terminal est soumis au même cycle que précédemment.

L'identification des PTHAA a été faite par chromatographie en couche mince sur film de silice gel avec liant amidon. Deux migrations successives dans le même sens, dans deux systèmes différents sont effectuées.

Au terme de cette étape, 16 PTHAA peuvent être identifiés. Les différenciations Asp/Asn, Glu/Gln et Val/Phé doivent être traitées à part. Chacun de ces problèmes ne nécessite qu'une nouvelle chromatographie.

MATÉRIEL ET RÉACTIFS

Préparation des PTHAA

Matériel. Le matériel suivant était utilisé: Une boîte à gants en surpression d'air filtré (20 mbars). Cette boîte doit pouvoir contenir deux à trois portoirs hexagonaux; elle doit être obscure. Un filtre à air B. R. 4 C (Herfilco). Dessiccateurs en verre avec couvercle à robinet (diamètre intérieur, 250 mm). Étuve à 40° . Un dessiccateur à vide chauffant "Précision Scientific" (Pleuger). Papier Whatman No. 1 qui servira de support au peptide.

Réactifs. Les réactifs suivants étaient employés: Phénylthioisocyanate (PTIC) de Eastman ou Pierce. Dioxane (Merck), redistillé en éliminant les fractions de tête et de queue; le dioxane est ensuite réparti dans des flacons de 40 ml et conservé dans le réfrigérateur à $+4^{\circ}$; la conservation est d'environ 3 mois. La solution de PTIC dans le dioxane est préparée extemporanément. Pyridine p.a., Merck. Benzène p.a., Merck. Acide acétique p.a., Merck. Acide chlorhydrique p.a., Merck. Acétone p.a., redistillée sur permanganate et carbonate de potassium, pour éliminer les corps réducteurs. Méthylcellosolve (2-méthoxyéthanol), Biorad "peroxyd free", conservé sous azote.

Identification par chromatographies en couche mince

Matériel. Le matériel suivant était utilisé: Films 200×200 mm pour chromatographie en couche mince, MN Polygram, gel de silice avec liant amidon. Pipettes pour dépôts: pipette à zéro automatique, Goldbrand de $1 \mu\text{l}$, en polypropylène à étranglement capillaire. Seringues Hamilton de $1 \mu\text{l}$. Cuves de verre pour plaques 200×200 mm, à couvercle rodé.

Solvants chromatographiques. Les solvants chromatographiques appliqués sont les suivants: (I) chloroforme; (V) chloroforme-méthanol (90:10); (VII) heptane-

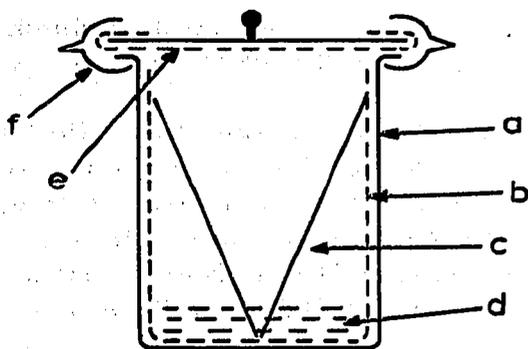


Fig. 1. Schéma de la cuve pour chromatographie en couche mince. (a) Cuve pour plaques chromatographiques de 200×200 mm; (b) Papier Whatman No. 3 MM tapissant intérieurement la cuve; (c) Plaques de verre 200×200 mm servant de supports aux films chromatographiques; (d) Solvant chromatographique introduit 24 h avant la migration; (e) Feuille de Teflon (épaisseur 1/10 mm) entourant le couvercle pour assurer une étanchéité parfaite; (f) Pinces à dessin pour maintenir solidement le couvercle sur la cuve.

pyridine (70:30). Les solvants sont utilisés 24 h après leur préparation; leur conservation est de 15 jours.

La préparation des cuves est résumée dans la Fig. 1.

Réactifs. Les réactifs suivants étaient employés: Méthylcellosolve (2-méthoxyéthanol), Biorad "peroxyd free", conservé sous azote. Méthanol p.a., Merck. Heptane Spectro, Merck. Pyridine p.a., Merck. Chloroforme p.a., Merck. Acide acétique p.a., Merck.

Solutions étalons de PTHAA. Solutions stock de chaque PTHAA, à 10 nmoles/ μ l, dans du méthylcellosolve, à partir desquelles sont préparées des solutions diluées renfermant chacune 6 à 7 PTHAA à la concentration de 1 nmoles/ μ l dans du méthylcellosolve. Ces solutions ne se conservent pas plus d'une semaine.

La composition des solutions diluées a été choisie d'après le R_F des constituants:

Solution A: Arg-Glu-Ser-Tyr-Lys-Val

Solution B: Asp-Gln-Thr-Try-Phe-Ile

Solution C: Asn-His-Gly-Ala-Met-Leu-Pro

Les solutions étalons sont conservées à $+4^\circ$, dans des flacons de 2 ml, à l'abri de la lumière.

Réactif pour révélation. Le réactif pour révélation est composé de: solution aqueuse à 10% d'azide de sodium p.a., 15 ml; iode N/10, 10 ml; eau distillée, 25 ml. Conserver à $+4^\circ$, renouveler tous les 2 jours.

PROTOCOLE

Obtention des PTHAA

Les essais ont été effectués sur des peptides trypsiques d'hémoglobine en solution aqueuse, à une concentration de 80 nmoles/100 μ l.

La préparation des PTHAA est schématisée dans la Fig. 2.

Identification des PTHAA

L'identification est effectuée comme cela est indiqué sur la Fig. 3.

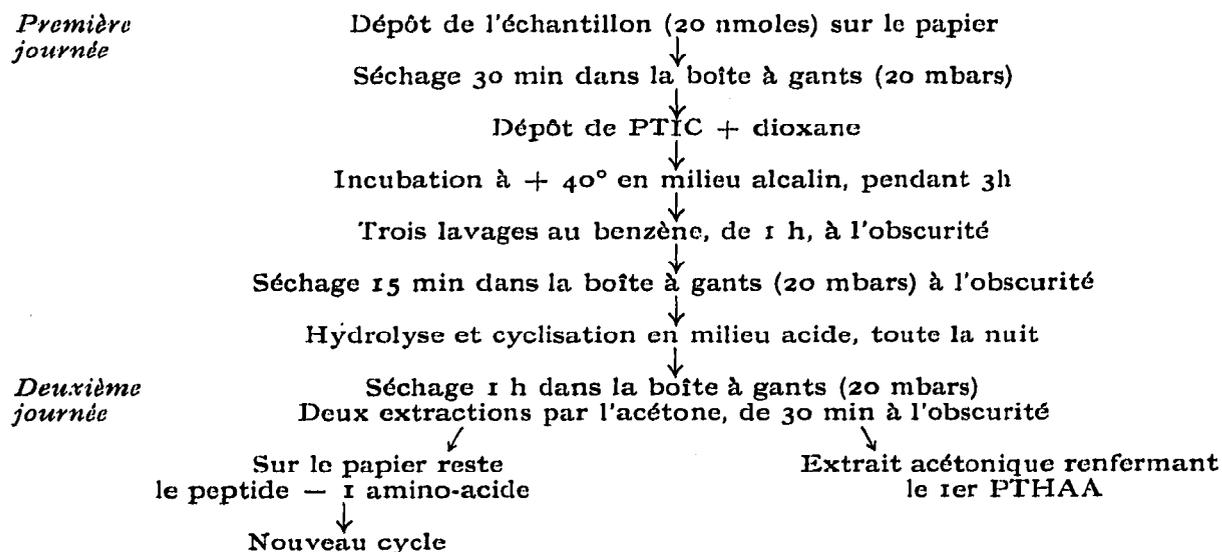


Fig. 2. Préparation des PTHAA.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Nous discuterons tout d'abord la technique chromatographique qui nous a permis d'identifier $0.5 \cdot 10^{-9}$ moles de PTHAA, puis nous étudierons les résultats d'analyse de peptides.

Technique chromatographique

Choix des plaques chromatographiques. Nous avons essayé successivement: des plaques de Gel de Silice F₂₅₄ (Merck), prêtes à l'emploi et des films Eastman type D 301 R avec indicateur fluorescent⁵. Nous avons rapidement abandonné ces types de plaques car (1) elles ne permettent pas de détecter des quantités inférieures à $5 \cdot 10^{-9}$ moles de PTHAA et (2) elles ne permettent pas d'après JEPSSON ET SJÖQUIST⁶

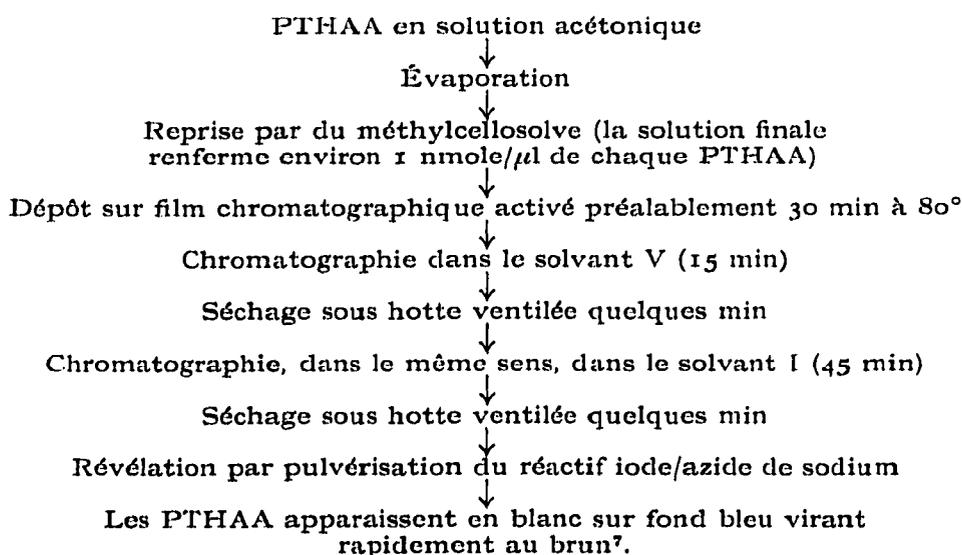


Fig. 3. Protocole chromatographique systématique.

de séparer Pro/Phe/Met et Glu/Tyr/Thr, qu'il faut différencier d'une autre manière (chromatographie sur papier par exemple).

Nous avons essayé ensuite des plaques de gel de silice selon BRENNER *et al.*⁶, mais pour éviter les inconvénients d'une double pulvérisation (amidon puis iode) nous avons essayé d'incorporer l'amidon au silica gel. Les premières plaques, silica gel + amidon, que nous avons préparées nous-mêmes, nous avaient donné de mauvais résultats (très grandes variations de R_F sur une même plaque).

Préparation des solutions étalons. Nous avons choisi le méthylcellosolve comme solvant, après en avoir essayé plusieurs d'autres: L'acide acétique à 90% préconisé par JEPSSON ET SJÖQUIST⁵ dissout mal certains PTHAA (Tyr et Asp). L'acétone utilisée par BRENNER⁶, non seulement dissout mal certains PTHAA (Lys) en particulier, mais encore s'évapore rapidement à la température du laboratoire au moment des dépôts d'où erreurs sur les quantités de PTHAA déposées. L'éthanol, moins volatil que l'acide acétique, dissout mal Gly, Asn, Pro, Gln; de plus, les solutions éthanoliques de PTHAA s'altèrent rapidement (en 8 jours pour Glu et Asp par exemple).

L'emploi du méthylcellosolve évite ces trois inconvénients: tous les PTHAA s'y dissolvent parfaitement; son point d'ébullition élevé (+124°) exclut une concentration des solutions étalons par évaporation; la conservation des solutions stock est bonne (3 mois) à +4° et à l'obscurité.

Révélation. Nous avons légèrement modifié la composition du réactif donné par BRENNER *et al.*⁶. La révélation se fait immédiatement après le séchage de la plaque. En effet, nous avons effectué des essais qui nous ont montré sans ambiguïté que l'intensité des taches diminue au bout d'une heure et qu'elles deviennent pratiquement invisibles au bout de la 5ème heure, par suite de la destruction des PTHAA à la lumière.

Solvants chromatographiques. Dans la Fig. 4 nous schématisons les résultats obtenus avec différents solvants en les comparant à ceux de BRENNER *et al.*⁶. Après avoir étudié le comportement chromatographique des PTHAA dans chacun de ces systèmes, nous sommes arrivés à séparer les PTHAA en deux grands groupes:

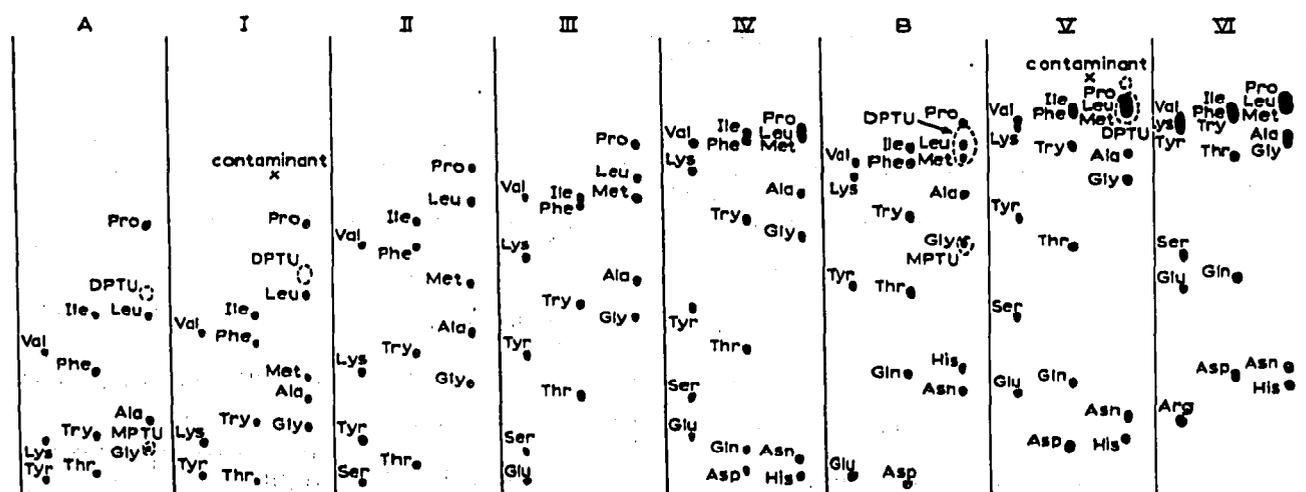


Fig. 4. Comparaison des migrations de PTHAA dans les différents solvants utilisés: (I) CHCl_3 ; (II) $\text{CHCl}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ (99:1); (III) $\text{CHCl}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ (98:2); (IV) $\text{CHCl}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ (95:5); (V) $\text{CHCl}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ (90:10); (VI) $\text{CHCl}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ (80:20). (A) CHCl_3 et (B) $\text{CHCl}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ (90:10), selon BRENNER *et al.*⁶.

(1) migrant dans le CHCl_3 pur : Tyr, Thr, Lys, Try, Gly, Ala, Met, Val, Phe, Ile, Leu, Pro.

(2) migrant dans les mélanges $\text{CHCl}_3 + \text{CH}_3\text{OH}$: Le nombre de ces PTHAA augmente au fur et à mesure que la concentration du système en méthanol augmente, ainsi que le montre la Fig. 4.

Les résultats obtenus par notre méthode personnelle sont schématisés dans la Fig. 5. Par cette technique sont identifiés sur une seule chromatographie les PTH des acides aminés suivants : Pro, Leu, Ile, Met, Ala, Lys, Gly, Try, Ser, Tyr, Thr, Glu, Gln, His, Asn, Asp. Outre sa rapidité et sa simplicité, ce procédé de double migration dans les solvants V et I élimine les interférences dues à la présence de deux contaminants : un contaminant inconnu qui migre au-delà de Pro, et le diphenylthiourée (DPTU) qui migre entre Leu et Pro, sans gêner l'identification des PTHAA (voir Fig. 5) comme cela se produisait en utilisant le seul solvant V. Il peut arriver que le DPTU soit en quantité très importante, masquant Leu et Pro ; dans ce cas, il faut faire une autre chromatographie dans le solvant I.

Suivant les chromatographies, il peut être difficile de distinguer entre Asp et Asn ainsi qu'entre Glu et Gln ; dans ce cas, la technique suivante est utilisée : après avoir déposé les solutions renfermant les PTHAA sur les films chromatographiques, $0.5 \mu\text{l}$ d'acide acétique pur est rajouté sur les taches supposées contenir Glu ou Gln, puis on procède à la migration dans le seul solvant V et à la révélation de la façon

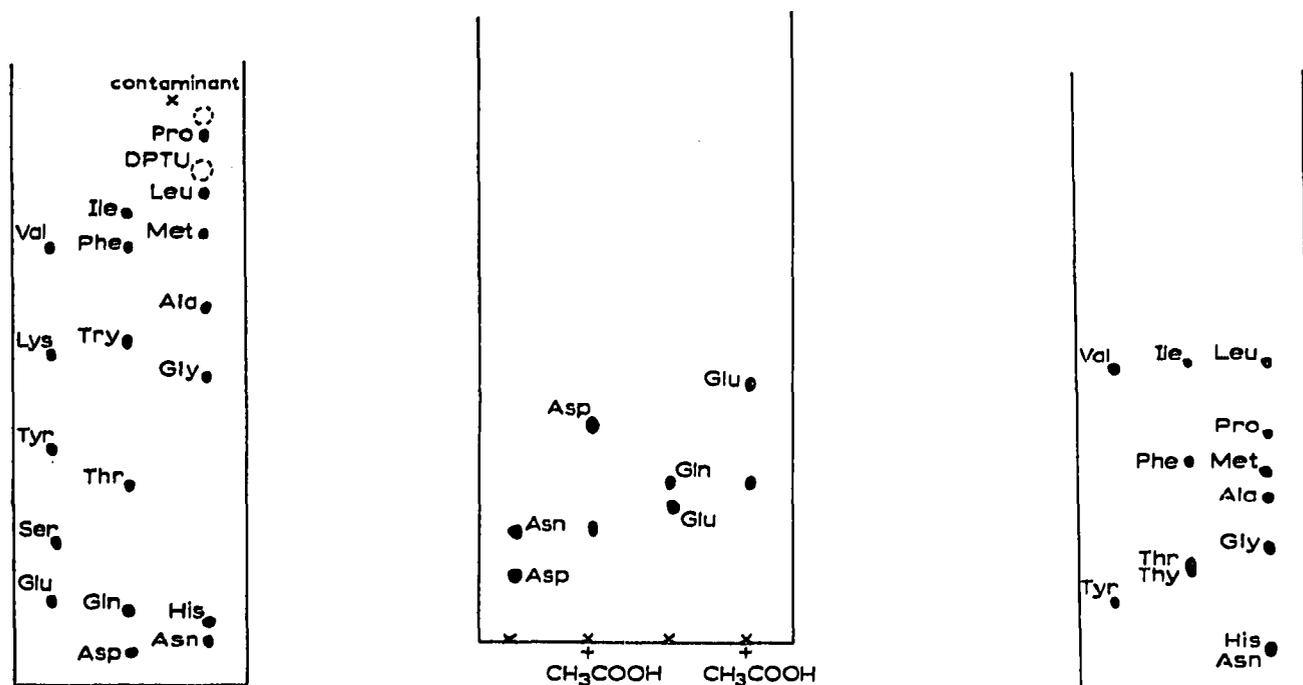


Fig. 5. Résultats obtenus par double migration, dans le même sens dans le solvant V (CHCl_3 - CH_3OH , 90:10) 8 cm, puis dans le solvant I (CHCl_3) 15 cm. Nous pouvons identifier 16 PTHAA. Les deux contaminants ne gênent pas l'identification.

Fig. 6. Différenciation Asp/Asn et Glu/Gln. Migration dans le solvant V (CHCl_3 - CH_3OH , 90:10) 10 cm. L'addition d'acide acétique sur les dépôts augmente les R_F de Asp et Glu, laissant inchangés les R_F de Asn et de Gln.

Fig. 7. Différenciation Phe/Val. Double migration, dans le même sens, dans le solvant VII (heptane-pyridine, 70:30) 2×15 cm.

TABLEAU I

COMPARAISON DES MÉTHODES ET DES RÉSULTATS OBTENUS PAR DIFFÉRENTES TECHNIQUES

Bibl.	Support	Solvants	Révélation	Quantité		Remarques	
				Déposée (moles)	Minimum détectée (moles)		
8	Papier Whatman No. 1	Heptane	I II III IV	UV	$25 \cdot 10^{-9}$	10^{-8}	Ne permet pas de séparer Leu, Ile et Pro, Lys, Ser.
		Chlorure d'éthylène	60 60 30 40				
		Acide propionique	5 30 60 —				
		<i>n</i> -Butanol	5 — — 30				
5	C.C.M. Films Eastman Type K 301 R avec indi- cateur fluo- rescent	Heptane	IV V	UV	10^{-8}	$5 \cdot 10^{-9}$	Ne permet pas de séparer Pro, Phe, Met et Glu, Tyr, Thr, qu'il faut différencier par chromato- graphie sur pa- pier.
		Chlorure d'éthylène	50 58				
		Acide propionique	— 17				
		<i>n</i> -Butanol	30 —				
		Acide formique 75%	9 —				
6	C.C.M. silica gel	Heptane	I II III IV	UV	$2 \cdot 10^{-9}$	$0,5 \cdot 10^{-9}$	Ne permet pas de séparer Leu, Ile, Asp., Glu.
		Chlorure d'éthylène	— — — 30				
		Acide propionique	— — — 18				
		Acide formique	— — — 5 21				
		Chloroforme	100 90 100 —				
		Méthanol	10 — — —				
Technique person- nelle	C.C.M. silica gel + liant amidon	Chloroforme	I V VII	Azide de Na/I ₂	$0,5 \cdot 10^{-9}$	10^{-10}	Évite pulvérisa- tion d'amidon. Plus grande sen- sibilité.
		Méthanol	100 90 — —				
		Heptane	— — — 70				
		Pyridine	— — — 30				

habituelle; l'acide déplace Glu dont le R_F augmente, alors que Gln conserve le même R_F . Il en est de même pour Asp et Asn (cf. Fig. 6).

Pour identifier Phe et Val, un autre solvant: le mélange VII (heptane-pyridine, 70:30) est utilisé en faisant deux migrations successives dans le même sens. La séparation est bonne, comme le montre la Fig. 7.

Pour identifier l'arginine, il faut utiliser le solvant VI (Fig. 4), mais le cas de l'Arg est particulier; en effet, dans l'analyse séquentielle de peptides tryptiques, Arg ou Lys seront le plus souvent le dernier résidu du peptide; d'autre part, l'analyse globale des acides aminés de la chaîne peptidique donne une indication en faveur de Lys ou d'Arg, ce qui nous permet soit d'utiliser d'emblée le solvant VI, soit d'utiliser le solvant V suivi du solvant I.

L'identification de la proline est difficile pour deux raisons: (1) sa sensibilité à la technique d'identification est quatre fois inférieure à celle des autres PTHAA; (2) en chromatographie en couche mince son R_F est voisin de celui du principal con-

TABLEAU II

RELEVÉ DES PEPTIDES ANALYSÉS

Les acides aminés en majuscules ont été identifiés sans ambiguïté. Les acides aminés en majuscules suivis de ? ont été retrouvés, mais l'identification n'est pas formelle. Les acides aminés en minuscules et soulignés n'ont pas été retrouvés.

Peptides	Quantité analysée (nmoles)	Numéros d'ordre de l'acide aminé à partir de l'acide aminé N-terminal								
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
β T ₃ normal	44 11	VAL VAL	ASP(N) asp(n)	VAL VAL	ASP asp	GLU GLU ?	VAL VAL	GLY gly	GLY ? gly	glu
Chaîne β	25	VAL	his	LEU	THR	pro	GLU	GLU ?	lys	ser
β T ₈ + 9 anormal	25	GLU	VAL	LEU	GLY	ALA	phe	ser		
β T ₁₃ normal	25	GLU	PHE	THR ?	PRO ?	pro	VAL	GLN	ALA	ALA ?
β T ₁₃ anormal	20	GLN	PHE	THR ?	PRO ?	pro	VAL	GLN	ALA	ALA ?
α T _{9 1}	10	LYS	VAL	ALA	asp	ala				
α T _{9 2}	10	ALA	VAL	ALA	his	VAL	ASP ?			

taminant, le DPTU. Si l'on augmente le volume de dépôt pour permettre sa détection, on augmente proportionnellement le contaminant. Si ce dernier est en quantité importante, il peut masquer le PTH Pro.

Le Tableau I présente une comparaison des résultats obtenus par différentes méthodes chromatographiques; ces différences portent sur le support, les solvants et les procédés de révélation.

Application à l'étude des séquences peptidiques

La méthode décrite de préparation et d'identification de PTHAA nous a permis d'identifier d'une manière directe l'acide aminé muté de deux hémoglobines anormales^{9,10}.

Dans le Tableau II sont relevés les résultats de l'analyse de quelques peptides tryptiques provenant de l'hémoglobine et d'un début d'analyse de la chaîne β . Ce tableau montre que, l'histidine mise à part, tous les autres acides aminés peuvent être identifiés.

Par suite de l'instabilité des PTHAA, déjà signalée précédemment, il est difficile de pratiquer ces analyses sur moins de 10 nmoles de peptide. Certains PTHAA sont plus instables que d'autres, en particulier ceux des amino-acides dicarboxyliques; le PTH de Pro, moins sensible vis-à-vis de la révélation, peut présenter quelques difficultés.

Nous n'avons pas pu préparer le PTH de l'His sur l'acide aminé isolé ou inclus dans une chaîne peptidique. Pour SCHROEDER *et al.*³ cette préparation est possible, mais il est nécessaire d'extraire le PTH de His par l'eau; dans un travail ultérieur⁴ il indique qu'il n'arrive pas à expliquer les résultats très irréguliers qu'il a obtenus dans la préparation de ce PTHAA.

Nous avons vérifié que, par l'acétone, 90% des 50 nmoles de PTH de His déposé sur un support papier sont extraits; bien que l'histidine n'ait pas pu être identifiée

dans une chaîne peptidique, cet amino-acide est cependant éliminé; l'acide aminé suivant est retrouvé normalement à l'étape ultérieure. La cyclisation du PTC de His en PTH de His ne se réalise peut-être pas dans les conditions opératoires utilisées.

En résumé, nous pouvons identifier un octa-peptide sur une prise d'essai de 30 à 40 nmoles par échantillon (soit 50 à 100 nmoles chaque détermination étant effectuée en double). Sur 10 nmoles, nous analysons un quadrapeptide. Sur 1 nmole, suivant la composition de la séquence, nous avons pu identifier les deux premiers acides aminés.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Docteur D. LABIE, Maître de Recherche à l'I.N.S.E.R.M., sans qui ce travail n'aurait pu être entrepris.

Ce travail a été financé par la Fondation pour la Recherche Médicale Française, et par une subvention du Ministère de la Santé Publique et de la Population.

RÉSUMÉ

Nous décrivons une ultra-microméthode d'analyse récurrentielle des séquences peptidiques permettant de travailler sur 10 à 40 nmoles et de réduire la durée de cette analyse. L'identification des phénylthiohydantoïnes d'acide aminé (PTHAA) obtenus se fait par chromatographie en couche mince. La méthode d'identification que nous avons mise au point permet de réduire au minimum le nombre des solvants chromatographiques et de détecter de faibles quantités de PTHAA de l'ordre de 10^{-10} nmoles.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 W. R. GRAY, *Method in Enzymol.*, II (1967) 469.
 - 2 P. EDMAN ET G. BEGG, *European J. Biochem.* 1 (1967) 80.
 - 3 W. A. SCHROEDER, J. R. SCHELTON, J. B. SHELTON, J. CORNICK ET R. T. JONES, *Biochemistry*, 2 (1963) 992.
 - 4 W. A. SCHROEDER, *Method in Enzymol.*, II (1967) 445.
 - 5 JEPSSON ET J. SJÖQUIST, *Anal. Biochem.*, 18 (1967) 264.
 - 6 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER ET G. PATAKI, dans E. STAHL (Rédacteur), *Thin-layer Chromatography*, Academic Press, New York, 1965, p. 427.
 - 7 N. HOHMAN-BANG, *Acta Chem. Scand.*, 4 (1950) 456.
 - 8 J. SJÖQUIST, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 447.
 - 9 J. ROSA, D. LABIE, H. WAJCMAN, J. M. BOIGNE, R. CABANNES, R. BIERME ET J. RUFFIE, *Nature*, 12 (1969) 190.
 - 10 H. WAJCMAN, J. M. BOIGNE, D. LABIE ET P. SERINGE, *Biochim. Biophys. Acta*, 188 (1969) 55.
- J. Chromatog.*, 47 (1970) 238-246