

- 7 C. H. W. HIRS, S. MOORE AND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 633.
8 W. J. DREYER AND E. BYNUM, *Methods in Enzymology*, Vol. II, Academic Press, New York and London, 1967, p. 37.
9 E. W. YEMM AND E. C. COCKING, *Analyst*, 80 (1955) 209.

Received June 16th, 1969

J. Chromatog., 44 (1969) 205-207

HRM. 4274

Détermination de l'acide aminé N-terminal d'une protéine par application de la méthode d'Edman au matériel fixé sur gel de polyacrylamide

Au cours de notre travail portant sur la séparation des deux isoenzymes du rypsinogène de mouton¹, nous avons été amené à mettre au point une technique de détermination du résidu N-terminal des protéines fixées sur gel de polyacrylamide en utilisant non pas la réaction avec le fluorodinitrobenzène (FDNB) comme l'a décrite CATSIMPOOLAS² mais bien celle au phénylisothiocyanate (PITC) selon la méthode bien connue d'EDMAN. C'est cette technique que nous allons décrire en détail.

Sur des gels à 15% d'acrylamide à pH 2.5 préparés selon CHOULES ET ZIMM³ sont placés 200 à 300 μ g de protéine afin de charger ceux-ci au maximum mais sans avoir toutefois de recouvrement des bandes. L'électrophorèse s'effectue pendant 4 h sous une différence de potentiel de 80 V. Comme la réaction avec le PITC se réalise en milieu organique basique le pH des gels a été modifié progressivement par agitation pendant 15 min dans un tampon phosphate 0.5 M pH 8.7, puis 30 min dans le même tampon auquel on ajoute progressivement un volume égal de pyridine. Ce processus a pour effet d'éviter autant que possible un éclatement des gels lors de la réaction avec le phénylisothiocyanate en milieu organique. A ce moment les gels sont à nouveau agités 1 h en présence d'un mélange composé d'un volume de tampon phosphate et d'un volume de solution de PITC à 5% dans de la pyridine. Ils sont alors placés dans une solution à 2.5% de PITC dans de la pyridine pendant une nuit. Leur aspect et leur conformation changent, ils durcissent et perdent leur transparence.

Le lendemain les gels sont lavés au benzène, ensuite recouverts de 100 ml de benzène et de 10 ml d'eau; le mélange est agité et remplacé jusqu'à ce que le support reprenne sa forme initiale et soit complètement décoloré. Les tranches de gels correspondant aux dérivés phénylthiocarbamylés des protéines sont alors découpées par comparaison avec des gels colorés au FDNB ou au bleu de Coomassie⁴ et dont l'électrophorèse a été réalisée en parallèle. Une vingtaine de tranches sont réunies, séchées sous vide et broyées afin d'être réduites en poudre; ce matériel est extrait 5 fois au benzène puis séché afin d'éliminer les traces résiduelles de solvant organique. L'hydrolyse ménagée libérant le PTH-acide aminé correspondant à l'extrémité N-terminale de la protéine est effectuée sur cette poudre à l'aide d'acide chlorhydrique 1 N à 100° pendant 90 min dans un tube à bouchon rodé. Après refroidissement on extrait 5 fois la solution acide par de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies contenant les PTH-acides aminés, sauf ceux de l'arginine et de l'histidine, sont alors lavées 3 fois par agitation en présence d'une quantité minimum d'eau. L'identification des PTH-acides aminés se réalise par chromatographie sur papier selon la méthode de SJOQUIST⁵. Elle

peut s'effectuer également très facilement par hydrolyse acide des PTH-acides aminés⁶. La solution dans l'acétate d'éthyle est évaporée à sec dans un tube à hydrolyse; après addition d'un ml de HCl 6 N, le tube est scellé sous vide et l'hydrolyse effectuée à 150° pendant 24 h. L'acide aminé N-terminal ainsi régénéré est déterminé à l'aide de l'analyseur automatique d'acides aminés.

Cette technique appliquée aux deux bandes obtenues lors de l'électrophorèse sur gel d'acrylamide du trypsinogène de mouton met en évidence, à côté de glycine, artefact inhérent à l'hydrolyse acide des PTH-acides aminés, de la valine et de la phénylalanine et cela pour chaque bande.

Ce résultat a été confirmé par réaction avec le fluorodinitrobenzène selon la technique de CATSIMPOOLAS².

Chacune des deux bandes séparées par électrophorèse est donc constituée par du trypsinogène. Des mesures d'activité trypsique potentielle l'ont confirmé. L'activité plus élevée du matériel élué de la bande rapide ainsi que des essais d'électrophorèse réalisés avec et sans persulfate, catalyseur de polymérisation nous ont permis de conclure à l'action oxydante de celui-ci⁷ dans les conditions opératoires utilisées ici.

L'intérêt de cette méthode est de permettre de caractériser, à partir de quantités minimales, les divers constituants séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide ainsi que de recouper et de confirmer les résultats obtenus par la méthode de SANGER appliquée au même matériel.

Laboratoire de Biochimie*,
Université de Liège, Liège (Belgique)

R. SCHYNS

- 1 R. SCHYNS, S. BRICTEUX-GRÉGOIRE ET M. FLORKIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 175 (1969) 97.
- 2 N. CATSIMPOOLAS, *Anal. Biochem.*, 19 (1967) 592.
- 3 G. L. CHOULES ET B. H. ZIMM, *Anal. Biochem.*, 13 (1965) 336.
- 4 A. CHRAMBACH, R. A. REISFELD, M. WYCKOFF ET J. ZACCARI, *Anal. Biochem.*, 20 (1967) 150.
- 5 J. SJOQUIST, *Biochim. Biophys. Acta*, 41 (1960) 20.
- 6 H. O. VAN ORDEN ET F. H. CARPENTER, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 14 (1964) 399.
- 7 R. SCHYNS, *J. Chromatog.*, 36 (1968) 549.

Reçu le 4 juillet 1969

* Directeur: Professeur M. FLORKIN.