



УДК 577.152.277'6:577.112.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА β' -СУБЪЕДИНИЦЫ
ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI*.
ГИДРОЛИЗ ТРИПСИНОМ

Богачук А. И., Еврвченко Т. В., Селюченко О. А.,
Шубаева Т. М., Липкин В. М.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва

Проведен гидролиз карбоксиметилированной β' -субъединицы РНК-полимеразы трипсином. Продукты гидролиза разделены гель-фильтрацией на биогеле Р-4 с последующей хроматографией на катионите и очищены с помощью хроматографии и электрофореза на бумаге. Смесь крупных пептидов подвергнута дополнительно расщеплению протеназой из *Staphylococcus aureus* с разделением полученных фрагментов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлена полная аминокислотная последовательность 162 и частичная 10 пептидов. Изученные пептиды в сумме содержат 862 аминокислотных остатка, входящих в полипептидную цепь β' -субъединицы.

Для понимания механизмов транскрипции необходимо иметь детальную информацию об организации активных центров ДНК-зависимой РНК-полимеразы (КФ 2.7.7.6) на разных этапах синтеза РНК. Такая информация может быть получена только на основании изучения аминокислотной последовательности субъединиц, составляющих фермент, и пространственной структуры фермента в целом. Аминокислотная последовательность меньшей из субъединиц РНК-полимеразы (α) (M_r 36 512) была установлена традиционными методами белковой химии [1]. В процессе определения первичной структуры β - и β' -субъединиц, имеющих значительно большие молекулярные массы (150 000 и 155 000 соответственно) возник ряд методологических трудностей, в частности при выделении и очистке фрагментов, полученных в результате расщепления белка, а также при реконструкции аминокислотной последовательности, требующей выделения и установления структуры большого числа крупных «перекрывающихся» пептидов. Ввиду этого для определения аминокислотной последовательности β - и β' -субъединиц РНК-полимеразы был использован подход, состоящий в параллельном исследовании первичных структур белков и соответствующих структурных генов *proB* (β -субъединица) и *proC* (β' -субъединица) [2, 3]. При реализации такого подхода основной задачей структурного анализа белка становится выделение и определение аминокислотной последовательности пептидов, покрывающих всю полипептидную цепь белка. Для этого можно использовать короткие (состоящие из 5–20 аминокислотных остатков) пептиды. Методы их разделения хорошо разработаны, и для определения их структуры достаточно небольшого количества материала.

Ранее нами была опубликована нуклеотидная последовательность фрагментов ДНК *E. coli*, покрывающих весь структурный ген β' -субъединицы РНК-полимеразы, и соответствующая ему аминокислотная последовательность белка [4–6], описано выделение и определение аминокислотной последовательности ряда пептидов, полученных при расщеплении β' -субъединицы бромцианом [7]. Целью данной работы является изучение продуктов триптического гидролиза β' -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*.

Трипсин был выбран в качестве гидролизующего агента, поскольку, во-первых, он обычно количественно расщепляет чувствительные к его

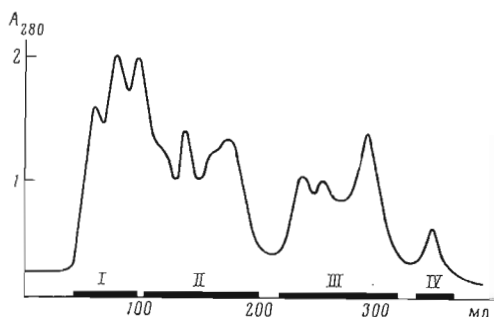


Рис. 1. Разделение пептидов, полученных в результате гидролиза β' -субъединицы трипсином, гель-фильтрацией на колонке (2,5×100 см) с биогеом Р-4 в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буферном растворе (рН 8,4). Отмечены границы объединения фракций

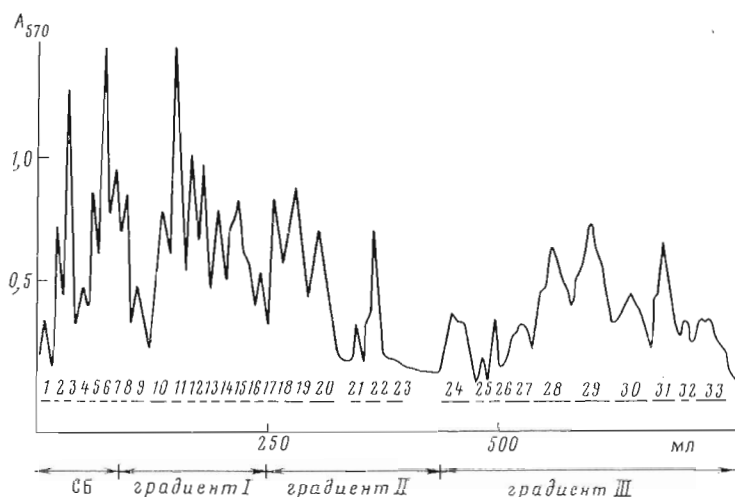


Рис. 2. Разделение растворимых пептидов фракции II (рис. 1) с помощью ионообменной хроматографии на колонке (0,6×60 см) с аминоксом АС-50W×4. Здесь и на рис. 3-6 отмечены границы объединения фракций. Состав стартового буфера (СБ) и градиентов здесь и на рис. 3, 4 см. в «Экспер. части»

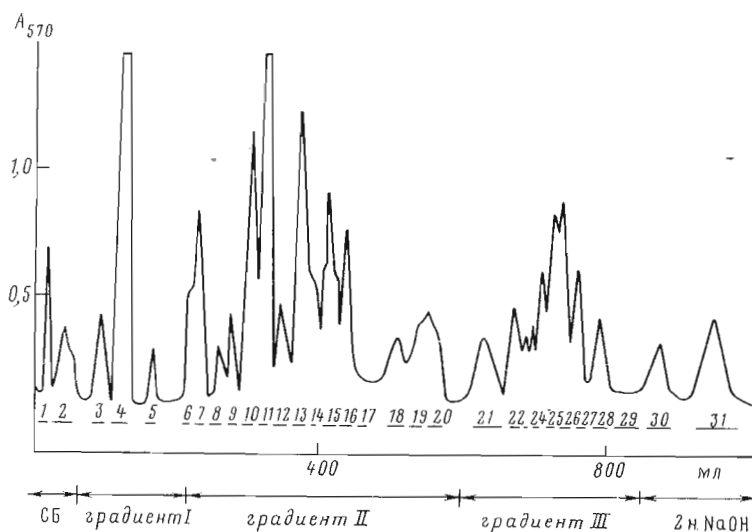


Рис. 3. Разделение пептидов фракции III (рис. 1) с помощью ионообменной хроматографии на колонке (0,6×60 см) с аминоксом АС-50W×4

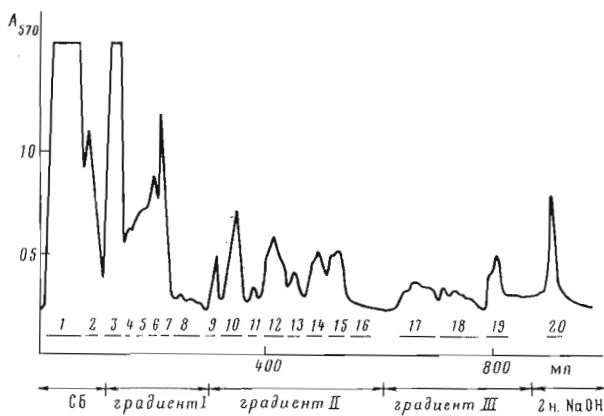


Рис. 4. Разделение растворимых пептидов фракции I (рис. 1) с помощью ионообменной хроматографии на колонке (0,6×60 см) с катионообменной смолой аминекс AG-50W×2

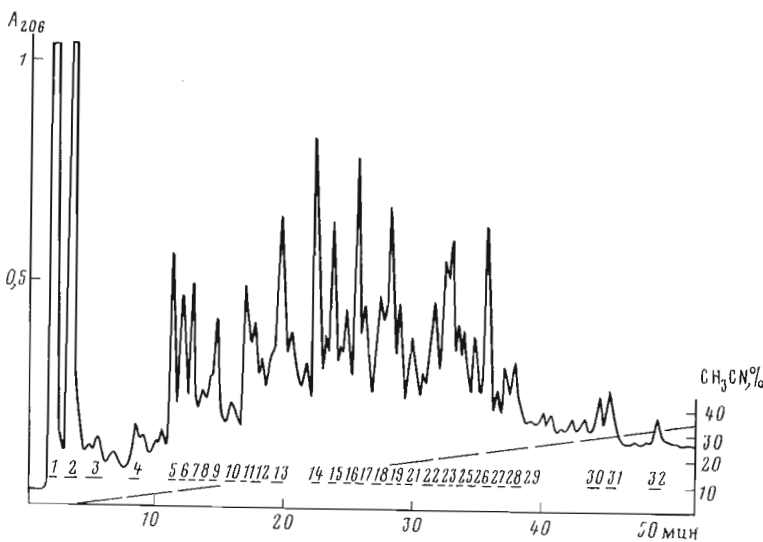


Рис. 5. Разделение пептидов фракции I-St-I на колонке (0,46×25 см) с силсорбом С 18 в 0,01 М аммоний-ацетатном буфере, рН 6,5. Градиент ацетонитрила 0–35%, скорость элюирования 2 мл/мин

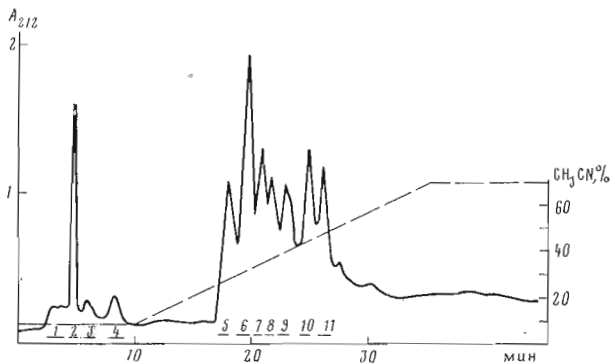


Рис. 6. Разделение пептидов фракции I-St-II на колонке Ultrosyl С 8, уравновешенной 0,05% трифторуксусной кислотой, оттитрованной 25% аммиаком до рН 6,0, в градиенте концентрации ацетонитрила (10–70%). Скорость элюирования 1 мл/мин

действию связи, образованные карбоксильными группами остатков лизина и аргинина, а во-вторых, наличие в полипептидной цепи β' -субъединицы 180 остатков лизина и аргинина [8] обеспечивало образование пептидов, удобных по своим размерам для дальнейшего структурного анализа. Гидролиз карбоксиметилированного белка проводился в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере (рН 8,4) при фермент-субстратном соотношении 1:25. Первоначальное фракционирование осуществлялось гель-фильтрацией на колонке с биогелем Р-4. В результате были получены четыре фракции (рис. 1).

Результаты аминокислотного и N-концевого анализа фракции IV показали, что ее основными компонентами были свободные аргинин и лизин. Их большой выход (28 и 14 мкмоль соответственно) указывает на наличие в цепи белка неоднократно встречающихся кластеров этих аминокислот. При концентрировании упариванием фракций I и II образовались осадки, которые были отделены центрифугированием.

Фракции II (растворимая часть) и III состояли из относительно небольших пептидов (2—15 аминокислотных остатков). Для их разделения была использована традиционная схема, основанная на первоначальном фракционировании на катионите аминекс AG 50W \times 4 с последующим разделением полученных фракций хроматографией на бумаге. Элюирование пептидов с катионита осуществлялось системой пиридин-ацетатных буферных растворов с экспоненциальным градиентом рН и концентрации (рис. 2, 3). Поскольку фракция I представляла собой смесь более высокомолекулярных пептидов, для ее разделения использовался катионит аминекс AG 50W \times 2 (рис. 4).

В результате ионообменной хроматографии из фракций I, II, III получены объединенные фракции (20, 33 и 31 соответственно). Их состав анализировался с помощью хроматографии в тонком слое целлюлозы и определения N-концевых аминокислотных остатков. Все фракции представляли собой смеси нескольких пептидов, и для их последующего препаративного разделения в большинстве случаев использовалась хроматография на бумаге.

Разделение пептидов фракций I-T-1, I-T-3, I-T-4, II-5, II-6, II-7, II-10 и II-14, не образующих четких зон при хроматографировании на целлюлозе, проводилось гель-фильтрацией на сефадексе G-25 (тонкий и сверхтонкий) с последующей хроматографией на бумаге.

Для разделения выпавших в осадок пептидов фракции II использовалось различие в их растворимости. Осадок растворялся в 20% муравьиной кислоте и экстрагировался *n*-бутиловым спиртом. Из спиртовой фазы хроматографией на сефадексе G-50 (сверхтонкий) был выделен пептид II-B-1, обессоливание же раствора в муравьиной кислоте на сефадексе G-10 позволило получить пептид II-M-1.

Анализ осадка фракции I с помощью метода пептидных карт показал, что он состоит из смеси крупных пептидов, не обладающих заметной электрофоретической и хроматографической подвижностью. С целью облегчения процесса разделения и последующего анализа пептидный материал осадка суспендировался в 0,1 М аммоний-ацетатном буферном растворе (рН 4,0) и подвергался дополнительному гидролизу протеиназой из *Staphylococcus aureus* (фермент-субстратное соотношение 1:20). По окончании гидролиза нерастворившиеся пептиды были отделены центрифугированием. Растворимые пептиды (фракция I-St-I) разделяли на колонке Silasorb C 18 (рис. 5), осадок (фракция I-St-II) растворяли в 6 М хлоргидрате гуанидина, рН 8,0, и хроматографировали на колонке с Ultrosyl C 8 (рис. 6).

Таким образом из фракций I, II, III были выделены 24, 85 и 63 пептида соответственно. Данные о распределении пептидов по фракциям и их аминокислотный состав представлены в табл. 1. Из таблицы видно, что в ряде случаев пептиды с одинаковым аминокислотным составом были выделены из различных объединенных фракций. Такое поведение пептидов связано с их неполным разделением при первоначальной гель-фильтрации или ионообменной хроматографии.

Аминокислотный состав пептидов, полученных в результате гидролиза β' -субъединицы трипсина

Аминокислота	Пептиды							
	I-T-1-3-10	I-T-1-5-2	I-T-1-5-3	I-T-1-5-4	I-T-3-4-3	I-T-3-4-10	I-T-3-4-14	I-T-14-10
Asp	—	2	1	—	—	2	—	2
Thr	—	—	1	—	1	2	1	1
Ser	2	—	—	—	1	—	—	1
Glu	2	1	2	2	2	1	3	—
Pro	1	—	—	—	1	2	1	2
Gly	2	1	—	1	2	1	—	1
Ala	2	2	2	3	—	2	3	—
Val	1	1	2	—	—	3	2	2
Cys(Cm)	—	—	—	—	—	—	—	—
Met	—	—	1	1	—	—	—	—
Ile	3	—	1	1	1	1	—	1
Leu	1	1	1	2	—	2	3	1
Tyr	—	—	—	—	—	—	—	1
Phe	1	—	—	—	—	—	—	—
His	—	—	—	—	—	—	1	—
Lys	1	1	—	1	1	1	—	—
Arg	—	—	1	—	—	1	1	—
Trp	—	—	—	—	—	—	—	—
N-Концевая	Glu	Asp	Val	Met	Ile	Val	Ala	Leu
Число остатков	16	9	12	11	9	18	15	12
Выход, %	18	15	4,5	9	5	7,5	3	18

Аминокислота	Пептиды							
	I-St-I-1	I-St-I-8	I-St-I-9	I-St-I-19	I-St-I-23	I-St-I-24	I-St-I-31	I-St-I-32
Asp	—	1	—	—	1	2	—	1
Thr	1	—	—	—	—	1	—	1
Ser	—	2	—	—	—	2	—	—
Glu	2	1	—	1	1	1	2	2
Pro	2	—	—	—	—	—	—	—
Gly	—	—	—	1	2	1	—	—
Ala	4	3	—	—	—	2	—	—
Val	1	—	1	1	—	1	—	—
Cys(Cm)	—	—	—	1	—	—	—	—
Met	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	—	1	—	—	1	1	—
Leu	—	1	—	—	—	1	—	—
Tyr	—	—	—	—	—	—	—	—
Phe	—	—	—	—	—	1	—	—
His	—	—	—	—	—	—	—	—
Lys	—	—	—	—	—	—	—	—
Arg	—	—	1	—	—	—	—	—
Trp	—	—	—	—	—	—	—	—
N-Концевая	Ala	Asp	Val	Cys	Gly	Ala	Ile	Gln
Число остатков	10	8	3	4	4	13	3	4
Выход, %	12	9,5	25	8	10	9,5	7	12

Для определения N-концевой аминокислотной последовательности пептидов применяли метод Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 1-диметиламинонафталин-5-сульфонильных (Dns) производных, фенолтиогидаптоинов (Pth) и 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-тиогидаптоинов (DABth) аминокислот.

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислота	Пептиды							
	I-St-II-2	I-St-II-3	I-St-II-4	I-St-II-7	I-St-II-8	I-St-II-9	I-St-II-10	I-St-II-11
Asp	—	—	2	2	1	—	—	—
Thr	—	—	1	—	1	—	—	1
Ser	—	—	2	—	3	—	1	—
Glu	2	1	1	3	1	2	1	1
Pro	—	—	—	—	—	—	—	—
Gly	2	—	2	—	1	—	—	—
Ala	1	—	1	1	1	1	—	—
Val	1	2	1	2	2	1	—	—
Cys(Cm)	—	—	—	—	—	—	—	—
Met	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	1	1	1	—	1	2	1
Leu	—	—	1	1	4	1	—	—
Tyr	—	—	—	—	—	—	—	—
Phe	—	—	—	—	—	—	—	—
His	—	—	—	—	—	—	—	—
Lys	—	—	—	—	—	—	—	—
Arg	—	—	1	—	1	—	—	—
Trp	—	—	—	1	—	—	—	—
N-Концевая	Gln	Val	Asp	Glu	Leu	Ala	Ile	Ile
Число остатков	6	4	13	11	15	6	4	3
Выход, %	7	4	5	3,5	4	9	8,5	10

Аминокислота	Пептиды									
	II-B-1	II-M-1	II-3-6, II-4-6	II-3-9, II-3-10	II-3-11, II-3-12	II-3-13	II-4-2	II-5-1-1, II-5-2	II-5-1-3, II-6-12-2	II-6-3-5
Asp	1	2	3	1	—	—	2	1	—	—
Thr	1	—	2	—	1	1	—	—	—	1
Ser	—	—	—	—	—	1	—	—	2	—
Glu	1	3	2	2	—	—	—	3	2	1
Pro	1	—	—	—	1	1	—	—	—	—
Gly	1	—	—	1	2	1	—	1	—	1
Ala	1	1	1	—	1	—	1	—	3	3
Val	1	3	1	1	—	2	1	—	1	2
Cys(Cm)	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Met	1	—	2	—	—	—	—	—	—	—
Ile	3	2	1	—	1	1	—	—	1	—
Leu	2	1	1	2	1	1	—	—	—	1
Tyr	1	—	—	1	1	1	—	—	—	—
Phe	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
His	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lys	1	—	—	—	—	—	1	1	1	1
Arg	—	1	1	—	—	1	—	—	—	—
Trp	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—
N-Концевая	Ile	Glu	Ala	Glu	Leu	Ser	Asp	Asp	Ala	Val
Число остатков	16	14	14	8	8	10	6	6	10	10
Выход, %	8,5	5	10,5	14,5	7	10	7,5	13	10	10

C-Концевые аминокислотные последовательности пептидов определяли с помощью карбоксипептидаз А, В и Y.

Полная структура 107 пептидов установлена с использованием только деградации по методу Эдмана и с помощью карбоксипептидаз. Результаты анализа структуры этих пептидов, а также 10 пептидов, для которых определена частичная структура, приведены в табл. 2.

Для установления структуры ряда пептидов применялись дополнительные гидролизы трипсином, протеиназой из *St. aureus*, расщепление с по-

Таблица 1 (продолжение)

Амино-кислота	Пептиды									
	II-7-3-7	II-7-3-8	II-8-2	II-8-3	II-8-5, II-10-4-7	II-8-6	II-8-7, II-15-14	II-9-1	II-9-2	II-9-3
Asp	2	1	1	—	1	1	1	1	—	1
Thr	3	1	2	1	—	1	—	—	—	—
Ser	—	—	—	—	—	—	—	3	—	1
Glu	1	—	—	1	—	—	—	—	1	—
Pro	—	1	—	1	—	—	1	—	—	1
Gly	1	2	1	3	1	1	1	1	1	—
Ala	—	—	—	—	1	—	—	—	—	2
Val	—	—	1	1	—	—	—	2	1	—
Cys (Cm)	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—
Met	1	—	—	1	—	—	1	—	—	1
Ile	2	1	—	1	—	1	1	—	1	2
Leu	—	1	—	—	1	2	4	—	—	1
Tyr	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Phe	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—
His	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lys	—	—	—	1	—	1	—	1	1	—
Arg	1	1	1	—	1	—	1	—	—	1
Trp	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N-Концевая	Phe	Asp	Asp	Gly	Asp	Asp	Ile	Ser	Gly	Ile
Число остатков	12	8	6	10	7	7	10	8	6	10
Выход, %	17,5	7,5	9,5	7,3	16	9	14	12,5	4,5	10

Амино-кислота	Пептиды									
	II-9-5	II-10-3-3	II-10-3-6 II-10-4-6	II-11-1	II-11-2	II-11-4	II-11-5	II-12-1	II-12-3 III-9-2	II-13-2-1
Asp	1	1	1	2	1	—	—	—	1	2
Thr	—	1	—	—	—	—	2	1	—	—
Ser	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—
Glu	1	—	1	—	1	—	—	1	—	—
Pro	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gly	1	1	1	—	—	1	1	—	—	—
Ala	1	1	—	3	—	2	1	—	1	—
Val	1	—	2	—	—	1	—	—	—	—
Cys (Cm)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Met	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	1	1	1	—	1	—	1	—	—	1
Leu	1	—	—	—	—	1	1	—	1	—
Tyr	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Phe	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
His	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lys	1	1	—	—	—	1	1	1	—	1
Arg	—	—	1	1	1	—	—	—	1	—
Trp	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N-Концевая	Ser	Ala	Glu	Ala	Asp	Gly	Gly	Glu	Asp	Ile
Число остатков	9	7	7	6	4	6	7	3	4	4
Выход, %	6	9	7,5	4	60	17,5	18	8	32	2,5

мощью бромциана и гидросиламина. В некоторых случаях удалось исключить стадию разделения и очистки полученных пептидных фрагментов — определение их аминокислотной последовательности проводилось путем анализа смеси двух компонентов (табл. 3).

Структура остальных пептидов определялась как описано ниже.

Пептид I-T-1-3-10 (1152—1167) (табл. 4). После определения N-концевой аминокислотной последовательности пептид был гидролизован про-

Аминокислота	Пептиды								
	II-13-2-2	II-13-4	II-14-1-1	II-14-1-2	II-14-1-8, II-15-8	II-14-1-9, II-15-9	II-15-5, III-12-5	II-15-6	II-15-7
Asp	—	—	1	—	3	1	—	—	1
Thr	1	—	—	—	1	—	—	—	—
Ser	—	1	—	—	1	—	1	—	1
Glu	—	1	1	2	—	1	—	1	—
Pro	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gly	2	1	—	—	—	—	1	1	—
Ala	1	2	—	1	1	2	—	—	—
Val	—	—	—	—	—	1	—	1	1
Cys(Cm)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Met	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	1	—	—	—	—	1	—	—
Leu	—	—	—	—	2	1	—	1	1
Tyr	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Phe	—	—	—	—	1	1	—	—	—
His	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lys	1	—	1	—	—	—	1	1	1
Arg	—	1	—	1	1	1	—	—	—
Trp	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N-Концевая	Thr	Gly	Asn	Glu	Phe	Val	Gly	Leu	Leu
Число остатков	5	7	3	4	11	8	4	5	5
Выход, %	2,5	22	3	14,5	26	50	11	27	6,5

Аминокислота	Пептиды									
	II-16-4	II-16-6	II-17-2, II-17-3	II-17-6	II-19-10-1	II-19-10-2	II-19-13	II-20-6	II-21-5, II-22-6	II-21-6, II-22-7, II-22-8
Asp	—	—	—	1	1	1	—	1	1	1
Thr	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Ser	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
Glu	1	—	1	1	—	—	—	1	1	1
Pro	1	2	—	—	1	—	1	—	1	—
Gly	—	1	—	1	—	1	1	1	—	2
Ala	—	—	—	—	1	2	—	1	—	—
Val	—	1	1	—	—	—	1	1	1	2
Cys(Cm)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Met	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	1	—	1	—	—	1	1	—	1
Leu	1	1	—	1	2	2	—	1	2	1
Tyr	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—
Phe	—	—	—	1	—	—	1	—	—	—
His	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
Lys	—	1	—	—	1	2	1	2	—	1
Arg	1	—	1	1	1	—	—	—	1	1
Trp	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N-Концевая	Glu	Ile	Val	Leu	Asp	Lys	Ile	Ser	Glu	Gly
Число остатков	4	8	3	7	7	9	6	10	8	10
Выход, %	12	2,5	20	23	12,5	12,5	5,5	4,5	30	22

теиназой из *St. aureus* в стандартных условиях. Анализ полученной смеси позволил установить N-концевую последовательность C-концевого фрагмента. Из химотриптического гидролизата пептида I-T-1-3-10 методом хроматографии в тонком слое целлюлозы были выделены C-концевой дипептид Gly-Lys и определена его структура. Полученные данные позволили реконструировать аминокислотную последовательность пептида I-T-1-3-10.

Таблица 1 (продолжение)

Амино-кислота	Пептиды									
	II-22-3	II-24-1	II-24-6	II-27-2	II-27-3, III-27-4	II-28-2-1	II-28-2-2, II-29-5, II-29-6	II-29-1	II-29-8	II-30-4, II-30-5, III-30-4
Asp	1	—	—	1	—	1	—	—	—	—
Thr	—	1	—	—	1	1	1	—	—	—
Ser	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
Glu	1	—	1	—	—	1	1	1	—	—
Pro	—	—	—	—	1	1	1	—	—	—
Gly	—	—	—	1	—	—	—	2	1	—
Ala	—	—	—	—	1	—	—	—	2	—
Val	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—
Cys(Cm)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Met	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	—	2	2	—	1	—	—	—	—
Leu	1	1	—	—	1	—	—	—	2	1
Tyr	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1
Phe	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
His	—	—	1	1	1	—	—	—	1	—
Lys	—	2	—	1	—	1	1	1	—	—
Arg	2	—	1	—	1	1	1	1	1	1
Trp	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N-Концевая	Arg	Lys	His	Gly	Ala	Lys	Thr	Gly	Ser	Leu
Число ос- татков	5	4	7	6	6	8	6	5	9	3
Выход, %	5	6	7	24	12	11	22,5	8	15	25,5

Амино-кислота	Пептиды									
	II-32-1, II-32-2, II-33-1	II-32-3, II-33-4	II-32-4	II-32-5	II-33-2, II-33-3, III-33-3	III-3-3, III-4-3	III-8-5	III-10-2, III-11-3	III-10-3	III-11-1
Asp	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Thr	—	—	1	—	—	1	1	—	—	—
Ser	—	—	1	2	—	—	—	1	1	—
Glu	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pro	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
Gly	1	—	2	—	—	1	1	—	—	—
Ala	—	—	2	—	—	1	1	—	1	—
Val	—	2	—	—	—	1	—	1	—	—
Cys(Cm)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Met	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—
Leu	—	—	—	2	1	—	—	—	—	—
Tyr	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—
Phe	—	—	1	1	—	—	1	—	—	—
His	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Lys	1	1	—	1	1	—	—	1	1	—
Arg	1	1	1	1	1	—	—	—	—	1
Trp	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N-Концевая	Gly	Val	Thr	Phe	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Asp
Выход ос- татков	3	4	10	8	3	5	5	3	4	2
Выход, %	10	22,5	8,5	2,3	20	6	8,5	6	11,5	32

Пептид I-T-3-4-10 (843—860) (табл. 5). Деграцией пептида по методу Эдмана была определена последовательность 15 аминокислотных остатков. Для установления полной структуры пептид I-T-3-4-10 был расщеплен термолизином. Образовавшуюся смесь пептидов разделяли электрофорезом в тонком слое целлюлозы. Сильно основной С-концевой аргининсодержащий пептид идентифицировали на электрофореграмме

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислота	Пептиды							
	III-12-1	III-12-2	III-12-3	III-12-6	III-14-1	III-14-1-2	III-14-2	III-15-1, III-16-1, III-17-1
Asp	1	—	—	—	—	1	—	2
Thr	—	—	1	1	—	—	—	—
Ser	—	—	—	1	—	1	—	—
Glu	—	—	—	—	—	—	—	—
Pro	—	—	—	—	—	—	—	—
Gly	—	1	—	—	—	1	1	—
Ala	—	—	—	—	—	—	—	—
Val	—	—	—	1	1	1	—	—
Cys(Cm)	—	—	—	—	—	—	—	—
Met	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	—	—	1	—	—	—	—
Leu	—	—	—	1	—	—	1	—
Tyr	—	—	—	—	—	1	—	—
Phe	—	—	—	—	—	—	—	—
His	—	—	—	—	—	—	—	—
Lys	1	1	1	—	1	—	1	—
Arg	—	—	—	1	—	1	—	1
Trp	—	—	—	—	—	—	—	—
N-Концевая	Asn	Gly	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Asn
Число остатков	2	2	2	6	2	6	3	3
Выход, %	8	7,5	10	4	9,5	8,5	11	23

Аминокислота	Пептиды								
	III-15-2	III-15-3	III-15-4	III-15-5	III-15-6	III-16-2, III-17-2, III-18-1	III-16-3	III-16-5	III-17-5, III-18-5, III-19-2, III-20-3
Asp	—	—	1	—	—	—	1	—	—
Thr	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ser	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glu	1	—	—	—	—	—	—	—	—
Pro	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Gly	—	—	—	—	1	1	—	—	1
Ala	—	2	1	—	—	—	—	2	—
Val	—	—	—	—	—	—	1	—	1
Cys(Cm)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Met	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	—	1	—	—	—	1	—	—
Leu	—	—	—	1	1	—	—	—	1
Tyr	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Phe	—	—	—	—	1	—	—	—	—
His	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lys	—	—	—	1	1	—	—	1	—
Arg	1	1	1	—	—	1	1	—	1
Trp	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N-Концевая	Glu	Ala	Ile	Leu	Phe	Gly	Val	Ala	Val
Число остатков	2	3	4	2	5	2	4	3	4
Выход, %	30,5	15	10,5	12,5	10	38,5	9	3,5	43,5

по цветной реакции Сакагучи. После определения его структуры была установлена аминокислотная последовательность пептида I-T-3-4-10.

Пептид I-T-3-4-14 (467—481) (табл. 6). После определения N-концевой аминокислотной последовательности пептид I-T-3-4-14 был подвергнут

Таблица 1 (окончание)

Аминокислота	Пептиды								
	III-18-2, III-24-2	III-19-1, III-20-1	III-20-2	III-20-4, III-21-4	III-21-1, III-22-1	III-21-2, III-22-2	III-21-3	III-22-5, III-23-3	III-23-2
Asp	—	—	—	—	1	—	1	—	—
Thr	—	—	—	—	—	—	2	—	—
Ser	—	1	1	—	—	—	1	—	—
Glu	—	—	1	—	—	—	—	—	—
Pro	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gly	—	—	—	—	—	—	1	—	—
Ala	—	—	—	1	—	—	1	—	—
Val	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Cys(Cm)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Met	1	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Leu	—	—	—	1	—	—	1	1	1
Tyr	—	—	1	—	1	—	1	—	—
Phe	—	—	—	—	—	—	—	1	—
His	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lys	—	—	1	—	1	—	—	1	—
Arg	1	1	—	—	—	1	1	—	1
Trp	—	—	—	1	—	—	—	—	—
N-Концевая	Met	Ser	Glu	Ala	Tyr	Val	Thr	Phe	Leu
Число остатков	2	2	4	4	3	2	9	3	2
Выход, %	15	35	4	10	12	35	5,5	14,5	50

Аминокислота	Пептиды									
	III-24-1, III-27-7	III-25-4	III-26-2	III-27-4	III-27-5, III-27-6	III-29-1	III-29-2	III-30-1	III-30-4	III-31-3
Asp	—	—	1	1	—	—	—	—	—	1
Thr	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Ser	—	2	—	1	—	—	1	—	—	—
Glu	—	1	1	—	—	1	—	1	1	—
Pro	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gly	—	1	—	1	—	—	1	—	—	—
Ala	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—
Val	—	1	—	1	—	—	—	—	—	1
Cys(Cm)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Met	1	—	—	—	—	—	1	—	—	1
Ile	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
Leu	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tyr	1	—	1	1	—	—	—	—	—	—
Phe	—	1	—	—	1	—	1	—	—	—
His	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Lys	—	1	—	—	—	—	—	1	1	—
Arg	1	—	1	2	1	2	1	1	1	—
Trp	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—
N-Концевая	Tyr	Ser	Ala	Arg	Phe	Arg	Phe	Arg	Arg	Arg
Число остатков	4	8	6	7	2	3	8	3	4	5
Выход, %	12	5,5	2	7,5	27	7,5	22	10	2,5	4,5

гидролизу протеиназой из *St. aureus*. Полученные фрагменты разделялись электрофорезом в тонком слое целлюлозы. Установление аминокислотных последовательностей трех полученных пептидов *St-1*, *St-2*, *St-3* дало возможность выяснить структуру пептида I-T-3-4-14.

Пептид I-T-14-10 (1175—1186) (табл. 7). При расщеплении пептида термолизинном была получена смесь трех пептидов, которые разделили ме-

Таблица 2 (продолжение)

Пептиды	Аминокислотная последовательность *	Местоположение пептида в цепи белка
II-8-2	Asp-Thr-Thr-Val-Gly-Arg → → → → →	571-576
II-8-3	Gly-Glu-Gly-Met-Val-Leu-Thr-Gly-Pro-Lys → → → → → → → → →	522-531
II-8-5, II-10-4-7	Asp-Gly-Leu-Phe-Cys(Cm)-Ala-Arg → → → → → →	54-60
II-8-6	Asp-Leu-Leu-Gly-Ile-Thr-Lys → → → → →	1305-1311
II-9-1	Ser-Val-Val-Asn-Ser-Ser-Gly-Lys → → → → → →	966-972
II-9-2	Gly-Val-Ile-Cys(Cm)-Glu-Lys → → → → →	82-87
II-9-3	Ile-Ala-Leu-Ala-Ser-Pro-Asp-Met-Ile-Arg ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ← ←	22-31
II-9-5	Ser-Ile-Val-Asn-Gln-Ala-Leu-Gly-Lys → → → → → → →	590-598
II-10-3-3	Ala-Ile-Thr-Gly-Ser-Asn-Lys → → → → →	315-321
II-10-3-6, II-10-4-6	Glu-Asn-Val-Ile-Val-Gly-Arg → → → → →	1349-1355
II-11-1	Ala-Ala-Ala-Asn-Asp-Arg → → → → →	687-692
II-11-2	Asp-Ile-Glu-Arg → → → →	134-137
II-11-4	Gly-Ala-Val-Leu-Ala-Lys → → → → → ← ← ←	1000-1005
II-11-5	Gly-Leu-Ala-Thr-Thr-Ile-Lys → → → → → ← ← ← ←	389-395
II-12-1	Glu-Thr-Lys → → →	1168-1170
II-12-3, III-9-2	Asp-Leu-Ala-Arg → → → →	902-905
II-13-2-1	Ile-Asn-Asp-Lys → → → →	1248-1251
II-13-2-2	Thr-Ala-Gly-Gly-Lys → → → → →	1068-1072
II-13-4	Gly-Ser-Ala-Ala-Gln-Ile-Arg → → → → → → →	732-738
II-14-1-1	Asn-Glu-Lys → → →	294-296
II-14-1-2	Glu-Ala-Glu-Arg → → → →	532-535
II-14-1-9, II-15-9	Val-Ala-Asp-Leu-Phe-Glu-Ala-Arg → → → → → → → →	1141-1148
II-15-5, III-12-5	Gly-Ser-Ile-Lys → → → →	956-959
II-15-6	Leu-Gln-Gly-Val-Lys → → → → →	1243-1247
II-15-7	Leu-Ser-Asn-Val-Lys → → → → →	960-964
II-16-4	Glu-Pro-Leu-Arg → → → →	833-836
II-16-6	Ile-Val-Pro-Lys-Gly-Leu-Pro-Tyr → → → → → → → →	582-589
II-17-2, II-17-3	Val-Glu-Arg → → →	1204-1206
II-17-6	Leu-Ile-Asp-Glu-Phe-Gly-Arg → → → → → → →	984-990

Таблица 2 (продолжение)

Пептиды	Аминокислотная последовательность *	Местоположение пептида в цепи белка
II-19-10-1	Asp-Leu-Arg-Pro-Ala-Leu-Lys → → → → →	1073-1079
II-19-10-2	Lys-Gly-Leu-Ala-Asp-Thr-Ala-Leu-Lys → → → → → ← ←	781-789
II-19-13	Ile-Phe-Gly-Pro-Val-Lys → → → → →	61-66
II-20-6	Ser-Ile-Val-Asn-Gln-(Ala-Leu-Gly-Lys-Lys) → → → → →	590-599
II-21-5, II-22-6	Glu-His-Pro-Val-Leu-Leu-Asn-Arg → → → → → → →	418-425
II-21-6, II-22-7, II-22-8	Gly-Leu-Lys-Glu-Asn-Val-Ile-Val-Gly-Arg → → → → → → → →	1346-1355
II-22-3	Arg-Asp-Glu-Leu-Arg → → → → →	1341-1345
II-24-1	Lys-Leu-Thr-Lys → → → → →	216-219
II-24-6	His-Ile-Glu-Val-Ile-Val-Arg → → → → → →	1252-1258
II-27-2	Gly-His-Ile-Ile-Asn-Lys → → → → →	906-911
II-27-3, III-27-4	Ala-Pro-Thr-Leu-His-Arg → → → → →	426-431
II-28-2-1	Lys-Pro-Glu-Thr-Ile-Asn-Tyr-Arg → → → → → ← ← ← ←	40-47
II-28-2-2, II-29-5, II-29-6	Thr-Phe-Lys-Pro-Glu-Arg → → → → → →	48-53
II-29-1	Gly-Lys-Gln-Gly-Arg → → → → →	333-337
II-29-8	Ser-Gly-Leu-Ala-Ser-Leu-His-Ala-Arg → → → → → → → →	539-547
II-30-4, II-30-5, III-30-4	Leu-Tyr-Arg → → →	536-538
II-32-1, II-32-2, II-33-1	Gly-Lys-Arg → → →	1171-1173
II-32-3, II-33-4	Val-Lys-Val-Arg → → → →	548-551
II-32-4	Thr-Phe-His-Ile-Gly-Gly-Ala-Ala-Ser-Arg → → → → → → → → →	934-943
II-33-2, II-33-3, III-33-3	Leu-Lys-Arg → → →	279-281
III-3-3, III-4-3	Val-Gly-Ala-Thr-Tyr → → → → →	1298-1302
III-8-5	Thr-Gly-Phe-Ala-Tyr → → → → →	627-631
III-10-2, III-11-3	Val-Ser-Lys → → →	693-695
III-10-3	Ala-Ile-Ser-Lys → → → →	600-603
III-11-1	Asp-Arg → →	837-838
III-12-1	Asn-Lys → →	954-955
III-12-2	Gly-Lys → →	333-334

Таблица 2 (продолжение)

Пептиды	Аминокислотная последовательность *	Местоположение пептида в цепи белка
III-12-3	Thr-Lys ↘ ↘	991-992
III-12-6	Leu-Val-Ile-Thr-Ser-Arg ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	973-978
III-14-1	Val-Lys ↘ ↘	548-549 1285-1286
III-14-1-2	Val-Asp-Tyr-Ser-Gly-Arg ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	347-352
III-14-2	Gly-Leu-Lys ↘ ↘ ↘	1346-1348
III-15-1, III-16-1, III-17-1	Asn-Asn-Arg → → ↘	276-278
III-15-2	Glu-Arg → ↘	100-101
III-15-3	Ala-Ala-Arg ↘ ↘ ↘	632-634
III-15-4	Ile-Ala-Asn-Arg ↘ ↘ ↘ ↘	1286-1289
III-15-5	Leu-Lys ↘ ↘	78-79 278-279
III-15-6	Phe-Leu-Pro-Gly-Lys ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	1100-1104
III-16-2, III-17-2, III-18-1	Gly-Arg ↘ ↘	313-314
III-16-3	Val-Ile-Asn-Arg ↘ ↘ ↘ ↘	272-275
III-16-5	Ala-Ala-Lys ↘ ↘ ↘	396-398
III-17-5, III-18-5, III-19-2, III-20-3	Val-Leu-Gly-Arg ↘ ↘ ↘ ↘	839-842
III-18-2, III-24-2	Met-Arg ↘ ↘	1370-1371
III-19-1, III-20-1	Ser-Arg ↘ ↘	1303-1304
III-20-2	Glu-Ser-Tyr-Lys → ↘ ↘ ↘ ↘	993-996
III-20-4, III-21-4	Ala-Ile-Leu-Trp ↘ ↘ ↘ ↘	577-580
III-21-1, III-22-1	Tyr-Asn-Lys ↘ → ↘	679-681
III-21-2, III-22-2	Val-Arg ↘ ↘	97-98 550-551 882-883
III-21-3	Thr-Ala-Asn-Ser-Gly-Tyr-Leu-Thr-Arg ↘ ↘ ↘ → ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	790-798
III-22-5, III-23-3	Phe-Leu-Lys ↘ ↘ ↘	7-9
III-23-2	Leu-Arg ↘ ↘	361-362 1223-1224
III-24-1, III-27-7	Tyr-Met-Thr-Arg ↘ ↘ ↘ ↘	512-515
III-25-4	Ser-Trp-Ser-Phe-Gly-(Glu-Val-Lys) ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	32-39
III-26-2	Ala-Tyr-His-(Gln-Asp-Arg) ↘ ↘ ↘ ↘	1364-1369

Пептиды	Аминокислотная последовательность *	Местоположение пептида в цепи белка
III-27-4	Arg-Val-Asx-Tyr-Ser-Gly-Arg ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	346-352
III-27-5, III-27-6	Phe-Arg ↘ ↘	338-339
III-29-1	Arg-Glu-Arg ↘ ↘ ↘	99-101
III-29-2	Phe-Ile-Ser-Thr-His-Gly-Ala-Arg ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	773-780
III-30-1	Arg-Pro-Lys ↘ ↘ ↘	1149-1151
III-30-4	Arg-Pro-Leu-Lys ↘ ↘ ↘ ↘	322-325
III-31-3	Arg-Val-Ile-Asn-Arg ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	271-275

* Здесь и далее стрелками показаны стадии деградации по методу Эдмана с идентификацией Pth-(↘), Dns-(→), Pth- и Dns-(↔), DABth-(⇒) производных аминокислот; ← — С-концевые аминокислоты, определенные с помощью карбоксипептидаз.

** Полная структура пептида выведена на основании нуклеотидной последовательности гена.

тодом хроматографии в тонком слое целлюлозы. В результате определения их структуры и сравнения ее с N-концевой последовательностью пептида I-T-14-10 установлено, что пептид Th-1 является N-концевым, пептид Th-3 — С-концевым, а пептид Th-2 располагается между ними.

Пептид II-3-6 (II-4-6) (696-709) (табл. 8). Деградацией пептида по методу Эдмана была установлена последовательность 6 аминокислотных остатков. Для определения полной структуры пептид был расщеплен бромцианом. Образовавшуюся смесь фрагментов анализировали по методу Эдмана, что позволило определить последовательность 10 аминокислотных остатков. Затем пептид II-3-6 гидролизировали протеиназой из *St. aureus*. Из полученного гидролизата электрофорезом в тонком слое целлюлозы был выделен С-концевой пятичленный пептид, анализ которого позволил установить С-концевую последовательность пептида II-3-6.

Расположение изученных в настоящей работе пептидов в полипептидной цепи β'-субъединицы приведено на рис. 7.

β'-Субъединица, содержащая в своем составе 1407 аминокислотных остатков, является удобным объектом для анализа специфичности протеиназ. В соответствии с субстратной специфичностью трипсина большинство полученных при триптическом гидролизе пептидов содержит в качестве С-концевой аминокислоты лизин или аргинин. Однако в 19 пептидах эти остатки встречаются также в середине цепи. Как известно, трипсин лишь частично расщепляет связи, образованные двумя основными аминокислотами. Вследствие этого нами наряду с пептидом II-9-5 (590-598), С-концевым остатком которого является Lys⁵⁹⁸, был выделен пептид II-20-6, содержащий последовательность Lys-Lys (598-599) (см. табл. 2). Аналогично наряду с пептидами III-12-2 (1171-1172) и III-15-5 (279-280) были выделены пептиды II-32-1 (1171-1173) и II-33-2 (279-281), содержащие последовательность Lys-Arg. В тех же случаях, когда в последовательности Lys(Arg)-Lys(Arg)-X трипсин вначале расщеплял пептидную связь, расположенную между основными аминокислотами, устойчивой к гидролизу становилась вторая связь, т. е. Lys(Arg)-X. Так образовались пептиды II-24-1 (216-219), II-22-3 (1341-1345), III-27-4 (346-352) и III-31-3 (271-275), N-концевыми аминокислотами которых являлся лизин (пептид II-24-1) или аргинин (остальные три пептида).

Пептиды, структура которых определялась с помощью дополнительных гидролизом без разделения смеси фрагментов

Анализируемый пептид *	Вид расщепления **	Результаты анализа
I-T-1-5-2 (558-556)	H	Asp-Ala-Asn-Gly-Gln-Leu-Val-Ala-Lys $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$ Asp-Ala-Asn $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$ Gly-Gln-Leu-Val-Ala-Lys $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$
I-T-1-5-3 (145-156)	B	Val-Val-Ile-Glu-Gly-Gly-Met-Thr-Asn-Leu-Glu-Arg $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$ Val-Val-Ile-Glu-Gly-Gly-Hse $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$ Thr-Asn-Leu-Glu-Arg $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$
I-T-1-5-4 (180-190)	St	Met-Gly-Ala-Glu-Ala-Ile-Gln-Ala-Leu-Leu-Lys $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$ Met-Gly-Ala-Glu $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$ Ala-Ile-Gln-Ala-Leu-Leu-Lys $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$
II-8-7, II-15-14 (124-133)	B	Ile-Gly-Leu-Leu-Leu-Asp-Met-Pro-Leu-Arg $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$ Ile-Gly-Leu-Leu-Leu-Asp-Hse $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$ Pro-Leu-Arg $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$
II-14-1-8, II-15-8 (260-270)	St	Phe-Ala-Thr-Ser-Asp-Leu-Asn-Asp-Leu-Tyr-Arg $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$ Phe-Ala-Thr-Ser-Asp $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$ Leu-Asn-Asp-Leu-Tyr-Arg $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$
II-32-5 (116-123)	T	Phe-Leu-Lys-Ser-Leu-Pro-Ser-Arg $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$ Phe-Leu-Lys $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$ Ser-Leu-Pro-Ser-Arg $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$

* В скобках указано местоположение пептида в цепи белка.
** Вид дополнительного расщепления: H — гидроксиламин, B — бромцианом, St — протеиной из St. aureus, T — трипсином.

Абсолютно устойчива к действию трипсина связь Lys-Pro, присутствующая в пептидах I-T-3-4-10 (843-860), II-B-1 (611-626), II-28-2-1 (40-47), II-29-5 (48-53) и I-St-II-11 (611-622).

Связь Arg-Pro считается уязвимой для расщепления трипсином [9]. Однако были получены три пептида, в которых она присутствует: II-19-10-1 (1073-1079), III-30-1 (1149-1151) и III-30-4 (322-325), причем в двух случаях (III-30-1 и III-30-4) устойчивость связи Arg-Pro к гидролизу можно объяснить тем, что она является второй в последовательности Lys(Arg)-Arg-Pro.

Частичное расщепление связей Lys-Glu (1348-1349), Lys-Gln (334-335), Lys-Ser (118-119) обусловлено либо соседством дикарбоновой глутаминовой кислоты (пептид II-21-6), либо стерическими затруднениями (пептиды II-29-1 и II-32-5).

Известна способность трипсина гидролизовать некоторые связи, образованные карбоксильными группами ароматических аминокислот [9]. При анализе структуры триптических пептидов β'-субъединицы было обнаружено, что расщепилось 10 связей, образованных тирозином (362-363,

Аминокислотная последовательность пептида I-T-1-3-10 (1152-1167)

Анализируемый пептид	Результаты анализа
I-T-1-3-10	Glu-Pro-Ala-Ile-Leu-Ala-Glu-Ile- → → → → → → → →
Смесь пептидов, полученных после гидролиза протеиназой из <i>St. aureus</i>	Glu-Pro-Ala-Ile-Leu-Ala-Glu → → → → → → → Ile-Ser-Gly-Ile-Val-Ser-Phe-Gly- → → → → → → →
Ch-1	Glu-Pro-Ala-Ile-Leu-Ala-Glu-Ile-Ser-Gly-Ile-Val-Ser-Phe → → → → → → → →
Ch-2	Gly-Lys → →
Строение	Glu-Pro-Ala-Ile-Leu-Ala-Glu-Ile-Ser-Gly-Ile-Val-Ser-Phe-Gly-Lys

Таблица 5

Аминокислотная последовательность пептида I-T-3-4-10 (843-860)

Анализируемый пептид	Результаты анализа
I-T-3-4-10	Val-Thr-Ala-Glu-Asp-Val-Leu-Lys-Pro-Gly-Thr-Ala-Asp-Ile-Leu- → → → → → → → → → → → → →
Th-1	Val-Thr-Ala-Glu-Asp-Val → → → →
Th-2	Leu-Lys-Pro-Gly-Thr-Ala-Asp → → → → → → →
Th-3	Ile-Leu-Val-Pro-Arg → → → → →
Строение	Val-Thr-Ala-Glu-Asp-Val-Leu-Lys-Pro-Gly-Thr-Ala-Asp-Ile-Leu-Val-Pro-Arg

Таблица 6

Аминокислотная последовательность пептида I-T-3-4-14 (467-481)

Анализируемый пептид	Результаты анализа
I-T-3-4-14	Ala-Val-His-Val-Pro-Leu-Thr-Leu-Glu-Ala-Gln- → → → → → → → → → → →
St-1	Ala-Val-His-Val-Pro-Leu-Thr-Leu-Glu → → → → → → → → →
St-2	Ala-Gln-Leu-Glu → → → →
St-3	Ala-Arg → →
Строение	Ala-Val-His-Val-Pro-Leu-Thr-Leu-Glu-Ala-Gln-Leu-Glu-Ala-Arg

Таблица 7

Аминокислотная последовательность пептида I-T-14-10 (1175-1186)

Анализируемый пептид	Результаты анализа
I-T-14-10	Leu-Val-Ile-Thr-Pro-Val-Asp-Gly- → → → → → → → →
Th-1	Leu-Val → →
Th-2	Ile-Thr-Pro → → →
Th-3	Val-Asp-Gly-Ser-Asp-Pro-Tyr → → → → → → →
Строение	Leu-Val-Ile-Thr-Pro-Val-Asp-Gly-Ser-Asp-Pro-Tyr

Аминокислотная последовательность пептида II-3-6 (II-4-6) (696-709)

Анализируемый пептид	Результаты анализа
II-3-6, II-4-6	Ala-Met-Met-Asp-Asn-Leu- → → → → → →
Смесь бромциановых пептидов	Ala-Hse → Hse Asp-Asn-Leu-Gln-Thr-Glu-Thr- → → → → → →
St-2	Thr-Val-Ile-Asn-Arg → → → → →
Строение	Ala-Met-Met-Asp-Asn-Leu-Gln-Thr-Glu-Thr-Val-Ile-Asn-Arg

589-590, 625-626, 631-632, 772-773, 999-1000, 1099-1100, 1186-1187, 1302-1303, 1363-1364), и две связи, образованные триптофаном (115-116, 580-581). Можно думать, что указанные связи расположены в участках полипептидной цепи β' -субъединицы, находящихся в напряженной конформации и поэтому в наибольшей степени подверженных протеолизу.

Первичная структура некоторых фрагментов гена *proC* изучалась в ряде лабораторий [10, 11]. Скваерс с сотрудниками определил первичную структуру фрагмента оперона, кодирующего С-концевую область β' -субъединицы [10]. Эта структура имеет некоторые отличия от структуры, установленной нами. В частности, Скваерсом пропущен аденозин в положении 7584, что привело к сбою рамки считывания, но вставка тимидина между цитидином-7717 и аденозином-7718 восстановила ее, однако в результате этого последовательность 45 аминокислотных остатков между лизином-1132 и треонином-1178, установленная Скваерсом по нуклеотидной последовательности, полностью отличается от определенной нами. Достоверность нашей структуры в этой области не вызывает сомнений, так как она полностью подтверждена анализом соответствующих триптических пептидов (см. рис. 7). В частности, нами был выделен 12-членный пептид I-T-14-10 (1175-1186), перекрывающий район, кодируемый нуклеотидной последовательностью с пропущенным в структуре Скваерса тимидином.

Очевидно, что определение первичной структуры гена не может служить заменой прямого исследования аминокислотной последовательности белка. Вместе с тем параллельное использование методов белковой и нуклеотидной химии значительно сокращает время исследования и увеличивает достоверность полученных результатов.

Таким образом, в результате проделанной работы установлена полная структура 162 и частичная 10 пептидов, содержащих в общей сложности 862 аминокислотных остатка. Полученные результаты способствовали успешному завершению исследований по определению аминокислотной последовательности β' -субъединицы РНК-полимеразы.

Экспериментальная часть

В работе использовали трипсин, α -химотрипсин, карбоксипептидазы А и В (Worthington, США), карбоксипептидазу Y (Boehringer, США), термоллизин (Calbiochem, США), протеиназу из *St. aureus* (Miles, Англия), бромциан (Pierce, США), биогели, катионообменные смолы AG 50W \times 4 и аминекс AG 50W \times 2 (Bio-Rad, США), сефадексы (Pharmacia, Швеция), пластинки с тонким слоем целлюлозы и полиамида (Schleicher und Schüll, ФРГ), трис (Calbiochem, США), β -меркаптоэтанол, 5-диметиламино-1-нафталинсульфонилхлорид (Serva, ФРГ), 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианат (Fluka, Швейцария), монодуксусную кислоту (Merck, ФРГ). Иодуксусную кислоту непосредственно перед употреблением пере-

1-17 Met-Lys-Asp-Leu-Leu-Lys-Phe-Leu-Lys-Ala-Gln-Thr-Lys-Thr-Glu-Glu-Phe-
 18-34 Asp-Ala-Ile-Lys-Ile-Ala-Leu-Ala-Ser-Pro-Asp-Met-Ile-Arg-Ser-Trp-Ser-
 35-51 Phe-Gly-Glu-Val-Lys-Lys-Pro-Glu-Thr-Ile-Asn-Tyr-Arg-Thr-Phe-Lys-Pro-
 52-68 Glu-Arg-Asp-Gly-Leu-Phe-Cys-Ala-Arg-Ile-Phe-Gly-Pro-Val-Lys-Asp-Tyr-
 69-85 Glu-Cys-Leu-Cys-Gly-Lys-Tyr-Lys-Arg-Leu-Lys-His-Arg-Gly-Val-Ile-Cys-
 86-102 Glu-Lys-Cys-Gly-Val-Glu-Val-Thr-Gln-Thr-Lys-Val-Arg-Arg-Glu-Arg-Met-
 103-119 Gly-His-Ile-Glu-Leu-Ala-Ser-Pro-Thr-Ala-His-Ile-Trp-Phe-Leu-Lys-Ser-
 120-136 Leu-Pro-Ser-Arg-Ile-Gly-Leu-Leu-Leu-Asp-Met-Pro-Leu-Arg-Asp-Ile-Glu-
 137-153 Arg-Val-Leu-Tyr-Phe-Glu-Ser-Tyr-Val-Val-Ile-Glu-Gly-Gly-Met-Thr-Asn-
 154-170 Leu-Glu-Arg-Gln-Gln-Ile-Leu-Thr-Glu-Glu-Gln-Tyr-Leu-Asp-Ala-Leu-Glu-
 171-187 Glu-Phe-Gly-Asp-Glu-Phe-Asp-Ala-Lys-Met-Gly-Ala-Glu-Ala-Ile-Gln-Ala-
 188-204 Leu-Leu-Lys-Ser-Met-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Cys-Glu-Gln-Leu-Arg-Glu-Glu-
 205-221 Leu-Asn-Glu-Thr-Asn-Ser-Glu-Thr-Lys-Arg-Lys-Lys-Leu-Thr-Lys-Arg-Ile-
 222-238 Lys-Leu-Leu-Glu-Ala-Phe-Val-Gln-Ser-Gly-Asn-Lys-Pro-Glu-Trp-Met-Ile-
 239-255 Leu-Thr-Val-Leu-Pro-Val-Leu-Pro-Pro-Asp-Leu-Arg-Pro-Leu-Val-Pro-Leu-
 256-272 Asp-Gly-Gly-Arg-Phe-Ala-Thr-Ser-Asp-Leu-Asn-Asp-Leu-Tyr-Arg-Arg-Val-
 273-289 Ile-Asn-Arg-Asn-Asn-Arg-Leu-Lys-Arg-Leu-Leu-Asp-Leu-Ala-Ala-Pro-Asp-
 290-306 Ile-Ile-Val-Arg-Asn-Gly-Lys-Arg-Met-Leu-Gln-Glu-Ala-Val-Asp-Ala-Leu-
 307-323 Leu-Asp-Asn-Gly-Arg-Arg-Gly-Arg-Ala-Ile-Thr-Gly-Ser-Asn-Lys-Arg-Pro-
 324-340 Leu-Lys-Ser-Leu-Ala-Asp-Met-Ile-Lys-Gly-Lys-Gln-Gly-Arg-Phe-Arg-Gln-
 341-357 Asn-Leu-Leu-Gly-Lys-Arg-Val-Asp-Tyr-Ser-Gly-Arg-Ser-Val-Ile-Thr-Val-
 358-374 Gly-Pro-Tyr-Leu-Arg-Leu-Lys-Gln-Cys-Gly-Leu-Pro-Lys-Lys-Met-Ala-Leu-
 375-391 Glu-Leu-Phe-Lys-Pro-Phe-Ile-Tyr-Gly-Lys-Leu-Glu-Leu-Arg-Gly-Leu-Ala-
 392-408 Thr-Thr-Ile-Lys-Ala-Ala-Lys-Lys-Met-Val-Glu-Arg-Glu-Glu-Ala-Val-Val-
 409-425 Trp-Asp-Ile-Leu-Asp-Glu-Val-Ile-Arg-Glu-His-Pro-Val-Leu-Leu-Asn-Arg-
 426-442 Ala-Pro-Thr-Leu-His-Arg-Leu-Gly-Ile-Gln-Ala-Phe-Glu-Pro-Val-Leu-Ile-
 443-459 Glu-Gly-Lys-Ala-Ile-Gln-Leu-His-Pro-Leu-Val-Cys-Ala-Ala-Tyr-Asn-Ala-
 460-476 Asp-Phe-Asp-Gly-Asp-Gln-Met-Ala-Val-His-Val-Pro-Leu-Thr-Leu-Glu-Ala-
 477-493 Gln-Leu-Glu-Ala-Arg-Ala-Leu-Met-Met-Ser-Thr-Asn-Asn-Ile-Leu-Ser-Pro-

Рис. 7. Расположение пептидов, полученных в результате гидролиза β' -субъединицы трипсином, в полипептидной цепи белка

494-516 Ala-Asn-Gly-Glu-Pro-Ile-Ile-Val-Pro-Ser-Gln-Asp-Val-Val-Leu-Gly-Leu-
 511-527 Tyr-Tyr-Met-Thr-Arg-Asp-Cys-Val-Asn-Ala-Lys-Gly-Glu-Gly-Met-Val-Leu-
 528-544 Thr-Gly-Pro-Lys-Glu-Ala-Glu-Arg-Leu-Tyr-Arg-Ser-Gly-Leu-Ala-Ser-Leu-
 545-561 His-Ala-Arg-Val-Lys-Val-Arg-Ile-Thr-Glu-Tyr-Glu-Lys-Asp-Ala-Asn-Gly-
 562-578 Glu-Leu-Val-Ala-Lys-Thr-Ser-Leu-Lys-Asp-Thr-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ile-
 579-595 Leu-Trp-Met-Ile-Val-Pro-Lys-Gly-Leu-Pro-Tyr-Ser-Ile-Val-Asn-Gln-Ala-
 596-612 Leu-Gly-Lys-Lys-Ala-Ile-Ser-Lys-Met-Leu-Asn-Thr-Cys-Tyr-Arg-Ile-Leu-
 613-629 Gly-Leu-Lys-Pro-Thr-Val-Ile-Phe-Ala-Asp-Gln-Ile-Met-Tyr-Thr-Gly-Phe-
 630-646 Ala-Tyr-Ala-Ala-Arg-Ser-Gly-Ala-Ser-Val-Gly-Ile-Asp-Asp-Met-Val-Ile-
 647-663 Pro-Glu-Lys-Lys-His-Glu-Ile-Ile-Ser-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Val-Ala-Glu-
 664-680 Ile-Gln-Glu-Gln-Phe-Gln-Ser-Gly-Leu-Val-Thr-Ala-Gly-Glu-Arg-Tyr-Asn-
 681-697 Lys-Val-Ile-Asp-Ile-Trp-Ala-Ala-Ala-Asn-Asp-Arg-Val-Ser-Lys-Ala-Met-
 698-714 Met-Asp-Asn-Leu-Gln-Thr-Glu-Thr-Val-Ile-Asn-Arg-Asp-Gly-Gln-Glu-Glu-
 715-731 Lys-Gln-Val-Ser-Phe-Asn-Ser-Ile-Tyr-Met-Met-Ala-Asp-Ser-Gly-Ala-Arg-
 732-748 Gly-Ser-Ala-Ala-Gln-Ile-Arg-Gln-Leu-Ala-Gly-Met-Arg-Arg-Gly-Leu-Ala-
 748-765 Lys-Pro-Asp-Gly-Ser-Ile-Ile-Glu-Thr-Pro-Ile-Thr-Ala-Asn-Phe-Arg-Glu-
 766-782 Gly-Leu-Asn-Val-Leu-Gln-Tyr-Phe-Ile-Ser-Thr-His-Gly-Ala-Arg-Lys-Gly-
 783-799 Ieu-Ala-Asp-Thr-Ala-Leu-Lys-Thr-Ala-Asn-Ser-Gly-Tyr-Leu-Thr-Arg-Arg-
 800-816 Leu-Val-Asp-Val-Ala-Gln-Asp-Leu-Val-Val-Thr-Glu-Asp-Asp-Cys-Gly-Thr-
 817-833 His-Glu-Gly-Ile-Met-Met-Thr-Pro-Val-Ile-Glu-Gly-Gly-Asp-Val-Lys-Glu-
 834-850 Pro-Leu-Arg-Asp-Arg-Val-Leu-Gly-Arg-Val-Thr-Ala-Glu-Asp-Val-Leu-Lys-
 851-867 Pro-Gly-Thr-Ala-Asp-Ile-Leu-Val-Pro-Arg-Asp-Thr-Leu-Leu-His-Glu-Gln-
 868-884 Trp-Cys-Asp-Leu-Leu-Glu-Glu-Asn-Ser-Val-Asp-Ala-Val-Lys-Val-Arg-Ser-
 885-901 Val-Val-Ser-Cys-Asp-Thr-Asp-Phe-Gly-Val-Cys-Ala-His-Cys-Tyr-Gly-Arg-
 902-918 Asp-Leu-Ala-Arg-Gly-His-Ile-Ile-Asn-Lys-Gly-Glu-Ala-Ile-Gly-Val-Ile-
 919-935 Ala-Ala-Gln-Ser-Ile-Gly-Glu-Pro-Gly-Thr-Gln-Leu-Thr-Met-Arg-Thr-Phe-
 936-952 His-Ile-Gly-Gly-Ala-Ala-Ser-Arg-Ala-Ala-Ala-Glu-Ser-Ser-Ile-Gln-Val-
 953-969 Lys-Asn-Lys-Gly-Ser-Ile-Lys-Leu-Ser-Asn-Val-Lys-Ser-Val-Val-Asn-Ser-
 970-986 Ser-Gly-Lys-Leu-Val-Ile-Thr-Ser-Arg-Asn-Thr-Glu-Leu-Lys-Leu-Ile-Asp-
 987-1003 Glu-Phe-Gly-Arg-Thr-Lys-Glu-Ser-Tyr-Lys-Val-Pro-Tyr-Gly-Ala-Val-Leu-

1004-1020	<u>Ala-Lys-Gly-Asp-Gly-Glu-Gln-Val-Ala-Gly-Gly-Glu-Thr-Val-Ala-Asn-Trp-</u>
1021-1037	<u>Asp-Pro-His-Thr-Met-Pro-Val-Ile-Thr-Glu-Val-Ser-Gly-Phe-Val-Arg-Phe-</u>
1038-1054	<u>Thr-Asp-Met-Ile-Asp-Gly-Gln-Thr-Ile-Thr-Arg-Gln-Thr-Asp-Glu-Leu-Thr-</u>
1055-1071	<u>Gly-Leu-Ser-Ser-Leu-Val-Val-Leu-Asp-Ser-Ala-Glu-Arg-Thr-Ala-Gly-Gly-</u>
1072-1088	<u>Lys-Asp-Leu-Arg-Pro-Ala-Leu-Lys-Ile-Val-Asp-Ala-Gln-Gly-Asn-Asp-Val-</u>
1089-1105	<u>Leu-Ile-Pro-Gly-Thr-Asp-Met-Pro-Ala-Gln-Tyr-Phe-Leu-Pro-Gly-Lys-Ala-</u>
1106-1122	<u>Ile-Val-Gln-Leu-Glu-Asp-Gly-Val-Gln-Ile-Ser-Ser-Gly-Asp-Thr-Leu-Ala-</u>
1123-1139	<u>Arg-Ile-Pro-Gln-Glu-Ser-Gly-Gly-Thr-Lys-Asp-Ile-Thr-Gly-Gly-Leu-Pro-</u>
1140-1156	<u>Arg-Val-Ala-Asp-Leu-Phe-Glu-Ala-Arg-Arg-Pro-Lys-Glu-Pro-Ala-Ile-Leu-</u>
1157-1173	<u>Ala-Glu-Ile-Ser-Gly-Ile-Val-Ser-Phe-Gly-Lys-Glu-Thr-Lys-Gly-Lys-Arg-</u>
1174-1190	<u>Arg-Leu-Val-Ile-Thr-Pro-Val-Asp-Gly-Ser-Asp-Pro-Tyr-Glu-Glu-Met-Ile-</u>
1191-1207	<u>Pro-Lys-Trp-Arg-Gln-Leu-Asn-Val-Phe-Glu-Gly-Glu-Arg-Val-Glu-Arg-Gly-</u>
1208-1224	<u>Asp-Val-Ile-Ser-Asp-Gly-Pro-Glu-Ala-Pro-His-Asp-Ile-Leu-Arg-Leu-Arg-</u>
1225-1241	<u>Gly-Val-His-Ala-Val-Thr-Arg-Tyr-Ile-Val-Asn-Glu-Val-Gln-Asp-Val-Tyr-</u>
1242-1258	<u>Arg-Leu-Gln-Gly-Val-Lys-Ile-Asn-Asp-Lys-His-Ile-Glu-Val-Ile-Val-Arg-</u>
1259-1275	<u>Gln-Met-Leu-Arg-Lys-Ala-Thr-Ile-Val-Asn-Ala-Gly-Ser-Ser-Asp-Phe-Leu-</u>
1276-1292	<u>Glu-Gly-Glu-Gln-Val-Glu-Tyr-Ser-Arg-Val-Lys-Ile-Ala-Asn-Arg-Glu-Leu-</u>
1293-1309	<u>Glu-Ala-Asn-Gly-Lys-Val-Gly-Ala-Thr-Tyr-Ser-Arg-Asp-Leu-Leu-Gly-Ile-</u>
1310-1326	<u>Thr-Lys-Ala-Ser-Leu-Ala-Thr-Glu-Ser-Phe-Ile-Ser-Ala-Ala-Ser-Phe-Gln-</u>
1327-1343	<u>Glu-Thr-Thr-Arg-Val-Leu-Thr-Glu-Ala-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Arg-Asp-Glu-</u>
1344-1360	<u>Leu-Arg-Gly-Leu-Lys-Glu-Asn-Val-Ile-Val-Gly-Arg-Leu-Ile-Pro-Ala-Gly-</u>
1361-1377	<u>Thr-Gly-Tyr-Ala-Tyr-His-Gln-Asp-Arg-Met-Arg-Arg-Arg-Ala-Ala-Gly-Glu-</u>
1378-1394	<u>Ala-Pro-Ala-Ala-Pro-Gln-Val-Thr-Ala-Glu-Asp-Ala-Ser-Ala-Ser-Leu-Ala-</u>
1395-1407	<u>Glu-Leu-Leu-Asn-Ala-Gly-Leu-Gly-Gly-Ser-Asp-Asn-Glu</u>

кристаллизовывали из бензола. Все остальные реактивы имели квалификацию ос.ч. РНК-полимеразу выделяли по методу Бержеса из штамма *E. coli* В [12]. Для разделения субъединиц использовали метод электрофореза на ацетате целлюлозы по методике [13].

Карбоксиметилирование β' -субъединицы. β' -Субъединицу (2,4 мкмоль) растворяли в 70 мл буфера, содержащего 6 М хлоргидрат гуанидина, 1 М трис-НСl (рН 8,6) и 31 мг дитиотрепта, и карбоксиметилировали иодуксусной кислотой по методу [14]. Раствор белка обессоливали на колонке (2,5×100 см) с сефадексом G-50, уравновешенным буфером, содержащим 0,01 М трис-НСl (рН 8,6), и лиофилизовали.

Гидролиз β' -субъединицы трипсином и разделение продуктов гидролиза. Раствор лиофилизованного препарата β' -субъединицы в 100 мл буфер-

ного раствора, содержащего 0,1 М NH_4HCO_3 и 6 М хлоридрат гуанидина (рН 8,4), диализовали против 0,1 М NH_4HCO_3 (рН 8,4). К суспензии белка добавляли по 8 мг трипсина дважды с интервалом в 4 ч и вели гидролиз 8 ч при 37° С (соотношение фермент — субстрат по весу 1:25). После гидролиза смесь лиофилизовали. Гидролизат растворяли в 15 мл буферного раствора, содержащего 0,1 М NH_4HCO_3 и 6 М хлоридрат гуанидина (рН 8,0), и делили на колонке (2,5×100 см) с биогелем Р-4, уравновешенным 0,1 М аммоний-бикарбонатным буферным раствором (рН 8,0) (рис. 1). Полученные объединенные фракции концентрировали в вакууме до небольшого объема, отделяли образующийся осадок (для фракций I и II) и растворы лиофилизовали.

Фракции I—III анализировали с помощью метода пептидных карт на пластинках (20×20 см) с тонким слоем целлюлозы. Электрофорез проводили 45 мин в пиридин-ацетатном буферном растворе (пиридин — уксусная кислота — вода, 25:1:225, рН 6,5) при напряжении 800 В. Для хроматографии в перпендикулярном направлении использовали систему (*n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 10:15:3:12). Пептиды обнаруживали обработкой карты 0,2% раствором нингидрина в ацетоне.

Хроматография на катионите. Подготовку смолы проводили по стандартной методике [15]. Колонку (0,6×60 см), термостатированную при 35° С, заполняли смолой, уравновешенной стартовым буфером (0,2 М пиридин-ацетат, рН 3,1). Пептидный материал растворяли в 3—5 мл 5% уксусной кислоты и наносили на колонку под давлением азота 1,5—2 атм. Разделение проводили при скорости элюции 30 мл/ч. Подачу растворов осуществляли насосом МЦ-30 (Ково, ЧССР) (см. рис. 2—4). Сначала через колонку пропускали 60 мл стартового буфера (при разделении фракции II объем составлял 100 мл). Градиент I получали пропусканьем через смеситель, содержащий 60 мл (100 мл для фракции II) стартового буфера, 150 мл 0,2 М пиридин-ацетатного буферного раствора, рН 4,2; градиент II — 400 (180) мл 0,5 М пиридин-ацетатного буфера, рН 5,0; градиент III — 220 (300) мл 2,0 М пиридин-ацетатного буфера, рН 5,0. Затем колонку промывали 150 мл 0,5 н. NaOH (при разделении фракции II этот этап отсутствовал). Детектирование пептидов во фракциях объемом 1,5 мл осуществляли по реакции с нингидрином, проводимой с помощью пептидного анализатора (Technicon, США). По результатам анализа фракции объединяли, упаривали на роторном испарителе до объема 1,0—1,5 мл.

*Экстракция гидрофобных пептидов *n*-бутиловым спиртом.* Осадок фракции II растворяли в 300 мкл 20% муравьиной кислоты и экстрагировали дважды 100 мкл *n*-бутилового спирта. Верхний спиртовой слой жидкости отделяли центрифугированием. Пептиды спиртовой фазы разделяли на колонке (0,6×85 см) с сефадексом G-50 (сверхтонкий), уравновешенной 10% уксусной кислотой. Раствор пептидов в муравьиной кислоте обессоливали на колонке (1,0×60 см) с сефадексом G-10, уравновешенной 5% уксусной кислотой.

Разделение пептидов методом гель-фильтрации. Упаренный досуха пептидный материал растворяли в 0,5 мл 10% уксусной кислоты и наносили на колонку (1,0×100 см) с сефадексом G-25 (тонкий или сверхтонкий), уравновешенным тем же буфером. Пептиды элюировали 10% уксусной кислотой со скоростью 3 мл/ч.

Хроматография и электрофорез на бумаге. Для препаративного разделения пептидов использовали бумагу 3 и 1 ММ. Хроматографию осуществляли в системе *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 15:10:3:12. Электрофорез проводили 1 ч в буферном растворе пиридин — уксусная кислота — вода (25:1:225) в приборе с жидкостным охлаждением (Savant, США) с градиентом потенциала 80 В/см. Пептиды обнаруживали по реакции с нингидрином. В некоторых случаях использовали качественную реакцию Эрлиха [16]. Пептиды с бумагой элюировали раствором 10% уксусной кислоты.

*Гидролиз пептидного материала осадка фракции I протеиназой из *St. aureus*.* Осадок суспендировался в 3 мл 0,1 М аммоний-ацетатного бу-

ферного раствора (рН 4,0). Гидролиз проводили 18 ч при 37° С (соотношение фермент — субстрат по весу 1 : 20) и осадок отделяли центрифугированием. Для разделения гидролизата использовали ВЭЖХ на хроматографе модели «322» (Altex, США). Супернатант разделяли на колонке Silasorb C 18 (0,46×25 см), уравновешенной буфером, содержащим 0,01 М аммоний-ацетат (рН 6,0), элюировали этим буфером с линейным градиентом концентрации ацетонитрила от 0 до 35% в течение 50 мин со скоростью 2 мл/мин. Детектирование пептидов в элюате проводили при 206 нм (рис. 5). Осадок гидролизата растворяли в 50 мкл 6 М хлоргидрата гуанидина и наносили на колонку Ultrosyl C8, уравновешенную 0,05% раствором трифторуксусной кислоты, дотитрованным 25% аммиаком до рН 6,0. Элюирование проводили этим же буфером сначала изократически 10% раствором ацетонитрила 10 мин, затем в линейном градиенте его концентрации (от 10 до 70%) в течение 35 мин, далее промывали 15 мин 70% раствором ацетонитрила со скоростью 1,0 мл/мин. Пептиды элюировались с колонки в интервале 10—50% ацетонитрила (рис. 6).

Расщепление пептидов I-T-1-5-3 и II-8-7 бромцианом, гидролиз пептидов I-T-1-5-4 и II-14-1-8 протеиназой из *St. aureus*, а также пептида II-32-5 трипсином и определение аминокислотной последовательности полученных фрагментов без разделения смеси проводили согласно методикам работы [17].

С-Концевую последовательность пептидов определяли с помощью карбоксипептидазы А и В по методике [18]. При использовании карбоксипептидазы У к 1—5 нмоль пептида добавляли 5—10 мкг фермента в 0,1 М пиридин-ацетатном буфере, рН 5,5, и выдерживали 1 ч при 37° С. Гидролизат лиофилизировали и анализировали с помощью аминокислотного анализатора D-550 (Durrum, США).

N-Концевые аминокислоты определяли в виде Dns-производных по методу Грея [19].

Химическую деградацию пептидов с идентификацией Pth-производных осуществляли по методу [20].

Деградацию пептидов по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде Dns-производных осуществляли по модифицированному методу Грея [21].

Деградация пептидов по методу Эдмана с идентификацией DABth-производных аминокислот [22]. 1—10 нмоль пептида растворяли в 80 мкл 50% водного пиридина, добавляли 40 мкл раствора 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианата [23] (112 мкг в пиридине). После термостатирования в атмосфере аргона (52° С, 50 мин) к реакционной смеси добавляли 10 мкл раствора фенилизотиоцианата, систему заполняли аргоном и термостатировали 30 мин при 52° С. Побочные продукты реакции и избыток реагента экстрагировали раствором гептан — этилацетат (2 : 1) дважды по 0,5 мл.

После экстракции к высушенному в течение 30 мин остатку добавляли 50 мкл безводной трифторуксусной кислоты и термостатировали 15 мин в атмосфере аргона при 52° С. Кислоту отгоняли в вакууме, а к остатку добавляли 50 мкл воды и экстрагировали DABth-производное аминокислоты бутилацетатом (2×200 мкл). Бутилацетат отгоняли в вакууме, остаток растворяли в 20 мкл воды и добавляли 40 мкл уксусной кислоты, насыщенной HCl, и термостатировали 50 мин при 52° С.

После окончания реакции раствор упаривали и остаток растворяли в этаноле. Идентифицировали DABth-производное аминокислоты двумерной хроматографией на пластинках со слоем полиамида (3×3 см) в следующих системах: уксусная кислота — вода (1 : 2), первое направление; толуол — *n*-гексан — уксусная кислота (2 : 1 : 1), второе направление; пластинку выдерживали в парах соляной кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ovchinnikov Yu. A., Lipkin V. M., Modjanov N. N., Chertov O. Yu., Smirnov Yu. V. FEBS Lett., 1976, v. 76, № 1, p. 108—111.
2. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaja G. S., Gubanov V. V., Guryev S. O., Chertov O. Yu., Modjanov N. N., Grinkevich V. A., Makarova I. A., Marchenko T. V., Polovnikova I. N., Lipkin V. M., Sverdlov E. D. Eur. J. Biochem., 1981, v. 116, № 2, p. 621—629.
3. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaja G. S., Gubanov V. V., Guryev S. O., Salomatina I. S., Shuvaeva T. M., Lipkin V. M., Sverdlov E. D. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 13, p. 4035—4040.
4. Монастырская Г. С., Губанов В. В., Гурьев С. О., Липкин В. М., Сverdлов Е. Д. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 7, с. 1106—1109.
5. Овчинников Ю. А., Монастырская Г. С., Губанов В. В., Саломатина И. С., Шуваева Т. М., Липкин В. М., Сverdлов Е. Д. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 7, с. 1107—1112.
6. Монастырская Г. С., Гурьев С. О., Калинина Н. Ф., Сорокин А. В., Саломатина И. С., Шуваева Т. М., Липкин В. М., Сverdлов Е. Д., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 130—134.
7. Шуваева Т. М., Липкин В. М., Назимов И. В., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 12, с. 1765—1777.
8. Модянов Н. Н., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Потапенко Н. А., Шуваева Т. М. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 2, с. 158—179.
9. Keil B. Methods in protein sequence analysis. Humana Press, 1982, p. 291.
10. Squires C., Krainez A., Barry G., Shen W.-F., Squires C. L. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, p. 6827—6840.
11. Гуревич А. И., Игошин А. В., Колосов М. Н. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1580—1584.
12. Burgess R. R. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 2, p. 6168—6178.
13. Heil A., Zillig W. FEBS Lett., 1970, v. 11, p. 165—168.
14. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 2, p. 622—627.
15. Овчинников Ю. А., Киришкин А. А., Егоров Ц. А., Абдулаев Н. Г., Киселёв А. П., Модянов Н. Н. Биохимия, 1972, т. 37, № 3, с. 451—460.
16. Reddi K. K., Kodicek E. Biochem. J., 1953, v. 53, № 2, p. 286—290.
17. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Потапенко Н. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. Биохимия, 1973, т. 38, № 1, с. 3—21.
18. Amber E. P. In: Methods in Enzymology/Ed. Hirs C. H. W. N. Y.: Acad. Press, 1967, v. XI, p. 156—166.
19. Grey W. R. In: Methods in Enzymology/Ed. Hirs C. H. W. N. Y.: Acad. Press, 1967, v. XI, p. 139—147.
20. Edman P., Begg J. Eur. J. Biochem., 1967, v. 1, № 1, p. 80—91.
21. Grey W. R. In: Methods in Enzymology/Ed. Hirs C. H. W. N. Y.: Acad. Press, 1967, v. XI, p. 469—475.
22. Chang J. Y. Biochem. J., 1981, v. 199, № 2, p. 557—564.
23. Chang J. Y., Brauer D., Wittman-Liebold B. FEBS Lett., 1978, v. 93, № 2, p. 205—214.

Поступила в редакцию
29.XII.1983

PRIMARY STRUCTURE OF THE *E. COLI* DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE β' -SUBUNIT. TRYPTIC HYDROLYSIS

BOGACHUK A. P., KRAVCHENKO T. B., SELYUCHENKO O. A.,
SHUVAEVA T. M., LIPKIN V. M.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

The carboxymethylated β' -subunit of DNA-dependent RNA polymerase was hydrolyzed with trypsin. The hydrolysate was separated on Bio-Gel P-4, followed by ion exchange chromatography, and was further purified by paper chromatography and electrophoresis. A mixture of large peptides was digested with *Staphylococcus aureus* protease, the fragments obtained were separated by an HPLC procedure. As a result, 172 peptides were isolated, the complete amino acid sequence for 162 and partial sequence for 10 of them being determined. In total, these peptides contain 862 amino acid residues