



УДК 547.962.1 : 541.6

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА СТУРИНА В — ПРОТАМИНА
ИЗ КАСПИЙСКОГО ОСЕТРА*Юликова Е. П., Евсеенко Л. К., Баратова Л. А.,
Белянова Л. П., Рыбин В. К., Силаев А. Б.**Межфакультетская лаборатория биоорганической химии
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

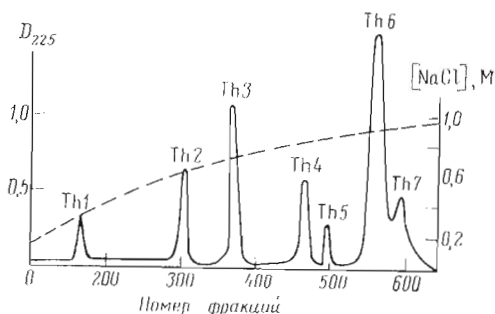
Автоматическим методом Эдмана в сочетании с анализом термолитизиновых пептидов установлена полная аминокислотная последовательность стурива В — протамина из каспийского осетра.

Стурин В является одним из протаминов, выделенных нами из молок каспийского осетра *Acipenser güldenstadtii* [1]. Ранее с помощью гидролиза трипсином, лейцинаминопептидазой и карбоксипептидазой В была определена частичная аминокислотная последовательность стурива В [2]. В настоящем сообщении приводятся результаты установления полной аминокислотной последовательности белка, полученные с помощью автоматического метода Эдмана в сочетании с анализом термолитизиновых пептидов.

Хотя в последние годы метод автоматического определения последовательности аминокислот получил самое широкое распространение при изучении строения различных белков, в том числе ряда гистонов [3, 4] и белка из спермы быка [5], для исследования первичной структуры протаминов из рыб он не применялся. Было интересно выяснить возможность использования этого метода для изучения столь высокоосновного белка, как стурин В.

Исследование N-концевой последовательности стурива В и некоторых его термолитизиновых пептидов проводили в секвенаторе фирмы «Beckman», используя стандартные белковую и пептидную программы.

На целой молекуле белка было произведено 26 циклов отщепления, причем опыт был проведен дважды. В первом опыте для установления N-концевой последовательности стурива В использовали белковую программу, во втором после проведения 18 циклов отщепления белковую программу заменяли пептидной. Но однозначная идентификация отщепляемых фенилтиогидантоинов аминокислот как в первом, так и во втором опыте оказалась возможной лишь до 20-го цикла расщепления (см. схему). Выход аланина (N-концевая аминокислота) составил лишь 62% теоретического. При анализе хлорбутановой фракции 11-го цикла отщепления нами были обнаружены фенилтиогидантоины как глутамина, так и глутаминовой кислоты. Появление последнего, по-видимому, результат частичного дезаминирования глутамина в ходе реакции Эдмана. Весьма показательно, что после 11-го цикла отщепления выходы фенилтиогидантоинов аминокислот резко упали. Подобное отмечали и другие авторы [6]. Наблюдаемый



Хроматография термолизинового гидролизата стурпина В на СМ-сефадексе С-25

заканчивается через 10 ч и расщеплению подвергаются все пептидные связи, образованные аминогруппами серина, глицина и гистидина. При сокращении времени гидролиза до 6 ч связь Arg²⁴-Gly²⁵ расщепилась неполностью, что позволило получить более крупный пептид Th4, представляющий собой С-концевой фрагмент белка (см. схему).

Фракционирование смеси пептидов проводили на СМ-сефадексе С-25 в 0,05 М фосфатном буфере (рН 6,2) с использованием градиента концентрации NaCl (рисунок). Однородными оказались все фракции, за исключением Th3, которая была разделена гель-фильтрацией на биогеле Р-2 на пептиды Th 3-а и Th 3-б. Таким образом, в индивидуальном состоянии нами было выделено 8 пептидов. Применение СМ-сефадекса С-25 для разделения термолизиновых пептидов стурпина В оказалось весьма эффективным. Нам удалось разделить не только пептиды с разным числом остатков аргинина (Th 1 — Th 4), но и пептиды, содержащие одинаковое количество аргинина и различающиеся между собой только одной аминокислотой (см. таблицу).

Изучение первичной структуры выделенных пептидов осуществляли сочетанием известных методов. Строение пептидов Th 1, Th 2, Th 3-а и

Аминокислотный состав и строение термолизиновых пептидов стурпина В

Пептид	Аминокислотный состав	Н-Концевая аминокислота	С-Концевая аминокислота	Строение пептида
Th 1	Gly ₁ , Arg ₂	Gly	Arg	Gly-Arg-Arg
Th 2	Gly ₁ , Arg ₄	Gly	Arg	Gly-Arg-Arg-Arg-Arg
Th 3-а	Ala ₁ , Arg ₆ , Ser ₁	Ala	Ser	Ala-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser
Th 3-б	Ala ₁ , Arg ₅	Ala	Arg	Ala-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg
Th 4	Gly ₂ , Arg ₆	Gly	Arg	Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-Arg-Arg
Th 5	Ser ₂ , Glu ₁ , Pro ₁ , Arg ₈	Ser	Arg	Ser-Ser-Arg-Pro-Gln-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg
Th 6	Ser ₂ , Glu ₁ , Pro ₁ , Arg ₈ , His ₁	Ser	His	Ser-Ser-Arg-Pro-Gln-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-His
Th 7	Ser ₁ , Glu ₁ , Pro ₁ , Arg ₈ , His ₁	Ser	His	Ser-Arg-Pro-Gln-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-His

Н-Концевые аминокислоты в пептидах Th 5, Th 6, Th 7 были установлены дан- сильным методом, в остальных пептидах — методом динитрофенилирования. С-Концевые аминокислоты в пептидах Th 3-а, Th 6 и Th 7 определяли с помощью карбокси- пептидазы А, в остальных — с помощью карбоксипептидазы В. Жирным прифтом выделена последовательность, установленная автоматическим методом Эдмана.

локализуются в тех же участках молекулы, что и в других протаминах. Наиболее ярко проявляется сходство N-концевой последовательности стурина В с аналогичными участками пептидных цепей других протаминов. Здесь располагается последовательность Ser-Ser-Arg-Pro-Gln-, в которой остаток аргинина, связанный с пролином, окружен остатками нейтральных аминокислот. Существенной особенностью стурина В является наличие в центральной части молекулы кластера из 7 остатков аргинина (остатки 12—18), более крупного, чем в других протаминах. Кроме того, полипептидная цепь стурина В несколько короче, чем у других протаминов.

Экспериментальная часть

Стурин В получали по методу, описанному нами ранее [1]. Термолизин (КФ 3.4.4) был получен от фирмы Sigma. Активность фермента определяли по казенину [9]. В работе использовались карбоксипептидаза В из поджелудочной железы свиньи (КФ 3.4.2.2) фирмы Serva и карбоксипептидаза А (КФ 3.4.2.1) фирмы Sigma, обработанные диизопропилфторфосфатом. Активность карбоксипептидаз определяли по методу, описанному в [10].

Гидролиз стурина В термолизинном и фракционирование пептидов. 200 мг белка растворяли в 20 мл 0,02 М трис-НСl-буфера (рН 8,0), содержащего 0,005 М CaCl₂, и добавляли 2 мг термолизина в соотношении фермент — субстрат 1 : 100. Реакционную смесь инкубировали 6 ч при 37°. Гидролиз останавливали 10-минутным нагреванием раствора на кипящей водяной бане.

Реакционную смесь растворяли в 3 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 6,2) и наносили на колонку (2 × 50 см), заполненную CM-сефадексом С-25 и уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили при комнатной температуре, используя экспоненциальный градиент концентрации NaCl от 0,1 до 1 М. Скорость элюции 16 мл/ч, объем смесителя 500 мл, объем отбираемых проб 3 мл. За ходом элюции следили по поглощению при 225 нм и с помощью реакции Сакагуши [11] в модификации Сатаке [12].

Определение чистоты пептидов. Пептиды обессоливали на катионите амберлит CG-50 в Н⁺-форме. Гомогенность пептидов проверяли электрофорезом на бумаге в пиридин-ацетатном буфере (рН 5,6) и гель-фильтрацией на биогеле Р-2 в 0,02 н. HCl на колонке (1 × 150 см) при скорости элюции 6 мл/ч.

Аминокислотный состав определяли на аминокислотном анализаторе Hitachi KLA-3B. Гидролиз проводили в стандартных условиях. При определении числа остатков аргинина в пептидах в качестве внутреннего свидетеля использовали лизин.

N-Концевой анализ. Динитрофенилирование пептидов проводили по методу Сэнджера [13]. Динитрофениламинокислоты идентифицировали тонкослойной хроматографией на силикагеле G в системах хлороформ — метиловый спирт — лед, уксусная кислота (95 : 5 : 1) и *n*-бутанол — 25% аммиак (80 : 20) [14]. Дансильрование пептидов осуществляли по методу Грэя [15]. Дансилпроизводные аминокислоты идентифицировали двумерной хроматографией [16].

C-Концевой анализ. C-Концевые аминокислоты в пептидах определяли с помощью карбоксипептидаз А и В. 0,1 мкмоль пептида растворяли в 1 мл 0,05 М трис-НСl-буфера (рН 8,05), содержащего 0,25 М NaCl, и добавляли фермент в соотношении 1 : 100. Инкубацию проводили при 37°. Отщепляемые аминокислоты определяли на аминокислотном анализаторе фирмы Hitachi, модель KLA-3B.

N-Концевые последовательности определяли в секвенаторе фирмы Beckman, модель 890, с реакционной ячейкой, модифицированной по схеме модели 890 С, используя стандартные белковую (050972) и пептидную (051073) программы.

Все реактивы, а также стандарты фенилтиогидантоинов аминокислот были получены от фирмы Beckman. В качестве летучего буфера при анализе пептидов использовали диметилаллиламин. К *n*-хлорбутану, экстрагирующему тиазолиноны из реакционного сосуда, добавляли дитиотреитол в количестве 10^{-4} моль/мл [17]. Превращение тиазолинонов в соответствующие фенилтиогидантоины аминокислот проводили в стандартных условиях [18]. Фенилтиогидантоины аминокислот и их триметилсилильные производные анализировали методом ГЖХ по Пизано и Бронзерту [19] на газовом хроматографе GC-45 фирмы Beckman. В некоторых случаях идентификацию подтверждали тонкослойной хроматографией [20]. Фенилтиогидантоины основных аминокислот гидролизовали до свободных аминокислот [21] 6 н. HCl, содержащей 0,2% 2-меркаптоэтанола, и анализировали на аминокислотном анализаторе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Юликова Е. П., Евсеенко Л. К., Буланов В. В., Силаев А. Б. (1972) Химия природы. соедин., 779—783.
2. Евсеенко Л. К., Юликова Е. П., Силаев А. Б. (1975) Химия природн. соедин., 778—785.
3. Olson M. O. J., Jordan J., Busch H. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 46, 50—55.
4. Brand W. F., Von Holt C. (1974) Eur. J. Biochem., 45, 419—429.
5. Coelingh J. P., Monfoort C. H., Rozijn T. H., Leuven J. A. G., Schiphof R., Stein-Parvé E. P., Braunitzer G., Schrank B., Ruhfus A. (1972) Biochim. et biophys. acta, 285, 1—14.
6. Putnam F. W., Whitley E. J., Paul C., Davidson J. M. (1973) Biochemistry, 12, 3763—3780.
7. Hermodsson M. A., Ericsson L. H., Titani K., Neurat H., Walsh K. A. (1972) Biochemistry, 11, 4493—4502.
8. Юликова Е. П., Евсеенко Л. К., Рыбин В. К., Силаев А. Б. (1975) Химия природн. соедин., 817—818.
9. Matsubara H. (1970) in Methods in Enzymology (Perlman G. E., Lorand L., eds.), vol. XIX, pp. 642—651, Acad. Press, N. Y.—London.
10. Люблинская Л. А., Ваганова Т. И., Пасхина Т. С., Степанов В. М. (1973) Биохимия, 38, 790—795.
11. Sakaguchi S. (1950) J. Biochem., 37, 231—236.
12. Satake K., Luck J. (1958) Bull. Soc. Chem. Biol., 40, 1743.
13. Sanger F. (1945) Biochem. J., 39, 507—515.
14. Бреннер М., Нидервизер А., Патаки Г. (1965) в сб. Хроматография в тонких слоях (под ред. Э. Штала), с. 418—420, «Мир», М.
15. Gray W. R., Hartley V. S. (1963) Biochem. J., 89, 59 p.
16. Бельский Б. Г., Ганкина Э. С., Нестеров В. В. (1967) Докл. АН СССР, 172, 91—93.
17. Hermodsson M. A., Ericsson L. H., Walsh K. A. (1970) Federat. Proc., 29, 728.
18. Edman P., Begg G. (1967) Eur. J. Biochem., 1, 80—91.
19. Pizano J. J., Bronzert T. J., Brewer H. B. (1972) Anal. Biochem., 45, 43—59.
20. Jeppsson J. O., Sjoquist J. (1972) Anal. Biochem., 18, 264—269.
21. Africa B., Carpenter F. H. (1966) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 24, 113—119.

Поступила в редакцию
12.III.1976

После доработки
24.V.1976

THE PRIMARY STRUCTURE OF STURINE B, A PROTAMINE FROM CASPIAN STURGEON

YULIKOVA E. P., EVSEENKO L. K., BARATOVA L. A.,
BELYANOVA L. P., RYBIN V. K., SILAEV A. B.

Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State
University, Moscow

The complete amino acid sequence of sturine B, a protamine from Caspian sturgeon *Acipenser guldendstadti*, has been established by Edman degradation and conventional analysis of thermolytic peptides.