



УДК 547.96

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ТРИПСИНОВЫХ ПЕПТИДОВ КРУПНЫХ
БРОМЦИАНОВЫХ ФРАГМЕНТОВ СОМАТОТРОПИНА КИТА
(*BALAELOPTERA BOREALIS*)

Осинова Т. А., Булатов А. А., Панков Ю. А.

Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов
Академии медицинских наук СССР, Москва

Проведен триптический гидролиз двух бромциановых фрагментов соматотропина сейвала, состоящих из 30 (ОБ1-2) и 120 (ОБ1-1) аминокислотных остатков. Смесь пептидов фракционировали с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25, высоковольтного электрофореза и ВХ. Выделено 19 гомогенных пептидов. Установлена полная аминокислотная последовательность пептида ОБ1-2 и частичная — ОБ1-1, отвечающая в сумме 86 аминокислотным остаткам. На основании полученных и опубликованных ранее данных предложено 75% аминокислотной последовательности соматотропина сейвала.

В данной работе продолжено изучение первичной структуры белкового гормона соматотропина, выделенного из гипофиза китов *Balaenoptera borealis*. Ранее нами был определен ряд структурных характеристик белка и установлена полная аминокислотная последовательность 3 фрагментов, полученных после расщепления белка бромцианом: 4-членного N-концевого (БШ-2), 12-членного C-концевого (БШ-1) и 25-членного фрагмента (БП) [1]. Для двух других фрагментов, состоящих из 120 (ОБ1-1) и 30 (ОБ1-2) аминокислотных остатков, из-за недостатка пептидного материала была установлена лишь N- и C-концевая аминокислотная последовательности.

Настоящая работа посвящена выделению пептидов, полученных после гидролиза бромциановых фрагментов ОБ1-1 и ОБ1-2 трипсином, и изучению их строения. В данной работе выделение и очистка соматотропина проводились по модифицированному методу Ли [2,3], что позволило значительно повысить выход и получить достаточные для исследования количества высокоочищенного гормона. Расщепление соматотропина бромцианом, выделение и очистка бромциановых фрагментов было проведено как описано в работе [1].

Всего в работе было использовано 300 мг (20 мкмоль) фрагмента ОБ1-1 и 12,3 мг (2,8 мкмоль) фрагмента ОБ1-2.

Гидролиз бромциановых фрагментов трипсином проводили в 0,2 М аммоний-ацетатном буфере при pH 8,5 и 37°.

Фрагмент ОБ1-1. Методом деградации по Эдману с идентификацией N-концевых аминокислот в виде Dns-производных для нативного соматотропина была установлена следующая N-концевая аминокислотная последовательность: Phe-Pro-Ala-Met-Pro-Leu-Ser-Ser-Leu-Phe-. Анализ N-концевой аминокислотной последовательности фрагмента ОБ1-1 выявил,

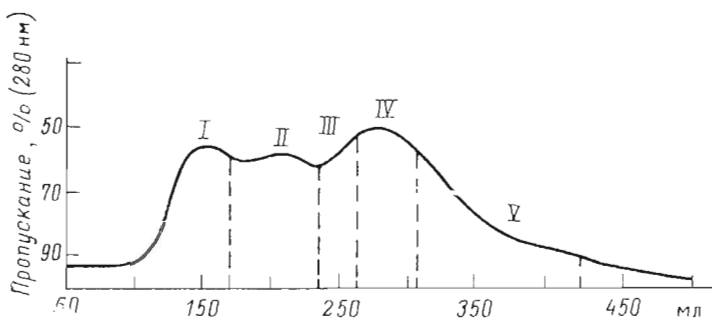


Рис. 1. Гель-фильтрация триптического гидролизата фрагмента ОБИ-1 через сефадекс G-25 в 0,4 М уксусной кислоте. Размеры колонки 2,0 × 170 см, скорость элюции 3/4 мл/ч

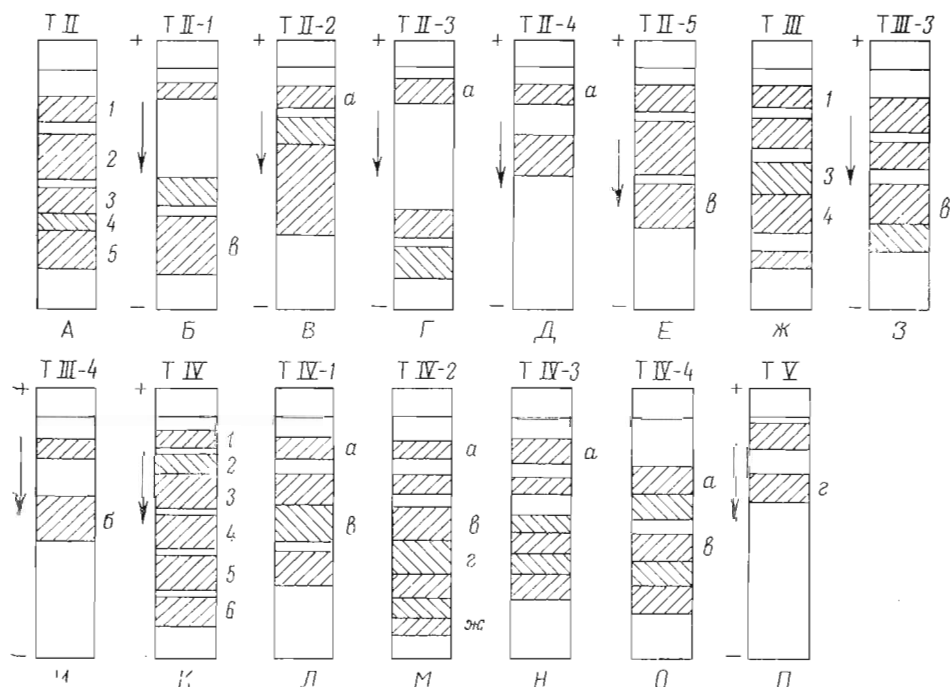


Рис. 2. Очистка пептидов триптического гидролизата ОБИ-1 хроматографией (А, Ж, Л — О) и высоковольтным электрофорезом (В — Е, З — К, П) на бумаге. Г II — Г V — фракции, полученные при гель-фильтрации через сефадекс G-25. Хроматография в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5), электрофорез в пиридин-ацетатном буфере, рН 3,5

что наряду с последовательностью Pro-Leu-Ser- в препарате ОБИ-1 содержится последовательность Phe-Pro-Ala-, аналогичная N-концевой последовательности соматотропина. Присутствие последней во фрагменте ОБИ-1 обусловлено неполным расщеплением связи Met-Pro под действием бромциана, что было отмечено ранее в работе [1].

Таким образом, совершенно очевидно, что фрагмент ОБИ-1 в молекуле гормона расположен непосредственно за N-концевым фрагментом БШ-2.

Начальное фракционирование триптического гидролизата ОБИ-1 осуществляли гель-фильтрацией через сефадекс G-25 в 0,4 М уксусной кислоте. Из растворившейся части материала было получено несколько фракций (рис. 1), при дальнейшем разделении которых методом хроматогра-

Таблица 1

Характеристика пептидов трипсинового гидролизата фрагмента ОБ-1

Пептид	АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ													Общее число остатков	N-Концевая аминокислота				
	CysSO ₃ H	Asp	Thr	Ser	Hse	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Tyr			Phe	His	Lys	Arg
ТIII-1в		1,1 (1)	1,0 (1)			2,2 (2)			2,9 (3)			2,0 (2)	0,6 (1)		1,7 (2)	1,0 (1)		13	Ala
ТIII-2а	1,3 (1)	1,4 (1)	2,1 (2)	1,6 (2)		2,8 (3)	2,1 (2)	1,8 (2)	2,2 (2)	0,9 (1)	1,3 (1)	1,1 (1)	1,7 (2)			1,3 (1)		21	Phe
ТIII-3а	1,2 (1)	1,5 (1)	1,9 (2)	1,7 (2)		2,5 (3)	2,1 (2)	1,7 (2)	2,3 (2)	0,7 (1)	1,1 (1)	1,2 (1)	1,3 (1)			1,2 (1)		20	Leu
ТIII-4а		0,7 (1)		0,4	(1) *	3,3 (3)	0,4	1,5 (1)	1,0 (1)	0,7 (1)	1,7 (2)	1,7 (2)						10	Asp
ТIII-5в		1,3 (1)	0,4	0,7	(1) *	2,6 (3)	0,7	1,2 (1)	1,2 (1)	0,5	0,8 (1)	2,7 (3)				0,9 (1)		12	Leu
ТIII-1		1,1 (1)				2,7 (3)			0,8 (1)							1,0 (1)		6	Asp
ТIII-3в		0,4				2,0 (2)	0,8 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)		0,7 (1)	0,4	0,6 (1)			0,9 (1)		8	Ala
ТIII-4б		0,9 (1)				0,4			1,7 (2)			1,1 (1)				0,4		6	Ala
ТIV-2ж		1,1 (1)		1,0 (1)		1,2 (1)		0,4		1,0 (1)	1,0 (1)	1,6 (2)	0,5			1,0 (1)		7	Ser
ТIV-3а		1,1 (1)	0,9 (1)	1,0 (1)		0,4		1,0 (1)		0,7 (1)								5	Gly
ТIV-4в				0,5		1,2 (1)				0,7 (1)			0,5 (1)			1,0 (1)		4	Val
TV-2						1,9 (2)												4	Glu

* Качественное определение.

Определение С-концевой аминокислотной последовательности пептидов гидролизата ОБИ-1 с помощью карбоксипептидаз А и В

Пептид	Карбоксипептидаза	Время гидролиза	Аминокислота	Выход, мкмоль/мкмоль пептида
ОБИ-1	А	1 и 24 ч	Gln	0,6
			Hse	1,0
			Ala	0,7
			Leu	1,0
ТII-1в	А+В	20 мин, 1 ч, 24 ч	Tyr	0,7
			Lys	1,0
ТII-5в	А+В	1 ч	Gln	0,4
			Hse	1,0
			Ala	0,7
			Leu	1,0
ТIII-3в	А+В	24 ч	Gln	0,5
			Arg	1,0

Таблица 3

Аминокислотная последовательность пептидов триптического гидролизата ОБИ-1

Пептид	Последовательности*
ТII-1в	Ala-Gln-His-Leu-His-Glu-Leu-Ala-Ala-Asp-Thr-Tyr-Lys → → → → → → → → → → → →
ТII-4а	Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-(Ile, Glu, Ala, Leu)-Hse → → → → → → → → → →
ТII-5в	Leu-Lys-** Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Glu-Ala-Leu-Hse → → → → → → → → → → → →
ТIII-1	Asp-Glu-Ala-Gln-Gln-Arg → → → → → → → → → →
ТIII-3в	Ala-Tyr-Ile-Pro-Glu-Gly-Gln-Arg → → → → → → → → → →
Т3-4б	Ala-Asn-Ala-Val-Leu-Arg → → → → → → → → → →
ТIV-2ж	Ser-Asp-Val-Glu-Leu-Leu-Arg → → → → → → → → → →
ТIV-3а	Gly-Thr-Ser-Asp-Arg → → → → → → → → → →
ТIV-4в	Val-Tyr-Glu-Lys → → → → → → → → → →
TV-2	Glu-Phe-Glu-Arg → → → → → → → → → →

* Здесь и в табл. 5: → — аминокислотный остаток идентифицирован в виде Dns-производного; → — аминокислотный остаток идентифицирован также в виде Pth-производного; ← — гидролиз карбоксипептидазами А и В.

** Определен в виде свободного лизина на аминокислотном анализаторе после щелочного гидролиза Pth-производного.

фии на бумаге в сочетании с высоковольтным электрофорезом на бумаге (рис. 2) были выделены 12 индивидуальных пептидов. Аминокислотный состав и N-концевые аминокислотные остатки этих пептидов приведены в табл. 1. В некоторых случаях одни и те же пептиды выделялись в ходе очистки различных фракций. Так, пептид ТIII-1 обнаруживался также в зоне ТIV-1а, пептид ТIII-3в — в зоне ТIV-2в, пептид ТIV-3а — в зоне ТIV-2а. В зонах ТIV-6 и ТIV-4а концентрировался свободный лизин.

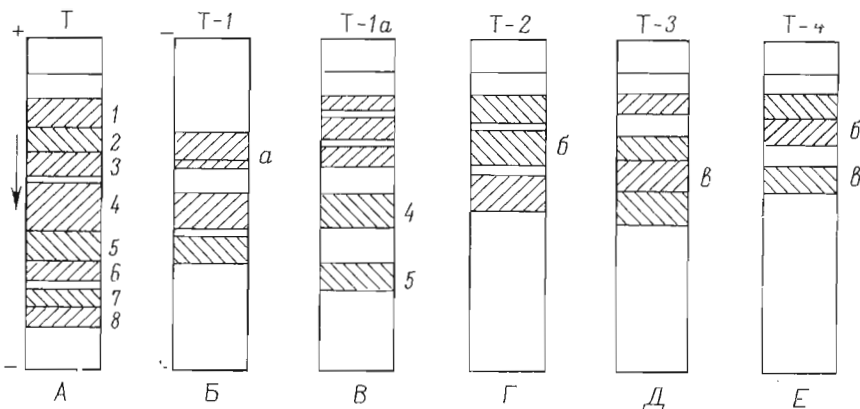


Рис. 3. Очистка пептидов триптического гидролизата ОБИ-2 высоковольтным электрофорезом (А, Б) и хроматографией (В — Е) на бумаге. Электрофорез в пиридин-ацетатных буферах, рН 3,5 и 6,5, хроматография в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5).

Последовательность аминокислотных остатков в пептидах изучали методом Эдмана. После каждой стадии деградации в укороченном пептиде N-концевую аминокислоту идентифицировали в виде Dns-производного, а дикарбоновые аминокислоты и их амиды — в виде Pth-производных. Отдельные пептиды для определения C-концевых аминокислот гидролизовали карбоксипептидазами А и В (табл. 2). Результаты исследования аминокислотной последовательности пептидов триптического гидролизата приведены в табл. 3.

При исследовании пептида ТП-5в после 1-й стадии деградации по Эдману N-концевую аминокислоту остаточного пептида по реакции с Dns-хлоридом выявить не удалось. После 2-й стадии деградации отщепившееся Pth-производное подвергали щелочному гидролизу. При этом на автоматическом аминокислотном анализаторе был идентифицирован лизин.

Судя по результатам определения аминокислотной последовательности пептидов ТП-4а и ТП-5в методом Эдмана (см. табл. 3) и их аминокислотному составу (см. табл. 1), последовательность аминокислот в пептиде ТП-5в, начиная с 3-го остатка, повторяет аминокислотную последовательность пептида ТП-4а. Присутствие же в составе пептида ТП-5в серина, пролина и валина (см. табл. 1), по-видимому, обусловлено наличием не полностью отделившейся от этого пептида примеси с относительно высоким содержанием указанных трех аминокислот. При гидролизе пептида ТП-5в карбоксипептидазами А и В были найдены те же самые аминокислоты и в том же соотношении, что и при гидролизе карбоксипептидазой А целого фрагмента ОБИ-1 (см. табл. 2). Это доказывает, что пептид ТП-5в представляет собой C-концевой участок бромцианового фрагмента.

Пептиды ТП-2а и ТП-3а были выделены из гидролизата с низким выходом, и потому удалось установить только их аминокислотный состав и N-концевые аминокислоты (см. табл. 1). При сравнении аминокислотного состава пептидов можно видеть, что ТП-2а отличается от ТП-3а лишь наличием дополнительного N-концевого остатка фенилаланина. По-видимому, пептид ТП-3а образовался за счет неспецифичного для трипсина разрыва связи Phe-Leu.

В целом из 120 аминокислотных остатков бромцианового фрагмента ОБИ-1 в выделенных трипсиновых пептидах представлены 86 остатков. Таким образом, из гидролизата не удалось получить лишь пептиды, составляющие последовательность примерно 30 аминокислотных остатков этого высокомолекулярного фрагмента.

Фрагмент ОБИ-2. При исследовании целого фрагмента ОБИ-2 с помощью метода Эдмана установлена N-концевая последовательность Arg-

Характеристика пептидов триптического гидролизата фрагмента ОБГ-2

Пептид	Аминокислотный состав														Общее число остатков	N-Концевая аминокислота			
	CysSO ₃ H	Asp	Thr	Ser	Hse	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Tyr	Phe			His	Lys	Arg
T-1a-5	1,2 (1)	1,1 (1)		1,0 (1)	0,4		1,0 (1)					1,9 (2)	0,6 (1)	0,8 (1)		0,9 (1)		9	Asn
T-2b		1,9 (2)		1,1 (1)			1,0 (1)					2,2 (2)				1,0 (1)		7	Ser
T-3b					(1) *				1,0 (1)									2	Val
T-4b		2,0 (2)		1,0 (1)	0,5				0,9 (1)			1,7 (2)				1,0 (1)	0,7 (1)	8	Arg
T-4b			1,1 (1)		1,3 (1)							1,5 (1)	0,5 (1)				1,0 (1)	6	Ala
T-5		0,9 (1)					0,4					1,0 (1)			0,7 (1)	1,0 (1)	4	Asp	
T-6												0,9 (1)				1,0 (1)	2	Leu	
T-7																1,0 (1)			Lys, Arg
T-8																1,0 (1)			Lys
T-1a-4		1,9 (2)	1,1 (1)	1,0 (1)	1,4 (1)		0,5	1,7 (2)				1,8 (2)	0,8 (1)			0,9 (1)		7+4	Ser, Ala
ОБГ-2	1,1 (1)	4,3 (4)	1,2 (1)	2,2 (2)	2,2 ** (2)	0,4	1,5 (1)	2,2 (2)	1,0 (1)			5,8 (6)	1,7 (2)	1,2 (1)	0,9 (1)	3,6 (4)	1,8 (2)	30	Arg

* Качественное определение.

** Вместе с глутаминовой кислотой с колонки аминокислотного анализатора выходил гомосерин.

Аминокислотная последовательность пептидов триптического гидролизата ОБИ-2

Пептид	Последовательность
T-1a-5	Asp-Tyr-Gly-Leu-Leu-Ser-CysSO ₃ H-Phe-Lys
T-2б	Ser-Asp-Asp-Ala-Leu-Leu-Lys
T-4б	Arg-Ser-Asp-Asp-Ala-Leu-Leu-Lys
T-3в	Val-Hse
T-4в	Ala-Glu-Thr-Tyr-Leu-Arg
T-5	Asp-Icu-His-Lys
T-6	Leu-Arg

Ser-Asp-Asp-Ala-Leu-Leu-, а в результате гидролиза карбоксипептидазой А — С-концевая последовательность -Val-Hse.

В процессе фракционирования трипсинового гидролизата фрагмента ОБИ-2 высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге (см. рис. 3) было получено 7 индивидуальных пептидов, а также свободные аргинин и лизин. Аминокислотный состав и N-концевые аминокислоты этих пептидов приведены в табл. 4.

Последовательность аминокислотных остатков в трипсиновых пептидах определялась деградацией по методу Эдмана (см. табл. 5). Аминокислотная последовательность пептида T-4б соответствует N-концевой последовательности фрагмента ОБИ-2. Пептид T-2б отличается от пептида T-4б лишь отсутствием аргинина на N-конце. Дипептид T-6, по-видимому, образовался в результате неспецифического расщепления связи Tyr-Leu в пептиде T-4в. Анализ аминокислотного состава фракции T-1a-4 (см. табл. 4) и определение в ней частичной аминокислотной последовательности методом Эдмана позволили заключить, что эта фракция представляет собой смесь пептида T-2б и N-концевой части пептида T-4в, образовавшейся вследствие расщепления в нем связи Tyr-Leu.

Наличие в дипептиде T-3в гомосерина свидетельствует о его C-концевом расположении во фрагменте ОБИ-2.

Состав пептидов T-4б, T-1a-5, T-5, T-4в, T-3в вместе со свободным лизином, обнаруженным во фракции T-8, в сумме соответствует аминокислотному составу целого фрагмента ОБИ-2 (см. табл. 4), т. е. эти пептиды составляют его полную аминокислотную последовательность.

К настоящему времени расшифрована первичная структура соматотропина человека [4,5], овцы [6], быка [7], и лошади [8], а также определена последовательность 67 остатков на C-конце соматотропина свиньи [9]. Соматотропины овцы и быка различаются аминокислотными остатками лишь в двух положениях. Значительно большие различия обнаружены в соматотропине лошади, и особенно велики различия в гормоне человека. В соматотропинах овцы и человека идентичные положения занимают лишь около 65% аминокислотных остатков.

Для всех трипсиновых пептидов фрагментов ОБИ-1 и ОБИ-2, описанных в настоящей работе, легко находились близкие или даже идентичные участки в структуре соматотропинов овцы, быка и лошади. Поэтому, расположив трипсиновые пептиды в соответствии с известной структурой соматотропинов, можно было представить полную аминокислотную последовательность фрагмента ОБИ-2 и большую часть последовательности фрагмента ОБИ-1. Это вместе с данными предыдущей публикации [1] о

Человек	-Thr-Ile-	-Arg-	-Asp-	-Met-	-His-Arg-	-Gln-	-Phe-	-Gln-	-Glu-
Кит	H-Phe-Pro-Ala-Met-Pro-Leu-Ser-Leu-Phe-Ala-Asn-Ala-Val-Leu-Arg-Ala-Gln-His-Leu-His-Glu-Leu-Ala-Asp-Thr-Tyr-Lys-Glu-Phe-Glu-Arg-Ala-Tyr								
Овца	H-Ala-	-Ser-	-Gly-			-Gln-	-Phe-		-Thr-
Лошадь									
Человек	-Lys-Glu-	-Lys-					-Arg-Glu-	-Thr-	
Кит	Ile-Pro-Glu-Gly-Gln-Arg-...-Phe-Leu-(Cys ₁ , Asx ₁ , Thr ₂ , Ser ₂ , Glu ₃ , Pro ₂ , Gly ₂ , Ala ₂ , Val ₁ , Phe ₁)-Lys-Asp-Glu-Ala-Gln-						-Asn-		
Овца	()-Ile-								
Лошадь	()-Ile-								
Человек	-Lys-	-Asn-Leu-Gln-	-Ala-	-Asn-Ser-Asp-	-Asp-Leu-			-Thr-	-Gly-
Кит	Gln-Arg-Ser-Asp-Val-Glu-Leu-Leu-Arg-...-Glu-Thr-Ser-Asp-Arg-()-Val-Tyr-Glu-Lys-Leu-Lys-Asp-Leu-Glu-Gly-Ile-Gln-Ala-Leu-Met-Arg-								
Овца	-Lys-	-Leu-						-Leu-	↓
Лошадь		-Met-							
Человек	-Arg-								
Кит	Glu-Leu-Glu-Asp-Gly-Ser-Pro-Arg-Ala-Gly-Gln-Ile-Leu-Lys-Gln-Thr-Tyr-Asp-Lys-Phe-Asp-Thr-Asn-Met-Arg-Ser-Asp-Ala-Leu-Leu-Lys-Asn-Tys-Gly-								
Овца	-Val-Thr-								
Лошадь									
Человек	-Tyr-	-Arg-	-Met-Asp-	-Val-	-Phe-	-Ile-Val-Gln-	-Ser-Val-Glu-Gly-		-Gly-
Кит	Leu-Leu-Ser-Cys-Phe-Lys-Lys-Asp-Leu-His-Lys-Ala-Glu-Thr-Tyr-Leu-Arg-Val-Met-Lys-Cys-Arg-Arg-Phe-Val-Glu-Ser-Ser-Cys-Ala-Phe-OH								
Овца		-Arg-							
Лошадь									

Рис. 4. Аминокислотная последовательность в молекуле соматотропина сейвала. Сверху и снизу указаны замены аминокислотных остатков в соматотропинах человека, овцы и лошади. Стрелками показаны места расщепления бромцианом

структуре других бромциановых фрагментов позволило предложить для соматотропина сейвала аминокислотную последовательность, приведенную на рис. 4.

Из 145 остатков, последовательность которых в соматотропине сейвала расшифрована, в гормоне лошади изменены 4 остатка и обнаруживается 1 делеция, в гормоне быка — 15 остатков и 1 делеция, овцы — 16 остатков и 1 делеция, человека — 50 остатков. Исходя из аминокислотного состава трипсиновых пептидов ТII-2а, и ТII-3а фрагмента ОБИ-1, содержащих цистеиновую кислоту, можно ожидать, что 2 остатка аланина и 1 остаток фенилаланина, присутствующие в соматотропине лошади на участке, соответствующем этим пептидам, в гормоне сейвала заменены на остатки валина, серина и глицина.

Установление особенностей строения соматотропина сейвала дает возможность путем сравнения его с соматотропинами других животных и человека выявить ряд наиболее изменчивых участков первичной структуры гормона. Такие участки вряд ли могут играть важную роль в осуществлении биологического действия соматотропика. В месте с тем они могут быть ответственны за его иммунологическую специфичность. Поскольку участки наибольшей изменчивости не группируются в каком-то одном месте, а распределены довольно равномерно вдоль всей полипептидной цепи, трудно предположить, чтобы сложный спектр биологического действия соматотропина в организме, а также его иммунологическая активность определялись бы строго ограниченными и относительно короткими фрагментами. По-видимому, так называемый активный центр (или «активные центры») молекулы соматотропина включает в себя элементы различных участков аминокислотной последовательности, которые сближаются при формировании третичной структуры белка.

Экспериментальная часть

При экстракции и очистке соматотропина сейвала за основу был взят метод, предложенный Ли для выделения этого гормона из гипофизов человека и животных, в том числе и китов [2,3]. Измельченную ткань свежезамороженных гипофизов экстрагировали раствором $\text{Ca}(\text{OH})_2$ при pH 10,0 и 4° дважды: вначале в течение 3 ч, а затем 1 ч. Суспензию центрифугировали при 20000 об/мин. К надосадочной жидкости добавляли равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и pH смеси доводили до 7,0. Выпавший осадок отделяли центрифугированием при 5000 об/мин и растворяли в воде. Раствор подвергали диализу против проточной водопроводной воды для освобождения от сульфата аммония. Из диализата белки осаждали сульфатом аммония при конечной концентрации 0,2 и 0,4 от насыщения. Осадок, образовавшийся при меньшей концентрации соли, отбрасывали. Осадок, сформировавшийся при большей концентрации сульфата аммония, растворяли в воде. Раствор диализовали вначале против проточной водопроводной, а затем против дистиллированной воды до полного освобождения от сульфата аммония и лиофилизовали.

Дальнейшую очистку гормона осуществляли ионообменной хроматографией на колонке с амберлитом IRC-50. Ионообменник уравнивали буфером с pH 5,1, содержащим 0,052 M NaH_2PO_4 , 0,0025 M Na_2HPO_4 и 0,45 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 10—12 г материала экстрагировали 250—300 мл того же буфера и наносили на колонку (4×40 см). Колонку промывали 2,5 л натрий-фосфатного буфера, pH 5,1, для полного удаления белка, не адсорбировавшегося ионообменником. Соматотропин элюировали буфером (pH 6,0), состоявшим из 0,18 M NaH_2PO_4 , 0,085 M Na_2HPO_4 и 0,45 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. При определении N-концевых аминокислот и аминокислотного состава отдельных фракций элюата в зоне выхода соматотропина из колонки были выявлены фракции с высоким содержанием гормона без примеси других белков (см. рис. 5). Это позволило не подвергать его после

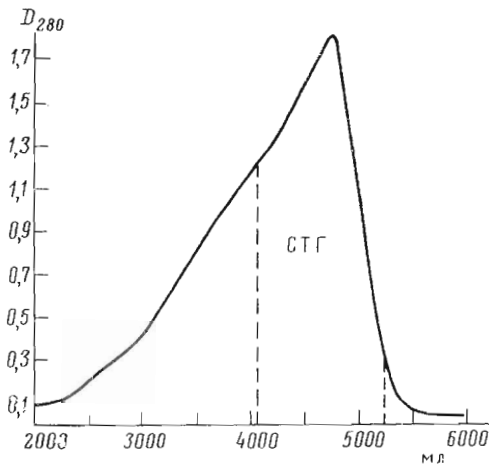


Рис. 5. Очистка соматотропина сейвала хроматографией на амберлите IRC-50. Условия хроматографии см. в «Экспер. части»

ионообменной хроматографии дополнительной очистке согласно методу Ли [2,3], включавшей изоэлектрическое фракционирование и осаждение этанолом. Исключение этих приемов очистки, приводивших к большой потере и денатурации материала, существенно увеличило выход гормона. После хроматографии на амберлите высокоочищенный соматотропин осаждали сульфатом аммония при концентрации 0,5 от насыщения, растворяли в воде, диализовали против воды и лиофилизовали. Конечный выход гормона из 1 кг свежезамороженных желез составлял около 2 г, т. е. в несколько раз превышал выход соматотропина сейвала при его выделении методом, использованным нами ранее [1].

Гидролиз бромциановых фрагментов трипсином (Serva, ФРГ), обработанным дифенилкарбамилхлоридом, проводили в 0,2 М аммоний-ацетатном буфере (рН 8,5) при 37° в течение 6 ч. Соотношение фермента и субстрата в первые 4 ч было 1:100, а затем 1:50.

Для разделения и очистки трипсиновых пептидов применяли высоковольтный электрофорез и распределительную хроматографию на бумаге Ватман 3 ММ. Электрофорез проводили в аппарате фирмы Savant (США) в пиридин-ацетатных буферах с рН 3,5 (6,6 мл пиридина и 66 мл уксусной кислоты на 3 л воды) и рН 6,5 (200 мл пиридина и 8 мл уксусной кислоты на 3 л воды) при напряжении 3500—4000 В в течение 70—75 мин. Хроматографию проводили в системе *n*-бутанолуксусная кислота — вода (4:1:5). Пептиды обнаруживали по реакции с нингидрином, присутствие аргинина — по реакции Сакагуши. Материал с бумаги элюировали 10% уксусной кислотой. О количественном выходе пептидов судили по данным аминокислотного анализа. Конечный выход большинства трипсиновых пептидов составлял 10—15%.

Аминокислотный состав пептидов изучали с помощью аминокислотного анализатора TSM (Technicon, США). В одной из систем буферов, использовавшихся для элюции аминокислот с ионообменной смолы, гомосерин выходил отдельным пиком перед глутаминовой кислотой, в другой системе — вместе с глутаминовой кислотой, глутамин и аспарагин выходили вместе с треонином. Из-за отсутствия соответствующего стандарта гомосерин определяли лишь качественно.

Методы, использовавшиеся при изучении первичной структуры пептидов, подробно описаны в работах [1, 10, 11]. Dns-производные аминокислот идентифицировали хроматографией на полиамидных пластинках, Pth-производные дикарбоновых аминокислот и их амидов — хроматографией на пластинках Silufol UV-254. В отдельных случаях Pth-производные аминокислот (в частности, лизина) подвергали гидролизу 0,1 н. NaOH при 120° в течение 12 ч, а затем свободные аминокислоты определяли на аминокислотном анализаторе.

После гидролиза пептидов карбоксипептидазами А и В (Worthington Biochem. Corp., США) отщепившиеся аминокислоты определяли количественно в аминокислотном анализаторе и идентифицировали качественно по реакции с Dns-хлоридом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Паяков Ю. А., Булатов А. А., Осипова Т. А., Кеда Ю. М., Свицидина А. Л. (1976) Биохимия, 41, 2047—2055.
2. Parke H., Li C. H. (1958) J. Biol. Chem., 231, 367—377.
3. Ли Ч. Х. (1961) Современные проблемы биохимии, с. 100—128, Изд-во иностранной литературы, М.
4. Li C. H., Gixon J. S. (1971) Arch. Biochem. and Biophys., 146, 233—236.
5. Niall H. D. (1971) Nature New Biol., 230, 90—91.
6. Li C. H., Gordon D., Knorr J. (1973) Arch. Biochem. and Biophys., 156, 493—508.
7. Wallis M. (1973) FEBS Lett., 35, 11—14.
8. Zakin M. M., Poskus H., Langton A. A., Ferrara P., Santome J. A., Dellacha J. M., Palladini A. C. (1976) Int. J. Pept. and Protein Res., 8, 435—444.
9. Mills J. B., Howard S. C., Scapa S., Wilhelmi A. E. (1970) J. Biol. Chem. 245, 3407—3415.
10. Паяков Ю. А. (1970) Проблемы эндокринологии, № 4, 110—117.
11. Паяков Ю. А., Юдаев Н. А. (1972) Биохимия, 37, 991—1004.

Поступила в редакцию
11.I.1978

После доработки
12.V.1978

STRUCTURAL STUDIES OF TRYPTIC PEPTIDES FROM LARGE CYANOGEN BROMIDE FRAGMENTS OF SEIWHALE (*BALAENOPTERA BOREALIS*) SOMATOTROPIN

OSIPOVA T. A., BULATOV A. A., PANKOV Yu. A.

*Institute of Experimental Endocrinology and Hormone Chemistry,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

The 30- and 120-residue cyanogen bromide fragments of seiwhale somatotropin were subjected to tryptic digestion. The peptide mixtures obtained were fractionated by Sephadex G-25 gel-filtration, high-voltage electrophoresis and paper chromatography, 19 peptides being isolated in a homogeneous state. The complete amino-acid sequence was determined for the 30-residue cyanogen bromide peptide and a partial one, accounting for in total 86 residues, for the 120-residue fragment. On the ground of these and earlier published data, 75% of the seiwhale somatotropin amino-acid sequence was proposed.
