



УДК 547.96

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА  $\alpha$ -СУБЪЕДИНИЦЫ  
ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI*

V. ПЕПТИДЫ БРОМЦИАНОВОГО ГИДРОЛИЗА

*Модянов Н. Н., Липкин В. М., Смирнов Ю. В.,  
Шуваева Т. М., Кочергинская С. А.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

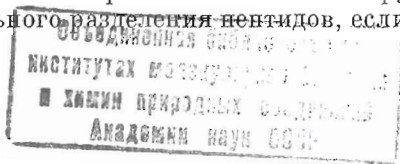
Проведено расщепление  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* бромцианом. Хроматографией на сефадексе G-75 выделено 6 пептидов, содержащих в сумме всю полипептидную цепь исходного белка. Определение аминокислотной последовательности этих пептидов позволило завершить установление полной первичной структуры  $\alpha$ -субъединицы.

Настоящее сообщение завершает серию публикаций [1—4], посвященных изучению полной первичной структуры  $\alpha$ -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* V; в нем описывается выделение и определение аминокислотной последовательности бромциановых фрагментов белка. В молекуле  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы содержится 5 остатков метионина [1], причем один из них является N-концевым аминокислотным остатком белка [5]. Таким образом, после расщепления белка бромцианом следовало ожидать образования 5 крупных фрагментов.

Расщепление  $\alpha$ -субъединицы бромцианом (500-кратный избыток реагента на моль метионина) проводилось в 70% муравьиной кислоте при комнатной температуре в течение 20 ч. Результаты анализа гидролизата с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, а также определение N-концевых аминокислотных остатков свидетельствовали об образовании 5—6 пептидов.

Первые эксперименты по разделению смеси пептидов даже в присутствии 6 М гуанидин-НСl или 8 М мочевины не дали положительных результатов из-за сильной агрегации высокомолекулярных фрагментов белка. Как выяснилось впоследствии, агрегация была вызвана в основном спонтанным образованием межмолекулярных дисульфидных связей. Известно, что  $\alpha$ -субъединица в составе молекулы РНК-полимеразы не содержит дисульфидных мостиков [6]. Однако такого типа связи могли образоваться при хранении препаратов  $\alpha$ -субъединицы или после гидролиза белка бромцианом, поскольку все предыдущие этапы выделения фермента проводились в присутствии восстановителей. О возможности возникновения дисульфидных связей в образцах  $\alpha$ -субъединицы, находящихся в растворе без восстанавливающих агентов, сообщали недавно и другие исследователи [7].

В результате аналитических экспериментов было обнаружено, что можно добиться удовлетворительного разделения пептидов, если проводить



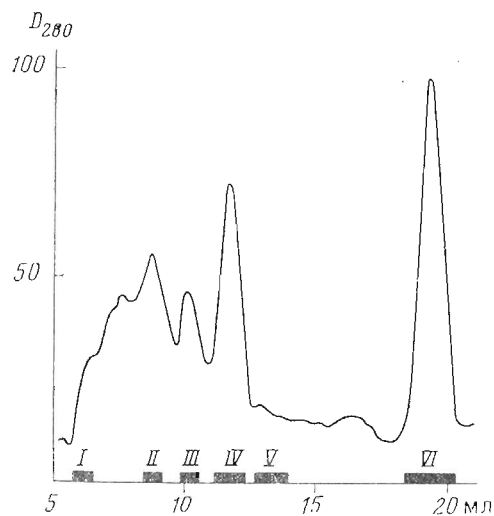


Рис. 1. Разделение бромцианового гидролизата  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы на сефадексе G-75 (здесь и далее черными прямоугольниками на оси абсцисс отмечены границы объединения фракций)

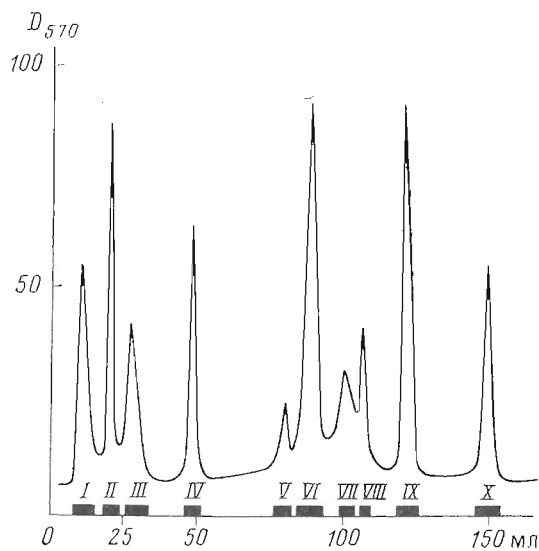


Рис. 2. Разделение химотриптического гидролизата пептида BV на смоле PA-35

предварительное восстановление смеси бромциановых пептидов меркаптоэтанолом. Наилучшие результаты получены при хроматографировании гидролизата на колонке с сефадексом G-75 в буфере, содержащем меркаптоэтанол наряду с дезагрегирующим агентом — 6 M гуанидинхлоридом.

Для достижения максимальной эффективности разделения был применен специально фракционированный сефадекс G-75 (сверхтонкий) и использована хроматографическая колонка длиной 200 см с внутренним диаметром 0,4 см. Картина разделения бромцианового гидролизата приведена на рис. 1. Для уточнения границ объединения фракций использовалось определение N-концевых аминокислотных остатков. В результате получено 6 объединенных фракций, из которых после дополнительной очистки на сефадексах G-75 (фракции I—IV), G-50 (фракция V) и электрофорезом на бумаге (фракция VI) были выделены чистые пептиды. В табл. 1 приведены

Аминокислотный состав бромциановых фрагментов  $\alpha$ -субъединицы

Аминокислота	Пептиды					
	VI	VII	VIII	IV	V	VI
Asp	14,8 (15)	11,0 (11)	10,3 (10)	5,4 (5)	2,2 (2)	1,92 (2)
Thr	9,4 (8)	7,3 (7)	6,4 (6)	2,4 (2)	3,7 (4)	
Ser	8,7 (7)	4,2 (4)	4,1 (4)	3,1 (3)	5,0 (5)	0,97 (1)
Glu	20,5 (21)	16,6 (17)	11,8 (12)	8,8 (9)	6,4 (6)	2,00 (2)
Pro	5,5 (6)	5,6 (6)	2,8 (3)	3,2 (3)	2,1 (2)	1,98 (2)
Gly	12,3 (11)	5,2 (5)	8,4 (8)	3,3 (3)	4,5 (4)	
Ala	10,7 (10)	9,4 (9)	5,5 (5)	5,2 (5)	2,3 (2)	1,92 (2)
Val	17,4 * (18)	7,7 (8)	10,5 * (11)	6,9 * (7)	3,8 (4)	
Hse	0,9 (2)	0,5 (1)	0,4 (1)	0,5 (1)	0,6 (1)	
Ile	13,6 * (14)	7,4 (7)	8,7 * (9)	4,8 * (5)	1,8 (2)	1,12 (1)
Leu	12,6 (13)	16,0 (16)	8,6 * (9)	3,9 (4)	7,6 (8)	0,96 (1)
Tyr	2,5 (4)	1,2 (1)	1,2 (1)	2,3 (3)		
Phe		1,7 (2)			1,5 (2)	
His	3,4 (5)	1,2 (1)	3,6 (4)	1,1 (1)	1,7 (2)	
Lys	7,4 (7)	7,2 (7)	5,2 (5)	2,1 (2)	2,3 (2)	
Arg	8,7 (10)	8,4 (8)	1,3 (1)	8,9 (9)	4,0 (4)	1,12 (1)
Trp						+ (1) **
Cys	1,2 (3)	0,5 (1)	1,3 (2)	0,4 (1)		
Число остатков	154	111	91	63	50	13
N-Концевая аминокислота	Pro	Glu	Pro	Arg	Gln (Met)	Arg
Выход, %	5	33	28	35	45	62

\* Результаты гидролиза в течение 72 ч.

\*\* Триптофан определяли качественно цветной реакцией с реактивом Эрлиха.

данные об аминокислотном составе, N-концевых аминокислотных остатках и выходе выделенных бромциановых пептидов.

**Фрагмент V (остатки 2—51).** Как видно из рис. 1, фракция V имеет крайне незначительное поглощение при 280 нм. Ее местоположение было определено путем измерения радиоактивности элюата в предварительных аналитических экспериментах по делению бромцианового гидролизата меченой  $^{14}\text{C}$   $\alpha$ -субъединицы.

Сравнение данных, полученных при деградации фракции V по методу Эдмана (5 стадий), с результатами определения аминокислотной последовательности  $\alpha$ -субъединицы на секвенсоре [8] показало, что эта фракция представляет собой смесь двух пептидов (остатки 1—51 и 2—51), N-концевыми остатками которых являются метионин и глутамин соответственно. Определение количества этих пептидов с помощью аминокислотного анализа по сравнению с выходами Pih-производных аминокислот при деградации по Эдману показало, что в реакцию вступает не более 10% пептидного материала. Эти результаты позволили предположить, что фракция V в основном состоит из пептида (2—51), имеющего в качестве N-концевого аминокислотного остатка пироглутаминовую кислоту.

Для установления аминокислотной последовательности пептида BV было осуществлено расщепление 1 мкмоль этого пептида химотрипсином (соотношение фермент — субстрат 1 : 50, рН 8,2; 6 ч, 37°). Первоначальное деление гидролизата проводилось на колонке с катионитом РА-35. Пептиды элюировались системой пиридин-ацетатных буферов и детектировались по реакции с нингидрином [1]. Полученная картина разделения гидролизата приведена на рис. 2. Всего было получено 10 объединенных фракций, причем, как показал анализ их состава путем хроматографирования в тонком слое целлюлозы и определения N-концевых аминокислотных остатков,

## Аминокислотный состав пептидов, полученных при химотриптическом гидролизе бромцианового фрагмента BV

Аминокислота	Пептиды *							
	BV-Ch-I	BV-Ch-II	BV-Ch-III-1	BV-Ch-III-4	BV-Ch-IV-1; BV-Ch-III-3	BV-Ch-IV-3	BV-Ch-V	BV-Ch-VI
Asp	0,93 (1)	1,01 (1)	0,90 (1)			0,92 (1)		0,93 (1)
Thr	1,25 (1)							
Ser	1,63 (2)			2,00 (2)	2,00 (2)			
Glu	2,26 (2)					0,98 (1)	2,12 (2)	
Pro						0,92 (1)	1,07 (1)	
Gly		1,00 (1)	1,10 (1)				0,98 (1)	
Ala		1,00 (1)				1,29 (1)		1,06 (1)
Val	1,69 (2)					0,88 (1)		0,98 (1)
Hse				0,60 (1)	0,53 (1)			
Ile	0,64 (1)							
Leu	1,29 (1)	0,98 (1)		0,99 (1)		2,18 (2)	1,06 (1)	1,14 (1)
Phe							0,90 (1)	
His	0,54 (1)							
Lys						0,82 (1)		0,90 (1)
Arg							0,72 (1)	
Число остатков N-Концевая аминокислота	11 Leu	4 Gly	2 Gly	4 Leu	3 Ser	8 Ala	7 Glu	5 Ala
Выход, %	41	20	3	5	22	15	14	10

Аминокислота	Пептиды					
	BV-Ch-VII-1; BV-Ch-VIII-2	BV-Ch-VII-2	BV-Ch-VIII-1	BV-Ch-IX	BV-Ch-X	BV-Ch-XI
Asp	1,02 (1)					
Thr	1,00 (1)	0,96 (1)		1,00 (1)		
Ser	2,07 (2)					
Glu	2,09 (2)	2,12 (2)			1,05 (1)	
Pro	1,05 (1)	1,09 (1)				
Gly		1,02 (1)	1,10 (1)	1,08 (1)	1,05 (1)	
Ala		0,95 (1)				
Val	1,96 (2)	1,01 (1)				
Hse						
Ile	0,93 (1)					0,92 (1)
Leu	1,84 (2)	1,97 (2)		1,00 (1)		1,14 (1)
Phe		0,94 (1)			0,97 (1)	
His	0,88 (1)		0,90 (1)	0,91 (1)		
Lys	0,98 (1)	0,95 (1)				
Arg	0,89 (1)	0,90 (1)			0,92 (1)	1,70 (2)
Число остатков N-Концевая аминокислота	15 Leu	12 Ala	2 Gly	4 Gly	4 Glu	4 Arg
Выход, %	8	10	6	39	20	10

\* Примеси менее 0,2 аминокислотного остатка в таблицу не включены.

Фракции BV-Ch-I, BV-Ch-II, BV-Ch-V, BV-Ch-VI, BV-Ch-IX и BV-Ch-X представляли собой чистые пептиды, остальные 4 фракции содержали по два пептида, которые были выделены с помощью препаративной хроматографии на бумаге. Аминокислотный состав химотриптических фрагментов пептида BV приведен в табл. 2, а результаты определения аминокислотной последовательности — в табл. 3. Необходимо отметить, что пептид Ser-Ser-Hse был выделен из далеко отстоящих друг от друга фракций III и IV, что связано, очевидно, с наличием в его составе как гомосерина, так и лак-

**Аминокислотная последовательность пептидов, полученных при химотриптическом гидролизе бромцианового фрагмента BV**

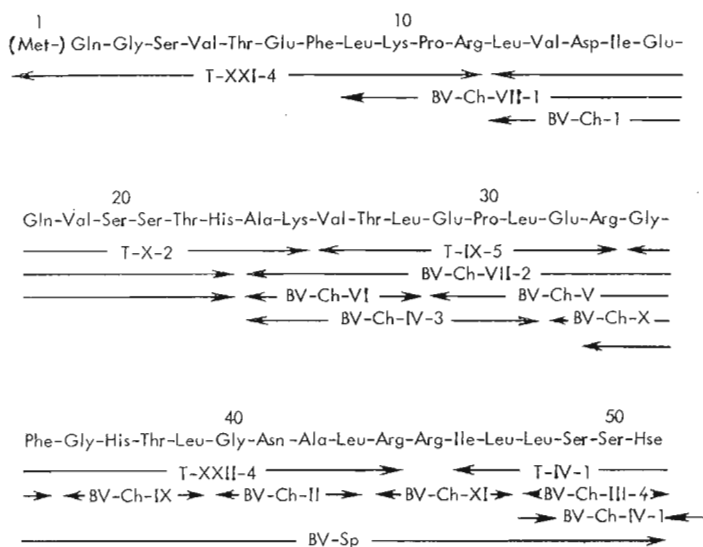
Пептид	Аминокислотная последовательность *
BV-Ch-I	Leu-Val-Asx-Ile-Glx-Glx-Val-Ser-Ser-Thr-His $\begin{array}{cccccccccccc} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \leftarrow & \leftarrow & \leftarrow & \leftarrow & \leftarrow \end{array}$
BV-Ch-II	Gly-Asn-Ala-Leu $\begin{array}{cccc} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \end{array}$
BV-Ch-III-1	Gly-Asn $\begin{array}{cc} \rightarrow & \rightarrow \end{array}$
BV-Ch-III-4	Leu-Ser-Ser-Hse $\begin{array}{cccc} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \end{array}$
BV-Ch-IV-1	Ser-Ser-Hse $\begin{array}{ccc} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \end{array}$
BV-Ch-IV-3	Ala-Lys-Val-Thr-Leu-Glx-Pro-Leu $\begin{array}{cccccccc} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \end{array}$
BV-Ch-V	Glu-Pro-Leu-Glu-Arg-Gly-Phe $\begin{array}{ccccccc} \Rightarrow & \Rightarrow & \Rightarrow & \Rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \end{array}$
BV-Ch-VI	Ala-Lys-Val-Thr-Leu $\begin{array}{cccccc} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \end{array}$
BV-Ch-VII-1	Leu-Lys-Pro-Arg-Leu-Val-Asx-Ile-(Glx <sub>2</sub> , Val, Ser <sub>2</sub> , Thr, His) $\begin{array}{cccccccc} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \end{array}$
BV-Ch-VII-2	Ala-Lys-Val-Thr-Leu-Glx-Pro-Leu-(Glx, Arg, Gly, Phe) $\begin{array}{cccccccc} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \end{array}$
BV-Ch-VIII-1	Gly-His $\begin{array}{cc} \rightarrow & \rightarrow \end{array}$
BV-Ch-IX	Gly-His-Thr-Leu $\begin{array}{cccc} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \end{array}$
BV-Ch-X	Glu-Arg-Gly-Phe $\begin{array}{cccc} \Rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \end{array}$
BV-Ch-XI	Arg-Arg-Ile-Leu $\begin{array}{cccc} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \end{array}$

\* Стрелками показана аминокислотная последовательность, определенная деградацией пептидов по методу Эдмана с идентификацией ФТГ ( $\rightarrow$ ), ДНС ( $\rightarrow$ ), ФТГ и ДНС ( $\Rightarrow$ ) производных аминокислот и с помощью карбоксипептидазы А ( $\leftarrow$ ) (в табл. 3,5).

тона гомосерина. Полученные данные позволили установить, какие триптические пептиды входят в состав бромцианового фрагмента BV, а также порядок их расположения в пептидной цепи (см. схему 1). Из химотриптического гидролизата не был выделен N-концевой фрагмент пептида BV, не содержащий свободной  $\alpha$ -аминогруппы и, следовательно, не реагировавший с нингидрином, но поскольку N-концевая последовательность белка была известна, то специального поиска этого пептида не проводили. В данном опыте не удалось также выделить аргининсодержащий пептид, соединяющий триптические фрагменты T-XXII-4 и T-IV-1, поэтому было проведено повторное расщепление 100 нмоль пептида BV химотрипсином с последующим разделением гидролизата с помощью пептидной карты на бумаге в условиях, обеспечивающих лучшее разделение основных пептидов. В результате был выделен пептид BV-Ch-XI, содержащий два остатка аргинина. Неудача с выделением этого сильноосновного пептида в первом опыте связана, очевидно, с необратимой сорбцией на катионите. Определение структуры пептида BV-Ch-XI свидетельствовало о наличии остатка аргинина между пептидами T-XXII-4 и T-IV-1.

Поскольку перекрывающаяся последовательность пептидов T-XXII-4 и BV-Ch-XI содержала только один аминокислотный остаток (схема 1), для окончательного доказательства предложенной структуры этого участка полипептидной цепи белка требовались дополнительные данные, которые были получены при изучении пептида BV-Sp, образовавшегося при гидролизе бромцианового фрагмента BV стафилококковой протеазой (соотношение фермент — субстрат 1 : 20, pH 8,2; 6 ч, 37°). Выделение пептида осу-

Схема 1

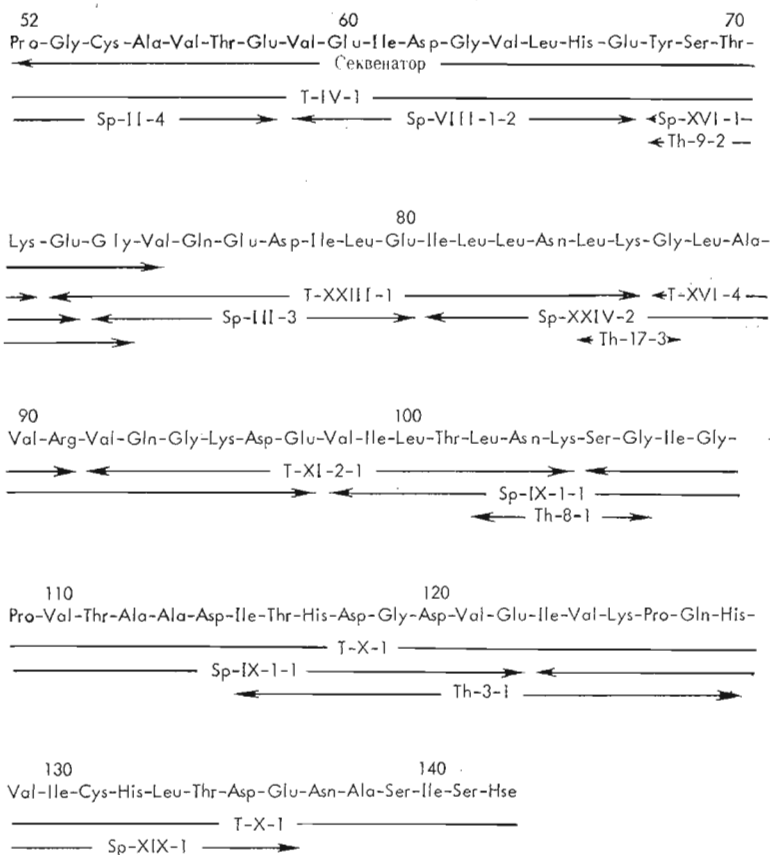


щественно хроматографией на сефадексе G-50 (рис. 3) в водном аммиаке при pH 10,3. Искомый 19-членный пептид BV-Sp элюировался с колонки значительно позже других пептидов, содержавших 7—15 аминокислотных остатков, и непосредственно перед фронтом мочевины, добавленной в образец перед нанесением на колонку. Как показали предварительные опыты, при отсутствии в образце мочевины пептид BV-Sp с сефадекса не элюировался. Определение аминокислотного состава пептида BV-Sp [Asp 1,35 (1); Thr 1,11 (1); Ser 2,31 (2); Gly 3,42 (3); Ala 1,25 (1); Hse 0,45 (1); Ile 1,14 (1); Leu 3,64 (4); Phe 0,66 (1); His 0,80 (1); Arg 3,00 (3)] и его частичной аминокислотной последовательности позволило завершить установление структуры пептида BV (схема 1). Необычность поведения пептида BV-Sp при хроматографировании на сефадексе объясняется, очевидно, его плохой растворимостью, обусловленной особенностями аминокислотного состава (3 остатка аргинина и остаток гистидина при отсутствии остатков дикарбоновых кислот). Аналогичный пептид не удалось выделить из гидролизата всей  $\alpha$ -субъединицы стафилококковой протеазой [2].

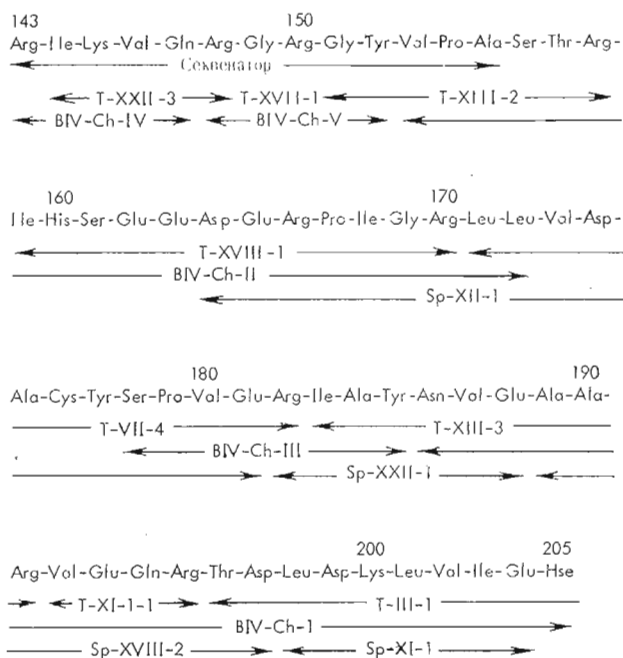
**Фрагмент III (остатки 52—142).** Определение N-концевой аминокислотной последовательности пептида VIII с помощью секвенсора (23 остатка) показало, что она совпадает со структурой C-концевого участка пептида T-IV-1; таким образом, фрагмент VIII в полипептидной цепи  $\alpha$ -субъединицы расположен непосредственно за фрагментом BV. Структура бромцианового пептида VIII (схема 2) была установлена на основании данных об аминокислотной последовательности взаимно перекрывающихся пептидов, полученных при гидролизе исходного белка трипсином, стафилококковой протеазой и термоллизинном [1—3].

**Фрагмент IV (остатки 143—205).** При деградации 40 нмоль пептида BIV на секвенсоре была установлена последовательность 13 аминокислотных остатков. Для определения полной структуры 100 нмоль фрагмента BIV гидролизовали химотрипсином (соотношение фермент—субстрат 1 : 20; pH 8,2; 4 ч, 37°). При разделении полученной смеси пептидов хроматографией на сефадексе G-50 (см. рис. 4) было выделено пять чистых пептидов; аминокислотный состав, N-концевые аминокислотные остатки и выход этих пептидов приведены в табл. 4, а данные по определению аминокислотной последовательности — в табл. 5. Сопоставление полученных результатов с данными о строении пептидов — продуктов гидролиза  $\alpha$ -субъединицы трипсином и стафилококковой протеазой позволили установить полную структуру пептида BIV (схема 3).

С х е м а 2



С х е м а 3



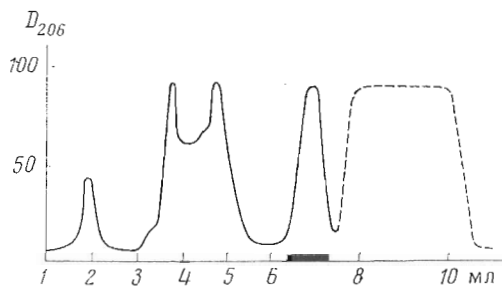


Рис. 3. Разделение продуктов гидролиза пептида BV стафилококковой протеазой на сефадексе G-50

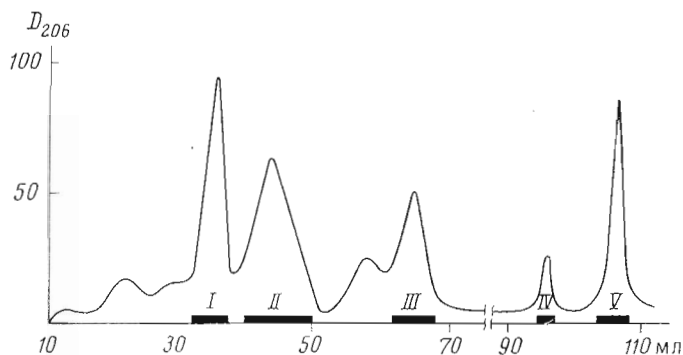
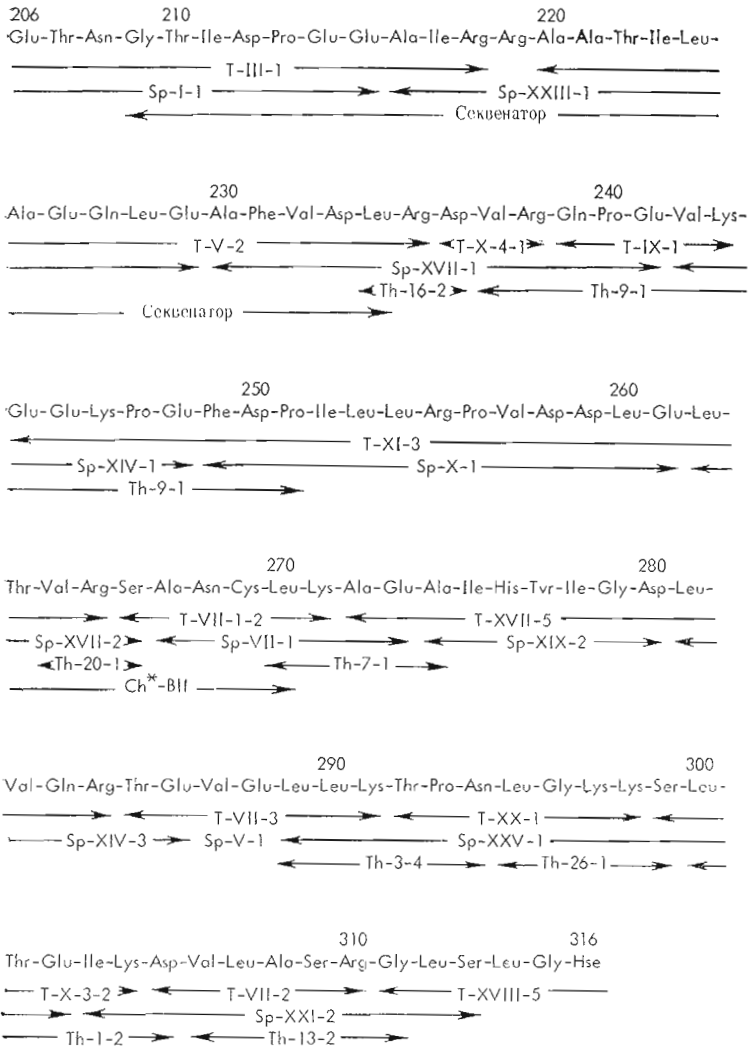


Рис. 4. Разделение химотриптического гидролизата пептида BIV на сефадексе G-50

**Фрагмент II (остатки 206—316).** Определение N-концевой аминокислотной последовательности фрагмента VII (5 стадий) показало, что она совпадает со структурой триптического пептида T-III-1, т. е. в полипептидной цепи  $\alpha$ -субъединицы фрагмент VII расположен непосредственно за BIV. Ценная информация о строении N-концевого участка пептида VII была получена при анализе на секвенсоре пептида, образовавшегося при расщеплении  $\alpha$ -субъединицы гидроксиламином по связи Asn-Gly [4]. Как видно на схеме 4, пептид T-VII-1-2 был расположен за пептидом T-XI-3 на основании структуры пептидов Sp-XVII-2 и Th-20-1. Поскольку в данном случае перекрывающаяся последовательность содержала только один аминокислотный остаток, для более четкого доказательства строения этого участка полипептидной цепи белка был проведен дополнительный опыт по расщеплению бромцианового фрагмента VII. Наиболее удачным оказалось использование для этой цели химотрипсина, так как ожидаемый химотриптический пептид, содержащий необходимую перекрывающую последовательность, должен был иметь в своем составе остаток цистеина, единственный в бромциановом фрагменте II. Поэтому пептид VII перед расщеплением химотрипсином был карбоксиметилирован [ $^{14}$ C]иодуксусной кислотой. Гидролизат был разделен с помощью пептидной карты. Детектирование искомого пептида Ch\*-VII (остатки 263—270) осуществлялось с помощью автордиографии. После элюирования с бумаги пептид Ch\*-VII дополнительно очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-50. Результаты определения аминокислотной последовательности этого пептида (5 стадий деградации по Эдману с идентификацией Dns-производных) окончательно доказали, что в структуре пептида VII за пептидом T-XI-3 расположен пептид T-VII-1-2. Полная структура фрагмента VII была установлена при сопоставлении упомянутых выше данных со строением пептидов, получен-



Схема 4



ных при гидролизе  $\alpha$ -субъединицы трипсином, стафилококковой протеазой и термолизинном (см. схему 4).

**Фрагмент VI (остатки 317—329).** Пептид BVI содержит в своем составе остаток триптофана, единственный в молекуле белка, чем и обусловлено его большее по сравнению с другими пептидами поглощение при 280 нм (рис. 1). Дополнительная очистка пептида BVI осуществлялась электрофорезом на бумаге. Аминокислотная последовательность этого пептида (Arg-Leu-Glu-Asn-Trp-Pro-Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Asp-Glu) была определена путем сопоставления данных, полученных при деградации по Эдману (5 стадий) с идентификацией фенилтиогидантоинов аминокислот, со структурой триптического пептида T-I-4 [1], отличающегося от пептида BVI на один остаток аргинина. Пептид BVI расположен в полипептидной цепи  $\alpha$ -субъединицы за пептидом BII. Этот вывод был сделан исходя из структуры пептида Sp-XX-4 (Leu-Gly-Met-Arg-Leu-Glu), полученного при гидролизе белка стафилококковой протеазой [2].

В результате проведенной работы была определена аминокислотная последовательность всех бромциановых фрагментов, составляющих полипептидную цепь  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы. Фрагмент VI по

**Аминокислотный состав пептидов, полученных при химотриптическом гидролизе бромцианового фрагмента BIV**

Аминокислота	Пептиды *				
	BIV-Ch-I	BIV-Ch-II	BIV-Ch-III	PIV-Ch-IV	EIV-Ch-V
Asp	2,94 (3)	1,28 (1)			
Thr	1,18 (1)	1,04 (1)			
Ser		1,82 (2)	1,19 (1)		
Glu	3,92 (4)	3,29 (3)	1,17 (1)	1,00 (1)	
Pro		1,61 (2)	0,91 (1)		
Gly		1,23 (1)			1,80 (2)
Ala	2,06 (2)	1,11 (1)	1,16 (1)		
Val	2,87 ** (3)	1,01 ** (1)	1,07 (1)	0,99 ** (1)	
Hse	0,49 (1)				
Ile	0,93 ** (1)	1,94 ** (2)	0,77 (1)	0,89 ** (1)	
Leu	1,98 (2)	2,00 (2)			
Tyr			0,84 (1)		0,52 (1)
His		0,51 (1)			
Lys	1,08 (1)			0,94 (1)	
Arg	2,04 (2)	2,85 (3)	0,90 (1)	1,26 (1)	2,20 (2)
Число остатков	20	20	8	5	5
N-Концевая аминокислота	Asn	Val	Ser	Arg	Arg
Выход, %	90	56	62	60	30

\* Примеси менее 0,2 аминокислотного остатка в таблицу не включены.  
 \*\* Результаты гидролиза в течение 72 ч.

Таблица 5

**Аминокислотная последовательность пептидов, полученных при химотриптическом гидролизе бромцианового фрагмента BIV**

Пептид	Аминокислотная последовательность
BIV-Ch-I	Asn-Val-Glu-Ala-Ala-Arg-Val-Glx-(Glx, Arg, Thr, Asp, Leu, Asp, Lys, $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow$ Leu, Val, Ile, Glx)-Hse
BIV-Ch-II	Val-Pro-Ala-Ser-Thr-Arg-Ile-His-Ser-Glx-(Glx, Asx, Glx, Arg, Pro, Ile, $\rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow$ Gly, Arg, Leu, Leu)
BIV-Ch-III	Ser-Pro-Val-Glx-Arg-Ile-Ala-Tyr $\rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow$
BIV-Ch-IV	Arg-Ile-Lys-Val-Glx $\rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow$
BIV-Ch-V	Arg-Gly-Arg-Gly-Tyr $\rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow$

аминокислотному составу и N-концевой аминокислотной последовательности является суммой фрагментов VIII и BIV. Возникновение этого пептида обусловлено неполным расщеплением пептидной связи остатка метионина, находящегося в последовательности <sup>141</sup>Ser-Met-<sup>143</sup>Arg. Устойчивость к действию бромциана связи остатка метионина, находящегося в точно такой же последовательности, отмечалась ранее в аспартат-аминотрансферазе [9]. В обоих случаях неполнота гидролиза, вероятно, связана с присутствием остатка серина рядом с остатком метионина [10].

Аминокислотная последовательность триптических пептидов T-IV-1, T-III-1 и пептида Sp-XX-4, полученного при гидролизе  $\alpha$ -субъединицы стафилококковой протеазой [1, 2], позволили соединить бромциановые

фрагменты BV с VIII, BIV с VII и VII с BVI соответственно. Два триптических пептида (Т-Х-1 и Т-ХVIII-5) имели С-концевую последовательность Met-Arg и представляли собой С-концевые участки бромциановых пептидов VIII и VII. В соответствии с этим за пептидами VII и VIII должны располагаться бромциановые фрагменты, имеющие в качестве N-концевых остатков аргинин, т. е. пептиды BIV и BVI. Поскольку пептид BVI был однозначно соединен с пептидом VII, пептид BIV расположен непосредственно за пептидом VIII. Таким образом, бромциановые фрагменты расположены в полипептидной цепи  $\alpha$ -субъединицы в следующем порядке: BV — VIII — BIV — VII — BVI.

Определение аминокислотной последовательности бромциановых фрагментов и порядка их расположения в молекуле белка явилось завершающим этапом в установлении полной первичной структуры  $\alpha$ -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* В [8].

### Экспериментальная часть

В работе использовали протеазу из *Staphylococcus aureus* (Miles, Англия),  $\alpha$ -химотрипсин (Worthington, США),  $[^{14}\text{C}]$ иодуксусную кислоту (Amersham, Англия).

Методы определения аминокислотного состава и последовательности пептидов описаны ранее [1]. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методике [11].

*Гидролиз  $\alpha$ -субъединицы бромцианом.* Лифофильный препарат  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы в количестве 110 мг (3 мкмоль) растворяли в 10 мл 70% муравьиной кислоты. К раствору добавляли 1 г бромциана (500-кратный избыток на 1 моль метионина). Гидролиз проводили в герметически закрытой колбе в течение 20 ч при комнатной температуре, после чего реакционную смесь разбавляли водой до объема 200 мл и лиофилизировали.

*Выделение бромциановых пептидов.* От 4 до 12 мг лиофильного препарата бромцианового гидролизата  $\alpha$ -субъединицы растворяли в 100–200 мкл буфера 0,05 М Трис-НСI (рН 7,0) — 6 М гуанидин-НСI — 5,0% 2-меркаптоэтанола; инкубировали 4 ч при 45° и наносили на колонку (0,4 × 200 см), изготовленную из полиэтиленового шланга, с сефадексом G-75, сверхтонкий (использовали предварительно фракционированный сефадекс с размером частиц 20–30 мкм), уравновешенным упомянутым выше буфером, содержащим 0,1% меркаптоэтанола. Элюирование пептидов проводили со скоростью 0,15 мл/ч. Детекцию пептидов осуществляли по поглощению при 280 нм (см. рис. 1). Элюат собирали фракциями объемом 0,15 мл. В результате разделения было получено 6 объединенных фракций. Последующую очистку пептидов проводили рехроматографией в описанных выше условиях (фракции I–IV), для фракции V использовали хроматографию на сефадексе G-50, сверхтонкий, а пептид из фракции VI очищали электрофорезом на бумаге при рН 4,9 в системе II (НСООН — СН<sub>3</sub>СООН — Н<sub>2</sub>О, 1 : 4 : 45); напряжение 4000 В, время 50 мин.

*Химотриптический гидролиз бромцианового пептида BV.* Пептид BV (1 мкмоль) суспендировали в 2 мл 0,2 М аммоний-бикарбонатного буфера (рН 8,2), добавляли 100 мкг химотрипсина и термостатировали при 37° в течение 6 ч. Нерастворившийся остаток пептида BV отделяли центрифугированием. Надосадочную жидкость лиофилизировали.

*Выделение химотриптических фрагментов пептида BV.* Первоначальное фракционирование химотриптического гидролизата осуществляли на катионите РА-35 (Векман, США). Подготовка смолы, колонки, получение градиента рН и концентрации буферов описаны ранее [12]. Условия разделения: колонка 0,6 × 25 см, скорость элюирования 16 мл/ч, объем фракций 1 мл, объем смесителя 40 мл, колонку термостатировали при 40°. Лифофильный препарат гидролизата растворяли в 4 мл 30% уксусной кислоты и наносили на колонку под давлением азота. Элюирование пептидов с

колонки проводили следующим образом: пропускали через колонку 24 мл 0,2 М пиридин-ацетатного буфера (рН 3,1), затем 128 мл градиента, полученного пропусканьем 0,5 М пиридин-ацетатного буфера через смеситель, содержащий 0,2 М буфер, рН 3,1; далее в смеситель подавали 72 мл 2,0 М пиридин-ацетатного буфера (рН 5,0) и окончательно, минуя смеситель, 40 мл 0,5 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Детекцию пептидов в элюате проводили по реакции с нингидрином на пептидном анализаторе (Technicon, США), для чего отбирали 0,04 мл из каждой второй фракции. Картина разделения приведена на рис. 2. Анализ состава объединенных фракций проводили восходящей хроматографией в тонком слое целлюлозы в системе I (пиридин — бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 15 : 3 : 12). Пептиды из фракций BV-Ch-III, BV-Ch-IV, BV-Ch-VII и BV-Ch-VIII выделяли препаративной хроматографией на бумаге в системе I.

*Выделение пептида BV-Ch-XI.* Гидролиз химотрипсином 100 нмоль пептида BV проводили как описано выше. Смесь пептидов разделяли с помощью пептидной карты на бумаге. Электрофорез проводили в течение 30 мин при рН 6,5 и напряжении 4000 В в системе III (200 мл пиридина — 8 мл уксусной кислоты — вода до 3 л). Хроматографию осуществляли в системе I. После высушивания пептидную карту обрызгивали 0,005 % раствором нингидрина в ацетоне. Окрашенные пятна вырезали и элюировали пептиды 10 % уксусной кислотой.

*Гидролиз пептида BV стафилококковой протеазой и выделение пептида BV-Sp.* Пептид BV (80 нмоль) растворяли в 8 М мочеvine и обессоливали на сефадексе G-15 против водного аммиака, рН 10,3. В полученный раствор (1,2 мл) добавляли 2,4 мг бикарбоната аммония, концентрировали на роторном испарителе до объема 0,3 мл и инкубировали с 20 мкг стафилококковой протеазы при рН 8,2 в течение 6 ч. Гидролизат лиофилизировали, растворяли в 0,05 мл 8 М мочеvine и наносили на колонку (0,4 × 150 см) с сефадексом G-50 (сверхтонкий), уравновешенным водным аммиаком, рН 10,3. Элюирование пептидов начинали 2 мл 8 М мочеvine и затем продолжали водным аммиаком со скоростью 0,36 мл/ч. Элюат собирали во фракции объемом 0,24 мл. Полученная картина разделения приведена на рис. 3.

*Определение N-концевой аминокислотной последовательности пептидов VIII и ВIV на секвенсоре.* Автоматическую деградацию пептидов (VIII 80 нмоль, ВIV 40 нмоль) проводили на секвенсоре 890 С (Beckman, США) по программе № 122974 с использованием реактивов этой же фирмы. Фенилтиогидантоины аминокислот идентифицировали методами газожидкостной хроматографии [13], тонкослойной хроматографии на силикагеле [14] и аминокислотного анализа после гидролиза Pth-аминокислот 57 %-ной HI [15].

*Химотриптический гидролиз пептида ВIV и выделение образовавшихся пептидов.* Липофильный препарат пептида ВIV (100 нмоль) растворяли в 200 мкл 0,2 М аммоний-бикарбонатного буфера (рН 8,2) и гидролизировали 4 ч 20 мкг химотрипсина при 37°. Гидролизат разделяли на колонке (1 × 100 см) с сефадексом G-50 (сверхтонкий), уравновешенным аммиаком, рН 10,0; скорость элюирования 0,9 мл/ч, объем фракций 0,9 мл. Определение пептидов проводили по поглощению при 206 нм, полученная картина разделения приведена на рис. 4.

*Карбоксиметилирование, химотриптический гидролиз пептида VII и выделение цистеинсодержащего фрагмента.* Карбоксиметилирование 150 нмоль пептида VII осуществляли иодуксусной кислотой [16], имевшей общую активность 0,25 мКи  $^{14}\text{C}$ . Предварительное инкубирование с меркаптоэтанолом продолжали 16 ч при комнатной температуре. После окончания реакции избыток иодуксусной кислоты нейтрализовали меркаптоэтанолом и пептид обессоливали против водного аммиака на затемненной колонке с сефадексом G-15. Химотриптический гидролиз карбоксиметилированного пептида VII осуществляли как описано выше для пептида BV. Гидролизат разделяли с помощью пептидной карты на бумаге (см. выше).

Определение искомого радиоактивного пептида проводили путем авторадиографирования [17]. После элюирования с бумаги пептид  $\text{Ch}^*\text{-VII}$  очищали на колонке с сефадексом G-50, уравновешенным водным аммиаком. Размеры колонки  $1 \times 100$  см, скорость элюирования 5 мл/ч, объем фракций 0,5 мл. Момент выхода искомого пептида с колонки определяли измерением радиоактивности [1].

Авторы признательны акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание и помощь при выполнении этой работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Модянов Н. Н., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Потапенко Н. А., Шуваева Т. М. (1978) *Биоорганическая химия*, **4**, 158—179.
2. Липкин В. М., Модянов Н. Н., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Хохряков В. С., Тюрин В. В., Потапенко Н. А. (1978) *Биоорганическая химия*, **4**, 180—196.
3. Чертов О. Ю., Хохряков В. С., Тюрин В. В., Модянов Н. Н., Липкин В. М. (1978) *Биоорганическая химия*, **4**, 302—313.
4. Модянов Н. Н., Бородин Т. М., Липкин В. М. (1978) *Биоорганическая химия*, **4**, 314—317.
5. Burgess R. R. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 6168—6176.
6. Nicholson V. H., King A. M. Q. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **37**, 575—584.
7. Zillig W., Palm R., Neil A. (1976) in *RNA-Polymerase* (Chamberlin M., Losick P., eds.), pp. 101—125, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor.
8. Овчинников Ю. А., Липкин В. М., Модянов Н. Н., Чертов О. Ю., Смирнов Ю. В., Хохряков В. С., Шуваева Т. М. (1977) *Биоорганическая химия*, **3**, 283—286.
9. Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Слободян Л. Н., Егоров Ц. А., Гришин Е. В., Овчинников Ю. А., Носков В. В., Поляновский О. Л., Браунштейн А. Е. (1975) *Биохимия*, **40**, 235—241.
10. Schroeder W. A., Shelter J. B., Shelton J. R. (1969) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **130**, 551.
11. Swank R. T., Munkres K. D. (1971) *Analyt. Biochem.*, **39**, 462—477.
12. Овчинников Ю. А., Кирюшкин А. А., Егоров Ц. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Модянов Н. Н. (1972) *Биохимия*, **37**, 451—460.
13. Pisano J. J., Bronzert T. J. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 5597—5607.
14. Edman P. (1970) in *Protein Sequence Determination* (Needleman S. B., ed.), pp. 241—255, New York Springer Verlag.
15. Inglis A., Nicholls P., Roxburgh C. (1971) *Austr. J. Biol. Sci.*, **24**, 1247—1250.
16. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 622—627.
17. Липкин В. М., Модянов Н. Н., Кочергинская С. А., Чертов О. Ю., Пикифоров В. Г., Лебедев А. Н. (1976) *Биоорганическая химия*, **2**, 1174—1181.

Поступила в редакцию  
11.VII.1977

После доработки  
23.VIII.1977

#### THE PRIMARY STRUCTURE OF $\alpha$ -SUBUNIT OF DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE FROM *E. COLI*. V. THE CYANOGEN BROMIDE PEPTIDES

MODYANOV N. N., LIPKIN V. M., SMIRNOV Yu. V.,  
SHUVAEVA T. M., KOCHERGINSKAYA S. A.

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

The  $\alpha$ -subunit of RNA polymerase from *E. coli* was splitted with cyanogen bromide, A separation by Sephadex G-75 chromatography at pH 8.0, in 6 M guanidine-HCl and 0.1% 2-mercaptoethanol, yielded 6 fragments containing all the amino acid residues of  $\alpha$ -subunit. The sequencing of these peptides completed the primary structure determination of  $\alpha$ -subunit.