



УДК 547.963.02

РИБОСОМАЛЬНЫЙ БЕЛОК L3

II *. ПЕПТИДЫ ХИМОТРИПТИЧЕСКОГО И ТЕРМОЛИТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗАТОВ

*Муранова Т. А., Муранов А. В., Маркова Л. Ф.**Институт белка Академии наук СССР, Пущино, Московская область*

Описаны химотриптический и термолитический гидролизы рибосомального белка L3. В обоих случаях для разделения гидролизатов была использована ионообменная хроматография на катионите AG 50 × 4 с дальнейшей очисткой пептидов при помощи высоковольтного электрофореза на бумаге или ТСХ на целлюлозе. Из химотриптического гидролизата были выделены 47 пептидов, составляющих в сумме 316 аминокислотных остатков; неперекрывающиеся пептиды составляют 192 остатка. Из термолитического гидролизата выделен 71 пептид с общей суммой аминокислотных остатков 329; неперекрывающиеся пептиды составляют 206 остатков. Определены аминокислотные последовательности всех выделенных пептидов. Данные, полученные в результате гидролизатов рибосомального белка L3 трипсином, химотрипсином и термолизином, позволили установить аминокислотные последовательности нескольких крупных фрагментов этого белка.

Настоящая работа является частью исследования по установлению первичной структуры рибосомального белка L3, который входит в число РНК-связывающих белков 50S-субчастицы 70S-рибосом [2]. При расщеплении белка L3 трипсином из гидролизата были выделены 36 пептидов и 4 индивидуальные аминокислоты, составляющие в сумме 265 аминокислотных остатков [1]. С целью выделения перекрывающихся пептидов и соединения триптических пептидов в единую полипептидную цепь нами проведен гидролиз белка L3 химотрипсином и термолизином.

Гидролиз белка химотрипсином проводили в стандартных условиях в течение 24 ч. Для разделения полученной смеси пептидов первоначально использовали ионообменную хроматографию на катионите AG 50 × 4 в градиенте концентрации и рН пиридин-ацетатного буфера. В результате было получено 26 объединенных фракций (рис. 1). При анализе этих фракций методом ТСХ на целлюлозе было обнаружено, что ни одна из них не является гомогенной. Методом высоковольтного электрофореза в тонком слое целлюлозы удалось подобрать условия для дальнейшего разделения полученных смесей при помощи высоковольтного электрофореза на бумаге при различных значениях рН. Для обнаружения Тгр-содержащих пептидов все объединенные фракции были исследованы при помощи реактива Эрлиха. Тгр-содержащий пептид был обнаружен только в двух из них — 25 и 26, из которых был выделен соответствующий пептид Ch45. Таким образом, из химотриптического гидролизата белка L3 были выделены 46 пептидов, аминокислотный состав которых приведен в табл. 1 **. Оцен-

* Сообщение I см. [1].

** Нумерация пептидов здесь и далее соответствует порядку выхода соответствующих фракций с колонки при ионообменной хроматографии.

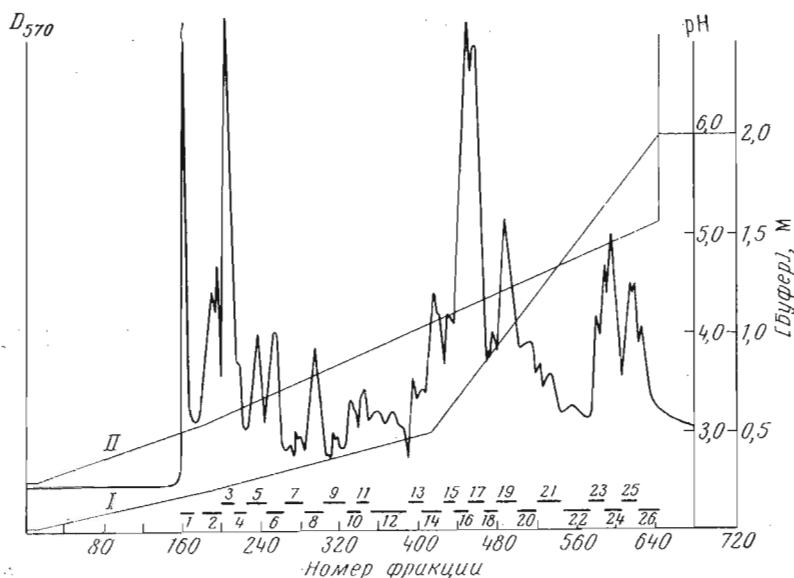


Рис. 1. Разделение химотриптического гидролизата рибосомального белка L3 на АГ 50 × 4 (0,9 × 60 см) в градиенте молярности (I) и рН (II) пиридин-ацетатного буфера. Объем фракции 3,5 мл. Над осью абсцисс обозначены границы объединенных фракций

ка гомогенности выделенных пептидов проводилась как хроматографически, так и определением их N-концевых аминокислотных остатков.

Для всех пептидов были определены полные аминокислотные последовательности, для пептида Ch47 — частичная (табл. 2). При этом выяснилось, что в гидролизате присутствовали продукты неспецифического расщепления, очевидно, в связи с увеличенным временем гидролиза. Так, например, в двух случаях расщепление химотрипсином прошло по остаткам Thr, что привело к образованию пептидов Ch16, Ch42 (в случае пептида T20) и пептидов Ch35, Ch40 (в случае пептида T4 [1]). Наблюдалось также частичное расщепление связи Lys-Lys в пептидах Ch16 и Ch35, что обусловило появление пептидов Ch18 и Ch40, Ch23 соответственно. Гидролизом связи Ala-Val в пептиде T16 объясняется присутствие в гидролизате пептидов Ch14, Ch25, Ch34. В отдельных случаях имело место расщепление пептидной связи по карбоксильным группам Gly (пептиды Ch37, Ch46), Val (Ch30). Однако, несмотря на большое время гидролиза, в некоторых случаях оказались устойчивыми к действию химотрипсина такие связи, как Leu-Ala (пептиды Ch20, Ch32), Leu-Val (Ch5), Leu-Asp (Ch31).

Выделенные из химотриптического гидролизата пептиды составляют в сумме 316 аминокислотных остатков, из них 192 входят в состав неперекрывающихся пептидов. На основании структуры пептидов, полученных в результате гидролиза рибосомального белка L3 химотрипсином, удалось соединить ряд триптических пептидов в более крупные фрагменты (схема).

С целью получения недостающих перекрытий был осуществлен гидролиз белка L3 термолизинном. Гидролиз проводили в стандартных условиях в течение 3,5 ч. Для разделения полученной смеси использовали ионообменную хроматографию на катионите АГ 50 × 4 в условиях, аналогичных условиям разделения растворимой части триптического гидролизата [1]. В результате были получены 32 объединенные фракции (рис. 2), которые далее были подвергнуты высоковольтному электрофорезу на бумаге при различных рН; в одном случае для разделения пептидов использовали ТСХ на целлюлозе с детекцией пептидов при помощи флюо-

Таблица 1
 Аминокислотный состав пептидов, выделенных из хитотриптического гидролизата рибосомального белка L3

Пептид	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Trp	N-концевая аминокислота	Кол-во остатков аминокислот в пептиде
Ch 1				1,0 (1)		1,10 (1)	1,0 (1)		0,75 (1)									Ala	4
Ch 2	2,02 (2)					1,25 (1)	1,0 (1)					0,87 (1)						Ala	5
Ch 3						1,11 (1)			0,68 (1)	0,82 (1)	1,0 (1)							Met	4
Ch 4			0,80 (1)								1,0 (1)							Ser	2
Ch 5	1,0 (1)	1,0 (1)	0,72 (1)		0,72 (1)	2,63 (3)	1,63 (2)	1,72 (2)			1,45 (2)				0,72 (1)			Leu	14
Ch 6											1,0 (1)							Leu	1
Ch 7	1,87 (2)	0,87 (1)	1,0 (1)			1,12 (1)	1,0 (1)				1,0 (1)			0,87 (1)				Asp	8
Ch 8	1,43 (2)	0,82 (1)				1,17 (1)	1,0 (1)							0,82 (1)				Asp	6
Ch 9	1,0 (1)	1,07 (1)	1,0 (1)					2,80 (2)						0,97 (1)				Asn	2
Ch 10	1,21 (1)				1,0 (1)	2,57 (3)	1,71 (2)				1,0 (1)				1,07 (1)			Val	13
Ch 11				1,0 (1)									1,18 (1)					Glu	2
Ch 12	0,96 (1)	1,0 (1)					1,19 (1)							1,0 (1)				Asp	4
Ch 13	0,80 (1)	0,87 (1)		1,78 (2)		1,08 (1)		2,02 (2)								1,0 (1)		Gly	8
Ch 14					0,94 (1)		1,05 (1)	0,64 (1)		0,58 (1)								Ile	5
Ch 15		0,86 (1)				1,04 (1)	1,02 (1)	1,0 (1)						0,98 (1)				Ala	5
Ch 16	2,0 (2)	1,85 (2)				1,14 (1)	1,0 (1)	2,85 (3)						1,71 (2)				Ala	11

Таблица 1 (продолжение)

Цепьид	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Trp	№-концевая аминокислота	Кол-во остатков аминокислот в пептиде
Ch 17	0,87 (1)	0,93 (4)		1,0 (4)	0,76 (4)	1,0 (4)		0,87 (4)					0,69 (4)		0,84 (4)			Asp	8
Ch 18	0,89 (1)						1,05 (4)	1,0 (4)							1,02 (4)			Ala	4
Ch 19		0,97 (1)		1,0 (4)	0,90 (4)	1,12 (4)		1,04 (4)					0,95 (4)		1,0 (4)			Glu	7
Ch 20	2,89 (3)					1,23 (4)	1,07 (4)	0,88 (4)			1,0 (4)	0,79 (4)			1,0 (4)			Val	9
Ch 21			0,80 (4)	1,0 (4)	0,80 (4)	2,40 (2)		1,44 (4)		1,28 (4)						0,87 (4)		Arg	8
Ch 22	0,93 (1)							1,0 (4)			0,87 (4)				1,12 (4)			Val	4
Ch 23	0,88 (1)														1,0 (4)			Lys	3
Ch 24	2,50 (3)			1,50 (4)			1,0 (4)	1,75 (2)			1,50 (4)					1,75 (2)		Asp	11
Ch 25							1,01 (4)	0,91 (4)							1,0 (4)			Val	3
Ch 26	2,00 (2)	1,77 (2)	1,16 (4)	1,29 (4)		1,41 (4)	1,0 (4)	2,33 (2)			1,16 (4)			0,87 (4)	2,0 (2)			Arg	11
Ch 27						1,83 (2)		1,12 (1)										Val	7
Ch 28		0,88 (4)		1,0 (4)				1,0 (4)								0,88 (4)		Arg	4
Ch 29	1,55 (2)	1,66 (2)		1,11 (4)		1,11 (4)	1,11 (4)	1,90 (2)		0,60 (4)				1,41 (4)		1,0 (4)		Arg	9
Ch 30					0,92 (4)		1,11 (4)	1,90 (2)							1,0 (4)			Ile	6
Ch 31	2,31 (3)		0,79 (4)	1,18 (4)			1,0 (4)	2,36 (3)		1,93 (2)						1,47 (2)		Ser	13
Ch 32				2,97 (3)		1,13 (4)	1,08 (4)			1,14 (4)			0,81 (4)			1,0 (4)		Arg	8

Таблица 1 (продолжение)

Пептид	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Грр	Н-конец- вая амино- кислота	Кол-во остат- ков амино- кислот в пептиде
Ch 33		0,89 (1)		1,0 (1)	0,54 (1)											1,09 (1)		Arg	3
Ch 34							1,0 (1)	0,70 (1)							1,62 (1)			Val	4
Ch 35	1,0 (1)					1,06 (1)	2,08 (2)								1,80 (2)			Gly	6
Ch 36			0,78 (1)				1,21 (1)			1,0 (1)						1,0 (1)		Arg	4
Ch 37						0,80 (1)	1,0 (1)		0,72 (1)						1,0 (1)			Lys	4
Ch 38	1,0 (1)	1,12 (1)	1,37 (1)	1,75 (2)	1,50 (2)	3,12 (3)		1,62 (2)		1,0 (1)			1,50 (1)		1,12 (1)	1,0 (1)		Arg	16
Ch 39	0,80 (1)	0,86 (1)		1,0 (1)				2,27 (2)			0,88 (1)				1,11 (1)	1,08 (1)		Arg	8
Ch 40						1,09 (1)	1,0 (1)			0,88 (1)					1,41 (1)			Gly	3
Ch 41		0,91 (1)											1,0 (1)			1,19 (1)		Thr	4
Ch 42			1,0 (1)										1,40 (1)					Ser	6
Ch 43						2,0 (2)			0,62 (1)						1,75 (2)			Lys	4
Ch 44		0,87 (1)		1,01 (1)	0,88 (1)	1,12 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)					0,80 (1)	0,73 (1)	1,11 (1)	1,04 (1)		Arg	10
Ch 45				1,07 (1)		2,85 (3)	2,68 (3)	0,72 (1)			1,01 (1)				1,0 (1)	1,05 (1)	(1)	Ala	12
Ch 46						1,19 (1)									1,0 (1)			Lys	2
Ch 47	1,25	1,49	2,07	3,11	0,46	1,57 (1)	0,81	4,0		1,67	1,62		1,10			0,44		Thr	21

Примечание. В скобках указано число остатков в пептиде согласно определенной для него аминокислотной последовательности.

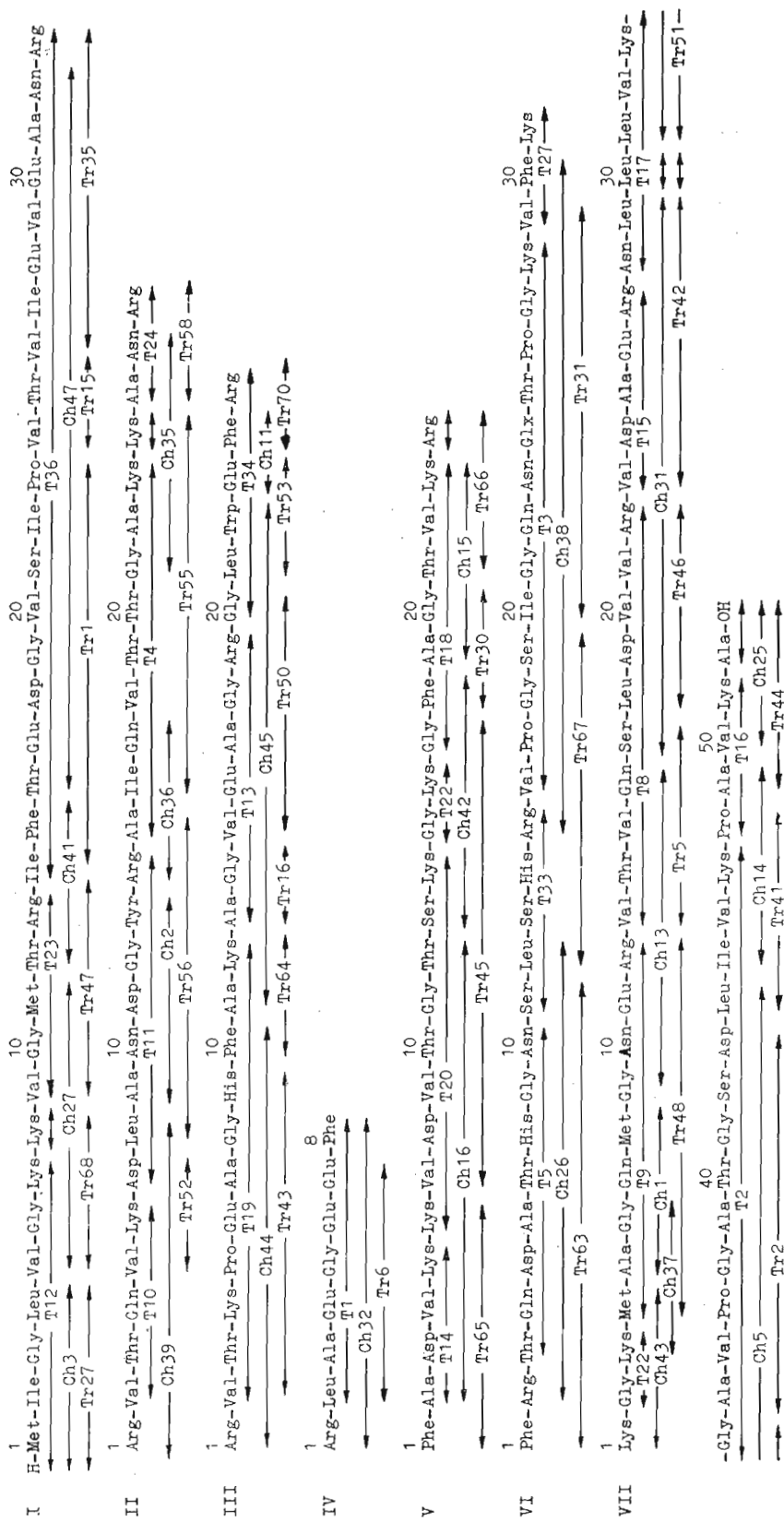
Таблица 2

Аминокислотные последовательности пептидов химотриптического гидролизата (Ch)

Пептид	Последовательность	Кол-во амино- кислотных остатков	Выход, %	Номер фракции (рис. 1)
Ch 1	Ala-Gly-Gln-Met	4	5,5	1
Ch 2	Ala-Asn-Asp-Gly-Tyr	5	16,7	2
Ch 3	Met-Ile-Gly-Leu	4	15,0	2
Ch 4	Ser-Leu	2	9,3	2
Ch 5	Leu-Val-Lys-Gly-Ala-Val-Pro-Gly-Ala-Thr-Gly- Ser-Asp-Leu	14	9,2	3
Ch 6	Leu	1	4,6	4
Ch 7	Asp-Ala-Thr-His-Gly-Asn-Ser-Leu	8	6,4	4, 5
Ch 8	Asp-Ala-Thr-His-Gly-Asn	6	2,5	4
Ch 9	Asn-Phe	2	5,0	5
Ch 10	Val-Lys-Gly-Ala-Val-Pro-Gly-Ala-Thr-Gly-Ser- Asp-Leu	13	8,5	5
Ch 11	Glu-Phe	2	23,3	6
Ch 12	Asp-Ala-Thr-His	4	1,3	6
Ch 13	Gly-Asn-Gly-Arg-Val-Thr-Val-Gln	8	22,7	8
Ch 14	Ile-Val-Lys-Pro-Ala	5	5,5	9
Ch 15	Ala-Gly-Thr-Val-Lys	5	15,0	10
Ch 16	Ala-Asp-Val-Lys-Lys-Val-Asp-Val-Thr-Gly-Thr	11	10,1	9, 10
Ch 17	Asn-Glx-Thr-Pro-Gly-Lys-Val-Phe	8	9,3	9
Ch 18	Ala-Asp-Val-Lys	4	8,6	10
Ch 19	Glx-Thr-Pro-Gly-Lys-Val-Phe	7	13,6	10, 11, 12
Ch 20	Val-Lys-Asp-Leu-Ala-Asn-Asp-Gly-Tyr	9	11,6	12
Ch 21	Arg-Val-Pro-Gly-Ser-Ile-Gly-Gln	8	1,0	12
Ch 22	Val-Lys-Asp-Leu	4	2,3	14
Ch 23	Lys-Ala-Asn	3	2,3	14
Ch 24	Asp-Val-Val-Arg-Val-Asp-Ala-Glu-Arg-Asn-Leu	11	1,0	14
Ch 25	Val-Lys-Ala	3	12,5	15
Ch 26	Arg-Thr-Gln-Asp-Ala-Thr-His-Gly-Asn-Ser-Leu	11	7,0	15, 17
Ch 27	Val-Gly-Lys-Lys-Val-Gly-Met	7	6,6	16, 17
Ch 28	Arg-Val-Thr-Gln	4	5,6	16, 17
Ch 29	Arg-Thr-Gln-Asp-Ala-Thr-His-Gly-Asn	9	3,0	16
Ch 30	Ile-Val-Lys-Pro-Ala-Val	6	14,5	16
Ch 31	Ser-Leu-Asp-Val-Val-Arg-Val-Asp-Ala-Glu- Arg-Asn-Leu	13	3,2	16
Ch 32	Arg-Leu-Ala-Glu-Gly-Glu-Glu-Phe	8	20,8	17
Ch 33	Arg-Thr-Gln	3	14,6	17
Ch 34	Val-Lys-Pro-Ala	4	3,6	17
Ch 35	Gly-Ala-Lys-Lys-Ala-Asn	6	11,6	18, 19
Ch 36	Arg-Ala-Ile-Gln	4	3,2	18
Ch 37	Lys-Met-Ala-Gly	4	3,4	18
Ch 38	Arg-Val-Pro-Gly-Ser-Ile-Gly-Gln-Asn-Glx-Thr- Pro-Gly-Lys-Val-Phe	16	1,0	19
Ch 39	Arg-Val-Thr-Gln-Val-Lys-Asp-Leu	8	6,6	20
Ch 40	Gly-Ala-Lys	3	5,6	21
Ch 41	Thr-Arg-Ile-Phe	4	15,5	23, 24
Ch 42	Ser-Lys-Gly-Lys-Gly-Phe	6	30,7	23, 24, 25
Ch 43	Lys-Gly-Lys-Met	4	7,0	24
Ch 44	Arg-Val-Thr-Lys-Pro-Glu-Ala-Gly-His-Phe	10	28,3	24, 25, 26
Ch 45	Ala-Lys-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Gly-Arg-Gly-Leu- Trp	12	24,6	25, 26
Ch 46	Lys-Gly	2	3,0	25, 26
Ch 47	Thr-Glu-Asp-Gly-Val-Ser-Ile-Pro-Val-Thr- Val-Ile	21	9,0	25

рескамина [3, 4]. Из термолитического гидролизата белка L3 был выделен 71 пептид. В табл. 3 приведен аминокислотный состав этих пептидов. Оценка гомогенности выделенных пептидов проводилась хроматографически и определением их N-концевых аминокислотных остатков. В табл. 4 представлены полные аминокислотные последовательности выделенных пептидов, которые составляют в сумме 329 аминокислотных остатков, из них 206 входят в состав неперекрывающихся пептидов. Полученные

Аминокислотные последовательности фрагментов рибосомального белка L3, составленные на основании данных, полученных в результате триптического, химотриптического и термолитического гидролизис этого белка



T — триптические, Ch — химотриптические, Tr — термолитические пептиды

Таблица 3

Аминокислотный состав пептидов, выделенных из термолитического гидролизата рибосомального белка L3

Пептид	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Trp	N-концевая аминокислота	Кол-во остатков аминокислот в пептиде
Tr 1	1,05 (1)	1,08 (1)	0,92 (1)	1,47 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	0,89 (1)		1,67 (2)			0,88 (1)					Ile	10
Tr 2	1,47 (1)	0,73 (1)	1,0 (1)		1,06 (1)	1,81 (2)	1,93 (2)	1,18 (1)										Ala	9
Tr 3					0,74 (1)	1,15 (1)	1,0 (1)	1,18 (1)										Ala	4
Tr 4	1,04 (1)	1,0 (1)	0,96 (1)			1,12 (1)	1,0 (1)											Ala	5
Tr 5		0,85 (1)	0,64 (1)	1,0 (1)				1,95 (2)										Val	5
Tr 6				2,90 (3)		1,10 (1)	1,0 (1)				1,10 (1)							Leu	6
Tr 7	0,76 (1)	0,84 (1)	0,72 (1)			1,05 (1)	1,15 (1)				1,0 (1)							Ala	6
Tr 8	1,0 (1)						1,19 (1)											Ala	2
Tr 9			0,89 (1)	1,62 (1)				1,0 (1)		1,12 (1)								Ile	4
Tr 10				1,15 (1)		1,0 (1)	0,84 (1)											Ala	3
Tr 11		1,0 (1)					1,0 (1)											Ala	2
Tr 12	1,12 (1)					1,0 (1)					1,0 (1)							Leu	2
Tr 13				1,21 (1)		1,0 (1)		0,91 (1)										Val	3
Tr 14				1,20 (1)			0,80 (1)				1,0 (1)							Leu	3

Таблица 3 (продолжение)

Пептид	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Trp	N-концевая аминокислота	Кол-во остатков аминокислот в пептиде
Tr 15		1,0 (1)						1,02 (1)										Val	2
Tr 16						1,0 (1)	1,0 (1)											Ala	2
Tr 17							1											Ala	1
Tr 18							2,08 (2)				1,0 (1)							Leu	3
Tr 19													1					Phe	1
Tr 20	1,10 (1)	0,91 (1)		1,0 (1)		1,15 (1)				0,70 (1)			0,87 (1)					Ile	6
Tr 21		0,80 (1)				1,0 (1)	1,03 (1)						0,90 (1)					Phe	4
Tr 22						1,18 (1)				0,88 (1)								Ile	2
Tr 23						1,20 (1)				0,89 (1)	1,0 (1)							Ile	3
Tr 24				1,18 (1)						0,88 (1)								Ile	2
Tr 25	1,0 (1)						1,0 (1)						0,87 (1)					Phe	3
Tr 26							1,0 (1)				1,0 (1)							Ala	2
Tr 27						1,0 (1)			0,69 (1)		1,31 (1)							Met	4
Tr 28		1,13 (1)								0,88 (1)								Phe	2
Tr 29											1							Leu	1
Tr 30						1,0 (1)	1,0 (1)						1,16 (1)					Phe	3

Таблица 3 (продолжение)

Пептид	Asp	Thr	Ser	Cis	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Грр	N-концевая аминокислота	Кол-во остатков аминокислот в пептиде
Tr 31	1,03 (1)	1,01 (1)		2,11 (2)	0,97 (1)	1,97 (1)		0,69 (1)		1,0 (1)					0,95 (1)			Ile	10
Tr 32										0,68 (1)	1,0 (1)		1,0 (1)		1,12 (1)			Leu	2
Tr 33					1,06 (1)		0,87 (1)	0,75 (1)			1,0 (1)		1,0 (1)					Leu	6
Tr 34	1,0 (1)			1,90 (2)		1,90 (2)	1,0 (1)		0,63 (1)							1,30 (1)		Ala	8
Tr 35	1,0 (1)			1,54 (2)			0,78 (1)	2,24 (2)		0,69 (1)						1,30 (1)		Val	8
Tr 36					1,10 (1)			0,86 (1)		0,62 (1)					1,0 (1)			Ile	4
Tr 37	1,96 (2)			1,28 (1)			1,0 (1)	0,88 (1)								1,03 (1)		Val	6
Tr 38					1,08 (1)		1,16 (1)	0,58 (1)		0,66 (1)					1,0 (1)			Ile	5
Tr 39	1,0 (1)	0,95 (1)	0,95 (1)			1,19 (1)	1,0 (1)							0,89 (1)				Ala	6
Tr 40					0,93 (1)		1,68 (1)	0,87 (1)							1,0 (1)			Val	4
Tr 41					1,12 (1)			0,75 (1)		1,0 (1)					1,12 (1)			Leu	5
Tr 42	1,94 (2)			1,24 (1)			1,13 (1)	0,89 (1)			1,0 (1)					1,0 (1)		Val	7
Tr 43		0,87 (1)		1,12 (1)	1,0 (1)	1,12 (1)	0,87 (1)	0,87 (1)			0,80 (1)			0,87 (1)	1,0 (1)			Val	8
Tr 44							2,0 (2)	0,85 (1)							0,85 (1)			Ala	4
Tr 45	1,0 (1)	1,76 (2)	1,07 (1)			2,61 (3)		2,0 (2)							1,61 (2)			Val	11

Таблица 3 (окончание)

Цепочка	Asp	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Trp	N-концевая аминокислота	Кол-во остатков аминокислот в пептиде
Tr 46	1,0 (1)							1,56 (2)			0,97 (1)					1,01 (4)		Leu	5
Tr 47		1,16 (1)				0,96 (4)		1,16 (1)	0,38 (1)							1,0 (4)		Val	5
Tr 48	1,0 (1)			2,03 (2)		1,78 (2)	1,07 (1)		1,57 (2)							1,10 (1)		Met	2
Tr 49	3,0 (2)			1,0 (1)							0,75 (1)							Leu	4
Tr 50				1,0 (1)		1,61 (4)	0,97 (1)	1,05 (1)								1,08 (4)		Val	6
Tr 51				1,0 (1)		1,07 (4)		1,10 (1)			1,0 (4)				0,89 (1)			Leu	4
Tr 52	1,0 (1)							0,70 (1)							1,11 (4)			Val	3
Tr 53											1,0 (1)					0,20 (1)		Leu	3
Tr 54				1,15 (1)														Val	3
Tr 55				1,0 (1)		1,0 (4)		1,0 (1)		1,0 (4)					1,02 (1)			Ile	9
Tr 56	1,75 (2)					1,12 (4)	1,75 (2)	0,90 (1)			0,87 (1)	1,12 (1)			1,66 (2)			Leu	8
Tr 57						1,14 (1)		0,91 (1)							0,87 (1)			Val	3
Tr 58	0,91 (4)															1,41 (1)		Ala	3
Tr 59	1,12 (1)						1,0 (1)	0,76 (1)							1,69 (2)			Ala	5
Tr 60		1,81 (2)	1,08 (1)			2,78 (3)		1,0 (1)							1,72 (2)			Val	9

Таблица 3 (окончание)

Пептид	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Trp	N-концевая аминокислота	Кодовый остатков аминокислот в пептиде
Tr 61	1,14 (1)	1,0 (1)		1,0 (1)									0,57 (1)			0,71 (1)		Phe	5
Tr 62								1,0 (1)							1,0 (1)			Val	2
Tr 63	1,85 (2)	1,83 (2)	0,95 (1)	1,16 (1)		1,07 (1)	1,0 (1)						1,14 (1)	0,87 (1)		1,21 (1)		Phe	11
Tr 64							1,14 (1)						0,92 (1)		1,0 (1)			Phe	3
Tr 65	1,0 (1)						1,0 (1)	0,96 (1)					0,96 (1)		1,84 (2)			Phe	6
Tr 66		1,0 (1)						0,68 (1)							0,37 (1)	0,93 (1)		Thr	4
Tr 67			1,65 (2)		0,86 (1)	1,14 (1)		1,17 (1)			1,0 (1)			0,98 (1)		1,13 (1)		Leu	8
Tr 68						1,39 (1)		0,81 (1)										Val	4
Tr 69								1,0 (1)							2,0 (2)			Val	3
Tr 70								1,0 (1)					1,01 (1)		1,71 (2)			Val	2
Tr 71								1,02 (1)							1,0 (1)			Val	3

Примечание. В скобках указано число остатков в пептиде согласно определенной для него аминокислотной последовательности.

Таблица 4

Аминокислотные последовательности пептидов термолитического гидролизата (Tr)

Пептид	Последовательность	Кол-во аминокислотных остатков	Выход, мол. %	Номер фракции (рис. 2)
Tr 1	Ile-Phe-Thr-Glu-Asp-Gly-Val-Ser-Ile-Pro	10	25,0	1, 2
Tr 2	Ala-Val-Pro-Gly-Ala-Thr-Gly-Ser-Asp	9	4,1	1, 2
Tr 3	Ala-Val-Pro-Gly	4	11,2	3
Tr 4	Ala-Thr-Gly-Ser-Asp	5	7,6	3
Tr 5	Val-Thr-Val-Gln-Ser	5	11,3	3
Tr 6	Leu-Ala-Glu-Gly-Glu-Glu	6	21,5	4
Tr 7	Ala-Thr-Gly-Ser-Asp-Leu	6	10,0	4
Tr 8	Ala-Asp	2	9,4	5
Tr 9	Ile-Ser-Val-Gln	4	14,1	5
Tr 10	Ala-Gly-Glu	3	3,3	5
Tr 11	Ala-Thr	2	5,1	5
Tr 12	Leu-Asp	2	1,1	6
Tr 13	Val-Gly-Gln	3	3,9	6
Tr 14	Leu-Ala-Glu	3	3,0	6
Tr 15	Val-Thr	2	20,0	6
Tr 16	Ala-Gly	2	13,8	6
Tr 17	Ala	1	14,7	6, 7
Tr 18	Leu-Ala-Ala	3	0,8	6
Tr 19	Phe	1	1,6	6
Tr 20	Ile-Phe-Thr-Glu-Asp-Gly	6	6,4	6
Tr 21	Phe-Ala-Gly-Thr	4	2,0	7, 8
Tr 22	Ile-Gly	2	3,2	7
Tr 23	Ile-Gly-Leu	3	10,4	7
Tr 24	Ile-Gln	2	9,7	7
Tr 25	Phe-Ala-Asp	3	10,0	8
Tr 26	Ala-Leu	2	6,6	8
Tr 27	Met-Ile-Gly-Leu	4	7,4	9
Tr 28	Phe-Thr	2	19,3	9, 10
Tr 29	Leu	1	17,6	10
Tr 30	Phe-Ala-Gly	3	8,8	10
Tr 31	Ile-Gly-Gln-Asn-Glx-Thr-Pro-Gly-Lys-Val	10	29,1	10
Tr 32	Leu-Phe	2	4,6	11
Tr 33	Leu-Ile-Val-Lys-Pro-Ala	6	4,0	12
Tr 34	Ala-Gly-Gln-Met-Gly-Asn-Glu-Arg	8	6,0	12, 14
Tr 35	Val-Ile-Glu-Val-Glu-Ala-Asn-Arg	8	18,3	12
Tr 36	Ile-Val-Lys-Pro	4	9,0	13, 15
Tr 37	Val-Asp-Ala-Glu-Arg-Asn	6	24,0	13
Tr 38	Ile-Val-Lys-Pro-Ala	5	5,0	13
Tr 39	Ala-Thr-His-Gly-Asn-Ser	6	10,5	13
Tr 40	Val-Lys-Pro-Ala	4	2,0	13
Tr 41	Leu-Ile-Val-Lys-Pro	5	1,1	13
Tr 42	Val-Asp-Ala-Glu-Arg-Asn-Leu	7	4,1	14
Tr 43	Val-Thr-Lys-Pro-Glu-Ala-Gly-His	8	35,5	15, 16
Tr 44	Ala-Val-Lys-Ala	4	3,5	15
Tr 45	Val-Asp-Val-Thr-Gly-Thr-Ser-Lys-Gly-Lys-Gly	11	10,2	15, 16
Tr 46	Leu-Asp-Val-Val-Arg	5	20,0	15, 16
Tr 47	Val-Gly-Met-Thr-Arg	5	7,0	15, 18
Tr 48	Met-Ala-Gly-Gln-Met-Gly-Asn-Glu-Arg	9	5,3	15
Tr 49	Leu-Asn-Asx-Glu	4	0,8	16
Tr 50	Val-Glu-Ala-Gly-Arg-Gly	6	15,3	16, 17
Tr 51	Leu-Val-Lys-Gly	4	16,6	17
Tr 52	Val-Lys-Asp	3	18,0	17
Tr 53	Leu-Trp-Glu	3	20,8	17
Tr 54	Val-Lys-Ala	3	1,6	18
Tr 55	Ile-Gln-Val-Thr-Thr-Gly-Ala-Lys-Lys	9	7,0	18, 19
Tr 56	Leu-Ala-Asn-Asp-Gly-Tyr-Arg-Ala	8	23,0	18, 19
Tr 57	Val-Lys-Gly	3	5,0	19
Tr 58	Ala-Asn-Arg	3	7,1	20
Tr 59	Ala-Asp-Val-Lys-Lys	5	4,6	20
Tr 60	Val-Thr-Gly-Thr-Ser-Lys-Gly-Lys-Gly	9	7,5	20
Tr 61	Phe-Arg-Thr-Gln-Asp	5	3,5	20
Tr 62	Val-Lys	2	1,0	21

Таблица 4 (продолжение)

Пептид	Последовательность	Кол-во аминокислотных остатков	Выход, мол. %	Номер фракции (рис. 2)
Tr 63	Phe-Arg-Thr-Gln-Asp-Ala-Thr-His-Gly-Asn-Ser	11	10,0	22
Tr 64	Phe-Ala-Lys	3	22,5	20, 22
Tr 65	Phe-Ala-Asp-Val-Lys-Lys	6	7,3	23
Tr 66	Thr-Val-Lys-Arg	4	3,3	23
Tr 67	Leu-Ser-His-Arg-Val-Pro-Gly-Ser	8	4,6	24, 25
Tr 68	Val-Gly-Lys-Lys	4	5,0	26
Tr 69	Val-Lys-Lys	3	8,0	26, 27
Tr 70	Phe-Arg	2	33,3	30, 31
Tr 71	Val-Lys-Arg	3	22,0	30, 31

данные подтвердили уже установленные ранее аминокислотные последовательности, позволили уточнить несколько перекрытий между триптических фрагментами, дали информацию о структуре триптических пептидов T35 и T36. Исходя из последовательностей, определенных для пептидов Ch41, Ch47, Tr1, Tr15, Tr20, Tr35, стало возможным предложить полную структуру пептида T36 (см. фрагмент I, схема).

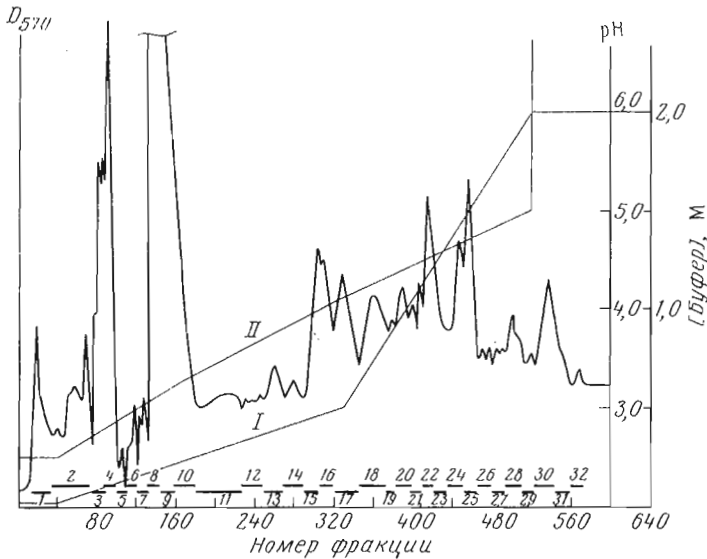


Рис. 2. Разделение термолитического гидролизата рибосомального белка L3 на AG 50 × 4 (см. подпись к рис. 1); объем фракции 3,2 мл

Таким образом, в результате триптического, химотриптического и термолитического гидролизом рибосомального белка L3 были выделены пептиды, позволяющие представить первичную структуру этого белка в виде нескольких фрагментов (см. схему) с общим количеством аминокислотных остатков 200. Необходимо отметить, что структура фрагмента I очень хорошо согласуется с N-концевой аминокислотной последовательностью белка L3, определенной Б. Виттманн-Лиенольд и сотр. [5] при помощи секвенатора. Чтобы выяснить, какой из имеющихся фрагментов представляет собой C-концевую аминокислотную последовательность исследуемого белка, был проведен гидролиз белка L3 карбоксипептидазами А и В и получена последовательность -Val-Lys-Ala, что совпадает с C-концевой аминокислотной последовательностью фрагмента VII. Это говорит о том, что фрагмент VII является C-концевой частью рибосомального белка L3.

Экспериментальная часть

Рибосомальный белок L3 выделяли по методу, описанному ранее [6].

Химотриптический гидролиз. Белок (90 мг, $\sim 3,5$ мкмоль) растворяли в 8 мл воды, подкисленной уксусной кислотой до pH 3,0. Затем триэтиламинем доводили pH до значения 8,0 и к суспензии прибавляли химотрипсин (Worthington, США) при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу). Химотрипсин прибавляли двумя равными порциями с интервалом в 2 ч. В ходе гидролиза (24 ч) pH среды поддерживали с помощью титратора (Radiometer, Дания) насыщенным водным раствором триэтиламина. Гидролиз вели при температуре 37°. По окончании гидролиза смесь подкисляли до pH 2,5 ледяной уксусной кислотой, а затем лиофилизировали.

Препаративное разделение пептидов химотриптического гидролизата при помощи ионообменной хроматографии. Около 3,5 мкмоль лиофилизованного химотриптического гидролизата в 10 мл 0,01 М пиридин-ацетатного буфера (pH 2,5) наносили на колонку (0,9 × 60 см) с ионообменной смолой AG 50 × 4, —400 меш (Bio-Rad, США). Элюирование проводили последовательно 80 мл 0,01 М пиридин-ацетатного буфера (pH 2,5), а затем в системе линейных градиентов концентрации и pH пиридин-ацетатного буфера: 300 мл, 0,01 М, pH 2,5—300 мл, 0,2 М, pH 3,1; 400 мл, 0,2 М, pH 3,1—400 мл, 0,5 М, pH 4,1; 400 мл, 0,5 М, pH 4,1—400 мл, 2,0 М, pH 5,1. В заключение через колонку пропускали 80 мл 2,0 М пиридина. Скорость элюции 40 мл/ч, объем фракции 3,5 мл. Анализ элюата проводили при помощи пептидного анализатора (Technicon, Ирландия).

Термолитический гидролиз. Белок (80 мг) растворяли в 8 мл воды, подкисленной уксусной кислотой до pH 3,0. Затем к раствору белка прибавляли твердый NH_4HCO_3 , чтобы его концентрация в растворе была 0,2 М. При помощи раствора аммиака доводили pH раствора до значения 8,0 и к суспензии прибавляли термоллизин (Serva, ФРГ) при соотношении фермент— субстрат 1 : 100. Гидролиз проводили при температуре 37° в течение 3,5 ч. Затем гидролизат подкисляли ледяной уксусной кислотой до pH 2,5 и упаривали при помощи роторного испарителя до объема 5 мл.

Препаративное разделение пептидов термолитического гидролизата проводили аналогично разделению растворимой части триптического гидролизата [1].

Для выделения и очистки пептидов кроме колоночной хроматографии применяли препаративный высоковольтный электрофорез на бумаге (1—2 ч) при pH 1,9; 3,5; 6,5 и напряжении 4000 В (70 В/см) в системах, использованных нами для разделения триптических пептидов [1]. Пептиды обнаруживали при помощи нингидрина. В случае препаративного выделения пептидов методом ТСХ на целлюлозе (Serva, ФРГ) использовали систему пиридин — *n*-бутанол — вода — уксусная кислота (1 : 1 : 1 : 0,2) (пластинки 20 × 20 см). Участки целлюлозы, соответствующие пятнам, проявляющимся после обработки пластинки флюорескаминем, снимали с пластинок и экстрагировали пептиды 5,6 н. HCl, экстракты высушивали. Электрофорез в тонком слое целлюлозы (Serva, ФРГ) выполняли на пластинках 9,4 × 8,4 см при pH 1,9; 3,5; 6,5 в течение 15 мин (напряжение 1000 В, ток 30 мА) в системах, использованных для высоковольтного электрофореза на бумаге.

Аминокислотный анализ. Пробы пептидов (~ 3 нмоль) гидролизовали 5,6 н. HCl в течение 24 или 72 ч при 110°. Аминокислотный анализ проводили на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США).

Аминокислотные последовательности пептидов (~ 20 нмоль) определяли методом Эдмана в модификации Чена [7]. N-Концевые аминокислотные остатки пептидов определяли дансильным методом с идентификацией Dns-аминокислот с помощью ТСХ на силикагеле [8, 9].

C-Концевую аминокислотную последовательность белка определяли

с помощью карбоксипептидаз А и В (Worthington, США) [10] и анализа отщепленных аминокислотных остатков на аминокислотном анализаторе.

Авторы выражают глубокую благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за ценные замечания, постоянное внимание и помощь при выполнении этой работы, а также старшему лаборанту Кривошеевой Л. А. за участие в работе по выделению рибосомального белка L3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Муранов А. В., Муранова Т. А., Маркова Л. Ф. (1978) Биоорг. химия, 4, 293—301.
2. Garret R. A., Müller S., Spierer R., Zimmermann R. A. (1974) J. Mol. Biol., 68, 553—557.
3. Udenfriend S., Stein S., Bohlen P., Dairman W. (1972) Science, 178, 871—872.
4. Tilley B. E., Izaddoost M., Talent J. M., Gracy R. W. (1974) Anal. Biochem., 62, 281—285.
5. Wittmann-Liebold B., Geissler A. W., Marzinzig E. (1975) J. Supramolec. Structure, 3, 426—447.
6. Алахов Ю. Б., Медникова Т. А., Мотуз Л. П., Маркова Л. Ф., Довгас Н. В., Кашпаров И. А., Овчинников Ю. А. (1975) Биоорг. химия, 1, 581—587.
7. Chen R. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 873—886.
8. Беленький Б. Г., Ганкина Э. С., Нестеров В. В. (1967) Докл. АН СССР, 172, 91—93.
9. Беленький Б. Г., Ганкина Э. С., Прянишникова С. Р., Эрастов Д. П. (1967) Молекуляр. биология, 1, 184—189.
10. Ambler R. P. (1972) in Methods in Enzymol., v. XXV, pp. 143—154, 262—272 Acad. Press, N. Y.—London.

Поступила в редакцию
6.III.1978

RIBOSOMAL PROTEIN L3. II. CHYMOTRYPTIC AND THERMOLYTIC PEPTIDE HYDROLYSATES

MURANOVA T. A., MURANOV A. V., MARKOVA L. F.

*Institute of Protein Research, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino*

The chymotryptic and thermolytic hydrolyses of ribosomal protein L3 are described. In both cases, hydrolysates were separated by means of AG 50 × 4 ion-exchange chromatography followed by high-voltage paper electrophoresis or cellulose thin-layer chromatography. The chymotryptic digest afforded 47 peptides comprising 316 amino acid residues, 192 residues being found in non-overlapping peptides. From the thermolytic hydrolysate, 71 peptides were isolated, wherein the total number of amino acid residues and that in non-overlapping peptides were 329 and 206, respectively. The amino acid sequences of all the separated peptides were determined. The data gleaned from chymotryptic, thermolytic and tryptic hydrolyses allowed to reconstruct the amino acid sequence for several large fragments of protein L3.