



УДК 547.96.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА LIV-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА
ИЗ *E. COLI*

I. ПЕПТИДЫ ИСЧЕРПЫВАЮЩЕГО ТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗА

Гринквич В. А., Арзамасова Н. М., Потапенко Н. А.,
Гринквич Х. А., Бравченко З. Б., Фейгина М. Ю.,
Алданова Н. А.

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

Проведен исчерпывающий триптический гидролиз карбоксиметилированного препарата LIV-белка. Для разделения гидролизата использовалась ионообменная хроматография на катионите AG-50W×4 с последующей очисткой пептидов хроматографией и электрофорезом на бумаге. В индивидуальном состоянии выделено 39 пептидов и установлено их строение. Полученные пептиды (без учета неспецифических фрагментов) содержат в сумме 344 аминокислотных остатка, что соответствует полной аминокислотной последовательности белка.

Изучение молекулярных механизмов транспорта метаболитов через клеточные мембраны — одно из главных направлений современной биохимии. В последние годы широкое развитие получили исследования белков, активно участвующих в процессе транспорта в качестве компонентов соответствующих систем.

В клетках *E. coli* идентифицированы три системы, осуществляющие перенос аминокислот с разветвленной боковой цепью. Две из них функционируют с участием локализованных в периплазматическом пространстве клетки LIV-белка, образующего комплекс с Leu, Ile, Val, и LS-белка, связывающего только Leu [1, 2]. Для выяснения химических основ высокоселективного комплексообразования, присущего белкам этой группы, необходимо изучение их первичной структуры.

Нами установлена полная аминокислотная последовательность LIV-связывающего белка [3, 4]. Настоящее сообщение является первым в серии, посвященной детальному изложению отдельных этапов исследования.

Молекула LIV-белка состоит из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 36 000 дальтон [5] и содержит, по результатам аминокислотного анализа, рассчитанного на указанный молекулярный вес, 36 остатков основных аминокислот и два остатка цистеина (табл. 1).

В качестве начального этапа определения первичной структуры был выбран исчерпывающий гидролиз карбоксиметилированного препарата белка (СМ-белок) трипсином. Триптический гидролиз проводился в обычных условиях: 37° С, 4,5 ч, рН 8,4, конечное соотношение фермент — субстрат 1 : 50.

Аминокислотный состав LIV- и CM-LIV-белка

АМИНО- КИСЛОТА	Вычисленное количество остатков		АМИНО- КИСЛОТА	Вычисленное количество остатков	
	LIV-белок	CM-LIV-белок		LIV-белок	CM-LIV-белок
Cys (Cm)		1,67(2)	Met	4,80(5)	4,63(5)
Asp	39,79(40)	40,14(40)	Ile ^{2*}	18,54(19)	19,52(20)
Thr	17,95(18)	17,84(18)	Leu ^{2*}	23,05(23)	22,83(23)
Ser	13,82(14)	13,73(14)	Tyr	12,80(13)	12,74(13)
Glu	39,40(39)	37,21(37)	Phe	10,23(10)	10,11(10)
Pro	16,21(16)	15,90(16)	His	3,87(4)	3,62(4)
Gly	33,80(34)	34,24(34)	Lys	29,16(29)	28,87(29)
Ala	43,36(43)	43,19(43)	Arg	6,91(7)	6,83(7)
1/2 Cys [*]	1,79(2)		Trp ^{3*}	2,54(3)	2,51(3)
Val ^{2*}	26,79(27)	26,61(27)			

* Определено после окисления белка надмуравьиной кислотой.

^{2*} Рассчитано по 120-часовому гидролизу.

^{3*} Определено после гидролиза метансульфоновой кислотой.

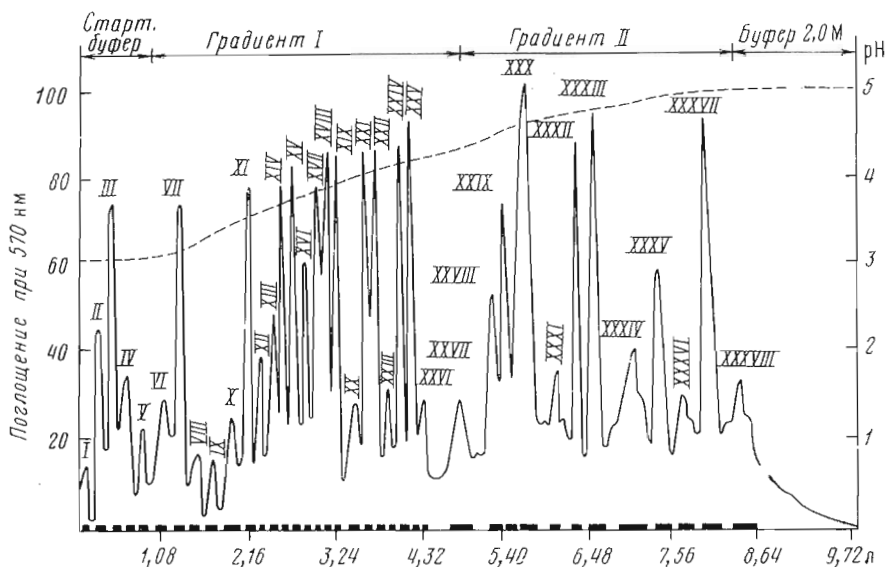
Первоначальное разделение гидролизата осуществлялось ионообменной хроматографией на катионите AG-50W×4 в градиенте концентрации и pH пиридин-ацетатных буферов (рисунок). В результате разделения гидролизата было получено 38 объединенных фракций. Анализ фракций с помощью хроматографии в тонком слое целлюлозы и определения N-концевых аминокислот показал, что 11 фракций (XIV, XV, XVI, XXI, XXII, XXIV, XXIX, XXXII, XXXIII, XXXV, XXXVII) гомогенны и не требуют дальнейшей очистки. Остальные фракции представляли собой смеси сравнительно небольшого числа пептидов.

В процессе ферментативного гидролиза и при подкислении гидролизата перед нанесением его на колонку образования нерастворимых пептидов не наблюдалось. Однако в некоторых фракциях при хранении образовались осадки, состоящие из индивидуальных пептидов (T-II, T-V, T-VI, T-VII — фракции II, V, VI и VII соответственно) или содержащие смесь пептидов (фракция XXX).

Осадок фракции XXX состоял из двух крупных пептидов, близких по молекулярному весу и заряду, и разделить их методами гель-фильтрации, ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе в присутствии детергентов, высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге не удалось. Один из пептидов смеси содержал остаток метионина, поэтому была проведена обработка фракции XXX бромцианом. При хроматографии образовавшейся при этом смеси на биогеле P-2 в 0,03 M NH₄НСO₃ были получены две фракции. Одна из них представляла собой индивидуальный пептид с C-концевым остатком аргинина (T-XXX-2-2). Из второй фракции с помощью хроматографии на целлюлозе DE-32 были выделены пептиды T-XXX-1 и T-XXX-2-1; последний содержал остаток гомосерина. Из растворимой части фракций V, VII и XXX с помощью хроматографии на бумаге были выделены пептиды T-V-1, T-VII-1, T-XXX-3 и T-XXX-4 соответственно.

Для выделения индивидуальных пептидов из остальных фракций (рисунок) была использована препаративная хроматография на бумаге и в некоторых случаях дополнительно электрофорез на бумаге. Фракции I, XII, XXIII, XXVI, XXVII, XXXI, XXXIV, XXXVI и XXXVIII состояли из сложной смеси небольших количеств пептидов и дальнейшей очистке не подвергались.

Данные о распределении триптических пептидов по фракциям, их аминокислотный состав и N-концевые аминокислотные остатки приведе-



Разделение пептидов триптического гидролизата SM-LIV-белка на колонке (0,9×150 см) с катионитом AG-50W×4. Пунктирная линия — градиент значений pH; прямоугольники на оси абсцисс — объединенные фракции. Стартовый буфер: 0,2 М пиридин-ацетат, pH 3,1; градиент I: 0,2 М, pH 3,1–0,5 М, pH 5,0; градиент II: градиент I→2,0 М, pH 5,0 (50° С); скорость элюции 108 мл/ч

ны в табл. 2. Большинство пептидов было сконцентрировано в четко разделяемых фракциях, однако в ряде случаев пептиды с одинаковым аминокислотным составом были выделены и из различных фракций. Распределение крупных пептидов в нескольких соседних фракциях (T-IV-2, T-V) может быть объяснено их медленным вымыванием со смолы, а выход одинаковых пептидов в сравнительно далеко отстоящих друг от друга фракциях (T-XVI и T-XIII, T-XXVIII-3 и T-XXX-1), по-видимому, обусловлен частичным дезаминированием остатков амидов дикарбоновых аминокислот, входящих в их состав.

Из фракции IV выделен пептид T-IV-1, не содержащий свободной α -аминогруппы. После его обработки раствором HCl в метаноле [6] в качестве N-концевого остатка была идентифицирована глутаминовая кислота. В небольших количествах пептиды с идентичным аминокислотным составом и блокированной α -аминогруппой были получены из фракций IX и X. Этот факт можно объяснить циклизацией остатка глутамина в пироглутаминовую кислоту, происходящей на различных стадиях процесса выделения. Вероятно, по той же причине распределялись по нескольким фракциям пептиды T-IX-2 и T-X-3.

N-Концевая аминокислотная последовательность пептидов устанавливалась методом Эдмана с идентификацией аминокислот в виде дансильных (Dns) производных и фенилтиогидантоинов (Pth). Второй вариант применялся при анализе пептидов, содержащих триптофан, дикарбоновые аминокислоты и их амиды. С-Концевая последовательность определялась с помощью карбоксипептидаз А и В.

В табл. 3 приведены триптические пептиды, строение которых было установлено прямой деградацией по методу Эдмана. Они составляют в сумме примерно одну треть молекулы белка.

Для определения структуры крупных пептидов и пептидов, не содержащих свободной α -аминогруппы, применялись дополнительно ферментативные и химические методы расщепления с разделением смеси образовавшихся фрагментов. Тип гидролиза и методы выделения индивидуальных компонентов указаны ниже в каждом конкретном случае. Для

Аминокислотный состав пептидов триглицерического гидролиза карбоксиметилированного LIV-белка

Аминокислота	T-II	T-III-1	T-III-2	T-III-2-1	T-III-2-2	T-IV-2 T-III-3, T-V-1	T-III-4	T-IV-1, T-IX-1, T-X-1	T-V, T-VI, T-VII
Cys (См)									
Asp	2,76 (3)	2,99 (3)	2,74 (3)	3,10 (3)		1,01 (1)		1,10 (1)	2,15 (2) ¹
Thr	0,81 (1)	1,07 (1)	1,88 (2)	1,82 (2)		2,02 (2)			1,78 (2)
Ser	0,96 (1)	3,10 (3)	3,60 (4)	3,40 (3)	1,18 (1)	3,99 (4)	0,69 (1)		2,60 (3)
Glu	4,64 (5)	0,89 (1)	0,98 (1)		0,72 (1)	4,16 (4)	0,95 (1)	1,06 (1)	4,18 (4)
Pro	0,63 (1)	1,18 (1)	1,00 (1)	1,18 (1)		3,03 (3)			1,96 (2)
Gly	3,69 (4)	2,96 (3)	4,76 (5)	2,76 (3)	1,90 (2)	2,16 (2)	2,31 (2)		4,13 (4)
Ala	6,60 (7)					4,95 (5)		3,06 (3)	3,20 (3)
Val *	4,95 (5)					0,71 (1)		2,09 (2)	3,03 (3)
Met	0,47 (1)	0,85 (1)	0,93 (1)		0,91 (1)	0,78 (1)			0,71 (1)
Ile *	0,95 (1)	1,01 (1)	2,75 (3)	2,62 (3)		3,63 (4)	1,98 (2)		0,96 (1)
Leu *						3,02 (3)			2,91 (3)
Tyr	1,04 (1)					1,79 (2)			0,93 (1)
Phe	1,01 (1)								
His		0,88 (1)	0,85 (1)		0,87 (1)	0,87 (1)		0,93 (1)	2,02 (2)
Lys									
Arg									
Число остатков	32	15	21	15	6	0,93 (1)	6	8	31
N-Концевая аминокислота	Val	Cln	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ala	Thr	Thr
Выход, %	22	8	30	20	20	48	6	6	93

Таблица 2 (продолжение)

Аминокислота	Т-VII-1	Т-IX-2, Т-VIII, Т-X-2	Т-X-3, Т-XI-4	Т-XI-1	Т-XI-2	Т-XI-3	Т-XI-5	Т-XIV	Т-XV
Cys (Cm)									
Asp	1,87 (2)			0,68 (4)	2,94 (3)	2,60 (3)		1,20 (1)	1,05 (1)
Thr	2,39 (3)			3,01 (3)	0,99 (1)	1,85 (2)			
Ser	1,07 (1)					1,00 (1)			
Glu	1,02 (1)	1,09 (1)	2,72 (3)	0,69 (1)	1,17 (1)	1,04 (1)	1,05 (1)	1,20 (1)	1,04 (1)
Pro	0,87 (1)					0,86 (1)			
Gly	2,41 (2)	0,94 (1)	1,85 (2)	1,04 (1)	2,73 (3)	1,01 (1)		1,11 (1)	
Ala	2,08 (2)		1,03 (1)		2,10 (2)	1,00 (1)		1,05 (1)	
Val *					1,69 (2)	1,92 (2)		1,00 (1)	
Met						0,64 (1)			
Ile *									0,82 (1)
Leu *	1,06 (1)				0,93 (1)	0,95 (1)		1,00 (1)	
Tyr				0,72 (1)					
Phe					1,84 (2)				
Lys	1,02 (1)			0,95 (1)	1,09 (1)	0,87 (1)	0,95 (1)	1,00 (1)	0,96 (1)
Arg **		0,97 (1)	0,87 (1)						
Трр **				8	16	+	2	7	4
Число остатков	14	3	9	8	16	16	9	7	4
N-Концевая аминокислота	Thr	-	-	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ala	Glu
Выход, %	31	8	5	44	2	22	9	89	89

Таблица 2 (продолжение)

Аминокислота	Т-XXVI Т-XXIII	Т-NVII	Т-XVIII	Т-XIX-1	Т-XIX-2	Т-XX	Т-XXI	Т-XXII	Т-XXIV
Asp	2,02(2)	0,81(1)		1,05(1)	3,94(4)	1,05(1)	1,04(1)		
Thr		0,80(1)							
Ser		0,92(1)							
Glu									
Pro	1,09(1)			0,94(1)	1,18(1)	1,21(1)	0,94(1)	1,08(1)	1,14(1)
Gly					1,69(2)			2,14(2)	
Ala		1,18(1)			1,85(2)				
Val*	1,65(2)	1,13(1)			1,75(2)				0,84(1)
Ile*	-0,85(1)				1,80(2)				0,95(1)
Leu*		1,20(1)		1,00(1)				1,00(1)	0,80(1)
Tyr					0,90(1)				
Phe		1,13(1)							
Lys	0,94(1)	1,08(1)	1,00(1)	0,97(1)	1,96(2)	0,84(1)	1,03(1)	1,00(1)	1,18(1)
Arg									
Число остатков	7	8	1	4	16	3	3	5	5
N-Концевая аминокислота	Val	Asp	Lys	Gly	Asn	Lys	Gly	Ala	Leu
Выход, %	45	22	114	56	56	10	89	94	89

Т а б л и ц а 2 (продолжение)

Аминокислота	Т-XXV-1	Т-XXV-2	Т-XXV-3	Т-XXVIII-1	Т-XXVIII-2	Т-XXIX	Т-XXX-1, Т-XXVIII-3
Asp		1,01 (1)		3,10(3)		1,00(1)	3,21(3)
Thr		0,98(1)		0,98(4)			1,97(2)
Glu		1,22(1)		1,11(1)			0,75(1)
Gly		1,03(1)	1,98(2)	3,18(3)			3,44(3)
Ala	0,92(1)	0,66(1)		2,11(2)		0,98(1)	3,00(3)
Val*			0,85(1)	1,80(2)		0,84(1)	0,78(1)
Ile*				0,99(1)		1,78(2)	
Leu*		1,02(1)			0,90(1)		
Phe				2,11(2)			2,65(3)
His						0,90(1)	0,89(1)
Lys	1,10(1)	2,31(2)	1,00(1)	1,80(2)	1,16(1)	1,12(1)	1,02(1)
Trp**							+(1)
Число остатков	2	8	4	17	2	7	19
N-Концевая аминокислота	Ala	Ala	Gly	Lys	Leu	Ile	Gly
Выход, %	22	2	28	21	6	56	21

Таблица 2 (окончание)

Аминокислота	T-XXX-2-1	T-XXX-2-2	T-XXX-3	T-XXX-4	T-XXXII	T-XXXIII	T-XXXV	T-XXXVII
Asp	2,10(2)		0,99(1) 1,62(2)					
Thr			0,67(1)					
Ser	2,03(2)	0,98(1)	1,01(1)	1,01(1)	1,05(1)		0,98(1)	
Glu	1,12(1)		1,18(1)				0,72(1)	
Pro	2,01(2)	1,23(1)	0,98(1)		1,01(1)			
Gly			0,86(1)					
Ala			0,62(1)				0,85(1)	
Val *	0,95(1)							
Hse	0,43(1)							
Ile *	1,02(1)							
Leu *		0,75(1)		0,98(1)	0,87(1)			0,90(1)
Tyr	2,93(3)	0,73(1)	0,67(1)	1,00(1)	1,78(2)	0,98(1)		
Phe	0,86(1)		0,87(1)	0,95(1)	0,85(1)	0,88(1)		
His								
Lys	0,84(1)			1,00(1)	1,02(1)	1,02(1)	1,01(1)	2,15(2)
Arg **		1,14(1)	1,03(1)				1,00(1)	
Trp **			+ (1)					
Число остатков	15	5	43	5	7	3	5	3
N-Концевая аминокислота	Glu	Gly	Lys	Tyr	Gly	Tyr	Val	Leu
Выход, %	11	13	18	33	47	89	85	89

* Результаты 72-часового гидролиза.

** Триптофан определяли качественно по реакции Эрлиха.

**Структура триптических пептидов CM-LIV-белка,
установленная прямой деградацией по
методу Эдмана**

Пептид	Аминокислотная последовательность
T-III-2-2	Pro-Ala-Glu-Ile-Ala-Lys
T-III-4	Ala-Ala-Leu-Gln-Ser-Leu
T-XI-1	Tyr-Asp-Asp-Ala-Cys(Cm)-Asp-Pro-Lys
T-XI-5	Pro-Lys
T-XIV	Ala-Val-Gln-Asp-Gly-Leu-Lys
T-XV	Glu-Asp-Ile-Lys
T-XVI	Val-Val-Asn-Asp-Gly-Ile-Lys
T-XVII	Asp-Phe-Ser-Thr-Leu-Val-Ala-Arg
T-XVIII	Lys
T-XIX-1	Gly-Asp-Leu-Lys
T-XX	Lys-Glu-Asp
T-XXI	Gly-Asn-Lys
T-XXII	Ala-Ala-Gly-Leu-Lys
T-XXIV	Leu-Gln-Ile-Val-Lys
T-XXV-1	Ala-Lys
T-XXV-2	Ala-Val-Gln-Asp-Gly-Leu-Lys-Lys
T-XXV-3	Gly-Gly-Ile-Lys
T-XXVIII-2	Leu-Lys
T-XXIX	Ile-Ala-Ile-Val-His-Asp-Lys
T-XXX-2-2	Gly-Gln-Ile-Leu-Arg
T-XXX-4	Tyr-Ile-Leu-Glu-Lys
T-XXXII	Gly-Tyr-Gln-Leu-Ile-Leu-Arg
T-XXXIII	Tyr-Leu-Lys
T-XXXV	Val-Lys-Pro-Gln-Arg
T-XXXVII	Leu-Lys-Lys

мента его подвергли гидролизу химотрипсином. В результате разделения гидролизата хроматографией на сефадексе G-25 в 0,1 М бикарбонате аммония были получены две фракции: Ch-1 и Ch-2. Фракция Ch-1 содержала один пептид, его строение установлено по методу Эдмана: Cys(Cm)-Ser-Ser-Ser-Thr-Gln-Pro-Ala-Ser-Asp-Ile-Tyr. Фракция Ch-2 содержала два пептида, условно обозначенные Ch-2-1 и Ch-2-2. Деградацией по методу Эдмана на смеси компонентов [7] удалось выяснить строение обоих пептидов, поскольку один из них (Ch-2-1) был N-концевым фрагментом исходного пептида с известной аминокислотной последовательностью.

Стадии деградации	I	II	III	IV	V	VI
Пептид Ch-2-1	Tyr	Val	Ile	Gly	His	Leu
Пептид Ch-2-2	Glu	Asp	Glu	Gly	Ile	Leu

Сумма всех полученных данных позволяет реконструировать полную структуру пептида T-IV-2, в дальнейшем подтвержденную (до 24-го остатка) автоматической деградацией на секвенаторе.

Пептид T-V. Данные по определению структуры пептида суммированы в табл. 4. Методом Эдмана идентифицировано 10 аминокислотных остатков. Смесь карбоксипептидаз А и В отщепляет с С-конца пептида только остаток лизина. Для установления полного строения пептида T-V потребовалось проведение двух типов гидролиза — термолизином и протеазой из *Staphylococcus aureus*. Из термолитического гидролизата с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге при pH 5,6 и последующей хроматографии некоторых фракций на бумаге было выделено 8 пептидов (Th-1 — Th-8). Их аминокислотный состав приведен в табл. 5, а строение дано в табл. 4. На основании полученных данных частичную структуру пептида T-V можно было представить следующим образом:

**Структура триптических пептидов СМ-LIV-белка,
установленная прямой деградацией по
методу Эдмана**

Пептид	Аминокислотная последовательность
T-III-2-2	Pro-Ala-Glu-Ile-Ala-Lys
T-III-4	Ala-Ala-Leu-Gln-Ser-Leu
T-XI-1	Tyr-Asp-Asp-Ala-Cys (Cm) -Asp-Pro-Lys
T-XI-5	Pro-Lys
T-XIV	Ala-Val-Gln-Asp-Gly-Leu-Lys
T-XV	Glu-Asp-Ile-Lys
T-XVI	Val-Val-Asn-Asp-Gly-Ile-Lys
T-XVII	Asp-Phe-Ser-Thr-Leu-Val-Ala-Arg
T-XVIII	Lys
T-XIX-1	Gly-Asp-Leu-Lys
T-XX	Lys-Glu-Asp
T-XXI	Gly-Asn-Lys
T-XXII	Ala-Ala-Gly-Leu-Lys
T-XXIV	Leu-Gln-Ile-Val-Lys
T-XXV-1	Ala-Lys
T-XXV-2	Ala-Val-Gln-Asp-Gly-Leu-Lys-Lys
T-XXV-3	Gly-Gly-Ile-Lys
T-XXVIII-2	Ileu-Lys
T-XXIX	Ile-Ala-Ile-Val-His-Asp-Lys
T-XXX-2-2	Gly-Gln-Ile-Leu-Arg
T-XXX-4	Tyr-Ile-Leu-Glu-Lys
T-XXXII	Gly-Tyr-Gln-Leu-Ile-Leu-Arg
T-XXXIII	Tyr-Leu-Lys
T-XXXV	Val-Lys-Pro-Gln-Arg
T-XXXVII	Ileu-Lys-Lys

мента его подвергли гидролизу химотрипсином. В результате деления гидролизата хроматографией на сефадексе G-25 в 0,1 М бикарбонате аммония были получены две фракции: Ch-1 и Ch-2. Фракция Ch-1 содержала один пептид, его строение установлено по методу Эдмана: Cys(Cm)-Ser-Ser-Ser-Thr-Gln-Pro-Ala-Ser-Asp-Ile-Tyr. Фракция Ch-2 содержала два пептида, условно обозначенные Ch-2-1 и Ch-2-2. Деградацией по методу Эдмана на смеси компонентов [7] удалось выяснить строение обоих пептидов, поскольку один из них (Ch-2-1) был N-концевым фрагментом исходного пептида с известной аминокислотной последовательностью.

Стадии деградации	I	II	III	IV	V	VI
Пептид Ch-2-1	Tyr	Val	Ile	Gly	His	Leu
Пептид Ch-2-2	Glu	Asp	Glu	Gly	Ile	Leu

Сумма всех полученных данных позволяет реконструировать полную структуру пептида T-IV-2, в дальнейшем подтвержденную (до 24-го остатка) автоматической деградацией на секвенаторе.

Пептид T-V. Данные по определению структуры пептида суммированы в табл. 4. Методом Эдмана идентифицированы 10 аминокислотных остатков. Смесь карбоксипептидаз А и В отщепляет с С-конца пептида только остаток лизина. Для установления полного строения пептида T-V потребовалось проведение двух типов гидролиза — термолитическим и протеазой из *Staphylococcus aureus*. Из термолитического гидролизата с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге при pH 5,6 и последующей хроматографии некоторых фракций на бумаге было выделено 8 пептидов (Th-1 — Th-8). Их аминокислотный состав приведен в табл. 5, а строение дано в табл. 4. На основании полученных данных частичную структуру пептида T-V можно было представить следующим образом:

Определение аминокислотной последовательности пептида Т-V

Анализируемый пептид	Результаты анализа
Т-V	<p>Thr-Gln-Phe-Met-Gly-Pro-Glu-Gly-Val-Ala → → → → → → → → → → → Phe-Met-Gly-Pro-Glu-Gly → → → → → → → → → → → Val-Ala-Asn → → → → → → → → → → → Thr-Gln → → → → → → → → → → → Thr-Glx-Phe-Met-Gly-Pro-Glx → → → → → → → → → → → Gly-Val-Ala-Asx-Val-Ser-Leu-Ser-Asx-Ile-Ala-Gly-Glx → → → → → → → → → → → Ser-Ala-Glx → → → → → → → → → → → Gly-Leu-Leu-Val-Thr-Lys-Pro-Lys → → → → → → → → → → →</p>
Th-1	<p>Ile-Ala-Gly-Glu-Ser-Ala-Glu-Gly → → → → → → → → → → →</p>
Th-2	<p>Val-Thr-Lys-Pro-Lys → → → → → → → → → → →</p>
Th-3	<p>Leu-Ser-Asn → → → → → → → → → → →</p>
Th-4	<p>Val-Ser → → → → → → → → → → →</p>
Th-5	<p>Leu-Leu → → → → → → → → → → →</p>
Th-6	<p>Leu-Leu → → → → → → → → → → →</p>
Th-7	<p>Leu-Leu → → → → → → → → → → →</p>
Th-8	<p>Leu-Leu → → → → → → → → → → →</p>
P-1	<p>Leu-Leu → → → → → → → → → → →</p>
P-2	<p>Leu-Leu → → → → → → → → → → →</p>
P-3	<p>Leu-Leu → → → → → → → → → → →</p>
P-4	<p>Leu-Leu → → → → → → → → → → →</p>
Строение	<p>Thr-Gln-Phe-Met-Gly-Pro-Glu-Gly-Val-Ala-Asn-Val-Ser-Leu-Ser-Asn-Ile-Ala-Gly-Glu-Ser-Ala-Glu-Gly-Leu-Val-Thr-Lys-Pro-Lys</p>

**Аминокислотный состав пептидов, полученных при гидролизе термолизином
и стафилококковой протеазой пептида Т-V**

Аминокислота	Th-1	Th-2	Th-3	Th-4	Th-5	Th-6
Asp			1,00(1)			1,04(1)
Thr				1,06(1)	0,98(1)	
Ser	1,01(1)					1,14(1)
Glu	1,92(2)	1,11(1)			1,03(1)	
Pro		0,90(1)		0,92(1)		
Gly	2,20(2)	2,24(2)				
Ala	1,84(2)		1,19(1)			
Val			0,81(1)	0,92(1)		
Met		0,80(1)				
Ile	0,79(1)					
Leu						0,86(1)
Phe		0,94(1)				
Lys				1,85(2)		
Число остатков	8	6	3	5	2	3
N-Концевая аминокислота	Ile	Phe	Val	Val	Thr	Leu

Аминокислота	Th-7	Th-8	P-1	P-2	P-3	P-4
Asp				1,98(2)		
Thr			0,78(1)			0,96(1)
Ser	1,05(1)			2,12(2)	0,84(1)	
Glu			1,89(2)	1,03(1)	1,21(1)	
Pro			0,81(1)			1,10(1)
Gly			1,21(1)	1,75(2)		1,10(1)
Ala				2,01(2)	0,97(1)	
Val	0,94(1)			1,83(2)		0,86(1)
Met			0,90(1)			
Ile				0,80(1)		
Leu		1,00(1)		0,71(1)		1,90(2)
Phe			1,00(1)			
Lys						1,96(2)
Число остатков	2	1	7	13	3	8
N-Концевая аминокислота	Val	Leu	Thr	Gly	Ser	Gly

Thr-Gln-Phe-Met-Gly-Pro-Glu-Gly-Val-Ala-Asn-(Val-Ser, Leu-Ser-Asn, Ile-Ala-Gly-Glu-Ser-Ala-Glu-Gly, Leu-Leu)-Val-Thr-Lys-Pro-Lys.

Из гидролизата, полученного при действии стафилококковой протеазы на пептид Т-V, высоковольтным электрофорезом на бумаге при pH 5,6 выделено 4 пептида (P-1-P-4), их аминокислотный состав и структура приведены в табл. 5 и 4 соответственно. Результаты исследования аминокислотной последовательности пептидов P-2 и P-4 дали возможность объединить термолитические пептиды в блоки Th-3-Th-7-Th-6-Th-1 и Th-1-Th-8-Th-4 и таким образом завершить установление структуры пептида Т-V.

Пептид Т-VII-1: Thr-Thr-Gly-Leu-Asp-Ser-Asp-Gln-Gly-Pro-Thr-Ala-Ala-Lys. С помощью карбоксипептидазы А определена С-концевая последовательность (84% Lys, 140% Ala). Далее проведено расщепление пептида термолизином и гидролизат разделен гель-фильтрацией (сефадекс G-15, раствор аммиака, pH 8,5) на две фракции. Одна из них состояла из смеси N- и С-концевых трипептидов (Thr-Thr-Gly и Ala-Ala-Lys), а вторая оказалась индивидуальным пептидом следующего аминокислотного состава: Asp 1,95(2), Ser 1,15(1), Thr 0,98(1), Glu 1,05(1), Pro 1,10(1),

Gly 1,13(1), Leu 0,93(1). Была определена аминокислотная последовательность этого пептида (Leu-Asx-Ser-Asx-Glx-Gly-Pro-Thr) и таким образом завершено установление строения пептида T-VII-1.

Пептид T-IX-2: $\overrightarrow{\text{Gln}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Arg}}$. Пептид не содержал свободной α -аминогруппы, его структура определена после раскрытия пироглутаминового цикла [6] по методу Эдмана.

Пептид T-X-3: $\overrightarrow{\text{Gln}}-\overrightarrow{\text{Gln}}-\overrightarrow{\text{Tyr}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Arg}}$. Методом дансирования в пептиде не обнаружено N-концевой аминокислоты. C-Концевая последовательность определена на основании результатов, полученных при действии смеси карбоксипептидаз А и В (100% Arg, 90% Ala, 75% Leu, 45% Gly). После раскрытия пироглутаминового цикла было идентифицировано в виде Dns-производных 6 аминокислотных остатков N-концевой последовательности пептида. Для идентификации остатков дикарбоновых аминокислот и их амидов был проведен гидролиз исходного пептида стафилококковой протеазой. В результате деградации полученной при этом смеси фрагментов была найдена только последовательность $\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Arg}}$, что свидетельствует о наличии остатков глутаминовой кислоты в 5-м и глутамина во 2-м положениях пептидной цепи.

Пептид T-XI-2: $\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Phe}}-\overrightarrow{\text{Phe}}-\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Lys}}$. Пептид был подвергнут химотриптическому гидролизу и из гидролизата с помощью хроматографии на бумаге выделены два пептида: Ch-1 и Ch-2. По данным аминокислотного состава и частичной N-концевой последовательности, пептид Ch-1 являлся N-концевым фрагментом (1-7) исходного пептида. Пептид Ch-2 представлял собой C-концевой фрагмент пептида T-XI-2 и имел следующий аминокислотный состав: Asp 1,19(1), Glu 1,15(1), Thr 0,92(1), Gly 2,12(2), Ile 0,88(1), Phe 0,95(1), Lys 1,05(1). Для него найдена последовательность $\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Lys}}$.

Пептид T-XI-3: $\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Met}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Trp}}-\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Lys}}$. При установлении N-концевой последовательности пептида был идентифицирован остаток метионина в 8-м положении. Для определения строения C-концевой части пептида было проведено расщепление бромцианом и с помощью хроматографии на бумаге в системе 1 выделен триптофансодержащий фрагмент (Asp 1,17(1), Thr 0,82(1), Glu 1,03(1), Pro 0,87(1), Gly 1,13(1), Leu 0,92(1), Lys 1,01(1), Trp *), для которого найдена последовательность $\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Trp}}-\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Lys}}$.

Пептид T-XIX-2: $\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Tyr}}-\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Gln}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Lys}}$. Смесь карбоксипептидаз А и В при pH 8,3 за 4 ч отщепляет 100% Lys и 100% Ile, при дальнейшем инкубировании смеси при pH 5 (2 ч) дополнительно отщепляются 48% Asp, 20% Ala и 18% Val. Совокупность полученных данных с результатами деградации по Эдману позволяет установить полную структуру пептида T-XIX-2.

Пептид T-XXVIII-1: $\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Phe}}-\overrightarrow{\text{Phe}}-\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Lys}}$. По данным аминокислотного состава и частичной N-концевой последовательности, пептид T-XXVIII-1 отличается от пептида T-XI-2 на один N-концевой остаток лизина.

Пептид T-XXX-1: $\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Phe}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Phe}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Phe}}-\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Trp}}-\overrightarrow{\text{His}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Lys}}$. После определения последовательности 10 N-концевых аминокислотных остатков пептид был расщеплен BNPS-ска-

* Триптофан определяли качественно с помощью реактива Эрлиха.

толом по остатку триптофана. Гидролизат методом высоковольтного электрофореза на бумаге при pH 6,4 разделен на две фракции. Одна из них содержала N-концевой фрагмент исходного пептида с уже известной структурой, а вторая — C-концевой следующего состава: Asp 1,67(2), Thr 1,68(2), Gly 1,13(1), Ala 2,70(3), His 0,95(1), Lys 1,00(1). Для этого пептида установлена аминокислотная последовательность His-Ala-Asn-Gly-Thr-Ala-Thr-Ala-Asx-Lys. Карбоксипептидаза А отщепляет с C-конца пептида при pH 8,3 только остаток лизина, что давало основание предполагать, что в 9-м положении находится остаток аспарагиновой кислоты. Для подтверждения был проведен гидролиз пептида карбоксипептидазой А с варьированием pH среды (2 ч, pH 8,3; 1 ч, pH 5,0). Полученные при этом данные (80% Lys, 109% Ala, 64% Thr, 50% Asp, 23% Gly) позволили завершить установление структуры пептида T-XXX-1-1. Аналогичные результаты были получены при гидролизе карбоксипептидазой А в приведенных выше условиях молекулы LIV-белка. Очевидно, пептид T-XXX-1 является C-концевым триптическим пептидом в молекуле белка.

Пептид T-XXX-2-1: Glu-Asn-Ile-Asp-Phe-Val-Tyr-Tyr-Gly-Gly-Tyr-His-Pro-Glu-Hse. Карбоксипептидаза А не отщепляет аминокислот с C-конца пептида. Для получения дополнительной информации проведен химотриптический гидролиз пептида и из гидролизата с помощью хроматографии на бумаге выделены три фрагмента (Ch-1—Ch-3) и свободный тирозин. Пептиды Ch-1 и Ch-2 были соответственно фрагментами 1—5 и 6—7 N-концевой последовательности исходного пептида. Пептид Ch-3 (Glu 1,00(1), Pro 0,72(1), Gly 2,33(2), Tyr 0,55(1), His 0,97(1), Hse 0,48(1)) представлял собой C-концевой фрагмент, для которого была установлена аминокислотная последовательность Gly-Gly-Tyr-His-Pro-Glu-Hse.

Пептиды T-XXX-2-1 и T-XXX-2-2 (табл. 3) составляют в сумме триптический пептид T-XXX-2, который не был выделен из гидролизата в индивидуальном состоянии (см. выше). Таким образом, полное строение пептида T-XXX-2 может быть представлено следующим образом: Glu-Asn-Ile-Asp-Phe-Val-Tyr-Tyr-Gly-Gly-Tyr-His-Pro-Glu-Met-Gly-Gln - Ile - Leu-Arg.

Пептид T-XXX-3: Lys-Gln-Asp-Pro-Ser-Gly-Ala-Phe-Val-Trp-Thr-Thr-Tyr. Пептид был подвергнут химотриптическому гидролизу и гидролизат разделен хроматографией на бумаге на три фракции, содержащие индивидуальные пептиды Ch-1—Ch-3. Пептид Ch-1 представлял собой N-концевой фрагмент (1—8) исходного пептида, пептид Ch-2 являлся дипептидом Val-Trp, пептид Ch-3 (Thr 1,80(2), Tyr 0,67(1)) имел следующее строение: Thr-Thr-Tyr. Очевидно, пептид Ch-3 занимает C-концевое положение в исходном триптическом пептиде. Данные, полученные при определении C-концевой последовательности пептида T-XXX-3 с помощью карбоксипептидазы А (75% Tyr, 152% Thr, 69% Val, 61% Trp, 53% Phe), подтверждают предложенную для него структуру.

В соответствии с содержанием основных аминокислот в составе LIV-белка при его триптическом гидролизе можно было ожидать образования максимально 37 пептидов. Однако реальное число триптических пептидов было несколько большим. Одной из причин этого является наличие в молекуле белка связей типа Lys—Lys, неполно гидролизуемых ферментом. Так, наряду с пептидами исчерпывающего гидролиза T-XXVIII-2 и T-XIV были выделены пептиды T-XXXVII и T-XXV-2 с двумя C-концевыми остатками лизина (табл. 3). Пептид T-XXVIII-1 отличался от пептида T-XI-2 тем, что содержал дополнительно остаток лизина в качестве N-концевой аминокислоты. Второй причиной увеличения числа пептидов в триптическом гидролизате было расщепление связей, не отвечающее специфичности трипсина и обусловленное, по-видимому, наличием хими-

триптической или химотрипсиноподобной активности в использованном препарате фермента. Так, в результате частичного гидролиза связи Leu—Gln в пептиде Т-III-2 образовались пептиды Т-III-4 и Т-III-1. Пептид Т-XXX-3, как было установлено в дальнейшем, образовался за счет полного гидролиза связи Tug—Ala (281—282) в молекуле белка [3, 4].

Наконец, несколько пептидов в триптическом гидролизате являются продуктами частичного расщепления кислотолабильных связей Asp—Pro. К ним относятся дипептид Т-ХI-5, образовавшийся из пептида Т-ХI-1, и пептид Т-XX, являющийся N-концевым фрагментом пептида Т-XXX-3. При хранении пептида Т-III-2 в 10% уксусной кислоте наблюдалось практически полное его расщепление по связи Asp—Pro с образованием N- и C-концевых фрагментов Т-III-2-1 и Т-III-2-2.

В целом триптический гидролиз LIV-белка прошел достаточно специфично, и основная масса пептидов содержала в качестве C-концевых остатков лизин или аргинин. Выделенные триптические пептиды, за исключением продуктов неспецифического расщепления, содержат в общей сложности 344 аминокислотных остатка. Как показало определение полной аминокислотной последовательности LIV-белка [3, 4], из триптического гидролизата были выделены все пептиды, составляющие молекулу белка.

Экспериментальная часть

В работе были использованы трипсин, химотрипсин, карбоксипептидазы А и В (Worthington, США), протеаза из *Staphylococcus aureus* (Miles, Англия), термолизин (Serva, ФРГ), BNPS-скатол (Pierce, США).

Реактивы и растворители очищали как описано ранее [8, 9]. LIV-белок выделяли из штамма K-12 *E. coli* по методу [10]. Гомогенность препаратов белка контролировали диск-электрофорезом в полиакриламидном геле [11], анализом N-концевой аминокислоты по дансильному методу [12] и определением специфической связывающей активности методом равновесного диализа против меченых субстратов [5].

Карбоксиметилирование LIV-белка осуществляли иодуксусной кислотой по методу [13].

Триптический гидролиз СМ-белка. 9 мкмоль СМ-белка растворяли в 50 мл дистиллированной воды, рН раствора доводили с помощью 0,1 н. NaOH до 8,4 и подвергали тепловой денатурации при 95° С в течение 15 мин. Раствор белка помещали в термостатированную ячейку автитратора ТТ1/ВР2 (Radiometer, Дания) и добавляли трипсин (1:100). Гидролиз вели при 37° С, поддерживая рН среды добавлением 0,2 н. раствора NaOH. Через 1,5 ч добавляли следующую порцию трипсина до отношения фермента к субстрату 1:50. Спустя 3 ч гидролиз останавливали прибавлением 0,1 н. HCl до рН 2,5. Гидролизат упаривали до объема 10 мл и наносили на хроматографическую колонку.

Разделение триптического гидролизата ионообменной хроматографией на колонке осуществляли на катионообменной смоле AG-50W×4 с размером частиц 200—400 меш (Bio-Rad, США). Колонку (0,9×150 см, Hitachi, Япония) заполняли суспендированной в стартовом буфере (0,2 М пиридин-ацетат, рН 3,1) смолы с помощью насоса МЦ-300 (Ково, СССР) при скорости 120 мл/ч и 37° С. Колонку стабилизировали, пропуская через нее стартовый буфер со скоростью 108 мл/ч при 37° С. Триптический гидролизат в объеме 10 мл (рН раствора 2,5) наносили на колонку под давлением азота 2—3 атм. В стеклянный смеситель, снабженный магнитной мешалкой, помещали 2180 мл стартового буфера. Буфер подавали на колонку насосом МЦ-300. Весь процесс разделения проводили при скорости элюирования 108 мл/ч. Сначала через колонку при 35° С пропускали 972 мл стартового буфера. Градиент I получали пропусканьем через смеситель, содержащий примерно 1200 мл стартового буфера, 4000 мл 0,5 М

пиридин-ацетатного буфера, рН 5,0. Через 46,5 ч после начала опыта температуру в рубашке колонки повышали до 50° С и в смеситель подавали 2,0 М пиридин-ацетатный буфер, рН 5,0 (градиент II), в течение 37 ч (4000 мл). Затем, минуя смеситель, через колонку пропускали 970 мл 2 М буфера (рН 5,0), 540 мл 6 М пиридина и окончательно колонку промывали 110 мл 0,5 н. NaOH. Элюат собирали при помощи коллектора фракций, объем каждой фракции 15 мл.

Анализ элюата. Для обнаружения пептидов из каждой второй пробирки отбирали по 0,04 мл и анализировали по реакции с нингидрином на автоматическом анализаторе (Technicon, США). По результатам анализа фракции объединяли, упаривали до объема 2–3 мл и хранили при 4° С. Для оценки числа пептидов в объединенных фракциях $1/_{300}$ – $1/_{500}$ часть каждой фракции хроматографировали в тонком слое целлюлозы MN-300 в системе А: пиридин — уксусная кислота — *n*-бутанол — вода (10 : 3 : 15 : 12). Детекцию пептидов осуществляли по реакции с нингидрином. Триптофан- и аргининсодержащие пептиды идентифицировали с помощью реактивов Эрлиха и Сакагучи соответственно.

Очистка пептидов. Для выделения индивидуальных пептидов из полученных фракций использовали нисходящую хроматографию и высоковольтный электрофорез на бумаге Ватман 3 ММ. Хроматографию проводили в системе А при комнатной температуре. Электрофорез осуществляли при рН 1,9 и 6,4 и напряжении 2500–4000 В. Детекцию пептидов проводили по реакции с нингидрином и специфическими реагентами (см. выше). Пептиды элюировали 10% уксусной кислотой.

Разделение пептидов фракции ХХХ. Осадок фракции ХХХ растворяли в 2 мл 85% муравьиной кислоты и добавляли 300-кратный избыток бромциана. Смесь инкубировали в течение 5 ч при 37° С, разбавляли в 10 раз дистиллированной водой и лиофилизовали. Сухой остаток растворяли в 0,5 мл 0,03 М NH_4HCO_3 (рН 8,0) и наносили на колонку (1×100 см) с биогеелем Р-2, уравновешенным этим же буфером. Элюирование вели со скоростью 3,2 мл/ч. Фракции объемом 2 мл собирали при помощи автоматического коллектора, а затем каждую из них анализировали на спектрофотометре при 210 нм. По результатам анализа элюат объединяли и лиофилизовали. Пептиды фракции ХХХ-1 растворяли в 2 мл буфера (0,003 М трис-НСl, 6 М мочевины) и наносили на колонку с целлюлозой DE-32, уравновешенной этим же буфером. Для разделения использовали градиент концентрации NaCl (0–0,16 М), скорость элюирования 40 мл/ч, общий объем градиентного раствора 240 мл. Контроль за выходом пептидов с колонки осуществляли с помощью ультрафиолетового детектора Uvicord II (ЛКВ, Швеция) при 280 нм. Объединенные фракции обессоливали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-10 в 0,01 М растворе NH_4HCO_3 .

Ферментативные гидролизы триптических пептидов. К 0,05–0,5 мкмоль пептида в 0,05–0,5 мл 0,1 М NH_4HCO_3 добавляли фермент (химотрипсин — 2%, термолизин, стафилококковая протеаза — 5% по весу) и выдерживали 4 ч при 37° С. По окончании гидролиза раствор подкисляли до рН 3 уксусной кислотой и хранили при –10° С.

Расщепление бромцианом пептида T-IV-2. 0,5 мкмоль пептида растворяли в 1 мл 70% HCOOH и добавляли к раствору 100-кратный избыток бромциана. Смесь выдерживали 24 ч под азотом при комнатной температуре и затем лиофилизовали, разбавив в 10 раз водой. Разделение гидролизата проводили на колонке (2,5×100 см) с сефадексом G-25 (тонкий) в 0,1 М NH_4HCO_3 со скоростью элюирования 10 мл/ч. Контроль за выходом пептидов осуществляли с помощью ультрафиолетового детектора при 280 нм. Фракции объединяли и лиофилизовали.

Расщепление BNPS-скатолом пептида T-XXX-1. 0,06 мкмоль пептида суспендировали в 0,08 мл ледяной уксусной кислоты и добавляли 0,22 мг (10-кратный молярный избыток) BNPS-скатола. Суспензию перемешива-

ли до полного растворения реагента, затем добавляли 0,02 мл воды и выдерживали 6 ч в темноте при 20° С. Раствор разбавляли равным объемом воды и экстрагировали 0,2 мл хлорбутана. К водному слою добавляли 5 объемов воды и лиофилизировали.

Дегградация пептидов по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде DNS-производных [14]. Реакцию проводили в пробирках (4×70 мм), помещаемых в эксикатор, снабженный краном для откачки воздуха и заполнения азотом. К 10–20 нмоль пептида добавляли 30 мкл 50% водного пиридина и 30 мкл 5% раствора фенилизотиоцианата в пиридине. Эксикатор при охлаждении смесью сухого льда и ацетона вакуумировали и заполняли аргоном (операцию повторяли 2–3 раза). После термостатирования при 45° С в течение 1 ч содержимое пробирок упаривали в вакууме досуха (60° С, 30 мин). К остатку добавляли 30 мкл безводной трифторуксусной кислоты и после заполнения эксикатора аргоном (при охлаждении) выдерживали 30 мин при 45° С. Отгоняли трифторуксусную кислоту в вакууме (60° С, 30 мин), остаток растворяли в 30 мкл воды и экстрагировали этилацетатом (3×50 мкл). Из водной фазы отбирали аликвоту (1–2 нмоль) на дансильирование, а остаток высушивали в вакууме и подвергали следующему циклу дегградации.

Идентификацию Dns-производных аминокислот проводили с помощью микротонкослойной хроматографии на силикагеле [9] и на микропластинчатых пластинках E 1700 (Schleicher und Schüll, ФРГ) [15].

Дегградацию пептидов по методу Эдмана с идентификацией фенилтиогидантоинос аминокислот проводили как описано в сообщении [16].

Автоматическую дегградацию пептидов осуществляли на секвенаторе 890 С (Beckman, США) по программе № 102974.

С-Концевую последовательность пептидов определяли с помощью карбоксицепптидаз А и В [17] с последующим анализом гидролизата на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США). Для более четкой идентификации серина, треонина, аспарагина и глутамина использовали микротонкослойную хроматографию их Dns-производных.

Анализ аминокислотного состава гидролизатов белка и пептидов (условия гидролиза см. [8]) проводили на аминокислотных анализаторах BC-200 (Bio-Cal, ФРГ) и D-500. Гидролизу подвергли 50 и 5–10 нмоль образца соответственно.

Авторы глубоко признательны акад. Ю. А. Овчинникову, по инициативе которого было проведено настоящее исследование, за постоянный интерес и ценные советы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Oxender D. L., Quay S. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **264**, 358–372.
2. Amanuma H., Anraku Y. (1974) *J. Biochem.*, **76**, 1165–1173.
3. Овчинников Ю. А., Алданова Н. А., Гринкевич В. А., Арзамазова Н. М., Мороз И. Н., Назимов И. В. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 564–567.
4. Ovchinnikov Yu. A., Aldanova N. A., Grinkevich V. A., Arzamazova N. M., Moroz I. N. (1977) *FEBS Lett.*, **78**, 313–316.
5. Anraku Y. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 3123–3127.
6. Kawasaki I., Itano H. A. (1972) *Analyt. Biochem.*, **48**, 546–556.
7. Липкин В. М., Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Жикюлина Е. Б., Виноградова Е. И. (1972) *Биохимия*, **37**, 410–413.
8. Овчинников Ю. А., Кирюшкин А. А., Егоров Ц. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Модянов Н. Н. (1972) *Биохимия*, **37**, 451–460.
9. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Потапенко Н. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. (1973) *Биохимия*, **38**, 3–21.
10. Антонов В. К., Арсеньева Е. Л., Гаврилова Н. А., Гинодман Л. М., Крылова Ю. И. (1973) *Биохимия*, **38**, 1294–1297.
11. Ornstein L. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321–349.
12. Gray W. R. (1967) in: *Methods in Enzymol.*, vol. XI, pp. 139–151. Acad. Press, N. Y. — London.
13. Hirs C., Moore S., Stein W. H. (1956) *J. Biol. Chem.*, **219**, 623–642.

14. Gray W. R. (1967) in: *Methods in Enzymol.*, vol. XI, pp. 469-475, Acad. Press, N. Y.—London.
15. Арутюнян А. А., Северин Е. С., Варшавский Я. М. (1975) *Биохимия*, 40, 878-884.
16. Модянов Н. Н., Линкин В. М., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Потепенко Н. А., Шуваева Т. М., (1978) *Биоорган. химия*, 4, 158-179.
17. Ambler R. P. (1972) in: *Methods in Enzymol.*, vol. XXV B, pp. 143-154, 262-272, Acad. Press, N. Y.—London.

Поступила в редакцию
22.V.1979

THE PRIMARY STRUCTURE OF LIV-BINDING PROTEIN FROM *E. COLI*. I. THE PEPTIDES OF EXHAUSTIVE TRYPTIC HYDROLYSIS

GRINKEVICH V. A., ARZAMAZOVA N. M., POTAPENKO N. A.,
GRINKEVICH Kh. A., KRAVCHENKO Z. B., FEIGINA M. Yu.,
ALDANOVA N. A.

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

Exhaustive tryptic digestion of carboxymethylated Leu, Ile, Val (LIV)-binding protein was carried out. For the initial separation of hydrolysate, chromatography on Aminex AG 50W×4 resin and subsequent purification of peptides by paper chromatography and paper electrophoresis were used. As a result 39 individual peptides were isolated and their complete amino acid sequences were determined. All tryptic peptides contain in total 344 amino acid residues which corresponds to the total sequence of the protein.
