



УДК 547.963.4.02+599.322

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА МИОГЛОБИНА БОБРА (*CASTOR FIBER*)

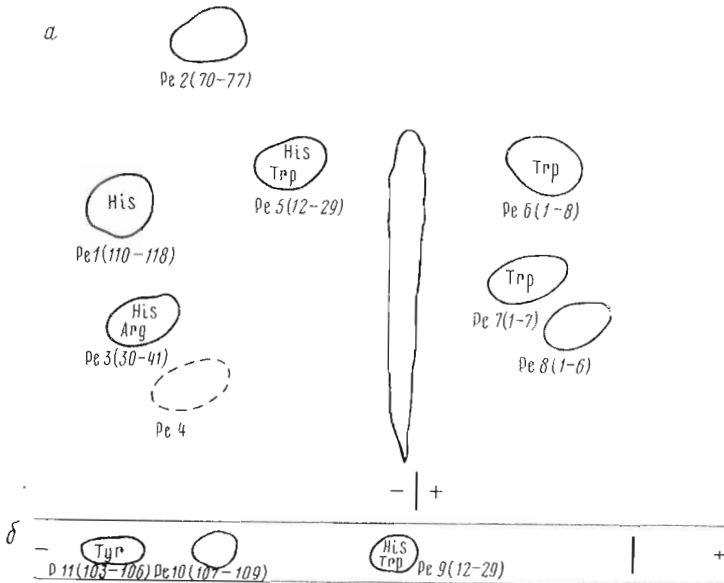
II. ПЕПСИНОВЫЕ ПЕПТИДЫ НЕРАСТВОРИМОЙ ФРАКЦИИ ТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗАТА. РЕКОНСТРУКЦИЯ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ ГЛОБИНОВОГО КОМПОНЕНТА МИОГЛОБИНА БОБРА

Сухомлинов В.Ф., Дробот Л.В.

Кафедра биохимии Львовского госуниверситета им. И. Франко, Львов

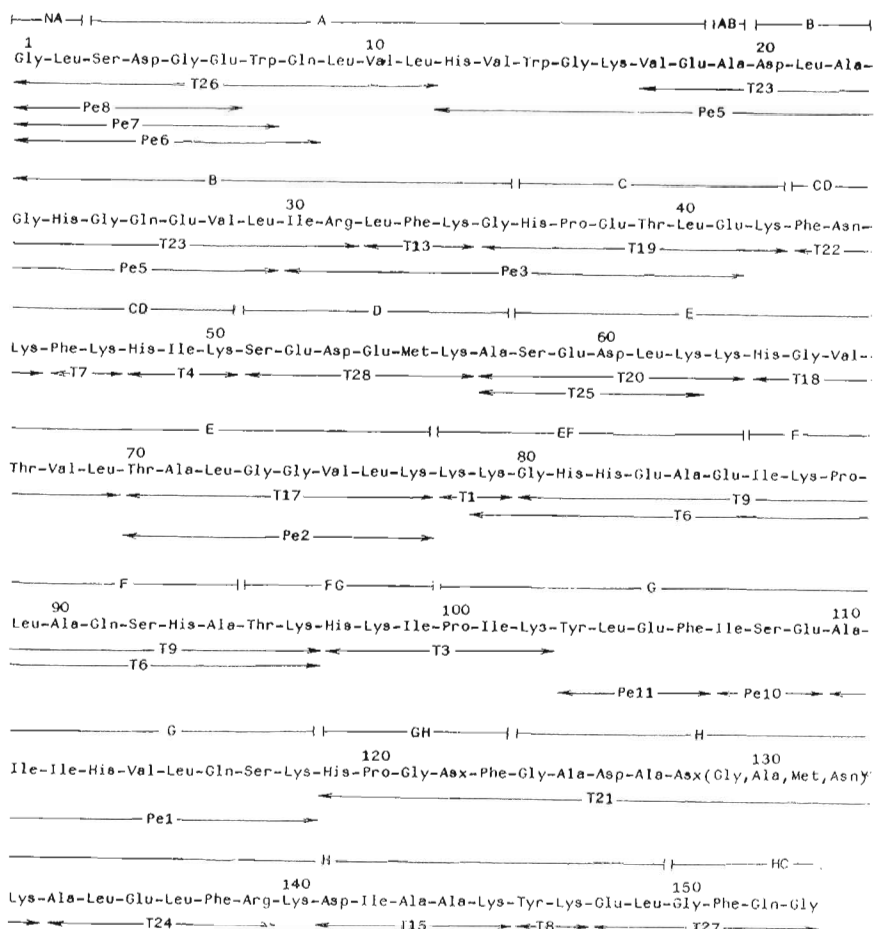
Из нерастворимой при pH 5,0 фракции триптического гидролизата апомиоглобина основного электрофоретического компонента миоглобина бобра выделено 10 пепсиновых пептидов, изучен их аминокислотный состав и N-концевая аминокислотная последовательность. На основании данных аминокислотного состава и структуры триптических пептидов и пепсиновых пептидов нерастворимой фракции триптического гидролизата, а также путем сравнения с гомологичными участками миоглобинов с изученной первичной структурой реконструирована последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи исследуемого белка.

В предыдущем сообщении [1] мы описали выделение, аминокислотный состав и аминокислотную последовательность растворимых триптических пептидов глобина основного электрофоретического компонента



Анализ пепсиновых пептидов нерастворимой фракции триптического гидролизата: *а* – схема пептидной карты (пунктиром обозначено положение минорного пятна), *б* – разделение нейтральных пептидов с помощью электрофореза при pH 1,9

Аминокислотная последовательность миоглобина бобра



Примечания: т – триптические пептиды, Pe – пепсиновые пептиды, А–Н – спиральные сегменты (нумерацию спиралью миоглобина см. [5])

миоглобина бобра. В настоящей работе представлены результаты исследования структуры пепсиновых пептидов нерастворимой фракции триптического гидролизата белка.

Триптические гидролизаты миоглобинов различных видов животных содержат нерастворимую фракцию, в состав которой входят обычно участки 1–16, 64–77, 103–118 полипептидной цепи [2–4], составляющие приблизительно $\frac{1}{3}$ белковой молекулы. Высокое содержание в указанных пептидах гидрофобных аминокислотных остатков объясняет склонность этих пептидов к агрегации в процессе проведения триптического гидролиза, что вызывает образование нерастворимого материала при подкислении до рН 5. Нами выявлено, что неспецифический гидролиз трипсином пептидных связей по остаткам лейцина в положениях 11 и 69 полипептидной цепи белка приводит к частичной солиubilизации фрагментов 1–11, 64–69 и 70–77, которые обнаруживаются на пептидных картах растворимых триптических пептидов [1].

Нерастворимую после проведения триптического гидролиза фракцию расщепляли пепсином. Дактилографический анализ и детекцию отдельных аминокислот в пептидах осуществляли в условиях, аналогичных таковым для растворимых триптических пептидов [1]. На рисунке представлена схема пептидной карты пепсиновых пептидов. В основной и кислой зонах выявлено 8 гомогенных пептидов, 3 из которых дают положительную

Таблица 1

Аминокислотный состав пептиновых пептидов нерастворимой фракции триптического гидролизата миоглобина бобра

Пептид	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Trp	N-Концевая аминокислота	Всего остатков
Pe8 (1-6)	1,00 (1)		1,30 (1)	1,07 (1)		1,93 (2)					0,70 (1)							Gly	6
Pe7 (1-7)	1,23 (1)		1,07 (1)	1,07 (1)		1,67 (2)					0,96 (1)						(1)	Gly	7
Pe6 (1-8)	0,91 (1)		1,03 (1)	2,24 (2)		2,00 (2)					0,82 (1)						(1)	Gly	8
Pe5 (12-29)	1,06 (1)			3,19 (3)		2,92 (3)	2,08 (2)	2,67 (3)			2,08 (2)			1,94 (1)	1,06 (1)		(1)	His	18
Pe9 (12-29)	1,07 (1)			3,23 (3)		3,28 (3)	2,21 (2)	2,64 (3)			1,84 (2)			1,72 (2)	1,01 (1)		(1)	His	18
Pe3 (30-41)		1,09 (1)		2,28 (2)	1,09 (1)	1,12 (1)				0,94 (1)	2,09 (2)		0,94 (1)	0,63 (1)	1,18 (1)	0,64 (1)		Ile	12
Pe2 (70-77)		0,75 (1)				2,06 (2)	1,08 (1)	0,90 (1)			2,07 (2)				1,14 (1)			Thr	8
Pe11 (103-106)				1,35 (1)							1,08 (1)	0,78 (1)	0,79 (1)					Tyr	4
Pe10 (107-109)			0,64 (1)	1,22 (1)						1,14 (1)								Ile	3
Pe1 (110-118)			0,73 (1)	1,12 (1)			0,78 (1)	1,12 (1)		1,58 (2)	1,26 (1)			1,19 (1)	1,22 (1)			Ala	9

Аминокислотная последовательность пепсиновых пептидов нерастворимой фракции триптического гидролизата миоглобина бобра

Пептид	Аминокислотная последовательность
Pe8 (1-6)	Gly-Leu-Ser-Asp-Gly-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
Pe7 (1-7)	Gly-Leu-Ser-Asp-Gly-Glu-Trp ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
Pe6 (1-8)	Gly-Leu-Ser-Asp-Gly-Glu-Trp-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
Pe5 (12-29)	His-Val-Trp-Gly-Lys-Val (Glu, Ala, Asp, Leu, Ala, Gly, His, Gly, ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ Gln, Glu, Val, Leu)
Pe9 (12-29)	His-Val-Trp-Gly-Lys-Val (Glu, Ala, Asp, Leu, Ala, Gly, His, Gly, ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ Gln, Glu, Val, Leu)
Pe3 (30-41)	Ile-Arg-Leu-Phe-Lys (Gly, His, Pro, Glu, Thr, Leu, Glu) ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
Pe2 (70-77)	Thr-Ala-Leu-Gly-Gly-Val-Leu-Lys ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
Pe11 (103-106)	Tyr-Leu-Glu-Phe ↘ ↘ ↘ ↘
Pe10 (107-109)	Ile-Ser-Glu ↘ ↘ ↘
Pe1 (110-118)	Ala-Ile-Ile-His-Val-Leu-Glu-Ser-Lys ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘

П р и м е ч а н и е. Стрелками показана аминокислотная последовательность, определенная деградацией пептидов по методу Эдмана с идентификацией Dns-производных аминокислот.

реакцию с реактивом Эрлиха. Пептидный материал нейтральной зоны, не разделяющийся при хроматографии в системе растворителей пиридин — бутанол — уксусная кислота — вода (15 : 10 : 3 : 12), элюировали 1% аммиаком и подвергали электрофорезу при pH 1,9. Такой прием позволил получить еще 3 пептида в гомогенном состоянии.

Аминокислотный состав выделенных пептидов и N-концевая аминокислотная последовательность представлены в табл. 1 и 2.

Пептиды Pe5 и Pe9 оказались идентичными по структуре и соответствуют участку 12—29 полипептидной цепи белка. Различие в подвижности пептидов при электрофорезе можно объяснить частичным дезамидированием остатка глутамина, занимающего обычно положение 26. Изучение N-концевой аминокислотной последовательности указанных пептидов позволило воссоздать последовательность аминокислотных остатков на участке 1—31 полипептидной цепи белка.

Пептид Pe3 (30—41) перекрывается с C-концевой аминокислотной последовательностью триптического пептида T23 (17—31), что позволило выяснить полную структуру этого пептида.

Пептиды Pe11, Pe10 и Pe1 составляют в сумме нерастворимый триптический фрагмент 103—118 полипептидной цепи белка.

На основании данных аминокислотного состава, N-концевой аминокислотной последовательности триптических пептидов и пепсиновых пептидов нерастворимой фракции триптического гидролизата, а также путем сравнения с гомологичными участками миоглобинов с известной первичной структурой нами реконструирована полная аминокислотная последовательность полипептидной цепи миоглобина бобра, насчитывающая 153 аминокислотных остатка (см. схему).

Большая часть различий в аминокислотной последовательности между миоглобином бобра и миоглобинами других видов животных [6] не касается остатков, принимающих участие в контактировании с гемом, образовании водородных связей и солевых мостов. Эти различия ограничены в основном поверхностью глобулы белка и являются консервативными.

Экспериментальная часть

Пепсиновый гидролиз нерастворимой фракции триптического гидролизата. После проведения триптического гидролиза рН раствора доводили до 5,0 уксусной кислотой, нерастворимый материал осаждали нагреванием на водяной бане при 90° С в течение 5 мин и центрифугировали. Осадок трижды промывали водой, растворяли в 0,4 М НСl и гидролизовали пепсином (2 мг/мл в воде) (Schüchardt München) при соотношении фермент — субстрат 1 : 25 в течение 3 ч при 37° С. Затем гидролизат лиофильно высушивали и анализировали методом пептидных карт.

Постановку пептидных карт (аналитических и препаративных), анализ аминокислотного состава пептидов и исследование N-концевой аминокислотной последовательности проводили в условиях, аналогичных применяемым для растворимых триптических пептидов в работе [1].

Авторы выражают глубокую благодарность В. Н. Коробову за предоставление препарата основного электрофоретического компонента миоглобина бобра, С. Н. Веремейченко за выполнение анализов на аминокислотных анализаторах, сотрудникам отдела химии белка Института молекулярной биологии и генетики АН УССР за ценные замечания, постоянное внимание и помощь при выполнении данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сухомлинов Б. Ф., Дробот Л. Б. (1980) Биоорг. химия, 6, 372—378.
2. Edmundson A. B. (1965) Nature, 205, 883—887.
3. Dautrevaux M., Boulanger J., Han K., Biserte G. (1969) Eur. J. Biochem., 11, 267—277.
4. Romero-Herrera A. E., Lehmann H. (1974) Proc. Roy. Soc. London, B186, 249—279.
5. Watson H. C. (1969) Progr. Stereochem., 4, 299—333.
6. Dayhoff M. O. (1976) Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, Suppl. 2, National Biomedical Research Foundation, Washington.

Поступила в редакцию
7.VIII.1979

После доработки
25.IX.1979

THE PRIMARY STRUCTURE OF MYOGLOBIN FROM BEAVER (*CASTOR FIBER*).

II. PEPTIC PEPTIDES OF THE TRYPTIC INSOLUBLE CORE. RECONSTRUCTION OF BEAVER MYOGLOBIN POLYPEPTIDE CHAIN

SUKHOMLINOV B. F., DROBOT L. B.

Lvov State University, Lvov

From the insoluble at pH 5.0 fraction of the tryptic hydrolysate of beaver myoglobin main electrophoretic component, 10 peptic peptides have been isolated and their amino acid composition and N-terminal amino acid sequences have been determined. The results obtained, along with those on tryptic peptides and the comparison with homologous portions of myoglobins of known primary structure, allowed to reconstruct the complete amino acid sequence of the beaver myoglobin.