



УДК 547.962.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ G
ИЗ *ESCHERICHIA COLI*VII. ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕПТИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ГИДРОЛИЗЕ
ФРАГМЕНТА T₄ ГЛУТАМИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗОЙ *STAPHYLOCOCCUS*
*AUREUS*Алахов Ю. Б., Бундуле М. А., Бундулис Ю. П.,
Винокуров Л. М., Козлов В. П.

Институт белка Академии наук СССР, г. Пушкино Московской обл.

Установлена аминокислотная последовательность пептидов, выделенных из продуктов гидролиза фрагмента T₄, полученного ограниченным триптическим гидролизом G-фактора стафилококковой глутаминовой протеиназой, охватывающая 76% всей структуры данного фрагмента. На основании полученных данных объединено в одну полипептидную цепь 7 из 12 ранее охарактеризованных пептидов бромцианового расщепления белка, входящих в состав фрагмента T₄.

Для получения перекрытий между фрагментами ограниченного трипсинолиза, а также для изучения аминокислотной последовательности фрагмента T₄, представляющего собой среднюю часть полипептидной цепи фактора элонгации G, ранее были исследованы пептиды, полученные при расщеплении целой молекулы белка бромцианом [1]. В результате было выделено и исследовано 23 бромциановых пептида, в том числе 12 пептидов, которые входят в состав фрагмента T₄.

Продолжением работы над установлением первичной структуры фрагмента T₄ явилось исследование продуктов, полученных при гидролизе этого фрагмента стафилококковой глутаминовой протеиназой. Результатам этих исследований посвящена данная статья.

По данным аминокислотного анализа (табл. 1), фрагмент T₄ содержит большое количество остатков глутаминовой кислоты, что давало возможность получить сравнительно небольшие пептиды. Целью данной работы являлось получение пептидов, объединяющих между собой пептиды бромцианового расщепления G-фактора, входящие в состав фрагмента T₄. Кроме того, было необходимо выяснить структуру неизвестных участков фрагмента T₄.

Так как выделение в чистом виде фрагмента T₄ затруднено, в данной работе использовали смесь фрагментов T₃ и T₄ (в соотношении 1:1). Фрагмент T₃ представляет собой изучаемый нами фрагмент T₄, удлиненный с N-конца на фрагмент T₇ (номенклатуру фрагментов см. в сообщениях [2, 3]). Фрагменты ограниченного трипсинолиза G-фактора были выделены как описано нами ранее [2]. Их гомогенность была оценена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, а также определением их N-концевых аминокислот.

По предварительным данным, фрагмент T₄ содержит две свободные сульфгидрильные группы. Поэтому после гидролиза смеси фрагментов T₃ и T₄ стафилококковой протеиназой полученный гидролизат был карбоксиметилирован I-[¹⁴C]CH₂CONH₂. Радиоактивно меченый гидролизат предварительно разделялся методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 (рис. 1). В результате получено пять фракций A, B, C, D и E, каждая из которых представляла собой довольно сложную смесь пептидов.

Дальнейшее разделение фракции A, которая содержала крупные пептиды, осуществляли с помощью ионообменной хроматографии на QAE-

Сообщение VI см. [1]. Принятые сокращения: DAVITC — 4-диметиламино-4-азобензолнотиоцианат.

Таблица I

Аминокислотный состав и N-концевые аминокислотные остатки пептидов, полученных при гидролизе фрагмента T₁ протеиназой из *Staphylococcus aureus*

Аминокислота	T ₁	SPIV-0	SPIV-1	SPIV-2-1	SPIV-2-2	SPIV-3	SPIV-4	SPIV-5	SPIV-6	SPIV-7	SPIV-8	SPIV-8-1	SPIV-8-2	SPIV-9	SPIV-10	SPIV-11	
Cys (Сm)	* (4)																
Asp	41,2 (42)	5,9 (6)	5,8 (6)	4,7 (5)	4,4 (1)	1,0 (1)	4,0 (4)	1,9 (2)	0,9 (1)	4,0 (1)	1,8 (2)	0,8 (1)	0,8 (1)			0,9 (1)	
Thr	13,1 (14)	1,8 (2)	1,0 (1)	0,9 (1)		0,9 (1)	0,9 (1)				3,1 (3)	1,4 (1)	2,0 (2)	1,0 (1)	2,1 (2)	1,0 (1)	
Ser	11,3 (12)																
Glu	41,0 (41)	4,9 (5)	4,8 (5)	1,9 (2)	2,8 (3)		2,0 (2)	1,95 (2)	1,1 (1)	2,1 (2)	3,0 (3)	2,1 (2)	1,1 (1)				
Pro	16,1 (16)	3,0 (3)	3,0 (3)	1,0 (1)	2,0 (2)		1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)							
Gly	24,1 (21)	3,1 (3)	3,0 (3)	2,2 (2)	4,2 (1)		2,1 (2)	1,1 (1)	1,0 (1)								
Ala	37,0 (37)	6,0 (6)	5,8 (6)	3,0 (3)	3,0 (3)	2,0 (2)	1,9 (2)	1,0 (1)	1,0 (1)				1,1 (1)		2,2 (2)		
Val	30,5 (29)	6,0 (6)	5,0 (5)	4,0 (4)	1,0 (1)		0,7 (1)	0,6 (1)									
Met	10,0 (11)	1,6 (2)	1,7 (2)	1,5 (2)			1,2 (1)	1,0 (1)	1,2 (1)	0,9 (1)							
Ile	25,1 (25)	3,2 (3)	3,3 (3)	2,1 (2)	0,9 (1)		1,0 (1)	0,9 (1)	1,2 (1)	1,0 (1)							
Leu	28,0 (27)	4,1 (4)	4,2 (4)	2,2 (2)	2,1 (2)		1,0 (1)	0,9 (1)	1,2 (1)	1,0 (1)						1,2 (1)	
Tyr	6,1 (5)	0,7 (1)	0,7 (1)	0,6 (1)													
Phe	13,0 (13)	1,8 (2)	1,8 (2)	1,8 (2)						0,9 (1)							
His	5,1 (5)																
Lys	25,2 (22)	5,1 (5)	4,8 (5)	4,9 (5)			1,8 (2)			0,9 (1)							
Trp *	(3)	(1)	2,9 (3)	2,8 (3)			(1)			(1)							
Arg	16,0 (17)	3,8 (4)															
Общее количество остатков	344	53	49	35	14	7	49	10	4	7	8	4	4	3	7	3	
N-Концевая аминокислота	Gln	Thr	Gln	Gln	Ala	His	Leu	Tyr	Leu	Trp	Ser	Ser	Ala	Leu	Lys	Leu	

Таблица 1 (окончание)

Аминокислота	SPIV-12	SPIV-13	SPIV-14	SPIV-15	SPIV-16	SPIV-9-16	SPIV-17	SPIV-18-1	SPIV-18-2	SPIV-19	SPIV-20	SPIV-21	SPIV-22	SPIV-23	SPIV-24
Cys (Cm)															
Asp	0,9(1)	0,9(1)		1,8(2)	2,0(2)	2,0(2)	1,3(2) 5,8(6) 2,0(2)	3,0(3) 0,9(1)			1,2(2) 4,8(5) 1,8(2)	4,0(1) 0,8(1)		0,9(1) 0,8(1)	1,8(2)
Thr					0,9(1)		1,8(2)	0,9(1)				0,9(1)			
Ser	3,0(3)	2,0(2)	1,0(1)	3,0(3)	7,0(7)	2,0(2)	2,0(2)	1,2(1)	0,9(1)	1,0(1)	4,0(1)	5,0(5) 2,9(3)	0,9(1) 2,0(2) 2,1(2)	3,0(3) 1,0(1)	
Glu							4,0(4)								
Pro	2,1(2)						2,2(2)				2,0(2)	2,0(2)	0,9(1)		
Gly			1,0(1)		1,0(1)	3,1(3)	2,2(2)	2,0(2)	2,0(2)		3,2(3)	2,0(2)	0,9(1)	2,0(2)	
Ala						2,0(2)	5,0(5)	3,0(3)	2,0(2)		5,0(5)	2,0(2)	0,7(1)	1,1(1)	1,0(1)
Val						0,9(1)	4,8(5)	1,0(1)	1,0(1)		2,1(2)	0,6(1)	0,7(1)	0,9(1)	0,8(1)
Met							0,9(1)					1,8(2)	1,1(1)		1,9(2)
Ile	2,1(2)	1,0(1)			0,9(1)	1,0(1)	4,9(5)	1,1(1)	1,0(1)		3,6(4)		0,8(1)		2,1(2)
Leu	1,0(1)				2,1(2)	4,9(5)	4,1(4)				3,2(3)				
Tyr						0,8(1)	0,7(1)								
Phe							1,0(1)								
His							1,0(1)								
Lys	4,2(1)				0,9(1)	1,8(2)	3,0(3)		1,3(1)	1,1(1)	0,9(1)	4,2(2)	2,2(2)		0,8(1)
Trp *															1,0(1)
Arg					1,8(2)	1,9(2)		12	1,4(1)	3	1,3(1)	4,2(1)	1,1(1)	42	1,8(2)
Общее количество остатков	10	5	2	15	13	28	45		7	3	31	22	40	12	12
N-Концевая аминокислота	Lys	Leu	Ala	Ala	Ile	Leu	Ile	Ser	Ser	Ile	Val	Arg	Arg	Ile	Leu

* Количество не определяется.

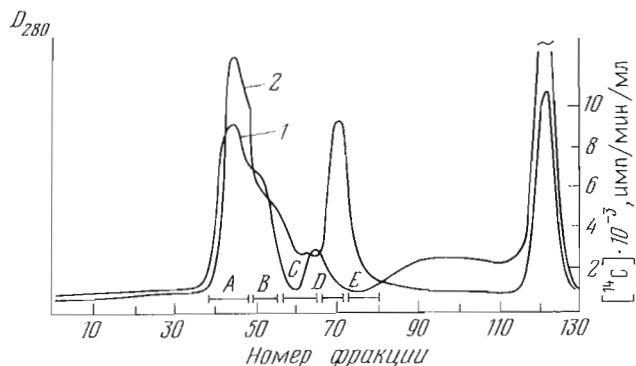


Рис. 1. Гель-фильтрация продуктов гидролиза смеси фрагментов T₃ и T₄ стафилококковой глутаминовой протеиназой на колонке (2,5×200 см) с сефадексом G-25, уравновешенным буфером 10 мМ трис-HCl (pH 9,0), содержащим 7 М мочевины. Скорость элюирования 6 мл/ч, объем фракций 6 мл. 1 – поглощение при 280 нм, 2 – радиоактивность

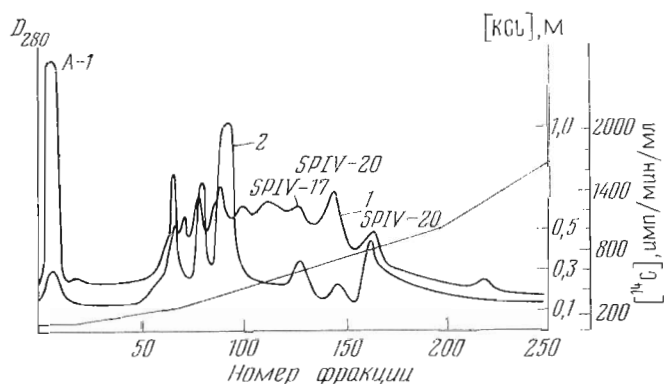


Рис. 2. Хроматография фракции A (рис. 1) на колонке (1×35 см) с QAE-сефадексом A-25 в буфере 0,01 М трис-HCl (pH 9,0), содержащем 7 М мочевины, в градиенте концентрации KCl. Скорость элюирования 8 мл/ч, объем фракций 4 мл. 1 – поглощение при 280 нм, 2 – радиоактивность

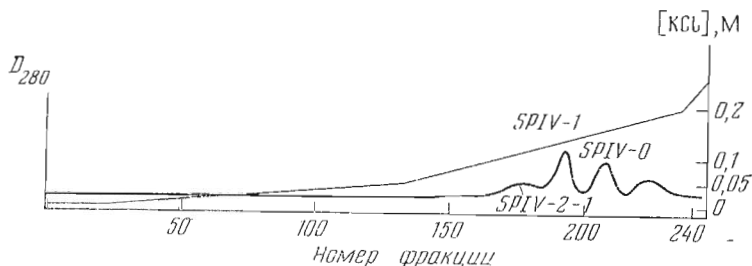


Рис. 3. Хроматография фракции A-1 (см. рис. 2) на колонке (1×20 см) с SP-сефадексом C-25 в буфере 0,5 мМ формиата калия (pH 3,0), содержащем 7 М мочевины, в градиенте концентрации KCl. Скорость элюирования 8 мл/ч, объем фракций 4 мл

сефадексе (рис. 2). В результате были выделены в чистом виде пептиды SPIV-20 и SPIV-17, которые содержали радиоактивную метку, и фракция A-1, которая не сорбировалась на QAE-сефадексе. Для разделения этой фракции использовали хроматографию на SP-сефадексе (рис. 3). При этом в чистом виде были выделены три пептида – SPIV-1, SPIV-2-1 и SPIV-0.

Разделение фракции B также проводили на колонке с QAE-сефадексом в градиенте концентрации KCl. В чистом виде были выделены следующие пептиды: SPIV-18-1, SPIV-24, SPIV-21, SPIV-2-2, SPIV-12, SPIV-9-16, SPIV-5. Необходимо отметить, что иногда один и тот же пептид элюиро-

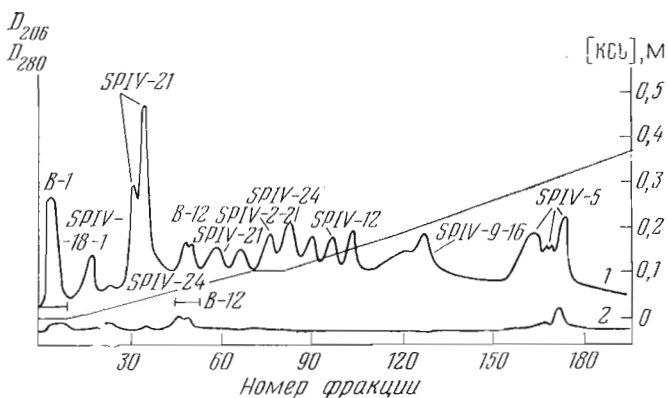


Рис. 4. Хроматография фракции *B* на колонке (1×12 см) с QAE-сефадексом А-25 в буфере 10 мМ трис-НСl (рН 9,0), содержащем 7 М мочевины, в градиенте концентрации КСl. Скорость элюирования 8 мл/ч. Объем фракций 8 мл. 1 — D_{206} , 2 — D_{280}

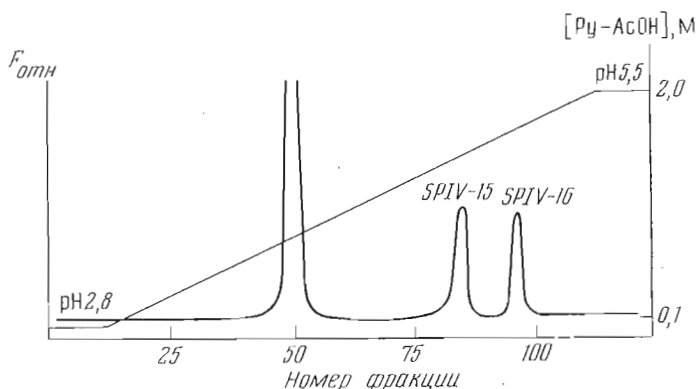


Рис. 5. Высокоэффективная хроматография фракции *B-1* на колонке (0,6×40 см) с хромобедсом (тип Р) в градиенте концентрации (0,1–2,0 М) пиридин-ацетата и рН (2,8–5,5). Скорость элюирования 20 мл/ч, объем фракций 1 мл

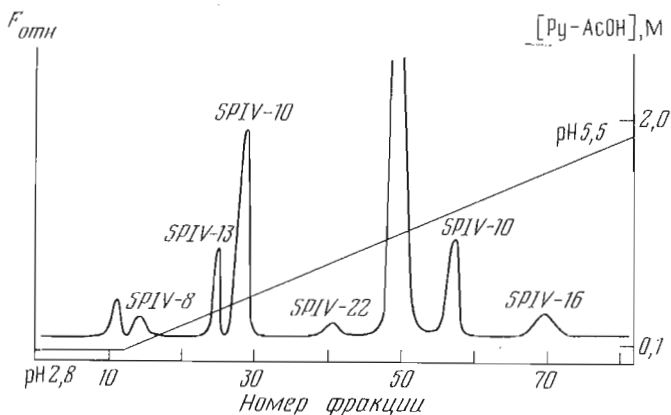


Рис. 6. Высокоэффективная хроматография фракции *C* на колонке (0,6×40 см) с хромобедсом (тип Р). Условия разделения аналогичны разделению на рис. 5

вался при разных концентрациях КСl (рис. 4). Фракция *B-1*, которая не сорбировалась на QAE-сефадексе, далее разделялась с помощью высокоэффективной хроматографии на ионообменной смоле Chromobeads Type Р (рис. 5). При этом в чистом виде были выделены пептиды SPIV-16 и SPIV-15.

Интересно, что фракцию В-12 (рис. 4) удалось разделить при подготовке лиофильно высушенного материала к хроматографии на ионообменной смоле. При растворении этой фракции в 0,1 М пиридин-ацетатном буфере (рН 2,8) образовался осадок. Исследование полученного осадка и надосадочной жидкости показало, что осадок представляет собой пептид SPIV-4, а в надосадочной жидкости находится чистый пептид SPIV-21.

Для разделения фракции С также была применена высокоэффективная хроматография на ионообменной смоле (рис. 6). В результате в чистом виде были выделены пептиды SPIV-8, SPIV-13, SPIV-10, SPIV-22 и SPIV-16. Интересно, что пептид SPIV-10 элюировался при двух разных концентрациях пиридин-ацетатного буфера (рис. 6).

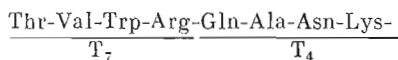
Полное разделение фракций D и E, предварительно обессоленных на колонке с сефадексом G-25, осуществляли двумерной техникой в тонком слое целлюлозы. При этом из фракции D получили в чистом виде пептиды SPIV-8-1, SPIV-8-2, SPIV-6, SPIV-18-2, SPIV-10, SPIV-23, SPIV-3 и SPIV-13, а из фракции E — пептиды SPIV-19, SPIV-8-1, SPIV-8-2, SPIV-14, SPIV-6, SPIV-9, SPIV-11 и SPIV-7.

Чистоту всех полученных пептидов контролировали определением N-концевых аминокислот дансильным методом.

В результате всех вышеуказанных разделений в чистом виде было выделено 30 пептидов. Для характеристики полученных пептидов определяли их N-концевые аминокислотные остатки, устанавливали аминокислотный состав, а также наличие остатков триптофана (с помощью реактива Эрлиха). Полученные данные представлены в табл. 1. Аминокислотные последовательности почти всех пептидов определяли ручным вариантом метода Эдмана (в дансильной модификации). N-Концевая аминокислотная последовательность пептида SPIV-20 определялась автоматическим методом Эдмана. Ковалентное связывание пептида с носителем осуществляли дипротиоцианатным методом через ε-аминогруппы остатков лизина данного пептида. Для подтверждения данных автоматической деградации пептид SPIV-20 повторно подвергался деградации с использованием окрашенного реагента Эдмана (DABITC). Этим же реагентом определяли N-концевые аминокислотные последовательности пептидов SPIV-4, SPIV-16, SPIV-24, SPIV-21.

Определение структуры нескольких больших пептидов осуществляли путем сопоставления их N-концевой последовательности, данных, полученных при их энзиматическом расщеплении, и структуры перекрывающихся пептидов бромцианового расщепления G-фактора (структуры последних приведены в работах [1, 4]). Аминокислотные последовательности исследованных пептидов представлены в табл. 2. Все пептиды пронумерованы по порядку их расположения в первичной структуре фрагмента T₄.

Пептид SPIV-0. В результате определения N-концевой аминокислотной последовательности оказалось, что этот пептид охватывает C-концевую часть фрагмента T₇ и N-концевую последовательность фрагмента T₄. При этом дополнительно удалось подтвердить тот факт, что при ограниченном трипсинолизе G-фактора между фрагментами T₇ и T₄ происходит точечный разрыв и между ними нет вставок. N-концевой треонин и последующие три аминокислотных остатка являются C-концевыми аминокислотными остатками фрагмента T₇, за которыми следуют аминокислотные остатки N-концевой части фрагмента T₄.



Пептид SPIV-1. N-Концевая аминокислотная последовательность пептида полностью соответствовала ранее установленной N-концевой последовательности фрагмента T₄ (схема 1). Для установления аминокислотной последовательности пептид подвергали гидролизу химотрипсином. Полученные продукты были разделены двумерной техникой на пластинках с тонким слоем целлюлозы. Определение аминокислотных последовательностей полученных пептидов показало, что пептид SPIV-1-Ch-3 дает

Аминокислотная последовательность пептидов, полученных при гидролизе фрагмента T₄ протениназой из *Staphylococcus aureus*

Пептид	Аминокислотная последовательность
SPIV-0	Thr-Val-Trp-Arg-Gln-Ala-Asn-Lys-(Tyr-Lys-Val-Pro-Arg-Ile-Ala-Phe-Val-Asn-Lys-Met-Asp-Arg-Met-Gly-Ala-Asn-Phe-Leu-Lys-Val-Val-Asn-Gln-Ile-Lys-Thr-Arg-Leu-Gly-Ala-Asn-Pro-Val-Pro-Leu-Gln-Leu-Ala-Ile-Gly-Ala-Glu-Glu) *
SPIV-1	Gln-Ala-Asn-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Arg-Ile-Ala-Phe-Val-Asn-Lys-Met-Asp-Arg-Met-Gly-Ala-Asn-Phe-Leu-Lys-Val-(Val-Asn-Gln-Ile-Lys-Thr-Arg-Leu-Gly-Ala-Asn-Pro-Val-Pro-Leu-Gln-Leu-Ala-Ile-Glu-Glu) *
SPIV-2-1	Gln-Ala-Asn-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Arg-Ile-Ala-Phe-Val-Asn-Lys-Met-Asp-Arg-Met-Gly-Ala-Asn-Phe-Leu-Lys-Val-Val-Asn-Gln-Ile-Lys-Thr-Arg-Leu-Gly
SPIV-2-2	Ala-Asn-Pro-Val-Pro-Leu-Gln-Leu-Ala-Ile-Gly-Ala-Glu-Glu
SPIV-3	His-Phe-Thr-Gly-Val-Val-Asp
SPIV-4	Leu-Val-Lys-Met-Lys-Ala-Ile-Asn-Trp-Asn-Asp-(Ala-Asp-Gln-Gly-Val-Thr-Phe-Glu) *
SPIV-5	Tyr-Glu-Asp-Ile-Pro-Ala-Asp-Met-Val-Glu
SPIV-6	Leu-Ala-Asn-Glu
SPIV-7	Trp-His-Gln-Asn-Leu-Ile-Glu
SPIV-8	Ser-Ala-Ala-Glu-Ala-Ser-Glu-Glu
SPIV-8-1	Ser-Ala-Ala-Glu
SPIV-8-2	Ala-Ser-Glu-Glu
SPIV-9	Leu-Met-Glu
SPIV-10	Lys-Tyr-Leu-Gly-Gly-Glu-Glu
SPIV-11	Leu-Thr-Glu
SPIV-12	Lys-Tyr-Leu-Gly-Gly-Glu-Glu-Leu-Thr-Glu
SPIV-13	Leu-Thr-Glu-Ala-Glu
SPIV-14	Ala-Glu
SPIV-15	Ala-Glu-Ile-Lys-Gly-Ala-Leu-Arg-Gln-Arg-Val-Leu-Asn-Asn-Glu
SPIV-16	Ile-Lys-Gly-Ala-Leu-Arg-Gln-Arg-Val-Leu-Asn-Asn-(Glu)
SPIV-9-16	Leu-Met-Glu-Lys-Tyr-Leu-Gly-Gly-Glu-Glu-(Leu-Thr-Glu-Ala-Glu-Ile-Lys-Gly-Ala-Leu-Arg-Gln-Arg-Val-Leu-Asn-Asn-Glu)
SPIV-17	Ile-Ile-Leu-Val-Thr-(Cys-Gly-Ser-Ala-Phe-Lys-Asn-Lys-Gly-Val-Gln-Ala-Met-Leu-Asp-Ala-Val-Ile-Asp-Tyr-Leu-Pro-Ser-Pro-Val-Asp-Val-Pro-Ala-Ile-Asp-Cys-Ile-Leu-Lys-Asp-Thr-Pro-Ala-Glu) *
SPIV-18-1	Ser-Gly-Val-Val-Asn-Ser-Gly-Asp-Thr-Val-Leu-Asn
SPIV-18-2	Ser-Val-Lys-Ala-Ala-Arg-Glu
SPIV-19	Ile-Lys-Glu
SPIV-20	Val-Arg-Ala-Gly-Asp-Ile-Ala-Ala-Ala-Ile-Gly-Leu-Lys-Asp-Val-Thr-Thr-Gly-Asp-Cys-Leu-Cys-Asp-Pro-Asp-Ala-Pro-Ile-Ile-Leu-Glu
SPIV-21	Arg-Met-Glu-Phe-Pro-Glu-Pro-Val-Ile-Ser-Ile-Ala-Val-(Glu-Pro-Lys-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Glu) *
SPIV-22	Arg-Met-Glu-Phe-Pro-Glu-Pro-Val-Ile-Ser
SPIV-23	Ile-Ala-Val-Glu-Pro-Lys-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Glu
SPIV-24	Leu-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Val-Asp-(Arg-Met-Lys-Arg) *

→ — здесь и далее определение аминокислотной последовательности ручным вариантом метода Эдмана (в дансильной модификации).

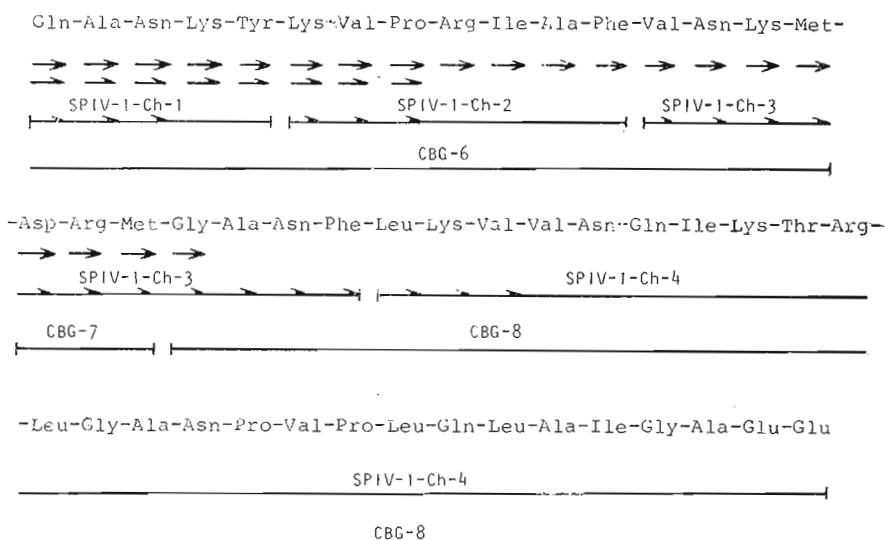
— — определение аминокислотной последовательности реагентом ДАВИТС.

→ — определение аминокислотной последовательности автоматическим методом.

* В скобках показана аминокислотная последовательность, которая на данном пептиде не устанавливалась.

Схема 1

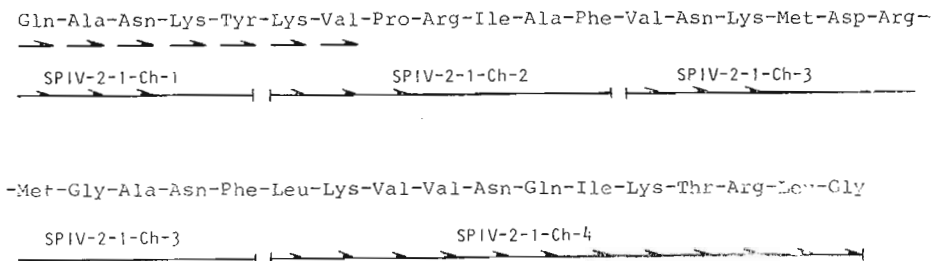
Исследование структуры пептида SPIV-1



→ — последовательность, установленная автоматическим методом Эдмана на фрагменте T₄ [2].
 Ch — пептиды химотриптического гидролиза.
 CBG — пептиды бромцианового расщепления фактора EF-G [1].

Схема 2

Исследование структуры пептида SPIV-2-1



возможность соединить между собой три бромциановых пептида — CBG-6, CBG-7 и CBG-8 [1] в порядке, указанном на схеме 1.

Пептид SPIV-2-1. N-Концевую последовательность первых семи аминокислотных остатков определили ручным вариантом метода Эдмана. Полученные результаты показали, что данный пептид, так же как и пептид SPIV-1, относится к N-концевой части фрагмента T₄, но по данным аминокислотного анализа оба пептида отличались. Пептид SPIV-2-1 был гидролизован химотрипсином и после разделения полученного гидролизата двумерной техникой на пластинках с тонким слоем целлюлозы были выделены четыре пептида (схема 2). При установлении их аминокислотных последовательностей оказалось, что пептид SPIV-2-1-Ch-4, являющийся C-концевым участком пептида SPIV-2-1, имеет следующую последовательность: -Arg-Leu-Gly (схема 2). Таким образом, пептид SPIV-2-1 является продуктом неспецифического расщепления связи Gly-Ala в пептиде SPIV-1 (схема 1) стафилококковой глутаминовой протеиназой.

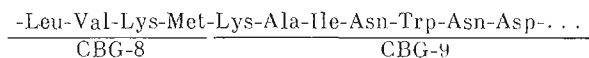
Пептид SPIV-2-2. При определении аминокислотной последовательности ручным методом Эдмана установили, что пептид является C-концевой частью пептида SPIV-1 и вместе с пептидом SPIV-2-1 образует пептид SPIV-1.

Пептид SPIV-3. Данные аминокислотного анализа показали, что пептид не содержит остатков глутаминовой кислоты. В результате определе-

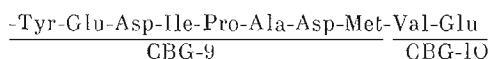
ния аминокислотной последовательности было показано, что С-концевым аминокислотным остатком данного пептида является остаток аспарагиновой кислоты. Таким образом, обнаружили еще одну неустойчивую к действию стафилококковой глутаминовой протеиназы связь Asp-Leu (бромциановый пептид CBG-8 [1]).

Пептид SPIV-4. Пептид также образуется в результате неспецифического гидролиза пептидной связи Asp-Leu. Согласно качественной реакции Эрлиха, этот пептид содержал остаток триптофана, а по данным аминокислотного анализа — остаток метионина.

На основании данных, полученных при установлении N-концевой последовательности пептида SPIV-4 (используя для деградации пептида DAVITC), удалось соединить между собой бромциановые пептиды CBG-8 и CBG-9:



Пептид SPIV-5. По данным аминокислотного анализа, пептид содержит остаток метионина. Установление аминокислотной последовательности пептида позволило соединить между собой бромциановые пептиды CBG-9 и CBG-10:



При этом обнаружили полную устойчивость к действию стафилококковой протеиназы связи Glu-Asp.

Пептид SPIV-6. Последовательность 4-членного пептида определена методом Эдмана (в дансильной модификации).

Пептид SPIV-7. При определении последовательности пептида ручным методом Эдмана в дансильной модификации не удалось установить N-концевую аминокислоту. Обработка пептида реагентом Эрлиха показала, что пептид содержит остаток триптофана. При определении структуры с идентификацией аминокислотных остатков в виде фенилтиогидантоинов аминокислот установили, что триптофан является N-концевой аминокислотой.

Пептиды SPIV-8, SPIV-8-1 и SPIV-8-2. Аминокислотную последовательность этих пептидов определили ручным методом Эдмана (в дансильной модификации). При этом оказалось, что пептид SPIV-8 состоит из пептидов SPIV-8-1 и SPIV-8-2.

Пептиды SPIV-9, SPIV-10, SPIV-11, SPIV-12, SPIV-13, SPIV-14. Первичная структура этих пептидов была полностью установлена ручным методом Эдмана (в дансильной модификации). Из полученных данных следовало, что пептид SPIV-12 состоит из пептидов SPIV-10 и SPIV-11, а пептид SPIV-13 перекрывает пептиды SPIV-12 и SPIV-14.

Пептид SPIV-15. Ручным методом Эдмана удалось установить аминокислотную последовательность 10 N-концевых аминокислотных остатков пептида, за исключением 6-го и 8-го остатков. Для установления полной структуры пептид был гидролизован трипсином и хмотрипсином. Полученные смеси пептидов были разделены двумерной техникой в тонком слое целлюлозы.

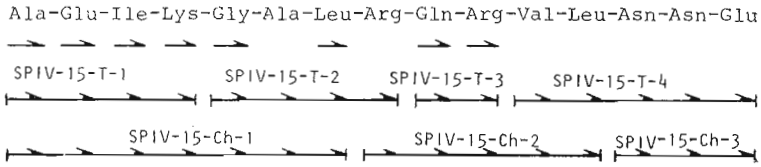
Данные, полученные при исследовании структуры всех этих пептидов, позволили установить полную аминокислотную последовательность исследуемого пептида SPIV-15 (схема 3).

Пептид SPIV-16. Аминокислотную последовательность пептида исследовали, используя для деградации DAVITC. При этом удалось установить все аминокислотные остатки, кроме последнего. Оказалось, что пептид SPIV-16 представляет собой пептид SPIV-15, укороченный с N-конца на два аминокислотных остатка, т. е. на пептид SPIV-14.

Пептид SPIV-9-16. По данным аминокислотного анализа, исследуемый пептид содержит остаток метионина. Ручным методом Эдмана определили первые 10 аминокислотных остатков пептида. Остаток метионина оказался вторым. Для установления полной аминокислотной последовательности

Схема 3

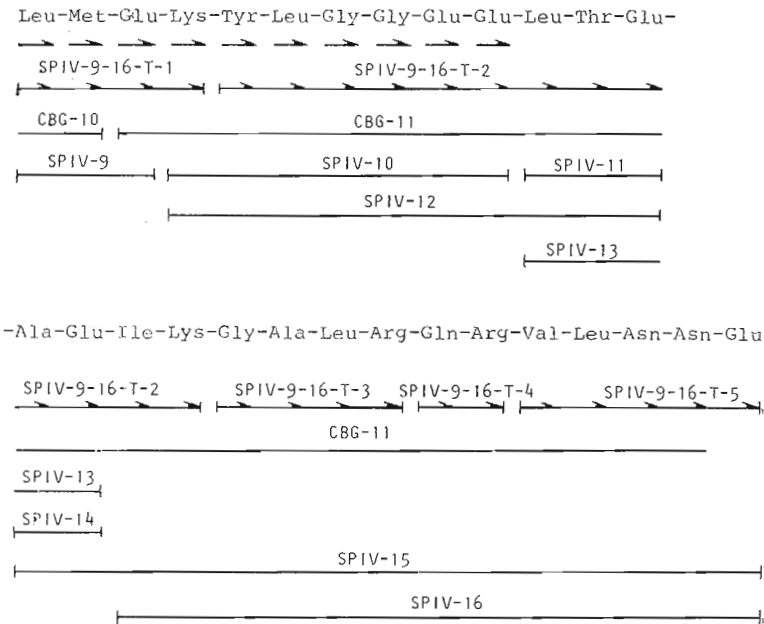
Исследование структуры пептида SPIV-15



T - пептиды триптического гидролиза.

Схема 4

Исследование структуры пептида SPIV-9-16

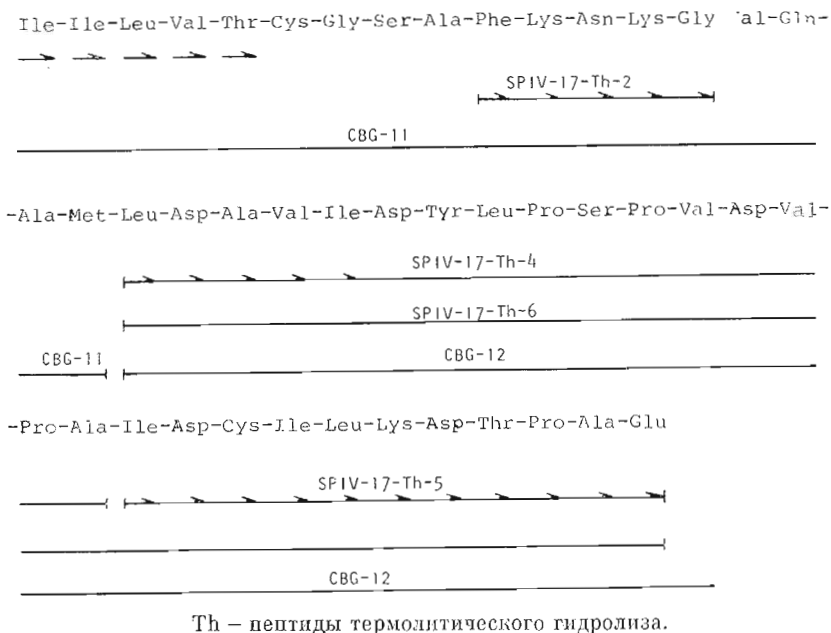


пептида SPIV-9-16 удачным оказалось использование триптического гидролиза. После разделения полученной смеси пептидов методом высокоэффективной ионообменной хроматографии были выделены пептиды SPIV-9-16-T-1 - SPIV-9-16-T-5 (схема 4). Анализ их аминокислотных последовательностей ручным методом Эдмана (в дансильной модификации) показал, что данные пептиды объединяют в одну полипептидную цепь (SPIV-9-16-T-2) или входят в состав (SPIV-9-16-T-1, SPIV-9-16-T-3, SPIV-9-16-T-4 и SPIV-9-16-T-5) ранее исследованных пептидов SPIV-9 - SPIV-16 (схема 4). Сопоставление полученных результатов позволило установить структуру пептида SPIV-9-16. Из аминокислотной последовательности видно, что данный пептид образовался в результате неполного расщепления стафилококковой протеиназой связей Glu-Lys, Glu-Leu, Glu-Ala и Glu-Ile. Исследуемый пептид SPIV-9-16, так же как пептид SPIV-9, дал возможность соединить между собой бромциановые пептиды CBG-10 и CBG-11 (схема 4).

Пептид SPIV-17. По данным аминокислотного анализа, пептид содержит остаток метионина, а также два остатка цистеина. Исследование N-концевой аминокислотной последовательности ручным методом Эдмана вместе с результатами, полученными при гидролизе пептида термолизином, показало, что пептид содержит участок фрагмента T₄, ранее исследованный на триптическом пептиде SPIV-11 [5] и бромциановых пептидах CBG-11 и CBG-12 [4]. Исследуемый нами пептид SPIV-17, так же как

Схема 5

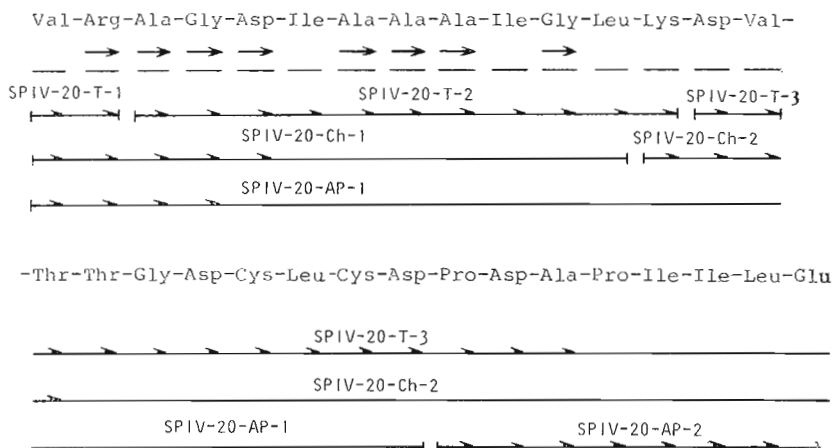
Исследование структуры пептида SPIV-17



Th – пептиды термолитического гидролиза.

Схема 6

Исследование структуры пептида SPIV-20



AP – пептиды, полученные при расщеплении по связи Asp-Pro.

пептид LTIV-11, перекрывает упомянутые бромциановые пептиды G-фактора CBG-11 и CBG-12 (схема 5).

Пептиды SPIV-18-1 и SPIV-18-2. Данные пептиды были выделены с очень низким выходом. Несмотря на небольшое количество вещества, аминокислотные последовательности пептидов установили полностью, используя метод Эдмана в дапсилльной модификации. После установления структуры пептидов и сопоставления ее со структурой бромцианового пептида CBG-12 [4] оказалось, что данные пептиды являются фрагментами пептида CBG-12, образовавшимися в результате неспецифического расщепления стафилококковой глутаминовой протеиназой связей Tyr-Ser и Asn-Ser [4]. Этим частичным неспецифическим гидролизом вышеуказанных связей и можно объяснить низкие выходы обоих пептидов.

Пептид SPIV-19. Пептид содержит три аминокислотных остатка, последовательность которых установили ручным методом Эдмана.

Пептид SPIV-20. По данным аминокислотного анализа, пептид содержит остаток лизина. Поэтому для определения N-концевой последовательности использовали автоматический твердофазный метод Эдмана (ковалентное связывание пептида с носителем проводили через ε-аминогруппу лизина). Таким образом, удалось установить последовательность первых 11 аминокислотных остатков, кроме остатков 6 и 10. Для подтверждения полученных данных пептид подвергли деградации с использованием DABITC; при этом удалось установить последовательность 15 аминокислотных остатков.

Для определения полной структуры пептид был подвергнут гидролизу трипсином и химотрипсином. Триптический гидролизат разделили гель-фильтрацией на сефадексе G-25, а химотриптический гидролизат — думерной техникой в тонком слое целлюлозы. Разделение смеси пептидов в обоих случаях дало довольно большие C-концевые фрагменты исследуемого пептида (схема 6). Структура триптических пептидов SPIV-20-T-1 и SPIV-20-T-2 была установлена полностью, а для пептида SPIV-20-T-3 удалось установить последовательность 13 аминокислотных остатков. При этом не удалось идентифицировать аминокислотный остаток в 7-м положении.

При гидролизе пептида SPIV-20 химотрипсином получили только два пептида. Как оказалось, в данных условиях к действию химотрипсина оказались устойчивыми связи Leu-Cys и Leu-Glu. Исследование продуктов вышеупомянутых гидролизом позволило установить аминокислотную последовательность пептида SPIV-20 до 26-го остатка включительно, кроме остатка в положении 20. При исследовании аминокислотной последовательности пептида CBG-13, полученного в результате бромцианового расщепления G-фактора [4], оказалось, что в этом положении находится остаток цистеина, образующий S-S-связь в молекуле G-фактора.

В пептиде была обнаружена связь Asp-Pro, и поэтому для установления структуры C-концевой части пептид был подвергнут кислотному гидролизу по связи Asp-Pro. Полученный гидролизат разделялся методом гель-фильтрации на сефадексе G-15. Исследование аминокислотной последовательности пептида SPIV-20-AP-2 позволило определить полную структуру пептида SPIV-20 (схема 6).

Пептид SPIV-21. Структуру пептида изучали с использованием реагента DABITC. Так как установленная аминокислотная последовательность первых 13 аминокислотных остатков совпала с N-концевой частью уже известного пептида CBG-4 бромцианового расщепления G-фактора [1], полную структуру пептида SPIV-21 не было необходимости определять.

Пептид SPIV-22 и SPIV-23. Аминокислотную последовательность пептидов установили ручным методом Эдмана. При этом оказалось, что пептиды являются продуктами неспецифического гидролиза стафилококковой протеиназой связи Ser-Pe в пептиде SPIV-21.

Пептид SPIV-24. По данным аминокислотного анализа, пептид содержит остаток метионина. Исследуя аминокислотную последовательность пептида ручным методом Эдмана, а также с помощью реагента DABITC, установили последовательность восьми аминокислотных остатков. Для данного пептида не удалось установить C-концевую последовательность (Arg-Met-Lys-Arg) и тем самым не было получено очень важное перекрытие между бромциановыми пептидами CBG-16 и CBG-17. Это перекрытие было получено при исследовании структуры продуктов кислотного гидролиза G-фактора по связям Asp-Pro [4].

Таким образом, структура исследованных пептидов, выделенных после расщепления фрагмента T₄ стафилококковой глутаминовой протеиназой, охватила около 76% всей структуры фрагмента T₄. При этом удалось объединить между собой в одну полипептидную цепь семь из 12 бромциановых пептидов G-фактора, входящих в состав фрагмента T₄.

Экспериментальная часть

В работе использовали: сефадексы G-10, G-15, G-25, QAE A-25 (Pharmacia, Швеция), катионообменную смолу Chromobeads, тип P (Technicon, Ирландия), стафилококковую глутаминовую протеиназу (Miles Lab. Англия), трипсин (Worthington, США), химотрипсин (Worthington, США), I-[¹⁴C]CH₂CONH₂ (Amersham, Англия), целлюлозу для ТСХ № 300 (Whatman, Англия), силикагель КСК с размером частиц 5–7 мк (СССР), полиамидные пластинки (BDH, Англия), Dns-Cl (Pierce, США), β-меркаптоэтанол (Serva, ФРГ), реактивы для автоматического метода Эдмана и аминокислот (Beckman, США). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Аминокислотный состав пептидов определяли как описано в работе [4].

Определение N-концевых аминокислот дансильным методом проводили по методу, описанному в работе [6]. Идентификацию Dns-производных аминокислот проводили двумерной тонкослойной хроматографией на пластинках (5×5 см) с закрепленным слоем силикагеля [7, 8] или на полиамидных пластинках (3×3 см) [9].

Установление аминокислотной последовательности в пептидах проводили методом Эдмана (дансильная модификация) по стандартной методике [10, 11] с изменениями, описанными нами ранее [4].

Дегградацию пептидов с использованием реагента DABITC осуществляли по методу [12]. Для идентификации DABITC-аминокислот использовали полиамидные пластинки размерами 2×2 см (BDH, Англия).

Автоматическое определение N-концевой последовательности пептида SPIV-20 проводили на твердофазном секвенаторе модели APS-240 (Rank Hilger, Англия). Ковалентное связывание пептида с носителем осуществляли диизотиоцианатным методом [13] через ε-аминогруппу лизина. Для дегградации использовали 100 нмоль пептида. Идентификацию отщепленных фенилтиогидантоинов аминокислот осуществляли тонкослойной хроматографией на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Fluka, Швейцария).

Идентификация амидов глутаминовой и аспарагиновой аминокислот проводилась по методу, описанному в работах [1, 14].

Препаративное разделение пептидов двумерной техникой. Для разделения гетерогенных фракций использовали пластинки с тонким слоем целлюлозы. 20 нмоль обессоленной смеси пептидов растворяли в 50 мкл 75% муравьиной кислоты и наносили на пластинку размерами 20×20 см полосой 1 см. В первом направлении проводили электрофорез при напряжении 1000 В в течение 1 ч в системе пиридин — уксусная кислота — вода (1 : 10 : 89), рН 3,6, во втором — хроматографию в системе *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода (1 : 1 : 1 : 1), рН 5,4. Пластинки проявляли 5% (по объему) раствором пиридина в ацетоне [15] с последующим опрыскиванием 3·10⁻³% раствором флуорескамина (Pierce, США) в ацетоне. Целлюлозу с флуорескамин-положительными пятнами снимали с пластинки, элюировали 75% муравьиной кислотой и переносили в полиэтиленовую ампулу, добавляли 150 мкл 75% муравьиной кислоты и суспендировали на вибротряске. Через 1 ч ампулы центрифугировали (5 мин, 5000 об/мин) и раствор осторожно отбирали капилляром из ампулы. Элюирование проводили трижды. Объединенный элюат высушивали, растворяли в 200 мкл деионизованной воды и использовали для ручной дегградации по Эдману (дансильная модификация). При этом отбирали аликвоту для аминокислотного анализа.

Гидролиз стафилококковой глутаминовой протеиназой смеси фрагментов T₃ и T₁. 100 мг фрагментов растворяли в 98 мл 0,1 М раствора NH₄НСО₃ (рН 8,1), содержащего 5 мМ β-меркаптоэтанол, и добавляли 2 мг фермента. Гидролиз проводили 20 ч при 37°С при тщательном перемешивании. После обессоливания гидролизат карбоксиметилировали.

Карбоксиметилирование продуктов гидролиза фрагментов T₃ и T₁ стафилококковой глутаминовой протеиназой. После гидролиза стафилококковой глутаминовой протеиназой полученный гидролизат был растворен в темной склянке в 20 мл 0,1 М трис-НСl (рН 8,1), содержащего 7 М моче-

вину и 5 мМ β-меркаптоэтанол. К раствору добавили 185 мг (1 мМ) ICH₂CONH₂ и 5 мМ I-[¹⁴C]CH₂CONH₂ (уд. акт. 52 мКи/мм и 185 мг сухого трис-НСl).

Карбоксиметилирование проводили в течение 30 мин при 20° С, поддерживая рН среды ~8,1—8,3. Затем добавляли 350 мкл β-меркаптоэтанола и полученный раствор наносили на затемненную колонку с сефадексом G-25, уравновешенным буфером 0,02 М трис-НСl (рН 9,0), содержащим 7 М мочевины (см. рис. 1).

Расщепление пептида SPIV-20 по связи Asp-Pro проводили как описано в работе [16]. 100 нмоль пептида растворяли в 400 мкл 90% муравьиной кислоты и выдерживали при 37° С в течение 24 ч. Затем реакционную смесь разделяли гель-фильтрацией на колонке (1×190 см) с сефадексом G-25 в 0,01 н. НСl.

Триптический гидролиз пептидов SPIV-15, SPIV-9-16 и SPIV-20. 100 нмоль пептида в 400 мкл 0,1 М NH₄HCO₃ (рН 8,1) инкубировали с трипсином при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу) в течение 12 ч при 37° С. Трипсин добавляли двумя равными порциями с интервалом 1 ч. По окончании гидролиза триптический гидролизат пептида SPIV-15 лиофильно высушивали и разделяли двумерной техникой на тонком слое целлюлозы. Триптический гидролизат пептида SPIV-9-16 разделяли высокоэффективной хроматографией на колонке (0,6×40 см) с хромобедом (тип Р), а гидролизат пептида SPIV-20 — гель-фильтрацией на колонке (1×180 см) с сефадексом G-15 в 0,01 н. НСl (скорость элюирования 2,5 мл/ч).

Химотриптический гидролиз пептидов SPIV-1, SPIV-2-1, SPIV-15 и SPIV-20. К раствору 100 нмоль пептида в 400 мкл 0,1 М NH₄HCO₃ (рН 8,1) добавляли химотрипсин при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 и инкубировали при 37° С в течение 4 ч. Полученный химотриптический гидролизат лиофильно высушивали, растворяли в 75% муравьиной кислоте, разделяли двумерной техникой на тонком слое целлюлозы.

Высокоэффективная хроматография пептидных фракций В-О, С и триптического гидролизата пептида SPIV-9-16 на ионообменной смоле (Chromobeads), тип Р. При хроматографии использовали колонку размером 0,6×40 см. Элюирование пептидов проводили со скоростью 20 мл/ч при 45° С в градиенте концентрации пиридин-ацетата и рН: 0,1 М пиридин-ацетат, рН 2,8 (15 мл); 0,1 М пиридин-ацетат, рН 2,8 (50 мл), 2 М пиридин-ацетат, рН 5,5 (50 мл); 2 М пиридин-ацетат, рН 5,5 (15 мл). Объем фракций 1 мл. При нанесении лиофильно высушенную пептидную фракцию растворяли в 1 мл 0,002 М пиридин-ацетатного буфера (рН 2,0).

Детектирование пептидов осуществляли по методу [17], как описано нами в статье [5].

Авторы выражают благодарность руководителю работы академику Ю. А. Овчинникову за постоянную помощь и ценные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алахов Ю. Б., Бундуле М. А., Бундулис Ю. П., Винокуров Л. М., Козлов В. П., Мотуз Л. П. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 3, с. 304—314.
2. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1333—1345.
3. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1301—1313.
4. Овчинников Ю. А., Алахов Ю. Б., Бундулис Ю. П., Бундуле М. А., Винокуров Л. М., Мотуз Л. П., Козлов В. П. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 3, с. 343—357.
5. Алахов Ю. Б., Бундуле М. А., Бундулис Ю. П., Винокуров Л. М., Козлов В. П. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 2, с. 330—342.
6. Gray W. R. In: Methods in Enzymol. / Ed. Hirs C. H. W. New York — London: Acad. Press, 1967, v. XI, p. 139—150.
7. Бельский Б. Г., Ганкина Е. С., Прляшников С. Р., Эрстов Д. П. Молекулярн. биология, 1967, т. 1, с. 184—189.
8. Бельский Б. Г., Ганкина Е. С., Нестеров В. В. Докл. АН СССР, 1967, т. 172, с. 91—93.
9. Woods K. R., Wang K. T. Biochim. et biophys. acta, 1967, v. 133, p. 369—370.
10. Gray W. R., Hartley B. S. Biochem. J., 1963, v. 89, p. 379—380.

11. Bruton C. J., Hartley B. S. J. Mol. Biol., 1970, v. 52, p. 165-178.
12. Chang I. Y., Brauer D., Wittmann-Liebold B. FEBS Lett., 1978, v. 93, p. 205-214.
13. Laursen R. A., Horn M. G., Bonner A. G. FEBS Lett., 1972, v. 21, p. 67-70.
14. Roseau G., Pantel R. J. Chromatogr., 1969, v. 44, p. 392-395.
15. Nierhaus K. N., Montejó V. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, v. 70, p. 1931-1935.
16. Landon M. In: Methods in Enzymol./Ed. Hirs C. H. W. New York - London: Acad. Press, 1977, v. XLVII, p. 145-149.
17. Creaser F. H., Hughes G. J. J. Chromatogr., 1977, v. 144, p. 69-75.

Поступила в редакцию
19.VIII.1982

**PRIMARY STRUCTURE OF THE ELONGATION FACTOR G FROM
ESCHERICHIA COLI. VII. STUDY OF PEPTIDES OBTAINED AT
HYDROLYSIS OF FRAGMENT T₄ BY GLUTAMIC PROTEASE FROM
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

ALAKHOV Yu. B., BUNDULE M. A., BUNDULIS Yu. P.,
VINOKUROV L. M., KOZLOV V. P.

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

For fragment T₄, obtained on limited trypsinolysis of the G-factor, the amino acid sequence embracing 76% of its structure has been determined by analysis of peptides resulting from the fragment T₄ cleavage with staphylococcal glutamic protease. These data permitted to assemble into one polypeptide chain 7 out of 12 earlier characterized cyanogen bromide peptides contained in the fragment T₄.