



УДК 547.962.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ 6
ИЗ *ESCHERICHIA COLI*VIII*. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ПЕПТИДОВ ТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗА,
ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ ФРАГМЕНТА T₃ ОГРАНИЧЕННОГО
ТРИПСИНОЛИЗА G-ФАКТОРА*Алахов Ю. Б., Бундуле М. А., Бундулис Ю. П.,
Винокуров Л. М., Козлов В. П.**Институт белка Академии наук СССР, г. Пушкино Московской обл.*

Проведено исследование продуктов триптического гидролиза модифицированного малеиновым ангидридом фрагмента Th₃, полученного ограниченным термолитическим гидролизом G-фактора. Проведено также разделение и исследование структуры некоторых мелких пептидов, входящих в состав фрагмента T₄, полученных, как и сам фрагмент, при действии трипсина на нативную молекулу G-фактора. Установлены N-концевые аминокислотные последовательности триптических пептидов, в сумме охватывающих 322 аминокислотных остатка фрагмента T₄, что составляет около 94% его аминокислотной последовательности.

Ранее было показано, что при ограниченном трипсинолизе нативной молекулы G-фактора образуется несколько фрагментов, относительно устойчивых к действию трипсина [2, 3]. Метод ограниченного протеолиза оказался очень плодотворным при изучении первичной структуры G-фактора, так как определение полной первичной структуры свелось, таким образом, к определению аминокислотной последовательности отдельных фрагментов и нахождению перекрываний между ними.

Ранее в нашей лаборатории была определена структура фрагментов T₆ и T₇, найдены перекрывания между ними, а также между фрагментами T₇ и T₄ [4] и была определена аминокислотная последовательность фрагмента T₅ [5]. Было также исследовано действие термолитина на нативную молекулу G-фактора и показано, что при его ограниченном термолитическом гидролизе образуются фрагменты Th₃ (M_r 45 000) и Th₄ (M_r 25 000), аналогичные триптическим фрагментам T₄ и T₅ [6]. Для выяснения полной структуры G-фактора необходимо было определить структуру фрагмента T₄ и получить перекрывание между фрагментами T₄ и T₅.

Термолитический фрагмент Th₃ отличается от триптического фрагмента T₄ тем, что он по сравнению с ним укорочен с C-конца и имеет гомогенную N-концевую часть. Так как фрагмент Th₃ включает в себя неизвестную часть фрагмента T₄, именно он и был взят для исследования.

В данной работе рассмотрен один из этапов определения первичной структуры фрагмента T₄. Ранее нами был предпринят тотальный гидролиз молекулы G-фактора бромцианом и выделены все бромциановые пептиды; 12 из них охватывают всю полипептидную цепь фрагмента T₄ [7]. Поэтому установление первичной структуры фрагмента T₄ было сведено к выяснению аминокислотных последовательностей 12 пептидов бромцианового расщепления белка и нахождению перекрываний между ними. Для решения второй половины этой задачи нами был предпринят гидролиз смеси фрагментов T₃ и T₂ стафилококковой глутаминовой протеназой [1]. Однако получить все перекрывания не удалось. Поэтому для решения этой проблемы был проведен триптический гидролиз термолитического фрагмента Th₃, модифицированного по остаткам лизина малеиновым ангидридом.

Фрагменты ограниченного термолитического гидролиза были выделены, как описано нами ранее [6]. Их гомогенность была оценена с по-

* Сообщение VII см. [1].

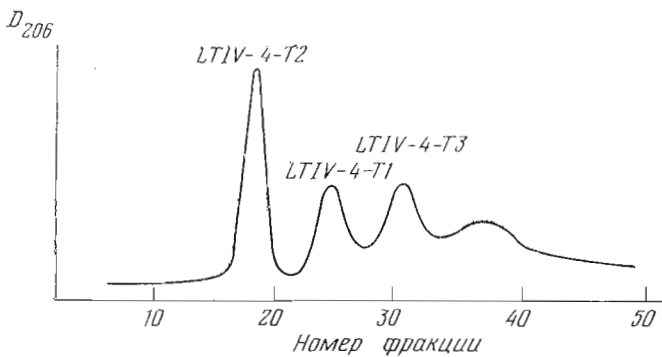


Рис. 1. Гель-фильтрация продуктов триптического гидролиза пептида LTIV-4 на колонке (1,6×180 см) с сефадексом G-50, уравновешенным аммиачной водой, pH 9,5. Скорость элюирования 10 мл/ч. Объем фракций 10 мл

мощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Фрагмент Th₃ был восстановлен β-меркаптоэтанолом, карбоксиметилирован иодацетамидом, а затем модифицирован малеиновым ангидридом и подвергнут триптическому гидролизу.

При концентрировании гидролизата на роторном испарителе выпал осадок, который содержал в гомогенном виде пептид LTIV-4 (табл. 1, 2). Его N-концевая аминокислотная последовательность была определена автоматическим методом Эдмана. После снятия малеинильной защиты пептид был подвергнут триптическому гидролизу. При разделении полученной смеси на колонке с сефадексом G-50 (рис. 1) были выделены пептиды LTIV-4-T1, LTIV-4-T2, LTIV-4-T3 (табл. 3). Пептид LTIV-4-T2 был подвергнут автоматической деградации по методу Эдмана на жидкофазном секвенаторе. Было определено 25 аминокислотных остатков с N-конца пептида и, таким образом, получено перекрытие между бромциановыми пептидами CBG-9 и CBG-10 [7].

Растворимая часть триптического гидролизата была разделена на колонке с сефадексом G-50. Анализ собранных фракций осуществлялся путем определения их N-концевых аминокислотных остатков. В гомогенном виде были выделены пептиды LTIV-3, LTIV-8, LTIV-11, LTIV-15, LTIV-16 и LTIV-19 (табл. 1 и 2).

Трипептид LTIV-16 элюировался с колонки позже дипептида LTIV-15 (Glu-Arg), вероятно, вследствие наличия остатка фенилаланина в его составе; его структура была установлена методом Эдмана (в дансильной модификации).

Пептид LTIV-3 был подвергнут твердофазной автоматической деградации по методу Эдмана, в результате чего было определено 12 аминокислотных остатков с N-конца пептида. После 13-го шага с колонки элюировался дипептид Thr-Arg; его структура была определена N-концевым и аминокислотным анализами. Установление структуры пептида LTIV-3 позволило получить перекрытие между бромциановыми пептидами CBG-7 и CBG-8 [7].

Определение N-концевой последовательности пептида LTIV-8 показало, что он является фрагментом пептида LTIV-7, образовавшимся из-за наличия примеси химотрипсина в препарате трипсина.

Пептид LTIV-11 также был подвергнут автоматической твердофазной деградации по методу Эдмана, в результате чего была определена последовательность 27 аминокислотных остатков с N-конца пептида и было получено перекрытие между бромциановыми пептидами CBG-11 и CBG-12. Для подтверждения полученных данных пептид LTIV-11 был модифицирован уксусным ангидридом и затем, после снятия малеинильной защитной группы, гидролизован трипсином. Полученная смесь пептидов была подвергнута автоматической твердофазной деградации по методу Эдмана. В результате ранее полученные данные были надежно подтверж-

Аминокислотный состав и N-концевые аминокислотные остатки пептидов триптического гидролиза фрагмента T₄

Аминокислота	LTIV-1	LTIV-2	LTIV-3	LTIV-4	LTIV-5	LTIV-6	LTIV-7	LTIV-8	LTIV-9	LTIV-10
Cys(Cm)										
Asp	1,2(1)	2,1(2)	2,2(2)	9,4(10)	3,2(3)	0,9(1)	1,1(1)		2,9(3)	
Thr			0,8(1)	2,5(3)	0,9(1)			0,8(1)	0,9(1)	
Ser				1,8(2)			1,8(2)			0,9(1)
Glu	0,5(1)		0,9(1)	18,5(18)	2,8(3)	1,1(1)	10,2(10)	4,2(4)	0,9(1)	
Pro	0,9(1)			2,6(3)	1,9(2)	1,8(2)				
Gly			1,1(1)	6,7(7)	2,9(3)	0,9(1)	2,9(3)		1,1(1)	
Ala	1,2(1)	0,9(1)	1,1(1)	11,5(12)	3,7(4)	1,1(1)	4,8(5)	3,2(3)	1,1(1)	
Val	1,1(1)	0,9(1)	1,7(2)	5,7(6)	4,1(4)	0,9(1)		1,9(2)	0,9(1)	
Met		0,8(1)	0,7(1)	2,5(3)	0,7(1)		0,7(1)			
Ile		0,9(1)	1,1(1)	5,6(5)	1,8(2)		1,8(2)	1,0(1)		
Leu			1,0(1)	10,2(10)	3,7(4)	2,8(3)	4,7(5)	3,2(3)		
Tyr	0,7(1)			1,7(2)			0,8(1)			
Phe		1,1(1)	1,1(1)	1,9(2)	1,1(4)				0,9(1)	
His				1,8(2)	0,8(1)		0,8(1)			
Lys	1,8(2)	0,9(1)	1,9(2)	4,3(4)	1,9(2)		1,1(1)	0,8(1)		
Trp				(2) *	(1) *					
Arg	1,1(1)	1,0(1)	1,1(1)	1,0(1)			1,0(1)	1,1(1)		1,2(1)
Всего остатков	9	9	15	92	32	10	35	16	9	2
N-Концевая аминокислота	<Glu	Ile	Met	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Asn	Glu

Аминокислота	LTIV-11	LTIV-12	LTIV-13	LTIV-14	LTIV-15	LTIV-16	LTIV-17	LTIV-18	LTIV-19	LTIV-20
Cys(Cm)	(2) **								(2) *	
Asp	7,5(8)	1,9(2)	2,1(2)	3,3(3)			1,1(1)		4,7(5)	
Thr	1,7(2)		1,9(2)	0,8(1)					1,8(2)	
Ser	1,6(2)	1,7(2)		2,6(3)						0,8(1)
Glu	3,2(3)	2,1(1)			1,2(1)		0,9(1)	2,8(3)	0,9(1)	2,1(2)
Pro	3,6(4)	1,1(1)	0,9(1)						1,8(2)	1,9(2)
Gly	1,8(2)		0,9(1)	2,1(2)		1,1(4)			2,9(3)	
Ala	4,6(5)	2,8(3)	1,0(1)	2,2(2)			1,1(1)		4,8(5)	
Val	5,7(6)		0,9(1)	4,6(5)			0,9(1)	0,9(1)	0,9(1)	0,9(1)
Met	0,8(1)						0,8(1)		0,8(1)	0,8(1)
Ile	5,1(5)		1,1(1)				1,1(1)	0,9(1)	3,8(4)	0,9(1)
Leu	5,2(5)	0,9(1)	1,0(1)	1,1(1)					3,2(3)	
Tyr	1,3(1)			0,9(1)						
Phe	0,9(1)	1,8(2)	2,6(3)			1,2(4)				1,1(4)
His		0,8(1)					0,9(1)			
Lys	2,7(3)	1,1(1)		0,9(1)			0,9(1)			
Trp								1,1(1)	1,1(1)	
Arg	1,0(1)		1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,0(4)	1,1(1)	1,0(1)	1,1(1)	
Всего остатков	51	14	14	20	2	3	9	7	30	9
N-Концевая аминокислота	Val	His	Ile	Val	Glu	Phe	Ile	Glu	Ala	Met

* Не определялся.

** Количественно не определялся.

дены, поскольку в этом случае метионин являлся четвертым остатком с N-конца пептида.

N-Концевая аминокислотная последовательность пептида LTIV-19 также была определена с помощью твердофазного автоматического метода Эдмана. После 10-го цикла деградации в элюате был обнаружен C-концевой фрагмент пептида LTIV-19, который был далее подвергнут ручной деградации по методу Эдмана.

Аминокислотная последовательность пептидов триптического гидролиза фрагмента T₄

Пептид	Аминокислотная последовательность
LTIV-1	<Glu-Ala-Asn-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Arg
LTIV-2	Ile-Ala-Phe-Val-Asn-Lys-Met-Asp-Arg
LTIV-3	Met-Gly-Ala-Asn-Phe-Leu-Lys-Val-Val-Asn-Gln-Ile-Lys-Thr-Arg
LTIV-4	Leu-Gly-Ala-Asn-Pro-Val-Pro-Leu-Gln-Leu-Ala-Ile-Gly-Ala-Glu-Glu-His- Phe-Thr-Gly-Val-Val-Asp-Leu-Val-Lys-Met-Lys-Ala-Ile-Asn-Trp-Asn-Asp- Ala-Asp-Gln-Gly-Val-Thr-Phe-Glu-Tyr-Glu-Asp-Ile-Pro-Ala-Asp-Met-Val- Glu-Leu-Ala-Asn-Glu-Trp-His-Gln-Asn-Leu-Ile-Glu-Ser-Ala-Ala-Glu-Ala- Ser-Glu-Glu-Leu-Met-Glu-Lys-Tyr-Leu-Gly-Gly-Glu-Glu-Leu-Thr-Glu-Ala- Glu-Ile-Lys-Gly-Ala-Leu-Arg
LTIV-5	Leu-Gly-Ala-Asn-Pro-Val-Pro-Leu-Gln-Leu-Ala-Ile-Gly-Ala-Glu-Glu-His- Phe-Thr-Gly-Val-Val-Asp-Leu-Val-Lys-Met-Lys-Ala-Ile-Asn-Trp
LTIV-6	Leu-Gly-Ala-Asn-Pro-Val-Pro-Leu-Gln-Leu
LTIV-7	His-Gln-Asn-Leu-Ile-Glu-Ser-Ala-Ala-Glu-Ala-Ser-Glu-Glu-Leu-Met-Glu- Lys-Tyr-Leu-Gly-Gly-Glu-Glu-Leu-Thr-Glu-Ala-Glu-Ile-Lys-Gly-Ala-Leu- Arg
LTIV-8	Leu-Gly-Gly-Glu-Glu-Leu-Thr-Glu-Ala-Glu-Ile-Lys-Gly-Ala-Leu-Arg
LTIV-9	Asn-Asp-Ala-Asp-Gln-Gly-Val-Thr-Phe
LTIV-10	Gln-Arg
LTIV-11	Val-Leu-Asn-Asn-Glu-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-Arg
LTIV-12	His-Ala-Ser-Asp-Asp-Glu-Pro-Phe-Ser-Ala-Leu-Ala-Phe-Lys
LTIV-13	Ile-Ala-Thr-Asp-Pro-Phe-Val-Gly-Asn-Leu-Thr-Phe-Phe-Arg
LTIV-14	Val-Tyr-Ser-Gly-Val-Val-Asn-Ser-Gly-Asp-Thr-Val-Leu-Asn-Ser-Val-Lys- Ala-Ala-Arg
LTIV-15	Glu-Arg
LTIV-16	Phe-Gly-Arg
LTIV-17	Ile-Val-Gln-Met-His-Ala-Asn-Lys-Arg
LTIV-18	Glu-Glu-Ile-Lys-Glu-Val-Arg
LTIV-19	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-Arg
LTIV-20	Met-Glu-Phe-Pro-Glu-Pro-Val-Ile-Ser

→ — установление аминокислотной последовательности автоматическим методом Эдмана,
 ↗ — установление аминокислотной последовательности ручным методом Эдмана в дансиль-
 ной модификации.

* Остаток Cys участвует в образовании S—S-связи.

Фракции, содержащие смесь пептидов малого размера (до 10 аминокислотных остатков), выдерживали в кислых условиях для снятия малеинильной защиты, обессоливали на колонке с сефадексом G-15 в 0,005 н. HCl и делили на колонке (0,6×40 см) с Chromobeads Type P в летучем пиридин-ацетатном буфере в градиенте концентрации и pH. Таким образом были разделены объединенные фракции 65–68, 69–73, 74–76.

При разделении фракций 65–68 (рис. 2) были выделены пептиды LTIV-20, LTIV-13, LTIV-18, LTIV-12 (табл. 1 и 2). Пептид LTIV-12 образовался в результате расщепления связи Lys-Ile в пептиде CBG-12, ве-

Пептиды, полученные после триптического гидролиза пептида LTIV-4

Пептид	Аминокислотная последовательность
LTIV-4-T1	Leu-Gly-Ala-Asn-Pro-Val-Pro-Leu-Gln-Leu-Ala-Ile-Gly-Ala-Glu-Glu- His-Phe-Thr-Gly-Val-Val-Asp-Leu-Val-Lys
LTIV-4-T2	Ala-Ile-Asn-Trp-Asn-Asp-Ala-Asp-Gln-Gly-Val-Thr-Phe-Glu-Tyr-Glu- Asp-Ile-Pro-Ala-Asp-Met-Val-Glu-Leu-Ala-Asn-Glu-Trp-His-Gln-Asn- Leu-Ile-Glu-Ser-Ala-Ala-Glu-Ala-Ser-Glu-Glu-Leu-Met-Glu-Lys
LTIV-4-T3	Tyr-Leu-Gly-Gly-Glu-Glu-Leu-Thr-Glu-Ala-Glu-Ile-Lys

роятно, вследствие неполной модификации лизина малеиновым ангидридом.

Структура пептидов LTIV-20, LTIV-18 и LTIV-13 была определена ручным методом Эдмана, пептида LTIV-12 — твердофазным автоматическим методом, а также ручным методом Эдмана до 10-го остатка.

При разделении фракций 69—73 (рис. 3) были выделены пептиды LTIV-20, LTIV-9, LTIV-6 и LTIV-2. Их структура была определена ручным методом Эдмана (в дансильной модификации).

При разделении фракций 74—76 (рис. 4) были выделены пептиды LTIV-6, LTIV-1 и LTIV-2. Пептид LTIV-1 имел на N-конце пироглутаминовую кислоту и поэтому был не пригоден для ступенчатой деградации по методу Эдмана. С целью установления его аминокислотной последовательности было проведено расщепление пептида трипсином с последующим разделением продуктов гидролиза высокоэффективной ионообменной хроматографией (рис. 5). В результате были выделены пептиды LTIV-1-T1, LTIV-1-T2, LTIV-1-T3 (табл. 4). Структура последних двух пептидов была определена ручным методом Эдмана, пептид LTIV-1-T1 был охарактеризован аминокислотным анализом.

При обессоливании фракций 78—82 был выделен пептид LTIV-17 (рис. 6). Его структура была определена как автоматическим, так и ручным методом Эдмана. Этот пептид дал перекрывание между бромциановыми пептидами CBG-12 и CBG-13.

Из фракции 85 были выделены дипептиды LTI-10 и LTIV-15; они были охарактеризованы N-концевым и аминокислотным анализами.

Для разделения более крупных пептидов мы использовали ионообменную хроматографию на QAE-сефадексе А-25, так как начиная с фракции 61 пептиды необратимо сорбируются на катионообменной смоле.

Объединенные фракции 50—62 были разделены на колонке с QAE-сефадексом А-25 (рис. 7). Структура пептида LTIV-14 была определена автоматическим методом Эдмана. В элюате с колонки после 17-го цикла деградации был обнаружен C-концевой трипептид Ala-Ala-Arg. Он был охарактеризован N-концевым и аминокислотным анализами.

Таблица 4

Пептиды, полученные после триптического гидролиза пептида LTIV-1

Пептид	Аминокислотная последовательность
LTIV-1-T1	<Glu-Ala-Asn-Lys
LTIV-1-T2	Val-Pro-Arg
LTIV-1-T3	Tyr-Lys-Val-Pro-Arg

Фракции 37—43 также разделены на колонке с QAE-сефадексом А-25. Профиль элюции показан на рис. 8. N-Концевая последовательность выделенного пептида LTIV-7 была определена автоматическим твердофазным методом Эдмана. Как видно из табл. 2, он является фрагментом пептида LTIV-4. В результате определения N-концевой последовательности этого пептида было получено перекрывание между пептидами CBG-10 и CBG-11.

Таким образом, при исследовании продуктов ограниченного триптического гидролиза фрагмента T₃ удалось выделить пептиды, охватывающие большую часть фрагмента T₄ — с первого по 290-й остаток. Оказалось, что термолитический фрагмент T₃ оканчивается на Ser-413.

Пептиды, составляющие C-концевую часть фрагмента T₄, не входящую в термолитический фрагмент T₃, удалось выделить следующим образом. При ограниченном триптическом гидролизе нативного G-фактора, как правило, образуется незначительное количество продуктов исчерпывающего гидролиза, и, как оказалось, их структура соответствует C-концевой части фрагмента T₄. При разделении фрагментов ограниченного триптического гидролиза белка на сефадексе G-100 (см. работу [3]) кроме фрагментов T₃, T₄, T₅, T₆ и T₇ можно выделить фракцию А, содержащую мелкие пептиды (рис. 9). После разделения данной фракции на колонке с сефадексом G-25 (рис. 10) были получены пептиды LTIV-21 и LTIV-24 (табл. 5 и 6) и фракция С, содержащая смесь пептидов, которая была подвергнута дальнейшему разделению на пластинках с тонким слоем целлюлозы. В результате были выделены пептиды LTIV-22 и LTIV-23. Аминокислотная последовательность этих пептидов, а также пептида LTIV-21 была определена ручным методом Эдмана в дансильной модификации.

Структура пептида LTIV-24 была определена до 8-го остатка ручным методом Эдмана. Затем для установления его полной структуры он был расщеплен стафилококковой глутаминовой протеиназой. Гидролизат был разделен на пластинках с тонким слоем целлюлозы. Выделенные пептиды охватывали всю последовательность исходного пептида (табл. 7). Таким образом, исследование структуры пептида LTIV-24 дало возможность получить перекрывание между пептидами CBG-15 и CBG-16 бромцианового расщепления G-фактора [7]. Необходимо отметить, что связь между Ala¹³-Gly¹⁴ оказалась нестабильной и при хранении пептида произошло расщепление по этой связи. Частично расщепленной оказалась также связь Asp²¹-Ile²². Для подтверждения положения остатка триптофана в пептиде LTIV-24 был предпринят гидролиз пептида BNPS-скатолом. Гидролизат был разделен на колонке с сефадексом G-25 (рис. 11), в результате чего были выделены пептиды, охватывающие всю молекулу исходного пептида LTIV-24 (табл. 7).

Таким образом, в результате проделанной работы были выделены триптические пептиды, входящие в состав фрагмента T₄ (из ограниченного трипсинолиза G-фактора) и в сумме охватывающие 322 аминокислотных остатка, что составляет около 94% его аминокислотной последовательности.

Экспериментальная часть

В работе использованы сефадексы G-25, G-50, G-100, QAE-25 (Pharmacia, Швеция), катионообменная смола Chromobeads, тип Р (Technicon, США), реактивы для автоматического метода Эдмана и фенилтиогидантоины аминокислот (Beckman, США), реактивы для диск-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (Serva, ФРГ), трипсин (Worthington, США), стафилококковая глутаминовая протеиназа (Miles Lab. Англия), BNPS-скатол (Pierce, США), пластинки с тонким слоем целлюлозы (Merck, ФРГ), флуорескамин (Pierce, США, *o*-фталевый диальдегид (Sigma, США), β-меркаптоэтанол (Pierce, США), Brij-35 (Serva, ФРГ). Все остальные реактивы имели квалификацию ос.ч.

Аминокислотный состав пептидов определяли как описано ранее [7].
Автоматический метод Эдмана. Автоматическое определение N-конце-

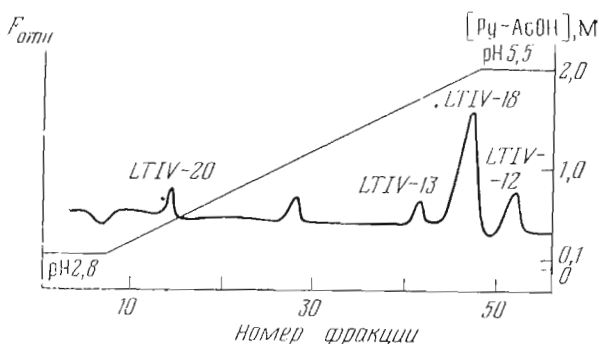


Рис. 2. Высокоэффективная хроматография фракции 65–68 на колонке (0,6×40 см) с хромобедсом (тип Р) в градиенте концентрации пиридин-ацетата (0,1–2,0 М) и pH (2,8–5,5). Скорость элюирования 20 мл/ч. Объем фракций 1 мл

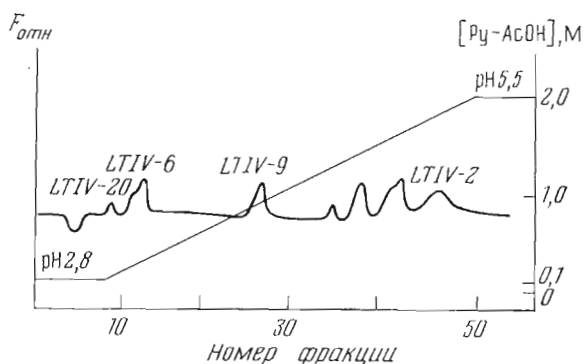


Рис. 3. Высокоэффективная хроматография фракции 69–73. Условия аналогичны разделению на рис. 2

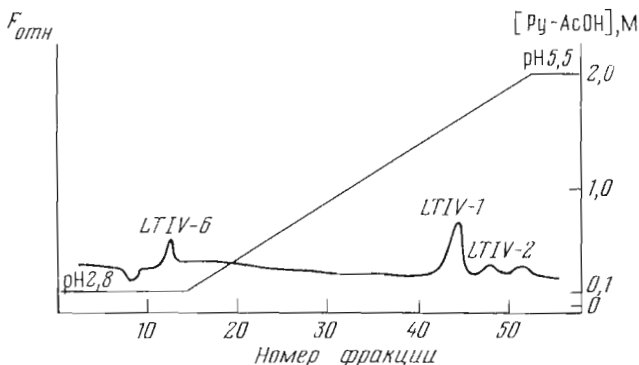


Рис. 4. Высокоэффективная хроматография фракции 74–76. Условия аналогичны разделению на рис. 2

вой аминокислотной последовательности в пептиде LTIV-4-T2 проводили на жидкофазном секвенаторе модели 890 С (Beckman, США) с использованием диметилаллиламинной программы. Для остальных пептидов был использован твердофазный секвенатор модели APS-240 (Rank Hilger, Англия). Ковалентное присоединение пептидов к аминопропил- или к аминоэтиламинпропилстеклу [4] осуществлялось через аминогруппы лизина с помощью *n*-фенилендиизотиоцианатного метода. Идентификацию фенилтиогидантоновых аминокислот осуществляли на жидкостном хроматографе модели 1070 А (Hewlett Packard, США) с колонкой (0,4×15 см), заполненной фазой Spherisorb RP-18 (5 мкм), в натрий-фосфатном растворе с использованием градиента метанола, а также ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Fluka, Швейцария).

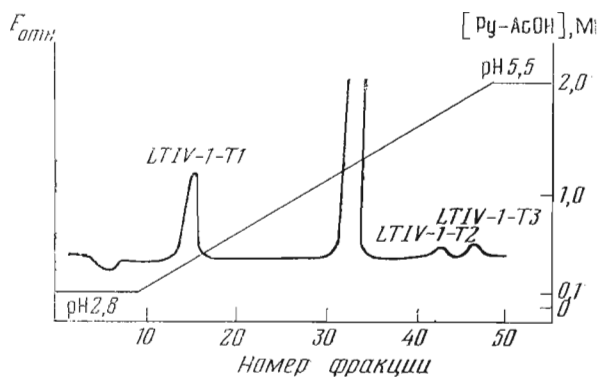


Рис. 5. Высокоэффективная хроматография продуктов триптического гидролиза пептида LTIV-1 на колонке (0,3×30 см) с хромобедсом (тип Р). Условия аналогичны разделению на рис. 2. Скорость элюирования 9 мл/ч

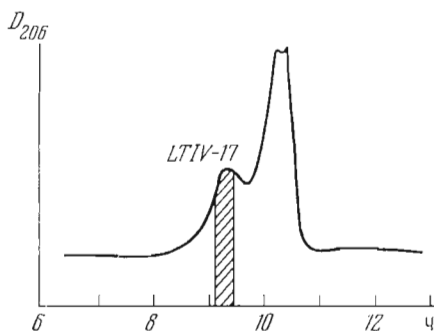


Рис. 6. Гель-фильтрация фракции 78-82 на колонке (1,6×90 см) с сефадексом G-15, уравновешенным 0,01 М HCl. Скорость элюирования 12 мл/ч. Заштрихована отбираемая фракция

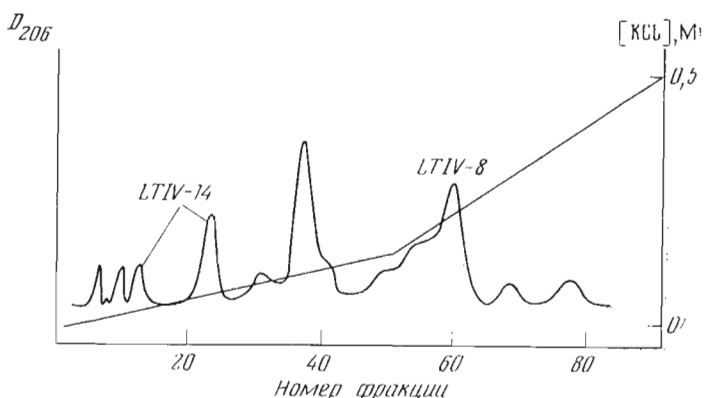


Рис. 7. Разделение фракции 50-62 на колонке (1×20 см) с QAE-сефадексом А-25, уравновешенным 0,02 М трис-HCl (рН 8,3), в градиенте концентрации KCl (0,0-0,5 М). Скорость элюирования 12 мл/ч, объем фракции 12 мл

Определение N-концевых аминокислот осуществляли дансильным методом, согласно методике, описанной в работе [8].

Установление N-концевых последовательностей в пептидах ручным вариантом метода Эдмана в дансильной модификации проводили по методике, описанной в работах [9, 10].

Идентификация амидов глутаминовой и аспарагиновой аминокислот проводилась согласно методике, описанной в работах [7, 11].

Восстановление и карбоксиметилирование термолитического фрагмента Th₃. 2,5 мкмоль термолитического фрагмента Th₃ растворяли в 10 мл

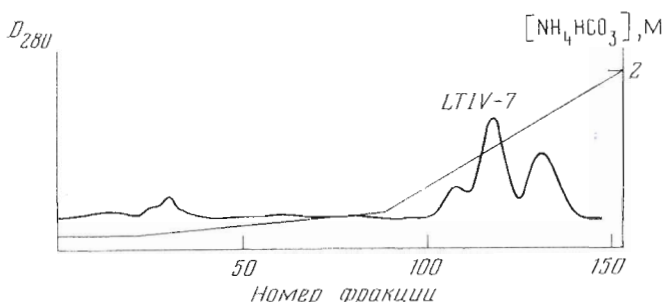


Рис. 8. Разделение фракции 37–43 на колонке (1×15 см) с QAE-сефадексом А-25, уравновешенным 0,02 М NH_4HCO_3 , в градиенте концентрации NH_4HCO_3 (0,02–2,0 М). Скорость элюирования 12 мл/ч. Объем фракции 12 мл

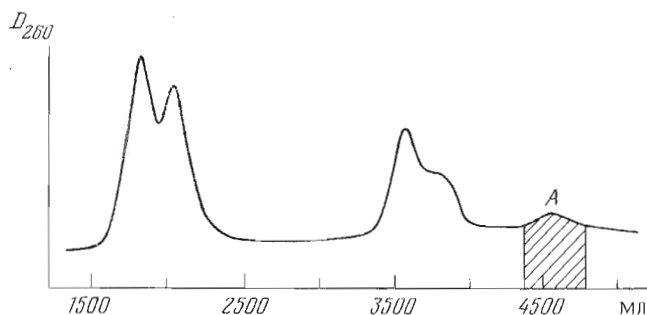


Рис. 9. Гель-фильтрация продуктов ограниченного триптического гидролиза G-фактора, карбоксиметилированного по одной SH-группе. Колонка (5×270 см) с сефадексом G-100 (сверхтонкий), уравновешенным буфером 0,02 М трис-HCl (pH 7,5), содержащим 1 мМ β-меркаптоэтанол и 6 М мочевины. Скорость элюирования 15 мл/ч. Заштрихована отбираемая фракция

буфера 0,1 М трис-HCl, pH 8,1, содержащего 7 М мочевины и 100 мМ β-меркаптоэтанол, и выдерживали в течение 15 ч при комнатной температуре. Затем восстановленный фрагмент обессоливали на колонке (2,5×90 см) с сефадексом G-25, уравновешенным буфером 0,1 М трис-HCl, pH 8,1, содержащим 7 М мочевины и 1 мМ β-меркаптоэтанол. К обессоленному фрагменту добавили трехкратный избыток иодацетамида по отношению к присутствующему в растворе β-меркаптоэтанолу. При этом pH поддерживали добавлением 10% NaOH. После этого смесь инкубировали 30 мин при 20° С в темноте. После проведения реакции фрагмент был обессолен на колонке (2,5×90 см) с сефадексом G-25, уравновешенным аммиачной водой, и лиофильно высушен.

Малеинирование термолитического фрагмента Th_3 . Предварительно обессоленные, лиофильно высушенные 2 мкмоль фрагмента Th_3 растворяли в 15 мл 0,5 М боратного буферного раствора (pH 9,1), содержащего 7 М мочевины. Затем к раствору порциями добавляли 1 г малеинового ангидрида. pH реакционной смеси поддерживали добавлением 10% NaOH. После добавления смесь инкубировали 30 мин. После завершения малеинирования раствор был обессолен на колонке (2,5×90 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 0,1 М NH_4HCO_3 , и лиофильно высушен.

Триптический гидролиз фрагмента Th_3 . К малеинированному фрагменту добавляли препарат трипсина в соотношении 1:50 (по весу) и смесь инкубировали 15 ч при 37° С при постоянном перемешивании. Гидролизат концентрировали на роторном испарителе при 25° С. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 15 мл 20 мМ трис-HCl-буфера, pH 8,3, содержащего 7 М мочевины, и обессоливали на колонке (2,5×90 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 0,1 М NH_4HCO_3 . Растворимую часть в объеме 15 мл наносили на колонку (2,5×180 см) с сефа-

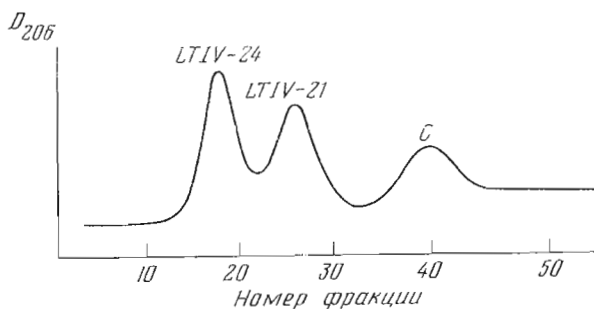


Рис. 10. Гель-фильтрация фракции А (см. рис. 9) на колонке (2,5×180 см) с сефадексом G-25, уравновешенным аммиачной водой. Скорость элюирования 20 мл/ч, объем фракции 20 мл

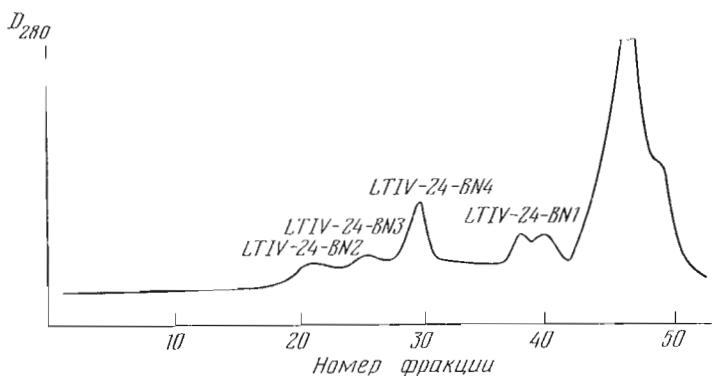


Рис. 11. Гель-фильтрация продуктов гидролиза пептида LTIV-24 BNPS-скатолом на колонке (1×180 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 10% уксусной кислотой. Скорость элюирования 2,8 мл/ч, объем фракций 3,5 мл

дексом G-50, уравновешенным 0,1 М NH_4HCO_3 . Скорость элюирования 8,5 мл/ч, объем фракций 8,5 мл. Собранные фракции анализировали определением их N-концевых аминокислотных остатков.

Для удаления малеинильной защитной группы пептид инкубировали при pH 3,5 (уксусная кислота) в течение 48 ч и обессоливали на колонке с сефадексом G-25 в 2 мМ HCl.

Триптический гидролиз пептида LTIV-1. 60 нмоль пептида растворяли в 200 мкл 0,1 М NH_4HCO_3 и к раствору добавляли препарат трипсина в соотношении 1 : 50 (по весу). Гидролиз проводили в течение 10 ч при 37° С. Затем гидролизат был высушен, растворен в 500 мкл 0,01 н. пиридин-ацетата, pH 2,0, и нанесен на колонку со смолой Chromobeads Type P. Разделение пептидов проводили в градиенте концентрации пиридин-ацетата и pH (0,1 М, pH 2,8–2,0 М, pH 5,5) (рис. 5).

Гидролиз пептида LTIV-24 стафилококковой глутаминовой протеиназой. 50 нмоль пептида, растворенного в 300 мкл 0,1 М NH_4HCO_3 , инкубировали 15 ч со стафилококковой глутаминовой протеиназой в соотношении фермент — субстрат 1 : 50 по весу при 37° С.

Расщепление пептида LTIV-24 BNPS-скатолом было проведено как описано в работе [12]. К раствору пептида (70 нмоль) в 500 мкл 66% уксусной кислоты добавляли 1,2 мг BNPS-скатола в ледяной уксусной кислоте (150 мкл). Смесь оставляли в темноте на 30 ч при комнатной температуре. Затем гидролизат разделяли гель-фильтрацией.

Расщепление пептида LTIV-4 трипсином. К 200 нмоль пептида, растворенного в 2 мл 0,1 М NH_4HCO_3 , добавили трипсин в соотношении 1 : 50 (по весу) и инкубировали 14 ч при 37° С. После анализа N-концевых аминокислот гидролизат разделяли гель-фильтрацией (см. рис. 1).

Модификация пептида LTIV-11 уксусным ангидридом. 150 нмоль высушенного пептида были растворены в 0,5 мл 0,5 М ацетата натрия, pH 8,1,

Аминокислотный состав и N-концевые аминокислотные остатки мелких пептидов (см. рис. 9, фракция А) триптического гидролиза G-фактора

Аминокислота	LTIV-21	LTIV-22	LTIV-23	LTIV-24
Cys(Cm)				
Asp		1,2(1)		3,5(4)
Thr				1,6(2)
Ser	0,8(1)			0,8(1)
Glu	2,6(3)	1,8(2)		4,2(4)
Pro	2,5(3)			
Gly			2,2(2)	2,2(2)
Ala	1,1(1)	1,1(1)	1,2(1)	1,2(1)
Val	2,1(2)			1,9(2)
Met	0,7(1)		0,8(1)	0,7(1)
Ile	1,7(2)			3,6(4)
Leu			2,1(2)	2,1(2)
Tyr				
Phe	0,9(1)			
His				0,9(1)
Lys	1,1(1)	1,1(1)		
Trp				* (1)
Arg			1,1(1)	1,0(1)
Всего остатков	15	5	7	26
N-Концевая аминокислота	Met	Ala	Met	Val

* Не определялся.

Таблица 6

Аминокислотная последовательность мелких пептидов (см. рис. 9) триптического гидролиза G-фактора

Пептид	Аминокислотная последовательность
LTIV-21	Met-Glu-Phe-Pro-Glu-Pro-Val-Ile-Ser-Ile-Ala-Val-Glu-Pro-Lys
LTIV-22	Ala-Asp-Gln-Glu-Lys
LTIV-23	Met-Gly-Leu-Ala-Leu-Gly-Arg
LTIV-24	Val-Trp-Thr-Asp-Glu-Glu-Ser-Asn-Gln-Thr-Ile-Ile-Ala-Gly-Met-Gly-Glu-Leu-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Val-Asp-Arg

содержащего 6 М гуанидин·HCl. К раствору было добавлено 200 мкл уксусного ангидрида порциями по 50 мкл в течение 30 мин при постоянном перемешивании, pH поддерживали 10% раствором NaOH. После этого раствор инкубировали еще 30 мин при 0° С.

Триптический гидролиз модифицированного пептида LTIV-11. После проведения модификации было проведено удаление малеинильных групп, затем пептид был обессолен, высушен и после этого растворен в 0,5 мл 0,1 М NH₄HCO₃. К раствору был добавлен трипсин в соотношении 1 : 50 (по весу) и смесь инкубировалась 15 ч при 37° С.

Препаративное разделение пептидов двумерной техникой осуществляли как описано в работе [4].

Для флуоресцентного детектирования пептидов в элюате после ионообменной колонки была использована методика, предложенная в работе [13], с некоторыми модификациями. На выходе из колонки 1/20 часть элюата отбирали через тройник перистальтическим насосом, смешивали с реагентом в соотношении 1 : 10 и сразу же подавали в проточный флуо-

Пептиды, полученные после гидролиза пептида LTIV-24
стафилококковой глутаминовой протеназой и после расщепления
BNPS-скатолом

Пептид	Аминокислотная последовательность
LTIV-24-SP1	Val-Trp-Thr-Asp-Glu-Glu
LTIV-24-SP2	Ser-Asn-Gln-Thr-Ile-Ile-Ala
LTIV-24-SP3	Gly-Met-Gly-Glu
LTIV-24-SP4	Leu-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Val-Asp-Arg
LTIV-24-SP5	Ile-Ile-Val-Asp-Arg
LTIV-24-BN1	Val-Trp
LTIV-24-BN2	Thr-Asp-Glu-Glu-Ser-Asn-Gln-Thr-Ile-Ile-Ala
LTIV-24-BN3	Gly-Met-Gly-Glu-Leu-His-Leu-Asp
LTIV-24-BN4	Ile-Ile-Val-Asp-Arg

риметр, где регистрировали флуоресценцию продуктов реакции пептидов с *o*-фталевым диальдегидом. Состав реагента: к 800 мл воды добавляли 89 г H_3BO_3 , pH доводили до 10,5 сухим КОН и затем добавляли раствор 1 г *o*-фталеевого диальдегида в 8 мл этанола. К полученному раствору добавляли 2 мл 30% раствора Brij-35 и 1 мл β -меркаптоэтанола. Объем доводили водой до 1 л.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Алахов Ю. Б., Бундуле М. А., Бундулис Ю. П., Винокуров Л. М., Козлов В. П. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 3, с. 315–329.
2. Skar D. C., Rohrbach M. S., Bodley J. W. Biochemistry, 1975, v. 14, p. 3922–3926.
3. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1977, т. 3, с. 1333–1345.
4. Мотуз Л. П., Бундулис Ю. П., Алахов Ю. Б. Биоорган. химия, 1979, т. 5, с. 814–827.
5. Alakhov Yu. B., Dougas N. V., Moluz L. P., Vinokurov L. M., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1981, v. 126, p. 183–186.
6. Алахов Ю. Б., Стенгревиц О. А., Бундулис Ю. П., Мотуз Л. П., Винокуров Л. М. Биоорган. химия, 1979, т. 5, с. 330–339.
7. 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.
8. Gray W. R. In: Methods in Enzymology / Ed. Hirs C. H. W. New York – London: Acad. Press, 1967, v. XI, p. 139–150.
9. Gray W. R., Hartley B. S. Biochem. J., 1963, v. 89, p. 379–380.
10. Bruton C. I., Hartley B. S. J. Mol. Biol., 1970, v. 52, p. 165–178.
11. Roseau G., Pantel P. J. Chromatogr., 1969, v. 44, p. 392–395.
12. Fontana A. In: Methods in Enzymology / Ed. Hirs C. H. W. New York – London: Acad. Press, 1972, v. XXV, p. 419–423.
13. Creaser E. H., Hughes G. G. J. Chromatogr., 1977, v. 144, p. 69–75.

Поступила в редакцию
19.VII.1982

PRIMARY STRUCTURE OF THE ELONGATION FACTOR G FROM
ESCHERICHIA COLI. VIII. STUDY OF THE STRUCTURE OF TRYPTIC
PEPTIDES COMPRISING THE FRAGMENT T₄ OF LIMITED
TRYPSINOLYSIS OF THE G-FACTOR

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*

Products of tryptic hydrolysis of the maleic anhydridemodified fragment Th₃ from limited thermolytic hydrolysis of the G-factor have been studied. Some short peptides which result from the trypsin action on the native G-factor molecule and belong to the fragment T₄ obtained on limited trypsinolysis of the G-factor have been separated and their structure has been studied. As a result amino acid sequence has been determined by tryptic peptides containing 322 amino acid residues of the fragment T₄ which makes up about 94% of its polypeptide chain.