



УДК 547.962;612.43/.45.018

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ПРОЛАКТИНА КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА **Юдаев Н. А., Шанков Ю. А., Елизарова Г. П.,
Хан З**., Николаева О. П.**Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Гомогенный препарат пролактина крупного рогатого скота расщепляли бромцианом и полученные 8 фрагментов разделяли гель-фильтрацией на сефадексах и ионообменной хроматографией на CM-целлюлозе. Каждый из пептидов гидролизovali трипсином и химотрипсином и продукты гидролиза разделяли гель-фильтрацией на сефадексах и распределительной хроматографией на бумаге. Аминокислотную последовательность пептидов изучали методом Эдмана, а N-концевые аминокислоты идентифицировали по реакции с дансилхлоридом с последующей хроматографией дансилпроизводных на полиамидных пластинках. Установлена полная последовательность аминокислотных остатков в восьми бромциановых фрагментах и предложена полная первичная структура пролактина крупного рогатого скота. Сравнение ее с известной структурой овечьего гормона обнаружило замену пяти аминокислотных остатков в пептидной цепи бычьего пролактина. В 10-м положении Asp→Asn, в 31-м Asn→Asp, в 35-м Glu→Gln, в 107-м Val→Ala и в 164-м положении His→Tyr. Полученные результаты указывают на значительное сходство в химической структуре и на эволюционную близость лактогенных гормонов двух видов животных.

Лактогенный гормон (пролактин) обладает широким спектром биологического действия у разных животных [1]. У млекопитающих он стимулирует развитие молочных желез, регулирует процессы лактации и активизирует биосинтез составных частей молока — казеина, молочного жира и молочного сахара. Поскольку пролактин, как и другие белки, обладает видовой специфичностью, изучение его химической структуры у разных видов животных представляет определенный интерес. Такие исследования могут выявить наиболее консервативные участки в структуре пептидной цепи гормона, ответственные за его биологическую активность. К настоящему времени лактогенные гормоны выделены из гипофиза овцы, крупного рогатого скота, свиньи, крысы, кита и человека [2]. Расшифрована первичная структура пролактина овцы [3] и показано, что по физико-химическим и иммунологическим свойствам он очень близок бычьему гормону [4].

Цель работы — изучение структуры бромциановых фрагментов бычьего пролактина и сравнение ее с известной структурой овечьего гормона.

Выделение пролактина из гипофизов крупного рогатого скота и расщепление его BrCN описаны в работах [5, 6]. Там же представлено выде-

* Принятые сокращения: Dns-Cl — дансилхлорид (1-диметиламиноафталин-5-сульфонилхлорид); HSL — лактон гомосерина; СуА — карбамидометилцистеин; Суа — цистеиновая кислота; Hser — гомосерин.

** Настоящий адрес: Физиологический институт Медицинского университета, г. Печ, Венгрия.

ление в чистом виде пяти пептидных фрагментов (В III-1, В IV-2, В IV-3, В V-4 и В V-5) и приведена их частичная аминокислотная последовательность. В данной статье изучена полная последовательность аминокислотных остатков восьми бромциановых фрагментов бычьего пролактина, включая самый короткий пептид В VI и самый крупный — В I, состоящий из двух цепей, соединенных дисульфидным мостиком. После дополнительной очистки фрагмент В I подвергли окислению надмуравьиной кислотой или

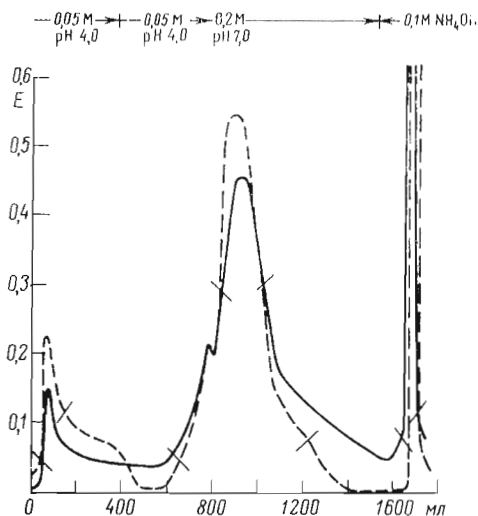


Рис. 1

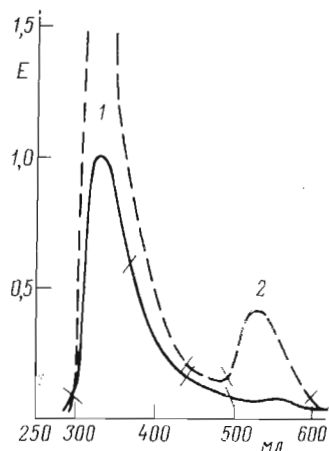


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография фрагмента В-I на колонке с СМ-целлюлозой (1,5×70 см). Градиент 0,05–0,2 М аммоний-ацетатного буфера создавали в смесителе объемом 700 мл, скорость элюции — 60 мл/час (здесь и на следующих рисунках: сплошная линия — оптическая плотность при 280 нм, штриховая — при 240 нм)

Рис. 2. Гель-фильтрация окисленного (или восстановленного и алкилированного) фрагмента В I на сефадексе G-50 (2,5×170 см) в 0,1 М NH₄OH, скорость элюции 40 мл/ч (пик 1 — В I-1; пик 2 — В I-2)

восстановлению и алкилированию (рис. 1, 2). Аминокислотные последовательности фрагментов рассматривали в порядке чередования их в пептидной цепи гормона.

Структура фрагмента В IV-2. Как указывалось в предыдущей работе [6], частичная N-концевая последовательность фрагмента В IV-2 (NH₂-Thr-Pro-Val-Cys-Pro-Asn-Gly-Pro-Gly-Asx...) совпадает с N-концевой последовательностью нативного гормона. Следовательно, он занимает N-концевое положение в молекуле пролактина. Аминокислотный состав его представлен в табл. 1. После гидролиза В IV-2 химотрипсином и хроматографии гидролизата на бумаге ватман 3 ММ в системе А были получены 5 пептидов: В IV-2x1, В IV-2x2, В IV-2x3, В IV-2x4 и В IV-2x5 (рис. 3, а).

Пептиды В IV-2x1 и В IV-2x3 имели по две одинаковые N-концевые аминокислоты — треонин и глицин. Их аминокислотный состав различался лишь присутствием дополнительных остатков серина, валина и лейцина в В IV-2x3. В связи с наличием двух N-концевых аминокислот и двух остатков полуцистина в каждом пептиде можно предположить, что они состоят из двух цепей, связанных дисульфидным мостиком. После окисления надмуравьиной кислотой и хроматографии на бумаге в системе А были выделены четыре гомогенных пептида: В IV-2x1А, В IV-2x1Б, В IV-2x3А и В IV-2x3Б.

Пептиды В IV-2x1А и В IV-2x3А оказались сходными по аминокислотному составу и имели треонин на N-конце. Пептид В IV-2x1Б отличался от

Таблица 1

Аминокислотный состав бромциановых фрагментов бычьего пролактина

Аминокислота	В IV-2	В V-5	В V-4	В I-2	В IV-3	В III-1	В VI	В I-1
Trp *					(1)			(1)
Lys			2	1		2		4
His		2		3	1			1
HSL	1	1	1	1	1	1	1	
Arg	2		1		2	2		4
CyA	2			1				3
Asx	4	1	2	2	2	2		9
Thr	1		1	3	1			3
Ser	1	3		3	2	1		5
Glx	1	1	2	6	1	5	1	5
Pro	3			2	1	1		4
Gly	2		2		2	2		3
Ala	1		1	2		3		3
Val	3	1		1	2			2
Pe		1	1		1	3		5
Leu	2	1		3	5	3		8
Tyr		1	1		1			5
Phe	1		3					2
Общее количество остатков	24	12	17	28	23	25	2	67
N-концевой остаток	Thr	Val	Phe	Ala	Ser	Lys	Glu	Pe

* Триптофан определяли спектрофотометрически.

Таблица 2

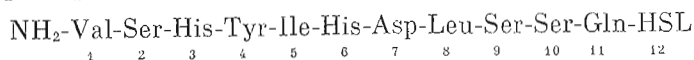
Аминокислотная последовательность фрагмента В IV-2

Пептид	Аминокислотная последовательность или состав
В IV-2	NH ₂ -Thr-Pro-Val-Cys-Pro-Asx-Gly-Pro-Gly (Arg ₂ , Asx ₁ , Ser, Glx, Cys, Val, Leu ₂ , Phe) Ala-Val-HSL
В IV-2x1A	NH ₂ -Thr-Pro-Val-Cya-Pro-Asn-OH
В IV-2x1Б	NH ₂ -Gly-Pro-Gly-Asn-Cya-Gln-OH
В IV-2x3Б	NH ₂ -Gly-Pro-Gly-Asn-Cya-Gln-Val-Ser-Leu-OH
В IV-2x4	NH ₂ -Arg-Asp-Leu-Phe-OH
В IV-2x2	NH ₂ -Asp-Arg-Ala-Val-HSL
Последовательность	NH ₂ -Thr-Pro-Val-Cys-Pro-Asn-Gly-Pro-Gly-Asn-Cys- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 Gln-Val-Ser-Leu-Arg-Asp-Leu-Phe-Asp-Arg-Ala- 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 Val-HSL 23 24

В IV-2x3Б отсутствием остатков серина, валина и лейцина. Пептид В IV-2x2 имел аспарагиновую кислоту на N-конце. После четырех стадий по Эдману и дансилрования был идентифицирован свободный Dns-гомосерин в негидролизованной пробе и лактон Dns-гомосерина — в гидролизованной, что позволило считать пептид В IV-2x2 C-концевым фрагментом В IV-2. В IV-2x4 представлял собой тетрапептид с N-концевым аргинином. В пептиде В IV-2x5 в качестве N-концевой аминокислоты идентифицирован валин. Аминокислотный состав и последовательность аминокислот этого пептида совпадали со структурой C-концевого участка В IV-2x3Б.

Полученные результаты позволили установить структуру фрагмента В IV-2, состоящего из 24 аминокислотных остатков (табл. 2).

Структура фрагмента В V-5. Аминокислотная последовательность фрагмента В V-5, состоящего из 12 остатков, была определена методом Эдмана без предварительного ферментативного гидролиза:



Структура фрагмента В V-4. Фрагмент В V-4 состоял из 17 аминокислотных остатков (табл. 1) и имел на N-конце фенилаланин. После гидролиза трипсином и хроматографии на бумаге в системе А были выделены четыре пептида: В V-4т1, В V-4т2, В V-4т3 и В V-4т4 (рис. 3, б). Структура пептида В V-4т2 совпадала с N-концевой последовательностью В V-4 [6], что давало основание считать его N-концевым фрагментом В V-4. Пептид В V-4т3 отличался от В V-4т2 только отсутствием аргинина. В V-4т1 представлял собой пентапептид с N-концевым тирозином. В V-4т4 был пентапептидом с N-концевым глицином и C-концевым гомосерином, что позволило считать его C-концевым фрагментом В V-4.

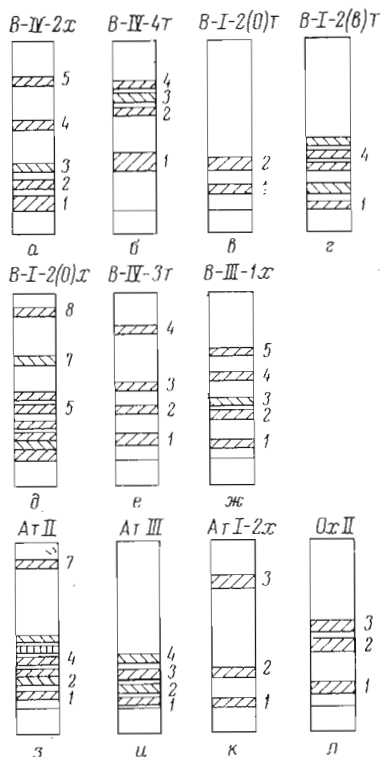


Рис. 3. Хроматография трипсиновых и химотрипсиновых гидролизатов на бумаге ватман 3 мм

да — В I-1 и В I-2, имеющие на N-конце изолейцин и аланин. Аминокислотный анализ пептидов представлен в табл. 1.

Частичная N-концевая последовательность 12 аминокислотных остатков в В I-2 была изучена на целом пептиде. Инкубация его с карбоксипептидазой А с последующим анализом отщепившихся аминокислот позволили предположить следующую C-концевую последовательность в пептиде: Val-Leu-Hser-OH.

В дальнейшем окисленный фрагмент В I-2 (о) подвергли гидролизу трипсином в течение 2 ч. После хроматографии на бумаге в системе А и Б получили два пептида: В I-2 (о) т1, состоящий из 16 аминокислотных остатков и имеющий аланин на N-конце, и В I-2 (о) т2, содержащий 12 аминокислот и глутаминовую кислоту на N-конце и гомосерин — на C-конце (рис. 3, в, табл. 4).

Восстановленный В I-2 (в) обрабатывали трипсином в течение 18 ч. С помощью хроматографии на бумаге в системе А (рис. 3, г) получили пять фракций. Исследовали фракции 1 и 4, содержащие по 8 аминокислотных остатков и имеющие аланин и серин на N-концах, соответственно В I-2 (в) т1 и В I-2 (в) т4.

При изучении аминокислотной последовательности полученных пептидов была установлена первичная структура фрагмента В V-4 (табл. 3).

Структура фрагмента В I-2. Крупный фрагмент В I, как отмечалось ранее [6], состоял из двух пептидов, связанных дисульфидным мостиком, и имел аланин и изолейцин на N-концах. Предварительно В I подвергли очистке на СМ-целлюлозе (рис. 1), а для расщепления S-S-связи применяли окисление надмуравьиной кислотой или восстановление и алкилирование. Продукты реакции разделяли на колонке с сефадексом G-50 (рис. 2). В результате гель-фильтрации были получены два пептида — В I-1 и В I-2, имеющие на N-конце изолейцин и аланин. Аминокислотный анализ пептидов представлен в табл. 1.

Окисленный фрагмент В I-2 (о) гидролизовали химотрипсином в течение 2 ч. По реакции с Dns-Cl в нем обнаружили свободный гомосерин. С помощью распределительной хроматографии на бумаге в системе А продукты гидролиза разделяли на несколько фракций (рис. 3, д). По результатам анализа аминокислотного состава и N-концевого остатка фракции В I-2 (о)х5, В I-2(о)х7 и В I-2 (о)х8 были гомогенны (табл. 4).

В I-2(о)х5 представлял собой гептапептид с треонином на N-конце. В I-2(о)х7 имел гистидин на N-конце и гомосерин на C-конце, что свидетельствовало о C-концевом расположении его во фрагменте В I-2. Пептид В I-2 (о)х8 имел равные количества аланина и лейцина и аланин на N-конце. Отщепление N-концевого остатка позволило получить свободный лейцин.

На основании полученных данных была установлена последовательность 28 аминокислотных остатков во фрагменте В I-2 (табл. 5).

Структура фрагмента В IV-3. Фрагмент В IV-3 состоял из 23 аминокислотных остатков и имел на N-конце серин (табл. 1). После гидролиза трипсином в течение 20 ч и хроматографии на бумаге ватман 3 ММ в системе А были выделены четыре пептида: В IV-3т1, В IV-3т2, В IV-3т3 и В IV-3т4 (рис. 3, е). Положительную реакцию Сакагуши на аргинин давали пептиды В IV-3т3 и В IV-3т4, а реакцию Эрлиха на тринтофан — В IV-3т2. В пептиде В IV-3т1 в качестве N-концевой аминокислоты идентифицирован глицин. При аминокислотном анализе пептида получили молярные количества глицина и лактона гомосерина. После отщепления глицина по методу Эдмана в пробе по реакции с Dns-Cl был идентифицирован свободный гомосерин, который после кислотного гидролиза превращался в лактон гомосерина. Пептид В IV-3т4 состоял из семи остатков. Его аминокислотная последовательность совпадала с N-концевой структурой В IV-3 [6], что позволило считать его N-концевым фрагментом В IV-3. Пептид В IV-3т2 содержал на N-конце серин и давал положительную реакцию Эрлиха. В пептиде В IV-3т3 на N-конце идентифицирован лейцин.

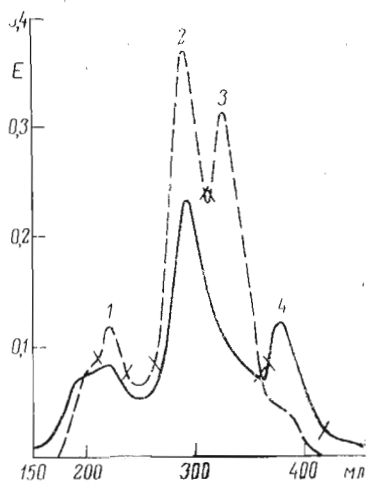


Рис. 4. Гель-фильтрация химотрипсинового гидролизата фрагмента В IV-3 на сефадексе G-25 (2,0×170 см) в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (рН 4,0), скорость элюции — 30 мл/ч (пик 1 — В IV-3х1; 2 — В IV-3х2; 3 — В IV-3х3; 4 — В IV-3х4)

Таблица 3

Аминокислотная последовательность фрагмента В V-4

Пептид	Аминокислотная последовательность или состав
В V-4	NH ₂ -Phe-Asn-Glu-Phe-Asp (Lys ₂ , Arg, Thr, Glx, Gry ₂ , Ala, Ile, Tyr, Phe) HSL
В V-4т2	NH ₂ -Phe-Asn-Glu-Phe-Asp-(Lys, Arg)
В V-4т3	NH ₂ -Phe-Asn-Glu-Phe-Asp-Lys-OH
В V-4т1	NH ₂ -Tyr-Ala-Gln-Gly-Lys-OH
В V-4т4	NH ₂ -Gly-Phe-Ile-Thr-HSL
Последовательность	NH ₂ -Phe-Asn-Glu-Phe-Asp-Lys-Arg-Tyr-Ala-Gln-Gly- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 Lys-Gly-Phe-Ile-Thr-HSL 12 13 14 15 16 17

Аминокислотный состав трипсиновых и химотрипсиновых пептидов фрагмента В 1-2 (о) и В 1-2 (в)

Аминокислота	(о) т1	(о) т2	(в) т1	(в) т4	(о) х5	(о) х7	(о) х8
Lys	1,1 (1)			1,0 (1)			
His	1,0 (1)	1,9 (2)	0,9 (1)		2,0 (2)	0,9 (1)	
HSL		0,7 (1)				0,8 (1)	
Cya	0,9 (1)		1,0 (1)				
Asx	2,0 (2)		1,0 (1)	1,1 (1)			
Thr	1,8 (2)	1,0 (1)	0,9 (1)	1,0 (1)	0,9 (1)		
Ser	2,9 (3)		2,0 (2)	0,9 (1)			
Glx	1,1 (1)	5,2 (5)		1,0 (1)	1,2 (1)	1,1 (1)	
Pro	1,9 (2)			1,8 (2)			
Ala	1,0 (1)	1,0 (1)	1,1 (1)				1,0 (1)
Val		1,1 (1)			1,0 (1)	1,0 (1)	
Leu	2,0 (2)	0,9 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	0,9 (1)	0,9 (1)
Общее количество остатков	16	12	8	8	6	5	2
N — концевой остаток	Ala	Glu	Ala	Ser	Thr	His	Ala

Таблица 5

Аминокислотная последовательность фрагмента В I-2

Пептид	Аминокислотная последовательность или состав
В I-2 (в)	NH ₂ -Ala-Leu-Asn-Ser-CyA-His-Thr-Ser-Ser-Leu-Pro-Thr-(Lys, His ₂ , Asx, Thr, Glx ₆ , Pro, Ala) Val-Leu-HSL
В I-2 (в) т4	NH ₂ -Ser-Leu-Pro-Thr-Pro-Glu-Asp-Lys-OH
В I-2 (о) т2	NH ₂ -Glu-Gln-Ala-Gln-Gln (His ₂ , Thr, Glx) Val-Leu-HSL
В I-2 (о) х5	NH ₂ -Thr-His-His-Glu-Val-Leu-HSL
Последовательность	NH ₂ -Ala-Leu-Asn-Ser-Cys-His-Thr-Ser-Ser-Leu-Pro-Thr-Pro-Glu-Asp- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 Lys-Glu-Gln-Ala-Gln-Gln-Thr-His-His-Glu-Val-Leu-HSL 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Изучение трипсиновых пептидов не позволило однозначно установить структуру фрагмента В IV-3, поэтому в дальнейшем В IV-3 гидролизировали химотрипсином в течение 24 ч. Продукты гидролиза разделяли на колонке с сефадексом G-25 (рис. 4). Дополнительное разделение и очистку проводили хроматографией на бумаге в системах А и Б. На каждом этапе очистки для выявления пептидов, содержащих аргинин и триптофан, использовали реакции Сакагуши и Эрлиха. В результате проведенных опытов были получены пептиды, гомогенные по N-концевой аминокислоте и составу: В IV-3x1, В IV-3x2, В IV-3x3 и В IV-3x4.

Пептид В IV-3x1 давал положительную реакцию Сакагуши. По реакции с Dns-Cl с последующей хроматографией Dns-производного на силуфолле в системе бензол — 2-хлорэтанол — 25%-ный NH₄OH (6 : 10 : 4) в качестве N-концевой аминокислоты идентифицирован гистидин. Присутствие гомосерина указывало на C-концевое происхождение пептида из В IV-3.

В IV-3x2 давал положительную реакцию Эрлиха, что свидетельствовало о присутствии в нем триптофана. На N-конце пептида был идентифицирован аргинин. После двух стадий Эдмана на полиамидной пластинке удалось обнаружить только Dns-о-Тур. Можно было предположить, что в 3-м положении В IV-3x2 находится остаток триптофана, разрушающийся при кислотном гидролизе. Пептид В IV-3x3 содержал на N-конце аспарагин.

Аминокислотная последовательность фрагмента В IV-3

Пептид	Аминокислотная последовательность или состав
В IV-3	NH ₂ -Ser-Leu-Ile-Leu-Gly-Leu-Arg (Trp, His, Arg, Asx ₂ , Thr, Ser, Glx, Pro, Val ₂ , Leu ₂ , Tyr) Gly-HSL
В IV-3т2	NH ₂ -Ser-(Trp, His, Asx ₂ , Pro, Leu, Tyr)-OH
В IV-3х2	NH ₂ -Arg-Ser-(Trp)-Asn-Asp-Pro-Leu-Tyr-OH
В IV-3х4	NH ₂ -Arg-Ser-Trp-OH
В IV-3х1	NH ₂ -His-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Arg-Gly-HSL
Последовательность	NH ₂ -Ser-Leu-Ile-Leu-Gly-Leu-Arg-Ser-Trp-Asn-Asp-Pro-Leu-Tyr-His- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 Leu-Val-Thr-Glu-Val-Arg-Gly-HSL 16 17 18 19 20 21 22 23

Таблица 7

Аминокислотная последовательность фрагмента В III-1

Пептид	Аминокислотная последовательность или состав
В III-1	NH ₂ -Lys-Gly-Ala-Pro-Asp-Ala-Ile-Leu (Lys, Arg ₂ , Asx, Ser, Glx ₅ , Gly, Ala, Ile ₂ , Leu ₂) HSL
В III-1х2	NH ₂ -Ser-Arg-Ala-Ile-Glu-Ile-Glu-Glu-Asn (Lys, Arg, Glx, Gly, Leu ₂) HSL
В III-1х4	NH ₂ -Lys-Arg-Leu-Leu-OH
В III-1х3	NH ₂ -Leu-Glu-Gly-HSL
Последовательность	NH ₂ -Lys-Gly-Ala-Pro-Asp-Ala-Ile-Leu-Ser-Arg-Ala-Ile-Glu-Ile-Glu-Glu- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 Glu-Asn-Lys-Arg-Leu-Leu-Glu-Gly-HSL 17 18 19 20 21 22 23 24 25

Его аминокислотная последовательность совпадала со структурой С-концевого участка пептида В IV-3х2. В IV3х4 (рис. 4) давал положительную реакцию на триптофан. При изучении аминокислотного состава после кислотного гидролиза были обнаружены только аргинин и серин в эквимольном отношении. В качестве N-концевой аминокислоты идентифицирован аргинин. После двух стадий Эдмана и дансилирования в пробе без гидролиза на полиамидной пластинке идентифицировали свободный Dns-триптофан.

Изучение аминокислотной последовательности пептидов трипсинового и химотрипсинового гидролизатов В IV-3 позволило установить полную структуру фрагмента, состоящего из 23 аминокислотных остатков (табл. 6).

Структура фрагмента В III-1. Аминокислотный состав фрагмента В III-1 представлен в табл. 1. Он имел на N-конце лизин. После гидролиза карбоксипептидазой А и определения свободных аминокислот по реакции с Dns-Cl был идентифицирован гомосерин. Фрагмент В III-1 подвергли гидролизу химотрипсином. С помощью распределительной хроматографии на бумаге получили пять гомогенных пептидов: В III-1х1, В III-1х2, В III-1х3, В III-1х4 и В III-1х5 (рис. 3, ж). Аминокислотная последовательность пептида В III-1х5 совпала с N-концевой последовательностью фрагмента В III-1 [6]. В III-1х1 и В III-1х2 имели на N-конце серин и одинаковую последовательность 10 аминокислотных остатков. Однако пептид В III-1х2 отличался от В III-1х1 присутствием дополнительных аминокислот, в том числе гомосерина, что указывало на С-концевое положение его во фрагменте В III-1. В III-1х3 был тетрапептидом с лейцином на N-конце и гомосерином на С-конце. В III-1х4 также был тетрапептидом и содержал остаток лизина на N-конце.

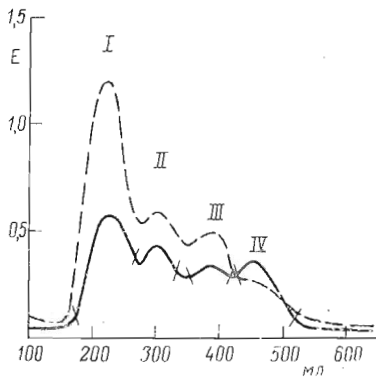


Рис. 5. Гель-фильтрация трипсинового гидролизата восстановленного фрагмента В I-1 (в) на сефадексе G-25 (2,0×170 см) в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (рН 4,0), скорость элюции 40 мл/ч (пик I — АтI; II — АтII; III — АтIII и IV — АтIV)

Структура выделенных пептидов позволила установить полную последовательность 25 аминокислотных остатков фрагмента В III-1 (табл. 7).

Структура фрагмента В VI. Аминокислотный анализ материала, собранного в области выхода солей на колонке G-50 при получении бромциановых фрагментов [6] обнаружил наличие только глутаминовой кислоты и лактона гомосерина. Анализ давал основание предполагать, что этот фрагмент является дипептидом, состоящим из глутаминовой кислоты и гомосерина. В результате очистки на колонке с сефадексом G-15 в 0,01М NH₄OH он был выделен в чистом виде и после одной стадии Эдмана и дансильирования в пробе был идентифицирован свободный Dns-Hser. Последовательность фрагмента NH₂-Clu-HSL.

Структура фрагмента В I-1. Исследования крупного фрагмента В I-1 с изолейцином на N-конце показали, что этот фрагмент является C-концевым в молекуле нативного гормона, так как он не содержит гомосерина, об-

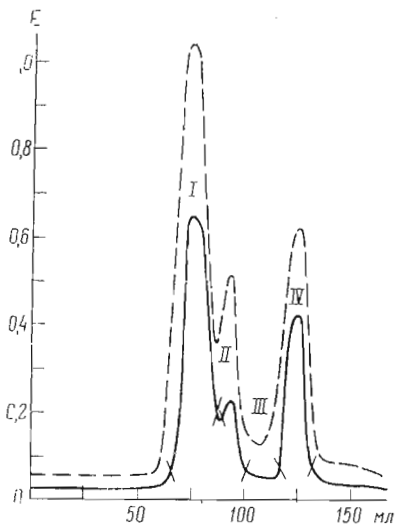


Рис. 6

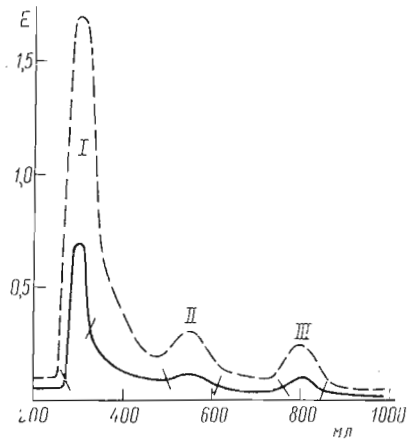


Рис. 7

Рис. 6. Гель-фильтрация химотрипсинового гидролизата восстановленного фрагмента В I-1 (в) на сефадексе G-25 — (1,7×80 см) в 0,1 М NH₄OH; скорость элюции 30 мл/ч (фракция I — АхI; II — АхII; III — АхIII и IV — АхIV)

Рис. 7. Гель-фильтрация химотрипсинового гидролизата окисленного фрагмента В I-1 (о) на сефадексе G-50 (2,5×160 см) в 0,1 М NH₄OH, скорость элюции 45 мл/ч (пик I — ОхI; II — ОхII и III — ОхIII)

разующегося из метионина при расщеплении белков ВгСN. Окисленный фрагмент В I-1 (о) * не расщеплялся карбоксипептидазой А, поэтому для изучения его С-концевого участка использовали восстановленный и алки-

* Для того, чтобы упростить номенклатуру пептидов, полученных из фрагмента В I-1, далее окисленная форма фрагмента обозначается индексом О, а алкилированная и восстановленная — А.

Аминокислотный состав трипсиновых пептидов из А

Аминокислота	т I-1	т I-2	т I-3	т II-2	т II-1	т IV	т II-4	т II-7	т III-1	т III-2	т III-3	т III-4
Trp	(4)	(4)										
CyA	2,0(2)	1,1(4)	1,1(4)	0,9(4)	1,0(4)		0,9(4)	1,1(4)	1,0(4)	1,0(4)		
Lys				0,9(4)	0,9(4)							
His	1,1(4)	1,0(4)		4,0(4)	1,1(4)				1,0(4)			1,1(4)
Arg	2,2(2)	2,1(2)		1,0(4)	1,0(4)		1,0(4)	3,0(3)	1,2(4)	1,0(4)	1,0	2,0(2)
Asx	1,9(2)	2,0(2)		0,9(4)	1,0(4)		1,0(4)					
Thr	1,8(2)	1,9(2)										
Ser	4,9(5)	4,2(4)	1,2(4)									1,2(4)
Glx	3,8(4)	2,8(3)	0,9(4)									
Pro	2,9(3)	1,0(4)	2,0(2)									
Gly	2,0(2)	1,1(4)	1,0(4)	1,0(4)								1,0(4)
Ala	2,0(2)	0,9(4)	0,9(4)									
Val	1,8(2)	1,9(2)	1,8(2)									
Ile	2,0(2)	1,9(2)		2,9(3)	3,0(3)		1,0(4)	1,8(2)	1,8(2)			
Leu	0,8(4)	0,9(4)		1,8(2)			1,1(4)	0,9(4)				
Tyr	0,8(4)			1,0(4)			0,9(4)					
Phe												
Общее количество остатков	32	22	10	12	7	5	6	7	5	4	1	5
N-концевой остаток	Ile	Glu	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Ile	Leu	Asp	Arg	Asp

Таблица 9

Аминокислотный состав химогрициновых пептидов из Ат I-2, А и О

Аминокислота	АтI-2хI	АтI-2х2	АтI-2х3	АхI	АхII	АхIII-1	АхIII-2	АхIV-1	АхIV-2	ОхII-1	ОхII-2	ОхII-3	ОхIII-1	ОхIII-2
Trp		(1)		1,1 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	0,9 (1)	1,0 (1)	0,9 (1)	1,1 (1)	1,0 (1)	1,9 (2)	1,0 (1)	
CyA	0,9 (1)			1,0 (1)	1,8 (2)				1,0 (1)	1,1 (1)	1,9 (2)	2,0 (2)	0,8 (1)	
Lys	1,0 (1)			2,2 (2)	2,0 (2)					2,1 (2)	2,0 (2)	2,1 (2)	1,0 (1)	
His	2,1 (2)			1,0 (1)	0,9 (1)					1,0 (1)	1,1 (1)	0,9 (1)	1,0 (1)	
Arg	1,0 (1)			2,1 (2)	1,8 (2)					0,9 (1)	1,9 (2)	1,8 (2)		
CyA	1,0 (1)			0,9 (1)		3,2 (3)	1,0 (1)							
Asx	2,1 (2)			1,1 (1)										
Thr	1,0 (1)	0,9 (1)	1,9 (2)	2,0 (2)										
Ser	1,2 (1)	2,1 (2)	1,1 (1)	0,9 (1)										
Glx		1,8 (2)	1,0 (1)	1,1 (1)										
Pro			1,0 (1)	1,0 (1)										
Gly				1,0 (1)										
Ala	1,0 (1)	1,0 (1)		1,0 (1)										
Val				1,9 (2)	1,0 (1)				4,8 (2)		0,9 (1)	1,0 (1)		0,9 (1)
Ile				0,8 (1)	0,9 (1)				0,8 (1)	0,9 (1)	1,0 (1)	3,1 (3)	1,9 (2)	
Leu		1,0 (1)									1,0 (1)	0,9 (1)		1,0 (1)
Tyr														
Phe														
Общее количество остатков	7	8	7	15	10	4	5	4	5	8	11	14	5	2
N-концевой остаток	Thr	Glu	Ser	Ser	Arg	Asn	Leu	Leu	CyA	Thr	Leu	Leu	Asn	Ile

лированный препарат. Гидролиз карбоксипептидазой А проводили в 1%-ном NaHCO_3 при 37° и соотношении фермент — субстрат 1 : 25. Отщепившиеся аминокислоты анализировали качественно (по реакции с Dns-Cl с последующей хроматографией негидролизованной и гидролизованной проб на полиамидных пластинках) и количественно в аминокислотном анализаторе «Unichrom».

После 15 мин переваривания были обнаружены карбамидометилцистеин и следовые количества аспарагина. Через 30 и 60 мин нарастало количество аспарагина ($\text{CysA}_{1,0}$; $\text{Asn}_{2,3}$; $\text{Phe}_{0,2}$; $\text{Tyr}_{0,2}$). Через 24 ч в карбоксипептидазном гидролизате найдено $\text{CysA}_{1,0}$; $\text{Asn}_{2,5}$; $\text{Phe}_{1,4}$; $\text{Tyr}_{0,8}$. Полученные результаты позволили предположить следующую С-концевую аминокислотную последовательность фрагмента VI-1 (в) *: (Phe , Phe , Tyr)- Asn - Asn - Asn - CysA .

Восстановленную форму фрагмента А подвергли гидролизу трипсином в течение 20 ч. При анализе аликвоты реакционной смеси на присутствие свободных аминокислот обнаружили аргинин. Продукты гидролиза разделяли на колонке с сефадексом G-25 в 0,1М ацетате аммония, pH 4,0 (рис. 5). Получили четыре фракции: АтI, АтII, АтIII и АтIV, из которых только последняя была гомогенной и имела тирозин на N-конце. Фракцию АтI очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-50, получили три гомогенных пептида: АтI-1, АтI-2, АтI-3 (табл. 8).

Фракции АтII и АтIII хроматографировали на бумаге ЗММ в системе А (рис. 3, з, u). Из АтII получили четыре гомогенных пептида: АтII-1, АтII-2, АтII-4 и АтII-7 (рис. 3, з; табл. 8). Из фракции АтIII выделили четыре фрагмента: АтIII-1, АтIII-2, АтIII-3 и АтIII-4 (рис. 3, u). Как можно видеть из табл. 8, АтIII-3 представлял собой свободный аргинин.

АтI-2 в дальнейшем гидролизовали химотрипсином в течение 6 ч и продукты гидролиза хроматографировали на бумаге ЗММ в системе А. Были выделены три пептида: АтI-2x1, АтI-2x2 и АтI-2x3 (рис. 3, в; табл. 9).

Фрагмент А гидролизовали также химотрипсином в течение 4 ч и смесь пептидов разделяли сначала на колонке с сефадексом G-25 в 0,1М NH_4OH (рис. 6), а затем хроматографией на бумаге. Фракции АхI и АхII представляли собой гомогенные пептиды (табл. 9). Из АхIII получили два пептида, тетрапептид АхIII-1 и пентапептид АхIII-2 (табл. 9). Из фракции АхIV выделили два фрагмента: АхIV-1 и АхIV-2.

Окисленный фрагмент О после гидролиза химотрипсином разделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50 в 0,1М NH_4OH (рис. 7) и выделили три фракции. Фракции ОхII и ОхIII очищали хроматографией на бумаге ЗММ. Из ОхII получили три пептида, один из которых (ОхII-1) имел на N-конце треонин и состоял из восьми аминокислот. Два других фрагмента (ОхII-2 и ОхII-3) имели на N-конце лейцин (рис. 3, л).

Из фракции ОхIII получили два пептида, один из которых (ОхIII-1) состоял из пяти аминокислот, а другой (ОхIII-2) был дипептидом (табл. 9).

Структура большей части выделенных пептидов представлена в табл. 10. Исследования установили полную последовательность 67 аминокислотных остатков во фрагменте VI-1.

Таким образом была изучена аминокислотная последовательность бромциановых фрагментов бычьего лактогенного гормона, на основании которых может быть представлена полная структура молекулы пролактина крупного рогатого скота (рис. 8).

В статье точно установлена локализация только двух фрагментов в пептидной цепи пролактина, а именно N-концевого BIV-2 и C-концевого VI-1. Кроме того, показано, что фрагмент VI-2 связан в молекуле пролактина с BIV-3, так как связь Met — Ser полностью расщеплялась BrCN и при хроматографии на КМ-целлюлозе продуктов расщепления (рис. 1) был получен фрагмент, идентичный по N-концевым аминокислотам VI, но отличающийся от него по аминокислотному составу присутствием фрагмента BIV-3. Расположение остальных бромциановых фрагментов в молекуле

Аминокислотная последовательность фрагмента В I-1

Пептид	Аминокислотная последовательность или состав
A	NH ₂ -Ile-Phe-Gly-Gln-Val-Ile-Pro-Gly- (Trp, Lys ₄ , His, Arg ₄ , Asx ₆ , Thr ₃ , Ser ₅ , Glx ₄ , Pro ₃ , Gly, Ala ₃ , CyA ₂ , Val, Ile, Leu ₈ , Tyr ₄ , Phe) (Ile ₂ , Tyr), Asn-Asn-Asn-CyA
At I-1	NH ₂ -Ile (Trp, Lys ₂ , Arg, Asx ₂ , Thr ₂ , Ser ₂ , Glx ₅ , Pro ₁ , Gly ₃ , Ala ₂ , Val ₂ , Ile, Leu ₂ , Tyr, Phe)
At I-3	NH ₂ -Ile-Phe-Gly-Gln-Val-Ile-Pro-Gly-Ala-Lys-OH
At I-2	NH ₂ -Glu-Thr-Glu-Pro-Tyr-Pro-Val (Trp, Lys, Arg, Asx ₂ , Thr, Ser ₂ , Glx ₂ , Pro, Gly, Ala, Leu ₂)
At I-2x2	NH ₂ -Glu-Thr-Glu-Pro-Tyr-Pro-Val-Trp-OH
Ax I	NH ₂ -Ser-Gly-Leu-Pro-Ser-Leu-Gln-Thr (Lys, Arg, Asx ₂ , Glx, Ala, Tyr)
Ox II-1	NH ₂ -Thr-Lys-Asp-Glu-Asp-Ala-Arg-Tyr-OH
At II-2	NH ₂ -Tyr-Ser-Ala-Phe-Tyr-Asn-Leu (His, Arg, CyA, Leu ₂)
At II-1	NH ₂ -Asn-Leu-Leu-His-CyA-Leu-Arg-OH
Ox II-3	NH ₂ -Leu-Arg-Arg-Asp-Ser-Ser-(Lys ₂ , Asx, Thr, Ile, Leu, Tyr) Leu-OH
At III-2	NH ₂ -Asp-Ser-Ser-Lys-OH
At II-4	NH ₂ -Ile-Asp-Thr-Tyr-Leu-Lys-OH
Ax III-2	NH ₂ -Leu-Lys-Leu-Leu-Asn-OH
At III-1	NH ₂ -Leu-Leu-Asn-CyA-Arg-OH
Ax IV-2	NH ₂ -CyA-Arg-Ile-Ile-Tyr-OH
At II-7	NH ₂ -Ile-Ile-Tyr-Asn-Asn-Asn-CyA
Последовательность	NH ₂ -Ile-Phe-Gly-Gln-Val-Ile-Pro-Gly-Ala-Lys-Glu-Thr-Glu-Pro-Tyr-Pro-Val- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 Trp-Ser-Gly-Ileu-Pro-Ser-Leu-Gln-Thr-Lys-Asp-Glu-Asp-Ala-Arg-Tyr-Ser- 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 Ala-Phe-Tyr-Asn-Leu-Leu-His-Cys-Leu-Arg-Arg-Asp-Ser-Ser-Lys-Ile-Asp- 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 Thr-Tyr-Leu-Lys-Leu-Leu-Asn-Cys-Arg-Ile-Ile-Tyr-Asn-Asn-Asn-Cys-OH 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67

бычьего пролактина представлено по аналогии с известной структурой овечьего гормона [3]. Исследования показали, что бычий и овечий гормоны очень сходны по химической структуре. Из рис. 8 можно видеть, что они различаются расположением только пяти аминокислотных остатков в положениях 10, 31, 35, 107 и 164, причем первые три представляют собой замены остатков дикарбоновых кислот на соответствующие амиды и только в 107-м положении имеется замена аланина на валин и в 164-м — тирозина на гистидин.

Некоторые свойства бычьего пролактина были исследованы ранее, Так, Тивей и Льюис [7], изучая аминокислотный состав пептидов, образующихся при гидролизе бычьего и овечьего пролактина трипсином, правильно предсказали замену валина на аланин в бычьем пролактине в 104-м положении, но допустили ошибку при постулировании различий в 164-м положении. Естественно, такие исследования не могли также определить расположение дикарбоновых аминокислот и их амидов, так как последние разрушаются при кислотном гидролизе. Вместе с тем в настоящее время имеются данные, которые заставляют думать, что наличие амидов или остатков свободных дикарбоновых кислот в пептидной цепи гормонов может оказывать заметное влияние на их лактогенную активность [8]. Неполная первичная структура пролактина крупного рогатого скота была предложена также Уоллисом в Атласе последовательностей и структуры белков [9]. Она в значительной степени совпадает со структурой, представленной в данной статье. Однако, по данным Уоллиса, бычий и овечий

гормоны не отличаются расположением амидов в N-концевой части молекулы, что противоречит нашим исследованиям и данным Графа и соавт. [10], которые также идентифицировали аспарагин в 10-м положении в 16-членном N-концевом фрагменте бычьего гормона. Более того, по последним данным Найалла и соавт. [11], в 10-м положении в молекуле овечьего пролактина также содержится остаток аспарагина, а не аспарагиновой кислоты, как было установлено ранее [3].

На рис. 8 можно видеть, что молекула пролактина представляет собой полипептидную цепь, состоящую из 198 аминокислотных остатков. Она имеет две небольшие петли на N- и C-концах, образованные дисульфидными мостиками, и одну большую петлю в центре молекулы. В пролактине содержатся два остатка триптофана и по семь остатков метионина и гистидина. Больше всего в нем серина (15 остатков) и лейцина (22 остатка).

Среди пролактинов разных видов животных гормон крупного рогатого скота, возможно, представляет наибольший интерес, так как именно ему люди обязаны значительной частью потребляемых молочных продуктов. Этот гормон регулирует обменные процессы в организме крупного рогатого скота таким образом, что они оказываются направленными на поддерживание высокой функциональной активности молочных желез.

Как уже отмечалось, бычий и овечий пролактин очень сходны и составляют обособленную группу. По предварительным данным, пролактин человека [11], свиньи [2, 12], крысы и кита [2] заметно отличаются от них по структуре, но обнаруживают значительное сходство между собой. Изучение последних пока находится в стадии развития, но установление их структуры несомненно представит дополнительные сведения о видовой специфичности и консервативных структурах в молекуле гормона, ответственных за его лактогенную активность.

Экспериментальная часть

Окисление надмуравьиной кислотой. Надмуравьиную кислоту получали смешиванием одной части 30%-ной перекиси водорода и девяти частей 98%-ной муравьиной кислоты и инкубацией смеси в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре. Белок растворяли в надмуравьиной кислоте (10 мг/мл) и выдерживали в течение 1 ч при 0° в темноте. Реакционную смесь разбавляли дистиллированной водой в 2—3 раза и дважды лиофилизировали. Выделение и очистку пептидов проводили на колонке с сефадексом G-50 в 0,1 M NH₄OH.

Восстановление и алкилирование. Для расщепления дисульфидной связи применяли восстановление дитиотреитолом и алкилирование иодацетамидом [13]. Белок растворяли в дистиллированной воде (5 мг/мл), pH раствора доводили до 8,1 и добавляли 20-кратный молярный избыток дитиотреитола по отношению к содержанию цистеина в белке. Восстановление проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем pH смеси повышали до 8,4 и добавляли иодацетамид в 10-кратном избытке по отношению к восстанавливающему реактиву. Алкилирование проводили в течение 10 мин. Избыток реактивов удаляли обессоливанием на колонке с сефадексом G-25 (2,5×100) в 0,1 M NH₄OH и пептиды разделяли на колонке с сефадексом G-50 в 0,1 M аммонийно-ацетатном буфере, pH 4,0 (рис. 2).

Ферментативный гидролиз. Гидролиз B₇CN-фрагментов пролактина трипсином и химотрипсином проводили в 0,2 M аммонийно-ацетатном буфере (pH 8,5) при 37° в течение 2, 18 или 24 ч при инкубации с трипсином и 2 и 24 ч при инкубации с химотрипсином. Фермент-субстратное отношение 1 : 50. После окончания гидролиза пробы разбавляли дистиллированной водой в 3—4 раза и лиофилизовали.

Распределительная хроматография на бумаге. Продукты ферментативного гидролиза разделяли и очищали хроматографией на бумаге ватман

3 ММ в системах растворителей: (А) *n*-бутанол — CH_3COOH — вода, 4 : 1 : 5, и (Б) *n*-бутанол — CH_3COOH — пиридин — вода, 15 : 3 : 10 : 12. Пептиды открывали реакцией с пингидрином и обнаруженные фракции элюировали с бумаги 0,005 М NH_4OH .

Изучение первичной структуры пептидов. Аминокислотный состав пептидов определяли на автоматическом аминокислотном анализаторе TSM «Technicon» после гидролиза 5,7 М HCl при 110° в запаянных ампулах в течение 24 ч. Последовательность аминокислотных остатков изучали методом Эдмана с идентификацией N-концевых аминокислот по реакции с Dns-Cl с последующей ТСХ Dns-производных на полиамидных пластинках. Используемый метод более подробно описан в работе [14].

Для идентификации пептидов, содержащих аргинин, использовали реакцию Сакагуши, а для пептидов, содержащих триптофан, — реакцию Эрлиха [15]. Идентификацию остатков дикарбоновых аминокислот и их амидов проводили путем ТСХ их фенилтиогидантоиновых производных на пластинках «силуфол УФ-254» в системе *n*-гептан — *n*-бутанол — 75%-ная HCOOH (50 : 30 : 9) [16]. На соответствующем этапе отщепления по Эдману фенилтиогидантоиновое производное аминокислоты экстрагировали этилацетатом, упаривали в вакууме до объема 2—3 капли и наносили на пластинку. Идентификацию пятен проводили путем сравнения со стандартным фенилтиогидантоиновым производным дикарбоновых кислот и их амидов. Расположение пятен на хроматограмме определяли при освещении пластинки ультрафиолетовым светом.

Идентификация Dns-His, Dns-Arg и Dns-Lys. Dns-производные гистидина, аргинина и ϵ -лизина плохо разделяются при ТСХ на полиамидных пластинках в обычных системах [17]. Поэтому для их определения использовали хроматографию на силуфоле в системе бензол — 2-хлорэтанол — 25%-ная NH_4OH (6 : 10 : 4) [18] и на полиамидных пластинках в системе 0,05 М Na_3PO_4 — этанол (3 : 1) [19].

ЛИТЕРАТУРА

1. Nicoll C. S., Bern H. A. (1972) in Lactogenic Hormone (Wolstenholme G. E. W., Knight J. Eds.), p. 299—324, Churchill Livingstone.
2. Панков Ю. А. (1974) Пробл. эндокринолог., XX, № 3, 104—114.
3. Li C. H., Dixon J. S., Lo T.-B., Schmidt K. D., Pankov Y. A. (1970) Arch. Biochem. and Biophys., 144, 705—737.
4. Baranyai P., Nagy I., Kurcz M., Orosz A. (1966) Nature, 212, 1255—1256.
5. Панков Ю. А., Елизарова Г. П. (1971) Пробл. эндокринолог., XVII, № 5, 92—96.
6. Панков Ю. А., Елизарова Г. П. (1973) Вопр. мед. химия, 19, 278—282.
7. Seavey B. K., Lewis U. I. (1971) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 42, 905—910.
8. Sherwood L. M., Handwerker S., McLaurin W. D., Lanner M. (1971) Nature New Biol., 233, 59—61.
9. Dayhoff M. O. (1972) in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, D-202. National Biomedical Research Foundation.
10. Graf L., Cseh G., Nagy I., Kurcz M. (1970) Acta biochim. et biophys. Acad. scient. hung., 5, 299—303.
11. Niall H. D., Hogan M. L., Tregear G. W., Segre G. V., Ilwang P., Friesen H. (1973) Recent Progr. Hormone Res., 29, 387—416.
12. Seavey B. K., Singh R. N. P., Lindsey T. T., Lewis U. I. (1973) Gen. and Comp. Endocrinol., 21, 358—367.
13. Bewley T. B., Li C. H. (1969) Int. J. Protein Res., 1, 117—124.
14. Панков Ю. А. (1970) Пробл. эндокринолог., XVI, № 4, 110—117.
15. Панков Ю. А., Юдаев Н. А. (1972) Биохимия, 37, 991—1004.
16. Jeppsson J.-A., Sjöquist J. (1967) Anal. Biochem., 18, 264—269.
17. Wood K. R., Wang K. T. (1967) Biochim. et biophys. acta, 133, 369—370.
18. Schally A. V., Baba I., Nair R. M. G., Bennett C. D. (1971) J. Biol. Chem., 246, 6647—6650.
19. Hartley B. S. (1970) Biochem. J., 119, 805—822.

Поступила в редакцию
10.VII.1974

THE PRIMARY STRUCTURE OF BOVINE PROLACTIN

N. A. YUDAEV, Yu. A. PANKOV, G. P. ELIZAROVA, Z. HAN,
O. P. NIKOLAEVA

*Institute of Experimental Endocrinology and Hormone Chemistry,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

The homogeneous preparation of bovine prolactin was cleaved with cyanogen bromide and the mixture of the resulting peptides was fractionated by gel filtration on Sephadex and ion-exchange chromatography on CM-cellulose. Eight peptides were isolated and hydrolyzed, using trypsin and chymotrypsin, and products of the digest were fractionated by gel filtration and paper chromatography. N-Terminal amino acid residues were determined by the «dansyl» method and N-terminal sequences -- by the «dansyl»-Edman technique. The analysis of overlapping peptides permitted to deduce the amino acid sequences of all 8 cyanogen bromide fragments and to determine the total primary structure of bovine prolactin. Comparison of the structure with that of bovine prolactin [Li et al. (1970), Arch. Biochem. Biophys. 144, 705] revealed five replacements in the polypeptide chain of bovine prolactin: Asp¹⁰→Asn¹⁰, Asn³¹→Asp³¹, Glu³⁵→Gln³⁵, Val¹⁰⁷→Ala¹⁰⁷ and His¹⁶⁴→Tyr¹⁶⁴. These results testify to considerable similarity of the chemical structure and evolutionary relationship of lactogenic hormones of both species.
