



УДК 577.412.5

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БРОМЦИАНОВЫХ ПЕПТИДОВ  
 $\alpha$ - И  $\beta$ -СУБЪЕДИНИЦ ТРАНСДУЦИНАЛиткин В. М., Обухов А. П., Богачук А. П.,  
Тележиская И. Н., Шемякин В. В.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук, Москва

Проведено расщепление бромцианом  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц GTP-связывающего белка (трансдуцина) из сетчатки глаз крупного рогатого скота. Из полученной смеси фрагментов выделены пептиды (21), составляющие в сумме 90–100% аминокислотной последовательности  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц белка. Определена полная или частичная последовательность выделенных пептидов и проведено сравнение полученных результатов с недавно опубликованными данными Нумы и др. [1], а также Лошри и др. [2] по первичной структуре  $\alpha$ -субъединицы трансдуцина, выведенной из нуклеотидной последовательности соответствующей кДНК. Показано, что структура, опубликованная Лошри, значительно отличается от истинной структуры  $\alpha$ -субъединицы. Это, вероятно, связано с тем, что авторы выделили кДНК, соответствующую гену не  $\alpha$ -субъединицы трансдуцина, а какого-то другого GTP-связывающего белка, гомологичного трансдуцину. Имеется ошибка и в структуре, опубликованной Нумой.

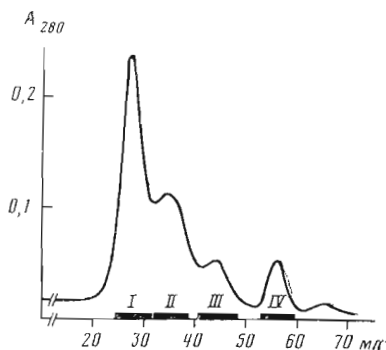
Приведена первичная структура  $\alpha$ -субъединицы трансдуцина. Полипептидная цепь белка состоит из 349 аминокислотных остатков.

Трансдуцин, периферическая мембранная GTP-аза, содержащаяся в фоторецепторных дисках наружных сегментов палочек сетчатки, осуществляет сопряжение между родоопсином и фосфодиэстеразой cGMP в процессе зрительного каскада [3]. Молекулярная масса этого белка равна 85 кДа. Он состоит из  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц с  $M$  40, 36 и 8 кДа соответственно [4].

Настоящая работа представляет собой часть комплексных исследований по выяснению первичной структуры и механизма функционирования белков, принимающих участие в преобразовании зрительного сигнала. Ранее нами были разработаны методы разделения субъединиц трансдуцина из сетчатки крупного рогатого скота и определены их аминокислотные составы, а также установлена полная аминокислотная последовательность  $\gamma$ -субъединицы [5, 6]. Цель данной работы — изучение продуктов бромцианового расщепления  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц.

В нативном состоянии трансдуцин сравнительно хорошо растворим в водных растворах с умеренной ионной силой, однако его  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы после выделения в индивидуальной форме быстро агрегируют и ста-

Рис. 1. Разделение бромциановых пептидов  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (сверхтонкий) в 20% уксусной кислоте. Прямоугольниками отмечены границы объединенных фракций



Аминокислотный состав бромциановых пептидов  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц трансдуцина

Аминокислота	Пептиды							
	I-1	I-2, II-2	I-3	I-4, II-3	II-1	II-4	II-5	II-6
Asp	4	7	7	12	4	2	10	9
Thr	2	4	5	3	2	2	3	5
Ser	4	2	8	6	1	4	5	7
Glu	2	4	8	—	2	8	5	9
Pro	1	1	4	—	—	—	2	2
Gly	3	3	10	7	1	4	2	4
Ala	4	4	9	5	2	6	3	3
Val	2	—	4	5	—	2	3	4
Cys(Cm)	1	1	—	2	—	—	2	1
Met(Hse)	1	1	1	1	1	1	1	1
Ile	—	3	3	2	1	1	5	5
Leu	4	3	4	6	2	6	7	7
Tyr	—	—	1	1	1	—	4	4
Phe	1	4	2	2	—	—	6	4
His	—	1	2	2	—	1	4	—
Lys	1	—	2	2	1	8	6	3
Arg	2	3	3	3	2	2	1	6
Trp	1	—	1	1	—	—	—	1
N-Концевая	X*	X	His	Thr	Thr	Ala	His	Ser
Число остатков	33	41	74	60	20	47	69	75
Выход, %	6,5	25	8	22	14,5	16	19,5	15

Аминокислота	Пептиды							
	II-7	III-1	III-2	III-3	III-4	III-5	III-6	III-7
Asp	2	1	—	1	3	6	2	6
Thr	1	—	2	2	1	2	1	4
Ser	2	1	—	1	3	2	2	—
Glu	5	1	—	2	1	8	3	2
Pro	—	—	—	1	1	1	—	—
Gly	2	—	1	2	2	1	3	1
Ala	3	—	2	2	3	4	3	2
Val	1	1	—	1	2	1	2	3
Cys(Cm)	1	—	—	—	—	1	2	2
Met(Hse)	1	1	1	1	1	1	1	—
Ile	7	1	1	1	—	3	4	3
Leu	4	—	2	2	3	3	1	2
Tyr	2	1	1	1	—	—	1	—
Phe	1	—	—	1	1	—	3	3
His	1	1	1	1	—	—	1	—
Lys	1	1	1	1	1	2	2	3
Arg	1	2	4	2	2	3	2	—
Trp	—	—	—	—	1	—	1	—
N-Концевая	Lys	Arg	Arg	X	Ser	X	Phe	Thr
Число остатков	35	11	16	22	25	38	34	31
Выход, %	12	24	41	4,5	18	32,5	28,5	30

новятся плохо растворимыми в 8 М мочеvine и даже в 70% муравьиной кислоте. Выяснено, что бромциановое расщепление лучше всего проводить на смеси  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц. Их получают при диализе раствора предварительно карбоксиметилированного свежего препарата трансдуцина в буфере, содержащем 6 М гидрохлорид гуанидина, против аммиачной воды (рН 9). При этом  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы выпадают в осадок, а  $\gamma$ -субъединица остается в растворе. Полученный материал осадка отделялся центрифугированием, быстро растворялся в муравьиной кислоте и расщеплялся бромцианом.

В состав  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц трансдуцина входит ~20 остатков метионина. Кроме того, при хроматографии на колонке с обращенной фазой бромциановые пептиды обычно элюируются парными пиками (за счет присутствия С-концевых остатков гомосерина в двух различных формах —

Аминокислота	Пептиды				
	IV-1	IV-2	IV-3	$\alpha$ -1	$\alpha$ -2
Asp	1	3	2	—	—
Thr	2	—	1	—	—
Ser	—	—	2	—	—
Glu	2	2	—	—	1
Pro	—	—	—	—	1
Gly	1	—	1	—	—
Ala	1	—	2	—	—
Val	—	3	1	—	—
Cys (Cm)	—	—	—	—	—
Met (Hse)	1	1	—	1	1
He	1	—	1	—	—
Leu	—	1	1	—	—
Tyr	—	—	—	—	—
Phe	—	—	1	—	—
His	—	—	—	1	—
Lys	—	—	1	—	1
Arg	—	1	—	—	—
Trp	—	—	2	—	—
N-Концевая	Ala	Val	Ala	His	Pro
Число остатков	9	11	15	2	4
Выход, %	14	20	55	25	20

\* X — N-концевая аминокислота неидентифицирована (возможно, за счёт блокированной  $\alpha$ -аминогруппы).

кислота и лактон). Разделение же смеси, содержащей свыше 40 высокомолекулярных пептидов, даже методом ВЭЖХ представляет собой весьма трудную задачу. Поэтому было решено провести предварительное фракционирование полученных пептидов гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50, уравновешенным 20% уксусной кислотой. В результате хроматографии были получены четыре объединенные фракции (рис. 1).

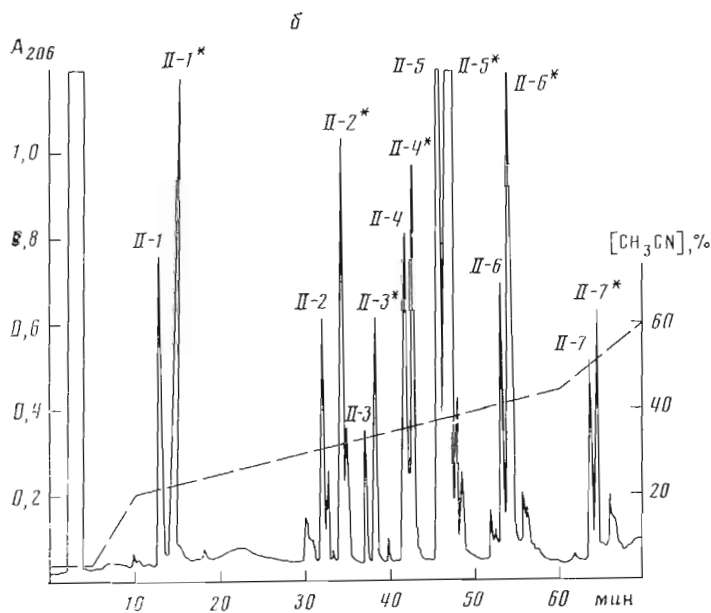
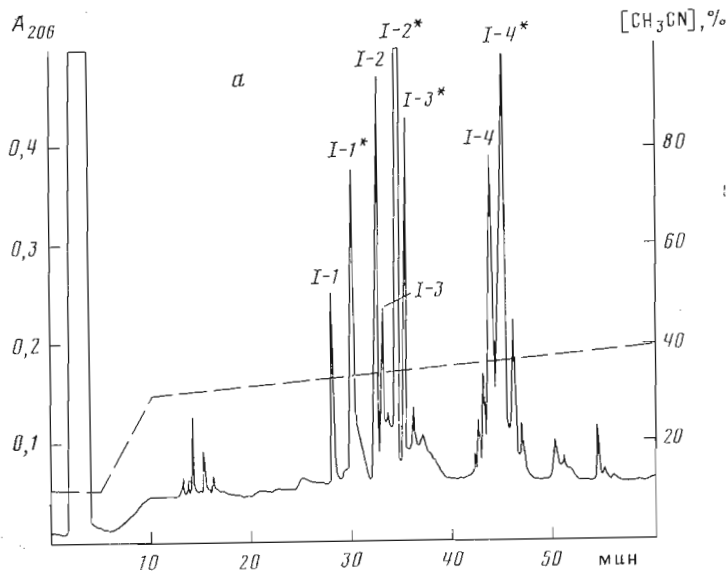
Выделение индивидуальных пептидов из этих фракций осуществлялось методом ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой Nucleosil 7 C<sub>18</sub>. Элюирование проводилось градиентом концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте (рис. 2a—г).

Пептиды I-4, I-4\*, II-5, III-2 и III-2\* дополнительно очищали рехроматографией на колонке Synchronak C<sub>4</sub> 6,5 (данные не приводятся).

Для всех полученных пептидов определяли аминокислотный состав и N-концевые аминокислотные остатки (табл. 1). Всего, таким образом, из бромцианового гидролизата было выделено 19 индивидуальных пептидов, содержащих от 9 до 75 аминокислотных остатков. Характерно, что все бромциановые пептиды, за исключением C-концевых, при хроматографии на колонке с обращенной фазой элюировались двумя пиками.

Для получения более коротких пептидов  $\alpha$ -субъединицы ее выделяли электрофорезом на ацетатцеллюлозе [6] и расщепляли бромцианом. Смесь фрагментов первоначально фракционировали гель-фильтрацией на сефадексе G-10 и низкомолекулярные фракции далее разделяли на колонке с Ultrasphere ODS 5. Таким образом были получены пептиды  $\alpha$ -1 и  $\alpha$ -2.

N-Концевые последовательности полученных пептидов определяли автоматической деградацией на секвенаторе и методом Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 5-диметиламино-1-нафталинсульфонильных (Dns) производных и фенилтиогидантоинов (Pth). Была выяснена полная структура 5 и частичная структура 5 пептидов (табл. 2). При установлении полной структуры некоторых пептидов проводилось дополнительное расщепление трипсином (пептиды III-2, III-7 и IV-3) или протеиназой из *Staphylococcus aureus* (пептид II-4) с последующим разделением полученных фрагментов методом ВЭЖХ на колонке Nucleosil 7 C<sub>18</sub>. (данные не приводятся). Результаты анализа структуры этих пептидов представлены в табл. 3—6.



Недавно одновременно в двух лабораториях была определена нуклеотидная последовательность комплементарной ДНК  $\alpha$ -субъединицы трансдукции из сетчатки крупного рогатого скота [1, 2]. Поражает, насколько сильно эти структуры отличаются друг от друга. В частности, выведенные из них аминокислотные последовательности имеют различия в 69 положениях (рис. 3). Различия в нуклеотидной последовательности значительно больше. Сравнение этих структур с определенной нами аминокислотной последовательностью бромциановых пептидов позволило установить, что пептиды II-1, II-4 — II-7, III-1, III-6, III-7, IV-1, IV-2,  $\alpha$ -1 и  $\alpha$ -2 относятся к  $\alpha$ -субъединице, и определить их положение в полипептидной цепи белка. Пептиды I-1 — I-4, III-2 — III-5 и IV-3 отнесены к  $\beta$ -субъединице. Аминокислотная последовательность бромциановых пептидов  $\alpha$ -субъединицы практически полностью согласуется со структурой, установленной Нумой и др. [1], и значительно отличается от структуры Лоури и др. [2] (рис. 3). Трудно предположить, что авторы работы [2] допустили так много ошибок при определении нуклеотидной последовательности кДНК.

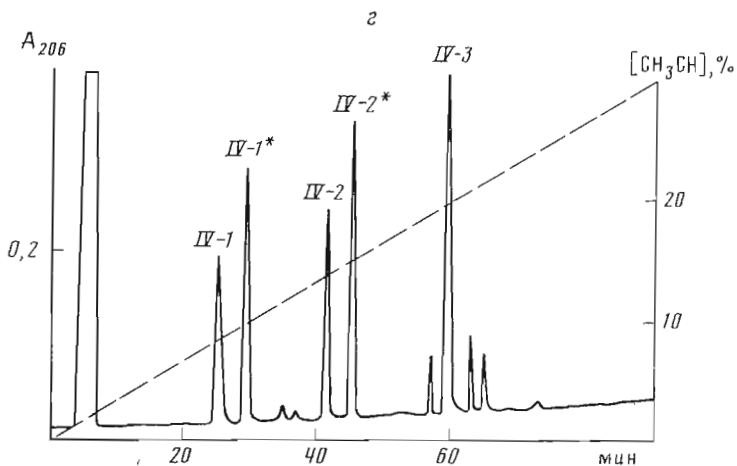
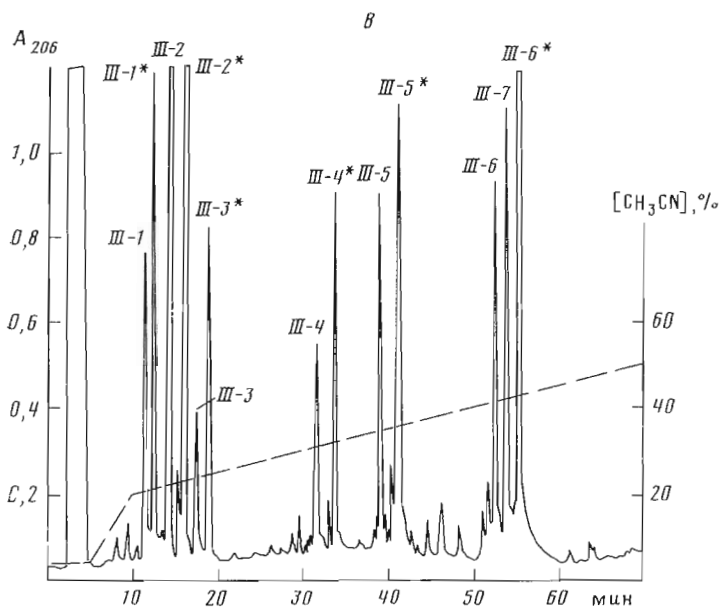


Рис. 2. Разделение пептидов фракций I (а), II (б), III (в), IV (г) бромцианового расщепления (см. рис. 1) с помощью ВЭЖХ на колонке (0,46×25 см) с носителем Nucleosil 7 C<sub>18</sub> в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте. Одинаковыми номерами (со звездочкой и без нее) обозначены пары бромциановых пептидов, различающихся формой С-концевого остатка гомосерина. Пунктирной линией отмечено изменение концентрации ацетонитрила

Скорее всего, обнаруженные различия связаны с тем, что выделенная кДНК соответствует гену не  $\alpha$ -субъединицы трансдуцина, а какого-то другого GTP-связывающего белка, гомологичного трансдуцину. Известно большое число таких белков, чрезвычайно близких как по структурным, так и по функциональным характеристикам [7, 8].

В то же время в структуре, опубликованной Нумой, также имеется ошибка. Нами была установлена структура бромцианового пептида II-4, имеющего в качестве N-концевого аминокислотного остатка остаток аланина и соответствующего последовательности 2–48  $\alpha$ -субъединицы. Согласно специфичности бромцианового расщепления, перед этим остатком аланина должен располагаться остаток метионина, а не глицина, как в структуре у Нумы. Ошибка, вероятно, произошла в результате того, что в нуклеотидной последовательности ATGGGG, кодирующей, по данным Нумы, N-концевые остатки метионина и глицина, между гуанинами-5 и -6 был выпущен тимидин. Не исключено, что это явилось результатом

**Аминокислотная последовательность бромциановых пептидов  $\alpha$ -субъединицы трансдуцина**

Пептиды	Установленная аминокислотная последовательность *	Местоположение в цепи белка
II-1	Thr-Thr-Leu-Asn-Ile-Gln-Tyr-Gly-	84-91
II-5	His-Glu- X-Leu-His-Leu-Phe-Asn- X-Ile-	239-248
II-6	Ser-Asp-Ile-Ile-Gln-Arg-Leu-Trp-Lys-Asp-	119-128
II-7	Lys-Ile-Ile-His-Gln-Asp-Gly-Tyr-	49-56
III-1	Arg-Arg-Asp-Val-Lys-Glu-Ile-Tyr-Ser-His-Hse	308-318.
III-6	Phe-Asp-Val-Gly-Gly-Gln-Arg- X-Glu-Arg-Lys-Lys-	194-205.
IV-1	Ala-Asp-Thr-Ile-Glx-Glx-Gly-Thr-Hse	106-114
IV-2	Val-Leu-Val-Glu-Asp-Asp-Glu-Val-Asn-Arg-Hse	228-238.
$\alpha$ -1	His-Hse	104-105.
$\alpha$ -2	Pro-Lys-Glu-Hse	115-118

\* Здесь и далее стрелками показаны стадии деградации по методу Эдмана с идентификацией Dns-( $\rightarrow$ ), Dns- и Pth( $\rightarrow$ ) производных аминокислот;  $\rightarrow$  — аминокислоты, определенные автоматической деградацией на секвенаторе; X — неидентифицированная аминокислота.

компрессии и пропущенный тимидин был помещен между аденином-1 и гуанином-3. В результате вставки пропущенного тимидина образуется иницирующий триплет GTC, кодирующий остаток N-концевого метионина.

Нам было обнаружено, что N-концевая аминогруппа  $\alpha$ -субъединицы блокирована — возможно, за счет ацетилирования. Природа блокирующей группы в настоящее время выясняется.

Таким образом, сравнение наших результатов по аминокислотной последовательности пептидов с данными Нумы [1] позволяет сделать вывод, что полипептидная цепь  $\alpha$ -субъединицы состоит из 349 аминокислотных остатков.

Из выделенных нами бромциановых пептидов 12 относятся к  $\alpha$ -субъединице, 9 — к  $\beta$ -субъединице. По аминокислотному составу эти пептиды покрывают всю полипептидную цепь  $\alpha$ -субъединицы и более 90% полипептидной цепи  $\beta$ -субъединицы. Пептид IV-3, не имеющий в своем составе гомосерина и содержащий на C-конце последовательность Trp-Asp, вероятно, является C-концевым пептидом  $\beta$ -субъединицы трансдуцина. На основании установленной структуры пептидов  $\beta$ -субъединицы синтезированы нуклеотидные зонды, с помощью которых проводится работа по выделению структурного гена  $\beta$ -субъединицы трансдуцина.

### Экспериментальная часть

В работе использовали бромциан, 5-диметиламино-1-нафталинсульфонилхлорид, дитиотреит (Serva, ФРГ), трипсин (Calbiochem, США), протеиназу из *St. aureus* (Miles, Англия), ацетонитрил Art. 16, моноацетамида (свежеперекристаллизованный из бензола), муравьиную кислоту (Merck, ФРГ), трифторуксусную кислоту, гидрохлорид гуанидина (Pierce, США), трис-гидроксиметиламинметан, бикарбонат аммония (Sigma, США), сефадексы G-50 (сверхтонкий) и G-10 (Pharmacia, Швеция). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Выделение трансдуцина и  $\alpha$ -субъединицы проводили так, как описано в [6].



1-20 Met-Gly-Ser *Arg* *Glu-Leu-Ala-Lys-Arg* *Lys* *Gln*  
Met-Ala-Gly-Ala-Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-His-  
Ser-Arg-Glu-Leu-Glu-Lys-Lys-Leu-Lys-Glu-

21-45 *Asp* *Glu* *Lys*  
Asp-Ala-Glu-Lys-Asp-Ala-Arg-Thr-Val-Lys-Leu-Leu-Gly-Ala-Gly-Glu-Ser-Gly-Lys-Ser-Thr-Ile-Val-

46-70 Lys-Gln-Met-Lys-Ile-Ile-His-Gln-Asp-Gly-Tyr-Ser-Leu-Glu-Glu-Cys-Leu-Glu-Phe-Ile-Ala-Ile-Ile-Tyr-Gly-  
*Pro* *Tyr-Lys*

71-95 *Val* *Ile* *Pro* *Gly* *Asp* *Ala-Glu-Val-Ser-Cys*  
Asn-Thr-Leu-Gln-Ser-Ile-Leu-Ala-Ile-Val-Arg-Ala-Met-Thr-Thr-Leu-Asn-Ile-Gln-Tyr-Gly-Asp-Ser-Ala-Arg-

96-120 *Val* *Asn-Gly* *Gln* *Asn-Asn-Leu* *Ser* *Pro* *Leu-Val-Glu*  
Gln-Asp-Asp-Ala-Arg-Lys-Leu-Met-His-Met-Ala-Asp-Thr-Ile-Glu-Glu-Gly-Thr-Met-Pro-Lys-Glu-Met-Ser-Asp-

121-145 *Val* *Arg-Lys* *Gly* *Val* *Ala*  
Ile-Ile-Gln-Arg-Leu-Trp-Lys-Asp-Ser-Gly-Ile-Gln-Ala-Cys-Phe-Asp-Arg-Ala-Ser-Glu-Tyr-Gln-Leu-Asn-Asp-

146-170 *Ser* *Asn-Gln* *Asp* *Ile-Thr-Ala* *Asp* *Leu* *Asn*  
Ser-Ala-Gly-Tyr-Tyr-Leu-Ser-Asp-Leu-Glu-Arg-Leu-Val-Thr-Pro-Gly-Tyr-Val-Pro-Thr-Gln-Gln-Asp-Val-Leu-

171-195 Arg-Ser-Arg-Val-Lys-Thr-Thr-Gly-Ile-Ile-Glu-Thr-Gln-Phe-Ser-Phe-Lys-Asp-Leu-Asn-Phe-Arg-Met-Phe-Asp-  
*Lys* *Val*



196-220	<u>Val-Gly-Gly-Gln-Arg-Ser-Glu-Arg-Lys-Lys-Trp-Ile-His-Cys-Phe-Glu-Gly-Val-Thr-Cys-Ile-Ile-Phe-Ile-Ala-</u>	<i>Cys</i>
221-245	<u>Ala-Leu-Ser-Ala-Tyr-Asp-Met-Val-Leu-Val-Glu-Asp-Asp-Glu-Val-Asn-Arg-Met-His-Glu-Ser-Leu-His-Leu-Phe-</u>	
246-270	<u>Asn-Ser-Ile-Cys-Asn-His-Arg-Tyr-Phe-Ala-Thr-Thr-Ser-Ile-Val-Leu-Phe-Leu-Asn-Lys-Lys-Asp-Val-Ile-Phe-Ser-</u>	<i>Lys-Phe</i> <i>Ala</i> <i>Leu</i> <i>Glu</i>
271-295	<u>Glu-Lys-Ile-Lys-Lys-Ala-His-Leu-Ser-Ile-Cys-Phe-Pro-Asp-Tyr-Asn-Gly-Pro-Asn-Thr-Tyr-Glu-Asp-Ala-Gly-</u>	<i>Val</i> <i>Glu</i> <i>Asp</i> <i>Asn</i> <i>Ser</i>
296-320	<u>Asn-Tyr-Ile-Lys-Val-Gln-Phe-Leu-Glu-Leu-Asn-Met-Arg-Arg-Asp-Val-Lys-Glu-Ile-Tyr-Ser-His-Met-Thr-Cys-</u>	<i>Ser</i> <i>Asp</i> <i>Lys</i>
321-345	<u>Ala-Thr-Asp-Thr-Gln-Asn-Val-Lys-Phe-Val-Phe-Asp-Ala-Val-Thr-Asp-Ile-Ile-Lys-Glu-Asn-Leu-Lys-Asp-</u>	
346-349	<u>Cys-Gly-Leu-Phe</u>	

Рис. 3. Аминокислотная последовательность  $\alpha$ -субъединицы трансдучина. Представлена структура, введенная из нуклеотидной последовательности кДНК, определенной Нумой [1] и подтвержденная нами с помощью анализа структуры пептидов. Установленная нами аминокислотная последовательность пептидов подчеркнута. Курсивом напечатаны несоответствующие аминокислотные остатки, соответствующие структуре, опубликованной Дюшри [2]. Вместо последовательности Met-Gly-Ala, опубликованной Нумой, в качестве N-концевой последовательности  $\alpha$ -субъединицы [1] напечатана соответствующая нашим результатам последовательность Met-Ala

Аминокислотная последовательность пептида III-2 ( $\beta$ -субъединица)

Анализируемый пептид *	Результаты анализа
III-2	Arg-Thr-Arg-Arg-Thr-Leu-Arg-Gly- X-Leu-Ala- $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$
T-2	Thr-Leu-Arg $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$
T-3	Gly-His-Leu-Ala-Lys $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$
T-4	Ile-Tyr-Ala-Hse $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$
Строение	Arg-Thr-Arg-Arg-Thr-Leu-Arg-Gly-His-Leu-Ala-Lys-Ile-Tyr-Ala-Hse

\* T — пептиды, полученные в результате гидролиза пептида III-2 трипсином.

Таблица 5

Аминокислотная последовательность пептида III-7 (319-349,  $\alpha$ -субъединица)

Анализируемый пептид *	Результаты анализа
III-7	Thr- X -Ala- -Asp- X-Gln-Asn-Val-Lys-Phe-Val-Phe-Asp-Ala-Val- $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$
T-1	Thr-Asp-Ile-Ile-Ile-Lys-Glu-Asn-Leu-Lys- $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$
T-4	Asp-Cys-Gly-Leu-Phe $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$
Строение	Thr-Cys-Ala-Thr-Asp-Thr-Gln-Asn-Val-Lys-Phe-Val-Phe-Asp-Ala-Val- $\leftarrow$ $\xrightarrow{\text{T-1}}$ $\leftarrow$ $\xrightarrow{\text{T-4}}$ $\leftarrow$ Thr-Asp-Ile-Ile-Ile-Lys-Glu-Asn-Leu-Lys-Asp-Cys-Gly-Leu-Phe

\* T — пептиды, полученные в результате гидролиза пептида III-7 трипсином.

Таблица 6

Аминокислотная последовательность пептида IV-3 (C-концевой  $\beta$ -субъединицы)

Анализируемый пептид *	Результаты анализа
IV-3	Ala-Val-Ala-Thr-Gly- X-Trp-Asp-Ser-Phe-Leu-Lys-Ile- $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$
T-1	Ala-Val-Ala-Thr-Gly-Ser-Trp-Asp-Ser-Phe- $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$
T-2	Ile-Trp-Asn $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$
Строение	Ala-Val-Ala-Thr-Gly-Ser-Trp-Asp-Ser-Phe-Leu-Lys-Ile-Trp-Asn

\* Пептиды, полученные в результате гидролиза пептида IV-3 трипсином.

*Карбоксиметилирование трансдуцина и получение смеси  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц.* Трансдуцин (100 нмоль) в 5 мл буферного раствора (0,2 М трис-HCl (pH 8,5), 0,2 М NaCl, 6 М гидрохлорид гуанидина) инкубировали 16 ч при 20° С с 10-кратным избытком дитиотрепта (3 мг) в расчете на цистеин. Затем добавляли 5-кратный мольный избыток иодацетамида (40 мг) в расчете на SH-группу и инкубировали смесь 1 ч в темноте при 20° С. Реакционную смесь после модификации диализовали против 800 мл аммиачной воды (pH 9). Полученную суспензию центрифугировали 10 мин при 2000g (T 51, MLW, ГДР). Осадок ресуспендировали в воде и центрифугирование повторяли.

Расщепление  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц бромцианом. Полученный после диализа осадок растворяли в 0,7 мл муравьиной кислоты, разводили водой до 70% HCOOH и добавляли 43 мг бромциана (200-кратный мольный избыток в расчете на метионин). Гидролиз проводили 20 ч при 20° С в темноте в атмосфере аргона. Реакционную смесь высушивали на ротационном испарителе.

Фракционирование бромциановых пептидов. Фрагменты бромцианового расщепления  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц растворяли в 0,7 мл 70% муравьиной кислоты и наносили на колодку (1×90 см, объем геля 70 см<sup>3</sup>) с сефадексом G-50 (сверхтопкий), уравновешенным 20% уксусной кислотой (рис. 1). Элюирование осуществляли при скорости потока 2 мл/ч с детектированием с элюата при 280 нм (спектрофотометр Uvicord S II, LKB, Швеция). Собирали фракции по 2 мл.

Объединенные фракции после хроматографии на сефадексе упаривали, растворяли в 1,5 мл 70% муравьиной кислоты и наносили на колодку (0,46×25 см) Nucleosil 7 C<sub>18</sub> (Macherey-Nagel, ФРГ). Элюирование проводили градиентом концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте при скорости потока 0,6–1,0 мл/мин с детектированием при 206 (спектрофотометр модели 852001-902, Du Pont, США) и 280 нм (спектрофотометр модели 153, Altex, США). ВЭЖХ осуществляли на хроматографе модели 322 (Altex, США).

При необходимости пептиды рехроматографировали на колонке (0,46×25 см) Synchronak C<sub>6</sub> 6,5 (Altex, США). Элюирование проводили в системе растворителей, использованной при выделении бромциановых пептидов.

Получение коротких бромциановых пептидов  $\alpha$ -субъединицы. 50 нмоль бромцианового гидролизата  $\alpha$ -субъединицы высушивали и растворяли в 0,7 мл аммиачной воды (рН 9). Суспензию центрифугировали 30 мин в настольной центрифуге модели 5414 (Eppendorf, ФРГ). Супернатант наносили на колодку (1×90 см, объем смолы 70 см<sup>3</sup>) с сефадексом G-10, уравновешенным аммиачной водой. Элюирование осуществляли при скорости потока 3,5 мл/ч с детектированием элюата при 206 нм (спектрофотометр Uvicord S II, LKB).

Фракции, содержащие низкомолекулярные пептиды, подвергали делению методом ВЭЖХ на колонке (0,46×15 см) Ultrasphere ODS 5 (Altex, США) с элюированием в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,01 М ацетате аммония (рН 4,5); детектирование осуществляли при 206 нм.

Дополнительное расщепление бромциановых пептидов и разделение образовавшихся пептидных фрагментов. Пептид (8–10 нмоль) растворяли в 50 мкл 0,1 М бикарбоната аммония (рН 8,0) и добавляли трипсин (фермент-субстратное соотношение 1:50) или протейназу из *St. aureus* (фермент-субстратное соотношение 1:20). Гидролиз проводили 4 ч при 37° С для трипсина или 16 ч для протейназы из *St. aureus*. Гидролизат лиофилизировали, растворяли в 0,5 мл 4% ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте и хроматографировали на колонке (0,46×25 см) Nucleosil 7 C<sub>18</sub> как описано при выделении бромциановых пептидов.

Определение аминокислотного состава пептидов. Пептидный материал (0,5 нмоль) высушивали, добавляли 100 мкл 5,7 н. HCl и запаивали в вакууме. Гидролиз проводили 20 ч при 110° С. По окончании гидролиза смесь высушивали.

Для количественного определения остатков триптофана высушенный пептидный материал (2 нмоль) помещали в ампулу, добавляли 150 мкл 4 н. метансульфоной кислоты и запаивали в вакууме. Гидролиз проводили 20 ч при 115° С. Ампулы вскрывали непосредственно перед анализом.

Аминокислотный состав пептидов определяли на аминокислотном анализаторе D-550 (Durrum, США).

Установление структуры выделенных пептидов. N-Концевую аминокислотную последовательность выделенных пептидов определяли химической деградацией по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 5-диметиламино-1-нафталинсульфонильных производных. При нали-

чий аспарагиновой и глутаминовой кислот и их амидов анализировали также их фенилтиогидантоины [9].

Аминокислотная последовательность выделенных пептидов определялась также с помощью автоматической деградации на секвенаторе 890C (Beckman, США) с использованием программы 122 974 и газофазном секвенаторе 470A (Applied Biosystems, США).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Tanabe T., Nukada T., Nishikawa Yo., Sugimoto K., Suzuki H., Takahashi H., Noda M., Haga T., Ishiyama A., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H., Numa S. *Nature*, 1985, v. 315, № 6016, p. 242–245.
2. Lochrie M. A., Hurlley J. B., Simon M. I. *Science*, 1985, v. 228, № 4695, p. 96–99.
3. Fung B. K.-K., Hurlley J. B., Stryer L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, v. 78, № 1, p. 152–156.
4. Fung B. K.-K. *J. Biol. Chem.*, 1983, v. 258, № 17, p. 10495–10502.
5. Овчинников Ю. А., Липкин В. М., Шуваева Т. М., Иценко К. А., Тележинская И. Н. *Биооргани. химия*, 1984, т. 10, № 11, с. 1572–1575.
6. Овчинников Ю. А., Липкин В. М., Тележинская И. Н., Шуваева Т. М., Обухов А. Н., Иценко К. А., Шелякин В. В. *Биооргани. химия*, 1985, т. 11, № 10, с. 1301–1314.
7. Hurlley J. B., Simon M. I., Teplow D. B., Robishaw J. D., Gilman A. G. *Science*, 1984, v. 226, № 4676, p. 860–862.
8. Manning D. R., Gilman A. G. *J. Biol. Chem.*, 1983, v. 258, № 11, p. 7059–7063.
9. Липкин В. М., Макарова И. А., Гринкевич В. А., Аханкина И. Г., Потопенко И. А., Тележинская И. Н. *Биооргани. химия*, 1982, т. 8, № 6, с. 747–775.

Поступила в редакцию  
16.VII.1985

#### ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF CYANOGEN BROMIDE PEPTIDES OF TRANSDUCIN $\alpha$ - AND $\beta$ -SUBUNITS

LIPKIN V. M., OBUKHOV A. N., BOGACHUK A. P.,  
TELEZHINSKAYA I. N., SHEMYAKIN V. V.

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

The  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of the GTP-binding protein (transducin) from cattle retina were cleaved with cyanogen bromide. 21 peptides covering 90–100% of the amino acid sequence of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits were isolated from the hydrolyzate. Cyanogen bromide peptides complete or partial amino acid sequence was determined, the results were compared with those by Numa and coworkers [1] and Lochrie et al. [2] at the primary structure of the transducin  $\alpha$ -subunit deduced from the nucleotide sequence of the cDNA. The structure by Lochrie is shown to differ much from the true structure of the  $\alpha$ -subunit; probably, the investigators isolated cDNA, corresponding to the gene for some GTP-binding protein homologous to transducin, but not to the gene for the transducin  $\alpha$ -subunit. The Numa's structure also contains an error.

The final primary structure of the transducin  $\alpha$ -subunit is given. The protein polypeptide chain consists of 349 amino acid residues and has an acetylmethionine residue as the N-terminal residue.