



УДК 577.152.361

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА α -СУБЪЕДИНИЦЫ Na^+ , K^+ -АТФ-азы

I. АНАЛИЗ ГИДРОФИЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ *

*Арзамасова Н. М., Аристархова Е. А., Шафиева Г. И.,
Назимов И. В., Алданова Н. А., Модянов Н. И.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Осуществлен избирательный триптический гидролиз нативной мембранно-связанной формы Na^+ , K^+ -АТФ-азы почек свиньи в условиях, обеспечивших глубокое расщепление α -субъединицы при полном сохранении интактности гликозилированной β -субъединицы. Из водорастворимой части гидролизата с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии выделено 27 индивидуальных пептидов, составляющих в сумме ~40% полипептидной цепи белка. Определена их полная или частичная аминокислотная последовательность. Проведенный анализ позволил получить общее представление о структуре экспонированных из мембраны гидрофильных участков α -субъединицы. Структурная информация использована для синтеза специфических олигонуклеотидных зондов.

Na^+ , K^+ -активируемая аденозинтрифосфатаза (К Ф 3.6.1.3) плазматических мембран клеток животных представляет собой универсальную систему активного транспорта Na^+ и K^+ . Используя энергию гидролиза АТФ, этот фермент осуществляет трансмембранный перенос одновалентных катионов против градиента их электрохимических потенциалов, обеспечивая тем самым постоянство неравновесного распределения этих ионов между клеткой и средой.

Молекула фермента состоит из двух типов субъединиц: α ($M_r \approx 100\,000$) и β ($M_r \approx 50\,000$). С функциональной точки зрения наибольшую значимость имеет α -субъединица, в цитоплазматическом домене которой расположен АТФ-гидролизующий центр фермента. Фрагменты полипептидной цепи α -субъединицы, экспонированные на наружной стороне мембраны, образуют участки связывания сердечных гликозидов — специфических ингибиторов фермента. Трансмембранный характер организации молекулы α -субъединицы свидетельствует о возможном ее участии в образовании катионпроводящего пути. Функциональная роль β -субъединицы пока не выяснена (см. обзоры 2—5).

Для выяснения молекулярных основ функционирования этого фермента необходим детальный анализ структурной организации его молекулы. Ранее в нашей лаборатории были определены молекулярные массы субъединиц Na^+ , K^+ -АТФ-азы из мозгового слоя почек свиньи, их аминокислотный состав и установлена аминокислотная последовательность N-концевых участков молекул [6]. В настоящее время мы завершаем работы по установлению полной первичной структуры субъединиц. Для определения аминокислотной последовательности такого высокомолекулярного интегрального мембранного белка, каким является α -субъединица, использовались главным образом методы анализа нуклеотидной последовательности, соответствующей структурному гену. Результаты этих исследований будут представлены в серии статей, первая из которых посвящена структурному анализу гидрофильных участков полипептидной цепи белка. Основная цель данного этапа исследований заключалась в получении структурной информации для синтеза специфических олигонуклеотидных зондов, не-

* Результаты данной работы были представлены на XVI конференции ФЕБО, Москва, 1984 [1].

Принятые сокращения: ПААГ — полиакриламидный гель.

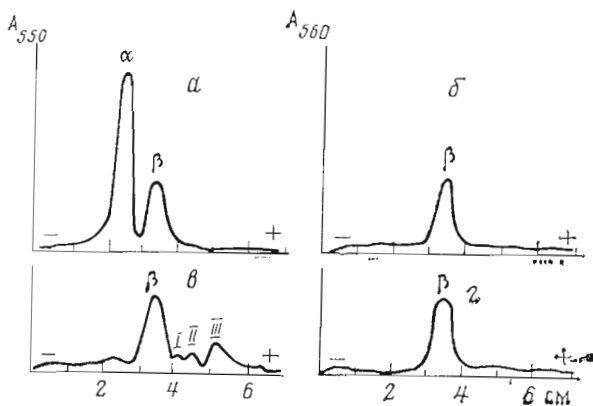


Рис. 1. Электрофоретический анализ Na^+ , K^+ -АТФ-азы до (а, б) и после триптического гидролиза (в, г). Окрашивание гелей кумасси G-250 (а, в) и реактивом Шиффа (б, г). Пики I, II, III соответствуют фрагментам с молекулярными весами 40, 30 и 15 кДа

обходимых для идентификации и поиска нуклеотидных последовательностей, соответствующих структурной части гена α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы. Такая постановка задачи позволила нам отказаться от выделения и анализа всех фрагментов полипептидной цепи белка и ограничиться установлением структуры отдельных ее участков.

Известен ряд характерных особенностей структурной организации молекулы Na^+ , K^+ -АТФ-азы. Это прежде всего возможность выделения гомогенного функционально-активного препарата фермента в мембранно-связанном состоянии [2]. Большая часть молекулы фермента, согласно результатам химической модификации [7] и иммунохимического анализа [8], образована гидрофильными участками, экспонированными по обе стороны мембраны. Каталитическая α -субъединица в составе мембранно-связанной формы фермента обладает большей чувствительностью к действию трипсина по сравнению с гликозилированной β -субъединицей [9, 10]. Таким образом, вполне реально осуществление структурного анализа экспонированной части полипептидной цепи молекулы α -субъединицы без выделения ее в гомогенном состоянии.

Ограниченный протеолиз α -субъединицы в составе мембранно-связанного фермента трипсином и химотрипсином является одним из наиболее чувствительных тестов конформационного состояния фермента [2, 11]. В зависимости от присутствия в среде инкубации ионов натрия или калия, стабилизирующих соответственно E_1 - или E_2 -конформации фермента, в процессе гидролиза образуется совершенно определенный набор небольшого числа специфических мембранно-связанных фрагментов, молекулярный вес которых сравним или превосходит молекулярный вес β -субъединицы. Основываясь на этих данных, мы попытались подобрать такие условия трипсинолиза мембранно-связанной формы фермента, которые обеспечили бы при сохранении интактности гликопротеина более глубокое расщепление экспонированных областей полипептидной цепи каталитической субъединицы. Использование стандартных условий триптического гидролиза белков (0,1 M NH_4HCO_3 , pH 8,3) в данном случае не представлялось целесообразным, поскольку при такой концентрации ионов водорода нарушается нативность мембранно-связанной Na^+ , K^+ -АТФ-азы. Однако обработка белка 1% трипсином в течение 10 мин при 37°С в 0,1 M NH_4HCO_3 при pH 7,5, соответствующим области стабильности фермента, приводит к образованию набора продуктов гидролиза, отличающегося от всех ранее описанных (рис. 1).

Как видно из результатов сканирования гелей, окрашенных кумасси G-250 и реактивом Шиффа, интактная β -субъединица составляет основную часть мембранно-связанных фрагментов гидролизата. Высокомолекулярные

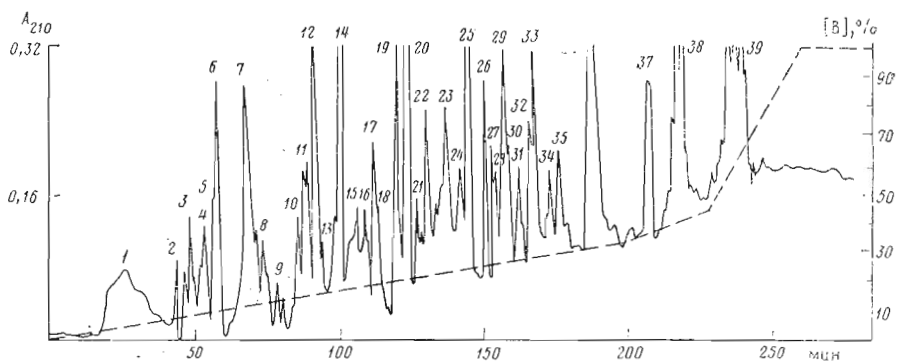


Рис. 2. Разделение водорастворимых пептидов тритического гидролизата на колонке (0,46×25 см) с носителем Nucleosil C₁₈. Элюирующие буферы: А — 10 мМ NH₄CH₃COO, рН 5,65; В — 10 мМ NH₄CH₃COO, рН 5,65, 70% CH₃CN. Скорость элюции 1 мл/мин. Пунктирная линия обозначает изменение процентного содержания буфера В

фрагменты α -субъединицы ($M_r \approx 40, 30$ и 15 кДа) присутствуют в незначительном количестве. Очевидно, что вся остальная масса пептидного материала образует набор низкомолекулярных водорастворимых фрагментов, не детектируемых на электрофореграмме, что свидетельствует о глубоком расщеплении экспонированных участков α -субъединицы. Увеличение времени инкубации (свыше 15 мин) препарата фермента с трипсином неизбежно ведет к постепенному расщеплению β -субъединицы, в то время как увеличение нагрузки протеиназы (до 10%) не приводит к дальнейшей деградации мембранно-связанных фрагментов каталитической субъединицы.

Препаративное расщепление мембранно-связанного препарата Na⁺, K⁺-АТР-азы проводили в выбранных условиях, и его результаты аналогичны результатам описанного выше аналитического гидролиза. По истечении времени инкубации реакцию смесь разбавляли 10-кратным объемом холодной воды и центрифугировали на холоде в течение 2,5 ч. Электрофоретическим анализом было показано, что в процессе центрифугирования гидролиза β -субъединицы и мембранно-связанных фрагментов α -субъединицы практически не было.

Распределение пептидного материала между осадком и супернатантом оценивалось по методу Лоури и результатам аминокислотного анализа. Оказалось, что в мембране после центрифугирования остается 63–64% от общего количества белка, что соответствует ~50% полипептидной цепи α -субъединицы (поскольку гликозилированная β -субъединица остается интактной, а на ее долю приходится ~30% по весу в ферменте). Таким образом, остальные ~50% полипептидной цепи α -субъединицы переходят в супернатант в виде водорастворимых пептидов.

Поскольку можно было предположить, что за короткое время проведения трипсинолиза на мембранно-связанном ферменте не все чувствительные к действию протеиназы связи подверглись расщеплению, для облегчения последующего фракционирования и увеличения выхода пептидов супернатант повторно обрабатывали трипсином в стандартных условиях в оптимуме рН в течение 4,5 ч (см. «Эксп. часть»).

В качестве основного метода разделения полученной сложной смеси пептидов нами была выбрана высокоэффективная жидкостная хроматография на носителе с обращенной фазой в аммоний-ацетатном буфере, рН 5,65, в градиенте концентраций ацетонитрила от 0 до 70% (рис. 2). Аналитическое деление супернатанта на колонке с носителем Nucleosil C₁₈ показало, что основная масса пептидного материала элюируется при концентрации ацетонитрила ниже 25%. В препаративном варианте для повышения эффективности деления на этом участке градиента использовалось очень медленное увеличение концентраций ацетонитрила (0–25% CH₃CN — 200 мин). Рехроматография полученных объединенных фракций прово-

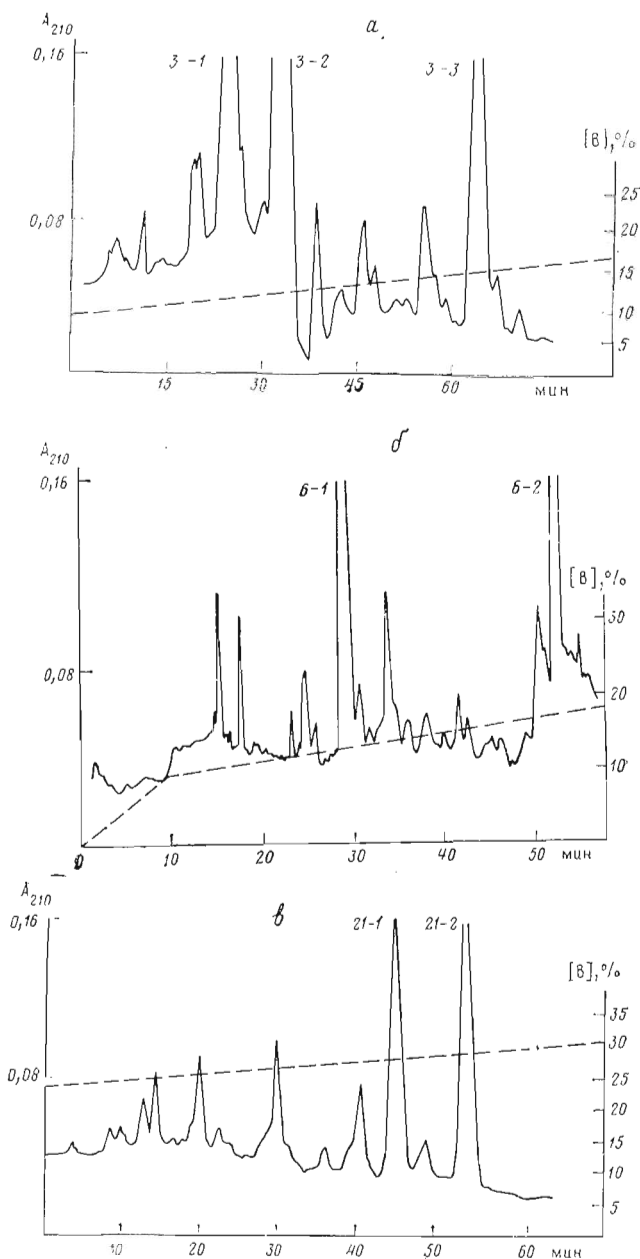


Рис. 3. Рехроматография фракций 3 (а), 6 (б) и 21 (в) триптического гидролизата (см. рис. 2) на колонке (0,46 × 25 см) с носителем Nucleosil C₁₈. Элюирующие буферы: А — 0,1% ТФУ; В — 0,1% ТФУ, 70% СН₃CN. Скорость элюции 1 мл/мин. Пунктирная линия обозначает изменение процентного содержания буфера В

длалась на той же колонке в 0,1% трифторуксусной кислоте с использованием градиента концентраций ацетонитрила. Более высокомолекулярные и гидрофобные пептиды, элюирующиеся при концентрации СН₃CN более 25%, рехроматографировались в аммоний-ацетатном буфере, рН 5,65, в градиенте концентраций ацетонитрила от 0 до 90% (рис. 3 а — в).

Фракция, элюирующаяся с объемом нанесения, содержала смесь коротких пептидов и в дальнейшем не анализировалась.

Гомогенность всех выделенных пептидов контролировалась определением их N-концевых остатков и аминокислотного состава. Установление

структуры пептидов проводилось методом Эдмана в дансильном варианте с одновременной идентификацией дикарбоновых аминокислот и их амидов в виде фенилтиогидантоинов. Автоматическую деградацию пептидов осуществляли на жидкофазном секвенаторе. В некоторых случаях С-концевая последовательность определялась (или подтверждалась) с помощью карбоксипептидаз А и В.

В таблице представлены пептиды, для которых установлена полная или частичная аминокислотная последовательность. В таблицу не включены пептиды, охарактеризованные только аминокислотным составом и N-концевой аминокислотой. Они содержат в сумме ~130 остатков.

Среди продуктов гидролиза отсутствуют фрагменты β -субъединицы (к настоящему времени установлена аминокислотная последовательность пептидов, составляющих в сумме более половины полипептидной цепи гликопротеина). Это является еще одним подтверждением сохранения интактности этой субъединицы при гидролизе мембранно-связанной формы фермента.

Анализируя полученные данные, следует отметить, что избирательный гидролиз трипсином экспонированных участков каталитической субъединицы прошел достаточно специфично. Все образовавшиеся пептиды, за исключением пептидов 8-1, 11-3, 13-1, 23-3, содержат в качестве С-концевых остатков лизин или аргинин. Однако в процессе гидролиза произошло частичное расщепление связей типа Ala-Ala, Ile-Val, Ala-Val, расположенных рядом с основной аминокислотой. В результате образовались пептиды 2-3, 21-1, 30-1, отличающиеся на один N-концевой остаток от пептидов 3-2, 25-1 и 33-1 соответственно. Расщепление двух связей в N-концевых областях пептидов 23-2 и 23-4 привело к образованию фрагментов 11-1, 5-1 и 13-1. Такой характер гидролиза не отвечает специфичности действия трипсина и не объясняется проявлением им химотрипсиноподобной активности. Скорее всего эти пептиды расположены в одном участке молекулы α -субъединицы, в первую очередь подвергающемся атаке протеолитических ферментов. Действительно, пептиды 3-2 и 23-2 разделены по полипептидной цепи всего лишь семью аминокислотными остатками [12].

В таблице подчеркнуты фрагменты пептидов 14-1, 33-1, 38-1 и 39-1, аминокислотная последовательность которых послужила основой для синтеза специфических 17-звенных олигонуклеотидных зондов.

В результате проведенного избирательного триптического гидролиза нам удалось выделить пептиды, участвующие в формировании каталитического центра фермента. Так, структура пептида 31-1 идентична части установленных ранее структур пептидов Na^+ , K^+ -АТФ-аз из различных источников (почка ягненка, собаки, крысы). Он содержит остаток лизина, модифицируемый необратимым ингибитором Na^+ , K^+ -АТФ-аз — изотиоцианатом флуоресцина [13, 14]. Предполагается, что этот пептид участвует в формировании АТФ-связывающего центра, поскольку введение АТФ в среду инкубации защищает фермент от ингибирования и модификации.

О консервативности молекулы фермента млекопитающих свидетельствуют и результаты сравнительного структурного анализа выделенных нами пептидов и пептидов триптического гидролизата препарата α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы из почки ягненка. Пять пептидов обоих гидролизатов имеют идентичные аминокислотные последовательности (2-2, 3-2, 16-1, 31-1, 33-1 и T13, T12, T11, T14, T16 [15] соответственно).

Значительная структурная гомология была обнаружена нами при сравнительном анализе триптических пептидов Na^+ , K^+ -АТФ-азы с отдельными участками полипептидных цепей других ионтранспортирующих АТФ-аз — Ca^{2+} -АТФ-азы саркоплазматического ретикулаума и субъединицы В Kdp АТФ-азы *E. coli* (гомологичные участки в аминокислотных последовательностях двух последних АТФ-аз были найдены ранее [16]). Наибольший интерес, по нашему мнению, представляет факт обнаружения единого элемента структуры центра фосфорилирования [17]. Полная идентичность N-концевого участка пептида 2-1 участкам активного центра Ca^{2+} -АТФ-азы и Kdp АТФ-азы *E. coli* позволила локализовать этот пептид в цепи α -субъединицы рядом с фосфорилирующимся остатком аспарагиновой кислоты.

**Аминокислотная последовательность триптических пептидов α -субъединицы
Na⁺, K⁺-АТФ-азы**

Пептид	Аминокислотная последовательность
2-1	Thr-Gly-Thr-Leu-Thr-Gln-Asn-Arg
2-2	
3-3	Asn-Ile-Pro-Val-Ser-Gln-Val-Asx-Pro-Arg
12-2	
2-3	Ala-Val-Pro-Asp-Ala-Val-Gly-Lys
3-1	Val-Val-His-Gly-Ser-Asp-Leu-Lys
3-2	Ala-Ala-Val-Pro-Asp-Ala-Val-Gly-Lys
7-1	
3-4	Val-Asp-Asn-Ser-Ser-Leu-Thr-Gly-Glu-Ser(Glx ₂ , Pro)Thr-Arg
4-2	
5-1	Val-Thr-Gly-Asp-His-Pro-Ile-Thr-Ala-Lys
6-1	
6-2	Val-Thr-Gly-Asp-Gly-Val-Asn-Asp-Ser-Pro-Ala-Leu-Lys
8-2	Asp-Ile-Gly-Val-Ala-Met-Gly-
8-1	Ser-Leu-Asp-Gln-Leu-His-Arg
8-3	
9-1	Ala-Val-Ala-Gly-Asp-Ala-Ser-Glx(Ser, Leu ₂ , Ala)Lys
10-1	
11-1	Met-Val-Thr-Gly-Asp-His-Pro-Ile-Thr-Ala-Lys
12-1	
11-2	Gly-Gly-Asp-Arg-Ile-Pro-Ala-Asp-Leu-Arg
11-3	Gly-Ile-Val-Val-Tyr
13-1	His-Thr-Glu-Ile-Val-Phe
14-1	Asp-Phe-Thr-Asn-Glu-Asn-Pro-Leu-Glu-Thr-Arg *
16-1	Gly-Ile-Val-Val-Tyr-Thr-Gly-Asp-Arg
19-1	Gly-Val-Gly-Ile-Ile-Ser-Glu-Gly-Asn-Glu-Thr-Val-Glu-Asx-Ile-Ala-Ala-Arg
20-1	Asp-Met-Thr-Ser-Glu-Gln-Leu-Asp-Asp-Ile-Leu-Lys
21-1	Val-Glu-Ile-Pro-Phe-Asn-Ser-Thr-Asn-Lys
22-1	
23-1	Ile-Phe(Asx ₂)Leu-Lys
23-2	Val-Ile-Met-Val-Thr-Gly-Asp-His-Pro-Ile-Thr-Ala-Lys
23-4	Tyr-His-Thr-Glu-Ile-Val-Phe-Ala-
25-1	Ile-Val-Glu-Ile-Pro-Phe-Asn-Ser-Thr-Asn-Lys
30-1	Val-Phe-Gln-Ala-Asn-Gln-Glu-Asn-Leu-Pro-Ile-Leu-Lys
31-1	His-Leu-Leu-Val-Met-Lys
32-1	Asn-Met-Val-Pro-Gln-Gln-Ala-Leu-Val-Ile-Arg
33-1	Ala-Val-Phe-Gln-Ala-Asn-Gln-Glu-Asn-Leu-Pro-Ile-Leu-Lys *
34-1	Leu-Ile-Ile-Val-Glx-Gly-
35-1	Asp-Ala-Phe-Gln-Asn-Ala-Tyr-Leu-Glu-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly-Glu-Arg
37-1	Gln-Ala-Ala-Asp-Met-Ile-Leu-Leu-Asp-Asp-Asn-Phe-Ala-X-Ile-Val(Thr, Ser, Glx ₂ , Gly ₂ Val)Arg
38-1	Glu-Gln-Pro-Leu-Asp-Glu-Glu-Leu-Lys-Asp-Ala-Phe-Gln-Asn-Ala-Tyr- Leu-Glu-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly-Glu-Arg *
39-1	Val-Leu-Gly-Phe-X-His-Leu-Phe-Leu-Pro-Asp-Glu-Gln-Phe-Pro-Glu-Gly- Phe-Gln-Phe-Asp-Thr-Asp-Asp-Val-Asn-Phe(Cys ₂ , Asx ₃ , Ser, Pro ₃ , Gly, Val, Met, Ile ₂ , Leu ₃)Arg *

* Подчеркнуты фрагменты, аминокислотная последовательность которых послужила основой для синтеза олигонуклеотидных зондов.

Наибольшее структурное сходство наблюдается между пептидами Na⁺, K⁺-АТФ-азы и фрагментом S₃ Ca²⁺-АТФ-азы, являющимся гидрофильным участком полипептидной цепи белка, экспонированным в цитоплазму [17]. Основываясь на этом факте и учитывая то, что все ранее описанные связи, чувствительные к действию трипсина [2, 8], локализованы в цитоплазматической области Na⁺, K⁺-АТФ-азы, можно предположить, что выделенные нами пептиды расположены главным образом в цитоплазматических районах полипептидной цепи α -субъединицы. Большая устойчивость к действию трипсина участков молекулы, экспонированных по другую сто-

ропу мембраны, вероятно, может быть обусловлена экранированием α -субъединицы углеводными цепями гликопротеина.

Таким образом, проведенный избирательный триптический гидролиз мембранно-связанного препарата Na^+ , K^+ -АТФ-азы и анализ водорастворимой части гидролизата позволил довольно быстро получить структурную информацию об обширных гидрофильных участках α -субъединицы, расположенных, по всей видимости, в цитоплазматической области молекулы фермента. Полученная структурная информация была использована для синтеза специфических олигонуклеотидных зондов.

Экспериментальная часть

В работе использованы трипсин ТРСК (Worthington, США), карбокси-пептидазы А (Calbiochem, Швейцария) и В (Boehringer, ФРГ), акрил-амид, N, N'-метиленбисакриламид, N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин, персульфат аммония (Bio-Rad, США), ацетонитрил (Merck, ФРГ), трифторуксусная кислота (Pierce, США). Выделение Na^+ , K^+ -АТФ-азы из мозгового слоя почек свиный проводили в ступенчатом градиенте плотности глицерина по модифицированному методу Йоргенсена [6].

Концентрацию белка во фракциях определяли по методу Лоури [18] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. Специфическая активность использованного препарата фермента ~ 1400 мкмоль P_i/ч/мг белка при 37° С.

Электрофорез проводили согласно работе [19] в натрий-фосфатном буфере, pH 7,0, в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия. Использовали градиентные пластины ПААГ (4–15%) размером 8×8 см и толщиной 3 мм. Для определения молекулярных масс строили калибровочную кривую по следующим белковым стандартам: цитохром с (11 700), химотрипсиноген А (25 000), яичный альбумин (45 000), бычий сывороточный альбумин (67 000). Образцы предварительно инкубировали в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,5, содержащем 5% додецилсульфата натрия, 2,5% β -меркаптоэтанола, 1 мМ EDTA, при 100° С в течение 2 мин, после чего 50 мкг образца вносили в ячейку. Электрофорез вели с охлаждением при постоянном токе 60 мА/пластина в течение 6 ч. Гели окрашивали коллоидным раствором кумасси G-250 в 12,5% трихлоруксусной кислоте [20] или реактивом Шиффра [21]. Сканирование проводили на приставке к спектрофотометру Gilford (Gilford, Франция) (λ 550 и 560 нм).

Избирательный триптический гидролиз. Na^+ , K^+ -АТФ-азу (90 мг) суспендировали в 0,1 М растворе бикарбоната аммония, pH 7,5, в концентрации 1 мг/мл. К суспензии при 37° С добавляли ТРСК-трипсин (соотношение фермент – субстрат 1:100) и инкубировали в течение 10 мин при непрерывном перемешивании. По окончании времени инкубации вводили 10-кратный избыток холодной воды (4° С). Мембраны осаждали центрифугированием (L5-50, Beckman, США, ротор – тип 35; 34 000 об/мин, 2,5 ч, 4° С). Супернатант, содержащий водорастворимые пептиды, лиофилизировали и ресуспендировали в 0,1 М NH_4HCO_3 , pH 8,3, в концентрации 1 мг/мл. Повторную обработку трипсином вели в течение 4,5 ч при 37° С при соотношении фермент – субстрат 1:100, после чего гидролизат разделяли на 10 равных частей и замораживали при –20° С.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию пептидов проводили на хроматографе Du Pont Instruments, модель 850 (Du Pont, США) с проточными спектрофотометрами Uvicord II, модель 2151, и Uvicord SD, модель 2158 (ЛКВ, Швеция). При разделении использовали колонки (0,46×25 см) с обращенной фазой Nucleosil C₁₈ (диаметр частиц 7 мкм, Machery-Nagel, ФРГ). Первичное деление гидролизата проводили в 10 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{CO}_3$, pH 5,65, в градиенте концентрации ацетонитрила от 0 до 70%. 1/10 часть гидролизата разводили водой до конечной концентрации 5 мМ бикарбоната аммония и наносили на колонку через фильтр. Скорость нанесения и элюции 1 мл/мин. Время изменения градиента ~ 5 ч (0–25% ацетонитрила – 200 мин; 25–30% – 30 мин; 30–70% – 30 мин;

70% CH_3CN — 30 мин). Рехроматографию пептидов проводили в 0,1% водной трифторуксусной кислоте или в 10 мМ аммоний-ацетате, pH 5,65 (для высокомолекулярных и гидрофобных пептидов) в градиенте концентрации ацетонитрила. Скорость элюции 1 мл/мин. Время изменения градиента ~1—2 ч. Пептиды детектировали спектрофотометрически при двух длинах волн: 210 и 280 нм.

Деградацию пептидов по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде дансильных производных проводили на 2—5 нм образца по методике [22]. Идентификацию фенилтиогидантоновых дикарбонных аминокислот и их амидов осуществляли как описано в сообщении [23].

С-Концевую последовательность пептидов определяли с помощью карбоксипептидаз А и В [24] с последующим анализом гидролизата на аминокислотном анализаторе Biotronic (Biotronic, ФРГ) с флуориметрическим детектором.

Автоматическую деградацию пептидов осуществляли на секвенаторе 890 С (Beckman, США) по программе № 102974. Идентификацию фенилтиогидантоновых аминокислот проводили методом ВЭЖХ [25].

Аминокислотный состав пептидов определяли на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США).

Авторы выражают глубокую признательность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к работе и ценные советы. Авторы благодарят Т. И. Муравьеву, Г. И. Полищук, Е. Г. Гаврильеву, Т. Д. Нестерову за участие в выделении препаратов фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Modyanov N. N., Arzamazova N. M., Gevondyan N. M., Kuzmina E. A., Petrakhin K. E., Shafieva G. I. In: Abstracts of 16th Meeting of FEBS, 1984, XV—032, p. 341.
2. Jorgensen P. L. Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 694, p. 27—68.
3. Cantley L. C. Curr. Top. Bioenerg., 1981, v. 11, p. 201—237.
4. Post R. L. Curr. Top. in Membr. and Transport, 1983, v. 19, p. 53—65.
5. Robinson J. D., Flashner M. S. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 549, p. 145—176.
6. Джанджугазян К. Н., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 6, с. 847—857.
7. Джанджугазян К. Н., Модянов Н. Н., Мустаев А. А. Биол. мембраны, 1984, т. 1, № 8, с. 823—830.
8. Джанджугазян К. Н., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 12, с. 1790—1800.
9. Castro J., Farley R. A. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 7, p. 2221—2228.
10. Giotta G. J. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 13, p. 5159—5164.
11. Jorgensen P. L. Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 401, p. 399—415.
12. Овчинников Ю. А., Монастырская Г. С., Арсенин С. Г., Бродя Н. Е., Петрухин К. Е., Гришин А. В., Арзамазова Н. М., Северцова И. В., Модянов Н. Н. Докл. АН СССР, 1985, т. 283, № 5, с. 1278—1280.
13. Farley R. A., Tran C. N., Carilli C. T., Hawke D., Shively J. E. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 15, p. 9532—9535.
14. Kirley T. L., Wallick E. F., Lane L. K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1984, v. 125, № 2, p. 767—773.
15. Collins J. H., Zot A. S., Ball W. J., Lane L. K., Schwartz A. Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 742, p. 358—365.
16. Hesse J. E., Wiczoroc R. L., Altendorf K., Reicin A. S., Dorus E., Epstein W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, p. 4746—4750.
17. Модянов Н. Н., Арзамазова Н. М., Аристархова Е. А., Гевондян Н. М., Овчинников Ю. А. Биол. мембраны, 1985, т. 2, № 8, с. 844—848.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
19. Weber W., Osborn M. J. Biol. Chem., 1969, v. 344, № 16, p. 4406—4412.
20. Diezel W., Kopperschlager G., Hofman E. Anal. Biochem., 1972, v. 48, p. 617—620.
21. Fairbanks G., Steck T. L., Wallack D. F. H. Biochemistry, 1971, v. 13, p. 2606—2617.
22. Гринкевич В. А., Арзамазова Н. М., Потанинко Н. А., Гринкевич Х. А., Кравченко З. Б., Фейгина М. Ю., Аладанова Н. А. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1757—1774.
23. Chen R. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 1976, v. 357, p. 873—886.
24. Ambler R. P. In: Methods in Enzymol./Eds Colowich S. P., Kaplan N. O. N. Y.—L.: Acad. Press, 1972, v. XXV B, p. 143—154, 262—272.
25. Hawke D., Yuan P.-M., Shively J. E. Anal. Biochem., 1982, v. 120, p. 302—311.

Поступила в редакцию
5.VII.1985

PRIMARY STRUCTURE OF α -SUBUNIT OF Na^+, K^+ -ATPase. I. ANALYSIS
OF HYDROPHILIC REGIONS OF THE POLYPEPTIDE CHAIN

ARZAMAZOVA N. M., ARYSTARKHOVA E. A., SHAFIEVA G. I.,
NAZIMOV I. V., ALDANOVA N. A., MODYANOV N. N.

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

The selective tryptic digestion of the native membrane-bound enzyme was carried out under conditions that provide the extensive hydrolysis of hydrophilic regions of the α -subunit into small fragments and allow to preserve the integrity of the β -subunit. Twenty-seven water-soluble peptides comprising $\sim 40\%$ of the total polypeptide chain were isolated by HPLC and their complete or partial amino acid sequence was determined. It led to general outline of the structural organisation of the α -subunit hydrophilic regions exposed from membrane. The information thus obtained was used in synthesis of specific oligonucleotide probes.