



УДК 577.112.826

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА «БЫСТРОПОДВИЖНОГО» КОМПОНЕНТА
АВЕНИНА (*AVENA SATIVA* L.) *

Егоров Ц. А.

Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Академии наук СССР, Москва

Основную массу запасных белков семян злаков составляют проламины — особый класс белков, отличающихся высоким содержанием глутамина, пролина и гидрофобных аминокислот. Более всего изучены и охарактеризованы проламины пшеницы, ячменя, ржи и кукурузы, а наименее — проламины овса — авенины: имеется всего несколько работ по их выделению и характеристике [1—3]. Между тем благодаря несложному компонентному составу и относительно малой молекулярной массе (20—40 кДа) авенины могут служить хорошим объектом для изучения физико-химических особенностей строения и эволюции проламинов.

В настоящей работе приведены результаты структурного анализа одного из компонентов авенина, который имеет наибольшую подвижность при электрофорезе в ПААГ (рН 3,1) и присутствует в большинстве сортов овса [4]. Этот «быстроподвижный» компонент был выделен из овса сорта «Нарымский 943» и обозначен как N9 (рис. 1).

По результатам аминокислотного анализа, компонент N9 содержит три остатка метионина, шесть остатков аргинина, один остаток лизина и восемь остатков цистеина. Все компоненты авенина, включая N9, не имеют свободных сульфгидрильных групп: эти белки не иммобилизуются на тиопропил-сефарозе 6В, но ковалентно связываются с носителем после их восстановления β-меркаптоэтанолом. Поэтому для структурного анализа авенин N9 восстанавливали, а остатки цистеина модифицировали 4-винилпиридином.

Анализ N-концевой аминокислотной последовательности компонента N9 позволил исходя из 1 мляб белка идентифицировать 47 аминокислотных остатков. В результате расщепления авенина N9 бромцианом были получены все четыре ожидаемых фрагмента, структура которых была определена частично или полностью (рис. 2). Белок N9 гидрофобен и плохо гидролизует трипсином в растворе даже в присутствии 4 М мочевины, но легко атакуется ферментом в иммобилизованном виде. Поэтому для реконструкции полипептидной цепи белка его гидролизовали трипсином, предварительно иммобилизовав на активированном носителе. В результате были получены две фракции. Фракцию цистеинсодержащих пептидов после «снятия» с носителя обессоливали обращенно-фазовой хроматографией и алкилировали 4-винилпиридином. Каждую из полученных двух фракций разделяли ВЭЖХ. Таким путем было выделено семь и секвенировано полностью шесть пептидов, включая 52-членный пептид T7 (рис. 2). Пептид T1 был секвенирован частично, а пептид T3

* Часть этой работы была доложена на III Международной школе по белкам глютена (клейковины) (Будапешт, 6—9 мая 1987 г.).

Сокращения: СВ — бромциановые пептиды, Т — триптические пептиды, ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография, TFA — трифторуксусная кислота, Gu·HCl — гуанидинийхлорид, EDTA-Na₂ — динатриевая соль диаминтетрауксусной кислоты, ПААГ — полиакриламидный гель, SDS — додецилсульфат натрия.

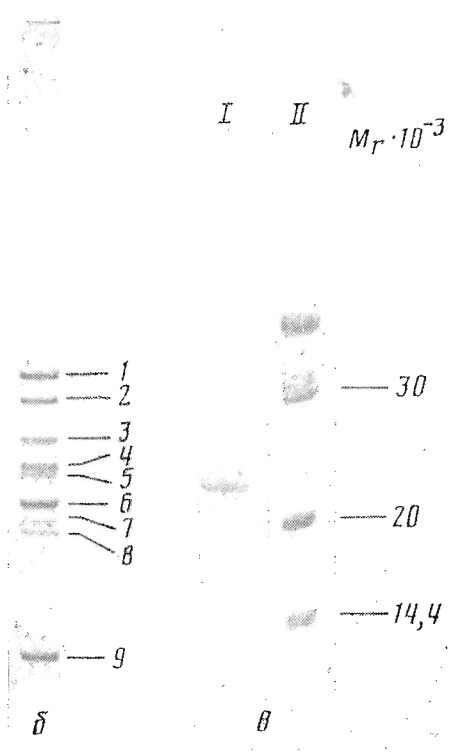
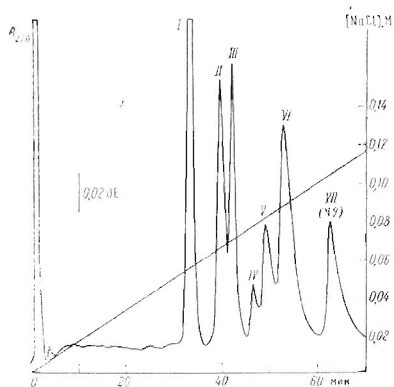


Рис. 1. Аналитическая ВЭЖХ авенинов, выделенных из овса сорта «Шарымский 943», на колонке Mono S 5/5. Разделение осуществляли на хроматографе FPLC (Pharmacia, Швеция) в линейном градиенте концентрации NaCl в 4 М мочевины, pH 3,5, в течение 120 мин при скорости элюции 1 мл/мин. Стартовый буфер — 4 М мочевины, pH 3,5, конечный буфер — 4 М мочевины, pH 3,5, в 0,2 М NaCl (а). б — электрофорез в ПААГ (pH 3,1) смеси авенинов. Компоненты обозначены по мере увеличения электрофоретической подвижности. в — электрофорез в ПААГ в присутствии SDS авенина N 9 (I) и смеси белковых маркеров (Pharmacia, Швеция) (II)

не был выделен. Однако участок цепи, отвечающий пептиду T3, был определен путем секвенирования бромцианового фрагмента CB2.

Необходимо отметить, что стратегия структурно-функционального анализа цистин- и цистеинсодержащих белков с использованием иммобилизации последних по остаткам цистеина на активированных носителях разрабатывается и используется достаточно успешно (см., например, работу [5]). Однако недостаток этого подхода заключался в трудности удаления избытков восстанавливающего агента и 2-тиопиридона, образующегося при «снятии» цистеинсодержащих пептидов с носителя, и концентрировании пептидов перед их алкилированием. Ранее на примере проламинов пшеницы было показано, что белки, содержащие дисульфидные мостики, могут быть иммобилизованы по остаткам цистеина на соответствующих носителях после восстановления и удаления избытка реагента обращенно-фазовой хроматографией [6]. Теперь этот же прием был успешно использован при алкилировании цистеинсодержащих пептидов после их «снятия» с носителя. Однако при этом необходимо учитывать, что короткие гидрофильные пептиды на этой стадии могут быть потеряны.

На основании выполненной работы можно сделать следующие выводы. Авенин N9 состоит из 182 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 21 000, что хорошо согласуется с результатами аминокислотного и электрофоретического анализов этого белка (рис. 1). Он имеет характерные для проламинов состав и аминокислотную последовательность. Он содержит много глутамина (30,7%), пролина (11,5%) и гидрофобных аминокислот (60%). Авенин N9 имеет уникальную

Расщепление *S*-пиридилэтилированного авенина N9 бромцианом (200 моль/моль белка) осуществляли в 80% TFA в течение 16 ч в атмосфере аргона. Смесь упаривали и растворяли в 5 М Cu·HCl, содержащем 0,1% TFA, и разделяли на колонке (4,6 × 220 мм) RP-300 Aquapore C₈ с предколонкой 15 мм (Brownlee Labs., США) в градиенте концентрации ацетонитрила (0—40%, за 60 мин), используя в качестве стартового буфера 0,1% TFA и в качестве конечного буфера ацетонитрил в 0,08% TFA (скорость элюции 0,8 мл/мин).

Триптический гидролиз авенина N9. Блок восстанавливали и обессоливали как описано выше. Фракцию белка немедленно упаривали на ротаторном испарителе, растворяли в 200 мкл буфера А и добавляли к приблизительно 1 мл тиопропил-сефарозы 6В (Pharmacia, Швеция), предварительно уравновешенной буфером Б (4 М мочевины, доведенная TFA до pH 3,5). Объем суспензии доводили буфером Б до 2 мл и инкубировали в атмосфере аргона при перемешивании на ротатиксере (Heto, Дания) при 20° С в течение 16 ч. Затем конъюгат отфильтровывали, промывали буфером А и уравновешивали 25 мл 0,05 М аммоний-бикарбонатного буфера, pH 7,8. Конъюгат переносили в реакционный сосуд и после удаления избытка буфера добавляли 200 мкл раствора трипсила (1 мг/мл). Объем суспензии доводили аммоний-бикарбонатным буфером до 1 мл и инкубировали при 37° С и перемешивании в атмосфере аргона в течение 4 ч. По окончании гидролиза конъюгат отфильтровывали и промывали буфером А. Обесединенную растворимую фракцию использовали для разделения ВЭЖХ. К конъюгату добавляли 50 мкл 2-меркаптоэтанола, объем суспензии доводили буфером А до 1 мл и оставляли стоять после перемешивания в атмосфере аргона в течение 1 ч при 20° С. Затем конъюгат отфильтровывали, промывали 5 мл буфера А, обессоливали обращенно-фазовой хроматографией и алкилировали 4-винилпиридином как описано выше. Каждую из полученных фракций разделяли на колонке (4,6 × 220 мм) RP-300 Aquapore C₈ в градиенте ацетонитрила (см. выше) после отмывания избытка реагента и солей 0,1% TFA.

Секвенирование белка и пептидов осуществляли на газофазном секвенаторе модели 470А с автоматической идентификацией фенилтиогидантоинов аминокислот на анализаторе модели 120А (Applied Biosystems, США).

Автор выражает благодарность инженеру А. Х. Мусолимову за помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kim S. I., Charbonier L., Mosse J. // *Biochim. et biophys. acta.* 1978. V. 537. № 1. P. 22—30.
2. Robert L. S., Nozzolio C., Altosaar I. // *Cereal Chem.* 1983. V. 60. № 6. P. 438—442.
3. Vietz J. A. // *Biochem Genetics.* 1982. V. 20. № 11/12. P. 1039—1053.
4. Портянко В. А., Поморцев А. А., Созинов А. А. // Докл. ВАСХНИЛ. 1987. № 1. С. 8—10.
5. Устишников Т. Б., Попов О. В., Егоров А. М., Егоров Ц. А. // Биополимеры и клетка. 1985. Т. 2. № 3. С. 129—135.
6. Егоров Ц. А., Одинцова Т. И., Созинов А. А. // Биорган. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 595—605.
7. Kreis M., Shewry P. R., Forde B. G., Forde J., Muflin B. J. // *Oxford surveys of plant molecular and cell biology.* 1985. V. 2. P. 253—317.
8. Bartels D., Altosaar I., Harberd N. P., Barker R. F., Thompson R. D. // *Ther. Appl. Genet.* 1986. V. 72. № 6. P. 845—853.

Поступило в редакцию
14.III.1988

THE COMPLETE PRIMARY STRUCTURE OF THE «FAST» AVENIN COMPONENT (*AVENA SATIVA* L.)

EGOROV Ts. A.

*N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

A procedure for the isolation and sequence analysis of the «fast» avenin component (N9) from the oat (*Avena sativa* L., cv. Narymsky 943) is described. Component N9 was prepared by an ion-exchange high-performance liquid chromatography on a strong cation exchange column type Mono S (Pharmacia, Sweden) in 4 M urea, pH 3,5, with a linear gradient of NaCl. A polypeptide chain of avenin N9 was reconstructed by the CNBr and tryptic peptides on a model 470А protein gas-phase sequencer (Applied Biosystems, USA). A good yield of tryptic peptides were obtained by an enzymatic hydrolysis of avenin N9 preliminary immobilized on Thiopropyl-Sepharose 6В (Pharmacia, Sweden) at cysteine residues. Avenin N9 consists of 182 amino acid residues and exhibits the features common for all the known prolamins.