



УДК 577.112.5

© 1991 г.

О. Е. Трубецкая, Г. И. Белогрудов, А. В. Данилов,
Г. Р. Титеева, Г. В. Афанасьева, Т. А. Муранова,
В. М. Липкин

**АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗАТА 40-кДа
БЕЛКА, ВХОДЯЩЕГО В СОСТАВ НУКЛЕОПРОТЕИНОВОЙ ФРАКЦИИ
СЫВОРОТКИ КРОВИ. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЕГО В КАЧЕСТВЕ
 α_1 -КИСЛОГО ГЛИКОПРОТЕИНА (ОРОЗОМУКОИДА)**

Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, г. Пушкино Московской обл.

Осуществлен триптический гидролиз 40-кДа белка, входящего в состав ДНК-содержащей фракции сыворотки крови мыши. С помощью ВЭЖХ из гидролизата выделено 34 пептида и установлена полная аминокислотная последовательность 28 из них и частичная 6. Анализ аминокислотной последовательности выделенных пептидов позволил идентифицировать исследуемый белок нуклеопротеиновой фракции сыворотки крови как α_1 -кислый гликопротеин.

В предыдущей работе [1] нами была исследована свободно циркулирующая ДНК сыворотки крови мыши и обнаружено, что в состав ДНК-содержащей фракции сыворотки крови входит практически гомогенный препарат белка с $M \sim 40$ кДа.

Настоящая работа посвящена исследованию структуры белкового компонента ДНК-содержащей фракции сыворотки крови мыши. Как было показано в работе [1], концентрация нуклеопротеинового комплекса сыворотки крови зараженных малярийным плазмодием (*Plasmodium berghei*) мышей превышает на порядок концентрацию этой фракции в норме, поэтому в качестве источника исходного материала была использована сыворотка больных малярией животных.

ДНК-содержащую фракцию выделяли по разработанной нами методике обработкой сыворотки фенолом и хлороформом. Молекулярная масса белкового компонента, по данным электрофореза в 15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, составляет 40 кДа, содержание белковых примесей в полученных препаратах не превышало 2% [1].

В качестве начального этапа структурных исследований был осуществлен триптический гидролиз белкового компонента. Нативный нуклеопротеиновый комплекс (5 нмоль по белку) обрабатывали трипсином (фермент-субстратное соотношение 1:25) в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 8,3, в течение 4 ч при 37° С. Первоначальное разделение гидролизата осуществляли с помощью ВЭЖХ на колонке Ultrasphere-ODS в 0,1% трифторуксусной кислоте (TFA), pH 2,0, в градиенте концентрации ацетонитрила (рис. 1). Пептиды были выделены из 17 фракций. По данным, полученным при определении аминокислотной последовательности пептидного материала, выяснилось, что фракции 5, 9 и 10 содержали индивидуальные пептиды Т-5, Т-9 и Т-10 соответственно, остальные представляли собой смесь двух и более пептидных фрагментов. Гомогенные пептиды из остальных фракций были получены после рехроматографии на колонке Ultrasphere-ODS в 10 мМ аммоний-ацетатном буфере, pH 5,7, в градиенте ацетонитрила (рис. 2). Аминокислотную последовательность выделенных пептидов устанавливали автоматической деграда-

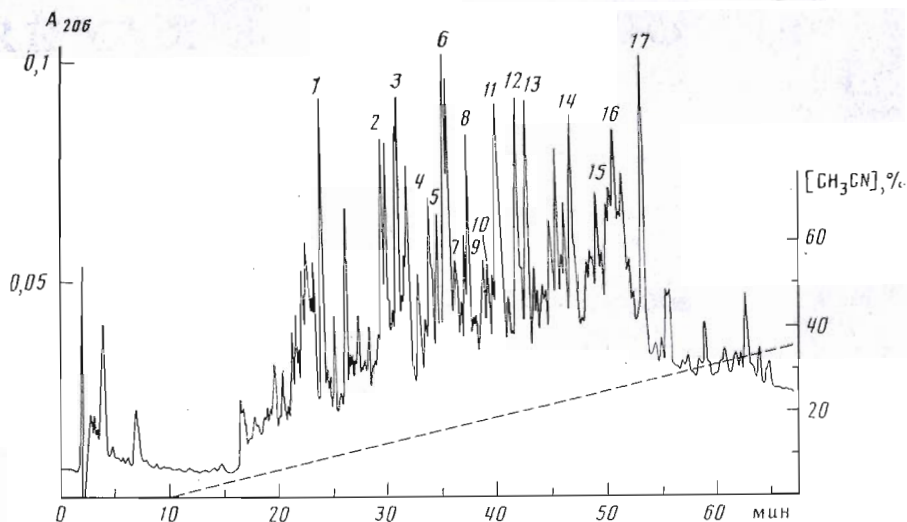


Рис. 1. Разделение пептидов триптического гидролизата 40-кДа белка методом ВЭЖХ на колонке ($0,4 \times 15$ см) с носителем Ultrasphere-ODS в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% TFA. Скорость элюции 1,2 мл/мин. Здесь и далее пунктирная линия обозначает изменение концентрации ацетонитрила

цией по методу Эдмана. Фракции 6-3, 12-1, 13, 16-2, 17 представляли собой смеси двух пептидов и анализировались без разделения на индивидуальные компоненты.

В таблице представлены данные о распределении пептидов по фракциям, их выходы и аминокислотные последовательности. В общей сложности из триптического гидролизата было выделено 34 пептида, для 28 из них определена полная аминокислотная последовательность.

Особенностью предпринятого гидролиза явилась высокая степень неспецифического расщепления белка препаратом трипсина (Boehringer, США), использованным в эксперименте. Значительная часть полученных пептидов образовалась в результате расщепления по остаткам ароматических и гидрофобных аминокислот. Это, по-видимому, можно объяснить высоким содержанием примесной химотриптической активности в используемом препарате фермента, а также большей доступностью гидролизующим химотрипсином связям исследуемого белка по сравнению со связями основных аминокислот, атакуемых трипсином.

К моменту завершения структурного анализа продуктов триптического гидролиза 40-кДа белка, входящего в состав нуклеопротеиновой фракции сыворотки крови мыши, была опубликована статья, посвященная молекулярному клонированию и структуре кДНК, соответствующей двум генам α_1 -кислого гликопротеина мыши [2]. Сравнение аминокислотных последовательностей полученных нами пептидов 40-кДа белка, входящего в состав нуклеопротеиновой фракции сыворотки крови, с первичной структурой изоформ AGP-1 и AGP-2 сывороточного α_1 -кислого гликопротеина мыши, выведенных из соответствующих кДНК [2], позволяет идентифицировать исследуемый белок как α_1 -кислый гликопротеин (рис. 3). Необходимо отметить, что в положении 56 AGP-1-формы (рис. 3) авторами ошибочно указан остаток треонина, хотя соответствующий этому остатку триплет TAC в нуклеотидной последовательности кодирует тирозин, что также согласуется со структурой пептида T-3-2.

Из 32 идентифицированных пептидов 18 соответствуют фрагментам изоформы AGP-1, 4 пептида — AGP-2, остальные 10 — областям, идентичным для обоих белков (таблица, рис. 3). В среднем выходы пептидов, принадлежащих AGP-1-изоформе, в 3—5 раз превышают выходы пептидов, принадлежащих AGP-2 (см. таблицу). Эти данные позволяют предположить, что изоформы AGP-1 и AGP-2 белков, выделенных из сыворотки крови мыши в составе нуклеопротеиновой фракции, находятся в соотношении 3—5 : 1.

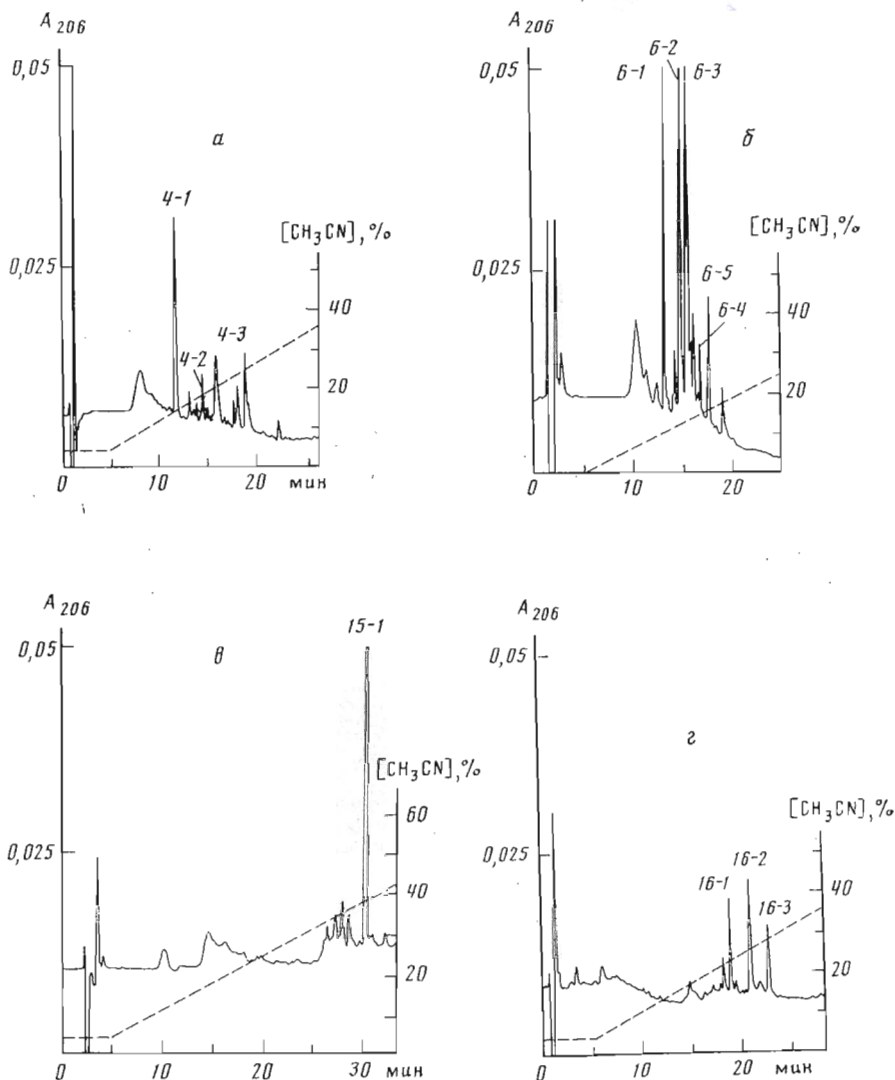


Рис. 2. Разделение фракций 4 (а), 6 (б), 15 (в), 16 (г) (см. рис. 1) с помощью ВЭЖХ на колонке (0,46 × 15 см) с носителем Ultrasphere-ODS в градиенте концентрации ацетонитрила в 10 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 5,7. Скорость элюции 1,2 мл/мин

Пептиды Т-1-1, Т-12-1-1 и Т-12-1-2 (таблица, рис. 3) содержат неидентифицированные аминокислоты, которые по нуклеотидной последовательности [2] соответствуют аспарагину, входящему в состав канонической последовательности Asn-X-Thr. Эти остатки могут быть местом присоединения углеводных цепей.

Из триптического гидролизата были выделены пептиды Т-7-1, Т-13-2, аминокислотная последовательность которых не укладывается в структуру обеих изоформ, однако выходы этих пептидов вполне сопоставимы с выходами остальных пептидов. Это наводит на мысль о возможном существовании третьей изоформы α_1 -кислого гликопротеина.

Таким образом, в результате структурного анализа белка, входящего в состав нуклеопротеиновой фракции сыворотки крови мыши, показана его идентичность α_1 -кислому гликопротеину. Предложенная нами простая и эффективная методика получения α_1 -кислого гликопротеина путем обработкой сыворотки крови фенолом и хлороформом [1] может быть использована для быстрого получения этого белка в гомогенном состоянии.

α_1 -Кислый гликопротеин — один из компонентов сыворотки, его уровень в крови резко возрастает при воспалениях, злокачественных новообразованиях и ряде других заболеваний [3, 4]. Он отличается вы-

AGP-1 Met-Ala-Leu-His-Thr-Val-Leu-Ile-Ile-Leu-Ser-Leu-Leu-Pro-Met-
 AGP-2 Met Ile Val Met Val Leu

30

Leu-Glu-Ala-Gln-Asn-Pro-Glu-His-Ala-Asn-Phe-Thr-Ile-Gly-Glu-
 Val Ile Asp

45

Pro-Ile-Thr-Asn-Glu-Thr-Leu-Ser-Trp-Leu-Ser-Asp-Lys-Trp-Phe-

—————T-16-1—————

60

Phe-Met-Gly-Ala-Ala-Phe-Arg-Lys-Leu-Glu-Tyr-Arg-Gln-Ala-Ile-
 Ile Val Leu Asn Pro Asp Glu

—————T-3-2————— T-3-1—————

—————T-16-3—————

—————T-14-1—————

—————T-4-3—————

—————T-16-2-I—————

75

Gln-Thr-Met-Gln-Ser-Glu-Phe-Phe-Tyr-Leu-Thr-Thr-Asn-Leu-Ile-
 Lys Thr Met Val Asn Pro

—————T-13-I————— T-12-1-II—————

—————T-17-II————— T-12-1-I—————

90

Asn-Asp-Thr-Ile-Glu-Leu-Arg-Glu-Ser-Gln-Thr-Ile-Gly-Asp-Gln-
 Met Tyr His Asp His

—————T-6-2—————

—————T-6-3-I—————

105

Cys-Val-Tyr-Asn-Ser-Thr-His-Leu²Gly-Phe-Gln-Arg-Glu-Asn-Gly-
 Ile

—————T-1-1—————

—————

120

Thr-Phe-Ser-Lys-Tyr-Glu-Gly-Gly-Val-Glu-Thr-Phe-Ala-His-Leu-
 Leu Val Lys Ile Asp

—————T-9—————

—————T-10—————

—————T-6-1—————

135

Ile-Val-Leu-Arg-Lys-His-Gly-Ala-Phe-Met-Leu-Ala-Phe-Asp-Leu-
 Lys Met

—————T-16-2-II————— T-2-2————— T-15-1—————

—————T-4-2————— T-6-5—————

150

Lys-Asp-Glu-Lys-Lys-Arg-Gly-Leu-Ser-Leu-Tyr-Ala-Lys-Arg-Pro-
 Asn

—————T-12-2————— T-11-2—————

165

Asp-Ile-Thr-Pro-Glu-Leu-Arg-Glu-Val-Phe-Gln-Lys-Ala-Val-Thr

—————T-2-1—————

—————T-11-1————— T-4-1—————

180

His-Val-Gly-Met-Asp-Glu-Ser-Glu-Ile-Ile-Phe-Val-Asp-Trp-Lys-

—————T-17-I————— T-8-1—————

**Аминокислотная последовательность триптических пептидов 40-кДа белка,
входящего в состав нуклеопротеиновой фракции сыворотки крови мыши**

Пептид	Аминокислотная последовательность				Мол-во пептида, пмоль	Идентифицирован в цепи	Номера а.о. в цепи
	1	5	10	15			
T-1-1	* S T H L				190	AGP-1, -2	94-98
T-2-1	E V F Q K				3070	AGP-1, -2	158-162
T-2-2	H G A F				700	AGP-1, -2	126-129
T-3-1	Q A I Q T M				1050	AGP-1	58-63
T-3-2	K L E Y R				1050	AGP-1	53-57
T-4-1	E V F				100	AGP-1, -2	158-160
T-4-2	I V L R				650	AGP-1	121-124
T-4-3	M G A A F				450	AGP-1	47-51
T-5	Q L E L G K				1200	AGP-1	191-196
T-6-1	E G G V E T F				2250	AGP-1	111-117
T-6-2	E S Q T I G D Q : V				900	AGP-1	83-92
T-6-3	I II E S Q T I G D Q : V Y : G Q Q E K K				900 300	AGP-1 AGP-1	83-93 184-190
T-6-4	Q L E L G K E T K				225	AGP-1	191-199
T-6-5	M H G A				170	AGP-2	125-128
T-7-1	S F D A A T M				100	-	-
T-8-1	V D W				1450	AGP-1, -2	177-179
T-9	Y E G G V E T F				250	AGP-1	110-117
T-10	S K Y E G G V E T F				250	AGP-1	108-117
T-11-1	R P D I T P E L				1100	AGP-1, -2	149-156
T-11-2	A K R P D I T P E L				2250	AGP-1, -2	147-156
T-12-1	I II * L T P N L I * D T M E L T T N L I * D T I E L				150 70	AGP-2 AGP-1	69-81 71-81
T-12-2	G L S L Y				2400	AGP-1	142-146
T-13	I II Q S E F F E L I L I L				750 250	AGP-1 -	64-68 -
T-14-1	F M G A A F				550	AGP-1	46-51
T-15-1	M L A F				2500	AGP-1, -2	130-133
T-16-1	L S D K W F				250	AGP-1, -2	40-45
T-16-2	I II F I G A A V L N P D Y R A H L I V L R				200 600	AGP-2 AGP-1	46-57 118-124
T-16-3	F F M G A A F				40	AGP-1	45-51
T-17	I II A V T H V G M D E S E I I F T Q M V F F				1500 650	AGP-1, -2 AGP-2	163-176 63-68

Обозначения:

- * — аминокислота не идентифицирована, предположительное место гликозилирования;
- : — аминокислота не идентифицирована, по структуре «ДНК» — остаток цистеина;
- I и II — последовательности, определенные на смеси двух пептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трубецкая О. Е., Тумеева Г. Р., Афанасьева Г. В., Резников Р. Ю., Садовников В. Б., Селюченко О. А., Липкин В. М. // Биоорг. химия. 1991. Т. 17. № 1. С. 42-46.
2. Lee S.-C., Chang C.-J., Lee Y.-M., Lei H.-Y., Lai M.-Y., Chen D.-S. // DNA. 1989. V. 8. № 4. P. 245-251.
3. Kremer J. M. H., Wilting J., Janssen L. H. M. // Pharm. Revs. 1988. V. 40. № 1. P. 1-47.
4. Bleasby A. J., Knowles J. C., Cooke N. J. // Clin. chem. acta. 1985. V. 150. № 2. P. 231-235.
5. Merritt C. M., Board P. G. // Gene. 1988. V. 66. № 1. P. 97-106.
6. Schmid K. // The plasma proteins. N. Y.: Acad. Press, 1975. V. 1. № 4. P. 183-228.

Поступила в редакцию
16. I. 1990

После доработки
7. VI. 1990

O. Ye. TRUBEFSKAYA, G. I. BELOGRUDOV, A. V. DANILOV, G. R. TITEYEVA,
G. V. AFANASIEVA, T. A. MURANOVA, V. M. LIPKIN
**ANALYSIS OF TRYPTIC HYDROLYSATE PRODUCTS OF 40-kDa PROTEIN
FROM THE BLOOD SERUM NUCLEOPROTEIN FRACTION AND ITS
IDENTIFICATION AS α_1 -ACID GLYCOPROTEIN (OROSOMUCOID)**
*Branch of M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region*

From the tryptic hydrolysis of 40-kDa protein from the mouse blood serum thirty-four peptides were isolated by HPLC, of which complete and partial amino acid sequence was established for twenty-eight and six, respectively. On the basis of these data the protein is identified as the blood serum α_1 -acid glycoprotein.