



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 17 * № 1 * 1991

УДК 577.112.5

© 1991 г.

*O. E. Трубецкая, Г. И. Белогрудов, А. В. Данилов,
Г. Р. Титеева, Г. В. Афанасьева, Т. А. Мурanova,
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. Путино 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% трифтормукусной 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 T-5, T-9 и T-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 деградацией

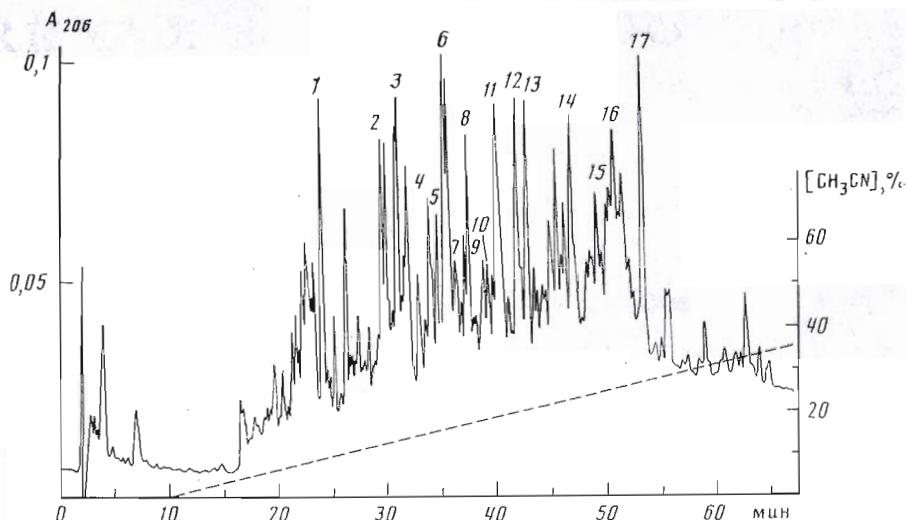


Рис. 1. Разделение пептидов триптического гидролизата 40-кДа белка методом ВЭЖХ на колонке ($0,4 \times 15$ см) с носителем Ultrasphere-ODS в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% ТГА. Скорость элюции 1,2 мл/мин. Здесь и далее пунктирная линия обозначает изменение концентрации ацетонитрила

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 гидролизуемых химотрипсином связей 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 ТАС 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 изоформе 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.

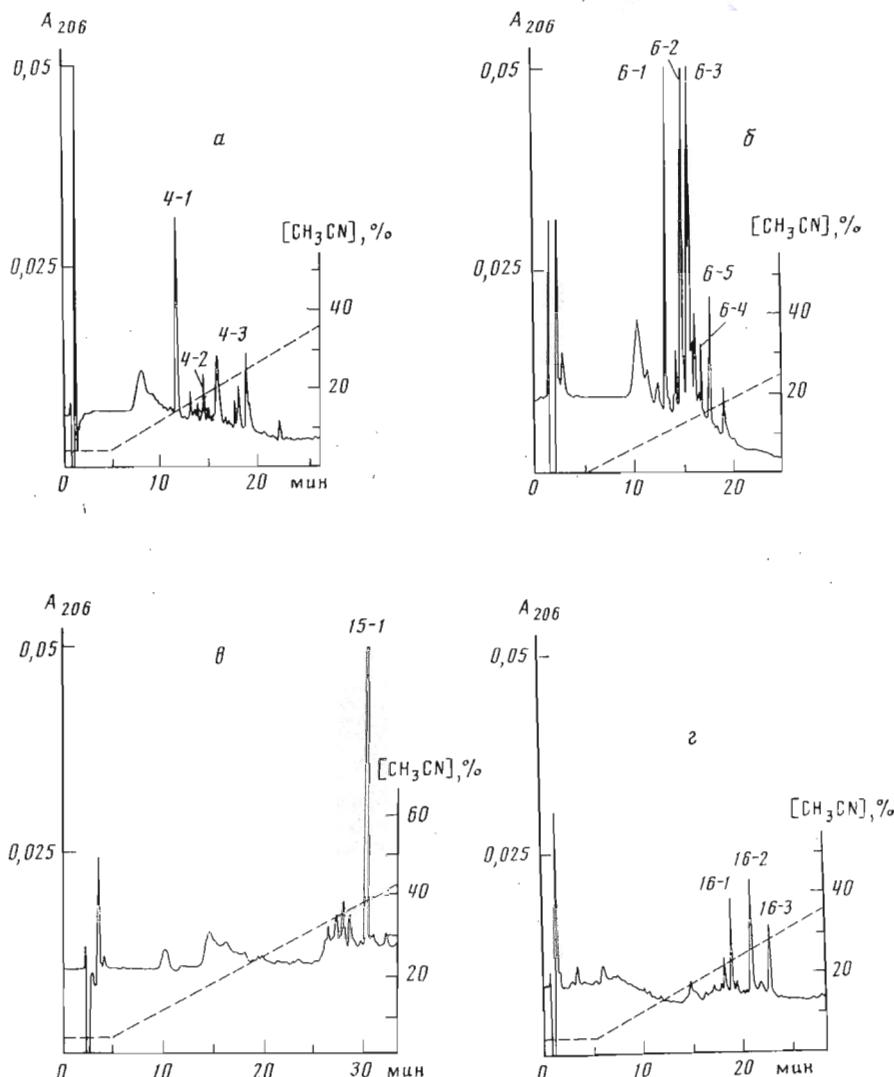


Рис. 2. Разделение фракций 4 (а), 6 (б), 15 (в), 16 (г) (см. рис. 1) с помощью ВЭЖХ на колонке ($0,46 \times 15$ см) с носителем Ultrasphere-ODS в градиенте концентрации ацетонитрила в 10 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 5,7. Скорость элюции 1,2 мл/мин

Пептиды Т-1-1, Т-12-1-I и Т-12-1-II (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-II, 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 обработки сыворотки крови фенолом и хлороформом [1] может быть использована для быстрого получения этого белка в томогенном 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-

Met-Ala-Leu-His-Thr-Val-Leu-Ile-Ile-Leu-Ser-Leu-Leu-Pro-Met
 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 75

T-3-2 T-3-1 60

T-16-3 75

T-14-1

T-4-3

T-16-2-I 90

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 90

T-17-II T-12-1-I

Asn-Asp-Thr-Ile-Glu-Leu-Arg-Glu-Ser-Gln-Thr-Ile-Gly-Asp-Gln-
 Met Tyr His Asp His 105

T-6-2

T-6-3-I

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

T-1-1

T-120

Thr-Phe-Ser-Lys-Tyr-Glu-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-Arg-Gly-Leu-Ser-Leu-Tyr-Ala-Lys-Arg-Pro-
 Asn

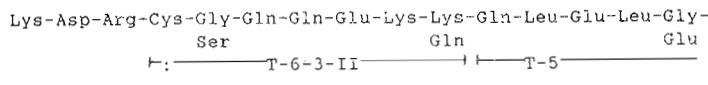
T-12-2 T-11-2 165

T-11-1 T-2-1

T-4-1

Asp-Ile-Thr-Pro-Glu-Leu-Arg-Glu-Val-Phe-Gln-Lys-Ala-Val-Thr-
 T-17-I T-8-1 180

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



207

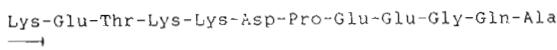


Рис. 3. Аминокислотные последовательности белков AGP-1 и AGP-2, выведенные из структуры соответствующих кДНК [2]. Отмечены пептиды, полученные нами в результате триптического гидролиза 40-кДа белка. Для изоформы AGP-2 приведены только отличающиеся от AGP-1 аминокислоты. Обозначения (: и *) см. таблицу

соким содержанием углеводных остатков ($\sim 45\%$ углеводов по массе). Характерной особенностью белка является микрогетерогенность, обусловленная как генетическим полиморфизмом (обнаружены гены *Agp-1* и *Agp-2*, кодирующие AGP-1- и AGP-2-изоформы белка у человека [5] и мыши [2]), так и различной посттрансляционной модификацией полипептидных цепей [6]. Белку приписывается множество биологических функций, в частности взаимодействие с фосфолипидными мембранами, ингибиование фагоцитоза, ингибирование размножения малярийного плазмодия, взаимодействие с витамином B_{12} , ингибирование активации нейтрофилов, способность связываться с гистамином, ингибирование агрегации тромбоцитов, взаимодействие с коллагеном, стимулация роста Hela- и Н-клеток, участие в T_3-T_1 -антигенспецифической Т-клеточной активации [3]. Нами обнаружено, что α_1 -кислый гликопротеин входит в состав нуклеопротеиновой фракции сыворотки крови и, возможно, образует комплекс с сывороточной ДНК [1].

Предметом последующих структурно-функциональных исследований является получение дополнительной информации о взаимодействии белка с ДНК сыворотки и его микрогетерогенности, а также локализация всех участков связывания углеводных цепей.

Экспериментальная часть

В работе использовали трипсин (Boehringer, США), ацетонитрил (Merck, ФРГ), TFA (Pierce, США) остальные реактивы — отечественного производства марки ос. ч., фенол и этанол — дважды перегнанные.

Заржение лабораторных нелинейных мышей малярийным плазмодием (*Plasmodium berghei*), приготовление сыворотки и выделение нуклеопротеиновой фракции осуществляли согласно [1].

Триптический гидролиз нуклеопротеинового материала (5 нмоль по белку) проводили в 0,1 М NH_4HCO_3 , pH 8,3, при фермент-субстратном соотношении 1 : 25 при 37° С в течение 4 ч. Гидролиз останавливали замораживанием при $-20^{\circ} C$ с последующей лиофилизацией.

ВЭЖХ образовавшейся смеси пептидов осуществляли на колонке (0,46 × 15 см) с обращенной фазой Ultrasphere-ODS (Altex, США). Образец наносили на колонку в виде раствора в исходном буфере (0,1% TFA, pH 2,0, или 10 mM CH_3COONH_4 , pH 5,7). Элюцию пептидов осуществляли градиентом концентрации ацетонитрила в 0,1% TFA, pH 2,0, или 10 mM CH_3COONH_4 , pH 5,7. Пептиды детектировали спектрофотометрически (λ 206 нм).

Аминокислотную последовательность пептидов устанавливали автоматической деградацией по Эдману при помощи белкового секвениатора (Model 477A, Applied-Biosystems, США), образец наносили на стеклянный фильтр, обработанный полибреном. Идентификацию (*on-line*) фенилтио-гидантониевых (Pth) производных аминокислот осуществляли на Pth-анализаторе (Model 120 A, Applied-Biosystems, США) в стандартных условиях. Количество пептидов определяли по выходу Pth-производного аминокислоты, отцепляемой на первом шаге.

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

Пептид	Аминокислотная последовательность 1 5 10 15	Кол-во пептида, пмоль	Идентифи- цирован в цепи	Номера а.о. в цепи
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	4050	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 E S Q T I G D Q : V Y	900	AGP-1	83-93
T-6-4	: G Q Q E K K	300	AGP-1	184-190
	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 * L T P N L I * D T M E L	150	AGP-2	69-81
T-12-2	II T T N L I * D T I E L	70	AGP-1	71-81
	G L S L Y	2400	AGP-1	142-146
T-13	I Q S E F F	750	AGP-1	64-68
T-14-1	II E L I L I L	250	-	-
	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 F I G A A V L N P D Y R	200	AGP-2	46-57
T-16-3	II A H L I V L R	600	AGP-1	118-124
	F F M G A A F	40	AGP-1	45-51
T-17	I A V T H V G M D E S E I I F	1500	AGP-1, -2	163-176
T-17	II T Q M V F F	650	AGP-2	63-68

Обозначения:

* — аминокислота не идентифицирована, предположительное место гликозилирования;
— аминокислота не идентифицирована, по структуре EDNA — остаток цистеина;

I и II — последовательности, определенные на смеси двух пептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трубецкая О. Е., Тимеева Г. Р., Афанасьев Г. В., Резников К. Ю., Садовников В. Б., Селюченко О. А., Липкин В. М. // Биоорганическая 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. TRUBETSKAYA, G. I. BELOGRUDOV, A. V. DANIOV, 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.