



УДК 547.962.1.02

## ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА СТЕЛЛИНА А

Юликова Е. П., Рыбин В. К., Силаев А. Б.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Хроматографией на СМ-сефадексе С-25 проведено фракционирование стеллина протамина из *Acipenser stellatus* на основные компоненты А и В и минорную фракцию Х. Анализом термолизиновых и трипсиновых пептидов установлена полная аминокислотная последовательность стеллина А.

Стеллины А и В являются протаминами, которые находятся в зрелых молоках *Acipenser stellatus* в виде комплекса с ДНК. Впервые суммарный стеллин был выделен и охарактеризован по элементному составу Кураевым [1]. Однако до настоящего времени не удавалось получить гомогенные компоненты белка. Определенный успех был достигнут при фракционировании стеллина на СМ-целлюлозе [2—4], но, по данным аминокислотного анализа, выделенные авторами фракции были неоднородны.

Ранее нами были представлены краткие результаты по установлению аминокислотной последовательности стеллина А [5]. В данном сообщении приводится подробное описание фракционирования стеллина, гидролиза термолизином и трипсином и установления первичной структуры стеллина А на основании данных анализа выделенных пептидов.

Фракционирование стеллина проводили на СМ-сефадексе С-25 (рис. 1). Этот ионообменник успешно был использован при изучении протаминов из *Acipenser güldenstädti* [6]. В результате разделения получили два основных компонента, А и В, в соотношении 3 : 1 и минорный Х, которые оказались однородными при дисковом электрофорезе в 30 % полиакриламидном геле. Компонент Х (табл. 1) содержит такие аминокислоты, как фенилаланин и метионин, не характерные для протаминов рыб. Возможно, он является либо продуктом деструкции какого-нибудь гистона, либо более кислым, чем протамины, белком, играющим определенную роль в образовании нуклеопротамина. Интересно, что сходная по составу фракция была выделена Бретцелем при фракционировании туннива [7].

Стеллины А и В представляют собой три- и дипротамины соответственно [8] и практически совпадают по аминокислотному составу со стуринами А и В из *Acipenser güldenstädti* [9, 10]. N-концевой аминокислотой всех выделенных компонентов является аланин, С-концевой для стеллина А — лизин, для стеллина В — аргинин.

Для получения фрагментов стеллин А гидролизовали термолизином и трипсином. Выбор времени термолизинового гидролиза производился на основании данных, полученных при изучении кинетики реакции с помощью дискового электрофореза в 30 % полиакриламидном геле (рис. 2). Расщепление пептидных связей практически заканчивалось через 5 ч.

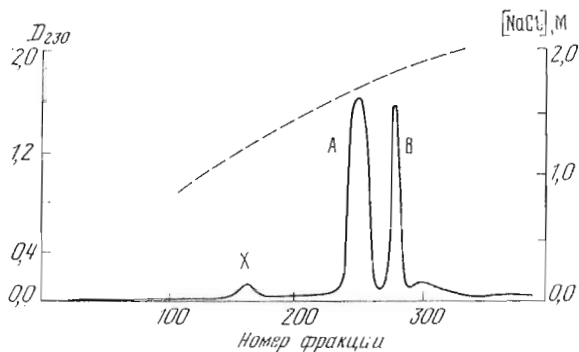


Рис. 1

Рис. 1. Фракционирование стеллина (300 мг) на CM-сефадексе С-25 (колонка 3 × 150 см) в 0,05 М фосфатном буфере (рН 6,2), объем фракций 6 мл

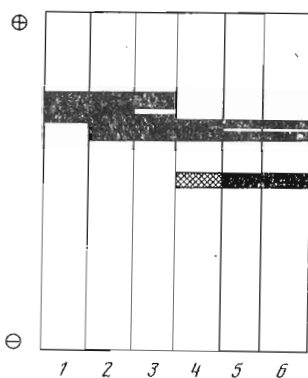


Рис. 2

Рис. 2. Дисктовый электрофорез в 30% полиакриламидном геле стеллина А (1) и продуктов его термолитинового гидролиза в течение 0,05; 0,5; 1; 2,75; 5; 8 ч (результаты 2—6 соответственно)

Гидролиз трипсином проводился в течение 24 ч, что обеспечивало образование коротких пептидов, содержащих блоки нейтральных аминокислот. Полученные смеси пептидов разделяли на CM-сефадексе С-25. Обычно для фракционирования трипсиновых пептидов протаминов применяют амберлит CG-50 [11, 12]. Нами предложено использовать для этой цели ионообменник CM-сефадекс С-25, что позволяет проводить элюцию пептидов в более мягких условиях.

В результате фракционирования удалось выделить 10 термолитиновых (Th1 — Th10) и 5 трипсиновых (T1 — T5) пептидов (рис. 3, 4). Строение пептидов Th1 — Th8, T1, T2, T4, T5 устанавливали из данных аминокислотного анализа, гидролиза карбоксипептидазами А и В, дансильирования (табл. 2, 3). При определении аминокислотной последовательности более крупных фрагментов (Th9, Th10, T3) использовали дополнительно субтрактивный метод Эдмана. С каждым из перечисленных пептидов проводили по три цикла отщепления. Результаты исследования приведены в табл. 2, 3.

Для правильного расположения пептидов в полипептидной цепи стеллина А определяли строение С-концевого участка белка карбоксипептидазами А и В. Согласно полученным данным, стеллин А имеет С-концевую последовательность . . .Lys-Lys-Ser-His-Lys-OH. При построении полной аминокислотной последовательности протамина достаточно использовать пептиды Th7, T3, перекрывающиеся по последовательности -His-Ala, и

Таблица 1

Аминокислотный состав стеллинов А, В, X \*

Аминокислота	А			Аминокислота	В			Аминокислота	X		
	А	В	Х		А	В	Х		А	В	Х
Arg	12	19	18	Thr	1	—	4	Val	—	—	2
His	3	1	4	Ser	2	2	3	Met	—	—	2
Lys	5	—	23	Pro	—	1	—	Leu	1	—	4
Asx	—	—	7	Gly	1	2	5	Phe	—	—	2
Glx	—	1	8	Ala	2	1	18				

\* Данные по аминокислотному анализу стеллинов А и В приведены в аминокислотных остатках, для стеллина X — в мол. %.

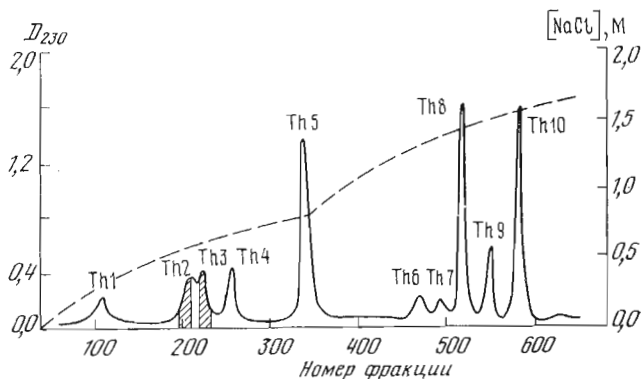


Рис. 3. Фракционирование термолизированных пептидов стеллина А на СМ-сефадексе С-25 (колонка  $2,5 \times 100$  см) в 0,05 М фосфатном буфере (рН 6,2), объем фракций 3,5 мл

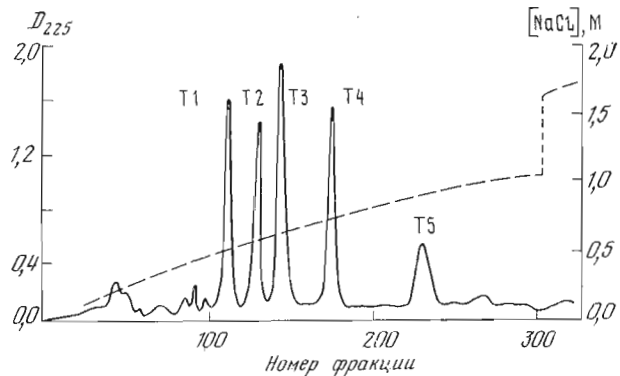
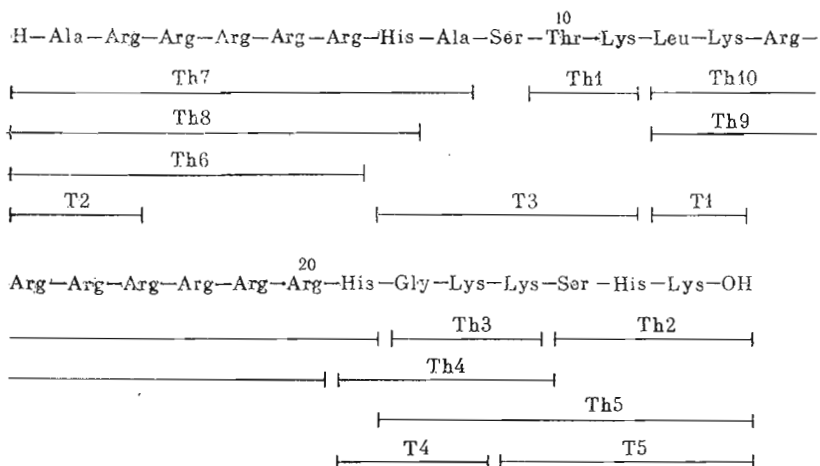


Рис. 4. Фракционирование трипсиновых пептидов стеллина А на СМ-сефадексе С-25 (колонка  $1 \times 100$  см) в 0,05 М фосфатном буфере (рН 6,0), объем фракций 1,7 мл

пептиды Th10, Th5, перекрывающиеся с помощью пептида T4. Перечисленные пептиды исчерпывают аминокислотный состав стеллина А, и строение его можно представить следующим образом:



Стеллин А имеет строение, характерное для протаминов рыб [13, 14]. Однако следует отметить некоторые особенности белка, выделяющие его в особую группу протаминов:

Аминокислотный состав и строение термолизиновых пептидов стеллина А

Пептид	Аминокислотный состав	Концевые аминокислоты		Строение пептида
		N-	C-	
Th1	Thr(1), Lys(1)	Thr	Lys	Thr-Lys
Th2	Ser(1), His(1), Lys(1)	Ser	Lys	Ser-His-Lys
Th3	Gly(1), Lys(2)	Gly	Lys	Gly-Lys-Lys
Th4	Gly(1), Lys(2), His(1)	His	Lys	His-Gly-Lys-Lys
Th5	Ser(1), Gly(4), Lys(3), His	Gly	Lys	Gly-Lys-Lys-Ser-His-Lys
Th6	Ala(1), Arg(5)	Ala	Arg	Ala-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg
Th7	Ala(2), Arg(5), His(1)	Ala	Ala	Ala-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-His-Ala
Th8	Ala(1), Arg(5), His(1)	Ala	His	Ala-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-His
Th9	Leu(1), Arg(7), Lys(1)	Leu	Arg	Leu-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg
Th10	Leu(1), Arg(7), His(1), Lys(1)	Leu	His	Leu-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-His

→ — последовательности, установленные методом Эдмана.

Таблица 3

Аминокислотный состав и строение трипсиновых пептидов стеллина А

Пептид	Аминокислотный состав	Концевые аминокислоты		Строение пептида
		N-	C-	
T1	Leu(1), Lys(1)	Leu	Lys	Leu-Lys
T2	Ala(1), Arg(1)	Ala	Arg	Ala-Arg
T3	Ala(1), Thr(1), Ser(1), His(1), Lys(1)	His	Lys	His-Ala-Ser-Thr-Lys → → → →
T4	Gly(1), His(1), Lys(1)	His	Lys	His-Gly-Lys
T5	Ser(1), His(1), Lys(2)	Lys	Lys	Lys-Ser-His-Lys

→ — последовательность, установленная методом Эдмана.

а) очень низкое содержание нейтральных аминокислот (7 аминокислот); как правило, протамины рыб содержат 10—13 нейтральных аминокислот;

б) наличие в центральной части молекулы белка блока из 9 остатков основных аминокислот, чаще всего основные блоки протаминов не превышают 4—6 остатков;

в) отсутствие характерного для протаминов рыб C-концевого блока из остатков аргинина;

г) присутствие кроме аргинина таких основных аминокислот, как лизин и гистидин, причем даже имеется лизиновый блок (остатки 23—24);

д) отсутствие пролина, играющего определенную роль в формировании третичной структуры протаминов [15].

### Экспериментальная часть

Стеллин выделяли по методу Андо [16] из молок севрюг, отловленных в устье реки Куры.

В работе использовались трипсин (КФ 3.4.4.4), термолизин (КФ 3.4.4), карбоксипептидазы А и В (КФ 3.4.2.2,1 и КФ 3.4.2.2, Sigma, США),

дансильхлорид (Schuchardt, ФРГ). Реактивы для дансильирования и деградации по методу Эдмана очищали по обычным методикам.

*Фракционирование стеллина и пептидов* осуществляли на СМ-сефадексе С-25 в 0,05 М фосфатном буфере при рН 6,2 для стеллина и термолизиновых пептидов и рН 6,0 для трипсиновых пептидов, используя экспоненциальный градиент хлористого натрия. За ходом элюции следили по поглощению при 225 и 230 нм. Обессоливали пептиды и компоненты стеллина на амберлите СС-50.

*Термолизиновый гидролиз* проводили в 0,02 М трис-НСl-буфере (рН 8,0), содержащем 0,005 М CaCl<sub>2</sub>, в течение 5 ч при 37° и соотношении фермент-субстрат 1 : 100. Концентрация субстрата 4,5 мг/мл. Гидролиз останавливали 10-минутным нагреванием при 100°.

*Трипсиновый гидролиз* проводили в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 8,0) 24 ч при 37° и фермент-субстратном соотношении 1 : 50. Реакцию останавливали как и в термолизиновом гидролизе.

*Однородность стеллинов и пептидов* проверяли дисковым электрофорезом в 30 % полиакриламидном геле при рН 1,9 в трубках 0,5 × 12 см при силе тока 1 мА/трубка. Гель приготавливали и прокрашивали согласно работе [17].

*Аминокислотный состав* на аминокислотных анализаторах Hitachi (Япония), модель KLA-3B и LKB-3201, устанавливали после гидролиза 5,7 н. HCl в стандартных условиях.

*N- и C-Концевые аминокислоты* определяли как описано в работе [9].

*C-Концевые последовательности* устанавливали гидролизом карбоксипептидазами А и В в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 8,0) при 37° и фермент-субстратном соотношении 1 : 150. Реакцию останавливали подкислением 0,3 н. уксусной кислотой. Отщепляющиеся аминокислоты анализировали на аминокислотном анализаторе.

*N-Концевые последовательности пептидов* определяли по методу Эдмана в модификации Грея [18]. Дансильные производные аминокислот идентифицировали с помощью двумерной хроматографии на пластинках (12 × 12 см) с закрепленным слоем силикагеля G [9]. Количественную оценку отщепления аминокислот на отдельных циклах осуществляли с помощью аминокислотного анализа остаточного пептида.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kurajeff D. (1901) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 32, 197.
2. Ермольева З. В., Покидова И. В., Колосова И. В. (1971) Антибиотики, 16, 435—436.
3. Пастернак Н. А., Покидова И. В., Шендерович В. А., Ермольева З. В. (1973) Антибиотики, 18, 227—229.
4. Каверзнева Е. Д., Рахматулина А. З. (1970) Химия природн. соедин., 119—123.
5. Юликова Е. П., Рыбин В. К., Силаев А. Б. (1977) IV Всес. симпозиум по химии белков и пептидов. Тез. докл., с. 71, Минск.
6. Юликова Е. П., Евсеевко Л. К., Буланов В. В., Силаев А. Б. (1972) Химия природн. соедин., 779—783.
7. Bretzel G. (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 352, 1025—1033.
8. Kossel A., Schenck E. G. (1928) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 173, 278—308.
9. Юликова Е. П., Евсеевко Л. К., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Рыбин В. К., Силаев А. Б. (1976) Биоорган. химия, 2, 1613—1617.
10. Буланова А. Н., Юликова Е. П., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Силаев А. Б. (1976) Советско-Американский симпозиум по химии и физике белка. Тез. докл., с. 63, Рига.
11. Azegami M. A., Ishii S., Ando T. (1970) J. Biochem., 67, 523—532.
12. Suzuki K., Ando T. (1972) J. Biochem., 72, 1419—1432.
13. Ando T., Yamasaki M., Suzuki K. (1973) Protamines. Springer, N. Y.-Berlin.
14. Coeligh J. P., Rozijn T. H. (1975) Biol. J. Linn. Soc., 7, 245—256.
15. Ottensmeyer F. P., Whitting R. F., Korn A. P. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 4953—4955.
16. Ando T., Ishii S., Yamasaki M., Iwai K., Hashimoto C., Sawada F. (1957) J. Biochem., 44, 275—288.

17. Bretzel G. (1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 209—216.  
18. Gray G. (1967) in: Methods in Enzymol., vol. 11, pp. 469—475, Acad. Press, N. Y.—  
London.

Поступила в редакцию  
5.VII.1978

## THE PRIMARY STRUCTURE OF STELLIN A

YULIKOVA E. P., RYBIN V. K., SILAEV A. B.

*M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Stellin, a protamine from *Acipenser stellatus*, was fractioned into the A and B main components and minor fraction X by chromatography on CM-Sephadex G-25. The complete amino acid sequence of stellin A was established by analysis of tryptic and thermolytic peptides.

---