



УДК 547.962.04

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА МОДИФИКАЦИИ
ОСТАТКОВ АРГИНИНА В БЕЛКАХ МАЛОНЫМ АЛЬДЕГИДОМ****Муранов А. В.***Институт белка Академии наук СССР, Пушкино, Московская область***Модянов Н. Н.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Разработана методика избирательного и количественного превращения остатков аргинина в белках в остатки N^δ-(2-пиримидинил)орнитина, пригодная для использования при изучении первичной структуры белков. В основу данной работы положен метод Кинга, заключающийся в обработке белка малоновым диальдегидом. Предложено для предотвращения побочных реакций удалять избыток реагента введением в реакционную среду после завершения реакции модификации хлоргидрата гуанидина. На примере рибонуклеазы А показана возможность использования этого метода при исследовании первичной структуры белков. Из триптического гидролизата модифицированной рибонуклеазы выделены все ожидаемые пептиды, определены их аминокислотный состав и частичная аминокислотная последовательность. Продуктов неспецифического расщепления полипептидной цепи белка не обнаружено*.

Трипсин является наиболее специфичным протеолитическим ферментом, расщепляющим полипептидную цепь по остаткам аргинина и лизина. Введение определенных заместителей в боковые цепи этих остатков блокирует действие на них трипсина. Использование такого приема дает возможность получить в отличие от триптического гидролиза немодифицированного белка более крупные пептиды, что в значительной мере облегчает определение аминокислотной последовательности белка. Для модификации остатков аргинина в белках было предложено несколько реакций, основанных на конденсации его гуанидиновой группы с различными дикетонами и альдегидами [2—11], но их применение при изучении первичной структуры белков остается проблематичным ввиду целого ряда присущих им недостатков [12]. В 1970 г. Риорданом [13] был предложен метод обратной и специфичной модификации остатков аргинина в белках бутандионом в боратном буфере. В 1975 г. аналогичные условия для реакции с циклогександионом были предложены Патти и Смитом [12]. Обе методики получили широкое распространение в белковой химии.

В нашей работе была поставлена задача создать методику модификации остатков аргинина в белках, пригодную для использования при изучении первичной структуры. Метод, изложенный в работе Кинга [5], при-

* Результаты данной работы сообщались на III Всесоюзном симпозиуме по химии пептидов и белков [1].

влек наше внимание полнотой превращения и специфичностью реакции, которая происходит в результате обработки раствора белка в 10 н. HCl малоновым диальдегидом. Последний образуется из тетраэтоксипропана, непосредственно вводимого в реакционную смесь. При этом остатки аргинина количественно превращаются в N⁶-(2-пиримидинил)орнитин (Orn(Pyr)) с характерным максимумом поглощения при 315 нм, что может облегчить обнаружение модифицированных пептидов в процессе их выделения. Попытки воспроизвести методику Кинга на рибонуклеазе А не привели к положительным результатам. При добавлении трипсина к раствору модифицированного белка гидролиз имел место, однако было невозможно определение N-концевой аминокислотной последовательности пептидного материала. Очевидно, какие-то побочные процессы происходили при извлечении белка из реакционной среды после завершения реакции модификации. Действительно, известно, что между белками и продуктами самоконденсации диальдегидов возможны процессы полимеризации [14, 15]. Образующиеся производные устойчивы в широком диапазоне рН. Если это так, то, блокируя избыток альдегида в реакционной среде, можно избежать нежелательных побочных процессов. Этого удалось достигнуть добавлением в реакционную среду после завершения реакции модификации избытка хлоргидрата гуанидина. Подобраны условия модификации: 50—200-кратный молярный избыток тетраэтоксипропана по отношению к общему количеству остатков аргинина в белке, температура реакционной среды 4—8°, время исчерпывающей реакции 1 ч, время выдерживания смеси с хлоргидратом гуанидина 30 мин, затем нейтрализация раствора ацетатом аммония.

В УФ-спектре модифицированной таким образом рибонуклеазы А появляется полоса с максимумом поглощения при 315 нм (рис. 1), что указывает на прошедшую модификацию. При достаточно жестких условиях реакции не происходило разрыва полипептидной цепи, что следует из данных по определению N-концевой аминокислоты модифицированного белка. Модификация остатков аргинина в рибонуклеазе прошла практически на 100%, что следует из данных аминокислотного анализа модифицированного белка (таблица). При определении процента модификации учитывался количественный распад пиримидинилорнитина в условиях кислотного гидролиза, о чем будет сказано далее. Отсутствие характерных для расщепления по аргинину N-концевых аминокислот в триптическом гидролизате модифицированного белка также говорит об исчерпывающей модификации.

Для выделения пептидов триптического гидролизата модифицированной рибонуклеазы была осуществлена гель-фильтрация на сефадексе G-25, в результате которой получены четыре фракции (рис. 2). Из фракции 1 после хроматографии на DEAE-целлюлозе (рис. 3) были получены четыре пептида, представляющие собой фрагменты рибонуклеазы 38—61, 8—31, 67—91, 105—124 (схема, таблица). Из фракции 2 нисходящей хроматографией на бумаге выделены три пептида: фрагменты 1—7, 62—66, 99—104. Фракции 3 и 4 (рис. 2) содержали в чистом виде фрагменты 32—37, 92—98. Итак, из триптического гидролизата модифицированной рибонуклеазы выделены 9 пептидов, что в сумме составляет всю полипептидную цепь молекулы. Других пептидов — продуктов расщепления по ос-

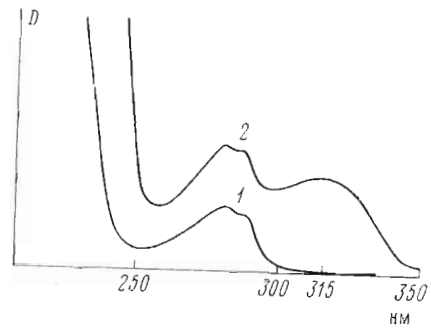


Рис. 1. УФ-спектр карбоксиметилированной панкреатической рибонуклеазы А до модификации остатков аргинина в белке малоновым альдегидом (1) и после (2)

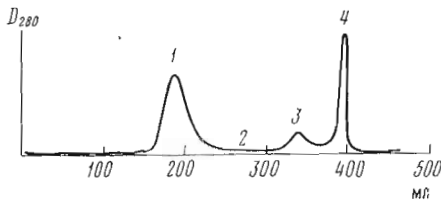


Рис. 2

Рис. 2. Разделение триптического гидролизата модифицированной по аргинину карбоксиметилированной панкреатической рибонуклеазы А на сефадексе G-25 (2,5 × 100 см)

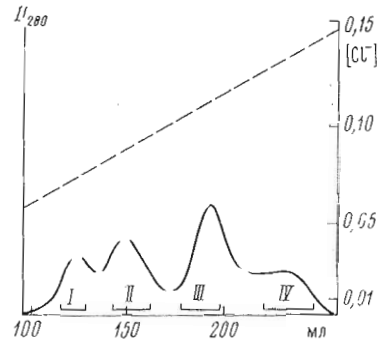


Рис. 3

Рис. 3. Разделение фракции 1 (рис. 2) на DE-52 (колонка 2,5 × 100 см). Указано положение в элюате пептидов 38—61 (I), 8—31 (II), 67—91 (III), 105—124 (I)

таткам аргинина не обнаружено. Выделенные пептиды охарактеризованы аминокислотным составом, а также частичной аминокислотной последовательностью с N-конца, включая остаток пиримидинилорнитина (таблица, схема).

Для исследования поведения пиримидинилорнитина при аминокислотном анализе и в процессе определения аминокислотной последовательности мы синтезировали это производное согласно методике Кинга [5].

Аминокислота	Количество остатков *										
	в карбоксиметилированной панкреатической рибонуклеазе А		в пептидах триптического гидролизата карбоксиметилированной панкреатической рибонуклеазы А, модифицированной по остаткам аргинина **								
	до модификации остатков аргинина в белке	малоновым альдегидом после модификации остатков аргинина в белке малоновым альдегидом	1—7	8—31	32—37	38—61	62—66	67—81	92—98	99—104	105—124
Cys (Cm)	8,0	7,5		0,8(1)		1,8(2)	0,9(1)	1,8(2)	0,9(1)		0,9(1)
Asp	15,0	14,2		2,9(3)	0,9(1)	2,9(3)	0,9(1)	2,9(3)	1,0(1)	1,0(1)	1,9(2)
Thr	10,0	9,6	1,0(1)	0,8(1)	0,9(1)	0,9(1)		3,8(4)		1,9(2)	
Ser	14,9	14,8		5,6(6)	0,9(1)	1,9(2)		4,6(5)			0,9(1)
Glu	11,7	11,9	1,0(1)	2,9(3)		2,9(3)		2,9(3)		1,0(1)	1,0(1)
Pro	3,8	3,7				0,9(1)			0,7(1)		1,8(2)
Gly	3,1	3,2						2,1(2)			1,2(1)
Ala	12,0	12,1	2,6(3)	1,9(2)		1,8(2)	1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)	2,0(2)
Val	8,3	8,4				3,7(4)	1,0(1)				3,5(4)
Met	3,7	3,5		2,5(3)				0,9(1)			
Ile	2,7	2,9						0,9(1)			1,5(2)
Leu	2,0	2,0			0,9(1)	0,9(1)					
Tyr	5,8	5,5		0,8(1)				1,8(2)	1,7(2)		0,9(1)
Phe	3,0	2,8		0,9(1)		0,9(1)					0,8(1)
Orn (Pyr)		2,7		0,7	0,6	0,7		0,7			
His	3,8	3,8		0,7(1)		0,9(1)					1,8(2)
Orn ***		0,8		0,2	0,2	0,2		0,2			
Lys	10,0	9,8	1,9(2)	0,9(1)	1,0(1)	1,9(2)	0,9(1)	1,1(1)	0,9(1)	1,1(1)	
Arg ***	4,0	0,4		0,1	0,1	0,1		0,1			

* В скобках указано число аминокислотных остатков в пептиде согласно известной первичной структуре белка (см. ниже).

** Указано положение пептида в белке по общей нумерации остатков.

*** Аминокислоты, образующиеся из пиримидинилорнитина в процессе кислотного гидролиза.

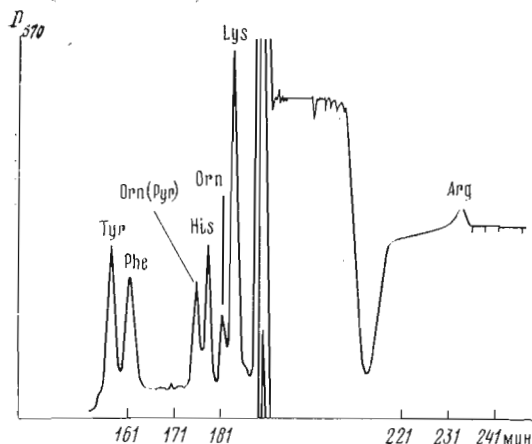


Рис. 4. Фрагмент профиля элюции, полученного при аминокислотном анализе кислотного гидролизата одного из модифицированных по остатку аргинина пептидов рибонуклеазы

Гидролизат синтезированного соединения в 5,7 н. HCl (110°, 24 ч) содержал три продукта: Orn(Pyr) 79%, Arg 8%, Orn 13%, обладающих различной подвижностью при аминокислотном анализе (см., например, рис. 4). В условиях стандартной двумерной ТСХ на силикагеле, применяемой для идентификации Dns-аминокислот [16, 17], Dns-Orn(Pyr) движется вместе с Dns-Thr, но отделяется от него при одномерной хроматографии.

Таким образом, нами усовершенствована методика модификации остатков аргинина в белках малоновым диальдегидом, предложенная Кингом, и на примере рибонуклеазы А показано ее применение для исследования первичной структуры белков. Найдены условия исчерпывающего превращения остатков аргинина без побочных реакций, причем возможна качественная и количественная оценки модифицированного остатка в полипептиде. Определение аминокислотной последовательности модифицированных пептидов не вызывает затруднений.

Описанная методика была использована при определении первичной структуры рибосомного белка L3. Выделены и охарактеризованы все пептиды, полученные в результате ограниченного гидролиза модифицированного белка L3 трипсином по остаткам лизина [18].

Экспериментальная часть

Панкреатическую рибонуклеазу А выделяли из препарата Ленмяско-комбината по методу [19]. Тетраэтоксипропан синтезировали по методике Протопоновой [20]. Пиримидинилорнитин синтезировали из аргинина и тетраэтоксипропана по методу Кинга [5]. Другие реактивы и материалы: трипсин (Serva, ФРГ), сефадекс (Pharmacia, Швеция), 2-меркаптоэтанол (Fluka, Швейцария), соляная кислота (ос. ч., «Союзреактив»), хлоргидрат гуанидина (ч., «Союзреактив»), дважды перекристаллизованный из метанола. Измерение оптического поглощения производили на спектрофотометре Specord (ГДР). Аминокислотные анализы выполняли на аминокислотном анализаторе BC-201 (Biocal, ФРГ).

Модификация остатков аргинина в рибонуклеазе. Белок предварительно карбоксиметилировали по методу [21]. Лиофилизированный белок (10 мкмоль) переносили в ячейку, снабженную магнитной мешалкой и термостатированную при 4°, растворяли при перемешивании в 32 мл 10 н. HCl, охлажденной до 0°. К раствору прибавляли 2 мл тетраэтоксипропана (200-кратный мольный избыток по отношению к общему количе-

ству остатков аргинина в белке). Оставляли на 1 ч при перемешивании и реакционную смесь разбавляли 10-кратным объемом насыщенного раствора хлоргидрата гуанидина в концентрированной HCl и выдерживали еще 30 мин при перемешивании. После этого нейтрализовали реакционную смесь насыщенным водным раствором ацетата аммония. Белок отделяли от остальных компонентов реакционной смеси гель-фильтрацией на сефадексе G-25 (2,5 × 100 см), уравновешенном водным раствором аммиака (pH 9,5). Белок лиофильно высушивали. Полноту модификации оценивали по УФ-поглощению и аминокислотному анализу.

Триптический гидролиз модифицированной рибонуклеазы. Образец белка (8 мкмоль) растворяли в 18 мл 0,2 М бикарбоната аммония (pH 8,0) и переносили в ячейку, термостатированную при 38°. Через 30 мин прибавили 2 мг трипсина в 1 мл воды (pH 3,0). После 6 ч гидролиза прибавили еще 1 мг фермента. Общее соотношение фермент — субстрат 1 : 50 (по весу). Через 16 ч гидролиз прекращали замораживанием. Гидролизат хранили в лиофилизированном виде.

Разделение и анализ триптических пептидов модифицированной рибонуклеазы. Предварительное разделение триптического гидролизата проводили на колонке с сефадексом G-25 fine (2,5 × 100 см), уравновешенным водным раствором аммиака, pH 9,0. Скорость элюции 50 мл/ч, объем фракции 3 мл (см. рис. 2). Ионообменную хроматографию на DEAE-целлюлозе (DE-52, Whatman, Англия) проводили в линейном градиенте (0—0,15 М) концентрации NaCl в 5 мМ трис-HCl (pH 7,8) (рис. 3). Нисходящую хроматографию на бумаге проводили в системе пиридин—*n*-бутанол-уксусная кислота — вода (10 : 15 : 3 : 12).

Аминокислотные последовательности пептидов определяли методом Эдмана в модификации Грея [22]. N-Концевые аминокислотные остатки пептидов и белка определяли дансильным методом с идентификацией Dns-аминокислот с помощью ТСХ на силикагеле [16, 17]. Для идентификации Dns-Orn(Pyr) использовали одномерную хроматографию в системе хлороформ — ацетон — изопропиловый спирт — 25% водный аммиак (6 : 4 : 5 : 0,5).

Для аминокислотного анализа пробы пептидов и белка гидролизовали 5,6 н. HCl в течение 24 ч при 110° в вакуумированных ампулах.

Авторы выражают глубокую благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за ценные замечания и помощь при выполнении этой работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Модянов Н. Н., Мурашов А. В. (1974) Тезисы докладов на III Всес. симпозиуме по химии пептидов и белков, с. 101.
2. Itano H. A., Gottlieb A. J. (1963) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **42**, 405—408.
3. Toi K., Bynum E., Norris E., Itano H. A. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 1036—1043.
4. Signor A., Bonora E. M., Biondi L., Nisato D., Marzotto A., Scoffone E. (1971) *Biochemistry*, **10**, 2748—2752.
5. King T. P. (1966) *Biochemistry*, **5**, 3454—3459.
6. Liu W. H., Feinstein E., Osuga D. T., Haynes R., Feeney R. E. (1968) *Biochemistry*, **7**, 2886—2892.
7. Habeeb A. F. S. A., Bennet J. C. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **251**, 181—184.
8. Yankeelov J. A., Mitchell C. D., Crawford T. H. (1968) *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 1664—1666.
9. Grossberg A. L., Pressman D. (1968) *Biochemistry*, **7**, 272—279.
10. Nakay K., Suzuki T., Takanaka O., Shibata K. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, **194**, 301—309.
11. Takachashi K. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 6171—6179.
12. Patthy L., Smith E. L. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 557—564.
13. Riordan J. F. (1974) *Biochemistry*, **12**, 3915—3923.
14. Richards F. M., Knowles J. R. (1968) *J. Mol. Biol.*, **37**, 231—233.
15. Chio K. S., Tappel A. L. (1969) *Biochemistry*, **8**, 2821—2827.
16. Белевский В. Г., Ганкина Э. С., Нестеров В. В. (1967) Докл. АН СССР, **172**, 91—93.

17. Беленький Б. Г., Ганкина Э. С., Прянишникова С. Р., Эрастов Д. П. (1967) Молекулярн. биология, 1, 184—189.
18. Muranova T. A., Muranov A. V., Markova L. F., Ovchinnikov Yu. A. (1978) FEBS Lett., in press.
19. Crestfield A. M., Stein W. H., Moor S. (1963) J. Biol. Chem., 238, 618—622.
20. Протопопова Т. В., Сколдинов А. П. (1957) Ж. общ. химии, 27, 57—61.
21. Crestfield A. M., Stein W. H., Moore S. (1963) J. Biol. Chem., 238, 622—627.
22. Gray W. R. (1968) in: Methods in Enzymology, vol. XI, pp. 469—475, Acad. Press, N. Y.— London.

Поступила в редакцию
3.VII.1978

IMPROVEMENT OF THE METHOD FOR MODIFICATION OF ARGININE RESIDUES IN PROTEINS WITH MALONIC ALDEHYDE

MURANOV A. V., MODYANOV N. N.

*Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino;
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow*

A procedure for selective and quantitative conversion of arginine residues in proteins to the N⁶-(2-pyrimidinyl)ornithine ones has been developed. The procedure is based on the King's method consisting in the treatment of the protein with malonic dialdehyde. To avoid side reactions it is suggested to remove the excess of the reagent by introducing guanidine hydrochloride into the reaction mixture after the completion of the modification reaction. It is shown on the example of ribonuclease A that this method can be used for investigation of the protein primary structure. All the peptides expected were isolated from the tryptic hydrolysate of the modified ribonuclease and their amino acid composition and partial amino acid sequence were determined. No products of non-specific cleavage of the polypeptide chain were observed.
