



УДК 547.96.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА β -СУБЪЕДИНИЦЫ ДНК-ЗАВИСИМОЙ
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI*Н. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПЕПТИДЫ ОГРАНИЧЕННОГО
ТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗА*Динкин В. М., Марченко Т. В., Хохряков В. С.,
Половникова И. Н., Шоталенко Н. А., Модянов Н. Н.,
Овчинников Ю. А.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Из фракций IX и X, полученных после разделения продуктов ограниченного триптического гидролиза β -субъединицы на сефадексе G-100, с помощью хроматографии на аминексе 50W $\times$ 4, гель-фильтрации, хроматографии и электрофореза на бумаге выделено 45 и 8 пептидов соответственно. Установлена полная аминокислотная последовательность всех пептидов фракции X и 38 пептидов фракции IX, содержащих 30 и 286 аминокислотных остатков соответственно, а также частичная последовательность 7 пептидов фракции IX, содержащих 64 аминокислотных остатка. Показано, что β -субъединица ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* существует в виде 2 изоформ, в одной из которых отсутствует N-концевой остаток метионина.

Анализ состава смеси продуктов ограниченного триптического гидролиза β -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы показал, что эта смесь наряду с высокомолекулярными фрагментами содержит также большое число более мелких пептидов [1]. В настоящем сообщении описывается выделение, очистка и определение аминокислотной последовательности низкомолекулярных продуктов ограниченного триптического гидролиза β -субъединицы из фракций IX и X, полученных в результате первоначального фракционирования гидролизата на сефадексе G-100 [1].

С помощью метода пептидных карт во фракции IX было обнаружено 25 пептидов. Для выделения пептидов из этой сложной смеси была использована традиционная схема, основанная на первоначальном фракционировании пептидов хроматографией на катионите с последующим разделением отдельных фракций хроматографией и электрофорезом на бумаге.

Для ионообменной хроматографии применялся катионит аминекс AG-50W $\times$ 4. Элюирование пептидов осуществлялось системой пиридин-ацетатных буферов с экспоненциальным градиентом pH и концентрации [2]. В результате хроматографирования были получены 24 объединенные фракции (рис. 1).

Объединенные фракции анализировали хроматографией в тонком слое целлюлозы (рис. 2) и определением N-концевых аминокислотных остатков, что позволило провести качественную и количественную оценку пептид-

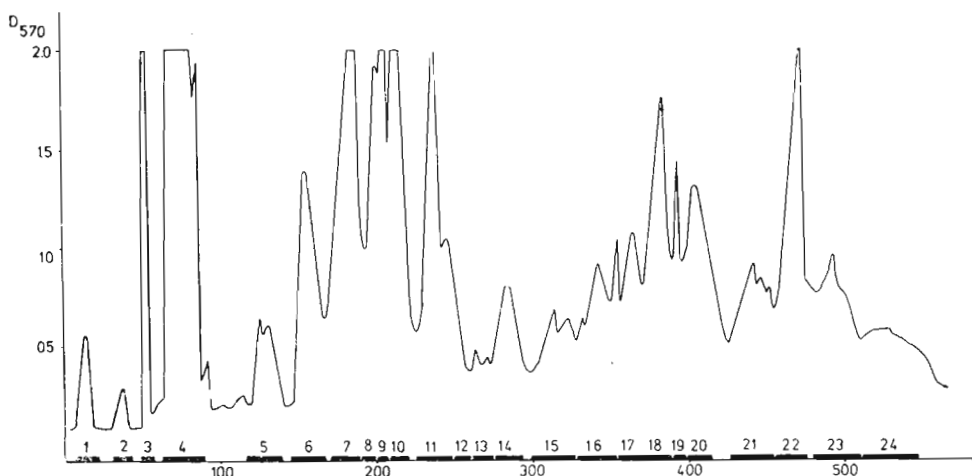


Рис. 1. Разделение пептидов IX фракции ограниченного триптического гидролиза β -субъединицы РНК-полимеразы на катионите аминекс 50W $\times$ 4. Отмечены границы объединения фракций

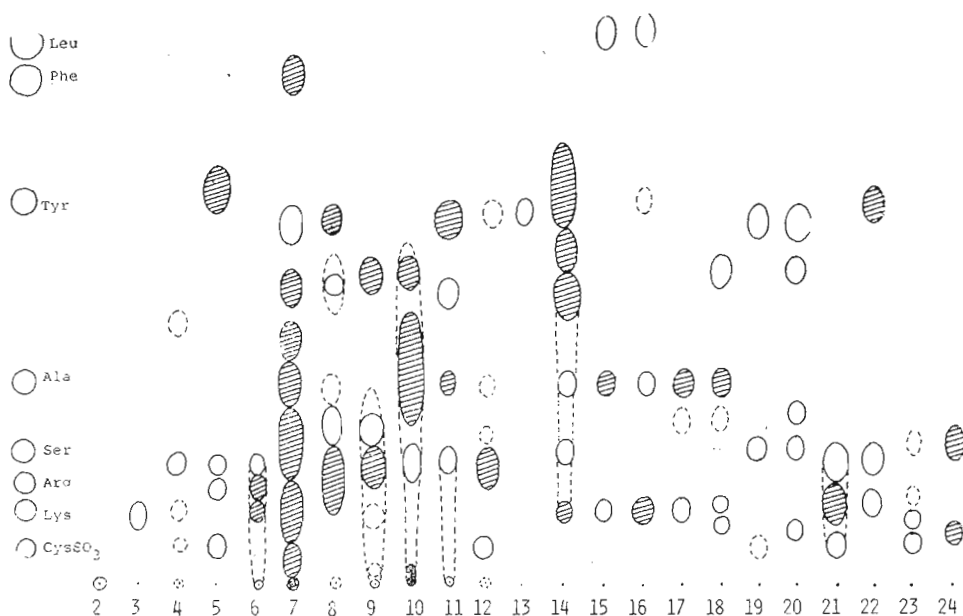


Рис. 2. Хроматография в тонком слое целлюлозы пептидов фракций IX-2 – IX-24 (см. рис. 1) ограниченного триптического гидролиза β -субъединицы в системе *n*-бутанол – уксусная кислота – пиридин – вода, 15:3:10:12

ного состава полученных фракций, а также наметить пути их дальнейшего разделения.

Все фракции (за исключением фракции 3, содержащей один гомогенный пептид) представляли собой смесь небольшого числа пептидов. Как видно из рис. 2, с помощью хроматографии в тонком слое целлюлозы можно добиться удовлетворительного разделения большинства пептидов, поэтому для препаративного выделения пептидов из фракций 4, 5, 9, 11–13, 15–20, 22–24 использовалась хроматография на бумаге. В итоге было выделено 23 гомогенных пептида, и только фракции IX-11-2 и IX-20-1 содержали более одного пептида. Электрофорезом на бумаге при pH 1,9 из

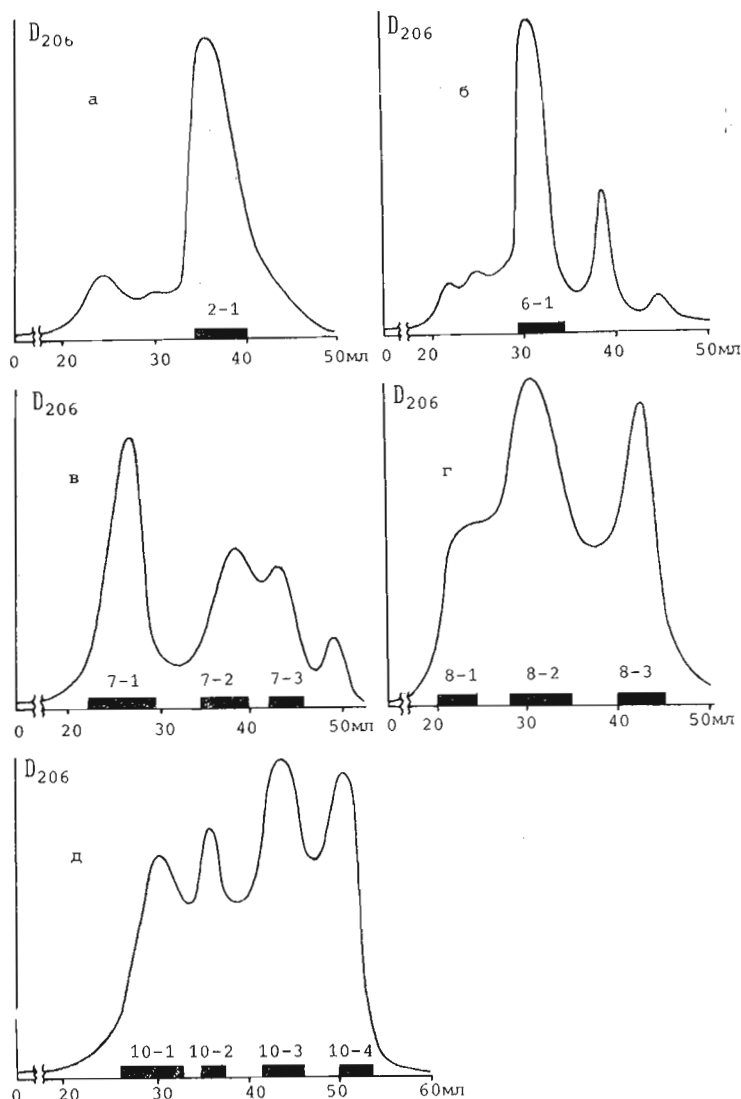


Рис. 3. Разделение триптических пептидов фракций IX-2 (а), IX-6 (б), IX-7 (в), IX-8 (г) и IX-10 (д) хроматографией на сефадексе G-50 в водном аммиаке, pH 9,5–10,5. Отмечены границы объединения фракций

этих фракций выделено три гомогенных пептида — IX-11-2-1, IX-11-2-2 и IX-20-1-2. Во фракциях 2, 6, 7, 8 и 10 содержался пептидный материал, оставшийся в точке нанесения при хроматографии в тонком слое целлюлозы, что свидетельствовало о наличии относительно крупных пептидов. Для разделения этих смесей применялась гель-фильтрация на сефадексе G-50 (рис. 3). В результате были выделены гомогенные пептиды IX-2-1, IX-7-2, IX-7-3, IX-8-1, IX-8-2 и IX-10-1. С помощью гель-фильтрации было получено также большое число фракций, которые содержали более одного пептида и подвергались дальнейшему фракционированию с помощью электрофореза на бумаге при pH 6,5 либо (в случае фракций IX-7-1 и IX-10-4) хроматографии на бумаге. Гель-фильтрацией на сефадексе G-50 было осуществлено также выделение пептида IX-1-2 из объединенной фракции IX-1. Пептиды из фракций 14 и 21, не образующие четких зон при хроматографии в тонком слое целлюлозы, выделяли электрофорезом на бумаге при pH 6,5.

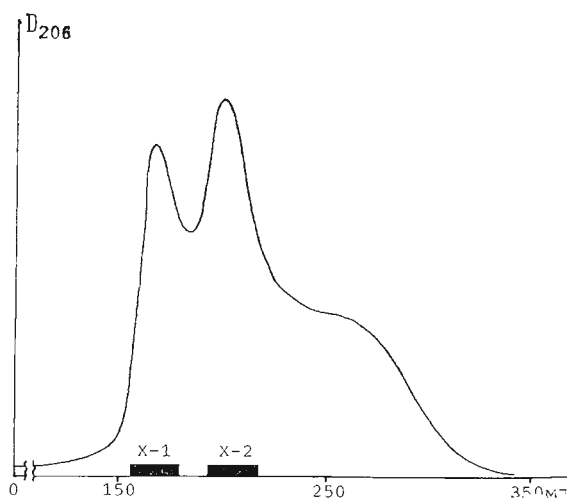


Рис. 4. Разделение триптических пептидов фракции X хроматографией на сефадексе G-10 в водном аммиаке, pH 9,5–10,5

При фракционировании продуктов ограниченного триптического гидролиза β -субъединицы на сефадексе G-100 во фракцию X был объединен пептидный материал, элюировавшийся с колонки вместе с низкомолекулярными соединениями. Следовательно, в этой фракции содержались очень мелкие пептиды.

Первоначальное разделение пептидов фракции X было осуществлено гель-фильтрацией на сефадексе G-10 (рис. 4). В результате пептидный материал был освобожден от солей и разделен на 2 фракции. Из фракции X-1 электрофорезом на бумаге при pH 1,9 был выделен гомогенный пептид X-1-4; при этом были получены также 3 гетерогенные фракции. С помощью хроматографии на бумаге из этих фракций были выделены 4 гомогенных пептида. Разделение пептидов фракции X-2 проводилось электрофорезом на бумаге при pH 6,5.

В конечном итоге из фракций IX и X, полученных при первоначальном разделении продуктов ограниченного триптического гидролиза β -субъединицы, было выделено 45 и 8 гомогенных пептидов соответственно. Данные о распределении пептидов по фракциям и их аминокислотном составе приведены в табл. 1 и 2.

Для определения N-концевой аминокислотной последовательности пептидов использовали метод Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 1-диметиламинонафталин-5-сульфонильных (Dns-) производных и фенилтиогидантоинов (Pth) аминокислот. Так как в большинстве случаев мы располагали ограниченным количеством пептидного материала, в реакции Эдмана с последующим анализом фенилтиогидантоинов аминокислот применяли [^{14}C]фенилизотиоцианат. Фенилтиогидантоины разделяли хроматографией в тонком слое силикагеля и детектировали с помощью автораддиографии, что позволило значительно увеличить чувствительность метода и снизить расход исследуемого пептида до 2–5 нмоль. С-Концевую последовательность пептидов определяли с помощью карбоксипептидаз А и В. Для установления полной структуры ряда пептидов применяли дополнительный гидролиз трипсином, химотрипсином или термолизином. В некоторых случаях полученную смесь фрагментов анализировали с помощью метода Эдмана без разделения по предложенной ранее методике [3].

Аминокислотные последовательности всех пептидов фракции X (табл. 3) и 41 пептида фракции IX (табл. 4) определяли только с использованием деградации по методу Эдмана и с помощью карбоксипептидаз. Структура остальных пептидов определялась как описано ниже.

Аминокислотный состав пептидов фракции X ограниченного триптического гидролиза β -субъединицы

Аминокислота	Пептиды							
	X-1-2-2	X-1-2-3	X-1-3-2	X-1-3-3	X-1-4	X-2-2	X-2-3	X-2-7
Asp		1,19(1)						0,90(1)
Thr						0,90(1)		
Ser								1,30(1)
Glu	2,39(2)	1,27(1)	1,21(1)		1,13(1)		1,03(1)	
Pro				0,90(1)				
Gly								1,17(1)
Ala					1,00(1)			
Val					0,77(1)			
Met				0,54(1)				
Ile	0,99(1)		0,87(1)					
Leu		0,95(1)						
Tyr				0,81(1)				0,47(1)
Phe	0,73(1)							
Lys				1,21(1)	1,01(1)	1,10(1)		
Arg	0,79(1)	0,86(1)	0,92(1)		0,90(1)		0,97(1)	0,97(1)
Число остатков	5	4	3	4	5	2	2	5
N-Концевая аминокислота	Glx	Asp	Glx	Met	Ala	Thr	Glu	Ser
Выход, %	1,6	0,7	3,2	2,0	2,7	3,5	2,4	1,6

Пептид IX-2-1: Ala-Val-Ala-Val-Asx-Ser-Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Lys.
 $\begin{array}{cccccccccccc} \nearrow & \nearrow & \nearrow & \nearrow & \nearrow & \nearrow & \nearrow & \nearrow & \nearrow & \nearrow & \nearrow & \nearrow \end{array}$

При деградации по методу Эдмана была установлена последовательность 10 аминокислотных остатков. Для установления полной структуры пептид гидролизовали термолизинном и полученную смесь разделяли электрофорезом в тонком слое целлюлозы при pH 6,5. С электрофореграммы был элюирован C-концевой положительно заряженный пептид IX-2-1-Th-1, для которого был найден следующий аминокислотный состав: Ala 1,21(1); Val 0,93(1); Lys 0,86(1) и аминокислотная последовательность: Val-Ala-Lys.
 $\begin{array}{ccc} \nearrow & \nearrow & \nearrow \end{array}$

Пептид IX-7-1-1: Val-Ala-Asp-Leu-Phe-Glu-Ala-Arg. С целью выбора между дикарбоновой кислотой и ее амидом в положениях 3 и 6 пептид IX-7-1-1 был подвергнут гидролизу химотрипсином, при котором расщепилась связь Phe-Glu. Полученную смесь 2 фрагментов анализировали по методу Эдмана, при этом на 1-й стадии были идентифицированы фенилтиогидантоины валина и глутаминовой кислоты, а на 3-й — фенилтиогидантоин аспарагиновой кислоты.

Пептид IX-18-1: Leu-Phe-Pro-Ala-Gly-Thr-His-Tyr-Ala-Tyr-His-Glx-Asx-Arg. При деградации по методу Эдмана была установлена последовательность 11 аминокислотных остатков. При гидролизе химотрипсином в пептиде расщепилась связь Tyr-Ala. Полученная смесь двух фрагментов без разделения подвергалась деградации по методу Эдмана. Было пройдено 6 стадий с идентификацией Dns-производных. Результаты, сведенные в табл. 5, в сочетании с известной N-концевой аминокислотной последовательностью пептида, позволили приписать ему приведенную выше структуру.

Пептид IX-20-1-2: Val-Gly-Leu-Val-Arg-Val-Glu-Arg. С целью более точной идентификации 7-го аминокислотного остатка пептид IX-20-1-2 был подвергнут гидролизу трипсином, в ходе которого расщепилась связь Arg-Val. Полученная смесь 2 фрагментов анализировалась по методу Эдмана. При этом на 2-й стадии были идентифицированы фенилтиогидантоины глицина и глутаминовой кислоты.

Аминокислотный состав пептидов фракции IX ограниченного триптического гидролиза β -субъединицы

Аминокислота	Пептиды								
	IX-1-2	IX-2-1	IX-3	IX-4-1	IX-5-1	IX-5-2	IX-6-1-2	IX-7-1-1	IX-7-1-2
Asp	2,02(2)	1,08(1)	4,83(2)		0,71(1)	1,09(1)	1,05(1)	1,17(1)	2,06(2)
Thr		0,82(1)				1,02(1)			
Ser	1,19(1)	1,17(1)	3,82(4)	2,04(2)		1,03(1)			
Glu	2,98(3)		1,06(1)	2,33(2)		1,43(1)	2,12(2)	1,07(1)	
Pro			1,20(1)		1,30(1)	0,98(1)			
Gly	1,32(1)	1,18(1)				2,09(2)			
Ala		3,83*(1)		2,13(2)					1,16(1)
Val		3,72*(4)		0,93(1)		0,82(1)	1,71*(2)	2,02(2)	2,03(2)
Ile	1,78*(2)		1,05(1)	0,54(1)	0,79(1)	1,69(2)		0,81(1)	0,59(1)
Leu	1,72(2)				1,98(2)			1,40(1)	1,05(1)
Tyr									0,86(1)
Phe								0,75(1)	
His									
Lys		0,88(1)	0,90(1)	1,02(1)	1,01(1)	0,97(1)	0,85(1)	0,82(1)	0,58(1)
Arg									
Число остатков	11	13	10	9	6	14	6	8	9
N-Концевая аминокислота	Ser	Ala	Gly	Ala	Asp	Leu	Val	Val	Ala
Выход, %	3,2	10,7	5,3	3,3	3,3	17,0	1,5	3,1	6,4

Таблица 2 (продолжение)

Аминокислота	Пептиды								
	IX-7-1-3	IX-7-2	IX-7-3	IX-8-1	IX-8-2, IX-7-1-6, IX-9-4	IX-8-3-2	IX-9-2, IX-8-3-3, IX-10-3-1	IX-9-3	IX-10-1
Asp	0,92(1)	1,23(1)	0,98(1)		1,10(1)	1,05(1)	1,13(1)	1,29(1)	2,38(2)
Thr	1,09(1)	1,05(1)	0,89(1)		1,00(1)				
Ser	2,78(3)	1,32(1)		1,89(2)	1,16(1)	1,19(1)	1,01(1)		1,25(1)
Glu			1,13(1)		0,91(1)				
Pro	1,19(1)	1,42(1)	2,81(3)		1,99(2)		1,29(1)	1,88*(2)	1,38(1)
Gly	1,01(1)	4,06*(4)	1,16(1)	1,09(1)	1,30(1)	1,32(1)	1,94(2)		
Ala	0,74(1)	3,75*(4)			0,80(1)				1,01(1)
Val	0,66(1)				0,81(1)		1,53(2)		
Met			0,77(1)			1,68(2)	0,99(1)	1,15(1)	
Ile			1,97(2)						
Leu									
Tyr	0,71(1)								
Phe									
His									
Lys		0,92(1)	0,87(1)	0,91(1)	0,81(1)	0,76(1)	0,92(1)	0,86(1)	1,99(2)
Arg		0,85(1)			0,83(1)				1,02(1)
Число остатков	11	14	11	4	12	6	9	5	8
N-Концевая аминокислота	Ser	Ala	Ile	Glu	Ala	Leu	Ala	Gly	Asp
Выход, %	5,3	9,1	29,5	1,7	14,3	1,2	14,7	1,8	1,6

Таблица 2 (продолжение)

Аминокислота	Пептиды							
	IX-10-4-1	IX-10-4-2	IX-11-1	IX-11-2-1	IX-11-2-2	IX-11-3	IX-11-4	IX-12-2
IX-12-5, IX-13-4								
Asp								
Thr								
Ser								
Glu	2,16(2)	1,00(1)		1,11(1)	0,95(1)	1,04(1)	0,95(1)	1,97(2)
Pro							0,84(1)	
Gly							1,16(1)	1,95(2)
Ala			1,11(1)	1,20(1)	1,20(1)	1,14(1)	2,86*(3)	
Val			1,63*(2)		1,07(1)		1,87*(2)	1,15(1)
Met					1,05(1)	0,38(1)		
Ile	0,91(1)	0,72(1)				0,83(1)	0,80(1)	
Leu			1,02(1)	1,10(1)				0,98(1)
Tyr	0,77(1)			0,78(1)	0,72(1)			
Phe								0,63(1)
His								
Lys								
Arg	0,83(1)	0,67(1)	0,84(1)	1,00(1)	1,11(1)	0,96(1)	0,86(1)	0,89(1)
Число остатков	5	3	5	5	6	5	11	7
N-Концевая аминокислота	Glu	Glu	Val	Leu	Ala	Gly	Val	Ala
Выход, %	3,8	3,5	2,2	3,8	1,5	3,8	2,0	2,3

Таблица 2 (продолжение)

Аминокислота	Пептиды								
	IX-13-3	IX-14-3	IX-14-4, IX-15-3	IX-14-5	IX-15-1, IX-16-1	IX-15-2	IX-16-4, IX-17-2	IX-17-1, IX-18-2	IX-18-1
Asp	0,93(1)	1,04(1)	1,11(1)			4,13(4)			1,10(1)
Thr	1,14(1)	1,25(1)		2,37(2)					0,96(1)
Ser	1,15(1)	1,25(1)	1,16(1)	1,28(1)		4,25(1)	1,13(1)	2,13(2)	1,27(1)
Glu				4,31(1)					1,04(1)
Pro			0,98(1)			4,04(1)	1,05(1)	1,07(1)	1,31(1)
Gly			0,61(1)				0,93(1)	1,08(1)	1,86(2)
Ala			0,89(1)					0,95(1)	
Val	0,92(1)	0,81(1)							
Met		0,82(1)							
Ile			1,00(1)	1,00(1)	1,81*(2)	1,67(2)			0,89(1)
Leu		1,69(2)							0,98(1)
Tyr	1,63(2)							0,98(1)	1,53(2)
Phe									
His				0,65(1)					1,71(2)
Lys	0,77(1)	1,00(1)	0,77(1)	1,02(1)	1,00(1)	4,01(1)	0,87(1)	1,79(2)	0,95(1)
Arg			0,95(1)			0,88(1)	0,88(1)		
Число остатков	7	8	8	7	3	7	5	8	14
N-Концевая аминокислота	Val	Met	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Glu	Leu
Выход, %	2,9	6,0	6,6	0,7	2,5	1,8	10,3	7,5	2,6

Таблица 2 (окончание)

Аминокислота	Пептиды									
	IX-19-1	IX-20-1-2	IX-21-2	IX-22-1	IX-20-6, IX-22-2	IX-23-2, IX-24-4	IX-24-1	IX-24-2	IX-24-3	
Asp										
Thr	0,86(1)		1,32(1)	0,87(1)						
Ser	1,08(1)		0,79(1)	0,97(1)				1,00(1)		
Glu		1,12(1)					2,10(2)		1,23(1)	
Pro			0,98(1)	1,14(1)						
Gly		1,21(1)	1,28(1)	2,87(3)		1,27(1)				
Ala				1,09(1)						
Val		2,75*(3)	0,80(1)		0,99(1)					
Met	1,61*(2)				0,83(1)					
Ile	0,42(1)			0,92(1)	0,59(1)		0,86(1)	0,52(1)	0,64(1)	
Leu	0,98(1)	0,88(1)		1,96(2)	1,81*(2)		1,31(1)			
Tyr			0,67(1)				0,95(1)	0,72(1)	0,63(1)	
Phe										
His	0,58(1)		1,72(2)		1,57(2)	0,57(1)			1,04(1)	
Lys					0,81(1)	1,03(1)		1,79(2)	1,00(1)	
Arg	1,08(1)	1,60(2)	0,91(1)	1,60(2)	0,94(1)		1,68(2)			
Число остатков	8	8	9	12	11	4	7	5	5	
N-Концевая аминокислота	Leu	Val	Asp	Arg	Leu	His	Leu	Thr	Met	
Выход, %	1,5	1,3	1,5	7,4	1,0	2,5	1,1	1,9	0,7	

* Результаты гидролиза в течение 72 ч.

Аминокислотная последовательность пептидов фракции X ограниченного триптического гидролиза β -субъединицы *

Пептид	Аминокислотная последовательность	Пептид	Аминокислотная последовательность
X-1-2-2	Glx-Phe-Ile-Glx-Arg → → → → →	X-1-4	Ala-Val-Lys-Glu-Arg ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ →
X-1-2-3	Asp-Glu-Leu-Arg ⇒ ⇒ → →	X-2-2	Thr-Lys → →
X-1-3-2	Glx-Ile-Arg → → →	X-2-3	Glu-Arg ⇒ →
X-1-3-3	Met-Tyr-Pro-Lys → → → →	X-2-7	Ser-Tyr-Asp-Gly-Arg ⇒ ⇒ ⇒ → →

* Здесь и далее стрелками показаны стадии деградации по методу Эдмана с идентификацией Pth-(→), Dns-(→), Pth- и Dns-(⇒) производных и аминокислоты, отщепляемые при действии карбоксипептидаз А и В(←).

Таким образом, в результате проделанной работы установлено полное строение 38 пептидов и частичное строение 7 пептидов, выделенных из фракции IX триптического гидролизата и содержащих в сумме соответственно 286 и 64 аминокислотных остатка. Кроме того, установлена полная структура 8 пептидов, выделенных из фракции X и содержащих в общей сложности 30 аминокислотных остатков. В состав пептидов фракции IX входило от 3 до 14 аминокислотных остатков, в состав пептидов фракции X — от 2 до 5. Это согласуется с представлениями о размере пептидов указанных фракций в соответствии с объемом выхода при элюировании с сефадекса G-100. 3 пептида фракции X (X-1-2-2, X-1-3-2 и X-1-4) оказались идентичными пептидам фракции IX (IX-10-4-1, IX-10-4-2 и IX-16-4 соответственно).

15 пептидов (см. табл. 1, 2) содержат более 1 остатка основных аминокислот. Как показало определение структуры этих пептидов (табл. 3, 4), 4 из них (IX-7-2, IX-11-4, IX-15-2 и IX-22-1) образовались в результате неполного гидролиза связей, образованных 2 остатками основных аминокислот, расположенных рядом в полипептидной цепи, и содержат либо один N-концевой остаток основной аминокислоты, а другой — C-концевой, либо оба остатка основных аминокислот в качестве C-концевого дипептида. В остальных пептидах (IX-8-2, IX-10-1, IX-14-4, IX-16-4, IX-17-1, IX-20-1-2, IX-22-2, IX-24-1, IX-24-2, IX-24-3 и X-1-4) один из остатков основной аминокислоты расположен в середине пептидной цепи, причем только в одном случае (пептид IX-8-2) за остатком основной аминокислоты следует остаток пролина, препятствующий гидролизу. В ряде случаев помимо пептидов, образованных в результате неполного гидролиза, были выделены также продукты исчерпывающего гидролиза этих пептидов по всем связям основных аминокислот (IX-2-1, IX-8-3-2, IX-11-2-2, X-2-3, IX-11-1, IX-7-3, IX-10-4-1, X-1-2-2, X-2-2). Эти данные, а также большое число выделенных пептидов указывают на относительно низкую специфичность ограниченного триптического гидролиза β -субъединицы. Фрагменты, образованные при расщеплении наиболее лабильных пептидных связей, подвергались дальнейшему гидролизу. Однако скорость такого гидролиза невелика, о чем свидетельствует низкий выход (менее 5%) большинства коротких пептидов. В то же время выходы ряда пептидов, несмотря на многостадийность процесса их выделения, оказались довольно высокими. Можно предположить, что эти пептиды являются продуктами первичного расщепления β -субъединицы по наиболее чувствительным и доступным для трипсина связям. К таким пептидам относятся две пары пептидов, различающихся одним остатком аргинина: IX-7-3 и IX-22-1 (суммарный

**Аминокислотная последовательность пептидов фракции IX ограниченного
триптического гидролиза β -субъединицы**

Пептид	Аминокислотная последовательность
IX-1-2	Ser-Leu-Gly-Ile-Asx-Ile-Glx-Glx-(Leu, Asx, Glx) → → → → → → → →
IX-3	Gly-Glu-Thr-Gln-Leu-Thr-Pro-(Glx, Glx, Lys) ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → → →
IX-4-1	Ala-Ala-Val-Glx-Ser-Ser-Ile-Glx-Lys → → → → → → → →
IX-5-1	Asp-Leu-Leu-Gly-Ile-Lys → → → → →
IX-5-2	Leu-Gly-Asp-Leu-Pro-Thr-Ser-Gly-Gln-Ile-Arg → → → → → → → → → → ← ← ←
IX-6-1-2	Val-Val-Gln-Glx-Asx-Arg → → → → →
IX-7-1-2	Ala-Tyr-Asp-Leu-Gly-Ala-Asp-Val-Arg → → → → → → → →
IX-7-1-3	Ser-Val-Gly-Glu-Met-Ala-Glu-Asn-Gln-Phe-Arg → → → → → → → → → →
IX-7-2	Ala-Val-Ala-Val-Asp-Ser-Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Lys-Arg → → → → → → → → → → → → ← ← ← ←
IX-7-3	Ile-Ser-Ala-Leu-Gly-Pro-Gly-Gly-Leu-Thr-Arg → → → → → → → →
IX-8-1	Glu-Ala-Gln-Lys → → → →
IX-8-2	Ala-Asp-Lys-Pro-Leu-Val-Gly-Thr-Gly-Met-Glu-Arg → → → → → → → → → → → ← ← ←
IX-8-3-2	Leu-Ala-Glx-Asx-Leu-Arg → → → → →
IX-9-2	Ala-Leu-Met-Gly-Ala-Asn-Met-Gln-Arg → → → → → → → →
IX-9-3	Gly-Ile-Gly-Asp-Lys → → → → →
IX-10-1	Asp-Gly-Val-Glu-Lys-Asx-(Lys, Arg) ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒
IX-10-4-1	Glu-Phe-Ile-Gln-Arg ⇒ ⇒ ⇒
IX-10-4-2	Glu-Ile-Arg ⇒ → →
IX-11-1	Val-Gly-Leu-Val-Arg → → → → →
IX-11-2-1	Leu-Tyr-Asp-Gly-Arg → → → → →
IX-11-2-2	Ala-Gly-Phe-Glx-Val-Arg → → → → →
IX-11-3	Gly-Ile-Met-Asn-Lys ← → → → →
IX-11-4	Val-Leu-Thr-Glu-Ala-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Arg → ⇒ ⇒ ⇒ → → → → → →
IX-12-2	Val-Leu-Gly-Arg → → → →
IX-12-5	Ala-Gln-Phe-Gly-Gly-Glx-Arg ⇒ ⇒ ⇒ → → → →

Пептид	Аминокислотная последовательность
IX-13-3	Val-Tyr-Ser-Tyr-Thr-Glu-Lys $\begin{array}{ccccccc} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \\ \leftarrow & \leftarrow & \leftarrow & \leftarrow & \leftarrow & \leftarrow & \leftarrow \end{array}$
IX-14-3	Met-Val-Tyr-Ser-Tyr-Thr-Glu-Lys $\rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow$
IX-14-4	Gly-Leu-Lys-Glu-Asn-(Val, Ala, Arg) $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow$
IX-14-5	Leu-Ser-Gln-Ser-Gly-(His, Lys) $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \rightarrow \rightarrow$
IX-15-1	Leu-Leu-Arg $\rightarrow \rightarrow \rightarrow$
IX-15-2	Leu-Ala-Glu-Asn-Leu-Arg-Lys $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \rightarrow \rightarrow$ $\leftarrow \leftarrow \leftarrow \leftarrow$
IX-16-4	Ala-Val-Lys-Glu-Arg $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \rightarrow$
IX-17-1	Glu-Arg-Ala-Gly-Phe-Glu-Val-Arg $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \rightarrow \rightarrow$
IX-19-1	Leu-Val-Val-Ser-Glx-Ile-His-Arg $\rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow$
IX-21-2	Asp-Val-His-Pro-Thr-(His, Tyr, Gly, Arg) $\Rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow$
IX-22-1	Arg-Ile-Ser-Ala-Leu-Gly-Pro-Gly-Gly-Leu-Thr-Arg $\rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow$
IX-22-2	Leu-Asx-Lys-Leu-Val-Asx-(Met, His, His, Ala, Arg) $\rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow$
IX-23-2	His-Gly-Asn-Lys $\rightarrow \Rightarrow \Rightarrow$
IX-24-1	Leu-Arg-Glx-Phe-Ile-Glx-Arg $\rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow$
IX-24-2	Thr-Lys-Met-Tyr-Lys $\rightarrow \rightarrow \leftarrow \leftarrow \leftarrow$
IX-24-3	Met-Lys-Phe-Asn-Arg $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \rightarrow$

Таблица 5

Аминокислоты, отщепляемые при деградации по методу Эдмана от смеси фрагментов, полученных при химотриптическом гидролизе пептида IX-18-1

Стадии деградации	1	2	3	4	5	6
Отщепляемые аминокислоты	Leu Ala	Ile Tyr	Pro His	Ala Glx	Gly Asx	Thr Arg

выход 37%); IX-2-1 и IX-7-2 (суммарный выход 20%), а также пептиды IX-5-2 (выход 17%), IX-8-2 (выход 14%), IX-9-2 (выход 15%), IX-16-4 (он же X-1-4, выход 13%), пептид IX-17-1 и образовавшиеся из него пептиды IX-11-2-2 и X-2-3 (суммарный выход 10%).

Особый интерес представляют пептиды IX-14-3 (Met-Val-Tyr-Ser-Tyr-Thr-Glu-Lys, выход 6%) и IX-13-3 (Val-Tyr-Ser-Tyr-Thr-Glu-Lys, выход 3%). Аминокислотные последовательности этих пептидов отличаются только наличием (пептид IX-14-3) или отсутствием (пептид IX-13-3)

N-концевого остатка метионина. По-видимому, эти пептиды образовались из одного участка полипептидной цепи, поскольку полное совпадение последовательностей из 7 аминокислотных остатков, принадлежащих разным участкам полипептидной цепи, маловероятно. С другой стороны, пептидная связь Met-Val устойчива к триптическому гидролизу. Таким образом, образование пептида IX-13-3, очевидно, является следствием наличия 2 изоформ β -субъединицы. Это предположение было подтверждено при анализе N-концевой аминокислотной последовательности β -субъединицы на секвенаторе. При деградации 5 пмоль β -субъединицы с использованием [^{35}S]фениллизотиоцианата паряду с основной последовательностью Met-Val-Tyr-Ser-Tyr-Thr-Glu-Lys- отчетливо прослеживалась последовательность Val-Tyr-Ser-Tyr-Thr-Glu-Lys-, причем интенсивность пятен фенилтиогидантоновых аминокислот, соответствующих второй последовательности, составляла примерно 50% от интенсивности пятен, соответствующих основной последовательности. Вероятно, дифференциация этих двух форм β -субъединицы РНК-полимеразы происходит в процессе посттрансляционной модификации полипептидной цепи β -субъединицы. Таким образом, пептиды IX-14-3 и IX-13-3 являются N-концевыми пептидами β -субъединицы.

Из фракции IX был выделен также пептид IX-1-2 (Ser-Leu-Gly-Ile-Asx-Ile-Glx-Glx-(Leu, Asx, Glx)), не содержащий основных аминокислот и, возможно, являющийся C-концевым пептидом β -субъединицы.

Экспериментальная часть

Разделение, очистку и определение аминокислотной последовательности пептидов осуществляли в основном методами, описанными ранее [2, 4]. В работе использовали ТРСК-обработанный трипсин, химотрипсин, карбоксипептидазы А и В (все Worthington, США), термолизин (Calbiochem, США), [^{14}C]фениллизотиоцианат (Amersham, Англия).

Ионообменная хроматография пептидов фракции IX на колонке. Фракцию IX продуктов ограниченного триптического гидролиза β -субъединицы разделяли на аминексе 50W $\times$ 4 (200—400 меш; Bio-Rad, США). Подготовку смолы проводили по описанной методике [5]. Колонку размером 0,6 $\times$ 60 см (LKB, Швеция), термостатированную при 35°С, заполняли смолой, уравновешенной стартовым буферным раствором. Липофильный пептидный материал растворяли в 5 мл 30% уксусной кислоты и наносили на колонку под давлением азота. Для разделения пептидов использовали градиент pH и концентрации пиридин-ацетатных буферных растворов. Подачу растворов осуществляли насосом МЦ-300 (Ково, СССР) со скоростью 30 мл/ч. Давление в колонке не превышало 5 кг/см². Первоначально в смеситель наливали 500 мл стартового буферного раствора и подавали его на колонку в течение 3,5 ч (105 мл). Затем через смеситель последовательно пропускали буферные растворы I, II, III и в заключение буферный раствор III подавали на колонку, минуя смеситель. Через 13 ч после начала опыта температуру в колонке повышали до 50°С. Параметры опыта приведены в табл. 6.

Элюат с колонки поступал на коллектор фракций (Ultrarak, LKB, Швеция); объем элюата в каждой пробирке составлял 1 мл. Фракции анализировали реакцией с нингидрином [2].

Гидролиз пептида IX-2-1 термолизинном и разделение образовавшихся пептидов. 50 пмоль пептида IX-2-1 гидролизovali термолизинном в 0,1 M NH_4HCO_3 (pH 8) в течение 4 ч при 37°С и соотношении фермент — субстрат 1 : 30. Смесь пептидов разделяли с помощью электрофореза в тонком слое целлюлозы (пластинки F-1440, 20 $\times$ 20 см, Schleicher und Schüll, ФРГ). Электрофорез проводили при pH 6,5 в системе пиридин — уксусная кислота — вода (25 : 1 : 225) при напряжении 1200 В в течение 30 мин. Пластинку проявляли 0,2% раствором нингидрина в ацетоне. Пептидную

Состав элюирующих буферных растворов и условия элюирования при ионообменной хроматографии на катионите аминекс 50W×4

Буферный раствор		Концентрация пиридина, М	Время элюирования, ч		Объем, мл		Температура в колонке, °С	Номер фракции
номер	рН		данным буферным раствором	общее	данного буферного раствора	общий		
Стартовый буферный раствор	3,1	0,2	3,5	3,5	105	105	35	1-4
I	4,2	0,2	5,0	8,5	150	255	35	5-11
II	5,0	0,5	7,0	16,5	210	465	35/50	12-21
III	5,0	2,0	9,0	25,5	270	735	50	22-24
III (без смесителя)	5,0	2,0	3,5	29,0	105	840	50	—

зону, двигавшуюся к катоду и соответствующую положительно заряженному пептиду, вырезали и пептид элюировали 10% уксусной кислотой.

Дегградация пептидов по Эдману с использованием [^{14}C]фенилизотиоцианата. Реакцию проводили в пробирке (6×70 мм) в вакуумном эксикаторе. 2–5 нмоль пептида растворяли в 30 мкл 1%-ного раствора [^{14}C]фенилизотиоцианата (6 мкКи/мкмоль) в пиридине. Эксикатор при охлаждении вакуумировали, заполняли аргоном и термостатировали при 45°С в течение 30 мин. Затем в реакционную смесь добавляли 10 мкл 5%-ного раствора фенилизотиоцианата в пиридине, систему заполняли аргоном и термостатировали при 45°С еще 30 мин. Реакционную смесь промывали бензолом (3×80 мкл) и высушивали в вакууме при 60°С в течение 30 мин. К остатку добавляли 20 мкл воды и 40 мкл уксусной кислоты, насыщенной HCl. Эксикатор заполняли аргоном и выдерживали 60 мин при 45°С. Содержимое упаривали 30 мин в вакууме при 60°С. К сухому остатку добавляли 30 мкл воды и экстрагировали образовавшиеся фенилтиогидантоины аминокислот этилацетатом (2×30 мкл). Этилацетат упаривали 15 мин при 45°С в вакууме, фенилтиогидантоины растворяли в 10 мкл этилацетата и наносили на три пластинки с тонким слоем силикагеля (60F₂₅₄, 60×60 мм, Merck, ФРГ). Первую пластинку хроматографировали в системе 1, вторую — последовательно в системах 1 и 2 и третью — в системах 1, 2 и 3 (система 1: 1,5% C₂H₅ОН в хлороформе; система 2: 1,5% C₂H₅ОН в хлороформе — CH₃ОН, 9 : 0,5; система 3: 1,5% C₂H₅ОН в хлороформе — CH₃COOH, 8 : 2).

Фенилтиогидантоины аминокислот идентифицировали с помощью автордиографии. Водный слой, оставшийся после экстракции фенилтиогидантоинов аминокислот, высушивали в вакууме при 60°С в течение 30 мин и подвергали следующему циклу дегградации по Эдману.

ЛИТЕРАТУРА

1. Марченко Т. В., Модянов Н. Н., Липкин В. М., Овчинников Ю. А. (1980) Биоорг. химия, 6, 325–331.
2. Модянов Н. Н., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Потапенко Н. А., Шуваева Т. М. (1978) Биоорг. химия, 4, 158–179.
3. Липкин В. М., Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Жигулина Е. Б., Виноградова Е. И. (1972) Биохимия, 37, 410–413.
4. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Потапенко Н. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. М., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. (1973) Биохимия, 38, 3–21.
5. Овчинников Ю. А., Киришкин А. А., Егоров Ц. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. М., Модянов Н. Н. (1972) Биохимия, 37, 451–460.

Поступила в редакцию
12.XI.1979

PRIMARY STRUCTURE OF THE β -SUBUNIT OF *E. COLI* DNA-DEPENDENT
RNA POLYMERASE. II. LOW MOLECULAR WEIGHT PEPTIDES OF LIMITED
TRYPTIC HYDROLYSIS

LIPKIN V. M., MARCHENKO T. V., KHOKHRYAKOV V. S., POLOVNIKOVA I. N.,
POTAPENKO N. A., MODYANOV N. N., OVCHINNIKOV Yu. A.

[*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Ion-exchange chromatography on Aminex 50W $\times$ 4, gel filtration, paper chromatography and paper electrophoresis of the fractions IX and X (isolated by Sephadex G-100 chromatography from the products of the β -subunit limited trypsinolysis) afforded 45 and 8 peptides, respectively. The total amino acid sequence was determined for all peptides of the fraction X and for 38 peptides of the fraction IX comprising 30 and 286 amino acid residues, respectively. For the remaining 7 peptides of the fraction IX, which contain in total 64 amino acid residues, a partial sequence was established. It was found that the β -subunit of DNA-dependent RNA polymerase of *E. coli* occurs as a mixture of two isoforms one of which is devoid of the N-terminal methionine residue.
