



УДК 547.962.02+577.158.45

**ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ
АСПАРТАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ СЕРДЦА КУР****I. ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКА И СТРУКТУРА ПЕПТИДОВ ТРИПТИЧЕСКОГО
ГИДРОЛИЗАТА ЦИТРАКОНИЛИРОВАННОЙ АСПАРТАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ****Мясников А. Н., Мягкова М. А., Шляпников С. В.,
Орлов В. М., Торчинский Ю. М., Северин Е. С.***Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Аспартат-аминотрансфераза из цитоплазмы сердца кур не имеет свободной α -аминогруппы и заметно отличается по аминокислотному составу от соответствующего изоэнзима из сердца свиньи. Использование химических и ферментативных методов с применением масс-спектрометрии позволило доказать наличие ацетильной группы, блокирующей N-концевой аминокислотный остаток белка. Осуществлено выделение и изучена структура некоторых пептидов триптического гидролизата цитраконилированного белка. Показано, что степень гомологии «свиного» и «куриного» изоэнзимов составляет примерно 80%.

Аспартат-аминотрансферазы (*L*-аспартат : 2-оксоглутарат аминотрансфераза; КФ 2.6.1.1) занимают ключевое положение в процессах метаболизма аминокислот, осуществляя реакции их ферментативного трансаминирования [1, 2]. Накопленная в литературе обширная информация о механизме действия этих ферментов вместе с данными о химической топографии и стереохимии их активного центра [2] делает аспартат-аминотрансферазу особенно привлекательным объектом для изучения структурно-функциональных взаимоотношений в ходе реакции трансаминирования и стимулирует развитие комплексных исследований по установлению аминокислотной последовательности белка и его трехмерной структуры.

В течение последних нескольких лет у нас в стране и в ряде зарубежных лабораторий расшифрована первичная структура двух изоэнзимов аспартат-аминотрансферазы, цитоплазматического и митохондриального, выделенных из сердца свиньи [3–6], проводится интенсивное изучение первичной структуры митохондриальной аспартат-аминотрансферазы из сердца кур [7] и опубликованы работы о попытках кристаллизации и начале экспериментов по установлению трехмерной структуры перечисленных белков [8, 9]. Первые рентгеноструктурные исследования были проведены с кристаллами цитоплазматической аспартат-аминотрансферазы из сердца кур [10]. Настоящее сообщение является исходным в серии работ по расшифровке структуры полипептидной цепи этого фермента.

Определение первичной структуры белков, для которых известны гомологии с уже установленной аминокислотной последовательностью, обладает рядом особенностей, главная из которых — возможность использования гомологии для определения положения фрагментов исследуемого белка в его полипептидной цепи. Вместе с тем наличие гомологии может быть

Таблица 1

**Аминокислотный состав цитоплазматической аспартат-аминотрансферазы
из сердца кур**

Аминокислота *	Вычисленное число остатков	Средне-квадратичная ошибка	Данные работ [3, 4] **	Аминокислота *	Вычисленное число остатков	Средне-квадратичная ошибка	Данные работ [3, 4] **
Cys	4,5	0,2	5	Met	9,6	0,1	6
Asp	43,5	0,7	42	Ile	21,0	0,3	19
Thr	22,6	0,4	25	Leu	35,4	0,4	38
Ser	26,2	0,5	26	Tyr	12,5	0,3	12
Glu	38,0	0,5	41	Phe	22,1	0,2	23
Pro	20,3	0,3	24	Lys	21,3	0,3	19
Gly	32,3	0,5	28	His	7,2	0,3	8
Ala	36,8	0,5	32	Arg	25,5	0,2	26
Val	28,4	0,3	29	Trp ***	7,8	0,4	9

* Содержание аминокислот рассчитывали, исходя из молекулярного веса белка 47000 [2], и усредняли по 12 анализам. Число остатков серина и треонина определяли графически из данных 24-, 48- и 72-часового гидролизав экстраполяцией к нулевому времени. Содержание валина, лейцина и изолейцина рассчитывали по данным 72-часового гидролиза.

** Для аспартат-аминотрансферазы из сердца свиньи.

*** Усреднение по результатам четырех измерений.

использовано в некоторых случаях при установлении структуры исследуемых пептидов, так как зачастую даже неполная информация о структуре пептида может на основании критерия подобия считаться достоверной и достаточной. Все это, вместе взятое, определяет своеобразие тактики при анализе гомологичных белков, основанной на расщеплении полипептидной цепи до фрагментов среднего (не крупного) размера. Такие пептиды легко поддаются непосредственному анализу, и выделение их, как правило, не сопровождается агрегацией. Очевидно, однако, что реализация подобного подхода решающим образом зависит от степени гомологии соответствующих белков, поэтому для выбора оптимальной стратегии определения ковалентной структуры цитоплазматической аспартат-аминотрансферазы из сердца кур представлялось существенным оценить степень ее сходства с изоэнзимом сердца свиньи.

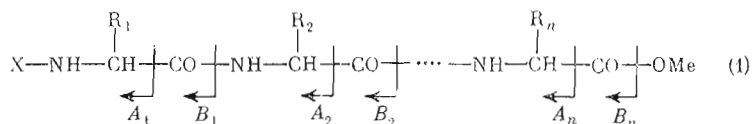
Аспартат-аминотрансфераза представляет собой димерный белок, состоящий из идентичных субъединиц с молекулярным весом около 47 000 [2]. Аминокислотный состав исследуемого белка (табл. 1) довольно близко коррелирует с аминокислотным составом аспартат-аминотрансферазы из сердца свиньи [34], однако для ряда аминокислот имеются значительные различия. Особенно существенно с точки зрения определения первичной структуры значительно большее (10) по сравнению со «свиным» ферментом (6) число метиониновых остатков. Близкие с нашими результаты аминокислотного анализа аспартат-аминотрансферазы из сердца кур были получены Кочкиной и др. [11]; наибольшие различия наблюдаются для пролина (25), изолейцина (16) и валина (25) (ср. табл. 1).

Цитоплазматическая аспартат-аминотрансфераза из сердца кур отличается от других изоэнзимов отсутствием свободной α -аминогруппы, что было показано как с помощью дансильного метода определения N-концевого остатка, так и при попытке деградации целого белка по методу Эдмана [12]. Предположение о присутствии на N-конце белка остатка пироглутаминовой кислоты не удалось подтвердить ни с помощью энзиматических (обработка пироглутаматаминопептидазой), ни с помощью химических (действием HCl в метаноле) методов [13, 14].

Для установления строения N-концевого участка карбоксиметилированный белок гидролизовали последовательно трипсином и химотрипсином. Полученный гидролизат разделяли ионообменной хроматографией и электрофорезом на бумаге. Выделен единственный кислый не проявляе-

мый нингидрином пептид, имеющий блокированную α -аминогруппу и обладающий электрофоретической подвижностью относительно аргинина, равной $-0,29$. Аминокислотный анализ показал, что в состав пептида входят два остатка аланина и по одному остатку серина, изолейцина и фенилаланина. Эти данные, вместе с результатами, полученными при 3-часовом гидролизе пептида карбоксипептидазой А (Phe — 105%, Ile — 98%, Ser — 38%, Ala — 32%), позволили представить структуру данного фрагмента в виде X-Ala-Ala-Ser-Ile-Phe. Применение гидролиза в сочетании с идентификацией ацилгидразидов в виде дансильных производных [15] привело к заключению, что блокирующей группой белка является ацетильный остаток. Экспериментально найденное значение Dns-ацетилгидразида (по отношению к Dns-амиду) в хроматографических системах I и IV, используемых для разделения Dns-аминокислот [16], составляет соответственно 1,15 и 1,20.

Окончательное подтверждение строения N-концевого пептидного фрагмента было получено при масс-спектрометрическом анализе его метилового эфира. При ионизации электронами распад летучих производных пептидов происходит по схеме (1) с преимущественной стабилизацией положительного заряда на N-концевом фрагменте [17]:



где R_1, R_2, R_n — боковые радикалы аминокислотных остатков, а X — N-концевая блокирующая группа пептида.

Интерпретация масс-спектра основывалась на анализе интенсивности сигналов, соответствующих характеристическим массовым числам фрагментов пептида (табл. 2). Результаты масс-спектрометрической деструкции анализировали исходя из трех гипотетических структур пептидного фрагмента:

- I. Ac-Ala-Ala-Ser-Ile-Phe-OMe
- II. Ac-Ala-Ser-Ala-Ile-Phe-OMe
- III. Ac-Ser-Ala-Ala-Ile-Phe-OMe

Результаты, представленные в табл. 2, убедительно свидетельствуют в пользу первой из перечисленных структур.

C-Концевую последовательность аспартат-аминотрансферазы определяли при ферментативном расщеплении белка карбоксипептидазами А и В. Гидролиз проводили в присутствии 1% додецилсульфата натрия, поскольку нативный фермент устойчив к действию карбоксипептидаз, а денатурированный нагреванием — нерастворим в условиях гидролиза. Результаты этих опытов (табл. 3) при сравнении с данными работ [3, 4] приводят к заключению об идентичности C-концевых последовательностей цитоплазматических аспартат-аминотрансфераз из сердца кур и свиньи (...-Lys-Ile-Gln).

Приведенные данные свидетельствуют о существенных различиях в отдельных районах пептидной цепи сравниваемых изоэнзимов, однако недостаточны для обоснованной количественной оценки степени гомологичности двух белков. Наиболее естественные способы получения такой предварительной оценки — исследование N-концевой аминокислотной последовательности белка с помощью секвенатора или метод сравнительного анализа пептидных карт [16] — также не могли быть информативными; последний — вследствие достаточно сложной и неоднозначно интерпретируемой картины разделения пептидного гидролизата такого высокомолекулярного белка, как аспартат-аминотрансфераза. В связи с этим нам казалось целе-

Таблица 2

Относительная интенсивность сигналов характеристических ионов трех гипотетических вариантов структуры N-концевого химотриптического пептида аспартат-аминотрансферазы

Вариант структуры	A ₁	B ₁	A ₂	B ₂	A ₃	B ₃	A ₄	B ₄	A ₅	B ₅	M+
I	24,4	85	62	98,9	26,1	100	38,6	12,6	2,8	23,2	3
II	24,4	85	19	0,3	26,1	100	38,6	12,6	2,8	23,2	3
III	0	3,3	19	0,3	26,1	100	38,6	12,6	2,8	23,2	3

Таблица 3

Гидролиз аспартат-аминотрансферазы смесью карбоксипептидаз А и В

Время гидролиза, мин	Количество отщепленной аминокислоты, %			Время гидролиза, мин	Количество отщепленной аминокислоты, %		
	Gln	Ile	Lys		Gln	Ile	Lys
5	31	24	14	20	90	74	35
10	57	43	18	40	110	96	73

сообразным предварительное изучение ограниченного по остаткам аргинина триптического гидролизата белка. Величина среднестатистического размера таких пептидов, равная примерно 16 остаткам, и эффективность их детекции позволяли, ограничиваясь в первом приближении пептидами низкого и среднего молекулярного веса, надеяться на получение интересующей нас информации.

Расщепление белка трипсином по остаткам аргинина проводили после его карбоксиметилирования и модификации остатков лизина цитраконовым ангидридом. Полученную смесь пептидов ограниченного протеолиза фракционировали на колошке с сефадексом G-50, тонкий (рис. 1), объединенные фракции лиофилизировали и децитраконализовали.

Фракция I содержала смесь высокомолекулярных пептидов, которые в настоящей работе не анализировали.

Фракцию II хроматографировали на колонке с катионитом Chromobeads P (рис. 2). Определение N-концевых аминокислот и данные аналитического электрофореза и хроматографии на бумаге показали, что субфракции II-3, II-6, II-10 содержат индивидуальные пептиды. Остальные субфракции подвергали препаративному электрофорезу на бумаге при pH 3,5; при этом получены в гомогенном состоянии пептиды ТС-II-1-1, ТС-II-2-1, ТС-II-4-1, ТС-II-5-1, ТС-II-8-1, ТС-II-9-1, ТС-II-9-2, ТС-II-11-1, ТС-II-12-1, ТС-II-12-2. Очистка фрагмента ТС-II-7-1-1 потребовала дополнительного проведения хроматографии на бумаге (R_{Ave} 1,34). Величины электрофоретической подвижности пептидов относительно аргинина приведены в табл. 4.

Разделение пептидной смеси III (рис. 1) осуществляли с помощью препаративного электрофореза на бумаге при pH 6,5. При этом получены четыре индивидуальных фрагмента ТС-III-1 — ТС-III-4, а также соединение ТС-III-5, оказавшееся свободным аргинином. Выход последнего составил 55%.

Аминокислотный состав и результаты анализа N-концевых аминокислотных остатков всех выделенных пептидов представлены в табл. 4. Основой для определения их структуры послужил метод Эдмана в дансильной модификации [12]. Применение только этого метода оказалось достаточным для определения полной аминокислотной последовательности в пептидах ТС-II-2-1, ТС-II-4-1, ТС-II-8-1, ТС-II-9-2, ТС-II-12-2, ТС-III-3 и

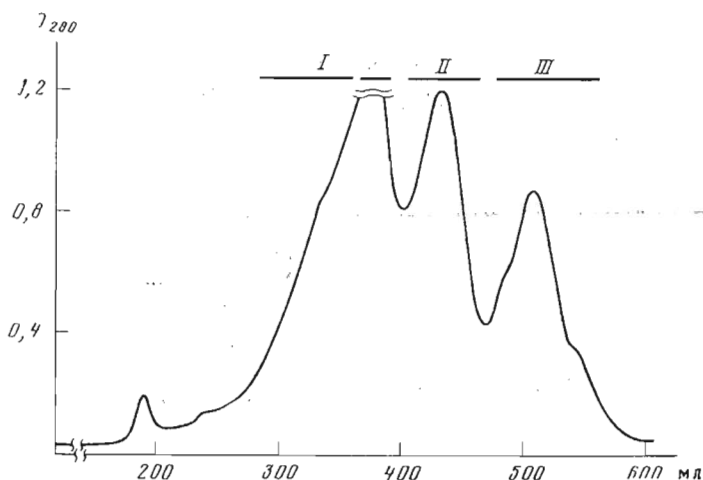


Рис. 1. Хроматография смеси пептидов, полученной при гидролизе карбоксиметилированной аспартат-аминотрансферазы трипсином, на колонке (1,8×200 см) с сефадексом G-50 (тонкий). Элюция 0,1 М триэтил-аммоний-бикарбонатным буфером, pH 8,5, скорость элюции 15 мл/ч. Здесь и на следующем рисунке показаны границы объединения фракций

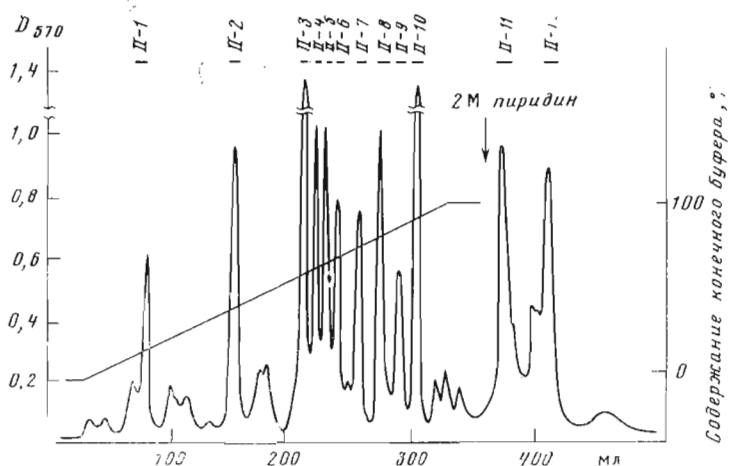


Рис. 2. Хроматография фракции II (см. рис. 1) на колонке с ионообменной смолой Chromobeads P. Условия — см. «Экспериментальную часть»

ТС-III-4 (табл. 5). Структура пептидов ТС-II-3, ТС-II-6, ТС-II-7-1, ТС-II-9-1, ТС-II-10, ТС-II-11-1, ТС-II-12-1, ТС-III-1 доказана на основании данных эдмановской деградации с привлечением результатов анализа аминокислот после исчерпывающего гидролиза пептидов лейцинаминопептидазой.

Пептид ТС-II-1-1. Гидрофобный характер пептида затруднил определение методом Эдмана его полной структуры. С-Концевая последовательность установлена при расщеплении пептида карбоксипептидазой А (5 мин: Phe — 101%, Val — 75%; 1 ч: Phe — 96%, Val — 98%, Ala — 53%).

Пептид ТС-II-5-1. Частичная последовательность пептида установлена с помощью девяти циклов деградации по Эдману. Гидролиз карбоксипептидазой С (2 ч: Arg — 73%, Ala — 65%, Gly — 23%, Gln — 15%; 6 ч: Arg — 98%, Ala — 105%, Gly — 62%, Gln — 45%, Ser — 30%) позволил представить строение С-концевой части пептида в виде -Ser-Gln-Gly-Ala-Arg. Лейцинаминопептидаза за 4 ч отщепляет 160% треонина, 55% триптофана и 8% серина.

Аминокислотный состав и некоторые характеристики пептидов ограниченного триптического гидролизата аспаргат-аминотрансферазы

Пептид	Аминокислота													E_{Arg} при pH		Выход, %	N-Концевой остаток			
	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	Arg			Trp		
TC-II-1-1				1,1	1,8		2,0	2,0			0,8	1,1		1,0		1,0		0,31	10	Ala
TC-II-3					1,0		0,9	1,1						1,0					33	Ile
TC-II-2-1								2,5				1,0				1,0		0,60	28	Val
TC-II-4-1								0,7	1,0		1,7					1,0		0,70	27	Val
TC-II-5-1	1,1	1,8	1,9	1,1	2,0	1,1	1,1									1,0	+	0,49	35	Thr
TC-II-6	2,0		1,0	1,0		1,0				0,9						1,0		0,47	10	Glu
TC-II-7-1	1,2				0,7		2,0	1,0								1,0		0,77	1	Asp
TC-II-8-1							1,0									1,0		0,54	50	Ala
TC-II-9-1	1,1	0,9					1,1							1,0		1,0		0,66	2	Thr
TC-II-9-2			1,0				1,1		0,7			1,0				1,0			12	Leu
TC-II-10			0,9	1,0								1,0				1,0			55	Ser
TC-II-11-1	1,0		1,0				2,1									1,0		0,69	30	Ala
TC-II-12-1	1,1			1,2												1,0		0,68	25	Asp
TC-II-12-2								1,1		0,9						1,0		0,81	10	Ile
TC-III-1	1,1			1,0												1,0		-0,29	1	Asp
TC-III-2	1,0						2,0						0,8		1,0	1,0	+	0,38	24	Tyr
TC-III-3		1,0											0,9			1,0			35	Thr
TC-III-4			1,0													1,0			40	Ser

пиями 381—386) не может считаться абсолютно строгой, однако для получения предварительной оценки степени гомологичности двух структур они представляются достаточно оправданными. Проанализированные пептиды в целом охватывают около четверти всей полипептидной цепи аспаргат-аминотрансферазы, представляя различные участки белковой молекулы. Средняя степень гомологии, оцененная таким образом, составляет около 80%.

Следует отметить несколько закономерностей, присущих исследованному гидролизату белка. Первая из них связана с обнаружением в продуктах протеолиза свободного аргинина. Наиболее вероятная причина его появления — наличие в белковой цепи последовательности ...Arg-Arg... (аналогично строению участка 214—215 свиного изоэнзима). Кроме того, анализ набора представленных в табл. 5 пептидов свидетельствует о наличии в гидролизате аспаргат-аминотрансферазы неспецифических для трипсинолиза «химотрипсиноподобных» фрагментов. Прежде всего это относится к пептидам N-концевой части белка, таким, как ТС-II-1-1 и ТС-II-8-1, которые являются типичными продуктами химотриптического гидролиза по связям ароматических остатков; в первом случае химотриптическое расщепление прошло по связи Phe¹⁸-Lys¹⁹, а во втором — по связи Phe⁶-Ala⁷ (см. структуру N-концевого химотриптического пептида). Выход соответствующих пептидов составляет 10 и 50% и может быть объяснен, по-видимому, только характером препарата трипсина, использованного в работе, который, очевидно, содержал некоторое количество химотрипсина или подобного ему по специфичности материала.

Таким образом, результаты настоящей работы позволяют сформулировать стратегию последующего исследования первичной структуры аспаргат-аминотрансферазы, которая основывается на значительном сходстве гомологичных последовательностей аминокислотных остатков «свиного» и «куриного» изоэнзимов и предполагает исследование двух «базовых» гидролизатов полипептидной цепи: исчерпывающих гидролизатов фермента стафилококковой протсазой и трипсином.

Экспериментальная часть

В работе использовали: α -химотрипсин (КФ 3.4.21.1); ТРСК-обработанный (35 К 927) трипсин (КФ 3.4.21.4); DFP-обработанные карбокси-пептидазы А (КФ 3.4.12.12) и В (КФ 3.4.12.3); лейцинаминопептидазу (КФ 3.4.11.1, Worthington, США); карбоксипептидазу С (КФ 3.4.12.1, Boehringer, FRG); сефадексы (Pharmacia, Швеция) и ионообменные смолы — Chromobeads Р (Technicon, США) и AG-50×4 (Bio-Rad, США), а также полиамидные пластинки (BDH, Англия). Все реактивы для деградации по методу Эдмана соответствовали квалификации Sequenal grade (Pierce, США). Реактивы, в том числе для электрофореза в полиакриламидном геле (Reanal, Венгрия), и все растворители, отвечающие маркам х.ч. или ос.ч. («Союзреактив»), перед употреблением очищали; для деионизации воды и растворов мочевины использовали ионообменную смолу Elgalite (Elga corp., Англия). Выделение цитоплазматической аспаргат-аминотрансферазы из сердца кур проводили по методу Кочкиной и др. [11].

Карбоксиметилирование аспаргат-аминотрансферазы проводили в 0,5 М трис-HCl-буфере (рН 8,3), содержащем 8 М мочевины [18], исходя из 120 мг лиофильно высушенного препарата фермента. Белок предварительно денатурировали инкубацией в вышеуказанном буфере в течение 12 ч при 20° С с 10-кратным молярным избытком 2-меркаптоэтанола. Использовали 50-кратный молярный избыток иодуксусной кислоты; через 30—40 мин реакцию останавливали повторным добавлением меркаптоэтанола (500-кратный избыток) и интенсивным диализом в темноте против 5% уксусной кислоты. Диализованный белок лиофильно высушивали.

Цитраконилирование карбоксиметилированного белка проводили в 8 М мочеvine и 0,5 М натрий-боратном буфере, pH 8,5. 1000-кратный мольный избыток цитраконового ангидрида (относительно белка) добавляли порциями при перемешивании, поддерживая pH смеси равным 8,5. Время реакции составляло 40 мин. Реакционную смесь диализовали против 0,2 М бикарбоната аммония, pH 8,0.

Снятие цитраконовой защиты проводили инкубацией пептидов при pH 3,0 в течение 15 ч при 20° С.

Триптический гидролиз. Карбоксиметилированный цитраконилированный препарат белка гидролизовали трипсином в 0,2 М аммоний-бикарбонатном буфере (pH 8,0) 16 ч при 37° С, используя фермент-субстратное соотношение 1 : 50. Фермент добавляли двумя порциями через 4 ч. Гидролизат лиофильно высушивали и пептиды фракционировали на колонке с сефадексом G-50 (рис. 1).

Ионообменную хроматографию фракции II (см. рис. 1) проводили на колонке высокого давления (0,6×50 см) с катионитом Chromobeads P. Элюцию осуществляли градиентом pH и молярности пиридин-формиатного — пиридин-ацетатного буферов, содержащих 30% пропанол. Стартовый буфер — 0,05 М пиридин-формиат, pH 2,4. Линейный градиент — стартовый буфер — 2,0 М пиридин-ацетатный буфер (pH 5,2) создавали с помощью системы Ultrograd (LKB, Швеция). В конце хроматографии колонку промывали 2 М пиридином. Скорость элюции (10 мл/ч) поддерживали насосом типа MC-706 (Kovo, СССР); объем фракции составлял 1,5 мл (рис. 2).

Детекцию пептидов в элюатах осуществляли по УФ-поглощению при 280 нм или (при хроматографии в пиридин-ацетатных буферах) с помощью нингидриновой реакции после щелочного гидролиза [19]. Аликваты (0,3 мл) отбирали из каждой фракции, смешивали с 1 мл 2,5 н. NaOH и инкубировали 2,5 ч при 90° С. Остаток нейтрализовали 1 мл 30% уксусной кислоты. К смеси добавляли 0,25 мл 0,2 М натрий-цитратного буфера, pH 5,0, содержащего 0,2% SnCl₂, затем 0,25 мл 4% нингидрина в пропанолу и инкубировали в кипящей водяной бане 10 мин. Пробу быстро охлаждали, добавляли 1,5 мл 50% пропанолу и измеряли поглощение при 570 нм.

Хроматография и электрофорез на бумаге. Для препаративного разделения пептидов использовали бумагу Whatman 3 MM, для аналитических экспериментов — Whatman 1. Хроматографию осуществляли в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода, 15 : 3 : 10 : 2. Электрофорез проводили в приборе с жидкостным охлаждением (Savant, США) при градиенте потенциала 80 В/см в течение 1 ч. Применяли две буферные системы: пиридин — уксусная кислота — вода, 25 : 1 : 225 (pH 6,5), и 10% водный раствор уксусной кислоты, доведенный до pH 3,5 пиридином. Пептиды обнаруживали последовательно флуорескаминном, фенантренхиноном и нингидрином [16, 20]. В некоторых случаях использовали реакцию с хлором и иод-крахмальным реагентом, а также качественную реакцию на триптофан [21]. Элюцию с бумаги основных и нейтральных пептидов осуществляли 10% уксусной кислотой и кислых — 10% пиридином в воде.

Выделение N-концевого пептида аспаргат-аминотрансферазы. Карбоксиметилированный фермент суспендировали в 1% NH₄CO₃ (10 мг/мл), обрабатывали 4 ч трипсином (1 : 100) и затем химотрипсином (1 : 100), продолжая инкубацию еще 4 ч. Полученный гидролизат высушивали, растворяли в воде и после подкисления до pH 5,5 наносили на колонку (1×120 см) с AG-50×4 (200—400 меш) в H⁺-форме. Смолу промывали 50 мл воды и элюат высушивали. Дальнейшую очистку пептида проводили электрофорезом на бумаге при pH 6,5. Детекцию пептидов осуществляли по реакции с хлором и иод-крахмальным реагентом.

Аминокислотный анализ проводили на анализаторах BC-201 и D-500 (Bio-Cal, ФРГ; Durrum, США). Пептиды гидролизовали 5,7 н. HCl 22—24 ч

при 105° С в вакуумированных, запаянных ампулах; время гидролиза белка составляло 24, 48 и 72 ч. Содержание метионина и цистеина определяли в виде метионинсульфона и цистеиновой кислоты после окисления белка надмуравьиной кислотой [21]. Количество остатков триптофана определяли флуориметрическим методом [22].

Определение N- и C-концевых последовательностей пептидов энзиматическими методами. Гидролиз с помощью карбоксипептидаз А и В и лейцинаминопептидазы проводили в 0,2 М NaHCO₃; для переваривания субстратов карбоксипептидазой С использовали 0,1 М этилморфолин-ацетатный буфер, рН 5,3. Соотношение фермент — субстрат для карбоксипептидаз А и В — 0,2, для С — 3, для лейцинаминопептидазы — 0,5 мкг/нмоль. Кинетику реакции прослеживали, анализируя аликвоты реакционной смеси методом дансильирования в количественной модификации [16]. С-Концевую последовательность аспарат-аминотрансферазы определяли при гидролизе 5 нмоль карбоксиметилированного белка смесью карбоксипептидаз А, В и С (1, 1 и 0,2 мкг соответственно, общий объем 10 мкл) в присутствии 1% додецилсульфата натрия. Отобранные по ходу реакции пробы (2 мкл) дансильировали, подкисляли добавлением 20 мкл смеси вода — ацетон — муравьиная кислота, 3 : 2 : 1, интенсивно перемешивали 1–2 мин с 3–5 мг анионита AG-1×2 в форматной форме. Жидкую фазу декантировали, смолу промывали той же системой растворителей (20 мкл×2), надосадочные жидкости объединяли и высушивали в вакууме. Dns-Аминокислоты хроматографировали на полиамидных пластинках.

Деградация пептидов по методу Эдмана. Определение аминокислотной последовательности в пептидах проводили по модифицированной методике Брутона и Хартли [12]. Пептид (10–20 нмоль) растворяли в 20 мкл воды в ампуле размером 4×55 мм. Ампулы (обычно 8–10 штук) помещали в цилиндрический сосуд (2,5×8 см), присоединяемый к трехходовому крану, обеспечивающему подачу азота или создание вакуума. Обогрев (замораживание) сосуда с ампулами осуществляли в термостатируемой ячейке, соединенной с ультратермостатом U-1 (ГДР), или жидким азотом. К раствору пептида добавляли 20 мкл 5% раствора фенилизотиоцианата в пиридине. Ампулу замораживали и прибор трижды последовательно вакуумировали и заполняли азотом, после чего термостатировали 1 ч при 45° С и высушивали при 60° С в течение 40 мин под вакуумом. К остатку добавляли 20 мкл безводной трифторуксусной кислоты, переводили в атмосферу азота, как описано выше, термостатировали (45° С, 30 мин) и высушивали в вакууме (60° С, 30 мин). Сухой остаток растворяли в 20 мкл воды и трижды экстрагировали 150 мкл бутилацетата, насыщенного водой. Водную фазу высушивали (10 мин, 60° С) в вакууме, добавляли 20 мкл воды или 50% пиридина и отбирали аликвоту для дансильирования. После этого проводили следующий цикл дегградации.

Анализ N-концевых аминокислот проводили по методу [12] с последующей хроматографией Dns-аминокислот на полиамидных пластинках в системах I–IV [16]. Для разделения Lys(Dns), Dns-Arg и Dns-His использовали систему V: пиридин — аммиак (25%) — вода, 2 : 1 : 10.

Количественный метод анализа Dns-аминокислот включал реакцию дансильирования, хроматографию и сканирование хроматографических зон Dns-аминокислот [16]. Сканирование проводили на спектрофлуориметре РМQ-II (Opton, Австрия); в качестве внутреннего стандарта использовали α-аминомасляную кислоту.

Масс-спектры снимали на приборе MC-1302 (СССР) при энергии ионизирующих электронов 70 эВ. Температура съемки 160–200° С. Карбоксильная группа пептида для увеличения летучести была метилирована диазومتаном [23].

Авторы приносят благодарность Л. Г. Николаеву за проведение аминокислотного анализа, Е. А. Самосудовой — за помощь при проведении экспе-

риментов, Г. А. Афанасенко — за ценные консультации по применению количественного дансильного метода анализа аминокислот и Т. К. Ивановой — за подготовку рукописи к печати.

ЛИТЕРАТУРА

1. Braunstein A. E. (1960) in: *The Enzymes* (Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., eds), vol. 2, pp. 113–184. Acad. Press, N. Y.
2. Braunstein A. E. (1973) in: *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.), vol. 9, pp. 379–481. Acad. Press, N. Y.
3. Ovchinnikov Yu. A., Egorov C. A., Aldanova N. A., Feigina M. Y., Abdulaev N. G., Grishin E. V., Kiselev A. P., Modyanov N. N., Braunstein A. E., Polyansky O. L., Nosikov V. V. (1973) *FEBS Lett.*, **29**, 31–34.
4. Doonan S., Doonan H. J., Hanford R., Vernon C. A., Walter J. M., Bossa F., Barra D., Carloni M., Fasella P., Riva F., Walton P. L. (1974) *FEBS Lett.*, **32**, 229–233.
5. Kagamiyama H., Sakakibara R., Wada H., Tanase S., Morino Y. (1977) *J. Biochem.*, **82**, 291–294.
6. Barra D., Bossa F., Doonan S., Fagmi H. M. A., Hughes G. J., Kakoz K. Y., Martini F., Petruzzelli R. (1977) *FEBS Lett.*, **83**, 241–244.
7. Gehring H., Wilson K. J., Christen P. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **67**, 73–78.
8. Gehring H., Christen P., Eichele G., Glor M., Jansonius J. N., Reimer A. S., Smith J. D., Thaller C. (1977) *J. Mol. Biol.*, **115**, 97–101.
9. Arnone A., Rogers P. H., Schmidt J., Han C., Harris C. M., Metzler D. E. (1977) *J. Mol. Biol.*, **115**, 509–513.
10. Борисов В. В., Борисова С. Н., Качалова Г. С., Сосфенов Н. И., Воронова А. А., Вайнштейн Б. К., Торчинский Ю. М., Волкова Г. А., Браунштейн А. Е. (1977) *Докл. АН СССР*, **225**, 212–215.
11. Кочкина В. М., Азарян А. В., Механик М. Л., Закомырдина Л. Н., Силицына Н. И., Болотина И. А., Егоров Ц. А., Торчинский Ю. М. (1978) *Биохимия*, **43**, 1478–1484.
12. Bruton C. J., Hartley B. S. (1970) *J. Mol. Biol.*, **52**, 165–178.
13. Reid K. B. M., Thompson E. O. P. (1978) *Biochem. J.*, **173**, 863–868.
14. Ikenaka T., Bammerlin H., Kaufmann H., Schmidt K. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 5560–5569.
15. Takagi T., Doolittle R. F. (1974) *Biochemistry*, **13**, 750–756.
16. Арутюнян А. А., Шляпников С. В., Северин Е. С. (1975) *Биоорганическая химия*, **1**, 1188–1196.
17. Shemyakin M. M., Ovchinnikov Yu. A., Vinogradova E. I., Kiryushkin A. A., Feigina M. Yu., Aldanova N. N., Alakhov Yu. B., Lipkin V. M., Miroshnikov A. I., Rosinov B. V., Kazaryan S. A. (1970) *FEBS Lett.*, **7**, 8–14.
18. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 622–634.
19. Hirs C. W. (1967) in: *Methods in Enzymology* (Hirs C. W. H., ed.), vol. XI, pp. 325–329.
20. Easley C. W. (1965) *Biochim. et biophys. acta*, **107**, 386–388.
21. Hirs C. W. H. (1967) in: *Methods in Enzymology* (Hirs C. W. H., ed.), vol. XI, pp. 179–199.
22. Rajot P. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **63**, 263–269.
23. Шляпников С. В., Карпейский М. Я., Якушина Л. М., Оселедчик В. С. (1965) *Биохимия*, **30**, 457–462.

Поступила в редакцию
21.VIII.1979

PRIMARY STRUCTURE OF CYTOPLASMIC ASPARTATE AMINOTRANSFERASE FROM CHICKEN HEART. I. CHARACTERIZATION OF THE PROTEIN AND STRUCTURE OF PEPTIDES ISOLATED FROM TRYPTIC HYDROLYSATE OF CITRACONYLATED ASPARTATE AMINOTRANSFERASE

MYASNIKOV A. N., MYAGKOVA M. A., SHLYAPNIKOV S. V.,
ORLOV V. M., TORCHINSKY Yu. M., SEVERIN E. S.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Carboxymethylated and citraconylated aspartate aminotransferase from chicken heart was hydrolyzed with trypsin. 18 low molecular weight peptides were isolated in homogeneous state and their structure was determined. The N-terminus of the protein is acetylated as was shown by isolating the N-terminal chymotryptic peptide. The average sequence homology of the chicken and pig isoenzymes is approximately 80%.