



УДК 547.963.4.02+599.322

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА МИОГЛОБИНА БОБРА
(*CASTOR FIBER*)

I. РАСТВОРИМЫЕ ПЕПТИДЫ ТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗАТА

*Сухомлинов В.Ф., Дробот Л.Б.**Кафедра биохимии Львовского государственного университета им. И. Франко*

Установлена аминокислотная последовательность 23 растворимых триптических фрагментов апомиоглобина основного электрофоретического компонента миоглобина бобра (*Castor fiber*). Фракционирование, идентификацию и выделение пептидов осуществляли с помощью пептидных карт. Выделенные пептиды содержат в сумме 132 аминокислотных остатка.

Миоглобин — гемсодержащий хромопротеид, входящий в состав мышц большинства животных, обладает способностью обратимо связывать и накапливать кислород, поддерживая необходимую интенсивность окислительного метаболизма в мышечной ткани. Благодаря особенностям химического строения и пространственной конфигурации, установленной с высоким разрешением, а также большому биологическому значению миоглобин является удобной моделью для решения ряда проблем молекулярной биологии. Так, в частности, изучение первичной структуры гомологичных миоглобинов позволяет строить древа филогенетического родства организмов [1, 2], дает необходимую информацию для выяснения принципов и закономерностей молекулярной эволюции [3] и механизмов молекулярной адаптации, реализованных в процессе приспособления водных и полуводных млекопитающих к среде с низким парциальным давлением кислорода [4].

В развитие исследований структурно-функциональных особенностей гемовых белков животных, ведущих полуводный образ жизни [5—7], нами проведено изучение первичной структуры миоглобина бобра. Данная работа посвящена установлению аминокислотной последовательности растворимых триптических пептидов глобинового компонента изучаемого белка.

Для структурных исследований использовали апомиоглобин основного электрофоретического компонента миоглобина бобра. Белок выделяли и фракционировали как описано ранее [8].

Гидролиз глобина трипсином проводили в стандартных условиях в течение 6 ч [8]. Материал, нерастворимый при pH 5,0, удаляли центрифугированием после нагревания на водяной бане. Дальнейшее разделение и анализ растворимых триптических пептидов, а также их выделение осуществляли с помощью пептидных карт. На аналитических пептидных картах (рисунок) выявлено 29 нингидрипположительных пятен, а также проведена детекция на гистидин, тирозин, метионин, аргинин и триптофан.

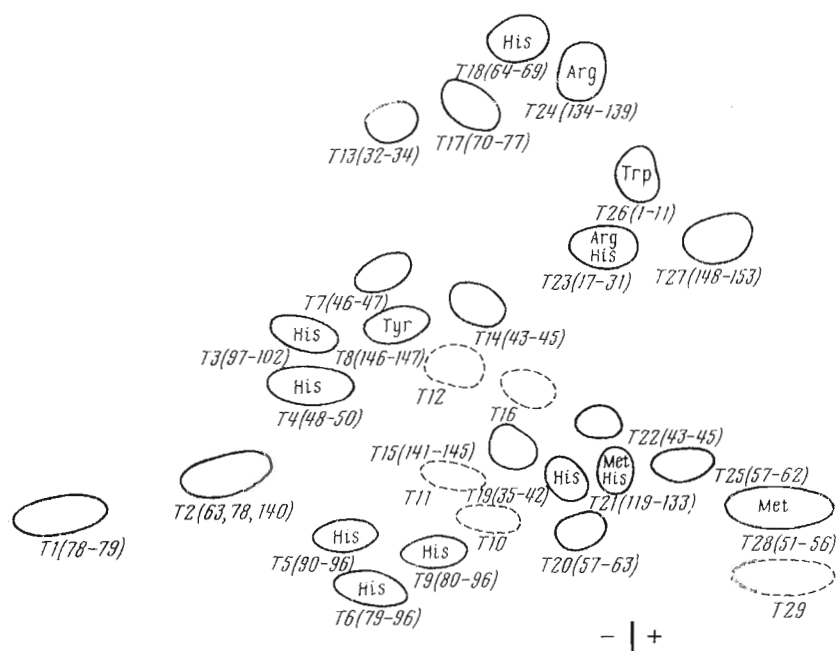


Схема пептидной карты растворимых триптических пептидов миоглобина бобра (минорные пятна обозначены пунктиром). В скобках приведены участки аминокислотной последовательности белка

Пептиды на препаративных дактилограммах обнаруживали опрыскиванием 0,01% раствором нингидрина в ацетоне и элюировали 20% уксусной кислотой или 1% аммиаком. Дополнительную очистку нейтральных пептидов проводили с помощью высоковольтного электрофореза при pH 3,5. Гомогенность выделенных пептидов оценивали определением их N-концевых аминокислотных остатков. Амиды идентифицировали, исходя из подвижности пептида при электрофорезе и расчета суммарного электрического заряда по формуле Оффорда [9], а также путем анализа гомологичных позиций в исследованных миоглобинах. Локализацию пептидов в полипептидной цепи белка и предполагаемую структуру некоторых больших триптических фрагментов устанавливали сравнением с гомологичными участками миоглобинов с известной аминокислотной последовательностью [1].

Аминокислотный состав пептидов представлен в табл. 1.

Для всех пептидов были определены полные или частичные аминокислотные последовательности (табл. 2). Необходимо отметить, что во время триптического гидролиза оказались частично или полностью не расщепленными связи Lys—Lys (пептиды T1, T20) и Lys—Pro (пептид T3). С другой стороны, кроме специфического расщепления трипсином пептидных связей по остаткам Lys и Arg наблюдался неспецифический гидролиз по остаткам Leu (пептиды T26, T18, T5).

Два остатка триптофана являются инвариантными в полипептидной цепи миоглобинов с известной первичной структурой и расположены в N-концевом участке молекулы в положениях 7 и 14. N-Концевой триптический фрагмент 1—16 входит обычно в состав нерастворимой при pH 5,0 фракции. Выявление на пептидных картах исследуемого белка кислого пептида (T26), дающего положительную реакцию с реактивом Эрлиха и не содержащего Lys или Arg, объясняется расщеплением пептидной связи 11—12, в результате чего N-концевой участок 1—11 становится растворимым.

Таблица 1

Аминокислотный состав растворимых триптических пептидов миоглобина бобра

Пептид	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Trp	N-Кон- цевая амино- кисло- та	Всего остат- ков
T26 (1-11)	4,25 (1)		1,04 (1)	2,08 (2)		2,08 (2)		0,83 (1)			2,72 (3)						(1)	Gly	11
T23 (17-31)	1,04 (1)			3,14 (3)		2,04 (2)	2,27 (2)	2,00 (2)		0,77 (1)	2,00 (2)			0,95 (1)		0,86 (1)		Val	15
T13 (32-34)											0,82 (1)		1,03 (1)		1,12 (1)			Leu	3
T19 (35-42)		1,14 (1)		2,09 (2)	0,91 (1)	0,81 (1)					1,14 (1)			0,95 (1)	1,00 (1)			Gly	8
T22 (43-45)	0,88 (1)												1,00 (1)		1,12 (1)			Phe	3
T14 (43-45)	0,76 (1)												0,98 (1)		1,26 (1)			Phe	3
T7 (46-47)													0,87 (1)		1,13 (1)			Phe	2
T4 (48-50)										1,06 (1)				0,67 (1)	1,27 (1)			His	3
T28 (51-56)	1,15 (1)		0,77 (1)	2,23 (2)					1,08 (1)						1,00 (1)			Ser	6
T25 (57-62)	1,19 (1)		0,76 (1)	1,03 (1)			0,90 (1)				0,90 (1)				1,24 (1)			Ala	6
T20 (57-63)	1,09 (1)		0,84 (1)	1,09 (1)			0,87 (1)				0,97 (1)				2,26 (2)			Ala	7

T18 (64-69)	0.83 (1)						1.03 (1)		2.19 (2)				4.09 (1)	0.86 (1)		His	6
T17 (70-77)	0.75 (1)						2.05 (2)	1.20 (1)	1.05 (1)				1.90 (2)		1.05 (4)	Thr	8
T2 (63, 78, 140)															1.00 (1)	Lys	1
T1 (78-79)															2.00 (2)	Lys	2
T6 (79-96)	0.96 (1)	0.92 (1)	3.15 (3)	0.87 (1)	1.00 (4)	3.50 (3)				0.86 (1)	0.99 (1)			3.00 (3)	2.75 (3)	Lys	18
T9 (80-96)	0.86 (1)	0.94 (1)	3.06 (3)	1.21 (1)	0.86 (1)	3.25 (3)				0.90 (1)	0.90 (1)			3.00 (3)	2.02 (2)	Gly	17
T5 (90-96)	1.08 (4)	1.00 (1)	1.05 (1)			1.75 (2)								1.07 (1)	1.05 (1)	Ala	7
T3 (97-102)				0.90 (1)						2.20 (2)				0.80 (1)	2.10 (2)	His	6
T21 (119-133)	3.62 (4)			0.73 (1)	3.26 (5)	3.35 (3)			0.98 (4)					0.69 (1)	1.31 (1)	His	15
T24 (134-139)			1.15 (1)			0.81 (1)					2.10 (2)			1.06 (4)		Ala	6
T15 (141-145)	1.07 (1)					1.82 (2)									1.03 (1)	Asp	5
T8 (146-147)															1.17 (1)	Tyr	2
T27 (148-153)			2.00 (2)		1.92 (2)										0.92 (4)	Glu	6

**Аминокислотная последовательность растворимых триптических пептидов
миоглобина бобра**

Пептид	Аминокислотная последовательность *
T26(1-11)	Gly-Leu-Ser-Asp-Gly-Glu-Trp-Gln (Leu, Val, Leu)
T23(17-31)	Val-Glu-Ala-Asp-Leu-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Glu (Val, Leu, Ile) Arg
T13(32-34)	Leu-Phe-Lys
T19(35-42)	Gly-His-Pro-Glu-Thr-Leu-Glu-Lys
T22(43-45)	Phe-Asp-Lys
T14(43-45)	Phe-Asn-Lys
T7(46-47)	Phe-Lys
T4(48-50)	His-Ile-Lys
T28(51-56)	Ser-Glu-Asp-Glu-Met-Lys
T25(57-62)	Ala-Ser-Glu-Asp-Leu-Lys
T20(57-63)	Ala-Ser-Glu-Asp-Leu-Lys-Lys
T18(64-69)	His-Gly-Val-Thr-Val-Leu
T17(70-77)	Thr-Ala-Leu-Gly-Gly-Val-Leu-Lys
T1(78-79)	Lys-Lys
T6(79-96)	Lys-Gly-His-His-Glu-Ala-Glu-Ile-Lys-Pro (Leu, Ala, Gln, Ser, His, Ala, Thr) Lys
T9(80-96)	Gly-His-His-Glu-Ala-Glu-Ile-Lys-Pro-Leu (Ala, Gln, Ser, His, Ala, Thr) Lys
T5(90-96)	Ala-Gln-Ser-His-Ala-Thr-Lys
T3(97-102)	His-Lys-Ile-Pro-Ile-Lys
T21(119-133)	His-Pro-Gly-Asx-Phe-Gly-Ala-Asp-Ala-Asx (Gly, Ala, Met, Asn) Lys
T24(134-139)	Ala-Leu-Glu-Leu-Phe-Arg
T15(141-145)	Asp-Ile-Ala-Ala-Lys
T8(146-147)	Tyr-Lys
T27(148-153)	Glu-Leu-Gly-Phe-Gln-Gly

* Стрелками показана аминокислотная последовательность, определенная деградацией пептидов по методу Эдмана с идентификацией Dns-производных аминокислот.

Вследствие расщепления связи Leu-Thr (69-70) на пептидных картах обнаружены пептиды T17 и T18, структура которых гомологична участку 64-77 полипептидной цепи миоглобина, выявляемого обычно в составе нерастворимых триптических пептидов.

Расщепление связи Leu-Ala (89-90) привело к появлению пептида T5, соответствующего по структуре С-концевым участкам триптических пептидов T6 (79-96) и T9 (80-96). Исследование N-концевой аминокис-

лотной последовательности пептидов T6, T9 и T5 позволило выяснить полную первичную структуру участка 79—96 полипептидной цепи белка.

Положение T2 на пептидной карте (рисунок) занимает лизин, отщепленный в положениях 63, 78 и 140.

Исследование аминокислотной последовательности пептидов T22 и T14 дало следующие результаты: Phe-Asx-Lys. Различие в подвижности пептидов при электрофорезе объясняется частичным дезамидированием остатка Asp в положении 44, происходящего, очевидно, в процессе выделения и фракционирования белка.

Таким образом, из триптического гидролизата миоглобина бобра выделено 23 растворимых пептида и одна индивидуальная аминокислота. Пептиды, приведенные в таблицах, содержат в сумме 132 аминокислотных остатка.

Экспериментальная часть

Триптический гидролиз глобина. Протеолиз глобина проводили трипсином (Spofa, Чехословакия), обработанным ТРСК [10], в аммонийно-карбонатном буфере (рН 8,2—8,4) при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 в течение 6 ч при 37° С. Затем раствор подкисляли уксусной кислотой до рН 5, нагревали на водяной бане при 90° С в течение 5 мин и центрифугировали. Супернатант, содержащий растворимую часть гидролизата, лиофилизовали.

Дактилографический анализ. На аналитические пептидные карты наносили 1,5 мг, на препаративные — 4 мг материала растворимых триптических пептидов. Высоковольтный электрофорез осуществляли в течение 3 ч в аппарате типа Михля на хроматографической бумаге Filtrak-1 размером 600×525 мм; буфер пиридин-ацетатный (рН 5,6), градиент напряжения 35 В/см. Хроматографию проводили перпендикулярно электрофорезу в восходящем потоке растворителя пиридин — бутанол — уксусная кислота — вода (15 : 10 : 3 : 12). Пептиды на аналитических дактилограммах обнаруживали опрыскиванием 0,3%, а на препаративных — 0,01% раствором нингидрина в ацетоне. Детекцию гистидин-, тирозин- и метионинсодержащих пептидов осуществляли по Эсли [11], аргинин- и триптофансодержащих — по Алексеенко [12]. Пептиды с препаративных дактилограмм элюировали 20% уксусной кислотой или 1% аммиаком. Для аминокислотного анализа пептиды элюировали 5,6 н. HCl.

Аминокислотный состав определяли на анализаторе аминокислот Nd 1200E (ЧССР) и ААА-881 (ЧССР). Пробы гидролизовали в вакууме в течение 24 ч при 105° С в 5,6 н. HCl с добавкой фенола.

N-Концевую аминокислотную последовательность в пептидах устанавливали методом Эдмана с последующей идентификацией аминокислот в виде Dns-производных. Дегградацию пептидов проводили по Грею [13] в модификации Виноградовой и др. [14]. Dns-аминокислоты идентифицировали на пластинках с полиамидом [15].

Авторы выражают глубокую благодарность В. Н. Коробову за предоставление препарата основного электрофоретического компонента миоглобина бобра, С. Н. Веремейченко за выполнение анализов на аминокислотных анализаторах, сотрудникам отдела химии белка Института молекулярной биологии и генетики АН УССР за ценные замечания, постоянное внимание и помощь при выполнении данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dayhoff M. O. (1976) Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, Suppl. 2, National Biomedical Research Foundation, Washington.
2. Ратнер В. А., Родин С. Н., Жарких А. А. (1977) в кн.: Математические модели эволюции и селекции, с. 53—95, Новосибирск.
3. Romero-Herrera A. E., Lehmann H., Joysey K. A., Friday A. E. (1978) Phil. Trans. Roy. Soc. London, B283, 61—163.

4. Castillo O., Lehmann H., Jones L. T. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **491**, 23–28.
5. Сухомлинов Б. Ф., Коробов В. Н. (1973) в сб.: Биохимическая эволюция, с. 107–109, «Наука», Л.
6. Сухомлинов Б. Ф., Сухомлинова Н. Б., Горчакова Г. И. (1973) *Укр. биохим. ж.*, **45**, 539–542.
7. Сухомлинов Б. Ф., Коробов В. Н., Горчакова Г. И. (1975) *Укр. биохим. ж.*, **47**, 275–279.
8. Сухомлинов Б. Ф., Коробов В. Н., Демчук В. В., Телегус Я. В. (1973) в сб.: Биохимическая эволюция, с. 102–106, «Наука», Л.
9. Offord R. E. (1966) *Nature*, **211**, 591–593.
10. Jentsch J. (1971) *Chromatography*, **57**, 450–456.
11. Easley C. W., Legers B. J. M., Di Vigeder M. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, **175**, 211–217.
12. Алексеевко Л. П. (1968) в кн.: Современные методы в биохимии, с. 301, «Медицина», М.
13. Gray W. (1967) *Methods Enzymol.*, **11**, 469–475.
14. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А., Овчинников Ю. А. (1973) *Биохимия*, **38**, 3–21.
15. Woods K., Wang K. (1967) *Biochim. et biophys. acta*, **133**, 369–375.

Поступила в редакцию
7.VIII.1979

THE PRIMARY STRUCTURE OF MYOGLOBIN FROM BEAVER (*CASTOR FIBER*). I. SOLUBLE PEPTIDES OF THE TRYPTIC HYDROLYSATE

SUKHOMLINOV B. F., DROBOT L. B.

I. Franko State University, Lvov

The amino acid sequence of 23 soluble tryptic peptides has been determined for main electrophoretic component of beaver myoglobin. Fractionation, identification and peptide isolation have been made by peptide maps. The isolated peptides contain in total 132 amino acid residues.