



УДК 547.962.02:577.11

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕПТИДОВ БРОМЦИАНОВОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ β' -СУБЪЕДИНИЦЫ ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI* И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА

*Шуваева Т. М., Липкин В. М., Назимов И. В.,
Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Проведено расщепление β' -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* бромцианом. Показана высокая эффективность экстракции бутиловым спиртом для выделения гидрофобных пептидов и электрофореза в ацетатцеллюлозных блоках для разделения высокомолекулярных фрагментов. С использованием этих методов, а также гель-фильтрации, хроматографии на бумаге и в тонком слое целлюлозы выделен 21 фрагмент белка. Для всех выделенных соединений определен молекулярный вес и аминокислотный состав. В сумме выделенные фрагменты содержат ~900 аминокислотных остатков из ~1450, входящих в состав β' -субъединицы. Установлена аминокислотная последовательность ряда пептидов.

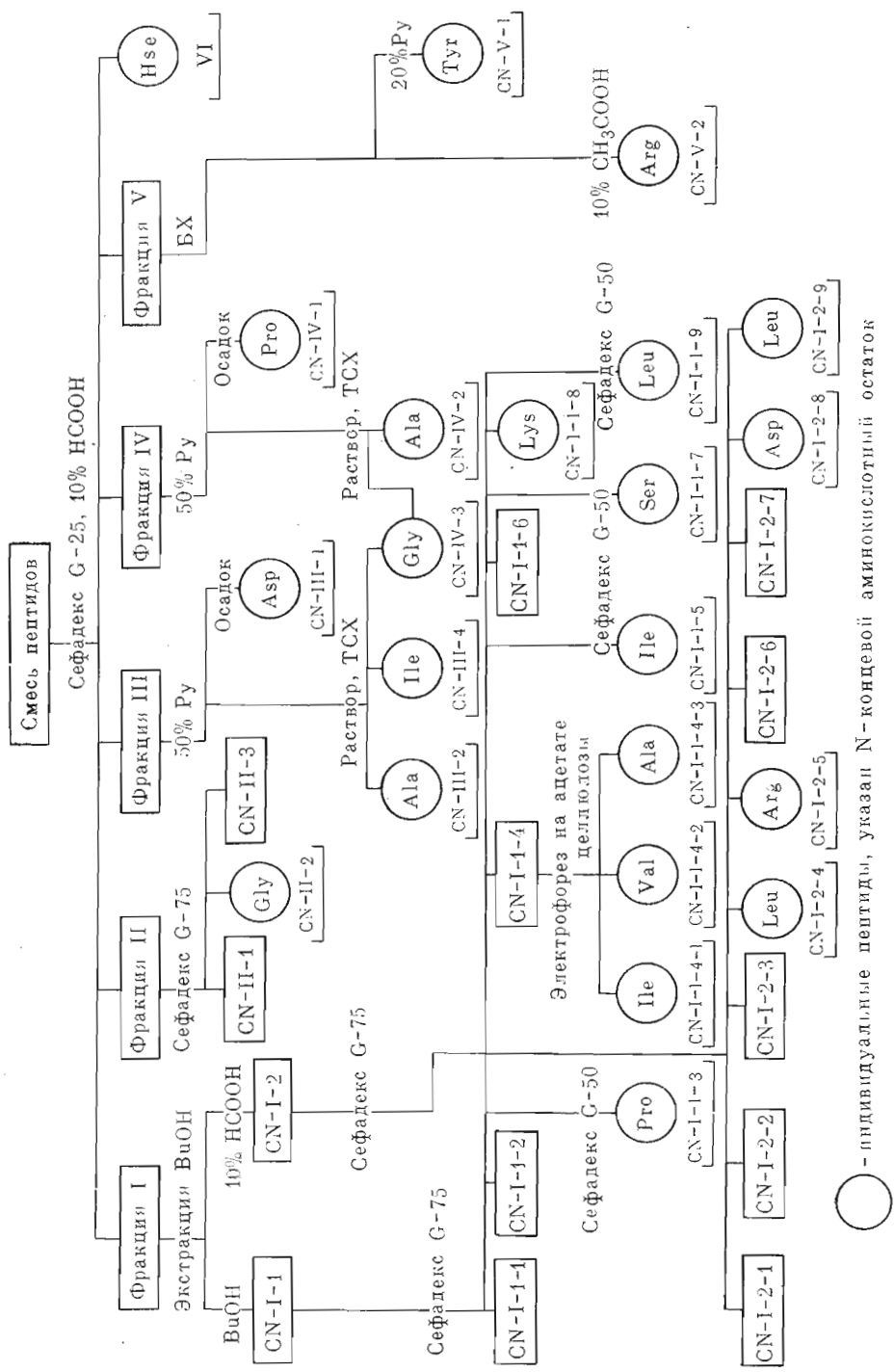
Процесс транскрипции генетической информации в клетке осуществляет ДНК-зависимая РНК-полимераза (нуклеозидтрифосфат: РНК-нуклеотидилтрансфераза, КФ 2.7.7.6), имеющая сложную субъединичную структуру [1, 2]. Чтобы детально выяснить механизм функционирования фермента, необходимо установить первичную структуру субъединиц РНК-полимеразы. Уже определена полная аминокислотная последовательность α -субъединицы [3], β -субъединицы [4] и проводится исследование самой крупной субъединицы РНК-полимеразы — β' [5].

В настоящем сообщении описано выделение, характеристика и исследование структуры бромциановых пептидов β' -субъединицы РНК-полимеразы.

Для определения аминокислотной последовательности белков требуется специфически расщепить полипептидную цепь на более короткие фрагменты таким образом, чтобы число образующихся пептидов было невелико, а их количества — достаточными для дальнейшего исследования. Для получения крупных фрагментов мы выбрали метод расщепления полипептидной цепи бромцианом, поскольку из всех химических методов, применяемых для этой цели, расщепление по остаткам метионина проходит наиболее селективно и количественно. Кроме того, для определения аминокислотной последовательности крупных фрагментов может быть использована деградация по Эдману на секвенаторе, что в значительной мере упрощает задачу установления первичной структуры белка.

Разделение высокомолекулярных пептидов, имеющих выраженную склонность к агрегации, особенно при большом содержании гидрофобных аминокислот, представляет собой достаточно сложную задачу даже в слу-

Схема разделения бромцановых фрагментов β'-субъединицы РНК-полимеразы



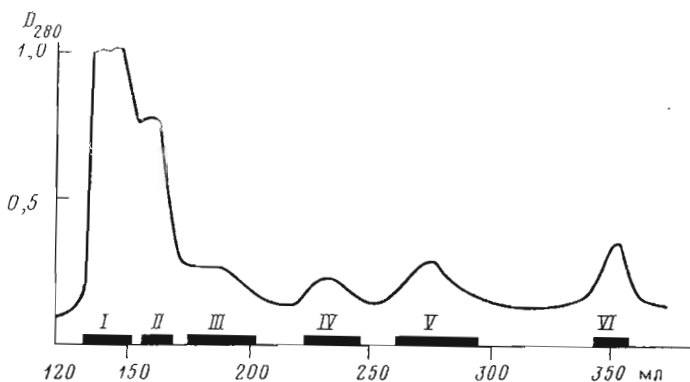


Рис. 1. Разделение фрагментов бромцианового расщепления β' -субъединицы РНК-полимеразы на сефадексе G-25 в 10% муравьиной кислоте на колонке размером $2,5 \times 100$ см (здесь и далее черными прямоугольниками отмечены границы объединения фракций)

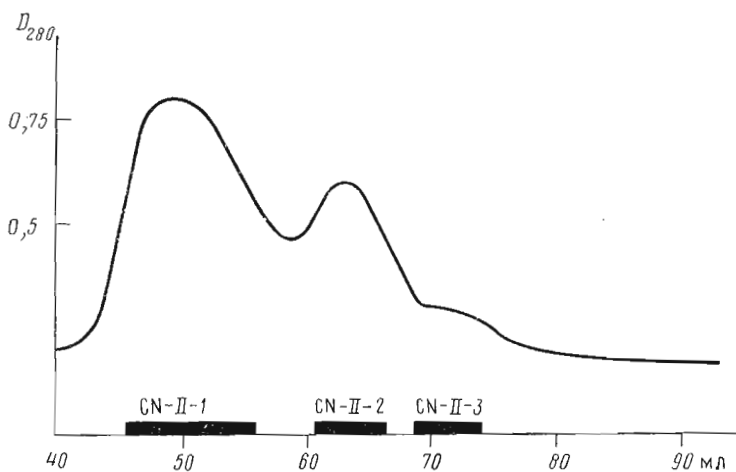


Рис. 2. Хроматография фракции II на сефадексе G-75 в 0,05 М трис HCl-буфере, 0,05% 2-меркаптоэтанол, pH 8,2, в 6 М растворе хлоридрата гуанидина (колонка $0,8 \times 200$ см)

чае белков среднего молекулярного веса, содержащих 5—10 остатков метионина. Ранее нами было показано, что β' -субъединица состоит из одной полипептидной цепи, включающей в себя ~ 1450 аминокислотных остатков, и содержит 32 остатка метионина [2]. Следовательно, при расщеплении белка бромцианом можно ожидать образования более 30 фрагментов. Кроме того, все пептиды, за исключением С-концевого, существуют в растворе в двух формах, обладающих различными С-концевыми остатками — гомосерином или лактоном гомосерина. Очевидно, что для разделения такой сложной смеси пептидов помимо широко используемых методов белковой химии требуется разработка новых, оригинальных и практических приемов, позволяющих свести агрегацию к минимуму.

Выделение β' -субъединицы из минимального фермента РНК-полимеразы осуществляли электрофорезом на ацетате целлюлозы [6]. Гомогенность белка оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Согласно [2], β' -субъединица не содержит дисульфидных связей, но имеет 16 остатков цистеина. В аналитических опытах по карбоксиметилированию белка было установлено, что лишь небольшая часть этих остатков (30—40%) доступна для модификации даже в денатурирующих условиях (8 М мочевины или 6 М хлоридрат гуанидина). Поэтому при

Аминокислотный состав бромциановых пептидов β' -субъединицы РНК-полимеразы

Аминокислота	Пептиды						
	CN-V-2, CN-V-3	CN-V-1	CN-IV-1	CN-III-1	CN-IV-2	CN-IV-3, CN-III-3	CN-III-2
Cys							
Asp		2,4	1,4	5,8			1,7
Thr		1,4	1,6	2,7	1,2		
Ser		2,8	1,5	2,8	0,7	1,4	2,3
Hsc	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Glu			1,3	7,1		1,9	2,7
Pro			1,0		1,2		
Gly	1,2	3,7	1,7	1,2		1,1	3,4
Ala		4,8			4,9	3,0	4,9
Val		0,8	2,3	2,4	1,6		
Ile		0,9	0,7	2,3		1,0	1,0
Leu	1,0			1,0	4,0	1,7	1,3
Tyr		1,3					
Phe		0,8	1,4	0,9			
His					0,4		
Lys				1,0		1,0	
Arg	1,1	1,0	1,0	1,6	1,1		2,2
Trp*							
Число остатков	4	19	15	25-27	17-18	11-12	17-19
N-Концевая аминокислота	Arg	Tyr	Pro	Asp	Ala	Gly	Ala
Молекулярный вес	445	1920	1666	3000	2000	1400	2000
Выход, %	60	22	37	35	11	9	9

* Определено после гидролиза метансульфоновой кислотой.

расщеплению белка бромцианом предварительную защиту остатков цистеина не проводили. Для расщепления β' -субъединицы (2,4 мкмоль) использовали обычные условия. Результаты анализа полученной смеси с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии мочевины и определение N-концевых аминокислотных остатков свидетельствовали об образовании более 20 фрагментов. Для подбора оптимальных условий их разделения была проведена серия аналитических опытов. При этом установлено, что агрегация, препятствующая разделению пептидов, в значительной мере зависит от способа первичной обработки полученных фрагментов и от выбора систем растворителей и буферных растворов. На основании проведенных исследований была разработана схема разделения бромциановых пептидов (схема).

Первоначальное фракционирование осуществляли с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25 (рис. 1). Замена 6 М хлоридрата гуанидина (деагрегирующий агент) 10% муравьиной кислотой не повлияла на качество выделения, но позволила концентрировать фракции, полученные после первичного разделения, без предварительного обессоливания. В результате было получено 6 объединенных фракций (I-VI). Метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии мочевины [7], хроматография в тонком слое целлюлозы, а также определение N-концевых аминокислотных остатков показали, что фракции I-V представляют собой смеси пептидов. С помощью аминокислотного анализа было установлено, что фракция VI содержит 6 мкмоль свободного гомосерина. Большой выход гомосерина указывает, вероятно, на то, что в β' -субъединице последовательность Met-Met встречается несколько раз.

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислота	Пептиды						
	CN-III-4	CN-II-2	CN-I-1-3	CN-I-1-5	CN-I-1-7	CN-I-1-8	CN-I-1-9
Cys(Cm)					0,6		0,7
Asp	1,1	1,2	6,5	9,2	7,7	4,2	2,5
Thr		1,0	5,2	6,7	2,1	2,7	2,0
Ser	2,3	4,2	7,8	4,6	4,6	1,8	
Hse	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Glu	1,4	1,5	14,4	7,5	4,2	3,9	1,8
Pro	2,5	2,1	8,1	2,5	2,8	1,5	1,3
Gly	2,9	3,2	12,8	8,9	6,2	1,0	1,9
Ala	2,8	3,1	7,7	4,5	2,8	5,1	1,8
Val	1,9		5,2	4,8	3,8		1,4
Ile	2,8	2,2	6,2	4,9	2,8	2,1	3,3
Leu	2,0	5,6	8,7	8,3	3,2	5,4	3,4
Tyr	0,4		1,1		1,5		1,2
Phe		0,7	3,0			2,1	1,3
His		1,1					
Lys	4,3	1,4	5,9	2,6	1,2	5,1	1,0
Arg		1,2	6,0	3,6	1,4		1,0
Trp		1,0					
Число остатков	23	25-30	90-98	54-60	39-41	27-32	24
N-Концевая аминокислота	Ile	Gly	Pro	Ile	Ser	Lys	Leu
Молекулярный вес	2453	3100	10800	6500	460	3400	2435
Выход, %	8	11	12	13	12	10	8

В состав фракции V входят пептиды, образующие четкие зоны при хроматографировании в тонком слое целлюлозы в системе бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода. Эту систему использовали для preparative выделения пептидов фракции V с помощью БХ. Пептиды CN-V-2 (R_f , 0,70) и CN-V-3 (R_f , 0,95) элюировали с бумаги 10% уксусной кислотой, а не двигавшийся со старта пептид CN-V-1 — 20% пиридином. Как оказалось, пептиды CN-V-2 и CN-V-3 имеют одинаковый аминокислотный состав (табл. 1). Различие в их подвижности объясняется наличием гомосерина или лактона гомосерина в C-концевом положении.

Для первоначального разделения пептидов фракций IV и III были использованы различия в их растворимости. Фракция IV представляла собой смесь трех пептидов. При ее растворении в 50% пиридине образовывался осадок, который после отделения центрифугированием оказался практически чистым пептидом CN-IV-1. Супернатант хроматографировали в тонком слое целлюлозы в специально подобранной системе элюентов (см. «Экспериментальную часть»). Таким образом были выделены пептиды CN-IV-2 (R_f , 0,42) и CN-IV-3 (R_f , 0,80).

При обработке фракции III 50% пиридином наблюдалось образование осадка, который оказался индивидуальным пептидом CN-III-1. Растворившиеся в пиридине пептиды разделяли хроматографией в тонком слое целлюлозы так же, как и соответствующие пептиды фракции IV. В результате были выделены пептиды CN-III-2 (R_f , 0,27), CN-III-3 (R_f , 0,80) и CN-III-4 (R_f , 0,93). По данным аминокислотного анализа, пептид CN-III-3 идентичен пептиду CN-IV-3 (табл. 1).

Для выделения пептида CN-II-2 из фракции II была использована гель-хроматография на сефадексе G-75 в буферном растворе, содержащем 6 M хлоридат гуанидина и 2-меркаптоэтанол (рис. 2). Фракция CN-II-1 включала в себя большое число пептидов и по своему составу, по данным электрофореза в полиакриламидном геле, была подобна фракции I, а фрак-

Таблица 1 (окончание)

Аминокислота	Пептиды						
	CN-I-1-4-1	CN-I-1-4-2	CN-I-1-4-3	CN-I-2-4	CN-I-2-5	CN-I-2-8	CN-I-2-9
Cys (Cm)		0,5	0,7			0,8	
Asp	9,4	8,6	13,5	9,4	9,5	5,1	5,1
Thr	1,1	0,7	8,2	7,9	5,2	3,0	0,9
Ser	1,9	1,0	4,2	12,2	14,2	2,4	2,7
Hse	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Glu	12,5	12,2	8,4	15,7	10,9	13,1	3,8
Pro	3,4	4,2	2,4	0,9	1,5	1,8	0,9
Gly	6,2	5,6	8,8	13,9	13,8	2,6	4,7
Ala	4,2	9,3	7,8	16,8	12,7	2,6	4,8
Val	11,4	7,8	5,8	7,8	8,1	1,6	1,1
Ile	7,4	7,2	5,9	7,1	4,5	1,8	1,4
Leu	4,8	8,1	8,2	9,5	4,7	6,8	4,8
Tyr	1,2	0,6	1,2	3,2	1,1		
Phe	1,0	1,9	1,9	3,3	2,0	1,4	
His	1,8	2,4	1,5	0,4	1,0		
Lys	3,4	1,4	3,4	6,6	10,2	6,4	2,2
Arg	8,1	4,3	4,0	10,3	5,0	3,9	4,0
Trp	1,0	1,0			1,0	1,0	
Число остатков	67-74	61-71	74-80	90-115	90-105	45-50	30-34
N-Концевая аминокислота	Ile	Val	Ala	Leu	Arg	Asp	Leu
Молекулярный вес	8100	7500	8900	11500	11000	5400	3700
Выход, %	3	3	1	4	4	9	10

ция CN-II-3 содержала фрагменты, идентичные выделенным ранее из фракции III.

Наибольшую трудность представляло разделение фракции I, так как электрофорез в полиакриламидном геле позволил обнаружить свыше 15 высокомолекулярных компонентов, которые в сумме составляют большую часть молекулы β' -субъединицы. Одним из факторов, способствующих агрегации пептидов, является спонтанное образование дисульфидных связей. Для предотвращения окисления остатков цистеина пептиды фракции I карбоксиметилировали иодуксусной кислотой [8]. По данным аминокислотного анализа, степень модификации остатков цистеина составляла 70%, поэтому перед каждой стадией разделения пептиды дополнительно обрабатывали меркаптоэтанолом. Процесс разделения осложнялся тем, что в состав фракции I входили пептиды, содержащие большое число гидрофобных аминокислот. Для селективного отделения этих пептидов оказалось эффективным использование экстракции *n*-бутиловым спиртом. При экстракции гидрофильные пептиды оставались в водном растворе, а гидрофобные переходили в органическую фазу. Таким образом фракция I была разделена на две: I-1 (спиртовой раствор) и I-2 (водный раствор), каждая из которых представляла собой смесь 7-10 пептидов. Дальнейшее разделение фракций I-1 и I-2 проводили на колонке с сефадексом G-75 в буферном растворе, содержащем меркаптоэтанол и 6 М хлоридат гуанидина. Детекцию пептидов осуществляли по поглощению при 280 нм и с помощью определения N-концевых аминокислотных остатков. В результате гелефильтрации фракции I-1 было получено 9 объединенных фракций (рис. 3). Фракция CN-I-1-8 представляла собой индивидуальный пептид, а пептиды CN-I-1-3, CN-I-1-5, CN-I-1-7, CN-I-1-9 были получены в гомогенном состоянии после рехроматографирования соответствующих фракций на сефадексе G-50 в 5% муравьиной кислоте. Фракция CN-I-1-4 содержала смесь 3 пептидов близкого молекулярного веса с N-концевыми аминокислотными

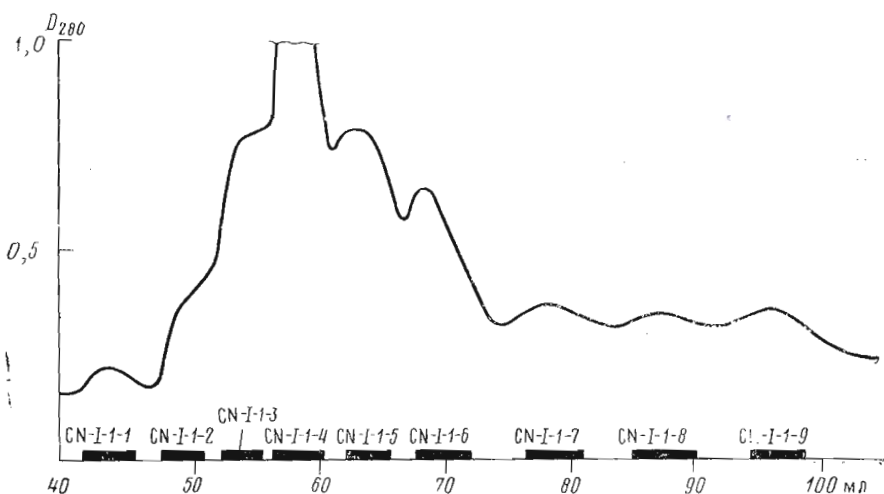


Рис. 3. Хроматография фракции I-1 на сефадексе G-75 (условия — см, рис. 2)

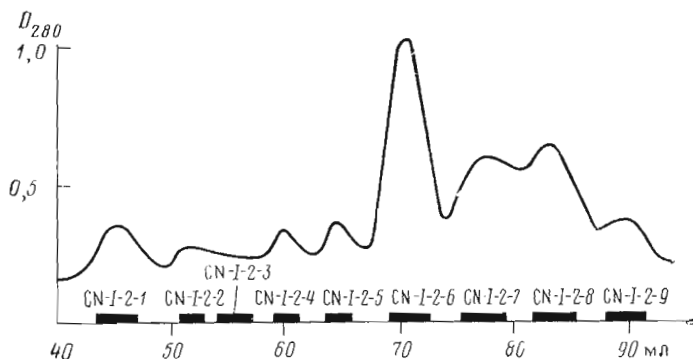


Рис. 4. Хроматография фракции I-2 на сефадексе G-75 (условия — см, рис. 2)

остатками *Pe*, *Val*, *Ala*. Наилучшие результаты при разделении были достигнуты с помощью метода электрофореза в ацетатцеллюлозных блоках. Использование электродного раствора с высокой ионной силой позволило применить этот метод для разделения высокомолекулярных фрагментов, а приготовление специальных блоков толщиной 0,3 см дало возможность провести его на препаративном уровне. Как показал анализ *N*-концевых аминокислотных остатков, каждый пептид при электрофорезе проявлялся в виде двух полос. После объединения соответствующих фракций были получены пептиды CN-I-1-4-1, CN-I-1-4-2 и CN-I-1-4-3.

При разделении фракции I-2 на сефадексе G-75 было получено 9 новых фракций (рис. 4). Анализ *N*-концевых аминокислотных остатков и электрофорез в полиакриламидном геле показали, что фракции CN-I-2-4, CN-I-2-5, CN-I-2-8 и CN-I-2-9 представляют собой индивидуальные пептиды. Остальные фракции содержали сложные смеси агрегированных пептидов, которые разделить не удалось. Данные о распределении пептидов по фракциям, их аминокислотный состав, *N*-концевые аминокислотные остатки и молекулярные веса приведены в табл. 1. Молекулярный вес наиболее крупных пептидов определяли по их подвижности в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и мочевины [9], а низкомолекулярных — по данным аминокислотного состава.

Для определения *N*-концевой аминокислотной последовательности пеп-

**N-Концевая аминокислотная последовательность бромциановых пептидов
β'-субъединицы РНК-полимеразы**

Пептид	Аминокислотная последовательность *
CN-IV-3	
CN-III-3	Gly-Ala-Glx-...
CN-III-4	Asx-Asx-Leu-Glx-...
CN-III-2	Ala-Val-His-Val-Pro-...
CN-I-1-3	Pro-Ala-Gln-Tyr-Phe-Leu-Pro-Gly-Lys-Ala-Ile-Val-Gln-Leu-Glx-x-Gly- Val-x-Ile-...
CN-I-1-5	Ile-Asp-Gly-Gln-Thr-Ile-Thr-Arg-Gln-Thr-Asp-x-x-Thr-Gly-Leu-x-x-Leu- Val-Val-Leu-x-x-Ala-Glx-x-x-Ala-Gly-Gly-...
CN-I-1-7	Ser-Thr-Asn-Asn-Ile-Leu-Val-Pro-...
CN-I-1-8	Lys-Asx-Leu-...
CN-I-2-8	Asx-Leu-Glx-Glx-Glx-...
CN-I-2-9	Leu-Glx-Glx-Ala-Val-...

* Здесь и далее приняты следующие обозначения: ∇ — стадии деградации по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде Dns-производных; \rightarrow — стадии деградации по методу Чанга [10] с идентификацией аминокислот в виде 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-тиогидантоинов; \rightarrow — стадии деградации с помощью секвенатора; \leftarrow — расщепление карбокси-пептидазой.

тидов использовали метод Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 1-диметиламиноафталин-5-сульфонильных производных (Dns) и автоматический анализ с помощью секвенатора (табл. 2).

Белки большого молекулярного веса, к которым относится и β'-субъединица, являются неудобными объектами для анализа с помощью секвенатора. Определение их аминокислотной последовательности осложняется наличием в полипептидной цепи значительного числа лабильных пептидных связей, неспецифически расщепляющихся в процессе деградации по методу Эдмана. Для сведения к минимуму побочных реакций было сокращено время циклизации. Изменение стандартной программы (122974), используемой для анализа N-концевой аминокислотной последовательности белков, позволило определить последовательность 8 аминокислотных остатков β'-субъединицы: Met-Lys-Asp-Leu-Leu-Lys-Phe-Leu [ср. 11].

Пептид CN-I-1-8 является N-концевым фрагментом β'-субъединицы, поскольку его N-концевая аминокислотная последовательность (табл. 2) совпадает с определенной N-концевой последовательностью β'-субъединицы.

Полную аминокислотную последовательность ряда пептидов определяли как описано далее.

Пептид CN-V-2: Arg-Gly-Leu-Hse. Аминокислотная последовательность пептида CN-V-2 была определена только с использованием деградации по методу Эдмана.

Пептид CN-V-1: Tyr-Thr-Gly-Phe-Ala-Tyr-Ala-Ala-Arg-Ser-Gly-Ala-Ser-Val-Gly-Ile-Asp-Asp-Hse. Деградацией пептида по методу Эдмана найдена последовательность 12 аминокислотных остатков (табл. 3). При

действии на пептид карбоксипептидазы Y (3 ч, 25°С, рН 4,5) отщепляются гомосерин (60%), аспарагиновая кислота (100%), изолейцин (45%). Для установления полной структуры пептид (50 нмоль) подвергали триптическому гидролизу; при этом расщеплялась связь Arg-Ser и образовывалась смесь двух фрагментов. Поскольку полная структура N-концевого фрагмента известна, смесь пептидов без разделения подвергали деградации по методу Эдмана (9 стадий). На основании полученных данных с учетом определения ранее N- и C-концевых последовательностей пептида CN-V-1 однозначно определяется структура C-концевого фрагмента, а следовательно, и всего пептида CN-V-1.

Пептид CN-IV-1: Pro-Val-Ile-Thr-Glu-Val-Ser-Gly-Phe-Val-Arg-Phe-
 $\begin{array}{cccccccccccc} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \end{array}$
 -Thr-Asp-Hse. Деградацией пептида по методу Эдмана установлена после-

довательность 14 аминокислотных остатков. При триптическом гидролизе пептида расщепилась связь Arg-Phe. Анализ полученной смеси двух фрагментов по методу Чанга с идентификацией аминокислот в виде 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-тиогидантонов позволил обнаружить в пятом положении N-концевого пептида и в третьем положении C-концевого пептида глутаминовую и аспарагиновую кислоты соответственно.

Пептид CN-III-4: Ile-Val-Pro-Lys-Gly-Leu-Pro-Tyr-Ser-Ile-Val-Asn-
 $\begin{array}{cccccccccccc} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \end{array}$
 -Gln-Ala-Leu-Gly-Lys-Lys-Ala-Ile-Ser-Lys-Hse. Результаты определения структуры суммированы в табл. 3. После определения N-концевой последовательности пептид CN-III-4 расщепляли трипсином. Из полученного гидролизата с помощью гель-фильтрации на бюгеле Р-4 и хроматографии в тонком слое целлюлозы были выделены 4 пептида и свободный лизин, что указывало на наличие в пептиде CN-III-4 связи Lys-Lys. Аминокислотная последовательность триптических пептидов приведена в табл. 3. Следует отметить аномальный гидролиз в пептиде CN-III-4 связи Tyr-Ser, не отвечающий специфичности фермента. N-Концевая аминокислотная последовательность пептида CN-III-4 позволяет последовательно соединить триптические пептиды CN-III-4-1Т, CN-III-4-2Т, CN-III-4-3Т. Фрагмент CN-III-4-5Т, содержащий остаток гомосерина, является C-концевым участком исходного пептида. Между пептидами CN-III-4-3Т и CN-III-4-5Т, вероятно, расположен остаток лизина. Из триптического гидролизата β'-субъединицы РНК-полимеразы был выделен пептид Т-II-9-5, определенная аминокислотная последовательность которого подтвердило, что в пептиде CN-III-4 в положении 18 находится остаток лизина*.

Пептид CN-I-1-9: Leu-Asn-Thr-Cys(Cm)-Tyr-Arg-Ile-Leu-Gly-Leu-
 $\begin{array}{cccccccccccc} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \end{array}$
 Lys-Pro-Thr-Val-Ile-Phe-Ala-Asp-Gln-Ile-Hse. Деградацией по методу Эдмана определена последовательность 6 аминокислотных остатков. Для получения дополнительной информации был проведен химотриптический гидролиз пептида. Из продуктов реакции с помощью хроматографии в тонком слое целлюлозы было выделено 4 пептида, аминокислотная последовательность которых представлена в табл. 3. Структуру пептидов CN-I-1-9-1Ch и CN-I-1-9-4Ch определяли по методу Чанга. Сопоставление N-концевой последовательности пептида CN-I-1-9 с последовательностью пептидов химотриптического гидролиза позволило реконструировать полную структуру пептида CN-I-1-9 (табл. 3).

Таким образом, по разработанной схеме был выделен 21 пептид и свободный гомосерин, образовавшиеся при расщеплении β'-субъединицы бромцианом. Для этих пептидов определены аминокислотный состав, N-концевые аминокислотные остатки и молекулярный вес. В сумме выделенные пептиды содержат ~900 аминокислотных остатков из ~1450, входя-

* Данные по триптическому гидролизу β'-субъединицы будут опубликованы отдельно.

Аминокислотные последовательности пептидов CN-V-1, CN-III-4, CN-I-1-9

Анализируемый пептид	Результаты анализа
CN-V-1	Tyr-Thr-Gly-Phe-Ala-Tyr-Ala-Ala-Arg-Ser-Gly-Ala-(Ser, Val, Gly)-Ile-Asp-Asp-Hse
Смесь продуктов триптического гидролиза пептида CN-V-1	Tyr-Thr-Gly-Phe-Ala-Tyr-Ala-Ala-Arg-
Строение пептида CN-V-1	Ser-Gly-Ala-Ser-Val-Gly-Ile-Asx-Asx-Hse Val-Gly-Ile-Asp-Asp-Hse
CN-III-4	Ile-Val-Pro-Lys-Gly-Leu-Pro-Tyr-Ser (Ile, Val, Asx, Glx, Ala, Leu, Gly, Lys, Lys, Ala, Ile, Ser, Lys, Hse)
CN-III-4-1T	Ile-Val-Pro-Lys
CN-III-4-2T	Gly-Leu-Pro-Tyr
CN-III-4-3T	Ser-Ile-Val-Asx-Glx-Ala-Leu-Gly-Lys
CN-III-4-4T	Lys
CN-III-4-5T	Ala-Ile-Ser-Lys-Hse
T-II-9-5	Ser-Ile-Val-Asn-Gln-Ala-Leu-Gly-Lys-Lys
Строение пептида CN-III-4	Ile-Val-Pro-Lys-Gly-Leu-Pro-Tyr-Ser-Ile-Val-Asn-Gln-Ala-Leu-Gly-Lys-Lys-Ala-Ile-Ser-Lys-Hse
CN-I-1-9	Leu-Asx-Thr-Cys(Cm)-Tyr-Arg (Ile, Leu, Gly, Leu, Lys, Lys, Pro, Thr, Val, Ile, Phe, Ala, Asx, Glx, Ile, Hse)
CN-I-1-9-1Ch	Leu-Asn-(Thr, Cys(Cm), Tyr)
CN-I-1-9-2Ch	Arg-Ile-Leu-Gly-Leu
CN-I-1-9-3Ch	Lys-Pro-Thr-Val-Ile-Phe
CN-I-1-9-4Ch	Leu-Asn-Thr-Cys(Cm)-Tyr-Arg-Ile-Leu-Gly-Leu-Lys-Pro-Thr-Val-Ile-Phe-Ala-Asp-Gln-Ile-Hse
Строение пептида CN-I-1-9	Leu-Asn-Thr-Cys(Cm)-Tyr-Arg-Ile-Leu-Gly-Leu-Lys-Pro-Thr-Val-Ile-Phe-Ala-Asp-Gln-Ile-Hse

щих в состав β' -субъединицы. Для пяти пептидов установлена полная аминокислотная последовательность и для девяти — частичная структура. Полученные результаты содержат существенную информацию об аминокислотной последовательности отдельных участков цепи β' -субъединицы.

Экспериментальная часть

В работе использовали бромциан (Pierce, США), сефадексы, биогели (Pharmacia, Швеция), пластинки с тонким слоем целлюлозы (Schleicher und Schüll, ФРГ), трипсин, химотрипсин (Worthington, США), карбоксипептидазу Y (Boehringer Mannheim, ФРГ).

Выделение β' -субъединицы РНК-полимеразы. Выделение минимального фермента проводили по методу Бёржеса [12]. Для разделения субъединиц использовали метод электрофореза на ацетате целлюлозы по методике [6]. Чистоту полученных препаратов контролировали с помощью электрофореза в 5% полиакриламидном геле [13].

Расщепление β' -субъединицы бромцианом. 400 мг (2,4 мкмоль) лиофильно высушенного препарата β' -субъединицы растворяли в 20 мл 70% муравьиной кислоты. К раствору добавляли 3 г бромциана (300-кратный избыток на 1 моль метионина). Реакцию проводили в течение 20 ч при 20° С, после чего реакционную смесь разбавляли водой и лиофилизировали.

Первичное разделение бромциановых фрагментов проводили с помощью гель-фильтрации на колонке (2,5×100 см) с сефадексом G-25 (тонкий), предварительно уравновешенным 10% муравьиной кислотой, при скорости элюирования 7 мл/ч. Контроль за выходом пептидов осуществляли с помощью УФ-детектора «Uvicord II» (ЛКВ, Швеция) при 280 нм. Фракции объединяли согласно спектрофотометрическим данным и лиофилизировали.

Нисходящую хроматографию на бумаге проводили в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода (3:10:15:12). Детекцию пептидов осуществляли с помощью нингидриновой реакции. Пептиды элюировали 10% CH_3COOH и 20% пиридином.

Хроматографию пептидов фракций IV и III на пластинке с целлюлозой проводили в системе изоамиловый спирт — пиридин — 0,1 М аммиак (6:3:5). Пептиды элюировали 20% пиридином.

Карбоксиметилирование пептидов фракции I осуществляли подуксусной кислотой по методике [8], исходя из 200 мг лиофильно высушенного препарата. После окончания реакции смесь дважды обессоливали на затемненной колонке (2,5×100 см) с сефадексом G-10, уравновешенным 10% муравьиной кислотой, и концентрировали до объема 30 мл.

*Экстракция гидрофобных пептидов *n*-бутиловым спиртом.* Пептиды фракции I в объеме 30 мл трижды экстрагировали 30 мл бутилового спирта. Верхний спиртовой слой жидкости отделяли центрифугированием. Фракции I-1 (спиртовой слой) и I-2 (водный) упаривали досуха.

Хроматография на сефадексе G-75. Пептиды фракций I-1, I-2 и II растворяли в 0,8 мл буферной системы Б (0,05 М трис-HCl (pH 8,2), 6 М хлоргидрат гуанидина), содержащей 2% меркаптоэтанол, инкубировали 4 ч при 40° С и наносили на колонку (0,8×200 см) с сефадексом G-75, уравновешенным буферной системой Б, содержащей 0,05% меркаптоэтанол. Детекцию пептидов осуществляли по поглощению при 280 нм.

Рехроматографирование на сефадексе G-50 (сверхтонкий) проводили в 5% муравьиной кислоте на колонке размером 1×100 см.

Приготовление ацетатцеллюлозных блоков. 35 г диацетилцеллюлозы растворяли в течение 2 сут в 60% уксусной кислоте при 20° С. Раствор выливали в форму (10×20×0,3 см), которую помещали в герметическую камеру и выдерживали 2 сут в атмосфере, насыщенной водяным паром. Полученные пленки промывали водой для удаления уксусной кислоты, а затем уравновешивали в течение 2 сут буферной системой А (0,6 М борная кислота — аммиак (pH 8,9), 8 М мочевины, 0,02 М 2-меркаптоэтанол).

Электрофорез на ацетатцеллюлозных пленках. 20 мг смеси пептидов фракции GN-I-1-4 растворяли в 0,5 мл буферного раствора А и инкубировали 4 ч при 35°С. Вязкий раствор наносили тонким слоем на пленку. В качестве электродного раствора использовали буферную систему А. Электрофорез проводили 4–5 ч при напряжении 500 В. Пептидный материал обнаруживали с помощью красителя амидного черного. После окрашивания пластинки участки целлюлозы, соответствующие каждой белковой полосе, вырезали и элюировали из них пептидный материал буферным раствором А. После выделения каждую фракцию обессоливали на колонке с сефадексом G-10, предварительно уравновешенным 5% муравьиной кислотой.

Методы определения аминокислотного состава, аминокислотной последовательности и ферментативного гидролиза пептидов описаны ранее [2, 14, 15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Burgess R. R. Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polymerase.— J. Biol. Chem., 1969, v. 244, p. 6168–6176.
2. Модянов Н. Н., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Поганенко Н. А., Шуваева Т. М. Первичная структура α -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*. I. Пептиды триптического гидролиза.— Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 2, с. 158–179.
3. Овчинников Ю. А., Липкин В. М., Модянов Н. Н., Чертов О. Ю., Смирнов Ю. В., Хохряков В. С., Шуваева Т. М. ДНК-зависимая РНК-полимераза *E. coli*. Полная аминокислотная последовательность α -субъединицы.— Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 2, с. 283–286.
4. Овчинников Ю. А., Монастырская Г. С., Губанов В. В., Гурьев С. О., Чертов О. Ю., Модянов Н. Н., Гринкевич В. А., Макарова И. А., Марченко Т. В., Половникова И. Н., Липкин В. М., Свердлов Е. Д. Первичная структура РНК-полимеразы *Escherichia coli*. Нуклеотидная последовательность гена *rpoB* и аминокислотная последовательность β -субъединицы.— Докл. АН СССР, 1980, т. 253, № 4, с. 994–998.
5. Овчинников Ю. А., Монастырская Г. С., Губанов В. В., Саломатина Н. С., Шуваева Т. М., Липкин В. М., Свердлов Е. Д. Первичная структура РНК-полимеразы *E. coli*. Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК *E. coli*, содержащего часть гена *rpoC*, и соответствующая С-концевая аминокислотная последовательность β' -субъединицы.— Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 7, с. 1107–1112.
6. Heil A., Zillig W. Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription.— FEBS Lett., 1970, v. 11, p. 165–168.
7. Panyim S., Chalkey R. The heterogeneity of histones. I. A quantitative analysis of calf histones in very long polyacrylamide gels.— Biochemistry, 1969, v. 8, p. 3972–3979.
8. Carne A., Moore C. H. The amino acid sequence of the tryptic peptides from actinidin, a proteolytic enzyme from the fruit of *Actinidia chinensis*.— Biochem. J., 1978, v. 173, p. 73–83.
9. Swank R. T., Munkres K. D. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate.— Anal. Biochem., 1971, v. 39, p. 462–477.
10. Chang J. Y., Creaser E. H., Bentley K. W. 4-N,N-Dimethylaminoazobenzene-4'-isothiocyanate, a new chromophoric reagent for protein sequence analysis.— Biochem. J., 1976, v. 153, p. 607–611.
11. Fujiki H., Zurek G. The subunits of DNA-dependent RNA polymerase from *E. coli*. I. Amino acid analysis and primary structure of the N-terminal regions.— FEBS Lett., 1975, v. 55, p. 242–244.
12. Burgess R. R. A new method for the large scale purification of *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase.— J. Biol. Chem., 1969, v. 244, p. 6160–6167.
13. Weber K., Osborn M. The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis.— J. Biol. Chem., 1969, v. 244, p. 4406–4412.
14. Липкин В. М., Марченко Т. В., Хохряков В. С., Половникова И. Н., Поганенко Н. А., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А. Первичная структура β -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*. Низкомолекулярные пептиды ограниченного триптического гидролиза.— Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 332–347.
15. Модянов Н. Н., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Шуваева Т. М., Кочергинская С. А. Первичная структура α -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*. V. Пептиды бромцианового гидролиза.— Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 4, с. 437–449.

Поступила в редакцию
9.VII.1981

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PEPTIDES [OBTAINED ON CYANOGEN BROMIDE CLEAVAGE OF THE β' -SUBUNIT OF *E. COLI* DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE

SHUVAEVA T. M., LIPKIN V. M., NAZIMOV I. V., MODYANOV N. N.,
OVCHINNIKOV Yu. A.

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

The β' -subunit of DNA-dependent RNA polymerase was subjected to cyanogen bromide cleavage. Butanol extraction was found to be a highly effective procedure for isolating hydrophobic peptides, while acetylcellulose slab electrophoresis was successfully used for separating high molecular weight fragments. With the aid of these methods in combination with gel-filtration and paper or thin-layer chromatography, 21 protein fragments were isolated. Molecular weight and amino acid composition were determined for all isolated compounds. In total, these fragments contain ~900 amino acid residues out of ~1450 residues of the β' -subunit. Amino acid sequence was established for a number of peptides.
