



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 7 * № 9 * 1981

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.03

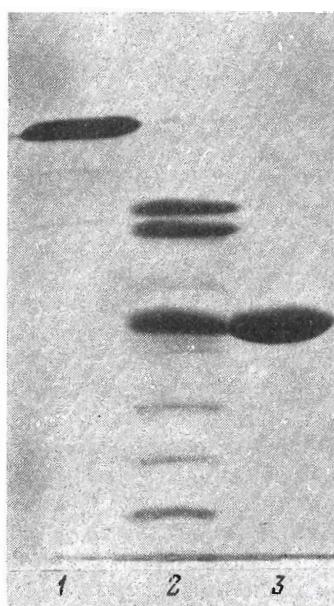
КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ С-КОНЦЕВОГО ТРИПТИЧЕСКОГО ФРАГМЕНТА ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ G ИЗ *E. coli*

Гарбер М. Б., Решетников Л. С.

Институт белка Академии наук СССР, Пущино, Московская область

Фактор элонгации EF-G — важный компонент белоксинтезирующей системы. Это мономерный белок с молекулярным весом ~80 000. В настоящее время в нашем институте заканчивается работа по определению его первичной структуры. Показано, что при ограниченном трипсинолизе нативного EF-G образуется несколько фрагментов, относительно устойчивых к дальнейшему действию трипсина [1, 2]. Наиболее стабильны крупные фрагменты с M_r 25 000 (C-концевой) и 49 000—41 000 (N-концевые), составляющие вместе почти 90% полипептидной цепи. Изучение термостабильности и спектральных свойств крупных фрагментов показало, что они глобулярны и их вторичная структура (в сумме) очень близка к вторичной структуре нативного белка [3]. По-видимому, эти фрагменты соответствуют доменам, имеющимся в структуре G-фактора. Кристаллизация круп-

Рис. 1. Электрофорез в поликариламидном геле с додецилсульфатом натрия [4] нативного G-фактора (1), триптического гидролизата (2), C-концевого пептида (3)



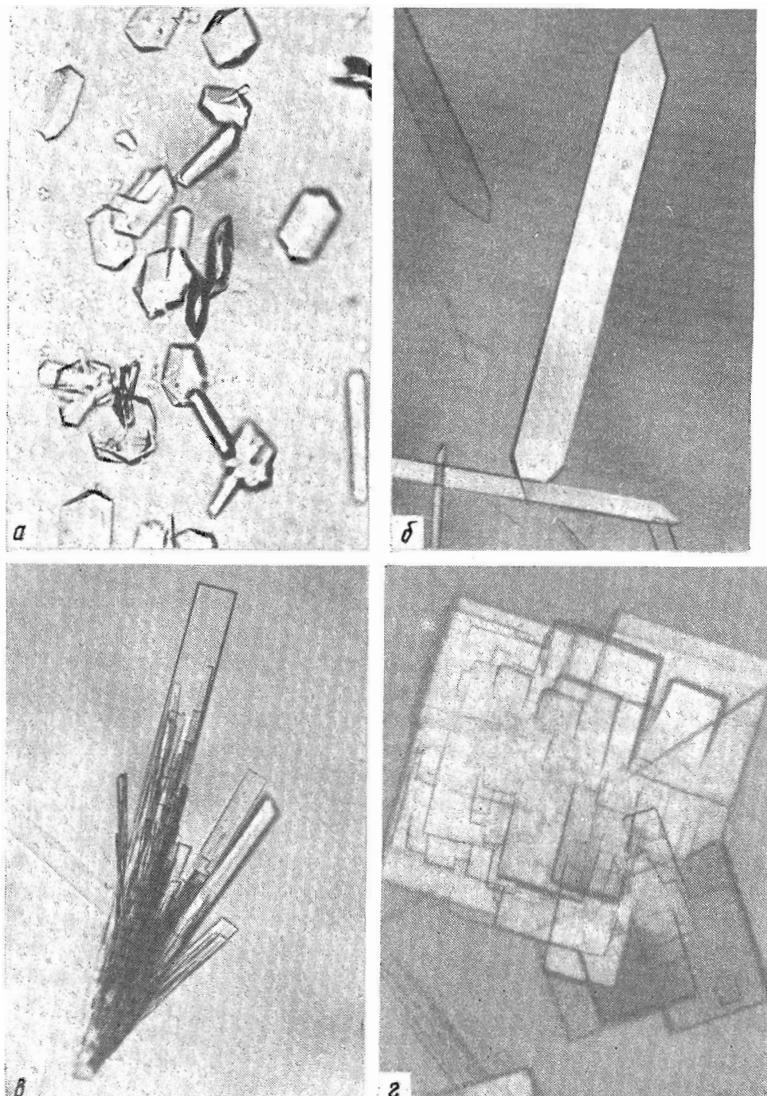


Рис. 2. Кристаллы С-концевого пептида, полученные в присутствии полиэтиленгликоля в разных буферных растворах: *а*, *б* – 50 мМ пирофосфат, pH 8,0; *в* – 10 мМ – калий-натрий-фосфатный буфер, pH 7,0; *г* – 50 мМ цитрат натрия, pH 8,0

ных триптических фрагментов открывает путь к изучению пространственной структуры EF-G, достаточно хороших кристаллов которого пока получить не удалось. Пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы N-концевых фрагментов были получены нами два года назад [4]. Данное сообщение посвящено кристаллизации С-концевого фрагмента.

Выделение EF-G и его ограниченный триптический гидролиз проводили по методикам, описанным в работе [4]. Смесь пептидов разделяли с помощью ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой 52, уравновешенной 20 мМ трис-HCl-буфером, pH 7,5, содержащим 3 мМ NaN₃. Элюцию проводили тем же буфером с линейным градиентом KCl от 0 до 300 мМ. Гомогенность выделенного фрагмента проверяли с помощью электрофореза в поликариламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (рис. 1).

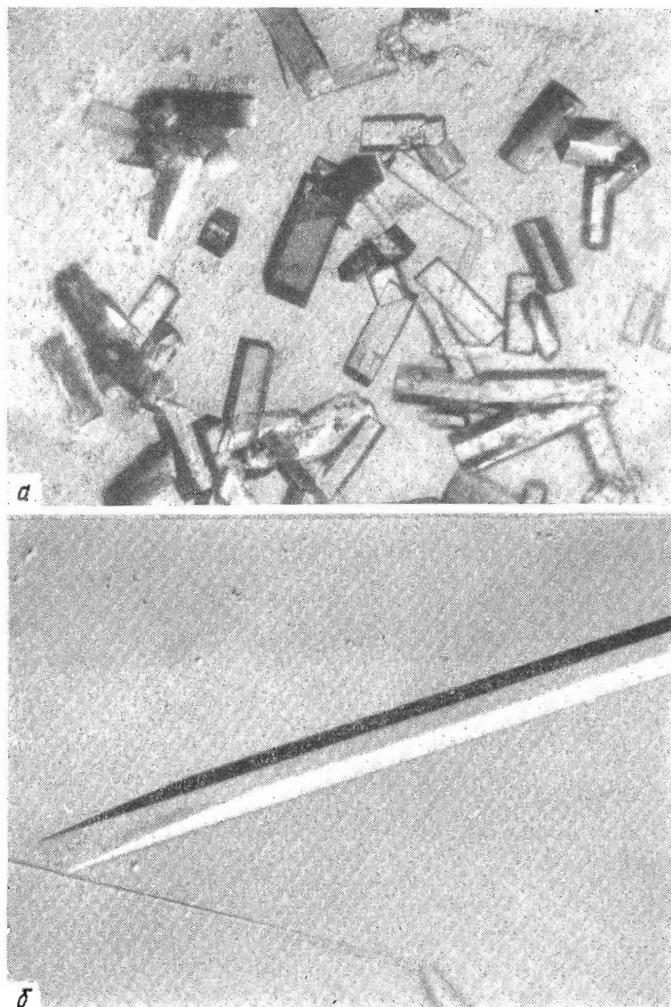


Рис. 3. Кристаллы С-концевого пептида, полученные (а, б) в 100 мМ трис-HCl, pH 8,0, при 42–47% насыщении сульфата аммония

Поиск условий кристаллизации проводили методом «висячей капли». Выяснилось, что при pH ниже 7,0 пептид неустойчив в растворе, поэтому для кристаллизации использовали буферы в области pH 7,0–8,5. В качестве осадителей применяли полиэтиленгликоль (M 6000 и 3000) и сульфат аммония. Низкомолекулярные спирты и другие органические растворители вызывали денатурацию пептида. Фрагмент легко кристаллизовался при доведении концентрации полиэтиленгликоля в растворе до 18–20%. Использование различных буферных растворов приводило к образованию кристаллов разной формы. Однако во всех случаях в присутствии полиэтиленгликоля кристаллы вырастали в виде очень тонких пластинок (рис. 2а – г).

Замена полиэтиленгликоля сульфатом аммония позволила получить кристаллы большей толщины (рис. 3а, б). При этом в одних и тех же условиях получались кристаллы двух разных форм: короткие прямоугольные параллелепипеды (рис. 3а) и длинные палочки с заостренными концами (рис. 3б). Мы предположили, что существование разных кристаллических форм в одних и тех же условиях может быть результатом негомогенности препарата пептида. Для проверки этого определили N- и C-концевые ами-

нокислоты [5, 6]. Оказалось, что в препаратах пептида, не осажденных трихлоруксусной кислотой (ТХУ), присутствует четыре N-концевых аминокислотных остатка: Glu, Gly, Ala, Val. Во фракции, осаждаемой ТХУ, присутствуют две N-концевые аминокислоты: Gly и Val. Таким образом, разные кристаллические формы действительно могут быть связаны с присутствием в препаратах крушного С-концевого пептида примесей более коротких пептидов, не отделяющихся при хроматографии в нативных условиях.

Наиболее детально мы исследовали длинные палочковидные кристаллы (рис. 3б). С помощью автоматического метода Эдмана была определена последовательность аминокислот в N-концевой части пептида из этих кристаллов. Оказалось, что исследуемый нами пептид на 7 аминокислотных остатков с N-коца короче триптического фрагмента Т5, описанного Алаховым и др. [7]. N-Концевая последовательность нашего фрагмента Val-Gly-Lys-Pro-Glu-Val-Ala-Tyr. Кристаллы могут быть выращены до размеров 100×200×1000 мкм. Эти кристаллы способны отражать рентгеновские лучи.

Авторы приносят благодарность Н. Я. Каипаровой, Л. Ф. Марковой и М. А. Бундуле за определение N- и C-концевых аминокислотных остатков и Л. М. Винокурову за определение N-концевой последовательности фрагмента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Skar D. C., Rohrbach M. S., Bodley J. W. Limited trypsinolysis of nature *Escherichia coli* elongation factor G.— Biochemistry, 1975, v. 14, № 17, p. 3922–3926.
2. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М., Овчинников Ю. А. Первичная структура фактора элонгации EF-G из *E. coli*.— Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1333–1345.
3. Alakhov Yu. B., Stengrevics O. A., Filimonov V. V., Venyaminov S. Yu. Cleavage of elongation factor G into compact domains.— Eur. J. Biochem., 1979, v. 99, № 3, p. 585–591.
4. Решетникова Л. С., Савченко И. В., Гарбер М. Б. Кристаллизация триптических фрагментов фактора элонгации EF-G из *E. coli*.— Докл. АН СССР, 1978, т. 243, № 2, с. 523–525.
5. Weiner A. M., Platt T., Weber K. Amino-terminal sequence analysis of proteins purified on a nanomole scale by gel electrophoresis.— J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 10, p. 3242–3251.
6. Ambler R. P. Carboxypeptidases A and B.— In: Methods in Enzymology/Hirs C. H. W., ed. N. Y.— London: Acad. Press, 1967, v. XI, p. 155–166.
7. Alakhov Yu. B., Dovgas N. N., Motuz L. P., Vinokurov L. M., Ovchinnikov Yu. A. The primary structure of the elongation factor G from *Escherichia coli*. Amino acid sequence of the C-terminal domain.— FEBS Lett., 1981, v. 126, № 2, p. 183–186.

Поступило в редакцию
16.IV.1981

CRYSTALLIZATION OF THE C-TERMINAL TRYPTIC FRAGMENT OF THE ELONGATION FACTOR G FROM *E. COLI*

GARBER M. B., RESHETNIKOVA L. S.

Institute of Protein Research, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino

The C-terminal large fragment isolated after limited tryptic digestion of the elongation factor G (EF-G) has been crystallized. A number of different crystalline forms were observed. The conditions were found which allow to grow quite large crystals capable of diffracting the X-rays.