



УДК 577.412.5:577.352.332

## ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА РОДОПСИНА

## II.\* ПЕПТИДЫ ХИМОТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗА

*Золотарев А. С., Миталева С. И., Шемякин В. В.,  
Костина М. Б., Фейгина М. Ю., Абдулаев Н. Г.*

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

Проведен гидролиз апомембран фоторецепторных дисков химотрипсином. Полученный гидролизат разделен центрифугированием на супернатант, содержащий пептиды, растворимые в водной фазе, и осадок, состоящий из пептидов, связанных с мембраной. Водорастворимые химотриптические пептиды разделены ионообменной хроматографией на катионите AG 50W-X4 с дальнейшей очисткой их высокоэффективной жидкостной хроматографией. Мембраносвязанные фрагменты разделены гель-фильтрацией на биогеле Р-30 в 80% муравьиной кислоте. Определена структура выделенных пептидов, содержащих в сумме 296 аминокислотных остатков, что составляет 85% полипептидной цепи родопсина.

В предыдущем сообщении было описано выделение и установление аминокислотной последовательности бромциановых пептидов родопсина из сетчатки глаза быка [1]. Настоящая статья посвящена изучению продуктов его химотриптического гидролиза.

Ферментативный гидролиз является одним из эффективных методов, используемых для фрагментации глобулярных белков при определении их первичной структуры. Однако этот метод практически неприменим в случае делипидированных препаратов мембранных белков, получаемых обычно с использованием органических растворителей или детергентов. Высокая степень агрегации и нерастворимость этих препаратов в водных средах исключают возможность проведения их исчерпывающих ферментативных гидролизом.

Одним из подходов, используемых для фрагментации мембранных белков, является их ферментативное расщепление непосредственно в мембране [2-4]. В случае нативных фоторецепторных мембран обработка протеолитическими ферментами приводит к образованию двух или трех крупных мембраносвязанных фрагментов [5-7]. Доступность действию ферментов лишь ограниченного числа пептидных связей свидетельствует о том, что молекула родопсина в нативном состоянии глубоко утоплена в мембрану.

Известно, что под действием света молекула родопсина подвергается значительным конформационным изменениям [8]. Следовательно, можно было ожидать, что в образовавшихся апомембранах в отличие от нативных мембран более протяженные участки полипептидной цепи белка будут находиться в непосредственном контакте с водной фазой и будут доступны действию протеназ. Действительно, судя по данным N-концевого анализа и электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия, обработка апомембран  $\alpha$ -химотрипсином приводит к глубокому расщеплению полипептидной цепи родопсина, в результате чего значительная часть молекулы белка переходит в раствор в виде коротких водорастворимых пептидов, а в мембраносвязанном состоянии остается лишь несколько фрагментов, составляющих в сумме небольшую часть полипептидной цепи белка. Эти данные послужили основой для проведения препаративного химотриптического гидролиза белка в апомембранах. Гидролиз проводили при конечном соотношении фермент — белок

\* Сообщение I см. [1].

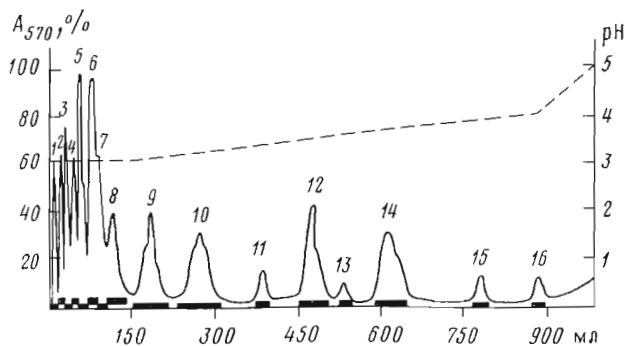


Рис. 1. Разделение водорастворимых пептидов химотриптического гидролизата родоцина на колонке (0,6×60 см) с катионитом AG 50W-X4. Здесь и далее прямоугольники на оси абсцисс — объединенные фракции Ch1 — Ch16. Стартовый буфер: 0,2 М пиридин-ацетатный, pH 3,1. Конечный буфер: 2,0 М пиридин-ацетатный, pH 5,0. Скорость элюирования 30 мл/ч

1:20 (по весу) в течение 4 и 16 ч. Полученный гидролизат разделяли центрифугированием на фракцию, содержащую пептиды, растворимые в водной фазе, и осадок, состоящий из пептидов, связанных с мембраной. В дальнейшем пептиды каждой группы разделяли по различным схемам.

Водорастворимые пептиды химотриптического гидролизата агомембран лиофилизовали, затем карбоксиметилировали  $^{14}\text{C}$ -меченой иодуксусной кислотой по методу [9] и обессоливали на сефадексе G-10 в 50% уксусной кислоте. Рядом аналитических опытов было показано, что непосредственное разделение полученной сложной смеси пептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) представляет определенные трудности. В связи с этим первоначальное разделение смеси растворимых пептидов осуществляли ионообменной хроматографией на катионите AG 50W-X4 в градиенте концентрации и pH пиридин-ацетатных буферов с последующей промывкой колонки 2 М водным раствором аммиака (рис. 1). Пептиды обнаруживали по реакции с нингидрином. Следует отметить, что при растворении смеси пептидов в стартовом буфере перед нанесением на колонку образовался осадок, который содержал незначительное количество пептидного материала и в дальнейшем не исследовался. В результате разделения было получено 16 фракций. Пептиды, элюируемые далее водным раствором аммиака, составили 17-ю фракцию. Анализ фракций хроматографией в тонком слое силикагеля и определение N-концевых аминокислотных остатков показали, что пять фракций (Ch2, Ch11, Ch13, Ch16 и Ch17) представляли собой индивидуальные пептиды и не требовали дальнейшей очистки. Остальные фракции являлись смесями сравнительно небольшого числа пептидов, кроме фракции Ch1, которая состояла из сложной смеси небольших количеств пептидов и дальнейшей очистке не подвергалась.

Авторадиографический анализ позволил обнаружить радиоактивные пептиды во фракциях Ch3, Ch7, Ch8, Ch9 и Ch13. Проявление тонкослойных хроматограмм реактивом Эрлиха указало на наличие триптофансодержащих пептидов во фракциях Ch3, Ch6, Ch8 и Ch9. Такое предварительное детектирование карбоксиметилцистеин- и триптофансодержащих пептидов дало возможность в дальнейшем целенаправленно выделять их из соответствующих фракций.

Выделение индивидуальных пептидов из фракций, полученных после ионообменной хроматографии, проводили методом ВЭЖХ на колонке с носителем Silasorb  $\text{C}_{18}$ . Для элюирования пептидов использовали линейный градиент ацетонитрила в 10 мМ ацетате аммония. Использование буферов, мало поглощающих в УФ-области, позволило вести прямую детекцию пептидов при 206 нм. Одновременное определение пептидов при 280 нм позволяло выявить тирозин- и триптофансодержащие пептиды, которые в свою очередь отличались друг от друга по величине отношения  $A_{206}/A_{280}$ .

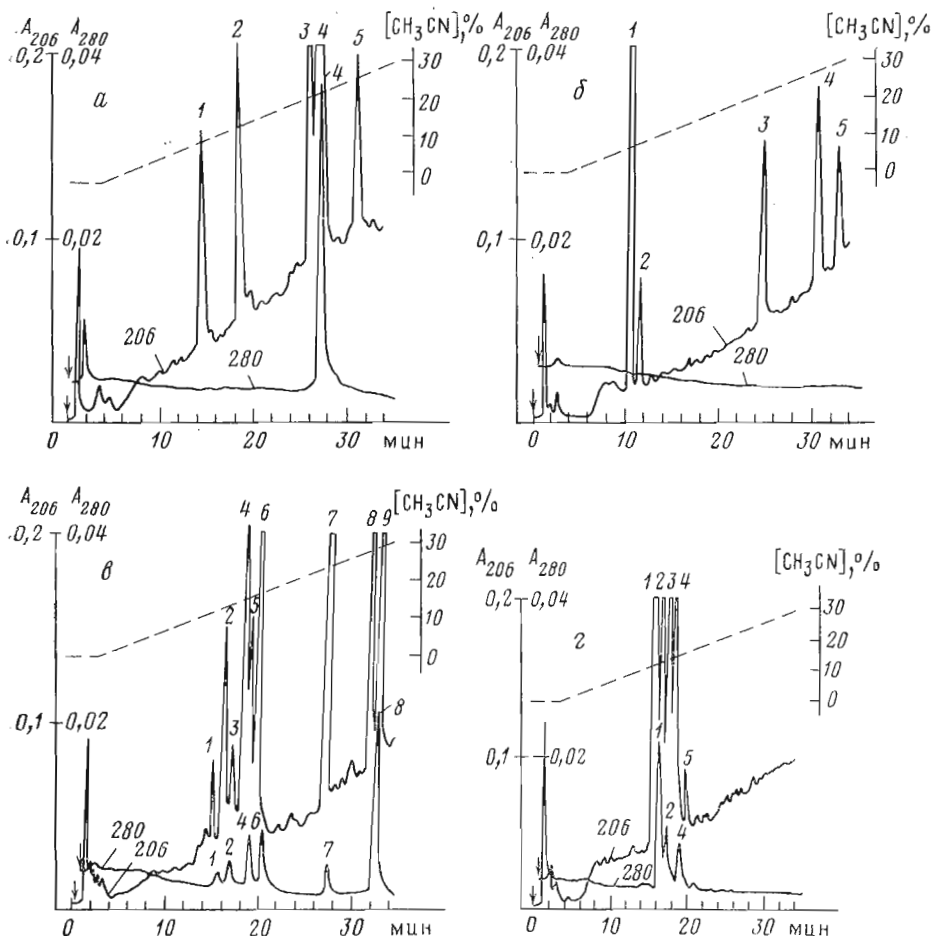


Рис. 2. Разделение химотриптических пептидов фракций Ch3 (а), Ch5 (б), Ch6 (в), Ch7 (г) рис. 1 ВЭЖХ на колонке (0,46×25 см) с носителем Silasorb C<sub>18</sub> с градиентом ацетонитрила в 10 мМ ацетате аммония (рН 5,7). Скорость элюирования 2 мл/мин

Карбоксиметилцистеинсодержащие пептиды определяли по наличию радиоактивности во фракциях. Использование летучих буферов позволило проводить N-концевой и аминокислотный анализы выделенных пептидов без дополнительной стадии обессоливания.

Предварительное разделение полной смеси растворимых пептидов химотриптического гидролизата с помощью ВЭЖХ показало, что пептиды элюируются с колонки градиентом ацетонитрила от 0 до 30%. Поэтому разделение фракций, полученных после катионообменной хроматографии, проводили по единой программе с конечной концентрацией ацетонитрила 30%. На рис. 2 представлены хроматограммы разделения наиболее сложных смесевых фракций.

Данные о выделенных растворимых химотриптических пептидах приведены в табл. 1.

N-Концевую аминокислотную последовательность пептидов определяли по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде их дансильных (Dns), фенилтиогидантоиновых (Pth) и 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-тиогидантоиновых (Dabth) производных. C-Концевые аминокислотные последовательности определяли с помощью карбоксипептидазы А. Структура растворимых пептидов химотриптического гидролизата родопсина представлена в табл. 2.

В целом химотриптическое расщепление белка в апомембране прошло довольно специфично по карбоксильным группам остатков тирозина, фенилаланина, триптофана, лейцина, метионина, гистидина и амидов дикар-

Аминокислотный состав растворимых пептидов химогригического гидролиза \*

Аминокислота	Ch2	Ch3-1	Ch3-2	Ch3-3	Ch3-4	Ch3-5	Ch4-1	Ch4-2	Ch5-1	Ch5-2	Ch5-3
Cys (Cm)		1,7(2)	1,8(2)	0,9(1)	1,0(1)	0,8(1)					
Asp		1,0(1)	1,1(1)	1,0(1)		1,1(1)	1,0(1)	2,1(2)	2,7(3)	2,0(2)	
Thr	0,9(1)			0,8(1)		0,9(1)			1,2(1)		1,0(1)
Ser	0,8(1)		1,2(1)			1,0(1)	1,4(1)		4,2(1)		
Glu	2,0(2)		2,0(2)	1,1(1)		1,0(1)			5,7(6)		
Pro	0,9(1)	1,2(1)	0,9(1)	1,0(1)	1,6(2)	1,4(1)					
Gly		1,1(1)	2,2(2)	2,7(3)	1,4(1)	2,9(3)					
Ala	1,9(2)				4,0(4)			2,0(2)	4,2(4)		
Val	0,9(1)				0,8(1)	0,8(1)	1,9(2)	0,9(1)	1,0(1)	0,8(1)	1,6(2)
Met			0,6(1)								
Ile			1,9(2)								
Leu		0,9(1)			1,7(2)	1,0(1)		1,8(2)		1,0(1)	2,4(2)
Tyr			0,9(1)								
Phe						1,9(2)		1,0(1)	0,9(1)		
Lys		0,9(1)		1,0(1)							
Trp**					+(1)				0,9(1)		
Число остатков	8	7	13	10	12	12	4	8	16	4	5
N-Концевая	Glu	Cys	Ile	Gly	Ala	Val	Val	Asn	Thr	Val	Ser
Выход, %	1	10	13	7	14	5	3	30	50	6	4

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислота	Ch5-4	Ch5-5	Ch6-1	Ch6-2 Ch7-1	Ch6-3	Ch6-4	Ch6-5	Ch6-6	Ch6-7	Ch6-8	Ch6-9
Asp	1,1(1)	0,9(1)			1,0(1)			1,1(1)	2,8(3)		0,9(1)
Thr				2,0(2)							
Glu				1,2(1)				0,9(1)			
Pro		1,1(1)							2,1(2)	2,0(2)	1,0(1)
Gly				0,9(1)						1,0(1)	
Ala	2,2(2)	1,1(1)					1,0(1)			1,9(2)	1,2(1)
Val	1,0(1)		0,9(1)				0,8(1)	0,9(1)			
Met		0,7(1)			1,6(2)					0,8(1)	
Ile		0,8(1)	1,0(1)		1,1(1)			0,8(1)			0,9(1)
Leu	1,9(2)					1,2(1)			1,1(1)		
Tyr			0,9(1)	1,0(1)		1,0(1)		1,0(1)	0,9(1)		
Phe	1,0(1)	1,0(1)							1,0(1)		2,1(2)
Трп **										+(1)	
Число остатков	7	6	3	5	4	5	4	5	8	8	6
N-Концевая	Leu	Met	Val	Glu	Ile	Thr	Val	Asn	Gly	Ala	Thr
Выход, %	4	2	4	50	6	16	30	16	10	10	20

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислота	Ch7-2	Ch7-3	Ch7-4	Ch7-5	Ch8-1	Ch8-2	Ch8-3	Ch8-4	Ch8-5	Ch8-6	Ch9-1
Cys (Cm)	0,9(1)				1,0(1)						
Asp	0,9(1)			0,9(1)	0,9(1)	1,9(2)	0,9(1)		0,9(1)		
Thr	0,9(1)				0,9(1)	1,8(2)				1,1(1)	
Ser	0,9(1)				0,9(1)	2,1(2)					
Glu			2,0(2)			1,0(1)					
Pro			1,1(1)			1,0(1)	0,9(1)				
Gly	1,0(1)	1,0(1)				1,8(2)	2,4(3)	1,0(1)		2,6(2)	
Ala		0,9(1)	1,0(1)	1,0(1)		2,1(2)	1,0(1)			1,0(1)	1,0(1)
Val		0,9(1)									
Met											
Ile	1,1(1)							1,0(1)		0,9(1)	
Leu	1,0(1)							2,0(2)		1,0(1)	
Tyr			1,9(2)	1,1(1)					2,0(2)		
Phe				1,0(1)	1,0(1)				0,8(1)		1,0(1)
Lys											
Trp **											
Число остатков	6	4	6	4	3	12	7	3	4	+	2
N-Концевая	Ser	Gly	Glu	Phe	Ser	Val	Val	Ile	Leu	Gly	Val
Выход, %	12	45	30	2	6	6	8	9	6	8	4

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислота	Ch9-2	Ch9-3	Ch9-4	Ch9-5	Ch10-1	Ch10-2	Ch10-3	Ch10-4	Ch11	Ch12-1
Cys (Cm)										
Asp			0,9(1)				1,1(1)	0,8(1)	0,8(1)	1,1(1)
Thr			1,0(1)		0,8(1)			1,0(1)	0,9(1)	1,0(1)
Ser			0,9(1)		3,8(4)	0,9(1)		1,9(2)	1,2(1)	0,8(1)
Glu	1,1(1)		1,0(1)	1,1(1)		1,0(1)	1,2(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,2(1)
Pro	1,0(1)							1,0(1)	0,9(1)	1,0(1)
Gly	1,0(1)				2,8(3)			1,1(1)	2,2(2)	1,0(1)
Ala					1,0(1)					
Val		1,1(1)	2,5(3)	1,0(1)		1,8(2)	1,6(2)	1,7(2)		
Met		0,7(1)	0,9(1)				0,8(1)			
Ile									1,0(1)	
Leu	1,2(1)									
Tyr				0,9(1)						
Phe		1,0(1)	1,1(1)	1,0(1)			1,0(1)	0,9(1)	2,0(2)	0,9(1)
His						1,0(1)			1,1(1)	1,0(1)
Lys			1,0(1)					1,0(1)		
Arg								1,1(1)		
Trp **	+(1)									
Число остатков	5	3	10	4	10	5	7	11	11	7
N-Концевая	Leu	Met	Val	Tyr	Thr	Val	Ile	Ser	Thr	Thr
Выход, %	2	15	2	7	3	30	2	30	4	10

Таблица 1 (окончание)

Аминокислота	Ch12-2	Ch12-3	Ch13	Ch14-1	Ch14-2	Ch14-3	Ch14-4	Ch15-1	Ch15-2	Ch16	Ch17
Cys (Cm)											
Asp		1,0(1)	0,8(1)					0,9(1)	1,1(1)		
Thr	0,9(1)	1,0(1)	1,0(1)			0,9(1)	0,9(1)				
Ser	4,0(1)	0,9(1)	1,8(2)				0,8(1)			0,8(1)	
Glu		1,1(1)		1,0(1)	1,1(1)	1,0(1)			0,9(1)		
Pro								1,0(1)			
Gly		0,9(1)						1,1(1)	2,3(2)		
Ala	1,9(2)			1,0(1)	1,0(1)			1,1(1)	1,9(2)		
Val	1,1(1)		1,2(1)					1,0(1)	0,9(1)		
Met			0,8(1)					0,9(1)	0,8(1)		
Ile		1,1(1)			0,9(1)	1,0(1)		0,9(1)	0,9(1)		
Leu			1,1(1)				1,1(1)	0,9(1)	0,9(1)		1,0(1)
Tyr	0,9(1)				0,9(1)		0,9(1)			1,0(1)	
Phe		2,0(2)		1,0(1)			1,0(1)	0,9(1)	1,9(2)		
His		1,2(1)					1,0(1)	1,1(1)	1,0(1)		
Lys	1,0(1)			1,0(1)							1,9(2)
Arg			1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)		0,9(1)	1,1(1)	1,0(1)	
Число остатков	7	9	8	3	5	4	7	9	13	3	3
N-Концевая	Ala	Ile	Arg	Lys	Ala	Arg	Thr	Arg	Arg	Ser	Lys
Выход, %	30	5	4	5	40	60	60	4	6	12	10

\* Прямеси менее 0,2 аминокислотного остатка в таблицу не включены.

\*\* Thr определены качественно по реакции Эрлика.



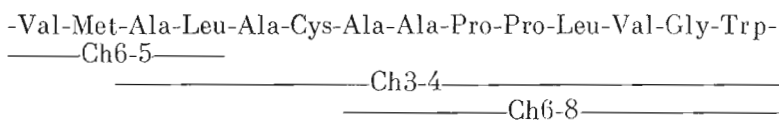
**Структура растворимых пептидов химотриптического гидролиза  
родопсина**

Пептид	Аминокислотная последовательность
Ch2	Glu-Thr-Ser-Gln-Val-Ala-Pro-Ala
Ch3-1	Cys-Cys-Gly-Lys-Asn-Pro-Leu
Ch3-2	Ile-Pro-Glu-Gly-Met-Gln-Cys-Ser-Cys-Gly-Ile-Asp-Tyr
Ch3-3	Gly-Pro-Thr-Gly-Cys-Asn-Leu-Glu-Gly-Phe
Ch3-4	Ala-Leu-Ala-Cys-Ala-Ala-Pro-Pro-Leu-Val-Gly-Trp
Ch3-5	Val-Phe-Gly-Pro-Thr-Gly-Cys-Asn-Leu-Glu-Gly-Phe
Ch4-1	Val-Thr-Val-Gln
Ch4-2	Asn-Leu-Ala-Val-Ala-Asp-Leu-Phe
Ch5-1	Thr-Val-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-Gln-Gln-Gln-Glu-Ser-Ala- Thr-Thr-Gln
Ch5-2	Val-Thr-Thr-Leu
Ch5-3	Ser-Leu-Val-Val-Leu
Ch5-4	Leu-Ala-Val-Ala-Asp-Leu-Phe
Ch5-5	Met-Thr-Ile-Pro-Ala-Phe
Ch6-1	Val-Ile-Tyr
Ch6-2	} Glu-Ala-Pro-Gln-Tyr
Ch7-1	
Ch6-3	Ile-Met-Met-Asn
Ch6-4	Thr-Thr-Thr-Leu-Tyr
Ch6-5	Val-Met-Ala-Leu
Ch6-6	Asn-Pro-Val-Ile-Tyr
Ch6-7	Gly-Gly-Phe-Thr-Thr-Thr-Leu-Tyr
Ch6-8	Ala-Ala-Pro-Pro-Leu-Val-Gly-Trp
Ch6-9	Thr-Ile-Pro-Ala-Phe-Phe
Ch7-2	Ser-Cys-Gly-Ile-Asp-Tyr
Ch7-3	Gly-Val-Ala-Phe
Ch7-4	Glu-Ala-Pro-Gln-Tyr-Tyr
Ch7-5	Phe-Ala-Thr-Leu
Ch8-1	Ser-Asn-Phe
Ch8-2	Val-Ser-Lys-Thr-Glu-Thr-Ser-Gln-Val-Ala-Pro-Ala
Ch8-3	Val-Val-Val-Cys-Lys-Pro-Met
Ch8-4	Ile-Leu-Leu
Ch8-5	Leu-Thr-Leu-Tyr
Ch8-6	Gly-Gly-Glu-Ile-Ala-Leu-Trp
Ch9-1	Val-Phe
Ch9-2	Leu-Ala-Glu-Pro-Trp
Ch9-3	Met-Val-Phe
Ch9-4	Val-Val-Val-Cys-Lys-Pro-Met-Ser-Asn-Phe
Ch9-5	Tyr-Val-Pro-Phe
Ch10-1	Thr-Val-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-Gln-Gln-Gln
Ch10-2	Val-Thr-Val-Gln-His
Ch10-3	Ile-Met-Met-Asn-Lys-Gln-Phe
Ch10-4	Ser-Asn-Lys-Thr-Gly-Val-Val-Arg-Ser-Pro-Phe
Ch11	Thr-His-Gln-Gly-Ser-Asp-Phe-Gly-Pro-Ile-Phe
Ch12-1	Thr-His-Gln-Gly-Ser-Asp-Phe
Ch12-2	Ala-Lys-Thr-Ser-Ala-Val-Tyr
Ch12-3	Ile-Phe-Thr-His-Gln-Gly-Ser-Asp-Phe
Ch13	Arg-Asn-Cys-Met-Val-Thr-Thr-Leu
Ch14-1	Lys-Gln-Phe
Ch14-2	Ala-Ile-Glu-Arg-Tyr
Ch14-3	Arg-Thr-Pro-Leu
Ch14-4	Thr-Ser-Leu-His-Gly-Tyr-Phe
Ch15-1	Arg-Phe-Gly-Glu-Asn-His-Ala-Ile-Met
Ch15-2	Arg-Phe-Gly-Glu-Asn-His-Ala-Ile-Met-Gly-Val-Ala-Phe
Ch16	Ser-Arg-Tyr
Ch17	Lys-Lys-Leu

боновых кислот. Пептиды Ch7-2 и Ch6-8 появились в результате действия химотрипсина на пептидную связь, образованную карбоксильной группой остатка цистеина, а пептиды Ch2 и Ch8-1 — карбоксильной группой треонина.

Некоторые выделенные пептиды (Ch6-8, Ch12-1, Ch15-1) являлись составными частями более крупных фрагментов (Ch3-4, Ch11, Ch15-2 соответственно). В ряде случаев были выделены перекрывающиеся пептиды, что дало возможность составить более крупные фрагменты. Сказанное иллюстрирует 14-членный фрагмент, который был реконструирован на

основании структуры трех пептидов:



Растворимые пептиды химотриптического гидролизата апомембран содержат в сумме 234 аминокислотных остатка из 348, входящих в состав родопсина. Отметим, что получены все пептиды из четырех гидрофобных участков молекулы, которые в предложенной модели упаковки полипептидной цепи родопсина в мембране составляют четыре трансмембранных тяжа [7]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о глубоком ферментативном расщеплении молекулы белка в апомембране.

Мембраносвязанные пептиды химотриптического гидролизата апомембран восстанавливали дитиотреитом, карбоксиметилировали в присутствии додецилсульфата натрия. Пептидный материал лиофильно высушивали и растворяли в 2-хлорэтанол, который является хорошим растворителем как для липидов, так и для мембранных белков [10]. Пептиды освободили от липидов и додецилсульфата натрия гель-фильтрацией на колонке с сефадексом LH-20, уравновешенным 80% 2-хлорэтанолом. Практически все фосфолипиды отделялись от пептидного материала, элюируемого со свободным объемом колонки.

Делипидированные пептиды разделяли на биогеле Р-30, уравновешенном 80% муравьиной кислотой, и объединяли по фракциям, как показано на рис. 3. Фракция I состояла из агрегатов пептидов и в дальнейшем не исследовалась.

Фракция II, судя по результатам N-концевого анализа, состояла из смеси фрагментов. По данным электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия, эти фрагменты обладали молекулярными массами от 7 до 10 кДа. Попытки выделения из фракции II индивидуальных пептидов оказались безуспешными.

Фракция III, по данным N-концевого анализа, содержала практически один фрагмент. После ее рехроматографии на биогеле Р-30 в 80% муравьиной кислоте выделен пептид Ch18, имеющий в качестве N-концевого аминокислотного остатка треонин.

На основании N-концевого анализа было установлено, что фракция IV содержала два пептида (Ch19 и Ch20), имеющие в качестве N-концевых аминокислотных остатков лейцин и лизин соответственно. Попытки разделить эти пептиды гель-фильтрацией на биогеле Р-30 с помощью нескольких циклов рехроматографии не дали положительных результатов. Однако после проведения химотриптического гидролиза на апомембранах в течение более длительного времени (16 ч) при сохранении профиля разделения смеси образовавшихся фрагментов (рис. 3) фракция IV содержала практически чистый пептид Ch19.

Пептид Ch18 (рис. 4). Автоматической деградацией пептида на жидкофазном секвенаторе идентифицировано 20 аминокислотных остатков. При расщеплении пептида бромцианом и разделении образовавшейся смеси продуктов гель-фильтрацией на биогеле Р-10 в 80% муравьиной кислоте выделены два фрагмента, Ch18-B1 и Ch18-B2, аминокислотный состав

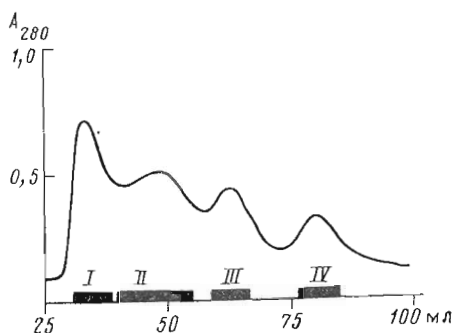


Рис. 3. Разделение мембраносвязанных химотриптических фрагментов родопсина на колонке (1,5×100 см) с биогелем Р-30 в 80% муравьиной кислоте

Аминокислотный состав фрагментов, входящих в состав пептидов Ch18 и Ch19

Аминокислота	Ch18			Ch19			
	Ch18-B1	Ch18-B2	Ch18-B2-NBS2	Ch19-B1	Ch19-B2	Ch19-B3	Ch19-B4
Cys(Cm)		0,7(1)					
Asp	2,2(2)						1,1(1)
Thr	2,1(2)						
Ser	0,9(1)			1,0(1)			
Hse	0,7(1)			0,7(1)	0,8(1)	0,7(1)	
Glu	2,8(3)	1,1(1)	1,1(1)	2,2(2)			
Pro	1,1(1)	1,0(1)		1,1(1)			1,0(1)
Gly		1,2(1)	1,0(1)				1,1(1)
Ala				1,0(1)	2,1(2)		
Val	0,8(1)	3,5(4)	0,8(1)				
Ile	0,8(1)	3,4(4)				0,9(1)	1,0
Leu		1,7(2)	1,0(1)	1,1(1)	1,0(1)	1,9(2)	0,9(1)
Tyr	0,9(1)	0,8(1)			0,9(1)		
Phe	1,0(1)	4,9(5)	1,0(1)	1,0(1)		1,0(1)	2,0(2)
His	1,0(1)	1,0(1)					
Trp				+ (1)			
N-Концевая	Thr	Phe	Gly	Leu	Leu	Phe	Leu
Число остатков	15	21	5	9	5	5	7

которых приведен в табл. 3. Для фрагмента Ch18-B2 методом Эдмана установлена последовательность 14 аминокислотных остатков. Далее фрагмент расщепляли N-бромсукцинимидом по единственному остатку тирозина. Реакционную смесь упаривали досуха и экстракцией водой из нее выделяли C-концевой пептид Ch18-B2-NBS2 (табл. 3). Для оставшегося в осадке N-концевого фрагмента Ch18-B2-NBS1, так же как и для пептида Ch18-B2, методом Эдмана было идентифицировано лишь 14 аминокислотных остатков. Устойчивость пептида Ch18-B2-NBS1 к действию ферментов и химических агентов создала трудности в определении его полной аминокислотной последовательности. Установить структуру пептида Ch18-B2-NBS1 и, таким образом, осуществить реконструкцию пептида Ch18-B2 удалось после определения автоматической деградацией на жидкофазном секвенаторе N-концевой последовательности бромцианового фрагмента родопсина B10 [1], N-концевая часть которого соответствует пептиду Ch18-B2-NBS1.

*Пептид Ch19* (рис. 5). Автоматической деградацией пептида на жидкофазном секвенаторе установлена последовательность 20 аминокислотных остатков. Для получения дальнейшей структурной информации проведено расщепление пептида бромцианом по остаткам метионина. Полученная смесь продуктов разделена с помощью ВЭЖХ в условиях, описанных для разделения коротких бромциановых фрагментов родопсина [1]. Аминокислотный состав выделенных бромциановых фрагментов (Ch 19-B1, Ch 19-B2, Ch 19-B3 и Ch 19-B4) \* приведен в табл. 3. Определение аминокислотной последовательности этих пептидов позволило установить полную структуру фрагмента Ch 19.

Мембраносвязанные хмотриптические фрагменты Ch18 и Ch19 содержат в сумме 62 аминокислотных остатка. Эти пептиды составляют первый и четвертый трансмембранные тяжи в предложенной модели упаковки полипептидной цепи родопсина в мембране [7].

Таким образом, из хмотриптического гидролизата апомембран удалось выделить 56 пептидов, содержащих в сумме 296 аминокислотных остатков, что составляет 85% полипептидной цепи белка.

Данные, полученные при установлении структуры целого ряда хмотриптических пептидов, сыграли важную роль не только при определении

\* Ch19-B2 соответствует бромциановому пептиду родопсина B2, Ch19-B3 – пептиду B3 (ср. сообщение [1]).



ли еще такую же порцию химотрипсина. Спустя 4 или 16 ч гидролиз останавливали понижением pH среды до 3,0 с помощью муравьиной кислоты. Мембраны осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 3000g. Осадок и супернатант, содержащий растворимые пептиды, лиофилизировали для удаления бикарбоната аммония. Полноту расщепления белка в апо-мембране контролировали с помощью электрофореза в ПААГ в условиях, описанных в сообщении [1].

*Водорастворимые пептиды карбоксиметилировали* по методу [9] с добавлением 250 мкКи иод-[2-<sup>14</sup>C]уксусной кислоты (Amersham, Англия). Реакцию останавливали добавлением 5-кратного избытка 2-меркаптоэтанола по отношению к иодуксусной кислоте. Реакционную смесь обессоливали в темноте на колонке (2,5×40 см) с сефадексом G-10, уравновешенным 50% уксусной кислотой. Пептидную фракцию упаривали досуха.

*Водорастворимые химотриптические пептиды разделяли* ионообменной хроматографией на термостатируемой (50°С) колонке (0,6×60 см) (Hitachi, Япония) с катионообменной смолой AG 50W-X4 с размером частиц 200—400 меш (Bio-Rad, Laboratories, США). Смесь пептидов растворяли в 1,5 мл стартового буфера (0,2 М пиридин-ацетат, pH 3,1), доведенного муравьиной кислотой до pH 2,7, и наносили на колонку под давлением 3 атм. Для разделения пептидов использовали градиент концентрации и pH пиридин-ацетатных буферов при скорости элюирования 30 мл/ч и рабочем давлении 8—9 атм. Градиент (см. рис. 1) создавали с помощью прибора Ultrograd (ЛКВ, Швеция). В качестве конечного буфера использовался 2 М пиридин-ацетатный буфер, pH 5,0. По окончании градиентного элюирования колонку промывали 40 мл 2 М NH<sub>4</sub>OH. Элюат собирали фракциями по 1,5 мл. Для обнаружения пептидов из каждой второй пробирки отбирали аликвоты, которые анализировали по реакции с нингидрином на автоматическом анализаторе (Technicon, США). По результатам анализа фракции объединяли, упаривали до объема 1 мл и хранили при 4°С. Для оценки числа пептидов в объединенных фракциях  $\frac{1}{100}$  часть каждой фракции хроматографировали в тонком слое силикагеля (DC-Fertigplatten Kieselgel, Merck) в системе пиридин — уксусная кислота — *n*-бутанол — вода (40 : 12 : 60 : 16). Детекцию пептидов осуществляли по реакции с нингидрином. Триптофансодержащие пептиды идентифицировали с помощью реактива Эрлиха. Карбоксиметилцистеинсодержащие пептиды определяли методом автордиографии (рентгеновская пленка РМ-1, экспонирование 2 недели). ВЭЖХ пептидов проводили как описано в сообщении [1].

*Карбоксиметилирование мембраносвязанных пептидов* осуществляли по методике, описанной в сообщении [1]. Реакцию останавливали добавлением 2-меркаптоэтанола и освобождали от низкомолекулярных продуктов реакции диализом против воды. Отдиализованный материал лиофильно высушивали, растворяли в 5 мл 2-хлорэтанола и делипидировали на колонке (2,5×100 см) с сефадексом LH-20 (Pharmacia, Швеция), уравновешенным 80% 2-хлорэтанолом. Фракцию, элюирующуюся со свободным объемом, упаривали досуха. Полноту удаления фосфолипидов проверяли путем определения неорганического фосфора по методу [14].

Разделение пептидов гель-фильтрацией осуществляли на колонке (1,5×100 см) с фракционированным (см. [1]) биогелем Р-30 (Bio-Rad, США, —400 меш), уравновешенным 80% муравьиной кислотой. В опытах использовали фракцию биогеля Р-30, оседавшую за 30 мин (при высоте столба воды 18 см). Перед нанесением пептиды растворяли в 1,5 мл муравьиной кислоты. Контроль за выходом пептидов с колонки осуществляли с помощью «Uvicord II» (ЛКВ, Швеция) по поглощению при 280 нм. Элюат собирали фракциями по 3 мл/ч.

*Расщепление бромцианом пептидов Ch18 и Ch19.* 0,1 мкмоль пептида растворяли в 0,2 мл 80% муравьиной кислоты и добавляли к раствору 100-кратный молярный избыток бромциана в расчете на метионин. Смесь выдерживали 24 ч при 20°С в темноте и затем лиофилизировали. Пептиды разделяли на колонке (1×100 см) с фракционированным биогелем Р-10 (Bio-Rad, США, —400 меш).

*Расщепление N-бромсукцинимидом пептида Ch18-B2.* 0,05 мкмоль пеп-

тида суспендировали в 0,1 мл 80% муравьиной кислоты и добавляли равный объем раствора N-бромсукцинимид (0,07 мг, 10-кратный мольный избыток) в 80% муравьиной кислоте. Смесь выдерживали при 20° С в течение 16 ч в темноте при перемешивании, затем упаривали досуха. Сухой остаток экстрагировали водой (3×0,1 мл). Супернатант и осадок высушивали лиофильно.

*Аминокислотный анализ пептидов*, определение N-концевых аминокислотных остатков, C-концевой аминокислотной последовательности с помощью карбоксипептидаз и деградацию пептидов ручным и автоматическим методом проводили как описано в сообщении [1].

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к данной работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Артамонов И. Д., Золотарев А. С., Костина М. Б., Хорошилова Н. И., Фейгина М. Ю., Абдулаев Н. Г. Биоорганич. химия, 1983, т. 9, № 10, с. 1301–1316.
2. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. FEBS Lett., 1977, v. 84, № 1, p. 1–4.
3. Gerber G. E., Anderegg R. J., Herlihy W. C., Gray C. P., Vicmann L., Khorana H. G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 1, p. 227–281.
4. Etemady A.-H. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 604, № 4, p. 347–422.
5. Trayhurn P., Mandel P., Virmaux N. FEBS Lett., 1974, v. 38, № 3, p. 351–353.
6. Pober J. S., Stryer L. J. Mol. Biol., 1975, v. 95, № 3, p. 477–481.
7. Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1982, v. 148, № 2, p. 179–191.
8. Rafferty Ch. N., Shichi H. Photochem. and Photobiol., 1981, v. 33, № 2, p. 229–234.
9. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 2, p. 622–627.
10. Zahler H. P., Wallach D. E. H. Biochim. et biophys. acta, 1967, v. 135, № 2, p. 371–374.
11. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Фейгина М. Ю., Артамонов И. Д., Богачук А. С., Золотарев А. С., Егян Е. Р., Костецкий П. В. Биоорганич. химия, 1983, т. 9, № 10, с. 1331–1340.
12. Родионов А. В., Байрамовили Д. И., Куделин А. Б., Фейгина М. Ю., Шкроб А. М., Овчинников Ю. А. Биоорганич. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1328–1334.
13. Bornstein P. Biochemistry, 1970, v. 9, № 12, p. 2408–2421.
14. Stewart D. J. Analyt. Biochem., 1974, v. 62, № 2, p. 349–364.

Поступила в редакцию  
27.IV.1983

#### PRIMARY STRUCTURE OF RHODOPSIN. II. CHYMOTRYPTIC PEPTIDES

ZOLOTAREV A. S., MITALEVA S. I., SHEMYAKIN V. V.,  
KOSTINA M. B., FEIGINA M. Yu., ABDULAEV N. G.

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

Apomembranes prepared from the photoreceptor disks were subjected to chymotryptic hydrolysis. The insoluble material, containing the membrane-bound peptides, was removed by centrifugation, and the water-soluble peptides of the supernatant were separated by ion-exchange chromatography on AG 50W×4 followed by high performance liquid chromatography. The insoluble peptides were separated by gel-filtration on Bio-Gel P-30 in 80% formic acid. Amino acid sequence of peptides containing in total 296 amino acid residues and comprising 85% of the rhodopsin polypeptide chain was determined.