



УДК 547.962.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ G ИЗ
*ESCHERICHIA COLI*VI. СТРУКТУРА ПЕПТИДОВ БРОМЦИАНОВОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ
МОЛЕКУЛЫ G-ФАКТОРА

*Алахов Ю. Б., Бундуле М. А., Бундулис Ю. П.,
Винокуров Л. М., Козлов В. П., Мотуз Л. П.*

Институт белка Академии наук СССР, г. Пушкино Московской обл.

Исследованы пептиды, полученные в результате расщепления G-фактора бромцианом. Выделены все 12 пептидов, охватывающих структуру фрагмента T₄. Для установления их аминокислотной последовательности исследовались продукты, полученные после расщепления бромциановых пептидов трипсином, химотрипсином, термолизином, стафилококковой глутаминовой протеиназой и BNPS-скатолом. Установлена полная первичная структура 9 из 12 пептидов бромцианового расщепления белка.

Избранная нами стратегия определения первичной структуры фактора элонгации G, включающая в себя исследование фрагментов ограниченного триптического гидролиза [2, 3], потребовала нахождения пептидов, объединяющих эти фрагменты в одну полипептидную цепь. Из данных аминокислотного анализа и определения молекулярных масс фрагментов ограниченного трипсинолиза следует, что в условиях протеинолиза не происходит отщепления сколько-нибудь значительных участков полипептидной цепи, не входящих в состав этих фрагментов [2]. Для подтверждения этого предположения и выяснения структуры самого крупного фрагмента полипептидной цепи G-фактора фрагмента T₄ [2] с M_r 41 000 мы провели расщепление белка, модифицированного I-[¹⁴C]CH₂CONH₂, бромцианом. В результате проделанной работы удалось выделить все 23 пептида бромцианового расщепления G-фактора, в том числе 12 пептидов, охватывающих структуру фрагмента T₄.

Настоящая работа посвящена исследованию первичной структуры пептидов бромцианового расщепления G-фактора, входящих в состав фрагмента T₄, а также структуры C-концевого пептида CBG-23 (табл. 1). Исследование аминокислотных последовательностей остальных пептидов бромцианового расщепления G-фактора опубликовано в предыдущих сообщениях [4, 5, 1].

Для выделения бромциановых пептидов смесь, полученная после расщепления белка, была модифицирована малеиновым ангидридом и на первом этапе разделена на колонке с сефадексом G-25 (рис. 1). Объединенные фракции I, II и III разделялись далее на колонках с QAE-сефадексом A-25 (рис. 2-4). В результате были выделены в чистом виде следующие пептиды: CBG-1*, CBG-2*, CBG-5*, CBG-6, CBG-7, CBG-8, CBG-14, CBG-17, CBG-20*, CBG-22* и CBG-23. Для выделения в чистом виде остальных пептидов неомогенные фракции, полученные в результате разделения на колонках с QAE-сефадексом A-25, после предварительного удаления малеинильной защитной группы были подвергнуты рехроматографии на колонках с QAE-сефадексом A-25 или SP-сефадексом C-25. Так, после рехроматографии фракции K-9 (рис. 3) на колонке с QAE-сефадексом A-25 в чистом виде были выделены пептиды CBG-3.

Сообщение V см. [1].

* Пептиды в данной работе не исследовались, так как они не входят в состав фрагмента T₄.

Исследование структуры пептидов бромцианового расщепления G-фактора *

Пептид	Метод выделения	Агенты расщепления полипептидной цепи	Методы разделения продуктов гидролиза	Вариант метода Эдмана **
СВГ-6 ***	1. ГФ, G-25 2. ИХ, QAE-A25	1. Трипсин 2. BNPS-скатол	1. МПК 2. ГФ, G-100	
СВГ-7	1. ГФ, G-25 2. ИХ, QAE-A25			
СВГ-8	1. ГФ, G-25 2. ИХ, QAE-A25	1. Трипсин 2. Глутаминовая протеиназа	1. ГФ, G-25 2. МПК 3. ТС	1. Автоматический 2. Дансильный
СВГ-9	1. ГФ, G-25 2. ИХ, QAE-A25 3. ИХ, QAE-A25	1. Глутаминовая протеиназа 2. BNPS-скатол	1. МПК 2. ГФ, G-25	1. Автоматический 2. Дансильный
СВГ-10	1. ГФ, G-25 2. ИХ, QAE-A25 3. ИХ, QAE-A25	1. Глутаминовая протеиназа 2. BNPS-скатол	1. МПК 2. ИХ, QAE-A25	1. Автоматический 2. Дансильный
СВГ-11	1. ГФ, G-25 2. ИХ, QAE-A25 3. ИХ, QAE-A25	1. Трипсин 2. Химотрипсин 3. Глутаминовая протеиназа	1. ВЭИХ 2. ГФ, G-25 и G-15 3. МПК	Дансильный
СВГ-12	1. ГФ, G-25 2. ИХ, QAE-A25 3. ИХ, QAE-A25	Трипсин	1. ГФ, G-25 2. МПК 3. ВЭИХ	Автоматический
СВГ-13	1. ГФ, G-25 2. ИХ, QAE-A25 3. ИХ, QAE-A25	Трипсин	МПК	Дансильный
СВГ-14	1. ГФ, G-25 2. ИХ, QAE-A25	1. Трипсин 2. Термолизин	1. ТС 2. ГФ, G-25	Автоматический
СВГ-15	1. ГФ, G-25 2. ИХ, QAE-A25 3. ИХ, QAE-A25	Трипсин	МПК	Дансильный
СВГ-16	1. ГФ, G-25 2. ИХ, QAE-A25 3. ИХ, QAE-A25	Глутаминовая протеиназа		Дансильный
СВГ-17	1. ГФ, G-25 2. ИХ, QAE-A25	1. Трипсин 2. Глутаминовая протеиназа	МПК	1. Автоматический 2. Дансильный
СВГ-23	1. ГФ, G-25 2. ИХ, QAE-A25	Глутаминовая протеиназа	МПК	Дансильный

* Используются следующие сокращенные обозначения: BNPS — 3-бром-2-(*o*-нитрофенил)сульфенил-, ВЭИХ — высокоэффективная ионообменная хроматография, ГФ — гель-фильтрация, ИХ — ионообменная хроматография, МПК — метод пептидных карт, ТС — твердофазный сенсатор для анализа C-концевого пептида.

** Определение аминокислотной последовательности автоматическим методом Эдмана осуществлялось на исходных пептидах.

*** Исследование аминокислотной последовательности пептида СВГ-6 подробно описано в работе [4].

СВГ-6 и СВГ-16 (рис. 5). Методы выделения остальных пептидов бромцианового расщепления G-фактора суммированы в табл. 1. Пептиды СВГ-11, СВГ-12 и СВГ-13 были выделены в количествах, недостаточных для определения их полных аминокислотных последовательностей, поэтому в настоящей работе определена лишь их частичная структура. Для выделения этих пептидов была разработана методика с использованием

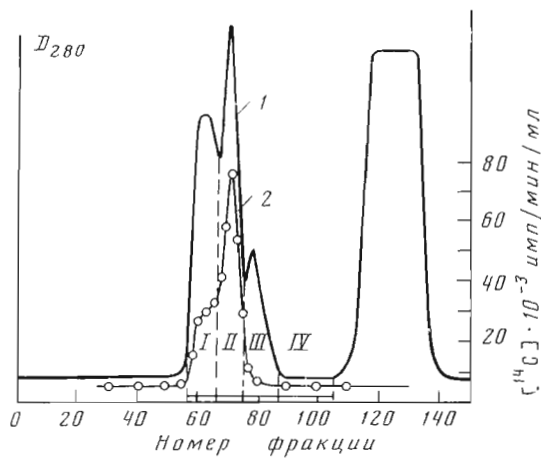


Рис. 1. Разделение смеси бромциановых пептидов G-фактора на колонке (2,5×160 см) с сефадексом G-25, уравновешенным аммиачной водой, pH 9 (скорость элюирования 18 мл/ч, объем фракций 6 мл). 1 — D_{280} , 2 — радиоактивность

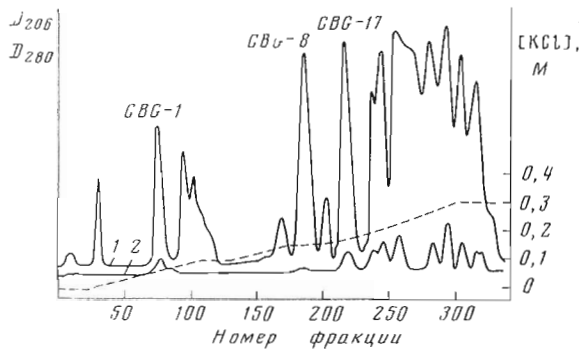


Рис. 2. Хроматография фракции I на колонке (1,6×12 см) с QAE-сефадексом А-25, уравновешенным буфером 0,02 М трис-НСl (рН 8,1) с 6 М мочевиной, в градиенте концентрации КСl. Скорость элюирования 10 мл/ч, объем фракций 10 мл. 1 — D_{206} , 2 — D_{280}

тиол-активированной сефарозы, подробное описание которой будет опубликовано в отдельном сообщении.

Для характеристики пептидов бромцианового расщепления G-фактора были определены их N-концевые аминокислоты, а также аминокислотный состав (табл. 2). Определение аминокислотных последовательностей твердофазным автоматическим методом Эдмана на исходных пептидах дало хорошие результаты при исследовании первичной структуры пептидов СВG-8, СВG-9, СВG-10, СВG-12, СВG-14, СВG-17 (табл. 3). Использование автоматического метода Эдмана в случае пептида СВG-8 позволило установить последовательность 25 аминокислотных остатков. Для установления строения С-концевой части пептида СВG-8 он был подвергнут триптическому гидролизу. После разделения смеси триптических пептидов на колонке с сефадексом G-25 (рис. 6) был выделен пептид СВG-8-Т4, состоящий из 26 аминокислотных остатков (табл. 4) и охватывающий всю С-концевую часть пептида СВG-8. При ограниченном кислотном гидролизе СВG-8-Т4 была получена смесь коротких пептидов, которая была разделена в тонком слое целлюлозы (рис. 7); их аминокислотная последовательность приведена в табл. 4. Данные по ограниченному кислотному гидролизу вместе с результатами определения аминокислотной последовательности пептидов СВG-8-Т4 и СВG-8 позволили установить последовательность 35 аминокислотных остатков в пептиде СВG-8 (табл. 3). По данным аминокислотного анализа (табл. 2), пептид СВG-8

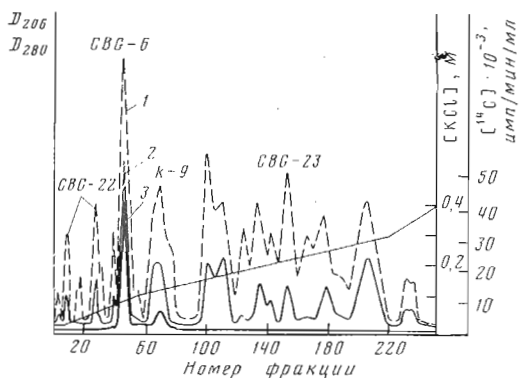


Рис. 3. Разделение фракции II на колонке (1,5×20 см) с QAE-сефадексом А-25, уравновешенным буфером 0,02 М трис-НСl (рН 8,2) с 6 М мочевиной; скорость элюирования 9 мл/ч, объем фракций 3 мл. 1 — D_{206} , 2 — D_{280} , 3 — радиоактивность

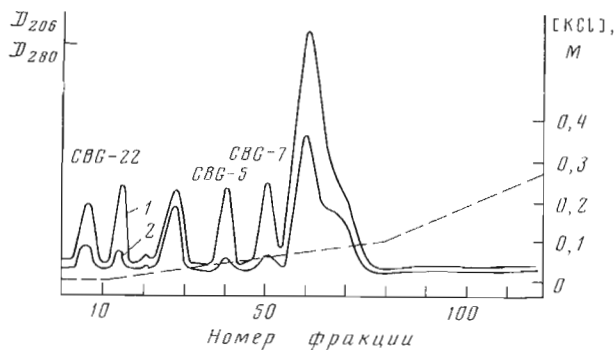


Рис. 4. Хроматография фракции III на колонке (1,0×10 см) с QAE-сефадексом А-25, уравновешенным буфером 0,02 М трис-НСl (рН 8,4) с 6 М мочевиной, в градиенте концентрации КСl. Скорость элюирования 10 мл/ч, объем фракций 10 мл. 1 — D_{206} , 2 — D_{280}

содержит 4 остатка глутаминовой кислоты. Гидролиз пептида СВГ-8 глутаминовой протеиназой позволили получить пептид СВГ-8-SP2 (табл. 4), объединяющий пептиды СВГ-8-Т4-А3 и СВГ-8-Т4-А4. Структура пептида СВГ-8-SP2 была установлена твердофазным автоматическим методом Эдмана на смеси пептидов, полученных после гидролиза СВГ-8 глутаминовой протеиназой. В результате была установлена первичная структура пептида СВГ-8 (табл. 3).

N-Концевой анализ пептидов СВГ-9 и СВГ-10 позволил установить последовательности 22 аминокислотных остатков в каждом пептиде (табл. 3). Для подтверждения этих данных и проверки расположения некоторых аминокислот нами был проведен гидролиз пептидов СВГ-9 и СВГ-10 глутаминовой протеиназой. Смеси пептидов были разделены в тонком слое целлюлозы в стандартных условиях (см. подпись к рис. 7). Аминокислотные последовательности выделенных пептидов СВГ-9-SP1—СВГ-9-SP3 и СВГ-10-SP1—СВГ-10-SP6 были установлены методом Эдмана в дансильной модификации (табл. 5 и 6). При определении структуры пептидов СВГ-9-SP1 (табл. 5) и СВГ-10-SP3 (табл. 6) методом Эдмана не удалось идентифицировать аминокислотные остатки в пятом и первом положениях соответственно. Как оказалось при проверке на реакцию Эрлиха, оба эти пептида содержат остатки триптофана. Для подтверждения этого пептиды СВГ-9 и СВГ-10 были расщеплены BNPS-скатолом (3-бром-2-(*o*-нитрофенил)сульфенилскатол), из смеси были выделены пептиды СВГ-9-N1, СВГ-9-N2 (табл. 5) и СВГ-10-N1, СВГ-10-N2 (табл. 6). Исследование структуры пептидов, полученных после гидролиза пептидов СВГ-9 и СВГ-10 глутаминовой протеиназой и расщепления

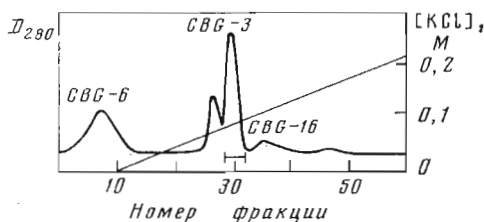


Рис. 5

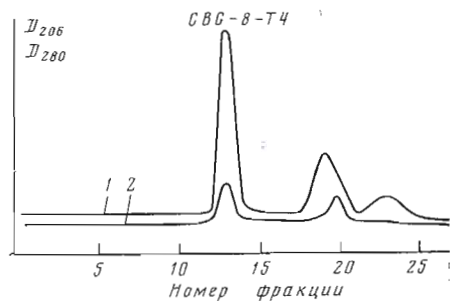


Рис. 6

Рис. 5. Рехроматография фракции К-9 (рис. 3) на колонке (1,0×10 см) с QAE-сефадексом А-25 в буфере 20 мМ трис-НСl (рН 8,3), содержащем 6 М мочевины, в градиенте 0–0,2 М КСl (по 150 мл). Скорость элюирования 10 мл/ч, объем фракций 6 мл

Рис. 6. Гель-фильтрация продуктов триптического гидролиза пептида СВГ-8 на колонке (1,0×100 см) с сефадексом G-25, уравновешенным буфером 0,1 М NH_4HCO_3 , рН 8,1. Скорость элюирования 2 мл/ч, объем фракций 2 мл. 1 – D_{206} , 2 – D_{280}

BNPS-скатолом, позволило установить первичную структуру пептидов СВГ-9 и СВГ-10 (табл. 3).

Первичная структура пептида СВГ-14 была установлена с использованием только автоматического метода Эдмана. Сначала была определена аминокислотная последовательность первых 15 аминокислотных остатков. По данным аминокислотного анализа, пептид содержит три остатка лизина. После триптического гидролиза структура С-концевой части пептида СВГ-14 была установлена твердофазным автоматическим методом Эдмана без предварительного разделения смеси пептидов с использованием гомосеринлактонового метода присоединения С-концевого пептида к нерастворимой матрице. Для подтверждения полученных данных пептид СВГ-14 гидролизовали термолизином, N-концевые последовательности термолитических пептидов определяли методом Эдмана (в дансильной модификации).

При выделении пептида СВГ-15 была получена фракция К-11-4 (рис. 8), содержащая С-концевую часть пептида СВГ-15. Этот фрагмент образовался в результате частичного расщепления пептида СВГ-15 по связи $-\text{Asp}^{11}-\text{Pro}^{12}$. Поскольку установить полную аминокислотную последовательность С-концевого фрагмента пептида СВГ-15 (выделенного из фракции К-11-4) не удалось, пептид СВГ-15 был подвергнут триптическому гидролизу. Продукты триптического гидролиза были разделены в тонком слое целлюлозы. Аминокислотная последовательность выделенных пептидов была установлена методом Эдмана в дансильной модификации (табл. 7). Исследование структуры пептида из фракции К-11-4 позволило объединить триптические пептиды СВГ-15-Т2 и СВГ-15-Т3 и завершить работу по установлению аминокислотной последовательности пептида СВГ-15.

Пептид СВГ-23 является С-концевым пептидом молекулы белка, так как, по данным аминокислотного анализа, он не содержит остатка гомосерина (табл. 2). В результате исследования продуктов, полученных при гидролизе пептида СВГ-23 глутаминовой протеиназой, был выделен С-концевой пептид и установлена его структура: $\text{Ala}-\text{Arg}-\text{Gly}-\text{Lys}$. Сравнение аминокислотной последовательности пептида СВГ-23 со структурой соответствующего пептида СВ-7, полученного при бромциановом расщеплении С-концевого фрагмента T_5 [5], позволило сделать вывод, что при ограниченном триптическом гидролизе G-фактора в С-концевой части молекулы белка отщепляется дипептид $\text{Gly}-\text{Lys}$.

Структура пептида СВГ-16 была установлена методом Эдмана (в дансильной модификации).

Таким образом, в результате исследования пептидов, полученных при расщеплении G-фактора бромцианом (табл. 1), была установлена полная аминокислотная последовательность пептидов СВГ-7, СВГ-8, СВГ-9,

Аминокислотный состав пептидов бромцианового расщепления G-фактора, входящих в состав фрагмента T₄

Аминокислота	СВГ-6	СВГ-7	СВГ-8	СВГ-9	СВГ-10	СВГ-11	СВГ-12	СВГ-13	СВГ-14	СВГ-15	СВГ-16	СВГ-17	СВГ-23	T ₄
Cys (Cm)	0,8(4)					** (1)	** (1)	** (2)	4,0(1)	3,3(3)	2,0(2)	4,3(4)	1,9(2)	** (4)
Asp	2,0(2)	1,0(1)	4,0(4)	6,1(6)	2,2(2)	3,3(3)	12,2(12)	6,3(6)	1,0(1)	2,3(2)		5,3(4)		41,2(42)
Thr	1,1(1)		2,1(2)	1,1(1)		2,0(2)	6,3(4)	2,4(2)	1,0(1)	2,2(2)		2,1(2)		13,1(14)
Ser	1,0(1)	** (1)			2,2(2)	1,3(1)	4,4(6)		1,0(1)	2,2(2)		0,8(1)	1,0(1)	11,3(12)
Hse	** (1)	** (1)	** (1)	** (1)	** (1)	** (1)	** (1)	** (1)	** (1)	** (1)	** (1)	** (1)		10,0(11)
Glu	4,0(4)	4,3(4)	4,3(4)	2,9(3)	7,3(7)	8,4(8)	4,2(4)	4,3(4)	5,3(5)	3,8(4)	1,3(1)	7,9(8)	4,3(4)	41,0(41)
Pro	2,1(2)	1,8(2)	1,8(2)	1,0(1)			6,3(6)	1,7(2)	2,9(3)	1,0(1)		1,3(1)	1,2(1)	16,1(16)
Gly	2,4(2)	4,3(4)	4,3(4)	1,2(1)			4,1(4)	3,3(3)	2,9(3)	3,3(3)	1,2(1)	6,0(6)	1,3(1)	24,1(21)
Ala	3,2(3)	4,2(4)	4,2(4)	3,2(3)	4,3(4)	5,3(5)	9,3(9)	6,4(6)	2,4(2)	3,4(3)		3,3(3)	3,9(4)	37,0(37)
Val	5,7(6)	5,9(6)	5,9(6)	1,2(1)	1,0(1)	3,4(3)	9,8(10)	2,3(2)	2,2(2)	1,2(1)	1,2(1)	7,0(7)	2,4(2)	30,5(29)
Ile	1,0(1)	2,2(2)	2,2(2)	2,1(2)	1,1(1)	2,7(3)	5,3(5)	4,7(5)	2,2(2)	2,1(2)	1,9(2)	2,3(2)	1,1(1)	25,1(25)
Leu	1,8(2)	4,7(5)	4,7(5)	3,2(3)	3,2(3)	5,2(5)	6,3(6)	3,2(3)	2,2(2)	3,3(3)	1,8(2)	1,2(1)	1,2(1)	28,0(28)
Tyr	1,0(1)		1,9(2)	0,8(1)		0,7(1)	1,7(2)		0,9(1)	1,1(1)		1,6(2)	1,1(1)	6,1(5)
Phe	1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)	1,1(1)	1,1(1)	5,8(6)	0,7(1)		1,1(1)	0,9(1)	1,4(1)	0,8(1)	13,0(13)
His	3,0(3)		2,8(3)	1,1(1)	1,1(1)	3,8(4)	0,9(1)	3,0(3)	2,8(3)	1,2(1)		1,8(2)	1,8(2)	5,1(5)
Lys	***(1)		***(1)	***(1)	***(1)	1,8(2)	3,2(3)	3,0(3)		4,2(1)		4,8(5)	1,8(2)	25,2(22)
Trp	2,0(2)	1,1(1)	1,2(1)	***(1)	***(1)	1,8(2)	4,8(5)	2,8(3)		***(1)	1,1(1)	3,7(4)	1,0(1)	***(3)
Arg		3	41	23	23	44	85	43	22	30	12	49	22	16,0(17)
Всего остатков	33	3	41	23	23	44	85	43	22	30	12	49	22	344
N-концевая аминокислота	Val	Asp	Gly	Lys	Val	Glu	Leu	His	Glu	Gly	Gly	Lys	Glu	Gln

* Аминокислотный состав остальных бромциановых пептидов G-фактора см. в работах [3, 4].

** Количественно не определяется.

*** Не определяется.

Пептиды бромцианового расщепления G-фактора, входящие в состав фрагмента T₄, и пептид CBG-23

Пептид	Аминокислотная последовательность
CBG-7	Asp-Arg-Met
CBG-8	Gly-Ala-Asn-Phe-Leu-Lys-Val-Val-Asn-Gln-Ile-Iys-Thr-Arg-Leu-Gly-Ala-Asn- 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 Pro-Val-Pro-Leu-Gln-Leu-Ala-Ile-Gly-Ala-Glu-Glu-His-Phe-Thr-Gly-Val- 36 37 38 39 40 41 Val-Asp-Leu-Val-Lys-Met
CBG-9	Lys-Ala-Ile-Asn-Trp-Asn-Asp-Ala-Asp-Gln-Gly-Val-Thr-Phe-Glu-Tyr-Glu- Asp-Ile-Pro-Ala-Asp-Met
CBG-10	Val-Glu-Leu-Ala-Asn-Glu-Trp-His-Gln-Asn-Leu-Ile-Glu-Ser-Ala-Ala-Glu-Ala- Ser-Glu-Glu-Leu-Met
CBG-11	Glu-Lys-Tyr-Leu-Gly-Gly-Glu-Glu-(Cys ₁ , Asp ₃ , Thr ₂ , Ser ₁ , Glu ₄ , Gly ₃ , Ala ₅ , Val ₃ , Ile ₃ , Leu ₄ , Phe ₁ , Lys ₃ , Arg ₂ , Gln, Met)
CBG-12	Leu-Asp-Ala-Val-Ile-Asp-Tyr-Leu-Pro-Ser-Pro-Val-Asp-Val-Pro-Ala-Ile- Asp-(Cys ₁ , Asp ₃ , Thr ₄ , Ser ₅ , Glu ₃ , Pro ₃ , Gly ₄ , Ala ₇ , Val ₇ , Ile ₃ , Leu ₄ , Tyr ₁ , Phe ₆ , His ₁ , Lys ₃ , Arg ₃ , Gln, Met)
CBG-13	His-Ala-Asn-Lys-Arg-Glu-Glu-(Cys ₂ , Asp ₅ , Thr ₂ , Glu ₂ , Pro ₂ , Gly ₃ , Ala ₅ , Val ₂ , Ile ₅ , Leu ₃ , Lys ₂ , Arg ₂ , Met)
CBG-14	Glu-Phe-Pro-Glu-Pro-Val-Ile-Ser-Ile-Ala-Val-Glu-Pro-Lys-Thr-Lys-Ala-Asp- Gln-Glu-Lys-Met
CBG-15	Gly-Leu-Ala-Leu-Gly-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Asp-Pro-Ser-Phe-Arg-Val-Trp- Thr-Asp-Glu-Glu-Ser-Asn-Gln-Thr-Ile-Ile-Ala-Gly-Met
CBG-16	Gly-Glu-Leu-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Val-Asp-Arg-Met
CBG-17	Lys-Arg-Glu-Phe-Asn-Val-Glu-Ala-Asn-Val-Gly-Lys-Pro-Gln-(Asp ₂ , Thr ₂ , Ser ₁ , Glu ₅ , Gly ₅ , Ala ₂ , Val ₅ , Met ₁ , Ile ₂ , Tyr ₂ , His ₂ , Lys ₃ , Arg ₃)
CBG-23	Glu-Phe-Leu-Lys-Tyr-Asp-Glu-Ala-Pro-Ser-Asn-Val-Ala-Gln-Ala-Val-Ile-Glu- Ala-Arg-Gly-Lys

Примечание. — определение аминокислотной последовательности методом Эдмана в данной модификации; → — автоматическим методом Эдмана.

CBG-10, CBG-14, CBG-15 и CBG-16 (табл. 3), входящих в состав фрагмента T₄, а также пептида CBG-3, объединяющего триптические фрагменты T₆ и T₇, и пептида CBG-6, объединяющего фрагменты T₇ и T₈ [4]. Кроме того, была установлена частичная структура пептида CBG-17, позволившая объединить фрагменты T₄ и T₅. Исследование структуры пептида CBG-23 показало, что он является С-концевым в полипептидной цепи G-фактора. Из данных, полученных при исследовании структуры этих пептидов, следует, что фрагменты ограниченного триптического гидролиза G-фактора (T₆, T₇, T₈ и T₅) расположены непосредственно друг за другом в полипептидной цепи белка и между ними нет никаких «вставок», только в С-концевой части белка при ограниченном трипсинолизе происходит отщепление дипептида Gly-Lys.

Экспериментальная часть

В работе использованы сефадексы G-15, G-25, G-100, QAE A-25, SP C-25 (Pharmacia, Швеция), I-[¹⁴C]CH₂CONH₂ (Amersham, Англия), катионообменная смола Chromobeads Type P (Technicon, Ирландия), стафилококковая глутаминовая протеиназа (Miles Lab., Англия), трипсин (Worthington, США), бромциан, термоллизин (Serva, ФРГ), BNPS-скатол (Pierce, США), пластинки с тонким слоем целлюлозы (Merck, ФРГ),

Пептиды, полученные после гидролиза пептида CBG-8 глутаминовой протеиназой (CBG-8-SP2) и трипсином (CBG-8-T4), и также при ограниченном кислотном гидролизе CBG-8-T4 (CBG-8-T4-A)

Пептид	Аминокислотная последовательность
CBG-8-SP2	His-Phe-Thr-Gly-Val-Val-Asp-Leu-Val-Lys-Met → → → → → → → → → →
CBG-8-T4	Leu-Gly-Ala-Asn-Pro-Val-Pro-Leu-Gln-Leu-Ala-Ile-Gly-Ala-Glu-Glu- His-Phe-Thr-Gly-Val-Val-Asp-Leu-Val-Lys-Met → → → → →
CBG-8-T4-A1	Leu-Gly-Ala-Asn-Pro-Val-Pro-Leu → → → → → → →
CBG-8-T4-A2	Gln-Leu-Ala-Ile-Gly-Ala → → → → →
CBG-8-T4-A3	Glu-Glu-His-Phe-Thr-Gly-Val → → → → → →
CBG-8-T4-A4	Val-Asp-Leu-Val-Lys-Met → → → → →

Таблица 5

Пептиды, полученные после гидролиза пептида CBG-9 глутаминовой протеиназой (CBG-9-SP) и после расщепления BNPS-скатолом (CBG-9-N)

Пептид	Аминокислотная последовательность
CBG-9-SP1	Lys-Ala-Ile-Asn-Trp-Asn-Asp-Ala-Asp-Gln-Gly-Val-Thr-Phe-Glu → → → → → → → → → →
CBG-9-SP2	Asp-Ile-Pro-Ala-Asp-Met → → → → →
CBG-9-SP3	Tyr-Glu-Asp-Ile-Pro-Ala-Asp-Met → → → → → → →
CBG-9-N1	Lys-Ala-Ile-Asn-Trp → → → →
CBG-9-N2	Asn-Asp-Ala-Asp-Gln-Gly-Val-Thr-Phe-Glu-Tyr-Glu-Asp-Ile-Pro-Ala- Asp-Met → → → → → → → → → →

Таблица 6

Пептиды, полученные после гидролиза пептида CBG-10 глутаминовой протеиназой (CBG-10-SP) и после расщепления BNPS-скатолом (CBG-10-N)

Пептид	Аминокислотная последовательность
CBG-10-SP1	Val-Glu → →
CBG-10-SP2	Leu-Ala-Asn-Glu → → → →
CBG-10-SP3	Trp-His-Gln-Asn-Leu-Ile-Glu → → → → → →
CBG-10-SP4	Ser-Ala-Ala-Glu → → → →
CBG-10-SP5	Ala-Ser-Glu-Glu → → → →
CBG-10-SP6	Leu-Met → →
CBG-10-N1	Val-Glu-Leu-Ala-Asn-Glu-Trp → → → → → →
CBG-10-N2	His-Gln-Asn-Leu-Ile-Glu-Ser-Ala-Ala-Glu-Ala-Ser-Glu-Glu- Leu-Met → → → → → → → → → →

реактивы для автоматического метода Эдмана и фенилтиогидантоины аминокислот (Beckman, США), полиамидные пластинки (BDH, Англия), β-меркаптоэтанол (Serva, ФРГ). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

G-фактор получен по методу, описанному нами ранее [2].

Определение N- и C-концевых аминокислот проводили как описано в работе [4].

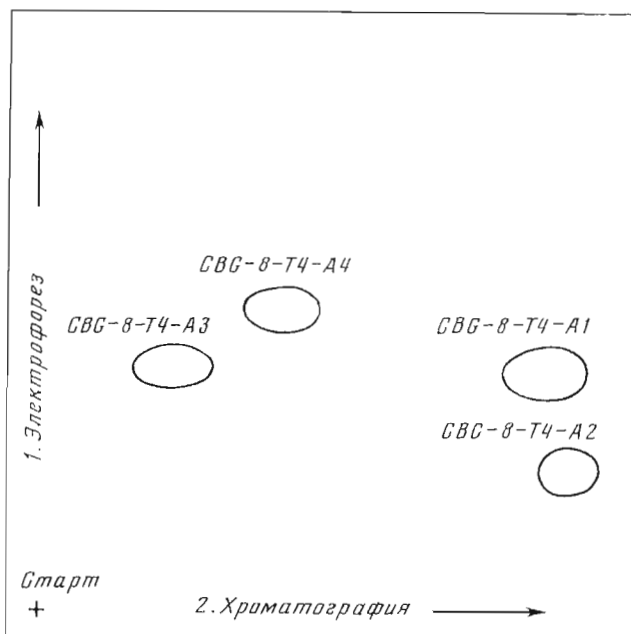


Рис. 7. Разделение пептидов, полученных при ограниченном кислотном гидролизе пептида СВГ-8-Т4 на пластинке (20×20 см) с тонким слоем целлюлозы. Электрофорез 800 В, 60 мин в буфере пиридин – уксусная кислота – вода (10:100:890), рН 3,6; хроматографии в системе *n*-бутанол – пиридин – уксусная кислота – вода (1:1:1:1), рН 5,4

Аминокислотный анализ осуществляли на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США). Гидролиз проводили 24 и 72 ч 5,6 н. HCl в вакуумированных запаянных ампулах при 105–110° С. Образец растворяли в 20 мкл HCl. Цистеин определяли в виде карбоксиметилцистеина, количество валина и изолейцина определяли по результатам 72-часового гидролиза. Наличие остатков триптофана в пептидах устанавливали, проявляя аналитические пептидные карты реагентом Эрлиха [6].

Автоматическое определение аминокислотной последовательности проводили на твердофазном секвенаторе модели APS-240 (Rank Hilger, Англия). Ковалентное связывание пептидов с носителем осуществляли через карбоксильную группу остатка гомосерина по методу Ларсена [7] или *n*-фенилеидиозацианатным методом [8] через ϵ -аминогруппу лизина. Идентификацию отщепленных фенилтиогидантоинов аминокислот проводили ТСХ на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Fluka, Швейцария) и высокоэффективной жидкостной хроматографией на колонках Ultrasphere RP-18, 5 мкм (Altex, США) или Separon RP-18 5 мкм (ЧССР).

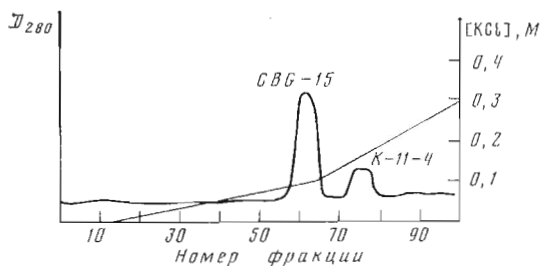


Рис. 8. Рехроматография фракции K-11 (рис. 3) на колонке (1,0×10 см) с QAE-сефадексом А-25, уравновешенным буфером 0,02 М трис-HCl (рН 8,2) с 6 М мочевиной, в градиенте концентрации KCl. Скорость элюирования 10 мл/ч, объем фракций 5 мл

Пептиды, полученные после триптического гидролиза пептида
CBG-15 (CBG-15-T)

Пептид	Аминокислотная последовательность
CBG-15-T1	Gly-Leu-Ala-Leu-Gly-Arg
CBG-15-T2	Leu-Ala-Lys-Glu-Asp-Pro-Ser-Phe-Arg
CBG-15-T3	Val-Trp-Thr-Asp-Glu-Gln-Ser-Asn-Gln-Thr-Ile-Ile-Ala-Gly-Met

Аминокислотную последовательность пептидов устанавливали ручным вариантом метода Эдмана в модификации Грея [9, 10] с некоторыми изменениями, описанными в работе [11].

Идентификация амидов глутаминовой и аспарагиновой аминокислот. Этилацетатные экстракты после каждого цикла дегградации высушивали в токе азота, растворяли в 200 мкл 1 н. HCl и инкубировали 5 мин при 80° С. Фенилтиогидантоины аминокислот экстрагировали этилацетатом (3×200 мкл). Экстракты высушивали в токе азота и растворяли в 20 мкл этилацетата для нанесения на пластинку с силикагелем (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, ФРГ) и последовательно хроматографировали в трех системах растворителей: хлороформ—этанол, 20:0,3; хлороформ—метанол, 9:1; хлороформ—уксусная кислота, 8:2.

После высушивания пластинки фенилтиогидантоины глутамина, аспарагина, глутаминовой и аспарагиновой аминокислот обнаруживали в УФ-свете, а также после опрыскивания пластинки 1% раствором нингидрина в смеси абсолютного этанола с коллидином (95:5) и выдерживания в течение 5 мин при 110° С [12]. Для контроля на пластинку наносили стандарты фенилтиогидантоинов соответствующих аминокислот.

Расщепление G-фактора бромцианом. К образцу карбоксиметилированного G-фактора [2] (2 мкмоль), растворенному в 10 мл 70% муравьиной кислоты, добавляли свежезоогнаный бромциан (5:1 по весу) и оставляли в темноте при 20° С на 24 ч. Затем смесь разбавляли водой в 10 раз (до 100 мл) и лиофильно высушивали.

Малеинирование продуктов бромцианового расщепления G-фактора и удаление малеинильной защитной группы после разделения пептидов бромцианового расщепления G-фактора осуществляли методом, описанным ранее [4].

Триптический гидролиз пептидов бромцианового расщепления G-фактора: CBG-6, CBG-8, CBG-11, CBG-12, CBG-13, CBG-14, CBG-15 и CBG-17. 100 нмоль пептида в 300—400 мкл 0,1 М NH₄HCO₃, pH 8,1, инкубировали с трипсином (соотношение фермент—субстрат 1:50) в течение 12 ч (37° С). По окончании реакции гидролизат лиофильно высушивали.

Гидролиз глутаминовой протеиназой пептидов CBG-8, CBG-9, CBG-10, CBG-11, CBG-16, CBG-17 и CBG-23. Пептиды (100 нм) в 0,1 М NH₄HCO₃-буфере (~300 мкл), pH 8,1, инкубировали в течение 12 ч с глутаминовой протеиназой при соотношении фермент—субстрат 1:50 (37° С). Затем гидролизат высушивали и разделяли методом пептидных карт на пластинках с тонким слоем целлюлозы.

Расщепление BNPS-скатолом пептидов CBG-6, CBG-9 и CBG-10 по остаткам триптофана было проведено как описано в работе [13].

Термолитический гидролиз пептида CBG-14. К раствору 100 нмоль пептида CBG-14 в 300 мкл 0,1 М NH₄HCO₃, pH 8,1, добавляли термолитин при соотношении фермент—субстрат 1:50 и инкубировали при 37° С в течение 2 ч. Термолитический гидролизат разделяли методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25.

Гидролиз глотрипсином пептида CBG-11 проводили как описано в сообщении [1].

Авторы выражают благодарность руководителю работы академику Ю. А. Овчинникову за постоянную помощь и ценные замечания при обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алахов Ю. Б., Винокуров Л. М., Довгас Н. В., Мотуз Л. П. Биорган. химия, 1983, т. 9, № 3, с. 293–303.
2. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М., Овчинников Ю. А. Биорган. химия, 1977, т. 3, с. 1333–1345.
3. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М. Биорган. химия, 1978, т. 4, с. 1301–1313.
4. Мотуз Л. П., Бундулис Ю. П., Алахов Ю. Б. Биорган. химия, 1979, т. 5, с. 814–827.
5. Alakhov Yu. B., Dviggas N. V., Moluz L. P., Vinokurov L. M., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1981, v. 126, p. 183–186.
6. Smith I. Nature, 1953, v. 171, p. 43.
7. Laursen R. A., Horn M. J., Bonner A. G. FEBS Lett., 1973, v. 36, p. 285–288.
8. Laursen R. A., Horn M. J., Bonner A. G. FEBS Lett., 1972, v. 21, p. 67–70.
9. Gray W. R., Hartley B. S. Biochem. J., 1963, v. 89, p. 379–380.
10. Bruton C. J., Hartley B. S. J. Mol. Biol., 1970, v. 52, p. 165–178.
11. Алахов Ю. Б., Довгас Н. В., Винокуров Л. М., Вельмога П. С., Овчинников Ю. А. Биорган. химия, 1978, т. 4, с. 879–893.
12. Roseau G., Paniel P. J. Chromatogr., 1969, v. 44, p. 392–395.
13. Fontana A. In: Methods in Enzymology / Ed. Hirs C. H. W. New York – London: Acad. Press, 1972, v. XXV, p. 419–423.

Поступила в редакцию
19.VII.1982.

PRIMARY STRUCTURE OF THE ELONGATION FACTOR G FROM *ESCHERICHIA COLI*. VI. STRUCTURE OF PEPTIDES OF CYANOGEN BROMIDE CLEAVAGE OF THE G-FACTOR MOLECULE

ALAKHOV Yu. B., BUNDULE M. A., BUNDULIS Yu. P.,
VINOKUROV L. M., KOZLOV V. P., MOTUZ L. P.

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

Peptides obtained as a result of cyanogen bromide cleavage of the G-factor have been studied. All 12 peptides embracing the whole structure of fragment T₄ have been isolated. For their amino acid sequence determination, cyanogen bromide peptides have been further cleaved with trypsin, chymotrypsin, thermolysin, staphylococcal glutamic protease and BNPS-skatole. The complete primary structure of 9 from 12 cyanogen bromide peptides has been determined.