



УДК 577.152.361.3:577.112.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА β -СУБЪЕДИНИЦЫ Na^+ , K^+ -АТФ-азы
ПОЧЕК СВИНЬИI. АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗА
ИММОБИЛИЗОВАННОГО БЕЛКА

*Арзамасова Н. М., Гезондян Н. М., Чертова Е. Н.,
Назимов И. В., Гаврильева Е. Е., Алдалова Н. А.,
Модянов Н. Н.*

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

Проведен исчерпывающий триптический гидролиз β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы, иммобилизованной на тиолсодержащем носителе. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии выделено и охарактеризовано более 25 пептидов, составляющих в сумме около 90% аминокислотной последовательности полипептидной цепи белка. Полученная информация послужила основой для синтеза специфических гибридизационных олигонуклеотидных зондов. На основании структурного анализа установлены места присоединения трех углеводных цепей в молекуле β -субъединицы.

В рамках структурно-функционального исследования Na^+ , K^+ -АТФ-азы почек свиньи (КФ 3.6.1.3) установлена нуклеотидная последовательность кДНК, соответствующая транскрибируемой области мРНК, и определена первичная структура обеих составляющих ферментативный комплекс субъединиц: каталитической α -субъединицы (M 112 кДа) [1] и гликопротеина β -субъединицы (M белковой части 35 кДа), функциональная роль которой до сих пор неизвестна [2].

Основная цель исследования заключалась во фрагментации гликозилированной β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы и получении структурной информации для синтеза специфических гибридизационных олигонуклеотидных зондов, а также для контроля рамки считывания нуклеотидной последовательности кДНК. В ходе исследования были выделены все гликозилированные пептиды и, таким образом, установлены участки полипептидной цепи β -субъединицы, содержащие углеводные цепи.

Ранее для получения необходимых данных по структуре пептидов каталитической α -субъединицы был осуществлен ее избирательный триптический гидролиз в составе мембраносвязанной Na^+ , K^+ -АТФ-азы в условиях полного сохранения интактности гликопротеина [3]. Осуществить селективное протеолитическое расщепление гликопротеина в нативном ферментном комплексе не удалось: β -субъединица оказалась весьма устойчивой к действию как трипсина, так и других протеиназ (химотрипсин, термолизина, стафилококковой протеиназы). Поэтому для получения необходимой структурной информации β -субъединица была выделена в индивидуальном состоянии.

Na^+ , K^+ -АТФ-азу выделяли из мозгового слоя почек свиньи по модифицированному методу Йоргенсена с центрифугированием в ступенчатом градиенте плотности глицерина [4].

Использование для разделения субъединиц фермента хроматографии на гидроксипатите оказалось малоэффективным: в описанных условиях [4] значительная часть белка элюировалась в виде агрегатов. Полной дезагрегации удавалось достичь увеличением концентрации детергента до весового соотношения детергент — белок 50 : 1. Однако при этом снижа-

Сокращения: SDS — додецилсульфат натрия, Dns — 1-диметиламиноафталин-5-сульфонилхлорид, Pth — фенилтиогидантоин.

лись хроматографические характеристики смолы, а длительность процесса разделения (36–48 ч) приводила к распаду лабильной α -субъединицы на фрагменты, ряд из которых имел молекулярную массу, близкую к молекулярной массе β -субъединицы, что осложняло дальнейшую очистку.

Для получения индивидуальных субъединиц фермента весьма перспективным оказалось применение метода высокоэффективной гель-хроматографии на колонке Ultro Pac TSK-G 3000 SWG (LKB, Швеция) (рис. 1). Возможность использования детергента в высокой концентрации (5%), обеспечивающей полную диссоциацию комплекса, и значительное сокращение времени процесса (1 ч) позволило количественно разделить субъединицы с сохранением целостности их полипептидных цепей. В случае необходимости (присутствие по данным электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) низкомолекулярных примесей) проводилась дополнительная очистка препаратов обогащенной β -субъединицы рехроматографией на колонке Ultro Pac TSK-G 2000 SWG (LKB, Швеция). Гомогенность полученных таким образом образцов белка контролировалась электрофорезом в ПААГ и определением N-концевого аминокислотного остатка.

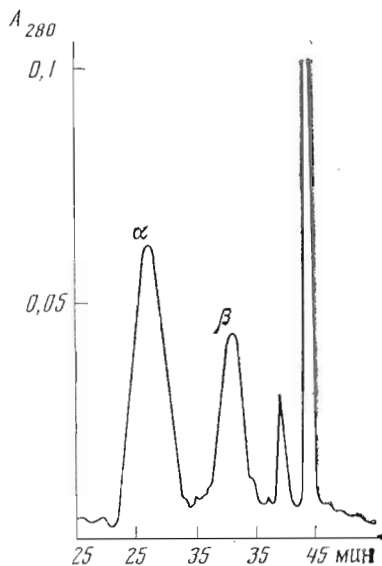


Рис. 1. Разделение субъединиц Na^+ , K^+ -АТФ-азы методом высокоэффективной гель-хроматографии на колонке (21,5×600 мм) Ultro Pac TSK-G 3000 SWG в 100 мМ трис- H_2SO_4 -буферном растворе, pH 7,5, содержащем 2 мМ EDTA- Na_2 , 2 мМ дитиотреит, 10^{-4} М фенилметилсульфонилфторид, 0,02% азид натрия и 5% SDS. Скорость элюции 3,2 мл/мин

Необходимой стадией последующего анализа было освобождение белка от связанного детергента, который препятствовал исчерпывающему ферментативному гидролизу и последующему разделению пептидов. Однако полное удаление детергента вызывало резкое понижение растворимости белка в обычных буферных системах, применяемых для протеолиза.

В нашей лаборатории при установлении структуры родопсина и бактериородопсина была показана принципиальная возможность количественной иммобилизации гидрофобных мембранных белков с

помощью реакции тиол-дисульфидного обмена на жестком носителе (тиол-стекло) и последующего эффективного ферментативного гидролиза связанного белка [5]. Ковалентное присоединение белка делает возможным полное освобождение от детергента, поскольку устойчивость нерастворимого носителя к кислотам и органическим растворителям позволяет осуществлять эффективную отмывку конъюгата. Белок становится более доступным к действию протеиназ, по-видимому, как за счет меньшей склонности ковалентно связанного с носителем белка к агрегации, так и вследствие происходящих при иммобилизации конформационных изменений, благоприятствующих взаимодействию субстрата с ферментом. При этом получаемую пептидную смесь можно разделить на две группы: цистеинсодержащие пептиды, соединенные с носителем S-S-связью, и пептиды, переходящие в раствор. Это значительно упрощает разделение и очистку пептидов.

По данным аминокислотного анализа, молекула β -субъединицы содержит 7 остатков цистеина [2, 4] и, следовательно, может связываться ковалентно с тиолсодержащим носителем. Предварительно проводилось восстановление белка избытком β -меркаптоэтанола в денатурирующих условиях (5% SDS) с последующим удалением восстановителя гель-фильтрацией на колонке с биогеелем P-2 в условиях, позволяющих избежать окисления SH-групп и агрегации белка (pH 4,0; 1% SDS). Процесс

иммобилизации осуществлялся добавлением активированного тиол-стекла [5] к фракции элюата, содержащей β -субъединицу в атмосфере аргона. Во избежание механического повреждения носителя перемешивание реакционной массы осуществляли во вращающемся флаконе. Полная иммобилизация белка (по данным аминокислотного анализа) достигалась при 15-кратном молярном избытке носителя (по емкости) за 16 ч.

Молекула β -субъединицы содержит 30 остатков лизина и 15 остатков аргинина [2], поэтому для фрагментации полипептидной цепи было целесообразно использовать гидролиз трипсином. В серии аналитических экспериментов были найдены оптимальные условия исчерпывающего трипсинолиза: 0,1 М аммоний-бикарбонатный буфер (рН 8,2, буфер В), нагрузка фермента 10% (по массе), время гидролиза 20 ч.

По окончании гидролиза супернатант декантировали, а стекло, учитывая возможность неспецифической сорбции гидрофобных пептидов, последовательно промывали буферным раствором В, 98% муравьиной кислотой и водным метанолом. Практически все пептиды гидролизата, не содержащие остатков цистеина, были обнаружены лишь в буферном растворе В; по данным аминокислотного анализа, они составляли в сумме ~60% от исходного количества белка.

Цистеинсодержащие пептиды были переведены в раствор при обработке коньюгата 50-кратным молярным избытком β -меркаптоэтанола в буферном растворе В, содержащем 3 мМ EDTA·Na₂, в течение 15 ч при перемешивании в атмосфере аргона. После отделения буферного раствора декантацией стекло промывали как описано в «Экспериментальной части». Цистеинсодержащие пептиды, по данным аминокислотного анализа, содержались только в исходном буферном растворе. Для предотвращения окисления SH-групп пептиды карбоксиметилировали. Чтобы исключить традиционную стадию обессоливания пептидов перед их разделением, процесс карбоксиметилирования проводился в нестандартных условиях: 0,5 М аммоний-бикарбонатный буферный раствор, рН 8,5.

Для фракционирования смесей пептидов обеих групп применялась высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) на колонке с носителем Nucleosil C₁₈ с использованием градиента концентрации ацетонитрила в 10 мМ аммоний-ацетатном буферном растворе, рН 5,65.

Большая часть пептидов, не содержащих остатков цистеина, выходила в диапазоне концентраций ацетонитрила 0–35%. Для повышения эффективности разделения в этой области создавали пологий градиент (0,16% в 1 мин) (рис. 2а). В результате первичного разделения гидролизата была получена 21 объединенная фракция.

При разделении цистеинсодержащих пептидов с использованием ступенчатого градиента концентрации ацетонитрила образовалось семь объединенных фракций (рис. 2б). Большинство пептидов элюировалось в области концентраций ацетонитрила 18–45%, и лишь одна из фракций выходила с колонки при высокой концентрации ацетонитрила (70%).

Рехроматография объединенных фракций пептидов обеих групп осуществлялась на той же колонке в 0,1% растворе трифторуксусной кислоты соответствующими градиентами концентраций ацетонитрила. Фракция, полученная в процессе нанесения цистеинсодержащих пептидов (SH-0), перед рехроматографией предварительно обессоливалась.

Гомогенность всех выделенных пептидов контролировали определением N-концевых остатков и по данным аминокислотного анализа. Структуру пептидов устанавливали методом Эдмана с идентификацией аминокислот в виде дансильных производных. Дикарбоновые аминокислоты, их амиды и остатки триптофана определяли в виде фенилтиогидантоинов. Для ряда пептидов применяли автоматическую деградацию на секвенаторе. В некоторых случаях для определения C-концевых последовательностей использовались карбоксипептидазы А, В, Y.

В таблице приведена структура (полная или частичная) полученных в индивидуальном состоянии пептидов β -субъединицы. Всего из триптического гидролизата иммобилизованной на тиол-стекле β -субъединицы выделено и охарактеризовано более 25 пептидов, составляющих в сумме

Аминокислотная последовательность триплических пептидов β-субъединицы Na⁺, K⁺-АТФ-азы

Положение по гену *	Пептид	Аминокислотная последовательность **
5-12	II-3	Ala-Lys-Glu-Glu-Gly-Ser-Trp-Lys
14-20	XIV-2, XIV-3	<u>(Lys)-Phe-Ile-Trp-Asn</u> -Ser-Glu-Lys
22-26	V-4, VI-1	Glu-Phe-Leu-Gly-Arg
27-33	XI-1	Thr-Gly-Gly-Ser-Trp-Phe-Lys
27-70	SH-VII-1	Thr-Gly-Gly-Ser(Cys1, Asx1, Thr3, Ser1, Glx3, Pro1, Gly3, Ala1, Val2, Met1, Ile6, Leu5, Tyr3, Phe3, Trp1, Lys2, Arg1)
71-84	XII-1, XIII-4, XIV-1	Val-Ala-Pro-Pro-Gly-Leu-Thr-Gln-Ile-Pro-Gln-Ser-Gln-Lys
85-106	XVII-2, XVIII-1	Thr-Glu-Ile-Ser-Phe-Arg-Pro-Asn-Asp-Pro-Gln-Ser-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Val-Val-Ser-Ile-Val-Arg
107-110	II-1	Phe-Leu-Glu-Lys
113-117	II-4	Asp-Leu-Ala-Gln-Lys
113-133	SH-III-1	Asp-Leu-Ala-Gln-Lys-Asp-Asp(Cys1, Asx2, Ser1, Glx2, Pro1, Gly1, Val1, Met1, Ile1, Leu1, Phe1) Lys
148-133	SH-II-1	Phe-Arg
150-151	I-1	Asp-Asp-Met-Ile-Phe(Cys1, Asx2, Glx1, Pro1, Gly1, Val1, Ser1, Gly1, Leu1) Ser-Gly-Leu-Lys
150-169	SH-V-1	Phe-Arg-Leu-Glu-Trp-Leu-Gly-Asn(Cys1, Asx2, Ser1, Thr1, Glx1, Gly2, Leu1, Tyr2) Lys
152-169	SH-IV-1	Leu-Glu-Trp-Leu-Gly-Asn-Cys-Ser(Asx2, Thr1, Glx1, Gly2, Leu4, Tyr2) Lys
170-178	SH-I-1	Asp-Gly-Lys-Pro-Cys-Val-Ile-Ile-Lys
182-202	XI-2, XII-2, XIII-2	Val-Leu-Gly-Phe-Lys-Pro-Lys-Pro-Pro-Lys-Asn-Glu-Ser-Leu(Thr1, Glx1, Pro1, Val1, Met1, Tyr1) Lys
203-215	SH-V-2, SH-VI-1	Tyr-Asn-Pro-Tyr-Val-Leu-Pro-Val-His(Cys1, Thr1, Gly1) Lys
223-247	XVIII-2, XIX-1, XIX-2, XX-1, XXI-1	<u>Val-Gly-Thr-Met-Glu-Tyr-Phe-Gly-Leu-Gly-Gly</u> -Tyr-Pro-Gly-Phe-Pro-Leu-Gln-Tyr-Tyr-Pro-Tyr-Tyr-Gly-Lys
248-252	IV-1	Tyr-Tyr-Gly-Lys
253-257	IX-1, X-1	Leu-Leu-Gln-Pro-Lys
253-272	XV-4, XV-2, XV-3, XV-4, XVI-1, XVII-1	Tyr-Leu-Gln-Pro-Leu
273-276	SH-0	Tyr-Leu-Gln-Pro-Leu(Asx2, Thr3, Glx2, Ala1, Val1, Met2, Ile1, Leu1, Phe1) Arg
277-287	VII-1, VIII-1	Ile-Glu-Cys-Lys
288-293	III-1	Ala-Tyr-Gly-Glu-Asn-Ile-Gly-Tyr-Ser-Glu-Lys
290-293	II-2	Asp-Arg-Phe-Gln-Gly-Arg
294-297	III-2	Phe-Gln-Gly-Arg
298-302	III-3	Phe-Asp-Val-Lys Ile-Gln-Val-Lys-Ser

* [2].

** Точками отмечены гликозилированные аминокислотные остатки. В рамки взяты фрагменты, аминокислотная последовательность которых послужила основой для синтеза олигонуклеотидных зондов.

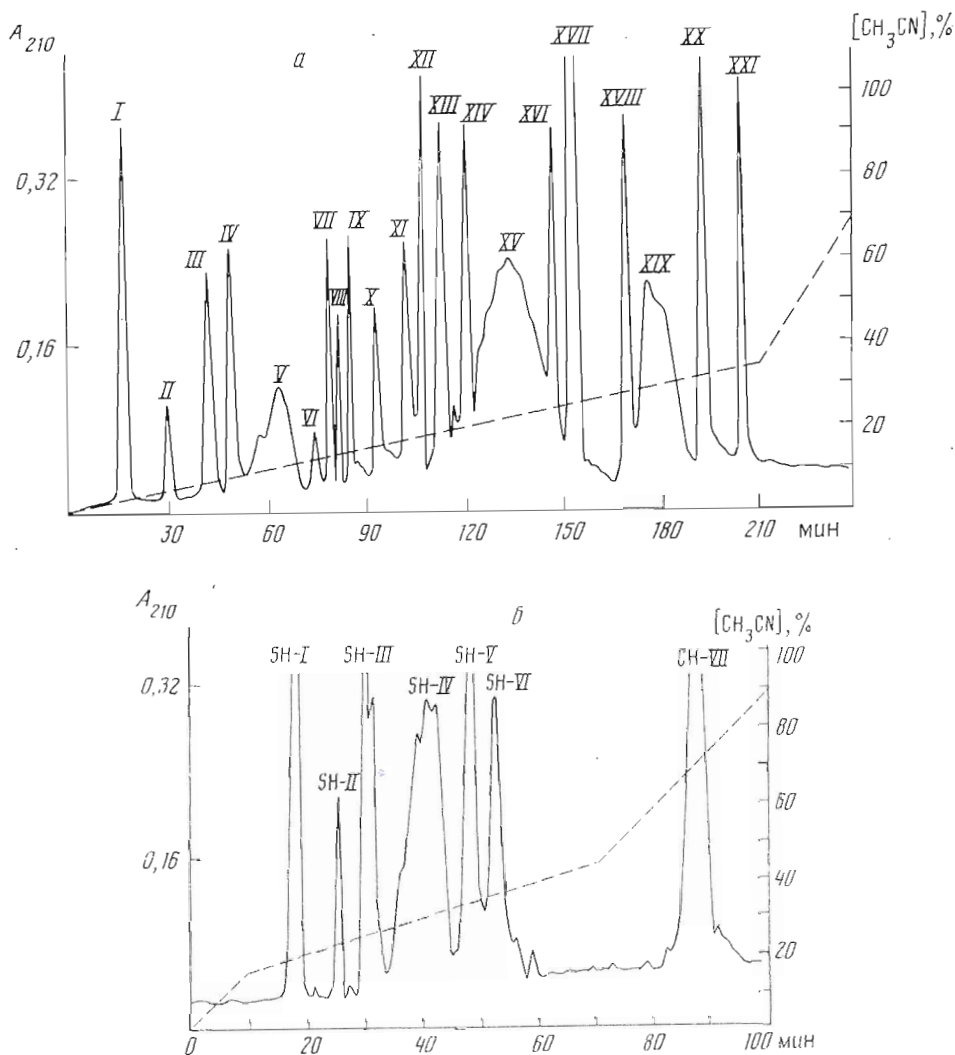


Рис. 2. Разделение триптических пептидов β -субъединицы, не содержащих остатков цистеина (а) и цистеинсодержащих (б), методом ВЭЖХ на колонке (0,46×25 см) с носителем Nucleosil C₁₈ в градиенте концентраций ацетонитрила в 10 мМ ацетате аммония, рН 5,65. Скорость элюции 1 мл/мин. Пунктиром показано изменение процентного содержания ацетонитрила

около 90% аминокислотной последовательности полипептидной цепи белка.

Анализ полученных данных позволяет заключить, что ковалентно присоединенными к носителю оказались только пептиды, содержащие остатки цистеина; неспецифической сорбции не наблюдалось.

Карбоксиметилирование в летучем аммоний-бикарбонатном буфере и применение для разделения пептидов ВЭЖХ без предварительной стадии обессоливания оказалось возможным. Фракция, полученная в процессе нанесения цистеинсодержащих пептидов, содержала индивидуальный тетрапептид (SH-0).

В целом триптический гидролиз иммобилизованного белка прошел достаточно специфично. Только два пептида, Ile-Glu-Val-Lys-Ser (III-3) и Tyr-Leu-Gln-Pro-Leu (IX-1), не содержали в качестве С-концевых остатков основных аминокислот. Структура пептида III-3 совпадает с С-концевой последовательностью белка, выведенной на основании нуклеотидной последовательности кДНК², а образование пептида IX-1 обусловлено, по-видимому, химотрипсиноподобной активностью трипсина. Пептиды SH-III-1 и SH-Y-1 являлись продуктами неполного трипсинолиза и представляли

собой удлинённые с N-конца индивидуальные пептиды SH-II-1 и SH-IV-1 соответственно (таблица).

Аминокислотные последовательности Val-Gly-Thr-Met-Glu-Tyr-Phe-Gly-Leu-Gly-Gly и Lys-Phe-Ile-Trp-Asn (пептиды XVIII-2 и XIV-2) оказались уникальными и были выбраны для синтеза специфических гибридационных олигонуклеотидных зондов, которые успешно использовали [2].

По данным аминокислотного анализа, пептиды XI-2, XV-1, SH-IV-1 и SH-V-1 (удлинённый пептид SH-IV-1) содержали наряду с остатками аминокислот глюкозамин, что давало возможность предположить наличие в них углеводных цепей, присоединённых N-гликозидными связями к остатку аспарагина. Действительно, анализ аминокислотной последовательности пептидов XI-2 и SH-IV-1 позволил определить положение остатков сахара в цепи. Вывод о локализации гликозилированных остатков аспарагина был сделан на основании их комбинированной идентификации в виде Dns- и Pth-производных остатков на 6-й и 11-й стадиях деградации пептидов SH-IV-1 и XI-2. Гликозилированные остатки Asn входят в состав структур: Asn-Cys-Ser и Asn-Glu-Ser, отвечающих каноническим последовательностям Asn-X-Thr/Ser, характерным для гликопротеинов.

Местоположение углеводного компонента в пептиде XV-1 идентифицировано не было. Впоследствии, при анализе структуры белка, выведенной на основании нуклеотидной последовательности кДНК, были выявлены три потенциально возможных участка гликозилирования [2]. Они оказались локализуемыми в пептидах SH-IV-1, XI-2 и XV-1. Суммируя полученные данные, можно заключить, что β -субъединица Na^+, K^+ -АТФ-азы почек свиньи содержит три углеводные цепи, присоединённые к остаткам аспарагина в положениях 157, 192 и 264 (Asn^{157} -Cys-Ser, Asn^{192} -Glu-Ser, Asn^{264} -Leu-Thr [2]). Эти участки полипептидной цепи, следовательно, экспонированы на наружной стороне мембраны.

Сравнительно равномерное распределение углеводных цепей на значительном участке C-концевой области (составляющей приблизительно половину молекулы белка), вероятно, создает экранирующий эффект, объясняющий недоступность протеолизу β -субъединицы в нативном комплексе и значительную устойчивость ее к ферментативному расщеплению в иммобилизованном состоянии на стекле (по сравнению, например, с интегральным мембранным белком родопсином, две углеводные цепи которого локализованы на коротком N-концевом участке [5, 6]).

Экспериментальная часть

В работе использовали: пористое стекло CPG/Thiol (Pierce, США) с размером зерна 125–177 мкм и диаметром пор 500 Å, трипсин TRPK (Worthington, США), карбоксипептидазы А (Calbiochem, Швейцария), В (Boehringer, ФРГ), Y (СССР) 2,2-дипиридинасульфид (Aldrich, США), акриламид, N,N-метиленабисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, персульфат аммония (Bio-Rad, США), β -меркаптоэтанол, дитиотреит (Sigma, США), ацетонитрил, муравьиную кислоту (Merck, ФРГ), 1-диметиламмониафталин-5-сульфонилхлорид (Dns-хлорид), SDS (Serva, ФРГ), EDTA (Reanal, Венгрия). Остальные реактивы отечественного производства квалификации х. ч. или ос. ч.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [7] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта и по результатам аминокислотного анализа. При определении количества иммобилизованного белка к навеске конъюгата, содержащей 0,2 нмоль белка, добавляли 400 мкл 5,7 н. HCl. Гидролиз проводили 24 ч в вакуумированной ампуле при 105° С. По окончании гидролиза кислоту декантировали, а носитель дополнительно промывали 100 мкл 5,7 н. HCl. Аминокислотный анализ проводили на анализаторе Durrum D-500 (Durrum, США).

Электрофорез осуществляли в течение 5–6 ч согласно работе [8] в 100 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,0, в присутствии 0,1% SDS с охлаждением при постоянном токе 60 мА на пластину. Использовали градиентные пластины ПААГ (4–15%) размером 8×8 см и толщиной 3 мм. Образцы с концентрацией белка 1 мг/мл предварительно инкубировали 3 мин

при 100° С в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 5% SDS, 2,5% β-меркаптоэтанола, 1 мМ EDTA, и затем вносили в ячейку 20 мкг β-субъединицы или 50 мкг Na⁺, K⁺-АТФ-азы. Гели окрашивали коллоидным раствором кумаси G-250 в 12,5% трихлоруксусной кислоте [9] или реактивом Шиффа [10].

Выделение Na⁺, K⁺-АТФ-азы из мозгового слоя почек свиньи и определение ее специфической активности проводили как описано в работе [4]. Специфическая удельная активность использованного препарата фермента составляла 1300–1500 Pi мкмоль/ч/мг белка при 40° С.

Разделение субъединиц Na⁺, K⁺-АТФ-азы. Фермент (0,75 мг) с концентрацией 2 мг/мл инкубировали 3 мин при 100° С в 50 мМ трис-H₂SO₄-буфере, рН 7,5, содержащем 10% SDS, 5% β-меркаптоэтанол, 1 мМ EDTA-Na₂. Перед нанесением на колонку образец разбавляли в 2 раза тем же буфером, не содержащим SDS и β-меркаптоэтанола. Разделение субъединиц осуществляли на колонке (21,5×600 мм) с Ultro Pac TSK-G 3000 SWG, уравновешенным 0,1 М трис-H₂SO₄-буферным раствором, рН 7,5, содержащим 2 мМ EDTA-Na₂, 2 мМ дитиотреит, 100 мМ фенолметилсульфонилфторид, 0,02% азид натрия и 5% SDS (буферный раствор А). Элюцию проводили раствором А со скоростью 3,2 мл/мин (рис. 1). Белки детектировали с помощью Uvicord SD (LKB, Швеция) по поглощению при 280 нм.

Активирование и определение емкости носителя — пористого стекла SPG/Thiol проводили как описано в работе [5]. Емкость тиол-стекла составила 23 мкмоль SH-групп на 1 г сухого препарата носителя.

Восстановление и иммобилизация β-субъединицы. К β-субъединице, находящейся в буфере А, добавляли β-меркаптоэтанол до концентрации 2% и выдерживали 4 ч при 20° С в атмосфере аргона. Затем белок обессоливали на колонке (2,5×100 см) с биогелем Р-2, уравновешенным 100 мМ натрий-ацетатным буферным раствором, рН 4,0, содержащим 3 мМ EDTA-Na₂ и 1% SDS (буфер В). Скорость элюции составляла 1,5 мл/мин. Детектирование фракций осуществляли спектрофотометрически при 280 нм. Фракцию, содержащую белок, собирали непосредственно во флакон с активированным носителем, предварительно замоченным в буфере В.

Иммобилизацию (16 ч, 20° С), а также последующий триптический гидролиз и «снятие» цистеинсодержащих пептидов (см. ниже) осуществляли во вращающемся флаконе в атмосфере аргона. Затем конъюгат переносили на стеклянный фильтр и тщательно промывали последовательно растворами (10-кратными объемами по отношению к набухшему тиол-стеклу): буфером В, водой, 98% муравьиной кислотой, водой, смесью вода — метанол (2:1, 1:1) и метанолом. По окончании отмывок стекло высушивали на воздухе.

Триптический гидролиз иммобилизованной β-субъединицы. Перед проведением гидролиза конъюгат промывали несколькими объемами 100 мМ аммоний-бикарбонатного буферного раствора, рН 8,2 (буфер В), на объем набухшего конъюгата добавляли 5 объемов буферного раствора В. Триптический гидролиз проводили 20 ч в буфере В при 37° С и нагрузке фермента 10% (к белку). Трипсин вводили двумя равными порциями с интервалом 4 ч. Конъюгат промывали несколькими объемами буфера В, водой, муравьиной кислотой, метанолом и высушивали. С помощью аминокислотного анализа было оценено содержание пептидов на носителе после трипсинолиза и в каждой «промывной» фракции. Раствор пептидов в буфере В (60% от исходного белка) разводили до конечной концентрации бикарбоната аммония 5 мМ и подвергали разделению с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (см. ниже).

«Снятие» цистеиносодержащих пептидов проводили при 20° С в течение 15 ч в буферном растворе В, содержащем 50 моль β-меркаптоэтанола на 1 моль остатка Cys (в иммобилизованных пептидах), 3 мМ EDTA-Na₂. Стекла отмывали аналогично вышеописанному. Контроль количества «снятых» пептидов осуществляли идентификацией N-концевых аминокислотных остатков на сорбенте и по данным аминокислотного анализа. Раствор пептидов карбоксиметилировали.

Карбоксиметилирование цистеиносодержащих пептидов иодуксусной

кислотой проводили в 0,5 аммоний-бикарбонатном буферном растворе, pH 8,5, в течение 15 мин при 20°С в темноте, постоянно контролируя pH реакционной среды. Молярность и pH исходного раствора поднимали до требуемых параметров добавлением к элюату соответствующего количества 2 М аммоний-бикарбонатного буфера, pH 8,5. Расчет избытка иодуксусной кислоты был проведен согласно работе [11]. Реакцию останавливали, дополнительно вводя β-меркаптоэтанол. Раствор концентрировали упариванием на ротаторном испарителе в 5 раз, а затем разбавляли водой до конечной концентрации бикарбоната аммония 5 мМ. После этого цистеинсодержащие пептиды разделяли с помощью ВЭЖХ.

Разделение пептидов. ВЭЖХ проводили на хроматографе Du Pont Instruments, модель 850 (Du Pont, США) с проточными спектрофотометрами Uvicord II, модель 2151, и Uvicord SD, модель 2158 (ЛКВ, Швеция). При разделении использовали колонку (0,46×25 см) с обращенной фазой Nucleosil C₁₈ (диаметр частиц 7 мкм, Machery-Nagel, ФРГ). Скорость напеснения и элюции 1 мл/мин. Первичное деление гидролизатов проводили в 10 мМ ацетате аммония, pH 5,65, в градиенте концентраций ацетонитрила от 0 до 70% (для пептидов, не содержащих цистеин) и от 0 до 90% (для цистеинсодержащих пептидов). Рехроматографию пептидов проводили на той же колонке в 0,1% водной трифторуксусной кислоте в градиенте концентраций ацетонитрила. Время изменения градиента 1–2 ч, выбор градиента на основании данных первичного деления фракции. Скорость элюции 1 мл/мин. Пептиды детектировали при двух длинах волны: 210 и 280 нм.

Обессоливание на биогеле Р-2. Фракцию, полученную в процессе напеснения цистеинсодержащих пептидов (SH-0), перед рехроматографией упаривали и предварительно обессоливали на колонке (1,5×100 см) с биогелем Р-2 (200–400 меш, Bio-Rad, США), уравновешенным 10% муравьиной кислотой. Соли детектировали с помощью кондуктора pH/Ion Monitor (ЛКВ, Швеция), последовательно соединенного с Uvicord II. Фракцию, вышедшую до солей, объединили, упарили, растворили в 150 мкл 98% HCOOH и рехроматографировали ВЭЖХ.

N-Концевые аминокислотные остатки пептидов и их аминокислотный состав определяли как описано в работе [12]. N-Концевую кислоту β-субъединицы определяли по дансильной методике в присутствии SDS [13]. При определении N-концевых аминокислотных остатков пептидов и белка, ковалентно связанных с носителем, после реакции дансильирования избыток реагента удаляли, а конъюгат несколько раз промывали ацетоном и метанолом. Затем носитель высушивали и подвергали в вакуумированной ампуле кислотному гидролизу.

Деградиацию пептидов по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде дансильных производных проводили на 2–5 нмоль образца по методу [12]. Идентификацию фенилтиогидантоинов дикарбоновых кислот, их амидов и триптофана осуществляли как описано в сообщении [14].

Автоматическую деградиацию пептидов осуществляли на секвенаторе 890 С (Beckman, США). Идентификацию фенилтиогидантоинов аминокислот проводили методом ВЭЖХ [15].

С-Концевую последовательность пептидов определяли с помощью карбоксипептидаз А и В как по стандартной методике [16], так и с варьированием pH среды (для пептидов, содержащих в С-концевой области остатки дикарбоновых кислот). В ряде случаев использовалась карбоксипептидаза Y. Анализ гидролизата осуществляли с помощью аминокислотного анализатора Durrum D-500 и дансильрованием.

Авторы выражают глубокую признательность Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к работе и ценные советы. Авторы благодарят Т. И. Муравьеву, Г. И. Полищук, Т. Д. Нестерову за участие в выделении препаратов фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю. А., Арсенян С. Г., Бродде Н. Е., Петрухин К. Е., Гришин А. В., Адамова Н. А., Арзамасова Н. М., Аристанхова Е. А., Мелков А. М., Смирнов Ю. В., Гурьев С. О., Монастырская Г. С., Модянов Н. Н. Докл. АН СССР, 1985, т. 285, № 6, с. 1490–1495.

2. Овчинников Ю. А., Броуде Н. Е., Петрухин К. Е., Гришин А. В., Кияткин Н. И., Арзамазова Н. М., Гевондян Н. М., Чертова Е. Н., Мелков А. М., Смирнов Ю. В., Малышев И. В., Монастырская Г. С., Модянов Н. Н. Докл. АН СССР, 1986, т. 287, № 6, с. 1491–1495.
3. Арзамазова Н. М., Аристархова Е. А., Шафиева Г. И., Назимов И. В., Алданова Н. А., Модянов Н. Н. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 12, с. 1598–1606.
4. Джанджугазян К. Н., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А. Биоорг. химия, 1984, т. 7, № 6, с. 847–857.
5. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Богачук А. С. Биол. мембраны, 1985, т. 2, № 10, с. 962–975.
6. Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1982, v. 148, № 2, p. 179–191.
7. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, v. 193, № 1, p. 265–275.
8. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 16, p. 4406–4412.
9. Diezel W., Koppenschläger G., Hofman E. Anal. Biochem., 1972, v. 48, № 2, p. 617–620.
10. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. Biochemistry, 1971, v. 10, № 13, p. 2606–2617.
11. Crestfield A. M., Moor S., Stein W. H. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 2, p. 622–627.
12. Гринкевич В. А., Арзамазова Н. М., Поганенко П. А., Гринкевич Х. А., Кравченко З. Б., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1757–1774.
13. Weiner A. M., Platt T., Weber K. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 10, p. 3242–3251.
14. Chen R., Hoppe-Seylers L. Physiol. Chem., 1976, v. 357, p. 873–886.
15. Hawke D., Yuan P.-M., Shively J. E. Anal. Biochem., 1982, v. 120, № 2, p. 302–311.
16. Ambler R. P. Meth. Enzymol., 1972, v. XXVB, p. 143–154, 262–272.

Поступила в редакцию
14.VII.1986

THE PRIMARY STRUCTURE OF β -SUBUNIT OF Na^+ , K^+ -ATPase FROM PIG KIDNEY. I. ANALYSIS OF TRYPTIC PEPTIDES OF IMMOBILIZED β -SUBUNIT

ARZAMAZOVA N. M., GEVONDYAN N. M., CHERTOVA E. N., NAZIMOV I. V.,
GAVRILEVA E. E., ALDANOVA N. A., MODJANOV N. N.

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

The Na^+ , K^+ -ATPase's β -subunit immobilized on thiol-glass was hydrolyzed with trypsin. Over 25 peptides covering ca. 90% of the protein polypeptide chain were isolated from the digest by HPLC and characterized. Structural analysis allowed us to localize the sites of attachment of all three carbohydrate chains of β -subunit. Sequence data were used to design of oligonucleotide hybridization probes for gene cloning.