



УДК 577.322.2

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФАКТОРА
ЭЛОНГАЦИИ EF-G ИЗ ЭКСТРЕМАЛЬНО ТЕРМОФИЛЬНЫХ
БАКТЕРИЙ *THERMUS THERMOPHILUS* HB8

Каширлов Н. А., Глимова И. А., Алахов Ю. Б.

Институт белка Академии наук СССР,
Пушкино Московской обл.

Разработан упрощенный метод выделения фактора элонгации EF-G из *Thermus thermophilus*, предусматривающий использование иммуноаффинной хроматографии. Показано, что в присутствии 2,5 М мочевины белок при трипсинолизе образует фрагменты с M 75, 43 и 26 кДа, которые по своим свойствам близки к аналогичным фрагментам EF-G из *E. coli*. Условия ограниченного трипсинолиза и исследование реакционной способности тиольных групп как в целом белке, так и в его триптических фрагментах позволили сделать вывод, что по основным физико-химическим свойствам EF-G из *T. thermophilus* — полный аналог EF-G из *E. coli*. Более высокая устойчивость к действию протеиназ и модифицирующих агентов, обусловлена, по-видимому, большей компактностью молекулы и более тесным взаимодействием доменов в составе целой молекулы в интервале 20–30°С. При частичном нарушении этого взаимодействия и/или частичной дестабилизации пространственной структуры поведение термофильного белка становится близким к поведению его аналога из *E. coli*.

Фактор элонгации полипептидной цепи EF-G из экстремально термофильных бактерий *Thermus thermophilus* HB8 ранее был выделен и частично охарактеризован по некоторым его физико-химическим и функциональным свойствам [1–3]. В частности, было показано, что наряду с высокой термостабильностью белок обладает повышенной устойчивостью к действию протеиназ. В отличие от EF-G из *E. coli* [4, 5] он не распадается на стабильные фрагменты под действием трипсина, а при отщеплении пептида с $M \sim 3$ кДа образуется высокоустойчивый полипептид с $M \sim 75$ кДа, который при более жестких условиях протеинолиза постепенно деградирует с образованием мелких фрагментов [3].

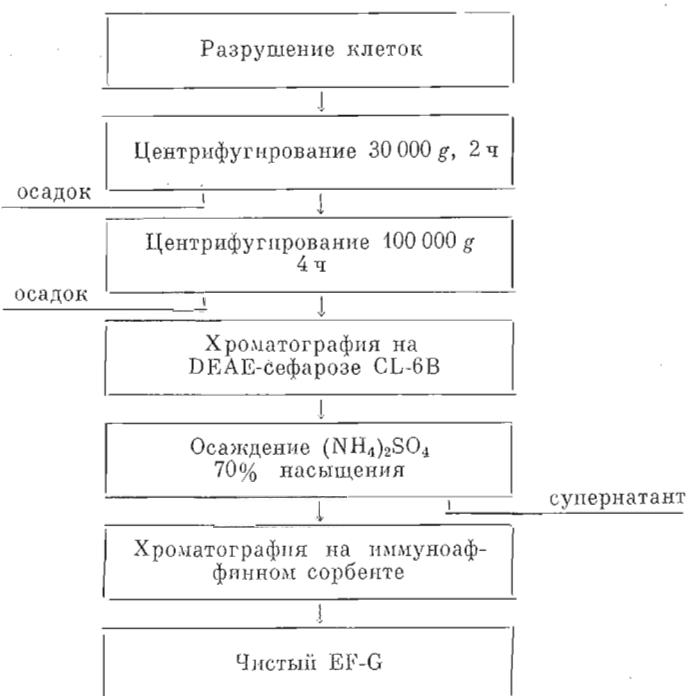
В этой работе мы описываем метод ограниченного протеинолиза EF-G из *T. thermophilus*, с помощью которого можно получить ряд устойчивых к дальнейшему протеинолизу фрагментов, близких по молекулярным массам к соответствующим протеолитическим фрагментам EF-G из *E. coli*. Детальная характеристика фрагментов дала возможность расположить их по полипептидной цепи белка, а также выяснить распределение тиольных групп по фрагментам и их реакционную способность как во фрагментах, так и в целом белке, что позволило сделать вывод о близком сходстве основных физико-химических свойств двух G-факторов из разных бактерий.

1. Выделение фактора элонгации EF-G

Предложенная схема выделения фактора элонгации EF-G из *T. thermophilus* HB8 включает в себя двухступенчатое скоростное центрифугирование и две стадии хроматографии (см. схему). Исходный клеточный экстракт был получен после разрушения клеток и центрифугирования гомогената при 30 000 и 100 000g. Для первоначального грубого разделения использована ионообменная хроматография на DEAE-сефарозе CL-6B, что дало возможность значительно обогатить смесь белков фактором элонгации EF-G и подавить неспецифическую сорбцию при последующей имму-

Сокращения: EF-G — фактор элонгации биосинтеза белка; СМВ — *p*-хлормеркурибензоат; DTNB — 5,5'-дितिобис(2-нитробензоат); DDP — 2,2'-дитиодициридин; ANS — 8-анилино-1-нафталинсульфонат.

Схема выделения фактора элонгации EF-G из *T. thermophilus*



ноафинной хроматографии на колонке с антителами против EF-G (рис. 1). Результаты электрофоретического анализа продуктов заключительного этапа выделения EF-G представлены на рис. 2. Благодаря высокоспецифической иммуноаффинной хроматографии процесс выделения удалось резко упростить и сократить во времени по сравнению с описанными в литературе методами [1, 6]. Необходимо отметить, что, несмотря на сравнительно небольшую емкость иммунного сорбента (~10–12 мг белка сорбируется на 56 мг иммобилизованных IgG), производительность процесса достаточно высока вследствие высокой скорости сорбции и десорбции белка и быстрой регенерации колонки без значительной потери ее емкости. Использование для десорбции белка растворов со слабощелочными значениями pH позволяет получать EF-G с высокой GDP-связывающей и GTP-азной способностями [7, 8].

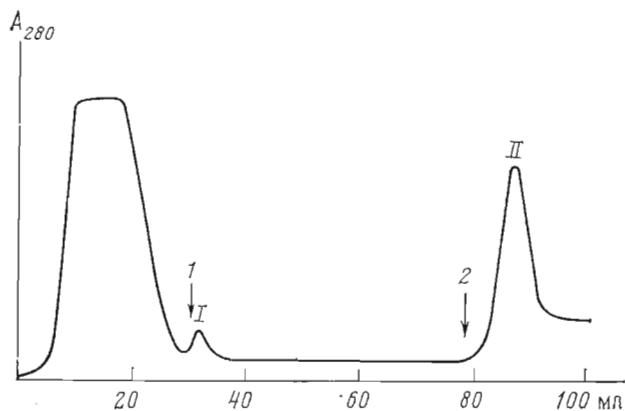


Рис. 1. Иммуноаффинное выделение фактора элонгации EF-G из белковой фракции, полученной после хроматографии грубого экстракта клеток *T. thermophilus* на DEAE-сефарозе CL-6B. Колонка с анти-EF-G-IgG, иммобилизованными на агарозе (2,5×8 см), уравновешена буфером 25 мМ трис-HCl, содержащим 150 мМ NaCl, 0,02% азид натрия, 2 мМ EDTA, pH 7,5. Стрелками показаны моменты добавления в уравновешивающий буфер 0,5 М NaCl (1) и 1,5 М KCNS (2)

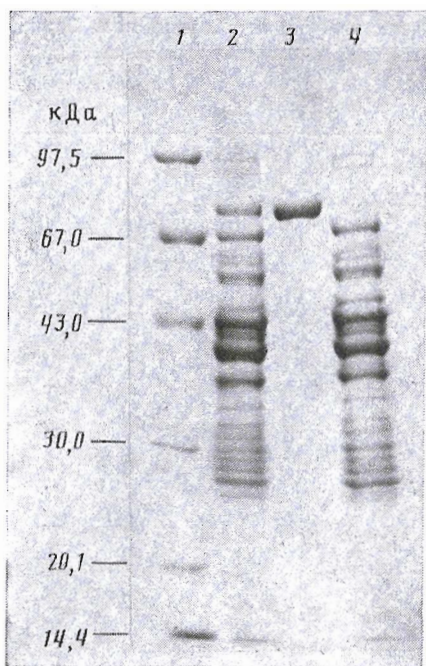


Рис. 2

Рис. 2. Электрофоретический анализ в ПААГ в присутствии SDS продуктов иммуноаффинного выделения EF-G. 1 – смесь стандартных белков по убыванию молекулярных масс: фосфорилиза *b*, сывороточный альбумин, овальбумин, карбоангидраза, соевый ингибитор трипсина, α -лактальбумин; 2 – белковая фракция, содержащая EF-G, нанесенная на иммуноаффинную колонку; 3 – фактор элонгации EF-G, элюированный с иммуноаффинной колонки (фракция II рис. 1); 4 – белковая фракция, не связавшаяся с иммуноаффинным сорбентом (фракция I рис. 1)

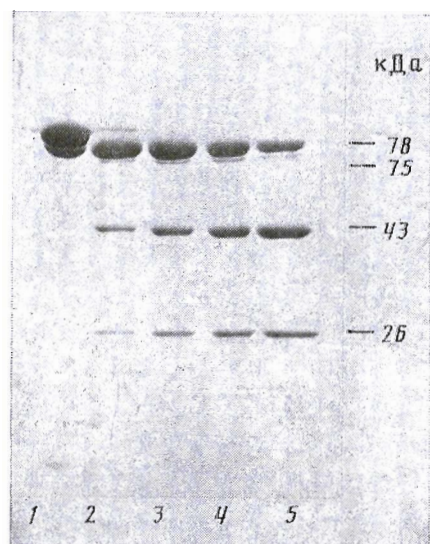


Рис. 3

Рис. 3. Электрофоретический анализ в ПААГ продуктов триптического гидролиза EF-G через 0 (1), 5 (2), 20 (3), 60 (4) и 120 (5) мин. Цифры справа характеризуют молекулярные массы получаемых фрагментов (в килодальтонах), определяемые по Леммли [12]

2. Ограниченный протеинолиз фактора элонгации EF-G

Как уже упоминалось, фактор элонгации EF-G из *T. thermophilus* значительно более устойчив к действию протеиназ, чем его аналог из *E. coli* [3]. Однако в его молекуле содержится, по-видимому, одна чрезвычайно чувствительная к протеинолизу пептидная связь, находящаяся в ее N-концевой части. Она способна разрываться даже в процессе длительной процедуры выделения EF-G за счет действия эндогенных протеиназ в клеточном экстракте. Полученный в результате такого естественного протеинолиза белок был выделен и охарактеризован [6]; он оказался идентичен триптическому фрагменту с *M* 75 кДа [3], который высоко устойчив к дальнейшему трипсинолизу и постепенно деградирует до мелких полипептидов при более жестких условиях протеинолиза.

Известно, что EF-G из *E. coli* имеет доменную организацию [9], причем С-концевой домен под действием протеиназ легко отщепляется от основной цепи и, по-видимому, ответствен за изменение сродства фактора к рибосоме [10, 11]. С другой стороны, EF-G из *T. thermophilus* и *E. coli* взаимозаменяемы в функциональных реакциях на гетерологичных рибосомах и различаются только по кинетике этих реакций при 37°С [2]. В связи с этим естественно было предположить, что EF-G из *T. thermophilus* и *E. coli* имеют сходную структурную и функциональную организацию. При микрокалориметрических исследованиях термостабильного EF-G обнаружено, что его полипептидная цепь имеет доменное строение, аналогичное EF-G из *E. coli* (В. В. Филимонов, И. А. Кашпаров, неопубликованные

Аминокислотный состав EF-G и его триптических фрагментов, моль/моль белка

Аминокислота	EF-G	Фрагмент с M 75 кДа (T_1)	Фрагмент с M 43 кДа (T_2)	Фрагмент с M 26 кДа (T_3)	Сумма T_2+T_3
Asp	49	47	31	13	44
Thr	37	37	25	9	34
Ser	21	21	11	8	19
Glu	84	77	40	29	69
Pro	31	30	19	10	29
Gly	92	87	46	38	84
Ala	71	71	39	19	58
$\frac{1}{2}$ Cys	3	3	3	—	3
Val	61	59	34	24	58
Met	14	12	6	6	12
Ile	45	45	25	14	39
Leu	50	50	26	9	35
Tyr	13	12	8	2	10
Phe	14	13	6	6	12
His	11	11	6	3	9
Lys	33	31	16	11	27
Arg	29	27	16	12	28
Trp	5	5	5	—	5
Сумма	666	640	362	213	575

данные). Поэтому мы попытались найти такие условия протеинолиза, при которых изучаемый белок смог бы расщепиться на фрагменты, аналогичные получаемым при ферментации EF-G из *E. coli*. Оказалось, что при частичной дестабилизации пространственной структуры белка мочевиной (2,5 М) триптический гидролиз приводит к ожидаемому результату.

Вначале под действием трипсина в присутствии 2,5 М мочевины EF-G быстро расщепляется с образованием фрагмента с M 75 кДа, который далее распадается на два фрагмента с M 43 и 26 кДа (рис. 3). Последние фрагменты по своим молекулярным массам близки к фрагментам T_3 и T_5 [5] EF-G из *E. coli*.

Смесь, полученную после гидролиза EF-G, хроматографировали на колонке с целлюлозой DE-52. При этом удалось выделить в чистом виде фрагмент с M 26 кДа, который не связывается с целлюлозой и выходит в свободном объеме (рис. 4а, пик I; рис. 5). Для последующего разделения фрагментов с M 75 и 43 кДа (рис. 4б, пик II; рис. 5) удачным оказалось использование хроматографии на иммуноаффинной колонке (рис. 4б, 5). Фрагмент с M 43 кДа не связывается с иммунным сорбентом, а фрагмент с M 75 кДа элюируется с колонки в условиях выделения исходного фактора элонгации, т. е. раствором, содержащим 1,5 М роданид калия, рН 7,5.

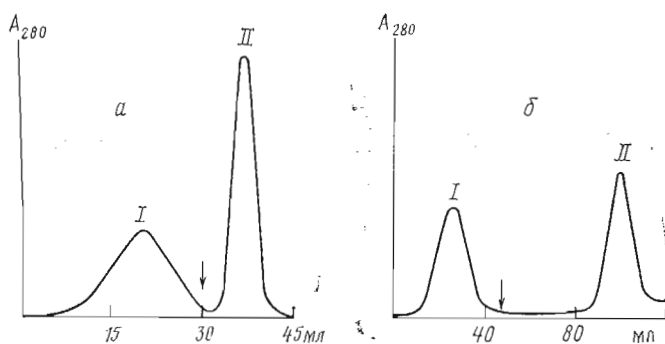


Рис. 4. Разделение фрагментов ограниченного трипсинолиза EF-G. а — Разделение на колонке (1,5×5 см) с целлюлозой DE-52, уравновешенной буфером, содержащим 10 мМ имидазол, 2 мМ EDTA, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,02% азид натрия, рН 5,5. Стрелкой показано начало элюирования буфером того же состава, но рН 7,0, содержащим 0,3 М KCl. б — Иммуноаффинное разделение смеси фрагментов фракции II, рис. 4а (условия — см. рис. 1). Стрелкой показано начало элюирования тем же буфером, но содержащим 1,5 М KCNS

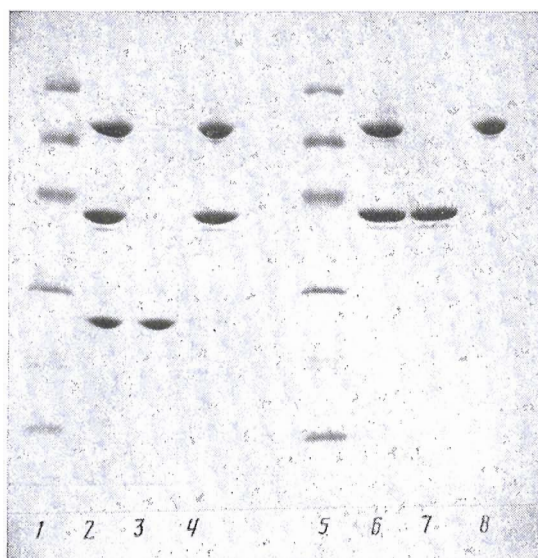


Рис. 5. Электрофоретический анализ в ПААГ продуктов хроматографического разделения фрагментов ограниченного триптического гидролиза EF-G. 1, 5 — смесь стандартных белков (см. рис. 2); 2 — смесь фрагментов ограниченного трипсинолиза EF-G; 3 — пик I на рис. 4а (фрагмент 26 кДа); 4, 6 — пик II на рис. 4а (смесь фрагментов 43 и 75 кДа); 7 — пик I на рис. 4б (фрагмент 43 кДа); 8 — пик II на рис. 4б (фрагмент 75 кДа)

или раствором 3 М имидазола, pH 9,5. Таким образом, все антигенные детерминанты EF-G находятся в его С-концевой части и, возможно, в N-концевом участке, который отщепляется в первую очередь в ходе трипсинолиза.

По данным аминокислотного анализа (таблица), сумма аминокислотных остатков фрагментов с M 43 и 26 кДа близка к сумме аминокислотных остатков фрагмента с M 75 кДа, однако сумма их молекулярных масс меньше молекулярной массы фрагмента с M 75 кДа. По-видимому, происходит выщепление небольшого участка полипептидной цепи между фрагментами и/или отщепление небольшого участка, находящегося на С-конце исходной молекулы и соответственно фрагмента с M 26 кДа.

Исследование N-концевых аминокислотных последовательностей во фрагментах показало, что фрагмент с M 43 кДа находится в N-концевой части молекулы EF-G, поскольку имеет ту же самую последовательность, что и фрагмент с M 75 кДа (Gly-Ile-Tyr-Ser-Ala-Ala-Val-...), а фрагмент с M 26 кДа, имея N-концевую последовательность Gln-Phe-Lys-Val-Asp-Ala-Glu-Pro-..., является С-концевым участком молекулы EF-G и представляет собой С-концевой домен, аналогичный домену в молекуле EF-G из *E. coli*. При исследовании N-концевой аминокислотной последовательности этого фрагмента обнаружено, что она гетерогенна. Кроме основной последовательности, приведенной выше, определяется также последовательность Val-Asp-Ala-..., т. е. при гидролизе происходит расщепление как связи -X-Gln..., так и связи -Lys-Val-.... Это говорит в пользу того, что между фрагментами происходит выщепление участка цепи в отличие от EF-G из *E. coli*, у которого расщепление цепи при трипсинолизе происходит строго специфично по единственной связи в этом участке полипептидной цепи.

Известно, что у фактора элонгации EF-G из *E. coli* нуклеотидсвязывающий участок находится в N-концевой части его полипептидной цепи [13, 14] и нуклеотидсвязывающая способность не зависит от присутствия С-концевого домена [11]. Аналогичная организация полипептидной цепи оказалась и у EF-G из *T. thermophilus*. По данным флуориметрического

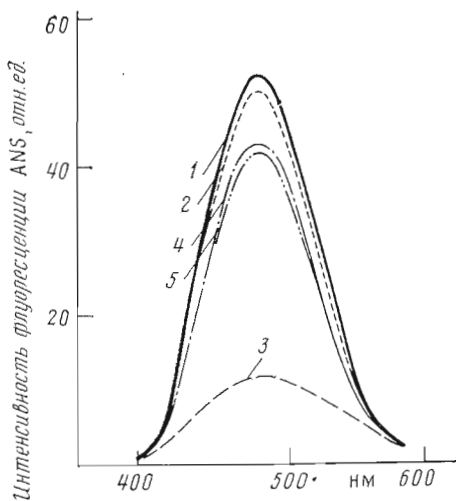


Рис. 6

Рис. 6. Спектры флуоресценции комплексов ANS с EF-G (1, 4) и с фрагментами с M 43 (2, 5), 26 кДа (3) в отсутствие (1, 2) и в присутствии (3-5) GTP

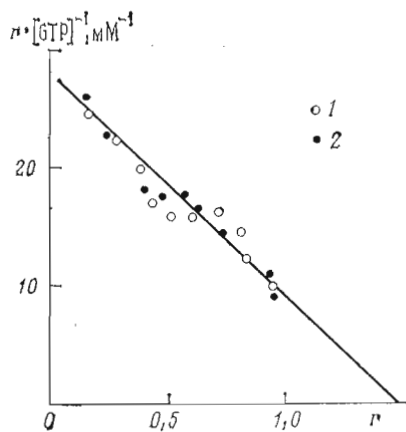


Рис. 7

Рис. 7. График Скэтчарда для связывания GTP с комплексами ANS с EF-G (1) и его фрагментом с M 43 кДа (2) (по данным рис. 6). $r = [GTP]_{связ} / [GTP]_{своб}$

титрования гуанозинтрифосфатом комплексов EF-G и его фрагментов с 8-анилино-1-нафталисульфонатом (рис. 6), фрагмент с M 43 кДа взаимодействует с GTP так же, как целый белок. Кажущиеся константы диссоциации комплексов GTP с EF-G и с фрагментом с M 43 кДа оказались практически одинаковы (в пределах ошибки опыта) и равны $(4,8 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}$ М.

Таким образом, ограниченный трипсинолиз EF-G, дестабилизированного мочевиной, приводит к фрагментам, несущим функциональную нагрузку, аналогичную функциям фрагментов ограниченного трипсинолиза EF-G из *E. coli*. Дестабилизация молекулы может быть вызвана и температурой. Известно, что EF-G из *E. coli* [15] и из *T. thermophilus* [2] содержат экспонированную SH-группу, модификация которой приводит к ингибированию взаимодействия белка с рибосомой. Однако скорость модификации и реакционная способность этой тиольной группы по отношению к различным тиольным реагентам в обоих белках сильно различаются. Так, было показано, что N-этилмалеимид не модифицирует (в отличие от EF-G из *E. coli*) термофильный фактор при 30°С, но модифицирует при 60°С с ингибированием образования трояственного комплекса EF-G-рибосома-GTP и GTP-азной реакции [3].

Для более тщательного исследования различий в структурной организации EF-G из *T. thermophilus* и *E. coli* мы провели титрование как самого белка, так и его фрагментов с помощью СМВ, DTNB и DDP.

3. Реакционная способность сульфгидрильных групп в факторе элонгации EF-G

Факторы элонгации EF-G из *E. coli* и *T. thermophilus* содержат по одной модифицируемой с помощью СМВ тиольной группе, однако если в EF-G из *E. coli* она высокореакционноспособна (полная модификация проходит за 1-1,5 мин), то в термофильном белке в тех же условиях модификация завершается за 50 мин (ср. кривые 1 и 2, рис. 8). Необходимо отметить, что термофильный EF-G в этих условиях вообще не модифицируется иодацетамидом, иодацетатом, N-этилмалеимидом и DTNB. Сходно протекает модификация только с помощью DDP (данные не приведены).

При дестабилизации структуры EF-G-белка из *T. thermophilus* 2,5 М

мочевинной, т. е. при модификации в условиях проведения ограниченного триптического гидролиза, ход модификации с помощью СМВ становится близким к ходу модификации EF-G из *E. coli* (кривая 3, рис. 8).

В присутствии 8 М гуанидингидрохлорида в обоих белках СМВ модифицирует три тиольные группы. Известно, что EF-G из *E. coli* содержит три остатка цистеина [16], тиольная группа одного из них легко модифицируется, а два других погружены в белковую глобулу и модифицируются тиольными реагентами только после полной денатурации белка мочевиной или гуанидингидрохлоридом. Таким образом, термофильный EF-G является в этом отношении полным аналогом EF-G из *E. coli*. Однако в работе [3] авторами было показано, что в 8 М гуанидингидрохлориде в термофильном EF-G с помощью СМВ титруется только одна тиольная группа, а после восстановления сульфитом натрия — около двух. На этом основании авторы делают вывод о наличии в белке одной дисульфидной связи. Наши данные этого не подтверждают. Более того, даже после восстановления белка различными реагентами (см. «Экспериментальную часть») количество модифицируемых тиольных групп не увеличивается, что говорит об отсутствии в молекуле белка дисульфидной связи.

Иначе протекает процесс модификации тиольных групп во фрагменте EF-G с *M* 75 кДа, который образуется вследствие отщепления от N-конца полипептидной цепи EF-G небольшого участка (см. выше). Результатом такого отщепления является, по-видимому, дестабилизация третичной структуры белка и экспонирование тиольных групп на поверхность глобулы. В итоге не только увеличивается скорость модификации функционально важной SH-группы, но и происходит достаточно быстрая модификация всех тиольных групп (рис. 8, 4).

При титровании хлормеркурибензоатом фрагмента ограниченного триптического гидролиза EF-G с *M* 43 кДа (рис. 8, 5) обнаружилось, что все три тиольные группы EF-G находятся в этом фрагменте и скорость их модификации идентична скорости модификации тиольных групп в белке, полностью денатурированном 8 М гуанидингидрохлоридом. Такой ход модификации может быть обусловлен двумя причинами. При расщеплении полипептидной цепи белка трипсином в образующемся фрагменте происходят конформационные перестройки, результатом которых является полное экспонирование остатков цистеина на поверхности глобулы и доступность тиольных групп для модифицирующего агента. С другой стороны, для фактора элонгации EF-G из *E. coli* известно, что аналогичные триптические фрагменты, по данным КД и микрокалориметрии [9], сохраняют компактную структуру и существуют в составе целой молекулы в виде независимых структурных единиц или доменов. Сходные результаты получены и для EF-G из *T. thermophilus* (И. А. Кашпаров, В. В. Филимонов, С. Ю. Веняминон, неопубликованные данные). Поэтому высокая реакционная способность тиольных групп во фрагменте с *M* 43 кДа может быть объяснена отсутствием С-концевого домена, который экранирует остатки цистеина в целой молекуле белка, делая по крайней мере два из них полностью недоступными для модификации. Во фрагменте же с *M* 76 кДа в результате отщепления N-концевого участка происходит нарушение взаимодействия N- и С-концевых доменов, приводящее к частичному экспонированию остатков цистеина.

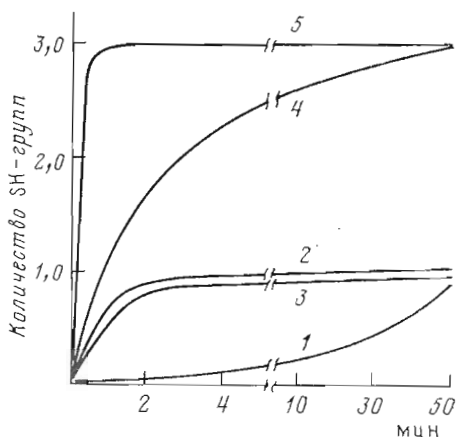


Рис. 8. Кинетика модификации с помощью СМВ факторов элонгации EF-G из *T. thermophilus* (1) и *E. coli* (2), термофильного EF-G в присутствии 2,5 М мочевины (3), его фрагмента с *M* 75 (4) из 43 кДа (5). Условия: 50 мМ калий-фосфат, рН 7,2

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что фактор элонгации EF-G из *T. thermophilus* по основным физико-химическим свойствам является полным аналогом EF-G из *E. coli*. Более высокая устойчивость к действию протеиназ и модифицирующим агентам обусловлена, по-видимому, большей компактностью молекулы и более тесным взаимодействием доменов в составе целой молекулы в интервале температур 20–30°С. Это взаимодействие может быть частично нарушено либо повышением температуры (а белок нормально функционирует именно при повышенной температуре), либо мягким воздействием денатурирующих агентов. В обоих случаях поведение термофильного EF-G становится близким к поведению EF-G из *E. coli* при описанных воздействиях.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института белка Г. В. Семисотнову за проведение флуориметрических измерений и Л. М. Винокурову за определение N-концевых аминокислотных последовательностей во фрагментах ограниченного трипсинолиза EF-G.

Экспериментальная часть

В работе использованы [¹⁴C]GTP, [³H]GTP (Amersham, Англия), *p*-хлормеркурибензоат (СМВ), 5,5'-дитиобис(2-нитробензоат) (DTNB), 2,2'-дитиодипиридин (DDP; Calbiochem, США), додецилсульфат натрия (SDS; Serva, ФРГ), сефадекс G-25, сефароза DEAE CL-6B (Pharmacia, Швеция), целлюлоза DE-52 (Whatman, Англия), ультрогель HA (ЛКВ, Швеция), трипсин (Serva, ФРГ), реактивы для автоматического метода Эдмана (Pierce, Applied Biosystems, США). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Клетки *T. thermophilus* HB8 были выращены при 75°С, собраны на 1/3 логарифмической фазы роста и хранились в замороженном состоянии при –20°С.

Моноспецифические антитела к фактору элонгации EF-G получали из сыворотки крови кролика, отобранной на 14-е сут после иммунизации. 10 мл сыворотки наносили на колонку (1,5×5 см) с EF-G, иммобилизованным на бромциан-активированной агарозе, уравновешенной буфером, рН 6,6 (0,15 М фосфат натрия, 0,5 М NaCl). После промывки колонки тем же буфером (10 объемов) антитела смывали раствором 0,2 М глицин-HCl, рН 2,8. Выход моноспецифических IgG из 10 мл сыворотки составил 4 мг. 56 мг IgG были иммобилизованы на бромциан-активированной агарозе по методу [17], в результате получено 40 мг иммунного сорбента с концентрацией IgG 1,4 мг/мл сорбента.

Выделение фактора элонгации EF-G. Замороженные клетки (1 кг) оттаивали в течение ночи при 4°С и суспендировали в равном объеме буфера А (20 мМ трис-HCl, 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0,02% азид натрия, рН 7,6). В смесь добавляли фецилметилсульфонилфторид до 0,2 мМ и клетки разрушали в дезинтеграторе 15М-8ТА (Manton-Gaulin, США). Все операции по выделению проводили при 4°С, электропроводность и рН буферов измеряли при 22°С. К полученному гомогенату добавляли 50 мкг ДНКазы I (Worthington, США) и центрифугировали 2 ч при 30 000g в роторе JA-14 на центрифуге J21-B (Beckman, США). Супернатант далее центрифугировали 4 ч при 100 000g в роторе Ti-45 на центрифуге L5-50 (Beckman, США), разбавляли в 2 раза водой и наносили на колонку (5×30 см) с DEAE-сефарозой CL-6B, уравновешенной буфером А (со скоростью 240 мл/ч). После напесения образца колонку промывали буфером А и белок элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl в буфере А (0→0,3 М NaCl, общий объем 4 л). Наличие EF-G во фракциях определяли по данным электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. Фракции, содержащие EF-G, объединяли и белок осаждали добавлением сульфата аммония до 70% насыщения (470 г на 1 л раствора). Осадок собирали центрифугированием, растворяли в 100 мл буфера В (25 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl, 0,02% азид натрия, 2 мМ EDTA, рН 7,5) и 12 мл раствора наносили на колонку (2,5×8 см) с иммобилизованными анти-EF-G-IgG, уравновешенную этим же буфером. Для элюи-

рования несвязавшегося материала колонку промывали буфером В с 0,5 М NaCl, а затем EF-G элюировали буфером В, содержащим 1,5 М роданид калия, или 3 М раствором имидазола, pH 9,5, со скоростью 25 мл/ч. EF-G элюировался в объеме 80 мл, который после концентрирования ультрафильтрацией на мембране PM-10 (Amicon, Голландия) до объема 5 мл далее диализовали против буфера, необходимого для дальнейших исследований. Выход чистого белка 10–12 мг. Общий выход чистого EF-G из 1 кг замороженных клеток составил ~80 мг.

Ограниченный триптический гидролиз EF-G проводили в условиях, описанных в работе [5], но в присутствии 2,5 М мочевины. Для препаративного получения фрагментов ограниченного трипсинолиза EF-G к раствору белка (3 мг/мл) в буфере, содержащем 0,1 М трис-HCl, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 2,5 М мочевины, pH 8,1, добавляли раствор трипсина в воде (1 мг/мл) при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 и смесь инкубировали 2 ч при 37°С. Реакцию останавливали добавлением раствора соевого ингибитора трипсина (1 мг/мл) при соотношении фермент — ингибитор 1 : 1,5, после чего смесь обессоливали на колонке с сефадексом G-25.

Разделение фрагментов ограниченного триптического гидролиза EF-G. Триптический гидролизат в буфере, содержащем 10 мМ имидазол, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,02% азид натрия, 2 мМ EDTA, pH 5,5, наносили на колонку (1,5×5 см) с целлюлозой DE-52 (рис. 4а). После промывания колонки стартовым буфером хроматографию проводили в буфере того же состава, но pH 7,0, содержащем 0,3 М KCl. Фракции со смесью фрагментов с M 75 и 43 кДа подвергали рехроматографии на иммуноаффинной колонке в условиях, аналогичных выделению EF-G.

Молекулярные массы фрагментов ограниченного трипсинолиза EF-G определяли при помощи электрофореза в ПААГ в присутствии SDS по Леммли [12], используя гели с линейным градиентом концентрации акриламида 9–25%.

Концентрации EF-G и его фрагментов измеряли спектрофотометрически, используя величины удельного поглощения при 280 нм ($A_{1\text{ см}}^{0,1\%}$) для EF-G, фрагментов с M 43 и 26 кДа равные 0,86; 0,95 и 0,58 соответственно. Эти значения были получены из данных аминокислотного анализа, а также при определении концентрации белка по Лоури [18] и Брэдфорду [19].

Определение N-концевых аминокислот осуществляли по методу Вайнера и др. [20]. Dns-производные аминокислот идентифицировали двухмерной тонкослойной хроматографией на пластинках с силикагелем (5×5 см) или полиамидных пластинок (5×5 см) (Pierce, США).

Для аминокислотного анализа (анализатор D-500, Durrum, США) образцы гидролизовали 5,7 н. HCl в течение 24 и 72 ч, при анализе триптофана — 4 н. раствором метансульфокислоты, содержащим 0,2% 3-(2-аминоэтил)индола.

Аминокислотные последовательности определяли на секвенаторе (созданном в Институте белка АН СССР) по программе, сходной с используемой в приборе модели 470A (Applied Biosystems, США).

Для титрования сульфгидрильных групп EF-G из *T. thermophilus* и его триптических фрагментов в качестве модифицирующих реагентов использовали CMB [21], DTNB [22] и DDP [23]. Реакционную способность сульфгидрильных групп определяли, снимая кинетическую зависимость хода модификации при 10-кратном молярном избытке реагента. При определении общего количества сульфгидрильных групп и измерении их доступности титрование проводили в присутствии 8 М гуанидингидрохлорида. Титрование сульфгидрильных групп DTNB осуществляли в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl, 1 мМ EDTA, pH 8,0, а титрование с помощью CMB и DDP — в 50 мМ фосфате калия, pH 7,2. Общий объем реакционной смеси во всех случаях был равен 1 мл.

Определение дисульфидных связей проводили тремя методами. 1. Для восстановления дисульфидных связей использовали сульфит натрия [24]. Реакционную смесь (1 мл), содержащую 20 мМ трис-HCl, 1 мМ EDTA, 6 М гуанидингидрохлорид, 0,2 М сульфит натрия, pH 8,0, и 500 мкг белка (6,25 нмоль), инкубировали 30 мин при 25°С. После инкубирования сум-

марное количество сульфгидрильных групп определяли титрованием с помощью СМВ. 2. В качестве восстанавливающего агента использовали дитионит натрия (Fluka, Швейцария) [25]. К инкубационной смеси (1 мл), содержащей 20 мМ трис-НСl, 1 мМ EDTA, 6 М гуанидингидрохлорид, рН 8,0 и 500 мкг белка, добавляли дитионит натрия до концентрации 0,2 М и равное по весу количество сухого трис-основания. После инкубирования в течение 20 мин при 25°С смесь титровали СМВ. 3. В качестве восстанавливающего агента использовали 2-меркаптоэтанол [26]. 10 нмоль белка инкубировали в течение 24 ч при 25°С в буфере, содержащем 20 мМ трис-НСl, 1 мМ EDTA, 6 М гуанидингидрохлорид, рН 8,0, и 150 ммоль 2-меркаптоэтанола, после чего смесь обессоливали на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной тем же буфером, но без 2-меркаптоэтанола, и суммарное количество SH-групп определяли титрованием с помощью СМВ и DPP.

Кажущиеся константы диссоциации (комплекса) EF-G и его фрагмента с СТР определяли при титровании комплекса белка или фрагмента с ANS (Sigma, США) увеличивающимися количествами GTP [27] при соотношении ANS/белок 30:1 в буфере, содержащем 20 мМ фосфат калия, рН 7,0 (концентрация белка 5 мкМ). Интенсивность флуоресценции ANS измеряли с помощью спектрофлуориметра SPF-1000 (Aminco, США) в стандартных кюветках (1×1 см) при 23°С. Длина волны возбуждающего света 400 нм, регистрации — 480 нм. Концентрацию ANS в растворе определяли спектрофотометрически, используя $\epsilon_{350} 4,95 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ [28].

ЛИТЕРАТУРА

1. Arai K., Ota Y., Arai N., Nakamura S., Henneka C., Oshima T., Kaziro Y. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 92. № 2. P. 509–519.
2. Arai K., Arai N., Nakamura S., Oshima T., Kaziro Y. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 92. № 2. P. 521–531.
3. Nakamura S., Ohta S., Arai K., Oshima T., Kaziro Y. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 92. № 2. P. 533–543.
4. Skar D. C., Rohrbach M. S., Bodley J. W. // Biochemistry. 1975. V. 14. № 17. P. 3922–3926.
5. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М., Овчинников Ю. А. // Биоорг. химия. 1977. Т. 3. № 10. С. 1333–1345.
6. Гарбер М. Б., Решетникова Л. С. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. № 11. С. 1572–1575.
7. Arai K., Kawakita M., Kaziro Y. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 21. P. 7029–7038.
8. Kaziro Y., Inoue-Yokosawa N., Kawakita M. // J. Biochem. 1972. V. 72. № 4. P. 853–863.
9. Alakhov Yu. B., Stengrevics O. A., Filimonov V. V., Venyaminov S. Yu. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 99. № 3. P. 585–591.
10. Alakhov Yu. B., Zalite I. K., Kashparov I. A. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 105. № 3. P. 531–538.
11. Kashparov I. A., Semisotnov G. V., Alakhov Yu. B. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 118. № 2. P. 417–421.
12. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
13. Girshovich A. S., Bochkareva E. S., Pozdnyakov V. A., Ovchinnikov Yu. A. // FEBS Lett. 1978. V. 85. № 2. P. 283–286.
14. Alakhov Yu. B., Motuz L. P., Stengrevics O. A., Ovchinnikov Yu. A. // FEBS Lett. 1978. V. 85. № 2. P. 287–290.
15. Arai N., Arai K., Nakamura S., Kaziro Y. // J. Biochem. 1977. V. 82. № 3. P. 695–702.
16. Lengel J. M., Archer R. H., Lindahl L. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 4. P. 2181–2192.
17. Pharmacia Fine Chemicals AB. Affinity Chromatography. Principles and Methods. Ljungföretagen AB. Örebro. Sweden. 1986. P. 15.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. Y., Farr A. L., Randall R. I. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
19. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254.
20. Weiner A. M., Platt T., Weber K. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 10. P. 3242–3251.
21. Riordan J. F., Vallee B. L. // Meth. Enzymol. 1972. V. 25. P. 442.
22. Habeeb A. F. S. II. // Meth. Enzymol. 1972. V. 25. P. 457–464.
23. Grassetti D. R., Murray J. F. // Arch. Biochem. and Biophys. 1967. V. 119. № 41. P. 41–49.
24. de Vries J. C., Kellogg R. M. // J. Org. Chem. 1980. V. 45. № 21. P. 4126–4129.
25. Cole R. D. // Meth. Enzymol. 1967. V. 11. P. 206–208.
26. White F. H. // Meth. Enzymol. 1967. V. 11. P. 480–482.

27. Arai N., Arai K., Kaziro J. // J. Biochem. 1975. V. 78. № 1. P. 243-246.
28. Arai N., Arai K., Kawakita M., Kaziro J. // J. Biochem. 1975. V. 77. № 5. P. 1095-1106.

Поступила в редакцию
4.VII.1988

SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES
OF THE ELONGATION FACTOR G FROM EXTREME THERMOPHILIC
BACTERIA *THERMUS THERMOPHILUS* HB8

KASHPAROV I. A., KLIMOVA I. A., ALAKHOV Yu. B.

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

A simplified procedure for isolation of the elongation factor G from *Thermus thermophilus* involving immunoaffinity chromatography has been developed. Trypsinolysis of the protein in the presence of 2.5 M urea yields fragments (mol. mass 75, 43 and 26 kDa) similar to fragments of EF-G from *E. coli*. Conditions of limited trypsinolysis and thiol group reactivity in the protein itself and in its tryptic fragments suggest that EF-G *T. thermophilus* is analogous to EF-G from *E. coli* in principal physico-chemical properties. Higher stability of the former to proteinases and modifying agents seems to be due to the increased compactness of the molecule and closer interaction of domains within the protein in the temperature range of 20-30°C. When this interaction is disturbed and/or the three-dimensional structure is destabilized, the thermophilic protein becomes quite similar to its analogue from *E. coli*.