



УДК 547.962

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА L25 ИЗ РИБОСОМ *E. COLI*
MRE-600, ВХОДЯЩЕГО В СОСТАВ 5S-РНК-БЕЛКОВОГО
КОМПЛЕКСА

*Алахов Ю. Б., Винокуров Л. М., Довгас Н. В.,
Маркова Л. Ф., Медникова Т. А., Мотуз Л. П.,
Кашипаров И. А., Овчинников Ю. А.*

Институт белка Академии наук СССР, Пушкино

Определена полная аминокислотная последовательность рибосомального белка L25, содержащего 94 аминокислотных остатка. Исследовались пептиды, полученные в результате триптического, ограниченного триптического и бромцианового гидролизом белка, а также пептиды, полученные при расщеплении бромциановых фрагментов бромсукцинимидом по остаткам тирозина. При этом автоматический анализ трех перекрывающихся крупных фрагментов позволил определить последовательность 82 аминокислотных остатков с N-конца молекулы белка.

В последнее время в ряде лабораторий интенсивно изучается функциональная роль отдельных структурных элементов рибосом как бактериального, так и животного происхождения. В частности, Монье и сотр. [1, 2] выделили из рибосом *E. coli* комплекс, содержащий белки L6, L18, L25 и рибонуклеиновые кислоты 5S и 23S. Причем L18 и L25 связаны с 5S-РНК, защищая в ней нуклеотидные последовательности 1—11 и 69—120. Комплекс, состоящий из 5S-РНК и двух рибосомальных белков L18 и L25, был реконструирован в бактериальных системах [3]. Наиболее прочно связывается с 5S-РНК белок L25 [4]. Было показано, что этот комплекс обладает активностью, гидролизующей АТФ и ГТФ [5].

В этой связи большой интерес представляет знание первичной структуры белков, входящих в состав 5S-РНК-белкового комплекса.

Ранее нами был разработан новый препаративный метод выделения индивидуальных белков из 70S-рибосом *E. coli* [6]. В развитие данных исследований мы предприняли изучение первичной структуры белка L25. Настоящая работа посвящена выяснению полной аминокислотной последовательности этого белка (см. также предварительное сообщение [7]).

Белок L25 был выделен из 70S-рибосом *E. coli* MRE-600, как описано ранее [6], с выходом около 80 мг из 10 г суммарного белка 70S-рибосом. По данным электрофореза, в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия белок L25 имеет M 11 500—12 000 [6, 8], не содержит остатков цистеина и триптофана. Для него определен следующий аминокислотный состав (молярные %) [9]: Asp — 8,6, Thr — 2,4, Ser — 2,8, Glu — 11,7, Pro — 4,7, Gly — 6,7, Ala — 11,6, Val — 8,5, Met — 3,0, Leu — 6,4, Ile — 4,9, Tyr — 3,5, Phe — 4,0, His — 3,0, Lys — 11,6, Arg — 6,7.

Полная аминокислотная последовательность белка L25

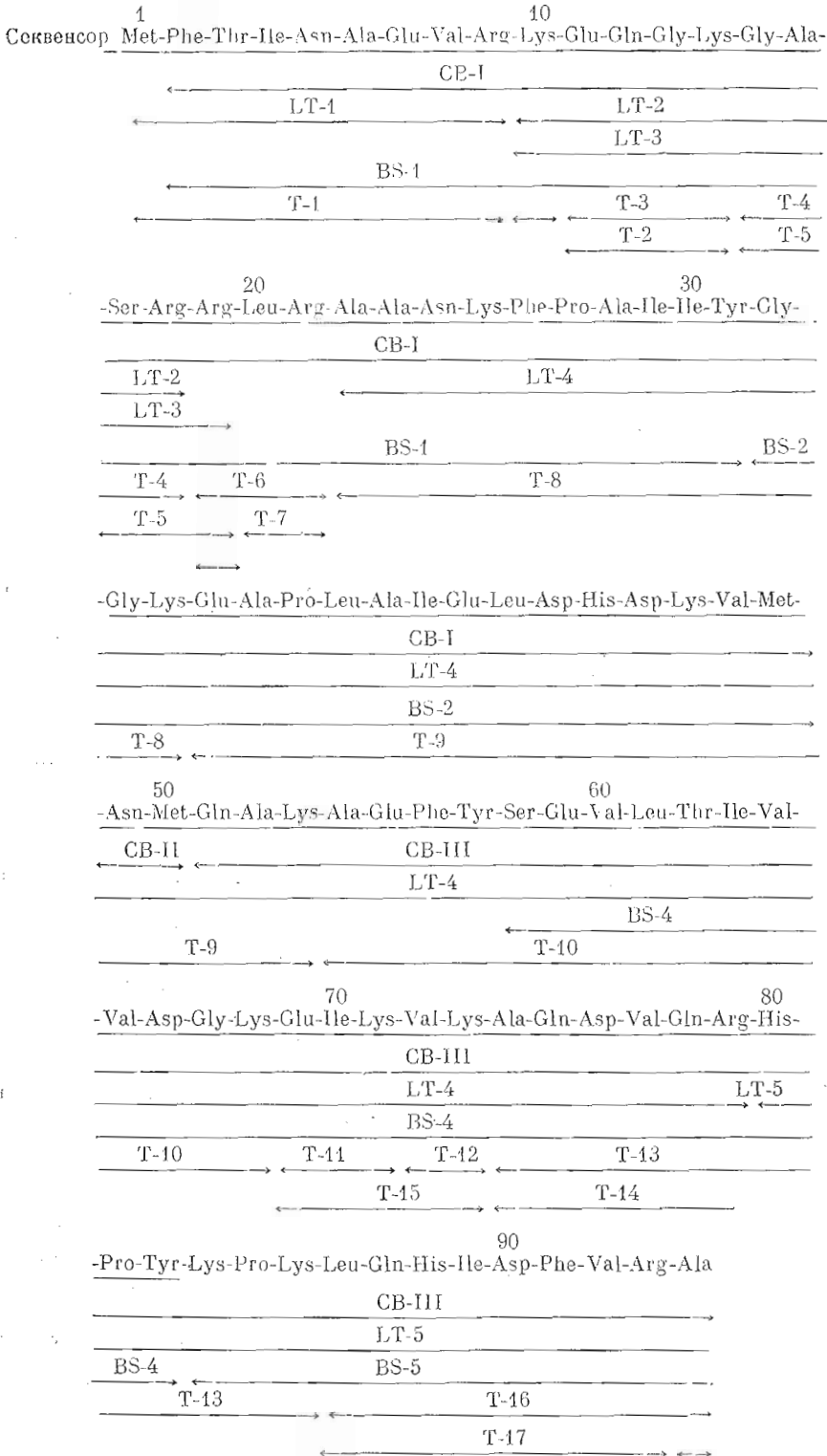


Таблица 1

Аминокислотный состав белка L25, фрагментов бромцианового расщепления (СВ) и пептидов (BS), полученных при расщеплении фрагментов СВ N-бромсукцинимидом
(в скобках приведены величины, вычисленные из структуры)

Аминокислота	Белок L25	Пептид СВ-I	Пептид СВ-III	Пептид BS-1	Пептид BS-2	Пептид BS-4	Пептид BS-5
Asp	8,6 (8)	4,0 (4)	3,2 (3)	1,9 (2)	2,2 (2)	2 (2)	1,3 (1)
Thr	2,3 (2)	0,8 (1)	0,9 (1)	0,9 (1)		1,5 (1)	
Ser	2,1 (2)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,1 (1)		1,0 (1)	
Glu	11,3 (12)	4,9 (5)	6,8 (7)	3,0 (3)	1,8 (2)	4,2 (4)	1,3 (1)
Pro	3,8 (4)	2,2 (2)	2,3 (2)	1,1 (1)	0,9 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)
Gly	4,8 (5)	4,0 (4)	1,2 (1)	2,2 (2)	2,3 (2)	1,5 (1)	
Ala	10,6 (11)	6,8 (7)	3,8 (4)	4,9 (5)	2,0 (2)	1,5 (1)	1,0 (1)
Val	8,3 (8)	2,0 (2)	5,7 (6)	0,9 (1)	0,9 (1)	3,8 (5)	0,6 (1)
Met	2,8 (3)	* (1)					
Ile	6,6 (7)	3,4 (4)	2,8 (3)	2,8 (3)	0,9 (1)	1,5 (2)	0,9 (1)
Leu	5,5 (5)	3,0 (3)	2,1 (2)	1,1 (1)	2,5 (2)	1 (1)	1,1 (1)
Tyr	2,5 (3)	0,8 (1)	1,8 (2)	* (1)		* (1)	
Phe	3,5 (4)	1,9 (2)	2,0 (2)	1,6 (2)			0,6 (1)
His	2,8 (3)	1,0 (1)	2,1 (2)		* (1)	* (1)	* (1)
Lys	11,6 (11)	5,2 (5)	6,6 (6)	3,1 (3)	2,0 (2)	3,5 (3)	2,4 (2)
Arg	6,0 (6)	4,1 (4)	2,2 (2)	3,8 (4)		1,1 (1)	0,7 (1)
Общее число остатков	(94)	(47)	(44)	(30)	(17)	(25)	(12)

* Не определялся.

Таблица 2

Аминокислотная последовательность пептидов N-бромсукцинимидного расщепления

Пептид	Аминокислотная последовательность
BS-1	Phe-Thr-Ile-Asn-Ala-Glu-Val-Arg-Lys-Glu-Gln-Gly-Lys-Gly-Ala-Ser-Arg-Arg-Leu-Arg-Ala-Ala-Asn-Lys-Phe-Pro-Ala-Ile-Ile-Tyr
BS-2	Gly-Gly-Lys-Glu-Ala-Pro-Leu-Ala-Ile-Glu-Leu-Asp-His-Asp-Lys-Val-Met
BS-4	Ser-Glu-Val-Leu-Thr-Ile-Val-Val-Asp-Gly-Lys-Glu-Ile-Lys-Val-Lys-Ala-Gln-Asp-Val-Gln-Arg-His-Pro-Tyr
BS-5	Lys-Pro-Lys-Leu-Gln-His-Ile-Asp-Phe-Val-Arg-Ala

Нами установлено, что N-концевой аминокислотный остаток белка — метионин, а С-концевая последовательность: -Phe-Val-Arg-Ala.

По данным определения молекулярного веса, полипептидная цепь белка содержит около 100 аминокислотных остатков и является поэтому удобным объектом для автоматического определения аминокислотной последовательности. На целой молекуле белка была определена N-концевая последовательность аминокислот до положения 35 (см. схему). Как оказалось, из трех остатков метионина один N-концевой. Поэтому для получения больших фрагментов и исследования их с помощью автоматического метода Эдмана проводилось расщепление белка по остаткам метионина бромцианом. Были получены три фрагмента СВ-I — СВ-III,

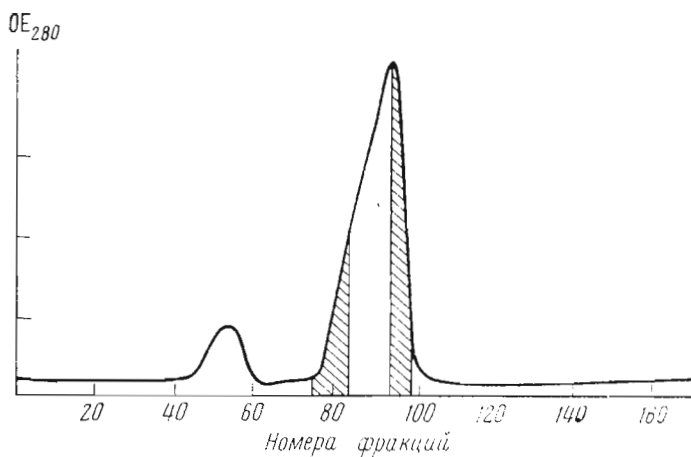


Рис. 1. Гель-фильтрация смеси фрагментов бромцианового расщепления на колонке с сефадексом G-50 в 0,01 н. HCl. Колонка 1,5 × 200 см. Скорость элюирования 5 мл/ч. Объем фракций 2,5 мл

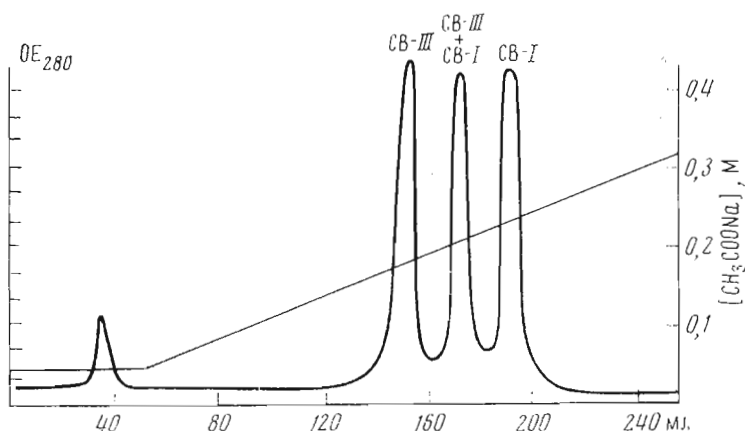


Рис. 2. Хроматография смеси фрагментов бромцианового расщепления на СМ-целлюлозе, уравновешенной 0,05 М натрий-ацетатным буфером при рН 5,6. Колонка 1,6 × 30 см. Градиент ацетата натрия от 0,05 до 4 М. Скорость элюирования 12 мл/ч

(см. табл. 1 и схему), которые удалось выделить в чистом виде после гель-фильтрации на сефадексе G-50 в 0,01 н. HCl (рис. 1), а также гомосерин, являющийся продуктом превращения N-концевого остатка метионина. Ввиду близости молекулярных весов пептидов СВ-I и СВ-III при гель-фильтрации на сефадексе не удается получить удовлетворительно разрешенные пики. Поэтому выделение чистых пептидов проводилось лишь после анализа N-концевых аминокислотных остатков в полученных фракциях. Фракции 76—83 содержали индивидуальный пептид СВ-I, а фракции 96—99 — СВ-III. Из последующих фракций был выделен дипептид СВ-II, имеющий структуры Asn-Hse. Фрагменты бромцианового расщепления СВ-I и СВ-III можно также разделить хроматографией на СМ-целлюлозе в градиенте концентрации ацетата натрия рН 5,6 (рис. 2). Однако при этом значении рН N-концевой остаток глутамина в пептиде СВ-III превращается в остаток пироглутаминовой кислоты, что исключает возможность дальнейшего изучения пептида деградацией по Эдману.

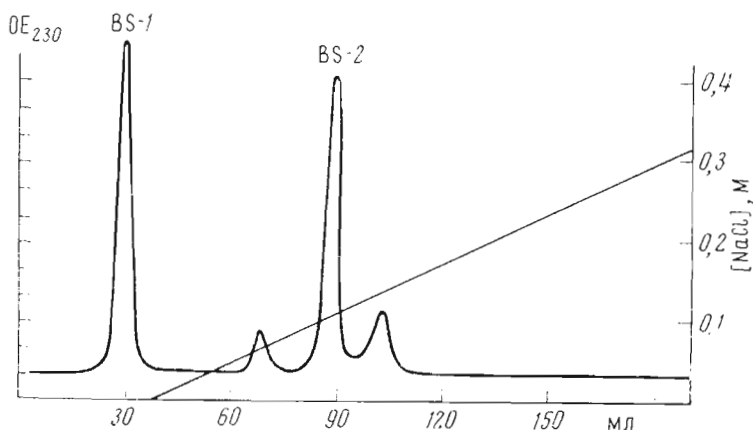


Рис. 3. Хроматография пептидов, полученных при расщеплении фрагмента СВ-I N-бромсукцинимидом на СМ-целлюлозе, уравновешенной 0,02 М натрий-фосфатным буфером, рН 7,0. Колонка 1,6 × 30 см. Градиент NaCl от 0 до 0,4 М. Скорость элюирования 12 мл/ч

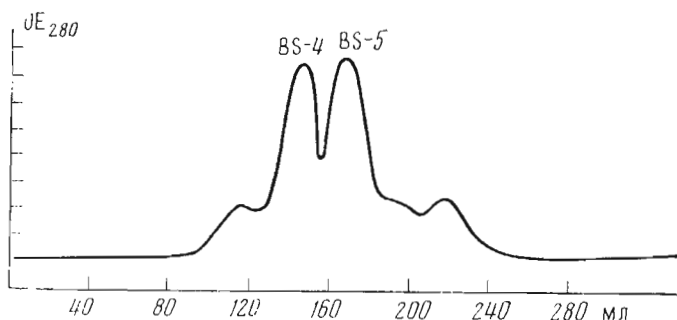


Рис. 4. Гель-фильтрация пептидов, полученных при расщеплении фрагмента СВ-III N-бромсукцинимидом на колонке 1,6 × 200 см с сефадексом G-50 в 0,01 н. HCl. Скорость элюирования 5 мл/ч

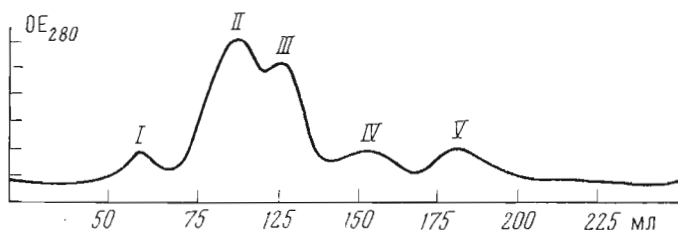


Рис. 5. Гель-фильтрация пептидов ограниченного триптического гидролиза на колонке 1,6 × 100 см с сефадексом G-50 в 0,01 н. HCl. Скорость элюирования 5 мл/ч

В пептиде СВ-I с помощью автоматического метода была установлена последовательность 35 аминокислотных остатков из 47 по данным аминокислотного анализа (см. табл. 1 и схему). Оказалось, что N-концевая последовательность фрагмента СВ-I совпадает с N-концевой последовательностью исходного белка с отщепленным N-концевым остатком метионина. Гидролиз с помощью карбоксипептидаз А и В показал, что фрагмент СВ-I имеет C-концевую последовательность -Lys-Val-Hse, а фрагмент СВ-III — -Phe-Val-Arg-Ala, идентичную C-концевой последовательности белка. Из вышеизложенного следует, что дипептид СВ-II заключен в молекуле белка между пептидами СВ-I и СВ-III. Автоматическая деградация по Эдману пептида СВ-III позволила установить последователь-

Аминокислотный состав пептидов ограниченного триптического гидролиза
(в скобках приведены величины, вычисленные из структуры)

Аминокислота	LT-1	LT-2	LT-3	LT-4	LT-5
Asp	1,1 (1)			6,0 (6)	1,3 (1)
Thr	0,8 (1)			0,8 (1)	
Ser		1,3 (1)	1,3 (1)	1,2 (1)	
Glu	1,2 (1)	1,9 (2)	2,0 (2)	8,1 (8)	1,3 (1)
Pro				1,8 (2)	2,0 (2)
Gly		2,2 (2)	2,1 (2)	2,8 (3)	
Ala	1,1 (1)	1,0 (1)	1,1 (1)	7,4 (8)	1,2 (1)
Val	0,9 (1)			4,8 (6)	0,8 (1)
Met	0,6 (1)			1,2 (2)	
Ile	0,8 (1)			4,6 (5)	1,0 (1)
Leu				3,0 (3)	1,3 (1)
Tyr				1,7 (2)	1,0 (1)
Phe	1,0 (1)			1,6 (2)	0,9 (1)
His				1,5 (1)	2,2 (2)
Lys		1,6 (2)	1,6 (2)	8,17 (7)	2,2 (2)
Arg	1,0 (1)	1,0 (1)	1,6 (2)	1,1 (1)	1,0 (1)
Общее число остатков	(9)	(9)	(10)	(58)	(15)

Таблица 4

Аминокислотная последовательность пептидов ограниченного триптического гидролиза

Пептид	Аминокислотная последовательность
LT-1	Met-Phe-Thr-Ile-Asn-Ala-Glu-Val-Arg
LT-2	Lys-Glu-Gln-Gly-Lys-Gly-Ala-Ser-Arg
LT-3	Lys-Glu-Gln-Gly-Lys-Gly-Ala-Ser-Arg-Arg
LT-4	Ala-Ala-Asn-Lys-Phe-Pro-Ala-Ile-Ile-Tyr-Gly-Gly-Lys-Glu-Ala-Pro-Leu-Ala-Ile-Glu-Leu-Asp-His-Asp-Lys-Val-Met-Asn-Met-Gln-Ala-Lys-Ala-Glu-Phe-Tyr-Ser-Glu-Val-Leu-Thr-Ile-Val-Val-Asp-Gly-Lys-Glu-Ile-Lys-Val-Lys-Ala-Gln-Asp-Val-Glu-Arg
LT-5	His-Pro-Tyr-Lys-Pro-Lys-Leu-Gln-His-Ile-Asp-Phe-Val-Arg-Ala

ность 32 аминокислотных остатков (из 44 по данным аминокислотного анализа — см. табл. 1 и схему).

Фрагмент СВ-I содержит единственный остаток тирозина в положении 30. Расщепление молекулы по этому остатку N-бромсукцинимидом позволило изучить аминокислотную последовательность C-концевого участка фрагмента СВ-I. Реакционная смесь после расщепления пептида СВ-I N-бромсукцинимидом была разделена на СМ-целлюлозе в натрий-фосфатном буфере при pH 7,0 (рис. 3). Полученные пептиды (BS) обессоливали гель-фильтрацией на сефадексе G-25 в 0,01 н. HCl. Пептид BS-1 (табл. 1, 2, схема), представляющий собой N-концевой участок пептида СВ-I, имел уже известную последовательность. Автоматическая деградация по Эдману пептида BS-2, модифицированного реагентом Браунитцера (см. «Экспериментальную часть») позволила в совокупности с уже имеющимися данными представить полную структуру фрагмента СВ-I.

Фрагмент СВ-III также был расщеплен N-бромсукцинимидом по имеющимся в нем двум остаткам тирозина. Полученные пептиды разделялись гель-фильтрацией на сефадексе G-50 в 0,01 н. HCl (рис. 4). N-концевой

Рис. 6. Пептидная карта пептидов триптического гидролизата белка L25 на пластинке 20×20 см с тонким слоем целлюлозы. В первом направлении использовали электрофорез в 1%-ном пиридин-ацетатном буфере при pH 3,5, во втором — хроматографию в системе бутанол — пиридин-ацетат — вода (1 : 1 : 1), pH 5,4

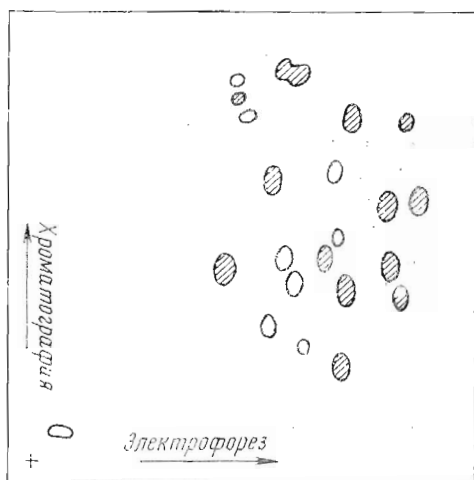


Рис. 6

Рис. 7. Гель-фильтрация продуктов триптического гидролизата белка L25 на сефадексе G-25 в 50%-ной муравьиной кислоте. Колонка $1,8 \times 150$ см. Скорость элюирования 10 мл/ч

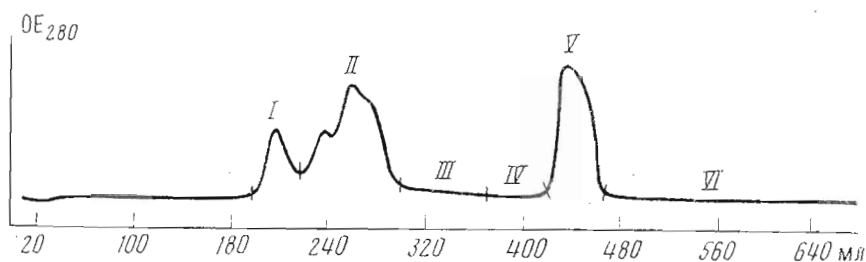


Рис. 7

пептид, имеющий пироглутаминовую кислоту на N-конце, не был выделен. Следующий за ним пептид BS-4 не представлял интереса, поскольку включал уже известную последовательность. Пептид BS-5 исследовался с помощью деградации по Эдману с идентификацией аминокислот в виде их Dns-производных (дансил-модификация), в результате установили последовательность девяти аминокислотных остатков. Таким образом была расшифрована полная структура пептида СВ-III.

Поскольку средняя часть белковой молекулы (с положения 22 до положения 79) не содержит остатков аргинина, представлялось интересным расщепить белок только по остаткам аргинина, чтобы исследовать пептид, перекрывающий фрагменты бромцианового расщепления. Для блокирования остатков лизина использовали цитраконовый ангидрид. Смесь пептидов (LT) после гидролиза трипсином цитраконалированного белка разделяли на сефадексе G-50 в 0,01 н. HCl (рис. 5). Повторной гель-фильтрацией фракции II в тех же условиях выделили пептид LT-4 (табл. 3 и 4). Пептиды, входящие во фракцию III, далее были разделены хроматографией и высоковольтным электрофорезом на бумаге. Таким образом выделили пептиды LT-1, LT-2, LT-3 и LT-5 (табл. 3 и 4). Пептиды LT-1, LT-2 и LT-3 не представляли интереса, так как содержали уже известную последовательность. Пептид LT-4 подвергался автоматической деградации по Эдману, в результате чего была установлена последовательность 36 аминокислотных остатков (положения 22—57 в молекуле белка) и сделано перекрытие всех трех фрагментов бромцианового расщепления. Пептид LT-5 исследовался деградацией по Эдману (дансил-модификация). Было установлено положение девяти аминокислотных остатков, подтвердивших структуру фрагмента СВ-III.

Таким образом была установлена полная аминокислотная последовательность белка L25 (см. схему). Данные, полученные при исследовании крупных фрагментов, были подтверждены изучением структуры продуктов триптического гидролиза молекулы белка.

После расщепления белка трипсином в гидролизате методом пептидных карт было обнаружено 22 пятна (рис. 6). Гидролизат подвергался гель-фильтрации на сефадексе G-25 в 50%-ной муравьиной кислоте (рис. 7). Полученные фракции проанализированы с помощью ТСХ на целлюлозе и методом пептидных карт. Все фракции, кроме VI, представляли собой смеси пептидов. Фракция VI содержала аланин. Фракции II и V подвергались хроматографии на ионообменной смоле аминекс А-5 или аминекс А-6 в градиенте концентрации и рН пиридин-ацетатного буфера (рис. 8 и 9). Объединенные фракции, полученные в результате разделения, исследовались с помощью ТСХ на целлюлозе. Оказалось, что фракции II-6 и II-17 из смеси II, а также фракции V-4 и V-6 из смеси V представляли собой гомогенные пептиды Т-9, Т-10, Т-11, Т-7 соответственно (см. схему и табл. 5 и 6), в то время как остальные имели более сложный состав. Фракция V-5 содержала только одну аминокислоту — аргинин. Для выделения индивидуальных пептидов далее использовались ТСХ и высоковольтный электрофорез на бумаге. Таким образом, из триптического гидролизата белка L25 было выделено 17 пептидов и три индивидуальных аминокислоты Ala, Lys и Arg, в том числе из фракции II (рис. 7) — пептиды Т-8, Т-9, Т-10, Т-13, Т-16 и Т-17; из фракции III — пептиды Т-1, Т-2, Т-5, Т-6, Т-14 и Т-15; из фракции IV — пептиды Т-4, Т-7, Т-12; из фракции V — пептиды Т-3, Т-7, Т-11, Т-12, а также аргинин и лизин. Оценка гомогенности выделенных пептидов проводилась как хроматографически, так и определением их N-концевых аминокислотных остатков. Результаты аминокислотного анализа и последовательности триптических пептидов приведены в табл. 5 и 6.

Необходимо отметить, что пептид Т-10 может быть выделен с выходом 90% при подкислении триптического гидролизата до рН 4.

Пептид Т-16 — С-концевой, что доказано определением его строения по методу Эдмана (дансил-модификация) и С-концевой последовательности при помощи карбоксипептидаз А и В. При определении С-концевой последовательности в пептиде Т-16 было обнаружено, что содержание аланина занижено по сравнению с ожидаемым. По-видимому, пептид Т-16 содержит в качестве примеси пептид Т-17. Структура пептида Т-16 была установлена без разделения этих пептидов. Аминокислотные последовательности выделенных пептидов определялись методом Эдмана и его дансил-модификацией. Структура пептида Т-10 была также устанавливаема методом автоматической дегградации по Эдману с использованием реагента Браунитцера. Результаты представлены в табл. 5 и 6.

Таким образом, с помощью автоматического анализа исходного белка и его фрагментов установлена последовательность аминокислотных остатков 1—82 (см. схему). Последовательность 83—94 найдена в результате исследования методом Эдмана пептидов LT-5, Т-16 и BS-5, а также определением четырех С-концевых аминокислот в молекуле белка и фрагменте СВ-III бромцианового расщепления. Точный *M* белка 10 681, полипептидная цепь состоит из 94 аминокислотных остатков и имеет следующий аминокислотный состав: Asp₅, Asn₃, Thr₂, Ser₂, Glu₇, Gln₅, Pro₄, Gly₅, Ala₁₁, Val₈, Met₃, Ile₇, Leu₅, Tyr₃, Phe₄, His₃, Lys₁₁, Arg₆.

При проведении триптического гидролиза оказались неполностью расщепленными связи -Lys-Phe-(25, 26), -Lys-Val-(46, 47), -Lys-Val-(71, 72), -Arg-His-(79, 80), -Lys-Pro-(83, 84), что в ряде случаев дало дополнительные перекрытия фрагментов триптического гидролиза.

Таким образом, установлена первичная структура белка L25. Это позволит в дальнейшем получить дополнительные данные о взаимодействии белок — РНК в рибосоме.

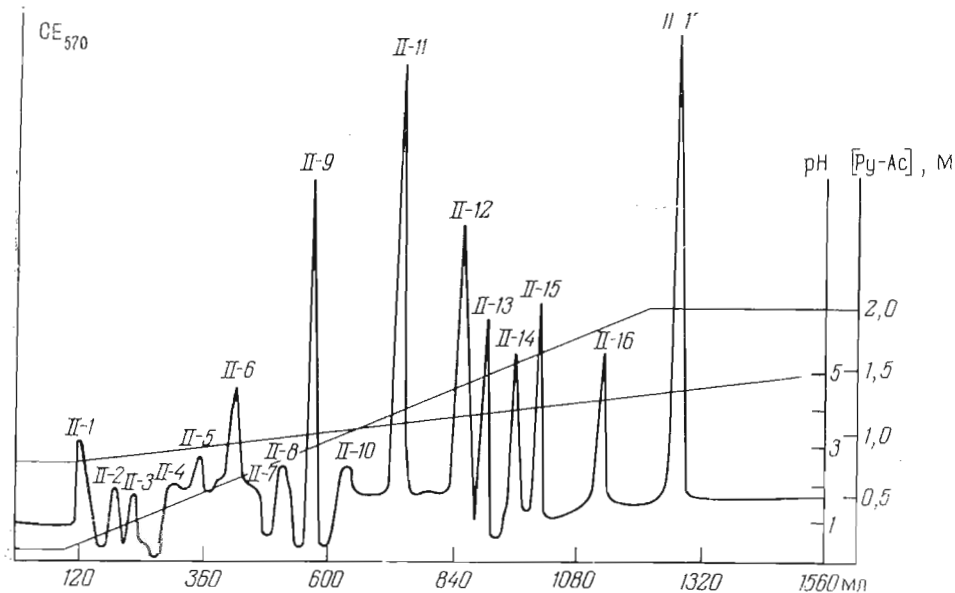


Рис. 8. Хроматография фракции II (см. рис. 7) на колонке $0,9 \times 58$ см с аминоксом А-6. Разделение пептидов проводили в градиенте концентрации пиридин-ацетата и рН: 600 мл 0,05 М пиридин-ацетата, рН 2,5—600 мл 2 М пиридин-ацетата, рН 5,0. Скорость элюирования 20 мл/ч. Объем фракции 3,5 мл

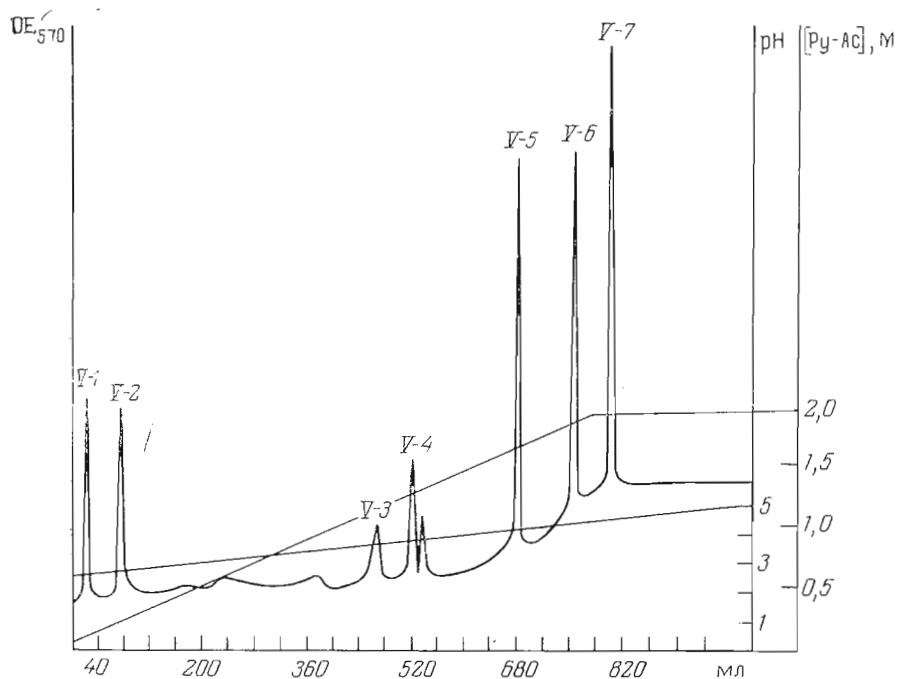


Рис. 9. Хроматография фракции V (см. рис. 7) на колонке $0,9 \times 58$ см с аминоксом А-5. Разделение пептидов проводили в градиенте концентрации пиридин-ацетата и рН: 400 мл 0,05 М пиридин-ацетата, рН 2,5—400 мл 2 М пиридин-ацетата, рН 5,0. Скорость элюирования 20 мл/ч, объем фракции 3,5 мл

Аминокислотный состав пептидов триплического гидролиза
(в скобках приведены величины, вычисленные из структуры)

Аминокисло- та	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8	T-9	T-10	T-11	T-12	T-13	T-14	T-15	T-16
Asp	1,3(1)							0,7(1)	2,8(3)	1,2(1)			1,2(1)	1,0(1)		1,2(1)
Thr	1,0(1)			0,4(1)						0,9(1)						
Ser					1,0(1)				2,5(3)	1,4(1)						
Glu	1,3(1)	1,7(2)	2,2(2)					1,7(1)	0,8(1)	2,0(2)	1,1(1)		2,4(2)	2,0(2)	1,5(1)	1,1(1)
Pro								2,0(2)					2,0(2)			
Gly		1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)			4,3(3)	2,8(3)	1,5(1)			1,0(1)	1,0(1)		
Ala	1,3(1)			1,0(1)					1,0(1)	1,0(1)			1,0(1)	0,8(1)		1,2(1)
Val	1,1(1)			1,0(1)					1,0(1)	2,8(3)			1,0(1)	1,0(1)		1,1(1)
Met	0,6(1)								1,4(2)							
Ile	1,0(1)							2,2(2)	1,1(1)	1,0(1)						0,9(1)
Leu						1,0(1)	1,0(1)		1,9(2)	0,8(1)						0,9(1)
Tyr								0,8(1)		0,7(1)			0,9(1)			
Phe	1,0(1)							0,8(1)		0,7(1)						0,8(1)
His									1,3(1)				1,0(1)			0,9(1)
Lys		2,8(2)	1,3(1)		1,9(2)	2,3(2)	0,9(1)	3,1(2)	2,3(2)	1,2(1)	0,9(1)	1,0(1)	1,7(2)	1,8(2)		
Arg	0,9(1)			0,9(1)									1,0(1)	1,0(1)		1,0(1)
Общее число остатков	(9)	(5)	(3)	(4)	(5)	(3)	(2)	(13)	(19)	(15)	(3)	(2)	(12)	(6)	(5)	(9)

Экспериментальная часть

Аминокислотный анализ. Пробы белка или пептидов гидролизovali 5,7 н. HCl в течение 24 и 72 ч при 110°. Аминокислотный анализ проводили на аминокислотном анализаторе BC-201 «Biocal» (ФРГ).

Определение N- и C-концевых аминокислот. N-концевые аминокислоты пептидов определяли дансильным методом с идентификацией Dns-аминокислот с помощью ТСХ на силикагеле [10, 11], C-концевые аминокислоты — с помощью карбоксипептидаз А и В («Worthington», США) [12].

Расщепление белка по остаткам метионина бромцианом. Навеску белка (5 мкмоль) растворяли в 7 мл 70%-ной муравьиной кислоты, смешивали с 250 мг свежеевозогнанного бромциана («Serva», ФРГ) и оставляли в темноте при комнатной температуре на 20 ч. Затем смесь разбавляли водой до 70 мл и лиофилизovali. Разделение полученных фрагментов СВ приведено на рис. 1, 2, аминокислотный состав — в табл. 1.

Расщепление пептидов СВ-I и СВ-III по остаткам тирозина N-бромсукцинимидом [13]. К раствору пептида ВС-I (0,8 мкмоль) или ВС-III (1,2 мкмоль) в 2 мл 50%-ной уксусной кислоты добавляли N-бромсукцинимид (перекристаллизованный из воды) в 2 мл 50%-ной уксусной кислоты в количестве 3 мкмоль на каждый остаток тирозина и 2 мкмоль на каждый остаток гистидина, содержащийся в пептиде. Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при 20°, а затем обессоливали на сефадексе G-25 в 0,01 н. HCl. Разделение полученных пептидов BS-1 — BS-5 приведено на рис. 3, 4, их аминокислотный состав и последовательность — в табл. 1, 2.

Цитракоилирование белка [14]. К 2 мкмоль белка, растворенного в 4 мл 0,2 М Na-боратного буфера (pH 8,4), небольшими порциями в течение 1 ч добавляли 100 мкл цитраконового ангидрида. pH раствора поддерживали в интервале 8,3—8,7 добавлением 2 М раствора NaOH. Затем цитракоилированный белок обессоливали на колонке с сефадексом G-25 в разбавленном NH₄OH (pH 8,3) и лиофилизovali.

Триптический гидролиз. 40 мг (5 мкмоль) белка растворяли в воде и белок денатурировали нагреванием при 90° в течение 5 мин. После ох-

Таблица 6

Аминокислотная последовательность пептидов триптического гидролиза

Пептид	Аминокислотная последовательность
T-1	Met-Phe-Thr-Ile-Asn-Ala-Glu-Val-Arg
T-2	Lys-Glu-Gln-Gly-Lys
T-3	Glu-Gln-Gly-Lys
T-4	Gly-Ala-Ser-Arg
T-5	Gly-Ala-Ser-Arg-Arg
T-6	Arg-Leu-Arg
T-7	Leu-Arg
T-8	Ala-Ala-Asn-Lys-Phe-Pro-Ala-Ile-Ile-Tyr-Gly-Gly-Lys
T-9	Glu-Ala-Pro-Leu-Ala-Ile-Glu-Leu-Asp-His-Asp-Lys-Val-Met-Asn-Met-Gln-Ala-Lys
T-10	Ala-Glu-Phe-Tyr-Ser-Glu-Val-Leu-Thr-Ile-Val-Val-Asp-Gly-Lys
T-11	Glu-Ile-Lys
T-12	Val-Lys
T-13	Ala-Glu-Asp-Val-Gln-Arg-His-Pro-Tyr-Lys-Pro-Lys
T-14	Ala-Gln-Asp-Val-Gln-Arg
T-15	Glu-Ile-Lys-Val-Lys
T-16	Leu-Gln-His-Ile-Asp-Phe-Val-Arg-Ala

Данные изучения последовательности на секвенсоре

Шифр	Кол-во мкмоль	Общее число остатков	Число пройденных остатков	Программа *	Модификация
Белок	0,3	94	35	Медленная белковая	—
СВ-I	0,3	47	35	Быстрая пептидная**	—
СВ-III	0,4	44	32	Медленная пептидная**	—
LT-4	0,4	58	36	То же	—
BS-2	0,15	17	12	»	Реагент Браунитцера
T-10	0,1	15	12	»	То же

* Руководство по использованию секвенсора модель 890С («Beckman», США).

** С применением диметилаллиллина.

лаждения до 37° рН раствора доводили до 8,3 и добавляли трипсин (ТРСЖ, обработанный тозилфенилаланилхлорметилкетонном — «Serva», ФРГ) при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу). Трипсин добавляли двумя равными порциями. Вторая порция была добавлена через 4 ч после начала гидролиза. В ходе гидролиза (14 ч) рН среды (8,3) поддерживали с помощью автотитратора («Radiometer», Дания) насыщенным водным раствором триэтиламина. По окончании гидролиза смесь подкисляли до рН 3,0 и лиофилизовали. Аналогично проводили триптический гидролиз цитраконилированного белка. Разделение пептидов Т-1—Т-16 приведено на рис. 7—9, их аминокислотный состав и последовательность — в табл. 5, 6.

Удаление цитраконильной защитной группы после проведения триптического гидролиза. Цитраконильную группу с пептидов триптического гидролиза удаляли сразу после ферментативного гидролиза подкислением смеси до рН 3,5 и выдерживанием при комнатной температуре в течение 5 ч. Разделение пептидов ограниченного триптического гидролиза LT-1—LT-5 см. на рис. 5, их аминокислотный состав и последовательность — в табл. 3, 4.

Пептидные карты. Пептидные карты пептидов триптического гидролиза белка и триптических пептидов бромциановых фрагментов выполняли на пластинах 20 × 20 см с тонким слоем целлюлозы «Whatman» No. 300. В первом направлении использовали хроматографию в системе бутанол — пиридин-ацетат — вода (1 : 1 : 1), рН 5,4 [15], во втором направлении — электрофорез в пиридин-ацетатном буфере при рН 3,5 в течение 1 ч; напряжение 880 В, ток 50 мА. Пептиды обнаруживали опрыскиванием пластин 0,4%-ным раствором нингидрина в ацетоне с последующим нагреванием до 40°. Для обнаружения пептидов, содержащих аргинин, пластинки опрыскивали реактивом Сакагучи (рис. 6).

Препаративное разделение пептидов триптического и ограниченного триптического гидролизом на бумаге. Нисходящую хроматографию пептидов проводили на бумаге «Whatman 3 mm» в системе бутанол — пиридин-ацетон — вода (1 : 1 : 1), рН 5,4. Высоковольтный электрофорез проводили в пиридин-ацетатных системах при рН 3,5 и 6,5, при напряжении 2500 В в течение 1 ч. Пептиды обнаруживали после обработки узких полос хроматограммы или фореграммы нингидрином. Найденные пептиды элюировали с бумаги 10%-ной уксусной кислотой или 1%-ным аммиаком.

Установление аминокислотной последовательности в пептидах. Определение аминокислотной последовательности белка и пептидов в автоматическом варианте проводили на автоматическом секвенсоре фирмы «Beck-

man» (США), модель 890 С. Используемые в работе программы приведены в табл. 7. Идентификацию фенилтиогидантоилпроизводных аминокислот производили на газовом хроматографе «Varian 2100» (США) с колонкой, заполненной носителем SP-400, а также с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках 6×6 см с закрепленным слоем силикагеля. Пептиды BS-2 и T-10 перед автоматической деградацией модифицировали 3-изотиоцианат-1,5-нафталиндисульфокислотой (реагент Браунитцера) [16] непосредственно в ячейке. К высушенному пептиду (0,1 мкмоль) добавляли 0,3 мкм дисульфонафтилизотиоцианата в 0,4 мл H_2O . После высушивания добавляли диметилаллиламиновый буфер (рН 9,5) и выдерживали 1,5 ч при 58° . Для поддержания постоянного объема через каждые 20 мин добавляли новую порцию буфера. Затем реакционную смесь высушивали и выдерживали в 20%-ном метиламине в течение 20 мин. После высушивания проводили 20-минутную промывку хлорбутаном с последующим высушиванием.

Ручной вариант метода Эдмана (дансил-модификация) проводили по методу [17] с некоторыми изменениями. 0,05—0,03 мкмоль пептида растворяли в 60 мкл 50%-ного водного пиридина. К полученному раствору добавляли 60 мкл 5%-ного раствора фенилизотиоцианата в пиридине. Пробирку замораживали, вакуумировали, заполняли азотом, размораживали, встряхивали, снова замораживали и вакуумировали. Операцию повторяли трижды и затем пробирку термостатировали при 45° в течение 1 ч. Раствор высушивали в вакууме 30 мин при 60° . К остатку добавляли 60 мкл трифторуксусной кислоты, насыщали азотом, как описано выше, и термостатировали 30 мин при 45° . После высушивания в вакууме (15 мин при 60°) к остатку добавляли 100 мкл воды и проводили трехкратное экстрагирование 50 мкл этилацетата. Для лучшего разделения слоев смесь центрифугировали 5 мин при 6000 об/мин. Из водной фазы отбирали 0,003 мкмоль пептида для дансилирования. Оставшийся водный раствор пептида высушивали и подвергали дальнейшей деградации. Аликвоту для дансилирования высушивали в ампуле, растворяли в 15 мкл 0,1 М бикарбоната натрия, добавляли 15 мкл дансилхлорида в ацетоне (3 мг/мл) и инкубировали при 37° 1 ч. Раствор высушивали, к остатку добавляли 30 мкл 5,7 н. HCl и гидролизовали при 105° 4 или 18 ч. Идентификацию дансилпроизводных аминокислот проводили методом двумерной ТСХ на пластинках 6×6 см с закрепленным слоем силикагеля [10, 11]. Деградацию некоторых пептидов проводили по прямому методу Эдмана [18], с идентификацией фенилтиогидантоилпроизводных аминокислот на пластинках 6×6 см с закрепленным слоем силикагеля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gray P. N., Bellemare G., Monier R. (1972) FEBS Lett., **24**, 156—160.
2. Gray P. N., Garrett R. A., Stöffler G., Monier R. (1972) Eur. J. Biochem., **28**, 412—421.
3. Horne J. R., Erdmann V. A. (1972) Mol. and Gen. Genet., **119**, 337—344.
4. Garrett R. A., Schulte C., Stöffler G., Gray P., Monier R. (1974) FEBS Lett., **49**, 1—4.
5. Horne J. R., Erdmann V. A. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**, 2870—2873.
6. Алахов Ю. Б., Медникова Т. А., Мотуз Л. П., Маркова Л. Ф., Довгас Н. В., Кампаров И. А., Овчинников Ю. А. (1975) Биоорг. химия, **5**, 581—587.
7. Винокуров Л. М., Довгас Н. В., Маркова Л. Ф., Медникова Т. А., Алахов Ю. Б., Овчинников Ю. А. (1975) Биоорг. химия, **4**, 563—566.
8. Dzionara M., Kaltschmidt E., Wittmann H. G. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **67**, 1907—1913.
9. Kaltschmidt E., Dzionara M., Wittmann H. G. (1970) Mol. and Gen. Genet., **109**, 292—297.
10. Белецкий Б. Г., Ганкина Е. С., Прянишникова С. Р., Эрастов Д. П. (1967) Молекулярн. биология, **1**, 184—189.
11. Белецкий Б. Г., Ганкина Е. С., Нестеров В. В. (1967) Докл. АН СССР, **172**, 91—93.
12. Ambler R. (1967) In Methods in Enzymol., **XI**, pp. 155—156, Acad. Press, N. Y.—London.

13. Ramachandran L. K., Witkop B. (1967) In *Methods in Enzymol.*, XI, 283—299, Acad. Press, N. Y.—London.
14. Kolb E., Harris J. J., Bridgen J. (1974) *Biochem. J.*, **137**, 185—197.
15. Schachner M., Zillig W. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **22**, 513—519.
16. Braunitzer G., Schrank B., Ruhfus A. (1971) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **352**, 1730—1733.
17. Gray W. R. (1972) In *Methods in Enzymol.*, XXV, pp. 121—138, Acad. Press, N. Y.—London.
18. Sauer R. T., Niall H. D., Hogan M. L., Keutmann H. T., O'Riordan J. L. H., Potts J. T. (1974) *Biochemistry*, **13**, 1994—1999.

Поступила в редакцию
7. VIII. 1975

THE PRIMRY STRUCTURE OF THE RIBOSOMAL PROTEIN L25 FROM
E. COLI MRE-600 RIBOSOMES CONTAINED
IN THE 5 S RNA PROTEIN COMPLEX

ALAKHOV Yu. B., VINOKUROV L. M., DOVGAS N. V.,
MARKOVA L. F., MEDNIKOVA T. A., MGTUZ L. P.,
KASHPAROV I. A., OVCHINNIKOV Yu. A.

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

The complete amino acid sequence of the ribosomal protein L25 containing 94 amino acid residues has been determined. A study was made of the peptides obtained on tryptic, limited tryptic and cyanogen bromide hydrolysis of the protein, as well as peptides obtained by cleavage of the cyanogen bromide fragments with bromosuccinimide at the tyrosine residues. An automated analysis of the three large overlapping fragments gave a sequence of 82 amino acid residues from the N-terminus of the protein molecule.
