



УДК 547.962

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА РИБОСОМАЛЬНОГО БЕЛКА L32
ИЗ РИБОСОМ *E. COLI* MRE-600*Винокуров Л. М., Алахов Ю. Б., Голов Е. А.,
Овчинников Ю. А.**Институт белка Академии наук СССР, Пушкино*

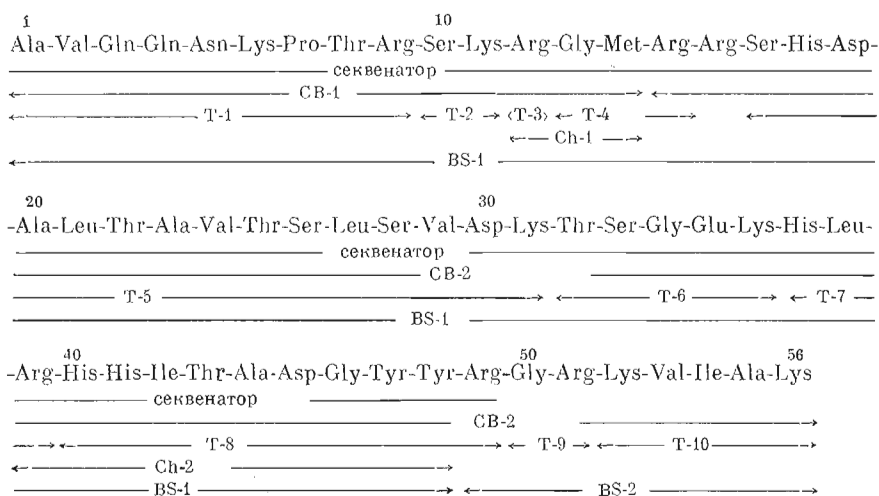
Приведена первичная структура рибосомального белка L32. Автоматическим методом Эдмана установлена аминокислотная последовательность 49 остатков. Исследовались продукты триптического, химотриптического, а также бромсукцинимидного расщеплений.

Основной белок L32 (pI11,3) [1] входит в состав большой субъединицы рибосомы. Поскольку белок содержит большое количество остатков аргинина и имеет сравнительно небольшой молекулярный вес, представлялось вероятным успешно использовать его как объект для изучения методических приемов установления первичной структуры, основанных на преимущественном использовании автоматического метода Эдмана. Недавно была опубликована первичная структура этого белка [2], однако мы считаем целесообразным опубликовать данные нашей работы, так как они получены с помощью иного методического подхода к установлению первичной структуры небольших белков.

Белок L32 был выделен по ранее описанному методу [3]. По данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия мол.вес белка 10 000—10 500 [3], а по уточненным нами данным — около 7000. Для него был определен следующий аминокислотный состав (молярные %): Asp 7,33; Thr 8,09; Ser 9,06; Glu 6,79; Pro 2,69; Gly 10,24; Ala 8,73; Val 6,25; Met 1,85; Ile 3,50; Leu 5,60; Tyr 3,77; His 5,82; Lys 10,67; Arg 12,08.

Прежде всего было установлено, что N-концевым остатком белка является Ala, а C-концевая последовательность, определенная с помощью карбоксипептидаз А и В, такова: (-Gly, Tyr₂, Arg₂)Lys-Val-Ile-Ala-Lys. Применение автоматического метода деградации по Эдману позволило на целой молекуле белка определить N-концевую последовательность до аминокислотного остатка в положении 29 (см. схему). Причем оказалось, что в положении 14 находится единственный в молекуле белка остаток метионина. Провели расщепление молекулы белка бромцианом и полученную смесь двух пептидов без разделения подвергли автоматической деградации по Эдману. В результате удалось установить аминокислотную последовательность до аминокислотного остатка в положении 49 (см. схему), за исключением аминокислот в положениях 26 и 33, 25 и 43, 40 и 41. Для установления неясных мест в полученной структуре, а также определения аминокислотной последовательности C-концевого участка моле-

Полная аминокислотная последовательность белка L32



T, Ch, CB, BS — пептиды триптического, химотриптического гидролиза, бромцианового и N-бромсукцинимидного расщепления.

кула белка была расщеплена трипсином, химотрипсином и N-бромсукцинимидом по остаткам тирозина. Пептиды триптического и химотриптического гидролизатов были выделены с помощью хроматографии и электрофореза на бумаге (см. рис. 1, табл. 1 и 2). Их анализ по Эдману с идентификацией дансилпроизводных подтвердил структуру, полученную с помощью автоматического метода, и позволил уточнить аминокислоты в перечисленных выше положениях. После расщепления молекулы белка N-бромсукцинимидом смесь пептидов разделяли на сефадексе G-25 в 0,01 н. HCl. Были выделены два фрагмента, соответствующие разрыву полипептидной цепи по остаткам тирозина в положениях 47 и 48 (см. рис. 2).

Фрагмент BS-1 интереса не представлял, поскольку включал уже известную последовательность, а исследование фрагмента BS-2 методом Эдмана (дансил-модификация) позволило определить аминокислотную последовательность С-концевого участка молекулы белка. Кроме того, структура С-концевого участка была подтверждена исследованием структуры триптических пептидов T-7 и T-8 (см. схему и табл. 2).

Таблица 1
Аминокислотный состав пептидов триптического (T), химотриптического (Ch) и N-бромсукцинимидного (BS) гидролизатов

	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8	T-9	T-10	Ch-1	Ch-2	BS-2
Asp	0,9(1)				2,1(2)			1,0(1)					1,0(1)
Thr	1,0(1)				1,0(2)	1,1(1)		0,9(1)					1,2(1)
Ser		1,0(1)			2,2(3)	0,9(1)							
Glu	2,0(2)					1,4(1)							
Pro	1,5(1)												
Gly				1,4(1)		1,5(1)		1,4(1)	1,0(1)		1,1(1)	1,5(1)	1,2(1)
Ala	1,6(1)				1,9(2)			1,4(1)		1,4(1)	1,3(1)		1,4(1)
Val	1,8(1)				1,9(2)					1,4(1)			1,5(1)
Met				1,2(1)							0,9(1)		
Ile								1,2(1)		1,0(1)		1,2(1)	1,0(1)
Leu					2,9(2)		1,5(1)						
Tyr								1,9(2)					1,6(2)
His					1,0(1)		1,0(1)	1,7(2)				1,3(2)	
Lys	1,0(1)	1,1(1)			1,6(1)	1,0(1)				2,1(2)			2,6(2)
Arg	1,8(1)		1,1(1)	1,3(1)			1,8(1)	1,4(1)	1,3(1)		1,1(1)	1,1(1)	2,8(2)

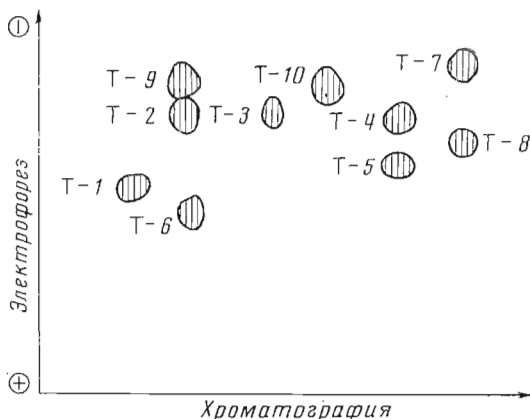


Рис. 1. Пептидная карта триптических пептидов белка L32 на бумаге (условия см. «Экспериментальную часть»)

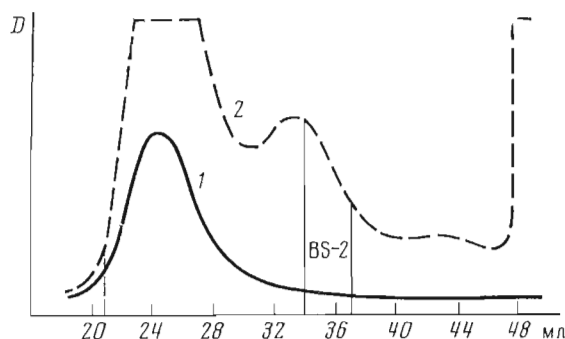


Рис. 2. Гель-хроматография фрагментов бромсукцинимидного расщепления на колонке с сефадексом G-25 ($0,9 \times 100$) в 0,01 н. HCl при скорости элюции 2 мл/ч: 1 и 2 — контроль при 280 и 210 нм соответственно

Таким образом, с помощью автоматического анализа была установлена последовательность аминокислотных остатков 1—49; последовательность 50—56 определена в результате исследования дансильным методом Эдмана пептидов BS-2, T-7 и T-8, а также определением С-концевой последовательности белка с помощью карбоксипептидаз А и В. Полученная полная аминокислотная последовательность представлена на схеме.

Экспериментальная часть

Аминокислотный анализ. Пробы белка или пептидов гидролизовали 5,7 н. HCl в течение 24 ч при 110° . Аминокислотный анализ проводили на аминокислотном анализаторе D-500 «Durrum» (США).

Определение N- и С-концевых аминокислот. N-Концевые аминокислоты определяли дансильным методом с идентификацией Dns-производных с помощью ТСХ на силикагеле [4], С-концевые — с помощью карбоксипептидаз А и В («Worthington», США) по стандартным методикам [5].

Триптический гидролиз. Растворяли в воде 1 мг (150 нмоль) белка и термостатировали 5 мин при 90° , после охлаждения до 40° рН раствора доводили до 8,0 и добавляли трипсин (ТРСК, обработанный тозилфенилаланилхлорметилкетон, «Serva», ФРГ) при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу). По окончании гидролиза (24 ч) рН среды доводили до 3,0 и раствор упаривали.

Аминокислотная последовательность пептидов триптического, химотриптического и N-бромсукцинимидного гидролизатов

Пептид	Аминокислотная последовательность
T-1	Ala-Val-Gln-Gln-Asn-Lys-Pro-Thr-Arg
T-2	Ser-Lys
T-3	Arg
T-4	Gly-Met-Arg
T-5	Ser-His-Asp-Ala-Leu-Thr-Ala-Val-Thr-Ser-Leu-Ser-Val-Asp-Lys
T-6	Thr-Ser-Gly-Glu-Lys
T-7	His-Leu-Arg
T-8	His-His-Ile-Thr-Ala-Asp-Gly-Tyr-Tyr-Arg
T-9	Gly-Arg
T-10	Lys-Val-Ile-Ala-Lys
Ch-1	Arg-Gly-Met
Ch-2	Arg-His-His-Ile-Thr-Ala-Asp-Gly-Tyr-Tyr
BS-2	Arg-Gly-Arg-Lys-Val-Ile-Ala-Lys

Химотриптический гидролиз. Растворяли в воде 8 мг белка, рН раствора доводили до 8,3 и добавляли химотрипсин («Serva», ФРГ) при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу). Время гидролиза 3 ч, температура 37°. После окончания гидролиза раствор лиофилизовали.

Расщепление белка бромцианом по остатку метионина. В 1 мл 70%-ной муравьиной кислоты растворяли 3 мг белка и добавляли 50 мг бромциана. Смесь оставляли в темноте при комнатной температуре на 24 ч, затем разбавляли водой до 10 мл и лиофилизовали.

Расщепление белка по остаткам тирозина N-бромсукцинимидом [6]. В 0,5 мл 50%-ной уксусной кислоты растворяли 3 мг белка и добавляли 100 мг N-бромсукцинимидом в 0,5 мл 50%-ной уксусной кислоты. Реакционную смесь выдерживали 5 ч при комнатной температуре в темноте и обес-солвали на сефадексе G-25 в 0,01 н. HCl.

Пептидные карты. Пептидные карты пептидов химотриптического и триптического гидролизатов выполняли на пластинках 8,5 × 9,5 см с тонким слоем целлюлозы марки «Whatman 300». В первом направлении использовали хроматографию в системе бутанол — пиридин-ацетат — вода (1 : 1 : 1), рН 5,1 [6], во втором направлении — электрофорез (200 В/см) в пиридин-ацетатном буфере, рН 3,5. Пептиды обнаруживали после опрыскивания пластин 4%-ным раствором нингидрина в ацетоне.

Препаративное разделение пептидов триптического гидролизата. Хроматографию пептидов осуществляли на бумаге (Filtrak N1) в системе, приведенной для пептидных карт, высоковольтный электрофорез — при рН 3,5 (4000 В в течение 1 ч). Пептиды обнаруживали после обработки узких полос хроматограмм или фореграмм нингидрином. Найденные пептиды элюировали 25%-ной уксусной кислотой.

Установление аминокислотной последовательности белка. Определение аминокислотной последовательности белка и смеси фрагментов бромцианового расщепления проводили на секвенаторе фирмы «Beckman» (США), модель 890С, идентификацию фенилтиогидантоинов аминокислот — на газовом хроматографе «Variac-2100» с колонкой, заполненной носителем SP-400, а также с помощью ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля. Некоторые фенилтиогидантоиновые производные идентифицировали в виде аминокислот на аминокислотном анализаторе D-500 после гидролиза 6 н. HCl в течение 24 ч при 130°.

Аминокислотную последовательность определяли методом Эдмана с идентификацией (дансил-модификация) дансилпроизводных аминокислот ТСХ на пластинках 6×6 см с закрепленным слоем силикагеля, как описано ранее [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Kaltschmid E. (1971) *Anal. Biochem.*, **43**, 25—31.
2. Wittmann-Liebold B., Greuer B., Paunenbecker R. (1975) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 1977—1979.
3. Алахов Ю. Б., Кашпаров И. А., Медникова Т. А., Мотуз Л. П., Маркова Л. Ф., Довгас Н. В., Овчинников Ю. А. (1975) *Биоорг. химия*, **1**, 581—587.
4. Бельский Б. Г., Гавкина Е. С., Пришвицкова С. Р., Эрастов Д. П. (1967) *Молекулярн. биология*, **1**, 184 — 189.
5. Ambler R. (1967) In *Methods in Enzymol.*, **XI**, pp. 155—156, Acad. Press, N. Y.—London.
6. Ramachandran L. K., Witkop B. (1967) In *Methods in Enzymol.*, **XI**, pp. 283—299, Acad. Press, N. Y.—London.
7. Алахов Ю. Б., Винокуров Л. М., Довгас Н. В., Маркова Л. Ф., Медникова Т. А., Мотуз Л. П., Кашпаров И. А., Овчинников Ю. А. (1976) *Биоорг. химия*, **2**, 5—18.

Поступила в редакцию
11.11.1976

THE PRIMARY STRUCTURE OF RIBOSOMAL PROTEIN L32 FROM *E. COLI* MRE-600 RIBOSOMES

VINOKUROV L. M., ALAKHOV Yu. B., GOLOV E. A.,
OVCHINNIKOV Yu. A.

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

A description of the primary structure of ribosomal protein L32 is given. The amino acid sequence of 49 residues was determined by the Edman automatic method. A study is made of the products of tryptic, chymotryptic and bromosuccinimide cleavage.
