



УДК 547.962

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ФАКТОРА
ЭЛОНГАЦИИ EF-G ИЗ *E. COLI*I. ХАРАКТЕРИСТИКА ФРАГМЕНТОВ ОГРАНИЧЕННОГО ТРИПСИНОЛИЗА
НАТИВНОГО EF-GАлахов Ю. В., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А.,
Винокуров Л. М., Овчинников Ю. А.

Институт белка Академии наук СССР, г. Пущино, Московская обл.

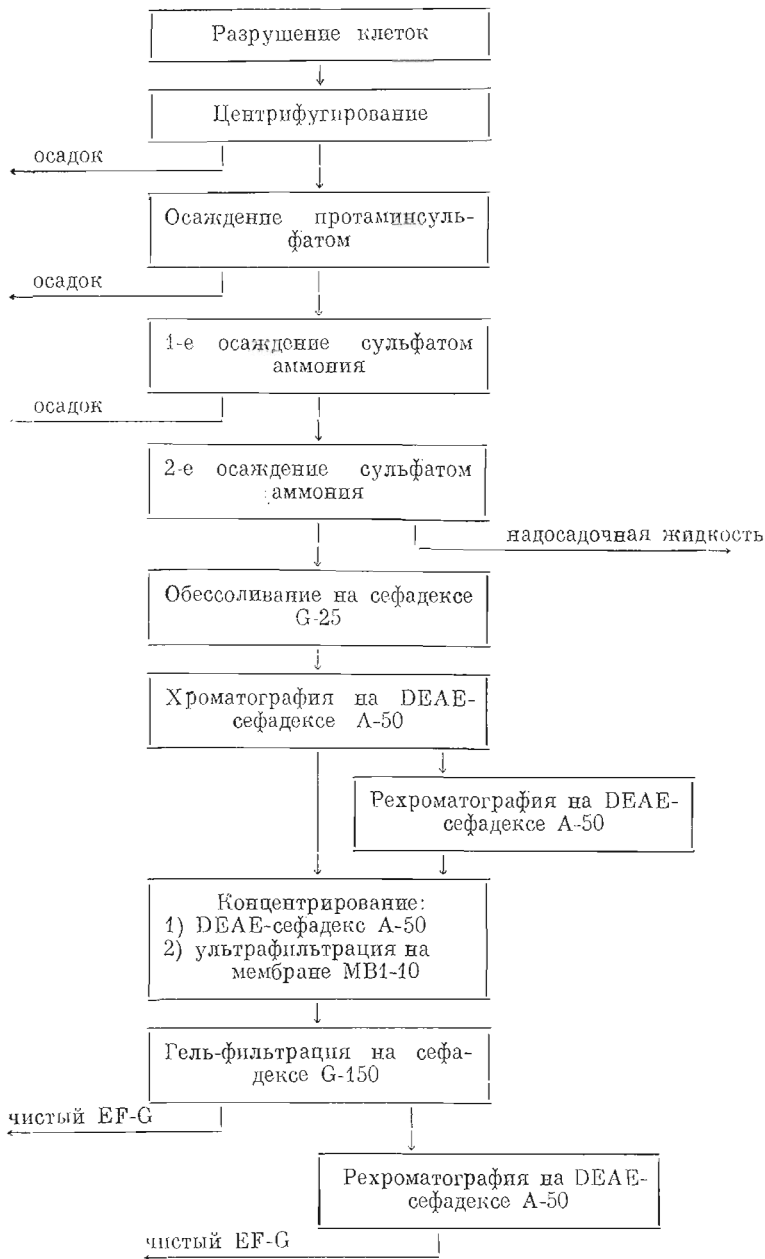
Инкубирование EF-G в нативном состоянии с трипсином приводит к образованию пяти сравнительно устойчивых к дальнейшему действию трипсина фрагментов с M 5000, 8000, 27 000, 41 000 и 49 000. Фрагменты выделены в гомогенном виде. Приведена их подробная характеристика, т. е. определены N- и C-концевые аминокислоты, аминокислотный состав, N-концевые аминокислотные последовательности. Исследования этих фрагментов позволило расположить их в полипептидной цепи EF-G, а также локализовать экспонированную функционально важную SH-группу, модификация которой приводит к ингибированию несопряженной GTP-азной активности. Показано, что экспонированная SH-группа находится в N-концевом участке EF-G.

Фактор элонгации биосинтеза белка EF-G катализирует GTP-зависимую транслокацию комплекса пептидил-тРНК-мРНК из участка A в участок P на рибосоме с освобождением дезацилированной тРНК из участка P и выходом ее из рибосомы. Кроме того, известно, что EF-G также катализирует рибосомезависимую GTP-азную реакцию в отсутствие мРНК и аминуацил-тРНК [1—3]. Эта активность фактора названа несопряженной GTP-азной активностью, поскольку она непосредственно не связана с транслокацией [4]. Показано, что несопряженная GTP-азная реакция протекает через промежуточную стадию образования тройственного комплекса, который включает рибосому, EF-G и GTP [4—8]. Образованию тройственного комплекса, вероятно, предшествует образование бинарного комплекса между EF-G и GTP [9, 10].

Для детального изучения физико-химических основ функционирования EF-G мы предприняли исследование его первичной структуры. В качестве первого этапа изучения был использован ограниченный протеолиз фактора на крупные фрагменты. Метод ограниченного протеолиза белков в нативных условиях получил широкое распространение для исследования структурных и функциональных свойств ряда ферментов [11—15]. В частности, недавно было показано, что при ограниченном трипсинолизе нативного EF-G образуется несколько фрагментов, относительно устойчивых к дальнейшему действию трипсина [16].

Сокращения: β -МЭ — β -меркаптоэтанол; ДСН — додецилсульфат натрия; РНТС — фенилизотиоцианат, РТН — фенилтиогидантин.

Схема выделения рибосомального фактора EF-G



В данном сообщении мы приводим подробную характеристику фрагментов, образующихся при ограниченном триптическом гидролизе EF-G в нативном состоянии. Исследование этих фрагментов позволило расположить их в полипептидной цепи EF-G, а также локализовать экспонированную функционально важную SH-группу, модификация которой приводит к ингибированию несопряженной GTP-азной активности [4, 17]. Эта SH-группа, очевидно, входит в состав GTP-связывающего участка EF-G, так как известно, что гуаниловые нуклеотиды защищают ее от действия тиольных реагентов [18]. Кроме того, фотоаффинной химической модификацией аналогом GTP показано, что район, включающий экспонированную SH-группу, непосредственно участвует в связывании GTP [19].

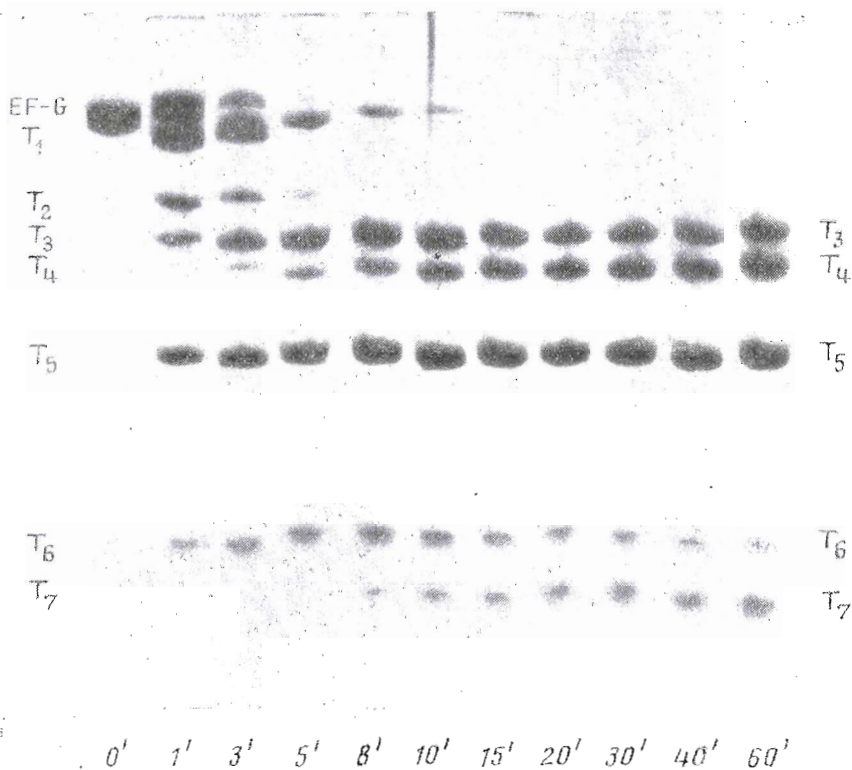


Рис. 1. Ход триптического гидролиза EF-G в зависимости от времени

EF-G был выделен в гомогенном состоянии по методу, представляющему собой сочетание методик, предложенных Казиро и др. [20] и Рорбахом и др. [21], и адаптированному к крупномасштабному выделению. Общий путь выделения представлен на схеме, а характеристики каждой стадии очистки суммированы в табл. 1. Чистота выделенного EF-G, оцененная по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (далее гель-электрофорез) и определения N-концевых аминокислот, составляет 98—100%. Его молекулярный вес по гель-электрофорезу равен примерно 81 000. Основные данные, характеризующие EF-G, представлены в табл. 2.

При инкубировании EF-G с трипсином в условиях, когда белок сохраняет нативную структуру, через 40—60 мин образуются пять сравнительно устойчивых к дальнейшему действию трипсина фрагментов, T_3 — T_7 (рис. 1). При увеличении времени инкубирования эти фрагменты постепенно гидролизуются с образованием более мелких пептидов, причем в первую очередь подвергается гидролизу фрагмент T_3 , а наиболее устойчивым оказывается фрагмент T_5 . В табл. 3 приведены молекулярные веса, R_f и молярные количества основных фрагментов, образующихся в ходе триптического гидролиза. На рис. 1 показан ход трипсинолиза в зависимости от времени, а на рис. 2 дана количественная оценка образования триптических фрагментов. Из кинетических данных трипсинолиза видно, что первоначальным актом является отщепление от EF-G фрагмента T_6 с $M \sim 5000$ и образование фрагмента T_1 (M 76 000), который далее распадается на фрагменты T_3 (M 49 000) и T_5 (M 27 000). Фрагмент T_3 в свою очередь отщепляет фрагмент T_7 (M 8000) и образует фрагмент T_4 (M 41 000). Интересно отметить аномальное электрофоретическое поведение фрагмента T_6 . Его величина R_f соответствует $M \sim 13000$, однако, по данным

№ п.п.	Стадия очистки	Объём, л	Общее количество единиц EF-G-активности · 10 ⁻³	Концентрация белка, мг/мл	Общий белок, г	Удельная активность, ед./мг***	Выход, %	Степень очистки
1	Исходный экстракт	15,1	108 760 *	30,0	453,2	240	100	1
2	Осаждение протамин-сульфатом	20,6	85 921	12,4	254,2	338	79,0	1,4
3	Осаждение (NH ₄) ₂ SO ₄	1,77	73 216	90,6	160,21	457	67,0	1,9
4	Хроматография на DEAE-сефадексе	4,1	59 357	1,98	8,12	7310	54,6	30,5
5	Концентрирование на DEAE-сефадексе, мембране MB1-10	0,39	45 720	15,2	6,0 **	7620	42,0	32
6	Гель-фильтрация на G-150	0,67	17 652	3,2	2,15	8210	16,23	34,2
7	Рехроматография после стадий 4 и 6 на DEAE-сефадексе		7281		0,9	8090	6,7	
	Общий выход EF-G				3,05		22,93	

* Вычислено по исходному количеству рибосом, как в работе [20].

** На колонку с сефадексом G-150 наносится порция в 1 г белка.

*** Единица EF-G соответствует количеству белка, которое в присутствии фусидовой кислоты и избытка рибосом задерживает на нитроцеллюлозном фильтре 1 пмоль GDP [24].

Таблица 2

Данные аминокислотного состава, N- и C-концевые аминокислоты EF-G и триптических фрагментов

Аминокислота	Аминокислотный состав EF-G			Аминокислотный состав фрагментов					Аминокислотный состав суммы фрагментов	
	экспериментальный	лит. данные *		T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₁ +T ₂ +T ₈	T ₄ +T ₅ +T ₆ +T ₇
		[21]	[20]							
Cys	5	5	6	4	3	1	—	1	5	5
Asp	67	72	76	41	45	8	3	4	62	70
Thr	37	39	40	22	14	9	5	7	36	35
Ser	28	33	38	16	10	12	1	4	29	27
Glu	90	97	96	53	43	33	5	8	91	89
Pro	36	37	33	23	19	14	1	3	38	37
Gly	64	63	62	34	26	26	3	7	63	62
Ala	75	69	71	51	43	21	4	6	76	74
Val	68	60	60	43	37	25	1	8	69	71
Met	22	26	20	13	10	6	1	3	20	19
Ile	45	46	50	30	25	12	4	6	46	47
Leu	46	46	48	30	28	16	1	1	47	46
Tyr	18	19	17	9	6	9	2	2	20	19
Phe	24	23	24	17	13	7	1	2	25	23
His	16	15	14	7	5	5	2	2	14	14
Lys	52	46	42	26	25	22	1	1	49	49
Trp	5	6	6	4	4	—	—	1	4	5
Arg	39	37	34	22	16	11	4	4	36	34
Всего	737	730	735	445	372	247	39	70	731	727
N-конец	Ala			Gly	Gln	Glu	Ala	Gly		
C-конец	Lys			Arg	Arg	Arg	Arg	Arg		

* Пересчитан на молекулярный вес 81 000.

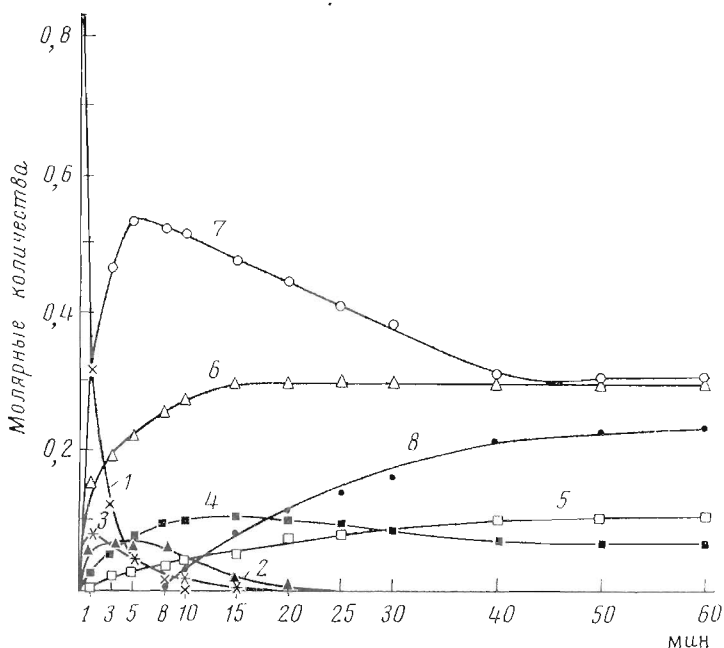


Рис. 2. Изменение молярных количеств EF-G и фрагментов $T_1 - T_7$ в ходе трипсинолиза: 1 — EF-G; 2 — T_1 ; 3 — T_2 ; 4 — T_3 ; 5 — T_4 ; 6 — T_5 ; 7 — T_6 ; 8 — T_7

гель-фильтрации на сефадексе G-100 и аминокислотному анализу, он имеет молекулярный вес ~ 5000 . Рассмотренный ход триптического гидролиза подтверждается также изучением N-концевых последовательностей фрагментов (см. ниже).

Кроме основного пути гидролиза прослеживается еще один, менее выраженный, который приводит в итоге к тем же самым фрагментам. Он заключается в следующем: EF-G отщепляет фрагмент T_5 с образованием T_2 (M 56 000), а последний далее расщепляется на фрагменты T_6 и T_3 . Таким образом, ход триптического гидролиза в данном случае аналогичен описанному Скарром и др. [16], за исключением образования фрагментов T_6 и T_7 , которые не были обнаружены гель-электрофорезом. Эти фрагменты обнаруживаются только при проведении гель-электрофореза по Веберу и Осборн в модифицированном варианте (см. «Экспериментальную часть»).

Для разделения и характеристики фрагментов ограниченного трипсинолиза EF-G смесь, полученную после гидролиза 1 г белка, подвергли гель-фильтрации на колонке (5×270 см) с сефадексом G-100 (сверхтонкий), уравновешенной буфером 0,02 М Трис-HCl (pH 7,5) — 1 мМ β -МЭ — 6 М мочевины; скорость элюирования 15 мл/ч (рис. 3).

Таблица 3

Молекулярные веса, R_f и максимальные молярные количества триптических фрагментов

Фрагмент	R_f	Молекулярный вес	Максимальное молярное количество	Фрагмент	R_f	Молекулярный вес	Максимальное молярное количество
EF-G	0,12	81 000	1,00	T_4	0,34	41 000	0,11
T_1	0,14	76 000	0,07	T_5	0,44	27 000	0,30
T_2	0,23	56 000	0,08	T_6	0,71	5000	0,54
T_3	0,29	49 000	0,11	T_7	0,83	8000	0,23

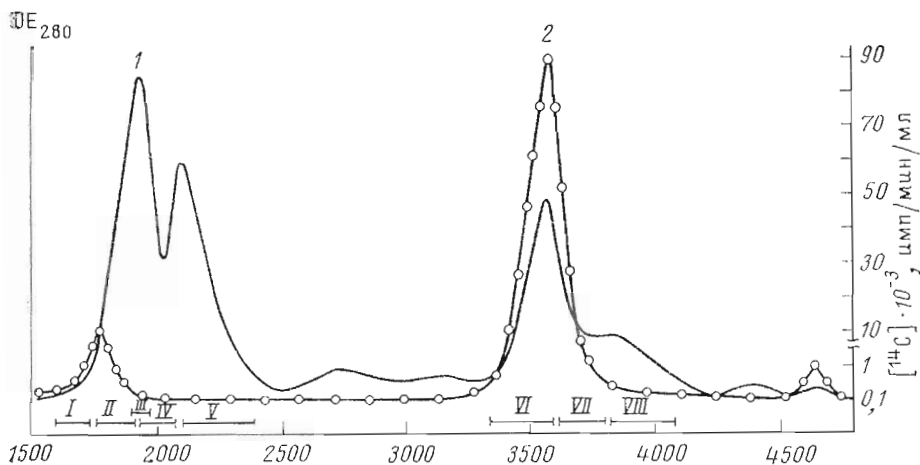


Рис. 3. Гель-фильтрация продуктов ограниченного триптического гидролиза $[^{14}\text{C}]$ -жарбоксиметилированного по одной SH-группе EF-G. 1 — поглощение на 280 мкм; 2 — радиоактивность

При таком первоначальном разделении можно выделить в чистом виде 5 фрагментов ($T_3 - T_7$). Фракция I содержит фрагмент T_3 , фракция III — T_4 , фракция V — T_5 , фракция VI — T_6 и, наконец, фракция VIII — T_7 . Фракцию IV, содержащую смесь фрагментов T_4 и T_6 , подвергли разделению на колонке ($2,5 \times 5$ см) с DEAE-целлюлозой DE-52. Колонка была уравновешена буфером 10 мМ Трис-НСl — 6 М мочевины (рН 7,5), градиент концентрации KCl 0—0,2 М (100 + 100 мл), скорость элюирования 10 мл/ч, образец — 150 мг белка (рис. 4). В результате выделены фрагменты T_4 и T_6 , гомогенность которых была проверена гелелектрофорезом и определением N-концевых аминокислот.

Для выделения фрагментов T_1 и T_2 образец белка гидролизовали трипсином в течение 5 мин. Образовавшуюся смесь вначале также разделили на колонке (5×180 см) с сефадексом G-100 (сверхтонкий), уравновешенной буфером 0,02 М Трис-НСl (рН 7,5) — 5 мМ β -МЭ — 6М мочевины; скорость элюирования 15 мл/ч. Профиль гель-фильтрации приведен на рис. 5. Фракция I, содержащая фрагмент T_1 с примесью фрагментов T_2 и T_3 , была рехроматографирована на колонке ($1 \times 1,5$ см) с DEAE-целлюлозой DE-52. Колонка была уравновешена буфером 10 мМ Трис-НСl — 6 М мочевины (рН 8); образец — 15 мг (рис. 6).

Фракция A содержала практически чистый фрагмент T_1 . Фрагмент T_2 выделить в чистом виде не удалось; его N-концевая аминокислотная последовательность была определена на его смеси с фрагментом T_3 .

Молекулярные веса полученных фрагментов определены методом гелелектрофореза и гель-фильтрацией. Данные аминокислотного анализа, N- и C-концевые аминокислоты представлены в табл. 2. Результаты аминокислотного анализа показывают, что фрагменты $T_3 - T_7$ в основном охватывают всю молекулу EF-G. Сумма аминокислотных остатков фрагментов практически равна сумме аминокислотных остатков EF-G, т. е. выплечения сколько-нибудь значительных участков цепи, находящихся между фрагментами, не происходит. У фрагментов $T_3 - T_7$ C-концевой аминокислотой является аргинин, т. е. разрыв полипептидной цепи EF-G осуществляется только по остаткам аргинина. Вместе с тем EF-G, по данным Порбаха с сотр. [22], а также по нашим данным, имеет C-концевую аминокислоту лизин. Отсутствие фрагмента с C-концевым лизином, по всей вероятности, можно объяснить тем, что полипептидная цепь EF-G

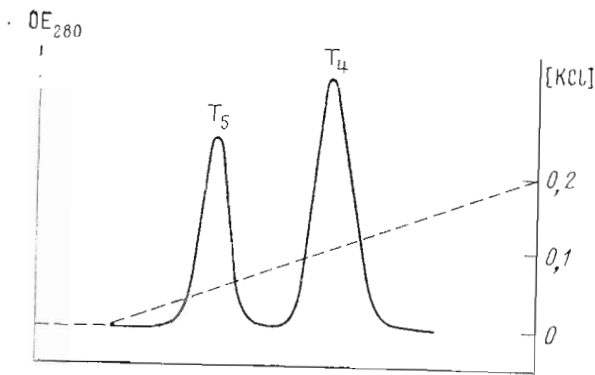


Рис. 4. Хроматография фракции IV (фрагменты $T_4 + T_5$) на колонке с целлюлозой DE-52

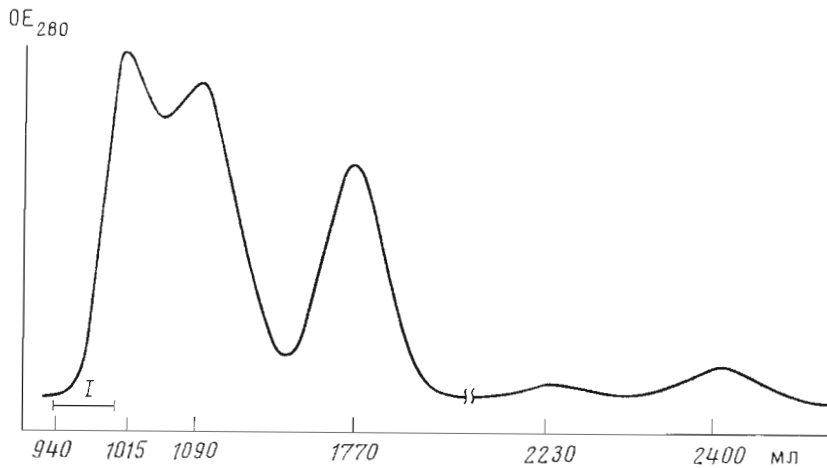


Рис. 5. Гель-фильтрация продуктов 5-минутного триптического гидролиза EF-G

имеет C-концевую последовательность -Arg-Gly-Lys и происходит отщепление дипептида Gly-Lys с образованием в качестве C-кольцевой аминокислоты аргинина.

Исследование N-концевых последовательностей EF-G и фрагментов T_1-T_7 позволило не только установить пути образования фрагментов, определенные с помощью кинетических данных хода трипсинолиза, но и расположить все фрагменты по полипептидной цепи EF-G. N-Концевые последовательности устанавливали с помощью автоматического метода Эдмана. Полученные данные представлены в табл. 4. Определение N-концевой последовательности EF-G было в значительной степени затруднено вследствие гидролитической нестабильности полипептидной цепи белка. Эта трудность в некоторой степени была преодолена благодаря использованию диметилаллиламинной программы в модификации Найла с сотр. [23], которая предусматривает применение $[^{35}\text{S}]$ -фенилизотиоцианата с последующей идентификацией $[^{35}\text{S}]$ -ФТГ-аминокислот автордиографией. Такой подход позволил определить последовательность 13 аминокислот.

Фрагмент T_6 имеет N-концевую последовательность, идентичную с EF-G, т. е. является N-концевым; у фрагментов T_1 , T_3 и T_7 одна и та же N-концевая аминокислотная последовательность. Таким образом, T_7 расположен в полипептидной цепи EF-G непосредственно за T_6 , а фрагмент T_3 пред-

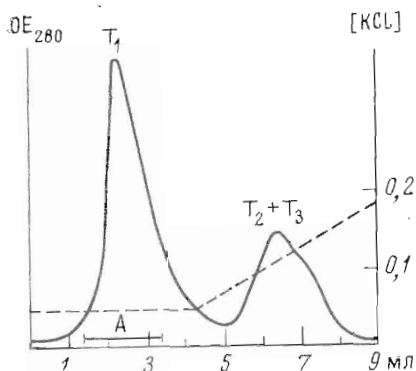


Рис. 6

Рис. 6. Хроматография фракции 1 (из 5-минутного трипсинолиза) на DEAE-целлюлозе DE-52

Рис. 7. Расположение фрагментов ограниченного триптического гидролиза по полипептидной цепи EF-G

Рис. 8. Распределение радиоактивности в продуктах ограниченного трипсинолиза EF-G, модифицированного в нативных условиях $[^{14}\text{C}]\text{ICH}_2\text{CONH}_2$

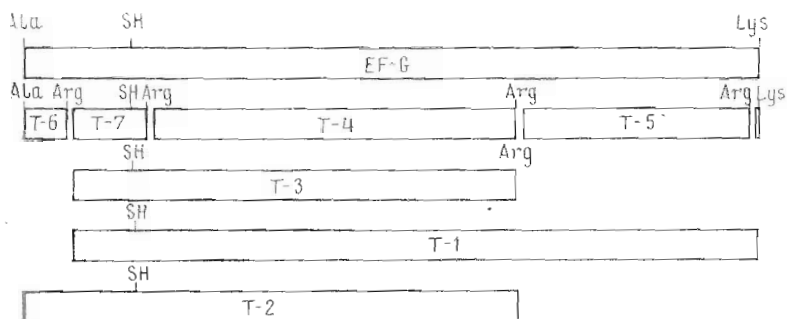


Рис. 7

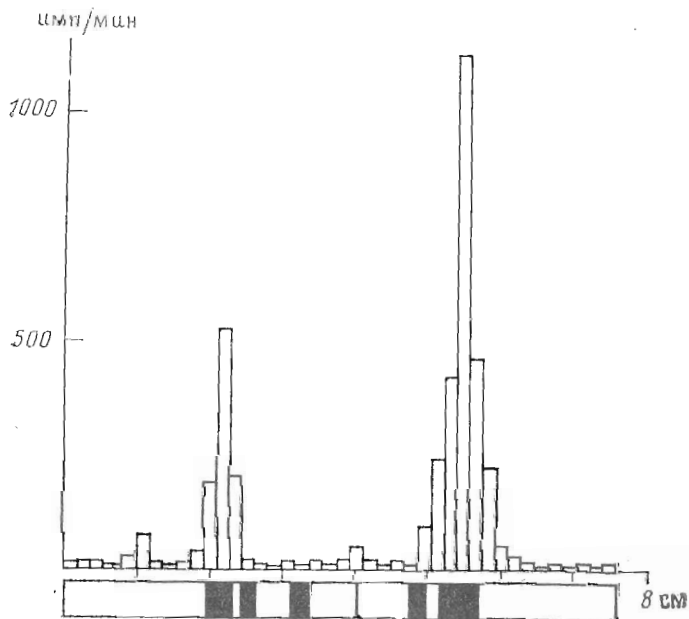


Рис. 8

N-концевые последовательности EF-G-фактора и продуктов его ограниченного триптического гидролиза

Шаг деградации по Эдману	EF-G	Фрагменты						
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇
1	Ala	Gly	Ala	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly
2	Arg	Ile	Arg	Ile	Ala	Phe	Arg	Ile
3	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Asn	Thr	Thr
4	Thr	Ile	Thr	Ile	Lys	Val	Thr	Ile
5	Pro	Thr	Pro	Thr	Tyr	Glu	Pro	Thr
6	Arg			Ser	Lys	Ala		Ser
7	Ala			Ala	Val	Asn		Ala
8	Arg			Ala	Pro	Val		Ala
9	Tyr			Thr	Pro	Gly		Thr
10	X			Thr	Ile	Lys		Thr
11	Asn			Ala	Ala	Pro		Ala
12	Leu			Phe	Phe	Gln		Phe
13	Gly			Thr	Val	Val		Thr
14				Ser	His	Ala		Ser
15				Gly	Lys	Tyr		Gly
16				Met	Met	Arg		Met
17				Ala	Asp	Glu		Ala
18				Lys	Asp	Thr		Lys
19				Gln	Met	Ile		Gln
20				Tyr	Gly	Arg		Tyr

ставляет собой фрагмент T₁, лишенный C-концевого участка с M 27 000, т. е. фрагмента T₅, который является C-концевым участком EF-G и фрагмента T₁. В пользу этого предположения говорит тот факт, что фрагмент T₂ имеет N-концевую аминокислотную последовательность, аналогичную EF-G. Таким образом, T₂ представляет собой EF-G, лишенный C-концевого участка, т. е. T₅. Согласно кинетическим данным трипсинолиза, фрагмент T₄ образуется путем отщепления от T₃ фрагмента T₇; следовательно, T₄ расположен непосредственно за фрагментом T₇ в полипептидной цепи EF-G. Расположение фрагментов в полипептидной цепи EF-G суммировано на рис. 7.

Как уже упоминалось, активность EF-G сильно ингибируется тиольными реагентами, и это ингибирование связано с модификацией экспонированной SH-группы в нативном белке. Исследование продуктов ограниченного триптического гидролиза позволило локализовать эту функционально важную SH-группу. После карбоксиметилирования EF-G [¹⁴C]-иодацетамидом белок был подвергнут ограниченному трипсинолизу. Оказалось, что вся радиоактивная метка находится в двух фрагментах: T₃ и T₇ (см. рис. 3 и 8). Поскольку T₇ является N-концевым участком T₃, такое распределение метки закономерно. Фрагмент T₇ содержит только один остаток цистеина, который и претерпевает модификацию при карбоксиметилировании. Таким образом, функционально важная SH-группа находится в N-концевом участке полипептидной цепи EF-G.

Экспериментальная часть

В работе использованы [¹⁴C]GTP, [³H]GTP, [¹⁴C]ICH₂CONH₂, [³⁵S]PITC (Amersham, Англия), сефадексы G-100, G-150, DEAE A-50 (Pharmacia, Швеция), целлюлоза DE-52 (Whatman, Англия), реактивы для диск-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (Bio-Rad Lab., США), трипсин, карбоксипептидазы А и В (Worthington, США), реактивы для автоматического метода Эдмана и РТН-аминокислот (Beckman, США). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Крупномасштабное выделение EF-G. Источником для получения EF-G были клетки *E. coli* MRE-600, выращенные на минимальной среде и собранные на $1/3$ лог-фазы. Перед использованием клетки хранились замороженными при -60° .

Грубый экстракт. 5 кг замороженных клеток оттаивали и суспендировали в равном объеме буфера А (10 мМ Трис-НСl — 5 мМ β -МЭ, рН 7,5) и разрушали в дезинтеграторе 15М-8ТА (Manton-Gaulin, США). Все операции по выделению проводили при температуре 4° , измерение электропроводности и рН буферов — при $22,5^{\circ}$. К полученному гомогенату добавляли 250 μ ДНКазы (Worthington, США) и экстракт центрифугировали 30 мин при 19 000 *g* в роторе JA-10 на центрифуге J21-B (Beckman, США). После центрифугирования супернатант отделяли и осадок ресуспендировали в двух объемах буфера А. После центрифугирования супернатант объединяли с первоначальным и осветляли центрифугированием (30 мин, 19 000*g*, ротор JA-10). В результате образуется 15,1 л экстракта с концентрацией белка 30,0 мг/мл.

Осаждение протаминсульфатом. К осветленному супернатанту добавляли при размешивании 1,4% раствор нейтрализованного протаминсульфата в соотношении 1 мг протамин к 5 мг белка. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (30 мин, 19 000*g*). Полученный супернатант составил 20,6 л с концентрацией белка 12,4 мг/мл.

Осаждение сульфатом аммония. К супернатанту добавляли твердый $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в соотношении 23 г на 100 мл раствора при механическом перемешивании с образованием 38% насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Осадок удаляли центрифугированием (15 мин, 19 000*g*) и отбрасывали. К полученному супернатанту добавляли твердый $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в соотношении 15 г на 100 мл исходного раствора с образованием 59% насыщения. Осадок собирали центрифугированием и растворяли в буфере В (20 мМ Трис-НСl — 0,25 М сахараза — 5 мМ β -МЭ, рН 7,5). В результате образуется 1,77 л раствора с концентрацией белка 90,6 мг/мл.

Обессоливание на сефадексе G-25. Раствор белка (1,77 л), полученный на предыдущей стадии, наносили на колонку (10 \times 90 см) с сефадексом G-25 (тонкий), уравновешенную буфером С (20 мМ Трис-НСl — 0,15 М КСl — 5 мМ β -МЭ, рН 7,5), и элюировали тем же буфером.

Хроматография на DEAE-сефадексе. Раствор белка после обессоливания наносили на колонку (10,0 \times 80 см) с сефадексом DEAE А-50, уравновешенную буфером С. После нанесения образца колонку промывали 10 л буфера Д (20 мМ Трис-НСl — 0,2 М КСl — 5 мМ β -МЭ, рН 7,5) и белок элюировали линейным градиентом концентрации КСl (20 л буфера Д + 20 л буфера Д, содержащего 0,3 М КСl). Электропроводность буфера Д 24,5 мСм, буфера, содержащего 0,3 М КСl, — 34,5 мСм, скорость элюирования 180 мл/ч, объем фракций 15 мл, элюирование белка детектировали поглощением при 280 нм. Активность EF-G, определенная по связыванию с рибосомами и GTP в присутствии фусидовой кислоты (см. ниже), была найдена в элюате с электропроводностью 27—29 мСм. Фракции, имеющие EF-G-активность, составили 4,1 л с концентрацией белка 1,98 мг/мл. Фракции, содержащие меньшее количество EF-G, объемом 2 л с концентрацией белка 1,5 мг/мл, подвергали рехроматографии на колонке с DEAE-сефадексом А-50 (см. ниже).

Концентрирование на DEAE-сефадексе. Объединенную фракцию с EF-G разбавляли буфером (20 мМ Трис-НСl — 5 мМ β -МЭ, рН 7,5) до электропроводности 19 мСм и наносили на колонку (5,6 \times 10 см) с DEAE-сефадексом А-50. Колонку промывали 500 мл буфера С, белок элюировали буфером 20 мМ Трис-НСl — 0,4 М КСl — 5 мМ β -МЭ, рН 7,5. EF-G элюировали в объеме 500 мл с концентрацией белка 12 мг/мл. Раствор белка затем концентрировали на мембране MB1-10 (СКБ АП АН СССР) до объема 390 мл. К полученному раствору добавляли сахарозу до концентрации 0,25 М и раствор хранили замороженным при -60° до дальнейшего использования.

Гель-фильтрация на сефадексе G-150. 70 мл раствора белка (после концентрирования на сефадексе DEAE A-50) с концентрацией 15,2 мг/мл наносили на колонку (5,6 × 180 см) с сефадексом G-150 (сверхтонкий), уравновешенную буфером *E* (50 мМ Трис-HCl — 0,15 М KCl — 5 мМ β-МЭ, pH 7,5), и элюировали тем же буфером. Фракции, содержащие чистый, по данным гель-электрофореза, EF-G, объединяли, добавляли сахарозу до концентрации 0,25 М, замораживали и хранили при —60°. Фракции, содержащие загрязненный EF-G, объединяли и подвергали повторной очистке на DEAE-сефадексе A-50.

Рехроматография на DEAE-сефадексе. Объединенную после колонки с сефадексом G-150 или DEAE A-50 фракцию наносили на колонку (2,5 × 40 см) с DEAE-сефадексом A-50, уравновешенную буфером *E*. Колонку промывали 200 мл буфера *E*, содержащего 0,2 М KCl (электропроводность буфера доведена до 25,5 мСм), а затем буфером с электропроводностью 28 мСм. Фракции, содержащие чистый, по данным гель-электрофореза, EF-G, объединяли и хранили с сахарозой при —60°.

Концентрацию белка находили спектрофотометрическим определением разности поглощения при 228,5 и 234,5 нм [24], а также определением поглощения при 280 нм, принимая величину молярного поглощения для EF-G равной 62 300 М⁻¹·см⁻¹.

EF-G-активности определяли по способности EF-G образовывать комплекс с рибосомами, [³H]- или [¹⁴C]GTP в присутствии фусидовой кислоты, используя метод фильтрации через нитроцеллюлозный фильтр, как описано в [25, 26].

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). Анализ каждой стадии выделения EF-G, а также хода трипсинолиза нативного EF-G проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле по Веберу и Осборн [27], а также по модифицированному методу, используя в качестве электродного буфера раствор 20 мМ фосфата натрия + 0,1% ДСН (pH 7,0), гелевого буфера — раствор 40 мМ фосфата натрия + 0,2% ДСН (pH 7,0), буфера для растворения образца — раствор 2 мМ фосфата натрия, 1% ДСН, 1% β-МЭ, 20% сахарозы (pH 7,0). Молекулярный вес EF-G и фрагментов ограниченного трипсинолиза определяли методом гель-электрофореза, используя в качестве стандартов следующие белки: фосфоорилаза, *M* 94 000 (Calbiochem, США), сывороточный альбумин, *M* 68 000 (Serva, ФРГ), лейцинаминопептидаза, *M* 53 000 (Worthington, США), овалбумин, *M* 43 000 (Serva, ФРГ), пепсин, *M* 35 000 (Worthington, США), химотрипсиноген, *M* 25 700 (Serva, ФРГ), миоглобин, *M* 17 200 (Serva, ФРГ), цитохром *c*, *M* 13 000 (Serva, ФРГ). Для определения количества образующихся фрагментов при трипсинолизе гели сканировались на спектрофотометре Gilford-2400 (Франция).

Молярные количества каждого фрагмента были вычислены из площади соответствующего пика и молекулярного веса.

Определение N- и C-концевых аминокислот. Определение N-концевых аминокислот проводили по методу Вайнера и др. [28]. Dns-производные аминокислот идентифицировались двумерной тонкослойной хроматографией на пластинках с силикагелем (5 × 5 см). C-концевые аминокислоты определяли с помощью карбоксипептидаз А и В [29].

Селективное карбоксиметилирование EF-G по экспонированной SH-группе. К 1 г EF-G (12,3 мкМ) в 45 мл буфера 0,4 М Трис-HCl — 2 мМ β-МЭ, pH 8,6, в темной склянке добавляли 200 мкМ (37,2 мг) ICH₂CONH₂, 4,8 мкМ [¹⁴C]ICH₂CONH₂ (уд. акт. 58 мКи/мМ и равное количество по весу Трис — 38,1 мг). Смесь инкубировали 30 мин при 20° и затем обессоливали на затемненной колонке (2,5 × 80 см) с сефадексом G-25, уравновешенной буфером 0,1 М Трис-HCl — 1 мМ β-МЭ, pH 8,1.

Аминокислотный анализ. Аминокислотный состав определяли на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США). Гидролиз проводили

5,6 н. HCl в вакуумированных, запаянных ампулах 24 и 72 ч. Цистеин определяли в виде карбоксиметилцистеина, количество валина и изолейцина определяли по результатам 72-часового гидролиза. Содержание триптофана устанавливали после гидролиза образцов 4 н. метансульфонокислотой, содержащей 0,2% 3-(2-аминоэтил)индола.

Триптический гидролиз EF-G. 1 мг/мл EF-G в буфере 0,1 М Трис-HCl — 1 мМ β -МЭ (рН 8,1) инкубировали с трипсином при 37° (соотношение фермент—субстрат 1 : 50). Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты по 50 мкл и добавляли к 5,5 мкл 10% раствора ДСН, затем белок высаживали 9-кратным объемом ацетона и анализировали гелеэлектрофорезом. Для препаративного получения фрагментов ограниченного трипсинолиза EF-G к раствору белка (5 мг/мл) в 0,1 М Трис-HCl, содержащем 1 мМ β -МЭ (рН 8,1), добавляли раствор трипсина в воде (1 мг/мл) при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 и смесь инкубировали 30 мин при 37°. Для прекращения действия трипсина к реакционной смеси добавляли фенолметансульфенилфторид до концентрации 10^{-4} М и затем гуанидинхлорид до концентрации 6 М. После этого смесь обессоливали на колонке с сефадексом G-25, добавляли 10-кратное количество мочевины от веса белка и лиофилизировали.

Автоматический метод Эдмана. Автоматическое определение аминокислотной последовательности проводили на секвенсере модели 890С (Beckman, США) с использованием диметилаллиламинной программы (102974 по фирменному руководству). Идентификацию РТН-аминокислот осуществляли на газовом хроматографе модели 5710 (Hewlett-Packard, США) с колонкой, наполненной фазой SP-400; на жидкостном хроматографе высокого давления модели 8500 (Varian, США) с колонкой, наполненной фазой LiChrosorb Si 60, и тонкослойной хроматографией на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Fluka, Швейцария), а также на аминокислотном анализаторе D-500 после гидролиза РТН-производных аминокислот 5,6 н. HCl. Автоматическое определение аминокислотной последовательности с использованием [³⁵S]PITC проводили как описано в работе [23], используя для радиоавтографии рентгеновскую пленку RP Royal (Eastman Kodak, США).

ЛИТЕРАТУРА

1. Haselkorn R., Rothman-Denes L. B. (1973) Ann. Rev. Biochem., 41, 397—437.
2. Conway T., Lipmann F. (1964) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 52, 1462—1469.
3. Nishizuka Y., Lipmann F. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55, 212—219.
4. Kaziro Y., Inoue N., Kuriki Y., Mizumoto K., Tanaka M., Kawakita M. (1969) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 385—393.
5. Brot N., Spears C., Weissbach H. (1969) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 34, 843—848.
6. Parmeggiani A., Gottschalk E. M. (1969) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 35, 861—867.
7. Bodley J. W., Zieve F. J., Lin L., Zieve S. T. (1970) J. Biol. Chem., 245, 5656—5661.
8. Kuziki Y., Inoue N., Kaziro Y. (1970) Biochim. et biophys. acta, 224, 487—497.
9. Arai N., Arai K., Kaziro Y. (1975) J. Biochem., 78, 243—246.
10. Baca O. G., Rohrbach M. S., Bodley J. W. (1976) Biochemistry, 15, 4570—4574.
11. Reed R. G., Feldhoff R. C., Clute O. L., Peters T. (1975) Biochemistry, 14, 4578—4583.
12. Files J. G., Weber K. (1976) J. Biol. Chem., 251, 3386—3391.
13. Twardowski T., Redfield B., Kemper W. M., Merrick W. C., Weissbach H. (1976) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 71, 272—279.
14. Panasenko S. M., Modrich P., Lehman I. R. (1976) J. Biol. Chem., 251, 3432—3435.
15. Arai K., Nakamura S., Arai T., Kawakita M., Kaziro Y. (1976) J. Biochem., 79, 69—83.
16. Skar D. C., Rohrbach M. S., Bodley J. W. (1975) Biochemistry, 14, 3922—3926.
17. Nishizuka Y., Lipmann F. (1966) Arch. Biochem. and Biophys., 116, 344—351.
18. Marsh R. C., Chinali G., Parmeggiani A. (1975) J. Biol. Chem., 250, 8344—8352.
19. Girshowich A. S., Bochkareva E. S., Ovchinnikov Yu. A. (1977) FEBS Lett., in press.
20. Kaziro Y., Inoue-Yokosawa N., Kawakita M. (1972) J. Biochem., 72, 853—863.

21. Rohrbach M. S., Dempsey M. E., Bodley J. W. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 5094—5101.
22. Rohrbach M. S., Bodley J. W. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 6831—6836.
23. Jacobs J. W., Niall H. D. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 3629—3636.
24. Ehresmann B., Imbault P., Weil J. H. (1973) *Anal. Biochem.*, **54**, 454—463.
25. Highland J. H., Lin L., Bodley J. W. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4404—4409.
26. Bodley J. W., Zieve F. J., Lin L., Zieve S. T. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 5656—5661.
27. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406—4412.
28. Weiner A. M., Platt T., Weber K. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 3242—3251.
29. Ambler R. P. (1967) in *Methods in Enzymol.* (Hirs C. H. W., ed.), **XI**, pp. 155—166, Acad. Press, N. Y.—London.

Поступила в редакцию
22.IV.1977

**THE PRIMARY STRUCTURE OF ELONGATION FACTOR EF-G
FROM *E. coli*. I. CHARACTERIZATION OF FRAGMENTS OBTAINED
ON LIMITED TRYPSINOLYSIS OF NATIVE EF-G**

ALAKHOV Yu. B., MOTUZ L. P., STENGREVITZ O. A.,
VINOKUROV L. M., OVCHINNIKOV Yu. A.

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

Incubation of EF-G in the native state with trypsin leads to the formation of five fragments with molecular weights of 5 000, 8 000, 27 000, 41 000 and 49 000 which are comparatively resistant to further trypsin action. The fragments were isolated in a homogeneous state and characterized by determination of N- and C-terminal amino acids, the amino acid composition and the N-terminal amino acid sequences. The study of these fragments permitted to align them in the EF-G polypeptide chain and to localize the exposed functionally important SH-group, the modification of which leads to inhibition of the unconjugated GTPase activity. This SH-group is shown to reside within the N-terminal region of EF-G.
