



УДК 577.15.02

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПОПЕРЕЧНЫХ СШИВОК, ОБРАЗУЮЩИХСЯ
В АСПАРТАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗЕ ПРИ РЕАКЦИИ
С 1,5-ДИФТОР-2,4-ДИНИТРОБЕНЗОЛОМ

Деев С. М., Афанасенко Г. А., Поляновский О. Л.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Бифункциональный реагент 1,5-дифтор-2,4-динитробензол в определенных условиях избирательно взаимодействует с остатком лизина активного центра аспартат-аминотрансферазы, а при повышении рН второй атом фтора замещается остатком цистеина или тирозина. Для получения окрашенных продуктов и локализации аминокислот, участвующих в реакции, был использован нецелый протеолиз проназой. Основная стадия очистки окрашенных пептидов состояла в хроматографии на биогеле Р-2, на котором происходила специфическая адсорбция материала, содержащего динитрофениленовый хромофор, в то время как остальная масса пептидов свободно проходила через колонку. Разделение окрашенных продуктов осуществляли с помощью хроматографии и электрофореза на бумаге. Определение структуры окрашенных фрагментов позволило установить, что бифункциональный реагент взаимодействует с остатками Lys 258 и Cys 390 полипептидной цепи апофермента. Таким образом однозначно установлено, что на расстоянии $\sim 5 \text{ \AA}$ от остатка лизина, образующего в активном центре аспартат-аминотрансферазы альдиминную связь с пиридоксаль-5'-фосфатом, находится остаток Cys 390 и остаток Tug.

Ранее, при исследовании взаимодействия бифункционального реагента 1,5-дифтор-2,4-динитробензола с активным центром аспартат-аминотрансферазы, нами было показано, что карбоксиметилированный по доступным тиоловым группам и ацетилованный по «внешним» аминогруппам апофермент избирательно взаимодействует с реагентом с образованием внутримолекулярных сшивок. Присоединение дифтординитробензола происходит в области активного центра фермента. Модификация белка бифункциональным реагентом проводилась в две стадии. На начальной стадии реакции при рН 7 дифтординитробензол монофункционально связывается с ϵ -аминогруппой остатка лизина. На второй стадии реакции при рН 9 оставшийся атом фтора бифункционального реагента замещается боковой цепью остатков тирозина или цистеина, стереохимически близких с ним [1].

Цель данной работы состояла в установлении местоположения в полипептидной цепи молекулы аспартат-аминотрансферазы аминокислотных остатков активного центра, участвующих в образовании поперечной сшивки. Первая часть работы включала в себя идентификацию остатка лизина, вступающего в реакцию с 1,5-дифтор-2,4-динитробензолом, поскольку

Сокращения: Lys-X-БМ — 5-(N^ε-лизил)-S-бутил-2,4-динитрофенол; Cys-X-Lys — 1-(S-цистеил)-5-(N^ε-лизил)-2,4-динитробензол; Tug-X-Lys — 1-(O-тирозил)-5-(N^ε-лизил)-2,4-динитробензол.

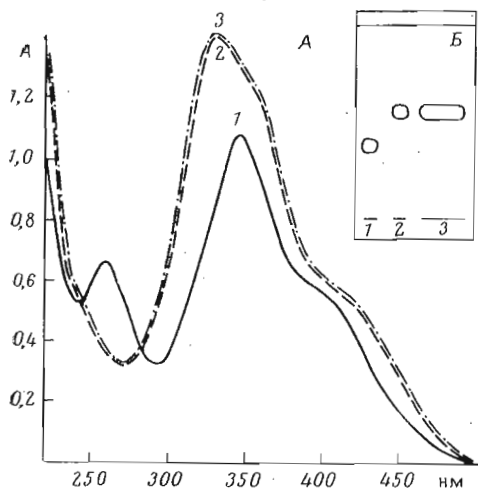


Рис. 1

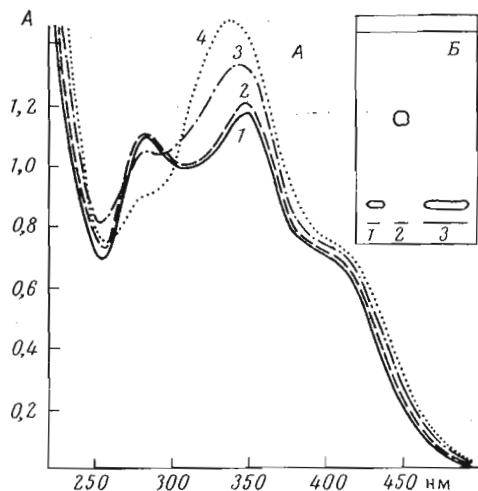


Рис. 2

Рис. 1. Спектры поглощения (А) и хроматограмма (В) инкубационной смеси N^ϵ -(5-фтор-2,4-динитрофенил)лизина и бутилмеркаптана (37° , рН 7). А: 1 — исходная смесь, 2 — после 3 ч, 3 — после 24 ч инкубации. В — восходящая хроматография в системе *опор*-бутанол — 85% муравьиная кислота — вода (750 : 135 : 115): 1 — N^ϵ -(5-фтор-2,4-динитрофенил)лизин, 2 — 5-(N^ϵ -лизил)-S-бутил-2,4-динитрофенол, 3 — реакционная смесь после 3 ч инкубации

Рис. 2. Спектры поглощения (А) и хроматограмма (В) инкубационной смеси 1-(О-тирозил)-5-(N^ϵ -лизил)-2,4-динитробензола и бутилмеркаптана (37° , рН 7). А: 1 — исходная смесь, 2 — после 3 ч, 3 — после 24 ч, 4 — после 48 ч инкубации. В — восходящая хроматография в системе *опор*-бутанол — 85% муравьиная кислота — вода (750 : 135 : 115): 1 — 1-(О-тирозил)-5-(N^ϵ -лизил)-2,4-динитробензол, 2 — 5-(N^ϵ -лизил)-S-бутил-2,4-динитрофенол, 3 — реакционная смесь после 3 ч инкубации

локализация этого остатка значительно упрощала идентификацию поперечно сшитых пептидов. Однако непосредственное выделение меченого пептида из белка, содержащего монозамещенное производное дифтординитробензола, было невозможным, так как второй атом фтора бифункционального реагента при протеолитическом и дальнейших обработках вступил бы в побочные реакции с функциональными группами аминокислотных остатков (в частности, с аминогруппами N-концевых аминокислот пептидных фрагментов). Таким образом, чтобы выделить этот пептид, необходимо было заместить оставшийся атом фтора в молекуле дифтординитробензола.

Задача состояла в подборе нуклеофильного реагента, который, с одной стороны, в мягких условиях достаточно быстро и необратимо взаимодействовал бы с монозамещенным производным дифтординитробензола, а с другой — не разрушал бы поперечные связи с остатками тирозина и цистина, образующиеся на второй стадии модификации аспаргат-аминотрансферазы. При выборе подходящего соединения критериями протекания реакций служили изменения спектров поглощения модельных соединений при их инкубации с соответствующими реагентами и образование новых продуктов, которые обнаруживали с помощью бумажной хроматографии. Было показано, что аммиак, гидроксилламин, гидразин и его производные наряду с замещением атома фтора в N^ϵ -(5-фтор-2,4-динитрофенил)лизине вызывают более или менее значительные разрушения молекул 1-(О-тирозил)-5-(N^ϵ -лизил)-2,4-динитробензола и 1-(S-цистеил)-5-(N^ϵ -лизил)-2,4-динитробензола. Наилучшие результаты были получены при использовании в качестве блокирующих реагентов меркаптосоединений, в частности бутилмеркаптана. Так, изменения спектра поглощения раствора бутилмеркаптана

и монозамещенного производного дифтординитробензола при 37° и рН 7 прекращаются менее чем через 3 ч после начала инкубации (рис. 1). При хроматографическом разделении продуктов реакции был обнаружен только 5-(N^ε-лизил)-S-бутил-2,4-динитрофенол, что также свидетельствует о полном завершении реакции. При инкубации бутилмеркаптана и 1-(O-тирозил)-5-(N^ε-лизил)-2,4-динитробензола в течение 3 ч в идентичных условиях спектр последнего практически не изменяется, и лишь через сутки наблюдаются значительные спектральные изменения (рис. 2). В этих условиях не происходит также разрушения 1-(S-цистеил)-5-(N^ε-лизил)-2,4-динитробензола. Таким образом, бутилмеркаптан можно с успехом применять для замещения непрореагировавшего атома фтора бифункционального реагента в аспарат-аминотрансферазе, прошедшей как первую (при рН 7), так и вторую (при рН 9) стадии реакции с дифтординитробензолом.

Аспарат-аминотрансферазу, прошедшую начальную стадию модификации, т. е. содержащую дифтординитробензол, монофункционально прореагировавший с ε-аминогруппой лизинового остатка, денатурировали, обрабатывали в выбранных условиях бутилмеркаптаном, а затем карбоксиметилировали по внутренним тиоловым группам [2]. Обработанный таким образом белок подвергали протеолизу.

При хроматографии триптического гидролизата на колонке с сефадексом G-50 в 6 М мочеvine — 0,005 М фосфатном буфере, рН 6,5, основная часть пептидных фрагментов, содержащих динитрофениленовое производное, выходила из колонки со свободным объемом (фракция Т1, рис. 3). Удовлетворительного разделения этой фракции, а также фракций Т2 и Т3, соответствующих более низкомолекулярным фрагментам, не удалось получить ни при использовании других методов очистки на колонках, ни с помощью электрофореза и хроматографии на бумаге. При бумажной хроматографии и электрофорезе желтый материал необратимо сорбировался на старте, и его не удавалось элюировать даже 30% уксусной кислотой.

Расщепление химотрипсином дало сложную смесь более мелких пептидных фрагментов, слабее сорбировавшихся на бумаге. Однако и в этом случае встретились значительные трудности при выделении гомогенных пептидов, что согласуется с сообщениями других авторов, занимавшихся очисткой пептидов, содержащих остаток динитрофенилена [3, 4]. Сложность выделения таких пептидов объясняется рядом их особенностей. Известно, что нитрогруппы ароматических соединений обладают повышенным сродством к амидным связям [5—7]. Это, по всей вероятности, одна из основных причин, обуславливающих способность пептидов, содержащих динитрофениленовые производные, образовывать устойчивые агрегаты. С другой стороны, как отмечается в работе [3], протеолиз вблизи поперечной сшивки затруднен, что ведет к получению наряду с обычными более длинными пептидными фрагментами, разделять и идентифицировать которые труднее.

Ранее нами было установлено, что дифтординитробензол образует в области активного центра аспарат-аминотрансферазы сшивки между остатками Lys и Tyr и Lys и Cys, а некоторое количество реагента монофункционально связано с остатком Lys [1]. Исходя из этого при протеолизе белка, прошедшего вторую стадию модификации, можно было ожидать образования по меньшей мере трех различных пептидных фрагментов, содержащих динитрофениленовые производные, что еще более затрудняло их разделение и идентификацию. Учитывая этот факт, а также трудности, возникающие при выделении крупных пептидов, нам представлялось целесообразным применять расщепление проназой, хотя и не однозначное, но дающее мелкие фрагменты.

Первичное разделение фрагментов проназного расщепления аспарат-аминотрансферазы, прошедшей первую стадию модификации дифтординит-

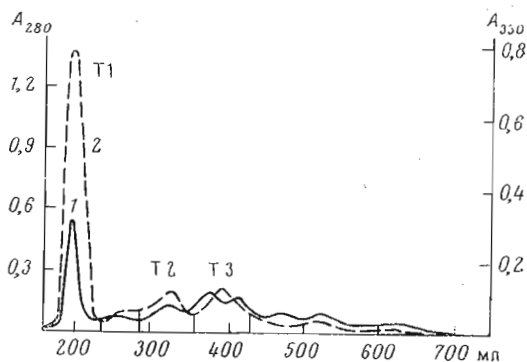


Рис. 3. Хроматография триптического гидролизата аспартат-аминотрансферазы, прошедшей первую стадию модификации 1,5-дифтор-2,4-динитробензолом на колонке ($2,7 \times 115$ см) с сефадексом G-50 в 6 М мочевины — 0,005 М фосфатном буфере, pH 6,5. Оптическая плотность при 280 нм (1), при 330 нм (2)

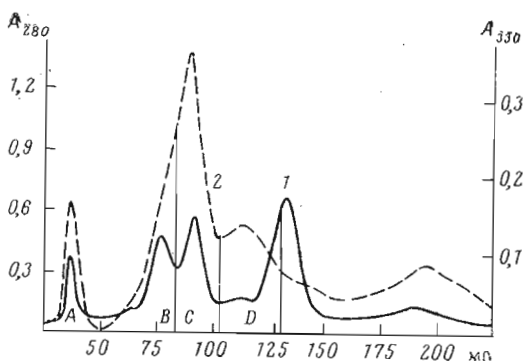


Рис. 4. Хроматография проназного гидролизата аспартат-аминотрансферазы, прошедшей первую стадию модификации 1,5-дифтор-2,4-динитробензолом на колонке ($1,4 \times 61$ см) с сефадексом G-25 в 0,01 М HCl (обозначения те же, что на рис. 3)

робензолом, осуществляли на колонке с сефадексом G-25. Результаты фракционирования представлены на рис. 4. Фракцию А, выходящую из колонки со свободным объемом и содержащую небольшое количество желтого материала, дальнейшему исследованию не подвергали. Основное количество окрашенного материала содержалось во фракциях В, С и D. Фракцию В после рехроматографии на колонке с сефадексом G-25 объединяли с фракцией С. Дальнейшая очистка окрашенных пептидов проводилась на колонке с биогелем. Объединенный материал из фракций В и С наносили на колонку с биогелем Р-2. Результаты разделения представлены на рис. 5. Фракция (В + С)1 не содержала окрашенных пептидов. Во фракции (В + С)2 присутствовали неорганические соли и незначительное количество желтого материала. Основное количество окрашенного материала находилось во фракции (В + С)4. При ее анализе с помощью аналитического электрофореза и хроматографии на бумаге было показано, что в ней присутствуют только окрашенные фрагменты. Таким образом, посредством хроматографии на колонке с биогелем Р-2 было достигнуто полное отделение низкомолекулярных фрагментов, содержащих динитрофениленовую метку, от остальной массы продуктов проназного гидролиза. Этот результат мы объясняем повышенным сродством динитрофениленового остатка к амидным связям [5—7]. Можно думать, что биогель Р-2,

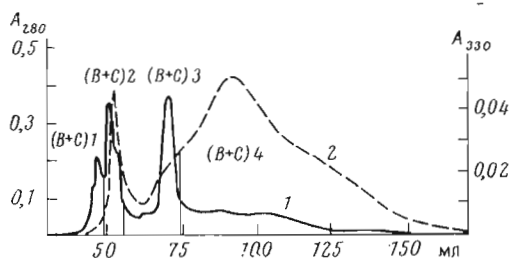


Рис. 5. Хроматография фракции $(B + C)$ на колонке $(1,0 \times 90 \text{ см})$ с биогелем Р-2 в $0,01 \text{ M HCl}$ (обозначения те же, что на рис. 3)

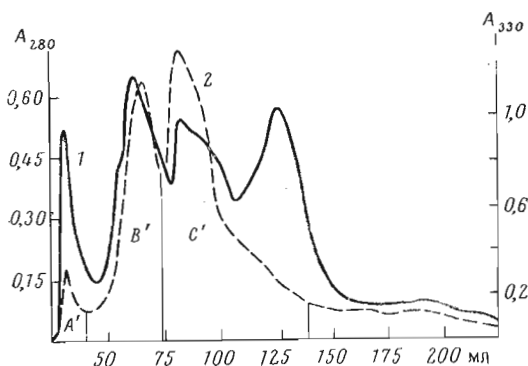


Рис. 6. Хроматография проназного гидролизата аспартат-аминотрансферазы, прошедшей вторую стадию модификации 1,5-дифтор-2,4-динитробензолом на колонке $(1,4 \times 61 \text{ см})$ с сефадексом G-25 в $0,01 \text{ M HCl}$ (обозначения те же, что на рис. 3)

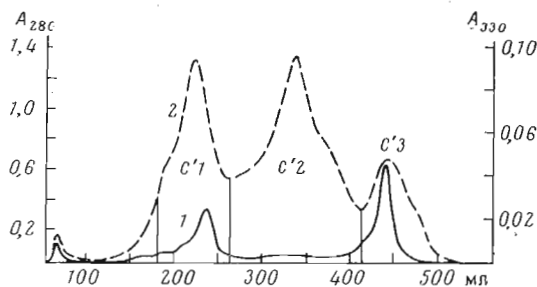


Рис. 7. Хроматография фракции C' на колонке $(1,5 \times 106 \text{ см})$ с сефадексом G-15 в $0,01 \text{ M HCl}$ (обозначения те же, что на рис. 3)

являющийся по своей природе полиакриламидом, в отношении динитрофениленовых производных выступает как специфический адсорбент.

Часть фракций $(B + C)4$ и D подвергали кислотному гидролизу и гидролизаты хроматографировали на колонке с нейлоновым порошком. Динитрофениленовые производные аминокислот, содержащиеся в пептидах, были идентифицированы сравнением с соответствующими синтетическими стандартами по их местоположению на колонке и спектральным характеристикам. Таким образом, было показано, что во фракциях $(B + C)4$ и D содержится только одно динитрофениленовое производное — Lys-X-БМ.

Дальнейшее разделение фракции $(B + C)4$ проводили с помощью высоковольтного электрофореза и бумажной хроматографии. В результате были выделены два гомогенных пептида $(B + C)4-a$ и $(B + C)4-b$. Сравнение спектров поглощения этих фрагментов со спектральными характеристика-

ми модельных соединений подтвердило, что оба они содержат производное, в котором остаток лизина связан через динитрофениленовый мостик с бутилмеркаптаном. При определении аминокислотного состава фрагмента $(B + C)4-a$ были обнаружены Ser (1,2), Asx (1,0) и соединение, Dns-производное которого не совпадало по местоположению ни с одним из Dns-производных стандартной смеси аминокислот. Оно являлось, очевидно, дансильированным Lys-X-БМ. В то же время местоположение фрагмента $(B + C)4-a$ соответствовало при электрофорезе нейтральным пептидам, что указывало на присутствие в нем аспарагина, а не аспарагиновой кислоты. N-Концевой аминокислотой этого фрагмента был Ser. На основании первичной структуры молекулы аспарат-аминотрансферазы [8] и совокупности полученных данных можно сделать вывод, что пептиду $(B + C)4-a$ соответствует последовательность с 257-го по 259-й остаток и этот пептид имеет, таким образом, структуру Ser-Lys²⁵⁸(X-БМ)-Asn.

Анализ пептида $(B + C)4-b$ позволил установить, что пептид содержит только две аминокислоты: Lys(X-БМ) и Asx. Следует отметить, что фрагмент $(B + C)4-b$ был выделен в значительно меньшем количестве, чем $(B + C)4-a$.

Разделение фракции *D* проводили аналогично разделению $(B + C)$. После хроматографии на колонке с биогелем P-2, высоковольтного электрофореза при pH 6,5 и бумажной хроматографии этой фракции были выделены в небольшом количестве два окрашенных фрагмента: *D1* и *D2*. Первый содержал Lys-X-БМ, а второй — Lys-X-БМ и Asx. Пептиды $(B + C)4-b$ и *D2*, судя по электрофоретической подвижности, нейтральны и, следовательно, содержат Asn. Наиболее вероятно, что эти дипептиды — фрагменты трипептида Ser — Lys(X-БМ)—Asn, образующиеся в результате более глубокого расщепления проназой.

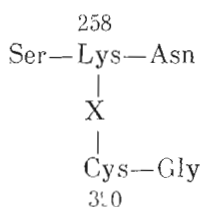
Выделение и идентификация перечисленных пептидных фрагментов однозначно показывают, что участком первоначального взаимодействия карбоксиметилированной по «внешним» тиоловым группам и ацилированной по доступным аминокислотным группам апоаспарат-аминотрансферазы с 1,5-дифтор-2,4-динитробензолом является ϵ -аминогруппа остатка Lys 258.

Аспарат-аминотрансфераза, прошедшая вторую стадию модификации (при pH 9), содержит, как отмечалось выше, помимо сшивок между остатками Lys и Cys и Lys и Tyr небольшое количество монозамещенного производного дифтординитробензола. Поэтому во избежание побочных реакций ее обрабатывали бутилмеркаптаном, так же как и белок, прошедший только начальную стадию модификации дифтординитробензолом (при pH 7).

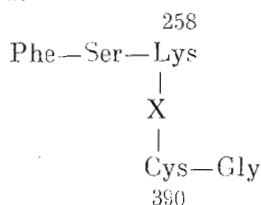
После карбоксиметилирования «внутренних» тиоловых групп проводили расщепление проназой. Исходную смесь пептидов проназного гидролизата наносили на колонку с сефадексом G-25. Результаты фракционирования представлены на рис. 6. Фракцию *A'*, выходящую из колонки со свободным объемом и содержащую незначительное количество желтого материала, дальнейшему исследованию не подвергали. Фракцию *C'* после концентрирования хроматографировали на колонке с сефадексом G-15. Результаты разделения представлены на рис. 7.

После высоковольтного электрофореза при pH 6,5 и бумажной хроматографии из фракции *C'1* были выделены гомогенные пептиды *C'1-a* и *C'1-b*. Спектры поглощения выделенных фрагментов свидетельствуют о наличии в них динитрофениленовой сшивки между ϵ -аминогруппой остатка лизина и меркаптосоединением. Наличие в этих пептидах Lys-X-Cys было подтверждено также сравнением дансильированного синтетического Lys-X-Cys с Dns-производными, полученными после кислотного гидролиза фрагментов *C'1-a* и *C'1-b*. Результаты анализа пептида *C'1-a* (N-концевая аминокислота Ser, состав: Ser (1,1), Asn (1,0), Gly (1,25)) и первичной структуры молекулы аспарат-аминотрансферазы [8] показывают, что

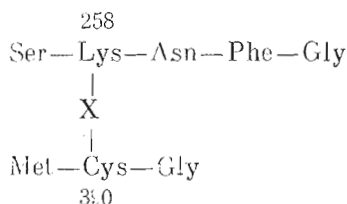
этому пептиду соответствуют только участки последовательности 257—259 и 390—391. Таким образом, фрагмент *C'1-a* являлся поперечно сшитым пептидом следующей структуры:



Пептид *C'1-b* (N-концевая аминокислота Phe, состав: Phe (1,0), Ser (0,9), Gly (1,1)) соответствует участкам первичной структуры 256—258 и 390—391. Его структура:



Из фракции *B'* после разделения, проведенного аналогично разделению фракции *C'*, был выделен еще один пептид, содержащий Lys-X-Cys. Составление данных его анализа (N-концевые аминокислоты Met и Ser, состав: Met (0,8), Ser (0,9), Asx (0,9), Phe (1,0), Gly (2,2)) и первичной структуры молекулы фермента [8] показало, что они отвечают только участкам последовательности 257—261 и 299—391. Следовательно, выделенный фрагмент представляет собой поперечно сшитый пептид:



Выделение трех последних пептидов доказывает наличие поперечной сшивки между ω -функциональными группами остатков Lys 258 и Cys 390.

Остаток Lys 258 локализован в активном центре фермента, и его ϵ -аминогруппа образует альдиминную связь с пиридоксаль-5'-фосфатом — коферментом аспарат-аминотрансферазы [9]. Таким образом, установление того факта, что на первой стадии модификации белка дифтординитробензол монофункционально соединяется с ϵ -аминогруппой остатка Lys 258, является прямым доказательством высказанного нами ранее на основании совокупности косвенных данных утверждения об избирательном введении реагента в активный центр фермента [1].

Участие ϵ -аминогруппы остатка Lys 258 в образовании поперечного мостика с тиоловой группой остатка Cys 390 свидетельствует о пространственной близости этих функциональных групп (длина динитрофениленового мостика составляет 5 Å) и позволяет объяснить ряд противоречивых на первый взгляд результатов, полученных при модификации остатка Cys 390 различными реагентами. Так, блокирование существенной для трансаминазной активности сульфгидрильной группы (Cys 390) *n*-хлормеркурибензоатом [10], N-этилмалеинимидом [11], тетранитрометаном [11], а также реактивом Эллмана (5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой) [11] вызывает инактивацию фермента на 95%. Наряду с этим блокирование того же

остатка цианидом сопровождается снижением активности лишь на 40% [11]. Рассматривая эти данные в совокупности с установленным в настоящей работе фактом пространственной близости остатков Lys 258 и Cys 390, можно заключить, что объемные или заряженные заместители значительно снижают каталитическую активность, затрудняя подход субстратов к активному центру фермента. В то же время модификация небольшими и незаряженными группами (такими, как CN-группа) совместима с сохранением значительной трансминазной активности. Таким образом, сульфгидрильная группа остатка Cys 390, очевидно, не играет существенной роли в катализе или поддержании каталитически активной конформации фермента, но ее модификация может вызвать стерические затруднения в активном центре.

Ранее полученные данные указывают также на локализацию в активном центре аспаргат-аминотрансферазы остатка тирозина [1].

Экспериментальная часть

В работе использовали: 1,5-дифтор-2,4-динитробензол (Sigma, США), Dns-Cl, дважды перекристаллизованный из бензола (Merck, ФРГ), полиамидные пластины для ТСХ (BDH, Англия), трипсин и химотрипсин (Worthington, США), проназу (Calbiochem, Швейцария), динитрофениленовые стандарты, синтезированные из соответствующих N^α-защищенных аминокислот, иодуксусную кислоту, трижды перекристаллизованную из *n*-гептана.

Взаимодействие синтетических динитрофениленовых производных с аммиаком, гидроксиламином, гидразином осуществляли в буферных растворах при 20, 30 и 37°. Реакцию с бутилмеркаптаном проводили в герметически закрытых кюветах при 37° в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7, и в 0,1 М Трис-HCl-буфере, pH 8,5 (растворы содержали 5—10% этанола). За ходом реакций следили, регистрируя через определенные промежутки времени спектры поглощения инкубационных смесей на спектрофотометрах Specord UV-Vis (ГДР) или Beckman, модель 25 (США). Для разделения продуктов реакций реакцию смесь упаривали досуха, экстрагировали спиртом и экстракт подвергали восходящей хроматографии на бумаге Ватман 3ММ в системе *втор*-бутанол — 85% муравьиная кислота — вода (750 : 135 : 115).

Аспаргат-аминотрансферазу из цитозоля сердечной мышцы свиньи (КФ 2.6.1.1) выделяли по методу [10]. Ее апофермент получали аналогично [12]. Карбоксиметилирование внешних тиоловых групп проводили как описано ранее [2], ацилирование доступных аминокислот фермента и модификацию его 1,5-дифтор-2,4-динитробензолом — согласно методике, описанной в работе [1].

Для замещения непрореагировавшего атома фтора бифункционального реагента препараты белка после удаления избытка дифтординитробензола с помощью гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-25 (средний) инкубировали с бутилмеркаптаном. К раствору белка в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7, содержащем 5% этанола, при комнатной температуре добавляли бутилмеркаптан (молярное соотношение белок — бутилмеркаптан 1 : 200). Через 1 ч добавляли мочевины до концентрации 8 М, EDTA и раствор бутилмеркаптана в этаноле (конечное соотношение белок — бутилмеркаптан 1 : 300) и инкубировали еще 2,5 ч при 37°. Затем раствор продували 15 мин током азота и повышали pH до 8,5 с помощью 1 М Трис-HCl-буфера. Для карбоксиметилирования внутренних тиоловых групп [2] к полученному раствору добавляли 300-кратный избыток иодацетата. Через 30 мин непрореагировавший иодацетат удаляли фильтрованием через колонку с сефадексом G-25 (средний) в 3 М мочевины — 0,005 М фосфатном буфере, pH 6,5. Белковую фракцию концентрировали в 3 раза и диализовали в течение 2 сут против больших количеств воды.

Динитрофениленовые производные из кислотных гидролизатов выделяли с помощью хроматографии на колонке (1,5 × 65 см) с нейлоновым порошком в 0,01 М HCl. Нейлоновый порошок получали по модифицированному методу [6]. Из нейлонового блока (180 г) получали стружку, помещали ее в смесь 2 л уксусной кислоты и 0,1 л муравьиной кислоты. Смесь кипятили 45 мин, а затем горячий прозрачный раствор перелили в стакан и оставили на 1 сут при комнатной температуре. Выпавший осадок отфильтровали и сушили в вакууме. Сухой порошок суспендировали в дистиллированной воде и промывали до нейтрального pH. Отмытый порошок гомогенизировали в течение 2 мин при 14 000 об/мин и использовали для хроматографии.

Трипсиновый и химотрипсиновый гидролиз белка осуществляли в термостатированной при 37° кювете титратора ТТТ-11 (Radiometer, Дания) в течение 20 ч при соотношении фермент — субстрат 1 : 50; pH 8,3 поддерживали добавлением к реакционной смеси 0,1 М NaOH. Реакцию останавливали добавлением мочевины до 8 М концентрации.

Расщепление белка проназой проводили в термостатированной при 37° ячейке титратора при pH 7,7. Раствор проназы в 0,005 М фосфатном буфере добавляли к белку в течение 3 ч тремя равными порциями (конечное весовое соотношение проназа — трапсаминаза 1 : 40); общее время расщепления 5—6 ч. pH 7,7 поддерживали добавлением 0,1 М раствора NaOH.

Пептиды хроматографировали на колонке с сефадексом G-50 (2,7 × 115 см) в 6 М мочеvine — 0,005 М фосфатном буфере, pH 6,5, на колонках с сефадексами G-25 (1,4 × 61 см), G-15 (1,5 × 106 см) и биоге-лем Р-2 (1,0 × 90 см) — в 0,01 М HCl. Для контроля за выходом пептидов из колонок использовали регистрацию поглощения элюата при 280 нм с помощью проточного денситометра Uvicord-II (Швеция). Наличие окрашенных пептидов во фракциях обнаруживали, измеряя их поглощение при 330 нм на спектрофотометре Beckman, модель 25 (США).

Для препаративного разделения пептидов применяли электрофорез при pH 6,5 (пиридин — уксусная кислота — вода, 33 : 1 : 300) и 3,5 (пиридин — уксусная кислота — вода, 1 : 10 : 184) на бумаге Ватман ЗММ при градиенте напряжения 60 В/см в течение 40 мин и хроматографию на бумаге Ватман ЗММ (пиридин — бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 15 : 3 : 12). Аналитическое разделение пептидного материала проводили аналогичным образом на бумаге Ватман 1. Желтые пептидные фрагменты вырезали и элюировали 0,01 М HCl.

Для проверки индивидуальности выделенных пептидов дансильным методом [13] определяли их N-концевые аминокислоты.

Аминокислотный состав устанавливали методом разделения с помощью ТСХ на полиамидном слое и количественного анализа аминокислот в форме их Dns-производных [14].

Спектральные характеристики пептидов получали как непосредственно с бумаги, так и после их элюции. В первом случае пептидное пятно на хроматограмме сканировали соответствующей щелью на спектрофотометре РМQ-11 (Opton, ФРГ) через 5 нм, устанавливая при каждой новой длине волны нулевое значение по «чистой» (не содержащей пептидного материала) бумаге. Во втором случае раствор пептида доводили 0,01 М HCl до 0,4 мл, помещали в микрокювету и регистрировали спектр поглощения на спектрофотометре Beckman, модель 25 (США).

Авторы выражают глубокую признательность акад. А. Е. Браунштейну за постоянное внимание к данной работе и обсуждение ее результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Деев С. М., Брага Э. А., Носиков В. В., Поляновский О. Л. (1976) Биоорган. химия, 2, 1691—1696.
2. Носиков В. В., Гришин Е. В., Деев С. М., Поляновский О. Л., Браунштейн А. Е., Овчинников Ю. А. (1974) Молекулярн. биология, 9, 406—415.

3. Guatrecasas P., Fuchs S., Anfinsen C. B. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 406—412.
4. Hardman J. K., Hardman D. F. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 6489—6496.
5. Otto G. (1955) *Leder*, **6**, 207—215.
6. Beyer H., Schenk U. (1969) *J. Chromatogr.*, **39**, 482—490, 491—495.
7. Beyer H., Schenk U. (1971) *J. Chromatogr.*, **61**, 263—268.
8. Овчинников Ю. А., Браунштейн А. Е., Егоров Ц. А., Поляновский О. Л., Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Липкин В. М., Абдулаев Н. Г., Гришин Е. В., Киселев А. П., Модянов Н. Н., Носиков В. В. (1972) *Докл. АН СССР*, **207**, 728—731.
9. Braunstein A. E. (1973) *The Enzymes*, **9**, pp. 379—481, Acad. Press, New York — London.
10. Поляновский О. Л., Телегди М. (1965) *Биохимия*, **30**, 174—182.
11. Birchmeier W., Wilson K. J., Christen P. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 1751—1759.
12. Wada H., Snell E. E. (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 127—132.
13. Weiner A. M., Platt T., Weber K. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 3242—3251.
14. Арутюнян А. А., Варшавский Я. М., Северин Е. С. (1975) *Биохимия*, **40**, 878—884.

Поступила в редакцию
17.XI.1976

LOCALIZATION OF CROSS-LINKS IN ASPARTATE TRANSAMINASE FORMED BY REACTION WITH 1,5-DIFLUORO-2,4-DINITROBENZENE

DEYEV S. M., APHANASENKO G. A., POLYANOVSKY O. L.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Bifunctional reagent 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene in neutral media reacts selectively with a lysine residue of the aspartate aminotransferase active site, whereas in alkaline media (pH 9.0) the second fluorine atom of bifunctional reagent is substituted with cysteine or tyrosine residues. To obtain the colored peptides, partial proteolysis with pronase was utilized. The isolation of yellow material involved chromatography on Bio-gel P-2. Specific adsorption of chromophore-containing material which occurred at this step allowed to separate the modified and unmodified fragments. Further purification of colored products was performed by means of paper chromatography and electrophoresis. The structure determination for colored peptides enabled identification of lysine 258 and cysteine 390 which have been reacted with the bifunctional reagent. Thus it is unambiguously shown that ϵ -amino group of Lys 258 forming aldimine bond with pyridoxal 5'-phosphate has at a distance of about 5 Å the Cys 390 and tyrosine residues.