



УДК 547.962.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ
ИЗ *ESCHERICHIA COLI*II *. АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ УЧАСТКА, СОДЕРЖАЩЕГО
GTP-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ЦЕНТР*Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А.,
Винокуров Л. М.**Институт белка Академии наук СССР, г. Пушкино, Московской обл.*

Определена аминокислотная последовательность фрагмента, полученного ограниченным трипсинолизом EF-G. Фрагмент содержит функционально важную SH-группу и формирует GTP-связывающий центр EF-G. Полипептидная цепь фрагмента состоит из 69 аминокислотных остатков; в 55-м положении находится единственный остаток цистеина. Для установления его структуры исследовались пептиды, полученные после расщепления молекулы или ее фрагментов бромцианом, трипсином, термолизном, стафилококковой глутаминовой протеазой и ограниченным кислотным гидролизом.

Фактор элонгации EF-G катализирует рибосомозависимую GTP-азную реакцию [2], которая протекает через промежуточные стадии образования бинарного комплекса EF-G·GTP [3—7] и тройственного комплекса EF-G·GTP·Rs [8, 9]. В последнем наводится GTP-азная реакция и происходит гидролиз GTP с диссоциацией комплекса EF-G·GDP·Rs на EF-G·GDP и Rs [3]. Активность EF-G в этой реакции зависит от наличия в нем свободной сульфгидрильной группы. Эта экспонированная SH-группа легко модифицируется сульфгидрильными реагентами, что приводит к ингибированию как взаимодействия EF-G с рибосомой, так и несопряженной GTP-азной реакции [8, 10—12]. Однако модификация экспонированной SH-группы не влияет на образование бинарного комплекса EF-G с GTP или GDP [3, 4]. Таким образом, наличие свободной SH-группы в молекуле EF-G существенно для его взаимодействия с рибосомой, а не с нуклеотидами. Вместе с тем известно, что гуаниловые нуклеотиды защищают эту группу от действия тиольных реагентов [13]. Как было показано [12], экранирующий эффект нуклеотидов, вероятно, обусловлен не прямым экранированием сульфгидрильной группы, а локальным изменением конформации полипептидной цепи вблизи реактивной SH-группы в присутствии GTP. Из этих данных следует, что экспонированная SH-группа, хотя и не входит непосредственно в GTP-связывающий участок, находится в непосредственной от него близости. Недавно в нашей лаборатории фотохимической модификацией EF-G аналогом GTP было показано, что район по-

* Сообщение I см. [1]; Rs — рибосома.

липептидной цепи EF-G, включающий экспонированную SH-группу, непосредственно участвует в связывании GTP [14].

Инкубирование EF-G с трипсином дает несколько сравнительно устойчивых к дальнейшему действию трипсина фрагментов [15]. Подробно исследовав фрагменты, образующиеся при ограниченном трипсинолизе EF-G, модифицированного по экспонированной SH-группе [^{14}C]ICH₂CONH₂, мы показали, что эта SH-группа находится в N-концевом участке EF-G [1].

В этой статье мы приводим аминокислотную последовательность фрагмента EF-G, содержащего экспонированную SH-группу и, по-видимому, формирующего GTP-связывающий центр *. Фрагмент состоит из 69 аминокислотных остатков, в положении 55 находится единственный на молекулу белка остаток цистеина.

EF-G получен по методу, описанному нами ранее [1]. Фрагмент, содержащий экспонированную SH-группу (SH-фрагмент), выделен из продуктов ограниченного триптического гидролиза EF-G, модифицированного [^{14}C]ICH₂CONH₂. Первоначальное разделение проведено гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-100 (сверхтонкий) [1] (рис. 1). Фракция «А», содержащая радиоактивную метку, была далее подвергнута рехроматографии на колонке с QAE-сефадексом А-25 в градиенте концентрации KCl (рис. 2). Гомогенность исходного белка и фрагмента, оцененная с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и определением N-концевых аминокислотных последовательностей автоматическим методом Эдмана, составила 98—100%.

Согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата, фрагмент, содержащий SH-группу, имеет молекулярный вес ~8000 и следующий аминокислотный состав (мол. %):

Cys 1,63; Asp 5,86; Thr 8,74; Ser 4,66; Glu 10,62; Pro 4,50; Gly 9,14; Ala 8,73; Val 11,84; Met 4,38; Ile 8,12; Leu 2,00; Tyr 3,32; Phe 3,12; His 3,68; Lys 1,66; Trp 1,76; Arg 6,24.

Нами установлено, что N-концевым остатком фрагмента является глицин, а C-концевая последовательность -Val-Trp-Arg. Из данных аминокислотного анализа видно, что фрагмент содержит три остатка метионина. Поэтому для получения крупных пептидов фрагмент был расщеплен бромцианом и полученную смесь пептидов разделили на колонке с QAE-сефадексом А-25 (рис. 3). В результате были выделены в гомогенном виде три пептида, СВ-2, СВ-4 и СВ-5, а также смесь пептидов СВ-1 и СВ-3 (табл. 1 и 2). Последние были разделены высоковольтным электрофорезом на бумаге при pH 3,6 (5000 В, 1,5 ч).

Пептид СВ-1 оказался N-концевым, а пептид СВ-4 — C-концевым. Пептид СВ-5 образовался в результате неполного расщепления связи между остатками метионина и аланина (положение 16—17, см. схему). Таким образом, в результате проведенного разделения выделено пять пептидов, которые охватывают всю молекулу фрагмента (см. табл. 2 и схему). Для определения аминокислотной последовательности пептиды СВ-1 — СВ-4 были подвергнуты ручной деградации по Эдману (дансиловая модификация). В результате структура пептидов СВ-1 и СВ-3 была установлена полностью, а структура пептидов СВ-2 и СВ-4 — до положения 13 и 16 соответственно. Структура пептида СВ-5 не устанавливалась, поскольку из данных аминокислотного анализа и определения N-концевой последовательности следовало, что он представляет собой пептиды СВ-1 и СВ-2, объединенные в одну полипептидную цепь.

Для выяснения полной структуры пептида СВ-2 его подвергали ограниченному кислотному гидролизу разбавленной HCl, гидролизат разделили высоковольтным электрофорезом на бумаге при pH 3,6 (4500 В, 1,5 ч). В результате было выделено 5 пептидов (табл. 3 и 4): Ас-1 — Ас-4,

* См. также предварительное сообщение [16].

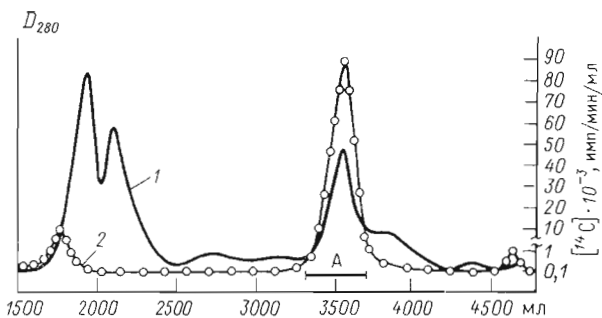


Рис. 1. Гель-фильтрация продуктов ограниченного триптического гидролиза ^{14}C карбоксиметилированного по одной SH-группе EF-G. Колонка (5×270 см) с сефадексом G-100 (сверхтонкий), уравновешенная буфером 0,02 М трис-HCl (pH 7,5) — 1 мМ β -меркаптоэтанол — 6 М мочевины; скорость элюирования 15 мл/ч; образец — 1 г гидролизата; 1 — поглощение при 280 нм, 2 — радиоактивность

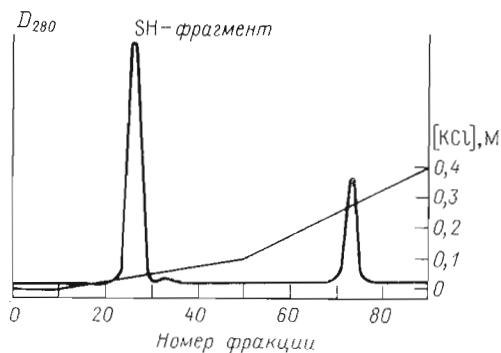


Рис. 2. Хроматография фракции «А» (см. рис. 1) на колонке ($1,5 \times 10$ см) с QAE-сефадексом А-25, уравновешенной буфером 0,02 М трис-HCl (pH 8,3) с 6 М мочевиной, в градиенте концентрации KCl; скорость элюирования 28 мл/ч, объем фракции 7 мл

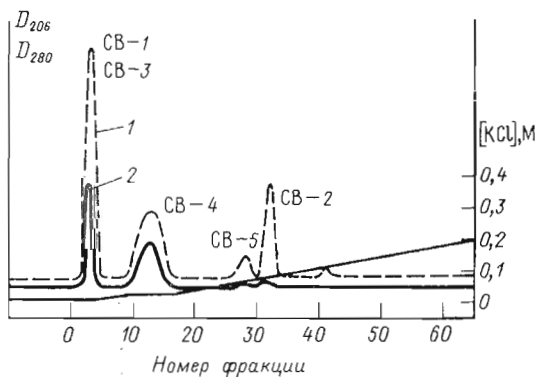


Рис. 3. Хроматография продуктов бромиданового расщепления SH-фрагмента на колонке (1×8 см) с QAE-сефадексом А-25, уравновешенной буфером 0,01 М трис-HCl (pH 8,3) с 6 М мочевиной, в градиенте 0—0,3 М KCl (по 150 мл). Скорость элюирования 10,5 мл/ч, объем фракции 3,5 мл. 1, 2 — соответственно поглощение при 206 и 280 нм

Аминокислотный состав SH-фрагмента и его бромциановых пептидов (СВ)

N-Концевая аминокисло- та	SH-фрагмент	СВ-1	СВ-2	СВ-3	СВ-4	СВ-5
	Gly	Gly	Ala	Arg	Val	Gly
Cys(См)	1,1(1)				1,1(1)	
Asp	4,1(4)		2,9(3)	1,2(1)		3,0(3)
Thr	6,1(7)	3,7(4)	2,0(2)		1,0(1)	5,6(6)
Ser	3,3(4)	1,6(2)	1,1(1)		0,9(1)	3,0(3)
Hse		* (1)	* (1)	* (1)		* (1)
Glu	7,3(7)		4,0(4)		3,2(3)	4,3(4)
Pro	3,1(3)		1,9(2)		0,9(1)	1,9(2)
Gly	6,3(6)	2,3(2)	1,2(1)	1,1(1)	2,1(2)	3,3(3)
Ala	6,0(6)	3,2(3)	1,2(1)	1,0(1)	1,2(1)	3,2(4)
Val	8,2(8)		2,0(2)	1,8(2)	4,0(4)	2,0(2)
Met	3,0(3)					0,6(1)
Ile	5,6(6)	2,0(2)	3,8(4)			5,6(6)
Leu	1,4(1)			1,0(1)		
Tyr	2,3(2)		0,9(1)		0,8(1)	1,0(1)
Phe	2,1(2)	1,2(1)	0,9(1)			2,1(2)
His	2,4(2)		1,9(2)			2,0(2)
Lys	1,1(1)		1,2(1)			1,0(1)
Trp	1,2(2)	** (1)			** (1)	** (1)
Arg	4,3(4)		2,0(2)	1,0(1)	0,9(1)	2,3(2)
Количество остатков	69	16	28	8	17	44

* Количественно не определяется.
** Не определяется.

Таблица 2

Бромциановые пептиды SH-фрагмента

Пептид	Аминокислотная последовательность
СВ-1	$\overrightarrow{\text{Gly-Ile-Thr-Ile-Thr-Ser-Ala-Ala-Thr-Thr-Ala-Phe-Trp-Ser-Gly-Hse}}$
СВ-2	$\overrightarrow{\text{Ala-Lys-Gln-Tyr-Glu-Pro-His-Arg-Ile-Asn-Ile-Ile-Asp-Thr-Pro-Gly-His-Val-Asp-Phe-Thr-Ile-Glu-Val-Glu-Arg-Ser-Hse}}$
СВ-3	$\overrightarrow{\text{Arg-Val-Leu-Asp-Gly-Ala-Val-Hse}}$
СВ-4	$\overrightarrow{\text{Val-Tyr-Cys-Ala-Val-Gly-Gly-Val-Gln-Pro-Gln-Ser-Glu-Thr-Val-Trp-Arg}}$
СВ-5	$\text{Gly-Ile-Thr-Ile-Thr-Ser-Ala-Ala-Thr-Thr-Ala-Phe-Trp-Ser-Gly-Met-Ala-Lys-Gln-Tyr-Glu-Pro-His-Arg-Ile-Asn-Ile-Ile-Asp-Thr-Pro-Gly-His-Val-Asp-Phe-Thr-Ile-Glu-Val-Glu-Arg-Ser-Hse}$

$\overrightarrow{\quad}$ — аминокислотная последовательность, установленная ручным методом Эдмана.
 $\overleftarrow{\quad}$ — аминокислотная последовательность, установленная с помощью карбоксипептидаз А и В.

составившие полную структуру пептида СВ-2, и пептид Ас-5, составивший структуру Ас-1 и Ас-2. Структура всех выделенных пептидов была полностью определена данильным методом Эдмана, и, таким образом, установлена полная аминокислотная последовательность пептида СВ-2. Полученные данные были подтверждены определением аминокислотной последовательности на целой молекуле автоматическим методом Эдмана до 40-го аминокислотного остатка включительно, что позволило, кроме того, объединить в одну полипептидную цепь бромциановые пептиды СВ-1 и СВ-2.

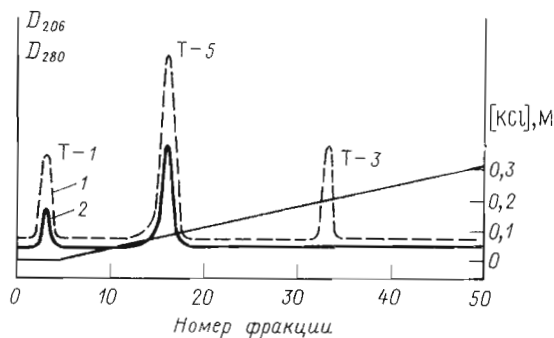


Рис. 4. Хроматография нерастворимой части продуктов триптического гидролиза SH-фрагмента на колонке (1 × 10 см) с QAE-сефадексом А-25, уравновешенной буфером 0,01 М трис-HCl (рН 8,3) с 6 М мочевиной, в градиенте 0—0,4 М KCl (по 150 мл). Скорость элюирования 9 мл/ч, объем фракции 4,5 мл. 1, 2 — соответственно поглощение при 206 и 280 нм

подвергнут гидролизу термוליзином и стафилококковой глутаминовой протеазой. Термолитический гидролизат был разделен методом пептидных карт на пластинке с тонким слоем целлюлозы (рис. 5). В результате выделено 7 пептидов (табл. 7 и 8). Структура пептидов Th-1, Th-2, Th-5 — Th-7 не определялась, поскольку они входят в уже известную часть молекулы, а пептиды Th-3 и Th-4 охватывают С-концевой участок молекулы фрагмента (положение 56—69). Исследование их структуры подтвердило данные по определению С-концевой последовательности фрагмента и бромцианового пептида СВ-4 с помощью карбоксипептидаз А и В и структуру пептида СВ-4.

Таблица 3

Аминокислотный состав пептидов из ограниченного кислотного гидролиза пептида СВ-2 (Ac)

N-Концевая амино- кислота	Ac-1	Ac-2	Ac-3	Ac-4	Ac-5
	Ala	Ile	Phe	Val	Ala
Cys (Cm)					
Asp	1,0(1)	2,0(2)			2,9(3)
Thr		1,2(1)	0,9(1)		1,1(1)
Ser				0,9(1)	
Hse				* (1)	
Glu	2,1(2)		1,2(1)	1,2(1)	2,1(2)
Pro	0,9(1)	1,0(1)			2,0(2)
Gly		1,1(1)			1,1(1)
Ala	1,1(1)				1,1(1)
Val		1,0(1)		0,9(1)	1,1(1)
Met					
Ile	1,1(1)	1,8(2)	1,0(1)		2,7(3)
Leu					
Tyr	1,0(1)				1,0(1)
Phe			0,9(1)		
His	0,9(1)	1,0(1)			1,7(2)
Lys	0,9(1)				1,0(1)
Trp					
Arg	1,1(1)			1,1(1)	1,3(1)
Количество остатков	10	9	4	5	19

* Количественно не определялся.

Таблица 4

Пептиды ограниченного кислотного гидролиза пептида СВ-2

Пептид	Аминокислотная последовательность
Ac-1	$\vec{\text{Ala}}-\vec{\text{Lys}}-\vec{\text{Gln}}-\vec{\text{Tyr}}-\vec{\text{Glu}}-\vec{\text{Pro}}-\vec{\text{His}}-\vec{\text{Arg}}-\vec{\text{Ile}}-\vec{\text{Asn}}$
Ac-2	$\vec{\text{Ile}}-\vec{\text{Ile}}-\vec{\text{Asp}}-\vec{\text{Thr}}-\vec{\text{Pro}}-\vec{\text{Gly}}-\vec{\text{His}}-\vec{\text{Val}}-\vec{\text{Asp}}$
Ac-3	$\vec{\text{Phe}}-\vec{\text{Thr}}-\vec{\text{Ile}}-\vec{\text{Glu}}$
Ac-4	$\vec{\text{Val}}-\vec{\text{Glu}}-\vec{\text{Arg}}-\vec{\text{Ser}}-\vec{\text{Hse}}$
Ac-5	$\vec{\text{Ala}}-\vec{\text{Lys}}-\vec{\text{Gln}}-\vec{\text{Tyr}}-\vec{\text{Glu}}-\vec{\text{Pro}}-\vec{\text{His}}-\vec{\text{Arg}}-\vec{\text{Ile}}-\vec{\text{Asn}}-\vec{\text{Ile}}-\vec{\text{Ile}}-\vec{\text{Asp}}-\vec{\text{Thr}}-\vec{\text{Pro}}-\vec{\text{Gly}}-\vec{\text{His}}-\vec{\text{Val}}-\vec{\text{Asp}}$

Таблица 5

Аминокислотный состав триптических пептидов SH-фрагмента (Т)

N-Концевая амино- кислота	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5
	Gly	Gln	Ile	Ser	Val
Cys(Cm)					1,0(1)
Asp			3,0(3)		1,2(1)
Thr	3,7(4)		1,8(2)		1,1(1)
Ser	1,7(2)			0,9(1)	1,2(1)
Glu		2,2(2)	2,2(2)		3,1(3)
Pro		1,0(1)	0,7(1)		0,8(1)
Gly	2,3(2)		1,5(1)		3,2(3)
Ala	4,5(4)				2,1(2)
Val			2,0(2)		5,8(6)
Met	1,0(1)			0,9(1)	0,9(1)
Ile	2,3(2)		3,2(4)		
Leu					1,1(1)
Tyr		0,6(1)			0,9(1)
Phe	1,1(1)		1,1(1)		
His		1,0(1)	1,0(1)		
Lys	1,3(1)				
Trp	** (1)				0,7(1)
Arg		1,2(1)	1,0(1)	1,1(1)	1,0(1)
Количество остатков	18	6	18	3	24

** Не определялся.

Таблица 6

Триптические пептиды SH-фрагмента

Пептид	Аминокислотная последовательность
T-1	$\vec{\text{Gly}}-\vec{\text{Ile}}-\vec{\text{Thr}}-\vec{\text{Ile}}-\vec{\text{Thr}}-\vec{\text{Ser}}-\vec{\text{Ala}}-\vec{\text{Ala}}-\vec{\text{Thr}}-\vec{\text{Thr}}-\vec{\text{Ala}}-\vec{\text{Phe}}-\vec{\text{Trp}}-\vec{\text{Ser}}-\vec{\text{Gly}}-\vec{\text{Met}}-\vec{\text{Ala}}-\vec{\text{Lys}}$
T-2	$\vec{\text{Gln}}-\vec{\text{Tyr}}-\vec{\text{Glu}}-\vec{\text{Pro}}-\vec{\text{His}}-\vec{\text{Arg}}$
T-3	$\vec{\text{Ile}}-\vec{\text{Asn}}-\vec{\text{Ile}}-\vec{\text{Ile}}-\vec{\text{Asp}}-\vec{\text{Thr}}-\vec{\text{Pro}}-\vec{\text{Gly}}-\vec{\text{His}}-\vec{\text{Val}}-\vec{\text{Asp}}-\vec{\text{Phe}}-\vec{\text{Thr}}-\vec{\text{Ile}}-\vec{\text{Glu}}-\vec{\text{Val}}-\vec{\text{Glu}}-\vec{\text{Arg}}$
T-4	$\vec{\text{Ser}}-\vec{\text{Met}}-\vec{\text{Arg}}$
T-5	$\vec{\text{Val}}-\vec{\text{Leu}}-\vec{\text{Asp}}-\vec{\text{Gly}}-\vec{\text{Ala}}-\vec{\text{Val}}-\vec{\text{Met}}-\vec{\text{Val}}-\vec{\text{Tyr}}-\vec{\text{Cys}}-\vec{\text{Ala}}-\vec{\text{Val}}-\vec{\text{Gly}}-\vec{\text{Gly}}-\vec{\text{Val}}-\vec{\text{Gln}}-\vec{\text{Pro}}-\vec{\text{Gln}}-\vec{\text{Ser}}-\vec{\text{Glu}}-\vec{\text{Thr}}-\vec{\text{Val}}-\vec{\text{Trp}}-\vec{\text{Arg}}$

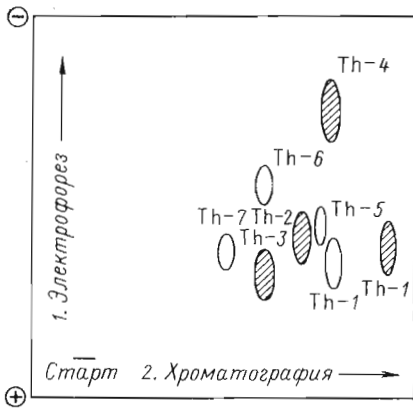


Рис. 5

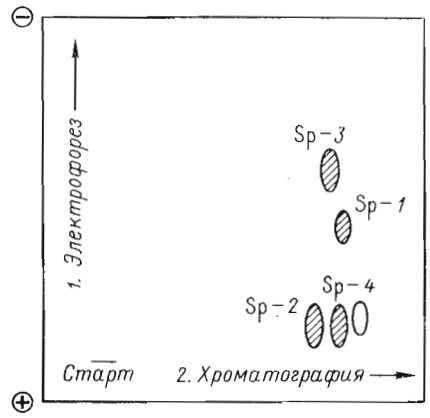


Рис. 6

Рис. 5. Микропрепаративное разделение продуктов термолитического гидролиза пептида Т-5 методом пептидных карт на пластинке (20 × 20 см) с тонким слоем целлюлозы. Электрофорез (800 В, 1 ч) в буфере НСООН — СН₃СООН — Н₂О (20 : 80 : 900), рН 1,9; хроматография в системе *n*-бутанол — пиридин-ацетат — вода (1 : 1 : 1), рН 5,4

Рис. 6. Микропрепаративное разделение продуктов гидролиза пептида Т-5 стафилококковой глутаминовой протеазой методом пептидных карт. Условия аналогичны разделению на рис. 5

Однако термолитические пептиды не позволили подтвердить последовательность Thr-Val в положении 66—67. Поэтому триптический пептид Т-5 был подвергнут гидролизу стафилококковой глутаминовой протеазой. В результате разделения продуктов гидролиза методом пептидных карт (см. рис. 6 и табл. 9 и 10) получили пептид с последовательностью Thr-Val-Trp-Arg и тем самым установили аминокислотную последовательность пептида Т-5. Таким образом, исследование структуры пептидов, выделенных

Таблица 7

Аминокислотный состав пептидов термолитического гидролиза пептида Т-5 (Th)

N-Концевая аминокислота	Th-1	Th-2	Th-3	Th-4	Th-5	Th-6	Th-7
	Val	Val	Ala	Val	Val	Ala	Val
Cys(Cm)		0,8(1)					
Asp	1,0(1)						
Thr			1,0(1)				1,0(1)
Ser			1,0(1)				1,2(1)
Glu			3,0(3)				2,8(3)
Pro			1,0(1)				0,9(1)
Gly	1,2(1)		2,0(2)			2,1(2)	
Ala	1,0(1)		0,8(1)			1,0(1)	
Val	2,0(2)	1,2(1)	2,0(2)	0,9(1)	1,2(1)	1,0(1)	1,0(1)
Met	0,9(1)						
He							
Leu	0,9(1)						
Tyr		1,0(1)				0,8(1)	
Phe							
His							
Lys							
Trp							
Arg				0,6(1) 1,2(1)			
Количество остатков	7	3	11	3	2	4	7

Пептиды термолитического гидролиза пептида Т-5

Пептиды	Аминокислотная последовательность
Th-1	Val-Leu-Asp-Gly-Ala-Val-Met
Th-2	Val-Tyr-Cys
Th-3	$\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Gln}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Gln}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Thr}}$
Th-4	$\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Trp}}-\overrightarrow{\text{Arg}}$
Th-5	Val-Tyr
Th-6	Ala-Val-Gly-Gly
Th-7	Val-Gln-Pro-Gln-Ser-Glu-Thr

Таблица 9

Аминокислотный состав пептидов, полученных при гидролизе пептида Т-5 глутаминовой протеазой SP

N-Концевая аминокислота	Sp-1	Sp-2	Sp-3	Sp-4
	Val	Gly	Thr	Val
Cys(Cm)		0,9(1)		0,9(1)
Asp	0,9(1)			1,0(1)
Thr			1,0(1)	
Ser		1,0(1)		1,0(1)
Glu		3,2(3)		3,2(3)
Pro		0,9(1)		0,9(1)
Gly		3,2(3)		3,2(3)
Ala		2,1(2)		2,1(2)
Val	1,2(1)	3,8(4)	1,1(1)	4,9(5)
Met		0,8(1)		0,8(1)
Ile				
Leu	0,9(1)			0,9(1)
Tyr		0,9(1)		0,9(1)
Phe				
His				
Lys				
Trp			0,6(1)	
Arg			1,2(1)	
Общее количество остатков	3	17	4	20

Таблица 10

Пептиды, полученные при гидролизе пептида Т-5 глутаминовой протеазой

Пептид	Аминокислотная последовательность
Sp-1	Val-Leu-Asp
Sp-2	Gly-Ala-Val-Met-Val-Tyr-Cys-Ala-Val-Gly-Gly-Val-Gln-Pro-Gln-Ser-Glu
Sp-3	$\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Trp}}-\overrightarrow{\text{Arg}}$
Sp-4	Val-Leu-Asp-Gly-Ala-Val-Met-Val-Tyr-Cys-Ala-Val-Gly-Gly-Val-Gln-Pro-Gln-Ser-Glu

после расщепления исследуемой молекулы или ее фрагментов бромцианом, трипсином, термолизиним, стафилококковой глутаминовой протеазой и ограниченным кислотным гидролизом, позволило установить аминокислотную последовательность фрагмента G-фактора, формирующего его GTP-связывающий центр.

Точный молекулярный вес фрагмента, образующего этот участок полипептидной цепи EF-G, равен 7511,64. Фрагмент содержит два остатка триптофана и один остаток цистеина. Интересно, что какой-либо гомологии в аминокислотной последовательности GTP-связывающих участков EF-Tu [17] и EF-G нет.

Экспериментальная часть

В работе использованы [^{14}C]ICH₂CONH₂ (Amersham, Англия), сефадексы G-100, QAE A-25 (Pharmacia, Швеция), реактивы для диск-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (Bio-Rad Lab., США), трипсин, карбоксипептидазы А и В (Worthington, США), термолизин (Serva, ФРГ), стафилококковая глутаминовая протеаза (Miles Lab., Англия), бромциан (Serva, ФРГ), реактивы для автоматического метода Эдмана и фенилтиогидантоины аминокислот (Beckman, США), пластинки с тонким слоем целлюлозы (Merck, ФРГ). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Аминокислотный анализ. Аминокислотный состав SH-фрагмента или пептидов определяли на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США). Гидролиз проводили 24 и 72 ч 5,6 н. HCl в вакуумированных запаянных ампулах. Цистеин определяли в виде карбоксиметилцистеина, количество валина и изолейцина — по результатам 72-часового гидролиза. Содержание триптофана устанавливали после гидролиза образцов 4 н-метансульфонокислотой, содержащей 0,2% 3-(2-аминоэтил)индола.

Определение N- и C-концевых аминокислот. N-Концевые аминокислоты пептидов определяли дансильным методом с идентификацией Dns-аминокислот двумерной ТСХ на пластинках с силикагелем (5 × 5 см), C-концевые аминокислоты — с помощью карбоксипептидаз А и В по модифицированному методу [18]. 9 нмоль фрагмента или пептида растворяли в 100 мкл 0,2 М N-этилморфолин-ацетатного буфера (рН 8,1), прибавляли карбоксипептидазу В в соотношении 1 : 100 по весу, инкубировали 20 мин, отбирали третью часть раствора, замораживали и лиофилизовали. К оставшейся части раствора добавляли карбоксипептидазу А в соотношении 1 : 50 по весу и отбирали аликвоты через 20 и 60 мин. Анализ проводили на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США).

Селективное [^{14}C]карбоксиметилирование EF-G по экспонированной SH-группе и выделение SH-фрагмента из продуктов ограниченного триптического гидролиза проводили как описано нами ранее [1].

Расщепление SH-фрагмента по остаткам метионина бромцианом. К образцу фрагмента (0,5 мкмоль), растворенного в 0,5 мл 70% муравьиной кислоты, добавляли 20 мг свежеевозогнанного бромциана и оставляли на 24 ч в темноте при комнатной температуре. Затем смесь разбавляли водой до 5 мл, лиофильно высушивали и далее разделяли на колонке с QAE-сефадексом А-25 (рис. 3).

Триптический гидролиз SH-фрагмента. 1,5 мкмоль SH-фрагмента, модифицированного [^{14}C]ICH₂CONH₂, растворяли в 3 мл аммиачной воды (рН 9,5), рН доводили до 8,1 уксусной кислотой и раствор термостатировали в ячейке титратора при 37°. К раствору добавляли трипсин (1% раствор в воде) (ТРСК-обработанный) в соотношении фермент—субстрат 1 : 50 двумя равными порциями с интервалом 2 ч и смесь инкубировали 6 ч при 37°, рН раствора поддерживали с помощью автотитратора (Radiometer, Дания) 1% раствором аммиака. Затем раствор подкисляли уксусной кислотой до рН 3, выпавший осадок отделяли центрифугированием (30 мин,

16 000 об/мин), затем суспендировали в 2 мл 5% уксусной кислоты и снова центрифугировали. Объединенный супернатант, содержащий растворимую часть гидролизата, разделяли в течение 1,5 ч высоковольтным электрофорезом при напряжении 4500 В на бумаге (Whatman, 3 ММ) в буфере пиридин — уксусная кислота — вода (20 : 200 : 1780), pH 3,6. Осадок растворяли в 50 % уксусной кислоте, лиофильно высушивали с мочевиной (10-кратное количество по весу) и разделяли хроматографией на колонке с QAE-сефадексом А-25 (рис. 4).

Термолизинный гидролиз пептида Т-5. К 70 нмоль пептида Т-5 в 0,2 мл 0,1 М ацетата аммония добавляли 1% раствор термолизина в воде в соотношении фермент — субстрат 1 : 50 по весу и инкубировали 1 ч при 37°. Затем гидролизат лиофильно высушивали и разделяли методом пептидных карт на пластинках (20 × 20 см) с тонким слоем целлюлозы (рис. 5). После высушивания пластинку обработали 3% раствором пиридина в абсолютном ацетоне, а затем 0,001% раствором флуорескамина (Pierce, США) в абсолютном ацетоне. Целлюлозу с флуорескаминположительными пятнами снимали с пластинки, переносили в полиэтиленовую ампулу, добавляли 50 мкл 50% водного пиридина и суспендировали на вибромешалке. Через 20 мин ампулы центрифугировали (50 мин, 5000 об/мин) и раствор осторожно отбирали капилляром из ампулы. Экстракцию проводили дважды. Объединенный экстракт использовался для ручной деградации по Эдману (дансильная модификация). Если образец пептида использовали для аминокислотного анализа, то экстракцию проводили аналогично, но вместо пиридина брали 5,6 н. HCl.

Гидролиз пептида Т-5 стафилококковой глутаминовой протеазой. К 50 нмоль пептида в 0,2 мл 0,2 М N-этилморфолин-ацетатного буфера (pH 7,5) добавляли раствор глутаминовой протеазы в воде (0,3 мг/мл) при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 по весу. Гидролиз проводили 24 ч при 37°. После лиофильного высушивания гидролизат разделяли методом пептидных карт в условиях разделения термолизинного гидролизата пептида Т-5 (рис. 6).

Автоматический метод Эдмана. Автоматическое определение N-концевой последовательности в SH-фрагменте проводили на секвенаторе модели 890С (Beckman, США) с использованием диметилаллиламинной программы [102974 по фирменному руководству). Для деградации было взято 300 нм карбоксиметилированного SH-фрагмента. Идентификацию фенилтиогидантоинов 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 Li Chrosorb Si 60, и тонкослойной хроматографией на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄, (Fluka, Швейцария), а также на аминокислотном анализаторе D-500 после гидролиза фенилтиогидантоинов аминокислот 5,6 н. HCl.

Установление аминокислотной последовательности в пептидах. Ручной вариант метода Эдмана (дансильная модификация) проводили по методу [19, 20] с некоторыми изменениями. Все операции с пептидами производили в пробирках (0,4 × 4 см), которые присоединяются к 4- или 8-местному пауку, снабженному трехходовым краном, для подсоединения азота или вакуумного насоса. Обогрев пробирок осуществляется в термостабируемой ячейке, соединенной с ультратермостатом U-1 (ГДР). Образец пептида (5—10 нмоль) высушивали в пробирке, добавляли 50 мкл бидистиллированной воды (перегнанной над KMnO₄) и высушивали в вакууме. Затем снова растворяли в 50 мкл воды и отбирали 2—3 мкл этого раствора для последующего дансирования. К остатку добавляли 50 мкл 5% раствора фенилизотиоцианата в пиридине (трижды перегнанного), пробирки заполняли азотом и реакцию проводили 60 мин при 45°. После завершения реакции раствор высушивали в вакууме при 60° в течение 30 мин, затем пробирки заполняли азотом и добавляли 100 мкл трифторук-

сусной кислоты, перегнанной над CrO_3 , и реакцию проводили 30 мин при 45° . По окончании реакции смесь высушивали в вакууме (15 мин, 60°), добавляли 50 мкл воды и трижды экстрагировали этилацетатом (порциями по 200 мкл). Экстракты собирали, высушивали в токе азота и хранили при -18° . После экстракции анилинтиоазолинона цикл деградации повторяли.

2—3 мкл раствора пептида, отобранного перед реакцией карбамиллирования, помещали в стеклянную ампулу, высушивали в вакууме и добавляли 10 мкл 0,1 М раствора NaHCO_3 и 10 мкл раствора дансилхлорида в ацетоне (2,5 мг/мл). Ампулы закрывали парафильмом и реакцию проводили 30 мин при 45° . После этого реакционную смесь высушивали в вакууме, добавляли 10 мкл 5,6 н. HCl , ампулы замораживали, вакуумировали и запаивали. Гидролиз проводили 4—16 ч при 110° . По окончании гидролиза ампулы вскрывали, высушивали в вакууме, добавляли 10 мкл воды и снова высушивали. Идентификацию Dns-производных аминокислот проводили двумерной ТСХ на пластинках (5×5 см) с силикагелем [21, 22] или на полиамидных пластинках 5×5 см (Pierce, США) [23].

Идентификация амидов глутаминовой и аспарагиновой аминокислот. Этилацетатные экстракты после каждого цикла деградации высушивали в токе азота, затем добавляли 200 мкл 1 н. HCl и инкубировали 5 мин при 80° . Фенилтиогидантоины аминокислот экстрагировали из водной фазы тремя порциями по 200 мкл этилацетата и экстракт высушивали в токе азота. Остаток растворяли в 25 мкл этилацетата, наносили на пластинку с силикагелем (Kieselgel 60F₂₅₄, Merck, ФРГ) и последовательно хроматографировали в трех системах растворителей: I — хлороформ — 0,5% этанола; II — хлороформ — метанол, 9 : 1; III — хлороформ — уксусная кислота, 8 : 2. После высушивания пластинки фенилтиогидантоины глутамина, аспарагина, глутаминовой и аспарагиновой аминокислот обнаруживали в УФ-свете, а также после опрыскивания пластинки 1% раствором нингидрина в смеси абсолютного этанола с коллидином (95 : 5) и выдерживания в течение 5 мин при 110° [24]. После такой обработки фенилтиогидантоины этих аминокислот окрашиваются в разные цвета. Для контроля на пластинку наносили также стандарты фенилтиогидантоинов аминокислот.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия проводили по Веберу и Осборн [25] с некоторыми изменениями. В качестве электродного буфера использовали раствор 20 мМ фосфата натрия с 0,1% додецилсульфата натрия (рН 7,0); гелевого буфера — раствор 40 мМ фосфата натрия с 0,2% додецилсульфата (рН 7,0), буфера для растворения образца — раствор 2 мМ фосфата натрия с 1% додецилсульфата, 1% β -меркаптоэтанола, 20% сахарозы (рН 7,0).

ЛИТЕРАТУРА

1. Алахов Ю. Б., Могуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М., Овчинников Ю. А. (1977) Биоорг. химия, 3, 1333—1345.
2. Nishizuka Y., Lipmann F. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55, 212—219.
3. Arai N., Arai K., Kaziro Y. (1975) J. Biochem., 78, 243—246.
4. Arai N., Arai K., Maeda T., Ohnishi S., Kaziro Y. (1976) J. Biochem., 80, 1057—1065.
5. Arai N., Arai K., Kaziro Y. (1977) J. Biochem., 82, 687—695.
6. Baca O. G., Rohrbach M. S., Bodley J. W. (1976) Biochemistry, 15, 4570—4574.
7. Rohrbach M. S., Bodley J. W. (1976) Biochemistry, 15, 4565—4569.
8. Kaziro Y., Inoue N., Kuriki Y., Mizumoto K., Tanaka M., Kawakita M. (1969) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 385—393.
9. Kuriki Y., Inoue N., Kaziro Y. (1970) Biochim. et biophys. acta, 224, 487—497.
10. Nishizuka Y., Lipmann F. (1966) Arch. Biochem. and Biophys., 116, 344—351.
11. Kaziro Y., Inoue-Yokosawa N., Kawakita M. (1972) J. Biochem., 72, 853—863.
12. Arai N., Arai K., Nakamura S., Kaziro Y. (1977) J. Biochem., 82, 695—702.
13. Marsh R. C., Chinali G., Parmeggiani A. (1975) J. Biol. Chem., 250, 8344—8352.
14. Girshovich A. S., Bochkareva E. S., Pozdnyakov V. A., Ovchinnikov Yu. A. (1978) FEBS Lett., 85, 283—286.
15. Skar D. C., Rohrbach M. S., Bodley J. W. (1975) Biochemistry, 14, 3922—3926.

16. Alakhov Yu. B., Motuz L. P., Stengrevics O. A., Ovchinnikov Yu. A. (1978) FEBS Lett., 85, 287—290.
17. Wade M. J., Laursen R. A., Miller D. L. (1975) FEBS Lett., 53, 37—39.
18. Ambler R. P. (1967) in Methods in Enzymology (Nirs C.H.W., ed.), vol. XI, pp. 156—166, Acad. Press, N. Y. — London.
19. Gray W. R., Hartley B. S. (1963) Biochem. J., 89, 379—380.
20. Bruton C. J., Hartley B. S. (1970) J. Mol. Biol., 52, 165—178.
21. Белецкий Б. Г., Ганкина Е. С., Прянишников С. Р., Эрастов Д. П. (1967) Молекулярн. биология, 1, 184—189.
22. Белецкий Б. Г., Ганкина Е. С., Нестеров В. В. (1967) Докл. АН СССР, 172, 91—93.
23. Woods K. R., Wang K. T. (1967) Biochim. et biophys. acta, 133, 369—370.
24. Roseau G., Pantel P. (1969) J. Chromatogr., 44, 392—395.
25. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406—4412.

Поступила в редакцию
20.IV.1978

**THE PRIMARY STRUCTURE OF THE ELONGATION FACTOR G FROM
ESCHERICHIA COLI. II. AMINO ACID SEQUENCE OF THE REGION
CONTAINING THE GTP-BINDING CENTER**

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

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

Amino acid sequence of the fragment obtained by limited trypsinolysis of EF-G has been determined. The fragment contains a functionally important SH-group and forms the GTP-binding center of EF-G. The polypeptide chain of the fragment consists of 69 amino acid residues, and the only cysteine residue is in position 55. To determine its structure, peptides obtained after digestion of the molecule or its fragments by cyanogen bromide, trypsin, thermolysine, staphylococcus glutamine protease and limited acid hydrolysis have been studied.
