



УДК 547.96.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА  $\alpha$ -СУБЪЕДИНИЦЫ ДНК-ЗАВИСИМОЙ  
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI* \*

## I. ПЕПТИДЫ ТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗА

*Модянов Н. Н., Динкин В. М., Смирнов Ю. В.,  
Чертов О. Ю., Потапенко Н. А., Шувалова Т. М.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шелюгина  
Академии наук СССР, Москва*

Определен аминокислотный состав  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\beta'$  субъединиц РНК-полимеразы *E. coli*. Проведен триптический гидролиз карбоксиметилированного препарата  $\alpha$ -субъединицы, радиоактивно меченой  $^{14}\text{C}$  по всем аминокислотам. Продукты гидролиза разделены хроматографией на катионите Аминекс 50 W  $\times$  4 и очищены с помощью гель-фильтрации, хроматографии и электрофореза на бумаге. Выделено 42 пептида. Установлена полная аминокислотная последовательность 39 пептидов и частичная 3 пептидов. Изученные пептиды (без учета неспецифических фрагментов) содержат 329 аминокислотных остатков, что соответствует полной полипептидной цепи исходного белка.

ДНК-зависимая РНК-полимераза (пуклеозидтрифосфат: РНК-нуклеотидилтрансфераза; КФ 2.7.7.6) осуществляет процесс транскрипции генетической информации в клетке. Фермент катализирует инициацию, элонгацию и терминацию синтеза полирибонуклеотидных цепей из рибонуклеозидтрифосфатов, используя в качестве матрицы ДНК. Молекулярный вес РНК-полимеразы *E. coli* равен  $\sim 500\,000$ ; фермент имеет сложную субъединичную структуру. Известны две энзиматически активные формы фермента: кор-фермент (минимальный фермент)  $\alpha_2\beta\beta'$  и холо-фермент  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ , отличающийся наличием фактора инициации  $\sigma$ .

В настоящее время имеется мало данных о механизме действия РНК-полимеразы, функциональной роли отдельных субъединиц и особенностях структурной организации молекулы фермента. В связи с этим мы предприняли исследование первичной структуры фермента. Проведенный нами ранее сравнительный анализ пептидного состава  $\alpha$ -субъединиц РНК-полимераз ряда бактерий с помощью метода пептидных карт показал эволюционную консервативность  $\alpha$ -субъединицы [2], что свидетельствует о ее существенной роли в процессе функционирования фермента.

В данном сообщении описывается определение аминокислотного состава субъединиц минимального фермента РНК-полимеразы, карбоксиметилирование  $\alpha$ -субъединицы, гидролиз этого белка трипсином, разделение и очистка продуктов гидролиза, определение аминокислотной последовательности выделенных пептидов.

На первом этапе исследования испытывались различные методы выделения РНК-полимеразы и было показано, что для выделения больших

\* Краткое сообщение см. [1].

Таблица 1

Аминокислотный состав субъединиц ДНК-зависимой РНК полимеразы *E. coli* В

Аминокислота	α		β		β'	
	Мольный процент	Число остатков *	Мольный процент	Число остатков	Мольный процент	Число остатков
Asp	9,1	29,9 (30)	10,7	149,6	9,9	151,8
Thr	6,1	20,1 (19)	4,4	61,8	5,5	84,4
Ser	5,4	17,6 (17)	5,7	79,2	5,3	80,5
Glu	14,0	46,2 (46)	13,5	188,5	12,4	190,1
Pro	5,0	16,4 (16)	4,3	59,3	3,7	56,3
Gly	6,2	20,4 (20)	8,2	114,5	9,0	137,0
Ala	7,2	23,8 (23)	6,7	93,4	9,4	143,6
1/2Cys	1,0	3,4 (4)	1,0	13,3	1,1	17,5
Val	8,8	29,0 (30)	8,4	117,0	7,5	114,8
Met	1,4	4,7 (5)	2,7	37,2	2,1	32,4
He	7,0	23,0 (24)	5,9	83,1	5,6	85,9
Leu	11,2	37,1 (38)	9,5	132,3	9,7	148,5
Tyr	1,4	4,7 (5)	3,1	42,9	2,2	33,4
Phe	1,4	4,6 (4)	2,9	40,1	2,2	34,1
His	2,1	6,9 (8)	1,3	18,5	1,4	21,4
Lys	4,9	16,1 (16)	5,3	74,3	5,3	81,6
Arg	7,3	24,1 (23)	6,3	88,3	6,8	104,7
Trp	0,3	1,0 (1)	0,5	6,7	0,8	12,0

\* В скобках указано число аминокислотных остатков исходя из установленной первичной структуры [1].

количеств кор-фермента наиболее целесообразно использовать метод Бёрджеса [3]. Наилучшие результаты по разделению фермента на субъединицы получены при использовании следующей схемы: а) хроматография на фосфоцеллюлозе Р-11 при pH 8,0 в буфере, содержащем 8 М мочевины [4], при этом α-субъединица проходит с объемом нанесения, а β- и β'-субъединицы разделяются с помощью ступенчатого градиента концентрации KCl; б) дополнительная очистка α-субъединицы на DEAE-целлюлозе [5]. Чистота полученных препаратов РНК-полимеразы и ее субъединиц определялась электрофорезом в полиакриламидном геле. Приготовление образцов [<sup>14</sup>C]α-субъединицы проводилось как описано ранее [2].

В табл. 1 приведены данные аминокислотного анализа субъединиц РНК-полимеразы (ср. [6]). Аминокислотный состав рассчитан на молекулярные веса: α — 36 500 [1], β — 155 000, β' — 165 000 [5].

Известно, что α-субъединица РНК-полимеразы представляет собой одну полипептидную цепь и не содержит дисульфидных связей [7]. Для предотвращения окисления цистеина в процессе выделения пептидов препарат α-субъединицы обрабатывался меркаптоэтанолом и затем карбоксиметилировался [<sup>3</sup>H]иодуксусной кислотой. Аминокислотный анализ полученного таким образом белка показал, что карбоксиметилирование остатков цистеина прошло практически количественно, а остатки других аминокислот при этом не затрагивались.

Триптический гидролиз карбоксиметилированного и радиоактивно меченного <sup>14</sup>C по всем аминокислотам образца α-субъединицы проводился при pH 8,3 и 37° в течение 5,5 ч (соотношение фермент — субстрат 1 : 30). Гидролиз останавливали подкислением реакционной массы, при этом часть пептидов выпала в осадок и была отделена центрифугированием. Первоначальное разделение растворимой части триптического гидролизата проводилось на смоле Аминекс 50W × 4 (минус 400 меш) с использованием экспоненциального градиента pH и концентрации пиридин-ацетатных буферов. В результате удалось разделить гидролизат на 22 фракции, каждая из которых представляла собой смесь небольшого числа пептидов. Кривая разделения пептидов на колонке показана на рис. 1, а ре-

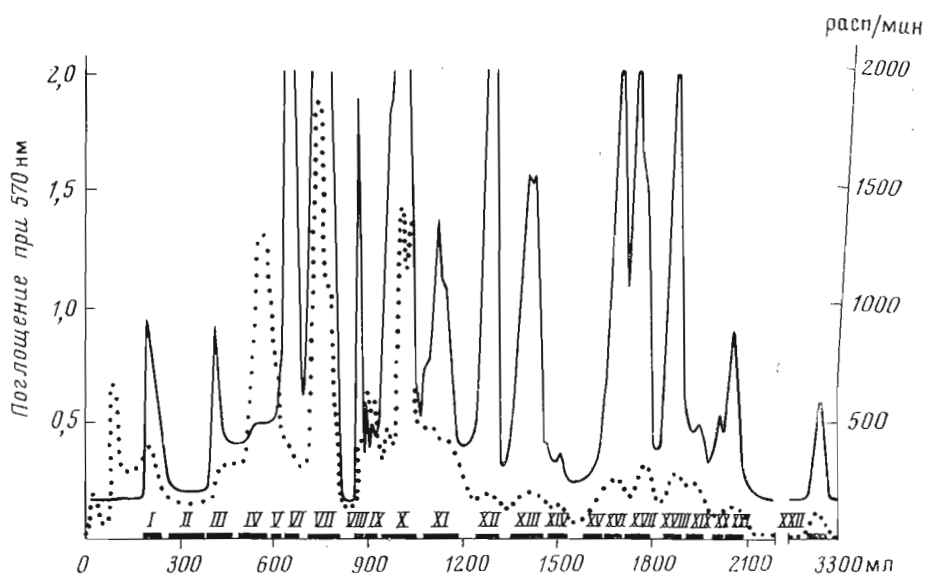


Рис. 1. Разделение растворимых триптических пептидов  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы на катионите Аминекс 50W  $\times$  4. Сплошная линия — поглощение при 570 нм после реакции с нингидрином; пунктир — радиоактивность; черные прямоугольники на оси абсцисс — границы объединения фракций

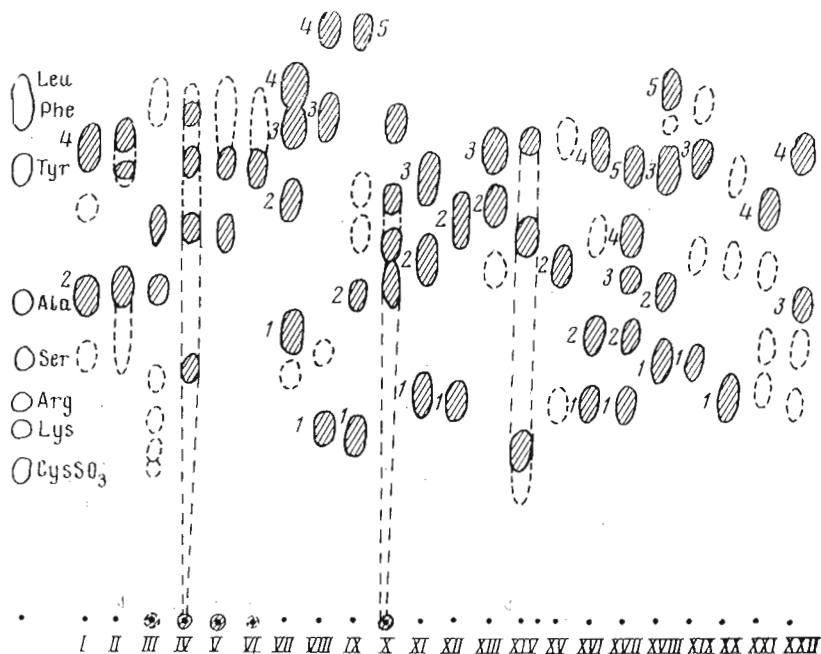


Рис. 2. Хроматография в тонком слое целлюлозы фракций I—XXII триптического гидролизата КМ  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода (15 : 3 : 10 : 12) (система I)

зультаты анализа фракций I—XXII с помощью хроматографии в тонком слое целлюлозы — на рис. 2. Промывание колонки после окончания опыта 0,5 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$  показало, что элюирование пептидов со смолы прошло полностью.

Использование в работе радиоактивно меченного препарата  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы существенно облегчило процесс детектирования

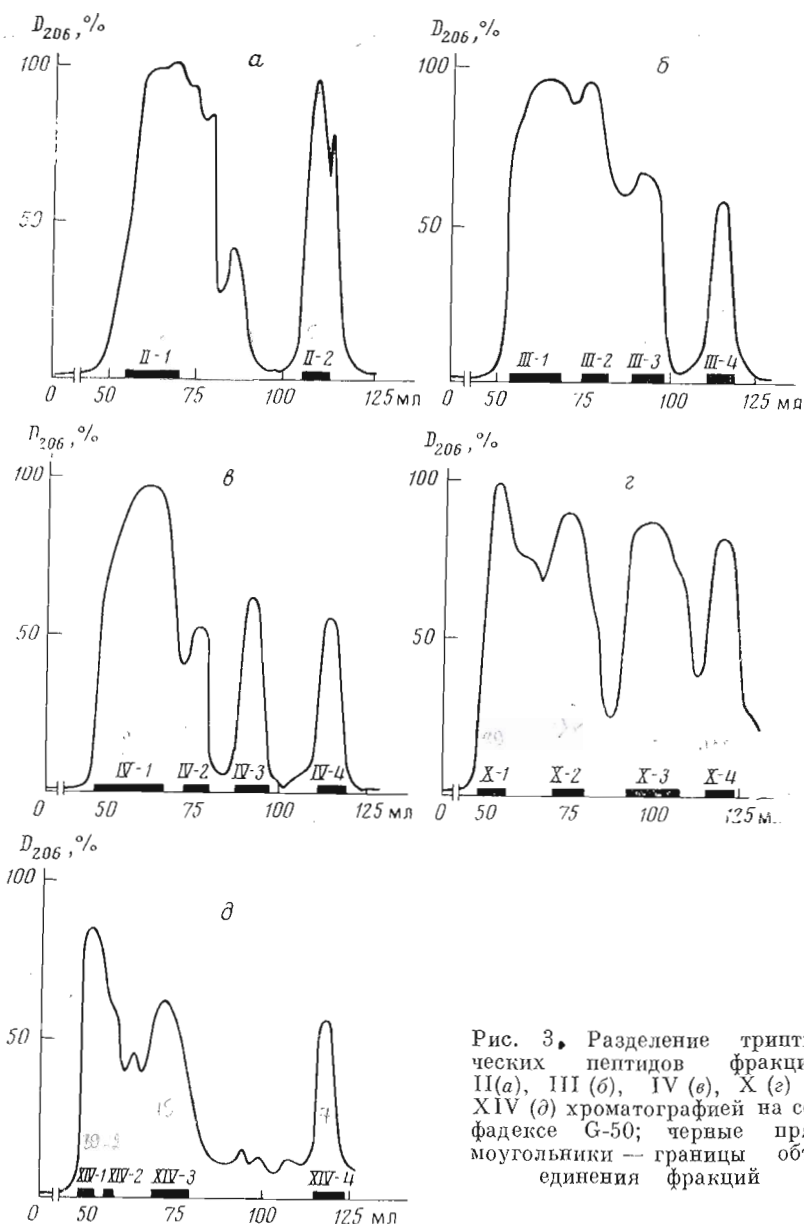


Рис. 3. Разделение триптических пептидов фракций II (а), III (б), IV (в), X (г) и XIV (д) хроматографией на сефадексе G-50; черные прямоугольники — границы объединения фракций

пептидов, особенно цистеинсодержащих и высокомолекулярных. Дальнейшее разделение объединенных фракций и очистку пептидов проводили в основном с помощью хроматографии на бумаге; для обнаружения пептидов использовали реакцию с нингидрином и автордиографию.

Большинство пептидов из объединенных фракций было выделено однократным хроматографированием на бумаге в системе 1. Как показал анализ N-концевых аминокислотных остатков, фракции VII-1, XI-1 и XI-2 содержали более одного пептида. Выделение пептидов из фракций VII-1 и XI-2 проводили путем повторного хроматографирования на бумаге в течение вдвое большего времени, а в случае фракции XI-1 был использован высоковольтный электрофорез на бумаге.

Как видно из рис. 2, фракции II—VI, X и XIV содержали высокомолекулярные пептиды, которые или не двигались с точки нанесения, или не образовывали четких зон при хроматографировании в тонком слое целлюлозы. Присутствие высокомолекулярных пептидов в этих фракциях

было подтверждено с помощью автордиографии. Поэтому для разделения этих фракций была использована хроматография на сефадексе G-50. Поскольку  $\alpha$ -субъединица РНК-полимеразы отличается крайне низким содержанием ароматических аминокислот, для обнаружения пептидов в элюате использовали измерение оптической плотности при 280 и 206 нм. Картины разделения пептидов приведены на рис. 3. В ряде случаев для уточнения областей выхода пептидов с колонки проводилось измерение радиоактивности или анализ N-концевых аминокислотных остатков. Окончательная очистка высокомолекулярных пептидов, полученных после первоначального деления на сефадексе, проводилась рехроматографированием в тех же условиях; для деления и очистки коротких пептидов использовалась хроматография на бумаге.

Часть пептидов из фракции X удалось выделить в гомогенном состоянии, используя различия в их растворимости. Так, осадок, не растворившийся в 50% пиридине, оказался практически чистым пептидом T-X-1. Таким путем было выделено 80% этого пептида. При растворении оставшейся части фракции в 2 М пиридин-ацетатном буфере, pH 5,0, в осадке осталось ~60% пептида T-X-2.

Из нерастворимой части гидролизата  $\alpha$ -субъединицы путем ряда последовательных хроматографий на сефадексах удалось выделить пептид T-XXIII-1. Остальная часть пептидного материала этой фракции представляла собой смесь пептидов, ранее выделенных из растворимой части гидролизата, и была использована, в частности, для наработки дополнительных количеств пептида T-V-2.

Всего из триптического гидролизата  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы было выделено 42 пептида (табл. 2). Соединение T-VIII-1 оказалось свободным лизином (выход 38%), а T-XII-1 — свободным аргинином (выход 112%), которые образовались в результате гидролиза одной связи Lys-Lys (остатки 297—298) и двух связей Arg-Arg (остатки 44—45, 218—219) [1].

Исчерпывающие данные о распределении пептидов по фракциям и их аминокислотный состав приведены в табл. 2. Как видно из этой таблицы, в ряде случаев пептиды с одинаковым аминокислотным составом были выделены из различных объединенных фракций, что чаще всего связано с неполным разделением при ионообменной хроматографии. Выход в далеко отстоящих друг от друга фракциях одинаковых пептидов T-XII-2, T-XIV-4 и T-XVIII-5 также может быть объяснен разницей степенью окисления входящего в их состав остатка метионина. Из объединенной фракции IX были выделены два пептида с идентичным аминокислотным составом. Пептид T-IX-1 имел в качестве N-концевого остатка глутамин, в то время как N-концевая группа T-IX-2 была блокирована. Образование пептида T-IX-2 произошло, очевидно, в процессе хранения фракции IX до деления с помощью бумажной хроматографии. Такой же аминокислотный состав и не поддающийся определению N-концевой аминокислотный остаток имели, кроме того, пептиды, которые элюировались во фракциях I—IV: T-I-2, T-II-2, T-III-4 и T-IV-4. Эти факты объясняются, по-видимому, циклизацией остатка глутамина в пироглутаминовую кислоту [8] в процессе гидролиза и деления на колонке.

Для определения N-концевой аминокислотной последовательности пептидов использовался метод Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 1-диметиламинонафталин-5-сульфонильных (ДНС) производных и фенилтиогидантоинов (ФТГ) аминокислот. Второй вариант обычно применялся для пептидов, содержащих остатки триптофана, глутаминовой и аспарагиновой кислот и их амидов. C-Концевая последовательность определялась с помощью карбоксипептидаз A, B и C. Для установления полной структуры длинных пептидов применялся дополнительный гидролиз стафилококковой протеазой или химотрипсином. Полученная смесь фрагментов разделялась гель-фильтрацией. При изучении взаимного располо-

Аминокислотный состав пептидов триптического гидролизата  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы

Аминокислота	Пептиды ***							Т-V-2, Т-IV-2; Т-VI-1
	Т-I-2; Т-II-2; Т-IX-2	Т-I-4	Т-II-1	Т-III-1	Т-III-3	Т-IV-1; Т-V-1		
СmCys								
Asp		1,87 (2)	2,43 (2)	4,03 (4)	2,05 (2)	0,95 (1)	1,34 (1)	1,34 (1)
Thr		0,97 (1)	1,64 (2)	2,90 (3)	1,05 (1)	1,86 (2)	1,86 (2)	1,17 (1)
Ser		2,29 (2)	4,08 (4)	4,33 (4)	4,36 (1)	2,60 (3)	3,30 (3)	3,15 (3)
Glu	2,06 (2)	2,05 (2)	1,41 (1)	1,31 (1)		3,30 (3)	1,43 (1)	
Pro	0,98 (1)		1,15 (1)	1,38 (1)		4,95 (2)	4,23 (1)	
Gly			1,29 (1)	1,27 (1)		1,23 (1)	2,78 (3) *	3,90 (4)
Ala		2,03 (2)	0,97 (1) *	4,47 (1) *	0,87 (1) *	0,48 (1)	0,98 (1)	0,98 (1)
Val	0,81 (1)		0,44 (1)	0,69 (1)		1,88 (2) *		
Met			2,70 (3) *	2,79 (3) *	0,81 (1) *	2,81 (3) *	1,09 (1)	1,09 (1)
Ile		4,43 (1)	1,03 (1)	2,45 (2)	1,80 (2)	0,76 (1)	3,44 (3)	3,44 (3)
Leu		1,08 (1)						
Tyr								
Phe							0,84 (1)	0,82 (1)
His							0,90 (1)	
Lys	1,15 (1)			0,92 (1)	0,95 (1)			
Arg		(1) **	0,77 (1)	0,92 (1)				0,92 (1)
Trp								
Число остатков	5	42	18	23	9	26	16	16
N-Концевая аминокислота	-	Leu	Leu	Thr	Asp	Ile	Ala	Ala
Выход, %	28	34	12	9	11	25	12	12

Таблица 2 (продолжение)

Аминокислота	Пептиды									
	T-VII-4-1	T-VII-4-2	T-VII-2	T-VII-3	T-VII-4	T-VIII-1	T-VIII-3	T-IX-1		
СмCys					0,70(1)					
Asp	2,07(2)	0,51(1)	4,01(1)	0,93(1)	0,99(1)					
Thr	0,96(1)	1,18(1)								
Ser		0,98(1)	0,98(1)	2,09(2)	0,95(1)			2,10(2)		
Glu					1,19(1)			1,30(1)		
Pro					1,00(1)					
Gly										
Ala		0,91(1)	1,00(1)	1,06(1)	1,05(1)		1,02(1)	0,92(1) *		
Val			0,95(1)		2,00(2)					
Met										
Ile			1,00(1)							
Leu	0,90(1)	0,96(1)	1,00(1)	1,98(2)	2,00(2)		0,97(1)			
Tyr					0,70(1)		0,70(1)			
Phe										
His										
Lys	1,07(1)	1,03(1)	1,22(1)	0,93(1)	0,95(1)	1		0,92(1)		
Arg										
Число остатков	5	6	6	7	12	1	3	5		
N-Концевая аминокислота	Thr	Ser	Asp	Thr	Leu	Lys	Ile	Gln		
Выход, %	9	19	36	22	44	38	11	4		
	Пептиды									
Аминокислота	T-IX-5; T-VIII-4	T-X-1; T-XIV-1	T-X-2	T-X-3-1	T-X-3-2	T-X-4-1	T-X-4-2	T-XI-1-1		
СмCys		0,87(1)								
Asp		5,07(5)	1,00(1)	4,12(1)		1,16(1)	1,05(1)			
Thr	0,89(1)	2,99(3)	1,01(1)		0,99(1)		0,94(1)			

Ser	2,77 (3)	1,91 (2)	0,93 (1)	1,01 (1)	2,27 (2)
Glu	3,28 (3)	2,12 (2)	1,27 (1)	1,04 (1)	
Pro	2,08 (2)				
Gly	3,00 (3)				
Ala	3,00 (3)	4,03 (1)			
Val	3,75 (4) *	4,96 (2)			
Met	0,69 (1)				
Ile	4,71 (5) *	0,97 (1)			
Leu	0,82 (1)	0,93 (1)			
Tyr					
Phe					
His	2,66 (3)	0,88 (1)			
Lys	0,97 (1)	0,98 (1)			
Arg	0,94 (1)				
Число остатков	39	13	6	3	4
N-Концевая аминокислота	Ser	Leu	Ser	Asp	Val
Выход, %	43	18	36	5	53
	4,98 (2)				
	1,17 (1)				
	0,84 (1)				
	4,93 (2)				
	4,09 (1)				
	8				
	46				
	0,97 (1)				
	4,82 (2)				
	4,10 (1)				
	0,98 (1)				
	0,90 (1)				
	4,01 (1)				
	0,90 (1)				
	1,00 (1)				
	6				
	Thr				
	40				

Пептиды

Аминокислота	Пептиды							
	T-XI-4-2	T-XI-1-3	T-XI-2-1	T-XI-3; T-XIV-2	T-XII-4	T-XIII-2	T-XIII-3	T-XIV-3
СмСys								
Asp		0,98 (1)	2,10 (2)	3,02 (3)		0,95 (1)	0,99 (1)	2,25 (2)
Thr		4,02 (1)	4,04 (1)	4,00 (1)		0,92 (1)		0,97 (1)
Ser								
Glu	4,01 (1)		2,18 (2)	4,20 (4)			1,06 (1)	4,40 (1)
Pro				3,19 (3)		0,97 (1)		2,36 (2)



Таблица 2 (продолжение)

Аминокислота	Пептиды							
	Т-ХI-2	Т-ХI-3	Т-ХI-2-4	Т-ХI-3; Т-ХIV-2	Т-ХII-4	Т-ХIII-2	Т-ХIII-3	Т-ХIV-3
Gly	4,40(4)		1,24(1)	1,92(2)		0,98(1)	2,59(3)	
Ala	0,96(1)		1,86(2) *			1,05(1)	0,90(1)	1,93(2) *
Val			0,88(1) *	0,88(1)		0,95(1)		0,92(1) *
Met			1,84(2)	3,93(4)				3,83(4) *
Ile				0,91(1)		0,77(1)		
Leu								
Tyr								
Phe								
His								
Lys	0,94(1)	1,01(1)	1,88(2)	1,04(1)	1	1,00(1)	1,00(1)	2,40(2)
Arg				1,82(2)	1	8	9	15
Число остатков	4	3	43	22	1	Gly	Pro	
N-Концевая аминокислота	Val	Ser	Val	Glu	Arg			
Выход, %	17	4	40	40	112	33	26	1
Аминокислота	Пептиды							
	Т-ХVI-2; Т-ХVII-2	Т-ХVI-4	Т-ХVII-4; Т-ХVI-1	Т-ХVII-4	Т-ХVII-5; Т-ХVIII-3	Т-ХVIII-4; Т-ХIX-4		
СmCys								
Asp					1,02(1)	1,03(1)		
Thr								
Ser								
Glu					1,94(2)	1,00(1)		
Pro	1,07(1)					3,05(3)		
Gly			1,03(1)		1,15(1)	0,94(1)		
Ala					1,98(2)	1,07(1)		
Val	0,94(1)				0,89(1) *			
Met								
Ile				1,02(1)	1,83(2) *	1,82(2) *		
Leu					1,04(1)			

Tyr										0,67(1)			
Phe										0,65(1)			
His										1,02(1)			0,58(1)
Lys									0,98(1)	1,90(2)			
Arg	1,00(1)		0,83(1)	0,97(1)					2	43			
Цисло остатков	3		5	2									
N-Концевая аминокислота	Val		Gly	Gly					Ile	Ala			Ile
Выход, %	41		47	21					7	18			38

Пептиды

Аминокислота	Пептиды												
	T-XVIIII-5; T-XIV-4	T-XIIII-2; T-XIV-4	T-XIX-3	T-XX-4	T-XXI-4	T-XXII-3	T-XXII-4	T-XXIII-1					
СмCys													
Asp				1,02(1)	1,00(1)							1,02(1)	1,80(2)
Thr				0,93(1)	1,10(1)							0,90(1)	
Ser	1,02(1)				2,11(2)								4,00(4)
Glu					0,91(1)								
Pro					1,40(1)								1,24(1)
Gly													
Ala			1,10(1)										1,16(1)
Val					0,85(1)								
Met					0,69(1)								
Ile													1,87(2)
Leu													4,22(4)
Tyr													
Phe													
His													
Lys													
Arg													
Цисло остатков	0,99(1)		1,00(1)	1,89(2)	0,95(1)								1,16(1)
	7		3	7	12								15
N-Концевая аминокислота	Gly		Ala	Thr	Met								Glu
Выход, %	41		8	3	45								10

\* Результаты гидролиза в течение 72 ч. \*\* Триптофан определяли качественно цветной реакцией с реактивом Эрлиха.  
\*\*\* Примеси менее 0,2 аминокислотного остатка в таблицу не включены.

**Аминокислотная последовательность пептидов триптического гидролиза КМ  
α-субъединицы, определенная по методу Эдмана**

Пептид	Аминокислотная последовательность пептида *
T-VII-1-1	Thr-Asp-Leu-Asp-Lys → → → → →
T-VII-1-2	Ser-Ala-Asn-CmCys-Leu-Lys ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → → → →
T-VII-2	Asp-Val-Leu-Ala-Ser-Arg ⇒ → → → → → → →
T-VII-3	Thr-Glu-Val-Glu-Leu-Leu-Lys ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → → → →
T-VIII-3	Ile-Ala-Tyr → → →
T-IX-1	Gln-Pro-Gln-Val-Lys → → → → →
T-IX-5	Val-Thr-Leu-Glu-Pro-Leu-Glu-Arg ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → →
T-X-2	Leu-Val-Asp-Ile-Glu-Gln-Val-Ser-Ser-Thr-His-Ala-Lys ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → → → → → → → →
T-X-3-1	Asn-Val-Glu-Ala-Ala-Arg ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → → → →
T-X-3-2	Ser-Leu-Thr-Glu-Ile-Lys ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → →
T-X-4-1	Asp-Val-Arg ⇒ → → →
T-X-4-2	Thr-Pro-Asn-Leu-Gly-Lys ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → → → →
T-XI-1-1	Val-Glu-Gln-Arg ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → →
T-XI-1-2	Val-Gln-Gly-Lys → → → → →
T-XI-1-3	Ser-Thr-Lys → → →
T-XIII-2	Gly-Tyr-Val-Pro-Ala-Ser-Thr-Arg → → → → → → → → → → →
T-XIII-3	Ile-Ala-Tyr-Asn-Val-Glu-Ala-Ala-Arg ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → → → →
T-XVI-2	Val-Gln-Arg ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → →
T-XVI-4	Gly-Leu-Ala-Val-Arg → → → → → → →
T-XVII-1	Gly-Arg → → →
T-XVII-4	Ile-Lys → → →
T-XVIII-1	Ile-His-Ser-Glu-Glu-Asp-Glu-Arg-Pro-Ile-Gly-Arg ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → → → → → → →
T-XVIII-5	Gly-Leu-Ser-Leu-Gly-Met-Arg → → → → → → → → → →
T-XIX-3	Ala-Leu-Arg → → → →
T-XX-1	Thr-Pro-Asn-Leu-Gly-Lys-Lys ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → → → → →
T-XXII-3	Ile-Lys-Val-Gln-Arg ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → →
T-XXII-4	Gly-Phe-Gly-His-Thr-Leu-Gly-Asn-Ala-Ileu-Arg ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → → → → →

\* Здесь и далее стрелками показаны стадии деградации по методу Эдмана с идентификацией ФТГ (→, →→), ДНС (→, →→), ФТГ и ДНС (⇒, ⇒⇒) производных.

## Аминокислотная последовательность пептида Т-IV-1

Анализируемый пептид	Результаты анализа
Т-IV-1	Ile-Leu-Leu-Ser-Ser-Met-Pro-Gly-CmCys-Ala-Val-Thr-Glx-Val-Clx-Ile-Asx →
Т-IV-1-Sp-1	Val-Glu-Ile-Asp-Gly-Val-Leu-His-Glx ⇒
Т-IV-1-Sp-2	Ile-Leu-Leu-Ser-Ser-Met-Pro-Gly-CmCys(Ala, Val, Thr)Glu →
Т-IV-1-Sp-3	Ile-Asp-Gly-Val-Leu-His-Glu ⇒
Т-IV-1-Sp-4	Tyr-Ser-Thr-Lys →
Строение	Ile-Leu-Leu-Ser-Ser-Met-Pro-Gly-CmCys-Ala-Val-Thr-Glu-Val-Glu-Ile-Asp-Gly-Val-Leu-His-Glu-Tyr-Ser-Thr-Lys

жения дикарбоновых аминокислот и их амидов ряд пептидов подвергался гидролизу химотрипсином и полученная смесь фрагментов анализировалась с помощью метода Эдмана без разделения по предложенной ранее методике [9]; кроме того, в некоторых случаях определялась электрофоретическая подвижность пептидов по методу Оффорда [10].

Полная аминокислотная последовательность 27 пептидов (табл. 3) была определена только с использованием деградации по методу Эдмана. Структура остальных пептидов определялась как описано далее.

*Пептид T-I-4:* Leu-Glu-Asn-Trp-Pro-Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Asp-Glu. При действии на пептид карбоксипептидазы С (4 ч, 25°) отщепляются глутаминовая кислота (100%), аспарагиновая кислота (77%), аланин (39%), изолейцин (15%), серин (14%).

*Пептид T-II-1:* Leu-Val-Ile-Glu-Met-Glu-Thr-Asn-Gly-(Asx, Thr, Pro, Glx<sub>2</sub>, Ala, Ile<sub>2</sub>)-Arg.

*Пептид T-III-1:* Thr-Asp-Leu-Asp-Lys-Leu-Val-Ile-Glu-Met-Glu-Thr-Asn-Gly-(Asx, Thr, Pro, Glx<sub>2</sub>, Ala, Ile<sub>2</sub>)-Arg. Пептид T-III-1 является суммой пептидов T-VII-1-1 (Thr-Asp-Leu-Asp-Lys) (табл. 3) и T-II-1 (см. выше) и содержит нерасщепленную связь Lys-Leu.

*Пептид T-III-3:* Asp-Glu-Val-Ile-Leu-Thr-Leu-Asn-Lys. Смесь карбоксипептидаз А и В за 4 ч при 37° отщепляет лизин (82%), аспарагин (77%), лейцин (150%), треонин (75%), изолейцин (72%), валин (40%).

*Пептид T-IV-1.* Деградацией пептида по методу Эдмана найдена N-концевая аминокислотная последовательность, содержащая 17 аминокислотных остатков (табл. 4). Для установления полной структуры 300 нмоль пептида подвергались гидролизу стафилококковой протеазой. Из полученного гидролизата с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-50 были выделены четыре пептида. Аминокислотные составы пептидов приведены в табл. 5, а их аминокислотная последовательность дана в табл. 4. Приведенные данные показывают, что пептид T-IV-1-Sp-2 является N-концевым, а пептид T-IV-1-Sp-4 — C-концевым фрагментами пептида T-IV-1; пептид T-IV-1-Sp-1 расположен за пептидом T-IV-1-Sp-2. Частичная структура пептида T-IV-1-Sp-2, его аминокислотный состав и специфичность стафилококковой протеазы [11] позволяют предположить, что C-концевой аминокислотой в пептиде является глутаминовая кислота. Пептид T-IV-1-Sp-3 короче пептида T-IV-1-Sp-1 на две аминокислоты. Частичный гидролиз связи Glu-Ile в пептиде T-IV-1 находится в соответствии с ранее замеченной особенностью стафилококковой протеазы с меньшей скоростью гидролизовать пептидные связи, образованные остатками глутаминовой кислоты при наличии последовательности Glu-X-Glu [12].

*Пептид T-V-2.* Результаты определения структуры пептида суммированы в табл. 6. После определения N-концевой аминокислотной последовательности 100 нмоль пептида T-V-2 подвергались гидролизу стафилококковой протеазой. Из полученного гидролизата с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25 были выделены два пептида T-V-2-Sp-1 и T-V-2-Sp-2. Аминокислотные составы пептидов приведены в табл. 5, а их аминокислотная последовательность дана в табл. 6. С целью нахождения взаимного расположения дикарбоновых аминокислот и их амидов пептид T-V-2 был подвергнут гидролизу химотрипсином, при котором расщепилась связь Phe-Val. Полученная смесь фрагментов без разделения анализировалась по методу Эдмана с идентификацией ФТГ аминокислот (табл. 6). Полученные данные позволили установить полную структуру пептида T-V-2.

*Пептид T-VII-4:* Leu-Leu-Val-Asp-Ala-CmCys-Tyr-Ser-Pro-Val-Glu-Arg. При гидролизе пептида T-VII-4 химотрипсином расщепилась связь Tyr-Ser. Анализ полученной смеси двух фрагментов по методу Эдмана

Аминокислотный состав пептидов, полученных при гидролизе стафилококковой протеазой пептидов Т-IV-1, Т-V-2, Т-X-1, Т-XI-3

Аминокислота	Пептиды *											
	Т-IV-1-Sp-1	Т-IV-1-Sp-2	Т-IV-1-Sp-3	Т-IV-1-Sp-4	Т-V-2-Sp-1	Т-V-2-Sp-2	Т-X-1-Sp-1	Т-X-1-Sp-2	Т-X-1-Sp-3	Т-XI-3-Sp-1	Т-XI-3-Sp-2	Т-XI-3-Sp-3
CarCys												
Asp	1,10(1)	0,90(4)	1,10(1)	1,00(4)	0,94(4)	1,19(1)	3,13(3)	0,62(4)	1,14(1)	3,17(3)		1,06(1)
Thr		1,06(4)		1,26(1)		1,81(2)	1,81(2)	1,05(1)				
Ser	2,20(2)	1,92(2)	4,42(1)		3,39(3)	1,98(2)	0,95(1)	1,98(2)	1,83(2)	4,17(1)	2,95(3)	
Glu		1,41(4)				0,99(1)	1,29(1)	0,99(1)		2,33(2)	1,17(4)	
Pro	4,40(1)	1,00(4)	1,25(1)			4,45(1)	4,45(1)					
Gly		1,31(4)				3,34(3)	4,92(2)					
Ala		1,11(4)	0,91(4)		2,91(3)	1,25(4)	1,92(2)	1,81(2) **	1,05(4)	1,01(4)		1,06(1)
Val	4,72(2)	1,03(1)				0,86(1)	2,03(2)		0,54(4)	0,95(4)		
Met		0,68(1)				0,97(4)	1,89(2)	1,79(2) **	0,73(1)	2,83(3)		
Ile	0,99(1)	0,99(1)	1,01(4)		0,86(4)	0,97(4)		1,08(4)		0,90(4)		0,96(4)
Leu	1,14(4)	1,92(2)			4,82(2)							
Tyr				0,89(1)								
Phe							0,94(4)	4,57(2)			0,88(1)	
His	0,72(1)		0,84(4)			0,82(4)		0,90(4)	0,82(4)	0,85(4)		0,93(4)
Lys				1,39(4)		0,92(4)						
Arg												
Число остатков	9	13	7	4	10	6	18	14	7	13	5	4
N-Концевая аминокислота	Val	Ile	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ile	Asn	Phe	Glu	Leu
Выход, %	24	43	7	75	89	63	50	21	33	31	40	98

\* Примеси менее 0,2 аминокислотного остатка в таблицу не включены.

\*\* Результаты гидролиза в течение 72 ч.

Аминокислотная последовательность пептида T-V-2

Анализируемый пептид	Результаты анализа
T-V-2	Ala-Ala-Thr-Ile-Leu-Ala-Glx-Glx-Leu-Glx-Ala-Phe- → → → → → → → → → → → →
T-V-2-Sp-1	Ala-Ala-Thr-Ile-Leu-Ala-Glx-Glx-Leu-Glx → → → → → → → → → →
T-V-2-Sp-2	Ala-Phe-Val-Asx-Leu-Arg → → → → → →
Смесь химотриптических фрагментов пептида T-V-2	Ala-Ala-Thr-Ile-Leu-Ala-Glu-Gln-Leu-Glu- → → → → → → → → → →  Val-Asp-Leu-Arg → → → → →
Строение	Ala-Ala-Thr-Ile-Leu-Ala-Glu-Gln-Leu-Glu-Ala-Phe-Val-Asp-Leu-Arg

позволил идентифицировать на четвертой стадии ФТГ аспарагиновой и глутаминовой кислот.

*Пептид T-X-1:* Ser-Gly-Ile-Gly-Pro-Val-Thr-Ala-Ala-Asx-Ile-Thr-His-Asx-Gly-Asx-Val-Glu-Ile-Val-Lys-Pro-Glx-His-Val-Ile-CmCys-His-Leu-Thr-Asx-Glu-Asn-Ala-Ser-Ile-Ser-Met-Arg. При деградации пептида на секвенаторе (Beckman, США) определена N-концевая последовательность: Ser-Gly-Ile-Gly-Pro-Val-Thr-Ala-Ala-Asx-Ile-Thr-His-Asx-Gly-Asx-Val-Glx-. 100 нмоль пептида T-X-1 подвергались гидролизу стафилококковой протеазой. Из полученного гидролизата с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-50 были выделены три пептида: T-X-1-Sp-1, T-X-1-Sp-2, T-X-1-Sp-3. Аминокислотные составы пептидов приведены в табл. 5. Аминокислотный состав и N-концевая аминокислота пептида T-X-1-Sp-1 показывают, что он является N-концевым в пептиде T-X-1 и имеет строение: Ser-Gly-Ile-Gly-Pro-Val-Thr-Ala-Ala-Asx-Ile-Thr-His-Asx-Gly-Asx-Val-Glu. Для пептидов T-X-1-Sp-2 и T-X-1-Sp-3 найдены аминокислотные последовательности: Ile-Val-Lys-Pro-Glx-His-Val-Ile-CmCys-His-Leu-Thr-Asx-Glu и Asn-Ala-Ser-Ile-Ser-Met-Arg. Пептид T-X-1-Sp-3 представляет собой C-концевой фрагмент в пептиде T-X-1. Вывод о том, что C-концевой аминокислотой в пептидах T-X-1-Sp-1 и T-X-1-Sp-2 является глутаминовая кислота, а не ее амид, был сделан на основании специфичности действия стафилококковой протеазы [11].

*Пептид T-XI-2-1:* Val-Gln-Gly-Lys-Asp-Glu-Val-Ile-Leu-Thr-Leu-Asn-Lys. Карбоксипептидазы А и В за 4 ч отщепляют от пептида лизин (93%), аспарагин (90%), лейцин (172%), треонин (88%), изолейцин (82%). Полученные данные показывают, что пептид T-XI-2-1 является суммой пептидов T-XI-1-2 (Val-Gln-Gly-Lys) (табл. 3) и T-III-3 (Asp-Glu-Val-Ile-Leu-Thr-Leu-Asn-Lys) (см. выше) и содержит не расщепленную трипсином связь Lys-Asp.

*Пептид T-XI-3.* Результаты определения структуры пептида суммированы в табл. 7. После определения N-концевой аминокислотной последовательности пептид T-XI-3 гидролизовался стафилококковой протеазой. Из полученного гидролизата с помощью гель-фильтрации на биогеле Р-2 были выделены три пептида. Аминокислотные составы пептидов приведены в табл. 5, а их аминокислотная последовательность дана в табл. 7. Пептид T-XI-3-Sp-1 был подвергнут далее гидролизу химотрипсином, при котором расщепилась связь Leu-Arg. Полученная смесь двух фрагментов без разделения анализировалась по методу Эдмана с идентификацией





ФТГ аминокислот (табл. 7). При сопоставлении структуры пептидов Т-ХI-3-Sp-1, Т-ХI-3-Sp-2 и Т-ХI-3-Sp-3 с N-концевой аминокислотной последовательностью пептида Т-ХI-3 видно, что пептид Т-ХI-3-Sp-2 в молекуле Т-ХI-3 N-концевой, за ним следует пептид Т-ХI-3-Sp-1 и C-концевым пептидом является пептид Т-ХI-3-Sp-3.

*Пептид Т-ХIV-3:* Pro-Ile-Leu-Leu-Arg-Pro-Val-Asp-Asp-Leu-Glu-Leu-Thr-Val-Arg. Данные аминокислотного состава (табл. 2) и N-концевой последовательности показывают, что пептид Т-ХIV-3 — часть пептида Т-ХI-3 (см. выше), образовавшаяся в результате неспецифического разрыва связи Asp-Pro.

*Пептид Т-ХVII-5:* Ala-Glu-Ala-Ile-His-Tyr-Ile-Gly-Asp-Leu-Val-Gln-Arg. С целью нахождения взаимного расположения дикарбоновых аминокислот и их амидов пептид Т-ХVII-5 был подвергнут химотриптическому гидролизу, при котором расщепилась связь Tyr-Ile. Полученная смесь двух фрагментов без разделения анализировалась по методу Эдмана, при этом на второй стадии были идентифицированы ФТГ глутаминовой кислоты и глицина, на третьей стадии — ФТГ аланина и аспарагиновой кислоты и на шестой — ФТГ тирозина и глутамина.

*Пептид Т-ХXI-4:* Met-Gln-Gly-Ser-Val-Thr-Glu-Phe-Leu-Lys-Pro-Arg. N-Концевая аминокислотная последовательность пептида совпадает с N-концевой последовательностью  $\alpha$ -субъединицы, определенной на секвенаторе: Met-Gln-Gly-Ser-Val-Thr-Glu-Phe-Leu-Lys [1]. Карбоксипептидаза С (10 мин, 25°) отщепляет от пептида аргинин (82%), пролин (51%), лизин (22%) и лейцин (17%), что свидетельствует о наличии в пептиде следующей C-концевой последовательности: -Leu-Lys-Pro-Arg.

*Пептид Т-ХXIII-1:* Glu-Gly-Val-Gln-Glu-Asp-Ile-Glu-Phe-Leu-Leu-Leu-Asn-Leu-Lys. Для установления полной структуры 200 нмоль пептида подвергались гидролизу стафилококковой протеазой. Из полученного гидролизата с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге выделен пептид Т-ХXIII-1-Sp-1, имеющий следующий аминокислотный состав: Asp 1,04 (1), Ile 0,81 (1), Leu 2,70 (3), Lys 1,00 (1) и аминокислотную последовательность: Ile-Leu-Leu-Asn-Leu-Lys. Пептид Т-ХXIII-1-Sp-1 является C-концевым фрагментом пептида Т-ХXIII-1.

Таким образом, в результате проделанной работы установлено полное строение 39 пептидов и частичное строение 3 пептидов, выделенных из триптического гидролизата. Полученные результаты показывают, что триптический гидролиз  $\alpha$ -субъединицы протекает достаточно специфично. Однако было обнаружено несколько случаев разрыва связей, не связанного со специфичностью действия трипсина. В частности, наряду с пептидом Т-ХIII-3 (Ile-Ala-Tyr-Asn-Val-Glu-Ala-Ala-Arg, выход 26%) из триптического гидролизата с достаточно большими выходами (11 и 19% соответственно) были выделены пептиды Т-VIII-3 (Ile-Ala-Tyr) и Т-X-3-1 (Asn-Val-Glu-Ala-Ala-Arg), образовавшиеся в результате неспецифического разрыва связи Tyr-Asn, вызванного наличием «химотрипсиноподобной» активности в использовавшемся нами препарате трипсина (ср. [13]). Аналогичное происхождение, вероятно, имеют пептиды Т-ХI-1-3 (Ser-Thr-Lys, выход 4%) и Т-ХIX-3 (Ala-Leu-Arg, выход 8%), аминокислотные последовательности которых совпадают с C-концевыми последовательностями пептидов Т-IV-1 и Т-ХXII-4 соответственно. С другой стороны, пептид Т-ХIV-3 (Pro-Ile-Leu-Leu-Arg-Pro-Val-Asp-Asp-Leu-Glu-Leu-Thr-Val-Arg, выход 1%) образовался из пептида Т-ХI-3 в результате кислотного гидролиза связи Asp-Pro [14].

За исключением двух пептидов Т-I-4 (Leu-Glu-Asn-Trp-Pro-Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Asp-Glu) и Т-VIII-3 (Ile-Ala Tyr), все пептиды имеют в качест-

ве С-концевых остатков основных аминокислот лизина или аргинина. Пептид Т-I-4 является С-концевым пептидом  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы, поскольку его С-концевая последовательность совпадает с С-концевой последовательностью белка [1].

9 пептидов содержат более одного остатка основных аминокислот. При этом пептиды Т-X-1 и Т-XXI-4 содержат последовательность Lys-Pro, пептиды Т-XIV-3 и Т-XVIII-1 — последовательность Arg-Pro, а пептид Т-XI-3 — одновременно последовательности Lys-Pro и Arg-Pro. Пептиды Т-III-1, Т-XI-2-1, Т-XX-1 и Т-XXII-3, являющиеся суммой пептидов Т-VII-1-1 и Т-II-1, Т-XI-1-2 и Т-III-3, Т-X-4-2 и лизина, Т-XVII-4 и Т-XVI-2 соответственно, образовались в результате неполного расщепления связей Lys-Leu, Lys-Asp, Lys-Lys и Lys-Val. Выход пептидов Т-XX-1 (3%) и Т-XXII-3 (1%) невысок, в то время как в случае пептидов Т-III-1 (9%) и Т-XI-2-1 (10%) значителен. Высокий выход пептида Т-XI-2-1 объясняется тем, что в нем за остатком лизина следует остаток аспарагиновой кислоты. В случае же пептида Т-III-1 устойчивость связи Lys-Leu, вероятно, объясняется стерическими препятствиями.

Без учета перечисленных выше неспецифических пептидов полученные нами пептиды триптического гидролиза  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы содержат 327 аминокислотных остатков. Кроме того, в состав  $\alpha$ -субъединицы входят два остатка аргинина, выделенные в свободном состоянии. Определение полной аминокислотной последовательности  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы [1] показало, что из триптического гидролизата были выделены все пептиды, составляющие молекулу белка. Установление их строения дало основную информацию о структуре полипептидной цепи  $\alpha$ -субъединицы.

### Экспериментальная часть

В работе использовали трипсин, химотрипсин, карбоксипептидазы А и В (Worthington, США), карбоксипептидазу С (Roth, ФРГ), протеазу из *Staphylococcus aureus* (Miles, Англия). Приготовление реагентов и растворов описано ранее [15, 16].

*Выделение субъединиц ДНК-зависимой РНК-полимеразы E. coli B.* Выделение минимального фермента РНК-полимеразы проводили по методу Бёрджеса [3]. Приготовление радиоактивно меченных препаратов белка и условия диссоциации фермента на субъединицы описаны ранее [2]. Для разделения субъединиц использовали хроматографию на фосфоцеллюлозе Р-11 [4] с последующей очисткой  $\alpha$ -субъединицы на ДЕАЕ-целлюлозе [5]. Контроль чистоты полученных препаратов осуществляли электрофорезом в полиакриламидном геле [2].

*Карбоксиметилирование  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы.* Карбоксиметилирование осуществляли иодуксусной кислотой [17], имевшей общую активность 5 мКи  $^3\text{H}$ , исходя из 180 мг лиофильного препарата белка (с активностью 4,5 мКи  $^{14}\text{C}$ ), предварительно инкубированного с 2-меркаптоэтанолом в течение 15 ч при комнатной температуре. После окончания реакции белок сразу же обессоливали на затемненной колонке (2,5  $\times$  400 см) с сефадексом G-50, уравновешенным 50% уксусной кислотой. Белковую фракцию концентрировали на роторном испарителе до объема 40 мл, разбавляли водой и вновь упаривали до того же объема (операцию повторяли 3 раза), добавляли концентрированный водный аммиак до pH 10,5 и повторно обессоливали на сефадексе G-10, уравновешенном водным аммиаком, pH 8,3. Белковую фракцию концентрировали на роторном испарителе до объема 37 мл.

*Гидролиз  $\alpha$ -субъединицы трипсином.* Раствор карбоксиметилированного белка переносили в термостатируемую ячейку. Перед добавлением трипсина белок денатурировали прогревом до 90° в течение 5 мин. Затем ячейку термостатировали при 37°. Гидролиз вели на автотитраторе в атмо-

сфере азота при рН 8,3 в присутствии 4 мг трипсина; рН среды поддерживали 0,3 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Через 2 ч после начала опыта добавляли еще 2 мг трипсина. После 5,5 ч гидролиз останавливали подкислением среды до рН 2,9 с помощью ледяной уксусной кислоты. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием и промывали 3 раза по 3 мл 0,2 М пиридин-ацетатного буфера, рН 3,1. Объединенную надосадочную жидкость лиофилизировали. Осадок растворяли в водном аммиаке с добавлением мочевины, полученный раствор имел рН 10,8.

*Разделение пептидов ионообменной хроматографией на колонке.* Растворимую часть триптического гидролизата карбоксиметилированной  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы разделяли на катионите Амникс 50W  $\times$  4 (минус 400 меш) (Bio-Rad, США). Обработку смолы проводили по работе [15]. Колонку (1,2  $\times$  100 см) (ЛКВ, Швеция), термостатированную при 35°, заполняли смолой, уравновешенной 0,2 М пиридин-ацетатным буфером, рН 3,1 (стартовый буфер). Лиофильный препарат триптического гидролизата растворяли в 6 мл 50% уксусной кислоты, доводили общий объем водой до 10 мл и наносили на колонку под давлением азота. Элюирование проводили со скоростью 50 мл/ч с помощью насоса МЦ-300 (Ково, СССР). Давление на колонке во время опыта составляло 3—5 кг/см<sup>2</sup>. Для разделения пептидов использовали градиент рН и концентрации пиридина. В смеситель, снабженный магнитной мешалкой, помещали 600 мл стартового буфера, буфер из смесителя на колонку подавали насосом. В течение 3 ч через колонку пропускали 150 мл стартового буфера. Градиент I получали пропусканием через смеситель 1400 мл 0,5 М пиридин-ацетатного буфера (рН, 5,0) в течение 28 ч. Потом в смеситель подавали 1100 мл 2,0 М пиридин-ацетатного буфера, рН 5,0 (22 ч) (градиент II), при этом температуру колонки повышали до 50° за 1 ч до начала подачи градиента II. Затем через колонку пропускали, минуя смеситель, 300 мл 2,0 М пиридин-ацетатного буфера (рН 5,0), 100 мл 2 М пиридина и окончательно колонку промывали 0,5 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Элюат собирали с помощью коллектора фракций, объем фракции 3 мл.

*Анализ элюата.* Для обнаружения пептидов использовали нингидринную реакцию, проводимую с помощью пептидного анализатора (Technicon, США), для чего отбирали 0,04 мл из каждой второй фракции. Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Mark II (Nuclear-Chicago, США) в сцинтилляторе Unisolve I (Koch-Light, Англия). Для этого отбирали по 0,1 мл из каждой второй фракции. После сопоставления результатов нингидринной реакции с данными по определению радиоактивности (рис. 1) фракции объединяли и упаривали досуха. Для ориентировочной оценки числа пептидов в объединенных фракциях 1/100—1/200 часть каждой фракции хроматографировали в тонком слое целлюлозы в системе 1 (рис. 2). Хроматограммы проявляли 0,2% раствором нингидрина в ацетоне и затем делали автордиографию [2].

*Деление пептидов с помощью гель-фильтрации.* Выделение пептидов из фракций II—VI, XXIV и нерастворимой части гидролизата осуществляли гель-фильтрацией на колонке (1,5  $\times$  100 см) с сефадексом G-50 (сверхтонкий), уравновешенной водным аммиаком, рН 9,5—10,5. Контроль за выходом пептидов с колонки вели с помощью ультрафиолетового детектора Uvicord III (ЛКВ, Швеция) при 206 и 280 нм (рис. 3), а также путем определения N-концевых аминокислотных остатков в отдельных фракциях и измерения радиоактивности.

Фракцию X не удалось полностью растворить в 50% пиридине, нерастворившуюся часть отделяли центрифугированием и дважды промывали 50% пиридином. Осадок, содержащий пептид Т-Х-1, растворяли в 50%  $\text{HCOOH}$  с добавлением мочевины и хроматографировали на сефадексе G-50 в 10%-ной  $\text{HCOOH}$ . Детекцию пептида Т-Х-1 проводили измерением радиоактивности на жидкостном сцинтилляционном счетчике. Растворимую часть фракции X упаривали досуха и растворяли в 2 М пиридин-

ацетатном буфере; нерастворимую в этих условиях часть пептидного материала отделяли центрифугированием (пептид Т-Х-2). Надосадочную жидкость упаривали, растворяли в водном аммиаке с мочевиной и хроматографировали на сефадексе G-50 в водном аммиаке, рН 9,5, как описано выше (рис. 3 з).

*Очистка пептидов.* Пептиды из остальных объединенных фракций, а также из части фракций, полученных после гель-фильтрации (например, Х-3, Х-4), выделяли и очищали в основном с помощью нисходящей хроматографии на бумаге Ватман 3 М в течение 18—36 ч в системе I (*n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода, 15 : 3 : 10 : 12). Чистые пептиды из фракций VII-1 и XI-2 удалось выделить только после повторной рехроматографии в тех же условиях, но в течение 50—60 ч. Для разделения фракции XI-1 использовали высоковольтный электрофорез на бумаге при рН 1,9 (НСООН — СН<sub>3</sub>СООН — вода, 1 : 4 : 45). Детекцию пептидов на бумаге проводили с помощью нингидриновой реакции, в ряде случаев (например, фракции VII-3 и VII-4) использовали автордиографию. Пептиды элюировали обычно 10%-ной СН<sub>3</sub>СООН.

*Аминокислотный анализ белков и пептидов.* Условия проведения кислотного гидролиза описаны ранее [15]. Аминокислотный анализ выполняли на анализаторе D-500 (Durrum, США), для чего обычно использовали 1—10 нмоль пептида. Для определения аминокислотного состава субъединиц РНК-полимеразы проводили по три параллельных опыта по кислотному гидролизу в течение 24, 48, 72 и 120 ч. Количество лейцина, изолейцина и валина определяли по максимальному времени гидролиза, количество серина и треонина — экстраполяцией к нулевому времени гидролиза. Определение количества остатков триптофана выполняли по цветной реакции с фруктозой [18] и спектрофотометрически [19]. Расчет числа остатков проводили на молекулярный вес:  $\alpha$  — 36 500 [1],  $\beta$  — 155 000 и  $\beta'$  — 165 000 [5].

*N-Концевые аминокислоты* определяли в виде ДНС-производных по методу Грея [20], как описано ранее [16].

*Деградацию пептидов по Эдману с идентификацией аминокислот в виде ДНС-производных* осуществляли по методу Грея [21]. Реакции проводили в пробирках (4 × 80 мм), присоединяемых на шлифах к крану, служащему для откачки воздуха и заполнения пробирки аргоном. К 10—50 нмоль пептида добавляли 150 мкл 50% водного пиридина и 50 мкл 50% раствора фенилизотиоцианата в пиридине. После 2—3-кратного вакуумирования с последующим заполнением аргоном пробирки выдерживали 30 мин при 60°. Затем реакционную смесь упаривали досуха в вакууме (60°, 15 мин) и к сухому остатку добавляли 200 мкл безводной трифторуксусной кислоты. После заполнения аргоном пробирки выдерживали 3—4 мин при 60°, трифторуксусную кислоту отгоняли в вакууме (60°, 10 мин). К остатку добавляли 100 мкл воды и экстрагировали этилацетатом (3 × 100 мкл). Из водной фазы отбирали 1—2 нмоль пептида для дансирования, а остаток высушивали в вакууме и подвергали следующему циклу дегградации.

*Деградацию пептидов по Эдману с идентификацией ФТГ аминокислот* осуществляли по модифицированной методике Сьеквиста [22]. Все стадии проводили в пробирках (6 × 70 мм), снабженных насадкой с двумя кранами. К 20—50 нмоль пептида в 100 мкл 60% водного пиридина добавляли 20 мкл 5% раствора фенилизотиоцианата в пиридине. После 2—3-кратного вакуумирования с последующим заполнением аргоном пробирки выдерживали 25 мин при 55°. Реакционную смесь промывали бензолом (3 × 100 мкл) и высушивали в вакууме 20 мин при 55°. К остатку добавляли 100 мкл воды и 200 мкл уксусной кислоты, насыщенной HCl. Пробирку заполняли аргоном и выдерживали 30 мин при 55°. Содержимое упаривали в вакууме в течение 15 мин и к сухому остатку добавляли 100 мкл воды. Образовавшиеся ФТГ аминокислот экстрагировали этилацетатом. Этилацетатный раствор

упаривали в вакууме и ФТГ аминокислот хроматографировали на пластинках с тонким слоем силикагеля 60f 254 (Merck, ФРГ) в обычных системах [16]. Водный слой высушивали в вакууме и подвергали следующему циклу деградации по Эдману.

*S-Концевую аминокислотную последовательность пептидов* определяли с помощью карбоксипептидаз А, В и С [23, 24] и анализа отщепленных аминокислот на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США).

*Гидролиз пептидов химотрипсином и определение аминокислотной последовательности без разделения смеси полученных пептидов* проводили, как описано ранее [16].

*Гидролиз пептидов стафилококковой протеазой.* К 100—300 нмоль пептида в 0,2—0,5 мл 0,1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  добавляли стафилококковую протеазу в отношении фермент — субстрат 1 : 20 (по весу) и выдерживали 4 ч при 37°. 2—3 нмоль пептидов отбирали для определения N-концевых аминокислот, а остаток лиофилизировали.

Авторы выражают признательность акад. Ю. А. Овчинникову, по инициативе которого проводилась настоящая работа, за постоянное внимание и ценные советы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю. А., Липкин В. М., Модянов Н. Н., Чертов О. Ю., Смирнов Ю. В., Хохряков В. С., Шуваева Т. М. (1977) Биорган. химия, 3, 283—286.
2. Липкин В. М., Модянов Н. Н., Кочергинская С. А., Чертов О. Ю., Никифоров В. Г., Лебедев А. Н. (1976) Биорган. химия, 2, 1174—1181.
3. Burgess R. R. (1969) J. Biol. Chem., 244, 6155—6167.
4. Lill U. I., Behrendt E. M., Hartmann G. R. (1975) Eur. J. Biochem., 52, 411—420.
5. Burgess R. R. (1969) J. Biol. Chem., 244, 6168—6176.
6. Burgess R. R. (1976) in RNA Polymerase (Chamberlin M., Losick R., eds.), pp. 68—100, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor.
7. Nicholson B. H., King A. M. Q. (1973) Eur. J. Biochem., 37, 575—584.
8. Blomback B., Doolittle R. F. (1963) Acta chem. scand., 17, 1816—1819.
9. Липкин В. М., Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Жикулиева Е. Б., Виноградова Е. И. (1972) Биохимия, 37, 410—413.
10. Offord R. E. (1966) Nature, 211, 591—593.
11. Drapeau G. R., Boily Y., Houmad J. (1972) J. Biol. Chem., 247, 6720—6726.
12. Wootton G. R., Baron A. J., Fincham J. R. S. (1975) Biochem. J., 149, 749—754.
13. Jentsch J. (1969) Z. Naturforsch., 24b, 264—267.
14. Piszkiecz D., Landon M., Smith E. L. (1970) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 40, 1173—1178.
15. Овчинников Ю. А., Кириушкин А. А., Егоров Ц. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Модянов Н. Н. (1972) Биохимия, 37, 451—460.
16. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Поталенко Н. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. (1973) Биохимия, 38, 3—21.
17. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. (1963) J. Biol. Chem., 238, 622—627.
18. Messineo L., Musarra E. (1972) Int. J. Biochem., 3, 700—704.
19. Edelhoch H. (1967) Biochemistry, 6, 1948—1954.
20. Gray W. R. (1967) in Methods in Enzymol., XI, pp. 139—151, Acad. Press, N. Y.—London.
21. Gray W. R. (1967) in Methods in Enzymol., XI, pp. 469—475, Acad. Press, N. Y.—London.
22. Sjöquist J. (1960) Biochim. et biophys. acta, 41, 20—25.
23. Ambler R. P. (1972) in Methods in Enzymol., XXVB, pp. 143—154, 262—272, Acad. Press, N. Y.—London.
24. Tschensche H., Kupfer S. (1972) Eur. J. Biochem., 26, 33—36.

Поступила в редакцию  
11.VII.1977

THE PRIMARY STRUCTURE OF  $\alpha$ -SUBUNIT OF DNA-DEPENDENT  
RNA POLYMERASE FROM *E. COLI*. I. THE TRYPTIC PEPTIDES

MODYANOV N. N., LIPKIN V. M., SMIRNOV Yu. V.,  
CHERTOV O. Yu., POTAPENKO N. A., SHUVAEVA T. M.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The amino acid composition of *E. coli* B RNA polymerase  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  subunits was determined. A tryptic hydrolysis was performed on carboxymethylated  $\alpha$ -subunit which has been [ $^{14}\text{C}$ ] labeled at all the amino acids. The hydrolysate was separated on the Aminex AG 50W  $\times$  4 resin and further purified by gel-filtration, paper chromatography and paper electrophoresis. As a result 42 peptides were isolated, for 39 of them the complete amino acid sequence was determined and partial sequence — for 3 peptides. In total all these peptides contain 329 amino acid residues which corresponds to the whole sequence of the  $\alpha$ -subunit.

---