



УДК 547.963.02

**ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА L10 ИЗ РИБОСОМ
E. COLI MRE-600****Алахов Ю. Б., Довгас Н. В., Винокуров Л. М.,
Вельмога И. С., Овчинников Ю. А.***Институт белка Академии наук СССР,
г. Пушкино, Московской обл.*

Определена полная аминокислотная последовательность рибосомального белка L10, содержащего 165 аминокислотных остатков. Исследовались пептиды, полученные в результате триптического, химотриптического и бромцианового гидролизом белка, а также пептиды, полученные при расщеплении бромциановых фрагментов бромсукцинимидом по остаткам тирозина.

Белок L10, один из нейтральных белков 50S-субъединицы рибосомы *E. coli* с изоэлектрической точкой 7,5 [1], слабо связан с 50S-субъединицей и легко удаляется из последней двухступенчатой обработкой смесью 1 М NH_4Cl — 50% этанол при 0 и 37° [2]. При такой обработке вместе с L10 отделяются также белки L7/L12 и L11, причем связывание белков L7/L12 50S-субъединицей зависит от наличия в ней белка L10, а также L6 и L18 [3, 4]. В свою очередь связывание белка L10 зависит от наличия белка L11 [2]. Соседство белков L7/L12, L10 и L11 в рибосоме показано обработкой 50S-субъединицы и бифункциональными сшивающими реагентами, в частности диметилсуберимидатом [5, 6] или диметиладипинамом [7]. В результате такой обработки образуется несколько белковых комплексов, состоящих, с одной стороны, из белков L7/L12 и L11, а с другой — из белков L7/L12 и L10 и белков L10 и L11 [7]. Известно, что белок L7/L12 необходим для связывания рибосомой факторов трансляции, и в частности фактора элонгации EF-G [8], белок L11, вероятно, является частью пептидил-трансферазного центра [9], а белок L10 вместе с белком L6 необходим для EF-G-зависимой GTP-азной активности рибосомы [3].

Для детального исследования физико-химических основ функционирования фактора элонгации биосинтеза белка EF-G мы предприняли исследование структуры компонентов рибосомы, включенных в фактор-зависимый гидролиз GTP, в частности белка L10. В данной работе мы приводим подробные экспериментальные данные, которые позволили установить полную первичную структуру белка L10*.

Белок L10 выделен в гомогенном состоянии из суммарного белка 70S-рибосом *E. coli* MRE-600 с выходом ~ 60 мг из 10 г по методу, разработанному нами ранее [12]. Чистота его, оцененная по данным двумерного электрофореза в полиакриламидном геле и определения N-концевых аминокислот, составляет 98—100%; молекулярный вес, вычисленный из

* См. также предварительное сообщение [10, 11].

Аминокислотный состав белка L10

Аминокислота	После гидролиза		Откорректированный состав
	72 ч	24 ч	
Cys(Cm)	0,9	1,0	1,0(1)
Asp	9,2	9,3	9,2(9)
Thr	9,1	8,8	9,1(9)
Ser	5,1	6,0	6,0(6)
Glu	17,5	17,2	17,5(18)
Pro	5,8	5,8	5,8(5)
Gly	10,5	9,5	9,5(9)
Ala	31,5	31,0	31,5(33)
Val	15,4	9,1	15,4(15)
Met	3,3	4,8	4,8(5)
Ile	6,2	5,7	5,7(5)
Leu	15,7	13,6	15,5(15)
Tyr	2,8	2,8	2,8(3)
Phe	6,9	6,0	6,0(6)
His	1,0	1,0	1,0(1)
Lys	12,7	12,4	12,4(12)
Arg	13,2	13,0	13,0(13)
Общее число остатков			(165)

Таблица 2

Данные изучения последовательности автоматическим методом Эдмана

Шифр	Кол-во вещества, мкмоль	Общее число остатков	Число установленных остатков	Программа *
Белок L10	0,3	165	37	Медленная белковая 042772
Пептид BC-4	0,4	35	12	Медленная пептидная 071472 ДМАА **
Пептиды BC-3+BC-5	0,3	BC-3-51 BC-5-54	27	Медленная пептидная 071472 ДМАА
Пептид BC-7	0,4	22	13	ДМБА *** [15]

* Руководство по использованию секвенатора модель 890С (Beckman, США).

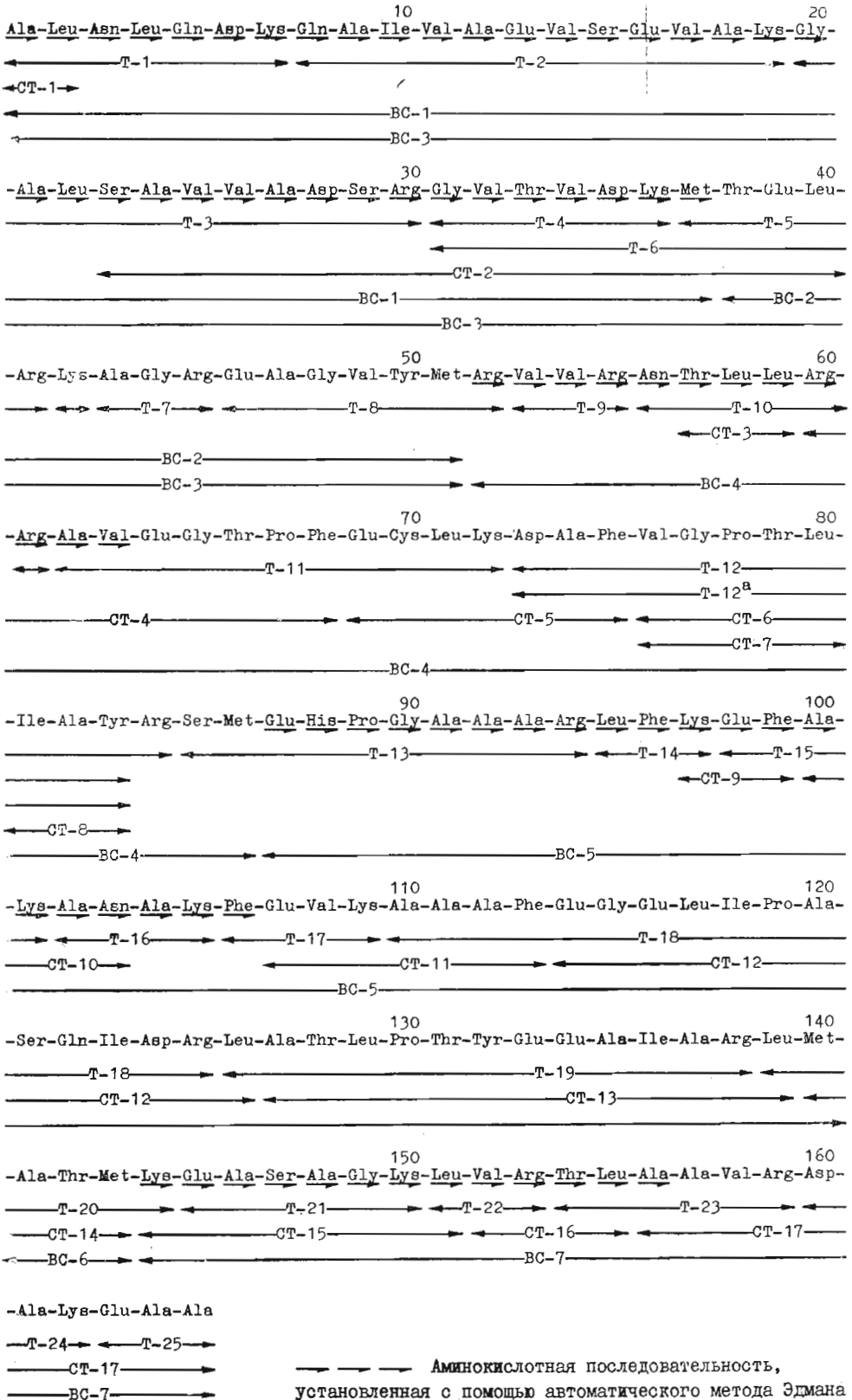
** Диметилаллиламин.

*** Диметилбензиламин.

данных электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, равен 19000 [12, 13]; аминокислотный состав следующий (молярные %) [14]: Asp — 7,2, Thr — 6,0, Ser — 4,7, Glu — 11,8, Pro — 2,8, Gly — 6,9, Ala — 17,6, Val — 9,5, Met — 2,8, Ile — 3,4, Leu — 8,8, Tyr — 1,8, Phe — 3,3, His — 0,8, Lys — 6,8, Arg — 6,7. С помощью гидролиза метансульфокислотой и из спектра флуоресценции мы установили, что белок не содержит остатков триптофана.

После карбоксиметилирования по данным аминокислотного анализа в молекуле белка обнаружен один остаток карбоксиметилцистеина. Результаты определения аминокислотного состава приведены в табл. 1. Нами установлено, что N- и C-концевыми аминокислотными остатками белка является аланин. На целой молекуле белка автоматическим методом Эдмана определена N-концевая аминокислотная последовательность до положения 38 (см. схему и табл. 2).

СХЕМА I



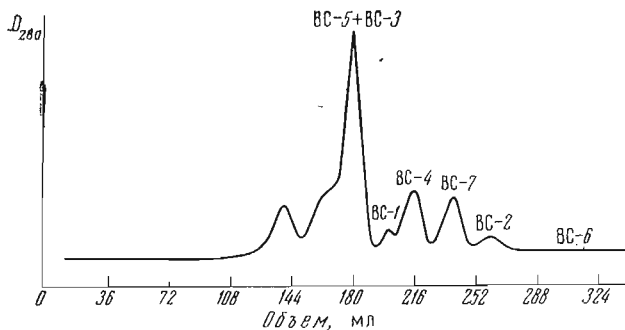


Рис. 1. Гель-фильтрация малеинированных пептидов, полученных после расщепления белка L10 бромцианом, на колонке (1,5 × 300 см) с биогелем Р-10 в буфере 0,01 М трис-НСl (рН 7,8) — 6 М хлоридрат гуанидина. Скорость элюирования 3,6 мл/ч

Для получения крупных фрагментов белок L10, содержащий 5 остатков метионина, был расщеплен бромцианом. В результате выделено семь пептидов вместо ожидавшихся шести, поскольку связь Met—Thr (положение 37—38, схема) расщепилась лишь частично. Смесь бромциановых фрагментов была лиофильно высушена и обработана малеиновым ангидридом для предотвращения агрегирования при гель-фильтрации и затем подвергнута разделению на колонке с биогелем Р-10 в трис-НСl-буфере в присутствии 6 М хлоридрата гуанидина (см. рис. 1). В результате выделены пептиды ВС-1, ВС-4, ВС-7, смесь пептидов ВС-5 и ВС-3, а также короткие пептиды ВС-2 и ВС-6 (табл. 3, 4) *. После обессоливания малеинильную защитную группу с бромциановых фрагментов удаляли выдерживанием их в 50% уксусной кислоте.

Смесь фрагментов ВС-3 и ВС-5 подвергали автоматической деградации по Эдману. Установлено, что один из пептидов (ВС-3) имеет N-концевую последовательность, совпадающую с N-концевой последовательностью белка, и отличается от фрагмента ВС-1 на последовательность пептида ВС-2. Это дало возможность в свою очередь определить последовательность 27 аминокислотных остатков с N-конца во фрагменте ВС-5.

Автоматическим методом Эдмана была также установлена последовательность 12 и 13 аминокислотных остатков во фрагментах ВС-4 и ВС-7 соответственно (см. табл. 2, 4). Структура фрагментов ВС-2 и ВС-6 определена полностью дансильным методом Эдмана.

Для получения перекрывающихся пептидов, а также выяснения структуры неизвестных участков полипептидной цепи молекулу белка подвергали гидролизу трипсином и химотрипсином. После анализа триптического гидролизата методом пептидных карт были обнаружены 24 пятна (см. рис. 2). Смесь пептидов первоначально разделяли на колонке с ионообменной смолой AG-50 × 4. В результате получено 14 объединенных фракций (см. рис. 3). Фракции I—IV, VIII и XIII оказались однородными и содержали пептиды Т-2, Т-12а, Т-25, Т-18, Т-21 и свободный аргинин соответственно. Остальные фракции, содержащие смеси пептидов, подвергали дальнейшему разделению с помощью бумажной хроматографии или электрофореза на бумаге. В результате выделено 26 триптических пептидов, а также свободные лизин и аргинин. Данные аминокислотного анализа и структура триптических пептидов приведены в табл. 5 и 6. Следует отметить, что пептид Т-6 содержал нерасщепленную связь Lys—Met (положение 36—37), а в пептиде Т-12 расщепилась связь Tyr—Arg (положение 83—84, схема), в результате образовался укороченный пептид Т-12а. Последовательность аминокислот в пептидах определена

* Нумерация всех пептидов дана по порядку их расположения в полипептидной цепи белка.

Аминокислотный состав бромциановых пептидов (BC)

Аминокислота	BC-1	BC-2	BC-4	BC-6	BC-7
Cys(Cm)			0,9 (1)		
Asp	3,5 (4)		1,3 (2)		1,0 (1)
Thr	1,2 (1)	1,0 (1)	2,3 (3)	1,0 (1)	1,0 (1)
Ser	3,0 (3)		0,9 (1)		0,8 (1)
Glu	4,3 (4)	2,1 (2)	1,9 (2)		2,1 (2)
Pro			1,9 (2)		
Gly	2,5 (2)	2,1 (2)	2,1 (2)		1,1 (1)
Ala	6,2 (7)	2,3 (2)	3,6 (3)	1,0 (1)	6,5 (7)
Val	6,5 (7)	1,0 (1)	4,0 (4)		2,0 (2)
Met	* (1)	* (1)	* (1)	* (1)	
Ile	1,0 (1)		1,0 (1)		
Leu	3,1 (3)	1,0 (1)	2,6 (4)		1,6 (2)
Tyr		0,9 (1)	0,9 (1)		
Phe			2,1 (2)		
Lys	3,0 (3)	1,3 (1)	1,1 (1)		2,8 (3)
Arg	1,3 (1)	1,9 (2)	3,6 (5)		1,8 (2)
Общее число остатков	(37)	(14)	(35)	(3)	(22)

* Не определяли.

Таблица 4

Бромциановые пептиды (BC)

Пептид	Аминокислотная последовательность *
BC-1	Ala-(Leu-Asn-Leu-Gln-Asp-Lys-Gln-Ala-Ile-Val-Ala-Glu-Val-Ser-Glu-Val-Ala-Lys-Gly-Ala-Leu-Ser-Ala-Val-Val-Ala-Asp-Ser-Arg-Gly-Val-Thr-Val-Asp-Lys-Hse)
BC-2	Thr-Glu-Leu-Arg-Lys-Ala-Gly-Arg-Glu-Ala-Gly-Val-Tyr-Hse
BC-3	Ala-Leu-Asn-Leu-Gln-Asp-Lys-Gln-Ala-Ile-Val-Ala-Glu-Val-Ser-Gln-Val-Ala-Lys-Gly-Ala-Leu-Ser-Ala-Val-Val-Ala-(Asp-Ser-Arg-Gly-Val-Thr-Val-Asp-Lys-Met-Thr-Glu-Leu-Arg-Lys-Ala-Gly-Arg-Glu-Ala-Gly-Val-Tyr-Hse)
BC-4	Arg-Val-Val-Arg-Asn-Thr-Leu-Leu-Arg-Arg-Ala-Val-(Glu-Gly-Thr-Pro-Phe-Glu-Cys(Cm))-Leu-Lys-Asp-Ala-Phe-Val-Gly-Pro-Thr-Leu-Ile-Ala-Tyr-Arg-Ser-Hse)
BC-5	Glu-His-Pro-Gly-Ala-Ala-Ala-Arg-Leu-Phe-Lys-Glu-Phe-Ala-Lys-Ala-Asn-Ala-Lys-Phe-Glu-Val-Lys-Ala-Ala-Ala-Phe-Glu-(Gly-Glu-Leu-Ile-Pro-Ala-Ser-Gln-Ile-Asp-Arg-Leu-Ala-Thr-Leu-Pro-Thr-Tyr-Glu-Glu-Ala-Ile-Ala-Arg-Leu-Hse)
BC-6	Ala-Thr-Hse
BC-7	Lys-Glu-Ala-Ser-Ala-Gly-Lys-Leu-Val-Arg-Thr-Leu-Ala-(Ala-Val-Arg-Asp-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala)

* В скобках показана аминокислотная последовательность, которая на данном пептиде не устанавливалась.

дансильным методом Эдмана (табл. 6). В пептиде Т-2 N-концевой остаток глутамина в процессе выделения превратился в остаток пироглутаминовой кислоты, поэтому пептид нельзя было подвергнуть деградации по Эдману. Из данных аминокислотного анализа и определения его С-концевой последовательности установлено, что пептид Т-2 имеет структуру, уже известную по результатам автоматического определения N-концевой последовательности на целой молекуле белка (положение 8—19, схема).

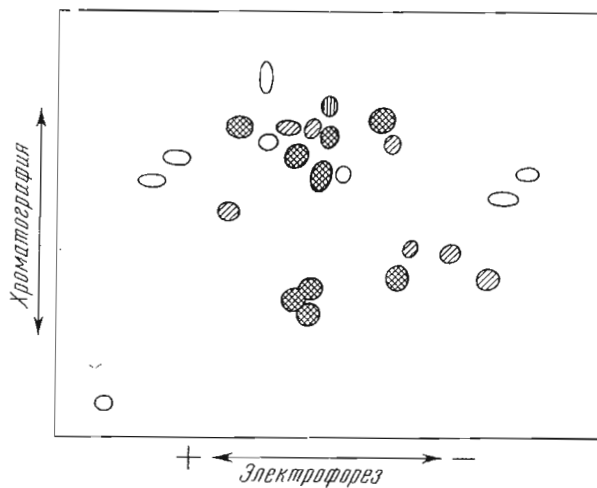


Рис. 2. Пептидная карта пептидов триптического гидролизата белка L10 на пластинке (20 × 20 см) с тонким слоем целлюлозы Whatman № 300. Первое направление — электрофорез в 1% (по объему) пиридин-ацетатном буфере, рН 3,5; второе — хроматография в системе бутанол — пиридин-ацетат — вода, 1 : 1 : 1, рН 5,4

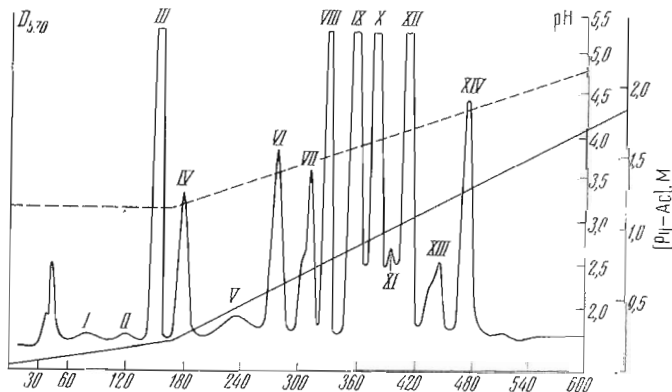


Рис. 3. Хроматография триптического гидролизата белка L10 на колонке (0,6 × 55 см) с ионообменной смолой AG-50 × 4. Разделение пептидов проводили в градиенте концентрации пиридин-ацетата и рН: 100 мл 0,05 М пиридин-ацетата (рН 3,1), — 100 мл 0,2 М пиридин-ацетата (рН 3,1), затем 250 мл 0,2 М пиридин-ацетата (рН 3,1) — 250 мл 2 М пиридин-ацетата (рН 5,1). Скорость элюирования 12 мл/ч. Объем фракций 1,5 мл

Для подтверждения структуры пептида Т-2 его гидролизовали стафилококковой протеазой и полученную смесь пептидов подвергали деградации по Эдману (дансильная модификация) без разделения. Для идентификации глутаминов параллельно исследовали отщепившиеся фенилтиогидантоины аминокислот (см. «Экспериментальную часть»). Обнаружено, что пептид расщепился в двух местах (положения 13 и 16 в молекуле белка), а в положении 16 находится остаток глутаминовой кислоты, а не глутамин, как было опубликовано ранее [10, 11].

Пептид Т-12 выделен с очень низким выходом, однако с выходом ~ 10% получен пептид Т-12а, имеющий ту же аминокислотную последовательность, но укороченную на С-концевой остаток аргинина. В результате исследования пептида Т-12а оказалось необходимым внести исправления в структуру пептида Т-12, опубликованную ранее. Он содержит 12,

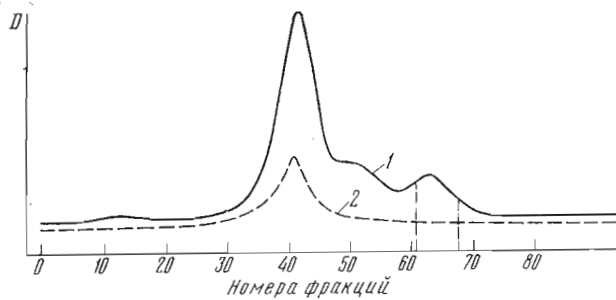


Рис. 4. Гель-фильтрация пептидов, полученных после расщепления смеси бромциановых фрагментов ВС-3 и ВС-5 N-бромсукцинимидом, на колонке ($1,0 \times 100$ см) с сефадексом G-25 в 0,01 н. HCl. Скорость элюирования 0,8 мл/ч. 1 — поглощение при 206, 2 — при 280 мμ

а не 11 аминокислотных остатков и имеет следующую последовательность аминокислот: Val-Gly-Pro-Thr-Leu-Ile-Ala-Tyr-Arg, что подтверждено также исследованием химотриптических пептидов (пептиды СТ-6, СТ-7).

В пептиде Т-18 удалось определить последовательность только 12 аминокислотных остатков из 16. Аминокислотная последовательность остальных триптических пептидов была установлена полностью дансильным методом Эдмана. Для определения амидов глутаминовой и аспарагиновой аминокислот в пептидах Т-5, Т-8, Т-11, Т-18, Т-19, Т-24 и Т-25 был использован также прямой метод Эдмана.

Таким образом, исследование структуры триптических пептидов позволило объединить в одну полипептидную цепь все бромциановые фрагменты, а также выяснить аминокислотную последовательность практически всей молекулы белка, за исключением его С-концевого участка.

Для подтверждения полученных данных и выяснения структуры С-концевого участка молекулы белок был подвергнут химотриптическому гидролизу. Химотриптические пептиды выделяли как с помощью метода пептидных карт на бумаге, так и хроматографией на колонке с ионообменной смолой AG-50 \times 4 в условиях, аналогичных разделению триптических пептидов. Однако в последнем случае все фракции, полученные после хроматографии на колонке, оказались неоднородными. Для дальнейшего их разделения использованы электрофорез и хроматография на бумаге. Методом пептидных карт выделен ряд уже имевшихся пептидов, а также 3 пептида (СТ-4, СТ-7, СТ-14) дополнительно. Всего выделено 17 пептидов (см. табл. 7 и 8). Их строение устанавливали с помощью дансильного метода Эдмана, а в случае пептидов СТ-5, СТ-12, СТ-13 и СТ-17 был использован также прямой метод Эдмана для идентификации амидов аспарагиновой и глутаминовой аминокислот. Структура пептидов, выделенных методом пептидных карт, не устанавливалась, а о положении пептида в полипептидной цепи белка судили по N-концевому аминокислотному остатку и аминокислотному составу.

Некоторые из выделенных химотриптических пептидов дали дополнительные перекрытия для триптических пептидов, в частности пептид СТ-5 объединил пептиды Т-11 и Т-12, а пептиды СТ-11 — СТ-17 объединили пептиды Т-17 — Т-25, что позволило однозначно установить аминокислотную последовательность С-концевого участка молекулы белка (положение 107—165, схема).

Для подтверждения перекрытий в положениях 84—85 и 138—139 бромциановый фрагмент ВС-4 и смесь фрагментов ВС-3 и ВС-5 были расщеплены N-бромсукцинимидом по остаткам тирозина. После разделения пептидов (см. рис. 4) в первом случае выделен трипептид Arg-Ser-Hse, а во втором — октапептид Glu-Glu-Ala-Ile-Ala-Arg-Leu-Hse, структура которых подтвердила указанные выше места в полипептидной цепи белка.

Аминокислота	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8	T-9	T-10	T-11	T-12
Cys (Cm)											0,8(1)	
Asp	1,9(2)		0,9(1)			1,2(1)		1,0(1)		1,0(1)		0,8(1)
Thr				1,0(1)	1,0(1)	1,4(2)				1,1(1)	1,2(1)	0,8(1)
Ser		0,8(1)	1,7(2)									
Glu	1,0(1)	3,3(3)			1,0(1)	1,0(1)					2,1(2)	
Pro											2,1(1)	1,0(1)
Gly			1,0(1)	1,0(1)		1,1(1)	1,0(1)	1,0(1)			1,0(1)	1,1(1)
Ala	1,0(1)	3,2(3)	2,6(3)				1,0(1)	1,0(1)			1,0(1)	1,6(2)
Val		2,5(3)	1,2(2)	2,1(2)		1,7(2)		0,9(1)	1,6(2)		0,9(1)	1,1(1)
Met					0,2(1)	0,2(1)		0,5(1)				
He		0,5(1)										1,0(1)
Leu	2,0(2)		1,0(1)		1,0(1)	0,9(1)				1,9(2)	1,6(1)	1,0(1)
Tyr								0,8(1)				1,1(1)
Phe											0,7(1)	1,0(1)
His												
Lys	1,1(1)	1,1(1)		1,5(1)		0,9(1)					0,7(1)	
Arg			1,1(1)		1,0(1)	0,8(1)	1,0(1)	0,9(1)	1,0(1)	1,2(1)		1,0(1)
Общее число остатков	(7)	(12)	(11)	(6)	(5)	(11)	(3)	(7)	(3)	(5)	(11)	(12)

Таким образом, в результате описанного выше исследования установлена полная аминокислотная последовательность белка L10. Точный молекулярный вес белка равен 17504, и полипептидная цепь состоит из 165 аминокислотных остатков.

Первичная структура белка L10, установленная в нашей лаборатории, практически полностью совпадает со структурой, предложенной Хейландом с сотр. [16]. Единственное отличие структуры, представленной здесь, заключается в том, что в положении 116 находится остаток глутаминовой кислоты вместо глутамин. Это, возможно, объясняется различием в штаммах *E. coli*, использованных для работы. В нашем случае белок был выделен из рибосом *E. coli* MRE-600, а в другом случае — из рибосом *E. coli* K-12.

Экспериментальная часть

В работе использовали: сефадексы G-10, G-25, G-50, G-100 (Pharmacia, Швеция), целлюлозы DE-32, CM-32 (Whatman, Англия), катионообменную смолу AG-50×4 и биогель P-10 (Bio-Rad, США), трипсин, химотрипсин и карбоксипептидазы А и В (Worthington, США), стафилококковую протеазу (Miles Labor., Англия), бумагу для БХ и ЭФ 3 ММ (Whatman, Англия), целлюлозу для ТХС № 300 (Whatman, США), силикагель КСК с размером частиц 5—7 мк, полиамидные пластинки (BDH, Англия), бромциан (Serva, ФРГ), реактивы для автоматического метода Эдмана (Beckman, США), β-меркаптоэтанол (Serva, США). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Аминокислотный анализ. Образцы белка или пептидов гидролизовали 24 и 72 ч при 110° в ампулах, заполненных азотом, 5,7 н. HCl. Аминокислотный анализ проводили на аминокислотном анализаторе BC-201 (Bio-Cal, ФРГ) или D-500 (Durrum, США). Цистеин определяли в виде

триптических пептидов (Т)

Т-12а	Т-13	Т-14	Т-15	Т-16	Т-17	Т-18	Т-19	Т-20	Т-21	Т-22	Т-23	Т-24	Т-25
0,8(1) 0,9(1)				1,0(1)		1,0(1)						1,0(1)	
	1,0(1)						2,1(2)	1,0(1)			0,5(1)		
	1,0(1)				1,0(1)	0,9(1)			1,0(1)				
1,0(1)	1,0(1)		0,9(1)			3,1(3)	2,6(2)		1,0(1)				1,0(1)
1,1(1)	1,1(1)					1,0(1)	1,2(1)						
1,6(2)	2,6(3)			1,8(2)		1,0(1)			1,2(1)				
1,1(1)			0,9(1)			4,0(4)	3,1(3)	1,0(1)	2,0(2)		1,7(2)	1,0(1)	1,8(2)
	0,3(1)				0,9(1)					0,9(1)	0,9(1)		
1,0(1)						2,1(2)	0,8(1)						
1,0(1)		1,0(1)				0,9(1)	2,0(2)	1,0(1)		0,8(1)	1,2(1)		
1,0(1)							0,8(1)						
1,1(1)		1,0(1)	1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)							
	1,0(1)												
		0,9(1)	1,1(1)	1,0(1)	1,0(1)			0,9(1)	1,0(1)			1,0(1)	
	0,9(1)					1,0(1)	1,2(1)			1,0(1)	0,9(1)		
(11)	(10)	(3)	(4)	(4)	(4)	(16)	(13)	(6)	(6)	(3)	(6)	(3)	(3)

карбоксиметилцистеина. Содержание триптофана устанавливали после гидролиза образцов 4 н. метансульфокислотой, содержащей 0,2% 3-(2-аминоэтил)индола.

Определение N- и C-концевых аминокислот. N-Концевые аминокислоты пептидов определяли дансильным методом с идентификацией Dns-аминокислот с помощью ТСХ на силикагеле или полиамиде, C-концевые аминокислоты — с помощью карбоксипептидаз А и В [17].

Пептидные карты смесей пептидов выполняли на пластинах 8,3 × 9,3 или 20 × 20 см с тонким слоем целлюлозы. В одном направлении использовали хроматографию в системе *n*-бутанол — пиридин-ацетат — вода (1 : 1 : 1), рН 5,4 [18], в другом направлении — электрофорез при напряжении 1000 В в одной из следующих систем: 1) муравьиная кислота — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 45), рН 1,9; 2) 1% (по объему) пиридин-ацетат, рН 3,5; 3) пиридин — уксусная кислота — вода (2 : 4 : 15 : 97), рН 4,4; 4) 10% (по объему) пиридин-ацетат, рН 6,5. Пептиды обнаруживали опрыскиванием пластин 0,4% раствором нингидрина в ацетоне с последующим нагреванием до 40° или опрыскиванием 2,5 · 10⁻⁴% раствором флуорескамина в ацетоне тщательно высушенных пластинок, предварительно опрыснутых 3% (по объему) раствором пиридина в ацетоне [9].

Препаративное разделение пептидов на бумаге. Нисходящую хроматографию пептидов проводили на бумаге в системе *n*-бутанол — пиридин-ацетат — вода (1 : 1 : 1), рН 5,4; высоковольтный электрофорез — в буферных системах при рН 1,9; 3,5; 6,5 и напряжении 3000 В. Пептиды обнаруживали после обработки узких полос хроматограммы или электрофореграммы нингидрином. Найденные пептиды элюировали с бумаги 10% уксусной кислотой или 1% аммиаком.

Препаративное выделение пептидов методом пептидных карт. 150 нмоль тщательно освобожденной от солей смеси пептидов наносили

Триптические пептиды (Т)

Пептид	Аминокислотная последовательность *
T-1	Ala-Leu-Asn-Leu-Gln-Asp-Lys
T-2	Glu-(Ala-Ile-Val-Ala-Glu-Val-Ser-Glu)-Val-Ala-Lys
T-3	Gly-Ala-Leu-Ser-Ala-Val-Val-Ala-Asp-Ser-Arg
T-4	Gly-Val-Thr-Val-Asp-Lys
T-5	Met-Thr-Glu-Leu-Arg
T-6	Gly-Val-Thr-Val-Asp-Lys-Met-Thr-Glu-Leu-Arg
T-7	Ala-Gly-Arg
T-8	Glu-Ala-Gly-Val-Tyr-Met-Arg
T-9	Val-Val-Arg
T-10	Asn-Thr-Leu-Leu-Arg
T-11	Ala-Val-Glu-Gly-Thr-Pro-Phe-Glu-Cys(Cm)-Leu-Lys
T-12	Asp-Ala-Phe-Val-Gly-Pro-Thr-Leu-Ile-Ala-Tyr-Arg
T-12a	Asp-Ala-Phe-Val-Gly-Pro-Thr-Leu-Ile-Ala-Tyr
T-13	Ser-Met-Glu-His-Pro-Gly-Ala-Ala-Ala-Arg
T-14	Leu-Phe-Lys
T-15	Glu-Phe-Ala-Lys
T-16	Ala-Asn-Ala-Lys
T-17	Phe-Glu-Val-Lys
T-18	Ala-Ala-Ala-Phe-Glu-Gly-Glu-Leu-Ile-Pro-Ala-Ser-(Gln-Ile-Asp)-Arg
T-19	Leu-Ala-Thr-Leu-Pro-Thr-Tyr-Glu-Glu-Ala-Ile-Ala-Arg
T-20	Leu-Met-Ala-Thr-Met-Lys
T-21	Glu-Ala-Ser-Ala-Gly-Lys
T-22	Leu-Val-Arg
T-23	Thr-Leu-Ala-Ala-Val-Arg
T-24	Asp-Ala-Lys
T-25	Glu-Ala-Ala Arg Lys

* В скобках указана последовательность, которая на данном пептиде не была установлена. Стрелкой обозначены аминокислотные остатки, определенные гидролизом карбоксипептидазами А и В.

на бумагу полосой 1 см. В первом направлении использовали электрофорез при pH 6,5 (напряжение 4 000 В), во втором — хроматографию в системе *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода (30 : 20 : 6 : : 24). Полученную пептидную карту проявляли флуорескаминол, как описано выше для пептидных карт на пластинках. Полоску бумаги, содержащую неразделенные нейтральные пептиды, вырезали, пришивали к новому листу бумаги и разделяли электрофорезом при pH 3,5 (напряжение 4 000 В). После высушивания пептиды проявляли опрыскиванием флуорескаминол. Флуорескаминолположительные пятна с обоих листов бумаги вырезали и элюировали водой. В тех случаях, когда пептид оказывался неоднородным, его дополнительно подвергали одномерной хроматографии или электрофорезу на пластинах 20 × 20 см с тонким слоем целлюлозы.

Определение аминокислотной последовательности в белках и пептидах проводили на автоматическом секвенаторе фирмы Beckman (США), модель 890С (используемые в работе программы приведены в табл. 2). Фенилтиогидантоины аминокислот идентифицировали на газовом хроматографе Varian 2100 с колонкой, заполненной 10% SP-400 на хромосорбе W, а также с помощью ТСХ на пластинах (6 × 6 см) с закрепленным слоем силикагеля.

Ручной вариант метода Эдмана (дансильная модификация) незначительно отличался от метода [20]. 0,05—0,03 мкмоль пептида растворяли в 60 мкл 50% раствора пиридина в воде. К полученному раствору добавля-

Аминокислотный состав химогриптических пептидов

Аминокислота	СТ-1	СТ-2	СТ-3	СТ-4	СТ-5	СТ-6	СТ-7	СТ-8	СТ-9	СТ-10	СТ-11	СТ-12	СТ-13	СТ-14	СТ-15	СТ-16	СТ-17
Cys (Cm)																	
Asp		2,2(2)			0,8(1)							1,0(1)	1,5(2)	0,8(1)			0,9(1)
Thr		2,0(2)	1,0(1)	0,8(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)			0,7(1)		1,0(1)			1,0(1)	0,8(1)	
Ser		2,0(2)									1,0(1)	2,8(3)	2,2(2)		1,1(1)		1,0(1)
Glu		1,2(1)			1,1(1)	0,9(1)	1,0(1)					1,1(1)	0,8(1)		1,1(1)		1,0(1)
Pro				1,2(1)	1,0(1)	1,2(1)	1,1(1)					1,4(1)			1,1(1)		
Gly		1,3(1)		1,3(1)	1,0(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,3(1)			3,1(3)	1,5(1)	2,9(3)	1,2(1)	1,1(1)		5,3(5)
Ala	1,0(1)	2,1(2)		1,2(1)	1,0(1)	1,1(1)	1,1(1)			2,0(2)	0,9(1)	1,5(1)		1,5(2)	1,1(1)		1,0(1)
Val		4,2(4)		0,8(1)	0,8(1)	0,8(1)	0,8(1)								1,1(1)		
Met		0,8(1)													1,1(1)		
Ile					1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	0,9(1)				1,7(2)	1,0(1)		0,8(1)	1,2(1)	
Leu	1,0(1)	1,1(1)	2,5(2)		1,0(1)	1,1(1)	1,0(1)					1,9(2)	1,9(2)		0,8(1)		
Tyr					0,9(1)	0,9(1)	0,9(1)	0,8(1)					0,8(1)				
Phe		1,0(1)		1,0(1)	0,9(1)	1,0(1)	1,0(1)				1,0(1)				1,7(2)		1,1(1)
Lys		0,8(1)		1,8(2)	1,0(1)	0,8(1)	0,8(1)			1,3(1)	1,0(1)	0,8(1)	0,8(1)			1,2(1)	1,0(1)
Arg												0,8(1)	0,8(1)				
Общее число остатков	(2)	(18)	(3)	(9)	(7)	(8)	(5)	(3)	(3)	(4)	(7)	(13)	(13)	(4)	(8)	(4)	(10)

Химотриптические пептиды (СТ)

Пептид	Аминокислотная последовательность *
СТ-1	Ala-Leu
СТ-2	Ser-(Ala-Val-Val-Ala-Asp-Ser-Arg-Gly-Val-Thr-Val-Asp-Lys-Met-Thr-Glu-Leu)
СТ-3	Thr-Leu-Leu
СТ-4	Arg-(Arg-Ala-Val-Glu-Gly-Thr-Pro-Phe)
СТ-5	Glu-Cys(Cm)-Leu-Lys-Asp-Ala-Phe
СТ-6	Val-Gly-Pro-Thr-Leu-Ile-Ala-Tyr
СТ-7	Val-(Gly-Pro-Thr-Leu)
СТ-8	Ile-Ala-Tyr
СТ-9	Lys-Glu-Phe
СТ-10	Ala-Lys-Ala-Asn
СТ-11	Glu-Val-Lys-Ala-Ala-Ala-Phe
СТ-12	Glu-Gly-Glu-Leu-Ile-Pro-Ala-Ser-Gln-Ile-Asp-Arg-Leu
СТ-13	Ala-Thr-Leu-Pro-Thr-Tyr-Glu-Glu-Ala-Ile-Ala-Arg-Leu
СТ-14	Met-(Ala-Thr-Met)
СТ-15	Lys-Glu-Ala-Ser-Ala-Gly-Lys-Leu
СТ-16	Val-Arg-Thr-Leu
СТ-17	Ala-Ala-Val-Arg-Asp-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala

* См. примечание к табл. 4.

ли 60 мкл 5% раствора фенилизотиоцианата в пиридине. Пробирку замораживали, вакуумировали, заполняли азотом, размораживали, встряхивали, снова замораживали и вакуумировали. Операцию повторяли трижды, затем пробирку термостатировали при 45° в течение 1 ч. Раствор высушивали 30 мин при 60° в вакууме. К остатку добавляли 60 мкл трифторуксусной кислоты, пробирку насыщали азотом, как описано выше, и термостатировали 30 мин при 45°. После высушивания в вакууме (15 мин при 60°) к остатку добавляли 100 мкл воды и проводили трехкратное экстрагирование 50 мкл этилацетата. Для лучшего разделения слоев смесь центрифугировали 5 мин при 4500 об/мин. Из водной фазы отбирали 0,001 мкм пептида для дансирования. Оставшийся водный раствор пептида вакуумировали для дальнейшей деградации. Аликвоту для дансирования высушивали в ампуле, растворяли в 15 мкл 0,1 М бикарбоната натрия, добавляли 15 мкл Dns-Cl в ацетоне (3 мг/мл) и инкубировали 1 ч при 37°. Раствор высушивали, к остатку добавляли 30 мкл 5,7 н. HCl и вакуумированный раствор гидролизовали 4 или 18 ч при 105°. Идентификацию Dns-производных аминокислот проводили двумерной ТСХ на пластинках (6 × 6 см) с закрепленным слоем силикагеля [21, 22] или на полиамидных пластинках (5 × 5 см) [23].

Ручной вариант прямого метода Эдмана проводили по методу [24] с рядом модификаций. 0,05—0,1 мкмоль пептида растворяли в 60 мкл 50% водного пиридина. К полученному раствору добавляли 60 мкл 5% раствора фенилизотиоцианата в пиридине. Пробирку замораживали, вакуумировали, заполняли азотом, размораживали. После трехкратного повторения этой операции реакционную смесь инкубировали 1 ч при 40°. После окончания реакции карбамоилирования проводили трехкратную экстракцию 200 мл бензола для удаления избытка фенилизотиоцианата и пиридина. Бензольный слой отбрасывали, а водный сушили 30 мин при 45°. К сухому остатку добавляли 100 мкл раствора 2 н. HCl в 50% уксусной кислоте. Пробирку заполняли азотом, как описано выше. Реакции отщепления и циклизации проводили в течение 30 мин при 45° с последующим высушиванием в вакууме (15 мин при 45°). Фенилтиогидантоиновые производные аминокислот трижды экстрагировали 50 мкл этилацетата

и идентифицировали хроматографией на пластинках (6×6 см) с тонким слоем силикагеля с люминофором.

В случае пептидов, полученных при гидролизе пептида Т-2 стафилококковой протеазой (см. ниже), наличие амидов глутаминовой кислоты определяли исследованием *n*-бутилацетатных экстрактов, полученных при дансильной модификации метода Эдмана [25]. Фенилтиогидантоины соответствующего шага для идентификации дважды хроматографировали в хлороформе, затем в системе хлороформ — метанол (9 : 1) и, наконец, в системе хлороформ — уксусная кислота (8 : 2). Фенилгидантоины идентифицировали сравнением подвижности со свидетелем в УФ-свете, а также по соответствующей окраске, появляющейся после опрыскивания пластинки 1% раствором нингидрина в смеси этанол — коллидин, 95 : 5 [26].

Выделение белка L10. Суммарный белок 70S-рибосом *E. coli* MRE-600 разделяли хроматографией на СМ-целлюлозе при рН 5,6 в градиенте концентрации ацетата натрия от 0,05 до 0,4 М в присутствии 6 М мочевины и 5 мМ β-меркаптоэтанола. Фракцию, содержащую L10 (наряду с L7/L12), далее очищали хроматографией на DE-целлюлозе в трис-НСI-буферном растворе при рН 7,8 в присутствии мочевины и β-меркаптоэтанола. Полной очистки белка достигали после гель-фильтрации на колонках с сефадексом G-100 в 10% уксусной кислоте также в присутствии 6 М мочевины и 5 мМ β-меркаптоэтанола [12]. Белок идентифицировали и оценивали его чистоту двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле по Кальтшмидту и Витману [27].

Карбоксиметилирование белка [28]. Белок (10—100 мг) растворяли в 3 мл 1,5 М трис-НСI-буфера (рН 8,6) в присутствии 3,61 г мочевины и 0,3 мл 5% раствора EDTA. Объем реакционной смеси доводили до 7,5 мл водой и добавляли 0,1 мл β-меркаптоэтанола. Смесь оставляли на 3 ч в темноте при комнатной температуре. Затем добавляли 0,268 г иодуксусной кислоты в 1 мл 1 н. раствора NaOH и выдерживали 15 мин, после чего белок обессоливали на затемненной колонке с сефадексом G-25 в 10% уксусной кислоте.

Расщепление белка по остаткам метионина бромцианом. Навеску белка (2 мкмоль) растворяли в 7 мл 70% муравьиной кислоты, смешивали с 250 мг свежезамороженного бромциана и оставляли на 48 ч в темноте при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли до 70 мл водой и лиофильно высушивали. К 40 мг смеси бромциановых фрагментов, растворенных в воде, в течение 1 ч небольшими порциями добавляли 80 мг малеинового ангидрида, рН реакционной смеси поддерживали в интервале 8,3—8,7 добавлением 1 М раствора NaOH. После окончания реакции пептиды (BC) лиофильно высушивали и разделяли гель-фильтрацией на биогеле Р-10 (см. рис. 1). После обессоливания выделенных пептидов на сефадексе G-10 в аммиачной воде (рН 8,9) удаляли малеинильную защитную группу выдерживанием в 50% уксусной кислоте в течение 24 ч при 37°.

Триптический гидролиз белка. 40 мг (2 мкмоль) белка растворяли в воде и белок денатурировали нагреванием при 90° в течение 5 мин. После охлаждения до 37° рН раствора доводили до 8,3 и добавляли трипсин (ТРСК-обработанный) при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу). Трипсин добавляли двумя равными порциями с интервалом в 4 ч. В ходе гидролиза (18 ч) рН среды 8,3 поддерживали с помощью титратора (Radiometer, Дания) насыщенным раствором триэтиламина. По окончании гидролиза смесь подкисляли до рН 3,0 и лиофильно высушивали. Первоначально пептиды (Т) разделяли на колонке с ионообменной смолой AG-50×4 в градиенте концентрации пиридин-ацетата и рН. Детектирование пептидов в элюате осуществляли с помощью нингидриновой реакции на автоматическом анализаторе пептидов (Technicon, Ирландия) (см. рис. 3). Смешанные фракции разделяли далее с помощью препаративной ВХ и ЭФ, как описано выше (см. табл. 5, 6 и рис. 2,3).

Химотриптический гидролиз белка. 40 мг (2 мкмоль) белка растворяли в воде и денатурировали нагреванием при 90° в течение 5 мин. После охлаждения до 37° рН раствора доводили до 8,4 и добавляли 0,4 мг химотрипсина. Гидролиз проводили 4 ч, рН среды 8,4 поддерживали с помощью титратора (Radiometer, Дания) насыщенным водным раствором триэтиламина. По окончании гидролиза смесь подкисляли до рН 2,0, выпавший осадок отделяли центрифугированием. Полученную смесь пептидов (СТ) разделяли по той же схеме, что и триптические, или методом пептидных карт.

Гидролиз стафилококковой протеазой. 70 нмоль пептида Т-2 (см. табл. 6) растворяли в 200 мкл 0,1 М раствора NH_4HCO_3 (рН 8,3) и выдерживали 5 ч с ферментом при 37° при соотношении фермент — субстрат 1 : 50. Затем лиофильно высушивали. Далее пептиды изучали без разделения.

Расщепление бромциановых фрагментов ВС-4 и смеси фрагментов ВС-3 и ВС-5 N-бромсукцинимидом [29]. К раствору пептида ВС-4 (0,2 мкмоль) или ВС-3 + ВС-5 (0,5 мкмоль) в 1 мл 50% уксусной кислоты был добавлен N-бромсукцинимид (перекристаллизованный из воды) в 1 мл 50% уксусной кислоты в количестве 3 мкмоль на каждый остаток тирозина и 2 мкмоль на каждый остаток гистидина. Реакционную смесь перемешивали 4 ч при 26°, а затем высушивали лиофильно. Пептиды после гидролиза разделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25 в 0,01 н. HCl (см. рис. 4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kaltschmidt E. (1971) *Anal. Biochem.*, **43**, 25—31.
2. Highland J. H., Howard G. A. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 831—834.
3. Schrier P. I., Maassen J. A., Möller N. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **53**, 90—98.
4. Stöffler G., Hasenbank R., Rodley J. N., Highland J. H. (1974) *J. Mol. Biol.*, **86**, 171—174.
5. Clegg C., Hayes D. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **42**, 21—28.
6. Expert-Bezancon A., Barritault D., Clegg J. C. S., Milet M., Knouvine Y., Hayes D. H. (1975) *FEBS Lett.*, **59**, 64—69.
7. Expert-Bezancon A., Barritault D., Milet M., Hayes D. H. (1976) *J. Mol. Biol.*, **108**, 781—787.
8. Hamel E., Koka M., Nakamoto T. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 805—814.
9. Nierhaus K. N., Montejo V. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1931—1935.
10. Довгас Н. В., Винокуров Л. М., Вельмога И. С., Алахов Ю. Б., Овчинников Ю. А. (1976) *Биоорган. химия*, **2**, 567—568.
11. Dovgas N. V., Vinokurov L. M., Velmoga I. S., Alakhov Yu. B., Ovchinnikov Yu. A. (1976) *FEBS Lett.*, **67**, 58—61.
12. Алахов Ю. Б., Медникова Т. А., Мотуз Л. П., Маркова Л. Ф., Довгас Н. В., Кашпаров И. А., Овчинников Ю. А. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 581—587.
13. Dzionara M., Kaltschmidt E., Wittman H. G. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 1909—1913.
14. Kaltschmidt E., Dzionara M., Wittmann H. G. (1970) *Mol. and Gen. Genet.*, **109**, 292—297.
15. Hermodson M. A., Ericsson L. H., Titani K., Neurath H., Wolsh K. A. (1972) *Biochemistry*, **11**, 4493—4502.
16. Heiland J., Brauer D., Wittmann-Liebold H. (1976) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 1751—1770.
17. Ambler R. (1967) in *Methods in Enzymology*, **XI**, pp. 155—156, Acad. Press, New York — London.
18. Schachner M., Zillig W. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **22**, 513—519.
19. Vandekerckhove J., Van Montgu M. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **44**, 279—288.
20. Gray W. R. (1967) in *Methods in Enzymology*, **XI**, pp. 469—475, Acad. Press, New York — London.
21. Белецкий Б. Г., Гайкина Э. С., Прянишникова С. А., Эрастов Д. П. (1967) *Молекулярн. биология*, **1**, 184—189.
22. Белецкий Б. Г., Гайкина Э. С., Нестеров В. В. (1967) *Докл. АН СССР*, **172**, 91—93.
23. Hartley B. S. (1970) *Biochem. J.*, **119**, 805—822.
24. Sauer R. T., Niall H. D., Hogan M. L., Keutmann H. T., Riordan J. L. H., Potts J. T. (1974) *Biochemistry*, **13**, 1994—1999.
25. Chen R. (1976) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 873—886.

26. Roseau G., Pantel P. (1969) *J. Chromatogr.*, **44**, 392—395.
27. Kaltschmidt E., Wittmann H. G. (1970) *Anal. Biochem.*, **36**, 401—412.
28. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 622—627.
29. Ramachandran L. K., Witkop B. (1967) in *Methods in Enzymology*, **XI**, pp. 283—299, Acad. Press, New York — London.

Поступила в редакцию
17.I.1978

THE PRIMARY STRUCTURE OF PROTEIN L10 FROM *E. COLI* MRE-600 RIBOSOMES

ALAKHOV Yu. B., DOVGAS N. V., VINOKUROV L. M., VELMOGA I. S.,
OVCHINNIKOV Yu. A.

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

The complete amino acid sequence of the ribosomal protein L10 containing 165 amino acid residues has been determined. A study was made of the peptides obtained on tryptic, chymotryptic, and cyanogen bromide hydrolyses of the protein, as well as peptides obtained by cleavage of the cyanogen] bromide fragments with bromosuccinimide at the tyrosine residues.
