



УДК 547.962.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ G
ИЗ *ESCHERICHIA COLI*IV*. N-КОНЦЕВАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ,
ВКЛЮЧАЮЩАЯ GTP-СВЯЗЫВАЮЩИЙ УЧАСТОК*Мотуз Л. П., Бундулис Ю. П., Алахов Ю. Б.**Институт белка Академии наук СССР, г. Пушкино, Московская обл.*

Исследован N-концевой фрагмент T₆ ограниченного триптического гидролиза фактора элонгации G (EF-G), состоящий из 58 аминокислотных остатков. Из бромцианового гидролизата EF-G выделены 2 пептида, один из которых перекрывает фрагменты T₆ и T₇, другой — T₇ и T₄. Показано, что фрагменты ограниченного триптического гидролиза EF-G расположены непосредственно друг за другом без отщепления каких-либо аминокислотных последовательностей. На основании этих результатов, а также ранее полученных данных о строении фрагмента T₇ и N-концевой части фрагмента T₄ установлена аминокислотная последовательность N-концевого участка G-фактора, состоящего из 147 аминокислотных остатков.

Исследование фрагментов, образующихся при ограниченном триптическом гидролизе EF-G в условиях, когда белок сохраняет нативную структуру, позволило нам локализовать положение экспонированной SH-группы в полипептидной цепи. Оказалось, что эта функционально важная SH-группа находится в N-концевой части полипептидной цепи EF-G [2], а район полипептидной цепи, включающий SH-группу, непосредственно участвует в связывании гуаниловых нуклеотидов [3]. Фрагмент, содержащий GTP-связывающий участок (T₇), был выделен, затем установлено его строение [4, 5]. Полипептидная цепь его состоит из 69 аминокислотных остатков, а единственный остаток цистеина находится в положении 55. Выявленное ранее расположение фрагментов ограниченного трипсинолиза EF-G [2] воспроизведено на рис. 1.

Из данных аминокислотного анализа и определения молекулярного веса триптических фрагментов следует, что в использованных условиях трипсинолиза не происходит отщепления сколько-нибудь значительных участков полипептидной цепи между фрагментами [2]. Для подтверждения этого в данной работе мы провели расщепление бромцианом EF-G, модифицированного [¹⁴C]ICH₂CONH₂. В результате был выделен ряд пептидов, в том числе пептид, объединяющий фрагменты T₆ и T₇, и пептид, объединяющий фрагменты T₇ и T₄. Исследование их структуры, а также выяснение структуры N-концевого фрагмента T₆ позволило установить аминокислотную последовательность N-концевого участка полипептидной цепи EF-G. Установленная аминокислотная последовательность охватывает 147 аминокислотных остатков и включает в себя фрагменты T₆ (58 ами-

* Сообщение III см. [1].

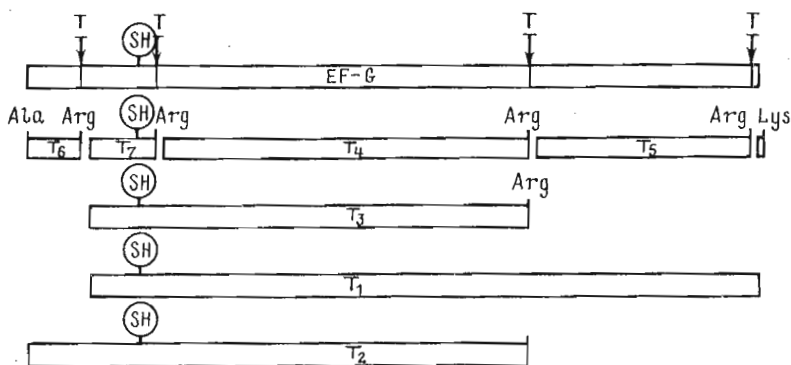


Рис. 1. Расположение фрагментов ограниченного триптического гидролиза в полипептидной цепи EF-G

нокислотных остатков), T₇ (69 аминокислотных остатков) и N-концевую часть фрагмента T₆ (20 аминокислотных остатков).

Фрагменты ограниченного триптического гидролиза EF-G были выделены как описано нами ранее [2, 5]. Их гомогенность была оценена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) и определением N-концевых аминокислотных последовательностей автоматическим методом Эдмана и составила 98–100%.

Таблица 1

Аминокислотный состав фрагмента T₆^{*} и его триптических пептидов (TVI)

Аминокислота	Фрагмент T ₆	TVI-1	TVI-2	TVI-3	TVI-4	TVI-5	TVI-6	TVI-7
Asp	5,0(5)				1,8(2)		1,1(1)	2,0(2)
Thr	7,2(8)		1,5(2)			3,0(4)	1,1(1)	1,1(1)
Ser	1,0(1)				1,3(1)			
Glu	7,3(7)					1,1(1)		6,2(6)
Pro	1,2(1)		1,0(1)					
Gly	5,3(5)				2,2(2)		1,2(1)	2,6(2)
Ala	6,0(6)	0,8(1)	1,0(1)		2,2(2)			2,4(2)
Val	2,0(2)						0,8(1)	0,8(1)
Met	2,0(2)							1,5(2)
Ile	6,0(6)		1,0(1)		2,8(3)		1,0(1)	1,0(1)
Leu	1,3(1)						1,1(1)	
Tyr	2,3(2)			0,9(1)			0,9(1)	
Phe	0,9(1)						0,9(1)	
His	2,6(3)				0,9(1)		1,0(1)	0,9(1)
Lys	1,7(2)				0,9(1)		1,0(1)	
Trp	0,6(1)							** (1)
Arg	5,0(5)	1,2(1)	0,9(1)	1,1(1)		0,9(1)		1,0(1)
Всего остатков	58	2	6	2	12	6	10	20
N-концевая	Ala	Ala	Thr	Tyr	Asn	Thr	Ile	Ile

* Данные уточнены по сравнению с ранее приведенными.

** Не определялся.

N-Концевой фрагмент EF-G T₆ по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН имеет молекулярный вес около 13 000, а по данным гель-фильтрации на сефадексе G-100 — около 6000*. Такое anomальное поведение при электрофорезе, вероятно, обусловлено особенностями его полипептидной цепи. Аминокислотный состав и концевые аминокислоты приведены в табл. 1.

* Приведены уточненные данные по сравнению с работой [2].

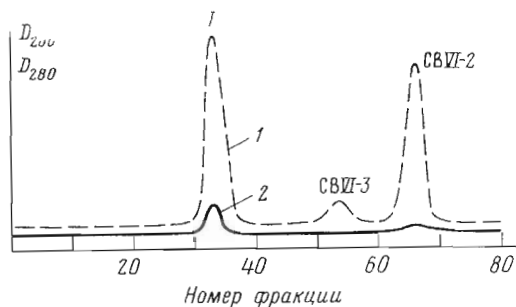


Рис. 2. Разделение пептидов бромцанового расщепления фрагмента T_6 на колонке (1×190 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 0,01 н. HCl (скорость элюирования 4 мл/ч, объем фракции 2 мл). 1 - D_{200} , 2 - D_{280}

В молекуле фрагмента содержится всего два остатка метионина, и поэтому для получения больших пептидов фрагмент был расщеплен бромцианом. Полученная смесь разделялась на колонке с сефадексом G-25 (см. рис. 2), в результате чего было выделено 2 пептида CBVI-2 и CBVI-3 (см. табл. 2 и схему 1). Объединенная фракция I содержала N-концевой пептид и продукты неполного расщепления полипептидной цепи. Пептид CBVI-3 оказался C-концевым, а пептид CBVI-2 также C-концевым, но удлиненным на три аминокислотных остатка с N-конца. Интересно, что пептид CBVI-2, несмотря на больший молекулярный вес, чем у пептида CBVI-3, элюируется с колонки в большем объеме. Это, вероятно, объясняется тем, что в его состав входит остаток триптофана (показано при изучении структуры пептидов триптического расщепления T_6 , см. ниже), который придает пептиду сродство к сефадексу.

Таблица 2

Аминокислотный состав бромцановых пептидов CBVI-2 и пептида BN-2 и после расщепления фрагмента T_6 BNPS-скатолом

Аминокислота	CBVI-2	CBVI-3	BN-2
Asp	1,1(1)		
Glu	5,0(5)	5,0(5)	5,0(5)
Met	0,5(1)		0,8(1)
Trp	* (1)		
Arg	0,9(1)	1,0(1)	1,2(1)
Всего остатков	9	6	7
N-Концевая	Asp	Glu	Met

* Не определялся.

Пептид CBVI-3, по данным аминокислотного анализа, содержит один остаток аргинина и пять остатков глутаминовой кислоты. Поэтому при определении его аминокислотной последовательности было уделено особое внимание идентификации амидов глутаминовой кислоты. Оказалось, что из пяти остатков глутаминовой кислоты два представлены в виде глутаминов (см. табл. 3). При определении структуры пептида CBVI-2 методом Эдмана не удалось идентифицировать аминокислотный остаток во втором положении. Как оказалось при исследовании структуры триптических пептидов, в этом положении находится остаток триптофана. Для подтверждения этого молекула фрагмента T_6 была расщеплена BNPS-скатолом (3-бром-2-(*o*-нитрофенил)сульфенилскатол) и выделены пептиды BN-2 (объединенная фракция II) и фракция I, которая содержала пептид BN-1, а также продукты неполного расщепления полипептидной цепи (см. рис. 3, табл. 2 и схему 1). Пептид BN-1 — N-концевой, а пептид BN-2 соответствует пептиду CBVI-3, но увеличен на один аминокислотный

Таблица 3

Пептиды, полученные после бромцианового расщепления фрагмента T₆ (CBVI) и после расщепления фрагмента T₆ BNPS-скатолом (BN)

Пептид	Аминокислотная последовательность
CBVI-1	<u>Ala-Arg-Thr-Thr-Pro-Ile-Ala-Arg-Tyr-Arg-...</u>
CBVI-2	<u>Asp-Trp-Met-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Arg</u>
CBVI-3	<u>Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Arg</u>
BN-2	<u>Met-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Arg</u>

→ — Здесь и далее определение аминокислотной последовательности методом Эдмана в дансильной модификации.

Таблица 4

Пептиды триптического гидролиза T₆ (TVI)

Пептид	Аминокислотная последовательность
TVI-1	<u>Ala-Arg</u>
TVI-2	<u>Thr-Thr-Pro-Ile-Ala-Arg</u>
TVI-3	<u>Tyr-Arg</u>
TVI-4	<u>Asn-Ile-Gly-Ile-Ser-Ala-His-Ile-Asp-Ala-Gly-Lys</u>
TVI-5	<u>Thr-Thr-Thr-Thr-Gln-Arg</u>
TVI-6	<u>Ile-Leu-Phe-Tyr-Thr-Gly-Val-Asn-His-Lys</u>
TVI-7	<u>Ile-Gly-Glu-Val-His-Asp-Gly-Ala-Ala-Thr-Met-Asp-Trp-Met-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Arg</u>

MTVI-2. Короткие пептиды были разделены и идентифицированы методом пептидных карт в условиях разделения триптического гидролизата T₆ и соответствовали триптическим пептидам TVI-1, TVI-2, TVI-3 (см. схему 1). Пептиды MTVI-1 и MTVI-2 были подвергнуты деградации по Эдману в дансильной модификации. Для подтверждения аминокислотной последовательности пептида MTVI-1 он был гидролизован термолизом, продукты гидролиза были разделены методом пептидных карт (см. рис. 6, табл. 5), затем была установлена их аминокислотная последовательность (см. табл. 6). Для выяснения структуры С-концевого участка пептида MTVI-2 и подтверждения аминокислотной последовательности пептида TVI-7 первый был гидролизован трипсином по единственному остатку лизина и смесь без разделения была подвергнута деградации по Эдману (см. схему 1).

Исследование структуры пептидов MTVI-1 и MTVI-2 позволило объединить триптические пептиды TVI-4 и TVI-5, а также TVI-6 и TVI-7 (см. схему 1) и представить структуру фрагмента T₆ в виде двух полипептидных цепей —N- и С-концевой, включающих в себя все триптические пептиды (см. схему 1). Для получения прямого доказательства связи Arg-Ile в положении 28—29 (см. схему 1) фрагмент T₆ подвергли модификации по остаткам аргинина тетраэтоксипропаном [7] (PTVI) и гидролизовали трипсином. Гидролизат без разделения был подвергнут деградации по Эдману в дансильной модификации. Исследование данной смеси позволило объединить триптические пептиды TVI-5 и TVI-6 (см. схему 1).

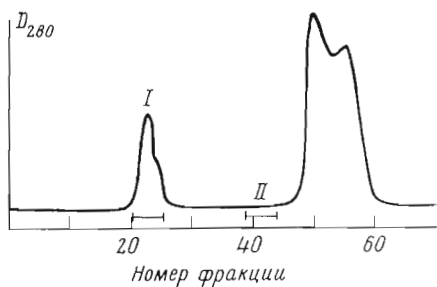


Рис. 3

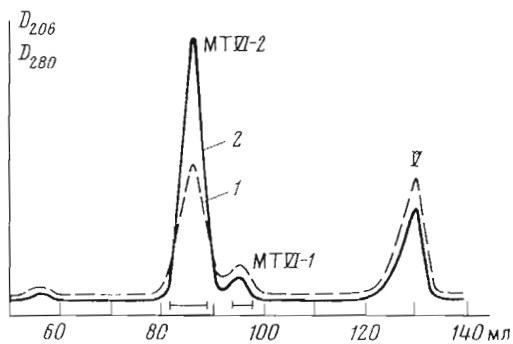


Рис. 5

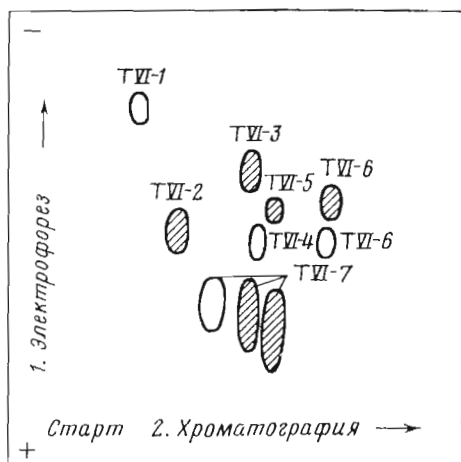


Рис. 4

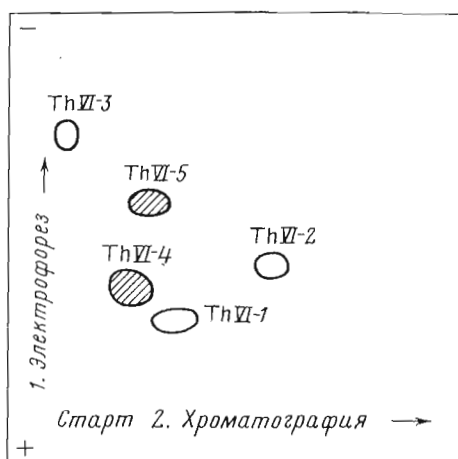


Рис. 6

Рис. 3. Разделение продуктов расщепления пептида T_6 BNPS-скатолом на колонке (1×190 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 50% уксусной кислотой (скорость элюирования 7,2 мл/ч, объем фракции 2,4 мл)

Рис. 4. Микропрепаративное разделение продуктов триптического гидролиза фрагмента T_6 методом пептидных карт на пластинке (20×20 см) с тонким слоем целлюлозы. Первое направление – электрофорез при pH 3,6 в буфере пиридин – уксусная кислота – вода (10 : 100 : 890), 800 В, 90 мин; второе направление – хроматография в системе *n*-бутанол – пиридин-ацетат – вода (1 : 1 : 1), pH 5,4

Рис. 5. Разделение пептидов триптического гидролиза MTVI на колонке (1×190 см) с сефадексом G-50 в буфере 20 мМ трис-HCl, содержащем 6 М мочевины (pH 7,5), скорость элюции 2 мл/ч. 1 – D_{206} , 2 – D_{280}

Рис. 6. Разделение пептидов термолитического гидролизата пептида MTVI-1 методом пептидных карт на пластинке (20×20 см) с тонким слоем целлюлозы. Первое направление – электрофорез в буфере $\text{HCOOH} - \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O}$ (20 : 80 : 900), pH 1,9; 800 В, 90 мин. Второе направление – хроматография в системе растворителей *n*-бутанол – пиридин-ацетат – вода (1 : 1 : 1), pH 5,4

Таким образом, исследование структуры пептидов, полученных после расщепления молекулы фрагмента T_6 бромцианом, BNPS-скатолом, трипсином, трипсином модифицированного фрагмента по остаткам лизина и трипсином фрагмента, модифицированного по остаткам аргинина, позволило установить аминокислотную последовательность N-концевого фрагмента ограниченного трипсинолиза EF-G. Его полипептидная цепь состоит из 58 аминокислотных остатков, содержит один остаток триптофана и не содержит остатков цистеина. Точный молекулярный вес фрагмента равен 6558,42.

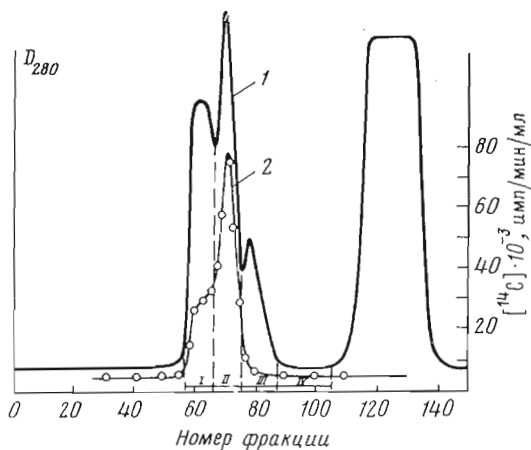


Рис. 7. Разделение смеси бромциановых пептидов EF-G на колонке (2,5×160 см) с сефадексом G-25, уравновешенным аммиачной водой, pH 9 (скорость элюирования 18 мл/ч, объем фракций 6 мл). 1 - D_{280} , 2 - радиоактивность

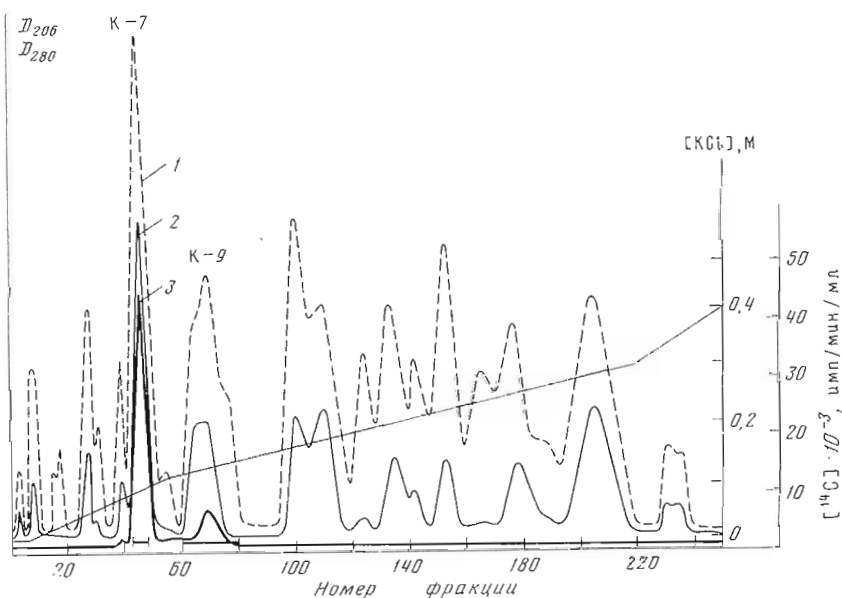


Рис. 8. Разделение фракции бромциановых пептидов, полученной после гель-фильтрации на сефадексе G-25 (фракция II) на колонке (1,5×20 см) с QAE-сефадексом A-25, уравновешенным 0,02 М трис-HCl (pH 8,2) с 6 М мочевиной (скорость элюирования 9 мл/ч, объем фракций 3 мл). 1 - D_{206} , 2 - D_{280} , 3 - радиоактивность

фрагменты непосредственно друг за другом, или между ними находятся небольшие пептиды. Для выяснения этого мы провели расщепление EF-G, модифицированного $[^{14}\text{C}]\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ бромцианом. Пептид, несущий радиоактивную метку на остатке цистеина, должен объединять фрагменты T₇ и T₄. Другой пептид, объединяющий фрагменты T₆ и T₇, должен иметь большое содержание глутаминовых кислот (как минимум 5) и иметь N-концевую глутаминовую аминокислоту.

Для выделения бромциановых пептидов смесь, полученная после расщепления EF-G бромцианом, была модифицирована малеиновым ангидридом и первоначально разделена на колонке с сефадексом G-25 (рис. 7). Объединенная фракция II была разделена далее на колонке с QAE-сефадексом A-25 (рис. 8). В результате был обнаружен пик, содержащий ра-

Аминокислотный анализ бромциановых пептидов CBG-1, CBG-2; пептидов, полученных после триптического гидролиза CBG-2 (Tr) и после расщепления по триптофану пептида CBG-2 (BN)

Аминокислота	CBG-1	CBG-2	Tr-6	Tr-7	Tr-8	Tr-9	BN-3	BN-4
Cys (Cm)		0,8(1)	0,8(1)				0,7(1)	
Asp		2,0(2)		1,0(1)		1,2(1)		1,8(2)
Thr	3,8(4)	1,1(1)	1,1(1)				1,0(1)	
Ser	1,6(2)	1,0(1)	1,1(1)				1,1(1)	
Hse	* (1)	* (1)				* (1)		* (1)
Glu	5,0(5)	4,0(4)	3,0(3)	1,0(1)			3,1(3)	1,2(1)
Pro		2,1(2)	1,1(1)		1,1(1)		1,1(1)	0,9(1)
Gly	2,1(2)	2,4(2)	2,3(2)				2,2(2)	
Ala	3,1(3)	3,2(3)	1,2(1)	1,0(1)		1,1(1)	1,1(1)	2,2(2)
Val		5,7(6)	3,7(4)		0,9(1)	0,8(1)	3,8(4)	2,0(2)
Met								
Ile	2,1(2)	1,0(1)				1,0(1)		1,0(1)
Leu							0,8(1)	0,9(1)
Tyr		1,8(2)	0,7(1)		0,7(1)			1,0(1)
Phe	1,0(1)	1,0(1)				0,9(1)		
His								3,0(3)
Lys		3,0(3)		1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)		
Trp	** (1)	** (1)	(1)					2,0(2)
Arg	1,1(1)	2,0(2)	1,0(1)		1,1(1)			
Всего остатков	22	33	17	4	5	7	16	17
N-Концевая	Glu	Val	Val	Gln	Tyr	Ile	Val	Arg

* Количественно не определялся.

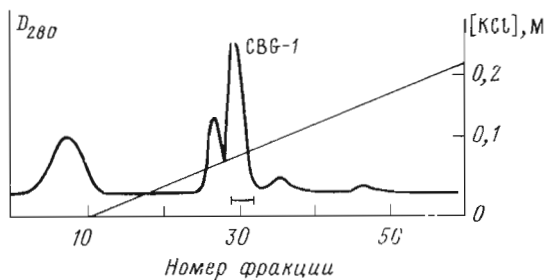
** Не определялся.

Таблица 8

Бромциановые пептиды CBG-1 и CBG-2, пептиды, полученные при триптическом гидролизе пептида CBG-2 (Tr) и после расщепления CBG-2 BNPS-скатолом (BN)

	Аминокислотная последовательность
CBG-1	<u>Glu-Gln-Gln-Gln-Glu-Arg-Gly-Ile-Thr-Ile-Thr-Ser-Ala-Ala-Thr-Thr-Ala-Phe-Trp-Ser-Gly-Met</u>
CBG-2	<u>Val-Tyr-Cys-Ala-Val-Gly-Gly-Val-Gln-Pro-Gln-Ser-Glu-Thr-Val-Trp-Arg-Gln-Ala-Asn-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Arg-Ile-Ala-Phe-Val-Asn-Lys-Met</u>
Tr-6	<u>Val-Tyr-Cys-Ala-Val-Gly-Gly-Val-Gln-Pro-Gln-Ser-Glu-Thr-Val-Trp-Arg</u>
Tr-7	<u>Gln-Ala-Asn-Lys</u>
Tr-8	<u>Tyr-Lys-Val-Pro-Arg</u>
Tr-9	<u>Ile-Ala-Phe-Val-Asn-Lys-Met</u>
BN-3	<u>Val-Tyr-Cys-Ala-Val-Gly-Gly-Val-Gln-Pro-Gln-Ser-Glu-Thr-Val-Trp</u>
BN-4	<u>Arg-Gln-Ala-Asn-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Arg-Ile-Ala-Phe-Val-Asn-Lys-Met</u>

Рис. 9. Рехроматография фракции К-9 (рис. 8) на колонке (1,0×10 см) с QAE-сефадексом А-25 в буфере 20 мМ трис-НСl (рН 8,3), содержащем 6 М мочевины в градиенте концентрации КСl (150 мл 0,0 М – 150 мл 0,2 М) (скорость элюирования 10 мл/ч, объем фракции 6 мл)



диоактивную метку (фракция К-7, рис. 8). Объединенная фракция с радиоактивностью содержала практически чистый пептид СВG-2 (см. табл. 7). Для обнаружения пептида с N-концевой глутаминовой кислотой в объединенных фракциях были определены N-концевые аминокислоты. Оказалось, что только три фракции содержали пептиды с глутаминовой кислотой на N-конце. Фракция К-9 (рис. 8) была подвергнута рехроматографии на колонке с QAE-сефадексом А-25. В результате был выделен пептид СВG-1 (см. табл. 7, рис. 9). Исследование N-концевой последовательности этого пептида дансильным методом Эдмана показало, что она включает C-концевую последовательность фрагмента Т₆ и N-концевую последовательность фрагмента Т₇ (см. табл. 8, схему 2). Следовательно, мы показали, что фрагменты Т₆ и Т₇ расположены в полипептидной цепи EF-G непосредственно друг за другом.

Бромциановый пептид СВG-2, по данным аминокислотного анализа (табл. 1), содержал один остаток карбоксиметилцистеина и один остаток триптофана, т. е. включал в себя C-концевую последовательность фрагмента Т₇. Ручным методом Эдмана в дансильной модификации была установлена его аминокислотная последовательность до положения 19, т. е. подтверждена структура C-концевого участка фрагмента Т₇ (см. табл. 8, схему 2). Для выяснения структуры C-концевого участка пептида СВG-2 он был подвергнут гидролизу трипсином и расщеплению по остатку триптофана BNPS-скатолом. Триптический гидролизат был разделен методом пептидных карт на пластинках с тонким слоем целлюлозы (рис. 10). В результате было выделено четыре пептида (табл. 7), которые охватывали всю молекулу пептида СВG-2. Исследование их структуры дансильным методом Эдмана позволило подтвердить аминокислотную последовательность фрагмента Т₄, установленную автоматическим методом Эдмана, до положения 16 (см. табл. 8, схему 2).

Для получения перекрывающегося пептида между фрагментами Т₇ и Т₄ бромциановый пептид СВG-2 был расщеплен BNPS-скатолом по остатку триптофана. Полученная смесь была разделена на колонке с сефадексом G-100 (рис. 11). В результате, как и ожидалось, были выделены пептиды: BN-3 (N-концевой, фракция III), BN-4 (фракция II) (см. табл. 7), исследование структур которых показало, что фрагменты Т₇ и Т₄ следуют непосредственно друг за другом (см. табл. 8, схему 2).

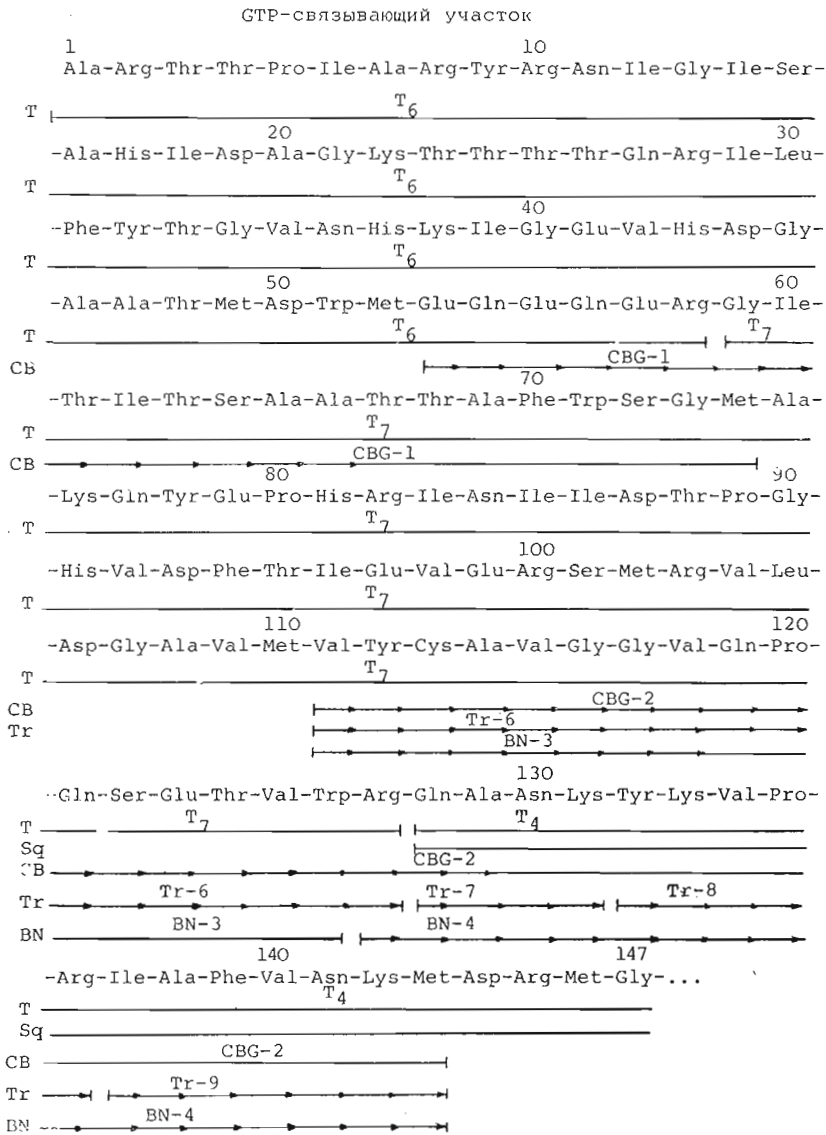
Таким образом, в результате исследования структуры фрагментов ограниченного трипсинолиза EF-G, а именно Т₆, Т₇ и Т₄, а также двух пептидов бромцианового расщепления EF-G была установлена аминокислотная последовательность 147 аминокислотных остатков N-концевого участка полипептидной цепи EF-G, который включает в себя GTP-связывающий центр.

Экспериментальная часть

В работе использованы [¹⁴C]ICH₂CONH₂ (Amersham, Англия), сефадексы G-25, G-100, QAE А-25 (Pharmacia, Швеция), реактивы для диск-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (Serva, ФРГ),

Схема 2

N-концевая аминокислотная последовательность EF-G, включающая



T - фрагменты ограниченного триптического гидролиза EF-G
 CB - пептиды бромцианового гидролиза EF-G
 Tr - пептиды триптического гидролиза пептида CBG-2
 BN - пептиды, полученные после гидролиза пептида CBG-2 BNPS-скатолом
 Sq - определение аминокислотной последовательности автоматическим методом.

трипсин, карбоксипептидазы А и В (Worthington, США), термоллизин (Serva, ФРГ), стафилококковая глутаминовая протеаза (Miles Lab., Англия), бромциан (Serva, ФРГ), BNPS-скатол (Pierce, США), реактивы для автоматического метода Эдмана и фенилтиогидантоины аминокислот (Beckman, США), пластинки с тонким слоем целлюлозы (Merck, ФРГ), флуорескамин (Pierce, США). Все остальные реактивы имели квалификацию ос.ч.

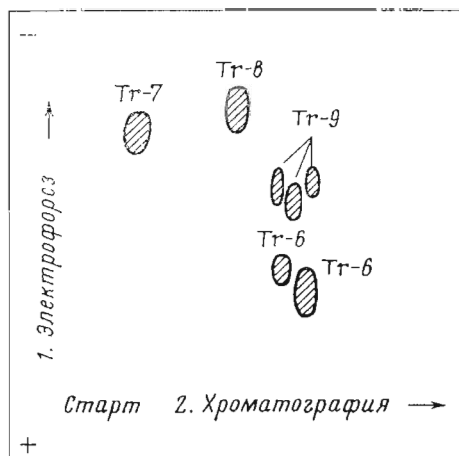


Рис. 10. Микропрепаративное разделение пептидов триптического гидролизата пептида СВГ-2 методом пептидных карт. Условия, аналогичные разделению на рис. 4

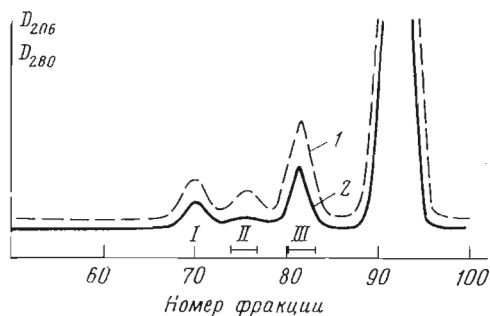


Рис. 11. Разделение пептидов, полученных после расщепления пептида СВГ-2 BNPS-скатолом на колонке (1×190 см) с сефадексом G-100 (тонкий), уравновешенным 50% уксусной кислотой (скорость элюирования 1,5 мл/ч, объем фракций 1,5 мл). 1 — D_{206} , 2 — D_{280}

Аминокислотный анализ. Аминокислотный состав фрагментов EF-G и пептидов определяли на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США). Гидролиз проводили 24 и 72 ч 5,6 н. HCl в вакуумированных запаянных ампулах. Образец растворяли в 50 мкл HCl. Цистеин определяли в виде карбоксиметилцистеина, количество валина и изолейцина определяли по результатам 72-часового гидролиза. Содержание триптофана устанавливали после гидролиза образцов 4 н. метансульфонокислотой (50 мкл, содержащей 0,2% 3-(2-аминоэтил)индола.

Автоматический метод Эдмана. Автоматическое определение N-концевой последовательности во фрагменте T_6 проводили на секвенаторе модели 890С (Beckman, США) с использованием диметилаллиламинной программы (102 974 по фирменному руководству). Для деградации было взято 200 нмоль фрагмента T_6 . Идентификацию фенилтиогидантоинов аминокислот осуществляли на газовом хроматографе модели 5710 (Hewlett-Packard, США) с колонкой, наполненной фазой SP-400, и ТСХ на пластинках Kieselgel 60_{F254} (Fluka, Швейцария), а также на аминокислотном анализаторе D-500 после гидролиза Pth-производных аминокислот 5,6 н. HCl.

Определение N- и C-концевых аминокислот. N-Концевые аминокислоты пептидов определяли дансильным методом, C-концевые — с помощью карбоксипептидаз А и В по модифицированному методу [5, 8].

Установление аминокислотной последовательности в пептидах. Ручной вариант метода Эдмана (дансильная модификация) производили по методу [9, 10] с видоизменениями, описанными нами ранее [5].

Идентификация амидов глутаминовой и аспарагиновой аминокислот проведена по методу, описанному ранее [5, 11].

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) осуществляли по Веберу и Осборн [12] с некоторыми изменениями, как в работе [2].

Селективное карбоксиметилирование EF-G по экспонированной SH-группе, ограниченный трипсинолиз и получение фрагментов были проведены, как описано нами ранее [2].

Расщепление EF-G и фрагмента T₆ бромцианом. К образцу EF-G (2 мкмоль) или фрагмента T₆ (0,1 мкмоль), растворенному в 70% муравьиной кислоте (концентрация белка 0,2 мкмоль/мл), добавляли свежезоогнанный бромциан (5 : 1 по весу) и оставляли в темноте при комнатной температуре на 24 ч. Затем смесь разбавляли водой в 10 раз и лиофильно высушивали. Бромциановый гидролизат T₆ разделяли на сефадексе G-25 (рис. 2).

Малеинирование фрагмента T₆ и бромцианового гидролизата EF-G [6]. Лиофильно высушенные 20 нмоль фрагмента T₆ или бромциановый гидролизат EF-G растворяли в 1 или 15 мл соответственно 0,5 М боратного буфера (рН 9,5), содержащего 7 М мочевины. Затем к раствору порциями добавляли 1,2 или 400 мг малеинового ангидрида, рН реакционной смеси поддерживали в интервале 9,3—9,5 добавлением 2 М раствора NaOH. Малеинирование проводили в течение 1 ч. После завершения реакции смесь была подвергнута разделению на колонке с сефадексом G-25 (рис. 7).

Удаление малеинильной защитной группы после разделения бромциановых пептидов осуществляли выдерживанием в 50% уксусной кислоте в течение 24 ч при 37°.

Триптический гидролиз фрагмента T₆, бромцианового пептида CBG-1 и малеинированного фрагмента T₆ (MTVI). 75 нмоль фрагмента T₆ или пептида CBG-1, или 150 нмоль MTVI в 200 мкл или 0,5 мл 0,1 М NH₄HCO₃ (рН 8,3) переваривали с трипсином (соотношение фермент — субстрат 1 : 50) в течение 8 ч (37°). По окончании реакции гидролизат лиофильно высушивали. Триптический гидролизат фрагмента T₆ и пептида CBG-1 разделяли методом пептидных карт (см. рис. 4 и рис. 10). Пластинки обрабатывали как в работе [5].

Триптический гидролизат малеинированного фрагмента T₆ разделяли на колонке (1×190 см) с сефадексом G-50 (рис. 5). Обессоливание проводили на колонке (1,5×30 см) с сефадексом G-25 в аммиачной воде, рН 9,0.

Гидролиз пептида MTVI-1 термолизином. Пептид (70 нм) в 200 мкл NH₄HCO₃, рН 8,3, инкубировали 1 ч с термолизином при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 (37°). Гидролизат был высушен и разделен методом пептидных карт на пластинках с тонким слоем целлюлозы (см. рис. 6). Пластинки обрабатывали аналогично триптическим картам в работе [5]; элюирование пептидов с целлюлозы проводили 50% водным пиридином.

Расщепление фрагмента T₆ и пептида CBG-1 BNPS-скатолом было проведено как описано в работе [14]. К раствору 150 нмоль фрагмента T₆ или пептида CBG-1 в 2 мл 66% уксусной кислоты добавляли 5,5 мг BNPS-скатола в ледяной уксусной кислоте (0,5 мл). Смесь оставляли в темноте на 30 ч при комнатной температуре. Затем гидролизат разделяли гель-фильтрацией (см. рис. 3 и 11).

Модификация фрагмента T_6 тетраэтоксипропаном [7]. 150 нмоль фрагмента T_6 растворяли в 30 мкл воды, добавляли 170 мкл 12 н. HCl, 15 мкл тетраэтоксипропана и инкубировали 60 мин при 4°, затем добавляли 0,4 мл 6 М хлоридата гуанидина в 12 н. HCl и оставляли на 1 ч при 4°. Реакционную смесь разбавляли водой в 10 раз и 25% раствором аммиака доводили pH до 8,0. Смесь обессоливали на колонке (1×80 см) с сефадексом G-25 в аммиачной воде, pH 9,5.

Триптический гидролиз фрагмента T_6 , модифицированного по остаткам аргинина тетраэтоксипропаном (PTVI). Образец в 200 мл NH_4HCO_3 (pH 8,3) инкубировали с трипсином при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 в течение 8 ч при 37°. Реакционную смесь лиофильно высушивали, промывали водой и подвергали деградации по Эдману без разделения пептидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алахов Ю. Б., Стенгревиц О. А., Буцдулис Ю. П., Мотуз Л. П., Винокуров Л. М. (1979) *Биоорган. химия*, 5, 330–339.
2. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М., Овчинников Ю. А. (1977) *Биоорган. химия*, 3, 1333–1345.
3. Girshovich A. S., Bochkareva E. S., Pozdnyakov V. A., Ovchinnikov Yu. A. (1978) *FEBS Lett.*, 85, 283–286.
4. Alakhov Yu. B., Motuz L. P., Stengrevits O. A., Ovchinnikov Yu. A. (1978) *FEBS Lett.*, 85, 287–290.
5. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М. (1978) *Биоорган. химия*, 4, 1301–1313.
6. Butler P. J. G., Hartley B. S. (1972) in: *Methods in Enzymology* (Hirs C. H. W., ed.), vol. XXV, pp. 191–199, Acad. Press, N. Y. — London.
7. King T. P. (1966) *Biochem.*, 5, 3454–3459.
8. Ambler R. P. (1967) in: *Methods in Enzymology* (Hirs C. H. W., ed.), vol. XI, pp. 156–166, Acad. Press, N. Y.— London.
9. Gray W. R., Hartley B. S. (1963) *Biochem. J.*, 89, 379–380.
10. Bruton C. J., Hartley B. S. (1970) *J. Mol. Biol.*, 52, 165–178.
11. Roseau G., Pantel P. (1969) *J. Chromatogr.*, 44, 392–395.
12. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 4406–4412.
13. Vandekerckhove J., Van Montgu M. (1974) *Eur. J. Biochem.*, 44, 279–288.
14. Fontana A. (1972) in: *Methods in Enzymology* (Hirs C. H. W., ed.), vol. XXV, pp. 419–423, Acad. Press, N. Y.— London.

Поступила в редакцию
17.XII.1978

THE PRIMARY STRUCTURE OF ELONGATION FACTOR G FROM *ESCHERICHIA COLI*. IV. N-TERMINAL AMINO ACID SEQUENCE CONTAINING THE GTP-BINDING SITE

MOTUZ L. P., BUNDULIS Yu. P., ALAKHOV Yu. B.

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

The N-terminal 58-residue fragment T_6 obtained on limited tryptic digestion of the elongation factor G (EF-G) was studied. After EF-G cleavage with cyanogen bromide, 2 peptides were isolated, one of which overlaps the fragments T_6 and T_7 , and the other — T_7 and T_4 . It was shown that the fragments of limited tryptic hydrolysis follow each other directly, with no amino acid sequence being split off. These, as well as earlier obtained results on the structure of T_7 fragment and N-terminal portion of T_4 fragment, allowed to establish the amino acid sequence 147-residue N-terminal fragment of the G-factor.