

УДК 577.1.7

БИОХИМИЯ

А. А. Арутюнян, Е. С. Северин

Выделение и исследование аминокислотного состава некоторых пептидов С-концевой части гистона F1 тимуса телят

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР А. А. Галоним 10/X 1974 г.)

Первичная структура гистона F1 изучена не полностью. Расшифрована последовательность аминокислот лишь N-концевой части молекулы (1-4). Надежных способов выяснения первичной структуры фрагментов белков, богатых однотипными остатками аминокислот, в настоящее время не имеется. Представляет большие трудности также получение гомогенных пептидов. Способ выделения пептидов, включающий методы гельфильтрации, ионообменной хроматографии и дополнительной очистки пептидов электрофорезом или хроматографией на бумаге, достаточно трудоемок и требует не менее 1 микромоля белка. Методы же расшифровки аминокислотной последовательности достаточно разработаны и высокочувствительны ($\sim 10^{-10}$ М).

В последнее время предпринимаются попытки разработать методические приемы работы с малыми количествами белков и пептидов. В частности, была показана возможность установления N-концевой последовательности белков, очищенных методом аналитического электрофореза в полиакриламидном геле (5), и получение гомогенных пептидов таких белков методом «отпечатков пальцев» (фингерпринт) (6).

В настоящей работе мы разработали методический прием выделения пептидов из малого количества белка. Этот метод использован для выделения некоторых пептидов из С-концевой части молекулы субфракции I гистона F1 тимуса телят. Аминокислотный состав выделенных пептидов изучен при помощи разработанного нами денсилового ультрамикрометода анализа аминокислот.

Гистон F1 тимуса телят (80 мг) расфракционирован на амберлите IRC-50, по методу, описанному в работе (7). Расщепление субфракций гистона F1 (15 мг) по остатку тирозина проводили бромсукцинимидом согласно проппен (2). Разделение С и N половинок молекулы осуществляли на колонке сефадекса Г-50 при скорости тока элюента (0,05М НСООН)—15 мл/час. Энзиматическое расщепление С-концевых половинок (1 мг) трипсином или химотрипсином проводили

в 1%-ном NH_4HCO_3 при соотношении фермент-субстрат 1 : 80 в течение 5 час при 37 С. Электрофорез при pH 5,0 проводили на бумаге ватман 3ММ (4000 в, 40 см). Хроматографию проводили в системе растворителей: пиридин-уксусная кислота-бутанол-вода (10 : 3 : 14 : 12).

Выделение пептидов Пептиды разделяли методом фингерпринта на бумаге. Для выделения пептидов с бумаги были разработаны два специальных приема, смысл которых заключается в получении копии или отпечатка фингерпринта, окрашивание которого позволяет восстанавливать картину разделения на основном фингерпринте.

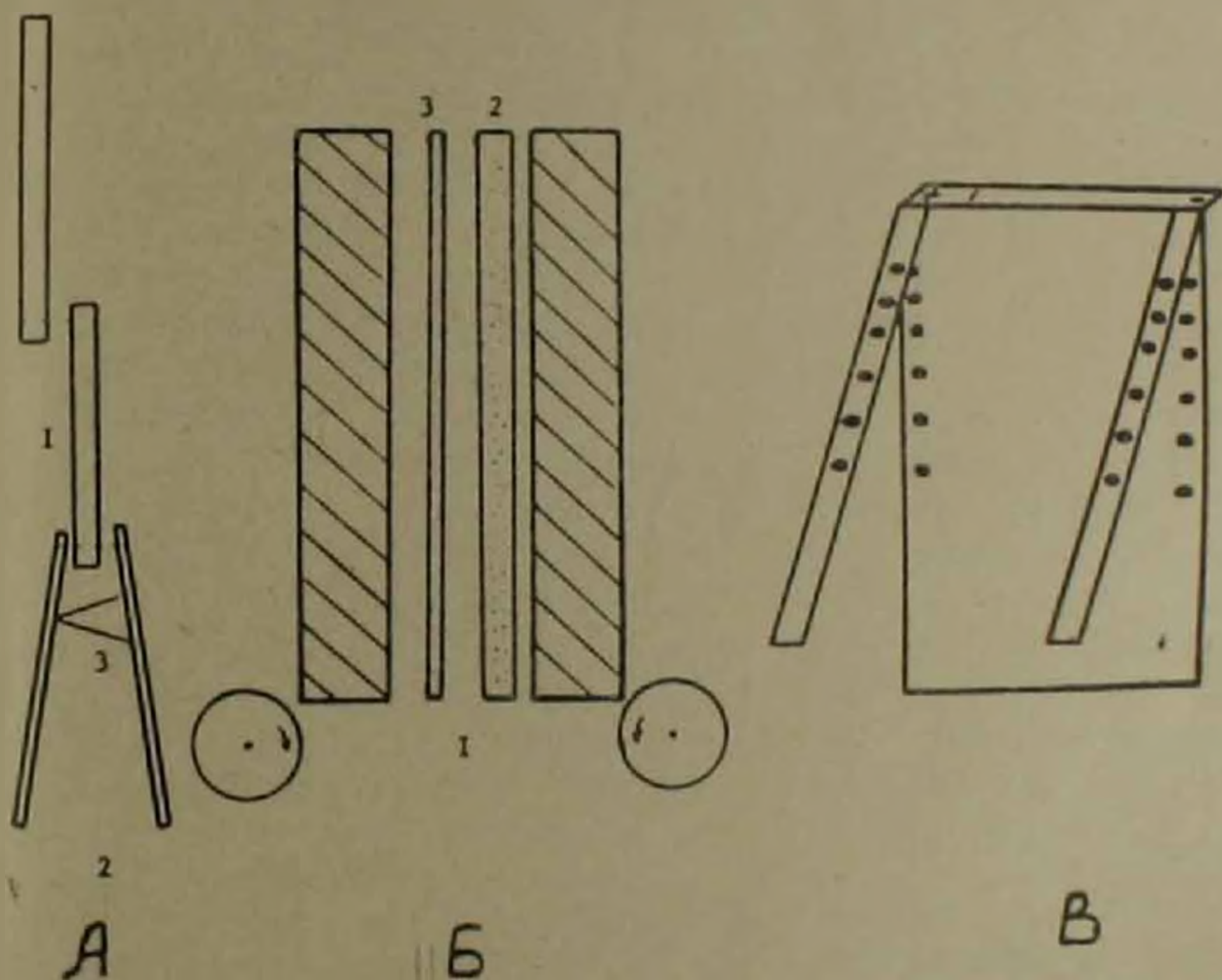


Рис. 1. Схема поясняющая получение отпечатков фингерпринтов (см. в тексте)

Первый способ заключается в следующем: после электрофореза пептидов на бумаге, полоска электрофореграммы (1), (рис. 1, А) пришивается к двум хроматографическим листам бумаги ватман I. Между листами, по всей длине, вставляется раздвигающий стержень (2) из листового полиэтилена в виде треугольника, для разобщения хроматограмм в процессе хроматографии. После хроматографирования и высушивания хроматограмм, основной лист вырезается согласно рис. 1, В, а остальное окрашивается нингидрином. Так как практически всегда имеется большое расхождение в расстояниях, пройденных пептидами на разных листах, проводят пересчет местонахождения пептидного пятна на основании расхождений аминокислотных маркеров (такой пеп-

решет допустим, поскольку пептиды имеют одинаковую R_f на обоих листах).

После восстановления картины на основном листе, пятна вырезают и элюируют. Контрольное окрашивание основного листа после вырезания пятен показывает, что практически всегда местонахождение пептидного пятна определено правильно.

Второй способ более простой и точный: обычный фингерпринт (ватман 3ММ), гидролизата белка осторожно опрыскивают водой до полного увлажнения, после чего, на него стелят сухой лист бумаги ватман 1. Эти листы помещают между двумя листами тонкого пластика и прокатывают через плотные резиновые ролики согласно рис. 1Б. Следует заметить, что сухой лист располагают таким образом, чтобы направление его расширения при промокании совпадало с направлением прокатки. При увлажнении вспомогательного листа на нем получается отпечаток фингерпринта, который проявляют 0,01%-ным раствором флуорескамина в ацетоне по методу, описанному в работе (6).

Определение аминокислотного состава пептидов. Аминокислотный состав пептидов определяли дансильным методом. Дансильрование аминокислот проводили в стеклянной ампуле (3×30 мм). В стеклянный капилляр, до фиксированной метки набирали 0,5—1 мкл 0,04М раствора ДНС—С1 в ацетоне, после чего, до той же метки набирали 0,2М раствор KHSO_3 . Смесь перемешивали повторным переворачиванием капилляра, после чего часть полученного раствора (0,5—1 мкл) переносили в ампулу, в которой находился пептидный гидролизат. Ампулу закрывали парафильмом и выдерживали 40 мин при комнатной температуре (7). По окончании реакции дансильрования, при помощи специальной установки на хроматографическую пластинку наносили 0,2 мкл реакционной смеси. Двухмерное хроматографическое разделение ДНС-аминокислот проводили на полиамидных пленках размером 5×6,5 см с использованием модифицированных хроматографических систем, предложенных в работах (8,9). 1 система: вода-муравьиная кислота-пропанол (100:2:5), 2 система: бензол-уксусная кислота-бутанол (90:10:5), и 3 система: этилацетат-метанол-уксусная кислота (20:1:1). Интенсивность сигнала флуоресценции пятен ДНС-аминокислот измеряли высокой узкой щелью (6×0,1 мм) на спектрофотометре для хроматограмм РМQ-II фирмы «Цейс» (ФРГ). Относительное содержание аминокислот в смеси определяли после коррекции значений сигнала флуоресценции пятен с помощью специальных коэффициентов, которые связывают сигнал флуоресценции пятна с содержанием соответствующей аминокислоты в смеси.

N-концевую последовательность аминокислот в пептидах определяли методом ДНС-Эдмана по методике, описанной в работе (10).

На рис. 2 показаны картины разделения триптических и химотриптических гидролизатов С-концевых половинок субфракций 1, 2 и 3 гистона F1 тимуса телянка. Различия фингерпринтов С-концевых участков разных субфракций гистона F1 обнаруживаются лишь в некоторых

пептидах. Аминокислотный состав пептидов, полученных из субфракции 1, приведен в табл. 1, а на рис. 3—аминокислотный состав некоторых пептидов соотнесен к структуре, известной для субфракции 3 тимуса кролика. Видно, что эти пептиды по своему аминокислотному составу, а также N-концевой последовательностью аминокислот полностью совпадают с ожидаемыми по структуре субфракции 3 пептидами. Причем, этот факт подтверждается и на триптических и химотриптических пептидах. Следует заметить, что полная идентичность местоположения изученных триптических пептидов на всех

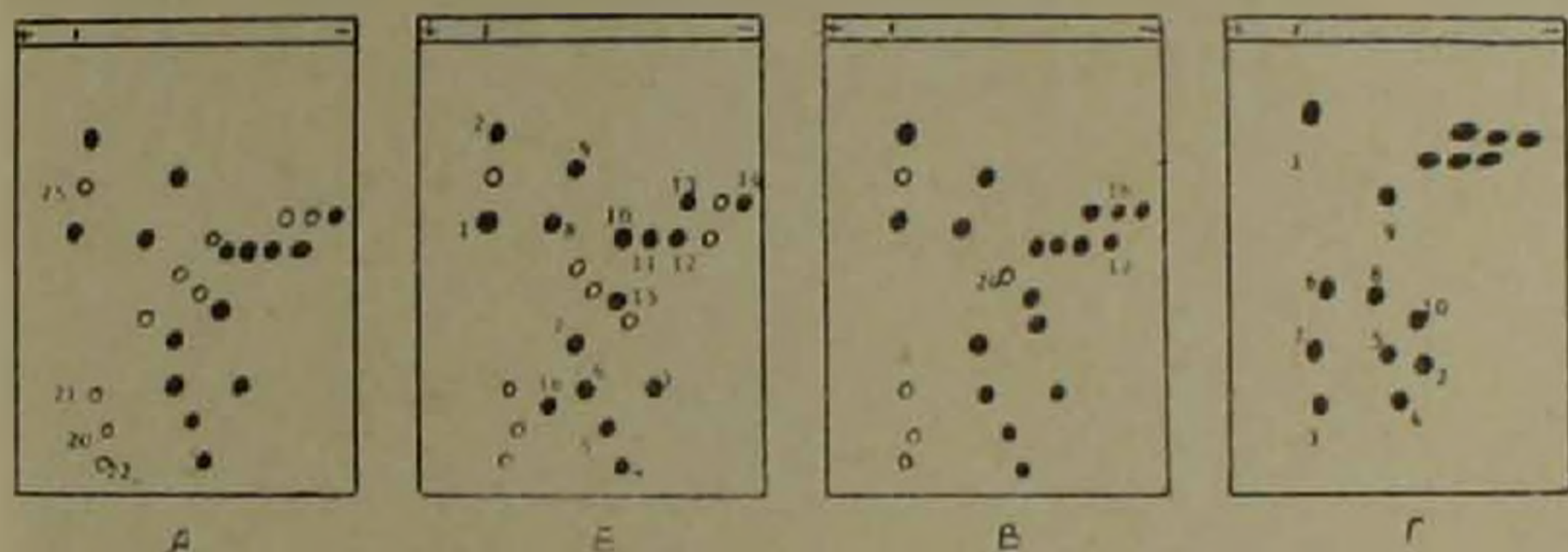


Рис. 2. Пептидные карты триптических (А, Б и В) и химотриптических (Г) гидролизатов С-концевой части гистона F1 тимуса теленка. В виде кружочков обозначены минорные пятна. Пронумерованы лишь те пептиды, для которых изучен аминокислотный состав

трех фингерпринтах (рис. 2, А, Б и В) позволяет сделать вывод о том, что во всех трех субфракциях этот участок молекулы имеет одинаковую структуру. Причем это сходство структур определенных участков имеет место не только в субфракциях гистона F1, но также в гистонах, выделенных из разных источников.

Анализ аминокислотного состава остальных пептидов показывает, что в этих пептидах имеется очень высокое содержание лизина и аланина. Как видно на рис. 2, триптический гидролиз прошел не полностью, поскольку количество пептидов на пептидной карте гораздо меньше, чем следовало ожидать. Этот результат объясняется тем, что в С-концевой части гистоновой молекулы имеется около 45 остатков лизина, а лизиновые последовательности, как известно, с трудом и в то же время неспецифически гидролизуются трипсином. Однако, похоже, что и последовательности, образованные из этих пептидов у разных субфракций, отличаются не сильно, так как большинство пептидов имеет идентичное местоположение на пептидных картах гидролизатов всех трех субфракций.

Предложенные в настоящей работе методические приемы выделения пептидов с пятна бумажного фингерпринта в отличие от метода слабого предварительного окрашивания для локализации пептидов⁽⁹⁾, позволяют получить пептидный материал, который может быть подвергнут деградации по Эдману. Кроме того, отсутствует риск потери

Аминокислотный состав пептидов (Цифрами обозначены аминокислоты N-концевой последовательности)

	Gly	Ser	Thr	Val	Asp	Glu	Ala	Ile	Leu	Phe	Lys	Arg	Pro
--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Триптические пептиды

1				1.0 ²	0.9 ¹	1.0					0.9		
2		1.1			2.0							0.8	
3								1.0 ¹			0.9		
4	1.2								1.8		1.0		
5		2.0		6.9					1.0		1.0		
6	1.3 ¹		2.2 ²	1.0		0.8			1.1 ²		1.3		
7	3.3 ¹	1.6	0.9 ²				1.0			1.0	1.7		
8	1.2		0.7			1.0	1.2 ¹				0.9		
9	1.1				1.0	1.0 ²	3.5 ¹				2.7	0.7	1.0
10		0.8 ¹					2.8 ²				2.0		1.0 ¹
11	1.0	1.8					4.5				4.0		3.2
12							1				1		
13											+		
14	1.0	0.8		1.1			1.2				3.0		
15							1				5		1
16	1.0	0.9									7.5		
17	0.7		1.2 ²				1.6 ¹				1.1		1.0
18				0.9 ¹	0.7 ²		1.6		0.7		2.7		0.6
19	1.3						1.3				1.0		
20	1.8 ¹	2.0		1.9	1.0	1.0	0.8 ²				2.0		0.8
21	1.0	1.4 ¹	0.7 ²	0.9		0.8	1.0	0.8	1.0 ¹		1.8		1.7
22	3.0 ¹	3.0	1.0 ²			0.9	0.6			0.7	1.0		
23	3.2	1.9	1.6	1.0		1.2	1.4		1.0		1.1		0.9
24	2.2	2.2		2.0		0.9	1.1		1.7		1.3		
25	1.0	1.1				0.7	1.2				1.2		0.8

	Gly	Ser	Thr	Val	Asp	Glu	Ala	Leu	Phe	Lys	Pro
--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Химотриптические пептиды

1	3.4	2.0	2.4	0.8		1.1	0.8		1.2	1.0	
2	1.2							1.0			
3				0.9	3.0	1.1				1.0	
4								1.0		1.0	
5	1.2							1.8		1.0	
6	1.2	1.0	1.0	1.0				0.9		1.0	
7	2.8	2.1	2.0	1.0			3.0		1.0	3.0	1.0
8	1.4	1.3	1.0	0.9		0.8	1.5	0.7	0.8	1.0	1.0
9	1.6	1.0	1.0	0.6		0.3	5.3			1.2	2.1
10	0.6	0.9						1.0		1.0	

пептида вследствие недоокрашивания, тем более, если учесть, что согласно нашим наблюдениям, кислые пептиды несколько слабее окрашиваются флуорескаминном. Метод анализа аминокислот имеет высокую чувствительность (порядка $2 \cdot 10^{-12}$ М) и достаточно прост. Отметим, что в наших опытах для определения аминокислотного состава использовали лишь 1/50—1/100 часть пептида, полученного из пятна

бумажного финтерпринта. На наш взгляд, этому методу аминокислотного анализа следует отдать предпочтение при работе с пептидами, а

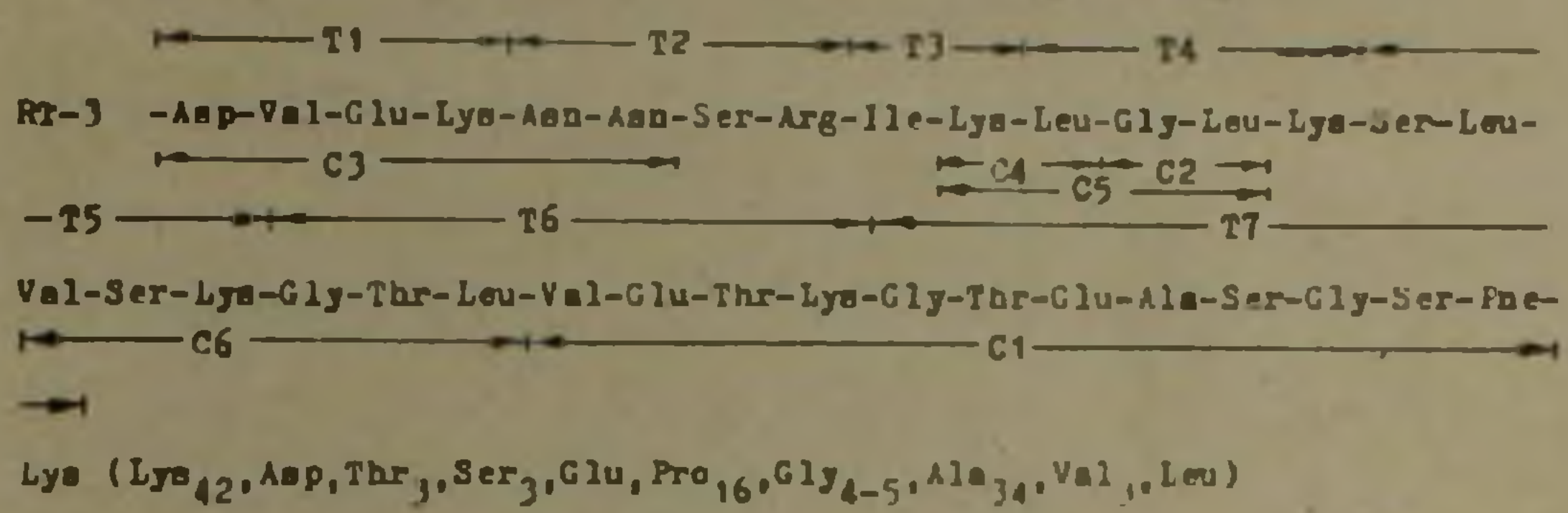


Рис. 3. Аминокислотная последовательность С-концевой части гистона H1 тимуса кролика (¹). Аминокислотный состав полученных триптических (Т) и химотриптических (С) пептидов соотнесен к структуре в виде стрелок

также при необходимости проведения большого количества параллельных определений, так как в этом случае фактическое время одного анализа заметно сокращается.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР
Институт биохимии АН Арм. ССР

И. А. ЗАРРЬЯНЦ, Б. Н. АБЕГЬЯН

Зарри ուրցազեղծի F1-հիսթոնի C-ծայրային մասի որոշ պեպտիդների անջատումը և ամինաթթվային կազմի ուսումնասիրությունը

Ստացված են չորթի ուրցազեղծի F1 հիսթոնի ենթաֆրակցիաների C-ծայրային մասերի տրիպտիկական և խիմոտրիպտիկական հիդրոլիզատորների պեպտիդային քարտեզները: Կրկնօրինակման մեթոդի օգնությամբ անջատված են առաջին սուբֆրակցիայի C-ծայրային մասի պեպտիդները և դանսիլային մեթոդով հետազոտված է վերջիններիս ամինաթթվային կազմը: Տույց է տրված, որ անջատված պեպտիդների ամինաթթվային կազմը համապատասխանում է ճազարի ուրցազեղծի F1 հիսթոնի երրորդ ենթաֆրակցիայի համար հայտնի ամինաթթվային հաջորդականությանը: Ըստ որում, ամինաթթվային փոխանակումները հիսթոնի մոլեկուլի այդ մասում հավանաբար քաղցակայում են:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ R. J. Delange and E. L. Smith, Accounts of Chemical Research, 5, 368 (1972). ² S. C. Rall and R. D. Cole, J. Biol. Chem., 246, 7175, (1971). ³ M. Hustin and R. D. Cole, J. Biol. Chem., 246, 1458, (1970). ⁴ J. M. Kinkade and R. D. Cole, J. Biol. Chem., 244, 3375, (1969). ⁵ A. M. Welner, T. Platt and K. Weber J. Biol. Chem., 247, 3242, (1972). ⁶ J. Vandekerckhove and M. V. Montagu Eur. J. Biochem., 44, 279, (1974). ⁷ A. A. Арутюнян В. А. Спасах и Я. М. Варшавский, Биохимия, 39, 1974. ⁸ K. R. Woods and K. T. Wang Biochem. Biophys. Acta, 103, 369, (1967). ⁹ K. Crowshaw S. Jexsup and R. W. Remwell Biochem. J., 103, 79, (1967). ¹⁰ B. S. Hartley Biochem. J., 119, 805, (1970).