

- пряда. II. Аминокислотная последовательность фрагментов // Биоорг. химия.— 1978.— 4, № 8.— С. 1036—1047.
7. Gray W. R. Sequence degradation plus dansylation // Meth. Enzym.— 1967.— 11.— P. 469—475.
8. Vainshtein B. K., Melik-Adamyan W. R., Barynin V. V., et al. Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* of 2 Å resolution // J. Mol. Biol.— 1986.— 188, N 1.— P. 49—61.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев
Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН Украины, Киев

Получено 24.07.92

УДК 577.112.5

**Т. Л. Левитина, М. Т. Бобровская, Н. М. Гусак,
О. С. Мирошниченко, Л. В. Гудкова, Н. В. Латышко, Э. А. Козлов**

ТРИПТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ МАЛЕИЛ-КАТАЛАЗЫ ГРИБА *Penicillium vitale*. 2. СТРОЕНИЕ ПЕПТИДОВ

Установлена частичная или полная аминокислотная последовательность 46 пептидов, насчитывающих 686 остатков аминокислот. 36 пептидов с уникальными последовательностями содержат 561 остаток (81% полипептидной цепи каталазы).

Введение. В предыдущем сообщении описано выделение пептидов из триптического гидролизата малеил-каталазы и приведен их аминокислотный состав [1]. В настоящей работе представлены методы выяснения аминокислотной последовательности и показано строение этих пептидов.

Материалы и методы. Секвенирование пептидов осуществляли либо ручным методом [2], либо с помощью секвенатора 890 С («Beckman», США) с последующей идентификацией РТН-аминокислот в системе HPLC («Pharmacia», Швеция). Субфрагментацию пептидов проводили химотрипсином, как в работе [3], а также кратковременным гидролизом по остаткам малеилированного лизина. Для этого приготавливали раствор пептида для снятия малеильных групп (рН 3,5) [1], и пептид гидролизовали в запаянных ампулах 1 ч при 100 °С. После гидролиза раствор лиофилизировали.

Субфрагменты разделяли высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге FN 17 («Filtrak», Германия), как описано [4]. Остатки глутаминовой, аспарагиновой кислот и их амидов идентифицировали в виде РТН-производных по методу [5].

Результаты и обсуждение. В табл. 1 приведены строение и количество остатков 46 пептидов. По сравнению с предыдущими данными [1] в этой таблице приведены три новых пептида (Тm54, Тm55, Тm56), выделенные, как описано ранее [1]. Строение коротких пептидов, содержащих до 15 остатков аминокислот, выясняли ручным методом секвенирования. N-концевую последовательность пептидов Тm2, Тm5, Тm26, Тm41 и Тm53 устанавливали с помощью секвенатора, строение пептида Тm53 — секвенированием смеси пептидов Тm52, Тm53 и Тm54, так как разделить их не удалось [1]. Поскольку пептид Тm54 получен в индивидуальном виде и его последовательность, как и пептида Тm52, не поддается деградации по Эдману, последовательность пептида Тm53 можно было легко выяснить с учетом того, что содержание его в смеси составляет около 60%. Из состава N-концевой последовательности пептида Тm53 следует, что C-концевую часть его занимает пептид Тm34. Зная аминокислотный состав смеси и пептида Тm54, а также соотношение пептидов в смеси, нетрудно вычислить аминокислотный состав Тm52.

© Т. Л. Левитина, М. Т. Бобровская, Н. М. Гусак, О. С. Мирошниченко,
Л. В. Гудкова, Н. В. Латышко, Э. А. Козлов, 1993

Таблица 1

Строение триптических пептидов млекопитающих

Пептиды	Строение	Число остатков
Tm2	Val-Ala-Lys-Ala-Ile-Gly-Val-Glu-Ala-Pro-Lys-Pro-Asp-Ser-Asn-Tyr-Phe-His-(Thr, Gln, Pro, Gly)-Asn-(His, Thr, Ser, Gly, Ala, Ile, Phe)-Val-Ala-Lys-Tyr-Asn-Val-Gly-Ser-Thr-Gln-Gly-Lys-Val-Gly-Leu-Leu-Ala-Ser-Val-Asn-Lys-Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Gln-Gly-Ala-Lys-(Asx, Ser, Glx ₂ , Pro, Leu ₂ , Phe ₂)-Ala-(Asn, Ser, Glu, Ala, Leu)-Arg	76
Tm3	Gly-Ser-Pro-Lys-Ala-Tyr-Ser-Asn-Thr-Glu-Pro-Asn-Lys	13
Tm4	Gly-Asn-Ser-Leu-Ala-Gln-Gly-Ser-Gln-Ile-Ser-Ser-Glu-Arg	14
Tm5	Gly-Thr-Gly-Ala-His-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Tyr-Glu-Asp-Trp-Ser-Asn-Leu-Thr-Ala-Ala-Ser-Phe-Leu-Ser-Ala-Glu-Gly-Lys	28
Tm6	Gly-Val-Asp-Phe-Thr-Glu-Asp-Pro-Leu-Leu-Gln-Gly-Arg	13
Tm7	Phe-Ala-Val-Asp-Gln	5
Tm8	Gly-Phe-Phe-Thr-Ala-Pro-Glu-Arg	8
Tm9	Leu-Val-Thr-Asp-Asn-Gly-Lys	7
Tm10	Phe-Pro-Glu-Gln-Gly-Pro-Glu-Leu-Gly-Val-Glu-Asp-Leu-Phe-(Asx ₄ , Thr, Ser ₃ , Glx ₆ , Gly, Ala, Val, Met, Ile ₂ , Leu, Tyr, Phe)-Arg	38
Tm14	Phe-Gln-Leu-Met-Gln-(Asx, Glx ₃ , Gly, Val ₂ , Ile ₂ , Leu)-Arg	16
Tm16	Phe-Gln-Pro-Ser-Asn-Val-Thr-Lys	8
Tm17	Gln-Lys-Ile-Gln-Arg	5
Tm18	Lys-Phe-Leu-Asp-Arg	5
Tm19	Thr-Ala-Ser-Gly-Lys-Leu-Gln-Arg	7
Tm20	Ser-Ser-Val-Val-Arg	5
Tm21	Glu-Arg	2
Tm22	Gly-Ser-Ala-Asp-Thr-Ala-Arg	7
Tm23	Ile-Ser-Asp-Asn-Leu-Thr-Ala-Arg	8
Tm24	Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-Met-(Asx, Pro ₂ , Ile, Leu)-Phe	12
Tm25	Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-Met	6
Tm26	Phe-Pro-Glu-Gln-Gly-Pro-Glu-Leu-Gly-Val-Glu-Asp-Leu-Phe-(Asx ₄ , Thr, Ser ₃ , Glx ₆ , Gly, Ala, Val, Met, Ile ₂ , Leu, Tyr, Phe)-Arg-Glu-Leu-Arg	41
Tm27	Ala-Pro-Ile-His-Asn-Asp-Asn-Arg	8
Tm28	His-Gly-Pro-Asn-Ile-Gln-Gln-Leu-Gly-Phe-Asn-Arg-Pro-Pro-Arg	15
Tm29	Phe-Asp-Glu-His-Arg	5
Tm31	Ala-Ser-Phe-Val-Glu-Thr-Gln-Glu-Trp-Gly-Ala-Lys	12
Tm32	Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-Met-(Asx, Pro ₂ , Ile, Leu)-Phe-Ala-Ser-Phe-Val-Glu-Thr-Gln-Glu-Trp-Gly-Ala-Lys	24
Tm34	Phe-His-Trp-Tyr-Asp-Leu-Gln-Gly-(Ser, Glx ₂ , Pro, Ala, Val, Ile, Leu ₂ , Trp)-Arg	19
Tm35	Phe-Gln-Pro-Ser-Asn-Val-Thr-Lys-Ser-Ser-Val-Val-Arg	13
Tm36	Val-Pro-Glu-Arg	4
Tm38	Phe-Gly-Phe-Asp-Leu-Pro-Leu-Asp-Thr-Lys	10
Tm39	Leu-Val-Ala-Gln-Ile-Pro-Phe-Gly-Glu-(Asp, Thr, Leu, Val)-Lys-Asn-(Asx ₂ , Glx ₂ , Pro, Gly ₂ , Ala, Val ₂ , Met ₂ , Ile ₃ , Leu, Phe ₂ , His)-Arg	33
Tm41	Phe-Tyr-Val-Asp-Glu-Gly-Asn-Phe-Asp-Ile-Val-Gly-Asn-Asn-Ile-Pro-Val-Phe-Phe-Ile-Trp-Asp-(Asx, Thr, Glx ₂ , Pro ₂ , Ala ₂ , Val, Met, Ile ₂ , Leu ₃ , His, Lys)-Arg	39
Tm42	Ala-Val-Ala-Asp-Phe-Arg	6
Tm43	Phe-Leu-Asp-Arg	4
Tm44	Asp-Val-His-Gly-Phe-Ala-Thr-Arg	8
Tm45	Ala-Val-His-Ala-Arg	5

Пептиды	Строение	Число остатков
Tm46	Asn-Asp-Asp-Asn-Val-Thr-His-Ala ₂ -Arg	9
Tm47	Gly-Thr-Leu-Leu-Leu-Gln-(Asx ₂ , Thr, Glx, Ala ₂ , Ile ₂ , Leu, Phe ₃)-Arg	19
Tm48	Phe-Ser-Arg	3
Tm49	Thr-Phe-Arg	3
Tm50	Asp-Ala-Phe-Arg	4
Tm51	Leu-Phe-Ser-Tyr-Leu-Asp-Thr-Gln-Leu-Asn-Arg	11
Tm52	Met-Gln-(Asx ₅ , Thr, Ser ₂ , Glx ₂ , Gly ₃ , Ala ₅ , Val ₃ , Leu, Tyr, Phe ₂)-Lys-Arg	29
Tm53	Leu-Val-Thr-Asp-Asn-Gly-Lys-Thr-Lys-Leu-Val-Lys-Phe-His-Trp-Tyr-Asp-Leu-Gln-Gly-(Ser, Glx ₂ , Pro, Ala, Val, Ile, Leu ₂ , Trp)-Arg	31
Tm54	Ala-(Lys ₃ , Asx ₃ , Ser ₂ , Glx ₅ , Gly ₄ , Ala ₃ , Val ₂ , Met, Ile, Leu ₃ Phe ₃)-Arg	32
Tm55	Leu-Val-Ala-Gln-Ile-Pro-Phe-Gly-Glu-(Asp, Thr, Leu, Val)-Lys	14
Tm56	Leu-Glu-(Lys, Asx ₃ , Ser ₂ , Glx, Gly, Ala ₂ , Val ₂ , Met, Ile, Leu, Phe ₂)-Arg	20

Строение пептида Tm2 устанавливали дополнительным фрагментированием и частичным гидролизом, как описано в разделе «Материалы и методы». Аминокислотный состав этого пептида, опубликованный ранее [1], уточнен: Lys₆, His₂, Arg, Asp₇, Thr₃, Ser₇, Gly₇, Pro₃, Gly₇, Ala₁₁, Val₆, Ile₃, Leu₅, Tyr₂, Phe₄. Проведено 18 стадий деградации пептида Tm2. Высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге получены 8 субфрагментов (А), строение которых, приведенное в табл. 2, установлено ручным методом деградации. Исходя из строения пептида Tm2A7, можно предположить, что в состав фрагмента входит триптический пептид T57, выделенный ранее [6]: Tyr-Asn-Val-Gly-Ser-Thr-Gln-Gly-Lys. Из табл. 2 ясно, что Tm2 включает четыре лизин-содержащих триптических пептида (T3, T4, T35, T57 [6]), насчитывающих все шесть остатков лизина, входящих во фрагмент. Пептид Tm2A7 является «мостиковым» для пептидов T4 и T57, а Tm2A6, очевидно, представляет С-концевую часть Tm2. На основании этих данных и выписывается строение фрагмента Tm2 (см. табл. 1). Аминокис-

Таблица 2
Строение субфрагментов частичного гидролиза пептида Tm2

Пептид	Строение	Выход, %
Tm2A1	Val-Ala-Lys	90
Tm2A2	Ala-Ile-Gly-Val-Glu-Ala-Pro-Lys-Pro-Asp	60
Tm2A3	Val-Gly-Leu-Leu-Ala-Ser-Val-Asn-Lys-Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Gln-Gly-Ala-Lys	60
Tm2A4	Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Gln-Gly-Ala-Lys	30
Tm2A5	Val-Gly-Leu-Leu-Ala-Ser-Val-Asn-Lys	30
Tm2A6	Ala-(Asn, Ser, Glu, Ala, Leu)-Arg	1
Tm2A7	Val-Ala-Lys-Tyr-Asp	1
Tm2A8	Tyr-Asp	1
Tm2A9	Ala-Pro-Lys-Pro-Asp-Ser-Asn-Tyr-Phe-His-(Thr, Gln, Pro, Gly)-Asp	1

лотный состав С-концевого аргининсодержащего триптического пептида по фрагменте Tm2 вычисляется как разница между аминокислотным составом фрагмента и суммой составов пептидов T3, T4, T35 и T57.

Сравнивая выходы субфрагментов из пептида Tm2 (см. табл. 2), можно предположить, что при частичном гидролизе модифицированных по остаткам лизина пептидов предложенным методом расщепление идет преимущественно по остаткам малеил-лизина. Однако не полностью разрушаются связи Lys-Val и Lys-Pro. Мы полагаем, что остатки лизина, образующие эти связи, не до конца промалеилированы, что подтверждается расщеплением трипсином малеил-каталазы по некоторым остаткам лизина (см. пептиды Tm3, Tm5, Tm9 и др. в табл. 1). Гидролиз пептида Tm2 идет также по остаткам аспарагиновой кислоты и в незначительной степени — по остаткам других аминокислот.

Приведенные в табл. 2 46 пептидов насчитывают 686 остатков аминокислот. Аминокислотные последовательности 19 пептидов (подчеркнуты в табл. 1) перекрываются с таковыми других пептидов. 36 пептидов с уникальными аминокислотными последовательностями содержат 561 остаток, что составляет 81 % полипептидной цепи каталазы.

Summary. Partial or complete amino acid sequence of 46 tryptic peptides from maleyl-catalase was determined. 36 unique peptides comprise 561 amino acid residues and account for 81 % of the catalase polypeptide chain.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левитина Т. Л., Мирошниченко О. С., Гудкова Л. В. и др. Триптические пептиды малеил-каталазы гриба *Penicillium vitale*. 1. Выделение и аминокислотный состав // Биополимеры и клетка. — 1993. — 9, № 1. — С. 5—8.
2. Гусак Н. М., Овчидер М. Н., Дробот Л. Б., Серебряный С. Б. Определение структуры пептидов комбинированным методом дансил-Эдман // Методы молекулярной биологии. — Киев: Наук. думка, 1979. — С. 142—153.
3. Гусак Н. М., Левитина Т. Л., Атепалахина С. А. и др. Триптические пептиды каталазы гриба *Penicillium vitale*. 3. Строение некоторых пептидов // Биополимеры и клетка. — 1989. — 5, № 1. — С. 45—51.
4. Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Родина Н. В. и др. Бромциановые фрагменты каталазы гриба *Penicillium vitale* // Там же. — № 5. — С. 55—63.
5. Алахов Ю. Б., Бундулис М. А., Бундулис Ю. П. Первичная структура фактора элонгации G из *E. coli*. IV. Структура пептидов бромцианового расщепления молекулы G-фактора // Биоорг. химия. — 1983. — 9, № 3. — С. 304—314.
6. Козлов Э. А., Гудкова Л. В., Левитина Т. Л. и др. Дополнительное исследование триптических пептидов каталазы гриба *Penicillium vitale* // Биополимеры и клетка. — 1993. — 9, № 1. — С. 22—25.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев

Получено 24.07.92

УДК 577.391

В. И. Древаль

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА БЕЛОК- ЛИПИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЛИПОСОМ

Изучили влияние ионизирующего излучения в дозах 10—10⁴ Гр на комплексы липосом с метгемоглобином и феррицитохромом С. Установлено снижение полосы Core и увеличение пероксидации липидов. Для комплексов липосом с метгемоглобином рассчитаны константы связывания, число мест связывания и А G.

Введение. К настоящему времени установлена важная роль мембран клетки в реализации поражающего действия радиации на организм [1, 2]. Изменения белкового [3] и липидного [4] компонентов биоло-

© В. И. Древаль, 1993