будут изучены в различных тест-системах. Результаты исследования эффективности проникновения в клетки алкилирующих производных ОНП и модификации ими биополимеров будут опубликованы отдельно.

Summary. Alkylating derivatives of oligonucleotidyl-(P-N)-peptides have been synthesized. These alkylating derivatives of oligonucleopeptides can be used as reagents for specific modification of nucleic acids.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shea Regan G., Marsters J. C., Bischofberger N.* Synthesis, hybridization properties and antiviral activity of lipid-oligodeoxynucleotide conjugates // Nucl. Acids. Res.— 1990.— **18**, N 13.— P. 3777—3783.
2. *Leonetti J. P., Degols G., Milhaud P. et al.* Antiviral activity antisense oligonucleotides linked to poly (*L*-lysine): targets on genomic RNA and/or mRNA of vesicular stomatitis virus // Nucleosides and Nucleotides.— 1989.— 8, N 56.— P. 825—828.
3. *Абрамова Т. В., Власов В. В., Зарытова В. Ф. и др.* Влияние модификации концевых звеньев олигонуклеотидов на их стабильность в культуре клеток // Молекуляр. биология.— 1991.— **25**, № 3.— С. 624—631.
4. *Чипенс Г. П., Полевая Л. К., Веретенникова Н. И., Крикис А. Ю.* Структура и функции низкомолекулярных пептидов.— Рига : Зинатне, 1980.— 327 с.
5. *Гершкович А. А., Кибирев В. К.* Синтез пептидов. Реагенты и методы.— Киев : Наук. думка, 1987.— 264 с.
6. *Куликов С. В., Соколова Н. Ю., Леонова Е. Б., Самарцев М. А.* Присоединение *трет*-бутилоксикарбониламинокислот к хлорметилированному сополимеру стирола с дивинилбензолом в условиях межфазного катализа // Биоорг. химия.— 1989.— **15**, № 3.— С. 348—353.
7. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Ярмолюк С. Н., Алексеева И. В.* Синтез олигонуклеотидил-(5′-N)-пептидов, содержащих аргинин // Биополимеры и клетка.— 1989.— **4**, № 4.— С. 220—222.
8. *Ярмолюк С. М., Іванова Є. М., Кондратюк І. В. та ін.* Олігонуклеотиди. III. Синтез і вивчення аргініновмісних олігонуклеотидил-(P-N)-пептидів // Там же.— 1992.— 8, № 6.— С. 95—100.
9. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П.* Синтез олигонуклеотидов в хлороформе триэфирным методом // Биоорг. химия.— 1983.— **9**, № 4.— С. 516—521.
10. *Ярмолюк С. М., Король Л. С., Алексєєва І. В., Шаламай А. С.* Олігонуклеотиди. II. Синтез олігонуклеотидил-(P-N)-пептидів з допомогою окисно-відновного реагенту — трифенілфосфіну і 2,2′-дипіридилдисульфіду // Биополимеры и клетка.— 1992.— 8, № 5.— С. 16—20.
12. *Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М.* Реакционноспособные фосфамиды моно- и динуклеотидов // Биоорг. химия.— 1986.— **12**, № 4.— С. 475—481.
13. *Райт А. К., Карпова Г. Г., Гринева Н. И.* Конформация 2′,3′-О-[4-N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]олигоцитидилатов и свойства их комплексов с полиинозиновой кислотой // Биоорг. химия.— 1977.— 3, № 1.— С. 31—38.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев
Ин-т биоорг. химии СО РАН, Новосибирск

Получено 28.09.92

УДК 577.112.5

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

ВЫДЕЛЕНИЕ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ПЕПТИДОВ, ОБРАЗОВАВШИХСЯ ПРИ РАСЩЕПЛЕНИИ КАТАЛАЗЫ ГРИБА Penicillium vitale СТАФИЛОКОККОВОЙ ПРОТЕИНАЗОЙ

Из гидролизата, полученного при расщеплении каталазы гриба Penicillium vitale стафилококковой протеиназой, методами гель-фильтрования, ионообменной хроматографии, высоковольтного электрофореза и хроматографии на бумаге выделены 38 пептидов и определен их аминокислотный состав и N-концевые остатки. 38 пептидов насчитывают в сумме 578 остатков аминокислот.

Введение. Настоящее сообщение продолжает серию публикаций, посвященных исследованию первичной структуры каталазы *P. vitale*. Ранее были опубликованы работы по выяснению строения триптических пеп-

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

тидов немодифицированной [1] и модифицированной по остаткам лизина [2] каталазы, а также по выделению, аминокислотному составу бромциановых фрагментов и строению одного из них [3].

Предполагается, что с выяснением строения пептидов, являющегося целью этой работы, будут известны «мостиковые» пептиды, необходимые для реконструкции пептидной цепи каталазы.

Материалы и методы. Получение каталазы описано ранее [4]. Для расщепления к 1,3 г сырой каталазы добавляли 50 мл 0,2 н. NaOH, и раствор белка диализовали против 0,1 н. NH_4HCO_3 в течение ночи при 8 °С. К диализату добавляли 10 мг стафилококковой протеиназы («Miles», Англия) и выдерживали 6 ч при

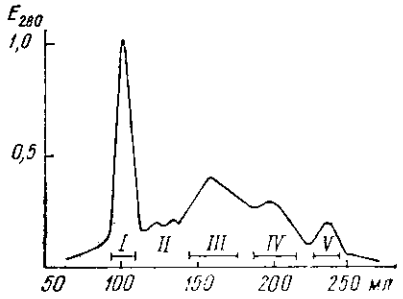
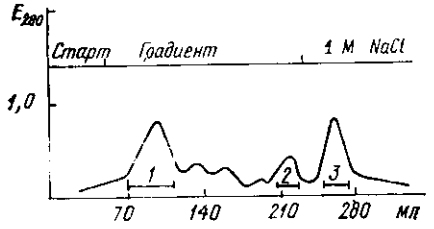


Рис. 1. Разделение пептидов, полученных при расщеплении каталазы стафилококковой протеиназой, на колонке (1,8×100 см) с сефадексом G-50. Растворитель — 0,2 н. NH_4HCO_3, скорость элюции 25 мл/ч

37 °С. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, надосадочную жидкость лиофилизировали. Гель-фильтрование проводили с применением сефадекса G-50 («Pharmacia», Швеция) в условиях, описанных под соответствующим рисунком. Для ионообменной хромато-



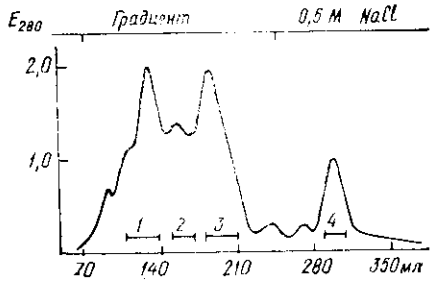


Рис. 2. Ионообменная хроматография материала пика I рис. 1 на колонке (1,4×29 см) с ДЭАЭ-TSK-Toyo-pearl. Стартовый буфер — 0,02 М трис-HCl, pH 8,9. Градиент: 120 мл стартового буфера+120 мл его же с 0,5 н. NaCl. Скорость элюции 25 мл/ч

Рис. 3. Ионообменная хроматография материала пика III рис. 1 в условиях, описанных в подписи к рис. 2.

графии использовали смолу ДЭАЭ-Toyo-pearl («Toyo-Soda», Япония). Детали хроматографии также приведены в подписи к соответствующему рисунку.

Обессоливали фракции гель-фильтрованием через сефадекс G-25 в 0,5 %-м растворе аммиака.

Высоковольтный электрофорез и хроматографию осуществляли на бумаге Filtrak FN-17 (Германия) [5], применяя различные комбинации электролитов и систем растворителей, описанных нами ранее [3]. Аминокислотный состав определяли с помощью анализатора аминокислот ААА-339 (ЧССР) по методике [6]. N-концевой анализ осуществляли дансил-методом [7].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 показаны результаты гель-фильтрования продукта расщепления каталазы стафилококковой протеиназой. После лиофилизации материал фракций I и III подвергали ионообменной хроматографии. Результаты приведены на рис. 2 и 3 соответственно. Материал фракций IV и V (рис. 1) после лиофилизации, а также материал фракций 1 (рис. 2) и 1, 3 (рис. 3) после обессоли-

Аминокислотный состав пептидов, полученных расщеплением каталазы стафилококковой протеиназой

Аминокислота	Sp 1	Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5	Sp 6	Sp 7	Sp 8	Sp 9	Sp 10
Lys	0,8(1)	1,7(2)	0,9(1)	—	1,0(1)	1,7(2)	0,8(1)	1,5(2)	1,3(1)	2,0(2)
His	3,4(4)	—	—	1,3(2)	0,4(1)	—	—	0,6(1)	—	—
Arg	3,0(3)	2,0(2)	—	2,5(3)	—	—	1,1(1)	—	0,9(1)	1,7(2)
Asp	5,1(5)	0,9(1)	1,7(2)	2,0(2)	—	1,0(1)	—	—	1,2(1)	2,2(2)
Thr	2,5(3)	—	1,2(1)	3,0(3)	—	—	0,8(1)	0,8(1)	1,3(2)	4,1(4)
Ser	0,8(1)	—	1,9(2)	3,2(4)	—	—	0,6(1)	0,7(1)	0,6(1)	2,1(2)
Glu	1,3(1)	3,0(3)	1,0(1)	2,4(3)	—	—	—	0,8(1)	1,7(2)	3,0(3)
Pro	1,0(1)	—	2,0(2)	1,0(1)	—	—	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)
Gly	2,6(3)	—	1,3(1)	3,3(3)	—	—	4,0(4)	1,0(1)	3,5(4)	5,1(5)
Ala	2,0(2)	1,7(2)	1,0(1)	6,0(6)	—	1,0(1)	2,2(2)	1,0(1)	3,6(4)	4,0(4)
1/2 Cys	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Val	3,0(3)	0,7(1)	—	1,5(2)	—	—	—	0,8(1)	0,6(1)	1,1(1)
Met	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,8(1)
Ile	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Leu	—	—	—	2,3(3)	—	2,0(2)	2,6(3)	1,7(2)	4,5(6)	5,0(7)
Tyr	—	—	0,4(1)	0,7(1)	—	—	0,9(1)	—	0,5(1)	0,4(1)
Phe	4,5(5)	—	—	2,0(2)	1,0(1)	—	—	1,0(1)	1,2(1)	2,1(2)
Trp	+(1)	—	—	+(1)	—	—	—	—	—	—
	33	11	12	36	3	6	15	13	26	37
N-конец	His	Arg	Gly	Arg	н.о.*	Lys	Gly	Gly	Ala	Thr

Аминокислота	Sp 11	Sp 12	Sp 13	Sp 14	Sp 15	Sp 16	Sp 17	Sp 18	Sp 19	Sp 20
Lys	2,0(2)	—	1,0(1)	1,0(1)	2,7(3)	—				1,2(1)
His	0,5(1)	—	—	—	—	0,6(1)				0,7(1)
Arg	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	—	—	1,0(1)			1,0(1)	
Asp	1,7(2)	0,9(1)	2,2(3)	1,4(2)	3,0(3)	4,5(5)	1,0(1)	0,9(1)	1,0(1)	
Thr	0,9(1)	1,7(2)	1,7(2)	1,7(2)	0,7(1)	—				0,6(1)
Ser	—	0,6(1)	1,0(1)	1,0(1)	—	—			3,2(4)	
Glu	2,2(2)	2,2(2)	3,5(4)	2,0(2)	2,6(3)	1,2(1)		1,0(1)	3,0(3)	2,0(2)
Pro	3,0(3)		1,0(1)	1,0(1)	—	1,0(1)			1,0(1)	1,0(1)
Gly	1,2(1)	2,0(2)	2,7(3)	1,1(1)	2,2(2)	1,5(2)			2,2(2)	
Ala	—	2,2(2)	1,0(1)	1,0(1)	2,2(2)	2,0(2)		0,8(1)		2,0(2)
1/2 Cys	—	—	—	—	—	—				
Val	2,8(3)	—	2,2(3)	1,0(1)	0,7(1)	—		1,1(1)		0,6(1)
Met	—	—	1,2(2)	1,2(2)	—	0,3(1)	1,0(1)			0,5(1)
Ile	1,5(2)	—	1,2(2)	—	1,1(1)	1,5(2)	1,0(1)		0,8(1)	1,2(2)
Leu	2,5(3)	3,7(5)	3,4(4)	2,5(3)	—	—				1,0(1)
Tyr	—	—	—	—	—	—				
Phe	2,0(2)	1,1(1)	2,4(3)	1,0(1)	0,9(1)	—		0,8(1)		
Trp	—	—	—	—	+(1)	—				
	23	17	31	18	18	16	3	5	13	13
N-конец	Val	Ser	Gly	Leu	н.о.	Ala	Met	Phe	Gln	Val

вания и лиофилизации разделяли высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге, применяя системы электролитов с pH 1,9 и 6,5 и растворителей для хроматографии, описанные ранее [3]. В результате всех этапов разделения было получено около 150 фракций, в которых проверяли наличие гомогенных пептидов N-концевым и аминокислотным анализом.

В итоге были получены 38 гомогенных пептидов (таблица), содержащих в сумме 578 остатков аминокислот, что составляет 83 % полипептидной цепи каталазы, насчитывающей 670 остатков аминокислот по данным рентгеноструктурного анализа [8].

Summary. 38 peptides containing 578 amino acid residues were isolated by gel-filtration, ion-exchange chromatography and paper highe-voltage electrophoresis and chromotagraphy.

Окончание табл.

Аминокислота	Sp 21	Sp 22	Sp 23	Sp 24	Sp 25	Sp 26	Sp 27	Sp 28	Sp 29
Lys									
His									
Arg	1,0(1)								
Asp	3,0(3)	3,0(3)		1,0(1)		1,4(2)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)
Thr					0,5(1)				
Ser	1,3(2)	1,7(2)				1,0(1)			1,4(2)
Glu	2,0(2)	1,1(1)	1,6(2)		2,0(2)	2,0(2)		0,9(1)	
Pro				1,0(1)			2,0(2)		
Gly			1,0(1)			0,8(1)			
Ala						0,8(1)		0,9(1)	
1/2 Cys									
Val			1,0(1)					1,0(1)	
Met	0,4(1)	0,9(1)					1,0(1)		0,5(1)
Ile	0,8(1)	1,0(1)			2,1(2)		1,0(1)		
Leu			1,0(1)	2,0(2)			1,0(1)		
Tyr									
Phe	1,1(1)	0,7(1)					0,8(1)		0,8(1)
Trp					+(1)				
	11	9	5	4	6	7	7	4	5
N-конец	Ile	Ile	Leu	Leu	н.о.	Gly	Met	Ala	Ser

Аминокислота	Sp 30	Sp 31	Sp 32	Sp 33	Sp 34	Sp 35	Sp 36	Sp 37	Sp 38
Lys					—	—	—	—	—
His					—	—	—	—	0,6(1)
Arg					—	—	1,0(1)	1,0(1)	3,9(4)
Asp	1,2(1)	1,0(1)	0,9(1)	4,6(5)	3,2(3)	—	—	2,0(2)	3,1(3)
Thr				0,9(1)	0,7(1)	1,0(1)	—	—	2,6(3)
Ser	0,8(1)		1,0(1)	2,5(3)	2,4(3)	—	—	1,0(1)	2,4(3)
Glu	1,0(1)	2,0(2)	2,0(2)	8,2(8)	4,0(4)	2,0(2)	2,6(3)	5,4(6)	1,0(1)
Pro				1,0(1)	1,0(1)	—	2,0(2)	2,0(2)	—
Gly				2,6(3)	1,2(1)	—	1,2(1)	2,2(2)	3,2(3)
Ala	1,0(1)			0,8(1)	1,0(1)	—	1,2(1)	2,0(2)	4,1(4)
1/2 Cys					—	—	—	—	—
Val	0,8(1)			2,0(2)	1,0(1)	—	—	1,3(2)	3,0(3)
Met		0,5(1)		1,0(1)	1,6(2)	—	—	—	—
Ile		0,6(1)	1,0(1)	2,0(2)	—	—	—	—	—
Leu	0,8(1)	1,0(1)	1,0(1)	2,3(3)	2,0(2)	—	—	2,3(3)	—
Tyr				0,6(1)	0,5(1)	—	—	1,0(1)	0,8(1)
Phe		1,0(1)	0,8(1)	1,4(2)	1,5(2)	—	1,2(1)	1,1(1)	2,8(3)
Trp				+(1)	+(1)	—	+(1)	+(1)	—
	6	7	7	34	23	3	10	24	29
N-конец	Leu	Ile	Asn	Gln	Leu	Thr	Ala	Ala	Arg

* н.о.— N-конец не определяется.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *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.
2. *Левитина Т. Л., Бобровская М. Т., Гусак Н. М. и др.* Триптические пептиды малеил-каталазы гриба *Penicillium vitale*. 2. Строение пептидов // Там же.— № 3.— С. 42—45.
3. *Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Роднин Н. В. и др.* Бромциановые фрагменты каталазы гриба *Penicillium vitale* // Там же.— 1989.— **5**, № 5.— С. 55—64.
4. *Гудкова Л. В., Кириленко М. Т., Левитина Т. Л., Козлов Э. А.* Исследование субъединичной структуры каталазы гриба *Penicillium vitale* // Укр. биохим. журн.— 1985.— **57**, № 4.— С. 29—33.
5. *Кавсан В. М., Мороз Л. В., Серебряный С. Б.* Приспособление для горизонтального электрофореза на бумаге упрощенной конструкции // Там же.— 1968.— **40**, № 1.— С. 104—106.
6. *Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Кацман М. С. и др.* Триптические фрагменты малеилированного белка тел включений вируса ядерного полиэдроза тутового шелко-

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 Pinicillium 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 PTH-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 (pH 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 PTH-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 (Tm54, Tm55, Tm56), выделенные, как описано ранее [1]. Строение коротких пептидов, содержащих до 15 остатков аминокислот, выясняли ручным методом секвенирования. N-концевую последовательность пептидов Tm2, Tm5, Tm26, Tm41 и Tm53 устанавливали с помощью секвенатора, строение пептида Tm53 — секвенированием смеси пептидов Tm52, Tm53 и Tm54, так как разделить их не удалось [1]. Поскольку пептид Tm54 получен в индивидуальном виде и его последовательность, как и пептида Tm52, не поддается деградации по Эдману, последовательность пептида Tm53 можно было легко выяснить с учетом того, что содержание его в смеси составляет около 60 %. Из состава N-концевой последовательности пептида Tm53 следует, что С-концевую часть его занимает пептид Tm34. Зная аминокислотный состав смеси и пептида Tm54, а также соотношение пептидов в смеси, нетрудно вычислить аминокислотный состав Tm52.

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