

order transition. The fraction of particles which are bound to the infinite cluster (precipitate) plays the role of the order parameter. The kinetics of an early stage of the agglutination reaction, previously studied, is in agreement with predictions of the dynamic scaling. It permits finding the fractal dimension of the bacterial clusters which has proved to be nontrivial, i. e. distinct from the dimension of the space. Magnitudes of the fractal dimension are compared to predictions of theoretical models.

1. *Кинетика иммунологической реакции агглютинации и экспрессное определение бактерий с помощью автоматизированного лазерного фотон-корреляционного спектрометра* / И. Г. Ерш, Л. С. Муратов, С. Ю. Новожилов и др. // Докл. АН СССР.— 1986.— 287, № 5.— С. 1239—1244.
2. *Шкловский Б. И., Эфрос А. Л.* Электронные свойства легированных полупроводников.— М.: Наука, 1979.— 416 с.
3. *Stanley H. A.* Cluster shapes at the percolation threshold: an effective cluster dimensionality and its connection with critical-point exponent // J. Phys. A: Math. and Gen.— 1977.— 10, N 11.— P. L211—L220.
4. *Эфрос А. Л.* Физика и геометрия беспорядка.— М.: Наука, 1982.— 176 с.
5. *Coniglio A., Stanley H. E., Klein W.* Solvent effects on polymer gels: a statistical-mechanical model // Phys. Rev. B— Solid State.— 1982.— 25, N 11.— P. 6805—6821.
6. *Frish H. L., Hamerley J. M., Welsh D. J. A.* Monte-Carlo estimates of percolation probabilities for various lattices // Phys. Rev.— 1962.— 126, N 3.— P. 949—951.
7. *Fractal geometry of colloidal aggregates* / D. W. Schaefer, J. E. Martin, P. Wiltzius, D. S. Cannel // Phys. Rev. Lett.— 1984.— 52, N 26.— P. 2371—2375.
8. *Botet R., Jullien R.* Size distribution of clusters in irreversible kinetic aggregation // J. Phys. A: Math. and Gen.— 1984.— 17, N 12.— P. 2517—2530.
9. *Feder J., Joessang T., Rosenqvist E.* Scaling behaviour and cluster fractal dimension determined by light scattering from aggregating proteins // Phys. Rev. Lett.— 1984.— 53, N 15.— P. 1403—1405.
10. *Meakin P., Chen Z.-Y., Deutch J. M.* The translational friction coefficient and time dependent cluster size distribution of three dimensional cluster-cluster aggregation // J. Chem. Phys.— 1985.— 82, N 8.— P. 3786—3789.
11. *Meakin P.* The effects of random bond breakings on diffusion limited cluster-cluster aggregation // Ibid.— 83, N 7.— P. 3645—3649.
12. *Isaacson J., Lubensky T. S.* Flory exponents for generalised polymer problems // J. Phys. Paris Lett.— 1980.— 41, N 3.— P. L469—L472.

Ин-т автоматки и электромстрии
Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск
Новосиб. гос. ун-т

Получено 26.06.86

УДК 577.112

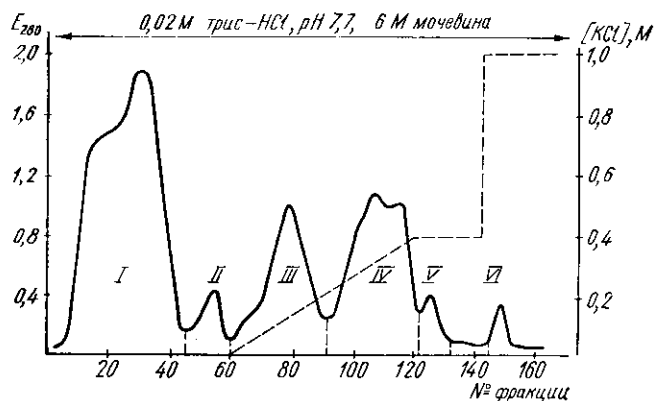
ТРИПТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ КАТАЛАЗЫ ГРИБА *PENICILLIUM VITALE*. 2. РАЗДЕЛЕНИЕ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ НЕРАСТВОРИМЫХ ПЕПТИДОВ

**М. Т. Киряченко, Т. Л. Левитина,
Л. В. Гудкова, Р. Г. Дегтярь, Э. А. Козлов**

В предыдущем сообщении описано выделение и приведены аминокислотные составы растворимых триптических пептидов каталазы *P. vitale* [1]. Из растворимой фракции триптического гидролизата каталазы было получено 54 пептида, насчитывающих 487 остатков аминокислот. Каталаза *P. vitale* содержит около 650 аминокислотных остатков [2]. Нерастворимая фракция составила 60 % всего триптического гидролизата [1]. Можно было ожидать, что в ней содержатся, кроме недостающих пептидов с уникальной аминокислотной последовательностью, крупные фрагменты с перекрывающимися последовательностями.

Настоящее сообщение посвящено выделению пептидов из нерастворимой фракции триптического гидролизата каталазы *P. vitale*.

Материалы и методы. Получение нерастворимой при pH 5,0 фракции (Тн) триптического гидролизата описано в сообщении [1]. Фракцию Тн растворяли в трис-НСl-буфере, pH 7,7, содержащем 6 М мочевины, и хроматографировали на ДЭАЭ-сефадексе А25 («Pharmacia», Швеция) в градиенте концентрации КСl. Для создания линейного градиента через смеситель, заполненный 150 мл вышеуказанного буфера, пропускали 150 мл того же раствора, содержащего 0,4 М КСl. Материал полученных при этом фракций разделяли далее высоковольтным электрофорезом на бумаге в электролитах ЭФ1 и ЭФ2, состав которых описан нами ранее [1]. Условия электрофореза приведены в этой же работе. Применяли бумагу FN 17 («Filtrak», ГДР).



Разделение ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А25 в градиенте концентрации КСl нерастворимых при pH 5,0 триптических пептидов каталазы *P. vitale*. Колонка 1,4×18 см. Скорость элюции 15 мл/ч. Объем фракции 5 мл

DEAE-Sephadex A25 ion-exchange chromatography of insoluble at pH 5.0 tryptic peptides of *P. vitale* catalase in linear gradient of KCl concentration. The column — 1.4×18 cm. Flow rate — 15 ml/h. Fraction volume — 5 ml

N-концевые аминокислотные остатки в пептидах определяли дансил-методом [3]. Дансил-производные аминокислот идентифицировали на пластинках с тонким слоем полиамида [4]. Аминокислотный состав определяли на анализаторе аминокислот ААА-331 (ЧССР). Пробы гидролизовали 5,7 н. НСl, содержащей 0,1 % фенола, в течение 24 ч при 105—110 °С в вакууме. Триптофан определяли реакцией Эрлиха [5].

Результаты и обсуждение. В результате разделения на ДЭАЭ-сефадексе фракции Тн триптического гидролизата каталазы получено шесть пиков (рисунок). Высоковольтным электрофорезом (в электролитах ЭФ1 и ЭФ2) из материала пика I было получено три фрагмента — Тн1—Тн3; из пика II (в электролите ЭФ1) — два фрагмента — Тн4 и Тн5; из пиков III и IV (в электролите ЭФ1) — по одному фрагменту соответственно Тн6 и Тн7. Пики V и VI не содержали пептидного материала. Аминокислотный состав полученных фрагментов представлен в табл. 1.

Семь фрагментов из нерастворимой фракции триптического гидролизата каталазы содержат 223 остатка аминокислот. Всего из триптического гидролизата каталазы *P. vitale* получили 61 пептид, из них 54 выделено из растворимой фракции [1]. Учитывая аминокислотный состав всех пептидов, можно утверждать, что трипсин расщепил каталазу, главным образом, по специфическим для него связям. Три пептида (Т8, Т10, Тн4) не содержат остатков лизина и аргинина. Один из этих пептидов может быть С-концевым. Два других образовались за счет расщепления неспецифических для трипсина связей. Число специфических для трипсина пептидов, выделенных нами из растворимой и нерастворимой фракций триптического гидролизата каталазы, приблизительно соответствует числу пептидов на пептидной карте и содержанию остатков лизина и аргинина в белке [2].

В табл. 2 сравнивается аминокислотный состав каталазы *P. vitale* [2] с суммированным аминокислотным составом триптических пепти-

дов и фрагментов. Сумма аминокислотных составов всех триптических пептидов и фрагментов равна 709. Это на 50 остатков больше аминокислотного состава белка. Сравнение аминокислотных составов пептидов Тн1 и Тн2 дает основание полагать, что аминокислотные последовательности этих пептидов перекрываются. Среди остальных пептидов, приведенных в этой статье и в работе [1], трудно определить возможность перекрывания последовательностей по данным только аминокислотного состава. Поэтому из суммы аминокислотного состава всех триптических пептидов можно вычесть состав фрагмента Тн2. Полученное число (678 остатков, табл. 2) только на 19 остатков больше аминокислотного состава каталазы. Значительное расхождение по отдельным аминокислотам наблюдается в содержании серина, аланина, аргинина, тирозина и триптофана. Мы не исключаем возможности перекрывания или потери нескольких коротких последовательностей. В основном можно полагать, что аминокислотные последовательности полученных пептидов и фрагментов перекрывают аминокислотную последовательность полипептидной цепи каталазы.

Авторы работы [6] показали, что у каталаз из печени и эритроцитов быка, а также из эритроцитов человека [7] наблюдаются 42 замены на 506 аминокислотных остатков. Каталаза *P. vitale* содержит по сравнению с каталазами быка и человека дополнительно около 150 остатков с С-конца [8]. Исходя из рентгеноструктурного анализа препаратов белка, выделенных из печени быка [9] и *P. vitale* [8, 10], можно было предположить, что N-концевая часть (~500 остатков) каталазы *P. vitale* и фермента из печени быка в высокой степени гомологичны. Если бы степень гомологии сравниваемых аминокислотных последовательностей была столь же высока, как, например, у каталаз быка и человека (свыше 90 %), то можно было бы ожидать наличия у каталазы *P. vitale* большого числа триптических пептидов, идентичных или очень сходных по составу с триптическими пептидами каталаз быка и человека. Однако среди пептидов каталазы *P. vitale* мы нашли только четыре коротких пептида (His, Arg; Glu, Lys; Ala, Leu, Lys; Glu, Pro, Val, Arg), сходных по составу с пептидами каталазы печени

Т а б л и ц а 1

Аминокислотный состав нерастворимых при pH 5,0 триптических пептидов каталазы *P. vitale*

The amino acid composition of insoluble at pH 5,0 tryptic peptides of P. vitale catalase

Аминокислота	Тн1	Тн2	Тн3	Тн4	Тн5	Тн6	Тн7
Lys	1,1(1)	1,7(2)	0,9(1)	—	—	0,9(1)	—
His	1,0(1)	1,0(1)	—	1,0(1)	—	2,0(2)	—
Arg	1,9(2)	1,0(1)	0,9(1)	—	1,0(1)	1,1(1)	2,0(2)
Asp	4,1(4)	3,2(3)	1,3(1)	3,3(3)	2,3(2)	9,0(9)	5,1(5)
Thr	2,0(2)	1,7(2)	3,1(3)	1,2(1)	0,8(1)	3,7(4)	0,8(1)
Ser	3,1(3)	1,9(2)	2,2(2)	1,0(1)	0,7(1)	2,0(2)	2,1(2)
Glu	4,2(4)	3,8(4)	2,6(3)	2,1(2)	3,0(3)	4,1(4)	10,8(11)
Pro	2,0(2)	2,3(2)	—	1,0(1)	—	3,3(3)	3,3(3)
Gly	2,0(2)	1,7(2)	2,7(3)	1,0(1)	2,2(2)	2,1(2)	2,0(2)
Ala	3,8(4)	2,8(3)	3,2(3)	2,1(2)	0,8(1)	4,6(5)	1,6(2)
1/2 Cys	—	—	—	—	—	—	—
Val	4,1(4)	1,7(2)	1,7(2)	0,8(1)	0,8(1)	1,9(2)	2,5(3)
Met	—	—	—	—	—	0,5(1)	0,8(1)
Ile	1,7(2)	1,3(2)	0,9(1)	1,8(2)	0,7(1)	4,5(5)	1,8(2)
Leu	3,1(3)	2,2(2)	2,0(2)	1,2(1)	1,6(2)	3,7(4)	4,9(5)
Tyr	0,8(1)	1,0(1)	1,1(1)	—	—	0,8(1)	1,0(1)
Phe	2,0(2)	1,8(2)	2,6(3)	1,6(2)	1,1(1)	5,0(5)	3,2(3)
Trp	—	—	—	—	—	+ (1)	—
Всего	37	31	26	18	16	52	43
N-конец	Leu	Leu	—	—	—	Phe	Phe

Примечание. N-конец для фрагментов Тн3—Тн5 дансил-методом не определяется.

Таблица 2

Сравнение аминокислотного состава каталазы *P. vitale* с суммированным составом триптических пептидовThe comparison of *P. vitale* catalase amino acid composition with tryptic peptides summarised one

Аминокислота	Белок	Пептиды	Аминокислота	Белок	Пептиды
Lys	30	31	Ala	74	66
His	13	13	1/2Cys	2	—
Arg	30	34	Val	43	47
Asp	73	80	Met	10	10
Thr	39	44	Ile	25	24
Ser	31	45	Leu	49	52
Glu	80	74	Tyr	16	11
Pro	30	37	Phe	44	48
Gly	61	57	Trp	9	5
			Всего	659	678

быка (His, Arg; Glu, Arg; Ala, Val, Lys; Glu, Pro, Ile, Arg [6]). В остальных пептидах мы не обнаружили явного сходства. На этом основании мы предполагаем, что N-концевая часть (остатки 1—506) каталазы *P. vitale* и каталаза печени быка не являются в высокой степени гомологичными, как это можно было предположить из данных рентгеноструктурных исследований [8—10]. Выяснение аминокислотной последовательности триптических пептидов позволит с большей точностью оценить степень гомологии этих каталаз.

TRYPTIC PEPTIDES OF *PENICILLIUM VITALE* CATALASE.

2. ISOLATION AND AMINO ACID COMPOSITION OF UNSOLUBLE PEPTIDES

M. T. Kirilenko, T. L. Levitina, L. V. Gudkova, R. G. Degtiar, E. A. Kozlov

Institute of Molecular Biology and Genetics,

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Seven peptides containing 223 amino acid residues were isolated from insoluble at pH 5.0 fraction of tryptic digest of *P. vitale* catalase by ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A25 column and high-voltage paper electrophoresis.

1. Триптические пептиды гриба каталазы *Penicillium vitale*. 1. Разделение и аминокислотный состав растворимых пептидов / Э. А. Козлов, М. Т. Кириленко, Т. Л. Левитина и др. // Биополимеры и клетка.— 1987.— 3, № 5.— С. 240—245.
2. Исследование субъединичной структуры каталазы *Penicillium vitale* / Л. В. Гудкова, М. Т. Кириленко, Т. Л. Левитина, Э. А. Козлов // Укр. биохим. журн.— 1985.— 57, № 4.— С. 29—33.
3. Gray W. R. Sequence degradation plus dansilation // Meth. Enzymol.— 1967.— 11.— P. 469—475.
4. Хроматография в тонких слоях полиамида / П. Д. Решетов, Г. Г. Честухина, С. Махмудов, А. С. Пышкин // Химия природ. соединений.— 1971.— № 1.— С. 66—88.
5. Eastly C. W. Combination of specific colour reactions useful in the peptide mapping techniques // Biochim. et biophys. acta.— 1969.— 107, N 2.— P. 386—388.
6. The complete amino acid sequence of bovine liver catalase and the partial sequence of bovine erythrocyte catalase / W. A. Schroeder, J. R. Shelton, J. B. Shelton et al. // Arch. Biochem. and Biophys.— 1982.— 214, N 1.— P. 397—421.
7. The partial amino acid sequence of human erythrocyte catalase / W. A. Schroeder, J. R. Shelton, J. B. Shelton et al. // Ibid.— P. 422—424.
8. Структура каталазы *Penicillium vitale* / Б. К. Вайнштейн, В. Р. Мелик-Адамян, В. В. Барынин и др. // Кристаллография.— 1981.— 26, № 5.— С. 1003—1028.
9. Structure of beet liver catalase / M. R. Murthy, T. J. Reid, A. Sicignano et al. // J. Mol. Biol.— 1981.— 152, N 2.— P. 465—499.
10. Three-dimensional structure of the enzyme catalase / B. K. Vainshtein, W. R. Melik-Adamyani, V. V. Barynin et al. // Nature.— 1981.— 293, N 5831.— P. 411—412.

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

Получено 27.02.86