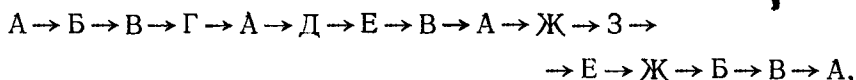


гурах. Аминокислоты вымываются в определенной последовательности. Небольшие порции элюата одинакового объема собирают автоматически в пробирки при помощи коллектора. Каждую фракцию смешивают с дающим окраску реагентом (нингидрин), нагревают в стандартных условиях и определяют на фотометре интенсивность окраски. Проводят калибровку для каждой аминокислоты, учитывающую зависимость поглощения света от концентрации. Площадь каждого «пика» отвечает количеству данной аминокислоты в гидролизате (рис. 2.3) [11]. Вся процедура сейчас автоматизирована и установление аминокислотного состава белка не составляет проблемы.

## § 2.5. ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ

Последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи называется ее *первичной структурой*. Определение первичной структуры производится путем частичного гидролиза белка с помощью специфических протеаз, катализирующих расщепление пептидной связи лишь между определенными остатками. Так, трипсин атакует лишь те пептидные связи, которые образованы СО-группами остатков основных аминокислот — Арг или Лиз. В результате образуется смесь коротких полипептидных цепей, *олигомеров*. Такие короткие цепи называются *пептидами*. Их исследование производится посредством химических и физико-химических методов (хроматография, масс-спектроскопия). Воздействуя другим ферментом, можно «разрезать» белок по другим связям, получить смесь других пептидов. N- и С-концевые остатки белка (см. стр. 68) определяются в результате их химической модификации, предшествующей частичному гидролизу. Зная строение пептидов, полученных при специфическом расщеплении различными ферментами, можно установить первичную структуру белка. Допустим, что белковая цепь имеет структуру



где буквами обозначены остатки, стрелками — пептидные связи —NH—СО—. Подействуем на белок ферментом, разрывающим связь группы СО с остатком А. Получим пептиды  $A, B \rightarrow V \rightarrow G \rightarrow A, D \rightarrow E \rightarrow V \rightarrow A, Ж \rightarrow З \rightarrow E \rightarrow Ж \rightarrow Б \rightarrow В \rightarrow A$ . Подействуем на белок другим ферментом, разрывающим связи с остатками Г и Е. Получим  $A \rightarrow Б \rightarrow В \rightarrow Г, A \rightarrow Д \rightarrow Е, В \rightarrow А \rightarrow Ж \rightarrow З \rightarrow Е, Ж \rightarrow Б \rightarrow В \rightarrow А$ . Последовательность пептидов нам неизвестна, но она легко устанавливается, так как

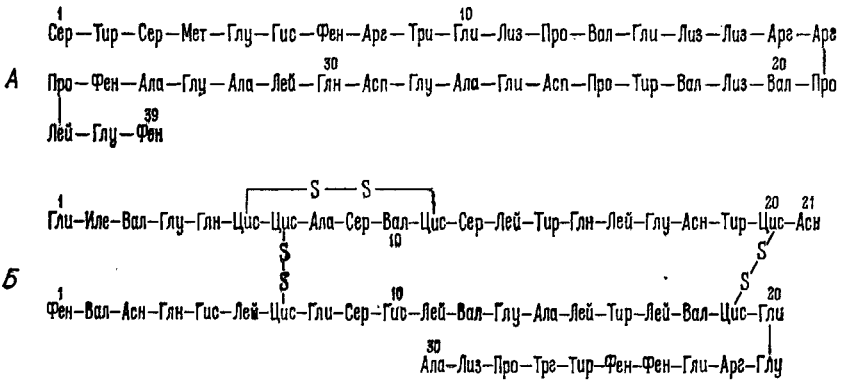


Рис. 2.4. Первичная структура β-кортикотропина свиньи (А) и инсулина быка (Б).

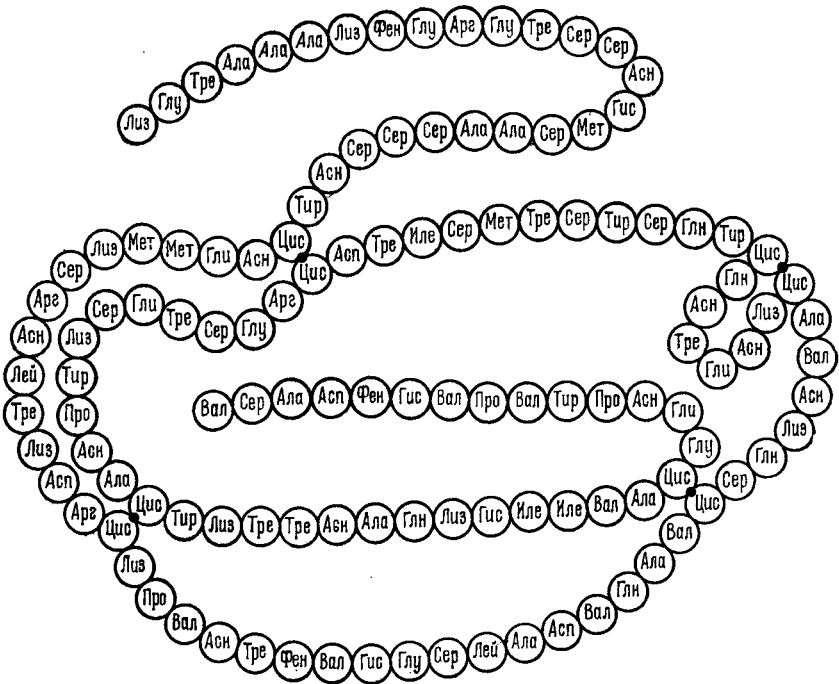


Рис. 2.5, Первичная структура рибонуклеазы быка.

их можно скомбинировать лишь одним единственным способом [2]:

А Б → В → Г → А, Д → Е → В → А, Ж → З → Е → Ж → Б → В → А,  
А → Б → В → Г А → Д → Е В → А → Ж → З → Е Ж → Б → В → А.

С помощью этого метода Сэнгер впервые определил структуру инсулина [12]. В дальнейшем была установлена первичная

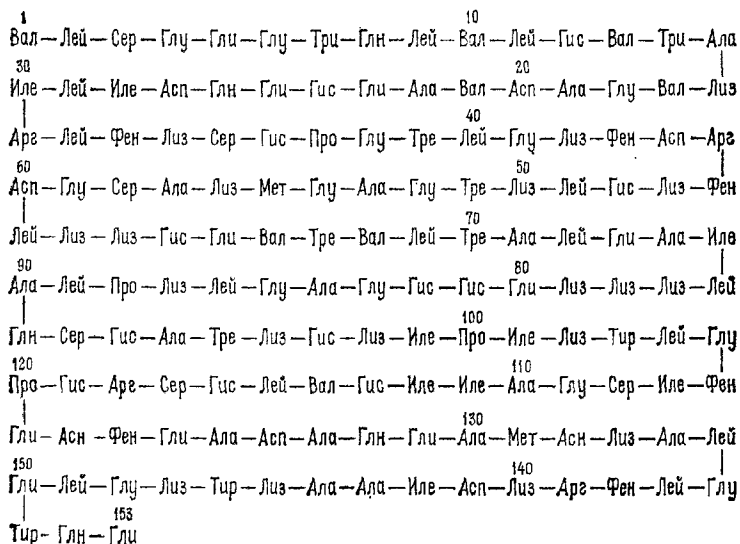


Рис. 2.6. Первичная структура миоглобина.

структура большого числа белковых цепей. Отметим определение одной из длинейших последовательностей — звеньев аспаратаминотрансферазы [66]. Сводка таких данных, полученных до 1968 г., приведена в атласе [13].

Каждая белковая цепь имеет определенную первичную структуру, и в этом смысле есть текст, написанный двадцатипушквенным алфавитом. Выше приведены первичные структуры двух пептидных гормонов — кортикотропина и инсулина (рис. 2.4) — и белков — рибонуклеазы (рис. 2.5) и миоглобина (рис. 2.6). Белковый текст содержит определенную информацию. Оценим ее количество. На каждом месте находится один из 20 возможных остатков. Количество информации в цепи из  $N$  остатков (в предположении об их равновероятности) составляет

$$I = N \log_2 20 = N \cdot 4,32 \text{ бит.}$$

В действительности  $I$  меньше, так как частоты появления разных остатков неодинаковы. Вместе с тем анализ последовательностей в белках и их фрагментах показал, что между соседними остатками в дипептидах нет значимой корреляции [14]. Вопрос о корреляции на больших расстояниях между остатками нельзя считать решенным.

Первичная структура белка имеет, как уже сказано, определенное значение для его функции. Это подтверждается прежде всего двумя группами фактов. Во-первых, различиями и сходством структур однотипных белков разных видов и, во-вторых, патологическими изменениями функций белков при замещениях (мутационных) аминокислотных остатков.

В работах Марголиаша и сотрудников (см. [15, 16]) проведено сопоставление цитохромов  $c$ , гемоглобинов и других белков различных видов. В табл. 2.3 приведены данные, относящиеся к цитохромам  $c$ . Функция цитохрома — участие в окислительном фосфорилировании — во всех разнородных организмах одна и та же. Вариации в первичной структуре характеризуют вид животного и являются его однозначным и ярким выражением. Сравнительное исследование первичных структур позволяет проследить за ходом биологической эволюции.

Мутации выражаются в изменении первичной структуры белков, в замещении аминокислотных остатков, т. е. в искажениях белкового текста. «Опечатка» в белковом тексте всегда имеет серьезные биологические последствия. Эти явления детально изучены на гемоглобине.

Известен ряд наследственных заболеваний крови — анемий. При так называемой серповидноклеточной анемии, распространенной в некоторых районах Африки, Юго-Восточной Азии, Средиземноморья, эритроциты имеют форму серпов. В этом случае гемоглобин (S-гемоглобин, в отличие от нормального А-гемоглобина) имеет кристаллоподобную структуру, эритроциты слипаются и подвергаются гемолизу — распаду. Тяжелые нарушения кровообращения, вызванные этим заболеванием, зачастую приводят к смерти в раннем возрасте. Средиземноморская анемия (Т-гемоглобин) выражается в распаде эритроцитов, малокровии, компенсаторном разрастании кроветворной ткани костного мозга, вызывающем скелетные деформации, в увеличении печени и селезенки. Другие анемии также весьма опасны. Эти заболевания наследуются рецессивно в соответствии с законом Менделя. Иными словами, анемия резко проявляется у гомозиготных, но не у гетерозиготных особей. Поддержание высокого уровня SA-гетерозигот в названных районах оказалось связанным с распространением в них малярии. Малярия является в этих районах одной из главных причин смертности. SA-гетерозиготы

Таблица 2.3

Первичная структура цитохрома с

*Лошадь*

Ацетил — Гли — Асп — Вал — Глу — Лиз — Гли — Лиз — Лиз —  
 — Иле — Фен — Вал — Гли — Лиз — Цис — Ала — Гли — Цис —  
 — Гис — Тре — Вал — Гли — Лиз — Гли — Гли — Лиз — Гис — Лиз —  
 — Тре — Гли — Про — Асп — Лей — Гис — Гли — Лей — Фен — Гли —  
 — Арг — Лиз — Тре — Гли — Гли — Ала — Про — Гли — Фен — Тре —  
 — Тир — Тре — Асп — Ала — Асп — Лиз — Асп — Лиз — Гли — Иле —  
 — Тре — Три — Лиз — Глу — Глу — Тре — Лей — Мет — Глу — Тир —  
 — Лей — Глу — Асп — Про — Лиз — Лиз — Тир — Иле — Про — Глу —  
 — Тре — Лиз — Мет — Иле — Фен — Ала — Гли — Иле — Лиз — Лиз —  
 — Лиз — Тре — Глу — Арг — Глу — Асп — Лей — Иле — Ала — Тир —  
 — Лей — Лиз — Лиз — Ала — Тре — Асп — Глу — СООН

1  
5  
10 15  
20 25  
30 35  
40 45  
50 55  
60 65  
70 75  
80 85  
90 95  
100 104

Отличия от цитохрома с лошади

*Свинья*

*и корова*

(3 отличия)

47 Сер 60 Гли 89 Гли

*Кенгуру*

(6 отличий)

33 Асп 35 Иле 58 Иле 60 Гли 62 Асп 89 Гли

*Человек*

(11 отличий)

11 Иле 12 Мет 15 Сер 46 Тир 47 Сер 58 Иле 60 Гли 62 Асп 83 Вал 89 Гли 92 Ала

*Курица*

(11 отличий)

3 Иле 15 Сер 44 Глу 47 Сер 60 Гли 62 Асп 89 Сер 92 Вал 100 Асп 103 Сер 104 Лиз

*Тунец*

(19 отличий)

4 Ала 9 Тре 22 Асп 28 Вал 33 Три 44 Глу 47 Сер 54 Сер 58 Вал 60 Асп 61 Асп 62 Асп 89 Гли 92 Гли 95 Вал 100 Сер 103 Сер; отсутствует остаток 104

*Бабочка*

(24 отличия)

Дополнительная последовательность — 4 до — 1 Гли Вал Про Ала

2 Асп 3 Ала 5 Асп 13 Арг 22 Ала 28 Вал 54 Ала 60 Гли 61 Асп 62 Асп 65 Фен 82 Вал 85 Лей 88 Ала 89 Асп 92 Ала 100 Глу 101 Сер 104 Лиз — СООН; отсутствует остаток 103

*Дрожжи*

(46 отличий)

Дополнительная последовательность — 5 до — 1 Тре Глу Фен Лиз Ала

2 Сер 3 Ала 4 Лиз 7 Ала 8 Тре 9 Лей 11 Лиз 12 Тре 13 Арг 15 Глу 16 Лей 25 Про 28 Вал 35 Иле 39 Гис 40 Сер 44 Гли 46 Тир 47 Сер 53 Иле 54 Лиз 56 Асп 57 Вал 58 Лей 60 Асп 62 Асп 63 Асп 64 Мет 65 Сер 69 Тре 81 Ала 83 Гли 85 Лей; 88 Глу 89 Лиз 90 Асп 92 Асп 96 Тре 103 Цис — SH 104 Глу — СООН отсутствует остаток 102.

более устойчивы к малярии, так как плазмодий малярийного комара хуже размножается в их крови.

Полинг и его сотрудники [17] обнаружили различия подвижности S- и A-гемоглобинов при электрофорезе, что объясняется различием в аминокислотном составе и, тем самым, в числе заряженных групп. Полинг определил болезни гемоглобина как молекулярные. Действительно, Ингрэм [18] показал, что отличие аномальных гемоглобинов от нормального определяется замещением всего лишь одного остатка в белковой цепи, — ведь смысл текста существенно меняется при замене одной «буквы». В табл. 2.4 указаны некоторые патогенные замещения в гемоглобине человека [13, 19]. Сейчас известно около 100 мутантных гемоглобинов человека.

Таблица 2.4

Мутационные замещения в гемоглобине человека

α-цепь				β-цепь			
Тип гемоглобина	Номер остатка	Замещающий остаток	Замещаемый остаток	Тип гемоглобина	Номер остатка	Замещающий остаток	Замещаемый остаток
J Торонто	5	Ала	Асп	S	6	Глу	Вал
J Тексас	16	Лиз	Глу	C	6	Глу	Лиз
G Аудхалн	23	Глу	Вал	G Сан Хосе	7	Глу	Гли
G Гонулуду	30	Глу	Гли	E	26	Глу	Лиз
Норфолк	57	Гли	Асп	K Ибадаи	46	Гли	Глу
M Бостон	58	Гис	Тир	J Бангкок	56	Гли	Асп
G Филадельфия	68	Асп	Лиз	M Саскатун	63	Гис	Тир
M Шибата	87	Гис	Тир	Цюрих	63	Гис	Арг
J Кейптаун	92	Арг	Глу	M Милвоки	67	Вал	Глу
J Чипсейк	92	Арг	Лей	Нью-Йорк	113	Вал	Глу
J Тонгарики	115	Ала	Асп	D Пенджаб	121	Глу	Гли
O Индонезия	116	Глу	Лиз	O Аравия	121	Глу	Лиз

**Химия располагает методами** синтеза пептидной связи, т. е. линейной шивки аминокислот (см. [20]). Эти методы, не имеющие ничего общего со способом синтеза белка в живой клетке (см. ниже гл. 9), обычно применяются для получения полиаминокислот — гомополимеров аминокислот, сходных с белками. Однако если первичная структура белка известна, то осуществим его химический синтез *in vitro*. Так были синтезированы белковые гормоны кортикотропин и инсулин. Меррифилд автоматизировал метод синтеза и впервые получил настоящий искусственный белок, обладающий ферментативной функцией, — рибонуклеазу [21].