



УДК 577.1 + 547.96

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ АДРЕНОДОКСИНА  
ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ СВИНЬИ

Ахрем А. А., Лапко А. Г., Лапко В. Н.,  
Морозова Л. А., Репин В. А., Тищенко И. В.,  
Чащин В. Л.

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Изучена аминокислотная последовательность адrenoдоксина, выделенного из митохондрий коры надпочечников свиньи. Адrenoдоксин совместно с адrenoдоксинредуктазой составляет цитохром Р-450-редуктазный комплекс, отвечающий за транспорт электронов в митохондриальных стероидгидроксилирующих системах. Для изучения полной аминокислотной последовательности адrenoдоксина предварительно карбоксиметилированный препарат белка расщепляли трипсином и химотрипсином, а в случае больших пептидов — термолизином и бромцианом. Полученные результаты позволили реконструировать полипептидную цепь адrenoдоксина, состоящую из 117 аминокислот.

Адrenoдоксин — негеминовый железосеросодержащий белок совместно с NADPH-зависимой флавопротеинредуктазой (адrenoдоксинредуктазой) составляет цитохром-Р-450-редуктазный комплекс, необходимый для стероидгидроксилирующих систем митохондрий коры надпочечников.

В цитохром-Р-450-редуктазном комплексе митохондриальных стероидгидроксилирующих систем адrenoдоксин может быть заменен белком подобного типа, выделенным только из стероидсинтезирующих органов [1]. Ферридоксин, выделенные из других источников, например путидаредоксин из *Pseudomonas putida*, не могут заменять адrenoдоксин в реакциях гидроксилирования стероидов. Подобная необмениваемость белков в гидроксилирующих системах должна, по-видимому, объясняться специфической связью между адrenoдоксинредуктазой и адrenoдоксином, с одной стороны, и между адrenoдоксином и цитохромом Р-450 — с другой. Действительно, нами недавно была показана необходимость самосборки для процесса гидроксилирования отдельных компонентов митохондриальной стероидгидроксилирующей системы — адrenoдоксина, адrenoдоксинредуктазы и цитохрома Р-450 — в единый ферментный ансамбль. Полученные при этом результаты позволили выдвинуть предположение о различиях для адrenoдоксинредуктазы и цитохрома Р-450 участках связывания с молекулой адrenoдоксина. Высокоспецифическое связывание этих белков, по-видимому, объясняет и тот факт, что, несмотря на отдельные аналогичные участки аминокислотной последовательности в полипептидных цепях адrenoдоксина из митохондрий коры надпочечников быка и путидаредоксина из *Pseudomonas putida*, последний не способен заменять адrenoдоксин в стероидгидроксилирующих системах [2].

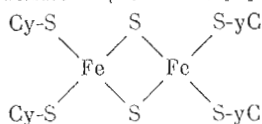
Выше отмечалось, что адrenoдоксин является железосеросодержащим белком, при этом железосеросодержащий кластер связан с молекулой бел-

Таблица 1

## Аминокислотный состав свиного и бычьего адренодоксина

Аминокислота	Свиной адренодоксин	Бычий адренодоксин	Аминокислота	Свиной адренодоксин	Бычий адренодоксин
Asp	18	18	Pe	8	8
Thr	10	10	Leu	12	12
Ser	7	7	Tyr	1	1
Glu	12	11	Phe	4	4
Pro	1	1	His	3	3
Gly	8	8	Lys	5	5
Ala	8	7	Arg	5	4
Cys	5	5	Trp	0	0
Val	7	7	Число	117	114
Met	3	3	остатков		

ка посредством четырех остатков цистеина [3]:



В молекуле путидаредоксина во взаимодействие железосеросодержащего кластера с молекулой белка вовлечены также четыре остатка цистеина. Однако суммарное количество остатков цистеина в молекуле адренодоксина и путидаредоксина составляет 5 и 6 остатков соответственно. Возможность различных вариантов локализации железосеросодержащего кластера в молекулах этих белков также, очевидно, может приводить к их необмениваемости в гидроксигирующих системах.

Для более детального выяснения влияния аминокислотной последовательности этих белков на структурную организацию стероидгидроксилирующих систем нами была проведена работа по изучению полной аминокислотной последовательности адренодоксина из митохондрий коры надпочечников свиньи. Несмотря на полную взаимозаменяемость бычьего и свиного адренодоксина в цитохром-Р-450-редуктазном комплексе (соответствующие значения констант и начальные скорости восстановления цитохрома Р-450 идентичны), аминокислотные составы этих белков различаются (см. табл. 1). Следует отметить, что эти различия связаны не только с заменой одних аминокислотных остатков на другие, но и с большим числом аминокислот, входящих в полипептидную цепь свиного адренодоксина по сравнению с бычьим (117 и 114 аминокислот соответственно).

Адренодоксин из митохондрий коры надпочечников свиньи выделяли по методике, предложенной для адренодоксина из митохондрий коры надпочечников быка [4]. Перед структурным анализом адренодоксина проводилось восстановление меркаптоэтанолом связей остатков цистеина с железосеросодержащим кластером и карбоксиметилирование. Последующий диск-электрофорез и N-концевой анализ карбоксиметилированного адренодоксина (СМ-Ад) показал наличие незначительной примеси белковой природы в препарате СМ-Ад. Дополнительная хроматография препарата СМ-Ад на целлюлозе ДЕ-32 с применением линейного градиента КСI в 0,01 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,4) позволила получить гомогенный СМ-Ад. Аминокислотный анализ СМ-Ад показал, что карбоксиметилирование прошло количественно.

N-Концевая аминокислотная последовательность СМ-Ад, определенная деградацией по методу Эдмана с идентификацией фенилтиогидантоиновых производных, оказалась следующей: Ser-Ser-Ser-Glu-Asp-Lys-Ile. Применение карбоксипептидазы А позволило установить C-концевую аминокислоту — Ser.

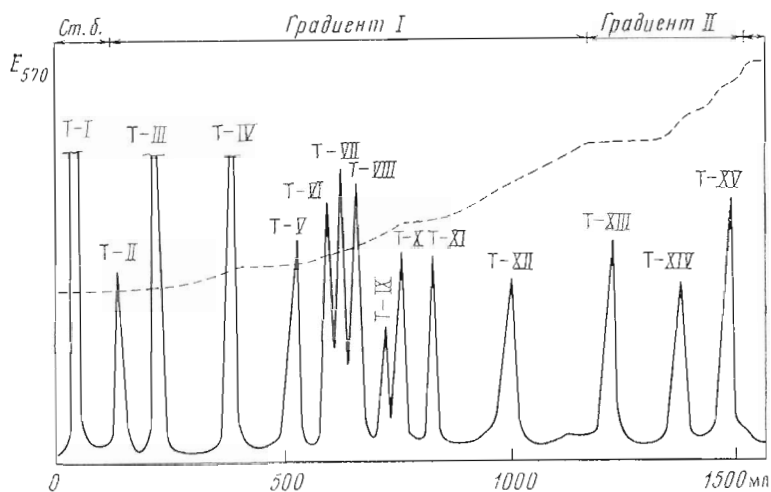


Рис. 1. Разделение растворимых пептидов триптического гидролиза СМ-Ад на колонке со смолой Аминекс 50W × 4

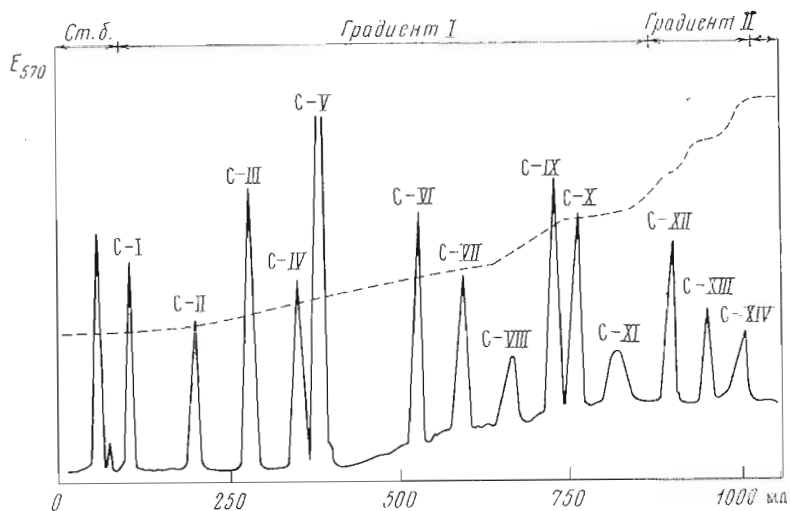


Рис. 2. Разделение растворимых пептидов химотриптического гидролиза СМ-Ад на колонке со смолой Аминекс 50W × 4

Первоначально было предпринято расщепление СМ-Ад трипсином. Подкисление триптического гидролизата привело к образованию нерастворимых в этих условиях продуктов триптического гидролиза (изучение строения нерастворимых продуктов см. ниже). Фракционирование растворимых пептидов триптического гидролиза СМ-Ад на катионите Аминекс 50W × 4 (20—30 мк) привело к получению 15 объединенных фракций (рис. 1). Аналитическая хроматография в тонком слое целлюлозы MN-300 показала, что все упомянутые выше фракции представляли собой индивидуальные пептиды. Таким образом, из растворимой части продуктов триптического гидролиза СМ-Ад было выделено 15 различных пептидов, аминокислотный состав которых приведен в табл. 2.

Аминокислотная последовательность этих пептидов (табл. 3) определена по методу Эдмана с идентификацией аминокислотных остатков в виде их фенилтиогидантоиновых производных. Однако в случае триптического пептида Т-II удалось определить последовательность лишь 13 из 21 аминокислотного остатка, входящего в состав данного пептида. Опре-

## Аминокислотный состав растворимых пептидов триглицерического гидролиза СМ-АД

Аминокислота	Пептид														
	Т-I	Т-II	Т-III	Т-IV	Т-V	Т-VI	Т-VII	Т-VIII	Т-IX	Т-X	Т-XI	Т-XII	Т-XIII	Т-XIV	Т-XV
Cys (Cm)															
Asp	4,4(4)	5,2(5)		1,8(2)	1,0(1)	1,0(1)	2,8(3)	1,1(1)	1,2(1)	2,2(2)	1,0(1)	1,1(1)		1,1(1)	1,0(1)
Thr	1,0(1)	1,9(2)		0,2(0)	0,9(1)				1,4(1)	0,9(1)		1,0(1)			1,0(1)
Ser		0,2(0)	1,0(1)			2,8(3)			1,4(1)				0,9(1)		
Glu	3,0(3)	3,2(3)	1,0(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)						
Pro															
Gly		1,1(1)		1,2(1)	1,0(1)		1,1(1)	1,0(1)				1,1(1)			
Ala	1,9(2)	2,1(2)			2,9(3)					1,0(1)					
Val					1,9(2)					0,9(1)					0,9(1)
Met	0,9(1)	1,0(1)								1,8(2)					
Ile	1,0(1)	1,0(1)		1,0(1)										1,0(1)	1,9(2)
Leu	3,1(3)	4,2(4)		2,1(2)			1,0(1)								
Tyr	1,0(1)	1,0(1)													
Phe															
His															
Lys									1,0(1)	0,2(0)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)
Arg		1,0(1)			1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)		1,0(1)					
Число остатков	16	21	2	9	9	6	7	3	4	8	4	5	2	4	8
Выход, %	64	21	84	83	78	55	82	84	74	39	41	28	87	36	30

## Аминокислотная последовательность растворимых пептидов триптического гидролиза СМ-Ад

Пептид	Аминокислотная последовательность
T-I	Leu-Glu-Ala-Ile-Thr-Asp-Glu-Glu-Asn-Asp-Met-Leu-Asp-Leu-Ala-Tyr
T-II	Leu-Glu-Ala-Ile-Thr-Asp-Glu-Glu-Asn-Asp-Met-Leu-Asp-Leu-Ala-Tyr- Gly-Leu-Thr-Asp-Arg
T-III	Glu-Ser
T-IV	Leu-Gly-Cys (Cm)-Gln-Ile-Cys (Cm)-Leu-Thr-Lys
T-V	Val-Pro-Glu-Ala-Val-Ala-Asp-Ala-Arg
T-VI	Ser-Ser-Ser-Glu-Asp-Lys
T-VII	Thr-Leu-Thr-Thr-Glu-Gly-Lys
T-VIII	Asp-Gly-Lys
T-IX	Ser-Glu-Asp-Lys
T-X	Ala-Met-Asp-Asn-Met-Thr-Val-Arg
T-XI	Ile-Thr-Val-His
T-XII	Gly-Leu-Thr-Asp-Arg
T-XIII	Ser-Arg
T-XIV	Phe-Ile-Asn-Arg
T-XV	Ile-Thr-Val-His-Phe-Ile-Asn-Arg

деление аминокислотной последовательности пептида T-II проводили согласно [5]. Так как в участок установленной аминокислотной последовательности пептида вошел остаток метионина, единственный по данным аминокислотного анализа в этом пептиде, данный пептид расщепили по метионину бромцианом и затем методом Эдмана без предварительного разделения продуктов гидролиза установили аминокислотную последовательность оставшейся части пептида T-II. Пептид T-I представлял собой укороченный с С-концевого участка на 5 аминокислотных остатков пептид T-II. Образование такого пептида можно объяснить неспецифическим расщеплением трипсином пептидной связи по остатку тирозина.

С целью получения пептидов, перекрывающих триптические пептиды СМ-Ад подвергли расщеплению химотрипсином. Разделение растворимой части пептидов химотриптического гидролиза на колонке с катионообменной смолой Аминекс 50W  $\times$  4 (20—30 мк) позволило получить все пептиды в гомогенном состоянии (рис. 2). Для всех растворимых пептидов химотриптического гидролиза СМ-Ад аминокислотный состав дан в табл. 4, а аминокислотная последовательность, определенная с помощью деградации по методу Эдмана, приведена в табл. 5.

Дальнейшая работа по изучению первичной структуры адренодоксина связана с исследованием строения нерастворимой части продуктов триптического и химотриптического гидролизом СМ-Ад. По данным N-концевого и аминокислотного анализов, нерастворимая часть триптического гидролизата СМ-Ад представляла собой гомогенный пептид, аминокислотный состав которого приведен в табл. 6.

N-Концевая последовательность, определенная деградацией по методу Эдмана с идентификацией ФТГ-производных аминокислот методом тонкослойной хроматографии, методом масс-спектрометрии, а также с идентификацией аминокислот, образующихся после гидролиза соответствующих ФТГ-производных на аминокислотном анализаторе, оказалась следующей: Val-Gly-Asp-Ser-Leu-Leu-Asp-Val-Val-Ile. Для определения полной аминокислотной последовательности нерастворимый триптический пептид расщепляли химотрипсином и термолизином. Разделение полученных пептидных смесей ионообменной хроматографией на катионите Аминекс 50W  $\times$  4 (20—30 мк) позволило получить гомогенные пептиды (рис. 3, 4). Аминокислотный состав пептидов химотриптического и термолитического гидролизом нерастворимого триптического пептида приведен в табл. 7

Аминокислотный состав растворимых пептидов химотриптического гидролиза СМ-Ад

Аминокислота	Пептид													
	C-I	C-II	C-III	C-IV	C-V	C-VI	C-VII	C-VIII	C-IX	C-X	C-XI	C-XII	C-XIII	C-XIV
Cys (Сm)														
Asp	3,2(3)	4,7(2)	4,1(1)	1,8(2)	4,8(2)	2,3(2)	4,2(1)		1,2(1)	4,2(1)	4,1(1)	2,1(2)	4,0(1)	4,0(1)
Thr	4,0(1)			4,0(1)	4,0(1)	4,1(1)	4,0(1)		1,0(1)	4,0(1)		4,0(1)	0,9(1)	4,0(1)
Ser				0,9(1)	4,4(1)	3,1(3)	3,1(3)		1,2(1)	2,8(3)			1,1(1)	4,1(1)
Glu	3,1(3)	4,1(1)				1,0(1)	1,0(1)	1,4(1)	2,1(2)	1,1(1)	1,0(1)			
Pro									1,0(1)					
Gly		4,1(1)				1,0(1)			2,9(3)		1,1(1)			4,1(1)
Ala	4,0(1)		4,0(1)	4,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	0,9(1)		2,8(3)	0,8(1)				
Val														
Met	0,9(1)					1,9(2)								
Ile	4,0(1)	0,9(1)									1,9(2)	0,9(1)		
Leu	1,0(1)	4,0(1)	4,0(1)		1,0(1)			1,0(1)		1,0(1)	1,9(2)	1,0(1)		1,9(2)
Tyr			4,0(1)											
Phe														
His				4,0(1)	4,0(1)		1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)	1,9(2)			
Lys						1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,2(1)		1,0(1)	1,1(1)		
Arg									2,0(2)			1,0(1)	2,0(2)	2,0(2)
Число остатков	41	6	4	6	7	7	40	3	14	11	7	8	6	8
Выход, %	60	58	42	24	18	44	21	38	52	22	49	52	30	26

**Аминокислотная последовательность растворимых пептидов химо триптического гидролиза СМ-Ад**

Пептид	Аминокислотная последовательность
C-I	Glu-Ala-Ile-Thr-Asp-Glu-Glu-Asn-Asp-Met-Leu
C-II	Gly-Cys (Cm) -Gln-Ile-Cys (Cm) -Leu
C-III	Asp-Leu-Ala-Tyr
C-IV	Ala-Cys (Cm) -Ser-Thr-Cys (Cm) -His
C-V	Ala-Cys (Cm) -Ser-Thr-Cys (Cm) -His-Leu
C-VI	Thr-Lys-Ala-Met-Asp-Asn-Met
C-VII	Ser-Ser-Ser-Glu-Asp-Lys-Ile-Thr-Val-His
C-VIII	Glu-Lys-Leu
C-IX	Thr-Val-Arg-Val-Pro-Glu-Ala-Val-Ala-Asp-Ala-Arg-Glu-Ser
C-X	Ser-Ser-Ser-Glu-Asp-Lys-Ile-Thr-Val-His-Phe
C-XI	Ile-Phe-Glu-Asp-His-Ile-Phe
C-XII	Ile-Asn-Arg-Asp-Gly-Lys-Thr-Leu
C-XIII	Thr-Asp-Arg-Ser-Arg-Leu
C-XIV	Gly-Leu-Thr-Asp-Arg-Ser-Arg-Leu

Таблица 6

**Аминокислотный состав нерастворимого пептида триптического и нерастворимого пептида химо триптического гидролизом СМ-Ад**

Аминокислота	Нерастворимый триптический пептид	Нерастворимый химо триптический пептид	Аминокислота	Нерастворимый триптический пептид	Нерастворимый химо триптический пептид
Cys (Cm)	3	1	Met	0	0
Asp	7	6	Ile	4	2
Thr	2	3	Leu	5	4
Ser	2	1	Tyr	0	0
Glu	4	3	Phe	3	1
Pro	0	0	His	2	0
Gly	4	5	Lys	1	1
Ala	2	1	Число остатков	42	31

Таблица 7

**Аминокислотный состав химо триптических пептидов нерастворимого триптического пептида СМ-Ад**

Аминокислота	Пептид						
	C *-I	C *-II	C *-III	C *-IV	C *-V	C *-VI	C *-VII
Cys (Cm)	0,9(1)	1,9(2)	1,8(2)				1,0(1)
Asp					1,1(1)	1,1(1)	6,3(6)
Thr	0,9(1)	0,9(1)	1,0(1)				0,9(1)
Ser		0,9(1)	0,9(1)				0,9(1)
Glu	1,1(1)			1,1(1)	2,2(2)	2,1(2)	2,3(2)
Pro							
Gly	2,2(2)						4,2(4)
Ala	1,1(1)	1,0(1)	1,1(1)				1,1(1)
Val							2,8(3)
Met							
Ile					2,1(2)	2,1(2)	1,9(2)
Leu	1,0(1)		1,0(1)			1,0(1)	4,0(4)
Tyr							
Phe					2,0(2)	2,1(2)	1,0(1)
His		1,0(1)	1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)	
Lys				1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	
Arg							
Число остатков	7	6	7	2	9	10	26
Выход, %	32	25	30	57	19	13	29

Таблица 8

## Аминокислотный состав термолитических пептидов нерастворимого триптического пептида СМ-Ад

Аминокислота	Пептид													
	Тн-I	Тн-II	Тн-III	Тн-IV	Тн-V	Тн-VI	Тн-VII	Тн-VIII	Тн-IX	Тн-X	Тн-XI	Тн-XII	Тн-XIII	Тн-XIV
Cys (См)	0,9(1)		0,9(1)		1,8(2)	1,1(1)	0,9(1)	2,0(2)	1,1(1)	1,1(1)		0,9(1)		
Asp	0,9(1)	3,2(3)	0,2(0)		1,0(1)	1,1(1)	0,1(0)	2,0(2)	1,1(1)	1,1(1)		1,0(1)	1,1(1)	
Thr			0,9(1)			1,0(1)	0,2(0)					1,1(1)		
Ser						1,1(1)								
Glu	1,0(1)	1,1(1)	1,0(1)		1,0(1)	1,1(1)							1,0(1)	1,0(1)
Pro										1,1(1)	1,1(1)			
Gly	1,1(1)		2,1(2)		1,1(1)	1,1(1)	0,2(0)	2,1(2)		1,1(1)				
Ala	1,0(1)		1,0(1)		2,0(2)	1,1(1)	1,1(1)							
Val		1,8(2)				0,9(1)								
Met														
Ile		1,0(1)						1,1(1)		1,0(1)			1,0(1)	1,0(1)
Leu		1,0(1)		(1)	1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)				1,0(1)	1,0(1)
Tyr								1,0(1)			1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)
Phe														
His														
Lys												1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)
Arg														
Число остатков	5	8	7	1	8	4	3	7	2	3	2	4	5	4
Выход, %	32	34	14	82	12	62	30	15	84	67	47	44	58	59



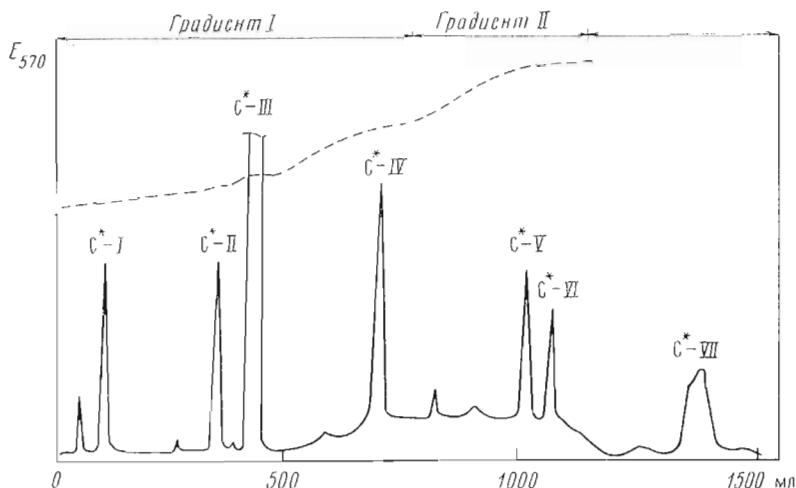


Рис. 3. Разделение пептидов химотриптического гидролиза нерастворимого триптического пептида CM-Ад на колонке со смолой Амниекс 50W × 4

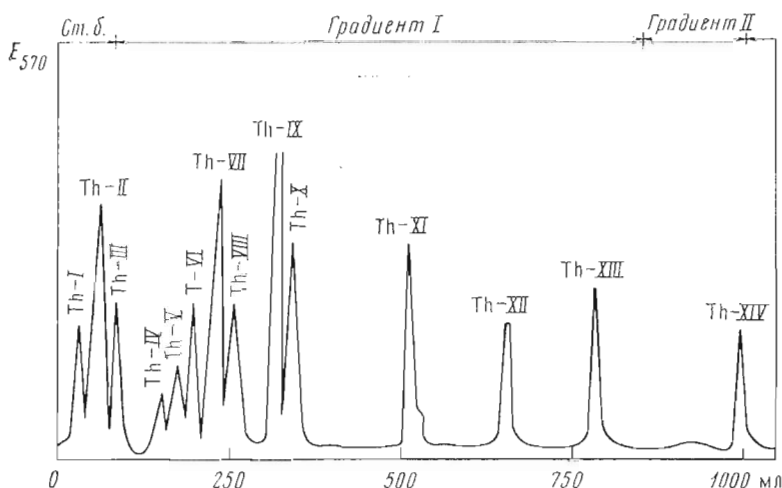


Рис. 4. Разделение пептидов термолитического гидролиза нерастворимого триптического пептида CM-Ад на колонке со смолой Амниекс 50W × 4

и 8 соответственно. Результаты определения аминокислотной последовательности пептидов химотриптического и термолитического гидролиз нерастворимого триптического пептида представлены в табл. 9 и 10 соответственно. Таким образом, было установлено строение нерастворимого триптического пептида CM-Ад (схема 1).

Таблица 9

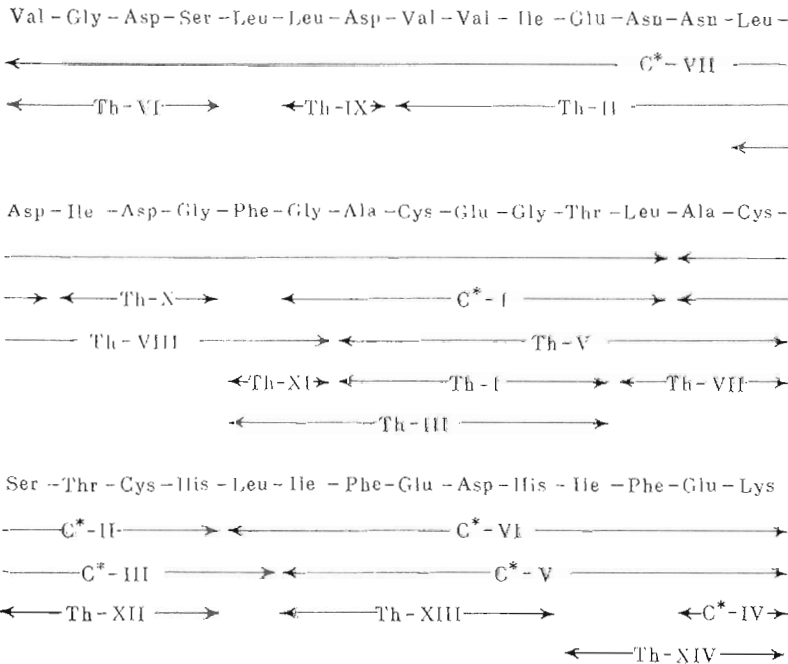
Аминокислотная последовательность химотриптических пептидов нерастворимого триптического пептида CM-Ад

Пептид	Аминокислотная последовательность
C*-I	Gly-Ala-Cys (Cm)-Glu-Gly-Thr-Leu
C*-II	Ala-Cys (Cm)-Ser-Thr-Cys (Cm)-His
C*-III	Ala-Cys (Cm)-Ser-Thr-Cys (Cm)-His-Leu
C*-IV	Glu-Lys
C*-V	Ile-Phe-Glu-Asp-His-Ile-Phe- (Glu, Lys)
C*-VI	Ile-Ile-Phe-Glu-Asp-His-Ile-Phe (Glu, Lys)
C*-VII	Val-Gly-Asp-Ser- (Cys <sub>1</sub> (Cm), Asp <sub>5</sub> , Thr <sub>1</sub> , Glu <sub>2</sub> , Gly <sub>3</sub> , Ala <sub>1</sub> , Val <sub>2</sub> , Ile <sub>2</sub> , Leu <sub>3</sub> , Phe <sub>1</sub> )

Аминокислотная последовательность термолитических пептидов  
нерастворимого триптического пептида CM-Ад

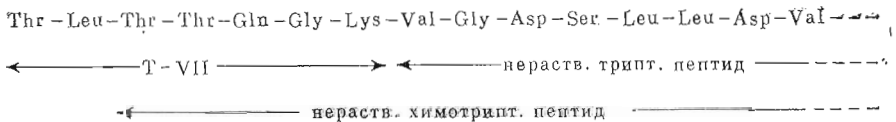
Пептид	Аминокислотная последовательность
Th-I	Ala-Cys (Cm)-Glu-Gly-Thr
Th-II	Val-Val-Ile-Glu-Asn-Asn-Leu-Asp
Th-III	Phe-Gly-Ala-Cys (Cm)-Glu-Gly-Thr
Th-IV	Leu
Th-V	Ala-Cys (Cm)-Glu-Gly-Thr-Leu-Ala-Cys (Cm)
Th-VI	Val-Gly-Asp-Ser
Th-VII	Leu-Ala-Cys (Cm)
Th-VIII	Leu-Asp-Ile-Asp-Gly-Phe-Gly
Th-IX	Leu-Asp
Th-X	Ile-Asp-Gly
Th-XI	Phe-Gly
Th-XII	Ser-Thr-Cys (Cm)-His
Th-XIII	Ile-Phe-Glu-Asp-His
Th-XIV	Ile-Phe-Glu-Lys

Схема 1



Аминокислотная последовательность нерастворимого триптического пептида CM-Ад

Схема 2



Перекрытие триптического пептида T-VIII с нерастворимым триптическим пептидом



С х е м а 4

Бычий адренодоксин	1	Gln	10	Glu	20
Свиной адренодоксин	1	Ser-Ser-Ser <sup>*</sup> -Glu-Asp-Lys-Ile-Thr-Val-His-Phe-Ile-Asn-Arg-Asp-Gly <sup>*</sup> -Lys-Thr-Leu-Thr-	10		20
		—Lys—	30	Val-Gln	40
		—Ile—	30		40
		Thr-Gln <sup>*</sup> -Gly-Lys-Val <sup>*</sup> -Gly-Asp-Ser-Leu-Leu-Asp-Val-Val-Ile <sup>*</sup> -Glu <sup>*</sup> -Asn-Asn-Leu-Asp-Ile-	50		60
		Asp-Gly-Phe-Gly-Ala-Cys-Glu-Gly-Thr-Leu-Ala-Cys-Ser-Thr-Cys-His-Leu-Ile-Phe-Glu	50		60
		Gln	70	Asn	80
			70	Asn	80
		*Asp-His-Ile-Phe-Glu-Lys-Leu-Glu-Ala-Ile-Thr-*Asp-Glu-Glu-Asn-*Asp-Met-Leu-Asp-Leu-	90		100
		Ala-Tyr-Gly-Leu-Thr-Asp-Arg-Ser-Arg-Leu-Gly-Cys-Gln-Ile-Cys-Leu-Thr-Lys-Ala-Met-	90		100
			110	Ser	114
		Asp	110		117
		Asp-Asn-Met-Thr-Val-Arg-Val-Pro-Glu-Ala-Val-*Ala-Asp-Ala-*Arg-Glu <sup>*</sup> -Ser			

Сравнение аминокислотных последовательностей бычьего и свиного адренодоксина

Изучение нерастворимой части химотриптического гидролиза СМ-Ад показало наличие только одного пептида, аминокислотный состав которого приведен в табл. 6. Результаты определения N-концевой последовательности нерастворимого химотриптического пептида позволили соединить между собой нерастворимый триптический пептид и триптический пептид Т-VII (схема 2).

На основании приведенных данных была реконструирована полная аминокислотная последовательность свиного адренодоксина, представленная на схеме 3. Схема 4 иллюстрирует различия в аминокислотной последовательности бычьего и свиного адренодоксина.

В заключение следует отметить, что использование пептидного анализатора, сконструированного на базе аминокислотного анализатора (Microtechna, ЧССР) в комплексе с градиентным смесителем Ultrograd (ЛКВ, Швеция), позволило нам благодаря непосредственному контролю за хроматографическим процессом разделить ферментативные гидролизаты СМ-Ад и нерастворимого триптического пептида без дополнительной очистки до индивидуальных пептидов. На наш взгляд, применение в повседневной лабораторной практике такого рода оборудования может существенно облегчить изучение первичной структуры белков.

### Экспериментальная часть

Адренодоксин из митохондрий коры надпочечников свиньи выделяли по методике, разработанной для выделения адренодоксина из митохондрий коры надпочечников быка [4]. В работе были использованы: трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза А (Worthington, США), термолизин (Merck, ФРГ), целлюлоза ДЕ-32 (Wathman, Англия), целлюлоза MN-300 (Mascherei-Nagel, ФРГ), ионообменная смола Aminex 50W × 4 (20—30 мк) (Bio-Rad, США), дансилхлорид (Koch-Light, Англия), наборы дансил- и фенилтиогидантоиновых производных аминокислот (Serva, ФРГ), хроматографические пластинки F-60 (Merck, ФРГ).

*Карбоксиметилирование адренодоксина* осуществляли по известной методике [6].

*Триптический гидролиз карбоксиметилированного адренодоксина.* Триптический гидролиз 2,8 мкмоль карбоксиметилированного адренодоксина проводили 12 ч при 37° в 3 мл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера (рН 8,3) и соотношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу). Продукты триптического гидролиза растворяли в 5% уксусной кислоте, не растворившуюся при этом часть отделяли центрифугированием. Осадок суспендировали в том же самом растворе и вновь отделяли центрифугированием. Эту процедуру повторяли три раза. Полученные при этом супернатанты объединяли, лиофилизировали и хранили при —20°.

*Химотриптический гидролиз карбоксиметилированного адренодоксина.* К раствору 1,6 мкмоль карбоксиметилированного адренодоксина в 1,6 мл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера (рН 8,3) добавляли химотрипсин до фермент-субстратного соотношения 1 : 50 (по весу). Время гидролиза 12 ч, температура 37°. Отделение нерастворимого химотриптического пептида перед ионообменной хроматографией проводили, как и в случае триптического гидролиза.

*Химотриптический гидролиз нерастворимого триптического пептида.* 1,8 мкмоль пептида в 1,5 мл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера (рН 8,3) расщепляли химотрипсином в течение 12 ч при 37° и соотношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу). Затем гидролизат лиофилизировали и хранили при —20°.

*Термолитический гидролиз нерастворимого триптического пептида.* 1,4 мкмоль пептида в 1,5 мл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера (рН 8,3) подвергали расщеплению термолитином при фермент-субстратном соотношении 1 : 100 (по весу). Гидролиз проводили при 37° в течение 10 ч. Гидролизат лиофилизировали и хранили при —20°.

*Бромциановый гидролиз триптического пептида T-II* осуществляли согласно работе [7].

*Разделение продуктов ферментативных гидролиз* проводили в одинаковых условиях, меняя лишь в каждом отдельном случае с помощью градиентного смесителя Ultrograd задаваемый градиент. Использование пептидного анализатора позволило сделать автоматическую запись процесса хроматографического разделения пептидов на ионообменной колонке путем непрерывного отбора  $1/12$  части элюата на реакцию с нингидриновым реагентом.

Перед началом опыта колонку размером 1,2 × 60 см уравнивали, пропуская через нее необходимое количество стартового 0,2 М пиридин-ацетатного буфера (рН 2,9) при скорости насоса 26,2 мл/ч. Лиофильно высушенные ферментативные гидролизаты растворяли в минимальном объеме 5% уксусной кислоты и наносили на колонку под давлением аргона. Для разделения пептидов использовали градиент рН и ионной силы буфера. Элюирование проводили при температуре рубашки колонки 47°. Градиент I получали смешением стартового буфера с 0,5 М пиридин-ацетатным буфером (рН 4,9). Градиент II получали смешением 0,5 М пиридин-ацетатного буфера (рН 4,9) с 2 М пиридин-ацетатным буфером (рН 5,0). Как в первом, так и во втором случае для создания градиентов использовали градиентный смеситель Ultrograd (ЛКВ, Швеция). Элюирование заканчивали 2,0 М пиридин-ацетатным буфером (рН 5,0) и окончательно — 2 М пиридином. Элюат собирали с помощью коллектора фракций Ultrograd (ЛКВ, Швеция). Объем отдельной фракции составлял 6 мл.

*Для ориентировочной оценки числа пептидов* в объединенных фракциях была использована хроматография в тонком слое целлюлозы MN-300 на пластинках 20 × 20 см в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода (15 : 3 : 10 : 12).

*Аминокислотный анализ* выполняли по методу [8] на анализаторе ЛКВ 3201 (ЛКВ, Швеция). Определение триптофана проводили согласно работе [9].

Аминокислотную последовательность выделенных пептидов устанавливали по методу Эдмана [10] с идентификацией образовавшихся фенолтиогидантоиновых производных аминокислот тонкослойной хроматографией [11, 12], методом масс-спектрометрии и анализом на аминокислотном анализаторе природы аминокислотного остатка, полученного после гидролиза соответствующего ФТГ-производного.

Авторы выражают благодарность за помощь в проведении ряда экспериментов сотрудникам лаборатории: В. М. Шкуматову, О. А. Стрельченко, Г. В. Аввакумову, Н. Б. Тимчук, Т. М. Берикбаевой, Н. С. Куприной.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kimura T., Nakamura S., Huang J. J., Chu J.-W., Wang H. P., Tsernoglou D. (1973) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **212**, 94—99.
2. Dus K. (1975) in *Cytochrome P-450 and cytochrome b<sub>5</sub>* (Cooper D., ed.), N. Y. Plenum Press, pp. 287—309.
3. Tanaka M., Haniu M., Yasunobu K. T., Kimura T. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 1141—1157.
4. Akhrem A. A., Shkumatov V. M., Chashchin V. L. (1976) *USSR-FRG Symposium on peptide and protein chemistry*. Dushanbe, p. 101.
5. Липкин В. М., Алдаюва Н. А., Фейгина М. Ю., Жякулива Е. Б., Виноградова Е. И. (1972) *Биохимия*, **37**, 410—414.
6. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 622—627.
7. Steers E., Craven G. R., Anfinsen C. B., Bethune J. L. (1965) *J. Biol. Chem.*, **240**, 2478—2484.
8. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S. (1958) *Anal. Chem.*, **30**, 1190—1198.
9. Penke B., Ferenczi R., Kovács K. (1974) *Anal. Biochem.*, **60**, 45—50.
10. Edman P., Begg G. (1967) *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80—91.
11. Brenner M., Niederwieser A., Pataki G. (1961) *Experientia*, **17**, 145—149.
12. Pataki G. (1964) *Chimia*, **18**, 23—27.

Поступила в редакцию  
8.VIII.1977

#### THE AMINO ACID SEQUENCE OF PORCINE ADRENODOXIN

AKHREM A. A., LAPKO A. G., LAPKO V. N.,  
MOROZOVA L. A., REPIN V. A., TISHCHENKO I. V., CHASHCHIN V. L.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the Byelorussian SSR, Minsk*

The amino acid sequence of porcine adrenodoxin has been established. Adrenodoxin is a key component of the steroid-hydroxylating electron transport system, which consists of adrenodoxin reductase, NADP, adrenodoxin and cytochrome P-450. Carboxymethylated adrenodoxin was cleaved with trypsin and cymotrypsin, whereby resulting large peptides were further degraded using thermolysin or cyanogen bromide. The analysis of the amino acid sequences of isolated peptides permitted to deduce the total primary structure of porcine adrenodoxin which consists of 117 amino acid residues.