



УДК 615.779.931.547.962

АКТИНОКСАНТИН

IV. ПЕПТИДЫ ХИМОТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗАТА АКТИНОКСАНТИНА*

*Чунова Л. А., Решетов П. Д., Хохлов А. С.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва*

S-карбоксиметил- и S-аминоэтилпроизводные актиноксантина гидролизуют химотрипсином. В случае КМА смесь пептидов фракционировали с помощью сефадекса G-25, высоковольтного ЭФ и БХ. Гидролизат АЭА фракционировали на катионите аминоксиде AG 50WX2. Выделено 20 пептидов. Установлена полная последовательность аминокислот восьми и частичная двух неперекрывающихся фрагментов, отвечающих в сумме 101 аминокислотному остатку. На основании полученных и ранее опубликованных данных [1] установлены N-концевая (12 остатков) и C-концевая (17 остатков) последовательности полипептидной цепи актиноксантина.

В ходе исследования антибиотика актиноксантина было показано, что он построен из одной полипептидной цепи, содержащей две дисульфидные связи и имеет $M \sim 12\,000$. В предыдущем сообщении нами приведены свойства КМА и АЭА, а также состав N- и C-концевого фрагментов [1].

Основываясь на особенностях аминокислотного состава актиноксантина [2,3] (3Tyr, 5Phe, 5Leu), мы надеялись с помощью специфического гидролиза химотрипсином получить относительно короткие пептиды, являющиеся удобными объектами для структурных исследований. Настоящая работа посвящена выделению пептидов, полученных после гидролиза КМА и АЭА химотрипсином, и установлению их строения.

Гидролиз КМА и АЭА химотрипсином проводили при pH 8,2 и соотношении фермент — субстрат, равном 1 : 50. На двумерных картах химотриптических гидролизатов КМА и АЭА (рис. 1) наблюдается по 10 интенсивно окрашенных пятен. Положение восьми пятен совпадает на обеих картах. Исключение составляют положения пептидов Ch-4 и Ch-8, что связано, по-видимому, с наличием различных производных цистеина (Sm-Cys в КМА, Aet-Cts в АЭА). Из фракций, полученных после деления гидролизата КМА гель-фильтрацией на сефадексе G-25 (рис. 2) с помощью БХ и ЭФ выделены 9 пептидов и свободный тирозин. Аминокислотный состав, N- и C-концевые аминокислоты и способ очистки полученных пептидов представлены в табл. 1. Общая сумма аминокислот, определенных в пептидах, составляла 92 остатка (из 107, найденных в актиноксантине).

* Сокращения: КМА — S-карбоксиметилированный актиноксантин, АЭА — S-аминоэтилированный актиноксантин; Aet — аминоэтил-; Sm — карбоксиметил-; Dns-1-диметиламинонафталин-5-сульфонил-; Pth — фенилтиогидантоил-; → — 1-я стадия деградации по Эдману; ← — гидролиз карбоксипептидазой А (1-я ступень); ЭФ — электрофорез; ИОХ — ионообменная хроматография.

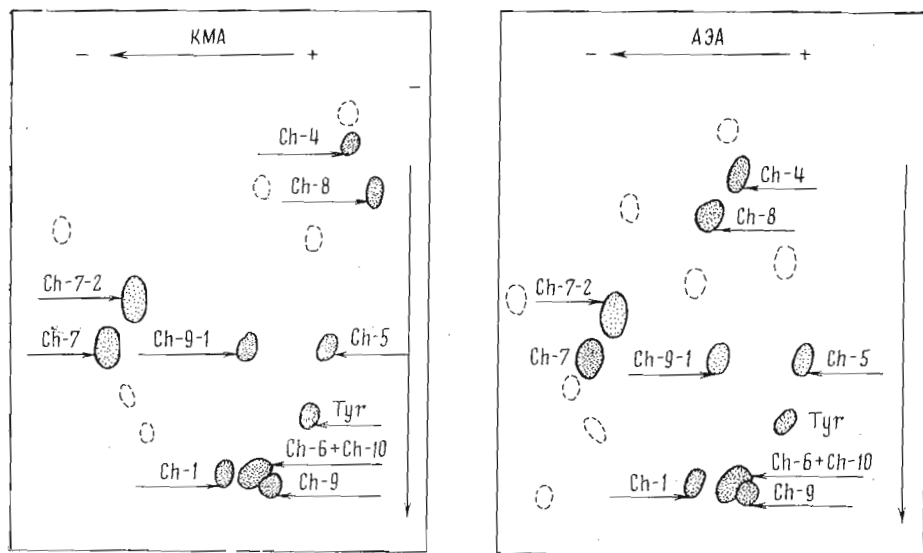
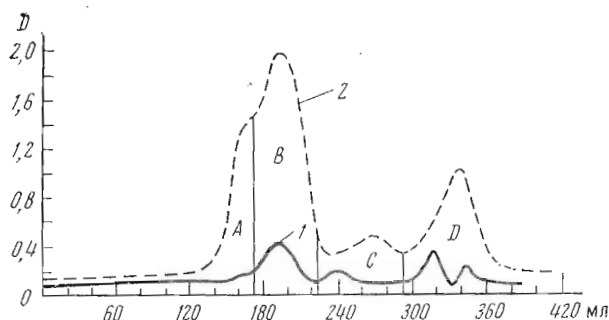


Рис. 1. Двумерные карты химотриптических гидролизатов КМА и АЭА. Хроматография в системе бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода (15 : 10 : 3 : 12); высоковольтный ЭФ в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5)

Рис. 2. Гель-фильтрация химотриптического гидролизата КМА на сефадексе G-25 (f) в 0,02 М бикарбонате аммония. Колонка 2 × 150 см, объем фракций 4 мл, скорость элюции 1 мл/мин: 1 — экстинкция при λ_{280} нм, 2 — при λ_{220} нм



Таким образом, при анализе продуктов гидролиза КМА полного баланса аминокислот достичь не удалось. Тем не менее была получена важная информация о распределении в полипептидной цепи остатков цистеина и ароматических аминокислот, в частности, было установлено, что 4 остатка цистеина распределены поровну между двумя крупными фрагментами Ch-4 и Ch-8. Поэтому был предпринят химотриптический гидролиз АЭА с тем, чтобы использовать крупные Aet-Cys-содержащие фрагменты для дальнейших структурных исследований.

Для фракционирования химотриптического гидролизата АЭА использовали ионообменную хроматографию на катионите аминекс AG 50WX2 в градиенте пиридин-ацетатных буферов (рис. 3).

Анализ элюатов с ионообменных колонок представляет определенные трудности. Обычно для этой цели применяют нингидрин [4, 5] и реже более трудоемкий анализ с *трет*-бутилгипохлоритом [6]. В последнее время в качестве реагента на первичную аминогруппу предложено использовать флуорескамин [7, 8], что существенно снижает предел обнаружения (0,1—0,01 нмоль в пробе). Вариантом этого метода является спектрофлуориметрическое определение продукта конденсации первичных аминов с нингид-

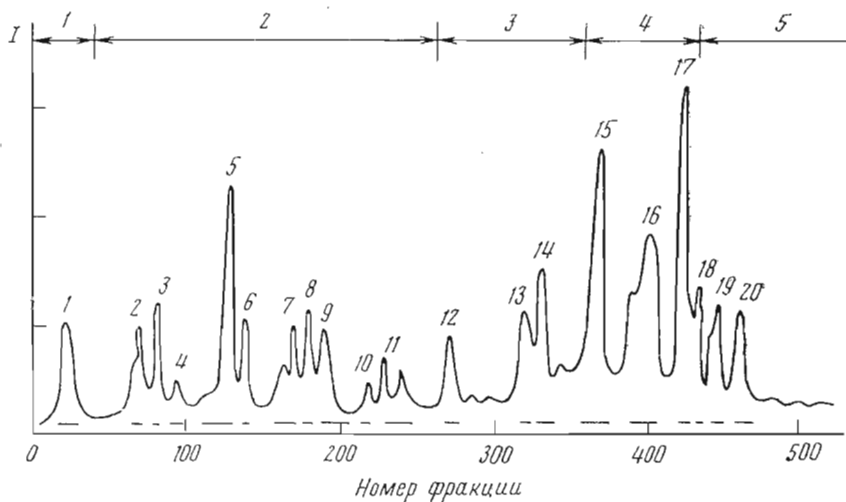


Рис. 3. Разделение химотриптического гидролизата АЭА на колонке с катионитом аминокс AG 50WX2 в системе экспоненциальных градиентов иридин-ацетатных буферов (см. раздел «Экспериментальная часть»); I — интенсивность флуоресценции

рином и фенилацетальдегидом [9] (рН 8; 60°; 15 мин). При анализе элюатов нами была использована именно эта методика, с помощью которой мы обнаруживали до 0,02 нмоль пептидов в пробе.

После ИОХ химотриптического гидролизата АЭА нами было получено 20 фракций, 9 из которых содержали индивидуальные пептиды. Из остальных фракций после дополнительной очистки с помощью ЭФ и БХ было получено еще 11 пептидов. Аминокислотный состав, N- и C-концевые аминокислоты и другие характеристики 20 полученных пептидов приведены в табл. 2, из них 6 полностью совпадают с пептидами, выделенными из гидролизата КМА (Ch-1, Ch-4, Ch-5, Ch-7-2, Ch-8, Ch-9-1 и тирозин), за исключением того, что Cm-Cys в пептидах Ch-4 и Ch-8 заменен на Aet-Cys.

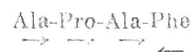
Как показал анализ C-концевых аминокислот и сопоставление выхода пептидов, химотриптический гидролиз как КМА, так и АЭА происходит в основном по остаткам тирозина, фенилаланина и лейцина.

Кроме того, из гидролизата АЭА с более низким выходом были выделены пептиды, являющиеся продуктами неспецифического химотриптического гидролиза.

Характерной особенностью химотриптического гидролиза как КМА, так и АЭА является образование свободного тирозина, что, возможно, свидетельствует о присутствии в белке фрагментов -Tyr-Tyr-, -Phe-Tyr-, -Leu-Tyr-.

Пептиды, перечисленные в табл. 1, составляют в сумме 162—164 остатка. Если же принимать во внимание только аминокислотный состав перекрывающихся пептидов — продуктов специфического гидролиза химотрипсином, то сумма содержащихся в них аминокислот равна 101—102 остаткам, что практически соответствует аминокислотному составу актипоксантина. Ниже рассматриваются доказательства строения этих 10 перекрывающихся фрагментов.

Пептид Ch-1



Аминокислотная последовательность определена деградацией по методу Эдмана в модификации Грея и Хартли, как указано в «Экспериментальной части». При действии карбоксипептидазы А найдено, что C-концевой аминокислотой пептида является фенилаланин (см. табл. 3).

Таблица 1

Характеристика пептидов химотриптического гидролизата КМА

Пептид	Аминокислотный состав													Общее число остатков	N-концевая аминокислота	С-концевая аминокислота	Данные о выделении			
	См-Суз	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Tyr	Phe				His	Lys	Arg	получен из фракции
Ch-1						1,00 (1)	2,40 (2)										Ala	Phe	D	ЭФ (рН 6,5)
Ch-4	1,33 (2)	1,79 (2)	1,42 (2)	1,31 (1)	1,91 (2)	1,20 (2)	1,69 (2)	4,40 (5)	0,75 (1)	1,00 (1)				0,74 (1)			Ile	Phe	B	БХ
Ch-5		0,93 (1)	1,85 (2)	1,78 (2)			1,03 (1)	2,85 (3)									Thr	Phe	C	ЭФ (рН 3,5)
Ch-6 + Ch-10			1,00 (1)	1,00 (1)			1,20 (1)										Ser Thr	Phe	D	ЭФ (рН 3,5 и 6,5)
Ch-7				1,20 (1)				0,60 (1)									Val		C	ЭФ (рН 3,5)
Ch-7-2				1,00 (1)													Lys		D	ЭФ (рН 3,5)
Ch-8	1,22 (2)	2,61 (3)	2,56 (3)	2,26 (2)	1,09 (1)	2,00 (2)	3,06 (3)	3,00 (3)	1,47 (2)	0,94 (1)							Ala	Leu	A	—
Ch-9		2,00 (2)	1,15 (1)	1,00 (1)			4,00 (4)	2,00 (2)	0,46 (1)	2,97 (3)				0,83 (1)			Gly	Leu	B	БХ
Ch-9-1		1,00 (1)		1,00 (1)			2,5 (3)	1,20 (1)		0,92 (1)							Gly	Leu	C	ЭФ (рН 3,5)
Tyr										1,00 (1)							Tyr		D	ЭФ (рН 3,5)

Характеристика пептидов химограптического гидролизата АЭА

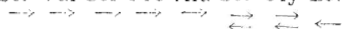
Пеп-тид	Аминокислотный состав												Данные о выделении									
	Asp	The	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Acl-Cys	Arg	Общее число остатков	Н-концевая аминокислота	С-концевая аминокислота	номер фракции с катодита	способ выделения	выход, мкмоль/облика
Ch-1					0,85 (1)		2,00 (2)					1,00 (1)					4	Ala	Phe	7	—	0,59
Ch-2			1,90 (2-3)		0,60 (1)	0,93 (1)	1,00 (1)	0,80 (1)		0,66 (1)							7-8	Ser	Leu	3	—	0,35
Ch-2-1			1,76 (2)		0,92 (1)		1,00 (1)	0,84 (1)									5	Ser	Ala	4	ЭФ	0,019
Ch-3			1,69 (2)		0,98 (1)	2,50 (2-3)	2,40 (3)	0,88 (1)			0,28 (1)						11-12	Ser		4	ЭФ	0,02
Ch-4	1,80 (2)	1,40 (2)	1,30 (1)	1,90 (2)	1,20 (2)	1,70 (2)	4,10 (5)	0,76 (1)	0,66 (1)			1,00 (1)			1,87 (1)		21	Ile	Phe	13	—	0,11
Ch-4-1				1,00 (1)			1,00 (1)	0,56 (1)		0,60 (1)							4	Tyr		8	ЭФ	0,01
Ch-4-2				1,00 (1)			0,85 (1)	0,83 (1)									3	Ile		6	ЭФ	0,05
Ch-4-3	1,80 (2)	1,80 (2)	1,00 (1)	1,20 (1)	1,60 (2)	1,80 (2)	3,60 (4)	0,80 (1)				1,00 (1)			1,60 (2)		18	Acl-Cys	Phe	15	—	0,06
Ch-5	1,00 (1)	1,87 (2)	1,90 (2)			1,05 (1)	2,67 (3)					0,93 (1)					10	Thr	Phe	2	—	0,60

Таблица 2 (продолжение)

Леп- тип	АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ													Данные о выделении									
	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Aet- Cys	Arg	Общее число остат- ков	N-кон- цевая амино- кисло- та	С-кон- цевая амино- кисло- та	номер фрак- ции с каби- нета	способ допол- ни- тель- ной оцист- ки	выход, мкг/моль/ белка	
	3,00 (3)	2,70 (3)	2,44 (2)	1,00 (1)	1,40 (2)	3,00 (3)	3,40 (3)	1,85 (2)	1,00 (1)	1,00 (1)	0,67 (1)	1,00 (1)		0,76 (1)	1,28 (2)	1,24 (2)							1,00 (1)
Ch-6			1,00 (1)														2	Ser	Phe	10	—	0,64	
Ch-7-1								1,00 (1)								1,00 (1)	2	Val	Arg	18	БХ	0,03	
Ch-7-2			1,08 (1)											0,76 (1)			3	Lys	Tyr	18	БХ	0,05	
Tyr																	1						
Ch-8	3,00 (3)	2,70 (3)	2,44 (2)	1,00 (1)	1,40 (2)	3,00 (3)	3,40 (3)	1,85 (2)	1,00 (1)	1,00 (1)					1,28 (2)		22	Ala	Leu	6	ЭФ	0,14 0,21	
Ch-8-1	2,04 (2)	0,80 (1)					1,86 (2)		1,00 (1)	1,00 (1)					1,24 (2)		8	Aet- Cys	Leu	17	ЭФ	0,06	
Ch-8-2	2,00 (2)						1,00 (1)		0,93 (1)	0,93 (1)					0,93 (1)		5	Asx	Leu	12	БХ	0,11	
Ch-9-1	1,40 (1)		1,00 (1)			2,86 (3)	1,20 (1)		0,95 (1)	0,95 (1)							7	Gly	Leu	5	—	0,19	
Ch-9-2	0,89 (1)					1,10 (1)	0,89 (1)	0,56 (1)	2,03 (2)	2,03 (2)				1,00			7	Asx	Leu	12	БХ	0,23	
Ch-10			1,04 (1)			1,29 (1)						1,00 (1)					3	Thr	Gly	11	—	0,56	

Пептид Ch-2

Ser-Val-Ser-Pro-Ala-Ser-Gly-Leu



Указанная С-концевая последовательность доказана с помощью гидролиза карбоксипептидазой А (см. табл. 3).

Пептид Ch-3

Ser-Val-Ser-(Thr, Glx, Gly₂, Ala₃, Tyr)

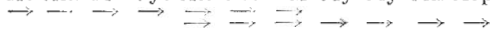


Пептид Ch-3 был выделен из гидролизата АЭА с низким выходом, вследствие чего была установлена лишь его N-концевая последовательность после двух стадий деградации по Эдману.

Пептид Ch-4

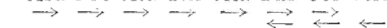
← Ch-4-T1 → ← Ch-4-T2 →

Ile-Ala-Gln-Cys-Ala-Pro-Val-Gly-Gly-Gln-Asp-Ala-Cys-



← Ch-4-T3 →

-Asn-Pro-Ala-Thr-Ala-Thr-Ser-Phe



N-концевая последовательность пептида была определена методом деградации по Эдману (7 стадий) в модификации Грея и Хартли. Глутамин на 3-й стадии определен в виде Pth-производного. После 6 стадий деградации в остаточном пептиде (6-Ch-4) по сравнению с исходным пептидом найдено:

	Cm-Cys	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Phe
6-Ch-4	1,23	2,00	1,70	0,88	1,46	1,46	2,00	3,64	1,00	0,01	1,00
Ch-4	2	2	2	1	2	2	2	5	1	1	1

С-концевая аминокислота определена по методу Мацуо; с помощью карбоксипептидазы А доказана последовательность С-концевого трипептида (см. табл. 3).

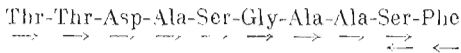
Таблица 3

Определение С-концевой последовательности и С-концевых аминокислот пептидов химотриптического гидролизата

Пептид	Время, гидролиза, мин	Гидролиз карбоксипептидазой А		Включение тритиевой метки по методу Мацуо, имп/мин		
		аминокислота	выход, % от взятого количества пептида	аминокислота	имп/мин	фон, имп/мин
Ch-1	50	Phe	100			
Cb-2	30	Leu	100			
		Gly	30			
		Ser	29			
Ch-4	30	Phe	100	Phe	5 180	55
		Ser	85			
		Thr	45			
Ch-5	10	Phe	100	Phe	17 400	1000
		Ser	85			
		Asn	100			
Cb-8	30	Leu	100	Leu	9 715	285
Ch-9	120	Leu	100	Leu	1 800	17
		Ala	78			
		Val	78			
		His	78			
Ch-10	30	Gly	100			

Пептид Ch-4, полученный из гидролизата АЭА, дополнительно гидролизовали трипсином. С помощью высоковольтного ЭФ и БХ были выделены пептиды Ch-4-T1, Ch-4-T2, Ch-4-T3. Последовательность аминокислот в них определена обычными методами.

Пептид Ch-5



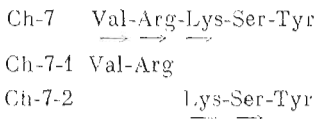
Последовательность аминокислот определена по стандартной методике. Аспарагиновую кислоту на 3-й стадии деградации идентифицировали в виде Pth-производного; после исчерпывающего гидролиза Ch-5 лейцинаминопептидазой (рН 8,5; 37°; 18 ч) в числе прочих аминокислот найдена аспарагиновая кислота, но не аспарагин. Указанную для пептида Ch-5 C-концевую последовательность доказали с помощью карбоксипептидазы А и метода Мацуо (см. табл. 3).

Пептид Ch-6



Последовательность аминокислот установлена на основании определения N-концевой аминокислоты (серин) и аминокислотного состава после 1-й стадии деградации по Эдману (фенилаланин).

Пептид Ch-7

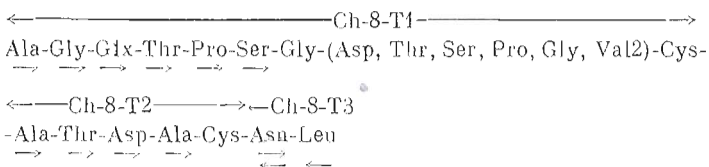


При анализе пептида Ch-7 методом Эдмана в модификации Грея и Хартли Dns-аргинин и Dns-лизин после 1-й и 2-й стадий деградации идентифицированы не были. После 3-й стадии в остаточном пептиде (3-Ch-7) по сравнению с исходным найдено:

	Ser	Val	Tyr	Lys	Arg
3-Ch-7	1,00	0	0,60	0,01	0
Ch-7	1	1	1	1	1

Эти данные, а также строение пептидов Ch-7-1 и Ch-7-2, установленное обычными методами, доказывают аминокислотную последовательность пептида Ch-7. В дальнейшем строение этого фрагмента было подтверждено при изучении пептида ТА-6, полученного при триптическом гидролизе АЭА.

Пептид Ch-8



N-концевая последовательность этого пептида определена после 6 стадий деградации по Эдману. Указанная C-концевая последовательность доказана методом Мацуо и после гидролиза карбоксипептидазой А (см. табл. 3).

Пептид Ch-8, полученный из АЭА, гидролизовали трипсином и выделили три фрагмента: Ch-8-T1, Ch-8-T2, Ch-8-T3. При выделении пептида Ch-8-T1 наблюдались большие потери, вследствие чего был определен лишь его аминокислотный состав, N- и C-концевые аминокислоты. Его полная аминокислотная последовательность была установлена позже в ходе исследования пептида ТА-7, полученного при триптическом гидролизе АЭА.

Аминокислотная последовательность пептидов Ch-8-T2 и Ch-8-T3 установлена стандартными методами. Аспарагиновую кислоту после 3-й стадии деградации пептида Ch-8-T2 определяли в виде Pth-производного. Аспарагин в пептиде Ch-8-T3 был идентифицирован после длительного гидролиза карбоксипептидазой А.

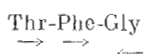
Пептид Ch-9



Аминокислотная последовательность этого пептида определена с помощью комбинированной методики. Аспарагин на 4-й и 8-й стадиях деградации по Эдману идентифицировали в виде Pht-производного. После 13 стадий деградации в качестве остаточной аминокислоты найден свободный лейцин, что совпадает с результатами анализа по включению тритиевой метки. Последовательность С-концевого тетрапептида подтверждена также гидролизом карбоксипептидазой А (см. табл. 3).

Строение пептида Ch-9 подтверждено также анализом его фрагментов Ch-9-1 и Ch-9-2, строение которых определяли обычными методами.

Пептид Ch-10



После 2-й стадии деградации по Эдману найден свободный глицин. С помощью карбоксипептидазы А в качестве С-концевой аминокислоты идентифицирован глицин (см. табл. 3).

Наличие свободного тирозина в гидролизатах КМА и АЭА доказано с помощью ЭФ и БХ, а также аминокислотным анализом фракции 6 до и после кислотного гидролиза.

Таким образом, установлена аминокислотная последовательность: полная — 8 и частичная — 2 пептидов (табл. 4), образующихся при специфическом химотриптическом гидролизе актиноксантина. Определено положение двух остатков тирозина, пяти остатков фенилаланина и пяти остатков лейцина.

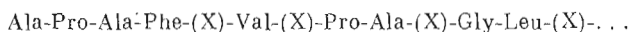
В ходе изучения пептидов было определено строение N- и С-концевого фрагментов полипептидной цепи. Частично N-концевая последователь-

Таблица 4

Аминокислотная последовательность непрерывающихся пептидов химотриптического гидролизата актиноксантина

Пептид	Последовательность	Число остатков
Ch-1	Ala-Pro-Ala-Phe	4
Ch-2	Ser-Val-Ser-Pro-Ala-Ser-Gly-Leu	8
Ch-3	Ser-Val-Ser-(Thr, Glx, Gly ₂ , Ala ₃ , Tyr)	11
Ch-4	Ile-Ala-Gln-Cys-Ala-Pro-Val-Gly-Gly-Gln-Asp-Ala-Cys-Asn-Pro-Ala-Thr-Ala-Thr-Ser-Phe	21
Ch-5	Thr-Thr-Asp-Ala-Ser-Gly-Ala-Ala-Ser-Phe	10
Ch-6	Ser-Phe	2
Ch-7	Val-Arg-Lys-Ser-Tyr	5
Ch-8	Ala-Gly-Glx-Thr-Pro-Ser-Gly-(Asx, Thr, Ser, Pro, Gly, Val ₂)-Cys-Ala-Thr-Asp-Ala-Cys-Asn-Leu	22
Ch-9	Gly-Ala-Gly-Asn-Ser-Gly-Leu-Asn-Leu-Gly-His-Val-Ala-Leu	14
Ch-10	Thr-Phe-Gly	3
	Tyr	1

ность КМА была определена ранее [1] прямым методом Эдмана:

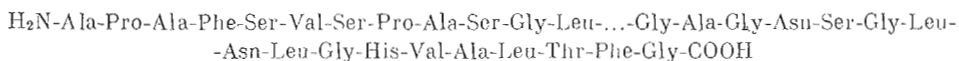


При сравнении этого фрагмента с данными табл. 4 становится очевидным, что он включает пептиды Ch-1 и Ch-2.

Ранее было установлено, что С-концевой аминокислотой актиноксантина является глицин. При действии карбоксипептидазы А на КМА С-концевую последовательность белка установить не удалось, однако было показано, что С-концевой фрагмент включает остатки треонина, аланина, валина, лейцина, фенилаланина и гистидина [1]. Как видно из табл. 2, этот набор аминокислот соответствует С-концевому фрагменту, составленному из пептидов Ch-9 и Ch-10.

Для получения более строгих доказательств этого предположения был выполнен химотриптический гидролиз КМА, в котором С-концевой глицин был предварительно помечен тритием по методу Мацуо. Двумерную карту химотриптического гидролизата проявляли кадмий-нингидриновым реагентом (см. раздел «Экспериментальная часть»), пятна вырезали и определяли уровень включения трития. Единственное пятно с высоким уровнем радиоактивной метки соответствовало смеси пептидов Ch-6 и Ch-10. Пептид Ch-6 (Ser-Phe) не может быть С-концевым фрагментом цепи, следовательно, им действительно является пептид Ch-10.

Таким образом, последовательность N- и С-концевого фрагментов актиноксантина может быть представлена следующим образом:



Экспериментальная часть

Актиноксантин был получен по ранее описанной методике [2,3]. При получении КМА и АЭА руководствовались стандартными методами [10, 11].

N-концевые аминокислоты определяли с использованием 4—8 нмоль вещества в виде Dns-производных по стандартной методике [12]. Хроматографию дансил-аминокислот выполняли на пластинках (6 × 6 см) с силикагелем КСК в следующих системах [13]: метилацетат — изопропанол — 25% NH₄OH (9 : 7 : 1); бензиловый спирт — хлороформ — этилацетат — уксусная кислота (6,6 : 9,8 : 7,8 : 0,5), бензиловый спирт — хлороформ — метанол — уксусная кислота (9 : 11 : 2,5 : 2,5).

Анализ N-концевой последовательности и полный гидролиз отдельных пептидов (20—40 нмоль) проводили лейцинаминопептидазой [14] («Serva», ФРГ).

Для определения С-концевых аминокислот и С-концевой последовательности 20—40 нмоль пептидов гидролизовали карбоксипептидазой А [15] (Worthington Biochem. Corp., США) (рН 8,5; 37°), обработанной диизопропилфторфосфатом. После гидролиза свободные аминокислоты определяли качественно в виде Dns-производных и количественно на аминокислотном анализаторе.

С-концевые аминокислоты определяли также путем включения тритиевой метки по Мацуо [16] с использованием 20—40 нмоль пептидов.

Полный гидролиз белка и пептидов проводили 6 н. HCl при 110° в течение 24 ч в вакуумированных запаянных ампулах. Гидролизат (10—20 нмоль) анализировали на анализаторе аминокислот BIO-CAL201 («Beckman», США).

Гидролиз КМА и АЭА химотрипсином (Worthington Biochem. Corp., США) проводили в 0,1%-ном бикарбонате аммония (рН 8,2) с начальным соотношением фермент — субстрат, равным 1 : 100, и конечным — 1 : 50. Гидролиз заканчивали через 5,5 ч, гидролизат подкисляли, замораживали и лиофилизовали.

Триптический гидролиз пептидов, содержащих Aet-Cys, проводили свиным трипсином («Novo», Дания) при 37° в течение 10 ч в N-этилморфолин-ацетатном буфере (рН 8) при соотношении фермент — субстрат, 1 : 100.

Для получения двумерных карт 20—40 нмоль гидролизата КМА или АЭА в 0,1% NH₄OH наносили на хроматографическую бумагу FN12 (55 × 62 см, «Filtrak», ГДР). Хроматографию проводили двукратно в системе *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода (15 : 10 : 3 : 12) [17]. Высоковольтный ЭФ на бумаге проводили в пиридин-ацетатных буферах с рН 3,5 (пиридин — уксусная кислота — вода, 1 : 10 : 189) и рН 6,5 (пиридин — уксусная кислота — вода, 25 : 1 : 250) при 75 В/см (40 мин) и 60 В/см (60 мин) соответственно.

Пептиды на бумаге проявляли кадмий-нингидриновым реагентом [18].

Для препаративного фракционирования химотриптический гидролизат КМА (52 мг в 2 мл 0,02 М бикарбоната аммония) наносили на колонку с сефадексом G-25 (f). Условия фракционирования приведены на рис. 2. Полученные фракции А, В, С и D разделяли затем с помощью препаративной БХ и высоковольтного ЭФ на бумаге в условиях, использовавшихся для получения двумерных карт (табл. 1).

Химотриптический гидролизат АЭА фракционировали на катионите аминекс AG 50WX2, 200—325 меш. 24 мг гидролизата растворяли в 1 мл бидистиллированной воды, подкисляли 2н. HCl до рН 2 и фракционировали на колонке 0,9 × 90 см, уравновешенной 0,2 М пиридин-ацетатным буфером с рН 3,1 при 40°. Деление проводили в системе экспоненциальных градиентов пиридин-ацетатных буферов, поступающих на колонку в следующем порядке: 75 мл 0,2 М буфера с рН 3,1 (1); последовательно градиенты 500 мл 0,2 М буфера с рН 3,1 → 500 мл 0,5 М буфера с рН 5,0 (2) → 190 мл 2,0 М буфера с рН 5,0 при 50°(3); 190 мл 2,0 М буфера с рН 5,0 (4) и 190 мл 2 М пиридина. Собирали фракции по 2,15 мл при скорости элюирования 18 мл/ч. Анализ фракций проводили флуориметрически после реакции с нингидрином и фенилацетальдегидом по следующей методике: из каждой фракции отбирали по 0,2 мл, упаривали досуха в вакуум-сушильном шкафу при 40°, добавляли 3 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 8), 0,2 мл раствора нингидрина в воде (50 мМ); 0,1 мл раствора фенилацетальдегида в этаноле (10 мМ), инкубировали при 60° 15 мин, быстро охлаждали и измеряли интенсивность флуоресценции на спектрофлуориметре «Hitachi» MPF-3 (Япония) ($\lambda_{возб}$ 390 нм, $\lambda_{исп}$ 490 нм).

Последовательность аминокислот в пептидах определяли по методу Эдмана в модификации Грея и Хартли [19] Дикарбоновые аминокислоты и их амиды определяли на одном образце, сочетая прямой метод Эдмана [20] с дансильной методикой. Все реактивы для деградации по Эдману были очищены до отсутствия реакции на альдегиды.

Стандартная методика. К 50—100 нмоль пептида в 0,3 мл 50%-ного водного пиридина добавляли 0,1 мл раствора фенилизотиоцианата в пиридине (50 мкл/мл) и инкубировали под аргоном при 45° 60 мин. При выполнении комбинированной методики реакционную смесь после завершения конденсации экстрагировали бензолом 2 × 2 мл, а затем упаривали и высушивали при 60° 60 мин в вакууме (2 × 10⁻² мм). К сухому остатку добавляли 0,3 мл безводной трифторуксусной кислоты и инкубировали под аргоном при 45° 30 мин. Затем трифторуксусную кислоту упаривали на роторном испарителе и сухой остаток досушивали при 60° в вакууме (2 × 10⁻² мм). К сухому остатку добавляли 0,3 мл бидистиллированной воды и проводили экстракцию этилацетатом 3 × 0,2 мл. При выполнении комбинированной методики экстракт упаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл 1н. HCl и инкубировали при 80° 10 мин. Кислотный раствор экстрагировали этилацетатом 3 × 1 мл, экстракт упаривали досуха и Pth-аминокислоты определяли хроматографически на пластинках 6 × 6 см, покры-

тых силикагелем КСК, содержащим гипс и люминофор К-60, в следующих системах [21—23]: хлороформ — 1,5%-ный этанол (А) (дважды); система А — метанол (9 : 0,5); система А — ледяная уксусная кислота (8 : 2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Черчес Б. З., Чунова Л. А., Решетов П. Д., Хохлов А. С. (1975) Биоорг. химия, **1**, 688—690.
2. Хохлов А. С., Черчес Б. З., Решетов П. Д., Смирнова Г. М., Колодицкая Т. А., Сорокина И. Б., Прокопцева Т. А., Рябова И. Д., Смирнов В. В., Навашин С. М., Фомина И. П. (1970) Изв. АН СССР. Сер. биол., **5**, 755—763.
3. Khokhlov A. S., Cherches B. Z., Reshetov P. D., Smirnova G. M., Sorokina I. B., Prokoptzeva T. A., Koloditskaja T. A., Smirnov V. V., Navashin S. M., Phomina I. P. (1970) J. Antibiot., **22**, 541—544.
4. Moore S., Stein W. H. (1948) J. Biol. Chem., **176**, 367—388.
5. Hirs C. W. H., Moore S., Stein W. H. (1956) J. Biol. Chem., **219**, 623—642.
6. Kimura M., Murayama K., Namoto M., Fujita J. (1969) J. Chromatogr., **41**, 458—461.
7. Udenfriend S., Stein S., Böhlen P., Dairman W., Stone J. (1972) Science, **178**, 871—872.
8. Nakai N., Lai C. Y., Horecker B. L. (1974) Anal. Biochem., **58**, 563—570.
9. Samejima K., Dairman W., Stone J., Udenfriend S. (1971) Anal. Biochem., **42**, 237—247.
10. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. (1963) J. Biol. Chem., **238**, 622—627.
11. Raftery M. A., Cole R. D. (1966) J. Biol. Chem., **241**, 3457—3461.
12. Gray W. R., Hartley B. S. (1963) Biochem. J., **89**, 59 p.
13. Spivak V. A., Sherbukhin V. V., Orlov V. M., Varshavsky Ya. M. (1971) Anal. Biochem., **39**, 271—281.
14. Light A. L. (1967) Methods in Enzymol. (Hirs C. H. W. ed.), Academic Press, N. Y., **XI**, 417—420.
15. Ambler R. P. (1967) Methods in Enzymol. (Hirs C. H. W., ed.), Academic Press, N. Y., **XI**, 455—466.
16. Matsuo H., Fujimoto I., Tatsuno T. (1966) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **22**, 69—74.
17. Waley S. G., Watson J. (1953) Biochem. J., **55**, 328—337.
18. Dreyer W. J., Bynum E. (1967) Methods in Enzymol. (Hirs C. H. W., ed.), Academic Press, N. Y., **XI**, 32—39.
19. Gray W. R., (1967) Methods in Enzymol. (Hirs C. H. W., ed.), Academic Press, N. Y., **XI**, 469—475.
20. Schroder W. A., (1967) Methods in Enzymol. (Hirs C. H. W., ed.), Academic Press, N. Y., **XI**, 445—361.
21. von Brenner M., Niederwieser A., Pataki G. (1961) Experientia, **17**, 145—153.
22. Pataki G. (1964) Chimia, **18**, 23—24.
23. Степанов В. М., Ланук Я. И. (1966) Ж. общ. химии, **36**, 40—44.

Поступила в редакцию
3.I.1975

ACTINOXANTHIN. IV. CHYMOTRYPTIC PEPTIDES OF ACTINOXANTHIN

CHUROVA L. A., RESHETOV P. D., KHOKHLOV A. S.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Reduced and alkylated actinoxanthin was digested with chymotrypsin; the resulting fragments were separated on Aminex AG 50Wx2 and purified by paper chromatography and electrophoresis. Twenty peptides were isolated, the sequences of 10 non-overlapping peptides (which constitute about 100 amino acid residues) being determined. This allowed, with the use of earlier findings, to deduce the structure of the N- and C-terminal fragments.