

Т. В. ГОРПИНЧЕНКО, А. Б. ВАКАР
член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ

ПРОТЕИНДИСУЛЬФИДРЕДУКТАЗА ПШЕНИЦЫ

Реакция ферментативного восстановления дисульфидных связей в белках, катализируемая ферментом протеиндисульфидредуктазой (восстановленный НАД(Ф): протеиндисульфид — оксидоредуктаза 1.6.4.4) играет, по-видимому, важную роль в процессах формирования и распада белкового комплекса клейковины при созревании и прорастании пшеницы. Между тем до настоящего времени протеиндисульфидредуктаза пшеницы остается почти не изученной (¹⁻⁴).

Настоящая работа имела целью показать наличие протеиндисульфидредуктазной активности в покоящихся и прорастающих семенах пшеницы и получить некоторые предварительные сведения об этом ферменте.

Опыты проводились на озимой пшенице сорта Немчиновская 495. Материалом служило цельносмолотое зрелое зерно и зерно, прораставшее трое суток, которое анализировали в свежем состоянии, предварительно отделив ручную эндосперм от проростков.

Для получения ферментной вытяжки навеску материала растирали в течение 15 мин. на холоду в фарфоровой ступке с двойным количеством 0,01 М трис-буфера, рН 7,4, содержавшего 10^{-3} М ЭДТА. Гомогенат центрифугировали 15 мин. при 6000 об/мин, а затем еще 20 мин., при 16 000 об/мин. Полученный центрифугат использовали в качестве ферментного экстракта.

Активность протеиндисульфидредуктазы в экстрактах определяли в присутствии кофакторов: НАДФ-Н₂ (кристаллический препарат фирмы «Boehringer и Soehne») и динатриевой соли глюкозо-6-фосфата (фирмы «Reanal») (^{1, 4}).

Субстратами в разных опытах служили: сывороточный альбумин крупного рогатого скота, лиофилизированная пшеничная клейковина и альбумин пшеницы.

Активность протеиндисульфидредуктазы определяли методом Хэтч и Тэрнер (¹), в модификации Проскурякова и Зуевой (²⁻⁴) по увеличению количества белковых сульфгидрильных групп за время инкубации реакционной смеси следующего состава: раствор субстрата 1,5 мл (15—60 мг белка, в зависимости от субстрата), ферментный экстракт 0,3—1,0 мл (3—10 мг белка), НАДФ-Н₂ 1,5 мг (1,8 μ мол.), глюкозо-6-фосфат 4 мг (10 μ мол.), 0,01 М трис-буфер, рН 7,4, содержащий 10^{-3} М ЭДТА до конечного объема 3 мл, рН реакционной смеси 7,4.

Инкубацию проводили в трубках Тунберга, заполненных азотом, при температуре 37° в течение 1 часа, после чего реакцию останавливали охлаждением смеси во льду и немедленно отбирали пробы для анализа.

В контрольных опытах реакционная смесь не содержала кофакторов и не подвергалась инкубации, а в некоторых случаях инкубировалась с прокипяченным ферментным экстрактом и кофакторами.

Содержание сульфгидрильных групп и дисульфидных связей в опытных и контрольных растворах определяли методом амперометрического титрования с азотнокислым серебром в атмосфере азота, используя реакционную смесь Бенеша, Ларди, Бенеша (^{5, 6}).

Белок определяли методом Лоури. Количество SH-групп и S—S связей выражали в микроэквивалентах на 1 г белка.

Предварительными опытами было показано, что инкубация ферментных экстрактов из зрелого зерна и зерна, прораставшего трие суток, с кофакторами, но без добавления субстратного белка, приводила к заметному возрастанию общего содержания сульфгидрильных групп в реакционных смесях. Количество этих групп увеличивалось в опытах со зрелым и проросшим зерном соответственно, в 1,8 и 3,5 раза. Это могло быть результатом ферментативного восстановления дисульфидных связей не только

Т а б л и ц а 1

Активность протеиндисульфидредуктазы зрелого зерна пшеницы и зерна, прораставшего в течение 3 суток (без проростков). Субстрат: сывороточный альбумин

Зерно	SH, μ экв. на 1 г белка			S—S, μ экв. на 1 г белка		
	контроль	опыт	$\frac{\text{опыт}}{\text{контроль}}$	контроль	опыт	$\frac{\text{опыт}}{\text{контроль}}$
Исходное	11,2	24,5	2,2	14,0	6,8	0,49
Прорастание 3 суток	2,1 *	8,9	4,2	19,0	10,5	0,55

* В этом опыте контролем служил прокипяченный ферментный экстракт, инкубированный с субстратом и кофакторами, а затем подвергнутый гель-фильтрации через сефадекс Г-50.

в белках, но и в некоторых низкомолекулярных соединениях (окисленный глутатион, цистин).

Чтобы проследить за восстановлением дисульфидных связей только в белках, требовалось отделить их от низкомолекулярных тиолов и дисульфидов. С этой целью ферментный экстракт, после инкубации с субстратом и кофакторами, подвергали гель-фильтрации через восстановленный боргидрид натрия сефадекс Г-50, элюировали белок 0,01 М трис-буфером, pH 7,4, в атмосфере азота и в первых 50 мл элюата, содержавших большую часть белка, нанесенного на колонку, определяли содержание SH-групп, S—S-связей и белка.

В контрольном опыте исходный ферментный экстракт подвергали гель-фильтрации в тех же условиях, а затем к элюату добавляли субстрат без кофакторов и немедленно без инкубации определяли в смеси содержание сульфгидридных групп, дисульфидных связей и белка.

Увеличение количества SH-групп в расчете на 1 г белка в опытной пробе по сравнению с контрольной служило показателем активности протеиндисульфидредуктазы.

Попытка заменить гель-фильтрацию диализом ферментного экстракта не имела успеха вследствие очень сильного окисления сульфгидрильных групп во время диализа и инактивирования фермента.

Результаты опытов, представленные в табл. 1, показывают, что зерно пшеницы содержит активную протеиндисульфидредуктазу, способную

Т а б л и ц а 2
Активность протеиндисульфидредуктазы из эндосперма зерна и проростков пшеницы, прораставшего 3 суток *.

Фракции, полученные осаждением при концентрациях $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, % от насыщения	SH-группы, μ экв. на 1 г белка		$\frac{\text{Опыт}}{\text{Контроль}}$
	контроль	опыт	
0—90	1,0	2,9	2,9
0—90	7,7	34,4	4,5
0—45	0,9	2,7	3,0
0—30	4,0	4,0	0
45—60	1,1	3,1	2,8
30—60	3,4	40,8	12,0
60—90	3,9	3,2	0,8
60—90	3,4	3,4	0

* Числа над чертой — данные для эндосперма пшеницы, под чертой — для проростков.

катализировать восстановление дисульфидных связей в белке с образованием сульфгидрильных групп.

Прораствание зерна в течение 3 суток приводит к заметному повышению активности протеиндисульфидредуктазы.

В следующих опытах ферментные экстракты из зерна, прораствовавшего 3 суток, фракционировали сульфатом аммония, отделяли полученные осадки центрифугированием (16000 об/мин), перерастворяли в минимальном объеме 0,01 *M* трис-буфера, pH 7,4, содержащего 10^{-3} *M* ЭДТА, и после диализа против этого же растворителя использовали диализаты в качестве источника фермента.

Субстратом в этих опытах служили лиофилизированная пшеничная клейковина, диспергированная в 12% водном растворе салицилата натрия ⁽⁶⁾ (для фермента из эндосперма) и водный раствор альбумина пшеницы (для фермента из проростков).

Результаты, представленные в табл. 2, показывают, что как эндосперм, так и проростки проросшего зерна содержат активную протеиндисульфидредуктазу в белковых фракциях, осаждаемых сульфатом аммония при концентрациях, не превышающих 60% от насыщения.

Таблица 3
Определение протеолитической активности в реакционной смеси, инкубируемой в условиях измерения активности протеиндисульфидредуктазы

Варианты опыта	Тирозин в реакционной смеси, μ г	μ г тирозина 1 мг белка
До инкубации (контроль)	351,0	23,1
Инкубация 15 мин.	342,6	22,6
Инкубация 1 час.	336,0	22,1

Примечание. Фермент: фракция экстракта из 3-суточных проростков пшеницы, осажденная сульфатом аммония при 30–60% от насыщения. Субстрат: альбумин пшеницы; температура 37°.

протеиндисульфидредуктазной активности, а за счет освобождения на первых стадиях протеолиза некоторого количества ранее «скрытых» SH-групп белка ⁽⁷⁾. Известно, что при прорастаннии зерна в нем увеличивается активность протеолитических ферментов, однако оптимальная реакция среды для них лежит в гораздо более кислой области (при pH 3,5–4,0) ⁽⁸⁾, чем оптимум pH протеиндисульфидредуктазы (pH 7,4).

Кроме того, специальный опыт показал, что в отсутствие кофакторов инкубация пшеничного альбумина с активным ферментом из проросшего зерна не приводит к увеличению SH-групп в опыте по сравнению с контролем, хотя условия для протеолиза в вариантах с кофакторами и без них одинаковы.

Чтобы выяснить этот вопрос, был поставлен следующий опыт.

Наиболее активную фракцию протеиндисульфидредуктазы, полученную из 3-суточных проростков пшеницы осаждением экстракта сульфатом аммония при 30–60% от насыщения, инкубировали в обычных условиях с альбумином пшеницы и кофакторами в течение 15 мин. и 1 часа.

В реакционных смесях до и после инкубации осаждали белок 2,5% трихлоруксусной кислотой и в фильтрате определяли количество тирозина колориметрическим методом с реактивом Фолина ⁽⁹⁾. По увеличению тирозина за время инкубации можно судить о протеолизе белка.

Результаты этого опыта, представленные в табл. 3, ясно показывают, что в условиях определения протеиндисульфидредуктазной активности никакого протеолиза субстратного белка не происходит.

Следовательно, увеличение количества сульфгидрильных групп белка в этих условиях действительно отражает активность протеиндисульфид-редуктазы в испытываемых экстрактах.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
7 II 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. D. Hatch, J. F. Turner, *Biochem. J.*, 76, № 3, 556 (1960). ² Н. И. Проскуряков, Е. С. Зуева, *Биохимия*, 28, № 2, 316 (1963). ³ Н. И. Проскуряков, Е. С. Зуева, *ДАН*, 158, № 1, 232 (1964). ⁴ И. С. Асриян, Е. С. Зуева, Н. И. Проскуряков, *Прикл. биохим. и микробиол.*, 1, № 5, 500 (1965). ⁵ А. И. Агатова, Н. И. Проскуряков, *Биохимия*, 27, № 1, 88 (1962). ⁶ О. С. Шорина, А. Б. Вакар, В. Л. Кретович, *Прикл. биохим. и микробиол.*, 3, № 4, 379 (1967). ⁷ Ю. М. Торчинский, Сульфгидрильные и дисульфидные группы белков, «Наука», 1971. ⁸ И. Д. Береш, А. Б. Вакар, Н. И. Соседов, *ДАН*, 203, № 2 (1972). ⁹ И. С. Петрова, М. М. Винцюнайте, *Прикл. биохим. и микробиол.*, 2, № 3, 322 (1966).