



УДК 577.156.02

СВОЙСТВА ИНГИБИТОРА СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ  
ИЗ КАРТОФЕЛЯ*Мосолов В. В., Малова Е. Л., Валужева Т. А.,  
Шульмина А. И.**Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР, Москва*

Из клубней картофеля с помощью изоэлектрического фокусирования в зоне рН 6—8 выделен термостабильный белок с ИЭТ при рН 7,3 и с  $M$  14 500 $\pm$ 300. Белок характеризуется относительно высоким содержанием полуцистина и пролина. N-концевым аминокислотным остатком белка является метионин, C-концевым — серин. В белке обнаружено 7 дисульфидных мостиков. Показано, что выделенный белок является ингибитором сериновых протеиназ с широким спектром действия.

Исследование белков и пептидов — природных ингибиторов ферментов важно для понимания путей и механизмов регуляции ферментативной активности в живых организмах. Кроме того, реакция белков — ингибиторов с ферментами является удобной моделью для изучения специфических белок — белковых взаимодействий [1]. В случае протеиназ изучение реакции с природными ингибиторами открывает новые возможности для исследования механизма связывания и превращения истинных белковых субстратов [2, 3].

В представленной работе описано получение из клубней картофеля (*Solanum tuberosum*) белка — ингибитора сериновых протеиназ с широким спектром действия и приведена его частичная химическая характеристика.

В предыдущей работе описано выделение из клубней картофеля белка — ингибитора трипсина и химотрипсина с  $pI$  7,2 [4]. Ингибитор был значительно активнее в отношении химотрипсина, чем в отношении трипсина. Позднее удалось показать, что при изоэлектрическом фокусировании в узкой зоне рН 6—8 в течение достаточно продолжительного времени компонент с  $pI$  7,2 может быть разделен на два различных белка с  $pI$  7,1 и 7,3. Первый из них лишен ингибиторной активности по отношению к трипсину, тогда как белок с  $pI$  7,3 характеризуется высокой антитриптической и антихимотриптической активностью.

После предварительной очистки (см. «Экспериментальная часть») термостабильные белки, содержащиеся в экстракте из клубней картофеля, подвергали фракционированию с помощью метода изоэлектрического фокусирования на препаративной колонке типа ЛКВ 8100—2 в зоне рН 6—8. (рис. 1). После повторного фокусирования в тех же условиях фракций, содержащих материал с  $pI$  около 7,3, был получен белок с  $pI$  7,3, который по данным изоэлектрического фокусирования на аналитической колонке свободен от примеси других белков (рис. 2).

Гомогенность полученного препарата белка подтверждается данными диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и  $\beta$ -меркаптоэтанола. В этих условиях белок мигрирует в виде одной полосы, его подвижность соответствует  $M 14\ 500 \pm 300^*$ . Определение молекулярного веса белка с помощью метода гель-хроматографии [5] дало значение 31 000. Удвоение молекулярного веса при определении методом гель-хроматографии по сравнению со значением, полу-

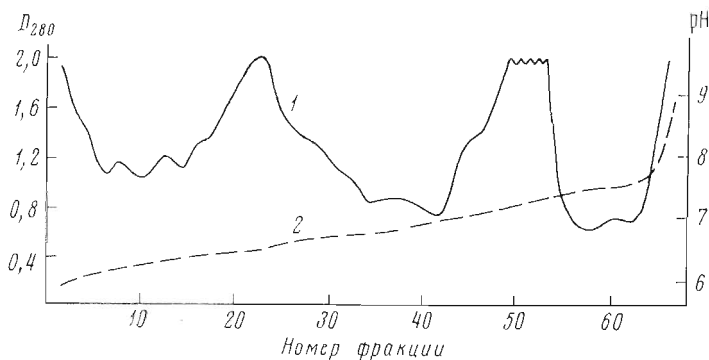


Рис. 1. Фракционирование термост бильных белков из клубней картофеля методом изоэлектрического фокусирования: 1 —  $D_{280}$ , 2 — pH

ченным с помощью электрофореза в условиях, обеспечивающих полную диссоциацию, очевидно, указывает на легкую ассоциацию молекул белка с  $pI$  7,3. Способность к полимеризации неоднократно отмечалась для некоторых других растительных белков, обладающих свойствами ингибиторов протеолитических ферментов [6—8]. Возможность того, что молекула белка с  $pI$  7,3 состоит из двух полипептидных цепей одинакового размера, соединенных дисульфидными мостиками, должна быть исключена, поскольку полная диссоциация наблюдается и без добавки  $\beta$ -меркаптоэтанола в присутствии одного додецилсульфата натрия.

Белок с  $pI$  7,3 имеет обычный спектр поглощения с максимумом, лежащим при 278 нм (рис. 3).  $E_{1\%}^{1\text{см}}$  при 280 нм 7,52.

Единственной  $\text{NH}_2$ -концевой аминокислотой, содержащейся во всех препаратах белка с  $pI$  7,3, при определении дансильным методом [9] был метионин. Однако некоторые препараты белка содержали следовые количества  $\text{NH}_2$ -концевого валина. При проведении реакции деградации по Эдману [10] образовывалось единственное фенилтиогидантоиловое производное метионина. Вторая аминокислота, освобождающаяся после проведения реакции Эдмана, была идентифицирована дансильным методом как тирозин. Таким образом, можно предполагать, что  $\text{NH}_2$ -концевая последовательность белка Met-Tyr... Для определения  $\text{COOH}$ -концевой аминокислоты нативный белок подвергали действию карбоксипептидазы А [11]. Единственной аминокислотой, освобождающейся в значительных количествах, был серин. После 24-часового гидролиза карбоксипептидазой выход свободной аминокислоты составлял  $\sim 0,5$  моль на 1 моль белка. Остальные аминокислоты освобождались в следовых количествах. Низкий выход аминокислот свидетельствует либо о наличии неблагоприятной для действия карбоксипептидазы А аминокислотной последовательности на  $\text{COOH}$ -конце белка, либо о малой доступности молекулы нативного белка действию фермента.

В табл. 1 приведен аминокислотный состав белка. Заслуживает внимания прежде всего высокое содержание полуцистина, а также пролина, глицина, аспарагиновой и глутаминовой кислот и лизина. В то же время

\* Опыты по определению молекулярного веса проводила Л. А. Дронова.

белок содержит только один остаток метионина и следовые количества триптофана. Отсутствие триптофана и низкое содержание метионина типично для многих ингибиторов протеиназ растительного происхождения [12]. Относительно высокое содержание пролина также является характерным для многих белков ингибиторов и может быть связано с особенностями конформации, делающими их устойчивыми к действию протеолитических ферментов [13].

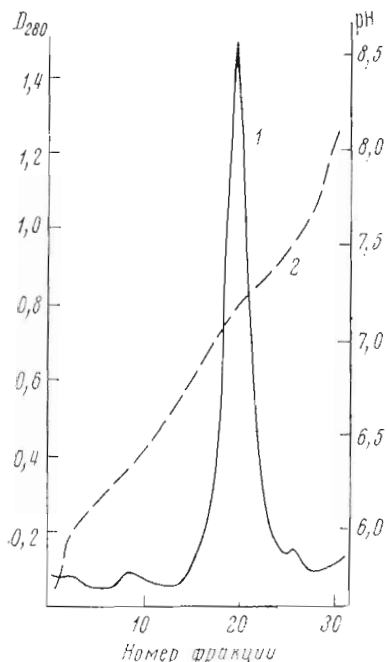


Рис. 2

Рис. 2. Аналитическое электрофокусирование очищенного белка — ингибитора с  $pI$  7,3: 1 —  $D_{280}$ , 2 —  $pH$

Рис. 3. УФ-спектр поглощения белка с  $pI$  7,3 (0,87 мг белка в 1 мл толщины слоя 1 см)

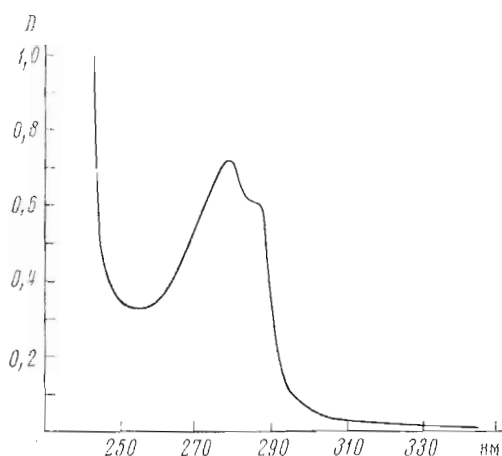


Рис. 3

Наличие 14 остатков полуцистина в белке позволяет предположить присутствие значительного числа дисульфидных связей. Для оценки количества дисульфидных связей проводили определение содержания сульфгидрильных групп в нативном белке и в белке после восстановления S—S-связей  $\beta$ -меркаптоэтанолом [14]. Результаты анализа (табл. 2) по-

Таблица 1

Аминокислотный состав белка с  $pI$  7,3

Аминокислота	Число остатков на молекулу *	Аминокислота	Число остатков на молекулу *	Аминокислота	Число остатков на молекулу *
Asp	10,80(11)	Ala	5,86(6)	Phe	2,69(3)
Tbr	9,40(9)	Val	4,07(4)	Lys	9,41(9)
Ser	8,82(9)	Met	0,74(1)	His	2,00(2)
Glu	11,23(11)	Ile	6,23(6)	Arg	4,14(4)
Pro	7,38(7)	Leu	5,58(6)	Trp	0,23(0)
Gly	16,01(16)	Tyr	7,98(8)	Cys	14,10(14)
					126 *
				Общее число остатков	13 533
				Молекулярный вес	

\* В расчете на 2 остатка His в молекуле, приведены средние величины для 24- и 48-часовых гидролизатов.

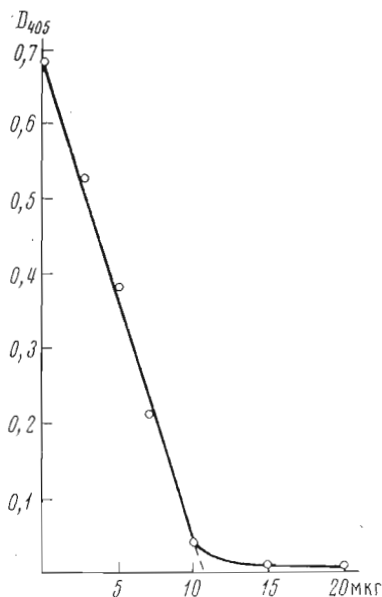


Рис. 4

Рис. 4. Влияние ингибитора на ферментативную активность трипсина. Субстрат *n*-нитроанилид бензоил-*DL*-аргинина (ось абсцисс: мкг ингибитора на 18,25 мкг активного трипсина)

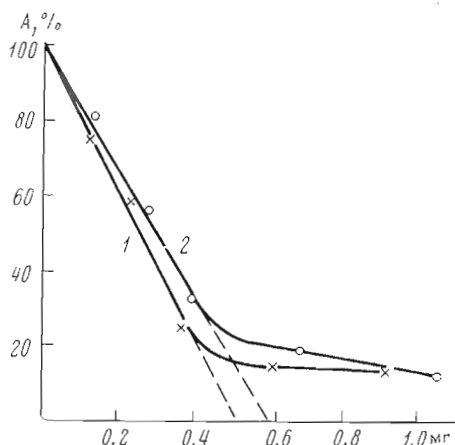


Рис. 5

Рис. 5. Влияние ингибитора на ферментативную активность (*A*)  $\delta$ -(1) и  $\alpha$ -химотрипсина (2). Ось абсцисс: мг ингибитора на 1 мг активного фермента

казали, что нативный белок не содержит свободных тиоловых групп, после восстановления обнаруживаются 14 SH-групп. Эти данные позволяют сделать вывод, что всего молекула белка содержит 7 дисульфидных мостиков. В нейтральной среде легко происходит спонтанное реокисление восстановленных —S—S-связей (табл. 2).

Определение углеводов в белке с фенолом и серной кислотой [15] показало, что их содержание не превышает 1,5% в пересчете на глюкозу. Очевидно, белок с *pI* 7,3 не является гликопротеидом.

Таблица 2

Содержание SH-групп в нативном белке и после восстановления  $\beta$ -меркаптоэтанолом

Характеристика образца	Содержание белка, мкмоль	Содержание SH-групп, мкмоль	Число SH-групп на моль белка
Нативный	0,25	0,002	0,008
После восстановления	0,0045	0,0645	14,30
»	0,018	0,253	14,05
Восстановленный, инкубация 6 ч при <i>pH</i> 8,0	0,0045	0,002	0,44

Определение ингибиторной активности белка с *pI* 7,3 по отношению к трипсину (рис. 4) показало, что 1 мг белка способен снизить на 50% активность 3,2—3,4 мг трипсина (здесь и далее все расчеты сделаны на активный фермент, содержание которого определяли титрованием активных центров, см. «Экспериментальную часть»). Эта активность соответствует содержанию 1,9 миллиединиц (мЕ) ингибитора по Верле в 1 мкг белка

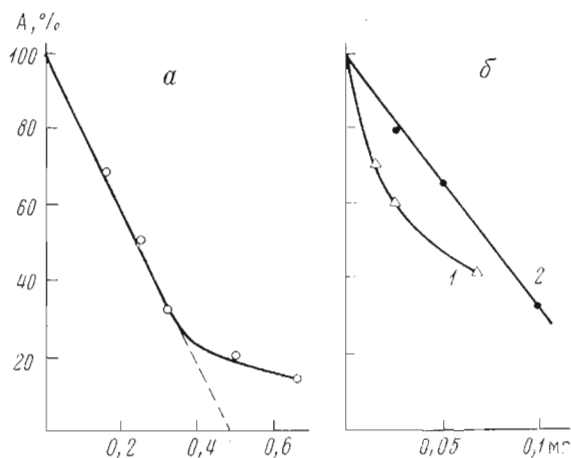


Рис. 6. Влияние ингибитора на ферментативную активность ( $A$ ) субтилизина ( $a$ ) и проназы ( $b$ ): 1 — БАЭЭазная и 2 — АТЭЭазная активности проназы. Ось абсцисс: мг ингибитора на 1 мг активного фермента ( $a$ ) и мг ингибитора на 1 мг препарата ( $b$ )

[16]. Значение константы диссоциации соединения трипсин — ингибитор ( $K_i$ ), равное  $2 \cdot 10^{-10}$  М было рассчитано по методу Грина [17].

Белок с  $pI$  7,3 является также эффективным ингибитором химотрипсина (рис. 5), причем действие ингибитора сильнее проявляется в отношении  $\delta$ -формы фермента. Можно полагать, что гидролиз дополнительной пептидной связи в молекуле фермента приводит к образованию более развернутой конформации, менее благоприятной для связывания природных ингибиторов.

Действие белка с  $pI$  7,3 на протеиназы микроорганизмов представлено на рис. 6. Как видно, белок подавляет активность как субтилизина, так и протеиназ комплекса проназы, гидролизующих этиловый эфир бензоил- $L$ -аргинина (БАЭЭ) и этиловый эфир ацетил- $L$ -тирозина (АТЭЭ) (так называемые щелочные протеиназы  $b$ ,  $a$  и  $c$  [18]). Так как все эти ферменты, подобно трипсину и химотрипсину, являются сериновыми протеиназами, белок с  $pI$  7,3 следует рассматривать как ингибитор сериновых протеи-

Таблица 3

Молекулярные веса белка с  $pI$  7,3

Способ определения	$M$
Гель-хроматография	31 000
Электрофорез в полиакриламидном геле	$14\,500 \pm 300$
Аминокислотный состав	13 533
Реакции	
с трипсином	14 400
с $\delta$ -химотрипсином	13 500
с $\alpha$ -химотрипсином	14 500
с субтилизином	13 700

наз с широким спектром действия. Кроме упомянутых выше ферментов, ингибитор способен угнетать активность плазмина. В то же время белок с  $pI$  7,3 не оказывал ингибирующего действия на папаин и пепсин — типичных представителей классов цистеиновых и кислых протеиназ.

На основании весовых соотношений ингибитора и фермента при 100%-ном подавлении ферментативной активности (определяли экстраполяцией

линейных участков кривых, отражающих зависимость между активностью фермента и количеством добавленного ингибитора, рис. 4—6) были рассчитаны эквивалентные молекулярные веса ингибитора. Полученные результаты приведены в табл. 3. Близкое совпадение молекулярных весов, рассчитанных из реакций ингибирования трех различных ферментов, позволяет сделать вывод, что ингибиторная активность по отношению к каждому из ферментов принадлежит одной белковой молекуле. Это является важным критерием, подтверждающим функциональную гомогенность белка с  $pI$  7,3. Хорошее соответствие между значениями молекулярного веса, рассчитанными на основании реакции с ферментами, и значениями, определенными с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и аминокислотного анализа, в свою очередь, может рассматриваться как еще одно доказательство отсутствия примеси посторонних белков, лишенных ингибиторной активности.

### Экспериментальная часть

Клубни картофеля сорта Любимец измельчали в механической мясорубке и экстрагировали равным объемом 1%-ного раствора NaCl в 0,1 н. HCl в течение часа при комнатной температуре. Экстракт фильтровали, фракционировали сульфатом аммония и диализовали, как описано ранее [4]. После диализа экстракт нагревали при 80° в течение 5 мин, выпавший осадок отделяли фильтрованием или центрифугировали и раствор, содержащий термостабильные белки, лиофилизировали. Выход составлял ~1 г препарата из 1 кг клубней, активность 0,7 мЕ ингибитора (см. ниже) в 1 мкг сухого материала. Дальнейшую очистку ингибитора вели с помощью метода препаративного изоэлектрического фокусирования.

1 г препарата термостабильных белков, полученных как описано выше, вносили в колонку фирмы LKB (Швеция) типа 8100-2 объемом 440 мл. Изоэлектрическое фокусирование проводили в градиенте плотности сахарозы от 0 до 40% и градиенте pH 6—8, который создавали с помощью амфолинов марки LKB 8154 (конечная концентрация 1,1%). Разделение проводили при +2° в течение 72 ч при напряжении 800 В и силе тока 3,8 мА.

В процессе разделения наблюдали образование значительных количеств агрегированного белка, который накапливался в зоне с pH 10. Образовавшиеся агрегаты отбирали с помощью тонкой полиэтиленовой трубки. После завершения фокусирования собирали фракции объемом 3,3 мл, в которых измеряли  $D_{280}$  на спектрофотометре СФ-16 и pH с помощью pH-метра рН262. Фракции 45—55 (рис. 1) объединяли и повторно фокусировали в тех же условиях без предварительного отделения амфолинов и сахарозы.

Полученный после повторного электрофокусирования материал с  $pI$  7,3 наносили на колонку (2,4 × 50 см) с сефадексом G-50 (размер частиц 50—150 мк), который был уравновешен водой. Элюцию проводили с помощью бидистиллята. Во фракциях элюата определяли содержание белка по  $D_{280}$ , сахарозы и амфолинов по реакции с  $\alpha$ -нафтолом [19] и по величине  $D_{250}$  [20]. Фракции, содержащие белок и свободные от сахарозы и амфолинов, лиофилизировали. Выход сухого белка ~ 20 мг.

Чистоту полученного препарата проверяли с помощью изоэлектрического фокусирования в аналитической колонке LKB 8100—1 объемом 110 мл в интервале pH 6—8 (рис. 2).

Трипсин (КФ 3.4.4.4) — коммерческий препарат фирмы «Srofa» (Чехословакия) перекристаллизовывали из сульфата магния [21], диализовали против 0,001 н. HCl и лиофилизировали. Содержание активного фермента в препарате, определенное титрованием активных центров *n*-нитрофениловым эфиром *n*'-гуанидинбензойной кислоты [22], составляло 73,0%.

Химотрипсиноген А выделяли из поджелудочных желез крупного рогатого скота и пятикратно перекристаллизовывали из сульфата аммония [21]. Кристаллический  $\alpha$ -химотрипсин (КФ 3.4.4.5) получали после активации химотрипсиногена трипсином в обычных условиях [21]. Фермент диализовали против 0,001 н. HCl и лиофилизовали.

Для получения  $\delta$ -химотрипсина 400 мг химотрипсиногена инкубировали с 12 мг трипсина 90 мин в ячейке рН-стата при рН 7,3 и 0°. Для удаления следов трипсина активационную смесь пропускали при рН 7,3 (0,005 М трис-HCl буфер) через колонку с иммобилизованным куриным овомукоидом, белком специфически связывающим трипсин [23]. Свободный от трипсина  $\delta$ -химотрипсин обессоливали на колонке с сефадексом G-15 и лиофилизовали. Содержание активного химотрипсина в препаратах, определенное титрованием активных центров *N-транс*-циннамоилимидазолом [24], составляло 81% для  $\alpha$ -химотрипсина и 92% для  $\delta$ -химотрипсина.

Протеиназа *Bac. subtilis* субтилизин (КФ 3.4.4.16) — кристаллический препарат фирмы «Nagase» (субтилизин BPN', Япония) с содержанием активного фермента 45% (определено титрованием *N-транс*-циннамоилимидазолом [25]). Проназа — комплексный препарат протеолитических ферментов *Str. griseus* производства фирмы «Kaken» (Япония). Папаин (КФ 3.4.4.10) — частично очищенный препарат фирмы «Merck» (ФРГ). Ввиду ограниченной растворимости препарата содержание фермента в растворе определяли по оптической плотности ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 25$  при 280 нм [26]). Пепсин (КФ 3.4.4.1) — кристаллический препарат получали кристаллизацией из спирта [21]. Плазмин (КФ 3.4.4.14) — препарат, полученный из лаборатории свертывания крови МГУ.

Другие белковые препараты: цитохром с (BDH Англия), РНКаза («Worthington», США), лизоцим («Reanal», Венгрия), бычий сывороточный альбумин, фракция V («Koch-Light», Англия), кристаллический альбумин из куриных яиц получали как описано в работе [27],  $\gamma$ -глобулин — препарат, полученный из института им. Мечникова.

Определение активности трипсина проводили с *n*-нитроанилидом бензоил-*DL*-аргина (Sigma) США с помощью модифицированной процедуры Верле и соавт. [16]. Модификация включала увеличение содержания трипсина в кювете спектрофотометра до 25 мкг и продолжительности регистрации  $\Delta D_{405}$  до 10 мин. Измерения проводили на регистрирующем спектрофотометре «Spectord» (ГДР), снабженном термостатируемым кюветодержателем. 1 МЕ трипсина соответствует увеличению экстинкции  $\Delta D_{405} = 0,00332$  за 1 мин. [16].

Активность химотрипсина определяли потенциометрическим методом [28], используя в качестве субстрата этиловый эфир ацетил-*L*-тирозина («Reanal» Венгрия). Ячейка рН-стата («Radiometer» ТТГ Ic, Дания) содержала 0,005 М трис-HCl буфер (рН 8,0), 0,04 М NaCl и 0,02 М CaCl<sub>2</sub>, конечная концентрация субстрата 0,01 М.

Активность субтилизина определяли в тех же условиях за исключением того, что концентрация этилового эфира ацетил-*L*-тирозина была увеличена до 0,02 М.

Активность проназы по отношению к БАЭЭ и АТЭЭ определяли титриметрически как описано в работе [18].

Активность папаина определяли с БАЭЭ [26], активность пепсина — модифицированным методом Ансона с гемоглобином [29], активность плазмина — по методу Фрица и соавт. [16].

При выяснении ингибиторной активности белка определенное его количество инкубировали с ферментом 5 мин при комнатной температуре и в аликвотах определяли активность фермента одним из перечисленных выше методов. За 1 МЕ ингибитора в соответствии с рекомендациями Верле и соавт. [18] принято количество ингибитора, снижающее активность 2 МЕ трипсина на 50%.

Аминокислотный состав определяли после гидролиза 6 н HCl в вакууме при 110° в течение 24 и 48 ч [30]. Анализ проводили на анализаторе «Biosal» BC 201 F (Швеция). Определение содержания полуцистина и метионина проводили после их окисления в цистеиновую кислоту и метионинсульфон [31]. Триптофан определяли с помощью высокочувствительного спектрофотометрического метода [32].

Содержание свободных SH-групп определяли спектрофотометрическим методом Элмана с 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) [14]. Восстановление S—S-связей в белке проводили β-меркаптоэтанолом по Анфинсену [33].

Определение NH<sub>2</sub>-концевой аминокислоты проводили на немодифицированном ингибиторе дансильным методом по Грею [9] и методом Эдмана, используя модифицированную методику Съёквиста [10]. Дансилпроизводные аминокислот идентифицировали с помощью двумерной хроматографии на пластинках (60 × 60 мм) с закрепленным слоем силикагеля в присутствии свидетелей в следующих двух системах растворителей: ацетон — изопропанол — 25% NH<sub>3</sub> (9 : 7 : 0,5; 9 : 7 : 0,7) в перпендикулярном направлении хлороформ — бензиловый спирт — этилацетат — метанол (6 : 4 : 5 : 0,2) и ацетон — изопропанол — 25% NH<sub>3</sub> (9 : 7 : 2; 9 : 7 : 3) в перпендикулярном направлении хлороформ — бензиловый спирт — метанол — уксусная кислота (5 : 4 : 1 : 1). Для более четкого разделения производных лизина и метионина использовали одномерную хроматографию в системе бензол — пиридин — уксусная кислота (16 : 8 : 0,4) и для производных тирозина и аланина — одномерную хроматографию в системе хлороформ — этанол — уксусная кислота (19 : 2 : 0,4).

Реакцию деградации по Эдману проводили с 0,3 мкмоль ингибитора. Фенилтиогидантоины аминокислот идентифицировали одномерной хроматографией на закрепленном слое силикагеля (пластинки 60 × 60 мм) в присутствии свидетелей последовательно в системах: хлороформ, стабилизированный 1,5%-ным этанолом, и хлороформ — метанол (9 : 1). Идентификацию второго NH<sub>2</sub>-концевого аминокислотного остатка проводили дансильным методом.

Обработку белка карбоксипептидазой А (КФ 3.4.2.1) («Sigma», США) проводили, как описано в работе [11]. Через 6 ч гидролиза обнаружили серин в количестве 0,38 моль/моль белка, через 24 ч количество освобожденного серина достигало 0,47 моль, и, кроме того, обнаружили незначительные количества глицина, аланина и глутаминовой кислоты (соответственно 0,09, 0,04 и 0,02 моль/моль белка).

Электрофорез в 10- и 15%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия проводили как описано Леммли [34]. 0,1 мг белка растворяли в 0,2 мл 0,0625 М трис-HCl буфера (рН 6,8), содержащего додецилсульфат натрия (2%), глицерин (10%), β-меркаптоэтанол (5%), краситель бромфеноловый синий (0,001%), и нагревали на водяной бане 1,5 мин при 100°. Раствор, содержащий 25—50 мкг белка наносили на концентрирующий гель в каждую трубку (10 × 0,6 см). Электрофорез проводили при силе тока 1 мА на трубку в течение 1-го часа и 5—8 мА в течение 2-го часа. Окраску гелей производили 0,1%-ным раствором кумасси в 50%-ной трихлоруксусной кислоте.

В качестве метчиков при определении молекулярного веса с помощью электрофореза в додецилсульфате натрия использовали γ-глобулин, химотрипсиноген, лизоцим и РНКазу.

Определение молекулярного веса с помощью гель-хроматографии проводили на колонке размером 1 × 90 см, заполненной сфадексом G-75 («Pharmacia», Швеция) с размером частиц 10—40 мк. Гель был уравновешен 0,05 М трис-HCl буфером (рН 7,8), содержащим 0,1 М NaCl. В качестве метчиков использовали цитохром с, химотрипсиноген и яичный альбумин.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Blow D. M., Janin J., Sweet R. M. (1974) *Nature*, **249**, 54—57.
2. Blow D. M., Wright C. S., Kukla D., Ruhlmann A., Steigemann W., Huber R. (1972) *J. Mol. Biol.*, **69**, 137—144.
3. Rühlmann A., Kukla D., Schwager P., Bartels K., Huber R. (1973) *J. Mol. Biol.*, **77**, 417—436.
4. Мосолов В. В., Шульмина А. И., Малова Е. Л., (1974) *Биохимия*, **39**, 956—963.
5. Andrews P. (1964) *Biochem. J.*, **91**, 222—233.
6. Hochstrasser K., Illchmann K., Werle E. (1969) *Z. physiol. Chem.*, **351**, 721—728.
7. Millar D. B. S., Willick G. E., Steiner R. F., Frattali V., (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 281—284.
8. Melville J. C., Ryan C. A. (1970) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **138**, 700—702.
9. Gray W. R., Hartley B. S. (1963) *Biochem. J.*, **89**, 59P.
10. Sjöquist J. (1960) *Biochim. et biophys. acta*, **41**, 20—30.
11. Ambler R. P. (1967) in *Methods in Enzymol.* (Hirs C. H. W., ed.) vol. 11, pp. 436—446, Acad. Press. N. Y.—London.
12. Мосолов В. В. (1975) *Растительные белки и их биосинтез*, стр. 172—184, «Наука», М.
13. Laskowski M. Jr., Sealock R. W. (1971) in *The Enzymes* (Boyer, P. D. ed.) vol. 3, p. 375, Acad. Press. N. Y.—London.
14. Ellman G. L. (1959) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **82**, 70—77.
15. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Smith A. P. (1956) *Anal. Chem.*, **28**, 350—357.
16. Fritz H., Trautshold I., Werle E. (1970) in *Methoden der Enzymatischen Analyse* (Bergmeyer H. U. ed.) 2 Aufgabe, Bd 2, S. 1024, Akademie — Verlag, Berlin.
17. Green N. M., Work E. (1953) *Biochem. J.*, **54**, 347—352.
18. Narahashi Y. (1970) in *Methods in Enzymol.* (Perlmann G., Lorand L., eds.) vol. 19, pp. 653—655, Acad. Press. N. Y.—London.
19. Micheel F., Klemmer A. (1956) *Chemie der Zucker und Polysaccharide*, pp. 49—50, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
20. Davis H. (1969) in *Protides of the Biological Fluids* (Peeters H., ed.), pp. 389—396, Brugge.
21. Нортроп Д., Кунитц М., Херриотт Р. М., (1950) в кн. *Кристаллические ферменты*, стр. 240—255, ИЛ, М.
22. Chase T. Jr., Shaw E. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **29**, 508—514.
23. Kassel B. (1970) in *Methods in Enzymol.* (Perlmann G., Lorand L., eds.) vol. 19, pp. 890—902, Acad. Press. N. Y.—London.
24. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 2930—2936.
25. Bender M. L., Begue—Canton M. L., Blakeley R. L. et al. (1966) *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 5890—5913.
26. Arnon R. (1970) in *Methods in Enzymol.* (Perlmann G., Lorand L., eds.) vol. 19, pp. 226—244.
27. Sandstrom W. M. (1935) *Biochemical Laboratory Methods*, pp. 90—92, John Wiley a. Sons. N. Y.
28. Laskowski M. (1955) in *Methods in Enzymol.* (Colowick S. P., Kaplan N. O., eds.) vol. 2, p. 36, Acad. Press., N. Y., London.
29. Ryle A. P., Porter R. R. (1959) *Biochem. J.*, **73**, 75—80.
30. Moore S., Stein W. H. (1963) in *Methods in Enzymol.* (Colowick S. P., Kaplan N. O., eds.) vol. 6, pp. 819—831, Acad. Press. N. Y., London.
31. Moore S. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 235—237.
32. Messineo L., Mussara E. (1972) *Int. J. Biochem.*, **3**, 700—704.
33. Anfinsen C. B., Haber E. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 1361—1363.
34. Laemmli U. K. (1970) *Nature*, **227**, 680—685.

Поступила в редакцию  
18.11.1975

### PROPERTIES OF THE INHIBITOR OF SERINE PROTEINASES FROM POTATOES

MOSOLOV V. V., MALOVA E. L., VALUEVA T. A.,  
SHULMINA A. I.

*A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of  
Sciences of the USSR, Moscow*

A thermostable protein with the isoelectric point at pH 7.3 and  $M = 14500 \pm 300$  was isolated from potato tubers by the isoelectric focusing procedure within a pH 6-8. Noteworthy is a comparatively high content of half-cystine and proline in the protein. Methionine was proved to be the amino terminal residue, and serine was found to be the carboxy terminal residue. 7 disulfide bridges are present in the protein suggest that the pI 7.3 protein is a broad specificity inhibitor of serine proteases.