



УДК 577.152.231*273.088.5:577.112.5

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РИБОНУКЛЕАЗЫ Ar_1
ИЗ *ASPERGILLUS PALLIDUS*Шлятников С. В., Безбородова С. И.*, Деметьев А. А.,
Куликов В. А.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

* Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Установлена первичная структура внеклеточной гуанилспецифичной РНКазы гриба *Aspergillus pallidus*. Белок содержит 104 аминокислотных остатка (6 Asp, 7 Asn, 4 Thr, 14 Ser, 3 Glu, 4 Gln, 4 Pro, 15 Gly, 9 Ala, 4 Cys, 6 Val, 2 Ile, 4 Leu, 10 Tyr, 4 Phe, 3 His, 4 Arg и 1 Trp) и имеет молекулярную массу 11 029 Да. Определение аминокислотной последовательности РНКазы основывалось на автоматической деградации по методу Эдмана S-карбоксиметилированного белка с последующим гидролизом остаточного продукта трипсином и секвенированием полученного таким образом триптического гидролизата. Дополнительная информация о структуре РНКазы получена из данных автоматической деградации по Эдману нефракционированной смеси пептидов бромцианового расщепления молекулы белка, а также на основании анализа кинетики протеолиза РНКазы карбоксипептидазой Y.

Внеклеточная эндонуклеаза гриба *Aspergillus pallidus* (РНКазы Ar_1 , КФ 3.1.27.3) принадлежит к семейству гомологичных пизкомолекулярных внеклеточных РНКаз микроорганизмов и катализирует расщепление 3'-5'-фосфодиэфирной связи РНК в 3'-положении остатка гуанозинового нуклеотида, являясь таким образом гуанилспецифичным ферментом [1-3].

Представители семейства гуанилспецифичных РНКаз бактерий, актиномицетов и грибов интенсивно исследуются в ряде лабораторий методом рентгеноструктурного анализа [4-12]. В настоящее время в Институте кристаллографии АН СССР начаты работы по выявлению пространственной топографии РНКазы Ar_1 и анализу особенностей ее структуры (частное сообщение).

В публикуемой статье представлены результаты определения аминокислотной последовательности РНКазы Ar_1 .

Согласно данным анализа аминокислотного состава РНКазы Ar_1 (не приведены), в молекуле белка содержатся четыре остатка аргинина, один остаток триптофана и нет остатков метионина и лизина. Эта информация была определяющей при выборе общей стратегии исследования первичной структуры этого фермента. В качестве начального этапа установления аминокислотной последовательности РНКазы Ar_1 была использована автоматическая деградация по методу Эдмана S-карбоксиметилированного белка (СМ-РНКазы Ar_1). В ходе проведения 78 циклов деградации идентифицированы 73 аминокислотных остатка (табл. 1), так как остатки аминокислот в положениях полипептидной цепи белка 64, 66, 67, 71 и 72 идентифицируются набором используемых в работе методов анализа неоднозначно [13]. Это позволило локализовать в полипептидной цепи положения всех остатков аргинина (Arg^{35} , Arg^{37} , Arg^{43} и Arg^{77}) и единственного в молекуле белка остатка триптофана (Trp^{59}).

Для расшифровки аминокислотной последовательности С-концевой области РНКазы на данном этапе работы проведено исследование продуктов триптического расщепления «остаточного» препарата СМ-РНКазы Ar_1 , ранее подвергнутого 78 циклам автоматической деградации по Эдману.

Результаты секвенирования полученного таким образом гидролизата показаны в табл. 2. Поскольку протеолизу трипсином в данном случае

Анализ продуктов автоматической деградации по Эдману СМ-РНКазы Ар₁

| Цикл деградации | Аминокислота | Выход, * ммоль | Методы идентификации | Цикл деградации | Аминокислота | Выход, * ммоль | Методы идентификации |
|-----------------|--------------|-------------------|----------------------|-----------------|--------------|-------------------|----------------------|
| 1 | Asp | 56,5 | A, T | 40 | His | — | A |
| 2 | Cys | 42,9 | A, Г, T | 41 | Gln | 14,3 | A, T |
| 3 | Asp | 62,8 | A, T | 42 | Tyr | 12,4 | A, Г, T |
| 4 | Tyr | 74,5 | Г, A, T | 43 | Arg | — | A |
| 5 | Thr | 39,8 | A, Г, T | 44 | Asn | 11,5 | A, T |
| 6 | Cys | 42,6 | A, Г, T | 45 | Tyr | 10,8 | A, Г, T |
| 7 | Gly | 56,2 | A, Г, T | 46 | Glu | 13,0 | A, T |
| 8 | Ser | 34,7 | A, Г, T | 47 | Gly | 12,1 | A, Г, T |
| 9 | His | — | A | 48 | Phe | 16,6 | Г, A, T |
| 10 | Cys | 40,0 | A, Г, T | 49 | Asn | 10,1 | A, T |
| 11 | Tyr | 49,1 | Г, A, T | 50 | Phe | 18,7 | Г, A, T |
| 12 | Ser | 33,9 | A, Г, T | 51 | Pro | 13,2 | Г, T |
| 13 | Ala | 85,5 | Г, A, T | 52 | Val | 14,3 | Г, A, T |
| 14 | Ser | 39,8 | A, Г, T | 53 | Ser | 7,6 | A, Г, T |
| 15 | Ala | 91,6 | Г, A, T | 54 | Gly | 8,9 | A, Г, T |
| 16 | Val | 76,0 | Г, A, T | 55 | Asn | 8,3 | A, T |
| 17 | Ser | 30,3 | A, Г, T | 56 | Tyr | 9,4 | A, Г, T |
| 18 | Asp | 33,2 | A, T | 57 | Tyr | 10,0 | A, Г, T |
| 19 | Ala | 59,3 | Г, A, T | 58 | Glu | 8,2 | A, T |
| 20 | Gln | 39,7 | A, T | 59 | Trp | 7,1 | Г, T |
| 21 | Ser | 21,6 | A, Г, T | 60 | Pro | 7,1 | Г, T |
| 22 | Ala | 49,4 | Г, A, T | 61 | Ile | 8,7 | A, Г, T |
| 23 | Gly | 34,8 | A, Г, T | 62 | Leu | 9,3 | A, Г, T |
| 24 | Tyr | 32,5 | Г, A, T | 63 | Ser | 5,4 | A, Г, T |
| 25 | Gln | 35,4 | A, T | 64 | (Ser) | 4,5 | A, Г |
| 26 | Leu | 50,3 | Г, A, T | 65 | Gly | 5,6 | A, Г, T |
| 27 | Tyr | 31,7 | Г, A, T | 66 | (Ser) | 5,0 | A, Г |
| 28 | Ser | 20,1 | A, Г, T | 67 | (Thr) | 4,1 | A |
| 29 | Ala | 45,9 | Г, A, T | 68 | Tyr | 5,1 | A, T |
| 30 | Gly | 26,4 | A, Г, T | 69 | Asn | 3,8 | A, T |
| 31 | Gln | 24,5 | A, T | 70 | Gly | 4,0 | A, T |
| 32 | Ser | 20,2 | A, Г, T | 71 | (Gly) | 3,5 | A |
| 33 | Val | 40,0 | Г, A, T | 72 | (Ser) | — | A, Г |
| 34 | Gly | 21,4 | A, Г, T | 73 | Pro | 4,2 | Г, T |
| 35 | Arg | — | A | 74 | Gly | 3,9 | A, T |
| 36 | Ser | 14,2 | A, Г, T | 75 | Ala | 4,8 | Г, A, T |
| 37 | Arg | — | A | 76 | Asp | 3,8 | A, T |
| 38 | Tyr | 16,3 | A, Г, T | 77 | Arg | — | A |
| 39 | Pro | 21,4 | Г, T | 78 | Val | 4,4 | Г, A, T |

* Выход аминокислот определен по первому из перечисленных методов идентификации: А — аминокислотный анализ, Г — ГЛХ, Т — ТСХ. Производные Cys(Cm), Ser, Thr, Ile, Gln и Asn определяли при аминокислотном анализе в виде Ala, Ala, α Abu, Ile+ α Ile, Glu и Asp соответственно. Выход производных Arg и His количественно не учитывался. Идентификация аминокислот, заключенных в скобки, неоднозначна.

подвергалась неоднородная смесь полипептидов, различающихся как по количественному соотношению, так и по структуре N-концевых аминокислотных последовательностей, выход индивидуальных триптических пептидов значительно варьирует. Следует отметить также, что наряду с практически полным гидролизом трипсином связи Arg⁴³ — Asn⁴⁴ наблюдалась лишь частичное расщепление полипептидной цепи РНКазы по связи Arg³⁷ — Tyr³⁸. Вследствие этого в смеси триптических пептидов присутствовали как фрагмент (38—43) полипептидной цепи РНКазы Ар₁, так и фрагмент (36—43).

С учетом результатов автоматической деградации СМ-РНКазы Ар₁ (табл. 1) анализ данных, приведенных в табл. 2, позволяет вывести аминокислотную последовательность триптического пептида, представляющего собой С-концевой фрагмент РНКазы (остатки 78—104). Однако остается нерешенным вопрос о С-концевом остатке белка, так как на основании данных эдмановской деградации исследуемых нефракционированных триптических пептидов теоретически возможно предположить, что полипептидная цепь РНКазы ограничена не остатком Gly¹⁰⁴, а может

Анализ продуктов автоматической деградации по Эдману триптического гидролизата СМ-РНКазы Ar₁, подвергнутой предварительно 78 циклам секвенирования (см. табл. 1)*

| Цикл деградации | Аминокислота (выход, нмоль; метод идентификации) | | | |
|-------------------------|--|--------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | Ser (6,9; A, T, Γ) | Tyr (8,4; Γ, A, T) | Asn (11,5; A, T) | Val (30,2; Γ, A, T) |
| 2 | Arg (-; A) | Pro (8,8; Γ, T) | Tyr (15,8; Γ, A, T) | Val (33,0; Γ, A, T) |
| 3 | Tyr (4,5; A, Γ) | His (-; A) | Glu (12,3; A, T) | Phe (28,4; Γ, A, T) |
| 4 | Pro (-; T) | Gln (8,2; A, T) | Gly (11,8; A, T, Γ) | Asn (14,1; A, T) |
| 5 | His (-; A) | Tyr (3,1; A, T) | Phe (18,5; Γ, A, T) | Asp (16,6; A, T) |
| 6 | Gln (4,0; A, T) | Arg (-; A) | Asn ** (24,9; A, T) | Asn ** (24,9; A, T) |
| 7 | Tyr (3,6; A, T) | | Phe (15,7; Γ, A, T) | Asp (17,6; A, T) |
| 8 | Arg (-; A) | | Pro (11,5; Γ, T) | Glu (11,5; A, T) |
| 9 | | | Val (14,9; Γ, A, T) | Leu (20,3; Γ, A, T) |
| 10 | | | Ser ** (27,9; A, T, Γ) | Ala (19,5; Γ, A, T) |
| 11 | | | Gly ** (17,0; A, T, Γ) | Gly ** (17,0; A, T, Γ) |
| 12 | | | Asn (6,9; A, T) | Leu (18,7; Γ, A, T) |
| 13 | | | Tyr (7,6; A, T, Γ) | Ile (17,2; A, T, Γ) |
| 14 | | | Tyr (7,8; A, T, Γ) | Thr (8,3; A, T, Γ) |
| 15 | | | Glu (7,1; A, T) | His (-; A) |
| 16 | | | Trp (-; Γ, T) | Thr (7,1; A, T, Γ) |
| 17 | | | Pro (5,8; Γ, T) | Gly (7,6; A, T, Γ) |
| 18 | | | Ile (6,2; Γ, A, T) | Ala (13,7; Γ, A, T) |
| 19 | | | Leu (8,6; A, T, Γ) | Ser (5,8; A, T, Γ) |
| 20 | | | Ser (3,8; A, T, Γ) | Gly (6,3; A, T, Γ) |
| 21 | | | (Ser) (4,5; A, T) | (Asn) (5,8; A, T) |
| 22 | | | Gly ** (11,8; A, T, Γ) | Gly ** (11,8; A, T, Γ) |
| 23 | | | (Ser) (3,6; A, T) | (Phe) (11,5; Γ, A, T) |
| 24 | | | (Thr) (3,5; A, T) | (Val) (10,0; Γ, A, T) |
| 25 | | | Tyr (4,1; A, T) | Ala (9,1; Γ, A, T) |
| 26 | | | Asn (3,2; A, T) | Cys (4,3; A, T, Γ) |
| 27 | | | Gly ** (6,9; A, T, Γ) | Gly ** (6,9; A, T, Γ) |
| 28 | | | (Gly) ** (3,8; A) | (Gly) ** (3,8 A) |
| Положение в цепи РНКазы | 36-43 | 38-43 | 44-71 | 78-104/105 |

* Обозначения как в табл. 1.

** Выход аминокислот не дифференцирован для отдельных пептидов.

содержать еще один остаток Gly¹⁰⁵ (табл. 2). Кроме того, часть остатков в полученной аминокислотной последовательности С-концевого пептида идентифицируется неоднозначно вследствие того, что при автоматической деградации СМ-РНКазы Ar₁ неоднозначно идентифицированы остатки 64, 66, 67, 71 и 72 (табл. 1). Все это затрудняет расшифровку полной аминокислотной последовательности РНКазы и требует привлечения дополнительных экспериментальных данных.

Анализ кинетики протеолиза СМ-РНКазы Ar₁ карбоксиэпептидазой У (рис. 1) показывает, что С-концевая последовательность белка имеет следующий вид: -Phe-Val-Ala-Cys-Gly. Отсюда вытекает: 1) полипептидная цепь РНКазы Ar₁ содержит 104 остатка аминокислот; 2) локализация Phe, Val и С-концевого остатка белка Gly в позициях 100, 101 и 104 соответственно позволяет сделать вывод, что остатки Ser, Thr и Gly, выявленные в ходе секвенирования пептидов триптического гидролизата на стадиях эдмановской деградации 23, 24 и 28 (табл. 2), соответствуют Ser⁶⁶, Thr⁶⁷ и Gly⁷¹ в молекуле белка.

Завершающим этапом установления первичной структуры РНКазы Ar₁ явилось проведение 29 последовательных циклов автоматического

Рис. 1. Кинетика гидролиза СМ-РНКаза A_{p1} карбоксипептидазой Y. Условия: 50 мМ N-этилморфолин-ацетат (рН 5,5), 45° С; соотношение фермент — субстрат 1 : 75. 1 — Gly, 2 — Cys(Cm), 3 — Ala, 4 — Val, 5 — Phe

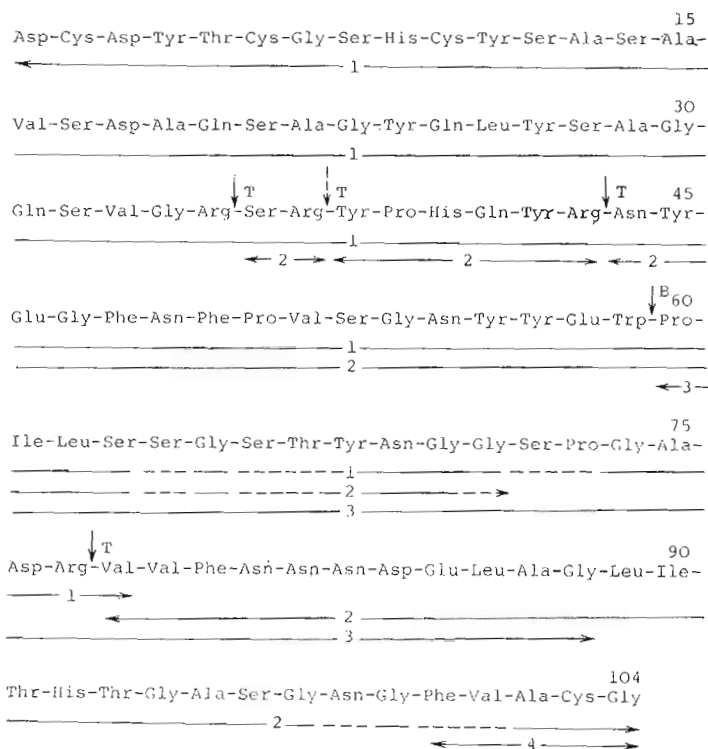
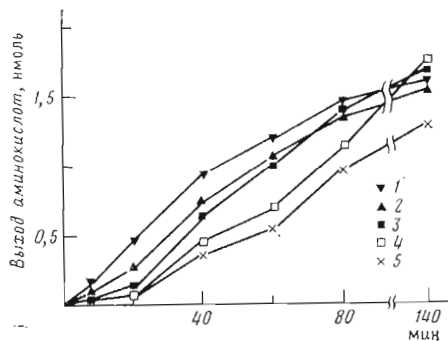


Рис. 2. Первичная структура РНКаза A_{p1} . Вертикальные стрелки — места расщепления полипептидной цепи трипсином (Т) и $B_{60}CN$ (В). Горизонтальные отрезки — аминокислотные последовательности, установленные при автоматической деградации по Эдману СМ-РНКаза и последующем секвенировании триптического гидролизата остаточного продукта (1, 2 соответственно) и расшифрованные при секвенировании модифицированных флуорескаминем пептидов бромцианового расщепления СМ-РНКаза (3); 4 — данные исследования кинетики протеолиза СМ-РНКаза карбоксипептидазой Y. Пунктиром отмечены остатки аминокислот, идентификация которых в данном типе секвенирования проведена неоднозначно

секвенирования по Эдману продуктов расщепления СМ-РНКаза A_{p1} по остатку Trp^{69} (табл. 1) бромцианом. Известно, что $B_{60}CN$ в смеси муравьиной и гептафтормасляной кислот расщепляет в белках связь $Trp-X$, где X — любой аминокислотный остаток [14]. Анализ данных секвенирования в настоящем случае был значительно облегчен тем, что продукты расщепления модифицировались флуорескаминем [13, 15]. Это исключало из эдмановской деградации N-концевой фрагмент белка (остатки 1—59), секвенированию подвергался только C-концевой пептид РНКаза (остатки 60—104).

Полученные результаты секвенирования (табл. 3) полностью подтвердили выведенную ранее аминокислотную последовательность в ана-

Анализ продуктов автоматической деградации по Эдману модифицированных флуорескаминном фрагментов бромцианового расщепления СМ-РНКаза Ar₁

| Цикл деградации | Аминокислота | Выход, нмоль | Методы * идентификации | Положение в цепи РНКаза |
|-----------------|--------------|--------------|------------------------|-------------------------|
| 1 | Pro | 42,9 | Г, Т | 60 |
| 2 | Ile | 49,1 | Г, А, Т | 61 |
| 3 | Leu | 50,2 | А, Г, Т | 62 |
| 4 | Ser | 17,4 | А, Г, Т | 63 |
| 5 | Ser | 19,3 | А, Г, Т | 64 |
| 6 | Gly | 21,5 | А, Г, Т | 65 |
| 7 | Ser | 17,3 | А, Г, Т | 66 |
| 8 | Thr | 20,0 | А, Г, Т | 67 |
| 9 | Tyr | 14,2 | Г, А, Т | 68 |
| 10 | Asn | 21,4 | А, Т | 69 |
| 11 | Gly | 15,2 | А, Г, Т | 70 |
| 12 | Gly | 16,3 | А, Г, Т | 71 |
| 13 | Ser | 10,0 | А, Г, Т | 72 |
| 14 | Pro | 20,5 | Г, Т | 73 |
| 15 | Gly | 12,3 | А, Г, Т | 74 |
| 16 | Ala | 24,8 | Г, А, Т | 75 |
| 17 | Asp | 16,2 | А, Т | 76 |
| 18 | Arg | — | А | 77 |
| 19 | Val | 21,3 | Г, А, Т | 78 |
| 20 | Val | 24,6 | Г, А, Т | 79 |
| 21 | Phe | 22,1 | Г, А, Т | 80 |
| 22 | Asn | 10,2 | А, Т | 81 |
| 23 | Asp | 12,3 | А, Т | 82 |
| 24 | Asn | 9,9 | А, Т | 83 |
| 25 | Asp | 11,5 | А, Т | 84 |
| 26 | Glu | 8,3 | А, Т | 85 |
| 27 | Leu | 16,7 | Г, А, Т | 86 |
| 28 | Ala | 14,6 | Г, А, Т | 87 |
| 29 | Gly | 7,4 | А, Т | 88 |

* Обозначения как в табл. 1.

лизируемой области полипептидной цепи белка и обеспечили корректную идентификацию остатков Ser⁶⁴ и Asn⁹⁸, определение которых ранее при секвенировании интактной СМ-РНКаза Ar₁ (табл. 1) и пептидов триптического гидролизата (табл. 2) оставалось неоднозначным.

Согласно данным анализа первичной структуры белка (рис. 2), в состав РНКаза Ar₁ входят 6 Asp, 7 Asn, 4 Thr, 14 Ser, 3 Glu, 4 Gln, 4 Pro, 15 Gly, 9 Ala, 4 Cys, 6 Val, 2 Ile, 4 Leu, 10 Tyr, 4 Phe, 3 His, 4 Arg и 1 Trp (M_r 11 029). В пяти ранее исследованных РНКазах аскомицетов: РНКаза T₁ *A. oryzae* [16], РНКаза C₂ *A. clavatus* [17], РНКаза MsA. *saitoi* [18], РНКаза Pb₁ *Penicillium brevicompactum* [13] и РНКаза Pch₁ *P. chrysogenum* [19] — имеются два дисульфидных мостика между остатками Cys в положениях 2—10 и 6—103. Разумно предположить, что и в РНКаза Ar₁ ковалентная сшивка полипептидной цепи в пространстве осуществляется таким же образом.

Из всех внеклеточных гуанилспецифичных РНКаз микроорганизмов, для которых известны аминокислотные последовательности, структура РНКаза Ar₁ наиболее близка к структуре РНКаза C₂. Сравнение аминокислотных последовательностей РНКаза Ar₁ и РНКаза C₂ [17] (не приведено) показывает наличие в исследуемом белке всего четырех замен аминокислот. Остатки Glu²⁷, Gly⁷², Asp⁹⁸ и Tyr¹⁰⁴ РНКаза C₂ заменены в РНКаза Ar₁ остатками Tyr, Ser, Asn и Gly соответственно.

Замена Glu²⁷ → Tyr²⁷ относится к химически неэквивалентным замещениям, которые могут возникнуть в результате нескольких актов мутаций, затрагивающих первое и третье основания соответствующих кодонов. Редко наблюдаемой заменой в белках является также замещение С-концевого остатка Tyr¹⁰⁴ РНКаза C₂ на Gly¹⁰⁴ в РНКаза Ar₁. Такое

замещение требует изменения двух первых нуклеотидов триплетов. Замена Gly⁷² → Ser⁷² относится к химически нейтральным и может возникнуть за счет точечной мутации первого основания кодирующих их триплетов. Наличие в РНКазе C₂ в положении 98 остатка аспарагиновой кислоты и Asn⁹⁸ в РНКазе Ar₁ может быть также следствием точечной мутации первого основания соответствующих кодонов. Однако в этом случае не исключено, в частности, что при очистке РНКазы C₂ и последующем ее хранении в растворе происходило дезамидирование Asn⁹⁸.

Высокая гомология структур РНКаз Ar₁ и C₂ отражает близкое родство продуцентов сравниваемых ферментов, что неудивительно, так как вид *A. pallidus*, описанный в 1963 г., принадлежит к той же группе, что и *A. clavatus* [20].

Экспериментальная часть

В работе использовали карбоксипептидазу Y (Boehringer, ФРГ), ТПСК-обработанный трипсин (Worthington, США), дитиотреит и флуорескамин (Fluka, ФРГ), глицилглицин (Sigma, США), бромциан и N-этилморфолин (Pierce, США). Иодуксусную кислоту (BDH, Англия) трижды перекристаллизовывали из гептана, а полибрен (Aldrich, ФРГ) перед употреблением очищали тройной экстракцией водного раствора хлорбутаном. Все реагенты и растворители для автоматической деградации по методу Эдмана (фенилтиоцианат, гептан, 0,1 М квадратный буфер, гептафтормасляная кислота, бензол, этилацетат и хлорбутан) соответствовали квалификации Sequenal grade (Beckman, США). Все растворители, отвечающие маркам х.ч. или о.с.ч. (Союз-реактив), перегоняли, а соли перекристаллизовывали.

Внеклеточную гуанилспецифичную РНКазу Ar₁ гриба *A. pallidus* Kamysko 2286 [20], свободную от солей, выделяли по методике, описанной в работах [1, 21]. Восстановление S—S-связей в РНКазе (50° С, 2 ч) и карбоксиметилирование белка проводили в 0,5 М трис-НСI-буфере (рН 8,5), содержащем 5 мМ EDTA и 6 М гуанидингидрохлорид, используя 10-кратный мольный избыток дитиотреита относительно белка и 2-кратный избыток иодуксусной кислоты по отношению к дитиотреиту.

Автоматическую деградацию по Эдману осуществляли на секвенаторе Beckman 890С (США) с использованием 0,1 М квадратного буфера в присутствии 3 мг полибрена и 100 нмоль глицилглицина, предварительно подвергнутых пяти полным циклам секвенирования [13]. Продукты эдмановской деградации выдерживали 10 мин и 1 н. НСI при 80° С в присутствии 0,2% этилмеркаптана [22] и затем экстрагировали 3 раза этилацетатом. Водные фракции анализировали на содержание аргинина и гистидина.

Идентификацию фенилтиогидантоиновых производных аминокислот осуществляли методами ТСХ и ГЖХ [13, 23], а также аминокислотным анализом (Biotronic LC-7000, ФРГ) после обратного гидролиза производных 5 н. НI при 150° С в течение 24 ч. Выход аминокислот оценивали, вводя во фракции их анилинтиазолиноновых производных в качестве внутреннего стандарта фенилтиогидантон норлейцина. Величину выхода корректировали с учетом систематических ошибок вследствие механических потерь в ходе конверсии, различной стабильности производных и их эффективности идентификации тем или иным способом, а также вводя поправку на уровень «общего аминокислотного фона» на данном цикле секвенирования и неполноту проведения многостадийного процесса деградации по Эдману [13, 24, 25]. Последняя величина рассчитывалась по уравнению

$$\text{выход в цикле } n + 1 / \text{выход в цикле } n = 0,008 \cdot n,$$

где n — номер цикла деградации по Эдману, а величина 0,008 — экспериментально наблюдаемое значение неполноты деградации, составляющее 0,8% остаточной аминокислоты на один цикл секвенирования.

Триптический гидролиз препарата СМ-РНКазы Ar₁, подвергнутого 78 циклам деградации по Эдману (после 38, 59 и 78-й стадий секвенирования смесь обрабатывали в реакционной ячейке секвенатора флуорескаминном [13, 14]), проводили 4 ч в 0,1 М N-этилморфолин-ацетатном буфере, рН 8,5, при 37° С и соотношении фермента — субстрат 1 : 50. Полученную таким образом смесь пептидов триптического гидролиза после высушивания секвенировали далее, осуществляя дополнительно еще 28 полных циклов эдмановской деградации.

Расщепление СМ-РНКазы Ar₁ BrCN проводили 12 ч в темноте в 2 мл смеси 88% муравьиной и 100% гептафтормасляной кислот (1 : 1) [15] при 25° С и молярном отношении BrCN к белку, равном 2·10⁴ : 1. Гидролизат упаривали примерно в 2 раза в токе азота, разбавляли водой в 10 раз и высушивали лиофильно. Перед секвенированием смесь пептидов обрабатывали в ячейке секвенатора флуорескаминном.

Протеолиз СМ-РНКазы Ar₁ карбоксипептидазой Y проводили в 50 мМ N-этилморфолин-ацетатном буфере, рН 5,5, при 45° С и отношении фермент — субстрат 1 : 75. Кинетику расщепления прослеживали, анализируя аликваты реакционной смеси, содержащей Nle в качестве внутреннего стандарта, на аминокислотном анализаторе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Безбородова С. И., Бородаева Л. И., Панкова Л. И. // Микробиология. 1968. Т. 37. № 1. С. 10—14.
2. Безбородова С. И. // Нуклеазы микроорганизмов. М.: Наука, 1974. С. 188—259.
3. Безбородова С. И., Безбородов А. М. // Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. М.: Наука, 1979. С. 92—145.
4. Hill G., Dodson G., Heinemann U., Saenger W., Mitsui Y., Nakamura K., Borisov V., Tischenko G., Polyakov K., Pavlovsky A. // Trends Biochem. Sci. 1983. V. 8. № 10. P. 364—369.
5. Mauguen Y., Hartley R. W., Dodson E. J., Dodson G. G., Bricogne G., Chotia C., Jack A. // Nature. 1982. V. 297. № 5862. P. 162—164.
6. Поляков К. М., Вагин А. А., Тищенко Г. Н., Безбородова С. И., Вайнштейн Б. К. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 276. № 6. С. 1383—1386.
7. Борисова С. Н., Вагин А. А., Некрасов Ю. В., Павловский А. Г., Строкопыхтов В. В., Вайнштейн Б. К. // Кристаллография. 1986. Т. 31. № 3. С. 474—477.
8. Sugio S., Oka K., Ohishi H., Tomita K., Saenger W. // FEBS Lett. 1985. V. 183. № 1. P. 115—118.
9. Heinemann U., Saenger W. // Nature. 1982. V. 229. № 5878. P. 27—31.
10. Pavlovsky A. G., Vagin A. A., Vainstein B. K., Cherpurnova N. K., Karpeisky M. Ya. // FEBS Lett. 1983. V. 162. № 1. P. 167—170.
11. Nakamura K. T., Iwahashi K., Yamamoto Y., Jitaka Y., Yoshida N., Mitsui Y. // Nature. 1982. V. 299. № 5883. P. 564—566.
12. Sevdic J., Zelinka J. // Studia biophys. 1986. V. 114. № 1—3. P. 31—34.
13. Куликов В. А., Шляпников С. В., Яковлев Г. И. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 3. С. 334—345.
14. Ozols J., Gerard C. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 17. P. 5986—5989.
15. Bhowm A. S., Bennett J. C., Morgan P. H., Mole J. E. // Anal. Biochem. 1981. V. 112. № 1. P. 158—162.
16. Takahashi K. // J. Biochem. 1985. V. 98. № 3. P. 815—817.
17. Bezborodova S. I., Khodova O. M., Stepanov V. M. // FEBS Lett. 1983. V. 159. № 12. P. 256—258.
18. Watanabe H., Ohgi K., Iruji M. // J. Biochem. 1982. V. 91. № 5. P. 1495—1509.
19. Shlyapnikov S. V., Bezborodova S. I., Kulikov V. A., Yakovlev G. I. // FEBS Lett. 1986. V. 196. № 1. P. 29—33.
20. Камышко О. П. // Ботанические материалы отдела споровых растений. Т. 16. М.—Л.: Изд-во АН СССР, 1963. С. 91—95.
21. Безбородова С. И., Белецкая О. П., Грищенко В. М. // Биохимия. 1977. Т. 42. № 9. С. 1556—1566.
22. Edman P., Begg G. // Eur. J. Biochem. 1967. V. 1. № 1. P. 80—91.
23. Pisano J. J., Bronzert T. J., Brewer H. B. // Anal. Biochem. 1972. V. 45. № 1. P. 43—59.
24. Snuthies O., Gibson D., Fanning E. M., Goodflesh R. M., Gilman J. G., Ballantyne D. L. // Biochemistry. 1971. V. 10. № 26. P. 4912—4921.
25. Bailey G. S., Gillett D., Hill D. F., Petersen G. B. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 7. P. 2218—2225.

Поступила в редакцию
26.V.1987
После доработки
1.XII.1987

AMINO ACID SEQUENCE OF RIBONUCLEASE A_{p1} FROM *ASPERGILLUS PALLIDUS*

SHLYAPNIKOV S. V., BEZBORODOVA S. I.*, DEMENTIEV A. A.,
KULIKOV V. A.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR;

* *Institute of Genetics and Selection
of Industrial Microorganisms, Moscow*

The complete amino acid sequence of an extracellular guanyl-specific RNase from *Aspergillus pallidus* fungi has been established. The RNase contains 104 amino acid residues (M_r 11 029). Its primary structure was analyzed basing on the automated Edman degradation of the carboxymethylated RNase followed by tryptic digestion and sequencing of the resultant hydrolysate. An additional structural information was obtained by means of the automatic sequencing of the cyanogen bromide peptide mixture and by studying the kinetics of the RNase's digestion with carboxypeptidase Y.