



УДК 577.152.34*236'1 : 577.112.5

© 1994 И. А. Сулова, В. В. Янонис,
Л. П. Ревина, В. И. Остославская, Л. А. Колесникова,
Е. А. Тимохина, Е. Д. Левин, В. М. Степанов

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СЕРИНОВОЙ
ПРОТЕИНАЗЫ *Bacillus amyloliquefaciens*
II*. АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПЕПТИДОВ
ХИМОТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗАТА

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

Ключевые слова: сериновая протеиназа; *Bacillus amyloliquefaciens*;
первичная структура.

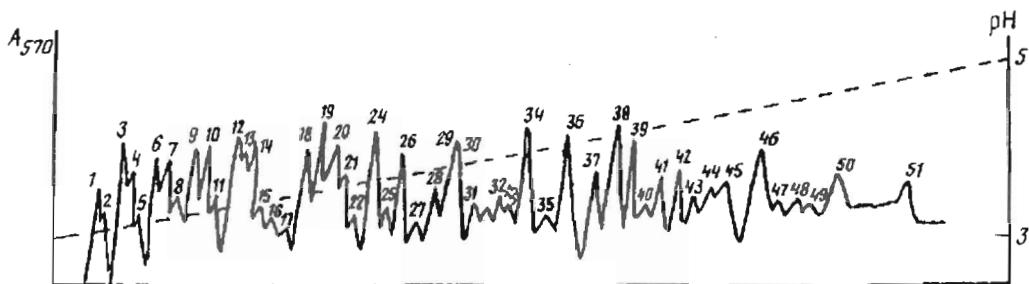
Проведен гидролиз химотрипсином восстановленной карбоксиметилированной внутриклеточной сериновой протеиназы *Bacillus amyloliquefaciens*. Гидролизат фракционирован на сульфокатионите в градиенте рН и концентрации пиридин-ацетатного буфера. Из полученных фракций с помощью ВЭЖХ выделен 51 пептид. Аминокислотная последовательность пептидов, установленная методом Эдмана, в сумме содержит 381 аминокислотный остаток.

Данная работа — часть исследования первичной структуры внутриклеточной сериновой протеиназы (ВСП) *Bacillus amyloliquefaciens*, посвященная изучению аминокислотной последовательности пептидов химотриптического гидролизата. Ранее [1] были описаны модифицированная методика выделения ВСП и результаты изучения продуктов ее трипсинового гидролиза.

Из триптического гидролизата не удалось выделить пептид, содержащий цистеин, в достаточном для дальнейшего изучения количестве из-за образования множественных продуктов окисления цистеина и получения вследствие этого трудноразделимых смесей пептидов. Поэтому гидролизу химотрипсином при рН 8,5 и 37° С подвергали восстановленную и карбоксиметилированную ВСП.

При разделении лиофилизованного гидролизата на колонке с сульфополистирольным катионитом Chromobeads (рисунок) в градиенте рН и концентрации пиридин-ацетатного буфера была получена 51 фракция. Анализ аминокислотного состава и ТСХ фракций показали, что практически все они содержали смеси пептидов. 20 фракций, содержащих небольшие количества вещества, вероятно, состояли из продуктов неспецифического или неполного гидролиза и в дальнейшем не изучались. Остальные фракции были подвергнуты разделению с помощью ВЭЖХ. Аминокислотный состав пептидов приведен в табл. 1. N-Концевые аминокислоты определяли методом дансилирования или DABITC/PITC-методом.

* Сообщение I см. [1].



Хроматография продуктов химотриптического гидролиза ВСП на смоле Chromobeads (колонка 0,9 × 60 см) в градиенте рН и концентрации пиридин-ацетатного буфера [3]. Штриховая линия — изменение рН

Последовательность 51 пептида устанавливали автоматическим методом Эдмана на твердофазном секвенаторе или вручную — методом Эдмана в дансильном варианте и методом DABITC/PITC (табл. 2). Некоторые пептиды гидролизovali карбоксипептидазами А и В. Для установления аминокислотной последовательности пептида С7-1 проводили гидролиз пептида Glu, Asp-специфичной протеиназой *Thermoactinomyces species*. Далее приведены некоторые пептиды в сопоставлении с пептидами триптического гидролизата.

Пептид С1-2. Определена последовательность первых 12 остатков (табл. 2). Пептид С1-2 включает пептид С1-1, что позволяет увеличить известную аминокислотную последовательность пептида С1-2 до 20 аминокислотных остатков (см. табл. 3, I).

Пептид С1-3. Структура пептида перекрывается триптическим пептидом Т9-1, благодаря чему установлена последовательность участка ВСП из 24 аминокислотных остатков, представленная в табл. 3, II.

Частичная структура пептида С3-2 установлена с помощью твердофазного секвенатора: Ala-Val-Glu-Gln-Xaa-Ala-Asp-Ile-Ile-Xaa-Met. N-Концевая пятичленная последовательность соответствует триптическому пептиду Т14-1 [1]. Следовательно, положение 5 в пептиде С3-2 занимает остаток лизина. В положении 10, судя по составу пептида С3-2, находится остаток серина.

N-Концевая 7-членная последовательность пептида С3-3 повторяет частичную структуру (остатки 3-9) триптического пептида Т10-2 [1]. Метионин, занимающий положение 8-го остатка в пептиде С3-3, отсутствует в составе пептида (см. табл. 1), что можно объяснить окислением этого остатка в процессе кислотного гидролиза.

Пептид С7-1 содержит 25 аминокислотных остатков, в том числе карбоксиметилцистеин. Для определения полной структуры этот пептид, содержащий четыре остатка глутаминовой кислоты, был расщеплен Glu, Asp-специфичной протеиназой *Th. species*. С помощью ВЭЖХ получены пептиды С7-1G-1, С7-1G-2 и С7-1G-3. Их структура определена методом DABITC/PITC.

Пептид С7-1G-1: Gly-Asp-Gly-Asp-Glu.

Пептид С7-1G-2: Arg-Thr-Glu-Glu-Leu.

Пептид С7-1G-3: Ala-Val-Lys-Val-Gly-Ser-Leu-Val-Val-Xaa-Ala-Ala-Xaa-Xaa-Glu.

Пептид С7-1G-3 содержит карбоксиметилцистеин. Сравнение данных по последовательностям пептида С6-1 (табл. 2) и пептидов, полученных расщеплением пептида С7-1, позволяет реконструировать структуру пептида С7-1, представленную в табл. 2. Сравнение его N-концевой последовательности (остатки 1—3) с трехчленной С-концевой аминокислотной последовательностью триптического пептида Т11-1 (-Ala-Val-Lys-) [1] позволяет предположить, что пептиды Т11-1 и С7-1 перекрываются в этой области. Следовательно, вышеуказанную 25-членную последовательность можно продолжить в N-концевой части еще на пять amino-

Аминокислотный состав пептидов, полученных в результате гидролиза ВСП химотрипсином

Аминокислота	Пептид					
	C1-1	C1-2	C1-3	C1-4	C1-5	C3-1
Asp	3,0(3)	3,0(3)	3,0(3)		1,0(1)	2,7(3)
Thr		0,8(1)		0,9(1)		1,0(1)
Ser	2,9(3)	3,4(3)	1,3(1)	1,0(1)	1,1(1)	1,1(1)
Glu	1,5(1)	1,6(2)	2,0(2)		1,1(1)	3,6(4)
Pro	1,2(1)	1,3(1)	0,9(1)			0,8(1)
Gly	3,1(3)	3,9(4)	1,6(2)	1,2(1)	1,0(1)	
Ala	3,1(3)	3,8(4)	2,1(2)	1,0(1)	0,9(1)	4,0(4)
Val	1,3(1)	2,0(2)	0,9(1)	0,9(1)	1,6(3) *	1,5(2) *
Ile	0,7(1)	1,5(2)	1,3(2)	1,0(1)	0,3(1)	
Leu	2,1(2)	2,1(2)	1,6(2)			1,2(1)
Tyr						2,2(2)
Lys			0,9(1)			
Arg						1,0(1)
Cys(Cm)						0,6(1)
Всего остатков	18	24	17	7	9	23

Аминокислота	Пептид					
	C3-2	C3-3	C3-4	C3-5	C3-6	C6-1
Asp	1,3(1)	2,4(2)	1,1(1)	2,2(2)	2,1(2)	2,1(2)
Thr				0,9(1)		1,0(1)
Ser	1,2(1)			1,8(2)		
Glu	2,2(2)	2,7(3)	1,0(1)	2,2(2)		4,4(4)
Pro		1,3(1)		1,7(2)	0,9(1)	
Gly			0,7(1)	1,9(2)		2,9(3)
Ala	1,8(2)	2,8(3)	1,3(1)	1,2(1)	1,3(1)	2,0(2)
Val	0,8(1)	1,3(1)	1,2(1)	1,9(2)	1,2(1)	1,2(1)
Met	1,0(1)	0(1) **				
Ile	0,8(1)	2,0(2)	0,5(1) *			
Leu			0,8(1)	1,9(2)	1,8(2)	1,0(1)
Lys		0,8(1)		0,9(1)		
Arg						0,9(1)
Cys(Cm)						0,6(1)
Всего остатков	9	14	7	17	7	16

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислота	Пептид					
	C7-1	C9-1	C10-1	C10-2	C12-1	C15-1
Asp	3,2(3)	3,0(3)		2,7(3)		
Thr	1,0(1)					
Ser	1,0(1)	4,9(5)		1,6(2)	1,1(1)	1,0(1)
Glu	4,2(4)	3,0(3)	1,8(2)	2,8(3)		
Gly	4,3(4)	2,2(2)		1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)
Ala	2,9(3)	3,1(3)	1,0(1)	2,1(2)	1,0(1)	1,0(1)
Val	3,1(4) *	3,8(4)	0,8(1)	0,9(1)	1,9(2)	0,9(1)
Ile		1,6(2)		3,9(5) *		
Leu	1,4(2)	1,0(1)		0,9(1)	1,0(1)	0,9(1)
Tyr		1,0(1)		0,7(1)		
Lys	0,9(1)	1,9(2)		1,0(1)	1,0(1)	
Arg	1,0(1)	1,0(1)				
Trp		0,8(1) ***				
Cys(Cm)	0,7(1)					
Всего остатков	25	28	4	20	7	5
Аминокислота	Пептид					
	C16-1	C16-2	C16-3	C20-1	C21-1	C21-2
Asp		2,3(2)			1,0(1)	1,0(1)
Ser	0,9(1)		0,9(1)			
Glu	1,9(2)	0,9(1)		1,1(1)		
Gly			1,1(1)		2,0(2)	1,7(2)
Ala	1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)
Val	1,0(1)		0,9(1)			
Ile		2,1(3) *				
Leu			1,0(1)	1,1(1)		0,9(1)
Tyr	0,9(1)	1,0(1)				
Phe					0,9(1)	0,9(1)
Всего остатков	6	7	5	3	5	6
Аминокислота	Пептид					
	C22-1	C24-1	C24-2	C26-1	C26-2	C28-1
Asp	5,3(5)					1,0(1)
Thr	0,9(1)					
Ser	0,8(1)		2,9(3)			
Glu	1,0(1)		0,9(1)		3,2(3)	
Pro		1,0(1)			1,8(2)	
Gly	1,8(2)				1,2(1)	1,1(1)
Ala	1,0(1)	1,9(2)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	
Val			1,0(1)		1,1(1)	
Ile					0,9(2) *	0,9(1)
Leu				1,0(1)	2,2(2)	
Tyr	0,4(1) **	1,7(2)				0,9(1)
Phe	0,8(1)		1,0(1)			
Lys	0,8(1)		0,9(1)		1,8(2)	
Arg			0,9(1)			
Всего остатков	14	15	9	2	14	4

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислота	Пептид						
	C29-1	C30-1	C31	C32-1	C34-1	C36-1	C36-2
Asp	1,1(1)						
Thr	1,1(1)						
Ser		0,8(1)	1,0(1)		1,0(1)		
Glu			1,8(2)	2,7(3)		1,1(1)	
Pro		1,0(1)					
Gly		1,0(1)	1,4(1)		1,0(1)		
Ala	1,0(1)	3,0(3)	1,8(2)	1,9(2)	1,0(1)	0,9(1)	
Val		0,9(1)			1,7(2)		
Met				0,4(1) **			
Ile	1,0(1)		1,0(1)				
Leu	1,0(1)	1,2(1)	2,0(2)		0,9(1)		0,9(1)
Tyr							0,9(1)
Phe			0,9(1)				
His		0,8(1)					
Lys	1,0(1)		0,9(1)	1,0(1)	0,9(1)	1,0(1)	
Всего остатков	6	9	11	7	7	3	2

Аминокислота	Пептид						
	C36-3	C36-4	C37-1	C38-1	C39-1	C41-1	C43-1
Asp			1,0(1)				
Thr				2,2(2)			0,9(1)
Ser		2,1(2)	0,9(1)	1,0(1)	2,8(3)		
Glu		1,0(1)	1,0(1)		1,0(1)		1,0(1)
Pro		0,8(1)					
Gly		3,0(3)	3,7(4)	2,2(2)			
Ala		2,0(2)			1,0(1)		
Val		0,9(1)			0,9(1)	1,1(2) *	
Met				0,3(1) **			
Ile		0,9(1)				0,3(1) *	
Leu	1,0(1)	0,9(1)		0,9(1)		0,8(1)	1,0(1)
Tyr	0,9(1)		1,0(1)				
Phe					1,0(1)		
Lys			1,1(1)	1,1(1)	1,0(1)	1,0(1)	
Arg					1,0(1)		0,9(1)
Всего остатков	2	12	11	8	9	5	4

Аминокислота	Пептид						
	C43-2	C43-3	C44-1	C44-2	C45-1	C46-1	C50-1
Asp					0,9(1)	1,0(1)	
Thr	1,1(1)	1,0(1)			1,0(1)	0,8(1)	1,0(1)
Ser						0,9(1)	
Glu				1,0(1)			
Pro	0,8(1)			1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)
Gly			1,1(1)		2,1(1)		
Ala			1,0(1)	1,0(1)			
Val							1,0(1)
Leu	2,0(2)	1,1(1)		1,0(1)		1,0(1)	1,9(2)
Tyr						0,8(1)	
Phe			1,0(1)				
His					2,0(2)	1,0(1)	
Lys			0,9(1)	1,0(1)		1,0(1)	
Arg	1,0(1)	0,8(1)					
Всего остатков	5	3	4	5	5	8	5

* Найдено при определении первичной структуры. Заниженное количество гидрофобных аминокислот (Phe, Leu, Val) объясняется плохой гидролизуемостью связей между ними.

** Заниженное количество тирозина и метионина в составе пептидов объясняется разрушением их при гидролизе.

*** Триптофан определяли с помощью метансульфоновой кислоты.

кислотных остатков, установив последовательность участка ВСП из 30 аминокислот (см. табл. 3, III).

N-Концевая последовательность пептида C10-2 перекрывается последовательностью триптического пептида T13-1, в результате чего последовательность этого участка ВСП можно увеличить с N-конца на остаток тирозина (табл. 3, V).

C-Концевая часть пептида C24-2 соответствует структуре триптического пептида T21-1. Так как пептид C24-2 — часть пептида C9-1, становится известной последовательность еще четырех остатков пептида C9-1 с C-конца (см. табл. 3, IV).

Последовательность пептида C26-2 в 7-членной N-концевой области повторяет последовательность пептида T12-1 и занимает в цепи ВСП положение 4-17, подтверждая данные по секвенированию ВСП [2].

Пептид C29-1 перекрывается пептидом T11-2 [1], в результате чего установлена последовательность ВСП из 10 аминокислотных остатков (см. табл. 3, VI).

Пептид C36-4, судя по последовательности, является частью пептида C1-1 (табл. 3, I). Таким образом, становится известным C-концевой фрагмент пептида C1-1, заключенный в скобки при его исследовании. С учетом перекрывания последовательностей C1-1 и C1-2 можно считать установленной структуру участка ВСП из 24 аминокислот (см. табл. 3, I).

N-Концевая последовательность пептида C37-1 (табл. 2) перекрывается пептидом T10-1 (T20-3), в результате чего установлена последовательность ВСП из 11 аминокислотных остатков (табл. 3, VII).

Последовательность пептида C43-2 (табл. 2) перекрывается пептидом T11-2 [1]. Следовательно, структуру ВСП, включающую пептиды T11-2 и C29-1, можно увеличить с N-конца на остаток аргинина (табл. 3, VI).

Таблица 2

Пептиды лимитриптического гидролизата ВСП

Пептид	Аминокислотная последовательность
C1-1	<u>Ala-Asn-Asp-Ser-Asn-Gly-Gly-Ile-Ser-Gly-Val-Ala-Pro-Glu</u> -(Ser, Ala, Leu ₂)
C1-2	<u>Val-Ser-Gly-Thr-Ile-Ala-Ala-Asn-Asp-Ser-Asn-Gly</u> -(Ser ₂ , Glx, Pro, Gly ₂ , Ala ₂ , Val, Ile, Leu ₂)
C1-3	<u>Ser-Asn-Ala-Gly-Lys-Glu-Ile-Asp-Leu-Val-Ala-Pro-Gly-Glu</u> -(Asx, Ile, Leu)
C1-4	<u>Val-Ser-Gly-Thr-Ile-Ala</u>
C1-5	<u>Asn-Glu-Val-Ile-Ala-Val-Gly-Ser-Val</u>
C3-1	<u>Val-Val-Cys(Om)-Ala</u> -(Asx ₃ , Thr, Ser, Glx ₄ , Pro, Gly ₃ , Ala ₂ , Leu, Tyr ₂ , Arg)
C3-2	<u>Ala-Val-Glu-Gln-Lys-Ala-Asp-Ile-Ile-Ser-Met</u>
C3-3	<u>Leu-Asp-Ala-Pro-Asp-Val-Leu-Met-Glu-Lys</u> -(Glx ₂ , Ala ₂)
C3-4	<u>Val-Ala-Pro-Gly-Glu</u> -(Asx, Ile, Leu)
C3-5	<u>Ser-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Asp-Val-Pro-Glu-Leu</u> -(Asx, Thr, Glx, Ala, Val, Lys)
C3-6	<u>Leu-Asp-Ala-Pro</u> -(Asp, Val, Leu)
C6-1	<u>Val-Val-Cys(Om)-Ala-Ala-Gly-Asn-Glu-Gly-Asp-Gly-Asp</u> -(Glx ₃ , Thr, Leu, Arg)
C7-1	<u>Ala-Val-Lys-Val-Gly-Ser-Leu-Val-Val-Cys(Om)-Ala-Ala-Gly-Asn-Glu-Gly-Asp-Gly-Asp-Glu-Arg-Thr-Glu-Glu-Leu</u>
C9-1	<u>Asn-Glu-Val-Ile-Ala-Val-Gly-Ser-Val-Ser-Val</u> -(Asx ₂ , Ser ₃ , Glx ₂ , Gly, Ala, Ile, Phe, Lys,)-Leu
C10-1	<u>Ala-Val-Glu-Gln</u>
C10-2	<u>Glu-Trp-Ile-Ile-Asn-Gly-Ile</u> -(Asx ₂ , Ser, Glx ₂ , Ala ₂ , Ile, Val, Tyr, Met, Lys)-Ser-Leu
C12-1	<u>Ala-Val-Lys-Val-Gly-Ser-Leu</u>
C15-1	<u>Val-Ser-Gly-Ala-Leu</u>
C16-1	<u>Ser-Glu-Ala-Glu-Val-Tyr</u>
C16-2	<u>Ile-Ile-Asn-Gly-Ile-Asn-Tyr</u>
C16-3	<u>Val-Ser-Gly-Ala-Leu</u>
C20-1	<u>Ala-Gln-Leu</u>
C21-1	<u>Ala-Gly-Asp-Gly-Phe</u>

Последовательность пептида C44-2 перекрывается последовательностью пептида T14-2 и занимает в цепи ВСП положение 13—17 [2]. По результатам исследования пептидов T14-2 и C44-2 положение 16 в цепи ВСП занимает глутаминовая кислота, а не глутамин, как было определено при секвенировании ВСП [3].

Октапептид C46-1 перекрывается пептидом T9-1, входящим в известную последовательность из 24 аминокислот (см. описание пептида C1-3), в результате чего соответствующая область молекулы ВСП может быть увеличена на остаток тирезина с С-конца (табл. 3, II).

Гептапептид C50-1 перекрывается последовательностями пептидов T21-2 и T11-2 с N- и С-концов соответственно. Поскольку известна 11-членная последовательность, включающая пептид T11-2 (см. описание пептида C43-2), можно считать установленной структуру 16-членного фрагмента (см. табл. 3, VI). Пептид

ТАБЛИЦА 2 (продолжение)

Пептид	Аминокислотная последовательность
C21-2	<u>Ala-Gly-Asn-Gly-Phe-Leu</u>
C22-1	<u>Thr-Asp-Asp-Asp-Gly-Gly-Lys-Glu-Asp-Ala-Phe-Ser-</u> <u>Asp-Tyr</u>
C24-1	<u>Tyr-Pro-Ala-Ala-Tyr</u>
C24-2	<u>Ser-Val-Ala-Arg-Lys-Ser-Ser-Glu-Phe</u>
C26-1	<u>Ala-Leu</u>
C26-2	<u>Glu-Leu-Pro-Glu-Gly-Ile-Lys-Val-Ile-(Glx, Pro, Ala,</u> <u>Leu, Lys, Trp)</u>
C28-1	<u>Gly-Ile-Asn-Tyr</u>
C29-1	<u>Asp-Ile-Ala-Lys-Thr-Leu</u>
C30-1	<u>Ala-Ala-Pro-His-Val-Ser-Gly-Ala-Leu</u>
C31	<u>Ala-Leu-Ile-Lys-Gly-Leu-Glu-Gln-Ala-Ser-Phe</u>
C32-1	<u>Met-Glu-Lys-Ala-Glu-(Glx, Ala)</u>
C34-1	<u>Ala-Val-Lys-Val-Gly-Ser-Leu</u>
C36-1	<u>Glu-Lys-Ala</u>
C36-2	<u>Leu-Tyr</u>
C36-3	<u>Tyr-Leu</u>
C36-4	<u>Gly-Gly-Ile-Ser-Gly-Val-Ala-Pro-Glu-Ala-Ser-Leu</u>
C37-1	<u>Gly-Gly-Gln-Asp-Gly-Ser-Gly-Lys-Tyr</u>
C38-1	<u>Gly-Lys-Leu-Thr-Gly-Thr-Ser-Met</u>
C39-1	<u>Ser-Val-Ala-Arg-Lys-Ser-Ser-Glu-Phe</u>
C41-1	<u>Ile-Val-Lys-Val-Leu</u>
C43-1	<u>Gln-Arg-Thr-Leu</u>
C43-2	<u>Arg-Thr-Leu-Pro-Leu</u>
C43-3	<u>Arg-Thr-Leu</u>
C44-1	<u>Ala-Lys-Gly-Phe</u>
C44-2	<u>Lys-Ala-Pro-Glu-Leu</u>
C45-1	<u>Asn-Gly-His-Gly-Thr-His</u>
C46-1	<u>Ser-Thr-Leu-Pro-Asn-His-Lys-Tyr</u>
C50-1	<u>Val-Arg-Arg-Thr-Leu-Pro-Leu</u>

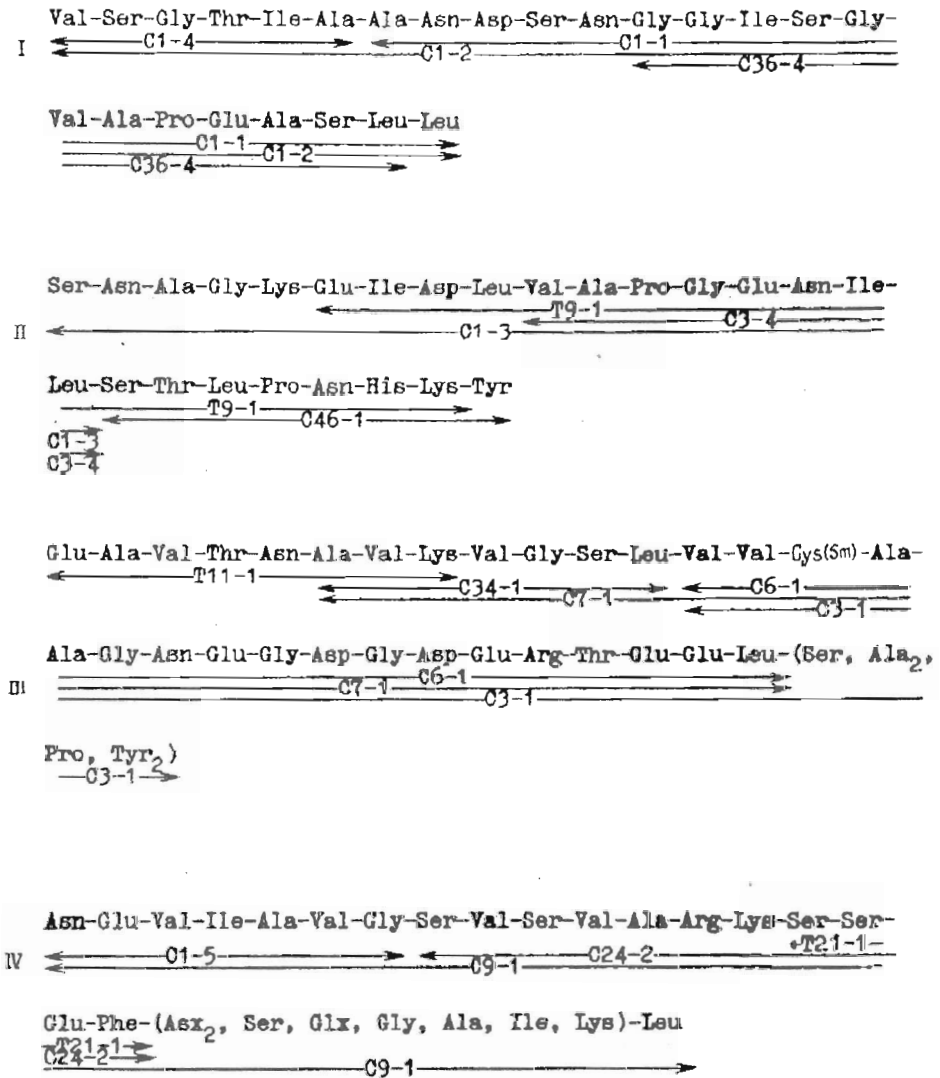
Определена методом Эдмана в сочетании с дансильрованием (→), методом DABITC/PITC (→), на твердофазном секвенаторе (→), гидролизом карбоксипептидазами А и В (←).

C43-2 (см. табл. 2) — продукт неспецифического расщепления химотрипсином связи -Arg-Arg- участка ВСП, соответствующего последовательности пептида C50-1.

Кроме приведенных выше 14 пептидов, была изучена структура еще 37 пептидов. Некоторые пептиды имеют одинаковую последовательность (например, пептид C12-1 аналогичен пептиду C34-1, пептид C39-1 — пептиду C24-2, пептид C16-3 — пептиду C15-3) или являются фрагментами каких-либо известных последовательностей (так, пептид C3-4 аналогичен последовательности 5—12 пептида Т9-1, пептид C43-2 является частью пептида C50-1).

Таким образом, в результате изучения структуры 51 пептида химотриптического гидролизата была установлена последовательность, в сумме составляющая 381 аминокислотный остаток. Анализ полученных данных показал, что иссле-

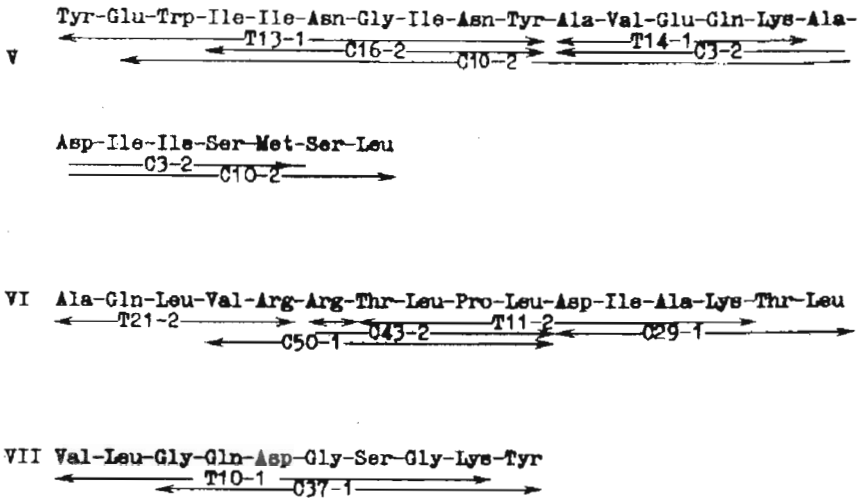
Таблица 3
Сопоставление последовательностей триптических
и химотриптических пептидов ВСП



дованные пептиды в основном (82%) — продукты специфического расщепления ВСП химотрипсином по карбоксильным связям лейцина и ароматических аминокислот (триптофана, тирозина и фенилаланина). Неспецифический гидролиз в единичных случаях прошел по карбоксильным связям аланина, валина, гистидина, метионина и амидов дикарбоновых кислот. Наиболее интересным представляется расщепление химотрипсином связи -Arg-Arg- (см. пептиды C50-1 и C43-2).

Следует отметить, что гидролиз ВСП химотрипсином прошел недостаточно глубоко, что подтверждает наличие специфических для химотрипсина нерасщепленных связей во многих исследованных пептидах (пептиды C1-3, C3-1, C3-5, C7-1, C10-2 и др. — см. табл. 2).

Таблица 3 (продолжение)



Экспериментальная часть

В работе использовали химотрипсин (Serva, ФРГ); карбоксипептидазы А и В (Worthington, США); фенилизотиоцианат, дансилхлорид (Fluka, Швейцария); диметиламиноазобензизотиоцианат (Aldrich, США); ионообменную смолу Chromobeads P,2-1-01-18(A)₂15-03-58-04 (Ирландия). Asp-Специфичная протеиназа была любезно предоставлена сотрудником нашей лаборатории О. В. Мосоловой [4].

Гидролиз ВСП химотрипсином. Восстановленную и карбоксиметилированную ВСП [5] (280 мг) растворяли в 60 мл 0,05 н. триэтиламин-карбонатного буфера, рН 8,5. К раствору добавляли 1,4 мг химотрипсина в 1 мл того же буфера и оставляли на 2 ч при перемешивании при 37° С. Затем добавляли еще 1,4 мг химотрипсина и продолжали гидролиз еще 2 ч. Гидролизат подкисляли конц. уксусной кислотой до рН 2,2, замораживали и лиофилизовали.

Продукты химотриптического гидролиза разделяли на колонке со смолой Chromobeads в условиях, описанных ранее [2].

Пептидсодержащие фракции идентифицировали на пептидном анализаторе AA-II (Technicon, Ирландия) [6].

ВЭЖХ проводили на приборе LDC (США). Пептиды растворяли в 100 мкл 5% водного раствора ацетонитрила, содержащего 0,05% трифторуксусную кислоту и 0,025% триэтиламин, и наносили на колонку (4,6×250 мм) Zorbax ODS (Du Pont, США), уравновешенную 5% водным раствором ацетонитрила. Элюцию проводили в градиенте концентрации ацетонитрила (5—95%). Поглощение элюатов измеряли при 210 нм.

Аминокислотный анализ пептидов (5,7 н. HCl, 105° С, 24 ч) осуществляли на анализаторе Durrum DDC (США).

Структуру пептидов изучали методом Эдмана в дансильном варианте [3] и методом DABITC/PITC [7] или с помощью твердофазного секвенатора Rank Hilger (Англия). Пептиды иммобилизовали на аминопропилстекле диизотиоцианатным методом [8]. Отщепляющиеся тиазолиноны переводили в фенилтиогидантоины обработкой 1 н. HCl в течение 10 мин при 80° С и анализировали с помощью ВЭЖХ или в тонком слое силикагеля [9].

Хроматографию производных аминокислот проводили на пленках фирмы BDH (Англия).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сурова И. А., Янонис В. В., Ревина Л. П., Левин Е. Д., Степанов В. М.//Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 6. С. 783—789.
2. Ковалева Г. Г., Остославская В. И., Сурова И. А., Ревина Л. П., Коплова Е. К., Немцова Е. Р., Левин Е. Д., Тимохина Е. А., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Степанов В. М.//Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 12. С. 1765—1777.
3. Stepanov V. M., Strongin A. Ya., Izotova L. S., Abramov Z. T., Belyanova L. P., Baratova L. A., Lyublinskaya L. A., Ermakova L. M.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 77. № 1. P. 397—403.
4. Мосолова О. В., Руденская Г. Н., Степанов В. М., Цапина И. А., Ходова О. М.//Биохимия. 1987. Т. 52. № 3. С. 414—421.
5. Ваганова Т. И., Левин Е. Д., Степанов В. М.//Биохимия. 1964. Т. 29. Вып. 6. С. 1070—1075.
6. Lin K. D., Deutsch H. F.//Anal. Biochem. 1973. V. 56. № 1. P. 155—164.
7. Chang I. Y.//Meth. Enzymol. 1983. V. 91. P. 455—466.
8. Laursen R. H., Horn M. I., Volner A. G.//FEBS Lett. 1972. V. 21. № 1. P. 67—72.
9. Алахов Ю. Б., Бундуле М. А., Бундулис Ю. П., Винокуров Л. М., Козлов В. П., Мотуз Л. П.//Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 304—314.

Поступила в редакцию
12.V.1993

После доработки
15.XI.1993

*I. A. Surova, V. V. Yanonis, L. P. Revina, V. I. Ostoslavskaya,
L. A. Kolesnikova, E. A. Timokhina, E. D. Levin, V. M. Stepanov*

PRIMARY STRUCTURE OF INTRACELLULAR SERINE PROTEASE OF *Bacillus amyloliquefaciens* II. AMINO ACID SEQUENCES OF CHYMOTRYPTIC PEPTIDES

Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

Chymotrypsin hydrolyzate of the intracellular serine protease was separated by ion-exchange chromatography on a sulphocationite resin followed by HPLC to yield fifty one individual peptides. Their sequences, corresponding in total to 381 amino acid residues, were determined by the manual Edman procedure.