



УДК 547.96.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА РИБОНУКЛЕАЗЫ  
*BACILLUS INTERMEDIUS* 7PАфанасенко Г. А., Дудкин С. М., Каминер Л. Б.,  
Северин Е. С.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Голубенко И. А.

Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина, Казань

Определена первичная структура рибонуклеазы *Bacillus intermedius* 7P. Для этого проведено расщепление белка двумя методами — протеазой из *Staphylococcus aureus* и N-хлорсукцинимидом, выделены соответствующие пептидные фрагменты и установлена их структура, что в сочетании с анализом N-концевого фрагмента белка на секвенаторе дало возможность реконструировать полипептидную цепь белка, состоящую из 109 аминокислотных остатков. Сравнительный анализ первичных структур некоторых РНКаз микроорганизмов различной специфичности показал наличие консервативных участков в их С-концевой области. Проведен теоретический расчет вторичной структуры исследуемого фермента, результаты которого хорошо согласуются с имеющимися экспериментальными данными.

Определение первичной структуры белка — необходимый этап детального структурно-функционального анализа ферментов. Один из подходов к изучению характерных особенностей первичной структуры белков, определяющих механизм действия ферментов и формирование их вторичной и третичной структур, заключается в сравнении аминокислотной последовательности белков, обладающих аналогичными функциональными свойствами, но выделенных из различных источников. Так, на примере белков семейств гемоглобинов [1], цитохромов *c* [2] и панкреатических рибонуклеаз [3] было показано, что более 30% аминокислотных остатков в молекуле белка могут быть замещены без существенных изменений в его конформации. В то же время некоторые аминокислотные последовательности этих белков являются консервативными и определяют как конформацию, так и функциональные свойства. На примере панкреатических РНКаз было показано, что существование их вторичной и третичной структур контролируется остатками ароматических аминокислот, а их каталитические свойства — остатками гистидина-12 и -119 и лизина-41 [3].

Интересным объектом для подобных исследований может служить РНКазы *Bacillus intermedius* 7P [4] \*. Фермент имеет преимущественную специфичность к пуриновым звеньям молекулы РНК и не расщепляет 2' : 3'-фосфаты и динуклеозидфосфаты [5].

Этот фермент в отличие от большинства РНКаз не содержит дисульфидных мостов, но в то же время обладает высокой стабильностью в широ-

\* Метод препаративного выделения фермента и некоторые его характеристики будут опубликованы в статье И. А. Голубенко и др. в № 3 (1979 г.) журнала «Биохимия».

ком диапазоне рН. Как было установлено методом КД [6], 6% молекулы РНКазы имеет  $\alpha$ -спиральную конформацию и около 20% —  $\beta$ -структуру.

Цель настоящей работы — определение полной аминокислотной последовательности рибонуклеазы *B. intermedius* 7P и сравнение ее с первичной структурой других РНКаз микроорганизмов, а также проведение теоретического расчета вторичной структуры белка и сопоставление этой модели с данными по вторичной структуре, полученными методом КД.

РНКазы *B. intermedius* 7P имеет  $M$  12 300 и состоит из 109 аминокислотных остатков: Asp (14), Thr (7), Ser (10), Glu (4), Pro (3), Gly (9), Ala (11), Val (7), Ile (7), Leu (7), Tyr (7), Phe (4), Lys (5), His (1), Arg (10), Trp (3). Из этих данных видно, что характерной особенностью белка с точки зрения выбора возможной стратегии установления первичной структуры является отсутствие в его составе метионина, что исключает применение бромциана для расщепления белка. В то же время высокое содержание основных и ароматических аминокислот делает нецелесообразным применение таких традиционных ферментов для расщепления полипептидной цепи, как трипсин и химотрипсин, поскольку их использование должно привести к образованию большого числа сравнительно мелких пептидных фрагментов. Вместе с тем наличие в составе белка только четырех остатков глутаминовой кислоты делает предпочтительным использование для гидролиза протеазы из *Staphylococcus aureus* (далее стафилококковая протеаза), специфичной в основном к связям типа Glu—X, где X — любая аминокислота, кроме пролина. Белок содержит в своем составе только три остатка триптофана, поэтому перспективным казалось расщепление полипептидной цепи белка по остаткам триптофана с помощью N-хлорсукцинимидов [7, 8]. Таким образом, выработанная нами стратегия определения первичной структуры рибонуклеазы *B. intermedius* 7P включала проведение двух гидролизом — с помощью стафилококковой протеазы и N-хлорсукцинимидов.

На первом этапе исследования было проведено определение структуры N-концевого фрагмента белка на секвенаторе. Помимо традиционных методов газожидкостного и аминокислотного анализа продуктов автоматической деградации мы использовали разработанный нами количественный метод определения фенилтиогидантоиновых производных аминокислот на полиамидных пластинах (см. «Экспериментальную часть»). Этот метод значительно облегчает идентификацию фенилтиогидантоинов и обеспечивает возможность регистрации результатов, полученных с помощью ТСХ. Кроме этого, все пробы с секвенатора исследовали с помощью соответствующих реакций на бумаге на присутствие аргинина и триптофана, а пробы после 42, 43 и 44-го цикла были подвергнуты дополнительному анализу на жидкостном анализаторе высокого давления для достоверной идентификации остатка глутаминовой кислоты в 43-м положении.

В табл. 1 представлены результаты анализа проб с секвенатора. Из этих данных видно, что из 50 циклов деградации в 40 была осуществлена достоверная идентификация аминокислот. Определение остальных аминокислот (в положениях 25, 27, 30, 37, 39, 40 и с 46-го по 49-е) было проведено при анализе пептидов. Следует отметить, что определение положения аминокислот Glu<sup>43</sup> и Trp<sup>34</sup> на секвенаторе значительно облегчило реконструкцию первичной структуры молекулы после завершения анализа последовательности аминокислот в полученных при расщеплении белка пептидах.

Гидролиз рибонуклеазы *B. intermedius* 7P стафилококковой протеазой проводили при рН 8,0—8,1. В этом диапазоне рН рибонуклеаза плохо растворима. Для увеличения растворимости белок предварительно модифицировали введением цитраконовой группировки по свободным аминогруппам. По окончании гидролиза цитраконовые группировки удаляли и полученную смесь пептидов фракционировали на сефадексе G-50 (рис. 1). Результаты гель-электрофореза, N-концевого и аминокислотного анализа показали, что фракция I содержит белок, не подвергшийся протеолизу.

## Анализ продуктов автоматической деградации белка на секвенаторе

Цикл, %	Аминокислота	Выход, %	Колличес- ственные методы анализа *	Цветные реакции	Цикл, %	Амино- кислота	Выход, %	Колличес- ственные методы анализа *	Цветные реакции
1	Ala	100	Г, Т		26	Lys	29,9	Т, А	
2	Val	99,52	Г, Т		27	Ser **	—	А, Т, Г	
3	Ile	97,9	Г, Т		28	Gln	14,0	Т, Г, А	
4	Asn	83,7	Т, Г, А		29	Ala	18,3	А, Т, Г	
5	Thr	43,8	Т, А		30	Ser **	—	А, Т, Г	
6	Phe	89,4	Г, Т		31	Ala	18,3	А, Т, Г	
7	Asp	71,7	Т, Г, А		32	Leu	16,6	Г, Т, А	
8	Gly	73,7	Т, Г		33	Gly	18,0	Т, Г, А	
9	Val	72,7	Г, Т, А		34	Trp	17,7	Г, Т	Trp+
10	Ala	64,4	А, Т, Г		35	Val	13,6	А, Т, Г	
11	Asp	59,8	Т, Г, А		36	Ala	17,9	Т, А, Г	
12	Tyr	63,5	Г, Т		37	Ser **	—	А, Т, Г	
13	Leu	65,2	Г, Т, А		38	Lys	15,9	Т, А	
14	Ile	62,9	Г, Т		39	Gly **	—	А, Т, Г	
15	Arg	41,9	А, Т	Arg+	40	Asp **	—	А, Т, Г	
16	Tyr	71,7	Т, Г		41	Leu	13,9	Г, А, Т	
17	Lys	61,8	Т, А		42	Ala	11,9	А, Т, Г	
18	Arg	40,7	А, Т	Arg+	43	Glu	10,9	Т, А	
19	Leu	58,2	Г, Т		44	Val	10,0	А, Т, Г	
20	Pro	51,8	А, Т, Г		45	Ala	8,0	А, Т, Г	
21	Asn	43,8	Т, А, Г		46	Pro **	—	А, Т, Г	
22	Asp	57,8	Т, А, Г		47	Gly **	—	А, Т, Г	
23	Tyr	45,9	Г, А, Т		48	Lys **	—	А, Т, Г	
24	Ile	43,6	Г, Т		49	Ser **	—	А, Т, Г	
25	Thr **	—	А, Т, Г		50	Ile	8,0	А, Т, Г	

\* Обозначения: Г — газожидкостный анализ; А — аминокислотный анализ; Т — ТСХ. Расчет выхода проводили с помощью метода, указанного первым.

\*\* Однозначная идентификация указанных аминокислот была получена при анализе пептидов.

Таблица 2

Аминокислотный состав пептидов, полученных при гидролизе РНКазы *B. intermedius* 7P стафилококковой протеазой

Аминокислоты	Пептиды					
	SpII-1	SpII-2	SpIII-1	SpIII-2	SpIII-3	SpIII-4
Asp	3,25(3)	6,20(6)	2,10(2)	3,35(3)	0,20(0)	0,15(0)
Thr	0,95(1)	1,80(2)	0,10(0)	0,85(1)	0,95(1)	1,85(2)
Ser	2,65(3)	2,80(3)	1,75(2)	0,10(0)	2,20(2)	0,20(0)
Glu	2,25(2)	—	1,05(1)	—	1,05(1)	—
Pro	0,85(1)	—	0,90(1)	—	0,95(1)	—
Gly	2,20(2)	1,15(1)	3,20(3)	1,10(1)	2,25(2)	0,15(0)
Ala	3,95(4)	2,25(2)	0,95(1)	2,20(2)	0,95(1)	1,00(1)
Val	0,80(1)	2,00(2)	1,75(2)	1,80(2)	0,15(0)	—
Ile	1,75(2)	1,80(2)	0,85(1)	0,75(1)	—	0,80(1)
Leu	3,85(4)	1,75(2)	0,15(0)	—	1,10(1)	—
Tyr	2,75(3)	2,80(3)	0,10(0)	0,10(0)	—	0,85(1)
Phe	—	0,90(1)	0,90(1)	0,85(1)	—	0,95(1)
His	—	—	—	—	—	1,05(1)
Lys	3,25(3)	1,25(1)	1,10(1)	0,10(0)	—	0,20(0)
Arg	1,95(2)	2,10(2)	1,00(1)	—	2,85(3)	2,05(2)
Trp *	0,65(1)	0,76(1)	—	—	0,71(1)	—
Всего остатков	32	28	16	11	13	9
N-концевая аминокислота	Tyr	Ala	Val	Ala	Gly	His
Выход, %	68	10	52	75	48	56

\* Триптофан определяли после гидролиза метансульфоновой кислотой.

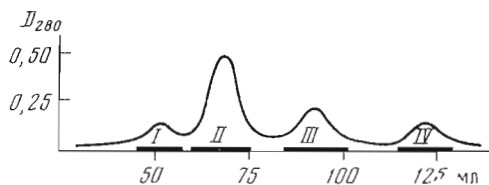


Рис. 1. Гель-фильтрация на колонке  $1 \times 180$  см с сефадексом G-50 (тонкий) смеси пептидов (Sp), полученных при гидролизе РНКазы стафилококковой протеазой, в 10%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  с 8 М мочевиной. Здесь и далее отмечены границы объединения фракций

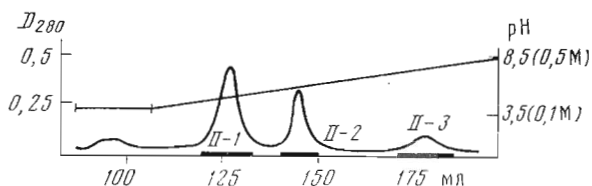


Рис. 2. Хроматография фракции II (рис. 1) на Sp-сефадексе C-25 (колонка  $1 \times 15$  см) в градиенте молярности и pH формат-аммонийного буфера

Спектр поглощения материала фракции IV имеет максимум в районе 254 нм и, вероятно, представляет собой цитраконовую кислоту, образовавшуюся при снятии защиты. Пептидного материала эта фракция не содержала. Разделение пептидов фракции II проводили ионообменной хроматографией на SP-сефадексе C-25 (рис. 2). При этом были получены в гомогенном состоянии пептиды SpII-1 и SpII-2. Фракция SpII-3 содержала пептидный материал в следовых количествах и дальнейшему анализу не подвергалась.

Выделение пептидов, содержащихся во фракции III (рис. 1), проводили с помощью хроматографии и электрофореза на бумаге при pH 3,5. При этом были получены пептиды SpIII-1 — SpIII-4. Таким образом, в результате расщепления белка стафилококковой протеазой получено шесть гомогенных пептидов, причем аминокислотный баланс суммы всех пептидов и исходного белка сходится с достаточной степенью точности (табл. 2).

Для определения структуры полученных пептидов использовались метод Эдмана в дансильной модификации [9] и гидролиз пептидов карбоксипептидазами А, В и С и лейцинаминопептидазой. Определение С-концевой последовательности проводили по кинетике деградации пептидов карбоксипептидазами с последующим анализом полученных продуктов количественным дансильным микрометодом [10, 11]. Для определения структуры пептидов большого молекулярного веса осуществляли их расщепление трипсином или химотрипсином.

*Пептид SpIII-2.* Сопоставление результатов пяти циклов деградации этого пептида по методу Эдмана (табл. 3) и его аминокислотного анализа с данными, полученными при секвенировании белка, позволяет утверждать, что пептид является N-концевым в молекуле белка и занимает положение с 1-го по 11-й остаток.

*Пептид SpII-1.* Данные деградации пептида по методу Эдмана с учетом результатов секвенирования белка показывают, что пептид непосредственно примыкает к пептиду SpIII-2. Так как структура основной части этого пептида определена на секвенаторе, то представляло интерес установить положение тех аминокислот, достоверность идентификации которых при автоматическом определении вызывала сомнения.

Пептид SpII-1 был подвергнут дополнительному гидролизу трипсином. Полученная смесь пептидов была разделена с помощью электрофореза и

Данные деградации по Эдману пептидов, полученных при расщеплении РНКазы стафилококковой протеазой

Пептид	Аминокислотная последовательность
SpII-1	Tyr-Leu-Ile-Arg-Tyr-Lys-Arg-Leu-
SpII-2	Ala-Asx-Ile-Asx-Tyr-Val-Ser-Gly-Phe-Arg-Asx-
SpII-1	Val-Ala-Pro-Gly-Lys-Ser-Ile-Gly-Gly-Asx-
SpII-2	Ala-Val-Ile-Asx-Thr-Phe-
SpIII-3	Gly-Arg-Leu-Pro-Ser-Ala-Gly-Ser-Arg-Thr-
SpIII-4	His-Tyr-Ala-Thr-Phe-Thr-Arg-

Таблица 4

Аминокислотная последовательность пептидов, полученных при триптическом гидролизе фрагментов SpII-1, SpII-2 и SpIII-3

Пептид	Аминокислотная последовательность *
SpII-11	Leu-Pro-Asx-Asx-Tyr-Ile-Thr-Lys → → → → → ← ← ← ←
SpII-12	Ser-Glx-Ala-Ser-Ala-Leu-Gly-X-Val-Ala-Ser-Lys → → → → → → → → → → → →
SpII-13	Gly-Asp-Leu-Ala-Glu → → → → ← ← ←
SpII-21	Ala-Asp-Ile-Asn-Tyr-Val-Ser-Gly-Phe-Arg → → → → → → → → → → →
SpII-22	Asn-Ala-Asp-Arg → → ← ←
SpII-23	Leu-Val-Tyr-Ser-Ser-Asx-Trp?-Leu-(Ile, Tyr, Lys) → → → → → → → →
SpII-24	Thr-Thr-Asp → → →
SpIII-31	Gly-Arg →
SpIII-32	Leu-Pro-Ser-Ala-Gly-Ser-Arg → → → → → → →
SpIII-33	Thr-Trp-Arg → → →

\* Стрелками показана аминокислотная последовательность, определенная деградацией пептидов по методу Эдмана с идентификацией Dns-производных аминокислот (→), с помощью лейцинаминопептидазы (↗) и с помощью карбоксипептидазы С (←).

хроматографии на бумаге. При этом, в частности, были выделены пептид SpII-11, имеющий в своем составе Asp (2,00), Thr (0,85), Pro (0,90), Ile (1,00), Leu (0,85), Tyr (0,90), Lys (1,10); пептид SpII-12: Ser (2,80), Glu (1,10), Gly (1,05), Ala (3,20), Val (0,90), Leu (0,85), Lys (1,00); пептид SpII-13: Asp (1,15), Glu (1,15), Gly (1,10), Ala (1,0), Leu (0,95). Последовательность первых шести аминокислот пептида SpII-11 была определена по методу Эдмана (табл. 4). После 24 ч инкубации этого пептида с карбоксипептидазой С были обнаружены три аминокислоты в свободном состоянии: Lys, Thr и Ile в соотношении 1 : 0,8 : 0,8, что подтверждает наличие остатка треонина в положении 25.

Идентификация остатков серина в положениях 27, 30 и 37 была получена при ступенчатой деградации пептида SpII-12, занимающего положение

ные с 27-го по 38-й остаток в молекуле белка. Положение первых трех аминокислот в структуре пептида SpII-13 установлено методом Эдмана (табл. 4). Карбоксипептидаза С за 1 ч отщепляет от этого пептида три аминокислоты, Glu, Ala и Leu, в соотношении 1 : 0,55 : 0,25. 24-часовой гидролиз этого пептида лейцинаминопептидазой показал отсутствие в его составе амида аспарагиновой кислоты. Установление структуры этого пептида дало возможность идентифицировать аминокислотные остатки в положениях 39 и 40.

*Пептид SpIII-4.* Идентификация N-концевой аминокислоты в этом пептиде была осуществлена с помощью лейцинаминопептидазы. Трехчасовой гидролиз этим ферментом показал наличие в инкубационной смеси в основном двух аминокислот, His и Trp, в эквимолярном соотношении. При деградации пептида по методу Эдмана была определена последовательность первых семи аминокислот (табл. 3). Пептид SpIII-4 является единственным, выделенным в результате протеолиза, не содержащим на C-конце глутаминовой или аспарагиновой кислот. При определении его C-концевой последовательности с помощью карбоксипептидазы В и смеси карбоксипептидаз А и В была получена последовательность Arg-Ile-Arg, совпадающая с C-концевой последовательностью исходного белка.

*Пептид SpIII-3.* N-концевая последовательность получена по Эдману (табл. 3). При гидролизе пептида карбоксипептидазой С за 6 ч происходило отщепление только одной аминокислоты — глутаминовой, а через 18 ч в инкубационной смеси определяли Glu, Arg и Trp в соотношении 1 : 0,85 : 0,40.

Для установления полной структуры пептид SpIII-3 был подвергнут гидролизу трипсином. Из полученного гидролизата с помощью электрофореза на бумаге при pH 3,5 была выделена глутаминовая кислота и три пептида, имеющих следующий аминокислотный состав: SpIII-31: Gly (1,20), Arg (1,00); SpIII-32: Gly (1,20), Arg (1,10), Leu (0,90), Pro (0,90), Ser (2,80), Ala (1,00); SpIII-33 : Arg (1,00), Thr (0,80). SpIII-33 проявляет положительную реакцию на триптофан. Очевидно, пептид SpIII-31 (табл. 4) является N-концевым в структуре исходного пептида, а пептид SpIII-32 непосредственно примыкает к нему. Гидролиз пептида SpIII-33 лейцинаминопептидазой (24 ч) дал три аминокислоты в эквимолярном соотношении: Thr, Trp и Arg. Полученные данные позволили полностью реконструировать первичную структуру пептида Sp III-3.

*Пептид SpIII-1.* Последовательность первых 10 аминокислот определена по методу Эдмана (табл. 3). Гидролиз пептида карбоксипептидазой С показал, что в течение 4 ч происходит отщепление только C-концевой аминокислоты — глутаминовой, а после 24 ч в инкубационной смеси определяли Asn, Arg и Glu в соотношении 0,8 : 0,8 : 1,0. При гидролизе пептида химотрипсином были получены два пептида. Их разделили методом хроматографии на бумаге: SpIII-11 — Asp (1,10), Ser (0,95), Pro (0,85), Gly (3,40), Ala (1,00), Val (1,80), Ile (0,90), Phe (0,90), Lys (1,10) и SpIII-12 — Asp (1,05), Ser (1,10), Glu (0,95), Arg (1,00). Карбоксипептидаза С отщепляет от пептида SpIII-11 за 10 мин Phe и Val в соотношении 1 : 0,3, а за 24 ч — Phe, Val и Asp в соотношении 1 : 0,8 : 0,6, т. е. C-концевая последовательность имеет вид: Asp-Val-Phe. Эдмановская деградация пептида SpIII-12 дала следующие результаты: Ser-Asx-Arg, что позволило завершить определение полной структуры пептида SpIII-1.

*Пептид SpII-2.* Анализ первичной структуры этого пептида вызвал значительные затруднения в связи с его низким выходом после хроматографии на SP-сефадексе С-25. Было проведено 10 циклов деградации по методу Эдмана (см. табл. 3). При инкубации пептида с карбоксипептидазой С за 4 ч происходило отщепление аспарагиновой кислоты и треонина в соотношении 1 : 0,25. После проведения дополнительного протеолиза пептида трипсином с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге были выделены четыре пептида. Первый из них, SpII-21, соответствует

N-концевой последовательности пептида SpII-2 и включает первые его 10 аминокислот, а четвертый (SpII-24) являясь -концевым трипептидом (см. табл. 4). Гидролиз пептида SpII-21 лейцинаминопептидазой при соотношении фермент — субстрат 0,2 мкг/1 нмоль пептида после 10 ч инкубации привел к отщеплению Ala и Asp кислоты в соотношении 1 : 0,3. При увеличенном (в 4 раза) соотношении фермент : субстрат через 24 ч в инкубационной смеси определяли Ala, Asp, Ile, Asn и Tyr в соотношении 1 : 0,85 : 0,90 : 0,40 : 0,40, что дало возможность завершить установление структуры пептида SpII-21 и тем самым структуры N-концевой части пептида SpII-2.

Пептид SpII-22 имел следующий аминокислотный состав: Asp (2,10), Ala (1,00), Arg (0,90) и, исходя из результатов ступенчатой деградации этого пептида и определения положения аспарагиновой кислоты и ее амида с помощью лейцинаминопептидазы и карбоксипептидазы C, структуру Asn-Ala-Asp-Arg.

Пептид SpII-23, имевший в своем составе Asp (1,05), Ser (1,90), Val (0,90), Ile (0,85), Leu (1,80), Tyr (1,90), Lys (1,00) и дававший положительную реакцию на триптофан, был выделен в количестве 40 нмоль. Это оказалось недостаточным для установления его полной структуры. Деградация пептида по методу Эдмана дала аминокислотную последовательность, представленную в табл. 4. При исчерпывающем гидролизе этого пептида лейцинаминопептидазой в течение 24 ч были обнаружены Asp, Ser, Val, Ile, Leu, Tyr, Lys и Trp в соотношении 0,5 : 1,8 : 1,0 : 0,1 : 1,2 : 0,9 : 0,4. Основным результатом эксперимента является идентификация аспарагиновой кислоты в дезамидированной форме (положение № 6 пептида), а также подтверждение наличия остатка триптофана в его составе.

Ввиду недостаточного количества пептида SpII-2, имевшегося в распоряжении авторов, была установлена только его частичная структура.

Определение структуры C-концевой части пептида SpII-23 и установление перекрытий между трипептическими фрагментами пептида SpII-2 проведено при анализе пептидов, выделенных при расщеплении белка по остаткам триптофана N-хлорсукцинимидом.

Таким образом, в результате расщепления рибонуклеазы стафилококковой протеазой получено шесть гомогенных пептидов и установлена полная аминокислотная последовательность пяти из них.

Для определения перекрытий между рассмотренными пептидами было проведено расщепление РНКазы по остаткам триптофана N-хлорсукцинимидом. Полученная смесь пептидов была подвергнута гель-фильтрации на сефадексе G-50 (рис. 3).

N-концевой анализ смеси пептидов перед их разделением показал, как и следовало ожидать из результатов анализа Sp-пептидов, наличие только четырех аминокислот: Ala, Val, Arg и Leu. Другие аминокислоты не были обнаружены даже в следовых количествах. Это свидетельствует о высокой специфичности использованного метода расщепления. N-концевой анализ объединенных фракций, полученных после гель-фильтрации смеси пептидов, показал, что фракции III (Val), IV (Val), VI (Ala) и VIII (Arg) представляют собой гомогенные пептиды (в скобках указаны N-концевые аминокислоты). Разделение пептидов фракции VII (N-концевой анализ: Leu, Arg) проводили гель-фильтрацией на биогеле P-6 (рис. 4). При этом были выделены пептиды SVII-1 — SVII-3, причем последний оказался идентичным пептиду, содержащемуся во фракции VIII. Ионнообменной хроматографией на CM-целлюлозе, уравновешенной 0,01 M ацетатом натрия (pH 4,5) в присутствии 4 M мочевины (рис. 5), из материала фракции V (N-концевые аминокислоты Arg, Ala) были получены пептиды SV-1 и SV-4. Фракции V-2 и V-3 содержали пептидный материал в следовых количествах и дальнейшему анализу не подвергались.

Таким образом, в результате расщепления белка по остаткам триптофана удалось получить 9 фрагментов (табл. 5, 6). Приведенные данные

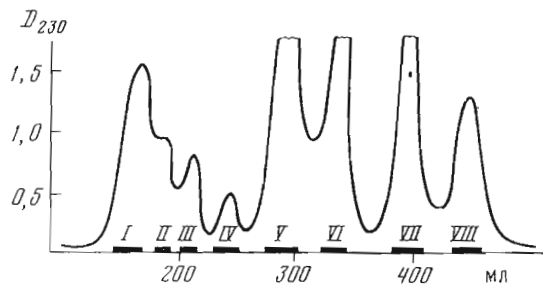


Рис. 3. Гель-фильтрация на колонке  $1,8 \times 200$  см с сфадексом С-50 (сверхтонкий) в 0,02 н. HCl смеси пептидов (S), полученных при расщеплении РНКазы N-хлорсукцинимидом.

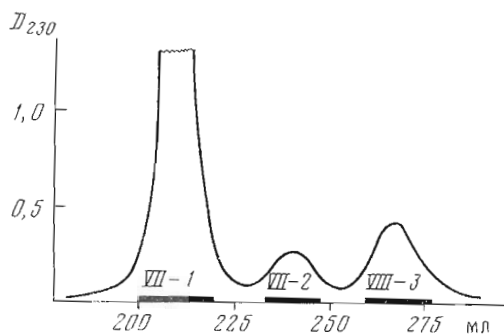


Рис. 4. Гель-фильтрация фракции VII (рис. 3) на колонке  $2 \times 100$  см с биогелем Р-6 (200—400 меш) в 0,02 н. HCl

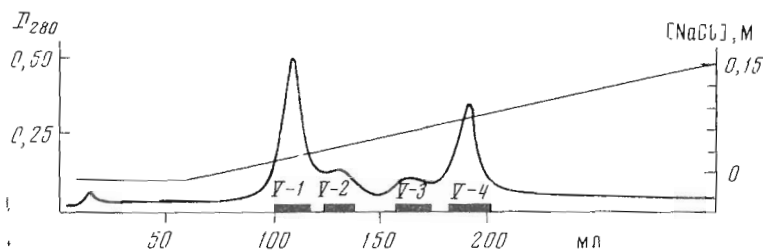


Рис. 5. Хроматография фракции V (рис. 3) на колонке  $1 \times 15$  см с СМ-целлюлозой в градиенте NaCl

позволяют сделать следующие выводы: 1) пептиды SVII-3, SV-4 и SVII-1 идентичны соответственно пептидам SVIII, SVI и SVII-2; 2) пептид SIII представляет собой сумму пептидов SIV и SVIII и содержит в своем составе перасцепленную связь  $\text{Trp}^{70}-\text{Arg}^{71}$ ; 3) аналогично пептид SV-1 представляет собой сумму пептидов SVIII и SVII-1; 4) пептид SVI является N-концевым в молекуле белка и занимает положение с 1-го по 34-й остаток; 5) пептид SIV занимает положение начиная с 35-го остатка; 6) кроме того, анализ С-концевой последовательности пептида SVII-1, содержащего единственный в молекуле белка остаток гистидина, показал, что этот пептид является С-концевым в молекуле белка.

Более детальный анализ пептида SVI не проводился, так как его структура однозначно следует из результатов секвенирования белка и данных по структуре пептида SpII-1.

Значительный интерес представлял пептид SIV, содержащий два остатка глутаминовой кислоты. Для его анализа был предпринят химотриптический гидролиз. После проведения электрофореза на бумаге из полученного гидролизата было выделено пять гомогенных пептидов, в том чис-



Аминокислотный состав пептидов, полученных при гидролизе РШказы *B. intermedium* 7Р N-хлорсулфинимидом

Аминокислоты	Пептиды									
	СПИ	СИУ	SV-1	SV-4	SVI	SVII-1	SVII-2	SVII-3	SVIII	
Asp	8,45(8)	3,25(3)	6,30(6)	5,30(5)	5,35(5)	4,30(1)	1,20(1)	5,25(5)	5,40(5)	
Thr	0,90(1)	0,80(1)	3,90(4)	1,30(2)	1,85(2)	3,70(4)	3,65(4)	—	—	
Ser	7,65(8)	4,65(5)	2,75(3)	1,90(2)	4,75(2)	—	—	2,75(3)	2,80(3)	
Glu	3,25(3)	1,95(2)	1,05(1)	0,90(1)	1,05(1)	—	—	1,00(1)	0,90(1)	
Pro	2,20(2)	2,05(2)	—	1,10(1)	0,95(1)	—	—	—	—	
Gly	7,35(7)	6,30(6)	1,10(1)	2,05(2)	2,25(2)	—	—	1,10(1)	1,25(1)	
Ala	6,00(6)	4,00(4)	3,00(3)	4,00(4)	4,00(4)	1,00(1)	1,00(1)	2,00(2)	2,00(2)	
Val	4,75(5)	2,75(3)	1,85(2)	1,70(2)	1,85(2)	—	—	1,75(2)	1,80(2)	
Ile	2,10(2)	0,80(1)	2,75(3)	2,65(3)	2,70(3)	1,75(2)	1,90(2)	0,80(1)	0,75(1)	
Leu	3,15(3)	1,80(2)	1,70(2)	2,90(3)	2,70(3)	0,95(1)	0,80(1)	0,80(1)	0,85(1)	
Tyr	2,10(2)	—	3,65(4)	2,75(3)	2,80(3)	2,20(2)	1,75(2)	1,95(2)	1,90(2)	
Phe	1,80(2)	0,90(1)	1,90(2)	0,90(1)	0,95(1)	1,05(1)	0,95(1)	0,80(1)	0,80(1)	
His	—	—	0,95(1)	—	—	0,90(1)	1,10(1)	—	—	
Lys	2,20(2)	2,30(2)	1,25(1)	2,15(2)	2,25(2)	1,25(1)	1,45(1)	—	—	
Arg	5,85(6)	3,10(3)	5,20(5)	1,95(2)	2,05(2)	2,10(2)	2,05(2)	2,75(3)	2,90(3)	
N-концевая аминокислота	Val	Val	Arg	Ala	Ala	Leu	Leu	Arg	Arg	
Число остатков	57	35	38	33	33	16	16	22	22	
Выход, %	43	24	42	21	48	58	11	8	41	

Аминокислотная последовательность N-концевой части пептидов, полученных при расщеплении белка N-хлорсукцинимидом и фрагментов химотриптического расщепления пептидов SIV и SVIII

Пептид	Аминокислотная последовательность	Пептид	Аминокислотная последовательность
SIII	Val-Ala-Ser-Lys-Gly-Asx-	SVII-1	Leu-Ile-Tyr-Lys-Thr-Thr-
SIV	Val-Ala-Ser-Lys-Gly-Asx-	SVII-2	Leu-Ile-Tyr-Lys-Thr-Thr-
SIV-1	Ala-Glx-Val-Ala-Pro-Gly-Lys-	SVII-3	Arg-Glx-Ala-Asx-Ile-Asx-
SIV-2	Ser-Asx-Arg-Glx-Gly-Arg-Leu-	SVIII-1	Arg-Glx-Ala-Asx-Ile-(Asx, Tyr)
SV-1	Arg-Glx-Ala-Asx-Ile-Asx-	SVIII-2	Val-Ser-Gly-Phe
SV-4	Ala-Val-Ile-Asx-Thr-Phe-	SVIII-3	Arg-Asx-Ala-Asx-(Arg, Leu)
SVI	Ala-Val-Ile-Asx-Thr-Phe-	SVIII-5	Ser-Ser-Asx-

ле пептид SIV-1, имеющий следующий аминокислотный состав: Ser (0,80), Glu (0,95), Pro (0,80), Gly (1,15), Ala (2,00), Val (0,80), Ile (0,85), Lys (1,10), и пептид SIV-2 состава: Asp (1,10), Ser (1,90), Glu (1,10), Pro (0,90), Gly (1,15), Leu (0,90), Arg (2,10). Структура их N-концевой части представлена в табл. 6.

Сопоставление N-концевой аминокислотной последовательности пептида SIV-1 со структурой пептидов SpII-1 и SpIII-1 показывает, что в цепи белка пептид SpIII-1 следует расположить непосредственно за пептидом SpII-1. Этот вывод полностью согласуется с идентификацией аминокислотных остатков в положениях 42—45, полученной при секвенировании белка. Сравнение структуры C-концевой части пептида SpIII-1 (-Ser-Asn-Arg-Glu) и N-концевой — пептида SpIII-3 (Gly-Arg-Leu-) с N-концевой аминокислотной последовательностью пептида SIV-2 дает возможность объединить пептиды SpIII-1 и SpIII-3 в единую полипептидную цепь. Рассмотрение аминокислотной последовательности пептида SVIII (табл. 6), структуры C-концевой части пептида SpIII-3 (-Trp-Arg-Glu) и N-концевой — пептида SpII-2 (Ala-Asp-Ile-) показывает, что пептид SpII-2 следует в полипептидной цепи непосредственно за пептидом SpIII-3.

Порядок расположения пептидов SpII-21 — SpII-24 в структуре пептида SpII-2 был установлен при анализе продуктов химотриптического расщепления пептида SVIII. С помощью электрофореза на бумаге при pH 3,5 было получено пять коротких пептидов, имеющих следующий аминокислотный состав: пептид SVIII-1: Asp (2,15), Glu (1,00), Ala (1,15), Ile (0,80), Tyr (0,85), Arg (1,05); пептид SVIII-2: Ser (0,90), Gly (1,00), Val (0,85), Phe (0,85); пептид SVIII-3: Asp (2,25), Ala (1,00), Leu (0,85), Arg (2,15); пептид SVIII-4: Val (1,00), Tyr (0,95); пептид SVIII-5: Asp (1,00), Ser (1,85).

Результаты деградации этих пептидов по методу Эдмана представлены в табл. 6.

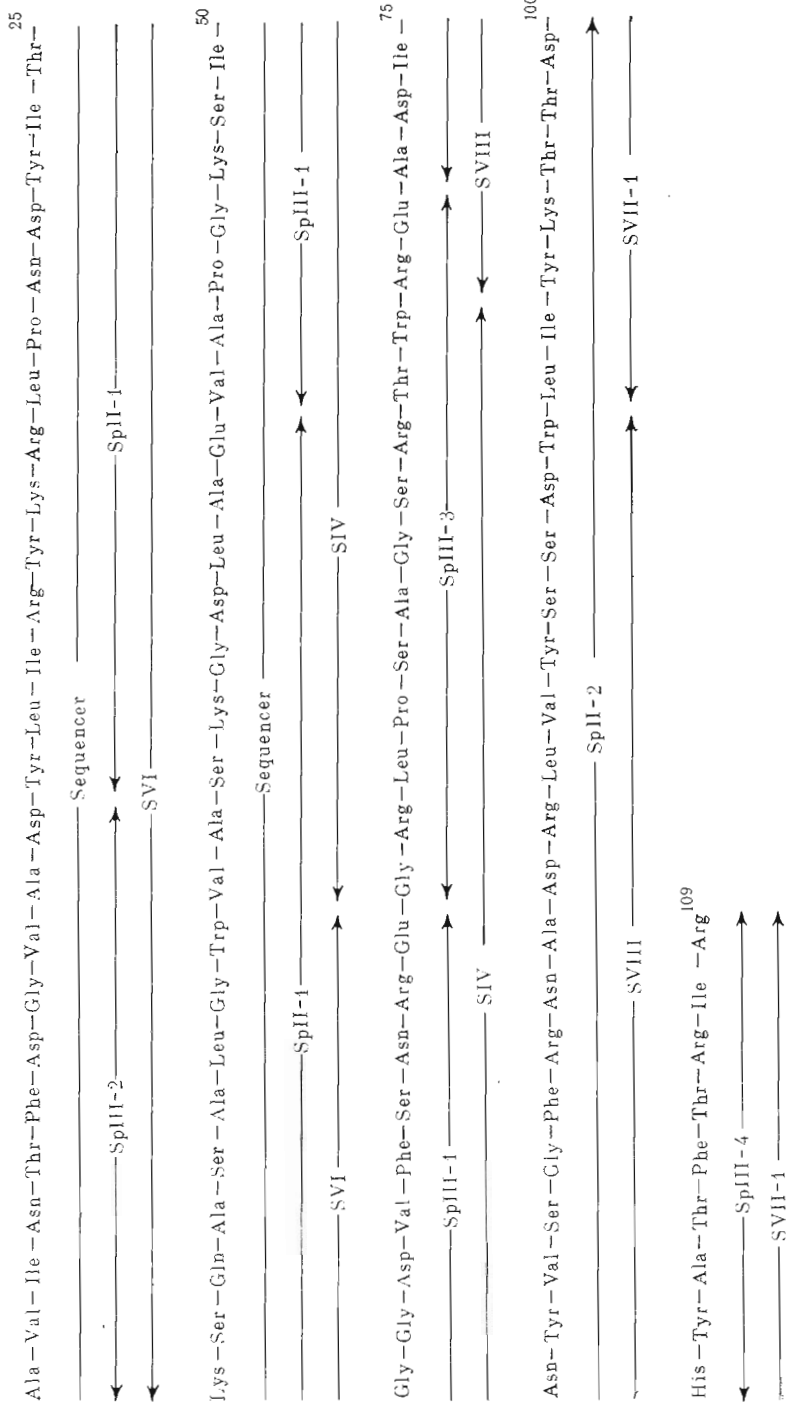
C-концевая последовательность пептида SVIII-3 (-Arg-Leu) была установлена с использованием карбоксипептидазы А и смеси карбоксипептидаз А и В.

Сопоставление приведенных данных со структурой пептидов SVIII (см. табл. 6), SpIII-3 и SpII-2 дает возможность сделать следующие выводы: 1) пептид SVIII-1 входит соответственно в N- и C-концевую области пептидов SpIII-3 и SpII-2; 2) пептид SVIII-2 входит в состав пептида SpII-21; 3) пептид SVIII-3 перекрывает пептиды SpII-21, SpII-22 и SpII-23; 4) пептиды SVIII-4, SVIII-5 входят в состав пептида SpII-23.

При проведении 10 циклов деградации по методу Эдмана в дансильной модификации C-концевого пептида SVII-1 была получена следующая аминокислотная последовательность: Leu-Ile-Tyr-Lys-Thr-Thr-Asp-His \*-Tyr-

\* Идентифицирован в виде  $\alpha$ -Dns-производного.

С х е м а



25

50

75

100

109

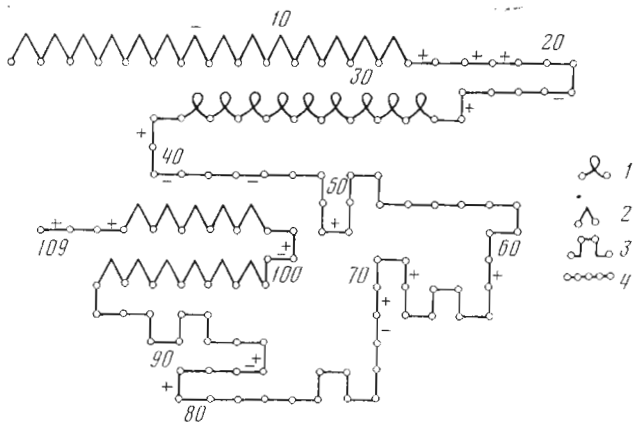


Рис. 6. Модель вторичной структуры РНКазы *B. intermedius* 7P. Обозначения: 1 —  $\alpha$ -спираль, 2 —  $\beta$ -структура, 3 —  $\beta$ -изгиб, 4 — клубок; «+» и «-» указывают положение заряженных аминокислот

-Ala-Thr-. Приведенные данные позволяют реконструировать С-концевую часть пептида SpII-23, соединить его с пептидом SpII-24 и объединить в единую полипептидную цепь пептиды SpII-2 и SpIII-4.

Следует отметить, что выше описано определение структуры только тех пептидных фрагментов N-хлорсукцинимидного расщепления, которые дают возможность получить перекрытия между пептидами, полученными при расщеплении белка стафилококковой протеазой, и установить полную структуру пептида SpII-2. Определение структуры остальных фрагментов полностью подтвердило результаты анализа аминокислотной последовательности пептидов, полученных при расщеплении белка стафилококковой протеазой.

Рибонуклеаза *B. intermedius* 7P имеет два гомолога среди рибонуклеаз микроорганизмов с известной первичной структурой — РНКазы из *B. amyloliquefaciens* [12—14] и *Streptomyces erythreus* [15]. К сожалению, практически отсутствуют данные о строении активного центра первой из них, обладающей наибольшей гомологичностью по отношению к изучаемому ферменту. Сопоставление аминокислотных последовательностей РНКаз *B. intermedius* 7P и *St. erythreus* показало наличие трех гомологичных участков, расположенных в С-концевой области этих белков: (52—63), (79—88) и (98—107) \*, причем последние два сегмента содержат остатки аргинина и гистидина, участвующие, по предположениям авторов работы [15], в формировании активного центра РНКазы *St. erythreus*. Кроме того, С-концевые области этих ферментов имеют аналогично расположенные сильногидрофобные участки, обычно имеющие важное значение для формирования третичной структуры белковой глобулы (для изучаемой РНКазы это участки -Leu-Val-Tyr<sup>89</sup>- и -Trp-Leu-Ile-Tyr<sup>96</sup>-) (схема). Гомология первичных структур N-концевых фрагментов РНКаз *B. intermedius* 7P и *St. erythreus* полностью отсутствует, причем в этом районе РНКазы *St. erythreus* имеет дисульфидный мост между остатками цистеина в положениях 4 и 55.

Проведенное сравнение показывает, что С-концевые области рассмотренных ферментов имеют гомологичные участки, содержащие аминокислотные остатки, определяющие как каталитические свойства РНКаз, так и остатки, вероятно, участвующие в формировании третичной структуры.

На основе установленной нами полной аминокислотной последовательности рибонуклеазы *B. intermedius* 7P (см. схему) был проведен теорети-

\* Номера остатков указаны для РНКазы *B. intermedius*.

ческий расчет вторичной структуры этого фермента по методу Чоу и Фасмана [16, 17]. Применение правил, изложенных в этих работах, дает возможность выделить в полипептидной цепи белка четыре участка, в которых вероятно образование упорядоченных вторичных структур. Расчеты, проведенные с помощью ЭВМ HP-9830A, показали, что на участках 1—14, 93—98 и 102—106 используемый метод предсказывает образование  $\beta$ -структур, а на участке 28—36 —  $\alpha$ -спиральной структуры (рис. 6). Кроме того, не исключено образование  $\alpha$ -спирали на участке 40—45, несмотря на то что 40-й и 45-й остатки этого фермента входят в соответствующие  $\beta$ -изгибы или формирование укороченной  $\alpha$ -спирали (41—45), состоящей из четырех аминокислот и имеющей значительный  $\alpha$ -потенциал. Согласно предложенной модели, содержание  $\beta$ -структур в белке составляет около 24%. Обращает на себя внимание малое содержание в белке  $\alpha$ -спиральных структур ( $\sim 8\%$ ). Представляет интерес сравнение этих результатов с данными, полученными методом КД. Доля  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -структур, определенная этим методом, составляет соответственно 6 и 20%. Таким образом, предложенная модель хорошо согласуется с имеющимися экспериментальными данными.

### Экспериментальная часть

*Гидролиз РНКазы *B. intermedius* 7P стафилококковой протеазой.* Нуклеазу (24 мг) растворяли в 4,2 мл 0,5 М натрий-боратного буфера (рН 8,5) в присутствии 8 М мочевины и добавляли при постоянном перемешивании 50% раствор цитраконового ангидрида в абсолютном диоксане ( $3 \times 20$  мкл), поддерживая рН 8,5 добавлением 10% NaOH. Через 30 мин после прекращения изменения рН белок обессоливали на колонке (2,6  $\times$  40 см) с сефадексом G-15, уравновешенным 0,1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , рН 8,0. Фракции, содержащие белок, объединяли и в полученный раствор ( $\sim 2$  мг/мл) добавляли с интервалом в 2 ч две порции по 0,4 мг стафилококковой протеазы (Miles, Англия). Гидролиз проводили в течение 15 ч при 37° [18]. По окончании гидролиза рН смеси понижали до 3,0 муравьиной кислотой и проводили удаление цитраконовой защиты в течение 15 ч при комнатной температуре.

*Выделение пептидов, полученных при гидролизе белка стафилококковой протеазой.* Лиофилизованную смесь пептидов растворяли в 2 мл 10% уксусной кислоты, содержащей 8 М мочевины, и подвергали гель-филтрации на сефадексе G-50 (тонкий), уравновешенном тем же буфером (колонка 1  $\times$  180 см, скорость элюции 6 мл/ч, объем фракций 1,5 мл, рис. 1). Фракции I—III были обессолены на колонке с сефадексом G-15 в 10% уксусной кислоте, а фракция IV — на колонках с дауэксом-50 и дауэксом-1. Разделение пептидов, содержащихся во фракции II, проводили ионообменной хроматографией на SP-сефадексе типа C-25 (колонка 1  $\times$  15 см), уравновешенном 0,1 М формиатом аммония (рН 3,5) и 8 М мочевиной (буфер 1). Элюцию проводили градиентом рН и молярности этого буфера, созданного с помощью прибора «Ultrograd» (ЛКВ, Швеция). Буфер 2 : 0,5 М формиат аммония, рН 8,5. Скорость элюции 16 мл/ч, объем фракций 1,8 мл (рис. 2).

Объединенные фракции обессоливали на колонке (2,5  $\times$  40 см) с сефадексом G-15, уравновешенным 10% уксусной кислотой. Разделение пептидов, содержащихся во фракции III (рис. 1), проводили хроматографией на бумаге (см. ниже).

При этом были получены фракции III-1, III-2 и III-(3 + 4). Из материала последней фракции при дополнительном разделении электрофорезом (см. ниже) были выделены пептиды SpIII-3 и SpIII-4.

*Разделение пептидов на бумаге.* Хроматографию на бумаге Ватман 3М проводили в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода, 15 : 3 : 10 : 12, в течение 20 ч. Электрофорез на бумаге Ватман 3М прово-

дили при pH 3,5 в течение 1 ч при градиенте потенциала 80 В/см. Во всех случаях разделение на бумаге проводили при нагрузке 0,1 мкмоль/см.

*Расщепление РНКазы N-хлорсукцинимидом.* Реакцию проводили в растворе, содержащем 27,7% уксусную кислоту и 4,7 М мочевины, в течение 30 мин при 20° при концентрации белка 1 мкмоль/мл [7]. Всего в опыте использовалось 4 мкмоль белка. Молярный избыток реагента по отношению к содержанию триптофана составлял 20 : 1. После окончания реакции для нейтрализации избытка N-хлорсукцинимиды в реакционную смесь добавляли метионин в количестве, в 2 раза превышающем содержание реагента в пробе.

*Выделение пептидов, полученных при расщеплении РНКазы N-хлорсукцинимидом.* Смесь пептидов подвергали гель-фильтрации на колонке (1,8 × 200 см) с сефадексом G-50 (сверхтонкий), уравновешенным 0,02 н. HCl. Скорость элюции 4 мл/ч. Объем фракций 2,6 мл (рис. 3).

Из материала фракций V при хроматографии на колонке 1 × 15 см с CM-целлюлозой (CM-32), уравновешенной 0,01 М ацетатом натрия (pH 4,5), в присутствии 4 М мочевины выделены пептиды SV-1 и SV-4. Элюцию осуществляли градиентом молярности NaCl. Скорость элюции 20 мл/ч, объем фракций 7 мл (рис. 5).

Разделение пептидов фракции VII проводили на колонке (2 × 100 см) с биогелем P-6 (200—400 меш), уравновешенным 0,02 н. HCl. Скорость элюции 6 мл/ч, объем фракций ~ 2,6 мл (рис. 4).

*Определение аминокислотного состава пептидов.* Гидролиз пептидов проводили 5,6 н. HCl (трижды перегнана над SnCl<sub>2</sub>) в ампулах диаметром 3 мм из стекла марки «Пирекс» при 105° в течение 24 ч в объеме около 50 мкл. После окончания гидролиза ампулу центрифугировали и ее содержимое тут же упаривали в вакуум-эксикаторе над щелочью. Аминокислотный анализ проводился на анализаторе Bio-Cal BC-201 (ФРГ).

*Определение структуры N-концевой части белка на секвенаторе.* Автоматическую деградацию белка по методу Эдмана проводили на секвенаторе типа 890 C (Beckman, США) по квадрольной программе № 122974 с использованием реактивов этой же фирмы. Подготовку образца для анализа и обработку проб, полученных с секвенатора, осуществляли в соответствии с техническим описанием прибора. Для проведения опыта было использовано 250 нмоль белка.

*Анализ продуктов автоматической деградации.* Газожидкостный анализ фенилтиогидантоинов аминокислот проводили на анализаторе фирмы Hewlett Packard (США) типа 5710-A, снабженном пламенно-ионизационным детектором, согласно работе [19].

Аминокислотный анализ проб с секвенатора осуществлялся после их гидролиза 5 н. иодистоводородной кислотой при 140° в течение 24 ч [20]. По окончании гидролиза пробы высушивали в вакуум-эксикаторе и анализировали на аминокислотном анализаторе Bio-Cal BC-201 (ФРГ). Данные в табл. 1 приведены без поправок на разрушение аминокислот при гидролизе.

Одномерное разделение фенилтиогидантоинов аминокислот на полиамидных пластинах размером 5 × 7 см проводили в хроматографических системах, описанных в работе [21]. Количественный анализ тонкослойных хроматограмм осуществлялся сканированием пластин щелью 0,1 × 7 мм на спектрофотометре-флуориметре РМQ-11 (Opton, ФРГ) при длине волны 280 нм. Результаты сканирования обсчитывали по методу Трайбера [22]. С этой целью для фенилтиогидантоинов всех аминокислот были проведены калибровочные измерения и найдены значения коэффициентов, при которых калибровочные кривые обладают наибольшей линейностью. Одновременно с анализируемой пробой хроматографическому разделению подвергали стандартные образцы в виде смесей фенилтиогидантоинов аминокислот. Количественный анализ хроматограмм осуществляли соотношением результатов анализа стандартной смеси и исследуемого препарата.

Расчет выходов фенилтиогидантоинов аминокислот при автоматической дегградации проводили с использованием метода анализа, обеспечивающего наиболее воспроизводимые результаты для данной аминокислоты.

*Анализ N-концевых аминокислот и дегградация пептидов по методу Эдмана* в дансильной модификации осуществляли согласно процедуре, описанной Хартли [9].

*Гидролиз пептидов экзопептидазами.* Гидролиз пептидов карбоксипептидазой С (Boehringer, ФРГ) проводили в 0,5 М N-этилморфолин-ацетатном буфере, рН 5,3, при 25°. Обычно используемое соотношение фермент — субстрат составляло 1,5 мкг/нмоль пептида. В инкубационную смесь предварительно вводили в качестве стандарта  $\alpha$ -аминомасляную кислоту в количестве, эквивалентном исследуемому пептиду. Через определенные интервалы времени из реакционной смеси отбирали аликвоты, лиофильно их высушивали и проводили аминокислотный анализ количественным дансильным микрометодом [10]. Анализ хроматограмм и расчет результатов осуществляли с помощью разработанной авторами автоматической системы сканирования и обработки данных тонкослойных хроматограмм [11].

При использовании карбоксипептидаз А и В в качестве буфера применяли 0,2 М  $\text{NaHCO}_3$ , рН 8,6. Отобранные аликвоты дансильировали без предварительной лиофилизации.

Энзиматический гидролиз пептидов лейцинаминопептидазой (Worthington, США, уд. акт. 227 МЕ/мг) проводили в 0,5 М  $\text{MgCl}_2$ . Обычно используемое соотношение фермент — субстрат составляло 0,2 мкг/нмоль пептида. Отбор проб и их анализа проводили аналогично процедуре, описанной для карбоксипептидазы С.

*Гидролиз пептидов трипсином и химотрипсином* (Worthington, США) осуществляли в 1% растворе  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  в течение 17 ч при 37°. Соотношение фермент — субстрат составляло 1 : 75, количество пептида ~ 200 нмоль.

Авторы выражают благодарность В. А. Куликову за проведение автоматической дегградации белка на секвенаторе и Д. В. Волкову за помощь в составлении программ для расчета на ЭВМ вторичной структуры фермента.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Love W. E., Klock P. A., Lattman E. E., Padlan E. A., Ward K. B. (1974) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 36, 349—357.
2. Dickerson R. E., Timkovich R., Alamassy R. J. (1976) J. Mol. Biol., 100, 473—491.
3. Lenstra J. A., Hofsteenge J., Beintema J. J. (1977) J. Mol. Biol., 109, 185—193.
4. Лещинская И. Б., Булгакова Р. Ш., Балабан Н. П., Егорова Г. С. (1974) Прикл. биохимия и микробиол., 10, 242—247.
5. Булгакова Р. Ш., Лещинская И. Б., Балабан Н. П., Егорова Г. С. (1974) Биохимия, 39, 299—302.
6. Болотина И. А., Дудкин С. М., Лугаускас В. Ю., Хандаян А. Ж., Лещинская И. Б. (1979) Биоорг. химия, 5, 203—209.
7. Lischwe M. A., Sung M. T. (1977) J. Biol. Chem., 252, 4976—4980.
8. Shechter Y., Patchornick A., Burstein Y. (1976) Biochemistry, 15, 5071—5075.
9. Hartley R. W. (1970) Biochem. J., 119, 805—822.
10. Афанасенко Г. А., Нисанов В. Я., Шляпников С. В., Каминир Л. Б., Севе-рин Е. С. (1978) Биохимия, 42, 2178—2185.
11. Нисанов В. Я., Афанасенко Г. А., Каминир Л. Б. (1978) Приборы и техника экс-перимента, № 1, 43—45.
12. Hartley R. W. (1970) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 40, 263—270.
13. Hartley R. W. (1977) J. Biol. Chem., 252, 3252—3254.
14. Hartley R. W., Barker E. A. (1972) Nature New Biol., 235, 15—16.
15. Yoshida N., Sasaki A., Rashid M. A., Otsuka H. (1976) FEBS Lett., 64, 122—125.
16. Chou P. Y., Fasman G. D. (1974) Biochemistry, 13, 222—245.
17. Chou P. Y., Adler A. J., Fasman G. D. (1975) J. Mol. Biol., 96, 29—45.
18. Houmard J., Drapeau G. R. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3506—3509.

19. Pisano J. J., Bronzert T. J. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 5597—5607.
20. Inglis A., Nicholls P., Roxburgh C. (1974) *Austr. J. Biol. Sci.*, **24**, 1247—1250.
21. Kulbe K. D. (1974) *Anal. Biochem.*, **59**, 564—573.
22. Treiber L. R. (1974) *J. Chromatogr.*, **100**, 123—135.

Поступила в редакцию  
22.VIII.1978

PRIMARY STRUCTURE OF RIBONUCLEASE FROM *BACILLUS*  
*INTERMEDIUS* 7P

APHAHASENKO G. A., DUDKIN S. M., KAMINIR L. B.,  
GOLUBENKO I. A\*, SEVERIN E. S.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,*  
*Moscow; \*Kazan State University, Kazan*

The amino acid sequence composed of 109 residue of the ribonuclease from *Bacillus intermedius* strain 7P has been established. It was achieved by automated Edman degradation of the intact RNA in conjunction with the analysis of peptides obtained upon its cleavage with *Staphylococcus aureus* protease or with N-chlorosuccinimide. The sequence comparison for several microbial RNA of varying specificity revealed the occurrence of conservative sites in the C-terminal portion. Secondary structure prediction by Chou and Fasman method showed good correlation with the available experimental data.

---