



УДК 547.962.02:577.156

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА  $\beta$ -СУБЪЕДИНИЦЫ ДНК-ЗАВИСИМОЙ  
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI*. ГИДРОЛИЗ ПРОТЕИНАЗОЙ  
ИЗ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Липкин В. М., Макарова И. А., Гринкевич В. А.,  
Ахаткина И. Г., Потапенко Н. А., Тележинская И. Н.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

С помощью протеиназы из *Staphylococcus aureus* проведен гидролиз карбоксиметилированной и цитраконовиллированной  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы. Продукты гидролиза разделены гель-фильтрацией на биогеле Р-4 с последующей хроматографией на катионите и очищены с помощью хроматографии и электрофореза на бумаге. Установлена полная аминокислотная последовательность 128 и частичная 16 пептидов. Изученные пептиды в сумме содержат 1087 аминокислотных остатков, входящих в полипептидную цепь  $\beta$ -субъединицы фермента.

Для детального изучения механизма функционирования ДНК-зависимой РНК-полимеразы необходимо знание первичной структуры составляющих ее субъединиц. Ранее традиционными методами белковой химии была установлена аминокислотная последовательность меньшей из них —  $\alpha$ -субъединицы (M 36512) [1]. К изучению более крупных  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц [2] стандартный подход не применим из-за ряда методологических трудностей, возникающих, во-первых, при разделении чрезвычайно сложных пептидных смесей, образующихся при расщеплении белков традиционными агентами, и, во-вторых, при реконструкции аминокислотной последовательности по «перекрывающимся» фрагментам.

Для установления аминокислотной последовательности  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц был использован подход, состоящий в параллельном исследовании первичных структур белков и соответствующих им генов. Основная задача при таком подходе состоит в выделении и определении первичной структуры пептидов, в сумме составляющих всю полипептидную цепь белка, и сопоставлении ее со структурой соответствующих участков гена. Для этих целей можно использовать пептиды сравнительно небольшого молекулярного веса, методы разделения которых хорошо разработаны, и таким образом избежать наиболее трудоемкой части работы — выделения и установления структур большого числа относительно крупных перекрывающихся пептидов.

Ранее была опубликована аминокислотная последовательность  $\beta$ -субъединицы, выведенная на основании нуклеотидной последовательности соответствующего ей гена *groB* и подтвержденная структурой пептидов, полученных при исчерпывающем гидролизе белка протеиназой из *St. aureus* и ограниченном протеинолизе трипсином [3, 4]. Целью данной работы является изучение продуктов гидролиза  $\beta$ -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* протеиназой из *St. aureus*.

Гидролиз протеиназой из *St. aureus*, проявляющей специфичность по отношению к связям, образованным  $\alpha$ -карбоксильными группами остатков глутаминовой кислоты, в качестве метода расщепления полипептидной цепи был выбран на основании аминокислотного анализа  $\beta$ -субъединицы [5]. Наличие 188 остатков глутаминовой кислоты и высокая специфическая активность протеиназы позволяли рассчитывать на образование сравнительно небольшого числа (100–150) достаточно коротких пептидов, необходимых для целей исследования. Для улучшения растворимости  $\beta$ -субъединицы карбоксиметилированный белок перед гидролизом модифицировали цитраконовым ангидридом. Гидролиз проводился в 0,2 М ам-

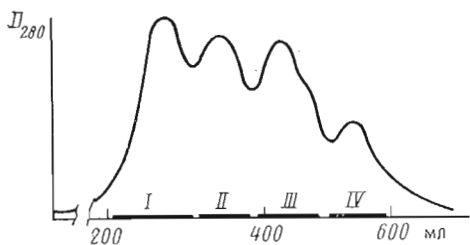


Рис. 1. Разделение пептидов, полученных в результате гидролиза  $\beta$ -субъединицы протеиназой из *St. aureus*, гель-фильтрацией на колонке (2,5×100 см) с биогеом P-4, уравновешенным 0,1 М аммоний-бикарбонатным буфером (рН 8,0). Элюция тем же буфером. Отмечены границы объединения фракций

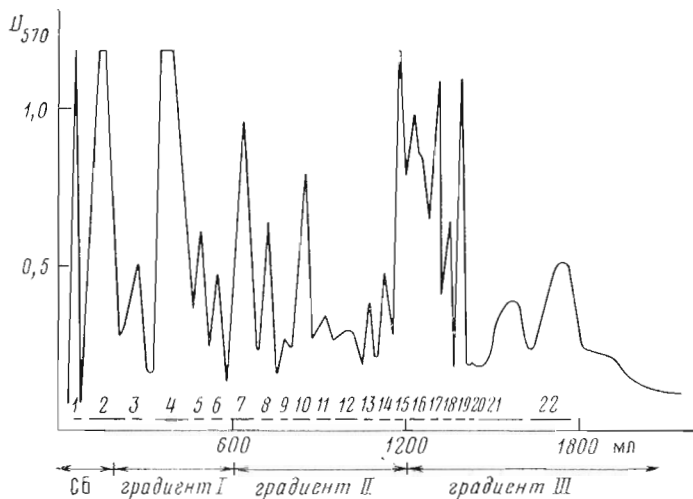


Рис. 2. Разделение пептидов фракции I (рис. 1) с помощью ионообменной хроматографии на колонке (0,6×60 см) с катионообменной смолой аминокс AG-50Wx4. Здесь и на рис. 3, 4 отмечены границы объединения фракций. Состав стартового буфера (СБ) и градиентов I—III см. «Эксперимент. часть»

моший-бикарбонатном буфере (рН 8,0) при фермент-субстратном соотношении 1 : 60. Первоначальное фракционирование осуществлялось гель-фильтрацией на колонке с биогеом P-4. В результате были получены четыре фракции (рис. 1).

Состав фракций анализировался с помощью метода пептидных карт.

Фракция IV наряду с пептидным материалом содержала соли. Пептиды этой фракции обессоливались на сефадексе G-10 и полученная смесь разделялась с помощью хроматографии на бумаге. В результате были выделены три индивидуальных пептида: IV-1, IV-2 и IV-3.

Фракции II и III состояли из пептидов со сравнительно небольшим молекулярным весом (2—20 аминокислотных остатков). Для разделения смесей этих пептидов была использована традиционная схема, основанная на первоначальном фракционировании пептидов хроматографией на катионите с последующим разделением отдельных субфракций хроматографией и электрофорезом на бумаге. Для ионообменной хроматографии фракции III применялся аминокс AG-50Wx4, а в случае фракции II, содержащей смесь сравнительно более высокомолекулярных пептидов, — аминокс AG-50Wx2. Элюирование пептидов осуществлялось системой пиридин-ацетатных буферов с экспоненциальным градиентом рН и концентрации.

Фракция I, как показал ее анализ с помощью метода пептидных карт, состояла из смеси крупных пептидов, не обладающих заметной электрофоретической и хроматографической подвижностью. С целью облегчения анализа пептидный материал фракции подвергался дополнительному гидролизу химотрипсином, и полученная смесь разделялась аналогично пептидам фракции III.

В результате хроматографирования из фракции I было получено 22, из фракции II — 33, а из фракции III — 41 объединенная фракция (рис. 2—4). Их состав анализировался с помощью хроматографии в тон-

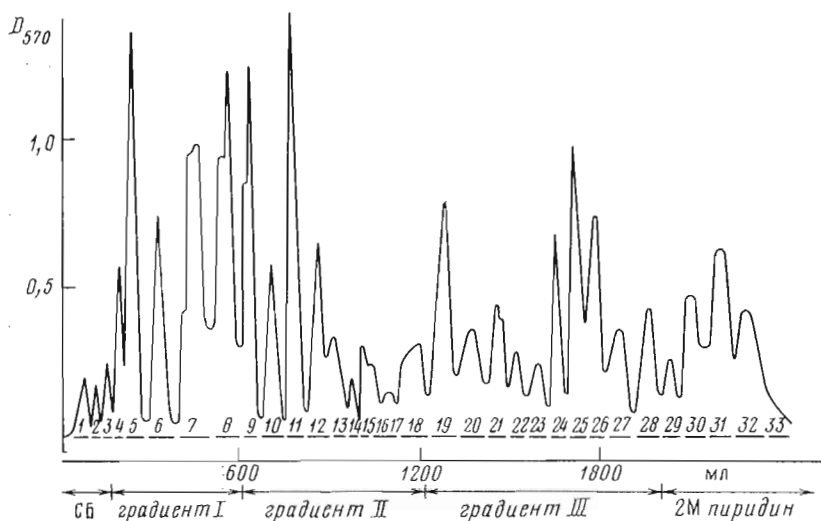


Рис. 3. Разделение пептидов фракции II (рис. 1) с помощью ионообменной хроматографии на колонке (0,6×60 см) с катионитом аминокс AG-50W×2

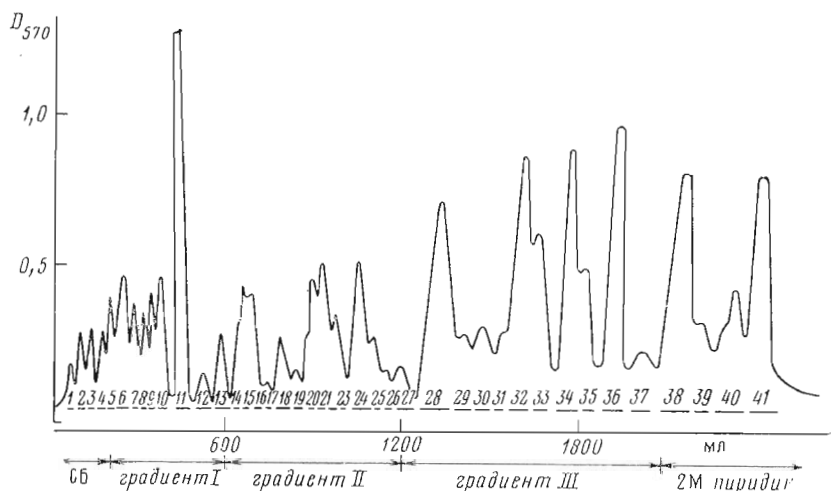


Рис. 4. Разделение пептидов фракции III (рис. 1) с помощью ионообменной хроматографии на колонке (0,6×60 см) с катионообменной смолой аминокс AG-50W×4

ком слое целлюлозы и определения N-концевых аминокислотных остатков. Фракции III-12, III-20 и III-40 были гомогенными пептидами. При концентрировании ряда фракций образовались осадки, которые были отделены центрифугированием. В результате было получено дополнительно шесть индивидуальных пептидов: I-7-1, II-16-1, III-22-1, III-30-1, III-34-1 и III-32-1.

Большинство фракций представляло собой смеси сравнительно небольшого числа пептидов, и для их последующего препаративного разделения использовалась хроматография на бумаге.

Разделение пептидов фракции I-12, не образующих четких зон при хроматографировании на целлюлозе, проводилось гель-фильтрацией на сефадексе G-25 (сверхтонкий) с последующей хроматографией на бумаге.

Анализ N-концевых аминокислотных остатков показал, что фракции III-38-1 и III-37-3, полученные с помощью хроматографии на бумаге, не являлись гомогенными пептидами, для их дальнейшего разделения использовался электрофорез на бумаге при pH 6,5.

Таким образом из фракций I—IV было выделено 41, 48, 68 и 3 индивидуальных пептида соответственно. Данные о распределении пептидов по фракциям и их аминокислотный состав представлены в табл. 1. Как вид-

Аминокислотный состав пептидов, полученных в результате гидролиза  
β-субъединицы протеиназой из *St. aureus*

| Аминокислота            | Пептиды |       |       |       |       |       |                 |                           |                 |       |       |
|-------------------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------|---------------------------|-----------------|-------|-------|
|                         | I-1-1   | I-1-2 | I-2-1 | I-2-2 | I-2-3 | I-3-1 | I-4-1,<br>I-7-4 | I-5-1,<br>I-7-2,<br>I-8-1 | I-5-2,<br>I-6-1 | I-5-3 | I-5-4 |
| Asp                     | 3       | 2     | 1     | —     | —     | —     | 1               | 3                         | —               | 2     | 2     |
| Thr                     | 2       | 1     | 1     | 1     | 1     | —     | 1               | —                         | 1               | 1     | 1     |
| Ser                     | 2       | 1     | —     | —     | 1     | 1     | 1               | —                         | —               | 1     | —     |
| Glu                     | 4       | —     | 2     | 1     | 2     | —     | 1               | 3                         | 2               | —     | 1     |
| Pro                     | 2       | 1     | —     | —     | 1     | —     | 1               | 2                         | 2               | 1     | 1     |
| Gly                     | 1       | 1     | —     | 2     | —     | 2     | 2               | 2                         | 1               | 2     | 2     |
| Ala                     | —       | 1     | 1     | —     | —     | —     | —               | —                         | —               | —     | 1     |
| Val                     | 2       | —     | —     | 1     | 1     | —     | —               | 1                         | 1               | 3     | 1     |
| Cys(Cm)                 | 2       | —     | —     | —     | —     | —     | —               | —                         | 1               | —     | —     |
| Met                     | 1       | —     | —     | 1     | —     | —     | —               | 2                         | —               | —     | —     |
| Ile                     | 1       | —     | —     | —     | —     | 1     | 1               | 1                         | 1               | 1     | 1     |
| Leu                     | 1       | —     | —     | —     | 2     | 1     | 5               | —                         | —               | —     | 2     |
| Tyr                     | —       | —     | —     | —     | —     | —     | 1               | —                         | —               | —     | —     |
| Phe                     | —       | —     | —     | —     | —     | —     | —               | —                         | —               | —     | —     |
| His                     | —       | —     | —     | —     | —     | —     | —               | 1                         | —               | —     | —     |
| Lys                     | —       | —     | —     | —     | —     | —     | 1               | 1                         | —               | —     | 1     |
| Arg                     | 1       | —     | —     | —     | —     | —     | 1               | —                         | 1               | 1     | —     |
| Trp                     | —       | —     | —     | —     | —     | —     | —               | —                         | —               | —     | —     |
| N-Концевая аминокислота | Thr     | Ala   | Ala   | Val   | Ser   | Gly   | Leu             | Lys                       | Gly             | Arg   | Lys   |
| Число остатков          | 22      | 7     | 5     | 6     | 8     | 5     | 16              | 16                        | 10              | 12    | 13    |
| Выход, %                | 35,7    | 16    | 3,6   | 13    | 26    | 13    | 8               | 5,7                       | 16              | 13    | 9     |

| Аминокислота            | Пептиды |       |       |                  |        |                   |        |          |                     |          |  |
|-------------------------|---------|-------|-------|------------------|--------|-------------------|--------|----------|---------------------|----------|--|
|                         | I-7-1   | I-7-3 | I-8-2 | I-9-1,<br>I-10-1 | I-10-2 | I-11-1,<br>II-7-2 | I-11-2 | I-11-3   | I-11-4,<br>I-12-1-2 | I-12-1-1 |  |
| Asp                     | 3       | 1     | —     | —                | 1      | 1                 | —      | —        | 3                   | —        |  |
| Thr                     | —       | 1     | —     | —                | —      | 1                 | —      | 1        | —                   | 1        |  |
| Ser                     | 1       | —     | 1     | —                | —      | 1                 | —      | —        | —                   | —        |  |
| Glu                     | —       | 1     | 1     | 4                | —      | 2                 | 2      | 1        | —                   | 1        |  |
| Pro                     | —       | —     | —     | —                | 1      | 1                 | 1      | —        | 1                   | 1        |  |
| Gly                     | —       | 2     | —     | —                | —      | 1                 | 1      | 1        | —                   | —        |  |
| Ala                     | —       | —     | 2     | —                | 1      | 1                 | —      | —        | —                   | 1        |  |
| Val                     | 1       | —     | 1     | —                | —      | 1                 | —      | 1        | —                   | 1        |  |
| Cys(Cm)                 | —       | —     | —     | —                | —      | 1                 | —      | 1        | —                   | —        |  |
| Met                     | 1       | —     | —     | —                | —      | —                 | —      | —        | —                   | —        |  |
| Ile                     | 2       | —     | —     | —                | 2      | —                 | —      | 1        | —                   | —        |  |
| Leu                     | 1       | —     | —     | —                | —      | 2                 | 1      | —        | 1                   | —        |  |
| Tyr                     | —       | —     | —     | —                | —      | —                 | —      | 1        | —                   | —        |  |
| Phe                     | —       | —     | —     | —                | —      | —                 | —      | —        | 2                   | —        |  |
| His                     | —       | —     | —     | —                | —      | —                 | —      | —        | —                   | —        |  |
| Lys                     | 3       | —     | 1     | 1                | 1      | 1                 | 1      | —        | 1                   | —        |  |
| Arg                     | —       | 1     | —     | —                | —      | 1                 | —      | 1        | —                   | 1        |  |
| Trp                     | —       | —     | —     | —                | —      | —                 | —      | —        | —                   | —        |  |
| N-Концевая аминокислота | Ser     | Asp   | Ser   | Lys              | Ile    | Leu               | Lys    | Cys (Cm) | Phe                 | Arg      |  |
| Число остатков          | 12      | 6     | 6     | 5                | 6      | 14                | 6      | 8        | 8                   | 6        |  |
| Выход, %                | 7       | 10    | 13    | 14               | 23     | 11                | 26     | 18       | 5,7                 | 3        |  |

| Аминокислота | Пептиды                        |                    |        |                   |        |        |        |        |        |  |
|--------------|--------------------------------|--------------------|--------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
|              | I-12-2-1,<br>I-13-1,<br>I-14-2 | I-14-1,<br>II-11-2 | I-15-1 | I-15-2,<br>I-16-2 | I-15-3 | I-15-4 | I-15-5 | I-15-6 | I-16-1 |  |
| Asp          | 1                              | 1                  | 3      | 2                 | 2      | —      | 2      | —      | 2      |  |
| Thr          | —                              | 1                  | —      | —                 | —      | —      | —      | 1      | 1      |  |
| Ser          | 1                              | —                  | —      | —                 | 1      | —      | —      | —      | 1      |  |
| Glu          | 2                              | 1                  | 1      | 1                 | 1      | 1      | 2      | 1      | —      |  |
| Pro          | 1                              | —                  | —      | —                 | —      | —      | 1      | 1      | —      |  |
| Gly          | 2                              | 1                  | 1      | 2                 | —      | 2      | —      | —      | 1      |  |

Таблица 1 (продолжение)

| Аминокислота            | Пептиды                        |                    |        |                   |        |        |        |        |        |
|-------------------------|--------------------------------|--------------------|--------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                         | I-12-2-1,<br>I-13-1,<br>I-14-2 | I-14-1,<br>II-11-2 | I-15-1 | I-15-2,<br>I-16-2 | I-15-3 | I-15-4 | I-15-5 | I-15-6 | I-16-1 |
| Ala                     | —                              | —                  | —      | —                 | —      | 1      | —      | 1      | —      |
| Val                     | 1                              | 1                  | 1      | —                 | 1      | —      | 3      | 1      | —      |
| Cys(Cm)                 | —                              | —                  | —      | —                 | —      | —      | —      | —      | —      |
| Met                     | 1                              | —                  | 1      | —                 | —      | —      | —      | —      | —      |
| Ile                     | 2                              | 1                  | 1      | 2                 | —      | —      | 1      | —      | —      |
| Leu                     | 1                              | —                  | —      | —                 | —      | —      | 1      | 1      | —      |
| Tyr                     | —                              | —                  | —      | —                 | 1      | —      | —      | —      | —      |
| Phe                     | —                              | —                  | —      | —                 | —      | 1      | —      | —      | —      |
| His                     | —                              | —                  | 1      | —                 | —      | —      | —      | —      | 1      |
| Lys                     | —                              | 2                  | 1      | 1                 | —      | 1      | 2      | —      | 2      |
| Arg                     | 1                              | —                  | —      | 1                 | 1      | —      | —      | 1      | —      |
| Trp                     | —                              | —                  | —      | —                 | —      | —      | —      | —      | —      |
| N-Концевая аминокислота | Gly                            | Gly                | Lys    | Ile               | Ser    | Gly    | Lys    | Arg    | Asp    |
| Число остатков          | 13                             | 8                  | 10     | 9                 | 7      | 6      | 12     | 7      | 8      |
| Выход, %                | 23                             | 24                 | 6      | 33                | 16     | 22     | 30     | 4      | 4      |

| Аминокислота            | Пептиды |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                         | I-17-1  | I-17-2 | I-18-1 | I-18-2 | I-19-1 | I-20-1 | I-20-2 | I-21-1 | I-21-2 | I-22-1 |
| Asp                     | —       | —      | 1      | —      | 1      | 2      | —      | 1      | 1      | 1      |
| Thr                     | 1       | —      | 1      | —      | 1      | 1      | 1      | —      | —      | —      |
| Ser                     | —       | —      | —      | 1      | —      | 1      | 2      | 1      | —      | —      |
| Glu                     | 1       | 3      | 1      | 1      | —      | —      | —      | 3      | —      | 1      |
| Pro                     | 1       | —      | 1      | —      | —      | —      | —      | —      | 1      | 1      |
| Gly                     | 2       | 3      | 2      | —      | —      | 1      | 1      | —      | —      | 1      |
| Ala                     | —       | —      | 1      | —      | —      | —      | 1      | 1      | 1      | —      |
| Val                     | 2       | —      | 1      | 2      | —      | —      | —      | —      | —      | —      |
| Cys(Cm)                 | —       | —      | —      | —      | —      | —      | —      | —      | —      | —      |
| Met                     | —       | 1      | 1      | —      | —      | —      | —      | —      | —      | 1      |
| Ile                     | —       | —      | —      | 1      | —      | —      | —      | —      | —      | 1      |
| Leu                     | —       | —      | 1      | 1      | 1      | —      | —      | 1      | 1      | —      |
| Tyr                     | —       | —      | —      | —      | 1      | —      | 1      | —      | —      | —      |
| Phe                     | —       | 1      | —      | —      | —      | 1      | —      | —      | —      | —      |
| His                     | —       | —      | —      | —      | —      | 1      | —      | —      | —      | —      |
| Lys                     | 2       | —      | 1      | —      | 1      | 2      | —      | 3      | 1      | 1      |
| Arg                     | —       | 1      | 1      | 1      | —      | —      | 1      | —      | 1      | 1      |
| Trp                     | —       | —      | —      | —      | —      | —      | —      | —      | —      | —      |
| N-Концевая аминокислота | Val     | Gly    | Arg    | Arg    | Asn    | Phe    | Ala    | Lys    | Arg    | Arg    |
| Число остатков          | 9       | 9      | 12     | 7      | 5      | 9      | 7      | 10     | 6      | 8      |
| Выход, %                | 10      | 7      | 5      | 11     | 16     | 15     | 6      | 10     | 16     | 10     |

| Аминокислота | Пептиды |                    |                    |                    |                   |        |        |        |                     |
|--------------|---------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------|--------|--------|---------------------|
|              | I-22-2  | II-1-1,<br>III-2-3 | II-1-2,<br>III-3-2 | II-2-1,<br>III-6-2 | II-2-2,<br>II-3-3 | II-3-1 | II-3-2 | II-4-1 | II-4-2,<br>III-14-1 |
| Asp          | 1       | —                  | 1                  | —                  | 2                 | 2      | 2      | —      | —                   |
| Thr          | —       | 2                  | 1                  | —                  | 1                 | 1      | 1      | —      | —                   |
| Ser          | —       | —                  | —                  | —                  | 3                 | 1      | —      | —      | —                   |
| Glu          | —       | 2                  | 1                  | 2                  | —                 | 2      | 5      | 3      | 2                   |
| Pro          | 1       | 1                  | —                  | —                  | 1                 | —      | —      | —      | —                   |
| Gly          | —       | —                  | 1                  | 1                  | 2                 | 1      | 1      | 1      | —                   |
| Ala          | 1       | —                  | —                  | —                  | —                 | 2      | —      | 2      | 1                   |
| Val          | —       | —                  | 2                  | —                  | 3                 | 2      | —      | —      | —                   |
| Cys(Cm)      | —       | —                  | —                  | —                  | —                 | —      | —      | —      | —                   |
| Met          | —       | —                  | —                  | —                  | —                 | —      | —      | —      | —                   |
| Ile          | —       | —                  | —                  | —                  | 1                 | 1      | —      | 1      | 1                   |
| Leu          | 2       | 1                  | —                  | 1                  | 1                 | —      | 3      | —      | —                   |
| Tyr          | —       | —                  | —                  | —                  | —                 | 1      | —      | —      | —                   |
| Phe          | —       | —                  | —                  | —                  | —                 | 1      | —      | —      | —                   |

Таблица 1 (продолжение)

| Аминокислота               | Пептиды |                    |                    |                    |                   |        |        |        |                     |
|----------------------------|---------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------|--------|--------|---------------------|
|                            | I-22-2  | II-1-1,<br>III-2-3 | II-1-2,<br>III-3-2 | II-2-1,<br>III-6-2 | II-2-2,<br>II-3-3 | II-3-1 | II-3-2 | II-4-1 | II-4-2,<br>III-14-1 |
| His                        | —       | —                  | —                  | —                  | —                 | —      | —      | —      | —                   |
| Lys                        | 1       | —                  | —                  | —                  | —                 | 1      | 1      | 2      | 1                   |
| Arg                        | 1       | —                  | —                  | —                  | 1                 | —      | —      | —      | —                   |
| Trp                        | —       | —                  | —                  | —                  | —                 | —      | —      | —      | —                   |
| N-Концевая<br>аминокислота | Leu     | Thr                | Gly                | Leu                | Ser               | Thr    | Leu    | Gly    | Ala                 |
| Число остатков             | 7       | 6                  | 6                  | 4                  | 15                | 15     | 13     | 9      | 5                   |
| Выход, %                   | 10      | 10                 | 17                 | 50                 | 12                | 10     | 6.6    | 2,5    | 22                  |

| Аминокислота                 | Пептиды             |        |                   |                                  |        |                     |                   |                   |        |  |
|------------------------------|---------------------|--------|-------------------|----------------------------------|--------|---------------------|-------------------|-------------------|--------|--|
|                              | II-4-3,<br>III-13-2 | II-5-1 | II-5-2,<br>II-6-3 | II-6-1,<br>III-16-1,<br>III-15-1 | II-6-2 | II-7-1,<br>III-17-1 | II-7-3,<br>II-8-2 | II-8-1,<br>II-9-3 | II-9-1 |  |
| Asp                          | 1                   | —      | 1                 | —                                | 1      | 1                   | 1                 | 3                 | 1      |  |
| Thr                          | —                   | 1      | 2                 | —                                | 1      | —                   | —                 | 1                 | 1      |  |
| Ser                          | 1                   | —      | —                 | —                                | 1      | —                   | 1                 | 2                 | —      |  |
| Glu                          | 1                   | 2      | 1                 | 1                                | 1      | 3                   | 4                 | 3                 | 3      |  |
| Pro                          | —                   | 1      | 1                 | —                                | —      | —                   | 1                 | —                 | —      |  |
| Gly                          | —                   | 1      | 4                 | 1                                | 1      | —                   | —                 | 1                 | 1      |  |
| Ala                          | 2                   | —      | —                 | 1                                | —      | —                   | —                 | 1                 | —      |  |
| Val                          | —                   | —      | 3                 | —                                | 1      | —                   | —                 | 2                 | 1      |  |
| Cys(Cm)                      | —                   | —      | —                 | —                                | 1      | —                   | —                 | —                 | —      |  |
| Met                          | —                   | —      | —                 | —                                | —      | —                   | —                 | —                 | —      |  |
| Ile                          | —                   | —      | 1                 | —                                | —      | —                   | 1                 | —                 | 1      |  |
| Leu                          | 2                   | 1      | 1                 | —                                | 1      | 1                   | —                 | 2                 | —      |  |
| Tyr                          | —                   | —      | —                 | —                                | —      | —                   | —                 | —                 | —      |  |
| Phe                          | —                   | —      | —                 | —                                | —      | —                   | 2                 | 1                 | —      |  |
| His                          | —                   | —      | —                 | —                                | —      | —                   | —                 | —                 | —      |  |
| Lys                          | 1                   | 1      | 2                 | 1                                | 1      | 1                   | 1                 | 1                 | 2      |  |
| Arg                          | —                   | —      | —                 | —                                | 1      | —                   | —                 | 1                 | —      |  |
| Trp                          | —                   | —      | —                 | —                                | —      | —                   | —                 | —                 | —      |  |
| N-Концевая ами-<br>нокислота | Ala                 | Thr    | Val               | Gly                              | Asp    | Lys                 | Ser               | Leu               | Gly    |  |
| Число остатков               | 8                   | 7      | 16                | 4                                | 10     | 6                   | 11                | 18                | 10     |  |
| Выход, %                     | 50                  | 2      | 21                | 22                               | 22     | 20                  | 12                | 12.6              | 15     |  |

| Аминокислота                 | Пептиды             |                    |         |                      |         |         |         |                                   |         |  |
|------------------------------|---------------------|--------------------|---------|----------------------|---------|---------|---------|-----------------------------------|---------|--|
|                              | II-9-2,<br>III-19-1 | II-9-4,<br>II-10-2 | II-10-1 | II-10-3,<br>III-22-1 | II-11-1 | II-12-1 | II-12-2 | II-13-1,<br>III-23-2,<br>III-24-3 | II-14-1 |  |
| Asp                          | —                   | 3                  | 2       | 1                    | 2       | —       | 2       | 1                                 | 2       |  |
| Thr                          | —                   | 2                  | —       | —                    | —       | 1       | —       | 1                                 | 3       |  |
| Ser                          | —                   | 1                  | —       | 1                    | 1       | 1       | —       | —                                 | —       |  |
| Glu                          | 2                   | 1                  | 1       | 1                    | —       | 1       | 1       | 1                                 | 1       |  |
| Pro                          | 1                   | 1                  | —       | —                    | —       | —       | —       | —                                 | 1       |  |
| Gly                          | —                   | —                  | —       | —                    | —       | 1       | 1       | —                                 | 1       |  |
| Ala                          | 1                   | 1                  | —       | —                    | 1       | —       | 1       | —                                 | —       |  |
| Val                          | —                   | 2                  | 1       | 1                    | 1       | 1       | 2       | 2                                 | 3       |  |
| Cys(Cm)                      | —                   | —                  | —       | —                    | —       | 1       | —       | —                                 | —       |  |
| Met                          | —                   | —                  | —       | —                    | —       | —       | —       | —                                 | —       |  |
| Ile                          | —                   | —                  | 1       | —                    | —       | —       | —       | —                                 | —       |  |
| Leu                          | —                   | 3                  | 1       | 2                    | —       | 1       | 1       | —                                 | —       |  |
| Tyr                          | —                   | —                  | —       | —                    | —       | —       | —       | —                                 | 1       |  |
| Phe                          | —                   | —                  | —       | 1                    | —       | —       | —       | 1                                 | —       |  |
| His                          | —                   | —                  | —       | —                    | —       | —       | —       | —                                 | —       |  |
| Lys                          | —                   | —                  | 2       | 1                    | 2       | 1       | 1       | —                                 | 1       |  |
| Arg                          | 1                   | 2                  | —       | —                    | —       | 1       | 1       | 1                                 | 1       |  |
| Trp                          | —                   | —                  | —       | —                    | —       | —       | —       | —                                 | —       |  |
| N-Концевая ами-<br>нокислота | Arg                 | Thr                | Lys     | Ser                  | Lys     | Leu     | Leu     | Val                               | Thr     |  |
| Число остатков               | 5                   | 16                 | 8       | 8                    | 7       | 9       | 10      | 7                                 | 14      |  |
| Выход, %                     | 20                  | 12                 | 18      | 6                    | 9,6     | 18      | 11      | 12                                | 4       |  |

Таблица 1 (продолжение)

| Аминокислота            | Пептиды                         |                                  |                                   |         |         |                      |                      |         |
|-------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|----------------------|----------------------|---------|
|                         | II-15-1,<br>II-19-1,<br>II-20-1 | II-15-2,<br>II-18-1,<br>III-33-1 | II-16-1,<br>III-30-1,<br>III-31-1 | II-17-1 | II-17-2 | II-21-1,<br>III-35-1 | II-22-1,<br>III-36-1 | II-22-2 |
| Asp                     | 1                               | 2                                | 1                                 | 2       | 1       | —                    | —                    | 2       |
| Thr                     | —                               | —                                | 2                                 | —       | 2       | —                    | —                    | 2       |
| Ser                     | 1                               | —                                | —                                 | —       | —       | —                    | —                    | 1       |
| Glu                     | 4                               | 2                                | 2                                 | 1       | 1       | 1                    | 1                    | 2       |
| Pro                     | —                               | —                                | —                                 | —       | 1       | —                    | —                    | 1       |
| Gly                     | —                               | —                                | —                                 | 1       | 1       | —                    | —                    | 4       |
| Ala                     | 1                               | —                                | —                                 | 2       | —       | —                    | —                    | —       |
| Val                     | —                               | —                                | —                                 | 2       | 1       | —                    | —                    | —       |
| Cys (Cm)                | —                               | —                                | —                                 | —       | —       | —                    | —                    | —       |
| Met                     | 1                               | 1                                | —                                 | —       | —       | —                    | —                    | —       |
| Ile                     | —                               | 1                                | 2                                 | 2       | —       | —                    | —                    | 1       |
| Leu                     | 2                               | 1                                | —                                 | —       | 1       | 1                    | 1                    | 5       |
| Tyr                     | —                               | —                                | —                                 | 2       | 2       | —                    | —                    | 1       |
| Phe                     | —                               | —                                | 1                                 | —       | 1       | —                    | —                    | —       |
| His                     | —                               | —                                | 1                                 | —       | —       | 1                    | —                    | —       |
| Lys                     | 3                               | 1                                | —                                 | 2       | 1       | 1                    | 2                    | 1       |
| Arg                     | —                               | 1                                | 1                                 | —       | 1       | —                    | —                    | 2       |
| Trp                     | —                               | —                                | —                                 | —       | —       | —                    | —                    | —       |
| N-Концевая аминокислота | Met                             | Ile                              | Asp                               | Tyr     | Tyr     | Leu                  | Lys                  | Leu     |
| Число остатков          | 13                              | 9                                | 10                                | 14      | 13      | 4                    | 4                    | 22      |
| Выход, %                | 25                              | 18                               | 38                                | 3       | 5       | 10                   | 8                    | 8       |

| Аминокислота            | Пептиды              |         |                        |         |         |                     |         |         |
|-------------------------|----------------------|---------|------------------------|---------|---------|---------------------|---------|---------|
|                         | II-23-1,<br>III-37-2 | II-23-2 | II-23-3,<br>III-37-3-1 | II-24-1 | II-24-2 | II-24-3,<br>II-25-2 | II-24-4 | II-25-1 |
| Asp                     | —                    | 4       | —                      | 1       | 1       | 2                   | 2       | 1       |
| Thr                     | —                    | —       | —                      | —       | 2       | 1                   | —       | —       |
| Ser                     | —                    | 1       | —                      | —       | —       | —                   | 1       | —       |
| Glu                     | 1                    | 1       | 1                      | 1       | 2       | —                   | 2       | 2       |
| Pro                     | —                    | —       | —                      | —       | 3       | 2                   | 2       | —       |
| Gly                     | —                    | 2       | —                      | —       | 1       | 1                   | 1       | —       |
| Ala                     | 1                    | —       | 1                      | 1       | —       | 1                   | —       | 1       |
| Val                     | 1                    | 2       | 1                      | —       | 3       | 1                   | 2       | —       |
| Cys (Cm)                | —                    | —       | —                      | —       | 1       | —                   | —       | —       |
| Met                     | —                    | —       | —                      | —       | —       | 1                   | —       | 1       |
| Ile                     | —                    | 2       | —                      | —       | 1       | 1                   | 1       | —       |
| Leu                     | —                    | 1       | 1                      | 1       | —       | 1                   | 4       | 1       |
| Tyr                     | —                    | —       | —                      | —       | 1       | —                   | 1       | —       |
| Phe                     | —                    | —       | —                      | —       | —       | 1                   | 1       | —       |
| His                     | —                    | 1       | —                      | —       | 2       | —                   | —       | —       |
| Lys                     | 1                    | —       | 1                      | 2       | —       | 1                   | 1       | 3       |
| Arg                     | 1                    | 3       | 1                      | 1       | 2       | 1                   | 1       | —       |
| Trp                     | —                    | —       | —                      | —       | —       | —                   | —       | —       |
| N-Концевая аминокислота | Arg                  | Val     | Val                    | Lys     | Val     | Asn                 | Phe     | Met     |
| Число остатков          | 5                    | 17      | 6                      | 7       | 19      | 14                  | 19      | 9       |
| Выход, %                | 48                   | 24      | 60                     | 49      | 18      | 21                  | 15      | 5       |

| Аминокислота | Пептиды                                     |                                   |         |         |         |         |         |         |
|--------------|---|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|              | II-26-1,<br>II-27-1,<br>II-28-1,<br>II-30-1 | II-29-1,<br>III-43-1,<br>III-42-1 | II-31-1 | II-32-1 | II-33-1 | III-1-1 | III-1-2 | III-1-3 |
| Asp          | —   | —                                 | —       | 2       | 1       | 1       | 1       | 2       |
| Thr          | 1   | —                                 | —       | —       | —       | —       | —       | —       |
| Ser          | —   | —                                 | 2       | —       | 2       | 2       | 3       | 1       |
| Glu          | 2   | 1                                 | 2       | 1       | 2       | 1       | 2       | —       |
| Pro          | 3   | —                                 | —       | 1       | —       | —       | 1       | 1       |
| Gly          | 1   | 1                                 | 1       | —       | 1       | —       | 1       | 2       |
| Ala          | —   | 1                                 | 1       | —       | 1       | —       | —       | —       |
| Val          | —   | —                                 | —       | —       | 1       | 1       | 1       | —       |
| Cys (Cm)     | —   | —                                 | —       | —       | —       | —       | —       | —       |

Таблица 1 (продолжение)

| Аминокислота               | Пептиды                                     |                                 |         |         |         |         |         |         |
|----------------------------|---|---------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                            | II-26-1,<br>II-27-1,<br>II-28-1,<br>II-30-1 | II-29-1,<br>II-43-1<br>III-42-1 | II-31-1 | II-32-1 | II-33-1 | III-1-1 | III-1-2 | III-4-3 |
| Met                        | 2   | —                               | —       | —       | 1       | —       | —       | —       |
| Ile                        | 1   | 1                               | 1       | —       | —       | 1       | 1       | 2       |
| Leu                        | —   | 2                               | 3       | 3       | 3       | 1       | —       | 1       |
| Tyr                        | 1   | —                               | —       | —       | —       | —       | 1       | —       |
| Phe                        | —   | 1                               | —       | —       | 1       | —       | 1       | —       |
| His                        | —   | —                               | 1       | —       | —       | —       | —       | —       |
| Lys                        | —   | 1                               | 2       | 2       | 1       | —       | —       | —       |
| Arg                        | 3   | 1                               | 1       | 2       | 3       | —       | —       | —       |
| Trp                        | —   | —                               | —       | 1       | —       | —       | —       | —       |
| N-Концевая<br>аминокислота | Ile   | Lys                             | Leu     | Lys     | Leu     | Asp     | Val     | Gly     |
| Число остатков             | 14  | 9                               | 14      | 12      | 17      | 7       | 12      | 9       |
| Выход, %                   | 40  | 45                              | 45      | 15      | 3       | 22,5    | 12      | 23      |

| Аминокислота               | Пептиды             |         |         |         |         |         |         |         |         |
|----------------------------|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                            | III-2-1,<br>III-3-1 | III-2-2 | III-4-1 | III-4-2 | III-5-1 | III-5-2 | III-6-1 | III-6-3 | III-6-4 |
| Asp                        | 1                   | 1       | —       | 1       | 1       | 1       | —       | 1       | —       |
| Thr                        | 1                   | —       | —       | 1       | —       | 1       | 1       | 1       | —       |
| Ser                        | —                   | —       | 1       | 1       | —       | 2       | 1       | 1       | —       |
| Glu                        | 1                   | 1       | 1       | 2       | 1       | 2       | 1       | 1       | 2       |
| Pro                        | —                   | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       |
| Gly                        | 1                   | —       | 2       | —       | —       | —       | 1       | —       | —       |
| Ala                        | —                   | 2       | 1       | 1       | —       | —       | —       | 1       | —       |
| Val                        | —                   | —       | 1       | 1       | —       | —       | —       | —       | —       |
| Cys(Cm)                    | —                   | 1       | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       |
| Met                        | —                   | 1       | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       |
| Ile                        | —                   | 1       | 2       | —       | —       | —       | —       | 1       | 1       |
| Leu                        | 2                   | 1       | —       | 1       | —       | 1       | —       | —       | 2       |
| Tyr                        | —                   | —       | 1       | 1       | —       | —       | —       | —       | —       |
| Phe                        | —                   | —       | —       | —       | —       | 1       | —       | —       | —       |
| His                        | —                   | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       |
| Lys                        | —                   | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       |
| Arg                        | —                   | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       |
| Trp                        | —                   | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       |
| N-Концевая<br>аминокислота | Leu                 | Leu     | Ser     | Leu     | Asp     | Leu     | Ser     | Thr     | Leu     |
| Число остатков             | 6                   | 8       | 9       | 9       | 2       | 8       | 4       | 7       | 5       |
| Выход, %                   | 6                   | 10      | 11      | 12      | 24      | 11      | 15      | 21      | 19      |

| Аминокислота | Пептиды |         |         |         |         |         |         |          |          |
|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|
|              | III-7-1 | III-7-2 | III-8-1 | III-8-2 | III-8-3 | III-9-1 | III-9-2 | III-10-1 | III-10-2 |
| Asp          | 2       | 1       | —       | —       | —       | —       | —       | —        | —        |
| Thr          | 2       | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —        | —        |
| Ser          | —       | 1       | —       | —       | —       | —       | —       | —        | —        |
| Glu          | —       | —       | 1       | 2       | 1       | 1       | 1       | 1        | 2        |
| Pro          | —       | —       | —       | —       | —       | —       | 1       | —        | —        |
| Gly          | —       | —       | —       | —       | 1       | —       | 1       | —        | 2        |
| Ala          | —       | —       | 1       | —       | —       | 1       | —       | —        | —        |
| Val          | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —        | —        |
| Cys(Cm)      | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —        | —        |
| Met          | —       | —       | —       | —       | —       | 1       | 1       | 1        | —        |
| Ile          | —       | —       | —       | 1       | —       | —       | —       | —        | —        |
| Leu          | 1       | 2       | —       | —       | 1       | —       | —       | —        | 1        |
| Tyr          | —       | —       | —       | —       | —       | —       | 1       | —        | 1        |
| Phe          | 1       | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —        | —        |
| His          | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —        | —        |
| Lys          | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —        | —        |
| Arg          | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —       | —        | —        |



Таблица 1 (продолжение)

| Аминокислота               | Пептиды  |                      |          |          |          |                       |                                     |                       |          |
|----------------------------|----------|----------------------|----------|----------|----------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------|----------|
|                            | III-7-1  | III-7-2              | III-8-1  | III-8-2  | III-8-3  | III-9-1               | III-9-2                             | III-10-1              | III-10-2 |
| Trp                        | —        | —                    | —        | —        | —        | —                     | —                                   | —                     | —        |
| N-Концевая<br>аминокислота | Thr      | Leu                  | Ala      | Ile      | Leu      | Met                   | Met                                 | Met                   | Gly      |
| Число остатков             | 6        | 4                    | 2        | 3        | 3        | 3                     | 5                                   | 2                     | 6        |
| Выход, %                   | 5        | 46                   | 4,9      | 6        | 4,5      | 20                    | 18                                  | 36                    | 43       |
| Аминокислота               | Пептиды  |                      |          |          |          |                       |                                     |                       |          |
|                            | III-11-1 | III-12               | III-13-1 | III-13-3 | III-15-2 | III-15-3              | III-15-4                            | III-16-2,<br>III-19-1 |          |
| Asp                        | —        | 1                    | 1        | 2        | —        | 1                     | 1                                   | —                     |          |
| Thr                        | —        | —                    | 1        | —        | —        | —                     | —                                   | —                     |          |
| Ser                        | 1        | 1                    | —        | —        | —        | —                     | 1                                   | —                     |          |
| Glu                        | 1        | —                    | —        | —        | 3        | 1                     | 1                                   | 1                     |          |
| Pro                        | —        | —                    | —        | —        | —        | —                     | 1                                   | 1                     |          |
| Gly                        | —        | —                    | 1        | —        | —        | 1                     | 1                                   | —                     |          |
| Ala                        | —        | 1                    | —        | —        | —        | 1                     | —                                   | —                     |          |
| Val                        | —        | 1                    | 1        | —        | —        | 2                     | —                                   | 1                     |          |
| Cys(Cm)                    | —        | 1                    | —        | —        | —        | —                     | —                                   | —                     |          |
| Met                        | —        | —                    | —        | —        | —        | —                     | —                                   | —                     |          |
| Ile                        | —        | —                    | —        | —        | 1        | —                     | 1                                   | —                     |          |
| Leu                        | 1        | 1                    | —        | —        | —        | —                     | 1                                   | 1                     |          |
| Tyr                        | —        | —                    | —        | —        | —        | 1                     | 1                                   | —                     |          |
| Phe                        | 1        | —                    | —        | —        | —        | —                     | —                                   | —                     |          |
| His                        | —        | —                    | —        | —        | —        | —                     | 1                                   | —                     |          |
| Lys                        | —        | —                    | 1        | 1        | 1        | 1                     | —                                   | —                     |          |
| Arg                        | —        | 1                    | —        | —        | —        | —                     | —                                   | —                     |          |
| Trp                        | —        | —                    | —        | —        | —        | —                     | —                                   | —                     |          |
| N-Концевая<br>аминокислота | Ser      | Leu                  | Gly      | Lys      | Ile      | Ala                   | Leu                                 | Leu                   |          |
| Число остатков             | 4        | 7                    | 5        | 3        | 5        | 8                     | 9                                   | 4                     |          |
| Выход, %                   | 50       | 7                    | 3        | 2        | 4        | 9                     | 9                                   | 11,5                  |          |
| Аминокислота               | Пептиды  |                      |          |          |          |                       |                                     |                       |          |
|                            | III-16-3 | III-17-2<br>III-18-1 | III-20   | III-21-1 | III-21-2 | III-23-1,<br>III-24-2 | III-24-1,<br>III-25-1,<br>III-26-1, | III-25-2,<br>III-26-2 |          |
| Asp                        | —        | 1                    | —        | —        | 1        | 1                     | —                                   | 1                     |          |
| Thr                        | 1        | 1                    | 1        | —        | —        | —                     | —                                   | —                     |          |
| Ser                        | —        | —                    | —        | —        | —        | —                     | —                                   | 1                     |          |
| Glu                        | 1        | 2                    | 1        | 1        | —        | 1                     | 2                                   | —                     |          |
| Pro                        | 1        | —                    | —        | —        | —        | —                     | —                                   | —                     |          |
| Gly                        | 3        | 1                    | 2        | —        | —        | 1                     | —                                   | 1                     |          |
| Ala                        | 1        | —                    | —        | —        | 2        | —                     | —                                   | —                     |          |
| Val                        | —        | 3                    | —        | —        | 2        | 1                     | 2                                   | —                     |          |
| Cys(Cm)                    | —        | —                    | —        | —        | —        | —                     | —                                   | —                     |          |
| Met                        | —        | —                    | —        | —        | —        | —                     | —                                   | —                     |          |
| Ile                        | —        | —                    | —        | 1        | —        | —                     | —                                   | —                     |          |
| Leu                        | 2        | —                    | —        | —        | —        | —                     | —                                   | 2                     |          |
| Tyr                        | —        | —                    | —        | —        | —        | —                     | —                                   | —                     |          |
| Phe                        | —        | 1                    | —        | —        | —        | 1                     | —                                   | —                     |          |
| His                        | —        | —                    | —        | —        | —        | 1                     | —                                   | —                     |          |
| Lys                        | —        | —                    | —        | 1        | —        | —                     | —                                   | —                     |          |
| Arg                        | 1        | 1                    | 1        | —        | 1        | —                     | 1                                   | 1                     |          |
| Trp                        | —        | —                    | —        | —        | —        | —                     | —                                   | —                     |          |
| N-Концевая<br>аминокислота | Ala      | Val                  | Gly      | Ile      | Arg      | Gly                   | Arg                                 | Arg                   |          |
| Число остатков             | 10       | 10                   | 5        | 3        | 6        | 6                     | 5                                   | 6                     |          |
| Выход, %                   | 2,5      | 6                    | 5,5      | 13       | 2,5      | 5                     | 24                                  | 6,5                   |          |

Таблица 1 (окончание)

| Аминокислота               | Пептиды                            |          |          |          |          |                       |                       |          |
|----------------------------|------------------------------------|----------|----------|----------|----------|-----------------------|-----------------------|----------|
|                            | III-26-3,<br>III-27-2,<br>III-28-1 | III-27-1 | III-29-1 | III-29-2 | III-29-3 | III-30-2,<br>III-37-1 | III-31-2,<br>III-32-1 | III-32-2 |
| Asp                        | —                                  | —        | 1        | —        | —        | —                     | 1                     | 3        |
| Thr                        | —                                  | —        | —        | —        | —        | —                     | —                     | —        |
| Ser                        | —                                  | 1        | 1        | —        | —        | 1                     | 4                     | 1        |
| Glu                        | 1                                  | 1        | 1        | 1        | 1        | 2                     | 2                     | 1        |
| Pro                        | —                                  | 1        | —        | —        | —        | —                     | 1                     | —        |
| Gly                        | —                                  | 1        | 1        | 1        | —        | —                     | 1                     | —        |
| Ala                        | 1                                  | —        | —        | —        | —        | 1                     | 2                     | —        |
| Val                        | 1                                  | —        | —        | 1        | 1        | —                     | 1                     | —        |
| Cys (Cm)                   | —                                  | —        | —        | —        | —        | —                     | —                     | —        |
| Met                        | 1                                  | —        | —        | —        | —        | —                     | —                     | —        |
| Ile                        | —                                  | 1        | 3        | —        | 1        | 2                     | 1                     | —        |
| Leu                        | 1                                  | —        | 1        | —        | —        | 1                     | —                     | 1        |
| Tyr                        | —                                  | 1        | —        | —        | —        | 1                     | 1                     | 1        |
| Phe                        | —                                  | —        | —        | 1        | 1        | —                     | 2                     | 2        |
| His                        | —                                  | 1        | —        | 1        | —        | 1                     | —                     | —        |
| Lys                        | —                                  | —        | —        | —        | 1        | —                     | —                     | —        |
| Arg                        | 1                                  | —        | 1        | —        | —        | —                     | 1                     | 1        |
| Trp                        | —                                  | —        | —        | —        | —        | —                     | —                     | —        |
| N-Концевая<br>аминокислота | Val                                | His      | Ile      | Gly      | Lys      | Ile                   | Ala                   | Asn      |
| Число остатков             | 6                                  | 7        | 9        | 5        | 5        | 9                     | 17                    | 10       |
| Выход, %                   | 33                                 | 4        | 7        | 5        | 5        | 17                    | 19                    | 2,5      |

| Аминокислота               | Пептиды                        |          |                       |            |          |                     |      |      |
|----------------------------|--------------------------------|----------|-----------------------|------------|----------|---------------------|------|------|
|                            | III-33-2,<br>III-34-1,<br>IV-3 | III-34-2 | III-35-2,<br>III-36-2 | III-38-1-1 | III-39-1 | III-40,<br>III-41-1 | IV-1 | IV-2 |
| Asp                        | —                              | —        | 1                     | 1          | —        | 1                   | —    | —    |
| Thr                        | —                              | —        | —                     | 2          | —        | —                   | —    | —    |
| Ser                        | —                              | 1        | 1                     | —          | —        | —                   | —    | 1    |
| Glu                        | 1                              | 2        | 2                     | —          | 1        | 2                   | 1    | —    |
| Pro                        | —                              | —        | 1                     | 1          | —        | —                   | —    | —    |
| Gly                        | 1                              | —        | 1                     | —          | —        | 1                   | 1    | —    |
| Ala                        | 1                              | —        | —                     | —          | 1        | —                   | —    | 2    |
| Val                        | —                              | —        | 2                     | 1          | —        | 3                   | —    | —    |
| Cys (Cm)                   | —                              | —        | —                     | —          | —        | —                   | —    | —    |
| Met                        | —                              | —        | —                     | —          | —        | —                   | —    | —    |
| Ile                        | —                              | 1        | —                     | —          | —        | —                   | —    | —    |
| Leu                        | —                              | —        | 2                     | —          | 1        | 1                   | 1    | —    |
| Tyr                        | —                              | —        | 2                     | 1          | —        | —                   | —    | —    |
| Phe                        | 1                              | 2        | 1                     | —          | —        | 1                   | —    | 1    |
| His                        | —                              | —        | —                     | —          | —        | —                   | —    | —    |
| Lys                        | —                              | 1        | —                     | 1          | 1        | —                   | —    | —    |
| Arg                        | 1                              | —        | 1                     | 1          | 1        | 2                   | 2    | 1    |
| Trp                        | —                              | —        | —                     | —          | —        | —                   | —    | —    |
| N-Концевая<br>аминокислота | Arg                            | Ser      | Leu                   | Thr        | Lys      | Asn                 | Arg  | Ala  |
| Число остатков             | 5                              | 7        | 14                    | 8          | 5        | 11                  | 5    | 5    |
| Выход, %                   | 18                             | 7        | 14                    | 8          | 5        | 11                  | 16   | 2,6  |

но из таблицы, в ряде случаев пептиды с одинаковым аминокислотным составом были выделены из различных объединенных фракций. Как правило, такое поведение пептидов связано с их неполным разделением при первоначальной гель-фильтрации или ионообменной хроматографии. Лишь в одном случае (пептиды II-15-1 и II-20-1) пептиды с одинаковым составом были обнаружены во фракциях, сравнительно далеко отстоящих друг от друга. Такое распределение пептидов, по-видимому, является результатом частичного дезамидирования остатков амидов дикарбоновых кислот.

Аминокислотная последовательность пептидов, полученных в результате гидролиза протеиназой из *Staphylococcus aureus*

| Пептиды                        | Аминокислотная последовательность *   | Местополо-<br>жение<br>пептида<br>в цепи белка |
|--------------------------------|---|--|
| I-1-2                          | Ala-Asp-Gly-Pro-Ser-Thr-Asp<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 784-790  |
| I-2-1                          | Ala-Gln-Thr-Asn-Glu<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 579-583  |
| I-2-2                          | Val-Gly-Thr-Gly-Met-Glu<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 700-705  |
| I-2-3                          | Ser-Leu-Val-Thr-Gln-Gln-Pro-Leu<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 1252-1259                                      |
| I-3-1                          | Gly-Ser-Gly-Ile-Leu<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 416-420  |
| I-4-1,<br>I-7-4                | Leu-Leu-Lys-Leu-Gly-Asp-Leu-Pro-(Thr, Ser, Gly, Glx, Ile,<br>Arg, Leu, Tyr)                                 | 1198-1213                                      |
| I-5-2,<br>I-6-1                | Gly-Arg-Val-Cys(Cm)-Pro-Ile-Glu-Thr-Pro-Glu<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘                                  | 556-565  |
| I-5-4                          | Lys-Ile-Thr-Gln-Gly-Asp-Asp-Leu-Ala-Pro-Gly-Val-Leu<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ ← ← <sub>A</sub> | 1035-1047                                      |
| I-7-1                          | Ser-Lys-Asp-Asp-Ile-Ile-Asp-Val-Met-Lys-Lys-Leu<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘                      | 421-432  |
| I-7-3                          | Asp-Gly-Arg-Thr-Gly-Glu<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 1214-1219                                      |
| I-8-2                          | Ser-Ala-Ala-Val-Lys-Glu<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 499-504  |
| I-9-1,<br>I-10-1               | Lys-Gln-Gln-Gln-Glu<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 1133-1137                                      |
| I-10-2                         | Ile-Asx-Ala-Lys-Pro-Ile<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 493-498  |
| I-11-1,<br>II-7-2              | Leu-Ala-Cys(Cm)-Val-Ser-Arg-Asp-Thr-Lys-Leu-Gly-Pro-<br>Glu-Glu<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘          | 836-849  |
| I-11-2                         | Lys-Leu-Gly-Pro-(Glx, Glx)  | 844-849  |
| I-11-3                         | Cys(Cm)-Gln-Ile-Arg-Gly-Val-Thr-Tyr<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 85-92  |
| I-11-4,<br>I-12-1-2            | Phe-Asp-Pro-Lys-Asp-Asn-Leu-Phe<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 188-195  |
| I-12-1-1                       | Arg-Gln-Ala-Val-Pro-Thr<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 687-692  |
| I-12-2-1,<br>I-13-1,<br>I-14-2 | Gly-Val-Pro-Ser-Arg-Met-Asx-Ile-(Gly, Glx, Ile, Leu, Glx)   | 1102-1114                                      |
| I-14-1,<br>II-11-2             | Gly-Thr-Val-Lys-Asp-Ile-Lys-Glu<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 112-119  |
| I-15-1                         | Lys-Asx-Ile-Val-Asx-Gly-Asn-His-Gln-Met<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ ← ← <sub>A</sub>                     | 1306-1315                                      |
| I-15-3                         | Ser-Arg-Asp-Gln-Val-Asp-Tyr<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 646-652  |
| I-15-4                         | Gly-Gly-Lys-Ala-Gln-Phe<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 1260-1265                                      |
| I-15-5                         | Lys-Asp-Asp-Val-Lys-Leu-Ile-Glu-Val-Pro-Val-Glu<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘                          | 279-290  |
| I-15-6                         | Arg-Gln-Ala-Val-Pro-Thr-Leu<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 687-693  |
| I-16-1                         | Asp-Ser-Asp-Lys-Gly-Lys-Thr-His<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 158-165  |
| I-17-1                         | Val-Gly-Lys-Val-Thr-Pro-Lys-Gly-Glu<br>└─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘ └─┘  | 884-892  |

\* Здесь и далее стрелками показаны стадии деградации по методу Эдмана с идентификацией Pth-(→), Dns-(→), Pth- и Dns-(→), DABth- и Dns-(→) производных аминокислот; С-концевые аминокислоты, определенные с помощью карбоксипептидаз A, B и Y (←).





Таблица 2 (продолжение)

| Пептид                             | Аминокислотная последовательность   | Местоположение пептида в цепи белка |
|------------------------------------|---|-------------------------------------|
| III-4-1                            | Ser-Gly-Ile-Val-Tyr-Ile-Gly-Ala-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘                            | 868-876                             |
| III-4-2                            | Leu-Ser-Val-Tyr-Ala-Gln-(Thr, Asx, Glx)<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘                        | 575-583                             |
| III-5-1                            | Asp-Glu<br>↘ ↘  | 739-740                             |
| III-5-2                            | Leu-Ser-Thr-Phe-Ser-Asp-Glu-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘<br>← ← ← ← ← Y                 | 1161-1168                           |
| III-6-1                            | Ser-Thr-Gly-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘  | 305-308                             |
| III-6-3                            | Thr-Ala-Ser-Phe-Asp-Ile-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘<br>← ← ← ← ← Y                     | 250-256                             |
| III-6-4                            | Leu-Gln-Ile-Leu-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 964-968                             |
| III-7-1                            | Thr-Leu-Phe-Thr-Asn-Asp<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘<br>← ← ← ← ← Y                         | 335-340                             |
| III-7-2                            | Ileu-Ser-Leu-Asp<br>↘ ↘ ↘ ↘   | 317-320                             |
| III-8-1                            | Ala-Glu<br>↘ ↘  | 986-987,<br>1193-1194               |
| III-8-2                            | Ile-Glu-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘  | 948-950                             |
| III-8-3                            | Leu-Gly-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘  | 791-793                             |
| III-9-1                            | Met-Ala-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘  | 459-461                             |
| III-9-2                            | Met-Tyr-Pro-Gly-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 741-745                             |
| III-10-1                           | Met-Glu<br>↘ ↘  | 1273-1274                           |
| III-10-2                           | Gly-Gln-Tyr-Gly-Leu-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 45-50                               |
| III-11-1                           | Ser-Leu-Phe-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘  | 383-386                             |
| III-12                             | Leu-Ala-Cys(Cm)-Val-Ser-Arg-Asp<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘                                | 836-842                             |
| III-13-1                           | Gly-Thr-Val-Lys-Asp<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 112-116                             |
| III-13-3                           | Lys-Asp-Asp<br>↘ ↘ ↘ ↘  | 279-281                             |
| III-15-2                           | Ile-Lys-Glu-Gln-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 117-121                             |
| III-15-3                           | Ala-Asx-Gly-Lys-Val-Tyr-Val-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘                                | 257-264                             |
| III-15-4                           | Leu-Asp-His-Gly-Pro-Tyr-Ile-Ser-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘     | 341-349                             |
| III-16-2,<br>III-19-1              | Leu-Val-Pro-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘  | 241-244                             |
| III-16-3                           | Ala-Leu-Gly-Pro-Gly-Gly-Leu-Thr-Arg-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ | 532-541                             |
| III-17-2,<br>III-18-1              | Val-Gln-Val-Phe-Thr-Arg-Asp-Gly-Val-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ | 931-940                             |
| III-20                             | Gly-Arg-Thr-Gly-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 1215-1219                           |
| III-21-1                           | Ile-Lys-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘  | 117-119,<br>1195-1197               |
| III-21-2                           | Arg-Ala-Val-Ala-Val-Asp<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 706-711                             |
| III-23-1,<br>III-24-2              | Gly-His-Phe-Val-Glu-Asp<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘<br>← ← ← ← ← A                         | 627-632                             |
| III-24-1,<br>III-25-1,<br>III-26-1 | Arg-Val-Val-Gln-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘<br>← ← ← ← ← Y                             | 821-825                             |
| III-25-2,<br>III-26-2              | Arg-Leu-Ser-Leu-Gly-Asp<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 478-483                             |

Таблица 2. (окончание)

| Пептид                             | Аминокислотная последовательность   | Местоположение пептида в цепи белка |
|------------------------------------|---|-------------------------------------|
| III-26-3,<br>III-27-2,<br>III-28-1 | Val-Met-Arg-Leu-Ala-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 1169-1174                           |
| III-27-1                           | His-Gly-Pro-Tyr-Ile-Ser-Glu   | 343-349                             |
| III-29-1                           | Ile-Arg-Ser-Leu-Gly-Ile-Asn-Ile-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘<br>← ← ← ← ← ← ← ←   | 1330-1338                           |
| III-29-2                           | Gly-His-Phe-Val-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 627-631                             |
| III-29-3                           | Lys-Val-Ile-Phe-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘<br>← ← ← ← ← ← ← ←   | 227-231                             |
| III-30-2,<br>III-37-1              | Ile-His-Tyr-Leu-Ser-Ala-Ile-Glu-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 603-611                             |
| III-32-1,<br>III-31-2              | Ala-Ala-Phe-Arg-Ser-Val-Phe-Pro-Ile-<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘<br>Glx-Ser-Tyr-Ser-Gly-Asn-Ser-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ | 51-67                               |
| III-32-2                           | Asn-Leu-Phe-Phe-Ser-Glu-Asp-Arg-Tyr-Asp<br>⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒  | 387-396                             |
| III-33-2,<br>III-34-1,<br>IV-3     | Arg-Ala-Gly-Phe-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 542-546                             |
| III-34-2                           | Ser-Phe-Gln-Lys-Phe-Ile-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘<br>← ← ← ← ← ← ← ←   | 34-40                               |
| III-35-2,<br>III-36-2              | Leu-Gln-Tyr-Val-Ser-Tyr-Arg-Leu-Gly-Glx-(Pro, Val, Phe,<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘<br>Asx)                                | 68-81                               |
| III-38-1-1'                        | Thr-Pro-Tyr-Arg-Lys-Val-Thr-Asp<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 589-596                             |
| III-39-1                           | Lys-Arg-Ala-Leu-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 943-947                             |
| III-41-1,<br>III-40                | Asn-Gln-Phe-Arg-Val-Gly-Leu-Val-Arg-Val-Glu<br>→ → → → → → → → → →<br>← ← ← ← ← ← ← ←                                 | 462-472                             |
| IV-1                               | Arg-Leu-Arg-Gly-Glu<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 245-249                             |
| IV-2                               | Ala-Ala-Phe-Arg-Ser<br>↘ ↘ ↘ ↘ ↘  | 51-55                               |

Для определения N-концевой аминокислотной последовательности пептидов был использован метод Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 1-диметиламинонафталин-5-сульфонильных (Dns) производных, фенилтиогидантоинов (Pth) и 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-тиогидантоинов (DABth) аминокислот.

C-Концевые аминокислотные последовательности пептидов определялись с помощью карбоксипептидаз А, В и Y.

Аминокислотные последовательности 133 пептидов установлены только с использованием деградации по методу Эдмана и с помощью карбоксипептидаз. Результаты их анализа представлены в табл. 2.

Для установления структуры ряда пептидов применялись дополнительные гидролизы трипсином, химотрипсином, термолизинном или бромцианом. В шести случаях удалось исключить стадию разделения и очистки полученных пептидных фрагментов — определение аминокислотной последовательности проводилось на смеси компонентов (табл. 3).

Структура остальных пептидов определялась как описано ниже.

*Пептид I-1-1* (757-778) Thr-Arg-Ser-Asn-Gln-Asx-Thr-Cys(Cm)-Ile-Asn-Gln-Met-Pro-Cys(Cm)-Val-Ser-Leu-Gly-Glu-Pro-Val-Glu. Данные по определению аминокислотной последовательности пептида суммированы в табл. 4. Деградацией пептида по методу Эдмана была установлена последовательность 10 аминокислотных остатков. Для установления полной

## Пептиды, структура которых определялась с помощью дополнительных ферментативных гидролизоз

| Анализируемый пептид                         | Результаты анализа   |
|--|--|
| I-15-2<br>I-16-2 (433—441) *                 | Ile-Asp-Ile-Arg-Asx-Gly-Lys-<br>Ile-Asp-Ile-Arg<br>Asn-Gly-Lys-Gly-Glu<br>Ile-Asp-Ile-Arg-Asn-Gly-Lys-Gly-Glu  |
| Смесь триптических пептидов                  |  |
| Строение                                     |  |
| II-7-3,<br>II-8-2 (34—44)                    | Ser-Phe-Gln-Lys-Phe-Ile-Glu-Gln-<br>Ser-Phe-Gln-Lys<br>Phe-Ile-Glu-Gln-Asp-Pro-Glu<br>Ser-Phe-Gln-Lys-Phe-Ile-Glu-Gln-Asp-Pro-Glu                                |
| Смесь триптических пептидов                  |  |
| Строение                                     |  |
| III-16-1,<br>III-30-1,<br>III-31-1 (826—836) | Asp-Arg-Phe-Thr-Thr-Ile-His-<br>Asp-Arg-Phe-Thr<br>Ile-His-Ile-Gln-Glu<br>Asp-Arg-Phe-Thr-Ile-His-Ile-Gln-Glu  |
| Смесь термолитических пептидов               |  |
| Строение                                     |  |
| II-17-1 (291—304)                            | Tyr-Ile-Ala-Gly-Lys-Val-Ala-Lys-Asp-Tyr-<br>Tyr-Ile-Ala-Gly-Lys<br>Val-Val-Ala-Lys<br>Asp-Tyr-Ile-Asx-Glu<br>Tyr-Ile-Ala-Gly-Lys-Val-Ala-Lys-Asp-Tyr-Ile-Asx-Glu |
| Смесь триптических пептидов                  |  |
| Строение                                     |  |



| Анализируемый пептид   | Результаты анализа  |
|--|---|
| II-24-4 (15—33)  |   |
| Смесь хлмотриптических пептидов                                      | Phe-Gly-Lys-Arg-Pro-Glx-Val-Leu-Asp-Val-Pro-Tyr-Leu-<br>Phe-Gly-Lys-Arg-Pro-Glx-Val-Leu-Asp-Val-Pro-Tyr<br>Leu-Leu-Ser-Ile-Glx-Leu-Asp<br>Leu-Leu-Ser-Ile-Glx-Leu-Asp |
| Строение   |   |
| II-31-1 (321—334)  |   |
| Смесь триптических пептидов  | Leu-Leu-Ala-Lys-Ser-Gln-Ser-Gly-His-Lys-Arg-<br>Leu-Leu-Ala-Lys<br>Leu-Ser-Gln-Ser-Gly-His-Lys<br>Arg-Ile-Glu<br>Arg-Ile-Glu  |
| Строение   | Leu-Leu-Ala-Lys-Leu-Ser-Gln-Ser-Gly-His-Lys-Arg-Ile-Glu   |
| В скобках указано местоположение пептида в полипептидной цепи белка. |   |

Аминокислотная последовательность пептида I-1-1

| Анализируемый пептид        | Результаты анализа   |
|-----------------------------|--|
| I-1-1                       |  |
| Смесь бромциановых пептидов | Thr-Arg-Ser-Asn-Gln-Asx-Thr-Cys(Cm)-Ile-<br>Thr-Arg-Ser-Asn-Gln-Asx-Thr-Cys(Cm)-Ile-Asx-Glx-Hse<br>Pro-Cys(Cm)-Val-Ser-Leu-Gly-Glx-Pro-Val-Glu<br>Thr-Arg-Ser-Asn-Gln-Asx-Thr-Cys(Cm)<br>Ile-Asn-Gln-Met-Pro-Cys(Cm)<br>Val-Ser<br>Leu-Gly-Glu-Pro-Val-Glu |
| Th-1                        |  |
| Th-2                        |  |
| Th-3                        |  |
| Th-4                        |  |
| Строение                    | Thr-Arg-Ser-Asn-Gln-Asx-Thr-Cys(Cm)-Ile-Asn-Gln-Met-Pro-Cys(Cm)-Val-Ser-Leu-Gly-Glu-Pro-Val-Glu  |

## Аминокислотная последовательность пептида I-5-1

| Анализируемый пептид | Результаты анализа  |
|----------------------|---|
| I-5-1                | Lys-Asn-Ile-Val-Asx-Gly-Asx-His-Glx-Met-Glx-                    |
| B-1                  | Lys-Asn-Ile-Val-Asx-Gly-Asx-His-Glx-Hse                         |
| B-2                  | Glx-Pro-Gly-Hse   |
| B-3                  | Pro-Glu   |
| Строение             | Lys-Asn-Ile-Val-Asx-Gly-Asx-His-Glx-Met-Glx-Pro-Gly-Met-Pro-Glu |

## Аминокислотная последовательность пептида II-23-2

| Анализируемый пептид | Результаты анализа  |
|----------------------|---|
| II-23-2              | Val-Asp-Asp-Ile-Asp-His-Leu-Gly-                                    |
| Th-1                 | Val-Asp-Asp-Ile-Asp-His   |
| Th-2                 | Leu-Gly-Asn-Arg-Arg   |
| Th-3                 | Ile-Arg-Ser-Val-Gly-Glu   |
| Строение             | Val-Asp-Asp-Ile-Asp-His-Leu-Gly-Asn-Arg-Arg-Ile-Arg-Ser-Val-Gly-Glu |

структуры пептид I-1-1 был гидролизован бромцианом. Образовавшуюся смесь двух фрагментов анализировали по методу Эдмана с идентификацией Dns-производных, что позволило определить C-концевую последовательность пептида I-1-1. Из термолитического гидролизата пептида I-1-1 с помощью хроматографии в тонком слое целлюлозы было выделено четыре пептида: Th-1, Th-2, Th-3 и Th-4. Для пептида Th-2 была установлена полная структура. Полученные данные позволили реконструировать аминокислотную последовательность пептида I-1-1.

*Пептид I-5-1* (I-7-2, I-8-1) (1306—1321) Lys-Asn-Ile-Val-Asx-Gly-Asx-His-Glx-Met-Glx-Pro-Gly-Met-Pro-Glu. После определения N-концевой аминокислотной последовательности (табл. 5) пептид был расщеплен бромцианом в стандартных условиях и из гидролизата методом хроматографии в тонком слое выделено три пептида. В результате определения их структуры было установлено, что пептид B-1 является N-концевым, пептид B-3, не содержащий остатка гомосерина, — C-концевым фрагментом пептида I-5-1, а пептид B-2 расположен между ними.

*Пептид I-5-3* (919—930) Arg-Val-Pro-Asn-Gly-Val-Ser-Gly-Thr-Val-Ile-Asp. С помощью деградации пептида по методу Эдмана была найдена N-концевая аминокислотная последовательность. Пептид был подвергнут термолитическому гидролизу и полученные фрагменты разделялись электрофорезом в тонком слое целлюлозы. Установлены следующие аминокислотные последовательности: Arg-Val-Pro-Asn-Gly (для Th-1), Val-Ser-Gly-Thr (для Th-2), Val-Ile-Asp (для Th-3), в результате чего была выяснена структура пептида I-5-3.

*Пептид II-2-2* (II-3-3) (916—930) Ser-Ser-Leu-Arg-Val-Pro-Asx-Gly-Val-Ser-(Gly, Thr, Val, Ile, Asx). При триптическом гидролизе пептида II-2-2 образовалась смесь двух пептидов. Анализ полученной смеси позволил установить N-концевую последовательность C-концевого фрагмента: Val-Pro-Asx-Gly-Val-Ser. Данные аминокислотного состава (табл. 1) и

N-концевой последовательности пептидов II-2-2 и I-5-5 показывают, что пептид II-2-2 на три аминокислотных остатка длиннее пептида I-5-3. Следовательно, пептид I-5-3 образовался в результате гидролиза химотрипсином связи Leu-Arg в пептиде II-2-2.

*Пептид II-23-2* (442—458) Val-Asp-Asp-Ile-Asp-His-Leu-Gly-Asn-Arg-Arg-Ile-Arg-Ser-Val-Gly-Glu. Последовательность определения структуры пептида приведена в табл. 6. После определения N-концевой последовательности пептид подвергался гидролизу термолизином. Полученные фрагменты разделяли с помощью электрофореза в тонком слое целлюлозы при pH 6,4. Аминокислотная последовательность фрагмента Th-1 показала, что он соответствует N-концевой части пептида, пептид Th-3 представляет собой среднюю часть молекулы, а пептид Th-3 — C-концевой участок пептида II-23-2.

Расположение изученных в настоящей работе пептидов в полипептидной цепи  $\beta$ -субъединицы приведено на рис. 5 [3].

$\beta$ -Субъединица, содержащая в своем составе большое число остатков дикарбоновых аминокислот (Glu-122, Asp-91) [3], представляет собой удобный объект для детального изучения специфичности действия протеиназы из *St. aureus*. В соответствии с ее ранее описанной специфичностью при гидролизе  $\beta$ -субъединицы расщепилось большинство связей, образованных  $\alpha$ -карбоксыльными группами остатков глутаминовой кислоты.

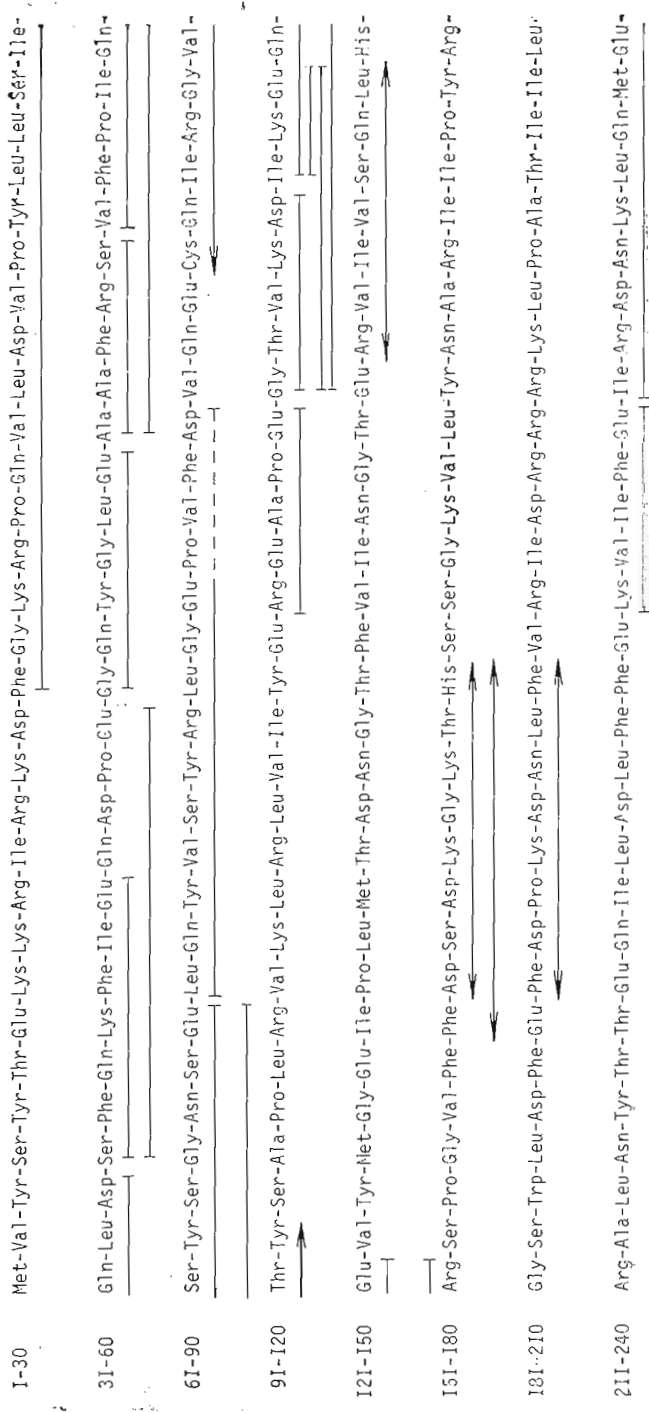
Как сообщалось ранее [6], связи типа Glu-Glu и Glu-Asp сравнительно устойчивы к действию этой протеиназы. Нам было выделено 12 пептидов, имеющих в своем составе последовательность Glu-Glu. Тем не менее в одном случае наблюдалось расщепление этой связи (остатки 898—899). Связь Glu-Asp оказалась в  $\beta$ -субъединице несколько менее стабильной. Только в двух случаях (остатки 392—393, 1341—1342) эта связь была устойчива к гидролизу, в результате чего были получены пептиды II-2-1 и III-32-2, содержащие последовательность Glu-Asp. В остальных же случаях наблюдался либо частичный (631—632), либо полный гидролиз этой связи (738—739, 813—814, 825—826).

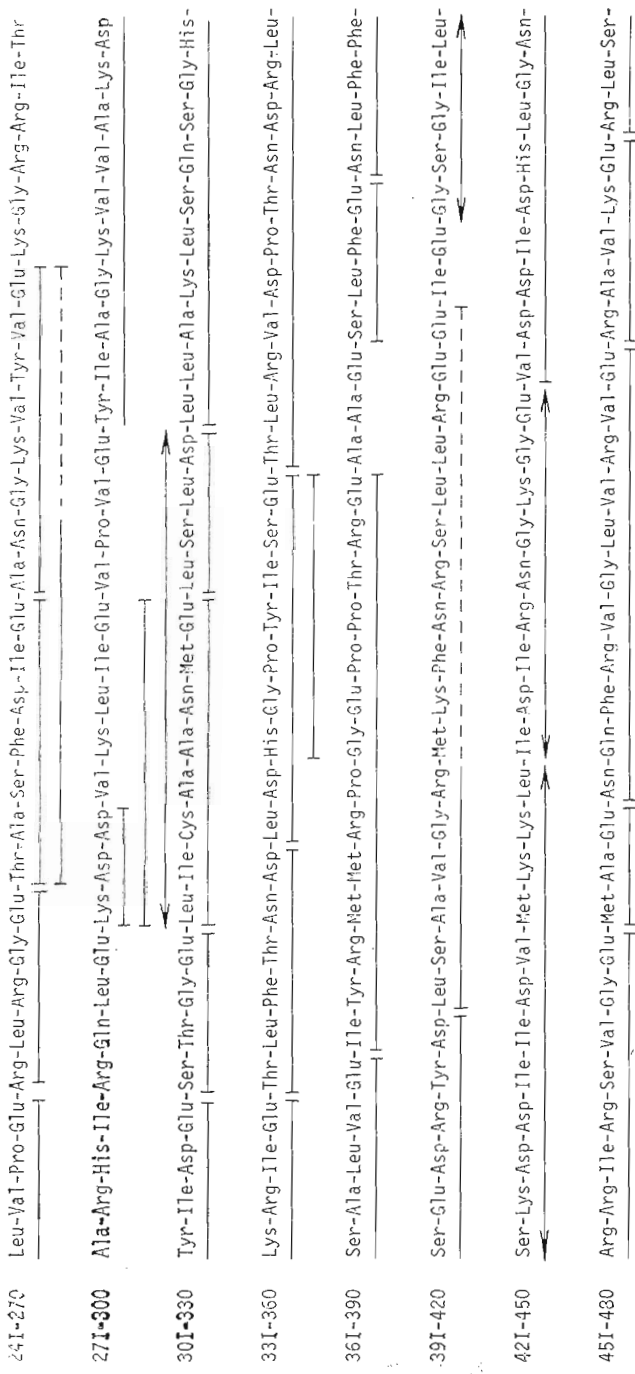
Весьма устойчивой к действию протеиназы из *St. aureus* оказалась связь Glu-Pro, присутствующая в пептидах I-1-1 (757—778), I-5-1 (1306—1321), II-26-1 (366—379), III-35-2 (68—81).

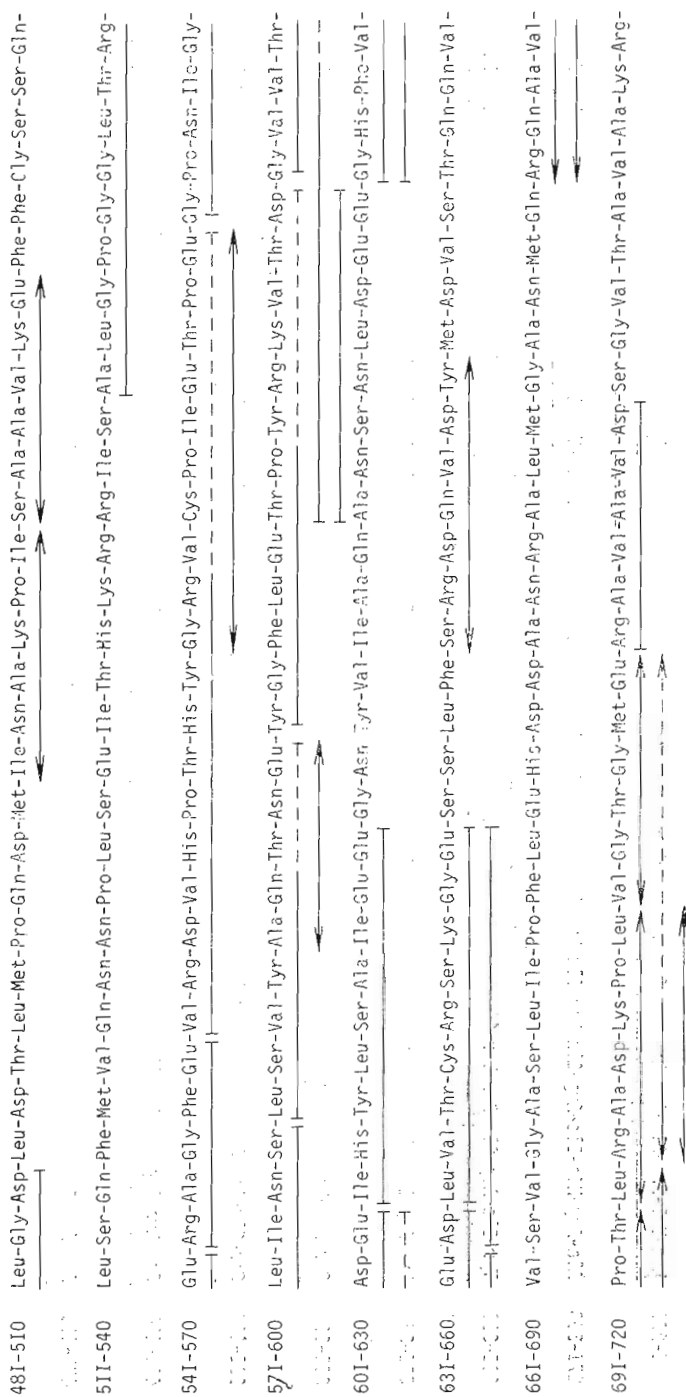
На основании структурных исследований  $\alpha$ -субъединицы [7] было сделано предположение об устойчивости к гидролизу протеиназой из *St. aureus* связей, образованных остатками глутаминовой кислоты в последовательности Glu-X-Pro. В случае  $\beta$ -субъединицы было обнаружено пять участков, содержащих эту последовательность. Как показал анализ выделенных пептидов, устойчивость связей Glu-X-Pro не является абсолютной, как это имело место для связей Glu-Pro. Только в двух случаях в  $\beta$ -субъединице не наблюдалось гидролиза по этим связям (пептид II-9-2 (107—111) и пептид I-5-2 (556—565)). В двух положениях произошло частичное расщепление, вследствие чего наряду с пептидами I-15-5 (279—290) и II-17-2 (584—596) были выделены пептиды II-10-1 (279—286), II-14-1 (589—602) и III-38-1-1 (589—596). В последовательности Pro-Glu-Gly-Pro (564—567) наблюдалось полное расщепление вышеупомянутой связи.

Установление первичной структуры выделенных пептидов позволило также детально проверить гипотезу Вуттона [8] о том, что протеиназа из *St. aureus* с меньшей скоростью гидролизует связи, образованные остатками глутаминовой кислоты, находящимися в последовательности Glu-X-Glu-Y. В  $\beta$ -субъединице было обнаружено восемь участков, содержащих данные последовательности (остатки 119—122, 413—416, 738—741, 985—988, 1024—1027, 1192—1195, 1272—1275, 1338—1341). Как правило, и связь Glu-X, и связь Glu-Y расщеплялись полностью. Лишь в трех случаях наблюдался частичный гидролиз связи типа Glu-X (остатки 119—120, 1192—1193 и 1272—1273) и в одном — связи типа Glu-Y (1194—1195). Особый интерес представляет C-концевой участок молекулы  $\beta$ -субъединицы, содержащей последовательность Glu-Leu-Glu-Asp-Glu (остатки 1338—1342). В этом фрагменте расщеплялась только связь Glu-Leu.

Рис. 5. Расположение пептидов, полученных в результате гидролиза  $\beta$ -субъединицы протеиназы из *St. aureus* в полипептидной цепи белка.







721-750 Gly-Gly-Val-Val-Gln-Tyr-Val-Asp-Ala-Ser-Arg-Ile-Val-Ile-Lys-Val-Asn-Glu-Asp-Glu-Met-Tyr-Pro-Gly-Glu-Ala-Gly-Ile-Asp-Ile-

751-780 Tyr-Asn-Leu-Thr-Lys-Tyr-Thr-Arg-Ser-Asn-Gln-Asn-Thr-Cys-Ile-Asn-Gln-Met-Pro-Cys-Val-Ser-Leu-Gly-Glu-Pro-Val-Glu-Arg-Gly-

781-810 Asp-Val-Leu-Ala-Asp-Gly-Pro-Ser-Thr-Asp-Leu-Gly-Glu-Leu-Ala-Leu-Gly-Gln-Asn-Met-Arg-Val-Ala-Phe-Met-Pro-Trp-Asn-Gly-Tyr-

811-840 Asn-Phe-Glu-Asp-Ser-Ile-Leu-Val-Ser-Glu-Arg-Val-Val-Gln-Glu-Asp-Arg-Phe-Thr-Thr-Ile-His-Ile-Gln-Glu-Leu-Ala-Cys-Val-Ser-

841-870 Arg-Asp-Thr-Lys-Leu-Gly-Pro-Glu-Glu-Ile-Thr-Ala-Asp-Ile-Pro-Asn-Val-Gly-Glu-Ala-Ala-Leu-Ser-Lys-Leu-Asp-Glu-Ser-Gly-Ile-

871-900 Val-Tyr-Ile-Gly-Ala-Glu-Val-Thr-Gly-Gly-Asp-Ile-Leu-Val-Gly-Lys-Val-Thr-Pro-Lys-Gly-Glu-Thr-Gln-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys-

901-930 Leu-Leu-Arg-Ala-Ile-Phe-Gly-Glu-Lys-Ala-Ser-Asp-Val-Lys-Asp-Ser-Ser-Leu-Arg-Val-Pro-Asn-Gly-Val-Ser-Gly-Thr-Val-Ile-Asp-

931-960 Val-Gln-Val-Phe-Thr-Arg-Asp-Gly-Val-Glu-Lys-Asp-Lys-Arg-Ala-Leu-Glu-Ile-Glu-Glu-Met-Gln-Leu-Lys-Gln-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu-

961-990 Ser-Glu-Glu-Leu-Gln-Ile-Leu-Glu-Ala-Gly-Leu-Phe-Ser-Arg-Ile-Arg-Ala-Val-Leu-Val-Ala-Gly-Gly-Val-Glu-Ala-Glu-Lys-Leu-Asp-

991-1020 Lys-Leu-Pro-Arg-Asp-Arg-Trp-Leu-Glu-Leu-Gly-Leu-Thr-Asp-Glu-Lys-Gln-Asn-Gln-Leu-Glu-Gln-Ala-Glu-Gln-Tyr-Asp-Glu-

1021-1050 Lys-Lys-His-Glu-Phe-Glu-Lys-Lys-Leu-Glu-Ala-Lys-Arg-Arg-Lys-Ile-Thr-Gln-Gly-Asp-Asp-Leu-Ala-Pro-Gly-Val-Leu-Lys-Ile-Val-

Расположение связей Asp-X, устойчивых к действию протеиназы из *St. aureus* в  $\beta$ -субъединице ДНК-зависимой РНК-поллимеразы *E. coli*

| Тип связи   | Локализация связи в цепи белка                                      |
|-------------|---|
| Asp-Glu     | 303-304, 601-602, 739-740, 866-867, 1004-1005, 1166-1167, 1341-1342 |
| Asp-Asp     | 280-281   |
| Asp-Asp-X   | 423-425, 443-445, 1040-1042   |
| Asp-Asn     | 192-193, 234-235  |
| Asp-Gln     | 648-650   |
| Asp-Arg     | 358-359, 393-394, 826-827, 995-996                                  |
| Asp-Lys     | 160-161, 696-697, 990-991, 1064-1065                                |
| Asp-Pro     | 42-43, 189-190, 354-355   |
| Asp-X-Asp-Y | 158-161, 444-447  |
| Asp-X-Glu   | 254-256   |
| Glu-Asp-X   | 392-394, 813-815, 825-827   |
| Asp-X-Pro   | 23-25, 696-698, 785-787, 1203-1205                                  |

Таблица 8

Влияние соседних основных аминокислотных остатков на степень гидролиза связей Asp-X

| Полностью не расщепляемые связи | Остатки   | Частично расщепляемые связи | Остатки   |
|---------------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|
| Asp-Ile-Arg                     | 434-436   | Lys-Asp-Ile-Lys             | 115-118   |
| Arg-Asp-Val                     | 548-550   | Arg-Asp-Thr                 | 841-843   |
| Asp-Val-Lys                     | 912-914   | Lys-Asp-Leu                 | 958-960   |
| Lys-Asp-Tyr                     | 299-301   | Arg-Asp-Gly                 | 936-938   |
| Asp-Val-Arg                     | 1154-1156 | Asp-Gly-Arg                 | 1214-1216 |

Ранее была отмечена способность протеиназы из *St. aureus* гидролизовать связи, образованные  $\alpha$ -карбоксильными группами остатков аспарагиновой кислоты [7]. Исходя из аминокислотной последовательности полученных пептидов нами было установлено, что в  $\beta$ -субъединице оказались устойчивыми связи Asp-X, где X — Asp, Glu, Asn, Gln, Lys, Arg, Pro. Не гидролизовались или гидролизовались с очень малой скоростью связи, образованные остатками аспарагиновой кислоты, находящейся в последовательности Asp-Asp-X, Glu-Asp-X, Asp-X-Asp-Y, Asp-X-Pro (табл. 7).

Наиболее часто в случае  $\beta$ -субъединицы полностью расщеплялись связи, образованные  $\alpha$ -карбоксильными группами остатков аспарагиновой кислоты и аминокислотными группами алифатических аминокислот: Asp-Leu (320-321, 340-341, 396-397, 483-484, 790-791, 1150-1151), Asp-Val (81-82, 930-931), а также связи Asp-Ser (33-34, 711-712, 915-916), Asp-Phe (14-15) и Asp-Gly (1188-1189). Примечательно, что из 11 связей Asp-Leu гидролизовалось полностью шесть и частично три связи (632-633, 959-960, 1160-1161), а из четырех связей Asp-Ser полностью расщепилось три. В обоих случаях гидролизу не подвергались только те связи, где остатку аспарагиновой кислоты предшествовал остаток дикарбоновой аминокислоты: Asp-Asp-Leu (1040-1042) и Glu-Asp-Ser (813-815), либо связи типа Asp-X-Pro: Asp-Leu-Pro (1203-1205).

На степень гидролиза связей Asp-X оказывает влияние природа соседних с расщепляемой связью аминокислотных остатков. Наличие основных аминокислот приводит к стабилизации связи (табл. 8).

При анализе первичной структуры пептидов, полученных в результате гидролиза  $\beta$ -субъединицы протеиназой из *St. aureus*, было обнаружено, что наряду со связями типа Glu-X и Asp-X расщепились также три связи, образованные  $\alpha$ -карбоксильными группами остатков серина. Связи Ser-Leu (574-575) и Ser-Ala (531-532) гидролизовались полностью, а связь Ser-Val (55-56) — частично. В результате расщепления связи Ser-Val наряду



с пептидом III-32-1 (остатки 51—67) были получены пептиды III-1-2 (остатки 56—67) и IV-2 (остатки 51—55).

Таким образом, в результате проделанной работы установлена полная первичная структура 128 и частичная 16 пептидов. Полученные результаты способствовали успешному завершению исследований по определению аминокислотной последовательности  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы. Статистическая обработка обширного экспериментального материала, полученного в результате исследования такого крупного белка, как  $\beta$ -субъединица, позволила сделать достаточно достоверные выводы о субстратной специфичности протеиназы из *St. aureus*.

### Экспериментальная часть

В работе использовали  $\alpha$ -химотрипсин (КФ 3.4.21.1), трипсин (КФ 3.4.21.4), карбоксипептидазы А (КФ 3.4.12.12) и В (КФ 3.4.12.3) (все Worthington, США), карбоксипептидазу Y (КФ 3.4.12; Boehringer, США), термолитины (КФ 3.4.24.4; Calbiochem, США), протеиназу из *St. aureus* (Miles, Англия), биогель Р-4, катионообменные смолы AG-50Wx4 и аминокс AG-50Wx2 (все Bio-Rad, США), сефадексы (Pharmacia, Швеция), трис (Calbiochem, США),  $\beta$ -меркаптоэтанол, 5-диметиламино-1-нафталинсульфонилхлорид (Serva, ФРГ), силикагельные пластинки (20×20 см), моноподуксусную кислоту (Merck, ФРГ). Иодуксусную кислоту непосредственно перед использованием перекристаллизовывали из гептана. Дистиллированную воду и раствор 8 М мочевины деионизировали на колонках со смолой AG-501x8(D) (Bio-Rad, США). Буферные растворы, использовавшиеся для разделения пептидов, а также 10% уксусную кислоту для элюции пептидов с бумаги, готовили на деионизованной воде без аминокислот, очищенной на колонках «Bioexchanger» (Pierce, США).

4-N,N-Диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианат был любезно предоставлен Ю. Б. Алаховым (Институт белка, г. Пущино Моск. обл.).

Все остальные реактивы имели квалификацию ос.ч.

РНК-полимеразу выделяли по методу Бержеса из штамма *E. coli* В. [2]. В основу выделения  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы была положена методика Хартмана [9].

**Карбоксиметилирование и цитракоцилирование  $\beta$ -субъединицы.**  $\beta$ -Субъединицу (2 мкмоль) растворяли в 50 мл буфера, содержащего 6 М хлоргидрат гуанидина, 1 М трис-HCl (рН 8,6) и 0,34 мл  $\beta$ -меркаптоэтанола, и карбоксиметилировали иодуксусной кислотой по методу [10]. Раствор белка обессоливали на колонке (2,5×100 см) с сефадексом G-50, уравновешенным буфером, содержащим 6 М мочевицу, 0,04 М трис-HCl (рН 8,6). К раствору, термостатированному при 2—4° С, постепенно добавляли 1 мл свежеперегнанного цитраконового ангидрида, поддерживая рН 8,0 с помощью 5 н. NaOH на автитраторе ТТ1/ВР2 (Radiometer, Дания). Белок после окончания реакции обессоливали на колонке с сефадексом G-50, уравновешенным водой, содержащей аммиак (рН 9—10), и лиофилизовали.

**Гидролиз  $\beta$ -субъединицы протеиназой из *St. aureus* и разделение продуктов гидролиза.** Лиофилизованный препарат карбоксиметилированной и цитракоцилированной  $\beta$ -субъединицы растворяли в 50 мл буферного раствора, содержащего 0,2 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 6 М хлоргидрат гуанидина (рН 8,0). Раствор диализовали против 0,2 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (рН 8,0). К свежевыпавшему осадку белка добавляли 5 мг протеиназы и вели гидролиз 20 ч при 37° С (соотношение фермент — субстрат по весу 1 : 60). После гидролиза смесь лиофилизовали. Гидролизат растворяли в 5 мл буферного раствора, содержащего 0,1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 6 М хлоргидрат гуанидина (рН 8,0), и делили на колонке с биогелем Р-4 (рис. 1). Полученные фракции лиофилизовали.

**Фракции I—III анализировали с помощью метода пептидных карт** на пластинках с тонким слоем целлюлозы. Электрофорез проводили 45 мин в пиридин-ацетатном буферном растворе В (пиридин — уксусная кислота — вода, 25 : 1 : 225, рН 6,5) при напряжении 800 В. Для хроматографии в перпендикулярном направлении использовали систему А (*n*-бутанол —

пиридин — уксусная кислота — вода, 15 : 10 : 3 : 12). Для обнаружения пептидов карты обрабатывали 0,2% раствором нингидрина в ацетоне.

*Разделение пептидов фракции IV.* Фракцию IV растворяли в 1,5 мл 0,1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  и обессоливали на колонке (1×100 см) с сефадексом G-10, уравновешенным тем же буфером, лиофилизовали и разделяли с помощью хроматографии на бумаге в системе А.

*Гидролиз химотрипсина.* 150 мг лиофилизованного препарата фракции I растворяли в 20 мл 0,1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , добавляли 3 мг химотрипсина и выдерживали 4 ч при 37°С. Гидролиз останавливали подкислением до рН 3. Гидролизат обессоливали на колонке (1,5×100 см) с сефадексом G-10, уравновешенным раствором 5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , и лиофилизовали.

*Хроматография на катионите.* Подготовку смолы осуществляли по стандартной методике [11]. Колонку (0,6×60 см), термостатированную при 35°С, заполняли смолой, уравновешенной стартовым буфером (0,2 М пиридин-ацетатный буфер, рН 3,1). Пептидный материал растворяли в 10 мл 30% уксусной кислоты и наносили на колонку под давлением азота 1,5—2 атм. Разделение проводили при скорости элюции 30 мл/ч. Подачу растворов осуществляли насосом МЦ-300 (Ково, ЧССР) (см. рис. 2—4). Сначала через колонку пропускали 150 мл стартового буфера. Градиент I получали пропуская через смеситель, содержащий 150 мл стартового буфера, 450 мл 0,2 М пиридин-ацетатного буферного раствора, рН 4,2; градиент II — 600 мл 0,5 М пиридин-ацетатного буфера, рН 5,0; градиент III — 700 мл 2,0 М пиридин-ацетатного буфера, рН 5,0. Затем колонку промывали 300 мл 2 М раствора пиридина и 50 мл 0,5 н.  $\text{NaOH}$ . Детектирование пептидов во фракциях объемом 1,5 мл осуществляли по реакции с нингидрином, проводимой с помощью пептидного анализатора (Technicon, США). По результатам анализа фракции объединяли, упаривали на роторном испарителе до объема 0,5—1,0 мл.

*Деление пептидов фракции I-12 с помощью геля-фильтрации.* Упаренный досуха пептидный материал растворяли в 0,5 мл 0,1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  и наносили на колонку (1×100 см) с сефадексом G-25 (сверхтонкий), уравновешенным тем же буфером. Пептиды элюировали 0,1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  со скоростью 2 мл/ч.

*Хроматография и электрофорез на бумаге.* Для препаративного разделения пептидов использовали бумагу ЭММ. Хроматографию осуществляли в системе А. Электрофорез проводили 1 ч в буферном растворе Б в приборе с жидкостным охлаждением (Savant, США) с градиентом потенциала 80 В/см. Пептиды обнаруживали по реакции с нингидрином. В некоторых случаях использовали качественную реакцию Эрлиха [12]. Пептиды с бумаги элюировали раствором 10%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

*Гидролиз пептидов I-1-1, I-5-3, II-16-1, II-23-2 термолизином.* Пептид (20 нмоль) растворяли в 0,1 мл 0,1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , а затем добавляли термолизин (соотношение фермент — субстрат 1 : 30, по весу) и выдерживали 3,5 ч при 37°С. Полученную смесь пептидов либо подвергали непосредственно химической деградации по методу Эдмана, либо разделяли с помощью хроматографии в тонком слое на целлюлозных пластинках в системе А и электрофореза в буфере Б. Пептиды с пластинок элюировались раствором 50% пиридина.

*Гидролиз пептидов II-7-3, II-17-1, I-15-2, II-31-1 трипсином, а также пептида II-24-4 химотрипсином* и определение аминокислотной последовательности полученных пептидов без разделения смеси проводили согласно [13].

*Определение С-концевой последовательности пептидов* с помощью карбоксипептидаз А и В проводили по методике [14]. При использовании карбоксипептидазы У к 1—5 нмоль пептида добавляли 5—10 мкг фермента в 0,1 М пиридин-ацетатном буфере, рН 5,5. Гидролиз проводили 1 ч при 37°С. Гидролизат лиофилизовали и анализировали с помощью аминокислотного анализатора D-550 (Durrum, США).

*N-Концевые аминокислоты* в пептидах определяли в виде Dns-производных по методу Грея [15].

Химическую деградацию пептидов с идентификацией Pht-производных осуществляли по методу [16].

Деградацию пептидов по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде Dns-производных осуществляли по модифицированному методу Грея [17]. К 5—25 нмоль высушенного пептида добавляли 20 мкл 50% водного пиридина и 20 мкл 5% раствора фенилизотиоцианата в пиридине. Реакцию проводили 1 ч в атмосфере аргона при 45° С, затем растворитель отгоняли в вакууме. К сухому остатку добавляли 40 мкл трифторуксусной кислоты и выдерживали 30 мин при 45° С в атмосфере аргона, после чего трифторуксусную кислоту отгоняли в вакууме и высушивали остаток (15 мин при 60° С). К остатку добавляли 30—40 мкл воды и экстрагировали этилацетатом (2×30 мкл). Водную фазу высушивали в вакууме, остаток растворяли в пиридине и отбирали аликвоту пептида для дансилирования. Идентификацию Dns-производных осуществляли по методу [15]; С-концевые остатки дикарбоновых аминокислот идентифицировались без кислотного гидролиза.

Для идентификации остатков глутаминовой и аспарагиновой аминокислот и их амидов этилацетатные экстракты после соответствующего цикла деградации высушивали, затем добавляли по 150 мкл 1 н. HCl и инкубировали 5 мин при 80° С. Фенилтиогидантоины аминокислот экстрагировали из водной фазы этилацетатом (3×200 мкл) и экстракт высушивали. Остаток растворяли в 25 мкл этилацетата, наносили на пластинку с силикагелем и подвергали двумерной хроматографии в системах растворителей: I — хлороформ, стабилизированный этанолом (0,5%), II — хлороформ, стабилизированный раствором этанол — уксусная кислота (8 : 2; 0,5%). Для обнаружения фенилтиогидантоинов аминокислот пластинку опрыскивали 1% раствором нингидрина в смеси абсолютного этанола с коллидином (95 : 6) и выдерживали 5 мин при 110° С. После такой обработки Pht-производные глутаминовой и аспарагиновой кислот окрашиваются в разные цвета [18].

Деградацию пептидов с идентификацией DABth-производных аминокислот проводили по методу [19].

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянный интерес к этой работе и помощь при ее выполнении.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ovchinnikov Yu. A., Lipkin V. M., Modjanov N. N., Chertov O. Yu., Smirnov Yu. V. FEBS Lett., 1976, v. 76, № 1, p. 108—111.
2. Burgess R. R. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 2, p. 6168—6178.
3. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaja G. S., Gubanov V. V., Guryev S. O., Chertov O. Yu., Modjanov N. N., Grinkevich V. A., Makarova I. A., Marchenko T. V., Polovnikova I. N., Lipkin V. M., Sverdlov E. D. Eur. J. Biochem., 1981, v. 116, № 3, p. 621—629.
4. Липкин В. М., Марченко Т. В., Хохряков В. С., Половникова И. Н., Погаченко Н. А., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 332—347.
5. Модянов Н. И., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Чергов О. Ю., Погаченко Н. А., Шуваева Т. М. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 2, с. 158—179.
6. Smith E. L. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1976, v. 72, № 2, p. 411—417.
7. Липкин В. М., Модянов Н. И., Смирнов Ю. В., Чергов О. Ю., Хохряков В. С., Тюрин В. В., Погаченко Н. А. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 2, с. 180—195.
8. Wooton J. C., Baron A. J., Lincham J. B. C. Biochem. J., 1975, v. 149, № 3, p. 749—759.
9. Lill U. J., Behrendt E. M., Hartmann G. R. Eur. J. Biochem., 1975, v. 52, № 3, p. 411—420.
10. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 2, p. 622—627.
11. Овчинников Ю. А., Кирюшкин А. А., Егоров Ц. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Модянов Н. И. Биохимия, 1972, т. 37, № 3, с. 451—460.
12. Reddi K. K., Kodicek E. Biochem. J., 1953, v. 53, № 2, p. 286—290.
13. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Погаченко Н. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. Биохимия, 1973, т. 38, № 1, с. 3—21.
14. Amber E. P. In: Methods in Enzymology / Ed. Hirs C. H. W. N. Y.: Acad. Press, 1967, v. XI, p. 156—166.
15. Grey W. R. In: Methods in Enzymology / Ed. Hirs C. H. W. N. Y.: Acad. Press, 1967, v. XI, p. 139—147.
16. Edman P., Begg J. Eur. J. Biochem., 1967, v. 1, № 1, p. 80—91.

17. Grey W. R. In: *Methods in Enzymology* / Ed. Hirs C. H. W. N. Y.: Acad. Press, 1967, v. XI, p. 469–475.
18. Roseau G., Pantel P. *J. Chromatogr.*, 1969, v. 44, № 2, p. 392–395.
19. Chang J. U., Grasser E. M. *Biochem. J.*, 1976, v. 157, № 1, p. 77–81.

Поступила в редакцию  
11.I.1982

**PRIMARY STRUCTURE OF THE  $\beta$ -SUBUNIT OF *E. COLI* DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE. HYDROLYSIS WITH *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PROTEASIS**

LIPKIN V. M., MAKAROVA I. A., GRINKEVICH V. A., AKHAPKINA I. G.,  
POTAPENKO N. A., TELEZHINSKAYA I. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

The carboxymethylated and citraconylated  $\beta$ -subunit of DNA-dependent RNA polymerase was hydrolyzed with *Staphylococcus aureus* protease. The hydrolysate was separated on Bio-gel P-4, followed by ion-exchange chromatography, and was further purified by paper chromatography and electrophoresis. As a result, 144 peptides were isolated, the complete amino acid sequence for 128 and partial sequence for 16 of them being determined. These peptides in total contain 1087 amino acid residues.