



УДК 577.156.3;547.963

КИСЛОТОСТАБИЛЬНЫЙ ИНГИБИТОР ТРИПСИНА ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРОЛИКА, АМИНОКИСЛОТНЫЙ И УГЛЕВОДНЫЙ СОСТАВ, НЕКОТОРЫЕ ЧЕРТЫ СТРОЕНИЯ **Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С.**Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Определен аминокислотный и углеводный состав высокоочищенного препарата ингибитора трипсина из сыворотки крови кролика, стабильного к нагреванию в кислой среде. Белковая часть ингибитора, составляющая 73% препарата, содержит 201 аминокислотный остаток, причем дикарбоновые аминокислоты преобладают над основными; отмечено высокое содержание полуцистина (10 остатков на 1 моль) и низкое содержание гистидина и метионина (по одному на 1 моль ТИ). В препарате ТИ найдено 22% углеводов, из них гексоз (галактоза и манноза) — 9,6%, гексозаминов (глюкозамин и галактозамин) — 9,1%, нейраминной кислоты — 3,3%. ТИ не содержит свободных SH-групп; результаты восстановления указывают на наличие в молекуле ТИ пяти S — S-связей. Восстановление S — S-связей в ТИ сопровождается полной потерей антитриптической активности; при реокислении SH-групп антитриптическая активность ТИ почти полностью восстанавливается. Показано, что ТЛХМК не взаимодействует с трипсином, находящимся в комплексе с ТИ, из чего следует, что ТИ блокирует участок, ответственный за каталитическую активность фермента. Полученные результаты указывают на отличие ТИ от всех полученных в чистом виде ингибиторов протеиназ плазмы крови человека и на его сходство с ингибиторами трипсина Шульмава и Аструпа из сыворотки крови и мочи человека.

Природные ингибиторы протеиназ подвергаются в последние годы интенсивным исследованиям, что связано с выявлением их важного физиологического значения как защитных факторов и регуляторов таких сложных и взаимосвязанных систем, как системы свертывания крови, фибринолиза, кининов и комплемента.

Выделенный нами ранее [1] из сыворотки крови кролика ТИ относится к числу наименее изученных ингибиторов протеиназ плазмы крови млекопитающих. В предыдущих сообщениях [2, 3] нами было описано выделение, свойства, спектр ингибиторного действия и кинетика торможения трипсина данным ингибитором.

В настоящей статье представлены данные об аминокислотном и углеводном составе и химическом строении ТИ, а также о механизме его взаи-

* Сокращения и обозначения: ТИ — термо- и кислотостабильный ингибитор трипсина; ТЛХМК — N- α -тозил-L-лизилхлорметилкетон; БАЭЭ — этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина; Е — международная единица активности ферментов, соответствует количеству фермента, катализирующему превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин; ИЕ — условная ингибиторная единица, соответствует количеству ингибитора, тормозящему расщепление 1 мкмоль субстрата в 1 мин в стандартных условиях; ТХУ — трихлоруксусная кислота; МЭ — β -меркаптоэтанол.

Таблица 1

Аминокислотный состав и содержание углеводных компонентов в ингибиторе трипсина из сыворотки крови кролика (ТИ) сравнительно с α_1 -антитрипсином

Аминокислота	ТИ		α_1 -антитрипсин [4]	
	аминокислотные остатки, %	моль/моль белка	аминокислотные остатки, %	моль/моль белка
Lys	7,27	13	7,15	30
His	0,45	1	2,92	12
NH ₂	1,82	26	1,04	35
Arg	3,21	5	1,85	6
Asp	9,77	20	8,02	38
Thr	2,91	7	4,97	26
Ser	3,60	10	2,98	18
Glu	12,48	23	10,90	46
Pro	4,03	10	2,69	15
Gly	5,70	23	2,03	19
Ala	2,95	9	2,89	22
Cys ^{1/2}	4,82	10	0	0
Val	3,03	7	3,86	21
Met	0,47	1	1,66	7
Ile	1,85	4	3,32	16
Leu	5,95	12	8,25	39
Tyr	4,71	7	1,87	6
Phe	5,97	9	6,37	23
Trp	3,42	4	0,55	2
Углеводный компонент	22	24	13	31
В с е г о	106,41	225	87,62	412

Таблица 2

Содержание SH-групп в высокоочищенном препарате ТИ до и после обработки β -меркаптоэтанолом

Препарат ТИ*	Количество белка в пробе, мг	Оптическая плотность проб при 412 нм		Количество SH-групп, моль/моль ТИ
		с раствором Эллимана	без раствора Эллимана	
До обработки МЭ	2,3	0,01; 0,017	0,01	0—0,23
После обработки МЭ	0,64	0,125; 0,135	0,01	10,42

* Молекулярный вес ТИ принят равным 23 000.

действия с трипсином; свойства ТИ сопоставлены со свойствами других известных ингибиторов трипсина, присутствующих в плазме крови млекопитающих.

В высокоочищенном препарате ТИ был определен аминокислотный состав (см. табл. 1). Для сравнения приведен аминокислотный состав α_1 -антитрипсина — главного ингибитора трипсина, присутствующего в сыворотке крови человека [4].

Как видно из табл. 1, пептидная часть ТИ содержит 201 остаток аминокислот, из них наибольшее количество составляют дикарбоновые аминокислоты — 43, основные — 19, в том числе лишь один остаток гистидина. Белковый компонент гликопротеида содержит 10 остатков полуцистина.

Сравнивая аминокислотные составы данного ингибитора и α_1 -антитрипсина следует отметить некоторые общие черты: высокое содержание дикарбоновых аминокислот, низкое содержание аргинина и метионина. Существенным отличием в аминокислотном составе этих двух ингибиторов

является присутствие 10 остатков полуцистина в ТИ, в то время как в α_1 -антитрипсине эта аминокислота отсутствует; другие известные ингибиторы протеиназ из плазмы крови человека [5] либо совсем не содержат цистина (α_1 -антихимотрипсин), либо содержат его в следовых количествах (α -интер-ингибитор трипсина, α_2 -макроглобулин и антитромбин III).

Поскольку свободные SH-группы и S—S-связи характеризуют свойства и структуру белка, нами было определено их содержание в высокоочищенном препарате ТИ (табл. 2).

Как видно из табл. 2, свободных SH-групп в препарате ТИ практически не найдено; обнаружение после восстановления 10,42 SH-групп пред-

Таблица 3

Содержание белка и углеводных компонентов в очищенном препарате ингибитора трипсина

Компонент	%	моль/моль гликопротеида
Белок	73	
GalN	1,8	2
GlcN	7,5	8
Gal	3,9	5
Man	5,7	7
Neu	3,3	2
Gal:Man	1:1,5	
GalN:GlcN	1:4	
Всего		24

полагает присутствие в молекуле ингибитора не менее пяти дисульфидных мостиков. Восстановление всех S—S-связей в ТИ сопровождается полной потерей антитриптической активности, что свидетельствует о важности сохранения нативной третичной конформации ТИ для проявления его ингибиторных свойств. Спонтанное реокисление SH-групп сопровождается постепенным восстановлением его антитриптической активности, полное реокисление через 2 сут приводит к практически полному восстановлению антитриптического действия ингибитора.

Большое число S—S-связей способствует, по-видимому, стабилизации молекулы ТИ и большей устойчи-

вости ее к денатурации по сравнению с другими ингибиторами трипсина плазмы крови [5].

Ранее [2] при использовании частично очищенного препарата ТИ (удельная активность 20 ИЕ) было найдено, что содержание углеводных компонентов в нем составляет 20,6%, из них гексоз — 9,0, гексозаминов — 8,5, нейраминовой кислоты — 3,4%. В настоящей статье эти данные уточнены и дополнены для более активного препарата (удельная активность 35 ИЕ), который содержал 22% углеводных компонентов, из них гексоз — 9,6, гексозаминов — 9,1, нейраминовой кислоты — 3,3%. Уточнение природы гексоз и гексозаминов, входящих в состав исследуемого гликопротеида, проводили при помощи качественной и количественной хроматографии на бумаге. В составе данного гликопротеида обнаружены галактозамин, глюкозамин, галактоза, манноза (пентозы не были найдены). Данные о количественном содержании обнаруженных компонентов представлены в табл. 3.

Как видно из данных табл. 3, содержание гексозамина и нейтральных гексоз в ТИ примерно одинаково, причем содержание глюкозамина, как это часто встречается в гликопротеидах, преобладает над содержанием галактозамина. Соотношение галактозы и маннозы равно 1 : 1,5, что отличает данный гликопротеид от многих гликопротеидов плазмы крови, характеризующихся преобладанием галактозы над маннозой (орозомукоид, α_1 -антитрипсин) [4]. Содержание нейраминовой кислоты относительно невелико — 3,3%. Тот факт, что нейраминовая кислота легко отщепляется уже при мягком кислотном гидролизе, дает основание предполагать, что она занимает терминальное положение в олигосахаридных цепях гликопротеида.

Для выяснения влияния нейраминовой кислоты на антитриптическую активность ТИ ее удаляли при кислотном гидролизе препарата в $1 \cdot 10^{-3}$ н. H_2SO_4 в течение 1 ч с последующим диализом, после чего в диализате измеряли антитриптическую активность. Как показали эти опыты, нейрами-

Таблица 1

Аминокислотный состав и содержание углеводных компонентов в ингибиторе трипсина из сыворотки крови кролика (ТИ) сравнительно с α_1 -антитрипсином

Аминокислота	ТИ		α_1 -антитрипсин [4]	
	аминокислотные остатки, %	моль/моль белка	аминокислотные остатки, %	моль/моль белка
Lys	7,27	13	7,15	30
His	0,45	1	2,92	12
NH ₃	1,82	26	1,04	35
Arg	3,21	5	1,85	6
Asp	9,77	20	8,02	38
Thr	2,91	7	4,97	26
Ser	3,60	10	2,98	18
Glu	12,48	23	10,90	46
Pro	4,03	10	2,69	15
Gly	5,70	23	2,03	19
Ala	2,95	9	2,89	22
Cys ^{1/2}	4,82	10	0	0
Val	3,03	7	3,86	21
Met	0,47	1	1,66	7
Ile	1,85	4	3,32	16
Leu	5,95	12	8,25	39
Tyr	4,71	7	1,87	6
Phe	5,97	9	6,37	23
Trp	3,42	4	0,55	2
Углеводный компонент	22	24	13	31
В с е г о	106,41	225	87,62	412

Таблица 2

Содержание SH-группы в высокоочищенном препарате ТИ до и после обработки β -меркаптоэтанолом

Препарат ТИ*	Количество белка в пробе, мг	Оптическая плотность проб при 412 нм		Количество SH-групп, моль/моль ТИ
		с раствором Эдмана	без раствора Эдмана	
До обработки МЭ	2,3	0,01; 0,017	0,01	0—0,23
После обработки МЭ	0,64	0,125; 0,135	0,01	10,42

* Молекулярный вес ТИ принят равным 23 000.

действия с трипсином; свойства ТИ сопоставлены со свойствами других известных ингибиторов трипсина, присутствующих в плазме крови млекопитающих.

В высокоочищенном препарате ТИ был определен аминокислотный состав (см. табл. 1). Для сравнения приведен аминокислотный состав α_1 -антитрипсина — главного ингибитора трипсина, присутствующего в сыворотке крови человека [4].

Как видно из табл. 1, пептидная часть ТИ содержит 201 остаток аминокислот, из них наибольшее количество составляют дикарбоновые аминокислоты — 43, основные — 19, в том числе лишь один остаток гистидина. Белковый компонент гликопротеида содержит 10 остатков полуцистина.

Сравнивая аминокислотные составы данного ингибитора и α_1 -антитрипсина следует отметить некоторые общие черты: высокое содержание дикарбоновых аминокислот, низкое содержание аргинина и метионина. Существенным отличием в аминокислотном составе этих двух ингибиторов

является присутствие 10 остатков полуцистина в ТИ, в то время как в α_1 -антитрипсине эта аминокислота отсутствует; другие известные ингибиторы протеиназ из плазмы крови человека [5] либо совсем не содержат цистина (α_1 -антихимотрипсин), либо содержат его в следовых количествах (α -интер-ингибитор трипсина, α_2 -макроглобулин и антитромбин III).

Поскольку свободные SH-группы и S—S-связи характеризуют свойства и структуру белка, нами было определено их содержание в высокоочищенном препарате ТИ (табл. 2).

Как видно из табл. 2, свободных SH-групп в препарате ТИ практически не найдено; обнаружение после восстановления 10,42 SH-групп пред-

Таблица 3

Содержание белка и углеводных компонентов в очищенном препарате ингибитора трипсина

Компонент	%	моль/моль гликопротеида
Белок	73	
GalN	1,8	2
GlcN	7,5	8
Gal	3,9	5
Man	5,7	7
Neu	3,3	2
Gal:Man	1:1,5	
GalN:GlcN	1:4	
Всего		24

полагает присутствие в молекуле ингибитора не менее пяти дисульфидных мостиков. Восстановление всех S—S-связей в ТИ сопровождается полной потерей антитриптической активности, что свидетельствует о важности сохранения нативной третичной конформации ТИ для проявления его ингибиторных свойств. Спонтанное реокисление SH-групп сопровождается постепенным восстановлением его антитриптической активности, полное реокисление через 2 сут приводит к практически полному восстановлению антитриптического действия ингибитора.

Большое число S—S-связей способствует, по-видимому, стабилизации молекулы ТИ и большей устойчи-

вости ее к денатурации по сравнению с другими ингибиторами трипсина плазмы крови [5].

Ранее [2] при использовании частично очищенного препарата ТИ (удельная активность 20 ИЕ) было найдено, что содержание углеводных компонентов в нем составляет 20,6%, из них гексоз — 9,0, гексозаминов — 8,5, нейраминовой кислоты — 3,1%. В настоящей статье эти данные уточнены и дополнены для более активного препарата (удельная активность 35 ИЕ), который содержал 22% углеводных компонентов, из них гексоз — 9,6, гексозаминов — 9,1, нейраминовой кислоты — 3,3%. Уточнение природы гексоз и гексозаминов, входящих в состав исследуемого гликопротеида, проводили при помощи качественной и количественной хроматографии на бумаге. В составе данного гликопротеида обнаружены галактозамин, глюкозамин, галактоза, манноза (пентозы не были найдены). Данные о количественном содержании обнаруженных компонентов представлены в табл. 3.

Как видно из данных табл. 3, содержание гексозамина и нейтральных гексоз в ТИ примерно одинаково, причем содержание глюкозамина, как это часто встречается в гликопротеидах, преобладает над содержанием галактозамина. Соотношение галактозы и маннозы равно 1 : 1,5, что отличает данный гликопротеид от многих гликопротеидов плазмы крови, характеризующихся преобладанием галактозы над маннозой (орозомукоид, α_1 -антитрипсин) [4]. Содержание нейраминовой кислоты относительно невелико — 3,3%. Тот факт, что нейраминовая кислота легко отщепляется уже при мягком кислотном гидролизе, дает основание предполагать, что она занимает терминальное положение в олигосахаридных цепях гликопротеида.

Для выяснения влияния нейраминовой кислоты на антитриптическую активность ТИ ее удаляли при кислотном гидролизе препарата в $1 \cdot 10^{-3}$ н. H_2SO_4 в течение 1 ч с последующим диализом, после чего в диализате измеряли антитриптическую активность. Как показали эти опыты, нейрами-

новая кислота не существенна для антитриптического действия ТИ, что согласуется с результатами других авторов, показавших, что отщепление нейраминовой кислоты не снижает антитриптической активности α_1 -антитрипсина из плазмы крови человека [6] и термо- и кислотостабильного ингибитора трипсина из мочи человека [7].

Как показывают исследования последних лет [8, 9], нейраминовая кислота необходима для активного транспорта гликопротеидов через клеточные мембраны. Так, накопление больших количеств α_1 -антитрипсина на месте его синтеза в клетках печени обнаружено у лиц, гомозиготных по α_1 -антитриптической недостаточности [8]; в этом случае лишь незначи-

Таблица 4

Влияние ТЛХМК на свободный трипсин и на комплекс трипсин — ТИ

Номер пробы	Состав пробы	ТЛХМК, М	Активность трипсина после осаждения 2,5%-ной ТХУ					
			Е/пробу			%		
1	Трипсин + ТИ	$4,6 \cdot 10^{-4}$	4,5;	3,37;	4,1	100;	83;	100
2	Трипсин	0	4,5;	4,1;	4,1	100;	100;	100
3	Трипсин	$4,6 \cdot 10^{-4}$	0	0	0		0	
4	Трипсин + ТИ	0	4,5;	3,37;	4,0	100;	83;	97

тельная часть ингибитора, лишенная нейраминовой кислоты, попадает в кровяное русло путем пассивной диффузии через мембраны клеток печени. Эти данные позволяют рассматривать наследственную недостаточность α_1 -антитрипсина в плазме крови как дефект в присоединении нейраминовой кислоты к молекуле гликопротеида [9]; накопление α_1 -антитрипсина в клетках печени при α_1 -антитрипсиновой недостаточности, возможно, является одной из причин гепатитов у детей [10].

В работах по изучению механизма взаимодействия трипсина с природными белковыми ингибиторами [11, 12] было показано, что при образовании комплекса трипсин — ингибитор происходит протеолитическое расщепление пептидной связи в ингибиторе ($\text{Arg}=\text{X}$, $\text{LyS}=\text{X}$) и образование фермент-ингибиторного комплекса, имеющего стабильную ацил-ферментную связь. Из этих данных следует, что активный центр трипсина, находящегося в комплексе с ингибитором, защищен от воздействия специфических химических реагентов. В данной работе была сделана попытка выявить, блокируется ли остаток гистидина-46 в трипсине при образовании комплекса с ТИ. С этой целью мы исследовали влияние ТЛХМК на комплекс трипсин — ТИ с последующим определением активности трипсина после диссоциации комплекса. Предварительно нами было найдено, что комплекс трипсин — ТИ полностью диссоциирует в 2,5%-ной ТХУ, а ТЛХМК в концентрации $4 \cdot 10^{-4}$ М полностью тормозит активность 400 мкг трипсина.

Как видно из данных табл. 4, ТЛХМК в концентрации $4,6 \cdot 10^{-4}$ М полностью и необратимо тормозит активность трипсина (проба 3); добавление ТЛХМК к комплексу трипсин — ТИ не изменяет активности трипсина, извлеченного из этого комплекса 2,5%-ной ТХУ (проба 4); количество трипсина, извлеченного из комплекса с ТИ до (проба 4) и после добавления ТЛХМК (проба 1), было одинаковым и составляло от 83 до 100% активности свободного трипсина, осажденного 2,5%-ной ТХУ (проба 2). Представленные данные показывают, что ТЛХМК не тормозит активность трипсина, находящегося в комплексе с ТИ, из чего следует, что гистидин-46 трипсина участвует в образовании комплекса с ТИ. Эти результаты сходны с данными работы [13], в которой изучалось влияние ТЛХМК и диизопропилфтор-

фосфата на комплексы трипсина с панкреатическим ингибитором Кунитца, ингибитором трипсина из *Ascaris* и овомукоидом цыпленка.

Значительный интерес представляет сопоставление свойств ТИ со свойствами других, хорошо изученных к настоящему времени ингибиторов протеиназ, присутствующих в сыворотке крови человека: α_1 -антитрипсина, α_1 -антихимотрипсина, α -интер-ингибитора трипсина, антитромбина III, С-1-инактиватора и α_2 -макроглобулина [5].

Прежде всего два основных свойства отличают ТИ от перечисленных выше ингибиторов — низкий молекулярный вес (средневесовая величина — 23 000) и кислотостабильность; молекулярные веса ингибиторов протеиназ плазмы крови человека находятся в интервале от 54 000 до 820 000; все они инактивируются при рН 4,0. О различиях в аминокислотном составе ТИ и ингибиторов протеиназ из плазмы крови человека упоминалось нами выше.

Будучи, как и все ингибиторы протеиназ плазмы крови, гликопротеином, ТИ характеризуется высоким содержанием углеводных компонентов (до 22%). По абсолютному и относительному содержанию углеводов ТИ приближается к α_1 -антихимотрипсину (24,6%); однако содержание нейраминной кислоты в ТИ в 2 раза ниже, чем в α_1 -антихимотрипсине [5].

Так же, как α_1 -антитрипсин и α_2 -макроглобулин, ТИ является сильным ингибитором трипсина и химотрипсина, но в отличие от них не является ингибитором калликреина плазмы крови и эластазы [2]. Взаимодействие ТИ с трипсином обратимо; величина K_i найдена равной $6 \cdot 10^{-10}$ [14]; по данным работы [5], ингибиторы трипсина из плазмы крови человека связывают трипсин необратимо.

Подобно α_2 -макроглобулину и α -интер-трипсин-ингибитору [5], ТИ относится к числу «аргининовых» ингибиторов [15].

Таким образом, выделенный нами из сыворотки крови кролика кислотостабильный ингибитор не идентичен ни одному из известных ингибиторов протеиназ плазмы крови человека, полученных в чистом виде. ТИ близок лишь к ингибитору, найденному Шульманом [16] в 1955 г. в сыворотке крови и в моче человека, и Аструпом [7] — в моче человека, однако этими авторами ингибитор был охарактеризован весьма фрагментарно.

Когда уже была готова к публикации данная статья, в печати появились сообщения Хохштрассера и соавтр. [17, 18] о выделении из секрета слизистой бронхов человека, а также из плазмы крови человека кислотостабильного ингибитора трипсина и химотрипсина, близкого по многим свойствам к ингибитору, описанному в данной статье.

Приведенные выше факты убеждают нас в том, что как ТИ, так и другие термо- и кислотостабильные ингибиторы трипсина, полученные из сыворотки крови человека [16, 18], из мочи человека [7], из бронхиального секрета [17], представляют собой одно и то же вещество и выполняют в организме сходную физиологическую функцию. Уточнение этих данных представляет собой вопрос ближайшего будущего.

Экспериментальная часть

Использованные препараты. Трипсин — кристаллический препарат фирмы «Srofa» (Чехословакия), уд. активность 20Е; БАЭЭ — препарат фирмы «Reanal» (Венгрия); 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойная кислота (реактив Элмана) — препарат фирмы «California Corporation» (США); МЭ — препарат фирмы «Sigma» (Англия); ТЛХМЖ — препарат, синтезированный в лаборатории синтеза пептидов Института биологической и медицинской химии АМН СССР. Для БХ использовали хроматографическую бумагу марки «М» фабрики им. Володарского.

ТИ — очищенный в 900—1000 раз препарат из сыворотки крови кролика, уд. активность соответствует 32—40 ИЕ. Препарат ТИ получили по модификации ранее описанного метода [2] с использованием фракциониро-

вания сульфатом аммония, хроматографии на DEAE-сефадексе А-50, экстракции ингибитора 2,5%-ной ТХУ и гель-фильтрации на сефадексе С-200. Освобожденный от солей и лиофилизированный препарат ТИ содержал 11,6% азота (микрометод Кьелдаля); pI 2,8; $S_{20}^W = 1,99 S$; средневесовой молекулярный вес ТИ равен 23 000 [3]; титрование трипсином свидетельствовало о 94—95%-ной чистоте препарата [14].

Активность ТИ измеряли по торможению БАЭЭ-эстеразного действия трипсина, как было описано ранее [2].

Аминокислотный состав ТИ определяли в аминокислотном анализаторе фирмы «Вестал» тип 121; 1,6 мг препарата ТИ с уд. акт. 35 ИЕ гидролизовали в 1 мл 6н. дистиллированной HCl в запаянной ампуле в атмосфере азота в течение 24 ч при 110°.

Определение SH- и S—S-групп в препарате ТИ. Содержание SH-групп определяли спектрофотометрическим методом Элмана [19] с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой. Число S—S-связей в препарате ТИ определяли после обработки ингибитора МЭ по методу Анфинсена и Хабера [20].

Определение углеводов компонентов в препарате ТИ проводили при помощи качественной и количественной БХ [21]. Для анализа использовали по 3 мг препарата ТИ (уд. акт. 35 ИЕ). Нейраминную кислоту определяли в отдельной навеске после 1-часового кислотного гидролиза тиобарбитуровым методом Уоррена [22].

Исследование влияния ТЛХМС на комплекс трипсин — ТИ. К опытной пробе (№ 1 в табл. 4) объемом в 1 мл, содержащей комплекс трипсин — ТИ (400 мкг трипсина и 800 мкг ТИ) в 0,05 М трис-малеиновая кислота-NaOH-буферном растворе (рН 6,0), добавляли 35 мкл $1,5 \cdot 10^{-2}$ М раствора ТЛХМК. Пробу выдерживали 60 мин при 37°, затем диализовали в течение 2 ч против 10^{-3} М раствора CaCl₂ при рН 7,0 для удаления несвязанного ТЛХМК. Из диализованного раствора трипсин осаждали добавлением 1,5 мл 5%-ной ТХУ, осадок отделяли центрифугированием, трижды промыли 0,5 мл 0,2 М CaCl₂ рН 2,0 с последующим центрифугированием и окончательно растворяли в $2,5 \cdot 10^{-4}$ М HCl. В полученном растворе активность трипсина определяли по расщеплению БАЭЭ, как описано ранее [2]. Контрольные пробы (2, 3, 4) были поставлены для определения активности трипсина после осаждения 2,5%-ной ТХУ (проба 2), влияния ТЛХМК на свободный трипсин (проба 3) и определения активности трипсина, извлеченного из комплекса с ТИ 2,5%-ной ТХУ (проба 4); контрольные пробы подвергались той же обработке, что и опытная проба. Результаты трех подобных опытов приведены в табл. 4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пасхина Т. С., Нартикова В. Ф. (1966) Вопросы медицинской химии, 12, 3, 325—327.
2. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. (1969) Биохимия, 34, 282—292.
3. Там же (1970), 35, 187—195.
4. Schultze H. E., Heremans J. F. (1966) Molecular Biology of Human Proteins., Vol 1, Amsterdam-London-N. Y., American Elsevier Publishing Co.
5. Heimburger N., Haupt H., Schwick H. G. (1971) Proceeding of the Internat. Research Conference on Proteinase Inhibitors, Munich 1970, pp. 1—21. Berlin-N. Y.
6. Schultze H. E., Heide K., Haupt H. (1962) Klin. Wochenschr., 40, 427—432.
7. Astrup T., Nissen U. (1964) Nature, 203, 255—257.
8. Sharp H. L. (1971) Hospital Practice, 6, 85—91.
9. Bell O. F., Carrell R. W. (1973) Nature, 243, 15, 410—411.
10. Ganrot P. O., Laurell C. B., Eriksson S. (1967) Scand. J. Clin. Lab. Invest., 19, 205—208.
11. Ozawa K., Laskowski M. (1966) J. Biol. Chem., 241, 3955—3961.
12. Finkenstadt W. R., Laskowski M., Jr. (1967) J. Biol. Chem., 242, 771—772.
13. Pudles I., Bachellerie D. (1968) Arch. Biochem. and Biophys., 128, 133—141.
14. Пасхина Т. С., Нартикова В. Ф., Якубовская Р. И. (1973) Тезисы Всес. симп. по протеолитическим ферментам, Вильнюс, 36—37.
15. Оглоблина О. Г., Якубовская Р. И., Пасхина Т. С. (1974) Тезисы Всес. симп. по химии белков и пептидов, Киев, 109.

16. Shulman R. (1955) J. Biol. Chem., 213, 655.
17. Hochstrasser K., Reichert R., Schwarz S., Werle E. (1973) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie, 354, 923—926.
18. Hochstrasser K., Feuth H., Steiner O. (1973) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie, 354, 927—932.
19. Ellman G. L. (1959) Arch. Biochem. and Biophys., 82, 70—77.
20. Anfinsen C. B., Haber E. (1959). J. Biol. Chem., 236, 1361—1363.
21. Розенфельд Е. И., Юсипова Н. А. (1967) Биохимия, 32, 1, 111—117.
22. Warren L. (1959). J. Biol. Chem., 234, 1971—1975.

Поступила в редакцию *
2.VIII.1974

**ACID-RESISTANT INHIBITOR OF TRYPSIN FROM RABBIT SERUM.
AMINO ACID AND CARBOHYDRATE COMPOSITION,
SOME STRUCTURAL DATA**

NARTICOVA V. F., PASKHINA T. S.

*Institute of Biological and Medical Chemistry,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

The amino acid and carbohydrate composition of highly purified preparations of thermostable in acid medium trypsin inhibitor (TI) from rabbit serum were determined. The polypeptide portion (73% of the preparation) contains 201 amino acid residues, among which dicarboxylic acids predominate over basic ones. The inhibitor is rich in half-cystines (10 residues) and has low content of histidine and methionine (1 residue). Carbohydrate moiety (22% of the preparation) contains 9.6% hexoses (galactose and mannose), 9.1% hexosamines (glucosamine and galactosamine), 3.3% neuraminic acid. There are no free SH-groups in TI, whereas 10.42 SH-groups were obtained after the reduction of S-S bonds in the inhibitor. Reduced TI does not display antitryptic activity; however, spontaneous reoxidation of SH-groups gives a fully active inhibitor. It is shown that trypsin in complex with TI does not interact with TLM because its active site is blocked by TI. The data obtained indicate that TI differs from all proteinase inhibitors from human blood plasma and resembles Schulman and Astrup trypsin inhibitors from human serum and urea.

* Статья из портфеля журнала «Биохимия», дата поступления — 13.V.1974 г.