



УДК 577.152.34*236'1 : 577.112.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СЕРИНОВОЙ
ПРОТЕИНАЗЫ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*I. ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПЕПТИДОВ ТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗАТАСуцова И. А., Янонис В. В., Ревина Л. П.,
Левин Е. Д., Степанов В. М.Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Модифицирован метод выделения внутриклеточной сериновой протеиназы *Bacillus amyloliquefaciens*. Использование в качестве аффинного сорбента синтезированной по измененной методике грамицидин-S-сефарозы CL-4B с более высоким содержанием лиганда позволило упростить очистку и получать с выходом 90% высокоактивный фермент. Проведен его гидролиз трипсином, гидролизат разделен на сульфокатионите. Из полученных фракций хроматографией и электрофорезом на бумаге выделено 25 пептидов. Методом Эдмана установлена их полная или частичная аминокислотная последовательность, соответствующая 146 аминокислотным остаткам.

Данная работа посвящена изучению первичной структуры внутриклеточной сериновой протеиназы *Bacillus amyloliquefaciens* (ВСП), КФ 3.4.23.6. Для установления аминокислотной последовательности этого фермента нами был проведен гидролиз трипсином, химотрипсином, Glu, Asp-специфичной протеиназой *Thermoactinomyces species* и изучена структура полученных пептидов. В настоящем сообщении описаны модифицированный метод выделения ВСП и результаты исследования триптических пептидов этого фермента.

Как было показано [1], ВСП обладает рядом общих свойств с внеклеточными ферментами бацилл — субтилизинами. Как и субтилизины, ВСП полностью ингибируется диизопропилфторфосфатом, фенилметилсульфонилфторидом и природным белковым ингибитором актиномицетов, аналогичным ингибитору субтилизинов SSI, и не ингибируется белковым ингибитором из сои. ВСП имеет характерные для щелочных сериновых протеиназ рН-оптимумы активности (7—10) и стабильности (6—7). В отличие от субтилизинов для этого фермента характерны строгая зависимость его протеолитической активности от ионов Ca^{2+} , низкое значение изоэлектрической точки (рI 4,3) и существование активных молекул в виде димеров. Кроме того, в отличие от секреторных субтилизинов ВСП содержит 1—2 остатка цистеина, ингибируется ионами Hg^{2+} и относится к подклассу тиолзависимых сериновых протеиназ. Способность ВСП связываться грамицидином S используется при выделении этого фермента методом аффинной хроматографии на грамицидин-S-сефарозе [2].

В то время как аминокислотная последовательность для некоторых секреторных субтилизинов известна [3], данные о первичной структуре ВСП до настоящего времени были весьма ограниченными. Изучение первичной структуры представляется важным для выяснения взаимоотношения структуры и функций фермента, эволюционного родства и классификации микроорганизмов.

Для выделения фермента мы модифицировали разработанную в нашей лаборатории методику [2]. Разрушение клеточных оболочек проводили не ультразвуком, а с помощью лизоцима, что обеспечивало возможность наиболее полного извлечения фермента из клеток (общая исходная активность протеиназы в клеточном экстракте возрастала в 8—10 раз по сравнению с [2]). После удаления нуклеиновых кислот осаждением стрептомицинсульфатом, минуя трудоемкие стадии очистки (осаждение сульфатом аммония и хроматографию на DEAE-целлюлозе), клеточный экстракт сра-

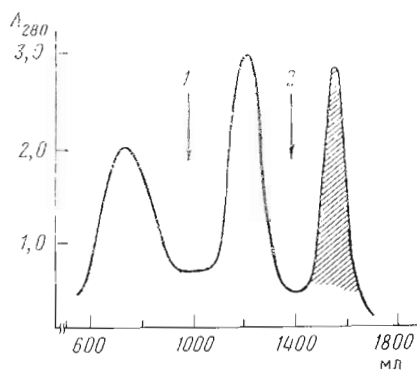


Рис. 1. Профиль разделения клеточного экстракта *B. amyloliquefaciens* на грамицидин-S-сефарозе CL-4В. Колонка с сорбентом (объем 150 мл) уравновешена 50 мМ трис-НСl-буфером (рН 8,0), содержащим 1 мМ CaCl₂. Стрелками отмечено начало промывания колонки: 1 М NaCl в том же буфере (1); 15% изопропиловым спиртом, 1 М NaCl в том же буфере (2). Пик, содержащий активные фракции, заштрихован

зу подвергали аффинной хроматографии на грамицидин-S-сефарозе. Методику синтеза сорбента [4] несколько изменили, используя сефарозу CL-4В и водно-спиртовой раствор грамицидина S. Это позволило увеличить содержание лиганда до 3,7 мкмоль/мл влажного геля сорбента. Ранее [2] также были сделаны попытки, опустив предварительную стадию очистки на DEAE-целлюлозе, подвергать «грубый» фермент, полученный при осаждении сульфатом аммония, аффинной хроматографии на грамицидин-S-сефарозе 4В (содержание лиганда 1 мкмоль/мл влажного геля). Однако фермент не связывался сорбентом прочно, а элюировался исходным буфером. При рехроматографии фракций, содержащих ВСП, на той же колонке получали фермент с невысокой удельной активностью (18 ед. акт./ОЕ). Возможно, связыванию ВСП сорбентом мешало большое количество солей, остающихся после осаждения сульфатом аммония. По модифицированной методике, несмотря на большое количество балластных белков, выделение ВСП удается провести в одну стадию. Фермент прочно связывается грамицидин-S-сефарозой CL-4В и элюируется 15% изопропиловым спиртом, содержащим 1 М NaCl, при рН 8,0 (рис. 1). В некоторых случаях, при перегрузке колонки, в процессе предварительной ее промывки 1 М NaCl (см. «Экспериментальную часть») незначительное количество активной ВСП элюировалось совместно с другими белками. Эти фракции подвергали рехроматографии на маленькой колонке с тем же сорбентом. В результате упрощения методики, применения лизоцима и сорбента с более высоким содержанием лиганда мы получили с выходом 90% (по активности) высокоочищенный фермент с удельной активностью, в 3—4 раза более высокой, и с выходом по белку (на одно и то же количество клеток), в 10 раз большим, чем по ранее описанной методике [2].

В нашей лаборатории был определен аминокислотный состав (табл. 1) и автоматическим методом Эдмана установлена N-концевая последовательность 53 остатков ВСП [1]. Для дальнейшего изучения протеиназа была денатурирована и гидролизована трипсином при рН 8,0 и 37° С в течение 4 ч, триптический гидролизат фракционирован на колонке с сульфокатионом Chromobeads (рис. 2). Анализ полученных 29 фракций показал, что фракции 1—8 содержат сложные смеси в основном крупных пептидов. Из фракции 6 после 4-стадийной очистки (электрофорезом, двукратной хроматографией на бумаге с последующей высокоэффективной жидкостной хроматографией) был выделен один пептид в гомогенном виде — Т6-1. Остальные фракции были подвергнуты электрофорезу и хроматографии на бумаге, в результате чего был выделен ряд пептидов. Аминокислотный состав пептидов приведен в табл. 1. N-Концевые аминокислоты определяли методом дансильирования. Аминокислотная последовательность пептидов устанавливалась методом Эдмана с идентификацией аминокислот в виде дансильных производных и автоматической деградацией на твердофазном секвенаторе, а также с помощью лейцинаминопептидазы и карбоксипептидаз А и В (табл. 2). Ниже описаны методы изучения структуры некоторых пептидов.

Пептид Т6-1 состоит из семи аминокислотных остатков. Аминокислотная последовательность определена методом Эдмана (дансильный вариант).

С помощью электрофореза по Оффорду [5] установлено, что пептид имеет заряд -1 , однако локализовать положение остатков глутаминовой кислоты и глутамин (остатки 3, 4) не удалось. Структура пептида: Gly-Leu-(Glu, Gln)-Ala-Ser-Phe.

Пептид T10-1 состоит из четырех аминокислотных остатков. Последовательность определена методом Эдмана в сочетании с дансированием. N- и C-концевые остатки дополнительно идентифицированы гидролизом лейцинаминопептидазой и карбоксипептидазой А. Электрофорез при рН 5,6 показал, что пептид обладает отрицательным зарядом; следовательно, в положении 3 находится глутаминовая кислота, а не глутамин. Структура пептида: Ser-Ser-Glu-Phe.

Пептид T11-1 состоит из восьми аминокислотных остатков. N-Концевая аминокислота определена дансированием, последовательность первых семи остатков — на твердофазном секвенаторе. C-Концевая аминокислота установлена с помощью карбоксипептидазы В. При электрофорезе (рН 5,6) пептид движется как нейтральное вещество. В положе-

Таблица 1

Аминокислотный состав пептидов, полученных в результате гидролиза ВСН трипсином

Аминокислота	Протен-наза Ват	Пептид						
		T6-1	T9-1	T10-1	T10-2	T10-3	T11-1	T11-2
Asp	36		2,6(3)	1,4(1)	2,9(3)		1,0(1)	0,8(1)
Thr	13		0,7(1)				1,1(1)	0,8(1)
Ser	25	0,8(1)	1,0(1)	1,4(1)	1,0(1)	1,5(2)		
Glu	33	2,2(2)	1,9(2)	1,3(1)	2,0(2)	1,0(1)	1,0(1)	
Pro	13		1,8(2)		0,9(1)			1,0(1)
Gly	36	0,9(1)	1,4(1)	3,9(4)	1,7(2)			
Ala	32	1,0(1)	1,0(1)		1,9(2)		1,7(2)	1,0(1)
Val	19		1,1(1)	1,0(1)	1,3(1)		1,7(2)	
Met	5				0,4(1) **			
1/2Cys	1-2							
Ile	13		1,4(2) *		1,3(1)			1,0(1)
Leu	25	0,9(1)	2,4(3) *	1,0(1)	3,2(4) *			1,5(2) *
Tyr	7				0,2(1) **			
Phe	7	0,9(1)			1,0(1)	1,0(1)		
Trp	Не опред.							
His	6		0,7(1)					
Lys	20		0,9(1)	1,0(1)	1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)
Arg	6							
Всего остатков	297-298	7	19	10	21	4	8	8
Выход, нмоль		200	320	200	800	200	1400	500
%		2	3,2	2	8	2	14	5

Аминокислота	Пептид								
	T11-3	T12-1	T13-1	T14-1	T14-2	T15-1	T18-1	T20-1	T20-2
Asp			1,5(2)			1,0(1)		1,0(1)	
Glu	1,0(1)	1,8(2)	1,0(1)	1,8(2)	0,8(1)				
Pro		1,0(1)			0,9(1)				
Gly		1,2(1)	1,0(1)						2,1(2)
Ala				0,8(1)	1,0(1)				
Val				1,0(1)					
Ile		0,7(1)	2,2(3) *			1,0(1)			1,2(2) *
Leu		1,0(1)			0,9(1)				
Tyr			1,1(2) **						
Trp			1,0(1) **		1,0(1) **				
Lys		0,7(1)		0,8(1)		0,8(1)	1,0(1)		1,0(1)
Arg	1,0(1)							1,0(1)	
Всего остатков	2	7	10	5	5	3	1	2	5
Выход, нмоль	2200	800	700	4400	200	600	1000	3200	2000
%	22	8	7	44	2	6	10	32	20

Аминокислота	Пептид								
	T20-3	T21-1	T21-2	T23-1	T24-1	T25-1	T25-2	T27	T28
Asp	1,1(1)								
Ser	1,0(1)	1,8(2)							
Glu	1,1(1)	1,2(1)	1,1(1)						1,0(1)
Gly	3,8(4)			1,0(1)					
Ala			1,0(1)			1,0(1)			
Val	1,0(1)		1,0(1)		1,0(1)				
Ile					1,0(1)				
Leu	1,0(1)		0,9(1)					1,0(1)	
Phe		1,0(1)							1,1(1)
Lys	1,0(1)	0,9(1)		1,0(1)	1,3(1)	1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)
Arg			1,1(1)				1,0(1)		
Всего остатков	10	5	5	2	3	2	1	2	3
Выход, моль %	200	1000	2000	3600	6000	3200	6000	800	4000
%	2	10	20	36	60	32	60	8	40

* Заниженное количество гидрофобных аминокислот (Ile, Leu, Val) объясняется плохой гидролизующемостью связей между ними.

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

* Триптофан определяли с помощью метансульфоновой кислоты.

нии 5 на твердофазном секвенаторе определен остаток аспарагина; следовательно, положение 1 занимает остаток глутаминовой кислоты. Структура пептида: Glu-Ala-Val-Thr-Asn-Ala-Val-Lys.

Пептид T12-1 содержит семь аминокислотных остатков. N-Концевая аминокислота установлена дансильрованием, последовательность — на твердофазном секвенаторе. При электрофорезе при pH 5,6 пептид имеет отрицательный заряд; следовательно, содержит два остатка глутаминовой кислоты. Структура пептида: Glu-Leu-Pro-Glu-Gly-Ile-Lys.

Пептид T13-1 содержит 10 аминокислотных остатков. N-Концевая аминокислота определена дансильрованием. Последовательность остатков 1—8, за исключением остатка Trp-3, установлена методом Эдмана (дансильный вариант). Остаток Trp-3 идентифицирован при анализе лейцинамиднопептидазного гидролизата. C-Концевая последовательность (остатки 8—10) установлена с помощью карбоксипептидазы А. Структура пептида: Tyr-Glu-Trp-Ile-Ile-Asn-Gly-Ile-Asn-Tyr.

Пептид T14-1 состоит из пяти аминокислотных остатков. N-Концевая аминокислота определена методом дансильрования. Аминокислотная последовательность установлена методом Эдмана (дансильный вариант). При электрофорезе (pH 5,6) пептид имеет подвижность нейтрального вещества. Пептид содержит один остаток лизина; следовательно, из двух остатков Glx (3 и 4) один является глутаминовой кислотой, другой — глутамином. Положение этих остатков было идентифицировано при анализе результатов гидролиза пептида смесью карбоксипептидаз А и В: были отщеплены Lys-5 и Gln-4. Структура пептида: Ala-Val-Glu-Gln-Lys.

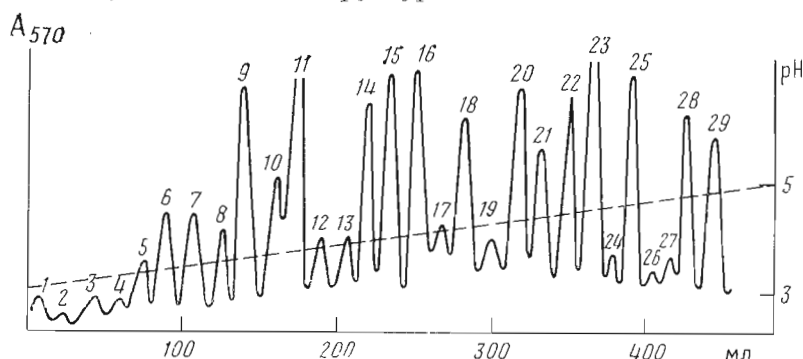


Рис. 2. Хроматография продуктов триптического гидролиза ВСП на смоле Chromobeads (колонка 0,9 × 60 см) в градиенте pH и концентрации пиридин-ацетатного буфера [7]. Штриховая линия — изменение pH

Пептиды триптического гидролизата ВСП

Пептид	Аминокислотная последовательность *
T6-1	Gly-Leu-(Glu, Gln)-Ala-Ser-Phe
T9-1	Glx-Ile-Asp-Leu-Val-Ala-Pro-Gly-Glu-Asn-Ile-Leu-Ser-Thr-Leu- Pro-Asn-(His)-Lys
T10-1	Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Asp-Gly-Ser-Gly-Lys
T10-2	Leu-Tyr-Leu-Asp-Ala-Pro-Asp-Val-Leu-Met-Glu-(Asx, Ser, Glx, Gly ₂ , Ala, Phe, Ile, Lys)-Leu
T10-3	Ser-Ser-Glu-Phe
T11-1	Glu-Ala-Val-Thr-Asn-Ala-Val-Lys
T11-2	Thr-Leu-Pro-Leu-Asp-Ile-Ala-Lys
T11-3	Gln-Arg
T12-1	Glu-Leu-Pro-Gly-Gly-Ile-Lys
T13-1	Tyr-Glu-Trp-Ile-Ile-Asp-Gly-Ile-Asn-Tyr
T14-1	Ala-Val-Glu-Gln-Lys
T14-2	Ala-Pro-Glu-Leu-Trp
T15-1	Asp-Ile-Lys
T18-1	Lys
T20-1	Asn-Arg
T20-2	Ile-Ile-Gly-Gly-Lys
T20-3	Val-Leu-Gly-Gly-Gln-(Asx, Gly, Ser, Gly)-Lys
T21-1	Lys-Ser-Ser-Glu-Phe
T21-2	Ala-Gln-Leu-Val-Arg
T23-1	Gly-Lys
T24-1	Val-Ile-Lys
T25-1	Ala-Lys
T25-2	Arg
T27	Leu-Lys
T28	Gly-Phe-Lys

Определена методом Эдмана в сочетании с дансильрованием (→), на твердофазном секвенаторе (↗), гидролизом карбоксипептидазами А и В (←), гидролизом лейцинаминопептидазой (⇒), с помощью электрофореза при pH 6,5 или 5,3 (—).

Пептид T21-2 содержит пять аминокислотных остатков. N-Концевая аминокислота определена методом дансильрования, последовательность — методом Эдмана (дансильный вариант). Остаток Gln-2 идентифицирован электрофорезом при pH 5,6. Пептид имеет положительный заряд (больше единицы), обусловленный наличием остатка аргинина. Структура пептида: Ala-Gln-Leu-Val-Arg.

Структуру коротких пептидов (T11-3, T15-1, T20-1) также определяли методом Эдмана (дансильный вариант), дикарбоновые кислоты и их амиды идентифицировали с помощью электрофореза при pH 5,6.

Таким образом, была изучена полная или частичная аминокислотная последовательность 25 триптических пептидов, в сумме содержащих 146

аминокислотных остатков. Анализ полученных данных показал, что исследованные нами пептиды в основном являются продуктами специфического гидролиза ВСП трипсином: в 21 из 25 пептидов С-концевыми остатками являются лизин и аргинин, в 4 пептидах — ароматические аминокислоты. Присутствие в гидролизате в большом количестве свободных лизина и аргинина говорит о наличии в полипептидной цепи ВСП кластеров основных аминокислот. Однако большой разброс данных по выходу пептидов (см. табл. 1) (200—6000 нмоль) заставляет предположить, что некоторые из них являются продуктами неполного или неспецифического гидролиза ВСП трипсином. Так, фракция 9 содержала пептид Т9-2. (не приведен), последовательность которого повторяла структуру пептида Т10-1 начиная с третьего остатка. Следовательно, в данном случае гидролизу трипсином подверглась связь Туг-Leu (см. табл. 2). Можно отметить, что короткие пептиды (до 10 аминокислотных остатков) в основном получены с более высоким выходом, чем длинные (10—20 аминокислот), что можно объяснить, с одной стороны, большей вероятностью неспецифического гидролиза участков полипептидной цепи внутриклеточной сериновой протеиназы, не содержащих лизин и аргинин на значительном протяжении, а с другой — большими потерями крупных пептидов при их очистке. Так, из фракции 9, содержащей около 10 крупных пептидов, сходных по составу, удалось выделить в гомогенном виде только два пептида (Т9-1 и Т9-2).

Экспериментальная часть

В работе использовали грамицидин S отечественного производства, перекристаллизованный из этилового спирта; сефарозу CL-4B (Pharmacia, Швеция); трис-HCl (Serva, ФРГ); ионообменную смолу Chromobeads P.2-1-01-18(A)T₂15-03-58-04 (Ирландия); фенилизотиоцианат, дансилхлорид (Fluka, Швейцария); лизоцим (Reanal, Венгрия); трипсин (Serva, ФРГ); карбоксипептидазы А и В (Worthington, США); лейциламинопептидазу из хрусталика глаза (Serva, ФРГ), стрептомициносульфат (СССР).

Синтез грамицидин-S-сефарозы CL-4B. 200 мл 5 М калий-фосфатного буфера (рН 13) поместили в колбу с 200 мл предварительно отмытой водой и охлажденной сефарозы CL-4B. При охлаждении и перемешивании добавили 60 г бромциана в 200 мл ацетонитрила. Активацию проводили 10 мин при 5°С. Далее активированную сефарозу быстро отмыли на фильтре холодной водой до нейтрального рН, затем последовательно охлажденными смесями этанол — вода, 1 : 3 и 3 : 1 (по 2 л) и 0,6 л этанола. Грамицидин (8 г) растворили в 160 мл этанола и добавили 80 мл 0,1 н. NaHCO₃. рН которого предварительно довели 2 н. NaOH до 12. К раствору лиганда добавили отмытую активированную сефарозу и оставили при перемешивании на 14 ч. Далее сорбент отмывали на фильтре последовательно 0,5 л этанола, 2 л смеси этанол — вода (3 : 1), 0,5 л смеси этанол — вода (1 : 3) и водой до нейтрального рН. К сорбенту добавили 200 мл 0,25 М раствора свежеперегнанного этаноламина в воде, подкисленного HCl до рН 8,3, и оставили при перемешивании на 2 ч, затем отмыли водой до нейтрального рН. Содержание лиганда в сорбенте определили аминокислотным анализом солянокислого гидролизата сорбента. Перед использованием грамицидин-S-сефарозу CL-4B промыли всеми буферными смесями, применявшимися при аффинной хроматографии ВСП, затем отмыли 0,05 М трис-HCl-буфером, рН 8,0.

Выделение и очистка внутриклеточной сериновой протеиназы. Культуру *Bacillus amyloliquefaciens* (штамм А-50) выращивали как описано в работе [1]. Разрушение клеточных оболочек проводили лизоцимом из расчета 0,5—0,7 мг лизоцима на 1 г клеток в 0,05 М трис-HCl-буфере, рН 8,0, содержащем 1 мМ CaCl₂ (буфер А), в течение 4—8 ч при 20°С. После удаления нуклеиновых кислот (осаждением стрептомициносульфатом с последующим центрифугированием) клеточный экстракт сразу наносили на колонку с грамицидин-S-сефарозой CL-4B (объем 150 мл), промывали 450 мл буфера А, затем таким же объемом 1 М NaCl в буфере А. Элюцию ВСП с сорбента проводили буфером А, содержащим 15% изопропиловый спирт и 1 М NaCl. При необходимости рехроматографии, в случае перегрузки колонки, фракции, содержащие ВСП, обессоливали и повторно наносили на колонку с грамицидин-S-сефарозой CL-4B (объем 50 мл). Выход фермента с колонки контролировали измерением протеолизической активности элюатов, как описано ранее [1], с помощью синтетического пептидного субстрата *p*-нитроанилида бензил-оксикарбонил-аланил-аланил-лейцина (*Z*-L-Ala-L-Ala-L-Leu-pNA), т. е. по количеству *p*-нитроанилина, образовавшегося в расчете на 1 мг белка за 1 мин и по УФ-поглощению при 280 нм. Полученный фермент ингибировали диизопропилфторфосфатом, диализовали и лиофильно высушивали.

Гидролиз ВСП трипсином. 300 мг ВСП денатурировали 10% трихлоруксусной кислотой по методике [6] и растворили в 20 мл 0,05 н. триэтиламинкарбонатного буфера, рН 8,0. К раствору добавили 10 мг трипсина в 0,5 мл того же буфера и ос-

тавили на 2 ч при перемешивании при 37° С. Затем добавили еще 10 мг трипсина и гидролиз продолжили еще 2 ч. Гидролизат заморозили и лиофилизировали.

Разделение продуктов триптического гидролиза на колонке со смолой Shrombeads проводили как описано ранее [7].

Идентификацию пептидсодержащих фракций проводили на пептидном анализаторе АА-II (Technicon, Ирландия) [8].

Пептиды очищали хроматографией в системах пиридин — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (10 : 15 : 3 : 12), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (200 : 30 : 75) и электрофорезом при рН 2,2 и 5,6 на бумаге Whatman ЗММ. При идентификации дикарбоновых кислот и их амидов использовали электрофорез по Оффорду (буфер рН 6,5) и электрофорез при рН 5,6. Аналитическую хроматографию проводили в тонком слое целлюлозы (Serva, ФРГ).

ВЭЖХ проводили на приборе LDC (США). Пептид Т6-1 растворили в 100 мкл 0,1% водного раствора трифторуксусной кислоты и нацесли на колонку (4,6 × 250 мм) Spherisorb (5 мкм), уравновешенную тем же раствором, и провели элюцию в градиенте концентрации метилового спирта (0—100%). Поглощение элюатов измеряли при 210 нм.

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

Структуру пептидов изучали методом Эдмана (дансильный вариант), как описано ранее [7], или на твердофазном секвенаторе Rank Hilger (Англия). Пептиды пришивали к аминопропилстеклу диэтилэтилендиимидным методом [9]. Отщепляющиеся тиазалины превращали в фенилтиогидантоины 1 н. HCl в течение 10 мин при 80° С и анализировали в тонком слое силикагеля [10].

Полиамидные пленки для хроматографии дансилпроизводных аминокислот готовили по методике [11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Stepanov V. M., Strongin A. Ya., Izotova L. S., Abramov Z. T., Belyanova L. P., Baratova L. A., Lyublinskaya L. A., Ermakova L. M. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 77. № 1. P. 397—403.
2. Изотова Л. С., Городецкий Д. И., Янонис В. В., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Тимохина Е. А., Стронгин А. Я., Степанов В. М. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 3. С. 397—403.
3. Smith E. L., Markland F. S., Kasper C. V., Delange R. G., Landon M., Evans W. H. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 24. P. 5974—5976.
4. Porath J., Aspberg K., Drevin P., Axen R. // J. Chromatogr. 1973. V. 86. № 1. P. 53—58.
5. Offord R. E. // Nature. 1966. V. 211. № 5049. P. 112—115.
6. Kasper C. V., Smith E. L. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 16. P. 3754—3770.
7. Ковалева Г. Г., Остославская В. И., Сурова И. А., Ревина Л. П., Котлова Е. К., Немцова Е. Р., Левин Е. Д., Тимохина Е. А., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Степанов В. М. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 12. С. 1765—1777.
8. Lin K. D., Deutsch H. F. // Anal. Biochem. 1973. V. 56. № 1. P. 155—164.
9. Laursen R. H., Horn M. I., Bonner A. G. // FEBS Lett. 1972. V. 21. № 1. P. 67—72.
10. Алазов Ю. Б., Бундуле М. А., Бундулис Ю. П., Винокуров Л. М., Козлов В. П., Мотуз Л. П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 3. С. 304—314.
11. Решетов П. Д., Честулина Г. Г., Махмудов С., Пышкин А. С. // Химия природы. соедinen. 1971. № 1. С. 66—68.

Поступила в редакцию

7.VIII.1987

После доработки

16.XII.1987

PRIMARY STRUCTURE OF INTRACELLULAR SERINE PROTEASE OF *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*. I. ISOLATION OF THE ENZYME AND DETERMINATION OF AMINO ACID SEQUENCES OF TRYPTIC PEPTIDES

SUROVA I. A., YANONIS V. V., REVINA L. P.,
LEVIN E. D., STEPANOV V. M.

*All-Union Research Institute of Genetics and Selection
of Industrial Microorganisms, Moscow*

Method of isolation of intracellular serine protease was modified. Gramicidin S-spharose CL-4B with a higher content of the ligand, synthesized through a modified procedure, was used as an affinity sorbent which simplified the purification and led to the pure enzyme with high specific activity and 90% yield. Trypsin hydrolizate of the protease was separated by ion-exchange chromatography on a sulphocationite resin followed by paper chromatography and paper electrophoresis to yield twenty-five individual peptides. Their complete or partial sequences, corresponding in total to 146 amino acid residues, were determined by the manual Edman procedure.