



УДК 577.152.34.14

ВЫДЕЛЕНИЕ ТРИПСИНА РС КАМЧАТСКОГО КРАБА *Paralithodes camtschatica* И ЕГО СВОЙСТВА

© 1998 г. Г. Н. Руденская[#], В. А. Исаев, Т. С. Калёбина, В. М. Степанов,
К. В. Мальцев*, С. В. Швец*, Н. А. Лукьянова*, Ю. А. Кислицин*, А. И. Мирошников*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119899, Москва, ГСП-3, В-234, Воробьевы горы;

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 23.05.97 г. Принята к печати 15.09.97 г.

Трипсин РС из гепатопанкреаса камчатского краба (*Paralithodes camtschatica*) получен в индивидуальном состоянии с помощью последовательных хроматографических процедур: ионообменных – на аминсилохроме и DEAE-сефадексе и аффинной – на аргинин-агарозе с выходом 37.7% и степенью очистки 21. Фермент с M 29 кДа и $pI < 2.5$ гидролизует *n*-нитроанилид *N*-бензоиларгинина с оптимальным рН 7.5–8.0, температурным оптимумом 55°C, K_m 0.05 мМ, стабилен в диапазоне рН 5.8–9.0 в присутствии Ca^{2+} . Фермент РС ингибируется диизопропилфторфосфатом и фенилметилсульфонилфторидом – специфическими ингибиторами сериновых протеиназ и *N*-тозиллизилхлорметилкетон – ингибитором трипсина, а также белковыми ингибиторами трипсина из сои и картофеля. Трипсин РС гидролизует в пептидных субстратах амидные связи, образованные карбоксильными группами аргинина и лизина, его *N*-концевая последовательность – IVGGTEVTPG-.

Ключевые слова: трипсин, камчатский краб, выделение, субстратная специфичность, ингибиторы, молекулярные свойства.

Трипсины (КФ 3.4.21.4) – одна из наиболее изученных групп сериновых протеиназ. Трипсины ракообразных [1–9], в частности известные трипсины крабов (КФ 3.4.21.32), имеют индивидуальные черты, отличающие их от типичных трипсинов млекопитающих. В ходе изучения гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica* нами были выделены и охарактеризованы карбоксипептидаза РС [10] и коллагенолитическая сериновая протеиназа РС [11]. В других лабораториях из этого же источника были выделены и частично охарактеризованы ферменты, обладающие коллагенолитическим действием и, по-видимому, относящиеся к семейству химотрипсина [4–6]. Однако литературные данные относительно протеиназ гепатопанкреаса неполны и часто противоречивы. Так, в работе Климовой и соавт. [4] описано выделение четырех сериновых протеиназ, которые, судя по их *N*-концевым последовательностям, принадлежат к семейству химотрипсина, к которому относится и

трипсин. Субстратная специфичность была изучена лишь для двух из этих ферментов. Один из них (M 28 кДа) гидролизует субстраты химотрипсина и трипсина и, вероятно, является коллагенолитической сериновой протеиназой, близкой по свойствам к сериновой протеиназе РС [11]. Другой фермент – “С” (M 36 кДа) гидролизует субстраты химотрипсина и эластазы. В работе Сахарова и соавт. [6] из гепатопанкреаса камчатского краба были выделены две, по-видимому различные, коллагенолитические протеиназы, которые были не вполне оправданно названы изоферментами А и С. По субстратной специфичности протеиназу А можно отнести к трипсинам, однако отсутствие структурных характеристик не позволяет окончательно классифицировать этот фермент. Данное исследование посвящено выделению из камчатского краба (*P. camtschatica*) протеиназы с субстратной специфичностью трипсина (далее – трипсин РС) и изучению ее свойств.

Выделение трипсина из суммарного препарата протеиназ гепатопанкреаса камчатского краба “морикразы” [12] осложнялось тем, что этот фермент и охарактеризованная нами ранее сериновая протеиназа РС [11] обладают рядом сходных свойств. Так, они имеют изоэлектрические точки в кислой области рН и близкие по значению молекулярные массы. Применение на первой стадии очистки морикразы ионообменной хроматогра-

Сокращения: -pNA – *n*-нитроанилид, Glp – пироглутамил, TLCK – тозиллизилхлорметилкетон, DFP – диизопропилфторфосфат, PMSF – фенилметилсульфонилфторид, БСА – бычий сывороточный альбумин.

[#] Автор для переписки (факс: (7-095) 939-31-81; e-mail: Rudenskaya@biorg.chem.msu.su).

фии на аминоксилохроме способствовало отделению пигментов и щелочных белков от протеиназ с изоэлектрическими точками < 6 (табл. 1). Последующая хроматография на другом анионообменном сорбенте – DEAE-сефадексе (рис. 1) позволила отделить карбоксипептидазу РС, а затем с помощью аффинной хроматографии на аргинин-агарозе удалось окончательно очистить трипсин от сопутствующих ферментов (рис. 2). В результате с выходом 38% был получен трипсин РС, об индивидуальности которого свидетельствовали данные электрофореза (рис. 3) и установление единственной N-концевой последовательности (рис. 4). Выход фермента несколько занижен, так как сериновая протеиназа РС, присутствующая в исходном препарате в значительных количествах и обладающая смешанным типом специфичности, также гидролизует Vz-Arg-pNA, хотя и медленнее, чем трипсин.

В табл. 2 представлены сравнительные характеристики полученного трипсина РС камчатского краба и трипсинов некоторых других членистоногих. Молекулярная масса трипсина РС составляет 29 кДа, что несколько выше, чем у трипсинов других видов крабов, но ниже молекулярной массы трипсиноподобной протеиназы А камчатского краба, определенной в работе [6]. Оптимальные для активности значения pH, а также диапазоны pH, в которых сохраняется стабильность, близки у сравниваемых ферментов. Величины температурного оптимума активности и K_m , наоборот, значительно различаются.

Стабильность трипсина РС была изучена нами более подробно. Оказалось, что протеиназа теряет до 30% активности при замораживании и оттаивании и в отличие от трипсина млекопитающих полностью инактивируется при pH < 5. Добавление в буферные растворы 1 мМ ацетата кальция заметно стабилизирует фермент. В присутствии ионов кальция трипсин РС в интервале pH 5.8–9.0 полностью сохраняет активность при 20°C в течение 8 сут. При pH 4.5 за это же время сохраняется до 60% активности.

Субстратную специфичность трипсина РС исследовали с помощью хромогенных пептидных субстратов разной длины и состава (табл. 3). Трипсин РС, как и другие трипсины, гидролизует связи, образованные карбоксильными группами лизина и аргинина, причем эффективность гидролиза возрастает с удлинением пептидной цепи субстрата. В отношении субстратов эластазы, химотрипсина, сериновой протеиназы РС, содержащих аланин и фенилаланин в положении P₁, обнаруживалась лишь следовая активность, детектируемая лишь при инкубации в течение 1 сут. Таким образом, трипсин РС не отличается по специфичности от других трипсинов и не похож на сериновую протеиназу РС, обладающую смешан-

Таблица 1. Выделение трипсина РС камчатского краба

| Стадия очистки | Белок, ОЕ ₂₈₀ | Актив-ность* | | Выход, % | Степень очистки |
|-------------------|--------------------------|-----------------|--------------------------------------|----------|-----------------|
| | | общая, ед. акт. | удельная, ед. акт./ОЕ ₂₈₀ | | |
| Раствор морикразы | 2700 | 297 | 0.11 | 100 | 1 |
| Аминоксилохром | 438 | 184 | 0.42 | 62 | 3.8 |
| DEAE-сефадекс | 175 | 140 | 0.80 | 47 | 7.2 |
| Аргинин-агароза | 48.7 | 112 | 2.3 | 37.7 | 21 |

* Определена по гидролизу Vz-Arg-pNA.

ной субстратной специфичностью, т.е. способную гидролизовать пептидные связи, образованные карбоксильными группами остатков аргинина и лизина, а также гидрофобных аминокислот.

Трипсин РС активно расщепляет белковые субстраты – азоказеин (2.5 ед. акт./мг), бычий

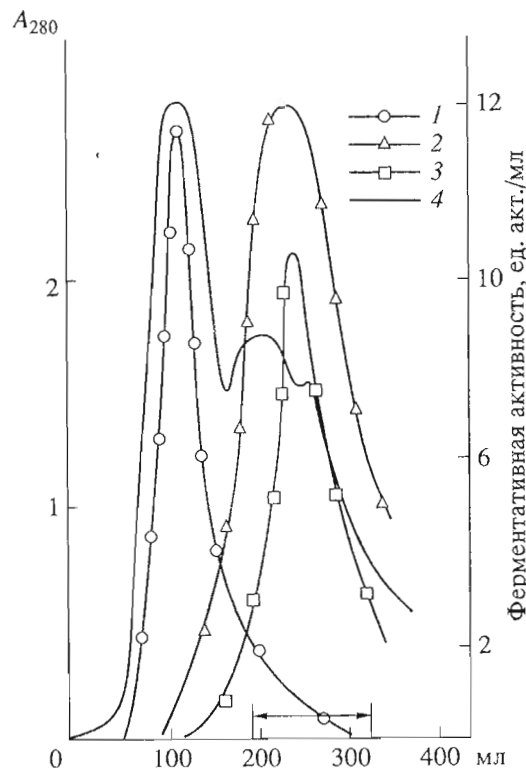


Рис. 1. Разделение протеолитических ферментов гепатопанкреаса камчатского краба на DEAE-сефадексе. Условия см. в "Экспер. части"; во фракциях определяли активность карбоксипептидазы РС (1), коллагенолитической сериновой протеиназы РС (2), трипсина РС (3), A₂₈₀ (4). Показаны границы выделяемой фракции

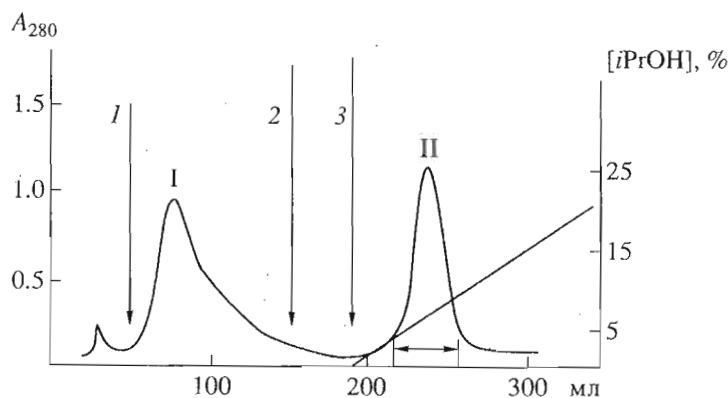


Рис. 2. Хроматография трипсина на аргинин-агарозе. Условия см. в "Экспер. части". Стрелками указаны: 1 - промывка 0.05 М трис-НСl (рН 8.0), 2 - элюция буфером В, 3 - буфером В с градиентом концентрации (0-25%) изопропанола

сывороточный альбумин [9]. Фермент обладает фибринолитическим действием и способностью активировать плазминоген, что хорошо согласуется с результатами, полученными в работе [12].

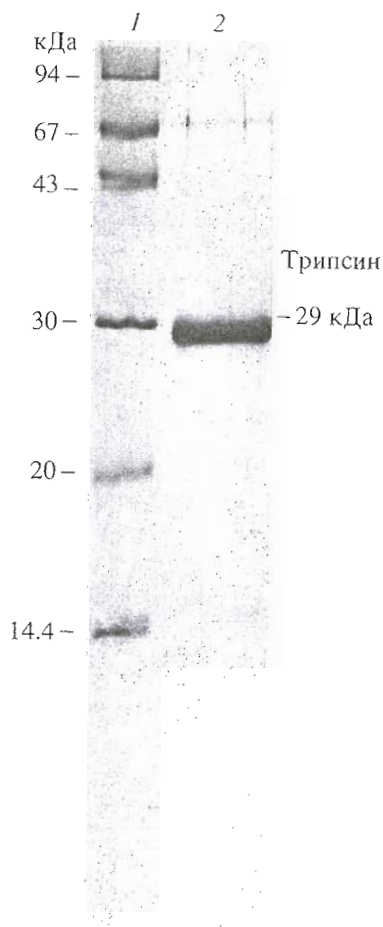


Рис. 3. Электрофорез в ПААГ с SDS трипсина РС (2). 1 - белки-маркеры (Serva), сверху вниз: фосфорилаза b, БСА, овальбумин, карбонатдегидрогеназа, соевый ингибитор трипсина, лактальбумин

Трипсин РС в одинаковых условиях дает зону лизиса диаметром 900 мм на непрогретой фибриновой пластинке и всего лишь 500 мм на прогретой. Это связано с активацией плазмينا, содержащегося в непрогретом фибриногене. В пересчете на единицу белка удельная "активаторная" активность в 5 раз ниже, чем у сериновой протеиназы РС [11].

Так же как трипсин млекопитающих, трипсин РС не гидролизует нативный коллаген (рис. 5, 6). Необходимо отметить, что при температуре выше 20°C коллаген теряет нативную конформацию, превращаясь в желатин, который быстро разрушается трипсином РС. Поэтому для получения достоверных результатов перед проведением электрофореза следует останавливать реакцию ферментативного гидролиза коллагена подкислением или ингибированием и только после этого нагревать образцы до 100°C. Возможно, коллагенолитическая активность трипсиноподобной протеиназы А, определенная в работе [12], при инкубации коллагена с ферментом при 37°C в течение 1 ч на самом деле является желатиназной. Значительная коллагенолитическая активность суммарного препарата протеиназ гепатопанкреаса морикразы (рис. 6, 2) может быть обусловлена кооперативным действием коллагенолитической сериновой протеиназы РС [11], разрушающей коллаген до α -цепей, трипсина РС и металлопротеиназы РС, гидролизующих α -цепи до пептидов, которые затем с помощью карбоксипептидазы РС [10] расщепляются до отдельных аминокислот. По интенсивности гидролиза нативного коллагена препарат морикразы сравним с действием наиболее активного коллагенолитического препарата коллагеназы *Clostridium histolyticum*.

Ингибиторный анализ показал (табл. 4), что трипсин РС полностью инактивируется специфическими ингибиторами сериновых протеиназ DFP и PMSF. Ингибитор трипсина TLCK полностью

| | |
|--|----------------|
| Трипсин РС | I VGGTEVTPG - |
| Протеиназа камчатского краба 36 кДа А [4] | I VGGTEVTPG - |
| Трипсиноподобные ферменты из гепатопанкреаса <i>Chionoectes opilio</i> [5] | I VGGTEVTPG - |
| <i>Astacus fluviatilis</i> [3] | I VGGTDAVLG - |
| <i>Penaeus monodon</i> [7] | I VGGTDA TLG - |
| <i>A. leptodactylus</i> [9] | I VGGTDA TLG - |
| <i>Thenus orientalis</i> [8] | I VGGSEVI PG - |
| <i>Uca pugilator</i> [1] | I VGGVEAVPG - |
| Трипсин быка [13] | I VGGYT CGAN - |

Рис. 4. N-Концевые последовательности трипсина РС, трипсиноподобных протеиназ членистоногих и трипсина быка. Подчеркнуты несовпадающие аминокислоты.

инактивирует фермент. Из белковых ингибиторов наиболее эффективны ингибиторы трипсина из сои – Кунитца [14] и Баумана-Бирк [15], а также ингибитор из картофеля [16]. Таким образом, по функциональным характеристикам трипсин РС камчатского краба можно отнести к типичным трипсинам.

По аминокислотному составу исследуемая протеиназа (табл. 5) близка к трипсинам других видов ракообразных, но заметно отличается от трипсина быка большим количеством дикарбоновых аминокислот и их амидов и меньшим содержанием лизина, что характеризует трипсины крабов как кислые белки. Это подтверждается низкими значениями изоэлектрических точек этих ферментов (табл. 2), лежащих в отличие от *pI* трипсина быка в кислой области pH.

N-Концевая последовательность трипсина РС характерна для типичных трипсинов животных. Как следует из рис. 4, десять N-концевых аминокислот трипсина РС идентичны определенным для протеиназы “А” (36 кДа) камчатского краба [4] и для трипсина краба *Ch. opilio* [5].

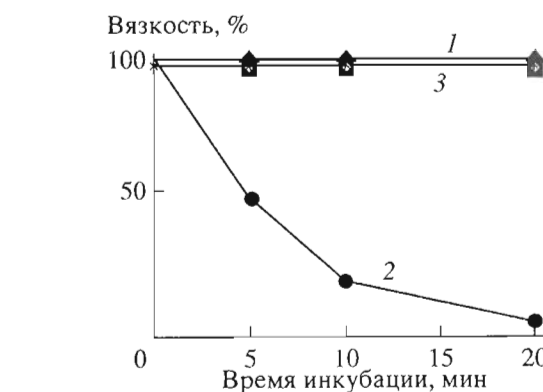


Рис. 5. Кривые изменения во времени вязкости раствора коллагена I типа в 0.05 М трис-НСI-буфере (pH 7.5) при 20°C (1, контроль) и в присутствии 100 мкг морикразы (2) или 500 мкг трипсина РС (3). Условия см. в “Экспер. части”.

кислот трипсина РС идентичны определенным для протеиназы “А” (36 кДа) камчатского краба [4] и для трипсина краба *Ch. opilio* [5]. Наибольшие различия наблюдаются с трипсином быка [13]. Полная идентичность первых четырех аминокислотных остатков указывает на то, что трипсин РС, как и трипсины млекопитающих, образуется в результате активации трипсиногена.

Таким образом, выделенный нами трипсин РС камчатского краба по ряду энзиматических характеристик близок к протеиназе А, полученной из того же источника [6]. Однако неспособность фермента гидролизовать нативный коллаген, различие в величине молекулярной массы, отсутствие полного аминокислотного анализа и данных по N-концевой последовательности в публикациях [6, 12] не позволяют утверждать, что эти ферменты идентичны.

Таблица 2. Свойства трипсина РС камчатского краба, известных трипсинов ракообразных и трипсина быка

| Свойства | Источник трипсина | | | | |
|----------------------------|-------------------------|-----|-------------------------------|---|----------|
| | Камчатский краб | | Краб <i>Uca pugilator</i> [1] | Антарктический криль <i>Euphausia superba</i> [2] | Бык [13] |
| | данные настоящей работы | [6] | | | |
| <i>M</i> , кДа | 29 | 30 | 24 | 31 | 23 |
| <i>pI</i> | <2.5 | 2.5 | <3 | 3.5 | 7.0 |
| <i>K_m</i> , mM* | 50 | 20 | 6.9 | 40 | 1.2 |
| pH-Оптимум | 7.5–8.0 | 8.0 | 8.0 | 8.2 | 8.2 |
| pH-Стабильность | 5.8–9.0** | 7–9 | 6–9 | 7–9 | 3–9.5 |
| Температурный оптимум, °C | 55 | 45 | – | 54 | 45 |

* Для реакции гидролиза Vz-Arg-pNa.

** В присутствии Ca²⁺.

Таблица 3. Субстратная специфичность трипсина РС

| Субстрат | Активность фермента, ед. акт./мг |
|-----------------------|----------------------------------|
| Bz-Arg-pNA | 2.3 |
| H-D-Val-Leu-Lys-pNA | 40.6 |
| Z-D-Ala-Leu-Arg-pNA | 51.1 |
| Z-Ala-Ala-Phe-Arg-pNA | 94.0 |
| Woc-Ala-Ala-Ala-pNA | 0.03 |
| Z-Gly-Gly-Leu-pNA | 0.07 |
| Z-Ala-Glu-Ala-pNA | 0.08 |
| Glp-Phe-Ala-pNA | 0.18 |
| Glp-Ala-Ala-Leu-pNA | 0.12 |

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве исходного препарата использовали протеолитический комплекс "морикраза А", полученный из гепатопанкреаса камчатского краба фирмой "Тринита" (Россия) [18]. Аминосилохром синтезировали по методу [19], аргинин-агарозу – присоединением аргинина к АН-агарозе ("Кемотех", Эстония) с помощью *n*-бензохинона [20]. DEAE-сефадекс – препарат производства Pharmacia (Швеция). Использованы буферные растворы: 0.1 М ацетат аммония (рН 6.4), 1 мМ Са(СН₃СОО)₂ (А); раствор А, содержащий 1 М NaCl и 25% изопропиловый спирт (Б); 0.05 М трис-НСl (рН 8.0) с 1 М NaCl (В).



Рис. 6. Электрофорез продуктов гидролиза коллагена (1) морикразой (2) и трипсином РС (3). Образцы перед электрофорезом инактивировали кислотой, а затем денатурировали нагреванием.

Выделение трипсина РС. На колонку (1.5 × 13 см) с аминосилохромом, уравновешенным буфером А, наносили 60 мл раствора морикразы А, после промывки тем же буфером элюировали буфером Б. Фракцию, содержащую трипсин, диализовали против воды и лиофилизировали. Полученный препарат растворяли в 6 мл буфера А и наносили на колонку (4 × 9 см) с DEAE-сефадексом, уравновешенным тем же буфером. После промывки проводили градиентную элюцию, постепенно повышая концентрацию NaCl и рН: 0–0.5 М NaCl в буфере А (по 50 мл), затем 0.5 М NaCl в буфере А и буфер В (по 200 мл). Фракцию, обогащенную трипсином (рис. 1), обессоливали диализом против дистиллированной воды с 1 мМ Са²⁺ (рН 7.7) и наносили на колонку (1.5 × 12.5 см) с аргинин-агарозой, уравновешенной 0.05 М трис-НСl-буфером (рН 8.0), промывали тем же буфером и проводили элюцию сначала буфером В (50 мл), а затем градиентную элюцию изопропанолом (0–25%) в буфере В (по 100 мл). Фракцию (II), содержащую трипсин (рис. 2), обессоливали на колонке с сефадексом G-25 и лиофильно высушивали.

Активность трипсина РС определяли по скорости гидролиза Bz-Arg-pNA (Reanal, Венгрия) в стандартных для определения активности трипсина условиях, как описано в [1]. За 1 ед. акт. принимали активность фермента, гидролизующего 1 мкмоль субстрата за 1 мин.

Субстратную специфичность трипсина (0.1 мг/мл) изучали по скорости гидролиза хромогенных пептидных субстратов, любезно предоставленных Т.Л. Воюшиной (ВНИИ "Генетика"). Активность по расщеплению азоказеина определяли по модифицированному методу [21].

Фибринолитическую активность* измеряли по методу [22]. За 1 ед. акт. принимали количество фермента, способное образовать 10-мм зону лизиса фибрина после 5 ч инкубации.

Коллагенолитическую активность определяли, используя кислоторастворимый коллаген I типа из кожи крыс [23]. Вязкость раствора коллагена измеряли по методике [24] на вискозиметре Оствальда. Протеиназы инкубировали с 0.02% раствором коллагена в 2 мл 0.05 М трис-НСl-буфера (рН 7.8), содержащего 10 мМ СаCl₂, при 20°C. Реакцию гидролиза останавливали добавлением HCl до рН 1. Электрофорез продуктов гидролиза коллагена проводили в 7.5% ПААГ в присутствии SDS с предварительным прогреванием образцов в течение 5 мин при 100°C.

Определение молекулярной массы трипсина. а – электрофоретически в 15% ПААГ с SDS. Образцы готовили осаждением фермента трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация

* Авторы благодарят Л.В. Лютову (МГУ, биологический факультет) за определение фибринолитической активности трипсина РС.

Таблица 4. Ингибирование трипсина РС

| Ингибитор | ЕД, | [I], мМ | Остаточная активность, % |
|----------------------------|-----------|---------|--------------------------|
| | моль/моль | | |
| DFP | 1 : 100 | 0.5 | 0 |
| PMSF | 1 : 100 | 0.5 | 2 |
| TLCK | 1 : 50 | 0.37 | 0 |
| Бензамидин | 1 : 50 | 0.4 | 55 |
| Белковые ингибиторы (БИ) | | | |
| SIT [14] | 1 : 10 | 0.2 | 0 |
| BBI [15] | 1 : 20 | 0.4 | 0 |
| БИ из картофеля [16] | 1 : 50 | 0.8 | 0 |
| Овомукоид | 1 : 10 | 0.2 | 44 |
| БИ из морской анемоны [17] | 1 : 20 | 0.2 | 64 |

Таблица 5. Аминокислотный состав трипсинов ракообразных и быка

| Аминокислота | Камчатский краб | | <i>A. fluvialis</i> [3] | <i>U. pugilator</i> [1] | <i>E. sin-perba</i> [2] | <i>P. monodon</i> [7] | Бык [13] |
|--------------|-----------------|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|----------|
| | данная работа | [6] | | | | | |
| Asx | 31 | 26 | 30 | 29 | 36 | 28 | 22 |
| Thr | 19 | 15 | 16 | 24 | 30 | 8 | 10 |
| Ser | 24 | 28 | 19 | 17 | 29 | 33 | 33 |
| Glx | 27 | 24 | 20 | 13 | 27 | 28 | 14 |
| Pro | 11 | 13 | 10 | 12 | 16 | 9 | 9 |
| Gly | 28 | 35 | 30 | 28 | 39 | 43 | 25 |
| Ala | 26 | 27 | 18 | 21 | 23 | 17 | 14 |
| Cys | 12 | 2 | 6 | 8 | 1 | 4 | 12 |
| Val | 22 | 12 | 19 | 20 | 20 | 13 | 17 |
| Met | 3 | — | 2 | 3 | 5 | 2 | 2 |
| Ile | 18 | 8 | 14 | 17 | 17 | 12 | 15 |
| Leu | 14 | 18 | 17 | 13 | 15 | 12 | 14 |
| Tyr | 9 | 9 | 12 | 8 | 7 | 8 | 10 |
| Phe | 8 | 9 | 9 | 8 | 11 | 8 | 3 |
| Lys | 6 | 7 | 5 | 2 | 5 | 11 | 14 |
| His | 4 | 5 | 5 | 5 | 7 | 5 | 3 |
| Arg | 5 | 6 | 2 | 5 | 6 | 5 | 2 |
| Trp | 3 | — | 3 | 2 | — | — | 4 |
| Всего | 260 | 256 | 237 | 235 | 294 | 250 | 223 |

10%) при 5°C с последующим центрифугированием и промыванием холодным ацетоном. б – гель-фильтрацией на колонке (1 × 40 см) с сефадексом G-75 (Pharmacia, Швеция) с использованием в ка-

честве стандартов БСА (67 кДа), пепсиногена быка (40 кДа), α-химотрипсина (25 кДа), рибонуклеазы (15 кДа).

Изоэлектрическую точку определяли методом хроматофокусирования по методике, описанной в руководстве Pharmacia (Швеция). На колонку (0.8 × 10 см) с РВЕ-96 наносили 3 мг белка; градиент рН (6.15–2.0) был получен из 25 мМ гистидина, рН 6.5 (стартовый буфер), и градиентного полибуфера 74, доведенного до рН 2.

Зависимость активности трипсина от рН определяли в интервале рН 4.5–10.0, используя трис-Н₃РO₄-буфер (рН 4.5–8.7) и 0.1 М боратный буфер (рН 8.2–10.0).

Зависимость стабильности трипсина от рН. К 0.9 мл 0.1 М трис-Н₃РO₄ с 1 мМ Са(СН₃СОО)₂ с рН 4.5–9.0 добавляли 0.1 мл раствора фермента (10 мг/мл) в 0.01 М ацетате аммония (рН 7.0), содержащем 1 мМ Са(СН₃СОО)₂, и измеряли активность сразу же после добавления фермента, а затем через 16 ч, 2, 4, 8 сут инкубации при 37°C.

Зависимость активности трипсина от температуры. Реакционную смесь, содержащую субстрат, выдерживали 2 мин при 20, 37, 42, 45, 50, 55°C, добавляли аликвоту раствора фермента и определяли скорость гидролиза.

Ингибирование фермента (табл. 4) проводили в 0.05 М трис-НСl-буфере (рН 8.0) при 20°C в течение 2 ч, используя раствор фермента с концентрацией 1 мг/мл.

Для определения аминокислотного состава фермент гидролизовали 5.7 н. НСl при 105°C в вакуумированных ампулах в течение 48 ч и анализировали на аминокислотном анализаторе Hitachi-835. Метионинсульфовую и цистеиновую кислоты определяли после окисления надмуравьиной кислотой, а триптофан – после гидролиза 4 М метансульфовоной кислотой в присутствии 0.2% триптамина.

При определении N-концевой последовательности препарат трипсина после электрофореза переносили на Immobilon Р методом полусухого блоттинга в течение 1 ч при напряжении 0.8 мА на 1 см геля и секвенировали на секвенаторе model 120 A РТН Apply Biosystem (США).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 96-04-49904 и 97-04-48773).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Grant G.A., Sacchetti J.C., Welgus H.G. // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 354–358.
- Osnes K.K., Mohr V. // Comp. Biochem. Physiol. 1985. V. B82. P. 607–619.

3. *Titani K., Sagasawa T., Woodbury R.G., Ericsson L.N., Dorsam H., Kraemer M., Neurath H., Zwilling R.* // *Biochemistry*. 1983. V. 22. P. 1459–1465.
4. *Klimova O.A., Borukhov S.I., Solovyeva N.I., Balaevskaia T.O., Strongin A. Ya.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. V. 166. P. 1411–1420.
5. *Климова О.А., Ведищева Ю.В., Стронгин А.Я.* // Докл. АН СССР. 1991. Т. 317. С. 482–484.
6. *Sakharov I.Yu., Litvin F.E.* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1990. V. B97. P. 407–410.
7. *Pei-Yung Lu, Hsien-Ching Liu, Inn-Ho Tsai* // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 1990. V. 371. P. 851–859.
8. *Johnston D., Hermans J.M., Yellowless D.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. V. 324. P. 34–40.
9. *Zwilling R., Neurath H., Ericsson L.H., Enfield D.L.* // *FEBS Lett.* 1975. V. 60. P. 247–249.
10. *Руденская Г.Н., Купенко О.Г., Исаев В.А., Степанов В.М., Дунаевский Я.Е.* // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21. С. 249–255.
11. *Руденская Г.Н., Исаев В.А., Степанов В.М., Дунаевский Я.Е., Баратова Л.А., Калебина Т.С., Нурминская М.В.* // *Биохимия*. 1996. Т. 61. С. 1119–1132.
12. *Сахаров И.Ю., Литвин Ф.Е., Митькевич О.З.* // *Биоорганическая химия*. 1994. Т. 20. С. 190–195.
13. *Titani K., Sasagawa T., Woodbury R.G., Ericsson L.H., Dorsman H., Kraemer M., Neurath H., Zwilling R.* // *Biochemistry*. 1983. V. 22. P. 1459–1465.
14. *Kunitz M.* // *J. Gen. Physiol.* 1946. V. 29. P. 149–154.
15. *Birk Y., Gertler A., Khalef S.* // *Biochem. J.* 1963. V. 87. P. 281–284.
16. *Мосолов В.В., Малова Е.Л., Валуева Т.А., Шульмина А.И.* // *Биоорганическая химия*. 1975. Т. 1. С. 1449–1457.
17. *Дельфин Х., Диас Х., Чавес М., Ларионова Н.И., Казанская Н.Ф., Руденская Г.Н., Филиппова И.Ю.* // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. Т. 31. С. 300–305.
18. *Исаев В.А., Руденская Г.Н., Купченко О.Г., Степанов В.М., Попова И.М., Диденко Ю.Г.* Способ получения препарата коллагеназы: Пат. № 2008353 от 5 авг. 1991 г. // *Б. И.* 1994. № 4. С. 18.
19. *Эльтеков Ю.А., Киселев А.В., Хохлова Т.Д., Никитин Ю.С.* // *Хроматография*. 1973. Т. 6. С. 187–192.
20. *Stepanov V.M., Rudenskaya G.N., Gayda A.V., Osterman A.L.* // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 1981. V. 5. P. 177–186.
21. *Шагинян К.А., Изотова Л.С., Иомантас Ю.И., Стронгин А.Я., Степанов В.М.* // *Биохимия*. 1980. Т. 45. С. 2083–2095.
22. *Astrup T., Mullerz S.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1952. V. 40. P. 345–351.
23. *Neuman R.E., Zogan M.A.* // *J. Biol. Chem.* 1950. V. 184. P. 299–306.
24. *Causton T.E., Murphy G.* // *Meth. Enzymol.* 1981. V. 80. P. 711–722.

Isolation and Properties of Trypsin PC from the King Crab *Paralithodes camtschatica*

G. N. Rudenskaya*, V. A. Isaev*, T. S. Kalebina*, V. M. Stepanov*, K. V. Mal'tsev,
S. V. Shvets**, N. A. Luk'yanova**, Yu. A. Kisilitsin**, and A. I. Miroshnikov****

*Department of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, GSP-3 Moscow, 119899 Russia

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

Trypsin PC from the hepatopancreas of the king crab *Paralithodes camtschatica* was isolated and purified to apparent homogeneity by ion-exchange chromatography on Aminosilochrom and DEAE-Sephadex and affinity chromatography on arginine-agarose. The yield of the enzyme was 37.7%, and the purification degree was 21. Trypsin PC has a molecular mass of 29 kDa and $pI < 2.5$. It hydrolyses *N*-benzoyl-*L*-arginine *p*-nitroanilide at the optimum pH of 7.5–8.0 and at the temperature optimum of 55°C ($K_m = 0.05$ mM). Trypsin PC retained its activity within the pH-range of 5.8–9.0 in the presence of Ca^{2+} . The enzyme was inhibited by the specific inhibitors of serine proteases diisopropyl fluorophosphate and phenylmethylsulfonyl fluoride, by the trypsin inhibitor *N*-tosyl-*L*-lysylchloromethylketone, and by the trypsin inhibitors from soybean and potato. Trypsin PC was found to hydrolyze amide bonds formed by carboxylic groups of lysine and arginine in peptide substrates. The *N*-terminal sequence of this enzyme is IVGGTEVTPG.

Key words: trypsin, king crab, isolation, substrate specificity, inhibitors, molecular properties