



УДК 152.342*4'1

ВЫДЕЛЕНИЕ И ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ТРИПСИНА КАМЧАТСКОГО КРАБА *Paralithodes camtschaticus*

© 2003 г. Ю. А. Кислицын*, Д. В. Ребриков**, Я. Е. Дунаевский*, Г. Н. Руденская*[#]*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 25.06.2002 г. Принята к печати 16.09.2002 г.

Трипсин из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* получен в индивидуальном состоянии с помощью последовательных хроматографических процедур: ионообменной (DEAE-сефадекс), аффинной (колонка с агарозой, содержащей в качестве лиганда пептиды трипсинового гидролизата белка сальмина) и ионообменной (колонка Моно Q); общий выход белка составил 64%. Определена его N-концевая аминокислотная последовательность -IVGGTEVTRG-. Получен образец амплифицированной суммарной кДНК гепатопанкреаса камчатского краба. На основании известной N-концевой аминокислотной последовательности зрелой формы трипсина изолирован фрагмент кДНК, содержащий полную кодирующую часть гена. Полипептидная цепь профермента состоит из 266 а.о. Зрелый трипсин включает в себя 237 а.о., что соответствует молекулярной массе 24.8 кДа. Сравнение аминокислотных последовательностей трипсина камчатского краба и трипсинов из других видов ракообразных показывает высокую степень их структурной идентичности. Наиболее близким по первичной структуре оказался трипсин из креветки *Penaeus vannamei* (70% идентичности).

Ключевые слова: трипсин, камчатский краб, выделение, кДНК, первичная структура.

ВВЕДЕНИЕ

Трипсины (КФ 3.4.21.4), выделенные из панкреатической ткани животных различных таксономических групп, существенно различаются по своим свойствам. Основные различия обнаружены между протеиназами беспозвоночных, низших позвоночных и млекопитающих. В то же время это важнейшее подсемейство эндопептидаз характеризуется многими общими свойствами, главным из которых является механизм катализа, включающий так называемую каталитическую триаду (специфические остатки серина, гистидина и аспарагиновой кислоты).

С 1931 г., когда Дж. Нортропом и М. Кунитцем [1] были получены кристаллы трипсина, этот фермент служит моделью для изучения структуры и функций сериновых протеиназ семейства химотрипсина. С тех пор детально изучен механизм катализа, первичные структуры и физиологическая роль некоторых трипсинов млекопитающих и птиц, однако не совсем ясна эволюция этого класса ферментов. Для решения этого вопроса требуется подробное сравнение трипсинов низших позвоночных, насекомых и ракообразных.

К настоящему времени описаны ферментативные и физико-химические свойства трипсинов,

выделенных из рыб [2–7], насекомых [8–15], ракообразных [16–21]. Эти работы весьма интересны, но лишь небольшая часть их содержит сведения о первичной структуре исследуемых белков. Так, например, для ракообразных полная аминокислотная последовательность известна только для трипсина рака *Astacus fluviatilis* [16] и креветки *Penaeus vannamei* [21]. Кроме того, приведены последовательности N-концевых фрагментов трипсинов креветки *P. monodon* [18], омара *Theraps orientalis* [20] и некоторых других ракообразных [22, 23].

В настоящей работе мы представляем новую схему очистки трипсина из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* (далее трипсин РС), выделенного нами ранее [24], и его полную первичную структуру. Проведено сравнение аминокислотных последовательностей трипсинов из организмов, принадлежащих к различным таксономическим группам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения гомогенного препарата была модифицирована схема очистки трипсина РС, предложенная нами ранее [24]. Выделение трипсина РС из суммарного препарата Морикразы [25, 26] осложнялось тем, что многие белки гепатопанкреаса имеют близкие молекулярные массы и об-

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 939-55-41; эл. почта: gnruden@genebee.msu.ru).

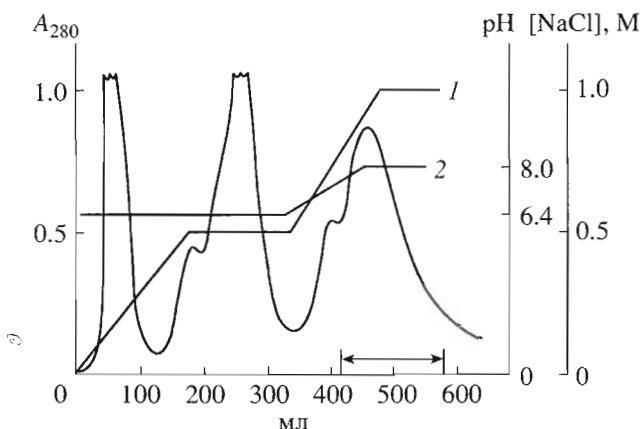


Рис. 1. Очистка трипсина PC ионообменной хроматографией на колонке с DEAE-сефадексом. 1 – градиент концентрации NaCl, 2 – градиент pH. Условия см. в “Эксперимент. части”. Горизонтальной стрелкой показаны фракции, обладающие трипсиновой активностью.

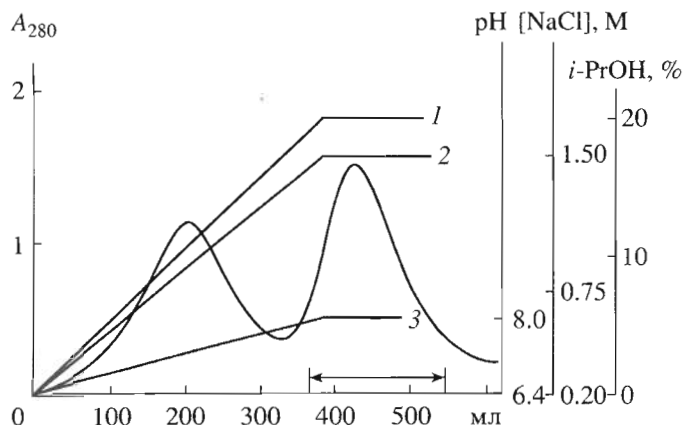


Рис. 2. Очистка трипсина PC аффинной хроматографией на колонке с ПТГ-агарозой. 1 – градиент концентрации изопропанола, 2 – градиент концентрации NaCl, 3 – градиент pH. Условия см. в “Эксперимент. части”. Горизонтальной стрелкой показаны фракции, обладающие трипсиновой активностью.

ладают смешанной субстратной специфичностью. Отличительная особенность этих примесей – изоэлектрические точки, значения которых лежат в кислой области pH, поэтому оправдано использование на первой стадии очистки анионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе (рис. 1). Применение этого сорбента вместо использованного ранее аминсилохрома позволило увеличить выход трипсина на первой стадии до 84% (табл. 1). На стадии аффинной хроматографии аргинин-агарозу заменили на более избирательный сорбент ПТГ-агарозу (рис. 2), синтезированный нами ранее [27] и содержащий в качестве лигандов пептиды триптического гидролизата сальмина – протамина осетровых рыб, богатого аргинином и лизином. Как показали предшествующие эксперименты, присутствующие в разделяемой смеси аминопептидаза PC [28], карбокси-пептидаза PC [29] и коллагенолитическая сериновая протеиназа PC [27], имеющие сродство к остаткам основных аминокислот, взаимодействуют с ПТГ-агарозой значительно слабее, чем

трипсин PC. Заключительный этап очистки трипсина PC включал ионообменную хроматографию на колонке Mono Q (рис. 3). Применение этой процедуры позволило нам избавиться от следовых примесей сопутствующих ферментов. Таким образом, с выходом 64%, вместо 37.7% по старой схеме очистки [24], нами был получен гомогенный препарат трипсина камчатского краба.

Чистота полученного белка была подтверждена электрофорезом в 15% ПААГ в присутствии SDS [30] (рис. 4) методом MALDI-масс-спектрометрии и определением N-концевой аминокислотной последовательности (табл. 2). Молекулярная масса трипсина PC, по данным электрофореза, составляет около 23 кДа, что несколько отличается от полученной нами ранее (M 29 кДа [24]), а также от приведенной для трипсина камчатского краба в работе И.Ю. Сахарова (30 кДа [31]). По данным масс-спектрометрии, молекулярная масса белка составила 24.8 кДа. Таким образом, по значению молекулярной массы трип-

Таблица 1. Выделение трипсина камчатского краба

Стадия очистки	Белок, OE ₂₈₀	Активность*		Выход, %	Степень очистки
		общая, ед. акт.	удельная ед. акт./OE ₂₈₀		
Раствор “Морикразы” [25, 26]	341.0	40.1	0.12	100	1
DEAE-сефадекс	163.8	34.4	0.21	84	1.8
ПТГ-агароза**	46.0	27.6	0.60	69	5
Mono Q	14.2	25.5	1.80	64	15

* Определена по гидролизу Bz-Arg-pNA.

** Агароза, содержащая в качестве лиганда пептиды трипсинового гидролизата белка сальмина [27].

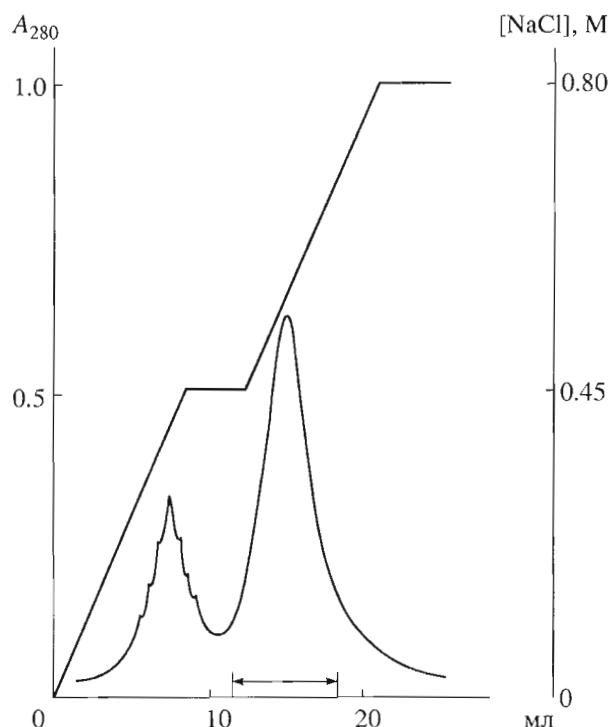


Рис. 3. Очистка трипсина ионообменной хроматографией на колонке Моно Q. Указан градиент концентрации NaCl. Условия см. в “Эксперимент. части”. Горизонтальной стрелкой показаны фракции, обладающие трипсиновой активностью.

син PC близок к трипсинам трески *Gadus ogac* (M 23.5 кДа [5]), лосося *Salmo salar* (M 23.7 кДа [6]), рака *A. fluviatilis* (M 25 кДа [16]), но отличается от трипсина краба *Callinectes sapidus* (M 33.5 кДа [17]).

N-Концевая аминокислотная последовательность трипсина камчатского краба совпадает с таковыми последовательностями трипсинов других животных. Полная идентичность первых четырех аминокислотных остатков указывает на то, что трипсин PC, как и трипсины млекопитающих, образуется в результате активации трипсиногена. Наибольшие различия наблюдаются с трипсином быка (табл. 2).

На основе выделенной нами суммарной РНК гепатопанкреаса камчатского краба нами была создана библиотека кДНК и проведено клонирование полноразмерной кДНК трипсина. В результате была получена нуклеотидная последовательность препрофермента и на основании генетического кода была выведена его соответствующая аминокислотная последовательность:

MKYLVFCLLLGAAFAAPSRKPTFRRLNKKIVGGTEVTPGEIPYQLSFQDTSFGGGEFHFCGASIYKDTWAICAGHCVQGEDFDSPASLQIVAGDHTLYSAEGNEQKIAVSKIIQHEDYNGFISISNDISLLQFASPLTFNSFVGPIALPAQGQVASGDCTCTGWGTTTEGGYSSDALLKVTMPIVSDADCRASYGESDIDDSMIC-

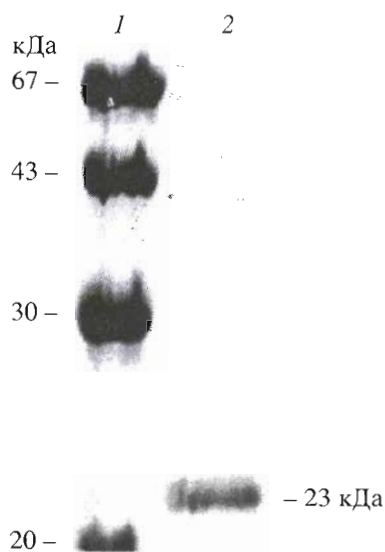


Рис. 4. Электрофорез в ПААГ с SDS трипсина PC (2); (1) – белки-маркеры (Serva).

AGVPQGGKDACQGGGPLACSDTGSPYLAGIVS-
WGYGCARPNYPGVYCEVAYYVDWVLANS.

Препрофермент камчатского краба, как и другие трипсины эукариот, имеет сайт AFA-AP (выделен), по которому проходит отщепление сигнального 15-членного пептида.

Активация зимогена у ракообразных, по-видимому, происходит иным способом, чем у млекопитающих. Как известно, трипсин позвоночных превращается в зрелый белок под действием специфичной энтеропептидазы, имеющей сродство к Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-последовательности активируемого белка [32], а трипсин PC, так же как и трипсин креветки [21], имеет иной пропептид Arg-Gly-Leu-Asn-Lys (выделен), не содержащий сайт расщепления энтеропептидазой. Поэтому активация профермента у ракообразных, вероят-

Таблица 2. *N*-Концевые последовательности трипсина PC, трипсиноподобных протеиназ членистоногих и трипсина быка. Подчеркнуты несовпадающие аминокислотные остатки

Источник фермента	<i>N</i> -Концевые аминокислотные последовательности
<i>Paralithodes camtschaticus</i> [25]	IVGGTEVTPG-
<i>Penaeus monodon</i> [18]	IVGGTA <u>V</u> TPG-
<i>Astacus fluviatilis</i> [16]	IVGGT <u>D</u> AVL <u>G</u> -
<i>Thenus orientalis</i> [20]	IVGGSEV <u>I</u> PG-
<i>Uca pugilator</i> [22]	IVGGV <u>E</u> AVPG-
<i>Penaeus vannamei</i> [21]	IVGGT <u>D</u> ATPG-
<i>Bos taurus</i> [34]	IVGGYTCGAN-

но, происходит при участии других трипсиноподобных протеиназ, присутствующих в гепатопанкреасе, или путем самоактивации.

Зрелый трипсин камчатского краба содержит 237 а.о. (рис. 5). По своему размеру фермент камчатского краба чуть больше, чем трипсины быка [33, 34] и микробный трипсин *Streptomyces griseus* [35], содержащие по 224 и 223 а.о. соответственно. Таким образом, по длине полипептидной цепи зрелый трипсин краба не отличается от трипсина речного рака *A. fluviatilis* и трипсина креветки *P. vannamei* (рис. 5) и чуть больше катионного и анионного трипсинов быка, микробного трипсина, а также трипсинов насекомых [36, 37]. На том же рисунке представлены степени идентичности первичных последовательностей (выраженные в процентах) различных ферментов по отношению к трипсину РС. Самая большая степень гомологии – 70% – наблюдается между первичными структурами трипсинов камчатского краба и креветки *P. vannamei*. Таким образом, последовательность аминокислот трипсина краба имеет высокую степень идентичности с другими известными трипсинами беспозвоночных и позвоночных животных.

Интересно отметить тот факт, что зрелый трипсин РС имеет в своем составе 18 остатков Asp, 10 остатков Glu, в то время как зрелый бычий катионный трипсин имеет 6 и 4 остатка соответственно. Трипсин РС содержит 6 остатков Asn, 11 остатков Gln, а катионный трипсин быка 16 и 10 соответственно. Таким образом, хорошо видно, что трипсин краба содержит в составе молекулы гораздо больше кислых аминокислот (Asp + Glu = 28), чем катионный трипсин быка, содержащий суммарно только 10 остатков таких аминокислот. Содержание амидов аминокислот обратное: 17 у трипсина РС и 26 у катионного трипсина быка. Сумма положительно заряженных аминокислотных остатков у фермента краба равна 7 (2 остатка Arg и 5 остатков Lys), а у катионного трипсина быка 16 (2 Arg и 14 Lys). Именно этим можно объяснить большие различия в значениях изоэлектрических точек двух белков – $pI < 2.5$ для трипсина РС и $pI 7.0$ для катионного трипсина быка.

Нами было произведено выравнивание аминокислотной последовательности трипсина РС с аминокислотными последовательностями трипсинов беспозвоночных, анионным и катионным трипсинами быка, трипсином свиньи, а также с трипсином из микроорганизма *S. griseus* (рис. 5). Интересно также отметить различия между анионным трипсином быка и трипсином камчатского краба. Бычий анионный трипсин имеет в своем составе 10 Asp, 8 Glu, 13 Asn, 12 Gln, суммарное содержание положительно заряженных аминокислот равно 10 (3 Arg и 7 Lys). Таким образом, заметно, что анионный трипсин быка занимает промежуточ-

ное положение между трипсином камчатского краба и катионным трипсином быка. Как видно из результатов выравнивания, зрелый трипсин камчатского краба, как и другие трипсины, имеет консервативные остатки триады активного центра (His57, Asp102, Ser195), а также остатки Ile16 и Asp194, образующие между собой солевой мостик, стабилизирующий активный центр.

Наиболее консервативный участок первичной структуры трипсинов обнаружен около остатка Ser195 активного центра и включает последовательность -CQGDSGGP-. Из одиннадцати остатков Cys, имеющих в трипсине РС, шесть инвариантны. Так же как и трипсин дрозофилы, трипсин РС в кальцийсвязывающем участке содержит остаток Asp70, тогда как у других трипсинов в этом месте находится остаток Glu (исключение составляет микробный белок). Устойчивость трипсина РС к автолизу в присутствии ионов Ca^{2+} [24] можно объяснить тем, что в положении петли, подверженной автолизу (остатки 142–153), вместо остатка Lys145 (бычий трипсин) у трипсина РС имеется остаток Thr145. Интересно отметить, что устойчивый к автолизу трипсин рака имеет в этом положении остаток Ser [16].

Ракообразные эволюционно более древнее семейство в классе членистоногих. Поскольку их протеолитические ферменты значительно отличаются от аналогичных ферментов высших животных, эти белки выделяют в особое подсемейство сериновых протеиназ-брахиуринов. По классификации, предложенной А. Барретом [38], трипсин камчатского краба относится к клану SA, семейству S1. Изучение брахиуринов значительно расширяет наше представление об эволюции сериновых протеиназ. Сравнительный структурный и функциональный анализ показывает, что трипсины ракообразных тесно родственны между собой, но имеют отличия от трипсинов позвоночных и прокариот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение гомогенного трипсина РС. Трипсин выделяли из протеолитического комплекса “Морикраза А”, полученного из гепатопанкреаса камчатского краба фирмой “Тринита” (Россия). Лиофильно высушенный препарат “Морикразы А” (0.3 г в 10 мл стартового буфера А (0.1 М ацетат аммония, pH 6.4, 5 мМ Ca(OAc)₂) наносили на колонку (4.5 × 12 см) с DEAE-сефадексом (Pharmacia, Швеция). После промывки колонки стартовым раствором А элюцию фермента проводили градиентом концентрации NaCl (0 → 0.5 М) в буфере А с последующей промывкой тем же раствором, содержащим 0.5 М NaCl. Далее элюцию осуществляли с помощью градиента концентрации NaCl (0.5 → 1 М) и одновременного повышения pH от 6.4 до 8.0, для чего был использован буфер-

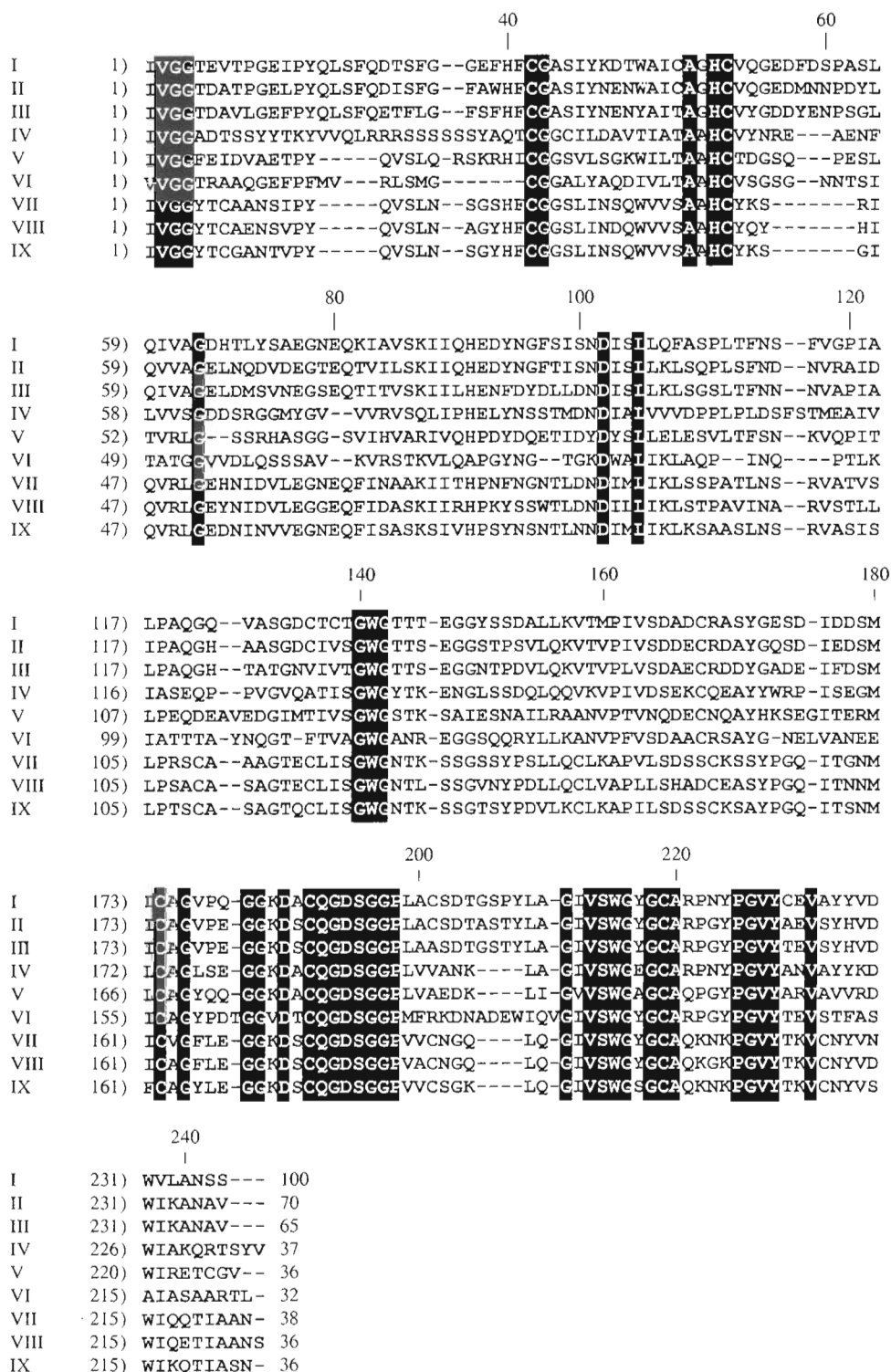


Рис. 5. Сравнение аминокислотных последовательностей трипсинов позвоночных и беспозвоночных с аминокислотной последовательностью трипсина PC. Приведены первичные структуры по базе данных Swiss-Prot (идентификационный номер указан перед латинским названием животного) для трипсинов: I – камчатского краба Q8WR10 (*Paralithodes camtschaticus*), II – креветки Q27761 (*Penaeus vannamei*), III – речного рака P00765 (*Astacus fluviatilis*), IV – плодовой мушки P42279 (*Drosophila melanogaster*), V – комара P35038 (*Anopheles gambiae*), VI – микроорганизма P00775 (*Streptomyces griseus*), VII – свиньи P00761 (*Sus scrofa*), VIII – анионного трипсина быка Q29463 (*Bos taurus*), IX – катионного трипсина быка P00760 (*Bos taurus*). Цифры над последовательностью – нумерация по химотрипсину быка. Цифры слева показывают количество аминокислотных остатков в каждом индивидуальном белке. Цифры справа соответствуют степени идентичности (в процентах) приведенных структур относительно последовательности трипсина PC. 18 полностью консервативных участков выделены черным цветом.

ный раствор В (0.05 М Трис-НСl, рН 8.0, 5 мМ Са(ОAc)₂), содержащий 1 М NaCl. Фракцию, обогащенную трипсином, диализовали против буферного раствора А, содержащего 0.2 М NaCl, с последующим концентрированием до 5 мл. Данную операцию проводили при температуре 5°C на ячейке для концентрирования белков (Amicon, США), используя мембраны PM-10 той же фирмы.

Аффинную хроматографию проводили с использованием ПТГ-агарозы – сорбента, синтезированного по методу, опубликованному ранее [27]. Концентрированный раствор белка в объеме 5 мл наносили на колонку (2 × 15 см), предварительно уравновешенную буферным раствором А, содержащим 0.2 М NaCl. Элюцию белков осуществляли градиентом концентрации NaCl от 0.2 до 1.5 М с одновременным увеличением концентрации изопропилового спирта от 0 до 20%, а также повышением рН от 6.4 до 8.0, для чего был использован буферный раствор В, содержащий 1.5 М NaCl и 20% изопропанола (рис. 2). Фракции, содержащие трипсин, объединяли, концентрировали, обессоливали, затем замораживали в жидком азоте и лиофильно высушивали.

Ионообменная хроматография на колонке Mono Q (Pharmacia, Швеция) (рис. 3). На колонку Mono Q HR 5/5 наносили белок в концентрации 7 мг/мл в 1 мл буферного раствора С (0.01 М Трис-НСl, рН 8.0). После промывки стартовым буфером С проводили элюцию белка ступенчатым градиентом концентрации NaCl в буфере С от 0 до 0.45 М и далее от 0.45 до 0.8 М (рис. 3). Фракцию, содержащую трипсин, обессоливали и лиофильно высушивали.

Активность трипсина определяли по скорости гидролиза Vz-Arg-pNA (Reanal, Венгрия) в стандартных для определения активности трипсина условиях [39]. За 1 ед. акт. принимали активность фермента, гидролизующего 1 мкмоль субстрата за 1 мин.

Определение молекулярной массы трипсина. *Электрофорез:* образцы белка готовили осаждением трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация 10%) при 5°C с последующим центрифугированием и промыванием холодным ацетоном. Для MALDI-масс-спектрометрического анализа использовали смесь равных объемов (0.2–0.5 мкл) образца, растворенного в 25 мМ цитрате аммония, и раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (Sigma G-5254) в концентрации 20 мг/мл в 20% ацетонитриле. Анализ был выполнен на приборе MALDI-TOF-MS BRUKER (Германия).

Выделение РНК. Камчатские крабы были выловлены в зал. Петра Великого недалеко от Владивостока и любезно предоставлены В.А. Кожемяко (ТИБОХ). 0.1 г гепатопанкреаса живого камчатского краба растворяли (путем пипетирования) в 500 мкл лизирующего буфера (4 М гу-

анидинизотиоцианат; 25 мМ цитрат натрия, 0.5% саркозил, 0.1 М β-меркаптоэтанол, рН 7.0). После окончательного лизиса тканей в раствор добавляли 250 мкл фенола, рН 10.0, встряхивали и добавляли 250 мкл смеси хлороформ–изоамиловый спирт (24 : 1). После интенсивного встряхивания смесь центрифугировали при 12000 g 10 мин при 4°C, переносили водную фазу в новую пробирку и повторяли процедуру экстракции еще раз. Затем водную фазу экстрагировали смесью хлороформ–изоамиловый спирт, после чего переносили в новую пробирку и осаждали нуклеиновые кислоты 350 мкл 98% изопропанола. После центрифугирования осадок нуклеиновых кислот промывали 70% этанолом и растворяли в 100 мкл бидистиллированной воды при 55°C 10 мин. Нерастворимые компоненты осаждали центрифугированием при 12000 g 10 мин. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и добавляли 100 мкл 12 М хлорида лития, встряхивали и инкубировали при –20°C 1 ч для осаждения РНК. После инкубации смесь центрифугировали при 12000 g и 4°C 10 мин, надосадочную жидкость удаляли, а осадок промывали 70% этанолом и растворяли в 20 мкл бидистиллированной воды. Для полной очистки препарата РНК от примеси ДНК перед синтезом кДНК препарат обрабатывали ДНКазой RQ (Promega, США) в рекомендованном буфере при 37°C 1 ч с добавлением 1 мкл ингибитора РНКазы AntiRNase (Amicon, США).

Получение библиотеки кДНК. Для синтеза кДНК использовали 1 мкг суммарной РНК гепатопанкреаса краба. Синтез первой цепи кДНК проводили с применением SMART PCR cDNA Synthesis Kit (CLONTECH) по прилагаемому фирмой протоколу. Далее проводили амплификацию кДНК с целью повышения относительной концентрации коротких транскриптов (до 3 т.п.о.) в соответствии со SMART PCR cDNA Synthesis Kit User Manual. Для амплификации кДНК до концентрации 20 нг/мкл потребовалось 19 циклов ПЦР.

Клонирование кДНК трипсина РС. Для клонирования полноразмерной кДНК трипсина на основании известной N-концевой последовательности фермента использовали модифицированный метод быстрой амплификации концов кДНК (RACE) [40]. Амплификацию 3'-концевой части транскрипта проводили с использованием вырожденного праймера P3', соответствующего N-концевой последовательности зрелого трипсина (IVGGTEVTPG): (5')GGC ACC GAG GTC ACC CCN GG. ПЦР проводили следующим образом: амплифицированную кДНК разводили в 20 раз водой и 1 мкл добавляли к 24 мкл реакционной смеси, содержащей 1 × Advantage2 Polymerase mix (CLONTECH), 1 × Advantage2 buffer, 200 мкМ dNTP, 0.3 мкМ вырожденный праймер P3' и систему праймеров step-out (0.02 мкМ олигонуклеотид “heel-carrier” и 0.15 мкМ олигонуклеотид “heel-specific”) [40]. Для

проведения ПЦР использовали MJ Research PTC-200 Thermocycler в режиме "calculated": 95°C, 8 с; 65°C, 10 с; 72°C, 2 мин; 25 циклов. Продукт ПЦР клонировали с помощью AdvanTAGE PCR Cloning Kit (CLONTECH) в соответствии с рекомендованным протоколом. Плазмидные ДНК получали с помощью Plasmid Purification Kit (QIAGEN). Последовательность клонированного фрагмента определяли на автоматическом секвенаторе Beckman SEQ-2000 с помощью Beckman SEQ-2000 Sequencing Kit в соответствии с рекомендованным протоколом, используя M13 прямой и обратный универсальные праймеры. Для анализа последовательности нуклеотидов использовали набор программ DNA Star, а для анализа базы данных GeneBank – алгоритмы blastn и blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

На основании полученной таким образом последовательности 3'-концевой части кДНК трипсина был создан праймер P5' для амплификации 5'-концевой части транскрипта: (5') GTC GGA GCA GGC CAG AGG. ПЦР для получения 5'-концевой части транскрипта выполняли как описано выше, за исключением режима амплификации: 95°C, 8 с; 68°C, 10 с; 72°C, 2 мин; 25 циклов. Клонирование и определение последовательности фрагмента ПЦР проводили как описано выше. Полученная последовательность зарегистрирована в базе данных GenBank под номером AF461036.

Идентификацию сигнального пептида проводили с помощью программы SignalP [41]. Подсчет процента идентичных аминокислот выполнялся по программе Tree Top [42]. Для выравнивания последовательности аминокислот трипсина РС с другими трипсинами использовали программу AliVee-Multiple alignment Release 2.0 [43], поиск гомологичных белков для выравнивания осуществляли в базе данных SwissProt.

Настоящая работа проведена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 02-09-48699.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kunitz M., Northrop J.H. // *Science*. 1931. V. 73. P. 262.
2. Jany K.D. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1976. V. 53B. P. 31–38.
3. Murakami K., Noda M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1981. V. 65B. P. 17–26.
4. Hjelmeland K., Raa J. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1982. V. 71B. P. 557–562.
5. Simpson B.K., Haard N.F. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1984. V. 79B. P. 613–622.
6. Smalas A.O., Hordvik A. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 214. P. 355–358.
7. Roach J.C. // *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 2002. V. 47. P. 31–44.
8. Casu R.E., Jarmey J.M., Elvin C.M., Eisemann C.H. // *Insect. Mol. Biol.* 1994. V. 3. P. 159–170.
9. East I.J., Allingham P.G., Bunch R.J., Matheson J. // *Med. Vet. Entomol.* 1995. V. 3. P. 120–126.
10. Valaitis A.P. // *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 1995. V. 25. P. 139–149.
11. Noriega F.G., Wang X.Y., Pennington J.E., Barillas-Mury C.V., Wells M.A. // *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 1996. V. 26. P. 119–126.
12. Bernardi R., Tedeschi G., Ronchi S., Palmieri S. // *Insect. Biochim. Mol. Biol.* 1996. V. 26. P. 883–889.
13. Sakal E., Applebaum S.W., Birk Y. // *Int. J. Pept. Protein. Res.* 1989. V. 34. P. 498–505.
14. Milne R., Kaplan H. // *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 1993. V. 23. P. 663–673.
15. Zeng F., Zhu Yu-Ch., Cohen A.C. // *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 2002. V. 32. P. 455–464.
16. Titani K., Sasagawa T., Woodbury R.G., Ericsson L.H., Dorsam H., Kraemer M., Neurath H., Zwilling R. // *Biochemistry*. 1983. V. 22. P. 1459–1465.
17. James E., O'Connor D., O'Connor K. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1990. V. 95B. P. 525–530.
18. Lu Peu-Jung., Liu Hsien-Ching., Tsai Inn-Ho // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 1990. V. 371. P. 851–859.
19. Glass H.J., Stark J.R. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1994. V. 108B. P. 225–235.
20. Johnston D., Hermans J.M., Yellowlees D. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. V. 324. P. 35–40.
21. Klein B., Moullac G.L., Sellos D., Wormhoudt A.V. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1996. V. 28. P. 551–563.
22. Grant G.A., Sacchetti J.C., Welgus H.G. // *Biochemistry*. 1983. V. 22. P. 354–358.
23. Zwilling R., Neurath H., Ericsson L.H., Enfield D.L. // *FEBS Lett.* 1975. V. 60. P. 247–249.
24. Руденская Г.Н., Исаев В.А., Калеева Т.С., Степанов В.М., Мальцев К.В., Швец С.В., Лукьянова Н.А., Кислицын Ю.А., Мирошников А.И. // *Биоорганическая химия*. 1998. Т. 24. С. 112–118.
25. Исаев В.А., Руденская Г.Н., Купенко О.Г., Степанов В.М., Попова И.М., Диденко Ю.Г. Способ получения препарата коллагеназы: Патент 2008353 // *Б. И.* 1994. № 4. С. 18.
26. Rudenskaya G.N., Isaev V.A., Shmoilov A.M., Karabasova M.A., Shvets S.V., Miroshnikov A.I., Brusov A.B. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000. V. 88. P. 175–183.
27. Руденская Г.Н., Исаев В.А., Степанов В.М., Дунаевский Я.Е., Баратова Л.А., Калеева Т.С., Нурминская М.В. // *Биохимия*. 1996. Т. 61. С. 1119–1122.
28. Руденская Г.Н., Шмойлов А.М., Исаев В.А., Ксенофонов А.В., Швец С.В. // *Биохимия*. 2000. Т. 65. С. 23–30.
29. Руденская Г.Н., Купенко О.Г., Исаев В.А., Степанов В.М., Дунаевский Я.Е. // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21. С. 249–255.
30. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
31. Сахаров И.Ю., Джунковская А.В. // *Биохимия*. 1993. Т. 58. С. 1145–1153.
32. Light A., Janska H. // *Trends Biochem. Sci.* 1989. V. 14. P. 110–112.
33. le Huerou I., Wicker C., Guilloteau P., Toullec R., Puigserver A. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 193. P. 776–778.

34. Mikes O., Holeysovsky V., Tomasek V., Sorm F // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1966. V. 24. P. 346–352.
35. Olafson R.W., Jurasek L., Carpenter M.R., Smillie L.B. // Biochemistry. 1975. V. 14. P. 1168–1177.
36. Muller H.M., Crampton J.M., della Torre A., Sinden R., Crisanti A. // EMBO J. 1993. V. 12 P. 2891–2900.
37. Kalhok S., Tabak L.M., Prosser D.E., Brook W., Downer A.E.R., White B.N. // Insect. Mol. Biol. 1993. V. 2. P. 71–79.
38. Barrett A., Rawlings N. // Eur. J. Biochem. 1997. V. 250. P. 1–6.
39. Grant G.A., Sacchetti J.C., Welgus H.G. // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 354–358.
40. Matz M., Shagin D., Bogdanova E., Britanova O., Lukyanov S., Diatchenko L., Chenchik A. // Nucl. Acids Res. 1999. V. 27. P. 1558–1560.
41. Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., Gunnar von Heijne. // Protein Engineering. 1997. V. 10. P. 1–6.
42. Brodsky L.I., Ivanov V.V., Kalaidzidis Ya.L., Leontovich A.M., Nikolaev V.K., Feranchuk S.I., Drachev V.A. // Biochemistry. 1995. V. 60. P. 923–928.
43. Nikolaev V.K., Leontovich A.M., Drachev V.A., Brodsky L.I. // Biochemistry. 1997. V. 62. P. 578–582.

Isolation and Primary Structure of Trypsin from the King Crab *Paralithodes camtschaticus*

Yu. A. Kislitsyn*, D. V. Rebrikov**, Ya. E. Dunaevskii*, and G. N. Rudenskaya**

Phone: +7 (095) 939-5541, e-mail: gnruden@genebee.msu.ru

* Chemical Faculty, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

** Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

Trypsin from hepatopancreas of the *Paralithodes camtschaticus* crab was isolated in homogeneous state by successive ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex, affinity chromatography on Agarose modified with peptide ligands from trypsin hydrolysate of salmin, and ion-exchange chromatography on a Mono Q column. The total yield of the protein was 64%. Its *N*-terminal amino acid sequence was determined (IVGGTEVTPG-). A sample of amplified total cDNA of hepatopancreas of king crab was obtained. The cDNA fragment containing the complete coding part of the gene was isolated on the basis of the known *N*-terminal amino acid sequence of the mature form of the trypsin. The polypeptide chain of the proenzyme consists of 266 aa. The mature trypsin involves 237 aa, which corresponds to its molecular mass of 24.8 kDa. A comparison of the amino acid sequence of the king crab trypsin with those of trypsins from other species of crustaceans demonstrated their high structural homology. The trypsin from the *Penaeus vannamei* shrimp appeared to be the most close in its primary structure to that of the king crab (70% identity). The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: cDNA, isolation, king crab, primary structure, trypsin