



УДК 547.962.02

ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  
ФОСФОЛИПАЗЫ  $A_2$  (ИЗОФЕРМЕНТ E)  
ИЗ ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КОБРЫ *NAJA NAJA OXIANA*

Овчинников Ю. А., Мирошников А. И., Назимов И. В.,  
Ансалон У. Р., Солдатова Л. Н.

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

Определена полная аминокислотная последовательность фосфолипазы  $A_2$  (изофермент E3) из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*. Химическое расщепление белка по остаткам Met и Trp, а также ограниченный трипсинолиз по остатку Arg и расщепление глутаминовой протеазой по остатку глутаминовой кислоты позволили получить большие фрагменты. Анализ последовательности этих фрагментов на секвенаторе привел к установлению первичной структуры белка, содержащего 119 аминокислот.

Фосфолипазы  $A_2$  (КФ 3.1.1.4), катализирующие гидролиз эфирной связи во 2-м положении 1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфатидов, выделены из различных природных источников — поджелудочной железы, эритроцитов, яда различных змей и перепончатокрылых [1—8]. К настоящему времени установлена аминокислотная последовательность некоторых ферментов этого класса и интенсивно исследуется молекулярный механизм биологического действия. Интерес к исследованию структуры и механизма действия фосфолипаз  $A_2$  связан, в частности, с тем, что ряд нейротоксинов пресинаптического действия обладает фосфолипазной активностью (нотексин,  $\beta$ -бунгаротоксин), а некоторые имеют в своем составе субъединицу с высокой ферментативной активностью (тайпоксин, кротоксин) [9—12]. Существует определенная гомология в строении отдельных участков полипептидной цепи фосфолипаз  $A_2$ , как обладающих пресинаптическим эффектом, так и абсолютно нетоксичных, однако причины различия их биологического действия в настоящее время неясны. Анализ первичной структуры, химическая модификация и исследования пространственного строения, возможно, позволят выявить химическую природу тонких функциональных различий, присущих каждой из фосфолипаз.

Ранее было показано, что яд среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* содержит 7 изоферментов, обладающих фосфолипазной активностью, которые могут быть выделены в индивидуальном состоянии с помощью иммуноспецифической и ионообменной хроматографии [13]. Целью данной работы является определение полной аминокислотной последовательности одного из изоферментов (E3), содержащего 119 аминокислотных остатков. Аминокислотный состав карбоксиметилированного белка представлен в табл. 1.

Таблица 1

Аминокислота	Пептид					
	СМ-белок	CN-1	CN-2	T-1	T-2	T-3
Cys (Cm)	14	13,6(14)	—	8,6(9)	8,7(9)	0,9(1)
Asp	21	18,7(19)	2,0(2)	11,2(11)	7,8(8)	6,2(6)
Thr	5	4,8(5)	0,1(0)	3,6(4)	2,8(3)	0,1(0)
Ser	8	7,7(8)	—	5,7(6)	4,8(5)	0,1(0)
Gln	6	5,2(5)	1,0(1)	4,1(4)	3,9(4)	0,2(0)
Pro	4	4,1(4)	—	2,1(2)	1,0(1)	1,1(1)
Gly	10	10,2(10)	—	7,2(7)	4,2(4)	1,1(1)
Ala	9	9,3(9)	—	3,2(3)	3,1(3)	5,1(5)
Val	3	3,0(3)	—	1,9(2)	1,0(1)	—
Met	1	—	(1)	—	—	—
Ile	5	4,9(5)	—	1,6(2)	1,9(2)	2,0(2)
Leu	6	4,8(5)	1,0(1)	2,1(2)	1,0(1)	1,9(2)
Tyr	9	7,8(8)	0,9(1)	3,8(4)	3,9(4)	1,8(2)
Phe	4	2,9(3)	1,0(1)	0,9(1)	1,0(1)	1,0(1)
His	1	0,8(1)	—	0,8(1)	0,8(1)	—
Lys	6	4,9(5)	1,0(1)	2,8(3)	2,9(3)	1,1(1)
Trp	2	(2)	—	+ (1)	+ (1)	—
Arg	5	(5)	—	(2)	(1)	(1)
Всего	119	111	8	64	52	23
N-Концевая	Asp	Ile	Asp	Gly	Cys(Cm)	Leu

Примечание. Остатки Trp в пептидах CN-1, T-1, T-2 обнаружены при помощи реакции Эрлиха; содержание Trp в белке определяли ранее [13].

Для определения первичной структуры фосфолипазы была выбрана стратегия автоматического анализа аминокислотной последовательности больших фрагментов, полученных при специфическом расщеплении полипептидной цепи химическими или ферментативными методами. Возможными точками расщепления могут служить остатки метионина, триптофана, аргинина и лизина. При помощи жидкофазного секвенатора была установлена последовательность 44 аминокислотных остатков СМ-белка, в том числе метионина-8, триптофана-18, лизина-6, 10, аргинина-16, 30, 42. С-Концевой анализ СМ-фосфолипазы карбоксипептидазами А и Б показал последовательность -Leu-Lys-Ala-Arg-Cys-Gln.

Таким образом, были локализованы три из шести остатков лизина, четыре из пяти остатков аргинина, один из двух остатков триптофана и единственный остаток метионина молекулы белка.

Для получения больших фрагментов проводили расщепление молекулы нативного белка бромцианом по остатку метионина. Полученные фрагменты разделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50 (рис. 1). Аминокислотный состав фрагментов CN-1 (карбоксиметилированного после расщепления) и CN-2 приведен в табл. 1. Полная структура пептида CN-2 была подтверждена анализом на твердофазном секвенаторе после присоединения пептида за С-концевой остаток гомосерина [14] к  $\gamma$ -аминопропилюльному стеклу. Фрагмент CN-1 исследовали при помощи жидкофазного секвенатора, проведя 40 циклов деградации по Эдману. Результаты определения структуры бромциановых пептидов твердофазным и жидкофазным методами позволили установить последовательность 48 аминокислот фосфолипазы  $A_2$  (схема), включая единственный в молекуле остаток His<sup>37</sup>, модификация которого в патиной молекуле *n*-бромфенацилбромидом приводит к потере ферментативной активности [15].

Так как в ходе вышеупомянутых определений структуры белка были локализованы 4 из имеющихся в белке 5 остатков аргинина, на следующем этапе анализа было проведено специфическое расщепление белка по остаткам аргинина. СМ-белок модифицировали янтарным ангидридом и далее расщепляли трипсином в стандартных условиях. Из смеси продук-

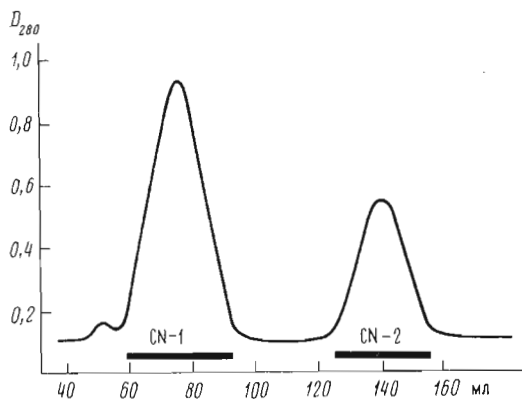


Рис. 1. Разделение продуктов гидролиза фосфолипазы  $A_2$  (изофермент ЕЗ) бромцианом на колонке ( $1,5 \times 100$  см) с сефадексом G-50 superfine в 10% уксусной кислоте. Скорость элюирования (здесь и на рис. 2-6) 10 мл/ч

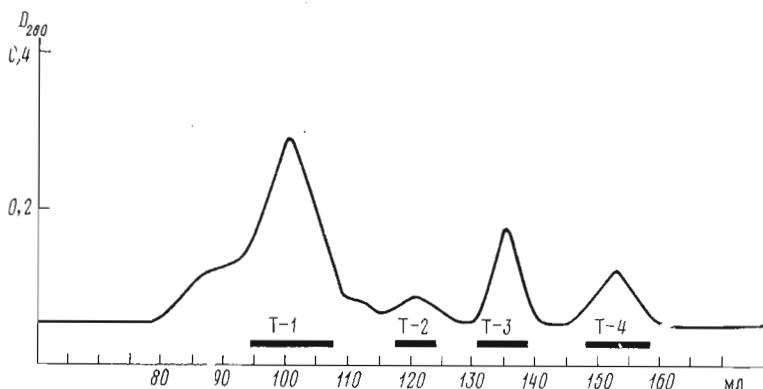
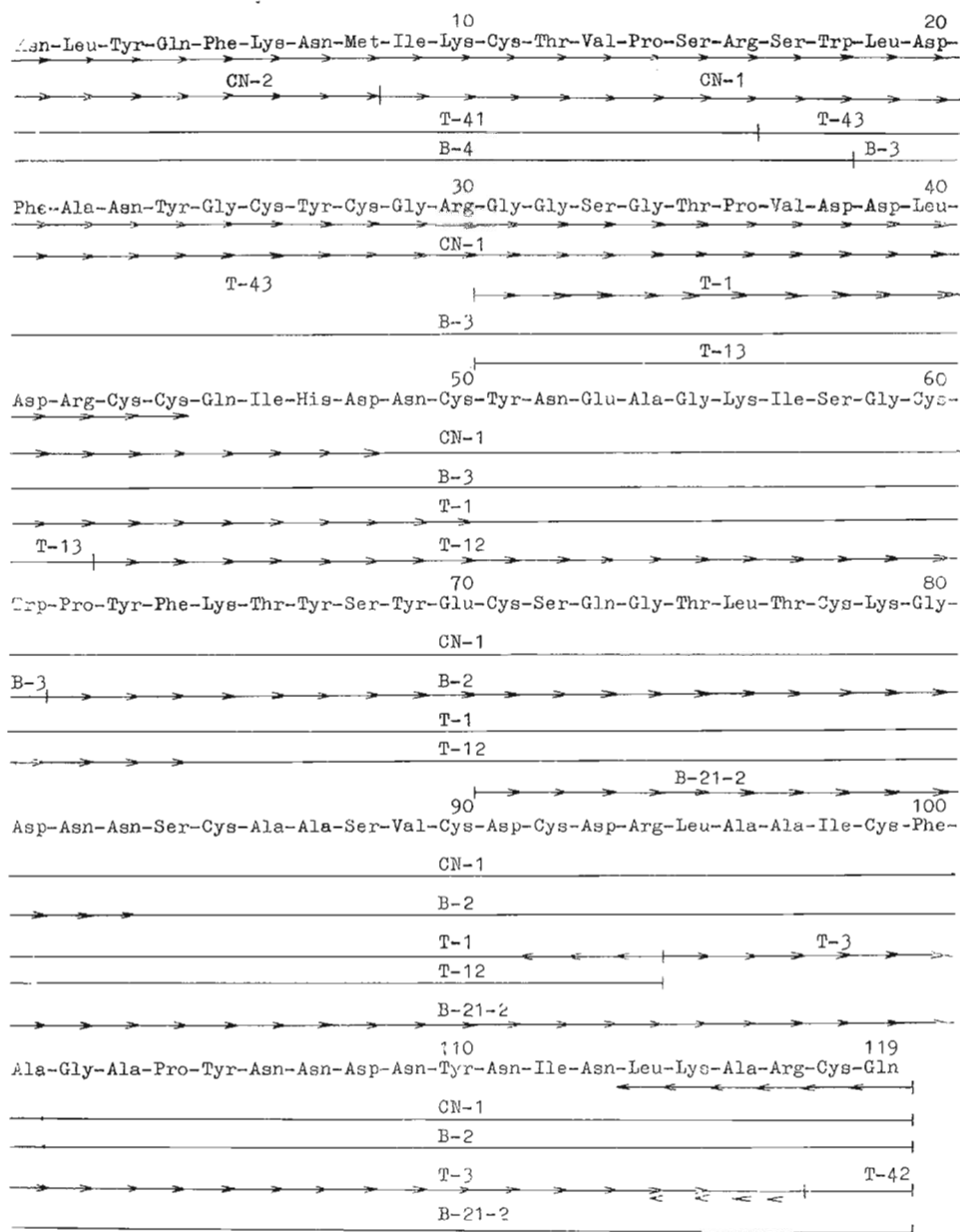


Рис. 2. Разделение продуктов ограниченного триптического гидролиза на сефадексе G-50 ( $1,5 \times 100$  см) в 0,1 М бикарбонате аммония

тов ограниченного триптического гидролиза были выделены фракции Т-1 — Т-4 (рис. 2). При этом фракции содержали в качестве N-концевых следующие аминокислоты: Т-1 — глицин, Т-2 — CM-цистеин, Т-3 — лейцин (табл. 1), Т-4 — серин, CM-цистеин, аспарагиновую кислоту. Разделение фракции Т-4 на анионообменной целлюлозе DE-52 позволило выделить компоненты фракции Т-4 в индивидуальном состоянии (пептиды Т-41, Т-42, Т-43, рис. 3, табл. 2).

Так как, по данным анализа аминокислотного состава и N-концевого анализа этих пептидов и по результатам определения аминокислотной последовательности самого белка, пептиды Т-41, Т-42, Т-43 достоверно принадлежали уже известным участкам структуры белка (см. схему), определение их первичной структуры не проводили.

Фракция Т-2 из-за недостаточного для анализа количества вещества была охарактеризована только N-концевым анализом и анализом аминокислотного состава (табл. 1). Анализ N-концевой последовательности пептида Т-3 на секвенаторе позволило определить следующую структуру: Leu-Ala-Ala-Phe-Cys-Phe-Ala-Gly-Ala-Pro-Tyr-Asn-Asn-Asp-Asn-Tyr-Asn-Phe-Asn-Leu-Lys-. C-Концевая последовательность пептида Т-3 была определена при помощи карбоксипептидаз А и Б (-Leu-Lys-Ala-Arg). Учитывая результаты C-концевого анализа молекулы белка, пептид Т-3 можно отнести к C-концевой области белка.



> определено при помощи секвенатора

< определено при помощи карбоксипептидаз А и В

При анализе на секвенаторе фракции Т-1 установили последовательность 20 аминокислот (схема). Этот же фрагмент гидролизовали трипсином для расщепления полипептидной цепи по связи Arg-Cys(Cm) в положении 42-43 (схема). Так как трипсинолиз проходил с малым выходом, то увеличивали время гидролиза до 8 ч и соотношение фермент — субстрат до 1 : 40, что позволило расщепить указанную связь и выделить продукты гидролиза (пептиды Т-11\*, Т-12, Т-13, рис. 4, табл. 2). При анализе

\* По данным анализа аминокислотного состава и N-концевому анализу, пептид Т-11 идентичен пептиду Т-1.

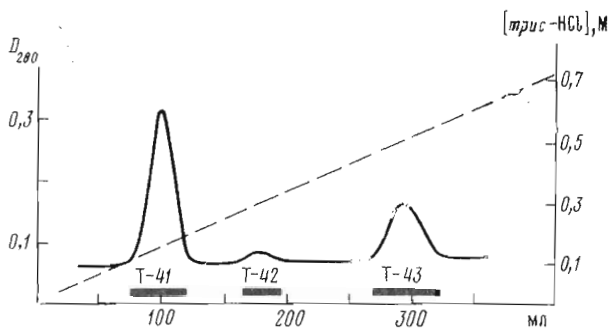


Рис. 3. Очистка фракции Т-4 на целлюлозе DE-52 (1,5×20 см) в градиенте концентрации трис-НСl-буфера, рН 8,4

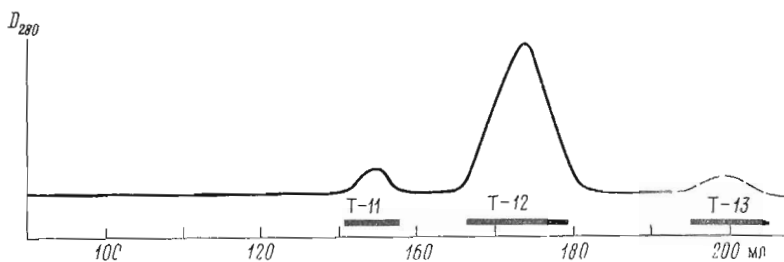


Рис. 4. Разделение пептидов ограниченного триптического гидролиза фракции Т-1 на сефадексе G-50 (1,5×100 см) в 0,1 М бикарбонате аммония

пептида Т-12 на секвенаторе были идентифицированы 22 аминокислотных остатка (см. схему), в том числе последовательность триптофанил-пролин в положении, соответствующем последовательности 61–62 исходной молекулы белка (схема).

Поскольку положение обоих остатков триптофана в полипептидной цепи стало известно, было предпринято расщепление СМ-белка по остаткам триптофана с помощью бромистого водорода в диметилсульфоксиде по методу Фонтана [16, 17]. При разделении гидролизата на сефадексе G-50 (рис. 5) были получены фракции, содержащие в качестве N-концевых аспарагиновую кислоту и лейцин (фракция В-1), пролин (В-2), лейцин (В-3), аспарагиновую кислоту (В-4). По результатам определения аминокислотной последовательности, фракция В-1 содержала смесь нерасщепленного белка и фрагмента белка, укороченного с N-конца на 18 аминокислотных остатков; фракция В-2 содержала C-концевую половину молекулы (начинающуюся с пролина-62), фракция В-3 — пептид, соответствующий аминокислотной последовательности 19–61 белка, фракция В-4 — N-концевой 18-членный пептид. Четырехкратной рехроматографией фракции В-1 на сефадексе G-50 удалось получить два составляющих ее компонента (пептиды В-11 и В-12, рис. 5б). После анализа на секвенаторе (10 циклов деградации по Эдману) указанные компоненты были окончательно идентифицированы как исходный нерасщепленный белок и его фрагмент, укороченный на 18 N-концевых аминокислот.

При анализе фракции В-2 на секвенаторе были идентифицированы 22 аминокислотных остатка (см. схему), что позволило увеличить длину известной структуры до 83 аминокислотных остатков. В ходе определения структуры фрагмента В-2 был обнаружен остаток глутаминовой кислоты (в положении 70 молекулы белка). Исходный белок содержит (суммарно) 6 остатков глутаминовой кислоты и глутамина (табл. 1). Так как расположение всех этих остатков в молекуле белка было найдено в ходе пре-

Таблица 2

Аминокислота	Пептид				
	T-41	T-42	T-43	T-12	T-13
Cys(Cm)	0,8(1)	0,9(1)	1,6(2)	8,4(9)	—
Asp	1,8(2)		2,0(2)	7,8(8)	2,9(3)
Thr	0,9(1)		0,2(0)	2,9(3)	0,9(1)
Ser	0,9(1)		0,9(1)	4,9(5)	0,8(1)
Glu	1,0(1)	1,0(1)	0,1(0)	4,1(4)	—
Pro	0,9(1)		—	0,9(1)	1,1(1)
Gly	0,2(0)		2,1(2)	4,3(4)	3,1(3)
Ala	0,1(0)		2,1(2)	3,1(3)	0,2(0)
Val	0,9(1)		0,1(0)	1,1(1)	0,9(1)
Met	0,9(1)		—	0,1(0)	—
Ile	0,8(1)		0,1(0)	1,9(2)	0,1(0)
Leu	1,1(1)		0,9(1)	1,1(1)	1,0(1)
Tyr	0,9(1)		0,9(1)	3,6(4)	0,1(0)
Phe	1,0(1)		1,0(1)	0,2(0)	0,2(0)
His	—		—	0,9(1)	0,1(0)
Lys	2,0(2)		0,2(0)	3,0(3)	0,2(0)
Trp	—		+	(1)	—
Arg	1,0(1)		1,0(1)	1,1(1)	1,0(1)
Всего	16	2	14	52	12
N-Концевая	Asp	Cys-(Cm)	Ser	Cys-(Cm)	Gly

Таблица 3

Аминокислота	Пептид			
	B-2	B-3	B-4	B-21-2
Cys(Cm)	6,5(7)	5,8(6)	0,7(1)	6,4(7)
Asp	11,2(11)	7,8(8)	2,1(2)	11,3(11)
Thr	2,7(3)	0,7(1)	0,9(1)	1,8(2)
Ser	3,7(4)	1,7(2)	1,8(2)	2,8(3)
Glu	2,8(3)	2,1(2)	1,0(1)	2,0(2)
Pro	2,1(2)	1,0(1)	0,9(1)	1,1(1)
Gly	3,3(3)	7,2(7)	0,3(0)	3,1(3)
Ala	7,1(7)	2,1(2)	0,2(0)	6,9(7)
Val	0,9(1)	0,9(1)	0,9(1)	0,9(1)
Met	—	—	0,6(1)	—
Ile	4,1(4)	1,9(2)	1,1(1)	1,9(2)
Leu	2,9(3)	2,0(2)	1,0(1)	2,9(3)
Tyr	5,5(6)	2,6(3)	0,7(1)	1,6(2)
Phe	1,8(2)	1,1(1)	0,9(1)	1,1(1)
His	0,2(0)	0,8(1)	1,0(0)	—
Lys	2,9(3)	1,1(1)	1,9(2)	2,1(2)
Trp	+	(1)	+	(1)
Arg	2,1(2)	2,0(2)	1,0(1)	2,0(2)
Всего	59	41	18	49
N-Концевая	Pro	Leu	Asp	Cys-(Cm)

дыдущих определений (остатки 4, 45, 53, 70, 73, 119), то фрагмент В-2 был гидролизован (по единственному остатку глутаминовой кислоты-70) глутаминовой протеазой из *Staphylococcus aureus*. N-Концевой анализ гидролизата показал, что в гидролизате помимо N-концевого остатка пролина содержится новая аминокислота — CM-цистеин, т. е. происходит расщепление пептидной связи в положении 70—71. Гидролизат разделили гель-фильтрацией и получили три фракции (рис. 6). Фракцию В-21 окончательно очищали на целлюлозе DE-52 (рис. 7). Полученную при этом фракцию В-21-2 (табл. 3) анализировали на секвенаторе; при этом были определены 30 аминокислотных остатков и обнаружено перекрытие пептида В-21-2 с пептидом Т-3 из ограниченного триптического гидролиза (схема). Это перекрытие позволило завершить реконструкцию молекулы белка.

Таким образом, последовательное использование методов специфического гидролиза молекулы CM-белка на ограниченное число больших фрагментов позволило реконструировать молекулу фосфолипазы А<sub>2</sub> (фракция ЕЗ) из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*. Использование секвенатора в сочетании с С-концевым анализом полипептидов карбокси-пептидазами А и Б помогло быстро локализовать полученные фрагменты в структуре белка и, что особенно важно, целенаправленно выбирать следующий тип специфического расщепления полипептидной цепи. Тем самым удалось избежать длительной многоступенчатой очистки мелких пептидов, получаемых обычно при гидролизе белка трипсином, химотрипсином, термолизинном.

### Экспериментальная часть

Источник фосфолипазы А<sub>2</sub> (изофермент ЕЗ), методы разделения и способы выделения индивидуального фермента описаны ранее [13]. В работе использовали трипсин, карбокси-пептидазы А и Б (Worthington, США), протеазу из *S. aureus* (Miles, Англия). Для выделения фрагментов белка использовали сефадекс G-50 (superfine, Pharmacia, Швеция) и анионообменную целлюлозу DE-52 (Whatman, Англия). Чистоту выделенных фрагментов определяли по методике Грея — Хартли, как описано ранее [18].

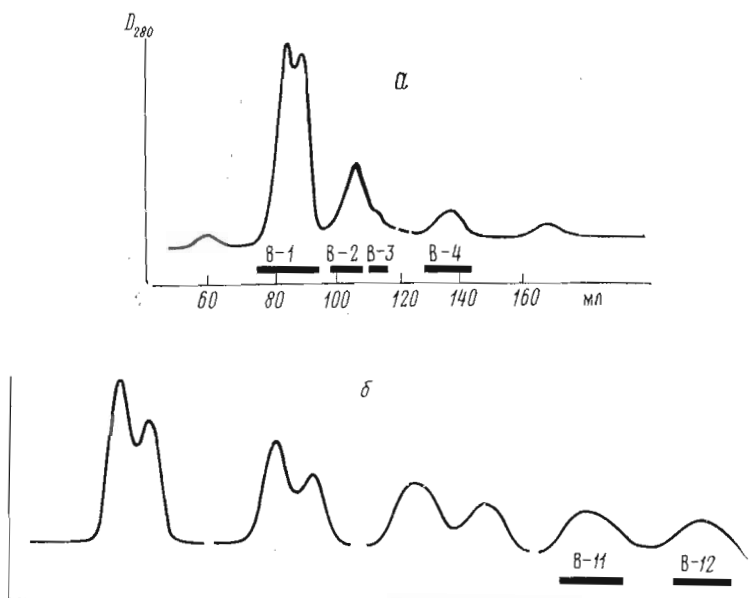


Рис. 5. *a* – разделение продуктов расщепления СМ-фосфолипазы по остаткам триптофана на сефадексе G-50 (1,5×100 см) в 10% уксусной кислоте; *б* – рехроматография в этих же условиях фракции В-1

Автоматический анализ последовательности аминокислот проводили на секвенаторе 890 С (Beckman, США) и на твердофазном секвенаторе 4020 (LKB, Швеция). При работе на секвенаторах использовали реактивы фирм Beckman, Pierce (США). Идентификацию 3-фенил-2-тиогидантоинов осуществляли ТСХ на силикагеле с люминофором (пластинки фирмы Merck, ФРГ), ГЖХ (10% фазы SP-400 на хромосорбе W, 100–120 меш), масс-спектрометрией электронного удара, как описано ранее [19], а также аминокислотным анализом после гидролиза фенилтиогидантоинов до свободных аминокислот 47% HI. Аминокислотный анализ гидролизатов пептидов и фенилтиогидантоинов проводили на анализаторе D-500 (Durrum, США).

**Карбоксиметилирование фосфолипазы  $A_2$  (изофермент E3).** Восстановление и карбоксиметилирование фермента проводили по стандартному методу, описанному ранее [20]. Аминокислотный анализ карбоксиметилированного белка приведен в табл. 1. Расщепление белка бромцианом по остатку метионина проводили по методике [21]. Полученные фрагменты разделяли на сефадексе G-50 (рис. 1). Аминокислотный анализ и N-концевые аминокислоты фрагментов приведены в табл. 1.

**Сукцинилирование СМ-белка.** СМ-белок (30 мг) растворяли в 4 мл 0,3 М раствора бикарбоната натрия и при интенсивном перемешивании к раствору добавляли 30 мг янтарного ангидрида четырьмя равными порциями в течение 1 ч. Добавлением 2 г NaOH поддерживали pH 9 при 20°. После добавления ангидрида реакционную смесь перемешивали 30 мин, обессоливали и лиофильно высушивали.

**Ограниченный триптический гидролиз СМ-белка.** Сукцинилированный СМ-белок (30 мг) в 4 мл 0,1 М бикарбоната натрия (pH 8,4) гидролизуют трипсином (0,3 мг) в течение 3 ч при 37°. Гидролизат разделяли на сефадексе G-50 (рис. 2). Фракции Т-1, Т-2, Т-3 рехроматографировали в тех же условиях. Фракцию Т-4 разделяли хроматографией на целлюлозе DE-52 (рис. 3). Характеристики пептидов приведены в табл. 1.

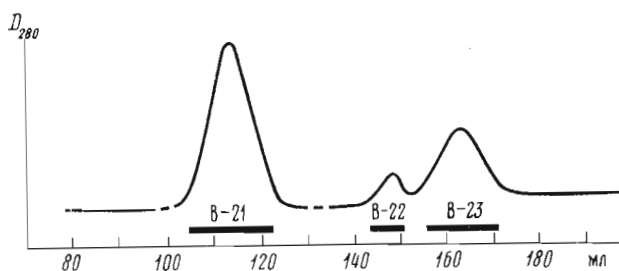


Рис. 6. Разделение продуктов гидролиза фракции В-2 глутаминовой протеазой на сефадексе G-50 (1,5×100 см) в 20% уксусной кислоте

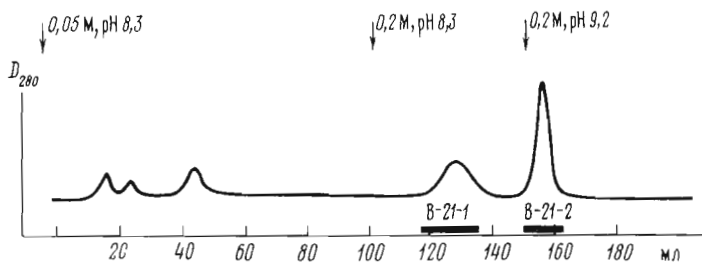


Рис. 7. Очистка фракции В-21 на целлюлозе DE-52 (1,5×20 см, 10 мл/ч, стрелками указана смена буфера — двузамещенный фосфат натрия)

Ограниченный триптический гидролиз пептида Т-1 проводили в аналогичных условиях (при увеличении соотношения фермент — субстрат до 1 : 40 по весу) в течение 8 ч. Разделение продуктов гидролиза показано на рис. 4. Характеристики пептидов приведены в табл. 2.

*Расщепление белка по остаткам триптофана.* СМ-белок (30 мг) растворили в 0,6 мл свежеперегнанной 47% НВг и 0,3 мл диметилсульфоксида. Реакционную смесь встряхивали 30 мин при 25°, добавляли 0,9 мл воды, нейтрализовали конц. аммиаком (до растворения осадка), не допуская перегрева, добавляли 6 М мочевины и разделяли на сефадексе G-50 (рис. 5). Все выделенные фракции обессоливали и проверяли на гомогенность данным методом.

*Гидролиз пептида В-2 глутаминовой протеазой.* Пептид В-2 (6 мг) в 1,5 мл 0,2 М бикарбоната аммония (рН 8,0) гидролизовали глутаминовой протеазой из *S. aureus* при соотношении фермент — субстрат 1 : 100 (по весу), 4 ч при 37°. После разделения пептидов гель-фильтрацией (рис. 6) фракция В-21 была окончательно очищена на анионообменной целлюлозе DE-52 (рис. 7). Определение аминокислотной последовательности СМ-белка проводили на секвенаторе по стандартной белковой программе (№ 122974), используя 250 нм белка. Аминокислотная последовательность пептидов определялась по пептидной программе № 102974.

С-Концевую аминокислотную последовательность пептидов определяли с помощью карбоксипептидаз А и В и анализа отщепленных аминокислотных остатков на аминокислотном анализаторе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. de Haas G. H., Postema N. M., Nieuwenhuizen W., van Deenen L. L. M. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, **159**, 103—117.
2. Dutilh C. E., van Dam P. J., Verheul F. E. A. A. M., de Haas G. H. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **53**, 91—97.
3. Rock Ch. O., Snyder F. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 6564—6566.



4. Shipolini R. A., Callewaert G. L., Cottrell R. C., Doonan S., Vernon C. A., Banks B. E. C. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **20**, 459-468.
5. Kihara H. (1976) *J. Biochem.*, **80**, 341-349.
6. van Wezel F., de Haas G. H. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **410**, 299-309.
7. Wells M. A., Hanahan D. J. (1969) *Biochemistry*, **8**, 414-424.
8. Joubert F. J., vander Walt S. J. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **379**, 317-328.
9. Halpert J., Eaker D. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 6990-6997.
10. Fohlma J., Eaker D., Karlsson E., Thesleff S. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **68**, 457-469.
11. Strong P. N., Goerke J., Oberg S. G., Kelly R. B. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 178-183.
12. Habermann E., Breithaupt H. (1978) *Toxicon*, **16**, 19-30.
13. Апсалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 1553-1559.
14. Horn M. J., Laursen R. A. (1973) *FEBS Lett.*, **36**, 285-288.
15. Апсалон У. Р., Мещерякова Е. А., Галстухов В. П., Шамборант О. Г., Ивановская Е. Г., Назимов И. В., Ефремов Е. С., Мирошников А. И. (1976) *Советско-американский симпозиум по химии и физике белка. Тезисы докладов*, с. 107-108, Рига.
16. Savige W. E., Fontana A. (1977) in: *Methods in Enzymology* (Hirs C. H. W., ed.), vol. 47, pp. 459-468, Acad. Press, New York - San Francisco - London.
17. Savige W. F., Fontana A. (1976) *J. Chem. Commun.*, 599-600.
18. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алдашова И. А., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Потапенко Н. А., Абдулаев И. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. (1973) *Биохимия*, **38**, 3-21.
19. Назимов И. В., Левина Н. Б., Богданова И. А., Розынов Б. В. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 192-199.
20. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 622-627.
21. Steers E., Jr., Cravan G. R., Anfinsen C. B., Bethune J. L. (1965) *J. Biol. Chem.*, **240**, 2478-2484.

Поступила в редакцию  
9.II.1979

**COMPLETE AMINO ACID SEQUENCE OF PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub> (ISOZYME E3)  
FROM THE VENOM OF MIDDLE ASIAN COBRA *NAJA NAJA OXIANA***

OVCHINNIKOV Yu. A., MIROSHNIKOV A. I., NAZIMOV I. V.,  
APSAŁON U. R., SOLDATOVA L. N.

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

The total amino acid sequence of the phospholipase A<sub>2</sub> (isozyme E3) from the Middle Asian cobra *Naja naja oxiana* venom was determined. Chemical cleavage of the protein at methionine and tryptophan residues, as well as limited tryptic hydrolysis at the arginine and glutamate-specific protease digestion at the glutamic acid residue allowed to isolate large fragments. Sequenator analysis of these fragments resulted in the determination of the primary structure of the protein consisting of 119 amino acid residues.