**Колобанова, Светлана Викторовна.**

## Модифицированные субтилизины в сегментной конденсации пептидов : диссертация ... кандидата химических наук : 02.00.10. - Москва, 1999. - 131 с. : ил.

## Оглавление диссертациикандидат химических наук Колобанова, Светлана Викторовна

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВВЕДЕНИЕ

I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СУБТИЛИЗИНЫ

1.1. Общая характеристика субтилизинов

1.1.1. Строение молекулы субтилизинов

1.1.2. Активный центр и механизм катализа

1.1.3. Зона связывания субстрата и специфичность

1.2. Модификация субтилизинов

1.2.1. Модификация активного центра.

1.2.1.1. Тиолсубтшизин и субтшигаза

1.2.1.2. Свленосубт ил из ии

1.2.1.3. Ангидросубтилизин

1.2.1.4. Модификация остатков А$р32, Н1з64, Абп155

1.2.2. Замены аминокислотных остатков вблизи активного

центра и в зоне связывания субстратов

1.2.3. Мутации в участках связывания ионов Са2+

1.2.4. Модификации в областях, удаленных от активного центра

1.3. Заключение

II. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 63 II. 1.1. Получение и свойства тиолсубтилизина 65 II. 1.2. Тиолсубтилизин как катализатор синтеза различных пептидов 74 II. 2. БВЗ-субтшшзии как возможный катализатор синтеза пептидов

на твердом носителе

II. 2.1. Выбор носителя

II. 2.2. Выбор спейсера

II. 2.3. Модельная реакция

II. 2.4. Двух- и трехстадийная конденсация пептидных сегментов

на аминосилохроме

II.2.5. Отщепление пептида от твердого носителя

II. 3. Заключение 99 III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

III.I. Получение и изучение ферментативных свойств тиолсубтилизина

111,1,1. Получение тиолсубтилизина

III. 1.2. Выделение тиолсубтилизина 104 III, 1,3. Определение ферментативной активности

III. 1.3.1. Определение активности по Glp-Ala-Ala-Leu-pNA

III. 1.3.2. Определение активности по п-нитрофенилацетату

III. 1.3.3. Определение активности по азоказеину

III. 1.4. Определение цистеина

III. 1.5. Определение сульфгидрильных групп 106 III. 1.6. Гидролиз эфиров пептидов и аминокислот

тиолсубтилизином 106 III. 1.7. Синтез пептидов при помощи тиолсубтилизина

(типичная методика)

III. 1.8. Определение выхода пептидов методом ВЭЖХ

III. 1.9. Препаративный синтез Z-Phe-Gly-NIfy

III. 1.10. Препаративный синтез Z-Phe-Ala-Ala-pNA 108 III.2. Конденсация пептидов на твердом носителе под действием SDS-субтилизина

111.2.1. Получение комплекса SDS-субтилизин

111.2.2. Синтез H-Met- Gly-Gly-аминосилохрома

III. 2.2.1. Присоединение Вое-Met-Gly-Gly-ОН к аминосилохрому

III. 2.2.2. Ацетилирование свободных аминогрупп

III. 2.3. Пикриновый тест

III. 2.2.4. Удаление Вос-группы

111.2.3. Синтез Dnp-Alu-Ala-Leu-Met-Gly-Gly-амино-

силохрома

III.2.4. Катализируемый субтилизином гидролиз пептидил-

аминосилохрома

111.2.5. Синтез Dnp-Ala-Ala-Leu-Met-Gly-Gly-aMum-

силохрома

111.2.6. Синтез Boc-Ala-Ala-Leu-Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохрома

111.2.7. Отщепление пептида от твердого носителя с

помощью BrCN

ВЫВОДЫ