

TINH SẠCH VÀ NGHIÊN CỨU MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA PROTEINAZA Ở SÂU XANH, *HELIOTHIS ARMIGERA*

Phạm Thị Trân Châu, Trịnh Hồng Thái
Khoa Sinh, ĐHTH Hà Nội

Sâu xanh, *Heliothis armigera* là côn trùng gây hại thuộc bộ Lepidoptera, tương đối phổ biến ở nhiều nước trên thế giới. Để có thể kiểm soát côn trùng gây hại một cách có hiệu quả, người ta đã sử dụng nhiều loại thuốc hóa học. Điều này đã dẫn tới sự phát triển tính kháng thuốc của côn trùng và đặc biệt là những vấn đề nghiêm trọng về môi trường. Việc phát hiện ra khả năng bảo vệ thực vật nhờ chất ức chế proteinaza (Ryan, 1973; Gatehouse et al., 1979; Broadway et al., 1986...) đã thúc đẩy sự phát triển một phương pháp mới để kiểm soát côn trùng gây hại. Vì vậy cần thiết phải có những hiểu biết đầy đủ về tính chất của các proteinaza ở côn trùng.

Nhiều nghiên cứu về các proteinaza ở ấu trùng thuộc bộ Lepidoptera đã cho thấy các enzym này có tính chất của proteinaza xerin "tương tự triplexin" với pH tối ưu ở vùng kiềm (Miller et al., 1974; Ahmad et al., 1976, 1980; Eguchi et al., 1985; Purcell et al., 1992....). Trong công trình trước (Trịnh Hồng Thái và Phạm Thị Trân Châu, 1993). chúng tôi đã bước đầu nghiên cứu một số tính chất của proteinaza kiềm ở sâu xanh (*Heliothis armigera*) và đã giả thiết trong dịch chiết của sâu xanh có chứa ít nhất 2 proteinaza. Công trình này giới thiệu kết quả tinh sạch và nghiên cứu một số tính chất của các proteinaza này.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng: ấu trùng sâu xanh, *Heliothis armigera* tuổi 5 và 6 lấy từ Viện Bảo vệ Thực vật (Từ Liêm, Hà Nội). Mẫu được chiết, thu dung dịch enzym theo phương pháp đã được mô tả trước đây (Trịnh Hồng Thái và Phạm Thị Trân Châu, 1993).

Hóa chất: Casein của hãng BDH Chemicals Ltd., BAPNa (benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide) của hãng Sigma (St Louis, Mo., USA); Sephadex G-75, DEAE-Sephadex A-50 của hãng Pharmacia Fine Chemicals (Thụy Điển). Các hóa chất khác đều có độ sạch phân tích.

Phương pháp

Xác định hoạt độ enzym: Sử dụng cơ chất Casein, hoạt độ proteolitic được xác định theo phương pháp Anson cải tiến như đã mô tả trước đây (Trịnh Hồng Thái và Phạm Thị Trân Châu, 1993). Sử dụng cơ chất BAPNA, hoạt độ phân giải BAPNA đã được xác định theo phương pháp Erlanger et al. (1961).

Xác định protein: Xác định protein theo phương pháp Lowry (Lowry et al., 1951).

Điện di trên gel poliacrilamit (PAGE): Điện di Page 7,5% theo phương pháp Davis (Davis, 1964). Điện di trên gel poliacrilamit có SDS (SDS - PAGE) thực hiện trên gel bán với 10% acrilamit theo phương pháp của Laemmli (1970). Nhuộm gel bằng dung dịch amino đen 10B 1% trong axit axetic 7%, tẩy màu bằng dung dịch axit axetic 7%.

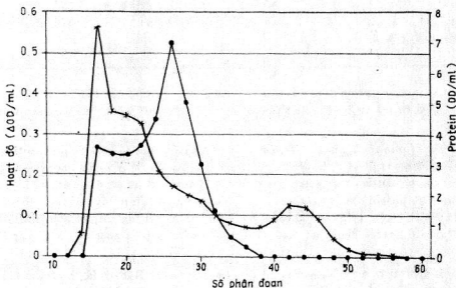
Xác định proteinaza trong gel bằng điện di SDS-PAGE có cơ chất Casein: áp dụng phương pháp của Heussen và Dowdle (1980) để xác định proteinaza trong gel SDS-PAGE 10% với một vài biến đổi sau: Casein được trộn đều với dung dịch poliacrilamit để cho nồng độ cuối cùng 0,2%; nồng độ SDS bằng 0,2% trong đệm điện cực; dung dịch mẫu được trộn với đệm mẫu có SDS (Laemmli, 1970) nhưng không có 2-mecaptoetanol và sau đó hỗn hợp không đun sôi. Sau khi điện di, gel được ngâm 45 phút ở 35,5°C trong triton X-100 2,5% để loại bỏ SDS. Rửa tiếp bằng nước cất trong 30 phút ở cùng nhiệt độ trên, sau đó ủ gel trong đệm điện di pH 8,3 trong 3 giờ ở 35,5°C. Nhuộm gel bằng dung dịch amino đen 10B trong dung dịch có metanol, axit axetic và nước cất theo tỷ lệ 3:1:6. Tẩy màu bằng dung dịch metanol: axit axetic: nước cất (3:1:6). Các băng proteinaza được nhìn thấy như là những dải sáng trên nền xanh sẫm của bản gel.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tinh sạch proteinaza của sêu xanh

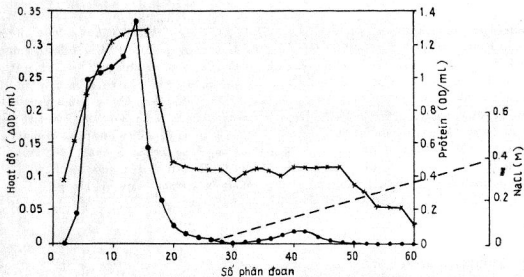
Tóm tắt quá trình tinh sạch proteinaza của sêu xanh tuổi 6 được trình bày ở bảng 1 gồm 2 bước: Sắc ký lọc gel qua Sephadex G-75 và sắc ký trao đổi ion DEAE - Sephadex A-50.

Kết quả sắc ký trên hình 1 cho thấy có 2 đỉnh có hoạt độ proteolytic, ký hiệu HaP-I và HaP-II theo thứ tự rút xuống cột. HaP - II là đỉnh chủ yếu, chiếm 65% hoạt độ lên cột và độ sạch tăng lên 4 lần so với ban đầu. HaP-I chỉ chiếm khoảng 22% hoạt độ ban đầu và hoạt độ riêng lại giảm xuống. Kết quả trên chứng tỏ dịch chiết (DC) có chứa ít nhất 2 proteinaza có khối lượng phân tử khác nhau, HaP-II có khối lượng phân tử nhỏ hơn HaP-I. HaP-II được sắc ký tiếp qua cột trao đổi ion DEAE - Sephadex A-50. Kết quả trên hình 2 cho thấy sau khi sắc ký nhận được 1 đỉnh có hoạt tính proteolytic. Đỉnh này không hấp phụ trên cột và được rút xuống ngay ở bước đầu tiên của quá trình sắc ký. Proteinaza sau khi qua cột đã tách ra khỏi chất màu và một số protein tạp nên hoạt độ riêng của nó đã tăng lên 11 lần.



Hình 1. Sắc ký qua cột Sephadex G-75 sêu xanh tuổi 6, đệm photphat 0,02 M, pH 7,5. Tốc độ chảy 18 ml/giờ. Thể tích mỗi phân đoạn 3 ml. Kích thước cột 1,4 x 95 cm

—●— hoạt độ; —*— protein



Hình 2. Sắc ký qua cột DEAE-Sephadex A-50 sấu xanh tuổi 6, đệm Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. Tốc độ chảy 30 ml/giờ. Thể tích mỗi phân đoạn 2 ml. Kích thước cột 1,1 x 6,5 cm. Đầy bằng Gradient NaCl 0 - 0,4 M. —●— Hoạt độ, —×— Protein; - - - NaCl.

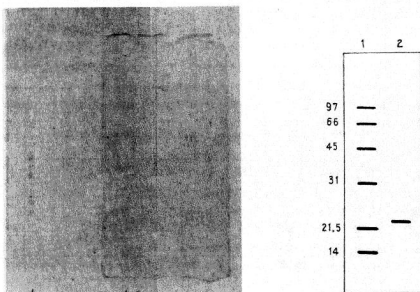
Bảng 1. Tóm tắt quá trình tinh sạch proteinasa của sấu xanh tuổi 6

Các bước tinh sạch	Protein		Hoạt độ		Hoạt độ riêng (U/mg)	Số lần tinh sạch
	mg	%	U	%		
Dịch lên cột	354	100	2,79	100	0,0078	1
Sephadex G-75						
HaP-I	108	30,5	0,63	22,5	0,0058	0,74
HaP-II	55	15,6	1,80	64,5	0,0326	4,18
DEAE-Sephadex A-50						
HaP-II	19,05	5,4	1,64	58,7	0,0861	11,04

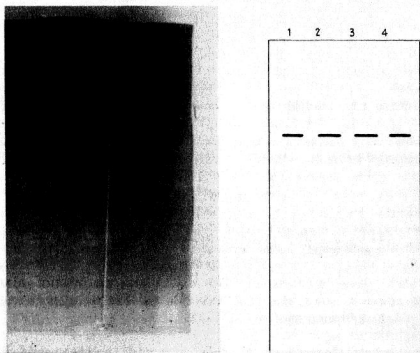
Quá trình tinh sạch proteinasa của sấu xanh tuổi 5 cũng được tiến hành theo cùng một quy trình và điều kiện tương tự như proteinasa của sấu xanh tuổi 6. Tóm tắt quá trình tinh sạch ở bảng 2.

Kết quả sắc ký qua cột Sephadex G-75 chỉ tách được một đỉnh có hoạt độ proteolitic (hình 5), ký hiệu HaP5. Đỉnh này được tinh sạch tiếp qua cột trao đổi ion DEAE - Sephadex A-50 (hình 6). Phần chủ yếu của proteinasa không hấp phụ trên cột đã được rút xuống đầu tiên, ký hiệu HaP5-I, chiếm khoảng 80% hoạt độ xuống cột. Phần hấp phụ trên cột được rút xuống ở nồng độ muối khoảng 0,2M NaCl, chiếm tỷ lệ nhỏ khoảng gần 20% hoạt độ xuống cột, ký hiệu HaP5-II. Đỉnh HaP5-I và HaP5-II đã tách khỏi chất màu và một số protein tạp và hoạt độ riêng tăng lên 5 lần và 3 lần tương ứng.

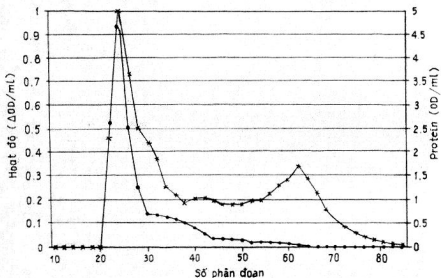
Tiến hành điện di trên gel poliacrilamit các đỉnh HaP-I và HaP-II đã cho thấy; khi điện di PAGE không có cơ chất các đỉnh HaP-I và HaP-II thu được qua sắc ký lọc gel có vài băng protein. Tuy nhiên, sau khi sắc ký qua cột DEAE-Sephadex A-50 đỉnh HaP-II chỉ còn một băng protein kết quả của điện di SDS-PAGE (hình 3). Phân tích proteinasa bằng điện di SDS-PAGE có cơ chất casein đã cho thấy HaP-II chỉ có 1 băng enzym, trong khi HaP-I có ít nhất là 2 băng proteinasa (hình 4).



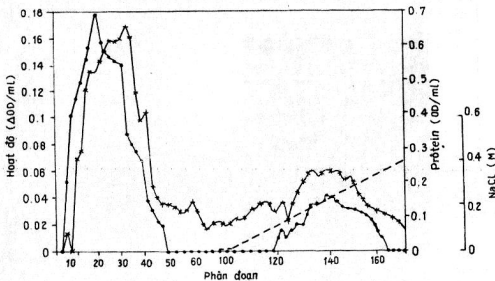
Hình 3. Điện di trên gel poliacrilamit SDS-PAGE, gel 10%
 1. Các protein chuẩn; 2. HaP-II đã qua cột DEAE-Sephadex A-50



Hình 4. Hình ảnh điện di proteinaza ở các bước tinh sạch khác nhau.
 Điện di trên gel poliacrilamit SDS-PAGE, gel 10% có cơ chất casein 0,2%; 1. HaP-I
 2. HaP-II đã qua cột Sephadex G-75; 3. 4. HaP-II đã qua cột DEAE - Sephadex A-50.



Hình 5. Sắc ký qua cột Sephadex G-75 sêu xanh tuổi 5, đệm photphat 0,02 M pH 7,5. Tốc độ chảy 30 ml/giờ. Thể tích mỗi phân đoạn 3 ml. Kích thước cột 2,2 x 60 cm
 —●— hoạt độ, —*— protein.



Hình 6. Sắc ký qua cột DEAE - Sephadex A-50 sêu xanh tuổi 5, đệm Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. Tốc độ chảy 30 ml/giờ. Thể tích mỗi phân đoạn 3 ml. Kích thước cột 1,8 x 10 cm. Đẩy bằng Gradient NaCl 0-0,4 M. —●— Hoạt độ; —*— Protein; --- NaCl.

Để tìm hiểu thêm về các proteinaza tách được, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến hoạt độ proteolytic của mỗi định.

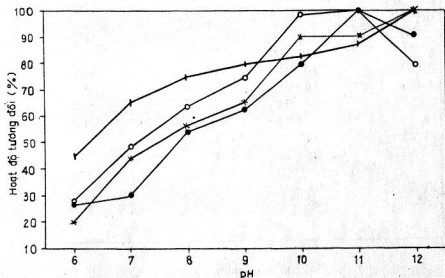
2. pH thích hợp của enzym

Ảnh hưởng của các pH khác nhau lên hoạt độ enzym đã được nghiên cứu sử dụng cơ chất casein. Hình 7 cho thấy pH tối ưu của các proteinaza này đều thuộc vùng kiềm (pH ≥ pH11),

tương tự như pH tối ưu của proteinasa ở dịch chiết. Đáng chú ý là đường biểu diễn ảnh hưởng của pH đến HaP-I và HaP5-II không giảm khi pH tăng dần đến giá trị 12. Điều đó chứng tỏ phần lớn các proteinasa của sấu xanh là proteinasa kiềm.

3. Ảnh hưởng của ion kim loại và một số chất khác đến hoạt độ enzym

Ảnh hưởng của ion kim loại và một số chất khác với nồng độ khác nhau lên hoạt độ enzym được trình bày ở bảng 3. Kết quả cho thấy cũng giống như DC, hoạt độ của chúng bị giảm mạnh dưới tác dụng của ion Hg^{2+} và triptxin inhibitor (TI) đậm tương, nhưng hầu như không thay đổi khi có EDTA $CaCl_2$ và KCN ($10^{-3} M$). Hoạt độ enzym cũng bị ức chế đáng kể bởi iôt.



Hình 7. Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ proteolitic của HaP-I, HaP-II, HaP5-I, HaP5-II
 —●— HaP5-I; —▲— HaP5-II; —×— HaP-I; —○— HaP-II

Bảng 2. Tóm tắt quá trình tinh sạch proteinasa của sấu xanh tuổi 5

Các bước tinh sạch	Protein		Hoạt độ		Hoạt độ riêng (U/mg)	Số lần tinh sạch
	mg	%	U	%		
Dịch lên cột	208,5	100	5,515	100	0,02645	1
Sephadex G-75						
HaP5	67,13	32,2	3,977	72,1	0,05923	2,2
DEAE-Sephadex A-50						
HaP5-I	9,73	4,6	1,324	24,0	0,13599	5,1
HaP5-II	5,09	2,4	0,375	6,8	0,07369	3,1

4. Tính đặc hiệu cơ chất của HaP-I và HaP-II

Cả HaP-I và HaP-II đều phân giải cơ chất BAPNA (cơ chất đặc hiệu của các proteinasa tương tự triptxin). Tuy nhiên, mức độ phân giải có khác nhau. Hoạt độ phân giải casein và hoạt độ phân giải BAPNA của HaP-I và HaP-II được xác định trong cùng điều kiện. Hoạt độ phân giải BAPNA

được tính tương đương với μg tripxin/phút. Kết quả ở bảng 4 cho thấy HaP-II có hoạt độ phân giải BApNA rất mạnh. Mặt khác, tỷ số hoạt độ riêng phân giải BApNA/casein của HaP-II cao hơn so với HaP-I, chứng tỏ HaP-II có ái lực với BApNA cao hơn với casein.

Bảng 3. Ảnh hưởng của ion kim loại và một số chất khác đến hoạt độ enzym

Các chất tác dụng	Nồng độ cuối cùng trong hỗn hợp phản ứng	Hoạt độ còn lại (%)			
		HaP-I	HaP-II	HaP5-I	HaP5-II
Đối chứng		100	100	100 ⁷	100
HgCl ₂	10 ⁻⁴ M	52,9	57,2	k	k
	10 ⁻³ M	10,7	20,5	21,1	15
	5.10 ⁻³ M	2,9	0	k	k
KCN	10 ⁻³ M	104,4	107,2	103,1	k
ZnCl ₂	10 ⁻³ M	k	k	86,3	k
CaCl ₂	10 ⁻³ M	k	k	113,6	116,6
Iot	10 ⁻³ M	50,0	38,5	31,5	k
EDTA	10 ⁻⁴ M	109,3	109,6	k	k
	10 ⁻³ M	101,7	105,1	k	k
	5.10 ⁻³ M	81,9	76,7	77,8	80,0
TI đậu tương	10 g/ml	54,1	52,8	k	k
	100 g/ml	24,4	34,6	25,2	18,3
	333 g/ml	19,1	25,0	k	k

Ghi chú. k: không xác định; TI: Tripxin Inhibitor.

Bảng 4. Hoạt độ phân giải BApNA và casein của HaP-I và HaP-II

	Hoạt độ riêng (casein)	Hoạt độ riêng (BApNA)	Tỷ số hoạt độ riêng (BApNA/casein)
Sephadex G-75			
HaP-I	0,0058	0,661	114,1
HaP-II	0,0326	5,216	160,0
DEAE-Sephadex A-50			
HaP-II	0,0861	15,785	183,3

Như vậy, kết quả nghiên cứu về các proteinasa ở sâu xanh đã cho thấy pH tối ưu của enzym ở trong vùng kiềm ($\text{pH} \geq 11$). Proteinasa kiềm đã được tìm thấy ở nhiều loài côn trùng thuộc bộ Lepidoptera như *Spodoptera litura* (Ahmad et al., 1976, 1980); *Bombyx mori* (Eguchi et al., 1985); *Agrotis ipsilon*, *Heliothis zea*, *Heliothis virescens* (Purcell et al., 1992). Vì vậy, tính chất này của proteinasa ở sâu xanh không phải là trường hợp ngoại lệ.

Kết quả sắc ký đã tách được HaP-I và HaP-II từ sâu xanh tuổi 6. Chúng có chung nhiều tính chất như p H thích hợp, ảnh hưởng của ion kim loại và chất đặc hiệu nhóm, và hoạt độ phân giải BApNA. Tuy nhiên, chúng khác nhau nhất định về mức độ phân giải BApNA. Căn cứ vào tính đặc hiệu cơ chất BApNA và hoạt độ bị giảm mạnh dưới tác dụng của tripxin inhibitor đậu tương

có thể cho rằng cả HaP-I và HaP-II đều có chứa proteinasa xerin "tương tự tripxin". Kết quả điện di phân tích proteinasa trên SDS-PAGE có cơ chất đã phân biệt rõ 1 băng enzym đối với HaP-II và ít nhất 2 băng enzym đối với HaP-I. Như vậy, HaP-II có chứa 1 proteinasa; và HaP-I có chứa ít nhất 2 proteinasa, hoặc nó có cấu trúc bậc 4 và mỗi monome vẫn còn giữ hoạt tính xúc tác sau khi bị phân ly (tuy nhiên trường hợp này ít gặp). HaP-II ở bước tinh sạch cuối cùng chỉ cho một băng protein khi điện di SDS-PAGE, băng này tương ứng với khối lượng phân tử khoảng 23 KDa. Giá trị này tương ứng với enzym "tương tự tripxin" của *Spodoptera litura* (Ahmad et al., 1980) và enzym "tương tự tripxin" của *Apis mellifica* (Giebel et al., 1971) với khối lượng phân tử khoảng 20 KDa.

Trong công trình trước (Trịnh Hồng Thái và Phạm Thị Trân Châu, 1993), chúng tôi nhận thấy có sự biến đổi về hoạt độ proteolitic trong quá trình phát triển của sâu trùng sâu xanh theo tuổi. Hoạt độ phân giải casein cao nhất ở tuổi 6 nếu tính trên con, nhưng nếu tính trên gam trọng lượng cơ thể thì cao nhất ở tuổi 5, sau đó hoạt độ giảm dần trong quá trình biến đổi của sâu sang tiền nhộng. Trong công trình này, chúng tôi không đi sâu nghiên cứu về sự biến đổi này. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu proteinasa của sâu xanh cho thấy sâu xanh tuổi 5 và tuổi 6 đều có chứa ít nhất 2 đỉnh có hoạt độ proteolitic, trong đó, nhiều tính chất đã cho phép giả thiết HaP-II của sâu xanh tuổi 6 tương ứng với HaP5-I của sâu xanh tuổi 5.

KẾT LUẬN

Qua kết quả nghiên cứu về proteinasa của sâu xanh, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Sắc ký qua cột Sephadex G-75 đã tách được từ sâu xanh tuổi 5 một đỉnh protein có hoạt độ proteolitic, ký hiệu HaP-5, chiếm 75% hoạt độ của DC, và từ sâu xanh tuổi 6 hai đỉnh protein có hoạt độ proteolitic, ký hiệu HaP-I và HaP-II tương ứng. Trong đó HaP-II chiếm phần chủ yếu (65% hoạt độ của DC).

2. Sau khi sắc ký tiếp tục qua cột DEAE - Sephadex A-50, HaP-II chứng tỏ đồng nhất khi điện di trên gel poliacrilamit SDS-PAGE, khối lượng phân tử vào khoảng 23 KDa. Điện di phân tích proteinasa trên gel poliacrilamit SDS-PAGE có cơ chất casein đã phát hiện được 1 băng proteinasa từ HaP - II và 2 băng proteinasa từ HaP-I.

3. Các proteinasa tách được đều hoạt động mạnh ở vùng kiềm (pH = 11). Cả HaP-I và HaP-II đều bị ức chế mạnh dưới tác dụng của ion Hg^{2+} và tripxin inhibitor đậu tương.

4. HaP-I và HaP-II đều có hoạt tính phân giải casein và BAPNA. HaP-II có nhiều tính chất của proteinasa xerin "tương tự tripxin" HaP-I có chứa proteinasa xerin "tương tự tripxin" và có thể cả những proteinasa khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Z. Ahmad, M. Saleemuddin, and M. Siddiqi, 1976: Alkaline protease in the larva of the armyworm, *Spodoptera litura*. *Insect Biochem.*, 6: 501 - 505.
2. Z. Ahmad, M. Saleemuddin, and M. Siddi, 1980: Purification and characterization of three alkaline proteases from the gut of the larva of armyworm, *Spodoptera litura*. *Insect, Biochem.*, 10: 667 - 673.
3. R. M. Broadway and S. S. Duffey, 1986: Plant proteinase inhibitors: mechanisms of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.*, 32: 827-833.
4. B. J. Davis, 1964: Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404-427.
5. B. F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen, 1961: the preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95: 271-275.
6. M. Eguchi and K. Kuriyama, 1985: Purification and characterization of membrane-bound alkaline proteases from midgut tissue of the Silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biochem.*, 97: 1437 - 1445.

7. W. Giebel, R. Zwilling and G. Pfeiderer, 1971: The proteolytic enzymes of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* B38: 197-210.
8. A. M. R. Gatehouse, J. A. Gatehouse, P. Dobie, A. M. Kilminster and D. Boulter, 1979: Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. *J. Sci. Food Agr.* 30: 948-958.
9. C. Heusse, E. B. Dowdle, 1980: Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analyt. Biochem.*, 102: 196 - 202.
10. O. H. Lowry, N. J. Rosebough, A. L. Farr, R. J. Randall, 1951: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
11. U. K. Laemmli, 1970: Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680 - 685.
12. C. J. Lens, J. Kang, W. C. Rice, A. H. McIntosh, G. M. Chippendale, and K. R. Schubert, 1991: Digestive proteinases of larvae of the corn earworm, *Heliothis zea*: characterization, distribution, and dietary relationships. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 16: 201-212.
13. W. J. Miller, K. J. Kramer, and J. H. Law, 1974: Isolation and partial characterization of the larval midgut trypsin from the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*, Johansson (*Lepidoptera*: Sphingidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 48B: 117-129.
14. J. Purcell, J. T. Greenplate and R. D. Sammons, 1992: Examination of midgut liminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect. Biochem. Molec. Biol.*, 22 (1): 41 - 47.
15. C. A. Ryan, 1973: Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 24; 173 - 196.
16. Trịnh Hồng Thái, Phạm Thị Trân Châu, 1993: Hoạt độ proteolitic và hoạt độ antiproteolitic của dịch chiết từ sâu xanh (*Heliothis armigera*). *Tạp chí Sinh học*, 15(4): 35 - 40.

VNU,H Journal of science, Nat. sci. t.XI, n°1, 1995

HELIOTHIS ARMIGERA: PURIFICATION OF ITS PROTEINASE AND STUDY OF SOME CHARACTERISTICS

Pham Thi Tran Chau, Trinh Hong Thai
Hanoi University

In our previous study, we suggested that the larval crude extract of *Heliothis armigera* contained at least 2 proteinases. The present paper presents the results of purification of the proteinases and study of some their characteristics.

The two proteolytic activity (PA) peaks were separated by Sephadex G-75 column chromatography, designated as HaP-I and HaP-II. Hydrolytic activity of HaP-II against BApNA and casein represented about 60-65% of total eluted activity. Rechromatography HaP-II through DEAE-Sephadex A-50 column, we have obtained one PA peak which showed one protein band by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis containing 0.2% casein separated two proteinase bands in HaP-I and only one proteinase band in HaP-II. This fact proved that HaP-II has been purified.

Using casein as a substrate, optimal pH of both enzymes was about 11. The activity of HaP-I and HaP-II was strongly inhibited by Hg^{2+} and soybean trypsin inhibitor, but nearly did not change under the effect of EDTA and KCN (10^{-3} M). The about results have demonstrated that HaP-II was a trypsin like - proteinase, HaP-I contained a trypsin like - proteinase and other proteinases.