

CATALYTIC ACTIVITY
OF ASPARTATE AMINOTRANSFERASE MICROCRYSTALS

V. M. Kochkina

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

The enzymic activity of crystalline cytosolic aspartate aminotransferase (L-aspartate: aminotransferase 2-oxoglutarate, EC 2.6.1.1) was determined in suspensions of microcrystals in 50 % ammonium sulphate and 20 % (wt/vol) polyethylene glycol. The crystals (1-2 μm wide) were small enough to preclude diffusional rate limitation. The catalytic activity of the crystalline enzyme is 32 % and 40 % of the enzyme activity in solution, respectively.

1. Doscher M. S., Richards F. M. The activity of an enzyme in the crystalline state: ribonuclease S // J. Biol. Chem.—1963.—238, N 7.—P. 2399—2406.
2. Spilburg C., Bethune J. L., Vallee B. L. Kinetic properties of crystalline enzymes. Carboxypeptidase A // Biochemistry.—1977.—16, N 6.—P. 1142—1150.
3. Kinetic properties of carboxypeptidase B in solution and crystals / G. M. Alter, D. L. Leussing, H. Neurath, B. L. Vallee // Ibid.—1977.—16, N 16.—P. 3663—3668.
4. Kirsten H., Christen P. Catalytic activity of microcrystals of aspartate aminotransferase // Biochem J.—1983.—211, N 2.—P. 427—434.
5. Изменения конформации цитозольной аспаратаминотрансферазы, индуцируемые оксоглутаратом / В. П. Малашкевич, В. М. Кочкина, Ю. М. Торчинский, Э. Г. Арутюнян // Докл. АН СССР.—1982.—267, № 5.—С. 1257—1261.
6. Конформации аспаратаминотрансферазы в кристалле / В. В. Борисов, С. Н. Борисова, Н. И. Сосфенов, Х. Ф. Б. Диксон // Молекуляр. биология.—1983.—17, № 4.—С. 705—713.
7. Jenkins W. T., Yphantis D. A., Sizer I. W. Glutamic aspartic transaminase // J. Biol. Chem.—1959.—234, N 1.—P. 51—57.
8. Bertland L. H., Kaplan N. O. Studies of the conformations of the multiple forms of chicken heart aspartate aminotransferase // Biochemistry.—1970.—9, N 13.—P. 2653—2665.
9. Кочкина В. М. Влияние ионов металлов на размер кристаллов аспараттрансаминазы, получение тяжелоатомных производных кристаллов фермента // Кристаллография.—1983.—28, № 5.—С. 1013—1017.
10. Küick D. M., Cook P. F. pH Studies toward the elucidation of the auxiliary catalyst for pig heart aspartate aminotransferase // Biochemistry.—1983.—22, N 2.—P. 375—382.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва

Получено 27.06.85

УДК 577.112.5:578.841

**СТРОЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ХИМОТРИПТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ
ГРАНУЛИНА ВИРУСА ГРАНУЛЕЗА ОЗИМОЙ СОВКИ,
AGROTIS SEGETUM**

Т. Л. Левитина, Н. В. Роднин, С. Б. Серебряный, Э. А. Козлов

В предыдущей работе [1] описаны результаты выяснения строения триптических пептидов гранулина вируса гранулеза (ВГ) *A. segetum*. В настоящей статье приведены данные, полученные при изучении химотриптических пептидов этого белка.

Материалы и методы. Получение белка, восстановление и карбоксиметилирование описано ранее [1]. Химотрипсин («Reanal», ВНР) обрабатывали ингибитором трипсина из бобов сои [2]. Расщепление химотрипсином проводили в 0,2 н. бикарбонате аммония (рН 7,8), содержащем 2 М мочевины, в течение 22 ч при 37 °С. Фермент-субстратное соотношение 1 : 50. Реакцию останавливали лизофилизацией. Химотрипсиновый гидролизат растворяли в 50 %-ной муравьиной кислоте и разделяли гель-фильтрованием

Таблица 1

Аминокислотный состав некоторых химотриптических пептидов гранулина вируса гранулеза
Amino acid composition of some chymotryptic peptides of the A. segetum granulosis virus gra-

Аминокислота	C1	C1'	C2	C3	C4	C5	C5'	C5''	C5'''	C5''''
Lys				0,9 (1)		2,0 (2)	1,9 (2)	1,7 (2)	1,7 (2)	
His						1,0 (1)	1,1 (1)			1,0 (1)
Arg	1,0 (1)			1,1 (1)		2,0 (2)	2,3 (2)	1,3 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)
Asp			1,0 (1)							
Thr					1,0 (1)					
Ser	0,9 (1)	0,7 (1)			0,6 (1)					
Glu	4,0 (4)	3,2 (3)		1,2 (1)	1,0 (1)					
Pro			1,2 (1)	0,9 (1)	0,7 (1)	1,0 (1)	1,1 (1)	1,2 (1)	1,1 (1)	
Gly	0,9 (1)		1,2 (1)			1,1 (1)	0,9 (1)	1,2 (1)	1,0 (1)	
Ala	2,0 (2)	0,8 (1)	1,0 (1)			2,6 (3)	1,7 (2)	2,7 (3)	2,6 (3)	
1/2 Cys										
Val	3,2 (3)					1,5 (2)	1,6 (2)	1,2 (1)	1,0 (1)	0,6 (1)
Met	1,6 (2)	0,7 (1)								
Ile	4,1 (4)	2,0 (2)			1,1 (1)	0,7 (1)	0,7 (1)			0,6 (1)
Leu				1,1 (1)		1,0 (1)		1,0 (1)	0,9 (1)	
Tyr			0,9 (1)	0,9 (1)		1,0 (1)	1,1 (1)	1,5 (2)	0,8 (1)	
Phe	0,7 (1)		0,8 (1)	0,9 (1)	0,6 (1)					
Trp				+						
Всего	19	8	6	8	6	15	13	12	11	4

Аминокислота	C15	C16	C17	C17'	C18	C19	C19'	C20	C21	C22
Lys		1,0 (1)	1,1 (1)	1,2 (1)		1,1 (1)	1,1 (1)	1,8 (2)		1,0 (1)
His										
Arg	1,0 (1)				1,1 (1)				1,1 (1)	1,1 (1)
Asp			1,1 (1)					2,0 (2)		
Thr	0,9 (1)							1,0 (1)		
Ser			0,8 (1)	0,8 (1)	1,0 (1)	0,9 (1)	0,8 (1)			
Glu						1,1 (1)				
Pro								0,9 (1)	0,9 (1)	
Gly						1,0 (1)	1,0 (1)			
Ala										
1/2 Cys										
Val								1,0 (1)		
Met								1,0 (1)		
Ile			0,9 (1)							
Leu			1,0 (1)		0,9 (1)				1,1 (1)	
Tyr					0,9 (1)					
Phe		0,9 (1)				0,9 (1)				
Trp										
Всего	2	2	5	2	4	5	3	8	3	2

через сефадекс G-25. Материал фракций II и III объединяли и разделяли ионообменной хроматографией на смоле Dowex 50×8. Условия разделения химотриптического гидролизата гель-фильтрованием и ионообменной хроматографией приведены в подписях к соответствующим рисункам. Высоковольтный электрофорез и хроматографию на бумаге FN17 или FN18 («Filtrak», ГДР) проводили в системах растворителей, описанных в предыдущей статье [1]. Методы установления первичной структуры пептидов представлены в этой же работе.

Результаты и обсуждение. Попытка гидролизовать гранулин химотрипсином в течение 6—10 ч без добавки детергентов не привела к желаемому результату. Как показано электрофорезом в полиакриламидном геле, белок при этом расщепляется на крупные фрагменты с молекулярными массами свыше 10 000 и большая часть белка остается негидролизованной (данные не приводятся). Поэтому гидролиз белка химотрипсином проводили в 2 М мочеvine в течение 22 ч. Даже в этих условиях часть белка оставалась нерасщепленной и имелись фрагменты с молекулярными массами 12 000, 10 000 и 8 000.

A. segetum
nulin

C6	C7	C7'	C8	C8'	C9	C10	C10'	C12	C13	C14	
1,0 (1) 1,1 (1)	3,0 (3)	2,1 (2)	1,0 (1) 1,3 (1) 0,7 (1)	1,0 (1) 0,7 (1)	2,3 (2) 1,0 (1) 0,7 (1) 1,2 (1)	1,0 (1) 0,8 (1) 1,3 (1)	0,9 (1) 0,9 (1) 1,1 (1)	0,8 (1) 0,8 (1) 1,2 (1)	1,6 (2) 1,0 (1) 0,9 (1) 1,0 (1) 2,1 (2) 1,0 (1)	1,8 (2) 1,0 (1)	
1,0 (1) 0,9 (1)	1,0 (1)	0,8 (1)	1,0 (1) 0,9 (1)	1,0 (1) 1,1 (1)	1,0 (1) 0,9 (1)	0,8 (1)	+	+	1,1 (1) 0,8 (1) 1,0 (1)	0,9 (1) 0,9 (1)	
4	6	4	7	5	10	5	4	4	10	5	
C23	C24	C25	C25'	C38	C39	C44	C45	C47	C48	C49	
2,0 (2) 1,2 (1) 0,7 (1) 0,9 (1) 2,2 (2)	1,0 (1) 1,0 (1) +(1) 0,7 (1)	3,1 (3) 0,7 (1) 0,7 (1) 4,6 (5) 1,0 (1) 0,8 (1) 0,4 (1) 1,5 (2) 1,9 (2) 0,8 (1) 2,6 (3)	1,0 (1)	1,0 (1) 1,0 (1)	1,1 (1) 2,0 (2) 0,8 (1) 1,0 (1) 1,0 (1)	0,9 (1)	1,0 (1) 1,0 (1) 1,1 (1)	1,0 (1) 1,2 (1) 0,9 (1) 0,8 (1) 0,9 (1) 1,0 (1)	0,9 (1) 2,1 (2) 1,3 (1) 1,3 (1) 0,8 (1) 0,7 (1)	0,8 (1) 1,2 (1) 0,8 (1) 1,2 (1)	(2)
7	4	21	3	2	6	2	6	7	5	2	

Расщепление гранулина трипсином [1] и особенно химотрипсином идет намного хуже, чем расщепление полиэдринов, которые почти полностью гидролизуются этими ферментами в сходных условиях [3—5]. Этот факт чрезвычайно интересен и с той точки зрения, что химотрипсиноподобная протеаза тел включений [6] расщепляет гранулин ВГ *A. segetum* до фрагментов, не обнаруживаемых при электрофорезе в полиакриламидном геле [7], а такая же протеаза гидролизует полиэдрины, в том числе и полиэдрин вируса ядерного полиэдроса (ВЯП) *A. segetum* до 2—5 фрагментов с молекулярными массами от 10 000 до 25 000, не затрагивая часть белка [7, 8].

В связи с наличием больших фрагментов, нерастворимых при pH ниже 7,0, химотриптический гидролизат растворяли в 50 %-ной муравьиной кислоте и разделяли гель-фильтрованием через сефадекс G-25 (рис. 1), уравновешенный 30 %-ной уксусной кислотой. Часть материала в процессе гель-фильтрования осаждалась на колонке. Этот материал вымывали 0,3 н. аммиаком (фракция V). По данным электрофореза в полиакриламидном геле, фракции I и V (рис. 1) содержали

целую полипептидную цепь и ее фрагменты с молекулярными массами 8000—16000.

Фракции II и III объединяли и разделяли ионообменной хроматографией (рис. 2). Нерастворившийся при pH 3,25 материал фракций II+III (Тн) и фракций, полученных ионообменной хроматографией, разделяли далее высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге.

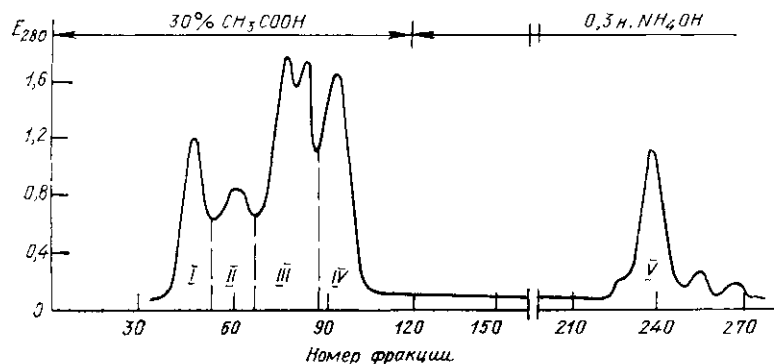


Рис. 1. Разделение химотриптических пептидов на колонке (2,2×60 см) с сефадексом G-25. Скорость элюции 20 мл/ч, объем фракции 6,5 мл.

Fig. 1. Separation of chymotryptic peptides on a 2.2×60 cm column of Sephadex G-25. Flow rate — 20 ml/h. Fraction volume — 6.5 ml.

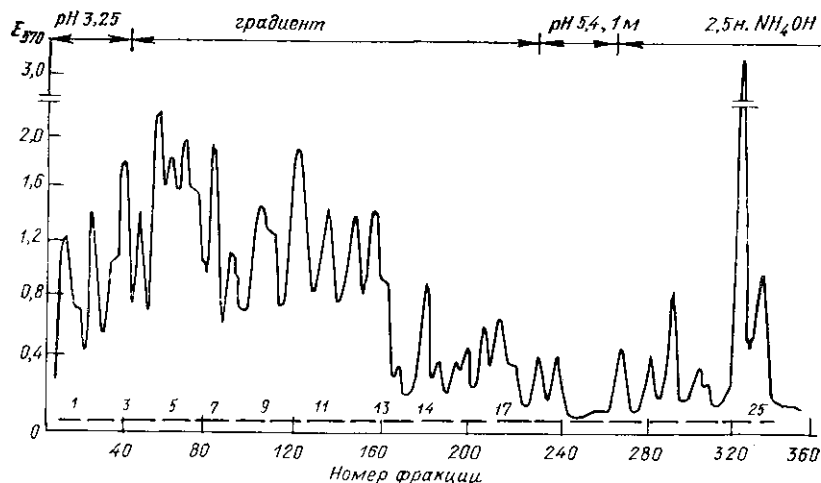


Рис. 2. Разделение химотриптических пептидов фракции II+III (рис. 1) на колонке (1,5×60 см) с AG 50×8. Стартовый буфер: 0,2 М пиридин-формат, pH 3,25; градиент: 0,2 М, pH 3,25→0,5 М, pH 5,4, t — 40 °С. Скорость элюции 26 мл/ч, объем фракции 5,7 мл.

Fig. 2. Separation of chymotryptic peptides of fraction II+III (Fig. 1) on a 1.5×60 cm column of AG 50×8. Start buffer — pyridine-formic acid, pH 3.25; gradient: 0.2 M, pH 3.25→0.5 M, pH 5.4, t — 40 °C. Flow rate — 26 ml/h. Fraction volume — 5.7 ml.

В табл. 1 приведены аминокислотные составы полученных пептидов, в табл. 2 — их строение.

Пептиду С49 приписали строение Phe-Phe, исходя из аминокислотного состава и подвижности при электрофорезе (pH 1,9). При гидролизе гранулина химотрипсином некоторые пептиды (С5, С5''', С12, С15—С17, С19', С22) образовались за счет расщепления связей, специфических для трипсина. Так как мы использовали химотрипсин, обработанный ингибитором трипсина, и сам трипсин очень плохо расщепляет гранулин [1], то можно предположить, что химотрипсин в

Таблица 2

Аминокислотная последовательность некоторых химотриптических пептидов гранулина вируса гранулеза *A. segetum*Amino acid sequence of some chymotryptic peptides of the *A. segetum* granulosis virus granulin

Пептид	Стадия очистки*	Последовательность
C1	Тн, ЭФ1	Asx, Ser, Glx ₄ , Gly, Ala ₂ , Val ₃ , Met ₂ , Ile ₄ , Phe
C1'	Тн, ЭФ1	Ser-Ala-Glx-Ile-Glx-(Glx, Ile)-Met
C2	AG11, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Phe-Thr-Gly-Pro-Ala-Tyr
C3	AG15, ЭФ1	Phe-Asp-Glu-His-Leu-(Pro, Tyr, Trp)
C4	AG3, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Ile-Thr-Glu-Pro-Ser-Phe
C5	AG15, ЭФ1, ЭФ2	Ala-Leu-Gly-Ala-His-(His, Asx, Pro, Ala, Val, Tyr)- Asp-Val-Ile-Arg
C5'	AG15, ЭФ1, ЭФ2	Gly-Ala-His-(His, Arg, Asx ₂ , Pro, Ala, Val ₂ , Ile, Tyr)
C5''	AG15, ЭФ1, ЭФ2	Tyr-Ala-Leu-Gly-(His ₂ , Asx, Pro, Ala ₂ , Val, Tyr)
C5'''	AG11, ЭФ1, ЭФ2	Ala-Leu-Gly-Ala-His-(His, Asx, Pro, Ala, Val, Tyr)
C5''''	AG10, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Asp-Val-Ile-Arg
C6	AG5, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Arg, Asx, Glx, Pro
C7	AG7, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Asx-(Asx, Glx, Phe)-(Asx, Phe)
C7'	AG2, ЭФ1, ЭФ2	Asx-(Asx, Glx, Phe)
C8	AG9, ЭФ1, ЭФ2	Val-(Asx, Thr, Glx, Pro)-(Arg, Phe)
C8'	AG2, ЭФ1, ЭФ2	Val-(Asx, Thr, Glx, Pro)
C9	AG24, ЭФ1, ЭФ2	Lys-Asp-Arg-(Lys, Arg, Ser, Glu, Ala, Ile, Tyr)
C10	AG24, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Leu-Arg-(Glu, Thr)-Trp
C10'	AG24, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Arg-(Glu, Thr)-Trp
C12	AG24, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Lys-Glu-Ile-Arg
C13	AG24, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Lys-Gly-Tyr-(Lys, Asx, Ser, Glx, Gly, Ala, Ile)
C14	AG24, ЭФ1, ЭФ2	Lys-Ile-Lys-Glu-Phe
C15	AG24, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Thr-Arg
C16	AG24, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Phe-Lys
C17	AG24, ЭФ1, ЭФ2	Ile-Asn-Leu-Ser-Lys
C17'	AG15, ЭФ1	Ser-Lys
C18	AG24, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Ser-Leu-(Arg, Tyr)
C19	AG13, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Ser-Gly-Lys-Glu-Phe
C19'	AG13, ЭФ1, ЭФ2	Ser-Gly-Lys
C20	AG23, ЭФ1	Lys ₂ , Asx ₂ , Thr, Pro, Val, Met
C21	AG24, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Arg, Pro, Leu
C22	AG14, ЭФ1, ЭФ2	Asn-Lys
C23	AG10, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Gly-Pro-Gly-(Lys ₂ , Asn, Ser)
C24	AG4, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Thr-Cys-Leu-Gln
C25	AG11, ЭФ1, ЭФ2	Phe-Ile-(Asx ₃ , Thr, Ser, Glx ₅ , Pro, Val, Met, Ile, Leu ₂ , Tyr, Phe ₂)
C25'	AG11, ЭФ1	Phe-Glu-Leu
C38	IV, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Val-Tyr
C39	AG4, ЭФ1, ЭФ2, БХ	(Asp, Pro ₂ , Ala, Val)-Leu
C44	IV, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Gly-Tyr
C45	AG9, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Ser-(His, Arg, Thr, Gly, Ala)
C47	AG10, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Lys-Asx-Leu-Ala-(Asx, Glx, Tyr)
C48	AG24, ЭФ1, ЭФ2	Lys-Leu-Ile-X-Asx-Trp
C49	IV, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Phe-Phe

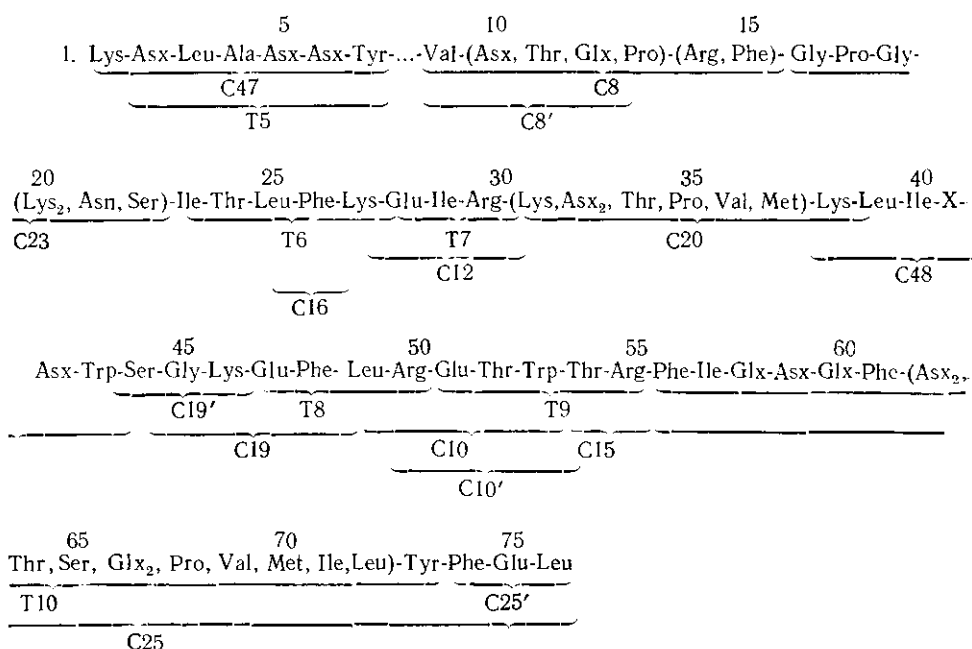
* Обозначения: AG — фракция, полученная ионообменной хроматографией; ЭФ — высоковольтный электрофорез на бумаге в соответствующем электролите [1]; БХ — бумажная хроматография [1]. Стрелкой обозначены стадии ступенчатой деградации по Эдману. Нумерация пептидов произвольная.

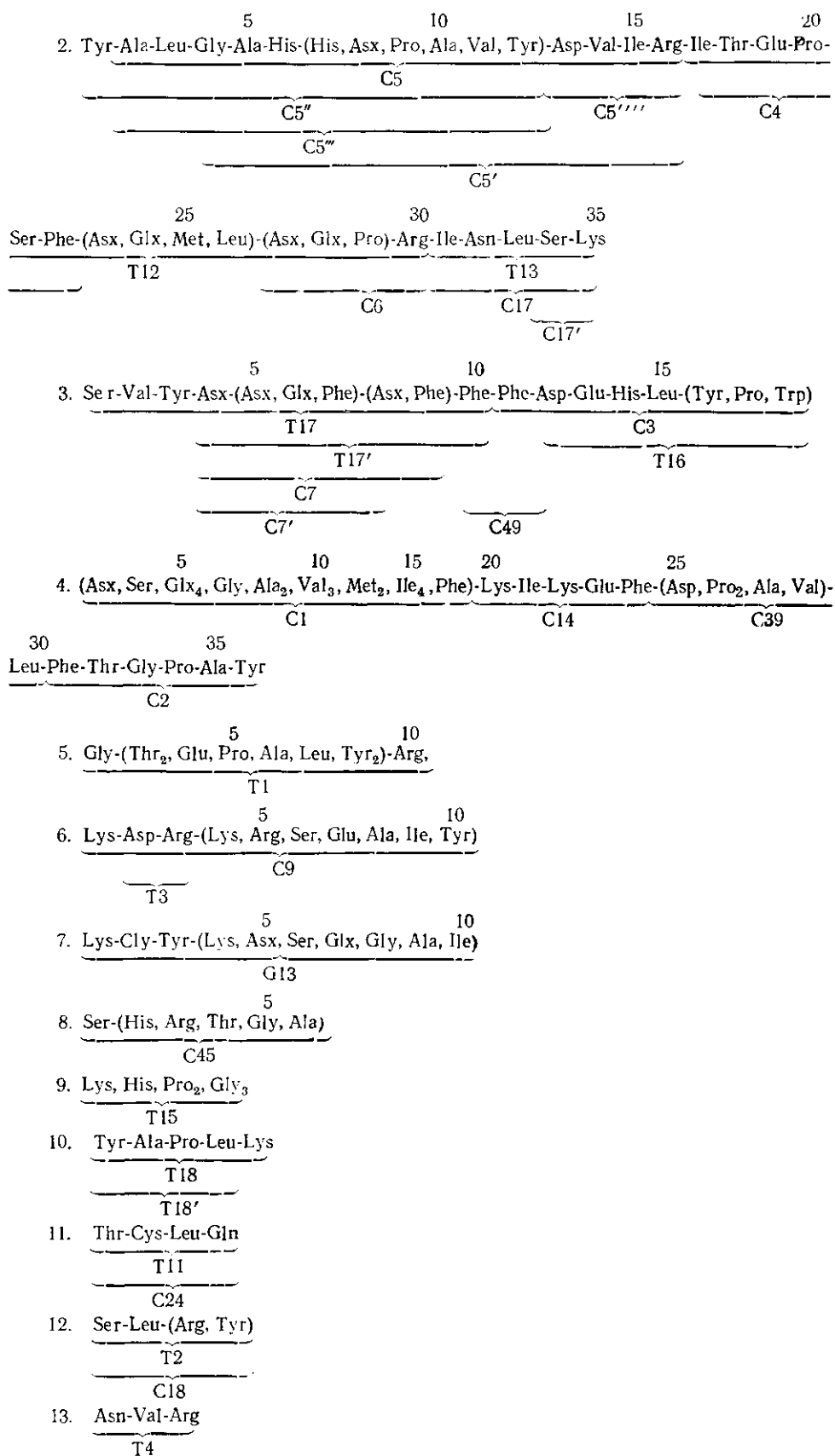
применяемых жестких условиях (2 М мочеви́на, 22 ч) проявляет триптическую активность.

Низким уровнем расщепления гранулина (наличие интактной полипептидной цепи и ее крупных фрагментов) наряду с гидролизом неспецифических для химотрипсина связей, а также высокой степенью ассоциации пептидов можно объяснить низкий выход химотриптических пептидов. Всего получено 42 пептида, насчитывающих 267 остатков аминокислот. 11 пептидов, обозначенных штрихами, имеют аминокислотные последовательности, перекрывающиеся с последовательностями одноименных пептидов без штрихов. 31 пептид с уникальными последовательностями включает 198 остатков, что составляет 85 % всей длины полипептидной цепи белка [7].

При сопоставлении строения химотриптических и триптических пептидов [1] можно отметить, что аминокислотные последовательности некоторых пептидов перекрываются. Однако недостаточное число триптических и химотриптических пептидов, охватывающих только 47 % [1] и 85 % полипептидной цепи соответственно, а также высокая степень неспецифического расщепления не дали возможности получить необходимое для реконструкции число мостиковых пептидов. К тому же сравнение строения химотриптических и триптических пептидов с известными аминокислотными последовательностями полиэдринов ВЯП *Bombyx mori*, *Porthetria dispar* и *Galleria mellonella* [9] показало, что только некоторые пептиды гранулина имеют явное сходство с соответствующими пептидами перечисленных выше полиэдринов (Т6—Т10, С2, С10, С12, С14, С17, С19, С25).

Для полиэдри́на ряда бакулови́русов путем сопоставления триптических пептидов с известной аминокислотной последовательностью полиэдри́на ВЯП *B. mori* [10] можно было реконструировать всю полипептидную цепь [4, 5] или фрагменты полипептидной цепи в том случае, когда были выделены не все триптические пептиды [11, 12]. В случае же гранулина ВГ *A. segetum* таким путем даже при наличии значительного числа триптических [1] и химотриптических пептидов удастся реконструировать только несколько фрагментов. Ниже выписаны реконструированные последовательности аминокислотных остатков фрагментов полипептидной цепи гранулина ВГ *A. segetum* и пептиды с уникальными последовательностями, полученные из совокупности данных по структуре триптических [1] и химотриптических пептидов.





14. Arg, Pro, Leu

C21

15. Asn-Lys

C22

16. Val-I yr

C38

17. Gly-Tyr

C44

Приведенные 17 фрагментов насчитывают в сумме 232 остатка аминокислот, что составляет 98 % полипептидной цепи гранулина [7]. Путем сравнения с известными аминокислотными последовательностями полиэдринов ВЯП *B. mori*, *G. mellonella* и *P. dispar* [9] удается с большей степенью вероятности локализовать фрагмент 1 (соответствующая последовательность в полиэдринах — 46—121), фрагмент 2 (138—172), фрагмент 3 (184—201), фрагмент 4 (209—244). Остальные фрагменты можно распределить вдоль полипептидной цепи в различных вариантах, подсчитывая при этом степень гомологии по принципу, избранному нами для группы полиэдринов [9]. Пропуск в положении 8 фрагмента 1 соответствует остатку метионина в полипептидной цепи полиэдрина ВЯП *B. mori* [10]. В положении 41 этого же фрагмента X обозначает неидентифицированный остаток. Максимальная гомология гранулина ВГ *A. segetum* с полиэдринами перечисленных выше ВЯП находится в пределах 60—65 %. Ясно, что степень гомологии гранулина с полиэдринами при выяснении полной аминокислотной последовательности гранулина не будет превышать 65 %. Это значительно ниже, чем степень гомологии полиэдринов между собой, которая лежит в пределах 80—95 % [9, 11, 12].

Работа по выяснению полной аминокислотной последовательности гранулина ВГ *A. segetum* продолжается.

THE STRUCTURE OF CERTAIN CHYMOTRYPTIC PEPTIDES OF THE *AGROTIS SEGETUM* GRANULOSIS VIRUS GRANULIN

T. L. Levitina, N. V. Rodnin, S. B. Serebryany, E. A. Kozlov

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

42 peptides comprising 267 amino acid residues were isolated from chymotryptic hydrolyzate of the *A. segetum* granulosis virus granulin. 31 unique peptides comprise 198 amino acid residues and account for 85 % of the granulin polypeptide chain.

1. *Строение* некоторых триптических пептидов гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* / Т. Л. Левитина, С. Б. Серебряный, Н. В. Роднин, Э. А. Козлов // Биополимеры и клетка.— 1986.—2, № 1.— С. 30—35.
2. *Кацман М. С., Кавсан В. М., Серебряный С. Б.* Разделение и аминокислотный состав хмотрипсиновых пептидов полиэдренного белка *Borrelinavirus bombycis* // Биохимия.— 1973.—38, № 5.— С. 971—975.
3. *Левитина Т. Л., Козлов Э. А., Серебряный С. Б.* Аминокислотная последовательность некоторых трипсиновых пептидов полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза *B. mori* // Там же.— 1979.—39, № 2.— С. 303—309.
4. *Триптические пептиды* белка тел включений вируса ядерного полиэдроза испарного шелкопряда, *Porthetria dispar* / Т. Л. Левитина, Э. А. Козлов, М. Н. Овандер, С. Б. Серебряный // Биоорг. химия.— 1981.—7, № 7.— С. 985—995.
5. *Триптические пептиды* белка тел включений вируса ядерного полиэдроза большой вошинной моли, *Galleria mellonella* / Н. М. Гусак, Э. А. Козлов, М. Н. Овандер, С. Б. Серебряный // Там же.— С. 996—1007.
6. *Eppstein D. A., Thoma J. A.* Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infected the cabbage looper // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1975.—62, N 2.— P. 478—484.

7. *Некоторые физико-химические свойства белка тел включений вируса ядерного полиэдро́за и вируса грануле́за озимой совки, *Agrotis segetum** / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, С. Б. Серебряный // Биополимеры и клетка.— 1985.—1, № 3.— С. 121—124.
8. *Сравнительное биохимическое исследование полиэдренных белков вирусов ядерного полиэдро́за* / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др. // Биохимия.— 1978.— 43, № 12.— С. 2184—2195.
9. *Сравнение аминокислотной последовательности белков тел включений вирусов ядерного полиэдро́за тутового, непарного шелкопряда и большой вошинной моли* / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др. // Биоорган. химия.— 1981.—7, № 7.— С. 1008—1015.
10. *Реконструкция полипептидной цепи белка тел включений вируса ядерного полиэдро́за тутового шелкопряда. Полная аминокислотная последовательность* / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, М. С. Кацман и др. // Там же.— 1978.—4, № 8.— С. 1048—1083.
11. *Козлов Э. А., Серебряный С. Б.* Строение некоторых триптических пептидов полиэдрина вируса ядерного полиэдро́за капустной совки, *Mamestra brassicae* // Биополимеры и клетка.— 1985.—1, № 4.— С. 194—198.
12. *Строение некоторых триптических пептидов полиэдрина вируса ядерного полиэдро́за озимой совки, *Agrotis segetum** / Н. М. Гусак, Э. А. Козлов, Н. В. Роднин, С. Б. Серебряный // Там же.— № 6.— С. 312—317.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 10.12.84

УДК 577.323.23

УСТОЙЧИВОСТЬ КОМПЛЕКСОВ МЕДИ(II) С ДЕНАТУРИРОВАННОЙ ДНК В РАСТВОРАХ С РАЗНОЙ ИОННОЙ СИЛОЙ

А. П. Бабий, И. А. Багавеев, А. А. Уминский, Г. Н. Саенко

Введение. Физико-химические свойства ДНК определяются рядом условий, к числу которых, несомненно, относится присутствие в растворе низкомолекулярной соли [1, 2]. По существу ДНК *in vivo* можно рассматривать как часть сложной системы: биополимер — ионы — сольватированная вода, при этом изменение термодинамического состояния каждого компонента отражается на состоянии всей системы. Состояние системы биополимер — ионы — сольватированная вода является важным в регуляции активности и точности процессов транскрипции и репликации ДНК [3, 4].

В настоящее время имеется достаточно богатая информация о физико-химических свойствах нативной ДНК (нДНК). Однако данные о физических характеристиках молекул денатурированной ДНК (дДНК) немногочисленны и разноречивы [5]. Это связано с большими трудностями исследования дДНК в растворе. Вместе с тем изучение одностречевой ДНК интересно для понимания процессов передачи генетической информации [6]. Предпосылкой для нашего исследования послужили данные о том, что избыточное поступление в организм соединений меди (II) приводит к дестабилизации ДНК, ингибированию РНК- и ДНК-полимеразной реакций в результате взаимодействия $Cu(II)$ с хроматином [7].

Настоящая работа посвящена исследованию условий образования и устойчивости комплексов меди (II) с дДНК в растворах с разной ионной силой.

Материалы и методы. В работе использовали очищенный препарат ДНК, выделенный из морской звезды *Asterias amurensis* по ранее описанной методике [8]. Содержание ГЦ-пар 41 %, примесь белка не более 1 %. Сохранность двойной спирали подтверждалась следующими показателями: $T_{пл} = 85,3^\circ C$, $T = 9,5^\circ C$, $h = 38\%$, где $T_{пл}$ — температура плавления, T — ее интервал, h — гиперхромный эффект при термической деспирализации ДНК в 0,15 моль/л NaCl.