



УДК 577.152.314\*23 : 577.344.2

ФОТООКИСЛЕНИЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ  
*BACILLUS INTERMEDIUS* 7P И ПОЛУЧЕНИЕ  
ФОТОИНАКТИВИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА ФЕРМЕНТА

Бурименко Б. М., Голубенко И. А., Булгакова Р. Ш.,  
Давыдов Р. Э., Нехорошково Э. М., Валуллина С. Ф.,  
Шлятиков С. В.\*

Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина, Казань;

\*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Фотоокисление РНКазы *Bacillus intermedius* 7P в присутствии сенсibilизирующего красителя метиленового синего при pH 7,5 сопровождается полной инактивацией фермента с константой скорости первого порядка  $0,034 \text{ мин}^{-1}$ . Подобраны условия реакции, позволяющие получать в препаративных количествах с выходом 40% фотоинактивированную РНКазу, необратимо и селективно модифицированную по единственному остатку гистидина-101 активного центра фермента. Способность к комплексообразованию с 3'-GMP у фотоинактивированной РНКазы понижается в 15 раз ( $K_a$   $3,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) по сравнению с нативным ферментом. Физико-химическими, иммунохимическими и иммунологическими методами показано, что фотоокисление не вызывает структурных изменений в молекуле фермента.

Внеклеточная низкомолекулярная ( $M_r$  12 300) рибонуклеаза *B. intermedius* 7P (КФ 3.1.4.23) катализирует расщепление межнуклеотидных связей в молекуле РНК преимущественно после остатков пуриновых нуклеотидов по двухступенчатому механизму, включающему образование олигонуклеотидов с концевыми 2' : 3'-циклофосфатами и гидролиз последних до соответствующих производных 3'-фосфорной кислоты [1]. В отношении динуклеозидфосфатов фермент проявляет ярко выраженную специфичность к гуанозину на 3'-конце фосфодиэфирной связи [2]. Гомополирибонуклеотиды poly(U) и poly(C) наряду с poly(A) и poly(I) также являются субстратами фермента [3]. РНКаза обладает противоопухолевой активностью [4] и является объектом детального структурно-функционального исследования, проводимого различными физико-химическими методами [5—8], включая рентгеноструктурный анализ [9]. Для более глубокого и всестороннего изучения всех аспектов биологических и структурно-функциональных исследований чрезвычайно полезным инструментом является препарат фермента, селективно инактивированный путем модификации по активному центру.

Ранее с помощью селективной химической модификации диэтилпироксикарбонатом было показано, что единственный остаток гистидина-101 расположен в каталитическом участке активного центра РНКазы, его карбэтоксигирование приводит к полной инактивации фермента с образованием двух монокарбэтоксипроизводных; при этом структурных изменений в молекуле белка не происходит [8]. Однако при физиологических значениях pH эти монокарбэтоксипроизводные РНКазы подвергаются спонтанному дезацелированию с восстановлением каталитической активности, что препятствует их использованию в исследованиях механизма биологической активности фермента. С целью получения препарата РНКазы, селективно и необратимо инактивированного по активному центру, нами изучено фотоокисление фермента в присутствии сенсibilизирующего красителя метиленового синего.

Известно, что в белках фотоокислению могут подвергаться остатки гистидина, тирозина, метионина и цистеина [10]. Однако серосодержащие

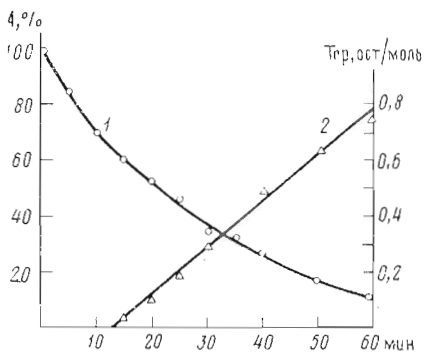


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость остаточной активности РНКазы от времени фотоокисления (1) и динамика окисления остатков триптофана (2)

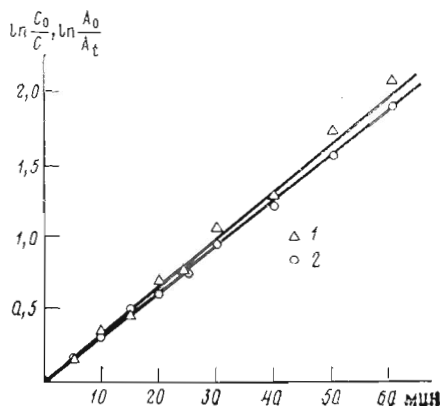


Рис. 2

Рис. 2. Кинетика инактивации РНКазы (1) и образования фотоинактивированного продукта (2).  $A_0$  и  $A_t$  — исходная и остаточная активность РНКазы,  $C_0$  — исходное количество РНКазы,  $C$  — количество фермента, не вступившего в реакцию ко времени  $t$

аминокислотные остатки в составе молекулы РНКазы *B. intermedius* 7P отсутствуют [5], а оптимальные условия для окисления остатков гистидина РНКазы не совпадают с таковыми для окисления остатков тирозина: при pH 7,5 доля непротонированных реакционноспособных остатков гистидина ( $pK$  6,0 [21]) приближается к максимальной (0,97), тогда как остатки тирозина практически полностью протонированы и не реакционноспособны [10]. Так как в водном растворе из семи остатков тирозина РНКазы только один полностью экспонированный обладает нормальным значением  $pK_{\text{каж}}$ , равным 10,1, а остальные имеют аномально высокие значения  $pK_{\text{каж}}$  ( $\sim 12$ ) [6], доля ионизованных остатков тирозина ( $A^-$ ) при pH 7,5 составляет  $2,5 \cdot 10^{-3}$  (рассчитано по формуле  $[A^-] = 1/(1 + [H^+]/K_a)$ , где  $[H^+]$  — концентрация ионов водорода,  $K_a$  — константа диссоциации протонированной формы). Таким образом, потенциальным побочным объектом фотоокисления в молекуле РНКазы *B. intermedius* 7P при pH 7,5 могут оказаться лишь остатки триптофана, реакционная способность которых не имеет выраженной pH-зависимости [10]. Ранее было показано, что из трех остатков триптофана РНКазы только триптофан-93 полностью экспонирован, но его окисление N-бромсукцинимидом не влияет на каталитическую активность РНКазы [7]. Это обстоятельство давало основание рассчитывать на возможность подбора условий высокой селективности фотоокисления при pH 7,5 по остатку гистидина.

Аналитические эксперименты показали, что фотоокисление РНКазы сопровождается инактивацией фермента, причем процесс инактивации подчиняется кинетике первого порядка. Кинетические параметры инактивации РНКазы практически не изменяются в диапазоне концентраций метиленового синего 0,002—0,0125%. Значение константы скорости инактивации составляет  $0,064 \pm 0,006 \text{ мин}^{-1}$ , а время полуинактивации —  $12 \pm 1 \text{ мин}$ .

При 10-кратном увеличении объема реакционной смеси (препаративное фотоокисление) константа скорости инактивации уменьшается до  $0,034 \text{ мин}^{-1}$ , а время полуинактивации увеличивается до 20—21 мин (рис. 1, 1). Такое изменение кинетических параметров связано, по-видимому, с понижением интенсивности аэрации реакционной смеси. Кинетика инактивации при этом идентична кинетике накопления полностью инактивированного (остаточная активность менее 0,1%) продукта с окисленным остатком гистидина (рис. 2). Небольшое отклонение прямых на участке, соответствующем времени фотоокисления свыше 40 мин, может быть вызвано осложнением процесса за счет вовлечения в него дополнительных окисляемых

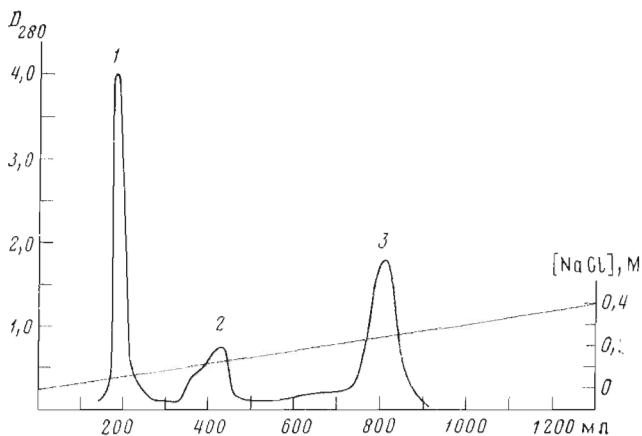


Рис. 3. Хроматография продуктов фотоокисления РНКазы на фосфоцеллюлозе Р-II

групп. Это предположение подтверждается данными по определению количества остатков триптофана, затронутых при разной глубине фотоинактивации фермента (рис. 1, 2). Так, при глубине инактивации, соответствующей 10—15% остаточной каталитической активности в реакционной смеси, содержание триптофана в фотоинактивированной и каталитически активной фракциях РНКазы уменьшается на 0,75—0,85 остатка, причем ферментативная активность в активной фракции сохраняется на 80%. По-видимому, фотоокисление одного остатка триптофана не оказывает существенного влияния на каталитическую активность фермента, как и в случае окисления N-бромсукцинимидом [7]. Из динамики окисления остатков триптофана, представленной на рис. 1, следует, что побочное фотоокисление происходит после достижения 50% глубины инактивации фермента в реакционной смеси. В связи с этим очевидно, что в выбранных нами условиях при фотоокислении РНКазы в течение времени полуинактивации в молекуле фермента происходят минимальные изменения из совокупности теоретически возможных. В этих условиях были получены препараты фотоокисленной РНКазы для более детальной характеристики ее структурных особенностей.

Выделение фотоокисленной РНКазы из реакционной смеси проводили путем хроматографии последней на фосфоцеллюлозе в условиях, описанных ранее для разделения продуктов ацилирования РНКазы [8]. Как видно из рис. 3, наряду с отделением фотосенсибилизатора происходит эффективное фракционирование продуктов фотоокисления фермента. Фотоинактивированная РНКаза элюируется в первых фракциях (пик 1), четко отделяясь от метиленового синего (пик 2) и полностью сохранившего активность фермента (пик 3). Симметричность белковых пиков, соответствующих фотоинактивированной и каталитически активной фракциям РНКазы, свидетельствует об их хроматографической гомогенности. Хроматографическое поведение фотоинактивированной РНКазы и одного из продуктов карбоксилирования по гистидину [8] одинаково и свидетельствует о понижении сродства модифицированного фермента к фосфоцеллюлозе. Таким образом, очевидно, что фотоокислению подвергается фосфатсвязывающий участок активного центра РНКазы.

Согласно данным аминокислотного анализа фракций 1 и 3, в молекуле фотоинактивированной РНКазы отсутствует гистидин, содержание остальных остатков не изменяется. Количественная оценка содержания триптофана показала, что его уменьшение в обеих фракциях не превышает 0,10—0,15 остатка, т. е. находится на уровне ошибки определения. Таким образом, различия в аминокислотном составе фотоинактивированного и нативного фермента минимальны и касаются практически только гистидина-101 активного центра.

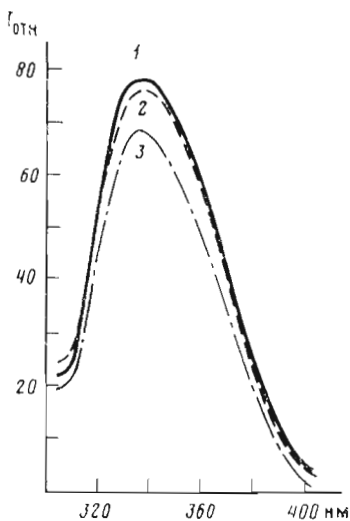


Рис. 4

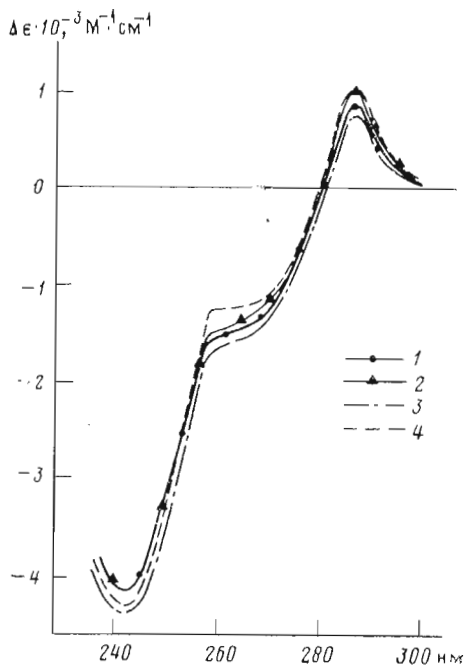


Рис. 5

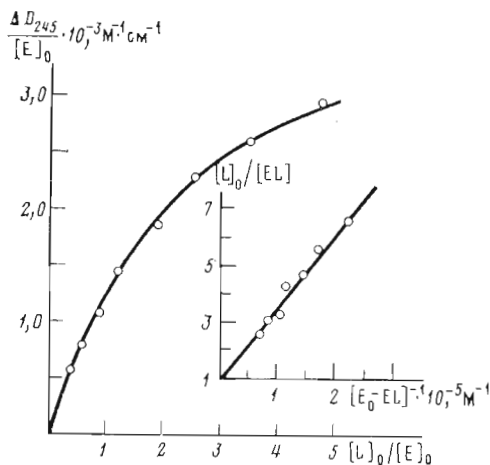


Рис. 6

Рис. 4. Спектры флуоресценции нативной РНКазы (1) и продуктов ее фотоокисления: каталитически активной (2) и фотоинактивированной (3) фракций

Рис. 5. Разностные УФ-спектры комплексов 3'-GMP с фотоинактивированным производным РНКазы (1), с монокарбэтоксипроизводными РНКазы (2, 3) [8] и с нативной РНКазой (4)

Рис. 6. Зависимость разностного молярного поглощения смеси 3'-GMP и фотоинактивированной РНКазы от соотношения нуклеотид/белок. Точками показаны экспериментальные значения, линией — теоретическая кривая, соответствующая значениям  $\Delta\epsilon_{245}$  4100  $M^{-1}\cdot cm^{-1}$  и  $K_a$   $3,8 \cdot 10^4 M^{-1}$ . Вставка: линейризация результатов

Влияние модификации РНКазы на пространственную структуру белка исследовано путем анализа спектров флуоресценции продуктов фотоокисления. Спектр флуоресценции сохранившей каталитическую активность фракции (пик 3, рис. 3) был идентичен спектру нативной РНКазы, в то время как в спектре фотоинактивированного производного наблюдалось тушение флуоресценции на 10—12% при незначительном сдвиге максимума на 1—2 нм в коротковолновую область (рис. 4). Изменения спектра флуоресценции фотоинактивированной фракции РНКазы, вероятнее всего, связаны с локальным изменением микроокружения остатка триптофана, обусловленным окислением гистидина-101.

Одним из критериев сохранения нативной структуры молекулы РНКазы в целом является способность модифицированного по остатку гистидина фермента образовывать комплекс с нуклеотидом, поскольку, как показано ранее, взаимодействие гистидина-101 с фосфорибозильным фрагментом 3'-GMP хотя и увеличивает прочность связывания, однако не является решающим для комплексообразования [2, 8]. Разностный УФ-

Таблица 1

Термодинамические характеристики нативной и фотоинактивированной РНКазы *B. intermedius* 7P

Препарат фермента	Фосфатный буфер, pH 4,5		Ацетатный буфер, pH 4,5	
	$T_d$ , °C	$\Delta H$ , ккал/моль	$T_d$ , °C	$\Delta H$ , ккал/моль
Нативная РНКазы	60,8	140,5	52,8	134,9
Фотоинактивирующая РНКазы	56,0	131,4	52,2	134,3

Таблица 2

Индексы сенсибилизации морских свинок РНКазой *B. intermedius* 7P в перекрестной реакции гиперчувствительности немедленного типа с фотоинактивированным препаратом фермента

Сенсибилизирующий препарат	Разрешающий антиген			
	Нативная РНКазы		Фотоинактивированная РНКазы	
	Индекс интенсивности шока, %	Количество животных	Индекс интенсивности шока, %	Количество животных
Нативная РНКазы	75	12	75	12
Контроль (изотонический раствор NaCl)	0	6	0	6

Таблица 3

Антигенное родство нативной и фотоинактивированной РНКазы *B. intermedius* 7P в перекрестных реакциях гиперчувствительности замедленного типа

Приведены результаты внутрикожных проб (см<sup>2</sup>) при введении нативной (А) или фотоинактивированной (Б) РНКазы

Разрешающие дозы препарата фермента для внутрикожных проб, мкг/животное	Сенсибилизация РНКазой		
	нативной		фотоинактивированной
	А	Б	А
5	0,0	0,0	0,0
10	0,0	0,0	0,26±0,04
25	0,46±0,08	0,49±0,1	0,48±0,08
50	0,73±0,08	—	0,62±0,12

спектр, индуцируемый при образовании комплекса фотоинактивированной РНКазы с 3'-GMP, по форме аналогичен спектрам, полученным при взаимодействии данного лиганда с монокарбэтоксипроизводными РНКазы [8] или с нативным ферментом (рис. 5). Зависимость интенсивности поглощения в разностном спектре комплекса фотоинактивированной РНКазы с 3'-GMP от концентрации нуклеотида при постоянной концентрации белка представлена на рис. 6. Анализ показывает, что тангенс угла наклона зависимости  $[L]_0/[EL]$  от  $[E_0 - EL]$  (рис. 6, вставка) представляет собой константу ассоциации ( $K_a$ ) фотоинактивированной РНКазы с 3'-GMP, а отсекаемый отрезок на оси ординат определяет количество молекул лиганда в комплексе [11]. Фотоинактивированная РНКазы так же, как карбэтоксипроизводные РНКазы [8] и нативный фермент [2], имеет один центр связывания. Значения константы связывания лиганда с фотоинактивированной ( $K_a$   $3,8 \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup>) и карбэтоксигированной ( $4,4 \cdot 10^4$  и  $5,3 \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup>) РНКазой практически одинаковы и примерно в 15 раз ниже, чем константа соответствующего комплекса с нативной РНКазой ( $6,3 \cdot 10^5$  M<sup>-1</sup>) [8].

Таким образом, качественное подобие разностных УФ-спектров, возникающих при комплексобразовании препаратов фотоинактивированной

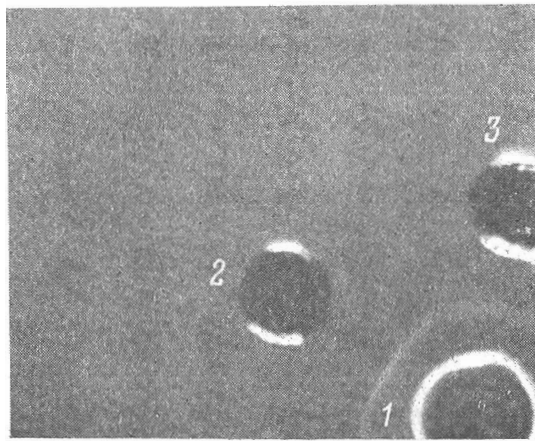


Рис. 7. Иммунопреципитация нативной и фотоинaktivированной РНКазы с антисывороткой против нативного фермента: 1 — антисыворотка, 2 — нативная РНКаза, 3 — фотоинaktivированная РНКаза

и нативной РНКазы с 3'-GMP, свидетельствует об отсутствии существенных изменений в структуре молекулы при фотоокислении. Этот вывод подтверждается термодинамическими характеристиками нативного и фотоинaktivированного фермента (табл. 1), полученными из данных по теплоемкости исследуемых препаратов. Весьма незначительные различия в температуре денатурации ( $T_d$ ) и энтальпии денатурации ( $\Delta H$ ) для нативного и фотоокисленного ферментов в ацетатном буфере позволяют предполагать, что при фотоокислении гистидина не происходит существенных изменений в конформации белка. Сопоставление температур денатурации препаратов в фосфатном и ацетатном буферах показывает, что стабилизирующее действие фосфата проявляется как для фотоокисленного, так и для нативного ферментов, причем  $T_d$  значительно больше увеличивается в последнем случае (на  $8^\circ\text{C}$ ). Это находится в полном соответствии с представлениями о взаимодействии фосфат-иона с гистидином активного центра и уже обсуждавшимися выше данными, свидетельствующими о разрушении этого остатка в молекуле фотоинaktivированной РНКазы. Результаты проведенных исследований подтверждают также выдвинутую ранее гипотезу о механизме функционирования фермента, согласно которой взаимодействие протонированного имидазольного цикла остатка гистидина-101 с фосфодиэфирным фрагментом субстрата вносит дополнительный вклад в энергию связывания при образовании фермент-субстратного комплекса и стабилизирует переходное состояние с пентаковалентным атомом фосфора [8].

Глубина структурных изменений фотоокисленной РНКазы была исследована также с помощью иммунохимических и иммунологических методов, наиболее чувствительных к изменению конформации белковой молекулы. Методом двойной диффузии (иммунопреципитации) в агаре установлено, что фотоинaktivированная и нативная РНКазы образуют с антисывороткой к нативному белку одну общую полосу преципитации (рис. 7), что свидетельствует о качественном родстве антигенных структур нативного и фотоинaktivированного белков. Количественная оценка этого родства была проведена *in vivo* в перекрестных реакциях гиперчувствительности немедленного и замедленного типов. Оказалось, что индекс анафилактического шока в реакции гиперчувствительности немедленного типа, вызванной фотоинaktivированным ферментом при сенсibilизации животных нативным ферментом, совпадает с индексом шока, вызванного нативным ферментом (табл. 2). Степень сенсibilизации животных в перекрестных реакциях гиперчувствительности замедленного типа, определяемая по площади воспаления в месте введения разрешающего антигена,

хорошо совпадает для возрастающих доз разрешающих антигенов (табл. 3). Это однозначно свидетельствует об идентичности антигенных детерминант сравниваемых белков. Учитывая, что антигенность определяется не только природой гаптенных группировок, но и их взаимоотношением с элементами макромолекулы, полученные данные можно рассматривать как свидетельство значительного сходства пространственной организации сравниваемых белков.

Таким образом, реакция фотоокисления в присутствии сенсibilизирующего красителя метиленового синего может быть с успехом использована для необратимой селективной модификации РНКазы *B. intermedius* 7P по гистидину-101 активного центра. Пространственная структура фотоинактивированной РНКазы в пределах чувствительности использованных физических, физико-химических, иммунохимических, иммунологических методов исследования существенно не отличается от структуры нативного фермента.

### Экспериментальная часть

В работе использовали препарат РНКазы *B. intermedius* 7P отечественного производства, дополнительно очищенный до состояния химической гомогенности согласно работе [3]. Гомогенность препарата РНКазы подтверждена результатами электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [12]. Фермент имел следующие спектральные характеристики:  $D_{280}/D_{260} = 2,2$ ,  $D_{280}/D_{250} = 3,9$  (рН 4—8). 3'-GMP (Sigma, США), poly(A) (НИКТИ БАН, г. Бердск) использовали без дополнительной очистки.

Концентрацию нативного фермента, 3'-GMP, poly(A) определяли спектрофотометрически, используя для РНКазы  $\epsilon_{280}$  22 500,  $D_{280}^{0,1\%}$  1,8 (рН 4—8) [3] и  $\epsilon_{280}$  20 800 (рН 3) [7], для 3'-GMP  $\epsilon_{253}$  13 700 [13], для poly(A)  $\epsilon_{260}$  10 100  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$  [14].

Спектры поглощения, разностные спектры поглощения снимали с помощью спектрофотометров Specord UV-VIS (ГДР) и Cary-118 (Varian, США) при 25°С и размере щели 0,8 мм, используя необходимые диапазоны чувствительности прибора.

Спектры флуоресценции снимали в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, рН 4,5, на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4 (Япония) при  $\lambda_{возб}$  295 нм. Относительную интенсивность флуоресценции рассчитывали по сравнению с интенсивностью флуоресценции раствора нативной РНКазы равной концентрации (0,064 мг/мл).

Калориметрические измерения проводили с помощью адиабатического дифференциального сканирующего микрокалориметра ДАСМ-1М. Объем измерительной ячейки 1 мл, скорость прогрева 1 град/мин. Использовали растворы белка с концентрацией 0,08—0,1%. Обработку кривых теплотности проводили согласно [15].

Фотоокисление РНКазы проводили в 0,1 М трис-ацетатном буфере, рН 7,5, при 25—28°С, облучая реакционную смесь лампой мощностью 200 Вт, расположенной на расстоянии 22 см. В аналитических экспериментах объем реакционной смеси, содержащей РНКазу в концентрации 2,5—5,0 мг/мл и метиленовый синий в концентрации 0,002—0,0125%, составлял 2 мл. Аэрация достигалась путем перемешивания на магнитной мешалке при 200—250 об/мин.

*Препаративное получение фотоинактивированной РНКазы.* 200 мг РНКазы в 20 мл 0,1 М трис-ацетатного буфера, рН 7,5, содержащего 0,005% метиленового синего, облучали 20—22 мин лампой мощностью 200 Вт на расстоянии 22 см при 20°С в стакане диаметром 4,6 см при перемешивании со скоростью 300—400 об/мин. Реакционную смесь, сохранившую ~50% остаточной активности, наносили на колонку (1,9 × 26 см) с фосфоцеллюлозой Р-II (Whatman, Англия), уравновешенной 0,1 М натрий-ацетатным буфером, рН 6,0, элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0—0,4 М; 1300 мл) в том же буфере. Скорость элюции 100 мл/ч, объем фракции 10 мл. Фракции, соответствующие пику I, объе-

динями, разбавляли в 2 раза водой, подкисляли до pH 5,5 уксусной кислотой и наносили на колонку ( $0,9 \times 5,0$  см) с фосфоцеллюлозой, уравновешенной 0,1 М натрий-ацетатным буфером, pH 5,5. Колонку промывали 40—50 мл 0,02 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,0, фермент элюировали 0,2 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,0, концентрировали и хроматографировали на колонке ( $3,5 \times 76$  см) с сефадексом G-25 (тонким), уравновешенным 0,01 М ацетатно-аммонийным буфером, pH 5,5. Полученный раствор лиофилизировали. Выход препарата фотоинaktivированной РНКазы составлял  $\sim 40\%$ .

Фракции нативного фермента (пик 3) объединяли, разбавляли водой в 3,5 раза, подкисляли до pH 5,5 и концентрировали на колонке с фосфоцеллюлозой, как описано в работе [3].

За кинетикой инактивации РНКазы при фотоокислении следили, определяя каталитическую активность фермента в аликвотах реакционной смеси (10 мкл), отобранных через фиксированный интервал времени, после разведения 4 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 5,0. Константу скорости инактивации рассчитывали по уравнению

$$k^I = (1/t) \ln (A_0/A_t),$$

где  $A_0$  — исходная активность РНКазы,  $A_t$  — остаточная активность ко времени  $t$ .

*Количественный и качественный анализ продуктов фотоокисления* проводили путем хроматографирования аликвот реакционной смеси (0,5—0,1 мл) на колонке ( $0,8 \times 5$  см) с фосфоцеллюлозой, как описано выше для препаративного эксперимента. Общий объем элюирующего буфера 40 мл, скорость элюции 20 мл/ч.

Кинетика образования фотоинaktivированной РНКазы описывалась уравнением

$$k^I = (1/t) \ln (C_0/(C_0 - C_t)),$$

где  $C_0$  — исходное количество РНКазы в аликвоте реакционной смеси,  $C_t$  — количество фотоинaktivированной РНКазы ко времени  $t$ , определенное после хроматографического разделения аликвоты на фосфоцеллюлозе.

*Количество остатков триптофана* определяли с помощью титрования белка N-бромсукцинимидом [7] в пиковых фракциях с максимальным оптическим поглощением. Фракции подкисляли до pH 3,0 50% уксусной кислотой. Концентрацию белка в пробах определяли, используя коэффициент молярного поглощения  $\epsilon_{262} 14\,900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ , соответствующий изобестической точке на спектрах поглощения РНКазы при ее окислении N-бромсукцинимидом при pH 3 в ацетатном буфере.

*Активность* нативной и модифицированной РНКазы определяли при  $25^\circ \text{C}$  и pH 8,0 по начальной скорости расщепления poly(A) как описано ранее [3]. Активность выражали как изменение поглощения при 283 нм реакционной смеси, содержащей 15 мМ poly(A), отнесенное к концентрации фермента в кювете.

*Аминокислотный анализ* проводили на анализаторе Biotronic LC2000 (ФРГ). Образцы РНКазы гидролизовали 24 ч при  $105^\circ \text{C}$  в 5,6 н. HCl (трижды перегнанной над  $\text{SnCl}_2$ ) в вакууме.

*Константу связывания* фотоинaktivированной РНКазы с 3'-GMP рассчитывали из разностных спектров поглощения комплекса белка с нуклеотидом, используя тандемные кюветы объемом 1 мл с длиной оптического пути для каждого отделения 0,438 см. В качестве растворителя применяли 0,1 М натрий-ацетатный буфер, pH 6,0 содержащий 0,1 М NaCl. Концентрация белка в термостатированных при  $25^\circ \text{C}$  кюветах после смешения с лигандом составляла 16 мкМ, а концентрация нуклеотида варьировала от 5,9 до 75,3 мкМ. Анализ данных проводили по уравнению

$$K_a = [EL]/[E] \cdot [L] = (\Delta D_\lambda / \Delta \epsilon_\lambda) / ([E]_0 - \Delta D_\lambda / \Delta \epsilon_\lambda) ([L]_0 - \Delta D / \Delta),$$



где  $K_a$  — константа связывания,  $\Delta D_\lambda$  — амплитуда разностного спектра поглощения на длине волны  $\lambda$ ;  $[E]_0$  и  $[L]_0$  — исходные концентрации белка и лиганда;  $\Delta \epsilon_\lambda$  — разностный молярный коэффициент экстинкции на длине волны  $\lambda$  [11]. Полученные экспериментальные данные наилучшим образом описываются при использовании значений  $\epsilon_{245}$   $4100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  и  $K_a$   $3,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ .

*Иммунопреципитацию в геле* проводили по Оухтерлони [16].

*Антигенное родство* нативной РНКазы и ее фотоинактивированного производного *in vivo* изучали на 61 морской свинке массой 250—300 г по тестам гиперчувствительности немедленного и замедленного типов [17].

Для изучения гиперчувствительности немедленного типа животных сенсibilizировали на 1, 3, 5 сут опыта подкожным введением рибонуклеазы *B. intermedius* 7P в дозе 2 мг/кг. На 21-е сут у животных вызывали анафилактический шок путем внутривенного введения половине животных разрешающей дозы (2 мг/кг) нативного, а другой половине — фотоинактивированного фермента. Контролем служили две группы животных, которым без предварительной сенсibilизации внутривенно вводили нативную или фотоинактивированную РНКазы в тех же дозах. Интенсивность анафилактического шока рассчитывали по индексу интенсивности шока [18].

Постановку реакции гиперчувствительности замедленного типа осуществляли следующим образом. Три группы по 5 животных в каждой сенсibilizировали нативной и фотоинактивированной РНКазой в дозах 2 мг/кг по 0,1 мл в подушечки четырех лапок. На 15-е сут после начала сенсibilизации делали прямые и перекрестные внутрикожные пробы ферментами в разрешающих дозах 5, 10, 25 мкг/животное. Контролем служили интактные животные, которым делали внутрикожные пробы ферментными препаратами в тех же дозах. Учет кожных реакций (по площади воспаления) проводили через 24 ч после постановки внутрикожных проб.

Достоверность различий между показателями в опытных и контрольных группах животных оценивали с помощью доверительных интервалов [19].

Авторы выражают благодарность М. Я. Карпейскому и Г. И. Яковлеву (Институт молекулярной биологии, Москва) за содействие в работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Булгакова Р. Ш., Лещинская И. Б., Балабан Н. П., Егорова Г. С. Биохимия, 1974, т. 39, вып. 2, с. 299—302.
2. Карпейский М. Я., Ханданян А. Ж., Чепурнова Н. К., Платонов А. Л., Яковлев Г. И. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1669—1679.
3. Голубенко И. А., Балабан Н. П., Лещинская И. Б., Волкова Т. И., Клейнер Г. И., Чепурнова Н. К., Афанасенко Г. А., Дудкин С. М. Биохимия, 1979, т. 44, вып. 4, с. 640—648.
4. Алексеева И. И., Куриченко Б. М., Клейнер Г. И., Скуя А. Ж., Пензикова Г. А., Орешина М. Г. Антибиотики, 1981, вып. 7, с. 527—532.
5. Афанасенко Г. А., Дудкин С. М., Каминир Л. Б., Голубенко И. А., Северин Е. С. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 187—202.
6. Ханданян А. Ж., Дудкин С. М. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 11, с. 1700—1709.
7. Голубенко И. А., Лещинская И. Б., Дудкин С. М. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 8, с. 1201—1208.
8. Голубенко И. А., Лещинская И. Б., Карпейский М. Я., Яковлев Г. И. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 8, с. 1108—1118.
9. Pavlovsky A. G., Vagin A. A., Vainstein B. K., Cherpurnova N. K., Karpeisky M. Ya. FEBS Lett., 1983, v. 162, № 1, p. 167—170.
10. Means G. E., Feeney R. E. Chemical modification of proteins. San Francisco: Holden-Day, 1971.
11. Wu C.-W., Hammes J. J. Biochemistry, 1973, v. 12, № 7, p. 1400—1408.
12. Методы в биохимии. Материалы второго съезда биохимиков Литовской ССР. Вильнюс, 1975, с. 18—21.
13. Handbook on biochemistry and molecular biology. V. 1. Nucleic Acids, 1975, 3rd Edition, CRS Press.
14. Holcomb D. N., Tinoco I. Biopolymers, 1965, v. 3, № 1, p. 121—133.
15. Privalov P. L. Pure and Appl. Chem., 1980, v. 52, p. 479—497.
16. Ouchterlony O. Acta pathol. microbiol. scand., 1953, v. 32, p. 231—240.

17. Адо А. И. Общая аллергология. М.: Наука, 1978.  
18. Шляхов Э. П. В кн.: Антракс. Клиппинев, 1964, с. 62.  
19. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Наука, 1962, с. 16—23.

Поступила в редакцию  
24.IX.1985

PHOTOOXIDATION OF *BACILLUS INTERMEDIUS* 7P RIBONUCLEASE  
AND PREPARATION OF THE PHOTOINACTIVATED ENZYME

KURINENKO B. M., GOLUBENKO I. A., BULGAKOVA R. Sh.,  
DAVYDOV R. E., NEKHOROSHKOVA Z. M., VALIULLINA S. F.,  
SHLYAPNIKOV S. V. \*

*V. I. Ulyanov-Lenin State University, Kazan; \* Institute of Molecular Biology,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Photooxidation of *B. intermedius* 7P RNase at pH 7,5 in the presence of Methylene Blue is accompanied with a complete enzyme inactivation, the first-order rate constant being  $0,034 \text{ min}^{-1}$ . The conditions are specified that provide in preparative amounts and 40% yield the photoinactivated RNase irreversibly and selectively modified at the active site His-101. The photoinactivated enzyme, as compared to native one, has a 15-fold diminished capacity for complexing 3'-GMP ( $K_a$   $3,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ ). The physicochemical, immunochemical and immunological methods showed that the conformation of the photoinactivated RNase did not change.