



УДК 577.152.31\*273.088.2

ВЫДЕЛЕНИЕ, АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНОЙ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ И КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ  
РИБОНУКЛЕАЗЫ  $Th_1$  ГРИБА *TRICHODERMA*  
*HARZIANUM-01*

Безбородова С. И., Василева-Тонкова Е. С., Поляков Ю. М.\*,  
Шляпников С. В.\*\*

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и селекции  
промышленных микроорганизмов Милмедбиопрома, Москва; \* Институт  
кристаллографии Академии наук СССР, Москва; \*\* Институт молекулярной  
биологии Академии наук СССР, Москва

Разработана схема препаративного выделения РНКазы  $Th_1$  из фильтрата культуральной жидкости гриба *Trichoderma harzianum-01*, позволяющая получить гомогенный фермент с выходом более 50%. Последовательное использование хроматографии на СМ-целлюлозе при рН 5,1, а также на DEAE-целлюлозе при рН 7,3 и рехроматографии на СМ-целлюлозе при том же значении рН привело к ~7500-кратной очистке и выделению фермента с уд. акт. ~4500 Е/мг. Показано, что РНКазы  $Th_1$  является щелочным белком с рI 9,5. Определена полная аминокислотная последовательность РНКазы. Белок содержит 106 аминокислотных остатков: 2 Asp, 6 Asn, 9 Thr, 12 Ser, 2 Glu, 1 Gln, 4 Pro, 16 Gly, 14 Ala, 4 Cys, 7 Val, 5 Pe, 2 Leu, 7 Tyr, 6 Phe, 2 His, 4 Lys и 3 Arg ( $M_r$  10747). Проведено сравнение первичных структур РНКазы  $Th_1$  и ряда других внеклеточных гуанилсцифических РНКаз грибов и показано, что эти ферменты гомологичны и входят в одно семейство белков. Выращены монокристаллы РНКазы, принадлежащие к пространственной группе  $P3_221$ , с параметрами элементарной ячейки  $a=b=55,7$ ,  $c=80,1$  Å.

Ферменты метаболизма нуклеиновых кислот, в частности рибонуклеазы (РНКазы), выполняют в организме ключевые функции, непосредственно связанные с процессами реализации генетической информации. В последние годы достигнуты существенные успехи в исследовании строения и изучения физико-химических свойств РНКаз, понимании структурно-функциональных основ специфичности и эффективности ферментативного катализа. РНКазы находят широкое применение в качестве аналитических инструментов генетической инженерии, в биоорганической химии и молекулярной биологии, являются объектом биотехнологического производства, представляя собой перспективные противовирусные лекарственные средства.

Внимание многих исследователей привлечено в настоящее время к изучению структуры внеклеточных РНКаз микроорганизмов, которые объединяют в одно семейство подгруппы гомологичных ферментов про- и эукариотического происхождения и которые являются удобной моделью анализа молекулярной эволюции белков. Проведение такого рода исследований, как и решение задач практического использования РНКаз, в значительной степени определяется доступностью ферментов в высокоочищенном состоянии.

Задачи данной работы: 1) разработка крупномасштабного метода выделения внеклеточной РНКазы гриба *Trichoderma harzianum-01* (РНКазы  $Th_1$ ), 2) определение аминокислотной последовательности фермента, 3) получение монокристаллов белка с целью исследования его трехмерной структуры.

Мицелиальные грибы рода *Trichoderma* продуцируют и секретируют в ходе роста в культуральную среду РНК-деполимеразы [1], сходные по ряду характеристик с описанными в литературе РНКазами других микроорганизмов [2, 3]. Наибольшей ферментативной активностью обладает

Схема выделения РНКазы Th<sub>1</sub>

Стадия очистки	Объем, мл	Активность, Е	Количество белка, мг	Уд. акт., Е/мг белка	Степень очистки	Выход, %	
						по активности	по белку
1. Фильтрат культуральной жидкости *	42 475	936 000	1 568 888	0,6	1	100	100
2. Хроматография на СМ-целлюлозе *	1280	584 000	6336	92	154	62	0,4
3. Хроматография на DEAE-целлюлозе	1685	620 750	806	770	1283	66	0,05
4. Рехроматография на СМ-целлюлозе	53	504 000	112	4500	7500	54	0,007

\* Суммарные данные после проведения трех ферментаций.

штамм гриба *T. harzianum*-01, который и отобран в качестве продуцента РНКазы Th<sub>1</sub> для дальнейшей работы.

Ранее, анализируя поведение РНКазы Th<sub>1</sub> в условиях хроматографии на катионо- и анионообменных целлюлозах, авторы предположили, что исследуемый фермент — щелочной белок, изоэлектрическая точка которого находится при значениях pH выше 8,0 [4]. Это свойство белка отличает его от всех описанных к настоящему времени внеклеточных РНКаз грибов, так как, согласно имеющимся в литературе сведениям, РНКазы микроорганизмов чаще всего являются кислыми белками [2, 3]. Традиционные методы выделения внеклеточных кислых РНКаз грибов, как правило, многостадийны и трудоемки. Основные этапы их очистки обычно включают высаливание белков из культуральной жидкости сульфатом аммония, несколько стадий хроматографий на DEAE-целлюлозе в нейтральной среде и СМ-целлюлозе в кислых условиях, а также многочисленные процедуры обессоливания и концентрирования растворов. Придерживаясь в основном этой схемы, авторы работы [4] получили аналитические количества частично очищенного препарата РНКазы Th<sub>1</sub> (степень очистки ~1000) с уд. акт. ~215 Е/мг белка.

При разработке крупномасштабного регламента выделения РНКазы Th<sub>1</sub> мы, основываясь на информации о хроматографических свойствах белка в условиях ионного обмена и эффективности используемых ранее отдельных этапов очистки [4], исключили ряд трудоемких и требующих больших затрат времени стадий (фракционирование с помощью сульфата аммония, обессоливание гелем-фильтрацией на сефадексе и ультрафильтрацию) и ограничились применением лишь трех процедур (табл. 1).

Низкая концентрация солей в фильтрате культуральной жидкости обеспечивает возможность проведения на начальной стадии очистки быстрого и эффективного концентрирования фермента методом ионообменной хроматографии в объеме с использованием СМ-целлюлозы при слабощелочных значениях pH. Одновременно достигается очистка РНКазы в ~150 раз.

Вторая стадия выделения РНКазы сводилась к пропусканию раствора фермента через колонку с DEAE-целлюлозой в условиях (см. «Экспериментальную часть»), при которых РНКазы Th<sub>1</sub> не взаимодействуют с DEAE-целлюлозой, в то время как часть сопутствующих примесей сорбируется на колонке. При этом достигается дополнительная 8–9-кратная степень очистки фермента. Рехроматография РНКазы на СМ-целлюлозе в слабощелочной или нейтральной среде при последовательной элюции в градиенте концентраций трис-НСl-буфера и NaCl соответственно (рис. 1) в свою очередь приводит к очистке фермента за один этап еще в ~6 раз. Выделение РНКазы на двух последних стадиях проходит практически без потерь ферментативной активности.

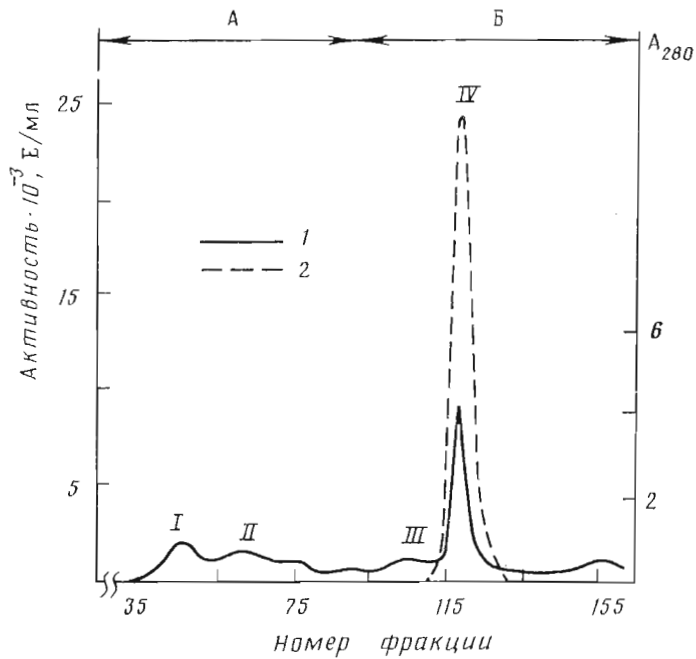


Рис. 1. Хроматография РНКазы  $Th_1$  на колонке ( $3 \times 8,5$  см) с СМ-целлюлозой в градиенте концентрации трис-НСl-буфера, рН 7,3 (10→50 мМ) (А) и градиенте концентрации NaCl (0→0,2 М) в 50 мМ трис-НСl, рН 7,3 (Б). Скорость элюции 70 мл/ч, объем фракций 5 мл. Приведен контроль по поглощению (1) и активности (2)

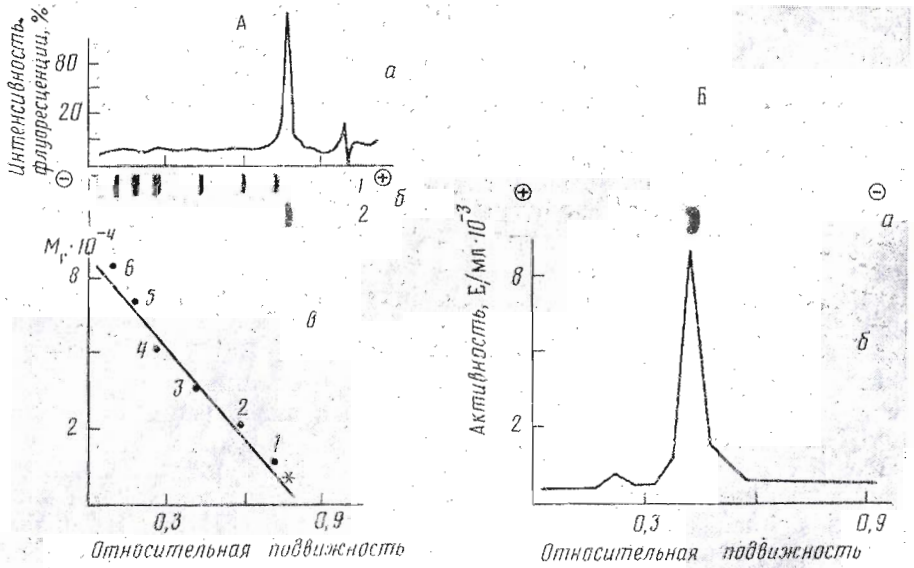


Рис. 2. Электрофоретический анализ РНКазы  $Th_1$  в ПААГ. А — электрофорез денатурированной РНКазы в 12,5% ПААГ в присутствии 0,1% SDS, рН 8,5. Показано сканирование геле-электрофореграммы флуорескаминмодифицированной РНКазы  $Th_1$  (а); детекция в геле с помощью кумасси голубого R-250 РНКазы  $Th_1$  (2б) и смеси стандартных белков (1б); зависимость  $\lg M_r$  белков-стандартов (1—6 см. «Экспер. часть») от их электрофоретической подвижности относительно бромфенолового синего (в). Звездочкой показано положение РНКазы  $Th_1$  на калибровочной прямой. Б — электрофорез нативной РНКазы  $Th_1$  в 10% ПААГ в присутствии 0,9 М  $CH_3COOH$ , 43 мМ N,N-тетраметилэтилендиамин (рН 4,3). Показана детекция РНКазы в геле при окрашивании кумасси голубым R-250 (а) и ферментативная активность РНКазы во фракциях препаративного геля после электрофоретической элюции (б). Электрофоретическая подвижность белка выражена в отношении к подвижности родамина 6Ж

Аминокислотный состав РНКазы Th<sub>1</sub>

Аминокислота	Количество аминокислотных остатков, моль/моль белка			
	Время гидролиза 6 н. HCl		Расчетное значение	Данные первичной структуры
	24 ч	72 ч		
Asp	8,1 *	7,7 *	8	2
Asn	—	—	—	6
Thr	8,3	7,8	9	9
Ser	12,0	11,0	12	12
Glu	3,2 *	3,4 *	3	2
Gln	—	—	—	1
Pro	3,8	3,5	4	4
Gly	14,9	14,0	15	16
Ala	14,2	13,6	14	14
Cys	3,1	2,8	4	4
Val	5,0	5,8	6	7
Met	0	0	0	0
Pe	3,1	3,7	4	5
Leu	2,1	2,2	2	2
Trp	0	0	0	0
Tyr	5,6	5,3	6	7
Phe	5,0	5,0	5	6
His	3,0	2,9	3	2
Lys	4,0	3,8	4	4
Arg	2,9	3,0	3	3
Сумма остатков			102	106
<i>M<sub>r</sub></i>			10 318	10 747

\* Суммарное содержание соответствующей кислоты и амида.

Предложенная схема выделения позволяет очистить РНКазу Th<sub>1</sub> в ~7500 раз и получить ~100 мг белка с уд. акт. ~4500 Е/мг и выходом более 50%. Следует также отметить, что технологичность предложенного метода позволяет изменять масштаб выделения РНКазы Th<sub>1</sub> в широких пределах.

Согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях или в отсутствие SDS (рис. 2), выделенный препарат фермента гомогенен и представляет собой белок с молекулярной массой ~10 000 Да.

РНКазы Th<sub>1</sub> расщепляет ролу (I), динуклеозид-3',5'-монофосфаты серии GrN, слабо действует на гуанозин-2',3'-циклофосфат и, следовательно, является гуанилспецифичным ферментом с КФ 3.1.27.3 [5]. Она имеет высокую трансферазную и низкую гидролазную активности и расщепляет с максимальной скоростью GrC, обладая наибольшим сродством к нему [5].

Фермент термостабилен при 40–50° С и устойчив при длительном хранении в лиофилизированном состоянии или в водных растворах, содержащих 40% глицерина. Так, в 40% растворе глицерина в 50 мМ трис-HCl-буфере, рН 7,3, содержащем 0,15 М NaCl, активность РНКазы не изменялась в течение 8 мес хранения при –10° С. В то же время активность РНКазы при лиофильной сушке существенно зависит от концентрации белка. При наличии в водном растворе ~100 мкг белка/мл в ходе лиофилизации терялось более 50% активности, а при лиофилизации растворов фермента с содержанием в них ~1 мг белка/мл исходная активность после сушки практически не менялась.

УФ-спектр РНКазы Th<sub>1</sub> близок к спектру внеклеточных гуанилспецифичных РНКаз пенициллов [3, 6] и имеет два характеристических экстремума при 278 и 250–252 нм,  $A_{\max}/A_{\min}=3,42$  (рис. 3). Судя по форме спектра, РНКазы Th<sub>1</sub> не содержит остатков триптофана.

Согласно данным аминокислотного анализа (табл. 2), молекула фермента состоит из 102 остатков аминокислот, а молекулярная масса составляет 10 318 Да. Эти значения находятся в хорошем соответствии с резуль-

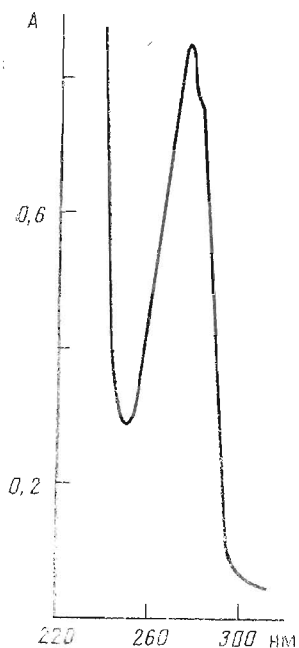


Рис. 1

Рис. 3. УФ-спектр РНКазы Th<sub>1</sub>.  
Условия: 10 мМ трис-НСl-буфер,  
рН 7,3, содержащий 30 мМ NaCl.  
Концентрация белка ~0,085%

Рис. 4. Изоэлектрическое фокусирование РНКазы Th<sub>1</sub>: градиент рН (1), ферментативная активность (2)

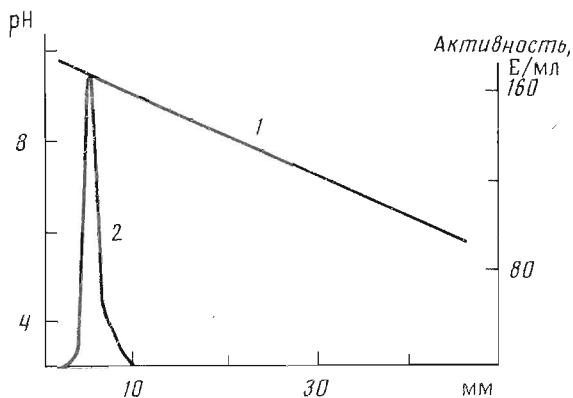


Рис. 2

татами определения молекулярной массы РНКазы Th<sub>1</sub> при электрофорезе в присутствии SDS (~10 000 Да) и данными исследования первичной структуры белка (см. ниже рис. 5: 106 остатков аминокислот, 10 747 Да). РНКаза отличается от кислых внеклеточных гуанилспецифичных РНКаз грибов высоким содержанием основных и более низким содержанием дикарбоновых аминокислот, что находит отражение в изоэлектрической точке фермента, равной 9,5 (рис. 4). Таким образом, РНКаза Th<sub>1</sub> — более щелочной белок, чем все описанные ранее гуанил-РНКазы грибов, и по изоэлектрической точке приближается к панкреатическим РНКазам животных. В связи с этим представляется особенно интересным анализ первичной структуры белка и поиск условий выращивания монокристаллов фермента для его рентгеноструктурного исследования.

Данные аминокислотного состава РНКазы Th<sub>1</sub> являются отправной точкой при анализе аминокислотной последовательности белка. Молекула фермента не содержит остатков метионина и триптофана, существенных в качестве потенциальных сайт-специфических центров расщепления полипептидной цепи РНКазы химическими реагентами. Отсюда особую значимость приобретает локализация в первичной структуре белка остатков лизина, аргинина и глутаминовой кислоты, важных для использования ферментативных методов гидролиза РНКазы.

В ходе автоматической деградации по Эдману карбоксиметилированного препарата РНКазы Th<sub>1</sub> (СМ-РНКаза) при проведении 73 циклов секвенирования нам удалось идентифицировать 71 аминокислотный остаток (см. рис. 5, табл. 3), а также локализовать положение всех четырех остатков лизина (Lys<sup>7</sup>, Lys<sup>50</sup>, Lys<sup>54</sup> и Lys<sup>66</sup>), двух остатков глутаминовой кислоты (Glu<sup>45</sup> и Glu<sup>58</sup>) и двух остатков аргинина (Arg<sup>27</sup> и Arg<sup>48</sup>). Автоматическая деградация по методу Эдмана смеси пептидов, полученных при триптическом гидролизе остаточных продуктов секвенирования СМ-РНКазы на данной стадии анализа (рис. 5, табл. 4), позволила расширить результаты исследования первичной структуры белка. В этом случае секвенированию подвергались одновременно три пептида. Два пептида являются продуктами расщепления полипептидной цепи РНКазы по остаткам: Arg<sup>27</sup> — Arg<sup>48</sup> (Arg<sup>48</sup> — остаток аргинина, локализованный в С-концевой области). Их структура, полная в одном случае и частичная в другом, известна из результатов анализа аминокислотной последовательности при

Анализ продуктов автоматической деградации по Эдману СМ-РНКазы Th<sub>1</sub>

Цикл деградации	Аминокислота	Выход, имоль	Методы идентификации	Цикл деградации	Аминокислота	Выход, имоль	Методы идентификации
1	Asp	75	A, T	38	Pro	25	G, T
2	Thr	60	A, T, G	39	His	—	A
3	Ala	90	G, A, T	40	Val	23	G, A, T
4	Thr	63	A, T, G	41	Tyr	19	G, A, T
5	Cys	54	A, T, G	42	Asn	14	A, T
6	Gly	61	A, T, G	43	Asn	17	A, T
7	Lys	46	A, T	44	Tyr	19	G, A, T
8	Val	82	G, A, T	45	Glu	15	A, T
9	Phe	65	G, A, T	46	Gly	11	A, T, G
10	Tyr	69	G, A, T	47	Phe	18	G, A, T
11	Ser	47	A, T, G	48	Arg	—	A
12	Ala	74	G, A, T	49	Phe	17	G, A, T
13	Ser	49	A, T, G	50	Lys	9	A, T
14	Ala	73	G, A, T	51	Gly	9	A, T, G
15	Val	60	G, A, T	52	Leu	15	G, A, T
16	Ser	37	A, T, G	53	Ser	7	A, T, G
17	Ala	52	G, A, T	54	Lys	8	A, T
18	Ala	56	G, A	55	Pro	10	G, T
19	Ser	40	A, T, G	56	Phe	11	G, A, T
20	Asn	28	A, T	57	Tyr	8	A, T, G
21	Ala	57	G, A, T	58	Glu	8	A, T
22	Ala	54	G, A	59	Phe	11	G, A, T
23	Cys	32	A, T, G	60	Pro	9	G, T
24	Asn	25	A, T	61	Ile	10	G, A, T
25	Tyr	40	G, A, T	62	Leu	9	A, G
26	Val	43	G, A, T	63	Ser	5	A, T, G
27	Arg	—	A	64	Ser	5	A, T, G
28	Ala	46	G, A, T	65	Gly	6	A, T, G
29	Gly	25	A, T, G	66	Lys	4	A, T
30	Ser	23	A, T, G	67	Thr	4	A, G
31	Thr	18	A, T, G	68	Tyr	7	A, T
32	Ala	36	G, A, T	69	Thr	4	A, G
33	Gly	20	A, T, G	70	Gly	3	A, T
34	Gly	19	A, G	71	(Gly)	4	A
35	Ser	16	A, T, G	72	(Ser)	3	A
36	Thr	17	A, T, G	73	Pro	5	G, T
37	Tyr	21	A, T, G				

Примечания. A — аминокислотный анализ, G — ГЖХ, T — ТСХ. Выход производных Arg и His количественно не обсчитывался. Идентификация аминокислот, заключенных в скобки, неоднозначна. Выход аминокислот определен по первому из перечисленных методов идентификации.

Таблица 4

Анализ продуктов автоматической деградации по Эдману смеси пептидов триптического гидролизата модифицированной флуорескаминном СМ-РНКазы Th<sub>1</sub>, подвергнутой предварительно 73 циклам секвенирования (см. табл. 3)

Цикл деградации	Аминокислота (выход, имоль; метод идентификации *)		
1	Ala (11; G, A, T)	Phe (14; G, A, T)	Val (20; G, A, T)
2	Gly (7 A, T, G)	Lys (8; A, T)	Val (23; G, A)
3	Ser (6; A, T, G)	Gly (8; A, G)	Ile (17; G, A, T)
4	Thr (5; A, T, G)	Leu (10; A, G)	Asn (9; A, T)
5	Ala (9; G, A, T)	Ser (16; A, T, G)	Gly (6; A, T, G)
6	Gly (5; A, G)	Lys (7; A, T)	Gln (5; A, T)
7	Gly (6; A, G)	Pro (9; G, T)	Cys (4; A, T)
8	Ser ** (10; A, T, G)	Phe (9; G, A, T)	Ser ** (10; A, T, G)
9	Thr (5; A, G)	Tyr (6; A, G)	Ile (7; A, G)
10	Tyr (5; A, T)	Glu (7; A, T)	Ala (6; A, T)
11	Pro (6; G, T)	Phe (8; G, A, T)	Gly (4; A, T)
12	His (—; A)	Pro (7; G, T)	Ile (5; G, A, T)
13	Val (6; G, A)	Ile ** (12; G, A)	Ile ** (12; G, A)
14	Tyr (4; A, T)	Leu (7; A, G)	—
Положение в цепи РНКазы	28–41	49–62	78–90

\* Обозначения как в табл. 3.

\*\* Выход аминокислот не дифференцирован для индивидуальных пептидов.

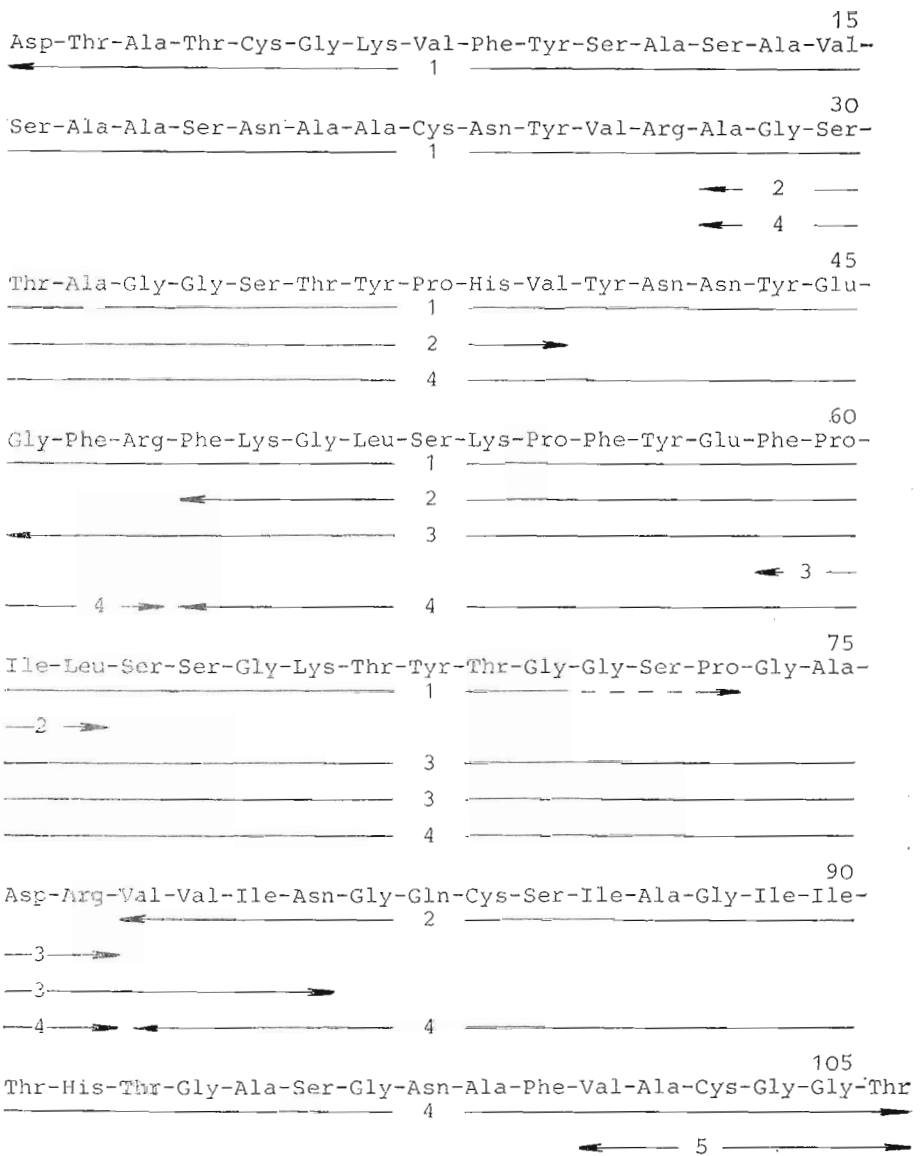


Рис. 5. Первичная структура РНКазы Th. 1, 2 — аминокислотные последовательности, установленные при автоматической деградации по Эдману карбоксиметилированного препарата белка (СМ-РНКазы) и последующем секвенировании триптического гидролизата остаточного продукта соответственно; 3, 4 — структуры, расшифрованные при секвенировании смеси пептидов, полученных при гидролизе сукцинизированной СМ-РНКазы стафилококковой протеиназой и трипсином; 5 — данные анализа кинетики протеолиза РНКазы карбоксипептидазой Y. Пунктиром отмечены остатки аминокислот, идентификация которых в данном типе секвенирования неоднозначна

эдмановской деградации молекулы СМ-РНКазы. Третий пептид, по-видимому, представляет собой С-концевой фрагмент полипептидной цепи белка. Структура его N-концевой части однозначно вытекает из данных качественного и количественного анализа продуктов секвенирования смеси исследуемых триптических пептидов (табл. 4). Вместе с тем низкий выход пептидов при гидролизе трипсином, так же как падение эффективности автоматической деградации по Эдману С-концевого протеолитического фрагмента РНКазы, наблюдаемое после трех стадий секвенирования, скорее всего вследствие «аномальных свойств» Asn-Gly-связи [7, 8] существенно ограничивает возможность их более детального структурного изучения. Поэтому дальнейший ход изучения аминокислотной последова-

Цикл депрессии	Аминокислоты (Выход, ммоль; методы идентификации *)			
	St		Tr	Tr
1	Gly (30; A,T,F)	Phe (49; G,A,T)	Ala (59; G,A,T)	Phe (63; G,A,T)
2	Phe (46; G,A,T)	Pro (15; F,T)	Gly (40; A,T,F)	Lys (-; A,F)
3	Arg (-; A)	Ile (47; G,A,T)	Ser (33; A,T,F)	Gly (54; G,A,T)
4	Phe (47; G,A,T)	Leu (16; A,T,F)	Thr (35; A,T,F)	Asn (38; A,T)
5	Lys (-; A,T)	Ser (9; A,T,F)	Ala (43; G,A,T)	Gly (23; A,T,F)
6	Gly (21; A,T,F)	Ser (10; A,T,F)	Gly (33; A,T,F)	Lys (-; A,T)
7	Leu (38; G,A,T)	Gly (9; A,T,F)	Gly (35; A,T,F)	Pro (39; F,T)
8	Ser (23; A,T,F)	Lys (-; A,T)	Ser ** (46; A,T,F)	Ser ** (46; A,T,F)
9	Lys (-; A,T)	Thr (8; A,T,F)	Thr (25; A,T,F)	Ile (26; G,A,T)
10	Pro (22; F,T)	Tyr (9; A,T)	Tyr (31; G,A,T)	Ala (25; G,A,T)
11	Phe (26; G,A)	Thr (7; A,T)	Pro (30; G,T)	Gly (19; A,T,F)
12	Tyr (21; A,T)	Gly (7; A,F)	His (-; A)	Ile (23; G,A,T)
13	Glu (11; A,T)	Gly (8; A,T)	Val (31; F,A)	Ile ** (52; G,A)
14	Phe (18; G,A,T)	Ser (6; A,T,F)	Tyr (24; A,T)	Thr (16; A,T)
15	Pro ** (21; G,T)	Pro ** (21; G,T)	Asn (19; A,T)	His (-; A)
16	Ile (14; G,A)	Gly (6; A,T)	Asn (21; A,T)	Thr (13; A,T,F)
17	Leu (15; A,F)	Ala (8; G,A)	Tyr (20; A,T,F)	Gly ** (29; A,T,F)
18	Ser (8; A,T,F)	Asp (6; A,T)	Glu (18; A,T)	Ala (17; G,A,T)
19	Ser (7; A,T,F)	Arg (-; A)	Gly (11; A,T,F)	Ser (11; A,T,F)
20	Gly (8; A,T,F)	Val (7; G,A,T)	Phe (12; G,A,T)	Gly (10; A,T,F)
21	Lys (-; A,T)	Val (6; G,A)	Arg (-; A)	Thr (42; A,T,F)
22	Thr (7; A,T,F)	Ile (6; G,A)		Asn (11; A,T)
23	Tyr (9; A,T)	Asu (4; A,T)		Ala (14; G,A,T)
24	Thr (6; A,F)			Phe (12; G,A,T)
25	Gly (7; A,T)			Val (14; G,A,T)
26	Gly (6; A,T)			Ala (11; F,T)
27	Ser (4; A,T,F)			Pro (13; G,T)
28	Pro (7; F,T)			Gly (9; A,T,F)
29	Gly (5; A,T)			Ala (10; G,A,T)
30	Ala (8; A,T)			Gly (7; A,T,F)
31	Asp (4; A,T)			Gly (5; A,T)
32	Arg (-; A)			Thr (4; A,T)
Положение в цепи РНКазы	46-77	59-81	28-48	49-77
				78-106

\* Обозначения как в табл. 3.

\*\* Выход аминокислот не дифференцирован для индивидуальных пептидов. Производные сукциниллизина, а также His количественно не обесцвечивались.



Рис. 6. Кинетика гидролиза СМ-РНКаза  $\text{Th}_1$  карбоксипептидазой Y. Условия: 50 mM N-этилморфолин-ацетат, pH 5,5; 45° C; соотношение фермент — субстрат 1 : 100

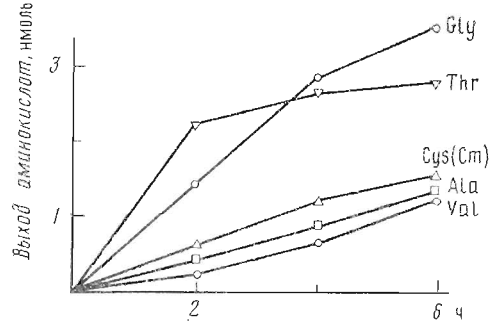


Рис. 6

Рис. 7. Сравнение первичных структур гуанилспецифичных РНКаз грибов: *T. harzianum*-01 ( $\text{Th}_1$ ), *A. oryzae* ( $\text{T}_1$  [45]), *F. moniliforme* ( $\text{F}_1$  [14]). Приведенная нумерация остатков (использован однобуквенный код аминокислот) соответствует аминокислотной последовательности РНКазы  $\text{Th}_1$ . Инвариантные для трех РНКаз остатки заключены в рамки. Для максимальной гомологии в аминокислотные последовательности введены дефисы (тире)

РНКаза	10										20										30										
$\text{Th}_1$	D	T	A	T	C	G	K	V	F	Y	S	A	S	A	V	S	A	A	S	N	A	A	C	N	Y	V	R	A	G	S	
$\text{T}_1$	A	C	D	Y	T	C	G	S	N	C	Y	S	S	S	D	V	S	T	A	Q	A	L	G	Y	Q	L	H	E	D	G	E
$\text{F}_1$	E	S	A	T	T	C	G	S	T	N	Y	S	A	S	Q	V	R	A	A	N	A	A	C	Q	Y	Y	Q	N	D	D	
40										50										60											
$\text{Th}_1$	T	A	G	G	S	T	Y	P	H	V	Y	N	N	Y	E	G	F	R	F	K	G	L	S	K	P	F	Y	E	F	P	
$\text{T}_1$	T	V	G	S	N	S	Y	P	H	K	Y	N	N	Y	E	G	F	D	F	S	V	S	S	-	P	Y	Y	E	W	P	
$\text{F}_1$	S	A	G	S	T	T	Y	P	H	T	Y	N	N	Y	E	G	F	D	F	P	V	N	G	-	P	Y	Q	E	F	P	
70										80										90											
$\text{Th}_1$	I	L	S	S	G	K	T	Y	T	G	G	S	P	G	A	D	R	V	V	I	N	G	Q	C	S	I	A	G	I	I	
$\text{T}_1$	I	L	S	S	G	D	V	Y	S	G	G	S	P	G	A	D	R	V	V	F	N	E	N	Q	L	A	G	V	I		
$\text{F}_1$	I	K	S	G	G	-	V	Y	T	G	G	S	P	G	A	D	R	V	V	I	N	T	N	C	E	Y	A	G	A	I	
100																															
$\text{Th}_1$	T	H	T	G	A	S	G	N	A	F	V	A	C	G	G	T															
$\text{T}_1$	T	H	T	G	A	S	G	N	N	F	V	E	C	T																	
$\text{F}_1$	T	H	T	G	A	S	G	N	N	F	V	G	C	S	N	T	G														

Рис. 7

тельности РНКазы  $\text{Th}_1$  основывался на результатах секвенирования нефракционированных смесей пептидов, полученных при гидролизе сукцинированного СМ-белка стафилококковой протеиназой и трипсином (табл. 5).

Анализ данных, полученных при секвенировании продуктов гидролиза сукцинированной СМ-РНКаза стафилококковой протеиназой, показывает (табл. 4, рис. 5), что эдмановской деградации подвергаются два фрагмента, которые образуются при расщеплении полипептидной цепи белка по остаткам  $\text{Glu}^{45}$  и  $\text{Glu}^{58}$ . Неполный гидролиз РНКазы по связи  $\text{Glu}^{58}$ — $\text{Phe}^{59}$  объясняется, по-видимому, наличием близрасположенного остатка  $\text{Pro}^{60}$  [9—12]. Секвенирование пептидов, продуцируемых гидролизом сукцинированной СМ-РНКаза  $\text{Th}_1$  стафилококковой протеиназой, подтверждает установленную ранее аминокислотную последовательность белка в анализируемом участке молекулы и, кроме того, позволяет определить структуру сегмента 71—77 полипептидной цепи (см. рис. 5).

Состав триптического гидролиза сукцинированной СМ-РНКаза  $\text{Th}_1$  качественно подобен ранее анализируемой смеси пептидов, полученных в

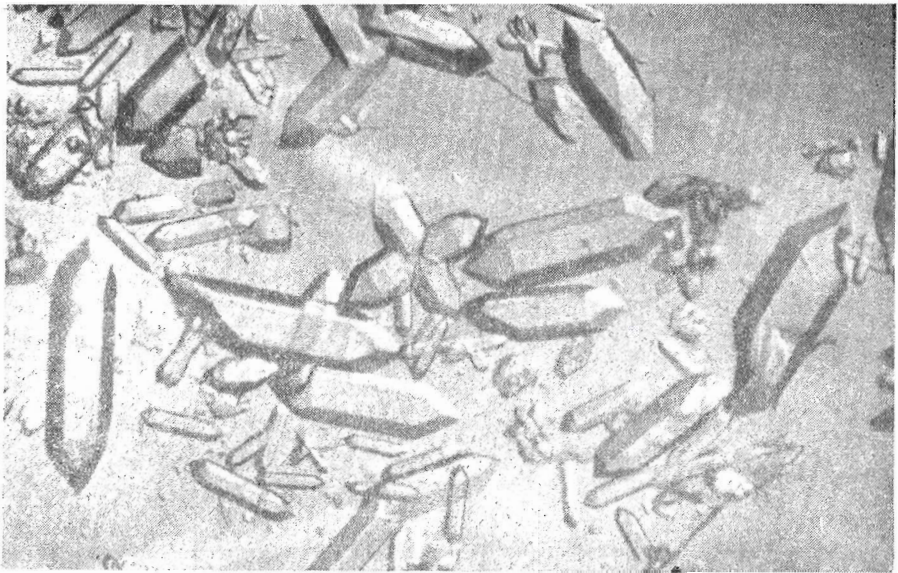


Рис. 8. Микрофотография кристаллов РНКазы  $Th_1$

результате гидролиза трипсином остаточных продуктов секвенирования немодифицированного белка (см. табл. 5). В сукцинилированном препарате СМ-РНКазы  $Th_1$  трипсин расщепляет связи, образованные остатками Arg<sup>27</sup>, Arg<sup>48</sup> и Arg<sup>77</sup>. Поскольку структура первых двух образующихся фрагментов уже установлена, секвенирование данной смеси позволяет вычленить искомую аминокислотную последовательность в С-концевом пептиде 78–106 (табл. 5, рис. 5).

Исследование кинетики протеолиза СМ-РНКазы  $Th_1$  карбоксипептидазой Y (рис. 6) — завершающий этап анализа первичной структуры белка, подтверждающий выведенную из данных эдмановской деградации С-концевую аминокислотную последовательность фермента — Val-Ala-Cys-Gly-Gly-Thr (см. рис. 5).

Сравнение первичных структур РНКазы  $Th_1$  и других внеклеточных гуанилспецифичных РНКаз грибов [11–16] показывает, что все эти ферменты являются представителями одного семейства белков. Так, анализ аминокислотных последовательностей РНКазы  $Th_1$  вместе с РНКазой  $T_1$  аскомицета *Aspergillus oryzae* [15] и РНКазой  $F_1$  несовершенного гриба *Fusarium moniliforme* [14], представителями РНКаз грибов различных таксономических групп, выявляет 53 идентичных в первичной структуре аминокислотных остатка (рис. 7). Инвариантными, естественно, являются в первую очередь остатки активного центра ферментов — His<sup>39</sup>, Glu<sup>58</sup>, Arg<sup>77</sup>, His<sup>92\*</sup> и примыкающие к ним в пространственной структуре белков области связывания субстратов [17–20].

До недавнего времени в литературе отсутствовали сведения о рентгеноструктурных исследованиях гуанилспецифичных РНКаз микроорганизмов. Начало подобных работ можно датировать 1977 г., когда впервые были получены монокристаллы РНКазы  $S_2$  *A. clavatus* и дана их предварительная характеристика [21]. Позднее появились сведения о кристаллизации РНКазы  $T_1$  [22] и анализе трехмерной топографии некоторых других РНКаз грибов, актиномицентов и бактерий [17–20, 23, 24].

В настоящей работе при равновесном диализе растворов РНКазы  $Th_1$  в микродиффузионных ячейках [25] против 60% (от насыщения) сульфата аммония в 0,2 М калий-фосфатном буфере, рН 7,2, содержащем 4% (по объему) диоксана, выращены кристаллы белка с максимальным размером 1,0×0,5×0,5 мм (рис. 8). Кристаллы имеют форму шестигранных призм с вершинами в виде трехгранных пирамид и, подобно одной из

\* Нумерация остатков по аминокислотной последовательности РНКазы  $Th_1$ .

Кристаллические формы РНКазы C<sub>2</sub> и РНКазы Th<sub>1</sub>

Параметры	РНКазы C <sub>2</sub> [26]	РНКазы Th <sub>1</sub>
Удельный парцальный объем, $\bar{v}$ , мл/г	0,707	0,706
Пространственная группа	<i>P</i> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 3 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub>
<i>a</i> , Å	31,4	55,7
<i>b</i> , Å	31,4	55,7
<i>c</i> , Å	40,5	80,1
$\gamma$ , град	98,8	—
Количество молекул в асимметричной части ячейки	1	1
Объем молекулы, Å <sup>3</sup>	19807	35800
<i>V<sub>m</sub></i> , Å <sup>3</sup> /Да	1,78	3,33
Содержание растворителя в кристалле *, %	34	66

\* Определено по методу [27].

кристаллических модификаций РНКазы C<sub>2</sub> [26], содержат одну молекулу белка в независимой части ячейки (табл. 6).

Высокий уровень гомологии РНКазы Th<sub>1</sub> с РНКазой C<sub>2</sub> и наличие для последней атомной модели с разрешением 1,5 Å [24] позволяют при анализе трехмерной структуры РНКазы Th<sub>1</sub> обойтись без получения тяжелоатомных производных. Определение фаз структурных факторов РНКазы Th<sub>1</sub> проводилось методом молекулярного замещения и сводилось к анализу ориентации и расположению известной структуры РНКазы C<sub>2</sub> в ячейке РНКазы Th<sub>1</sub>. Проведена первая стадия уточнения координат атомов белка при разрешении 1,75 Å с *R*-фактором 30% [28].

РНКазы Th<sub>1</sub> подобно другим гуанилспецифичным РНКазам грибов содержит четыре остатка цистеина, связанных попарно дисульфидными связями. Однако в отличие от РНКаз аскомицетов, где образование S—S-мостиков в белке обеспечивается соответственно остатками Cys<sup>2</sup>—Cys<sup>10</sup> и Cys<sup>6</sup>—Cys<sup>103</sup> (нумерация по [15]), в РНКазе Th<sub>1</sub>, так же как и в РНКазе F<sub>1</sub> [29], сохраняется только одна из этих связей: Cys<sup>5</sup>—Cys<sup>103</sup>. Другой дисульфидный мостик связывает полипептидную цепь РНКазы между остатками Cys<sup>23</sup> и Cys<sup>4</sup> [28].

Структурно-функциональная роль различий в положении дисульфидных связей у РНКаз микроорганизмов и роль других замен аминокислотных остатков может быть прослежена после завершения рентгеноструктурного исследования РНКазы Th<sub>1</sub> и проведения детального сравнения полученной трехмерной структуры со структурами, установленными ранее.

### Экспериментальная часть

В работе использовали стафилококковую протеиназу V8 (Miles, Англия), ТРСК-обработанный трипсин (Worthington, США), корбоксипептидазу Y (Pierce, США), флуорескамин (Fluka, ФРГ), глицилглицин и полибрен (Aldrich, ФРГ), реагенты и растворители для автоматической деградации по методу Эдмана (Beckman, США). Йодуксусную кислоту (BDH, Англия) трижды перекристаллизовывали из гептана, а полибрен перед употреблением очищали тройной экстракцией хлорбутаном. Очистку фермента проводили на DEAE-целлюлозе (Reanal, ВНР) и CM-целлюлозе CM-32 (Serva, ФРГ).

Активность РНКазы по отношению к РНК (препарат фирмы Sigma (США), очищенный тройным пересаживанием из 60% водного этанола) определяли модифицированным методом Анфинсена [30] при pH 8,0 в 0,1 М трис-ацетатном или трис-HCl-буферах, принимая за единицу активности количество фермента, вызывающего увеличение поглощения (*A*<sub>280</sub>) гидролизуемой смеси на 1 ОЕ/мин. Удельную активность выражали как отношение числа единиц активности фермента (Е) в 1 мл исследуемого раствора к его поглощению при 280 нм. Концентрацию белка рассчитывали исходя из того, что оптическое поглощение при длине волны 280 нм 0,1% раствора фермента равно 1 (см. рис. 3).

Аналитический электрофорез в денатурирующих условиях проводили на пластинах 12,5% полиакриламидного геля толщиной 1 мм в трис-глициновом буфере (25 мМ трис/192 мМ глицин), pH 8,5, содержащем 0,1% SDS [31]. Белки денатурировали при кипячении (10 мин) в присутствии 2% SDS и 5% β-меркаптоэтанола. Модификацию РНКазы флуорескамином осуществляли, добавляя 10 мкл раствора флуорескамина в

ацетоне (2 мг/мл) к раствору белка (100 мкг/100 мкл) в 0,2 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,5. Сканирование флуоресцирующего белка в геле проводили на спектрофотометре Opton РМQ-11 (ФРГ). Величина щели 0,1×6 мм при длине волны возбуждающего света 376 нм (фильтр FL-43). Скорость сканирования 10 мм/мин. В качестве белков-маркеров ( $M_r$ ) использовали  $\alpha$ -лактальбумин (14 400), ингибитор трипсина (20 100), карбоангидразу (30 000), овальбумин (43 000), альбумин (67 000), фосфорлазу b (94 000).

Электрофорез нативной РНКазы  $T_{H_1}$  проводили при pH 4,3 (0,9 М  $\text{CH}_3\text{COOH}/43$  мМ N,N'-тетраметилэтилендиамин) в модифицированной системе Паппама — Чокли [32] в отсутствие мочевины. Использовали пластины 10% полиакриламидного геля толщиной 3 мм. В препаративном варианте электрофореза анализируемый препарат (~1,4 мг, 6250 Е) наносили на полосу геля 50 мм, в аналитическом (20 мкг) — на полосу геля 5 мм. Аналитический гель после проведения электрофореза (в качестве свидетеля использовали родамин 6Ж) фиксировали в 20% трихлоруксусной кислоте и окрашивали кумасси голубым R-250. Полосу параллельного препаративного геля разрезали на зоны шириной ~5 мм и после электроосаждения из зон [32] белковые препараты анализировали на содержание РНКазной активности. Выход РНКазы  $T_{H_1}$  составлял по активности ~70–80%.

Изоэлектрическую точку РНКазы определяли методом изоэлектрофокусирования в трубках полиакриламидного геля длиной 74 мм и диаметром 5 мм с содержанием 7,5% акриламида, 4% амфолина и 20% сахарозы [33]. Использовали амфолины с диапазоном pH 3,5–10,0 (LKB, Швеция). В трубки вносили ~80 мкг белка (~360 Е). В качестве электродных буферов использовали 0,2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и 0,1 М NaOH. Электрофорез вели при 4° С. Начальная сила тока 3 мА, конечная — 5 мА на трубку. Продолжительность электрофореза 4,5 ч. После окончания электрофореза гели разрезали на сегменты толщиной ~2 мм, измельчали и экстрагировали 1,5 мл воды в течение 16 ч при 4° С, определяя в каждом экстракте pH и ферментативную активность.

Культура гриба *Trichoderma harzianum* получена из коллекции кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ им. М. В. Ломоносова. В качестве посевного материала использовали конидии со среды Чапека с агаром. Гриб выращивали на видоизмененной среде Ogata [30] в течение 4 сут при 25° С на качалке в колбах емкостью 750 мл, содержащих 100 мл среды, и затем 3 сут в трех ферментерах марки Marubishi (Япония) емкостью 30 л с коэффициентом заполнения 0,5. Режим ферментации: 300 об/мин, давление 0,5 атм, 25–27° С, подача воздуха от 8 до 16 л/мин. Пеногашение осуществляли силиконовыми эмульсиями.

Млечный отделяли фильтрованием культуральной жидкости через капроновую ткань на воронках Бюллера. Фильтрат объединяли, подкисляли 2 н. HCl до pH 5,1. Все операции в дальнейшем проводили при 4° С.

Выделение РНКазы  $T_{H_1}$  включало три последовательные стадии очистки.

1. Хроматография на *SM-целлюлозе*. Фильтрат культуральной жидкости с каждого ферментера смешивали в два приема при конечном соотношении 10 : 1 с *SM-целлюлозой*, уравновешенной 10 мМ натрий-ацетатным буфером, pH 5,1. После перемешивания в течение 30 мин целлюлозу отфильтровывали и фильтрат отбрасывали. Смола промывали на колонке 10 мМ натрий-ацетатным буфером, pH 5,1, до значения  $A_{280}$  в элюате, равного 0,2–0,4, и РНКазу элюировали 0,25 М трис-HCl-буфером, pH 7,3, содержащим 1 М NaCl, собирая фракции с  $A_{280}=0,5$ . Элюаты, полученные на данной стадии обработки фильтрата культуральной жидкости каждой из трех параллельных ферментаций, объединяли и диализовали против 10 мМ трис-HCl-буфера, pH 7,3.

2. Хроматография на *DEAE-целлюлозе*. Диализат, полученный на стадии 1, наносили на колонку (6×25 см) с *DEAE-целлюлозой* (630 мл), уравновешенной 10 мМ трис-HCl-буфером, pH 7,3, со скоростью ~500 мл/ч и целлюлозу далее промывали тем же раствором (~400 мл), собирая фракции белка с  $A_{280} \geq 0,2$ .

3. Рехроматография на *SM-целлюлозе*. Объединенные на стадии 2 фракции белка наносили на колонку (3×8,5 см) с *SM-целлюлозой*, уравновешенной 10 мМ трис-HCl-буфером, pH 7,3, элюируя РНКазу вначале в линейном градиенте концентрации того же буфера от 10 до 50 мМ, а затем в градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,2 М в 50 мМ трис-HCl-буфере, pH 7,3 (рис. 1). Удельная активность фракций 116–126, содержащих РНКазу  $T_{H_1}$  (пик IV), была практически одинаковой и достигала ~4500 Е/мг белка. Помимо основного пика активность РНКазы обнаруживалась дополнительно в трех фракциях (пики I–III, рис. 1) с удельной активностью соответственно в первом пике 64 Е/мг, втором — 104 и в третьем — 93. Эти фракции в дальнейшем не анализировали.

Автоматическую деградацию по Эдману проводили на секвенаторе Beckman 890С (США) с использованием 0,1 М квадратного буфера и в присутствии 3 мг полибрена и 100 нмоль глицилглицина, предварительно подвергнутых пяти полным циклам секвенирования [11, 12]. Продукты деградации конвертировали в 1 н. HCl 10 мин при 80° С.

Идентификация фенилтиогидантоиновых производных аминокислот осуществляли методами ТСХ и ГЯХ [11, 34], а также аминокислотным анализом (Biochrom LC-7000, ФРГ) после гидролиза производных 5 н. HI при 150° С в течение 24 ч. Выход аминокислот корректировали, вводя во фракции анилинтиазолининовых производных в качестве внутреннего стандарта фенилтиогидантоин норлейцина и учитывая фон «остаточных» аминокислот [12].

Препарат *SM-РНКазы*  $T_{H_1}$  [11] подвергали 73 циклам деградации по Эдману (после 37, 59 и 73-й стадий секвенирования проводили обработку остаточных продук-

тов деградации флуорескаминном [11]) и затем гидролизовали 3 ч в реакционной ячейке секвенатора трипсином в 0,1 М N-этилморфолин-ацетатном буфере, pH 8,5, при 37° С и соотношении фермента к субстрату 1 : 50. Смесь полученных пептидов секвенировали далее, осуществляя дополнительно 14 циклов деградации по Эдману.

*Гидролиз сукцинилированной СМ-РНКазы* [11] трипсином или стафилококковой протениазой проводили 5 ч в 0,1 М N-этилморфолин-ацетатном буфере, pH 8,5, при 37° С и соотношении ферментов к субстрату 1 : 30. Кинетику протеолиза СМ-РНКазы карбоксипептидазой Y (50 мМ N-этилморфолин-ацетат (pH 5,5), 45° С, соотношение фермент – субстрат 1 : 100) прослеживали, анализируя аликваты реакционной смеси, содержащей норлейцин в качестве внутреннего стандарта, на аминокислотном анализаторе.

*Кристаллизация РНКазы T<sub>h</sub>1*. Липофильно высушенный препарат фермента растворяли в 0,2 М трис-HCl-буфере (pH 7,6) с 0,2 М NaCl до достижения концентрации 17–20 мг/мл и центрифугировали 20 мин при 12 000 об/мин. Раствор диализовали [25] против 60% (от насыщения) сульфата аммония в 0,2 М калий-фосфатном буфере, pH 7,16, содержащем 4% (по объему) диоксиана.

В ходе диализа при комнатной температуре наблюдали появление одиночных кристаллов уже через 3 сут. Рост кристаллов прекращался через 10–14 сут. При проведении диализа при 4° С одиночные кристаллы появлялись через 7–8 сут и их рост продолжался в течение ~7 мес.

Пространственную группу кристаллов и параметры элементарной ячейки определяли по прецессионным рентгенограммам, полученным на четырехкружном дифрактометре Sintex P<sub>2</sub> с использованием монохроматизированного медного излучения. Интенсивности отражений измерялись при непрерывном сканировании кристалла вокруг оси  $\omega$  и фиксированном положении источника излучения и детектора.

Первые стадии уточнения структуры белка при разрешении 1,75 Å выполнены по программам POTLSQ [35] и CORELS [36].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Василева-Тонкова Е. С., Безбородова С. И. // Микробиология. 1986. Т. 55. № 3. С. 401–406.
2. Безбородова С. И. Нуклеазы микроорганизмов. М.: Наука, 1974. С. 182–259.
3. Безбородова С. И., Безбородов А. М. Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. М.: Наука, 1979. С. 92–145.
4. Василева-Тонкова Е. С., Безбородова С. И. // Прикл. биохимия и микробиология. 1986. Т. 22. № 4. С. 455–461.
5. Василева-Тонкова Е. С., Безбородова С. И. // Биохимия. 1987. Т. 52. № 3. С. 405–413.
6. Безбородова С. И., Белецкая О. П., Грищенко В. М. // Биохимия. 1977. Т. 42. № 9. С. 1556–1565.
7. Sauer R. T., Anderegg R. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 6. P. 1092–1100.
8. Bornstein P., Balian G. // Meth. Enzym. 1977. V. 47. P. 132–145.
9. Houmard J., Drapeau G. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 247. P. 6720–6726.
10. Drapeau G. R., Boily Y., Houmard J. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 20. P. 6720–6726.
11. Куликов В. А., Шляпников С. В., Яковлев Г. П. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. № 3. С. 334–345.
12. Шляпников С. В., Безбородова С. И., Куликов В. А., Яковлев Г. П. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 172–184.
13. Безбородова С. И., Ходова О. М., Степанов В. М. // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. № 8. С. 1136–1138.
14. Hirabayashi J., Yoshida H. // Biochem. Internat. 1983. V. 7. № 2. P. 255–262.
15. Takahashi K. // J. Biochem. 1985. V. 98. № 3. P. 815–817.
16. Sato S., Uchida T. // Biochem. J. 1975. V. 145. № 2. P. 353–360.
17. Heinemann U., Saenger W. // Pure and Appl. Chem. 1985. V. 57. № 3. P. 417–422.
18. Hill G., Dodson G., Heinemann U., Saenger W., Mitsu Y., Nakamura K., Borisov V., Tischenko G., Polyakov K., Pavlovsky A. // Trends Biochem. Sci. 1983. V. 8. № 10. P. 364–369.
19. Sugio S., Amisaki T., Ohishi R., Tomita K., Heinemann U., Saenger W. // FEBS Lett. 1985. V. 181. № 1. P. 129–132.
20. Поляков К. М., Вагин А. А., Тищенко Г. Н., Безбородова С. И., Вайнштейн Б. К. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 273. № 6. С. 1383–1386.
21. Безбородова С. И., Белецкая О. П., Тищенко Г. Н., Жухлистова Н. Е., Назимова Н. В. // Кристаллография. 1977. Т. 22. № 5. С. 1089–1091.
22. Martin P. D., Tulinsky A., Waiz F. G., Jr. // J. Mol. Biol. 1980. V. 136. № 1. P. 95–97.
23. Борисова С. Н., Вагин А. А., Некрасов Ю. В., Павловский А. Г., Строкопытов Б. В., Вайнштейн Б. К. // Кристаллография. 1986. Т. 31. № 3. С. 474–477.
24. Поляков К. М., Строкопытов Б. В., Вагин А. А., Тищенко Г. Н., Безбородова С. И., Вайнштейн Б. К. // Кристаллография. 1987. Т. 32. № 4. С. 918–926.
25. Dattagupta J. K., Fujiwara T., Grishin E. V., Linder K., Manor P. C., Pieniszek N. J., Saenger W., Such D. // J. Mol. Biol. 1975. V. 97. № 2. P. 267–271.
26. Поляков К. М., Безбородова С. И., Тищенко Г. Н. // Кристаллография. 1981. V. 26. № 4. С. 845–846.
27. Matthews B. W. // J. Mol. Biol. 1968. V. 33. № 2. P. 491–497.

28. *Strokopylov B. V., Polyakov K. M., Bezborodova S. I., Shlyapnikov S. V.* // Abst. Sixth Inter. Sympos. on Metabolism and Enzymology of Nucleic Acids. Smolenice Castle. Slovak Acad. Sci., 1987. P. 25.
29. *Yoshida H., Naijo S.* // Anal. Biochem. 1986. V. 159. № 2. P. 273-279.
30. *Безбородова С. И., Бородаева Л. И., Паикова Л. Н.* // Микробиология. 1968. Т. 37. № 2. С. 10-14.
31. *Laemmli U. K.* // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680-685.
32. *Мясников А. Н., Шляпников С. В.* // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 4. С. 529-541.
33. *Ригли К. В.* // Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков. М.: Мир, 1974. С. 320-324.
34. *Pisano J. J., Bronzert T. J.* // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. № 20. P. 5597-5607.
35. *Hendrickson W. A., Konnert J. H.* // Biomolecular structure, function, conformation and evolution/Ed. Srinivasan R. Oxford: Pergamon Press, 1981. V. 1. P. 43.
36. *Sussman J. L., Holbrook S. R., Church C. M., Kim S.-H.* // Acta cryst. 1977. V. 33. № 5. P. 800-804.

Поступила в редакцию  
31.VIII.1987

**ISOLATION, AMINO ACID SEQUENCE ANALYSIS AND  
CRYSTALLIZATION OF EXTRACELLULAR RIBONUCLEASE Th<sub>1</sub> FROM  
TRICHODERMA HARZIANUM-01 FUNGUS**

**BEZBORODOVA S. I., VASILEVA-TONKOVA E. S., POLYAKOV K. M.\*,  
SHLYAPNIKOV S. V.\*\***

*Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms:*

*\* Institute of Crystallography, Academy of Sciences of the USSR:*

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

A procedure of large-scale isolation of homogenous ribonuclease Th<sub>1</sub> from cultural filtrates of *Trichoderma harzianum* with a yield over 50% has been developed. Three ion-exchange chromatographies on CM- and DEAE-cellulose gave 7500 fold purification of the protein with a specific activity of ca. 4500 U/mg. The RNase Th<sub>1</sub> is shown to be a basic protein (pI 9,5) with  $M_r$  10 747; it contains 106 amino acid residues (2 Asp, 6 Asn, 9 Thr, 12 Ser, 2 Glu, 1 Gln, 4 Pro, 16 Gly, 14 Ala, 4 Cys, 7 Val, 5 Ile, 2 Leu, 7 Tyr, 6 Phe, 2 His, 4 Lys, 3 Arg). The total amino acid sequence of RNase Th<sub>1</sub> was determined and, on comparison with other guanyl-specific fungal RNases, showed a significant degree of homology, thus indicating probability of a common origin. By means of the equilibrium dialysis, crystals of RNase Th<sub>1</sub> were obtained with the space group  $P3_221$ ,  $a=b=55,7$ ,  $c=80,1$  Å. A preliminary X-ray study of RNase Th<sub>1</sub> was undertaken.