



УДК 577.159.022+543.422

РИБОНУКЛЕАЗА *BACILLUS INTERMEDIUS* 7PИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ОСТАТКОВ ТИРОЗИНА И ТРИПТОФАНА
С ПОМОЩЬЮ РАЗНОСТНЫХ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ

Ханданян А. Ж., Дудкин С. М.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Изучены свойства семи остатков тирозина и трех остатков триптофана РНКазы *Bacillus intermedius* 7P. Пертурбацией фермента этиленгликолем и $^2\text{H}_2\text{O}$ показано, что в нативном белке ~50% тирозинов контактируют с растворителем. Кроме того, с этиленгликолем взаимодействует 25%, а с $^2\text{H}_2\text{O}$ 50% триптофанов. Спектрофотометрическое титрование РНКазы в щелочной области рН показало, что полностью экспонируется один тирозин. Остальные остатки тирозина можно, по-видимому, рассматривать как «частично» и «полностью» экранированные. Данные титрования РНКазы в кислой области значений рН привели к выводу, что степень доступности остатков ароматических аминокислот фермента молекулам воды зависит от ионизации карбоксильных групп с $pK_{\text{каж}} 1,67$. Аналогичные исследования фермента в 4 М хлориде гуанидиния и 8 М мочевины показали, что в мочевины фермент, по-видимому, обладает определенной третичной структурой. При этом «полностью экспонированными» становятся три тирозина, однако лишь незначительно увеличивается доступность триптофанов. В растворе 4 М хлорида гуанидиния все остатки тирозина и триптофана доступны молекулам воды, а 30% триптофанов остаются экранированными по данным пертурбации этиленгликолем.

Внеклеточная РНКаза *Bacillus intermedius* 7P катализирует деполимеризацию полирибонуклеотидов с образованием олигонуклеотидов с концевыми 2' : 3'-фосфатами [1], проявляя преимущественную специфичность к расщеплению связей после остатков пуриновых нуклеозидов [2]. В предыдущих сообщениях был описан препаративный метод получения гомогенного фермента и изучена его стабильность в широком диапазоне значений рН и температуры [1], определена аминокислотная последовательность [3, 4] и вторичная структура в растворе [5]. Показано, что при незначительном содержании α -спиралей (6%) и β -структур (20%) РНКаза обладает большой устойчивостью к тепловой инактивации в области рН 3—10. При этом в молекуле фермента ($M 12\,300$) нет серосодержащих аминокислот, однако наблюдается относительно высокое содержание ароматических аминокислот: три остатка триптофана (34, 70, 93), семь остатков тирозина (12, 46, 23, 77, 89, 96, 102) и четыре остатка фенилаланина (6, 55, 81, 105). Это дает возможность эффективно использовать тирозиновые и триптофановые хромофоры белка в качестве «репортерных групп», дающих информацию о третичной структуре РНКазы в растворе и ее изменении в различных условиях.

Целью нашей работы было исследование методами абсорбционной спектроскопии степени погруженности остатков тирозина и триптофана в белковую глобулу, их доступности молекулам растворителя в присутствии

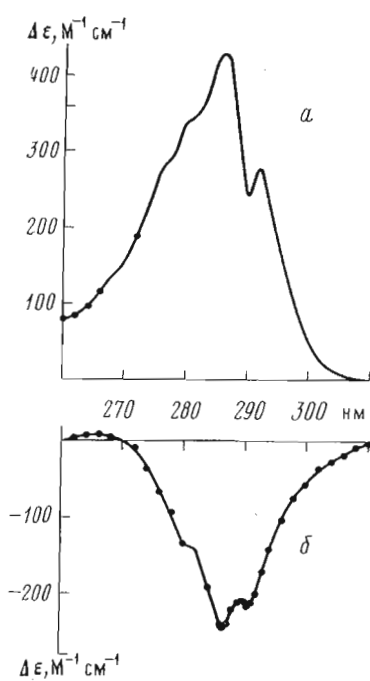


Рис. 1

Рис. 1. Пертурбационные спектры поглощения РНКазы в присутствии 20% этиленгликоля (а) и 49% $^2\text{H}_2\text{O}$ (б). Конечная концентрация белка 80 мкМ, 0,1 М ацетат натрия, pH 5,5

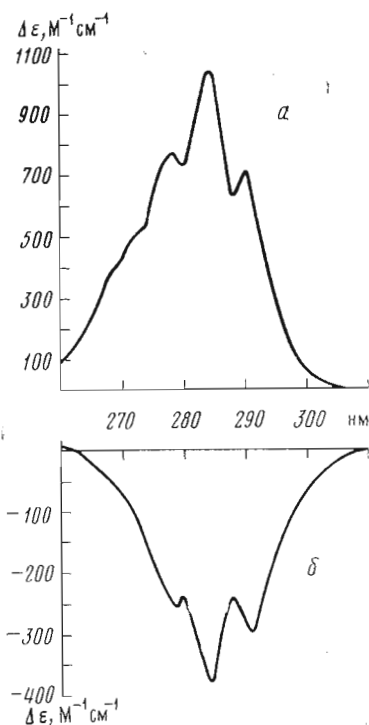


Рис. 2

Рис. 2. Пертурбационные спектры поглощения раствора РНКазы в 4 М хлориде гуанидиния в присутствии 20% этиленгликоля (а) и 49% $^2\text{H}_2\text{O}$ (б). Конечная концентрация белка 60 мкМ, 0,1 М ацетат натрия, pH 5,5

денатурирующих агентов, определение констант ионизации фенольного гидроксида остатков тирозина фермента.

При пертурбации РНКазы растворителями (рис. 1) видно, что в разностных спектрах присутствуют характерные экстремумы, один из которых относят в основном к экспонированным остаткам триптофана (291–293 нм), а второй является смешанным и характеризует доступность остатков тирозина и триптофана [6]. Для определения доступности остатков ароматических аминокислот молекулам растворителя в качестве соединений, моделирующих полную экспонированность, обычно используют защищенные производные тирозина и триптофана. Вклад остатков фенилалани-

Таблица 1

Определение степени экспонированности в нативной и денатурированной РНКазе остатков триптофана (а) и тирозина (б) (по уравнениям 1 и 2)

| Пертурбант (% объемный) | Минимальный диаметр молекулы пертурбанта, Å | $\Delta\epsilon_{291,5}$, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ | | $\Delta\epsilon_{285,5}$, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ | | 0,1 М CH_3COONa | | 4 М $\text{Gu}\cdot\text{HCl}$ | |
|-----------------------------|---|---|--------------------------|---|--------------------------|------------------------------------|-----|-----------------------------------|-----|
| | | Ac-Trp- NH_2 | Ac-Tyr- NH_2 | Ac-Trp- NH_2 | Ac-Tyr- NH_2 | a | b | a | b |
| | | Этиленгликоль (20) | 4,4 | 294 | 15 | 170 | 92 | 0,8 | 3,2 |
| $^2\text{H}_2\text{O}$ (49) | 2,0 | -117 | -8 | -68 | -37 | 1,5 | 3,7 | 2,7 | 7,0 |

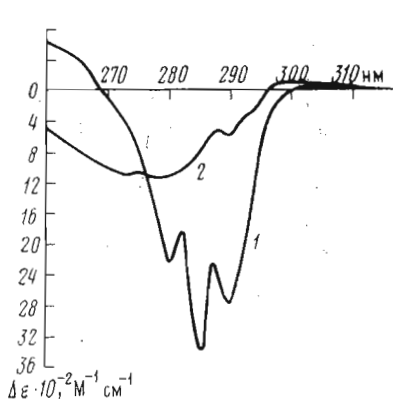


Рис. 3

Рис. 3. Разностные спектры поглощения РНКазы в 4 М хлориде гуанидиния (1) и 8 М мочеvine (2). Конечная концентрация белка 65 мкМ, 0,1 М ацетат натрия, рН 5,5

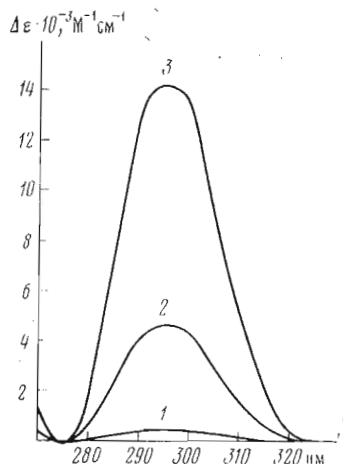


Рис. 4

Рис. 4. Разностные спектры поглощения РНКазы при рН 9,35 (1), 11,4 (2) и 13,5 (3). Конечная концентрация белка 57 мкМ, 0,1 М КСl. Раствор фермента в сравнительном канале спектрофотометра имел рН 5,8

на в пертурбационные спектры поглощения при длинах волн, больших чем 270 нм, незначителен, и его можно не учитывать [6]. В нашей работе в качестве модельных соединений были использованы N-ацетилтирозиламид и N-ацетилтриптофиламид. Параметры пертурбантов и спектральные характеристики модельных соединений приведены в табл. 1 и находятся в соответствии с литературными данными [6].

Степень экспонированности остатков триптофана и тирозина определяли, используя следующие совместные уравнения [7]:

$$\Delta \epsilon_{291-293}(\text{белка}) = a \Delta \epsilon_{291-293}(\text{trp}) + b \Delta \epsilon_{291-293}(\text{tyr}), \quad (1)$$

$$\Delta \epsilon_{285-287}(\text{белка}) = a \Delta \epsilon_{285-287}(\text{trp}) + b \Delta \epsilon_{285-287}(\text{tyr}), \quad (2)$$

где $\Delta \epsilon(\text{белка})$ и $\Delta \epsilon(\text{trp})$ или $\Delta \epsilon(\text{tyr})$ — разностные коэффициенты молярной экстинкции белка и соединений, моделирующих полную экспонированность триптофана и тирозина соответственно, а коэффициенты a и b представляют собой относительное число экспонированных хромофоров остатков триптофана и тирозина (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что в нативной РНКазе *Bacillus intermedius* 7P с молекулами пертурбанта контактируют три остатка тирозина и частично один остаток триптофана в случае пертурбации этиленгликолем и примерно четыре остатка тирозина и полтора остатка триптофана при использовании $^2\text{H}_2\text{O}$.

Представляло интерес определение степени экспонированности хромофоров ароматических аминокислот в молекуле «полностью денатурированной» РНКазы. Ранее было показано, что в присутствии 4 М хлорида гуанидиния спектр КД белка в далекой УФ-области соответствует спектру неупорядоченного полипептидного клубка [5]. Из рис. 2 видно, что в присутствии 4 М хлорида гуанидиния ($\text{Gu}\cdot\text{HCl}$) разностные спектры имеют большее разрешение и амплитуды, чем в случае нативной РНКазы. Результаты расчетов, проведенных по уравнениям 1 и 2, приведены в табл. 1. В присутствии 4 М хлорида гуанидиния с молекулами $^2\text{H}_2\text{O}$, имеющими диаметр 2,0 Å, контактируют семь остатков тирозина и три остатка триптофана, что полностью соответствует аминокислотному составу РНКазы.

В то же время с молекулами этиленгликоля, имеющими диаметр 4,4 Å, взаимодействуют семь остатков тирозина и только два остатка триптофана. Таким образом, в рассматриваемых условиях молекулу РНКазы *Bacillus intermedius* 7Р, по-видимому, нельзя представлять как «полностью денатурированную», так как при этом сохраняется частичная экранированность остатков триптофана.

Поскольку, как было показано выше, определенная экранированность остатка триптофана сохраняется даже в 4 М хлориде гуанидиния, мы исследовали степень экспонированности хромофоров остатков ароматических аминокислот РНКазы в присутствии другого классического денатурирующего агента — 8 М мочевины (рис. 3). Голубой сдвиг полос поглощения фермента в 4 М хлориде гуанидиния и 8 М мочеvine обусловлен увеличением степени взаимодействия ароматических хромофоров с молекулами воды, и по амплитуде разностных спектров можно судить об изменении третичной структуры белка. Из рис. 3 видно, что разностный спектр поглощения РНКазы, появляющийся в присутствии 4 М хлорида гуанидиния, имеет существенно большую амплитуду и лучше разрешен, чем в растворе 8 М мочевины. Таким образом, в последнем случае фермент, по-видимому, сохраняет определенную третичную структуру, что указывает на существование в его молекуле гидрофобного ядра (или ядер) с большой плотностью упаковки. Коэффициент разностной молярной экстинкции, определенный в этой работе для триптофана в 4 М хлориде гуанидиния, против триптофана в 8 М мочеvine при 291—293 нм составляет $100 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Поскольку поглощение при 290—292 нм практически полностью определяется хромофорами триптофана, то, используя данные по доступности остатков триптофана РНКазы в присутствии 8 М хлорида гуанидиния молекулам $^2\text{H}_2\text{O}$, можно оценить их доступность в присутствии 8 М мочевины в H_2O . Расчет показывает, что относительная доступность остатков триптофана молекулам воды увеличивается на 25%, что соответствует полной экспонированности двух остатков триптофана (по данным пертурбации с помощью $^2\text{H}_2\text{O}$). Аналогичный анализ для остатков тирозина провести сложно, так как полосы поглощения при длинах волн короче чем 290 нм являются смешанными.

Пертурбация спектров поглощения белка в присутствии различных растворителей очень удобна для определения степени экспонированности хромофоров ароматических аминокислот, однако получаемые результаты представляют эффективные величины. Очевидно, что, например, наличие одного полностью экспонированного остатка в действительности может отражать частичную доступность двух или более хромофоров. Дополнительную информацию о состоянии остатков тирозина в молекуле белка можно получить при спектрофотометрическом титровании в щелочной области значений рН. Метод основан на том, что разностный спектр поглощения, возникающий при ионизации остатка тирозина, имеет два максимума, при 295 и 242 нм [8]. В настоящей работе мы использовали разностные спектры поглощения при 295 нм в соответствии с методом [9] (рис. 4).

Спектры поглощения РНКазы не претерпевают никаких изменений в области рН 5,5—8, однако при дальнейшем увеличении рН в них наблюдается красное смещение, соответствующее увеличению разностного коэффициента молярной экстинкции, достигающего величины $14000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при рН 13,5. Ионизация фенольных групп остатков тирозина фермента не зависит от времени экспозиции раствора белка при всех исследованных значениях рН. Это говорит о том, что равновесие полностью устанавливается за время, проходящее от добавления раствора щелочи до снятия спектра (обычно 3—5 мин).

Данные, полученные при титровании РНКазы при 295 нм (рис. 5), анализировали аналогично работам [10, 11] (рис. 6), используя линейное уравнение

$$[\text{H}^+] \Delta \epsilon = \Delta \epsilon_{\text{макс}} K - \Delta \epsilon K, \quad (3)$$

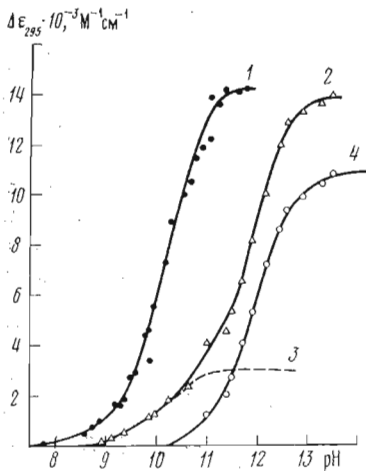


Рис. 5

Рис. 5. Кривые спектрофотометрического титрования РНКазы в щелочной области значений pH: в 4 М хлориде гуанидиния (1), в водном растворе (2), 3 — теоретическая кривая, соответствующая титрованию остатков тирозина с $pK_{\text{каж}} 10,1$; 4 — кривая, полученная вычитанием кривой 3 из кривой 2. Точки на графике соответствуют экспериментальным данным, а сплошные линии — теоретическим кривым, полученным по параметрам, представленным в табл. 2.

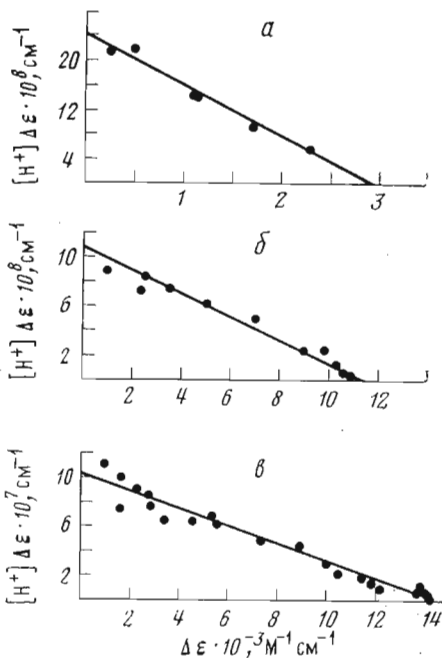


Рис. 6

Рис. 6. Результаты анализа данных, приведенных на рис. 5 по уравнению 3. График а соответствует кривой 3, б — кривой 4 и в — кривой 1

где K — кажущаяся константа ионизации. Величины $\Delta\epsilon_{\text{макс}}$ и K были найдены методом наименьших квадратов. Для одного остатка тирозина $\Delta\epsilon$ составляет $2060 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Соответственно кривая титрования РНКазы в присутствии хлорида гуанидиния отражает титрование семи остатков тирозина с $pK_{\text{каж}} 10,14$, а кривая титрования РНКазы в водном растворе наилучшим образом описывается ионизацией 1,4 остатка тирозина с $pK_{\text{каж}} 10,1$ и ионизацией 5,6 остатков тирозина с $pK_{\text{каж}} 12,0$ (табл. 2). Для построения на основании полученных результатов теоретических кривых титрования экспериментальные данные были проанализированы с помощью уравнения Хилла

$$\frac{\Delta\epsilon_{\text{макс}} - \Delta\epsilon_{\text{набл}}}{\Delta\epsilon_{\text{макс}} - \Delta\epsilon_{\text{мин}}} = \frac{K^n}{K^n + [\text{H}^+]^n}, \quad (4)$$

где n — коэффициент Хилла.

Таблица 2

Параметры ионизации остатков тирозина РНКазы *B. intermedius* 7P

| Раствор | Число остатков тирозина | $\Delta\epsilon_{295}$, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ | $pK_{\text{каж}}$ | n |
|--------------------------|-------------------------|--|-------------------|-----|
| 0,1 М КСl | 1,4 | 2950 | 10,1 | 1,0 |
| | 5,6 | 11500 | 12,0 | 1,1 |
| 0,1 М КСl, 8 М мочеви́на | 3 | 6000 | 9,9 | 1,0 |
| | 4 | 8200 | 11,3 | 1,1 |
| 0,1 М КСl, 4 М Gun-HCl | 7 | 14400 | 10,1 | 1,0 |

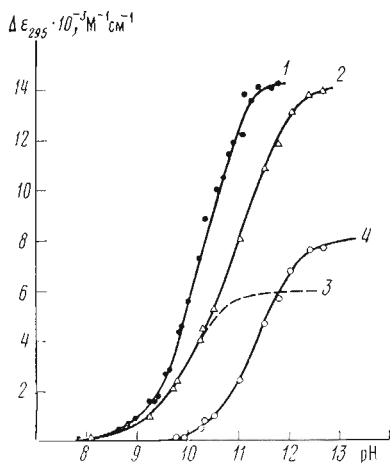


Рис. 7

Рис. 7. Кривые спектрофотометрического титрования РНКазы в щелочной области значений рН: в 4 М хлориде гуанидиния (1), в растворе 8 М мочевины (2); 3 — теоретическая кривая, соответствующая титрованию трех остатков тирозина с $pK_{\text{каж}} 9,95$ в 8 М мочевины; 4 — кривая, полученная вычитанием кривой 3 из кривой 2. Обозначения как на рис. 5

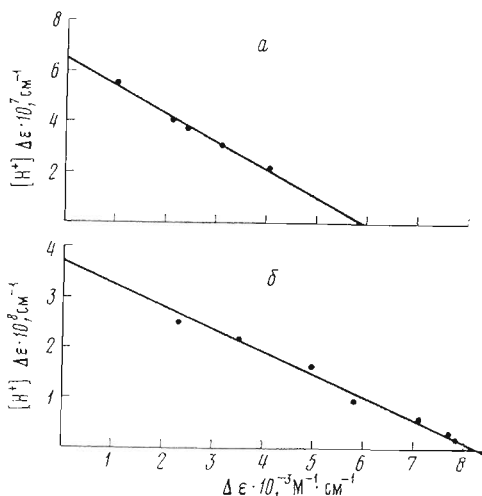


Рис. 8

Рис. 8. Результаты анализа данных, приведенных на рис. 7, по уравнению 3. График а соответствует кривой 3, б — кривой 4

Оказалось, что теоретические кривые титрования РНКазы в присутствии хлорида гуанидиния и титрования тирозина РНКазы с $pK_{\text{каж}} 10,1$ хорошо соответствуют экспериментальным точкам при использовании $n 1,0$, что указывает на полную независимость процесса их ионизации (рис. 5). В то же время теоретическая кривая титрования шести остатков тирозина с $pK_{\text{каж}} 12,0$ соответствует экспериментальным точкам при использовании $n 1,1$, что говорит о положительной кооперативности процесса щелочной денатурации и вовлечении в этот процесс дополнительных взаимодействий (рис. 5, табл. 2).

Аналогичный анализ кривой спектрофотометрического титрования РНКазы *B. intermedius* 7P в присутствии 8 М мочевины (рис. 7) показывает, что она отражает титрование трех остатков тирозина с $pK_{\text{каж}} 9,9$ и $n 1,0$ и четырех остатков с $pK_{\text{каж}} 11,3$ и $n 1,1$ (рис. 8 и табл. 2).

Сопоставление результатов, полученных при спектрофотометрическом титровании фермента в щелочной области значений рН, с данными по доступности хромофоров ароматических аминокислот молекулам растворителя позволяет предположить, что в молекуле РНКазы полностью экспонируется только один остаток тирозина (подтверждение этому выводу было получено в предварительных экспериментах по нитрованию белка). Остальные остатки тирозина обладают аномально высокими константами ионизации и лишь в незначительной степени контактируют с растворителем. Полученные экспериментальные данные позволяют также представить и другую модель третичной структуры фермента, по которой РНКаза содержит фракцию «частично экранированных» и «полностью экранированных остатков тирозина», однако и в том и другом случае их фенольные гидроксилы, по-видимому, находятся в гидрофобном окружении. Эта модель в какой-то степени подтверждается понижением величины $pK_{\text{каж}}$ двух остатков тирозина до нормальных значений в присутствии 8 М мочевины.

Для выяснения вопроса о том, как изменяется третичная структура РНКазы *B. intermedius* 7P при кислых значениях рН, мы провели соответствующее спектрофотометрическое титрование фермента, регистрируя разностные спектры, возникающие в области 260—300 нм.

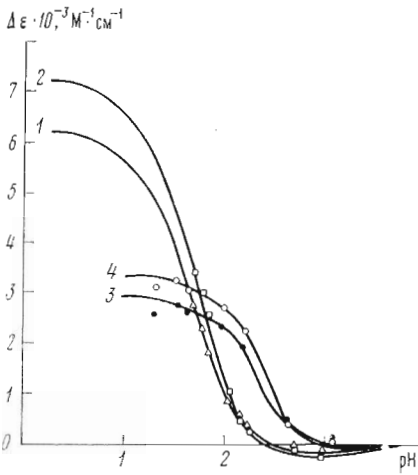


Рис. 9

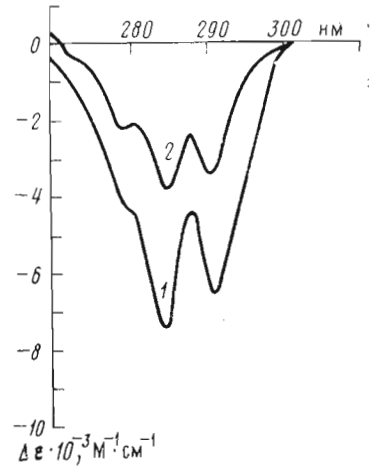


Рис. 10

Рис. 9. Кривые титрования в кислой области значений pH: нативной РНКазы при 290 нм (1), то же при 285 нм (2); 3 – кривая титрования белка, растворенного в 8 М мочеvine, при 290 нм, 4 – то же при 285 нм. Точки на графике соответствуют экспериментальным данным, сплошные линии – теоретическим кривым, полученным по уравнению 4 с использованием параметров, приведенных в табл. 3

Рис. 10. Разностные спектры поглощения раствора РНКазы при pH 0,5 (теоретический) (1) и РНКазы, растворенной в 8 М мочеvine, при pH 1,2 (2), снятые против раствора РНКазы при pH 5,5. Конечная концентрация фермента 62 мкМ, 0,1 М KCl

В водном растворе спектрофотометрическое титрование РНКазы не удается довести до конца, так как после pH 1,6 белок теряет растворимость. В связи с этим кривая титрования была синтезирована с помощью ЭВМ так, чтобы она наилучшим образом отвечала экспериментальным точкам (рис. 9). Соответственно максимальный разностный спектр кислотной денатурации РНКазы построен по теоретическим кривым титрования при разных длинах волн (рис. 10).

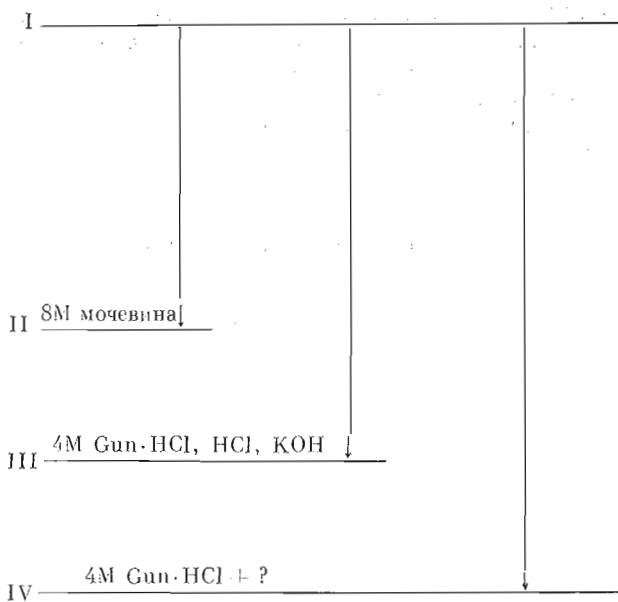
Как и в случае денатурирующих агентов (см. выше), голубое смещение полос поглощения в спектре белка при кислотном титровании обусловлено увеличением экспонированности остатков триптофана и тирозина молекулам воды, и амплитуды возникающих разностных спектров позволяют судить о степени разворачивания белковой глобулы. Фермент, растворенный в 4 М хлориде гуанидиния, разностных спектров при кислотном титровании не дает, т. е. в указанных условиях третичной структуры не имеет. Разностные спектры РНКазы в водном растворе и 8 М мочеvine (рис. 8) имеют одинаковую форму, однако их амплитуды различаются в 2 раза, что еще раз подтверждает наличие у фермента в 8 М мочеvine третичной структуры. Данные по кислотному титрованию РНКазы (рис. 7) анализировали с помощью уравнения 4 (табл. 3).

Таблица 3

Параметры кислотной денатурации РНКазы *B. intermedius* 7P

| Раствор | $\Delta\epsilon_{290}$, M ⁻¹ см ⁻¹ | $\Delta\epsilon_{285}$, M ⁻¹ см ⁻¹ | pK _{каж} | | n | |
|-------------------------|--|--|-------------------|----------|--------|--------|
| | | | 290 нм | 285 нм | 290 нм | 295 нм |
| 0,1 М KCl | 6460 | 7300 | 1,64±0,3 | 1,67±0,3 | 1,47 | 1,48 |
| 0,1 М KCl, 8 М мочеvина | 3270 | 3680 | 2,25±0,1 | 2,26±0,1 | 1,18 | 1,22 |

Нативная РНКазы *B. intermedius* 7P



Из табл. 3 видно, что разворачивание белковой глобулы в кислой области значений pH в водном растворе связано с титрованием групп, имеющих $pK_{\text{наж}}$ 1,67, а в растворе 8 М мочевины — с группами, характеризующимися $pK_{\text{наж}}$ 2,26. Таким образом, кислотная денатурация РНКазы контролируется степенью ионизации функциональных групп, по-видимому карбоксильных, с аномально низкими значениями $pK_{\text{наж}}$. Как и в случае щелочной денатурации фермента, процесс разворачивания белковой глобулы в водном растворе и растворе мочевины идет с положительной кооперативностью (табл. 3). Необходимо отметить, что кривые спектрофотометрического титрования, построенные по изменению поглощения в полосе триптофана и смешанной полосе тирозина и триптофана, дают одинаковые значения $pK_{\text{наж}}$ и коэффициента Хилла. Этот факт, по-видимому, указывает на отсутствие промежуточных форм в процессе кислотной денатурации РНКазы, или, иными словами, на то, что этот процесс можно описать моделью двух состояний: нативного и денатурированного.

Представленные в работе экспериментальные результаты позволяют предположить существование нескольких уровней организации молекулы РНКазы с точки зрения различных состояний остатков тирозина и триптофана фермента (схема). Первому уровню соответствует нативная РНКазы, в которой полностью экспонирован один остаток тирозина, вероятно, не взаимодействующий с функциональными группами белка. Два остатка тирозина также доступны молекулам растворителя, однако их фенольные гидроксильные группы погружены в белковую глобулу. Остальные четыре тирозина участвуют в образовании плотно упакованных гидрофобных зон в молекуле белка, существование которых обусловлено наличием диссоциированных карбоксильных групп с аномально низкими значениями pK . При этом молекулам воды полностью доступен лишь один остаток триптофана или частично — два. Второму уровню соответствует РНКазы, растворенная в 8 М мочевины. В этих условиях в 2 раза увеличивается фракция экспонированных тирозинов, лишь незначительно увеличивается доступность триптофанов и сохраняется гидрофобное ядро (или ядра) молекулы. Тем не менее последнее, по-видимому, имеет несколько другую структуру, чем в нативном ферменте, на что указывает понижение $pK_{\text{наж}}$ «экранированных» тирозинов и повышение $pK_{\text{наж}}$ кислотной денатурации РНКазы.

Третьему уровню соответствует фермент, развернутый под действием хлорида гуанидиния, кислоты или щелочи. При этом, однако, один из остатков триптофана, вероятно, частично остается экранированным. Четвертому уровню соответствует РНКазы с полностью доступными остатками ароматических аминокислот, однако достижение этого состояния требует дополнительных воздействий. Функциональная роль остатков тирозина и триптофана, находящихся на предложенных уровнях организации молекулы РНКазы *B. intermedius* 7P, будет рассмотрена в последующих сообщениях.

Экспериментальная часть

РНКазу *B. intermedius* 7P получали по методике, описанной ранее [1], N-ацетилтриптофиламид и N-ацетилтирозиламид (Sigma, США) использовали без дополнительной очистки. Концентрацию фермента и производных аминокислот определяли спектрофотометрически, используя для РНКазы $\epsilon_{230}^{25^\circ}$ 22 500 [1], N-ацетилтриптофиламида ϵ_{232} 5500 и N-ацетилтирозиламида $\epsilon_{274,5}$ 1340 $M^{-1}cm^{-1}$ [12].

Мочевина (ос.ч.), ацетат натрия (ос.ч.), KCl (ос.ч.) и 2H_2O (98%) — препараты отечественного производства, хлорид гуанидиния — квалификации «А» (Sigma), этиленгликоль использовали после очистки перегонкой до спектрально чистого состояния. Все растворы готовили на деионизованной бидистиллированной воде.

Спектры поглощения и разностные спектры поглощения снимали с помощью спектрофотометра Cary-118 (Varian, США) при постоянном размере щели прибора 0,3 мм, используя по необходимости диапазоны чувствительности прибора от 0—2 до 0—0,02 ОЕ.

Разностные спектры поглощения, возникающие в присутствии пертурбирующих растворителей и хлорида гуанидиния, получали, используя тандемные кюветы фирмы Hellma (США) с длиной пути для каждого отделения 0,438 см и с объемом 1 мл. В один отсек кюветы помещали водный раствор белка, а во второй — раствор пертурбирующего агента в концентрации, в 2 раза большей, чем это требовалось по условиям эксперимента. Заполненные кюветы помещали в кюветное отделение спектрофотометра, термостатировали при 24° С и прописывали нулевую линию. Далее растворы в кювете, находящейся в рабочем канале спектрофотометра, перемешивали и записывали появляющийся разностный спектр со скоростью сканирования 0,5 нм/с. Спектры обычно прописывали 2—3 раза с интервалом 15—20 мин до полной их воспроизводимости. Каждый эксперимент повторяли 3 раза и полученные данные усредняли. Расхождение в амплитудах разностных спектров, полученных таким образом, не превышало 10%.

Разностные спектры поглощения, возникающие при спектрофотометрическом титровании РНКазы, снимали в условиях, аналогичных описанным выше, используя кюветы с длиной пути 1 см (Hellma, США) и объемом 2 мл. Для титрования белка использовали растворы фермента в 0,1M KCl, а pH раствора изменяли добавлением 0,1 н. HCl и 0,1 н. KOH. Значение pH измеряли непосредственно в кювете с помощью pH-метра pH-240 (СССР) и комбинированного электрода фирмы Ingold типа 104053059 (США) диаметром 5 мм с точностью $\pm 0,05$ ед. pH.

Разностные спектры, возникающие при денатурации РНКазы 8M мочевиной, снимали способом, аналогичным описанному выше. Раствор мочевины, находящийся в кювете, расположенной в рабочем канале спектрофотометра, уравнивали против раствора буфера или KCl, а затем в обе кюветы добавляли 20—50 мкл раствора фермента.

Анализ данных по уравнению 3 проводили на ЭВМ Hewlett Packard 9830A (США), а по уравнению 4 — на ЭВМ Varian 620/L (США), варьируя в последнем случае величины K , n и $\Delta\epsilon_{max}$ с помощью программы, предоставленной А. З. Гуревичем (ИБХ АН СССР).

Авторы выражают благодарность М. Б. Лещинской (Казанский гос. университет) и Г. И. Клейнеру (Институт органических соединений Латв. АН ССР) за предоставление концентрированного ферментного препарата, И. А. Голубенко (Казанский гос. университет) и Н. К. Чепурновой (ИМБ АН СССР) за помощь в получении гомогенной РНКазы *B. intermedius* 7P, Л. В. Абатурову (ИМБ АН СССР) за плодотворную дискуссию и ценные критические замечания и А. З. Гуревичу (ИБХ АН СССР) за помощь при анализе кривых титрования фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голубенко И. А., Балабан Н. П., Лещинская И. Б., Волкова Т. И., Клейнер Г. И., Чепурнова Н. К., Афанасенко Г. А., Дудкин С. М. (1979) Биохимия, **44**, 640–648.
2. Булгакова Р. М., Лещинская И. Б., Балабан Н. П., Егорова Г. С. (1974) Биохимия, **39**, 299–302.
3. Arphanasenko G. A., Dudkin S. M., Kamindir L. B., Leschinskaja I. B., Severin E. S. (1979) FEBS Lett., **97**, 77–80.
4. Афанасенко Г. А., Дудкин С. М., Каминир Л. Б., Голубенко И. А., Северин Е. С. (1979) Биоорган. химия, **5**, 187–202.
5. Бологина И. А., Дудкин С. М., Лугаускас В. Ю., Хандаян А. Ж., Лещинская И. Б. (1979) Биоорган. химия, **5**, 203–209.
6. Herskovits T. T., Sorensen S. M. (1968) Biochemistry, **7**, 2523–2532.
7. Herskovits T. T., Sorensen S. M. (1968) Biochemistry, **7**, 2533–2542.
8. Hermans J. (1962) Biochemistry, **2**, 193–198.
9. Grammer J. L., Neuberger A. (1943) Biochem. J., **37**, 302–309.
10. Tachibana A., Murachi T. (1966) Biochemistry, **5**, 2756–2763.
11. Markland F. S. (1969). J. Biol. Chem., **244**, 694–700.
12. Beaven G. H., Holiday E. R. (1952) Adv. Protein Chem., **7**, 319–386.

Поступила в редакцию
3.IV.1979

RIBONUCLEASE *BACILLUS INTERMEDIUS* 7P. DIFFERENCE SPECTROSCOPY STUDIES OF THE STATES OF TYROSYL AND TRYPTOPHYL RESIDUES

KHANDANYAN A. G., DUDKIN S. M.

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

The states of seven tyrosyl and three tryptophyl residues of the RNase *B. intermedius* 7P were studied by solvent perturbation difference spectroscopy with $^2\text{H}_2\text{O}$ and ethylene glycol as perturbants, as well as by spectrophotometric titration at alkaline and acidic pH in aqueous solution and in the presence of 8M urea and 4M guanidine hydrochloride. The most of the aromatic amino acid residues of the enzyme were found «buried» in the interior of the native molecule. The conformation of RNase changed only partly in the presence of 8M urea but all aromatic residues became exposed to water molecules in the presence of 4M guanidine hydrochloride.