

36. Holmes D. S., Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids // Anal. Biochem.—1981.—114, N 2.—P. 193—197.
37. Lyamichev V., Panyutin I., Mirkin S. M. The absence of cruciform structures from pA03 plasmid DNA *in vivo* // J. Biomol. Struct. Dyn.—1984.—2, N 2.—P. 291—301.
38. Природа фермента, релаксирующего суперспиральную ДНК и выделяемого во фракции гистона H1 / И. М. Ундрицов, В. И. Нактинис, А. М. Колчинский, А. Д. Мирзабеков // Докл. АН СССР.—1977.—234, № 6.—С. 1474—1477.
39. Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40 / J. E. Germond, B. Hirt, P. Oudet et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1975.—72, N 5.—P. 1843—1847.
40. Shure M., Pulleyblank D. E., Vinograd J. The problems of eucaryotic and procaryotic DNA packaging and *in vivo* conformation posed by superhelix density heterogeneity // Nucl. Acids Res.—1977.—4, N 5.—P. 1183—1205.
41. Maxam A. M., Gilbert W. A new method for sequencing DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74, N 2.—P. 560—564.
42. Functional organization of the histone genes in the sea urchin *Psammechinus*: a progress report / M. Birnstiel, R. Portmann, M. Busslinger et al. // Proc. Alfred Benzon Symp.—1979.—13.—P. 117—132.
43. Haniford D. B., Pulleyblank D. E. The *in vivo* occurrence of Z DNA // J. Biomol. Struct. Dyn.—1983.—1, N 3.—P. 593—609.
44. Lee F. S., Bauer W. R. Temperature dependence of the gel electrophoretic mobility of superhelical DNA // Nucl. Acids Res.—1985.—13, N 5.—P. 1665—1682.
45. Gellert M., O'Dea M. H., Mizuuchi K. Slow cruciform transition in palindromic DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80, N 18.—P. 5545—5549.
46. Sinden R. R., Pettijohn D. E. Cruciform transitions in DNA // J. Biol. Chem.—1984.—259, N 10.—P. 6593—6600.
47. Horowitz D. S., Wang J. C. Torsional rigidity of DNA and length dependence of the free energy of DNA supercoiling // J. Mol. Biol.—1984.—173, N 1.—P. 75—91.
48. Frank-Kamenetskii M. D., Vologodskii A. V. Thermodynamics of the B-Z transition in superhelical DNA // Nature.—1984.—307, N 5950.—P. 481—482.
49. Chen F.-M. Base protonation facilitates B-Z interconversions of poly(dG-dC)·poly(dG-dC) // Biochemistry.—1984.—23, N 25.—P. 6159—6165.
50. Lyamichev V. I., Mirkin S. M., Frank-Kamenetskii M. D. A pH-dependent structural transition in the homopurine-homopyrimidine tract in superhelical DNA // J. Biomol. Struct. Dyn.—1985.—3, N 2.—P. 327—338.
51. Circular dichroism spectra show that repeating dinucleotide DNAs may form helices in which every other base is looped out / D. M. Gray, M. Vaughan, R. L. Ratliff, F. N. Hayes // Nucl. Acids Res.—1980.—8, N 16.—P. 3695—3707.
52. Gray D. M., Cui T., Ratliff R. L. Circular dichroism measurements show that C·C<sup>+</sup> base pairs can coexist with A·T base pairs between antiparallel strands of an oligodeoxynucleotide double-helix // Ibid.—1984.—12, N 19.—P. 7565—7580.
53. Photochemical demonstration of stacked C·C<sup>+</sup> base pairs in a novel DNA secondary structure / D. M. Brown, D. M. Gray, M. H. Patrick, R. L. Ratliff // Biochemistry.—1985.—24, N 7.—P. 1676—1683.
54. An unusually long poly(purine)·poly(pyrimidine) sequence is located upstream from the human thyroglobulin gene / D. Christophe, B. Cabrer, A. Bacolla et al. // Nucl. Acids Res.—1985.—13, N 14.—P. 5127—5144.
55. Margot J. B., Hardison R. C. DNase I and nuclease S1 sensitivity of the rabbit  $\beta$ 1 globin gene in nuclei and in supercoiled plasmids // J. Mol. Biol.—1985.—184, N 2.—P. 195—210.
56. Wang J. N. C., Hogan M. An equilibrium between distorted and undistorted DNA in adult chicken  $\beta^A$ -globin gene // J. Biol. Chem.—1985.—260, N 13.—P. 8194—8202.
57. Pulleyblank D. E., Haniford D. B., Morgan A. R. A structural basis for S1 nuclease sensitivity of a double stranded deoxy-polypyrimidine: deoxy-polypurine DNA // Book of abstracts of fourth conversation in biomolecular stereodynamics / Ed. R. H. Sarma.—Albany: Sunya, 1985.—P. 235.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 4.10.85

УДК 577.323.4

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ФАКТОРА КООПЕРАТИВНОСТИ ПРИ ПЛАВЛЕНИИ ДНК ОТ ИОННОЙ СИЛЫ \*

С. А. Козьякин, С. М. Миркин, Б. Р. Амирикян

**Введение.** В работе [1] высказано предположение, что уменьшение фактора кооперативности  $\sigma_0$  ( $\sigma_0 = \exp(-F_s/RT)$ , где  $F_s$  — свободная энергия инициации расплавленного участка в спиральной области) при

\* Представлена членом редколлегии д. ф.-м. н. В. И. Ивановым.

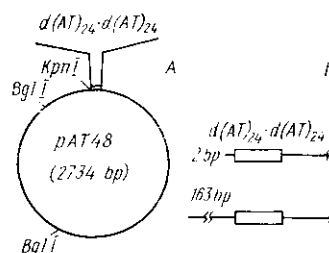
уменьшении ионной силы является основной причиной возникновения неравновесности плавления ДНК. Оценки влияния ионной силы на  $\sigma_0$  были получены в [1] на основе данных по кинетике реассоциации РНК. В то же время  $\sigma_0$  является параметром равновесной теории, поэтому представляет интерес выяснение его зависимости от концентрации соли из данных по равновесному плавлению ДНК. Несмотря на то, что теоретические профили плавления весьма чувствительны к значению этого параметра, его трудно определить из непосредственного сопоставления полных расчетных и экспериментальных профилей.

Определение  $\sigma_0$  проведено, как в работе [2], для чего необходимо было наличие двух идентичных по последовательности препаратов ДНК, в одном из которых участок плавится на конце молекулы, а в другом тот же самый участок плавится внутри спиральной области. Такие препараты можно получить при обработке одной и той же кольцевой замкнутой ДНК двумя различными рестриктазами. Сдвиг температуры плавления ( $T_{пл}$ ) такого участка при изменении его граничных условий обусловлен разностью свободных энергий образования расплавленного участка внутри спиральной области и на ее конце. Основным достоинством предложенного в [2] метода является то, что варьирование других параметров, например параметров гетерогенности стэкинг-взаимодействий, совершенно не влияет на расчетную величину сдвига  $T_{пл}$  участка, хотя абсолютные значения  $T_{пл}$  этого участка могут значительно изменяться. Таким способом в [2] был определен  $\sigma_0$  для 0,2 М натрия. Зависимость  $\sigma_0$  от ионной силы определить не удалось из-за возникновения неравновесности плавления первого участка использованной в работе [2] ДНК *ColEI*. Для настоящей работы мы выбрали ДНК плазмиды *pAT48* [3], в которой самый легкоплавкий участок плавится равновесно. Измерив сдвиги  $T_{пл}$  участка при изменении его граничных условий, мы определили зависимость  $\sigma_0$  от ионной силы.

**Материалы и методы.** ДНК. В работе использовали ДНК *pUC19* с вставленным в *SmaI*-сайт участком  $d(AT)_{24} \cdot d(AT)_{24}$ . Плазмиду, обозначенную *pAT48*, выделяли так же, как описано в [3]. ДНК очищали центрифугированием в градиенте плотности  $CsCl$ . С помощью различных рестриктаз были получены два препарата ДНК: ДНК1 — двойной перевар *pAT48* рестриктазами *BglI* и *KpnI* и ДНК2 — *pAT48*, расщепленная *BglI*. Рестриктная карта *pAT48* и положение  $d(AT)_{24} \cdot d(AT)_{24}$  по отношению к границе моле-

Рис. 1. Рестриктная карта *pAT48* (А) и положение  $d(AT)_{24} \cdot d(AT)_{24}$  по отношению к границе молекулы (Б); bp — пар нуклеотидов.

Fig. 1. Restriction map of *pAT48* (A) and the position of  $d(AT)_{24} \cdot d(AT)_{24}$  relative to the molecular boundary (B).



кулы приведены на рис. 1. Контроль за полнотой рестрикции осуществляли с помощью гель-электрофореза в 1 %-ной агарозе. Ферменты удаляли фенольным методом. ДНК переводили в требусмый буферный раствор гель-фильтрацией на колонке с сефакрилом S-300.

Плавление ДНК и обработка данных. Плавление и ренатурацию ДНК, а также обработку данных проводили, как описано в [4]. Скорость изменения температуры была 0,5 град/мин. Профили плавления сглаживались сверткой с гауссовой функцией с дисперсией 0,1 °C (рис. 2). Для визуализации плавления наиболее легкоплавких участков начальные части профилей плавления приведены в увеличенном по ординате масштабе в 50 раз (вставка к рис. 2). Эти части профилей сглажены сверткой с гауссовой функцией с дисперсией 0,5 °C (ДНК2) или 1 °C (ДНК1). Точность определения положения максимумов первых пиков профилей плавления 0,5 °C, амплитуд пиков — 0,001 °C<sup>-1</sup>.

Композитный препарат ДНК, использованный для уточнения расстояния между первыми пиками профилей плавления ДНК1 и ДНК2, состоял из ДНК1 и ДНК2 в отношении 3:2. В таком препарате ДНК1 и ДНК2 плавятся в абсолютно одинаковых солевых условиях. Композитный препарат нагревали в интервале  $T_{пл}$  легкоплавких участков ДНК1 и ДНК2, после чего проводили ренатурацию. Эту процедуру повторяли еще раз. Профили частичного плавления и ренатурации сглаживали сверткой с гауссовой функцией с дисперсией  $0,5^\circ\text{C}$ . Расстояние между максимумами первых двух пиков

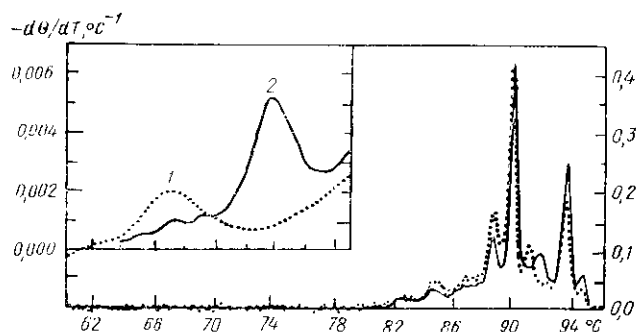


Рис. 2. Профили плавления ДНК1 (1) и ДНК2 (2) в  $1\times\text{SSC}$ . На вставке приведены начальные части профилей в увеличенном масштабе. Шкала ординат для вставки слева. Температурная шкала — обная.

Fig. 2. Melting profiles for DNA1 (1) and DNA2 (2) in  $1\times\text{SSC}$ . The insert shows the initial sections of the profiles on an enlarged scale. The ordinate scale for the insert is shown on the left. The temperature scale is the same.

профиля плавления композитного препарата ДНК определяли из профиля, усредненно по двум профилям денатурации и двум профилям ренатурации. Точность определения расстояния между пиками в этом случае составляла  $0,3^\circ\text{C}$ .

Теоретические профили плавления. Расчеты профилей плавления проводили по алгоритму [5]. Значения параметров  $\Delta H_A$ ,  $T_A$ ,  $T_G$  при различных концентрациях натрия вычисляли из формул [6, 7]:

$$\Delta H_A = 9300 + 1050 \lg [\text{Na}^+] \quad (\text{кал/моль}) \quad (1)$$

$$T_A = 355,25 + 17,3 \lg [\text{Na}^+] \quad (\text{K}) \quad (2)$$

$$T_G = 395,25 + 15,9 \lg [\text{Na}^+] \quad (\text{K}). \quad (3)$$

Статистический вес петли длиной  $l$  п. н. был задан в виде  $\sigma_l = \sigma_0 l^{-\alpha}$ , причем петлевой фактор  $\alpha$  для всех ионных сил полагали равным  $3/2$ , а величину параметра  $\sigma_0$  варьировали.

Последовательность нуклеотидов  $pAT48$  была взята из [3, 8].

**Результаты.** На рис. 2 приведены профили плавления ДНК1 (участок  $d(\text{AT})_{24} \cdot d(\text{AT})_{24}$  находится на конце молекулы) и ДНК2 (этот же участок фланкирован протяженными областями двойной спирали) в  $1\times\text{SSC}$  (буфер  $\text{SSC}$ :  $0,15 \text{ M NaCl}$ ,  $0,015 \text{ M}$  цитрат натрия). Пики профилей плавления, отвечающие выплавлению самого легкоплавкого участка, в данном масштабе не видны из-за малых величин их амплитуд. На вставке к рис. 2 приведены начальные части профилей плавления этих ДНК в увеличенном масштабе. Здесь хорошо видна разница в положении первых пиков профилей, вызванная различным положением участка  $d(\text{AT})_{24} \cdot d(\text{AT})_{24}$  по отношению к концам молекулы. Меньшую  $T_{пл1}$  имеет участок ДНК1, у которого  $d(\text{AT})_{24} \cdot d(\text{AT})_{24}$  расположен на конце молекулы (рис. 1). Большую  $T_{пл2}$  имеет участок ДНК2. В этом случае  $d(\text{AT})_{24} \cdot d(\text{AT})_{24}$  плавится внутри спиральной области. Аналогичные результаты были получены при более низких ионных силах буфера (данные не приведены).

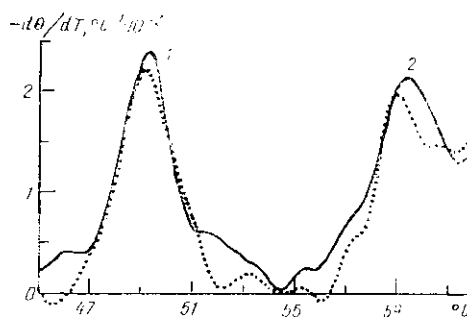
Для уточнения зависимости  $T_{пл2} - T_{пл1}$  от концентрации соли мы использовали композитный препарат, состоящий из ДНК1 и ДНК2. Этот же препарат был использован для проверки равновесности плавления

ления. Профили частичной денатурации и ренатурации композитного препарата, полученные в  $0,1 \times SSC$ , приведены на рис. 3. Как видно из рисунка, профили денатурации и ренатурации совпадают. Это означает, что плавление рассматриваемых участков ДНК1 и ДНК2 полностью равновесно. Равновесность их плавления сохраняется и при других ионных силах буфера (данные не приведены). Зависимость  $T_{пл2} - T_{пл1}$  от концентрации соли приведена в таблице, откуда видно, что уменьшение ионной силы приводит к увеличению  $T_{пл2} - T_{пл1}$ .

Для определения значения  $\sigma_0$  мы использовали подход, основанный на приведении в соответствие теоретически рассчитанных величин сдвига  $T_{пл}$  рассматриваемого участка при изменении его положения относительно концов мо-

Рис. 3. Профили частичного плавления (—) и ренатурации (...) композитного препарата, состоящего из ДНК1 и ДНК2, в  $0,1 \times SSC$ .

Fig. 3. Partial melting (—) and renaturation (...) profiles for a composite preparation comprising DNA1 and DNA2 in  $0.1 \times SSC$ .



лекулы с экспериментально найденными величинами  $T_{пл2} - T_{пл1}$  путем варьирования самого фактора кооперативности.

В таблице приведены определенные таким образом значения  $\sigma_0$  для различных ионных сил, из чего следует, что при уменьшении концентрации натрия от 1 до  $0,01$  М фактор кооперативности падает на три порядка. Поскольку  $T_{пл2} - T_{пл1}$  определяли из экспериментов с точностью до  $0,3^\circ C$ , то соответствующие значения  $\sigma_0$  определены с точностью до множителя 1,5.

*Сдвиги температуры плавления участка при изменении его граничных условий и расчетные значения фактора кооперативности*

*The shifts in the melting temperature of the stretch due to its different boundary conditions and calculated values of the cooperativity factor*

$[Na^+]$ , М	1	0,2	0,08	0,04	0,02	0,01
$T_{пл2} - T_{пл1}$ , $^\circ C$	6,5	7,3	7,9	8,8	10,0	11,8
$\sigma_0$	$7 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$7 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-8}$

**Обсуждение результатов.** Для определения зависимости фактора кооперативности  $\sigma_0$  от ионной силы из данных по сдвигу  $T_{пл}$  участка при изменении его граничных условий нам необходимо прежде всего знать зависимость энтальпии плавления АТ-пары  $\Delta H_A$  от ионной силы. В работе мы использовали данные [6, 7] (см. формулу (1)), которые, к сожалению, в настоящее время нельзя считать достаточно надежными. Этот факт приводит к некоторой неопределенности в полученной нами зависимости  $\sigma_0$  от  $[Na^+]$ . Так, например, если  $\Delta H_A$  вообще не зависит от ионной силы, то 10-кратное уменьшение  $[Na^+]$  будет приводить к на порядок более сильному уменьшению  $\sigma_0$ .

Кроме того, в теоретических расчетах сдвиг  $T_{пл}$  участка целиком (при известном  $\Delta H_A$ ) определяется значением статистического веса  $\sigma_l$ , приписываемого этому участку, когда он расплавлен внутри спиральной области. Функция  $\sigma_l$ , как правило, представлена в виде

$$\sigma_l = \sigma_0 l^{-\alpha}, \quad (4)$$

где  $\alpha$  — так называемый петлевой фактор, а  $l$  — длина участка в п. н.

Второй множитель в формуле (4) отражает зависимость статистического веса от длины расплавленного участка, в то время как первый множитель  $\sigma_0$  включает все факторы, не зависящие от размера петли. Следует отметить, что теоретические профили плавления не очень чувствительны к конкретному виду функции  $\sigma_l$  и вопрос о ее точной функциональной форме остается открытым (подробнее см. [9]).

Из наших экспериментов, проведенных для петли одного размера, невозможно определить, какой из множителей, входящих в статистический вес, дает основной вклад в зависимость от ионной силы. Поэтому в теоретических расчетах мы полагали, что вся зависимость величины  $\sigma_l$  от ионной силы обусловлена изменением фактора кооперативности  $\sigma_0$ , а величина петлевого фактора  $\alpha$  оставалась постоянной и равной  $3/2$ . Следует, однако, помнить, что сдвиг  $T_{пл}$  участка при изменении его граничных условий определяется полным статистическим весом петли  $\sigma_l$ . Вследствие этого полученная зависимость  $\sigma_0$  от ионной силы (таблица) отражает зависимость полного статистического веса петли, который при длине петли 48 п. н. уменьшается с уменьшением ионной силы. При понижении концентрации натрия от 1 до 0,01 М величина  $\sigma_l$  падает на три порядка, причем при высоких ионных силах она изменяется слабее, чем при низких.

Воспользовавшись данными работы [2], можно проверить достоверность формулы (4) при  $\alpha=3/2$  в 1×SSC. Сравнение показывает, что в 1×SSC величина фактора кооперативности  $\sigma_0$  (формула 4), определенная для петли длиной 48 п. н. (таблица), равна величине  $\sigma_0$ , определенной для петли длиной  $\approx 400$  п. н. [2]. Это равенство означает, что при высокой ионной силе формула (4) удовлетворительно описывает функциональную зависимость статистического веса петли от ее длины.

Авторы выражают благодарность А. В. Вологодскому, Ю. С. Лазуркину, Ю. Л. Любченко и М. Д. Франк-Каменецкому за полезные советы и критические замечания.

#### THE IONIC STRENGTH DEPENDENCE OF THE COOPERATIVITY FACTOR IN DNA MELTING

S. A. Kozyavkin, S. M. Mirkin, B. R. Amirikyan

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

#### Summary

The melting temperatures for the d(AT)<sub>24</sub>·d(AT)<sub>24</sub> stretch located inside the DNA helix or terminally have been determined in a wide range of the ionic strength values (0.01-1 M Na<sup>+</sup>). The values of cooperativity factor were calculated from the shifts in the melting temperature of the stretch due to its different boundary conditions. With a decrease of the sodium concentration from 1 to 0.01 M the cooperativity factor has dropped by three orders of magnitude, its change being less pronounced at high ionic strengths than at low ones.

1. Slow relaxational processes in the melting of linear biopolymers: a theory and its application to nucleic acids / V. V. Anshelevich, A. V. Vologodskii, A. V. Lukashin, M. D. Frank-Kamenetskii // *Biopolymers*.— 1984.—23, N 1.— P. 39—58.
2. Amirikyan B. R., Vologodskii A. V., Lyubchenko Yu. L. Determination of DNA cooperativity factor // *Nucl. Acids Res.*— 1981.—9, N 20.— P. 5469—5482.
3. Panyutin I., Lyamichev V., Mirkin S. A structural transition in d(AT)<sub>n</sub>·d(AT)<sub>n</sub> inserts within superhelical DNA // *J. Biomol. Struct. Dyn.*— 1985.—2, N 6.— P. 1221—1234.
4. Kozyavkin S. A., Naritsin D. B., Lyubchenko Yu. L. The kinetics of DNA helix-coil subtransitions // *Ibid.*— 1986.—3, N 4.— P. 846—850.
5. Fixman M., Freire J. J. Theory of DNA melting curves // *Biopolymers*.— 1977.—16, N 12.— P. 2693—2704.
6. Gruenwedel D. W. Salt effects on the denaturation of DNA. A calorimetric investigation of the transition enthalpy of calf thymus in Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solutions of varying ionic strength // *Biochim. et biophys. acta.*— 1974.—340, N 1.— P. 16—30.

7. Gruenwedel D. W. Salt effects on the denaturation of DNA. A calorimetric study of the helix-coil conversion of the alternating copolymer poly[d(AT)] // *Ibid.*— 1975.— 395, N 3.— P. 246—257.
8. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors // *Gene.*— 1985.— 33, N 1.— P. 103—119.
9. Gotoh O. Prediction of melting profiles and local helix stability for sequenced DNA // *Adv. Biophys.*— 1983.— 16.— P. 1—52.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 16.09.85

УДК 577.112.5:577.152.121

## ИЗУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-КОНЦЕВОЙ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ И ВЫДЕЛЕНИЕ ЦИСТЕИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ

Т. Б. Устинникова, В. О. Попов, А. М. Егоров, Ц. А. Егоров

**Введение.** НАД-зависимая формиатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2) катализирует окисление формиата до  $\text{CO}_2$ , в ходе которого осуществляется перенос гидрид-иона от субстрата к молекуле НАД. В предыдущих работах нами были получены гомогенные препараты НАД-зависимой формиатдегидрогеназы мезофильных бактерий *Pseudomonas sp101* (прежнее название *Achromobacter parvulus*) и изучены ее основные физико-химические свойства [1, 2]. Формиатдегидрогеназа представляет собой белок с молекулярной массой около 80000, состоящий из двух идентичных субъединиц и включающий два независимых активных центра [1, 3]. Нами был подробно исследован кинетический механизм действия формиатдегидрогеназы [4, 5]. Конформацию и структуру активного центра фермента исследовали методами химической модификации аминокислотных остатков специфическими реагентами, а также путем картирования аналогами субстратов и кофермента [2, 4]. На основании этих работ были сформулированы основные закономерности протекания ферментативного процесса окисления формиата [2]. В связи с получением кристаллов формиатдегидрогеназы, пригодных для рентгенографических исследований, возник вопрос об определении первичной структуры фермента.

Классические методы определения первичной структуры белков весьма трудоемки, что связано с необходимостью разделения сложных смесей пептидов. Особую трудность составляет изучение белков, содержащих остатки цистеина, которые отличаются высокой реакционной способностью. Формиатдегидрогеназа из *Pseudomonas sp101* характеризуется высоким содержанием тиоловых остатков. Субъединица фермента содержит шесть остатков цистеина, существенно различающихся по своей реакционной способности и доступности действию модифицирующих реагентов. Наиболее реакционноспособная тиольная группа находится в районе активного центра фермента. Ее избирательное блокирование приводит к полной потере ферментативной активности [1, 2, 6]. В последнее время успешно развивается новый подход структурно-функционального анализа белков, содержащих остатки цистеина и (или) цистина [7, 8]. Он основан на иммобилизации цистеинсодержа-

Сокращения: ДТТ — дитиотреитол, ДПДС — 2,2'-дипиридилдисульфид, ДНС-Cl — 5-диметиламинонафталин-1-сульфонилхлорид, ФИТЦ — фенилизотиоцианат, Gu-HCl — гуанидинхлорид, ТФУ — трифторуксусная кислота, МЭ — 2-меркаптоэтанол, ЭМА — N-этилморфолинацетатный буфер, ЭДТА- $\text{Na}_2$  — динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты.