

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 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 — гуанидингидрохлорид, ТФУ — трифторуксусная кислота, МЭ — 2-меркаптоэтанол, ЭМА — N-этилморфолинацетатный буфер, ЭДТА- Na_2 — динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты.

ших белков на носителях путем реакции тиол-дисульфидного обмена с последующим расщеплением конъюгата ферментативными или химическими способами.

Целью настоящей работы является дальнейшая разработка стратегии структурно-функционального анализа тиолзависимых ферментов и частичное изучение первичной структуры НАД-зависимой формиатдегидрогеназы метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp101*.

Материалы и методы. Реагенты. В работе использованы следующие реагенты: CPG/Thiol, ДНС-Cl, ТФУ, ФИТЦ («Pierce», США), ЭДТА-Na₂, N-(иодоацетиламиноэтил)-5-нафтиламин-1-сульфоновая кислота («Sigma», США), ДПДС («Aldrich», США), тиопропил-сефароза 6B («Pharmacia», Швеция), ТРСК-трипсин («Worthington», США).

Формиатдегидрогеназу из метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp101* выделяли, как описано ранее [1].

Активация носителя CPG/Thiol. 25 мл носителя инкубировали при перемешивании с 20-кратным молярным избытком ДТТ в 50 мл 0,2 М ЭМА, pH 8,0, содержащего 1 мМ ЭДТА-Na₂ и 20 %-ный этанол, в течение 4 ч при 40 °С в атмосфере азота. Затем носитель промывали на пористом фильтре водой и 50 %-ным MeOH до удаления ДТТ. Носитель перемешивали в атмосфере азота в течение 1 ч с 50 мл 50 %-ного раствора MeOH в 0,1 М ЭМА, pH 8,0, содержащего ДПДС (10-кратный молярный избыток). После этого раствор декантировали, остаток промывали 50 %-ным MeOH и снова инкубировали с раствором ДПДС. Повторяли до тех пор, пока не прекратилось выделение тиопиридона. Активированный носитель промывали MeOH до полного удаления ДПДС и сушили в вакуум-эксикаторе.

Иммобилизация формиатдегидрогеназы на активированных носителях. Для иммобилизации формиатдегидрогеназы на стекле CPG/Thiol концентрированный раствор фермента добавляли к носителю, уравновешенному 6 М Gu-HCl в 0,05 М К-фосфатном буфере, pH 7,6, содержащем 1 мМ ЭДТА-Na₂. Объем носителя составлял 35—25 % объема раствора белка. Иммобилизацию вели при перемешивании в атмосфере азота в течение 6 ч. Конъюгат промывали последовательно буфером с 6 М Gu-HCl, водой, водным MeOH и MeOH. Конъюгат сушили и хранили при 8 °С. Количество иммобилизованного белка определяли с помощью аминокислотного анализа. При использовании в качестве носителя тиопропил-сефарозы конъюгат промывали 6 М Gu-HCl и уравновешивали соответствующим буфером. Количество иммобилизованного белка определяли по выходу 2-тиопиридона [8].

Триптический гидролиз иммобилизованной формиатдегидрогеназы. Гидролиз формиатдегидрогеназы, иммобилизованной на тиопропил-сефарозе 6B, выполняли при перемешивании в атмосфере азота в течение 4 ч в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 7,8, при 37 °С (соотношение фермента к субстрату 1 : 100). По окончании гидролиза супернатант отбирали, остаток дважды промывали 1—2 объемами буфера и объединенный супернатант лиофилизировали. Затем остаток промывали 6 М Gu-HCl в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 7,8, и уравновешивали 0,1 М аммоний-бикарбонатным буфером. К полученной суспензии (на 1 объем геля 1—2 объема буфера) добавляли МЭ из расчета 50 мкл/мл геля и после перемешивания оставляли на 30 мин при комнатной температуре. После восстановления супернатант собирали, остаток дважды промывали буфером и объединенную фракцию цистинилпептидов лиофилизировали. Фракцию этих пептидов анализировали высокоэффективной эксклюзионной хроматографией на колонке TSK 2000 SW в 0,1 %-ной ТФУ, а в препаративных целях разделяли на био-геле Р-4 в 0,01 н. CH₃COOH, содержащей 1 мМ МЭ, с последующим алкилированием 4-винилпиридином [9] при pH 7,5, используя 3-кратный молярный избыток реагента по отношению к МЭ. Фракцию пептидов, не содержащих остатков цистеина, разделяли на колонке LiChrosorb RP-18 (4,6×250 мм) в 0,1 %-ной ТФУ и градиенте ацетонитрила.

Специфический гидролиз иммобилизованной формиатдегидрогеназы трипсином по остаткам аргинина. ε-Аминогруппы остатков лизина фермента, иммобилизованного на CPG/Thiol, предварительно блокировали ДНС-Cl или ФИТЦ. При дансировании около 25 мг конъюгата (2 нмоль белка) помещали в ампулу и добавляли 100—150 мкл 0,2 М ЭМА, pH 9,5. После перемешивания избыток буфера отбирали. К конъюгату добавляли 50 мкл ДНС-Cl в ацетоне (6 мг/мл) и инкубировали при 45 °С в течение 60 мин. Затем избыток реагента отбирали, остаток промывали ацетоном, водой и окончательно 0,1 М ЭМА, pH 7,2. Трипти-

ческий гидролиз формиатдегидрогеназы, модифицированной ДНС-Cl, вели при pH 7,2 и 37 °C в течение 90 мин (соотношение фермента к субстрату 1 : 150). Затем супернатант отбирали, остаток промывали 6 M Gu-HCl в буфере, pH 7,8, водой и 0,1 M Na-бикарбонатным буфером, pH 9,5, для последующего дансирования. Для блокирования боковых цепочек лизина иммобилизованной формиатдегидрогеназы с помощью ФИТЦ конъюгат вначале уравнивали 50 %-ным ЭМА, pH 9,5, после чего добавляли 5 %-ный ФИТЦ в ацетонитриле и инкубировали 1 ч при 45 °C в атмосфере аргона. Конъюгат промывали MeOH для удаления избытка реагента и уравнивали 0,1 M ЭМА,

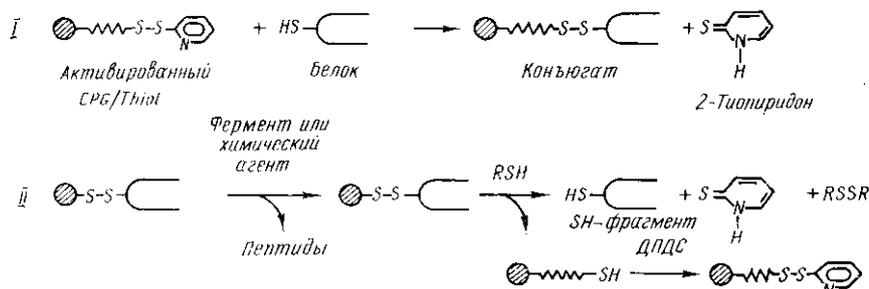


Рис. 1. Обратная иммобилизация белка по остаткам цистеина (I) и последующая фрагментация образовавшегося конъюгата ферментами или химическими агентами (II).
 Fig. 1. The reversible protein immobilization via cysteine residues (I) followed by fragmentation of the conjugate by enzymes or chemical agents (II).

pH 7,2. Триптический гидролиз белка, модифицированного таким образом на носителе, выполняли, как описано выше.

Расщепление иммобилизованной формиатдегидрогеназы бромцианом. Около 50 мг конъюгата (4 нмоль белка) помещали в ампулу, промывали 70 %-ной HCOOH, после чего добавляли 100-кратный молярный избыток бромциана. Смесь инкубировали в атмосфере азота в темноте 16 ч. Супернатант отбирали, остаток промывали два раза по 50 мкл 70 %-ной HCOOH и объединенную фракцию лиофилизировали. Остаток промывали дополнительно HCOOH, водой и 0,1 M Na-бикарбонатным буфером, pH 9,5.

Определение N-концевых аминокислот иммобилизованных пептидов. N-концевые аминокислоты в пептидах, образующихся при фрагментации иммобилизованного белка, определяли в виде ДНС-производных. N-концевой анализ пептидов, уходящих в раствор, проводили, как обычно. N-концевые аминокислоты пептидов, остающихся на пористом стекле после соответствующей фрагментации белка, определяли следующим образом. К суспензии остатка конъюгата, уравновешенного буфером с pH 9,5, добавляли равный объем ДНС-Cl в ацетоне (6 мг/мл) и после перемешивания инкубировали при 45 °C в течение 60 мин. Затем избыток реагента отбирали, остаток промывали MeOH и высушивали под уменьшенным давлением прямо в ампуле. К остатку добавляли небольшой избыток 5,7 н. HCl и гидролизовали в атмосфере аргона при 110 °C 16 ч. Супернатант отбирали, остаток промывали водой, объединенный супернатант улаживали и растворяли в минимальном объеме 50 %-ного пиридина. ДНС-аминокислоты идентифицировали на полиамидных пластинках размером 5×5 см.

Определение N-концевой аминокислотной последовательности формиатдегидрогеназы. Около 8 нмоль белка, иммобилизованного на 100 мг CPG/Thiol, подвергали анализу N-концевой аминокислотной последовательности на твердофазном секвенаторе модели APS 240 («Rank Hilger», Англия). Для сравнения анализ N-концевой аминокислотной последовательности белка осуществляли на жидкофазном секвенаторе модели 890C («Beckman», США). Фенилтиогидантоины аминокислот определяли высокоэффективной жидкостной хроматографией на колонке Ultrasphere ODS (4,6×250 мм) («Alltech», США) в градиенте метанола.

Определение аминокислотного состава и аминокислотной последовательности пептидов осуществляли, как в работе [10].

Результаты и обсуждение. Для структурного анализа формиатдегидрогеназы использовали обратную иммобилизацию белка (рис. 1). Таким путем смесь пептидов разделяется на две группы, одна из которых содержит только остатки цистеина. Благодаря этому, кроме селек-

тивного выделения SH-пептидов, существенно упрощается задача разделения и очистки пептидов. В зависимости от целей и задач исследования остатки цистеина в пептидах могут быть модифицированы различными способами и дифференцированно.

В настоящей работе для иммобилизации формиатдегидрогеназы использовано два типа носителей, содержащих активированную SH-группу — на основе сефарозы и пористого стекла. Последнее, SPG/Thiol, может быть активировано до 5—15 мкмоль/г сухого веса. Емкость носителей в отношении формиатдегидрогеназы не изучали. Для иммобилизации белка в денатурирующих условиях обычно использовали 100—200-кратный избыток активированного носителя. В этих условиях на обоих носителях была достигнута количественная иммобилизация белка. В результате кислотного гидролиза иммобилизованной формиатдегидрогеназы на хроматограмме аминокислотного анализатора обнаруживаются артефакты, которые мешают определению только глутаминовой кислоты, пролина и цистина. Носитель на основе сефарозы удобен для работы в мягких условиях, например при ферментативном гидролизе конъюгата. Носитель же на основе пористого стекла более пригоден для химической модификации иммобилизованных белков.

Для определения N-концевой аминокислотной последовательности формиатдегидрогеназы белок анализировали по Эдману на жидкофазном и твердофазном секвенаторах. В первом случае, исходя из количества белка 10 нмоль, было идентифицировано 14 аминокислотных остатков: $H_2N-Ala-Lys-Val-Leu-Cys-Val-Leu-Gly-Asp-Asp-Pro-Val-Asp-Tyr...$. Во втором случае при иммобилизации белка (8 нмоль) на пористом стекле и анализе на твердофазном секвенаторе, кроме 5-й позиции, было определено также 14 аминокислот. Полученные нами результаты подтверждают, что белки, иммобилизованные по остаткам цистеина, могут быть успешно проанализированы на твердофазном секвенаторе.

На рис. 2, А представлены результаты аналитического разделения методом эксклюзионной хроматографии цистеинсодержащих триптических пептидов формиатдегидрогеназы после их десорбции с носителя под действием МЭ. Расчет площадей пиков показал, что гидролиз трипсином иммобилизованной формиатдегидрогеназы идет достаточно быстро. Уже через 30 мин гидролиза появляются семь пиков, соотношение которых, меняясь в начале гидролиза, остается практически неизменным после 120 мин гидролиза, кроме пиков № 2 и 5 (таблица). Заметное изменение процентного содержания пика № 2 может быть обусловлено наличием химотриптической активности в используемом препарате трипсина. Сравнение с рис. 2, Б, на котором представлена хроматограмма пептидов, не содержащих остатков цистеина, наглядно

Процентное содержание цистеинсодержащих пептидов, получающихся при гидролизе трипсином формиатдегидрогеназы, иммобилизованной на тиопропил-сефарозе 6В
The content (%) of the cysteine containing peptides after tryptic digestion of the formate dehydrogenase immobilized on thiopropyl-Sepharose 6B

№ пика	Время гидролиза, мин			
	30	60	120	360
	следы	следы	0,7	0,7
	33,9	29,9	25,2	20,3
	37,7	34,5	35,4	32,3
	3,3	5,1	6,9	7,7
	14,4	19,2	19,5	23,1
6	следы	2,8	8,6	8,4
7*	10,7	8,5	8,6	7,6

* Пик № 7 непептидной природы.

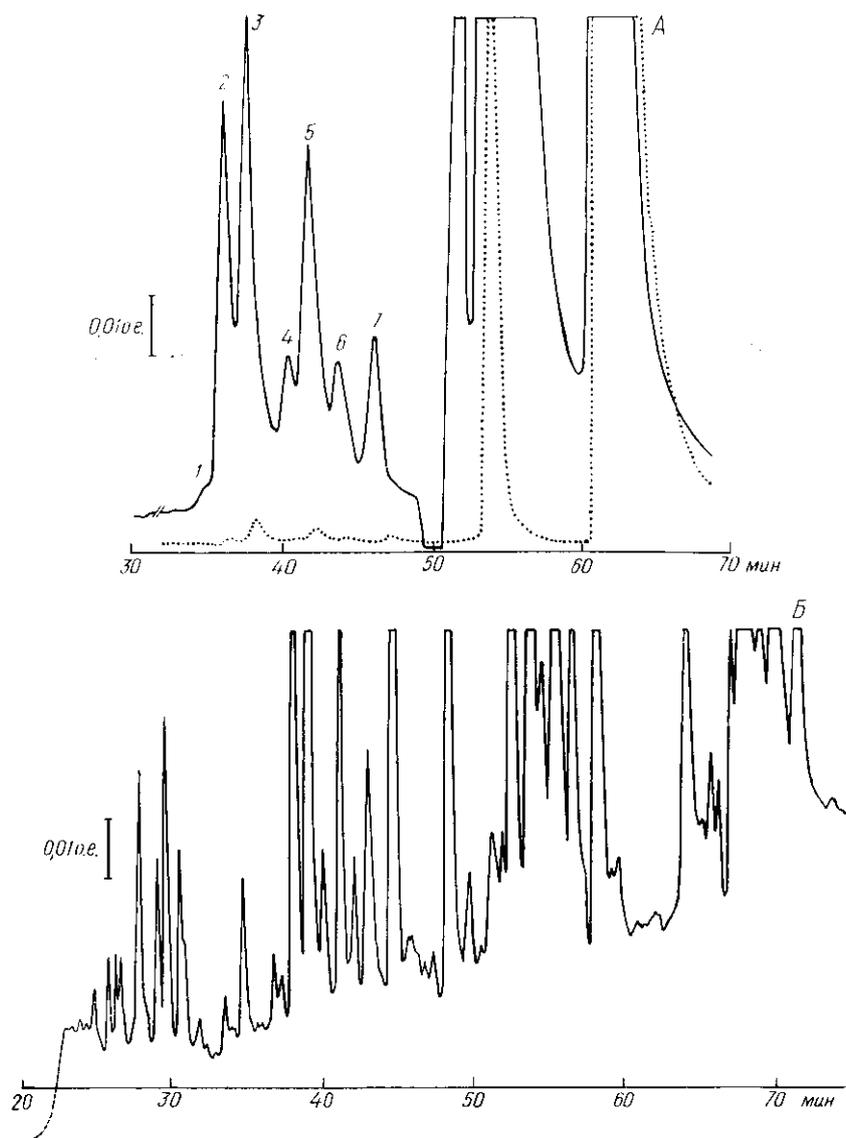


Рис. 2. Высокоэффективная эксклюзионная (А) и жидкостная (Б) хроматографии пептидов форматдегидрогеназы: А — содержащих цистеин, на колонке TSK 2000 SW (7,6×600 мм); — — детекция при 210 нм; ... — то же при 280 нм (после 50-й мин выходят соли, МЭ, 2-тиопиридон); Б — не содержащих остатков цистеина, на колонке с обращенной фазой LiChrosorb RP-18 (4,6×250 мм). Условия элюции: буфер А — 4 мин; линейный градиент от 0 до 100 % буфера Б — 90 мин. Буфер А — 0,1 %-ная ТФА; Буфер Б — 60 %-ный ацетонитрил в 0,1 %-ной ТФА. Скорость элюции 1 мл/мин, детекция при 210 нм.

Fig. 2. Gel-filtration (A) and reverse phase (B) HPLC of formate dehydrogenase peptides: A — cysteine containing peptides, TSK 2000 SW (7.6×600 mm) column; detection at 210 nm (—) and 280 nm (...); salts, mercaptoethanol and 2-thiopyridone are eluted after 50 min; B — peptides not containing cysteine; LiChrosorb RP18 (4.6×250 mm) column. Elution conditions: buffer A — 4 min, linear gradient from 0 to 100 % buffer B — 90 min. Buffer A — 0.1 % trifluoro acetic acid (TFA). Buffer B — 60 % acetonitril in 0.1 % TFA. Elution rate 1 ml/min, detection at 210 nm.

демонстрирует достоинства предлагаемого варианта разделения пептидов при исследовании первичной структуры белка.

В результате препаративного выделения триптических цистеинсодержащих пептидов было получено пять пептидов ТС-1—ТС-5 (соответственно пикам № 2—6, таблица), которые были частично секвени-

рованы:

TC-1 Glu-Asp-Met-Tyr-Pro-Val-Cys-Asx-(Asx₂, Thr₂, Ser₁, Glx₂, Pro₂, Gly₁, Val₁, Ile₁, Leu₂₋₃, His₁, Cys₁)-Lys

TC-2 Glu-Ile-Leu-Glu-Pro-Phe-(Asx₁, Thr₁, Ser₁, Glx₁, Gly₃, Ala₂, Val₁, Met₁, Leu₁, His₁, Cys₁)-Arg

TC-3 Gly-Gly-His-Asn-Ala-(Asx₁, Thr₁, Ser₁, Glx₁, Ala₂, Val₂, Leu₁, Tyr₁, His₁, Cys₁)-Arg

TC-4 Val-Leu-Cys-Val-Leu-Gly-Asp-Asp-Pro-(Asx₁, Pro₁, Val₁, Tyr₂)-Lys

TC-5 Leu-Cys-Asp-Arg.

Известно, что одна субъединица формиатдегидрогеназы содержит шесть остатков цистеина [6]. Наличие лишь пяти цистеинсодержащих пептидов после стадии триптического гидролиза указывает на то, что по крайней мере один из них содержит два остатка цистеина. Предположительно два остатка цистеина содержатся и в пептиде TC-1.

Как уже отмечалось, один из остатков цистеина в молекуле формиатдегидрогеназы обладает аномально высокой реакционной способностью, существен для проявления каталитической активности и может быть селективно блокирован рядом специфических реагентов [6]. Нами осуществлена специфическая модификация этого высокореакционноспособного тиола с помощью ¹⁴C-иодацетамида и N-(иодэтиламиноэтил)-5-нафтиламин-1-сульфоновой кислоты. В отдельных экспериментах было показано, что наблюдается линейная корреляция между включением метки и каталитической активностью формиатдегидрогеназы вплоть до модификации ~0,7 SH-группы на субъединицу фермента.

При иммобилизации препаратов формиатдегидрогеназы, модифицированной флюоресцентной меткой (1,4 молекулы метки на субъединицу, остаточная активность ~6%), и последующего триптического гидролиза не происходит уменьшения числа иммобилизованных пептидов. На матрице остаются все пять исходных цистеинсодержащих пептидов, причем около 85% метки включается во фракцию иммобилизованных пептидов и лишь около 15% переходит в растворимую фракцию. До 90% метки, включенной во фракцию цистеинсодержащих пептидов, находится в пептиде TC-1, что позволяет заключить, что данный пептид содержит два остатка цистеина, один из которых является «существенным». Аналогичные результаты были получены и при использовании ¹⁴C-иодацетамида.

С целью отработки условий получения более крупных фрагментов в аналитическом варианте был осуществлен специфический гидролиз иммобилизованной формиатдегидрогеназы трипсином по остаткам аргинина и проведено расщепление бромцианом. Для этих целей белок иммобилизовали на пористом стекле. В результате блокирования ε-аминогруппы лизина иммобилизованной формиатдегидрогеназы ДНС-Cl и ФИТЦ и последующего гидролиза модифицированного белка трипсином на носителе было обнаружено только три N-концевые аминокислоты — аланин, лейцин и глутаминовая кислота. Очевидно, что для модификации могут быть использованы другие реагенты, в том числе обратимая защита малениновым ангидридом [7, 8]. Положительные результаты были получены и при расщеплении иммобилизованной формиатдегидрогеназы бромцианом. Здесь на носителе были обнаружены следующие N-концевые аминокислоты: Gly, Ala, Ile, Asx, His, а в растворе — Ile, Asx, Tyr. Всего теоретически при расщеплении фермента бромцианом, исходя из содержания остатков метионина, можно ожидать образование восьми фрагментов.

Следует также отметить, что при анализе N-концевых аминокислот иммобилизованных фрагментов формиатдегидрогеназы в виде дансил-

ных производных наблюдаемый фон гораздо ниже, чем при дансировании белков и пептидов в растворе, так как избыток реагента и побочные продукты реакции перед гидролизом полностью удаляются метанолом. Этот способ может быть рекомендован для определения N-концевых аминокислот цистеинсодержащих белков с идентификацией ДНС-аминокислот на пластинках или высокоэффективной жидкостной хроматографией.

Таким образом, в данной работе на примере бактериальной форматдегидрогеназы показана применимость нового подхода для разделения пептидов при определении первичной структуры цистеинсодержащих белков, основанного на ковалентной иммобилизации белка с помощью реакции тиол-дисульфидного обмена. Выделены и охарактеризованы триптические цистеинсодержащие пептиды. Локализован существенный остаток цистеина, ответственный за проявление каталитической активности фермента.

Авторы выражают благодарность Л. М. Винокурову за определение N-концевой аминокислотной последовательности форматдегидрогеназы.

PRIMARY STRUCTURE
OF THE BACTERIAL FORMATE DEHYDROGENASE
DETERMINATION OF N-TERMINAL AMINO ACID SEQUENCE
AND ISOLATION OF CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDES

T. B. Ustinnikova, V. O. Popov, A. M. Egorov, Ts. A. Egorov

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
N. I. Vavilov Institute of General Genetics,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
M. V. Lomonosov University, Moscow

С у м м а р у

NAD-dependent formate dehydrogenase from methylotrophic bacteria of *Pseudomonas sp101* was immobilized on thiopropyl-Sepharose 6B and CPG/Thiol activated by 2,2'-dipyridyl disulphide via the thiol-disulphide exchange reaction. A procedure for the tryptic digestion of the immobilized enzyme was optimized. Cysteine-containing tryptic peptides were isolated and partially characterized. The peptide which contained the essential cysteine residue responsible for the catalytic enzyme activity was located. A method for the determination of the N-terminal amino acids after fragmentation of the immobilized protein was developed. The N-terminal amino acid sequence of the formate dehydrogenase immobilized via its cysteine residues on a controlled porous glass was determined.

1. NAD-dependent formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium, strain. I. Purification and characterization / A. M. Egorov, T. V. Avilova, M. M. Dikov et al. // Eur. J. Biochem.—1979.—99, N 2.—P. 569—576.
2. Kinetic and structural properties of NAD-dependent bacterial formate dehydrogenase / A. M. Egorov, V. O. Popov, I. V. Berezin, Yu. V. Rodionov // J. Solid Phase Biochem.—1980.—5, N 1.—P. 19—33.
3. Форматдегидрогеназа из *Bacterium sp. 1*: число активных центров и константы связывания с коферментами / В. О. Попов, Ю. В. Родионов, А. М. Егоров, И. В. Березин // Докл. АН СССР.—1978.—239, № 6.—С. 1482—1485.
4. НАД-зависимая форматдегидрогеназа из метилотрофных бактерий, изучение кинетической схемы действия / В. О. Попов, Ю. В. Родионов, А. М. Егоров, И. В. Березин // Биоорг. химия.—1978.—4, № 1.—С. 117—128.
5. Тишков В. М., Егоров А. М., Попов В. О. Бактериальная форматдегидрогеназа. Субстратная специфичность и кинетический механизм окисления S-формилглутатиона // Биохимия.—1983.—48, № 7.—С. 1172—1180.
6. Попов В. О., Егоров А. М. Исследование существенных SH-групп бактериальной форматдегидрогеназы // Там же.—1979.—44, № 2.—С. 207—213.
7. Егоров Ц. А., Шахпаронов М. И., Давидович Ю. А. Получение нерастворимого носителя с активированной SH-группой и его использование в химии белка // Биоорг. химия.—1977.—3, № 8.—С. 1111—1115.

(Окончание см. на с. 159).

мент, способный аденилировать тРНК по 3'-концу в присутствии поли(И)-поли(С) и АТР либо dАТР. Предполагают, что этот процесс может быть одним из механизмов антивирусного действия интерферона.

Супрессорные тРНК были рассмотрены на отдельном заседании. В целом изучение супрессорных тРНК развивается широким фронтом во многих странах, но, к сожалению, аналогичных работ в СССР проводится недостаточно.

Участие советских ученых в симпозиуме по тРНК было целиком и полностью оправданным: получена весьма обширная и существенная по своей научной значимости информация, выходящая за рамки собственно тРНК и aa-тРНК-синтетаз.

Э. И. БУДОВСКИЙ, Р. Х. ВИЛЛЕМС,
Л. Л. КИСЕЛЕВ, О. И. ЛАВРИК,
О. О. ФАВОРОВА

Окончание. Начало см. на с. 129—135.

8. Egorov Ts. A., Shakhparonov M. I. Strategy of thiol protein sequence analysis // Methods in peptide and protein sequence analysis / Ed. Chr. Birr.— Amsterdam: Elsevier, 1980.— P. 395—405.
9. Determination of the amino acid sequence of porcine trypsin by sequenator analysis / M. A. Hermondson, L. H. Ericsson, H. Neurath, K. A. Walsh // Biochemistry.— 1973.— 12, N 17.— P. 3146—3153.
10. Первичная структура α -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*. I. Пептиды триптического гидролиза / Н. Н. Модянов, В. М. Липкин, Ю. В. Смирнов и др. // Биооргани. химия.— 1978.— 4, № 2.— С. 158—179.

Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва
Ин-т общ. генетики им. Н. И. Вавилова АН СССР,
Москва
МГУ им. М. В. Ломоносова

Получено 20.08.85