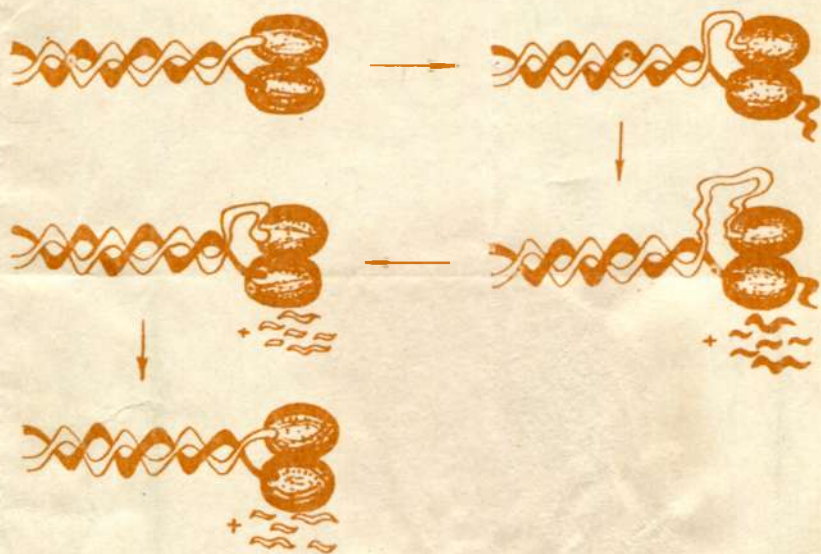


И. Б. Леушинская

НУКЛЕОДЕПОЛИМЕРАЗЫ САПРОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ



КАЗАНСКИЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО
ЗНАМЕНИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. В. И. УЛЬЯНОВА-ЛЕНИНА

И.Б.Лещинская

**НУКЛЕОДЕПОЛИМЕРАЗЫ
САПРОФИТНЫХ
БАКТЕРИЙ**



**ИЗДАТЕЛЬСТВО
КАЗАНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
1975**

П е ч а т а е т с я
по постановлению Редакционно-издательского Совета
Казанского университета

Под редакцией проф. М.И.Беляевой

Книга содержит литературный материал и экспериментальные данные по распространению нуклеаз у сапрофитных бактерий. Приводятся методы препаративного получения ряда нуклеополимераз, а также результаты исследования биохимических и некоторых физико-химических свойств нуклеополимераз. Особое внимание уделено методике изучения этих ферментов.

Монография представит интерес для микробиологов и биохимиков, аспирантов и студентов биологических факультетов.

Л $\frac{21007-022}{075(02)-75}$ 52-75



Издательство Казанского университета, 1975.

В В Е Д Е Н И Е

Микроорганизмы обладают чрезвычайно сложными и многообразными энзиматическими системами, обеспечивающими все жизненные функции клетки. Вместе с тем, ферменты микроорганизмов обеспечивают осуществление одного из самых грандиозных природных процессов — процесса малого биологического круговорота. Естественно поэтому, что закономерности и особенности обмена веществ микроорганизмов уже многие годы являются научной проблемой, которая стоит в центре внимания ученых разных специальностей.

Микроорганизмы, и в особенности бактерии, признаны наиболее удобной моделью для изучения многих биологических процессов. Это объясняется их необычайной физиологической активностью и огромным разнообразием путей метаболизма.

Широко изучаются у микроорганизмов ферменты, катализирующие реакции расщепления сложных биополимеров, таких, как белки и нуклеиновые кислоты.

Ферменты, деполимеризующие нуклеиновые кислоты, так называемые нуклеодеполимеразы, исследуются в разных аспектах, каждый из которых чрезвычайно актуален.

Фундаментальные успехи в области препаративного получения и исследования конформации нуклеиновых кислот создали предпосылки для изучения нуклеотидной последовательности их макромолекул и в то же время явились мощным стимулом для исследования ферментов, расщепляющих межнуклеотидные связи. Поэтому в числе первых появились работы по изысканию среди нуклеодеполимераз реагентов, пригодных для исследования первичной структуры нуклеиновых кислот. Были

получены специфические ферменты, которые уже нашли свое применение при расшифровке первичной структуры ряда транспортных РНК [267, 567, 350, 9, 40 и др.]

В настоящее время рибонуклеазы используются при изучении первичной структуры высокомолекулярных рибонуклеиновых кислот и для структурно-функционального исследования РНК разных типов. Разработка метода получения комплементарных к ДНК нитей РНК позволяет использовать специфические РНКазы и для расшифровки нуклеотидной последовательности ДНК. Дезоксирибонуклеазы применяются, в основном, для изучения особенностей вторичной структуры ДНК, хотя обнаруженные недавно высокоспецифичные дезоксирибонуклеазы рестрикции открывают новые возможности для изучения первичной структуры ДНК [285, 220, 201, 331, 318, 549, 8, 116, 173, 372, 299, 89, 450, 519, 199, 570, 196, 136, 443, 357, 569 и др.]

Нуклеодеполимеразы оказались настолько разнообразными по своим каталитическим свойствам, что поначалу каждый вновь исследованный фермент полностью отличался от ранее известных. В настоящее время описано свыше двадцати различных типов нуклеодеполимераз, обнаруженных у микроорганизмов, животных и растений. Однако этим не исчерпывается их разнообразие. В литературе все продолжают появляться сведения о новых своеобразных ферментах.

Накопленный многими исследователями богатейший экспериментальный материал по субстратной специфичности, механизму ферментативной атаки и другим свойствам нуклеодеполимераз создал предпосылки для глубокого изучения их биологических функций. В настоящее время имеется целый ряд экспериментальных и несколько обзорных работ, посвященных этой проблеме. Успехи в изучении биологической роли нуклеодеполимераз стали ощутимыми за последние пять-шесть лет. Отдельные вопросы, которые в 1960 - 1965 гг. освещались гипотетически, получили экспериментальное подтверждение в работах 1966-1973 гг.

Широко обсуждается вопрос о роли нуклеодеполимераз в синтезе ДНК и белка. Нуклеодеполимеразы, по-видимому,

участвуют во всех процессах превращения нуклеиновых кислот, начиная от инактивации генетически активной чужеродной ДНК и кончая избирательным расщеплением отдельных связей в макромолекуле, необходимым для инициации процессов репликации, репарации, рекомбинации и рестрикции [325, 326, 244, 359, 343, 449, 182, 550, 227, 400, 159, 298, 300, 455, 99, 126, 342, 346, 177, 363 - 365, 179, 65, 25, 104 и др.].

Экспериментальные и теоретические исследования в области препаративной химии белков открыли большие возможности для получения высокоочищенных ферментов и детального изучения их физико-химических свойств. Внеклеточные нуклеодеполимеразы оказались в этом отношении благодатным объектом в силу возможности сравнительно простого препаративного получения, низкого молекулярного веса и относительной стабильности. В настоящее время успешно изучается первичная, вторичная и третичная структура нуклеазы гемолитического стафилококка, панкреатических РНКазы и ДНКазы, РНКаз *Aer. aeruginosa*, щелочной РНКазы *Bac. subtilis* и др. Эти исследования имеют в своей перспективе получение синтетических ферментов [143 - 146, 150, 491, 154, 339, 416, 277 - 279, 494, 495, 252, 322, 253 - 256, 368 и др.].

В качестве самостоятельного и весьма перспективного направления можно назвать сравнительное изучение биохимических свойств, структурных особенностей, механизма ферментативного действия и биологических функций нуклеодеполимераз, полученных из организмов широкого эволюционного ряда, поскольку эти ферменты имеются у всех без исключения живых организмов.

Указанные выше направления в изучении нуклеодеполимераз находятся в тесной взаимосвязи и стремительно развиваются. Еще немногим более десяти лет назад, когда автор настоящей работы приступил к своим исследованиям, в литературе имелись весьма неполные сведения лишь о нескольких нуклеодеполимеразах: панкреатических РНКазе и ДНКазе, селезеночной ДНКазе, нуклеодеполимеразах змеиных ядов и отдельных видов микроорганизмов. В настоящее время опубликовано несколько сот оригинальных экспериментальных статей по вопросам обнаружения, препаративного получения, исследования биохимических свойств, биологических функций и применения нуклеодеполимераз. Опубликован также ряд

обзорных статей [316 - 319, 324 - 326, 26, 58, 162 - 165, 118, 510, 146, 432 и др.] и несколько монографий [417, 418, 208, 129, 95.].

Следует отметить, однако, что большинство обзорных статей содержит материал либо по какому-то одному подробно изученному ферменту [163, 164], либо по ферментам одного микроорганизма [324], либо по отдельным специальным вопросам [118]. Вместе с тем информация последних лет по всем указанным направлениям настолько обширна и разнообразна, что детальное изучение литературы по силам только авторскому коллективу, включающему специалистов разных профилей. Такая монография по нуклеазам микроорганизмов недавно написана группой советских исследователей (1974 г.). Автор настоящей работы входит в состав этой группы, что дает ему право использовать некоторые материалы, приведенные в указанной работе. Мы ограничиваем свои задачи подробным рассмотрением литературы, посвященной нуклеодеполимеразам сапрофитных бактерий, поскольку именно эта область составляет предмет собственных исследований. Особое внимание уделяется публикациям последних лет. Здесь приводятся также собственные экспериментальные данные, часть которых опубликована ранее, другая публикуется впервые.

1. КЛАССИФИКАЦИЯ НУКЛЕОДЕПОЛИМЕРАЗ

1. Основные принципы классификации нуклеодеполимераз

Соответственно сложности химического строения макромолекул нуклеиновых кислот, разнообразию типов химических связей, последовательный и многоступенчатый процесс их минерализации катализируется несколькими ферментами. Сюда включаются четыре основные группы: нуклеодеполимеразы, расщепляющие межнуклеотидные связи; нуклеофосфатазы, дефосфорилирующие олиго- и мононуклеотиды; нуклеозидазы, катализирующие разрыв связей между основанием и пентозой, и нуклеодезаминазы, вызывающие дезаминирование пуриновых и пиримидиновых оснований [333, 203, 308, 310, 316.].

В настоящем обзоре мы рассматриваем первую группу ферментов, которые катализируют гидролитическое расщепление фосфодиэфирных связей нуклеиновых кислот, образуя мононуклеотиды и олигонуклеотиды разной степени полимерности.

Ранее Ласковским [317] были предложены в качестве классификационных критериев четыре основные ферментативные свойства: специфичность по отношению к химической природе углеводного компонента; способ действия; место атаки фосфодиэфирных связей; специфичность по отношению к химической природе оснований, прилегающих к атакуемой связи. Несколько позже автор [318] предложил ряд дополнительных критериев для классификации ДНКаз: специфичность по отношению ко вторичной структуре ДНК; механизм гидролиза ДНК; специфическая устойчивость концевых динуклеотидов к атаке фермента и др.

Подробная классификация РНКаз приведена в работах Эгами и Накамуры, а также Барнарда [208, 162]. В основу классификации РНКаз положены те же признаки, что и классификации ДНКаз.

Обобщая данные ряда авторов [316 - 318, 208, 361, 129, 162], мы полагаем, что в качестве основных критериев для классификации нуклеодеполимераз можно выделить следующие:

1. Специфичность по отношению к химической природе углеводного компонента нуклеиновых кислот. По этому признаку выделяются три основные группы ферментов: гидролизующие только ДНК и дезоксирибоолигонуклеотиды - дезоксирибонуклеазы; гидролизующие только РНК и рибоолигонуклеотиды - рибонуклеазы; ферменты, которые гидролизуют обе нуклеиновые кислоты - нуклеазы.

2. Характер атаки нуклеиновых кислот. По этому признаку нуклеодеполимеразы подразделяются на ферменты эндонуклеолитического типа (эндонуклеазы), то есть такие, которые атакуют макромолекулы кольцевых и линейных нуклеиновых кислот внутри полинуклеотидной цепи, образуя олигонуклеотиды, гетерогенные по степени полимерности, и ферменты экзонуклеолитического типа (экзонуклеазы), катализирующие ступенчатое отщепление мононуклеотидов или коротких олигонуклеотидов от конца цепи и не способные атаковать замкнутые структуры.

3. Место атаки фосфодиэфирной связи. По этому признаку выделяются две группы ферментов: атакующие фосфодиэфирные связи между фосфором и углеродом в 5'-положении (5' - ФДЭ-связь) или между фосфором и углеродом в 3'-положении (3' - ФДЭ-связь).

4. Специфичность по отношению к химической природе оснований, прилегающих к атакуемым связям. По этому признаку ферменты классифицируются на несколько групп с различной чувствительностью по отношению к химической природе оснований, прилегающих к атакуемым связям.

5. Специфичность по отношению к вторичной структуре нуклеиновых кислот. По этому признаку нуклеазы подразделяются на три группы: ферменты, атакующие только структуры с водородными связями; ферменты, атакующие только однонитчатые структуры, и, наконец, ферменты, атакующие нуклеиновые кислоты, независимо от их вторичной структуры.

6. Механизм расщепления фосфодиэфирных связей. Эндонуклеазы по этому критерию подразделяются на две группы: ферменты "одноударного" механизма действия, производящие одномоментное расщепление обеих цепей ДНК так, что каждый удар приводит к расщеплению двуспиральных структур на более короткие двуспиральные фрагменты; ферменты "двуударного" механизма действия, производящие расщепление каждой комплементарной цепи "наугад" в разных местах так, что парные симметричные разрывы в обеих цепях ДНК образуются только после нескольких ассиметричных разрывов. Некоторые ДНКазы имеют оба механизма действия, проявляющиеся на разных стадиях реакции.

Экзонуклеазы по механизму действия подразделяются на две группы; первая из которых осуществляет так называемое "прогрессивное", вторая - "процессивное" расщепление полинуклеотидов. Ферменты первой группы осуществляют параллельный гидролиз всех нуклеотидных цепей. После отщепления одного или нескольких нуклеотидов от одной полинуклеотидной цепи фермент отделяется от последней и начинает атаковать следующие цепи. Ферменты второй группы осуществляют последовательное расщепление полинуклеотидных цепей. Фермент остается связанным с полинуклеотидной макромолекулой, пока не произойдет ее полный гидролиз, затем он переходит на следующую полинуклеотидную цепочку и так далее.

Все ДНКазы и нуклеазы на основе механизма прямого гидролиза ФДЭ-связей нуклеиновых кислот согласно Международной классификации и номенклатуры ферментов (1966) отнесены к группе гидролаз фосфодиэфиров [106]. Среди рибонуклеаз различаются две группы: первая группа - ферменты, осуществляющие многостадийное расщепление РНК, включающее внутримолекулярное перефосфорилирование и, как следствие его, образование нуклеозид-2', 3'-циклофосфатов, последующий гидролиз которых катализируется этим же ферментом. Такие РНКазы по Международной классификации ферментов относятся к группе рибонуклеинат-нуклеотидо-2'-трансфераз (циклизующих). Некоторые РНКазы этой группы не обладают способностью гидролизовать циклофосфаты. Вторая группа РНКаз катализирует реакцию прямого гидролиза РНК: это РНКазы-гидролазы, не имеющие трансферазной активности и работающие аналогично ДНКазам и нуклеазам.

7. Направление экзонуклеолитической атаки. Различаются экзонуклеазы, гидролизующие полинуклеотидные цепи в направлении $3' \longrightarrow 5'$ или в направлении $5' \longrightarrow 3'$.

8. Специфичность по отношению к модифицированным участкам нуклеиновой кислоты. В настоящее время обнаружены ДНКазы, которые "узнают" в макромолекуле ДНК определенные изменения, индуцированные ультрафиолетовым облучением или химическими агентами. Выделяются две группы таких ферментов: ДНКазы, специфичные к УФ-облученным ДНК и ДНКазы, специфичные к ММС-обработанным ДНК. Нативные ДНК такими ферментами либо совсем не атакуются, либо гидролизуются значительно медленнее модифицированных.

9. Чувствительность ДНКаз к специфическим к чужеродным участкам ДНК. Особую группу составляют ферменты рестрикции, "узнающие" специфические немодифицированные последовательности в ДНК. Некоторые из них для проявления активности требуют присутствия АТФ и САМ.

10. Специфическая потребность в АТФ. Описана особая группа ДНКаз, которые для проявления ферментативной активности требуют присутствия специфических факторов, таких, как АТФ и другие нуклеозидтрифосфаты. Эта особенность ферментов связана со специфическим механизмом их действия, однако достаточно полные сведения о механизме действия АТФ-зависимых ДНКаз в настоящее время не получены.

11. Способность расщеплять РНК в РНК-ДНК гибриде. Сравнительно недавно были описаны весьма своеобразные нуклеазы, обозначенные термином "гибридазы", которые не атакуют ни ДНК, ни РНК, а лишь цепь РНК, связанную с цепью ДНК. Эта группа ферментов чрезвычайно интересна в плане участия в синтезе ДНК.

Кроме указанных выше критериев, имеется ряд других свойств, по которым ферменты отличаются один от другого. Однако мы полагаем, что они составляют частные особенности нуклеодеполимераз и могут только затруднить их классификацию. Некоторые авторы, например, предлагают классифицировать нуклеодеполимеразы по их локализации в клетке [208]. Однако, как будет ясно из последующего изложения, ферменты, сходные по основным каталитическим свойствам (механизму, характеру, мес-

ту атаки и т.п.), локализованы в разных местах клетки или выделяются во внешнюю среду.

Совсем недавно (1973) вышла в свет новая книга по классификации и номенклатуре ферментов [215]. В представленной рекомендации по классификации ферментов наряду с известными ранее ферментами получили свое место и, соответственно, порядковый номер, новые нуклеазы, такие, как АТФ-зависимые ДНКазы, ферменты рестрикции, РНКазы и другие. В последующей части данной главы в скобках будут даны классификационные номера ферментов согласно указанной классификации 1973 года.

2. Основные группы нуклеополимераз микроорганизмов, животных и растений

Согласно указанным выше основным классификационным признакам, мы считаем возможным подразделить нуклеополимеразы на ряд ниже приведенных групп.

А. Дезоксирибонуклеазы

1. ДНКазы, гидролизующие ДНК по эндонуклеолитическому типу и расщепляющие 3' - ФДЭ-связи. Механизм атаки - "одно" или "двуударный". Ферменты не проявляют отчетливой специфичности по отношению к природе оснований. ДНКазы с такими свойствами обнаружены в культуральной жидкости *Streptococcus hemolyticus* - ДНКазы А и *Corynebact. diphtheriae* ряда споровых бактерий [33, 34, 51, 80, 122, 123] и некоторых актиномицетов [13, 16 и др.], в клетках *E. coli* и *Pr. mirabilis* эндонуклеаза I, дрожжей - эндонуклеаза А [327, 328, 235 - 237, 422]. В большинстве случаев микробные ДНКазы этой группы предпочтительно гидролизуют нативные молекулы ДНК и только эндонуклеаза А дрожжей и ДНКазы *Cor. diphtheriae* имеют предпочтение к односпиральным структурам ДНК.

Впервые фермент такого типа был выделен из панкреатической железы телят [310] и обозначен как ДНКазы I. Позднее подобные ферменты были выделены из других тканей млекопитающих и морских животных [128, 232, 161 и др.], а также из семян растений [531]. По международной классификации ферментов 1966 г. [106] ДНКазы, выделяемые в первую группу, относятся к дезоксирибонуклеинам - 5'-олигонуклеотидогидролазам - КФ 3.1.4.5 (3.1.4.5). - II -

II. ДНКазы, гидролизующие субстрат по эндонуклеолитическому типу, "одноударному" механизму, без строгой специфичности по отношению к химической природе оснований и вторичной структуре ДНК. Отличаются от ДНКаз первой группы тем, что гидролизуют 5'-ФДЭ связи. Ферменты такого типа (ДНКазы II) получены из селезенки, тимуса и других тканей млекопитающих и морских животных [354, 419, 166, 167, 163, 164, 466, 204, 191, 105, 555 и др.]. У микроорганизмов ДНКазы гидролизующие 5'-ФДЭ связи не найдены. Классифицируются как дезоксирибонуклеинат - 3'-олигонуклеотидогидролазы - КФ 3.1.4.6 (3.1.4.6).

III. ДНКазы рестрикции, гидролизующие нативные чужеродные ДНК, не атакующие ДНК собственных клеток. Характер атаки эндонуклеолитический. Место атаки - 3'-ФДЭ связь. Односторонние разрывы на каждой комплементарной цепи ДНК предшествуют двуспиральным разрывам. Выщепляют высокомолекулярные специфические фрагменты ДНК. Такие ферменты обнаружены в клетках *E. coli* - ДНКазы R·K, R·B и др. [359, 343, 342, 566, 373], *Neomophilus influenzae* - эндонуклеазы R и HI [469, 299, 243, 207, 518, 499], *Neomophilus aegyptius*, эндонуклеаза Z [360], *Neomophilus* genus [498 и др.], *Neomophilus parainfluenzae* - эндонуклеазы Нра I и II [459] и др.

Классифицируются как дезоксирибонуклеинат - 5 - олигонуклеотидогидролазы (ферменты рестрикции) - КФ 3.1.4.X (3.1.4.32). Здесь и далее вместо последнего числа стоит "X" в том случае, когда нуклеодеполимеразы имеют определенные особенности, не позволяющие объединить их с известными ранее группами нуклеодеполимераз, согласно рекомендации Международной комиссии по классификации ферментов /1966/.

IV. АТФ-зависимые ДНКазы, гидролизующие субстрат по экзонуклеолитическому типу, преимущественно двуспиральные структуры. Атакуют 3'-ФДЭ связи. Обладают своеобразной способностью отщеплять от концов цепи не мононуклеотиды, а короткие олигонуклеотидные фрагменты. Отличаются от других ДНКаз тем, что для проявления активности требуют присутствия АТФ. Такие ферменты обнаружены в клетках *Micrococcus lysodeikticus*, *Mycobacterium smegmatis*, *E. coli*, *Diplococcus pneumoniae*, *Neomophilus influenzae*, *Bacillus subtilis* [507, 271, 272, 138, 139, 542-

548, 400, 158, 159, 238, 239, 551, 565, 526, 527, 525, 228, 229, 468, 188, 63, 460]. Классифицируются как дезоксирибонуклеинат - 5'-олигонуклеотидогидролазы (АТФ-гидролизующие) - КФ 3.1.4.X(3.1.4.33).

У. ДНКазы, гидролизующие субстрат по эндонуклеолитическому и экзонуклеолитическому типу, "двуударному" механизму. Расщепляют 3'-ФДЭ связи, специфически в области повреждений цепи ДНК, индуцированных УФ-облучением. Эндонуклеазы строго специфичны к двуспиральным ДНК, облученным УФ. Экзонуклеазы атакуют и необлученные ДНК в направлении 5'→3'. Такие ДНКазы обнаружены в клетках *Micr. lysodeikticus*, *Bac. subtilis*, *E. coli* (экзонуклеаза У1) [290, 291, 455, 429, 430, 298]. Классифицируются как "УФ - специфичные" дезоксирибонуклеинат-5'-олигонуклеотидо-гидролазы - КФ 3.1.4.X.

У1. ДНКазы, гидролизующие субстрат по эндонуклеолитическому типу, "двуударному" механизму. Расщепляют 3'-ФДЭ связи, специфически в области повреждений цепи ДНК, индуцированных алкилирующими агентами. Ферменты атакуют двуспиральные ДНК. Выделены из клеток *E. coli* - эндонуклеаза II; обнаружены у *Bac. subtilis*, *Micr. lysodeikticus* [224 - 227, 483, 485, 429, 431]. Классифицируются как "ММС-специфичные" дезоксирибонуклеинат - 5'- олигонуклеотидо-гидролазы - КФ 3.1.4.X.

УП. ДНКазы, гидролизующие субстрат по экзонуклеолитическому типу. Атакуют 3'- ФДЭ связи односпиральных полинуклеотидных цепей, начиная атаку с 3'- конца. Такой фермент выделен из клеток *E. coli* - экзонуклеаза I [323, 324, 329]. Экзонуклеазы, имеющие предпочтение к однонитчатым ДНК и обладающие другими сходными с экзонуклеазой I *E. coli* свойствами, выделены из ядер клеток опухолевых тканей мышей и крыс, Нелл, костного мозга кролика и обозначены как ДНКазы III [341 и др.]. Классифицируются как дезоксирибонуклеинат (односпиральный)-5'-олигонуклеотидогидролазы - КФ 3.1.4.X (3.1.4.25).

УШ. ДНКазы, гидролизующие субстрат по экзонуклеолитическому типу. Атакуют 3'- ФДЭ связи нативных и денатурированных ДНК, с преимуществом к нативным структурам; начало атаки 3'-, либо 5'- конец. Механизм атаки полинуклеотидов - "прогрессивный". ДНКазы такого типа выделены из клеток *E. coli* и *Micr.*

lysodeikticus [330, 306, 257, 258, 363-365 и др.]. Они ассоциированы с ДНК-полимеразами. Экзонуклеазы, гидролизующие исключительно нативную ДНК, начиная с 5'-конца, по механизму гидролиза, сходные с экзонуклеазами *E. coli* обнаружены в ядерной и цитоплазматической фракциях тканей млекопитающих и обозначены как ДНКазы IV [341, 342]. Классифицируются как дезоксирибонуклеинат-5'-олигонуклеотидо-гидролазы - КФ 3.1.4.X (3.1.4.26).

IX. ДНКазы, гидролизующие субстрат по экзонуклеолитическому типу. Атакуют 3'-ФДЭ связи только двуспиральных молекул. Начинают атаку от 3'-ОН конца цепи. Ферменты обладают одной характерной особенностью - отщепляют концевые 3'-фосфомоноэфирные группы полидезоксинуклеотидов. Такие ферменты выделены из клеток *E. coli* - экзонуклеаза III, *Bac. subtilis*, *Dipl. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* [433, 434, 404, 314, 245]. Классифицируются как дезоксирибонуклеинат (двуспиральный) - 5'-олигонуклеотидогидролазы - КФ 3.1.4.X (3.1.4.27).

Б. Рибонуклеазы

I. РНКазы эндонуклеолитического типа действия, осуществляющие расщепление РНК по сложному механизму, включающему внутримолекулярное перефосфорилирование с образованием нуклеозид-2', 3'-циклофосфатов и последующий гидролиз этих соединений. Расщепляют 5'-ФДЭ связи с предпочтением к пириридиновым звеньям цепи. К этой группе относятся РНКазы, выделенные из панкреатической железы и других тканей млекопитающих и морских животных [308, 417, 513, 516, 432, 266, 269, 409, 98].

У микроорганизмов пиридин - специфичные РНКазы не обнаружены. По Международной классификации они отнесены к группе рибонуклеинат-пиридин-нуклеотидо-2'-трансфераз (циклизующих) - КФ 2.7.7.16 (3.1.4.22).

II. РНКазы эндонуклеолитического типа действия, расщепляющие РНК по сложному механизму, включающему образование нуклеозид-2', 3'-циклофосфатов с их последующим гидролизом. Атакуют 5'-ФДЭ связи. Они предпочтительно расщепляют однонитчатые РНК, неспецифичны по отношению к природе оснований. Такие РНКазы обнаружены в культуральной жидкости *Bac. subtilis*, *Bac. glutin-*

nosus, *Bac. intermedius*, *Bac. mesentericus* [389, 445, 76,85], выделены из клеток *E.coli* - РНКазы I [473 и др.], *Enterobacter* sp. [335, 336], *Salmonella typhimurium* РНКазы I [187]. РНКазы такого типа выделены также из культуральной жидкости и мицелия многих микроскопических грибов: *Asp. oryzae* - РНКазы T₂, *Asp. saitoi* - РНКазы M, *Neurospora crassa* - РНКазы N₂, *Physarum polycephalum* - РНКазы P_{p-2} и P_{p-3} и др. [378, 446, 447, 508, 512, 274, 276, 277, 497, 273, 152, 153, 265, 294, 511, 259, 279, 402, 510, 440 и др.]. РНКазы различных микроскопических грибов - *Pen.brevicompactum*, *Pen.claviforme*, *Asp. pallidus*, *Asp.clavatus*, *Pen.chrysogenum* получены в высокоочищенном виде и подробно изучаются группой советских исследователей [17 - 23, 90]. В тканях и секретах животных [162, 347], в тканях высших растений [219, 531, 162] также обнаружены пурин-специфичные или неспецифичные РНКазы. Классифицируются как рибонуклеинат-нуклеотидо-2'-трансферазы (циклизующие) - КФ 2.7.7.17. (3.1.4.23).

III. РНКазы, имеющие тот же тип и механизм действия, что и ферменты первой и второй групп, но отличающиеся от них строгой специфичностью к гуаниловым звеньям цепи РНК. Ферменты такого типа обнаружены в культуральной среде бактерий: *Bac. pumilis*, *Bac.amilozyma* [446, 4,5,6]. Наиболее подробно изучена гуанил-специфичная РНКазы *Asp.oryzae* - РНКазы T₁ [477, 451, 509, 512, 275, 278, 494, 495 и др.]. Аналогичные ферменты найдены у других микроскопических грибов: *Ust.spheroгена* - РНКазы U₁, *Ust. zeae* [234, 554], *Neurospora crassa* - РНКазы N₁, *Mucor genevensis* [496, 497, 446], щелочные РНКазы *Asp. clavatus*, *Asp. pallidus* и др. [95], а также у актиномицетов: *Act. aureoverticillatus* - первая РНКазы, которая была обнаружена, получена препаративно и подробно изучена советскими учеными [118 - 120, 1,2], *Str. erytreus*, *Str. albogriceolus*, *Str. aureofaciens*, *Act. levoris*, *Act. noursei*, *Act. antibioticum* [561, 563, 14, 61, 24, 157, 570]. В мицелии *Neurospora crassa* обнаружена РНКазы N₃, аналогичная внеклеточной РНКазе N₁ [294], гуанил-специфичная РНКазы - Рр-I найдена в мицелии *Phys.polycephalum* [265]. В тканях животных и высших растений гуанил-специфичные РНКазы не обнаружены.

По Международной классификации ферментов (1966) они отнесены к группе рибонуклеинат-гуанин-нуклеотидо-2'-трансфераз (циклизующих) - КФ 2.7.7.26 (3.1.4.8).

IV. РНКазы, расщепляющие РНК по эндонуклеолитическому типу, по такому же механизму, как и ферменты предыдущих групп, но в отличие от них не обладающие способностью гидролизовать нуклеозидциклофосфаты. Такие ферменты найдены в клетках *Azotobacter agile*, *Bac. subtilis*, *Proteus mirabilis* [462, 556-559, 185] .

По Международной классификации ферментов их можно отнести к группе рибонуклеинат-нуклеотидо-2'-трансфераз (циклизующих, не атакующих циклофосфаты) - КФ 2.7.7.X.

V. РНКазы, атакующие субстрат эндонуклеолитически без образования нуклеозид-2'-3'-циклофосфатов. Продуктами гидролиза являются 3'-олигонуклеотиды. Особенностью этих РНКаз является абсолютная потребность двуспиральных субстратов. Такого типа фермент выделен из клеток *E. coli* - РНКазы III [438, 439, 337, 338]. Классифицируются как двуспиральные рибонуклеинат-3'-олигонуклеотидогидролазы - КФ 3.1.4.X. (3.1.4.24).

VI. РНКазы, осуществляющие гидролиз РНК (не имеют трансферазной активности) по экзо- или эндонуклеолитическому типу. Расщепляют 5'- ФДЭ связи, без строгой специфичности к химической природе оснований. К ферментам этого типа относится РНК-аза II A *Thiobacillus thioarvus* [405, 406]. В культуральной среде *Ust. sphaerogena* - РНКазы U₄ [511], в клетках *Saccharomyces cerevisiae* [399] обнаружены ферменты, сходные с РНКазой *Thiobac. thioarvus*, но отличающиеся от последней экзонуклеолитическим характером гидролиза РНК. Классифицируются как рибонуклеинат-нуклеотидо-3'-гидролазы - КФ. 3.1.4.X.

УП. РНКазы, осуществляющие гидролиз РНК по экзо- или эндонуклеолитическому типу. Расщепляют 3'- ФДЭ связи. Экзонуклеолитическая атака осуществляется по "процессивному" механизму. Несколько быстрее других полинуклеотидов гидролизуют поли-А. Начало атаки от 3'-конца. Такие РНКазы получены из клеток *E. coli* - РНКазы II, *L. casei*, *L. plantarum*, *Salmonella typhimurium* - РНКазы II, *Mycobact. smegmatis*, *Serratia* sp. [474, 480, 395, 396, 296, 345, 230, 231, 424, 436, 334].

У плесневых грибов и актиномицетов-нуклеаза А 236, а также в яде кобры, митохондриях и ядрах клеток печени млекопитающих, в семенах бобов [265, 3, 39, 263, 369, 531] обнаружены РНК-азы, сходные с РНКазами бактерий, но отличающиеся от них эндонуклеолитическим типом действия на РНК.

Классифицируются как рибонуклеинат-нуклеотидо-5'-гидролазы - КФ. 3.1.4.X. (3.1.4.20).

Уш. РНКазы, осуществляющие гидролиз РНК только в составе гибрида РНК-ДНК и не атакующие ни ДНК, ни РНК. Ферменты обладают эндонуклеолитическим типом атаки. Расщепляют 3'-ФДЭ связи. Для этой нуклеазы был предложен термин "гибридаза" или РНК-аза Н. РНКазы Н выделены из клеток *E. coli* [362, 535, 261, 160], *Saccharomyces cerevisiae* [553], тимуса теленка, эмбрионов кур [478, 260, 297]. Классифицируются как РНК - ДНК-гибрид-рибонуклеотидо-гидролазы (3.1.4.34).

В. Нуклеазы

1. Нуклеазы, гидролизующие ДНК и РНК по эндонуклеолитическому типу. Расщепляют 3'-фосфодиэфирные связи, с некоторым предпочтением к нативным структурам, неспецифичны по отношению к природе оснований. В некоторых случаях проявляют предпочтение к межнуклеотидным связям с пуринами или аденином. Такие ферменты получены из культуральной жидкости *Str. hemolyticus* - нуклеазы В и Д [532 - 534, 242] *Ser. marcescens* [380, 381, 73, 74, 77 - 79, 82, 83, 10 - 12], из клеток *Azotobacter agilis* [479]. Подобные ферменты обнаружены у *Streptomyces aureus* [562], *Acrocyndrium* sp. [490]. Эти ферменты классифицируются как рибонуклеинат (дезоксирибонуклеинат) - 5'-нуклеотидогидролазы - КФ. 3.1.4.9 (3.1.4.9).

II. Нуклеазы, по всем свойствам сходные с ферментами предыдущей группы, но в отличие от них преимущественно гидролизующие одонитчатые ДНК и РНК. Ферменты с такими свойствами изолированы из клеток *Neurospora crassa* [344], *Saccharomyces fragilis* [321], *Physarum polycephalum* - нуклеаза P_{D-2} [265], *Aer. oryzae* - нуклеаза О [264, 514], нуклеаза S_1 [141, 522 и др.]. Подобные ферменты выделены из клубней картофеля, манговых бобов, листьев *Avena* [175, 531, 552 и др.], а также из

различных тканей млекопитающих: печени крысы, зубной железы цыпленка [162] и из шелковичного червя [471].

Нуклеазы второй группы классифицируются как односпиральные рибонуклеинат (дезоксирибонуклеинат) - 5'- нуклеотидогидролазы - КФ 3.1.4.9. (3.1.4.21).

III. Нуклеазы, гидролизующие нуклеиновые кислоты по эндонуклеолитическому типу. Расщепляют 5'- ФДЭ связи, специфичны к определенным основаниям на первых стадиях гидролиза. Проявляют предпочтение к одонитчатым полинуклеотидам. Такая нуклеаза получена из культуральной жидкости *Micr. pyogenes var aureus* [195, 420, 491 и др.]. Подобный фермент обнаружен у плесневого гриба *Physarum polycephalum* - нуклеаза PP-I [265]. Классифицируются как дезоксирибонуклеинат (рибонуклеинат)-3'-нуклеотидогидролазы - КФ 3.1.4.7. (3.1.4.7).

IV. Нуклеазы, гидролизующие субстрат по экзонуклеолитическому типу, "прогрессивному" механизму. Расщепляют 5'-ФДЭ связи. Начало атаки 5'- и 3'- концы цепи. Отчетливой специфичности по отношению к вторичной структуре не имеют. Такие нуклеазы выделены из культуральной жидкости *Bac. subtilis* [375, 301, 302, 403, 437], из клеток *Lactobacillus acidophilus* [220]. Эти ферменты сходны с экзонуклеазой, выделенной из селезенки быка - ФДЭаза II [262, 428 и др.] и позднее из молоков лососевых рыб [358]. Классифицируются как дезоксирибонуклеинат (рибонуклеинат) - 3'- нуклеотидогидролазы - КФ 3.1.4.7. (3.1.4.18).

V. Нуклеазы, гидролизующие ДНК и РНК по экзонуклеолитическому типу. Расщепляют 3'- ФДЭ связи, начало атаки -3'-ОН конец, реже - 5'- конец. Преимущественно гидролизуют одонитчатые ДНК и РНК. Экзонуклеазы такого типа выделены из клеток *Thiobacillus thioarvus*, *Lactobacillus acidophilus* [96, 448], культуральной жидкости *Micr. sodonensis* [168 - 171]. Последний фермент имеет своеобразное свойство - обладает 5'-ФМЭазной активностью. 5'-экзонуклеазы выделены японскими исследователями из культуральной жидкости *Streptomyces* sp. [489] и отечественными учеными из культуральной жидкости *Actinomyces coelicolor* - экзонуклеаза A5 [121, 503]. Экзонуклеазы актиномицетов не гидролизуют модельные субстраты, не содержащие

нуклеотидов. Из конидий *N. crassa* получена 5'-экзонуклеаза, отличающаяся от бактериальных 5'-экзонуклеаз тем, что атакует одонитчатые нуклеиновые кислоты в направлении 5'—3' [421]. Экзонуклеаза указанного типа действия впервые была обнаружена в ядах змей — ФДЭаза I [427, 537, 38 и др.]. ФДЭаза змеиных ядов атакует нуклеиновые кислоты от 3'-ОН конца, гидролизует модельные субстраты типа бис (пара) — нитрофенилфосфат. Из лейкозных клеток мышей изолирована экзонуклеаза, сходная с ФДЭазой I, но не гидролизующая нитрофениловые эфиры мононуклеотидов [140]. Перечисленные ферменты классифицируются как дезоксирибонуклеинат-рибонуклеинат-5'-нуклеотидо-гидролазы — КФ 3.1.4.1. (3.1.4.1).

х

х

х

Таким образом, нуклеодеполимеразы микроорганизмов, растений и животных тканей по их основным свойствам можно классифицировать на 22 группы, из которых ДНКазы составляют 9, РНКазы — 8 и нуклеазы — 5 групп. Наибольшим разнообразием отличаются микробные нуклеодеполимеразы. Из приведенных выше двадцати двух групп различных по своим биохимическим свойствам ферментов у микроорганизмов не обнаружены только ДНКазы, катализирующие гидролиз 5'-ФДЭ связей (группа П) и РНКазы-трансферазы, специфичные к пиримидиновым межнуклеотидным связям (группа I).

Нуклеодеполимеразы, выделенные из тканей и секретов животных, также отличаются большим разнообразием биохимических свойств. ДНКазы животных тканей классифицируются по четырем группам (I, П, УП, УШ), причем ферменты типа селезеночной ДНКазы П получены в настоящее время исключительно из тканей животных. ДНКазы, которые обладают специфической способностью "узнавать" повреждения ДНК, индуцированные УФ-облучением или химическими агентами, а также ферменты, имеющие абсолютную потребность в АТФ, не выделены из животных тканей, хотя указания на то, что такие ферменты присутствуют в ядерных фракциях клеток тканей животных и человека имеются в литературе [341, 342, 156]. РНКазы тканей и секретов животных классифицируются по трем группам (I, П, VI), причем пиримидил-специ-

фичные РНКазы (группа I) обнаружены только у животных. Однако у животных не найдено гуанил-специфичных РНКаз и ферментов, полностью лишенных способности атаковать нуклеозид -2'-3'-циклофосфаты. Нуклеазы животных классифицируются по четырем группам из пяти, не обнаружены только нуклеазы группы I, сходные по свойствам с нуклеазами группы II и отличающиеся от последних тем, что преимущественно гидролизуют нативные, а не денатурированные ДНК и РНК.

Что касается нуклеодеполимераз растений, то они сравнительно мало изучены. В настоящее время в различных тканях растений обнаружены РНКазы группы I, расщепляющие 5'-ФДЭ связи, имеющие трансферазную активность и неспецифичные к природе оснований, т.е. такие же РНКазы, которые обнаружены у большого числа видов микроскопических грибов. Нуклеазы, полученные из тканей самых разных видов растений, сходны по своим свойствам с нуклеазой *Neurospora crassa* (группа II). У растений обнаружены также ДНКазы группы I и РНКазы - гидролазы группы УП. В последние годы интерес к нуклеодеполимеразам растений усилился [538 - 540] и др.

Вместе с тем нельзя исключать возможность, что некоторые нуклеодеполимеразы действительно отсутствуют в тканях животных и растений и продуцируются только микроорганизмами. Характерно, что те нуклеодеполимеразы, которые обнаруживаются у высших растений, имеются также и у микроскопических грибов, т.е. филогенетически родственных организмов. С другой стороны, бактерии имеют нуклеазы, сходные с теми, которые обнаруживаются у животных.

В связи с этим нам представляется чрезвычайно интересным изучение нуклеаз в эволюционном аспекте. Во-первых, довольно обширный материал о свойствах нуклеаз различных живых организмов, который накоплен к настоящему времени, дает возможность проанализировать, как селектировались нуклеазы, в каком направлении шел отбор этих ферментов при переходе к более высокой ступени эволюции живого. Не менее интересно изучение путей селекции отдельных энзиматических свойств нуклеаз, исследование того, какие изменения и по каким причинам претерпели отдельные нуклеазы. Так, например, 3'-экзонуклеазы или

5'-эксонуклеазы, обнаруженные у различных микроорганизмов, а также у млекопитающих, морских животных, рептилий и др. (нуклеазы четвертой и пятой групп), представляют собой ферменты, сходные по основным свойствам, но имеющие какие-то индивидуальные особенности в зависимости от организма, из которого они выделены. То же относится и к другим нуклеазам, обнаруженным у разных организмов. Мы полагаем, что сейчас уже настало время для перехода к выяснению вопросов, связанных с эволюцией свойств и функций нуклеаз.

В таблице I суммированы данные по нуклеодеполимеразам бактерий. Более подробные сведения о нуклеодеполимеразах сапрофитных бактерий приведены в главе IV.

Т а б л и ц а I

Основные биохимические свойства бактериальных нуклеодеполимераз

Группы КФ	Ферменты (тривиаль- ное назва- ние), ли- тература	Атакуемый субстрат	Тип и меха- низм атаки	Продук- ты гид- ролиза	Специ- фичность	Условия действия		
						опт. рН	актива- торы	инги- биторы
I	2	3	4	5	6	7	8	9
А. Дезоксирибонуклеазы								
I. Дезоксирибонуклеиназ-5'-олиго- нуклеотидогидролазы - 3.I.4.5	1.Эндо- нукле- аза I E. coli 327, 328, 325	Нативная и денатуриро- ванная ДНК	Эндо- нукле- олити- ческий "одно- удар- ный"	Олигонук- леотиды с 5'- ФМЭ группой, средней длины 7 нуклео- тидов	Не атаку- ет связи ДФА - ФН; в комплек- се с тРНК приобрета- ет "nicking" активность	8,0	Mg ²⁺ (Mn ²⁺)	тРНК
	2.Эндо- нукле- аза I Pr. mira- bilis 236, 237	Нативная и денатуриро- ванная ДНК	Эндо- нукле- олити- ческий	Кислото- раство- римые фрагмен- ты с 5'- ФМЭ груп- пой	В комплек- се с тРНК приобрета- ет "nicking" активно- сть	10,0	Mg ²⁺	тРНК

1	2	3	4	5	6	7	8	9
3.	Дезокси- рибонук- леаза Bac. quer- cifolius /внекле- точная/ [34]	Натив- ная и денату- рирован- ная ДНК	Эндо- нукле- олити- ческий	Олиго- и мононук- леотиды с 5'-ФМЭ группой	Некото- рое пред- почтение к связи дФН-фЦ	8,6- 9,0	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Ca ²⁺	ЭДТА, Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Ni ²⁺ , фос- фат
4.	Дезокси- рибонук- леаза Bac. am- lozuma /внекле- точная/ [51]	Натив- ная и денату- рирован- ная ДНК	Эндо- нукле- олити- ческий	Олиго- и мононук- леотиды с 5'-ФМЭ группой	Некото- рое пред- почтение к связи с дФН-фТ	9,8	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , и др. Me ²⁺	ЭДТА
5.	Дезокси- рибонук- леаза Bac. mesentericus /внекле- точная/ [80]	Натив- ная и денату- рирован- ная ДНК	Эндо- нукле- олити- ческий "дву- ударный"	Олигонук- леотиды и мононукле- отиды с 5'- ФМЭ группой	Некото- рое пред- почтение к связям дФН-ФА и дФН- -фТ	9,0	Mg ²⁺ , (Mn ²⁺)	ЭДТА

1	2	3	4	5	6	7	8	9
6.	Дезоксири- бонуклеаза <i>Bac. subtilis</i> /внеклеточ- ная/ [122,123]	Нативная и денату- рирован- ная ДНК	Эндонукле- олитичес- кий "дву- ударный"	Олигонук- леотиды и мономер- леотиды с 5' - ФМЭ группой	Некоторое предпоч- тение к связям дФН-фТ и дФН-ФА	9,0	Mg^{2+} (Mn^{2+})	ЭДТА
7.	Дезоксири- бонуклеаза A <i>Str. haemo- lyticus</i> /внеклеточ- ная/ [251, 414 и др.]	Нативная и денату- рирован- ная ДНК	Эндонук- леолити- ческий	Олигонук- леотиды со средней длиной цепи 6,2 нуклео- тидов, с 5'- ФМЭ группой	Предпочте- ние к свя- зам дФН-фГ	8,0- 9,0	Mg^{2+} (Ca^{2+})	ЭДТА, цит- рат
8.	Дезоксири- бонуклеаза C <i>Str. haemo- lyticus</i> /внеклеточ- ная/ [251, 414, 233 и др.]	Нативная и денату- рирован- ная ДНК	Эндонук- леолити- ческий	Олигонук- леотиды со средней длиной цепи 2,95 нуклео- тидов, с 5' - ФМЭ группой	Неспеци- фична	5,0- 6,0	Mg^{2+} , Ca^{2+}	ЭДТА, цит- рат

II. Дезоксирибонуклеат-5'-олигонуклеотидогидролазы (ферменты рестрикции) - 3.1.4.X.

п. дезоксирибонуклеиназ (ферменты рестрикции) - 3.1.4.Х.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
9. Дезоксирибонуклеаза <i>Cor. diphteriae</i> /внеклеточная/ [33]	Денатурированная и нативная ДНК	Эндонуклеолитический, "двуударный"	Олигонуклеотиды с 5' - ФМЭ группой	Неспецифична	7,0-7,5	Mg ²⁺ , Mn ²⁺	ЭДТА, цитрат, Cu ²⁺	
1. Эндонуклеазы RK, RB <i>E. coli</i> K и B [359, 343, 442, 564]	Нативные, чужеродные немодифицированные ДНК	Эндонуклеолитический	Двуспиральные высокомолекулярные фрагменты ДНК с 5' - ФМЭ группой	"Узнает" специфический немодифицированные последовательности ДНК. Двуспиральным разрывам предшествуют односпиральные	7,2-8,0	АТФ, САМ, Mg ²⁺ /абсолютная потребность/	-	
2. Эндонуклеаза R <i>H. influenzae</i> [469, 299, 207]	Нативные, чужеродные, немодифицированные ДНК	Эндонуклеолитический	13 двуспиральных фрагментов из ДНК фага Φ, х 174 с 5' - ФМЭ группой	"Узнает" специфические последовательности, расщепляет 0,1% ФДЭ связей в ДНК	-	Mg ²⁺	-	

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	3. Эндонуклеаза <i>N. aegyptius</i> [360]	Нативные чувствительные немодифицированные ДНК	Эндонуклеолитический	11 двуспиральных фрагментов из ДНК фага $\psi\chi 174$ с 5' - ФМЭ группой	"Узнает" специфические последовательности ДНК	-	Mg^{2+}	-
III. Дезоксирибонуклеинат-5'-олигонуклеотидогидролазы (АТФ-зависимые) - 3.1.4.X.	1. АТФ-зависимая дезоксирибонуклеаза <i>Micr. lysodeikticus</i> [138, 139, 507, 271, 272]	Нативная ДНК	Экзонуклеолитический; ступенчатое отщепление олигонуклеотидов от концов цепи ДНК; "процессивный" механизм	Олигонуклеотиды с 5'-ФМЭ группой	Абсолютная потребность в АТФ или других нуклеозидтрифосфатах: АТФ превращается в АДФ и Фн	8,6-9,4	АТФ, /дНТФ/, Mg^{2+} , Mn^{2+}	ПГОМБ
	2. АТФ-зависимая дезоксирибонуклеаза <i>Muc. smegmatis</i> [542-548]	Нативная ДНК	Экзонуклеолитический; ступенчатое отщепление коротких олигонуклеотидов от конца цепи	Ди-, три-, тетра- и олигонуклеотиды с 5' - ФМЭ группой	Три молекулы АТФ необходимы для гидролиза одной ФДЭ связи	8,5	АТФ, /дАТФ/, /АДФ/, /УДФ/ и Mg^{2+}	Me^{2+} кро- me^{2+} Mg^{2+}

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	3. АТФ-зави- симая дезок- сирибонукле- аза <i>E. coli</i> [400, 158, 159, 238, 239]	Натив- ная и де- натури- рованная ДНК	Экзонук- леолити- ческий; ступенча- тое отщеп- ление оли- гонуклео- тидов от концов це- пи ДНК	Олигонук- леотиды со сред- ней дли- ной цепи 3, с 5'-ФМЭ группой	Абсолют- ная пот- ребность в АТФ. Более 20 молекул АТФ тре- буется для гид- ролиза одной ФДЭ-свя- зи	7,5- 9,5	АТФ, /дАТФ/ Mg^{2+} (Mn^{2+})	-
	4. АТФ-зави- симая дезок- сирибонукле- аза <i>Bac.</i> <i>subtilis</i> [188, 91, 104, 63, 398]	Натив- ная бес- трее де- натури- рован- ной ДНК	Экзонукле- олитичес- кий	-	Абсолют- ная пот- ребность в АТФ	9,0- 10,0	АТФ, /дАТФ/ Mg^{2+}	-
	5. АТФ-зави- симая дезок- сирибонукле- аза <i>Dipl.</i> <i>pneumoniae</i> [526, 527]	Натив- ная и де- натури- рован- ная ДНК	Экзонук- леолити- ческий; ступен- чатое от- щепление коротких олигонук- леотидов	Короткие олигонук- леотиды с 5' - ФМЭ группой	Абсолют- ная по- требность в АТФ. АТФ превраща- ется в АДФ и Фн	9,2- 9,8	АТФ, /дАТФ/ Mg^{2+} , Mn^{2+}	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9
IV. Дезоксирибонуклеиназ-5-олигонуклеотидогидролазы, специфичные к УФ-облученной ДНК - 3.1.4.X	6. АТФ-зависимая дезоксирибонуклеаза <i>H. influenzae</i> [228, 229, 468]	Нативная ДНК атакуется в 10 раз быстрее денатурированной	Экзонуклеолитический	Олигонуклеотиды с 5'-ФМЭ группой	Образует крупные фрагменты, которые затем превращаются в короткие олигонуклеотиды. Кольцевые ДНК не атакует. АТФ превращается в АДФ и Фн.	-	АТФ, Mg^{2+}	-
	1. "УФ-специфичная" эндонуклеаза <i>Microc. lysodeikticus</i> [290, 291, 455 и др.]	УФ-облученная нативная ДНК	Эндонуклеолитический "двуударный"	Полинуклеотидные цепи с единичными одноцепочными "надрывами"	Специфическая чувствительность к наличию пиримидиновых димеров	-	Не требуется	-
	2. "УФ-специфичная" экзонуклеаза <i>Microc. lysodeikticus</i> (литературу см. выше)	УФ-облученная и необлученная денатурированная ДНК	Экзонуклеолитический	Тиминовые димеры	Выщепление тиминового димера в местах эндонуклеолитических "надрывов"	-	Mg^{2+}	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9
У. Дезоксирибонуклеинат-5'-олигонуклеотидогидролаза, специфичная к алкилированным ДНК - 3.1.4.х.	1. Эндонуклеаза II E. coli [224-227]	Алкилированная ДНК и нативная ДНК бактериофагов	Эндонуклеолитический, "двуударный"	Высокополимерные олигонуклеотиды	Односпиральные разрывы вблизи алкилированных участков	8,0-9,0	Mg ²⁺	сульфгидрильные реагенты, ЭДТА, Co ²⁺ , Zn ²⁺
У1. Дезоксирибонуклеинат-5'-олигонуклеотидогидролаза-экзонуклеаза - 3.1.1.3 - 4.х.	1. Экзонуклеаза I E. coli [323, 324, 329]	Односпиральная ДНК	Экзонуклеолитический	Моно- и динуклеотиды с 5' - ФМЭ группой	Гидролизует все 3' - ФДЭ связи до концевых динуклеотидов; направление атаки: 3' → 5'	9,5	Mg ²⁺	-
	1. Экзонуклеаза II E. coli [330]	Двуспиральная ДНК гидролизует быстрее односпиральной	Экзонуклеолитический; ступенчатое отщепление мононуклеотидов от конца цепи ДНК	Нуклеозид-5-монофосфаты	Расщепляет все 3' - ФДЭ связи. Атакуют ДНК в направлении, 3' → 5'	8,6-9,2	Mg ²⁺	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Уш. Дезоксирибонуклеинат-5'-олигонуклеотидогидролазы, ассоциированные с ДНК-полимеразой - 3.1.4.X	2. Экзонуклеаза У1 <i>E. coli</i> [306, 197, 198]	Двуспиральная ДНК	Экзонуклеолитический	Моно-гексануклеотиды с 5'-ФМЭ группой	Направление атаки: 5'→3'	7,4-9,2	Mg ²⁺ , ДАТФ, /ДНТФ/	-
	3. Экзонуклеаза <i>Micrococcus deikticus</i> [257, 258, 363-365]	Односпиральная ДНК гидролизует-ся быстрее двуспиральной	Экзонуклеолитический	Нуклеозид-5 - моно-фосфаты	Направление атаки: 3'→5'	-	Mg ²⁺	-
	4. Экзонуклеаза <i>Micrococcus deikticus</i> /Литературу см. выше/	Двуспиральная ДНК гидролизуется быстрее односпиральной	Экзонуклеолитический	Моно-три-нуклеотиды с 5'-ФМЭ группой	Направление атаки: 5'→3'	7,5-9,0	Mg ²⁺ (Mn ²⁺), ДАТФ, /ДНТФ/	-

УШ. Дезоксирибонуклеинаг-5'-олигонуклеотидогидролазы-фосфатазы - 3.1.4.X

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Экзонуклеаза III <i>E. coli</i> [433, 434]	Двуспиральная ДНК	Экзонуклеолитический; ступенчатое отщепление моонуклеотидов от 3'-ОН концов	Нуклеозид-5-монофосфаты, одонитчатые фрагменты ДНК, Фн	Отщепляет 3'-ФМЭ группы полидезоксирибонуклеотидов; необходимо наличие свободных 3'-ОН групп	8,0		Mg ²⁺ (Mn ²⁺)	-
2. Экзонуклеаза-фосфатаза <i>Bac. subtilis</i> [404]	Двуспиральная ДНК	Экзонуклеолитический; ступенчатое отщепление моонуклеотидов от 3'-ОН концов	Нуклеозид-5-монофосфаты, одонитчатые фрагменты ДНК, Фн	Отщепляет 3'-ФМЭ группы полидезоксирибонуклеотидов; необходимо наличие свободных 3'-ОН групп	-	-	-	-
3. Экзонуклеаза <i>Dipl. pneumoniae</i> [314]	Двуспиральная ДНК	Экзонуклеолитический; ступенчатое отщепление моонуклеотидов от 3'-ОН концов	Нуклеотид-5-монофосфаты, одонитчатые фрагменты ДНК, Фн	Отщепляет 3'-ФМЭ группы полидезоксирибонуклеотидов; необходимо наличие свободных 3'-ОН групп	7,8-8,0		Mg ²⁺	ЭДТА, Zn ²⁺

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	4. Экзонук- леаза Н. <i>influenzae</i> [245]	Двуспи- ральная ДНК	Экзонук- леолити- ческий; ступен- чатое от- щепление моонук- леотидов от 3'-ОН концов	Нуклеозид- 5-монофос- фаты, одно- нитчатые фрагменты ДНК, Фн	Отщепля- ет 3'-ФМЭ группы по- лидезоксирн- бонуклеоти- дов; необ- ходимо на- личие сво- бодных 3'-ОН групп	8,2- 8,4	Mg ²⁺ (Mn ²⁺)	тРНК /высокие концент- рации/

Б. Р и б о н у к л е а з ы

1. Рибонук- леаза <i>Bac.</i> <i>subtilis</i> /внекле- точная/ [389, 445]	РНК	Эндонук- леолити- ческий, внутри- молекуляр- ное пере- фосфорили- рование и последую- щий гидро- лиз	Моно- и олигонук- леотиды с 3'-ФМЭ группой	Атакует преиму- щественно связи ГФ - НФ и АФ - НФ	7,5- 8,5	-	Me ²⁺
--	-----	--	--	--	-------------	---	------------------

1. Рибонуклеинат-нуклеотида-2'-транс-
феразы (циклизующие) - 2.7.7.17.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	2. Рибонуклеаза <i>Bac. glutinosus</i> /внеклеточная/ [76]	РНК	Эндонуклеолитический; внутримолекулярное перифосфорилирование и последующий гидролиз	Моно- и олигонуклеотиды с 3'-ФМЭ группой	Атакует преимущественно связи Гф-Нф и Аф-Нф	8,5-8,7	-	-
	3. Рибонуклеаза <i>Bac. intermedius</i> /внеклеточная/ [84, 85]	РНК	Эндонуклеолитический; внутримолекулярное перифосфорилирование и последующий гидролиз	Моно- и олигонуклеотиды с 3'-ФМЭ группой	Атакует преимущественно связи Гф-Нф и Аф-Нф	8,8	не требует	-
	4. Рибонуклеаза I <i>E. coli</i> [473]	РНК, Поли-Ц	Эндонуклеолитический; внутримолекулярное перифосфорилирование и последующий гидролиз	Моно- и олигонуклеотиды с 3'-ФМЭ группой	Атакует преимущественно связи т-п-а Аф-Нф и А > ф и Ц > ф	7,5-8,1	-	мочевина

1	2	3	4	5	6	7	8	9
5. Рибонуклеаза <i>Enterobacter</i> sp. [335, 336]	РНК, Поли-Ц	Эндонуклеолитический; внутримолекулярное перифосфорилирование и последующий гидролиз	Олигонуклеотиды с концевыми 3'-ЦМФ и 3'-АМФ, а также 3'-ЦМФ и 3'-АМФ	Атакует связи Цф - Нф и Аф - Нф. Поли-А, Поли-У, Поли-Г - интактны	-	-	-	
6. Рибонуклеаза I <i>Salmonella thimurium</i> [187]	Одно-спиральная РНК	Эндонуклеолитический, внутримолекулярное перифосфорилирование и последующий гидролиз	Олигонуклеотиды с 3'-ФМЭ группами, Н > Ф и 3'-НМФ	Предпочтительно гидролизует поли-У, медленно гидролизует А > Ф и У > Ф. Г > Ф и Ц > Ф не атакует	7,0	не требует	не обнаружено	
1. Рибонуклеаза <i>Bac. pumilis</i> /внеклеточная/ [446]	РНК	Эндонуклеолитический, внутримолекулярное перифосфорилирование и последующий гидролиз	Олигонуклеотиды с 3'-ФМЭ группой и 3'-ГМФ	Гидролизует связи типа Гф-Нф	7,9	-	Mg ²⁺ , Ca ²⁺	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
II. Рибонуклеиназ-нуклеотида-2-трансферазы (циклизирующие, не атакующие циклофосфаты) - 2.7.7.X.	2. Рибонуклеаза <i>Bac. amylozymus</i> /внеклеточная/ [4 -6]	РНК	Эндонуклеолитический, внутримолекулярное перефосфорилирование и последующий гидролиз	Олигонуклеотиды с 3'-ФМЭ группой и 3'-ГМФ	Гидролизует связи типа Гф-Нф	8,6	ЭДТА, Na ⁺	Mg ²⁺ , Ca ²⁺	
III. Рибонуклеиназ-нуклеотида-2-трансферазы (циклизирующие, не атакующие циклофосфаты) - 2.7.7.X.	1. Рибонуклеаза <i>Azotobacter agilis</i> [462]	РНК, полирибонуклеотиды	Эндонуклеолитический, внутримолекулярное перефосфорилирование	Нуклеозид-2',3'-циклофосфаты	Гидролизует все 5'-ФДЭ связи, не гидролизует нуклеозидциклофосфаты	7,5	-	ЭДТА, мочевины	
	2. Рибонуклеаза <i>Bac. subtilis</i> [556-559]	РНК	Эндонуклеолитический, внутримолекулярное перефосфорилирование	Нуклеозид-2',3'-циклофосфаты	Поли-Ц и поли-А гидролизует быстрее поли-У и РНК; нуклеозидциклофосфаты не гидролизует	5,5-5,7	-	АТФ и ДАТФ	

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	3. Рибонуклеаза <i>Proteus mirabilis</i> [185]	РНК, полирибонуклеотиды	Эндонуклеолитический, внутримолекулярное перефосфорилирование	Нуклеозид-2',3'-циклофосфаты	Гидролизует все 5-ФДЭ связи, не гидролизует нуклеозид-циклофосфаты	-	-	-
IX. Рибонуклеинат-нуклеотид-3'-гидролазы - 3.1.4.X.	1. Рибонуклеаза IIА <i>Thiobacillus thioararus</i> [405, 406]	РНК	Экзонуклеолитический, прямой гидролиз	Моно- и олигонуклеотиды с 3'-ФМЭ группой	Медленное других гидролизует связи типа Пурф-Пурф. Не гидролизует нуклеозид-циклофосфаты	7,0	-	бром-ацетат
	1. Рибонуклеаза II <i>E. coli</i> [474, 395 и др.]	Однонитчатые РНК и полирибонуклеотиды	Экзонуклеолитический, прямой гидролиз по "процессивному" механизму	Нуклеозид-5'-монофосфаты и тринуклеотиды с 5'-ФМЭ группой	Предпочтительно гидролизует поли-А. Направление атаки: 3'→5'	7,5	K ⁺ , Mg ²⁺	Мочевина

1	2	3	4	5	6	7	8	9
УП. Рибонуклеиназ-нуклеотида-5'-гидролазы 3.1.4.Х.	2. Рибонуклеаза <i>Serratia</i> sp. [334]	РНК и рибонуклеотиды	Экзонуклеолитический, прямой гидролиз	Нуклеозид-5-монофосфаты	Предпочтительно гидролизует поли-А; поли-Г не атакует. Направление атаки: $3 \rightarrow 5$	7,5	Mg^{2+} Mn^{2+} Ca^{2+}	Fe^{2+}
	3. Рибонуклеаза П <i>Lactobacillus plantarum</i> [345, 230, 231]	РНК и полирибонуклеотиды	Экзонуклеолитический, "процессивный" механизм	Нуклеозид-5-монофосфаты	Предпочтительно гидролизует поли-А, поли-Г не атакует	8,6	NH_4^+	ЭДТА
	4. Рибонуклеаза <i>Mycobacterium smegmatis</i> [436]	РНК и полирибонуклеотиды	Экзонуклеолитический, прямой гидролиз	Нуклеозид-5-монофосфаты	Предпочтительно гидролизует поли-А	7,5- 8,0	Na^+ Mg^{2+}	-
	5. Рибонуклеаза П <i>Salmonella typhimurium</i> [424]	Однонитчатые РНК и полирибонуклеотиды	Экзонуклеолитический, прямой гидролиз	Нуклеозид-5-монофосфаты	Предпочтительно гидролизует Поли-А	7,0- 8,0	K^+ Mg^{2+}	-
	Рибонуклеаза Н <i>E. coli</i> [362, 261, 160]	РНК в РНК-ДНК гибриде	Эндонуклеолитический	Олигонуклеотиды с 5'-ФМЭ группой	-	7,0- 8,0	Mg^{2+} сульф-гид-риль-ные агенты	$NaCl$ (0,3-0,5M)

1. Рибонуклеинат (дезоксирибонуклеинат)-5'-
нуклеотидо-гидролазы - 3.1.4.9

1	2	3	4	5	6	7	8	9
В. Н у к л е а з ы								
1. Нуклеаза <i>Ser. marcescens</i> /внеклеточная/ [73, 83, 381]	Нативная и денатурированная ДНК, РНК	Эндонуклеолитический	Олигонуклеотиды с 5'-ФМЭ группой	Некоторое предпочтение к связям типа дф Пур-фПур	8,3-8,5	Mg^{2+} (Mn^{2+})	ЭДТА	
2. Нуклеаза <i>Azotobacter agile</i> [479]	ДНК, РНК	Эндонуклеолитический	Олигонуклеотиды с 5'-ФМЭ группой	Гидролизует преимущественно поли-А, поли-Г не атакует; наиболее чувствительны связи типа фН-фА	-	-	-	
3. Нуклеаза <i>D. Str. haemolyticus</i> [532-534]	Нативная и денатурированная ДНК и РНК	Эндонуклеолитический	Олигонуклеотиды со средней длинной цепи 2,7 нуклеотидов с 5'-ФМЭ группой	Некоторое предпочтение к связям типа фН-фА	6,0-7,0	Mg^{2+} , Ca^{2+}	ЭДТА, цитрат	

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	4. Нуклеаза B Str. haemolyticus /внеклеточная/	Нативная и денатурированная ДНК и РНК	Эндонуклеолитический	Олигонуклеотиды с 5'-ФМЭ группой	Предпочтение к связям ФН-ФГ	8,0-9,0	Mg ²⁺ , Ca ²⁺	ЭДТА, цитрат
II. Дезоксирибонуклеинат (рибонуклеинат)-3'-нуклеотидогидролаза - 3.1.4.7	Нуклеаза Microgenes /внеклеточная/ [491 и др.]	Денатурированная ДНК, РНК, нативная ДНК	Эндонуклеолитический	Нуклеозид-3'-монофосфаты и динуклеотиды	Предпочтение к связям дНФ-Тф и дНФ-Аф	9,2-10,3	Ca ²⁺	Hg ²⁺ , Zn ²⁺ , Cd ²⁺
III. Рибонуклеинат (дезоксирибонуклеинат)-3'-нуклеотидогидролаза - 3.1.4.7	1. 3'-экзонуклеаза Bac. subtilis /внеклеточная/ [375, 301, 302, 437]	Денатурированная ДНК, РНК, нативная ДНК	Экзонуклеолитический, "прогрессивный" механизм атаки	Нуклеозид-3'-монофосфаты	Гидролизует все 5'-ФДЭ связи; денатурированную ДНК гидролизует от 5'-конца, нативную - от 3'-конца	8,5-9,5	Ca ²⁺	ЭДТА
	2. 3'-экзонуклеаза L. acidophilus [220, 221, 222]	Рибо- и дезокси-олигонуклеотиды	Экзонуклеолитический	Нуклеозид-3'-монофосфаты	Гидролизует все 5'-ФДЭ связи; направление атаки: 5' → 3'	Разные значения pH при гидролизе разных субстратов	-	-

IV. Рибонуклеинат (дезоксирибонуклеинат) -
5'-нуклеотидогидролаза - 3.I.4.I.

IV. Рибонуклеиназ (дезоксирибонуклеиназ) -
5'-нуклеотидгидролаза - 3.I.4.I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. 5'-экзонуклеаза <i>Microsodonensis</i> /внеклеточная/ [168-171]	Нативная и денатурированная ДНК, РНК, полинуклеотиды	Экзонуклеолитический	Фн, нуклеозиды	Гидролизует все 3'-ФДЭ и 5'-ФМЭ связи, начало атаки 3'-ОН конец. Не атакует полинуклеотиды с 3'-фосфатной группой	8,8	Mg^{2+} , (Mn^{2+}), (Ca^{2+})	Высокие концентрации Me^{2+}	
2. 5'-экзонуклеаза <i>Thiobacillus thioaratus</i> [96]	ДНК, РНК, полинуклеотиды и бисфосфат	Экзонуклеолитический	Нуклеозид-5-монофосфаты	Гидролизует все 3'-ФДЭ связи	9,0	Mn^{2+}	Zn^{2+}	
3. 5'-экзонуклеаза <i>Lactobacillus acidophylus</i> [448]	ДНК, РНК полинуклеотиды, паранитрофенил-5-тимидинфосфат	Экзонуклеолитический	Нуклеозид-5-монофосфаты	Гидролизует все 3'-ФДЭ связи. Пурин-динуклеотиды гидролизуют быстрее пиримидин-динуклеотидов	8,0	Mg^{2+}	-	

П. НУКЛЕОДЕПОЛИМЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ САПРОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ

І. Методы определения нуклеодеполимеразной активности. Особенности исследования нуклеаз бактерий

Общие указания по отдельным методам определения ДНКазной и РНКазной активности и обсуждение возможностей и ограничений этих методов можно найти в ряде обзорных и методических работ [453, 311, 284, 32, 129, 118]. Тем не менее мы считали необходимым провести анализ методов определения активности ферментов, отличающихся друг от друга каталитическими свойствами. Интересным представлялось изучить, насколько широко используются отдельные методы, каковы их модификации и в каких случаях необходимо использовать особо чувствительные, специфические способы определения нуклеодеполимеразной активности. Своей задачей мы поставили также обсуждение особенностей определения нуклеодеполимеразной активности бактерий. Мы стремились по возможности избежать обсуждения тех методических вопросов, которые достаточно полно освещены в литературе.

В обзорной работе Курника [311] методы анализа нуклеодеполимеразной активности в зависимости от принципа, положенного в основу определения, объединены в следующие группы.

Методы, основанные на определении освобождающихся в ходе реакции ионов водорода, так называемые титриметрические методы [284]. Ограниченность этих методов заключается в том, что они применимы только для нуклеодеполимераз, гидролизующих НК при щелочных и нейтральных значениях pH. Анализ литературных источников показывает, что титриметрические методы для оп-

ределения нуклеазной активности применяются сравнительно редко. Они используются при изучении кинетики ферментативных реакций.

Методы, основанные на учете изменения молекулярного веса, коэффициента седиментации и других физико-химических свойств нуклеиновых кислот. В некоторых специфических случаях, в частности, для регистрации единичных разрывов полимерной цепи НК, методы седиментационного анализа незаменимы. Они используются разными авторами для определения активности таких ферментов, как, например, нуклеаза *Bac. subtilis* [359], производящая ограниченное число разрывов, которые приводят к незначительному снижению молекулярного веса. Этот же метод используется для анализа активности ДНКаз *Micr. lysodeikticus*, *E. coli*, специфичных к модифицированным УФ-облучением и метилирующими агентами ДНК [482, 486, 227, 455 и др.]. Недавно Мукай с соавторами [371] предложил для определения эндонуклеазной активности высокочувствительный метод с использованием кольцевых ДНК как субстратов. Метод основан на том, что замкнутые кольцевые ДНК денатурируются медленнее, чем кольцевые ДНК, имеющие хотя бы один надрыв. Денатурированные и неденатурированные ДНК разделяются с помощью нитроцеллюлозных мембранных фильтров.

Более распространен способ определения ДНКазной активности по изменению вязкости растворов ДНК. Ограниченность метода состоит в том, что в качестве субстрата может быть использована только высокополимерная, нативная ДНК, образующая растворы с высокой вязкостью. Способ предложен Ласковским и Зейдель [320]. Основан на быстром снижении вязкости растворов ДНК при изменении ее полимерности. Метод высокочувствителен особенно для ДНКаз, обладающих "одноударным" механизмом атаки, поскольку разрушение небольшого числа ФДЭ-связей ведет к резкому снижению вязкости. С помощью вискозиметрии, наряду с седиментационным анализом, можно регистрировать единичные разрывы полимерной цепи ДНК.

Следует отметить, что этот метод применим для выявления только эндонуклеолитической активности, поскольку расщепление макромолекулярной цепи ДНК в нескольких местах внутри цепи

приводит к быстрому уменьшению полимерности цепи и вследствие этого к снижению вязкости растворов ДНК. Падение вязкости раствора ДНК почти до вязкости растворителя наступает на первых этапах эндонуклеолитической атаки, когда продукты гидролиза ДНК имеют сравнительно высокий молекулярный вес, и, хотя утратили вязкость, не потеряли способности осаждаться в растворах кислот. Вследствие этого, к моменту заметного снижения вязкости ДНК в гидролизате имеется незначительное количество кислоторастворимых нуклеотидов (рис. IА). Напротив, ступенчатое отщепление мононуклеотидов или коротких олигонуклеотидов от конца полимерной цепи приводит к заметному уменьшению молекулярного веса и, следовательно, вязкости раствора ДНК только тогда, когда пройдет довольно глубокий гидролиз. Таким образом, начальные этапы экзонуклеолитической реакции не могут быть учтены вискозиметрически. Как показано на рис. IБ, в этом случае медленное снижение вязкости растворов ДНК сопровождается быстрым накоплением кислоторастворимых олигонуклеотидов.

Для вискозиметрических анализов мы используем в качестве субстрата ДНК тимуса телят с молекулярным весом $5-10 \times 10^6$. В состав реакционной смеси общим объемом 1 мл входит 1 мг ДНК, 5×10^{-2} М трис-НСI буфера (рН оптимальный для действия исследуемой ДНКазы), 5×10^{-3} М Mg^{2+} или другого активатора. 0,1 мл раствора фермента добавляется после предварительной инкубации реакционной смеси в течение 30 мин. в водяной бане при $37^{\circ}C$. Замеры времени истечения начинаются тотчас же после добавления фермента и производятся с интервалами 5 - 10 мин. в течение 30 мин. Ферментный раствор разводится из такого расчета, чтобы время снижения вязкости раствора ДНК до вязкости растворителя составило 20 - 30 мин. Расчет активности производится по модифицированной Бенингом [32] формуле Ласковского и Зейдель [320] :

$$A = \frac{\sum K_t}{n} ; \quad K_t = \frac{10^3 \lg \frac{f_s - f_0}{f_t - f_0}}{t}$$

где, A - активность фермента,
 K_t - логарифмическая константа скорости падения вязкости для каждого замера,

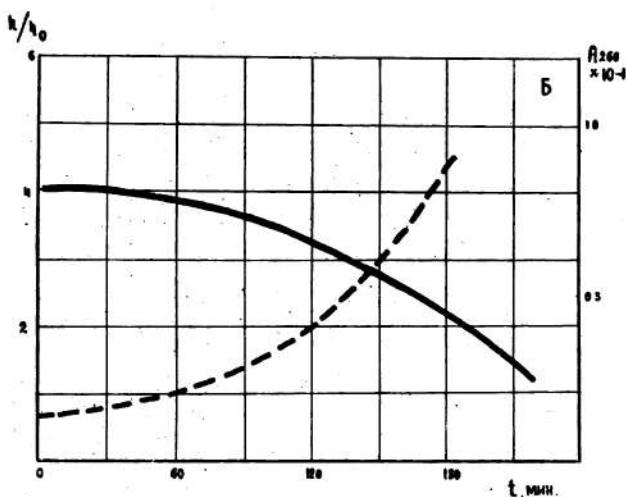
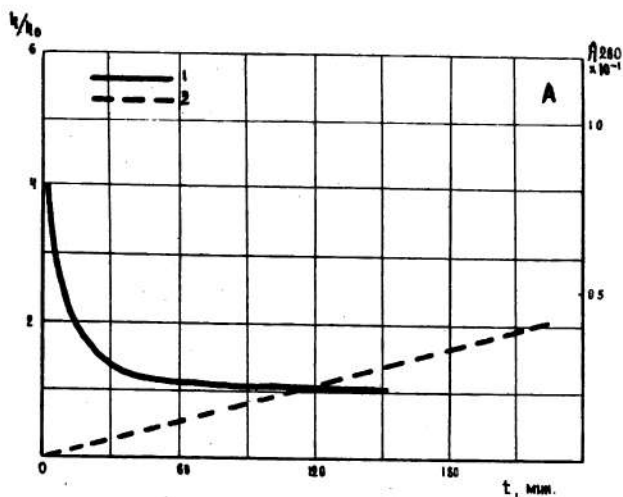


Рис. 1.

Изменение относительной вязкости (η/η_0) и количества продуктов гидролиза, растворимых в 2% хлорной кислоте (A_{260}), при воздействии на нативную ДНК: (А) панкреатической ДНКазы - эндонуклеазы, (Б) экзонуклеазы *Micr. sodonensis* [157].

- t_s - время истечения реакционной смеси сразу после добавления фермента,
 t_0 - время истечения растворителя,
 t_t - время истечения реакционной смеси через t мин. после начала реакции,
 n - количество вычисленных коэффициентов K_t . А равное 1, принято за единицу активности (виск. ед.).

Пользуясь этим методом, необходимо учитывать, что снижение вязкости ДНК зависит не столько от количества произведенных ферментом разрывов, сколько от их распределения. Кроме того, снижение вязкости отражает лишь начальный этап реакции. Поэтому, строго говоря, этот метод следует признать удобным лишь для сравнительного анализа ДНКазной активности. Однако, в силу его высокой чувствительности, а также простоты он незаменим для массовых анализов и особенно для выявления ДНКаз с низкой активностью.

Методы, основанные на изменении биологической активности ДНК при воздействии на нее ДНКазой, предусматривают использование в качестве субстрата бактериальных ДНК, обладающих, в частности, трансформирующей активностью. Для массовых исследований эти методы не применяются из-за их трудоемкости и малой доступности субстрата. Они используются в специальных случаях как высокочувствительные методы. В частности, по уменьшению трансформирующей активности ДНК *Bac. subtilis* была обнаружена специфичная к УФ-облученной ДНК ферментативная активность в бесклеточных экстрактах *Micrococcus luteus* [482] и специфичная к модифицированной ММД ДНК - в экстрактах *Bac. subtilis* [483]. РНКазная активность в отдельных случаях тоже определяется по инактивации биологически активных РНК, когда другими, более грубыми методами эта активность не выявляется.

Методы, основанные на способности нуклеиновых кислот при нарушении их вторичной структуры вследствие температурной обработки или как результат расщепления ФДЭ связей увеличивать оптическое поглощение при 260 нм и понижать при 300 нм. Наиболее распространен метод Кунитца [309], по которому в термостатированных кюветах спектрофотометра регистрируют изменение A_{260} в процессе ферментативного гидроли-

за НК. Использование этого метода для определения активности ДНКаз ограничено его малой чувствительностью, ибо нарушение водородных связей наступает только после расщепления значительного количества ФДЭ связей, особенно, если ферменты имеют "одноударный" механизм атаки. При воздействии на ДНК разными ДНКазами оптическая плотность повышается не более, чем на 20 - 30%.

При использовании в качестве субстратов уридин-2'-3'-и цитидин-2'-3'-циклофосфатов регистрируют увеличение экстинкции при 286 и 284 нм соответственно [191]. Этот способ применяется рядом отечественных и зарубежных исследователей для определения РНКазной активности в том случае, если исследуемая РНКаза обладает способностью гидролизовать пиримидин-циклофосфаты.

Методы, основанные на способности высокополимерных нуклеиновых кислот и полинуклеотидов осаждаться в растворах кислот, спиртов и других осадителей. В супернатанте остаются мелкие обломки НК. В зависимости от природы осадителя в растворе оказываются полинуклеотиды разной степени полимерности. Так, раствор уранилацетата в ТХУ или HClO_4 осаждает крупные олигонуклеотиды, оставляя в растворе моно- пентануклеотиды, 2 - 4%-ные растворы HClO_4 оставляют в растворе от моно- до нано- и более полимерные олигонуклеотиды [349, 143, 289 и др.]. В наших исследованиях в качестве осадителей используются 2%-ный раствор HClO_4 или 0,1% раствор уранил-ацетата в 2-х или 4-х %-ной HClO_4 .

Кроме наиболее распространенного, спектрофотометрического метода определения кислоторастворимых продуктов по величине поглощения в УФ-области, их количество можно учитывать по содержанию рибозы или дезоксирибозы, а также по содержанию фосфора. Наиболее чувствителен метод учета продуктов гидролиза по количеству P^{32} в гидролизате, когда в качестве субстрата используются меченные по Р ДНК или РНК [143, 250, 181 и др.].

Одной из модификаций указанного выше способа определения активности нуклеаз является метод кислотной преципитации в агаре, предложенный Джеффрисом с сотрудниками [281] для

определения нуклеазной активности бактерий. На чашку Петри с агаризованной питательной средой, содержащей ДНК или РНК (2 мг/мл), коротким штрихом засевают бактериальную культуру. После инкубации чашек с посевами в термостате в течение суток их заливают 1 М раствором HCl. По всей массе агара образуется непрозрачный белый преципитат негидролизированных нуклеиновых кислот. Вокруг колоний бактерий, секретирующих нуклеодеполимеразы, образуются прозрачные зоны кислоторастворимых продуктов гидролиза. За единицу активности принимают величину зоны в 1 мм. Метод рассматривается как полуколичественный, но чрезвычайно удобный для массовых анализов способности бактерий секретировать ДНКазы и РНКазы, и используется для этих целей многими исследователями. Применяется также модифицированный метод Джеффриса [64].

Следует учитывать ряд ограничений методов, основанных на кислотной преципитации нуклеиновых кислот. В случае эндонуклеолитического действия кислоторастворимые нуклеотиды накапливаются медленнее, после некоторого инкубационного периода. Полное превращение субстрата в кислоторастворимые нуклеотиды не является окончанием реакции вообще, так как может продолжаться их дальнейшая деполимеризация. Использование кислотных осадителей ограничено еще и тем, что сама кислота вызывает расщепление НК, поэтому необходимо в целях предотвращения этого все операции, включая центрифугирование, проводить на холоду.

Ряд исследователей предлагает использовать нейтральные осадители, имеющие преимущества перед кислотными, например, $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ в смеси с 2-этоксипантолом [219], 0,01 М MgCl_2 в 50%-ном этаноле [426] и другие.

Следует особо остановиться на методах, которые используются в том случае, когда субстратами являются не высокополимерные нуклеиновые кислоты, а их модифицированные низкомолекулярные производные, либо синтетические субстраты. Для ферментов экзонуклеолитического типа действия, способных гидролизовать короткие фрагменты, используются в качестве субстратов хромогенные фосфодиэфиры типа натриевой или кальциевой соли бис-(паранитрофенил)-фосфата. В экспериментальных работах последних лет используются пара-нитрофениловые эфиры

5'-НМФ и 3'-НМФ. Исчерпывающие сведения об использовании модельных субстратов для изучения нуклеаз даны в обзоре Татарской [118]. При использовании в качестве субстратов нуклеозид-циклофосфатов, динуклеотидов и других кислоторастворимых нуклеотидов применяют, как правило, бумажную и реже колоночную хроматографию для отделения субстрата от продуктов гидролиза.

Необходимо учитывать, что при определении нуклеодеполимеразной активности микроорганизмов обычно создают стандартные условия культивирования и определения ферментативной активности. Вследствие этого, независимо от точности использованного метода, результаты должны рассматриваться как относительные, с поправкой на возможные изменения в случае приближения условий культивирования микроорганизмов и определения активности ферментов к оптимальным.

2. Способность сапрофитных бактерий разных таксономических групп секретировать нуклеодеполимеразы

Работы по определению способности бактерий разжижать гели нуклеиновых кислот были начаты еще в 1890-1937 гг. [213, 411, 209, 481, 349, 461]. Однако серьезное изучение нуклеаз микроорганизмов началось после 1948 года, когда в исследовании нуклеиновых кислот были достигнуты значительные успехи.

В 1957 г. Джеффрисом с соавторами [281] был предложен быстрый метод определения нуклеодеполимеразной активности бактерий - вышеописанный метод кислотной преципитации в агаре. Пользуясь этим методом, сами авторы и другие ученые обследовали способность секретировать нуклеодеполимеразы почти всех основных видов бактерий.

Остановимся на работах, в которых приводятся результаты обследования большого числа видов.

Джеффрис с соавторами [281] обследовал наличие внеклеточных нуклеаз у различных видов бактерий из сем. Bacillaceae, Bacteriaceae, Coccaceae и др. Активные виды были обнаружены среди сем. Bacillaceae, Bacteriaceae (под Serratia и род Achromobacter), сем. Coccaceae (под Streptococcus). Не обладали нуклеодеполимеразной активностью многие виды рода Flavobacterium и рода Micrococcus (сапрофитные формы).

Среди советских ученых ранее других начали заниматься изучением нуклеаз бактерий сотрудники лаборатории микробиологии Казанского университета под руководством профессора М.И. Беляевой. В статьях, опубликованных с 1958 г. [27] и по настоящее время [26, 28, 112, 132, 69, 133, 134], содержится материал обследования более 700 штаммов, 100 видов из пяти основных семейств бактерий: *Coccaceae*, *Bacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Mycobacteriaceae*.

Полученные нами данные о нуклеодеполимеразной активности 210 штаммов 82 видов указанных выше семейств сапрофитных бактерий обобщены в таблице 2. Кроме определения полуколичественным методом Джеффриса (графы 4 и 6 в таблице), ДНКазная активность (при pH 8,0) определена вискозиметрически [320], РНКазная (при pH 8,0 и 5,0) — по продуктам гидролиза, растворимым в уранилацетате с HClO_4 [143].

Т а б л и ц а 2
Нуклеазная активность бактерий

№	Виды бактерий	Количество обследованных штаммов	ДНКазы		РНКазы		
			зоны, мм	виск. ед.	зоны, мм	pH 8,0 сп.ед.	pH 5,0
I	2	3	4	5	6	7	8
		Семейство <i>Coccaceae</i>					
1	<i>Sarcina flava</i>	4	0-6	2-13	0-3	0-14	0
2	<i>Sarcina subflava</i>	3	0-5	0-10	0	0	0
3	<i>Sarcina lutea</i>	3	5-8	5-11	0-4	0-29	0-5
4	<i>Sarcina aurantiaca</i>	1	0	0	0	2	0
5	<i>Micr. agilis</i>	1	5	24	0	5	0
6	<i>Micr. albus</i>	3	0	0	0	0	0
7	<i>Micr. aurantiacus</i>	1	0	1	0	0	0
8	<i>Micr. candidus</i>	1	5	9	2	8	0
9	<i>Micr. candidus epidermidis</i>	2	0	0	0-3	0-5	0
10	<i>Micr. chlorinus tetracoccus</i>	2	0-1	1-2	0	0	0
11	<i>Micr. cinnabareus</i>	1	0	0	0	0	0
12	<i>Micr. citreus</i>	1	0	0	0	0	0
13	<i>Micr. subcitreus</i>	3	0-3	0-4	0	0	0
14	<i>Micr. galbanatus</i>	1	0	0	0	0	0
15	<i>Micr. lysodeikticus</i>	1	0	0	0	0	0

1	2	3	4	5	6	7	8
16	<i>Micr. radiatus</i>	1	0	2	0	0	0
17	<i>Micr. roseus</i>	2	3	7	3-4	0-9	0
18	<i>Micr. carneus</i>	2	0	0	0	0	0
19	<i>Micr. rubefaciens</i>	2	0-1	2-6	0-6	28-40	0
20	<i>Micr. sulfureus</i>	2	1-2	4-5	1-3	12-29	0-13

Семейство Bacteriaceae

1	<i>Ser. marcescens</i>	9	2-8	153- 1090	2-8	10- 177	0-13
2	<i>Chromobacterium aurantiacum</i>	1	3	12	3	16	0
3	<i>Chromobacterium denitrificans</i>	2	2	12-28	0-2	0-30	0
4	<i>Chromobacterium rubefaciens</i>	1	2	3	6	92	0
5	<i>Bact. agile</i>	3	0-1	8-9	0	1-25	0
6	<i>Bact. liquefaciens</i>	1	0	14	2	17	0
7	<i>Bact. nitrificans</i>	1	0	2	0	0	-
8	<i>Escherichia coli</i>	5	0	0	0	0	0

Семейство Pseudomonadaceae

1	<i>Ps. fluorescens</i>	18	0-5	0-10	0-3	0-50	0-28
2	<i>Ps. pyocianea</i>	3	4	4-14	0-3	5-12	0
3	<i>Ps. myxogenes</i>	1	0	0	0	0	0
4	<i>Ps. striata</i>	1	2	4	1	0	0
5	<i>Ps. nonliquefaciens</i>	2	1-3	12-13	3	4	0
6	<i>Ps. liquefaciens</i>	5	0-2	0-9	0-2	0-92	0-18
7	<i>Ps. boreopolis</i>	1	0	1	0	0	0
8	<i>Ps. aurantiaca</i>	1	0	5	0	0	0
9	<i>Ps. sinuosa</i>	1	2	9	0	5	16
10	<i>Ps. denitrificans</i>	4	0-4	2-12	0-6	0-98	0-17
11	<i>Ps. xanthe</i>	1	0	0	0	0	0
12	<i>Ps. caudatus</i>	2	0	0-1	0	2-3	0
13	<i>Ps. desmolyticum</i>	1	0	0	0	33	13
14	<i>Ps. gracilis</i>	5	0-1	0-16	2-4	20-40	5-26

1	2	3	4	5	6	7	8
15	<i>Ps. radiobacter</i>	1	0	11	1	15	0
16	<i>Ps. aeruginosa</i>	1	3	9	0	0	0
17	<i>Ps. sp.</i>	6	0	0	0	0	0

Семейство Bacillaceae

1	<i>Bac. subtilis</i>	9	1-5	0-84	1-5	40-269	20-134
2	<i>Bac. mesentericus</i>	14	1-5	5-59	1-6	10-268	2-110
3	<i>Bac. pumilis</i>	1	5	42	2	96	25
4	<i>Bac. solaniperda</i>	1	2	0	4	73	18
5	<i>Bac. idosus</i>	3	1-3	0-48	2-6	10-103	0-51
6	<i>Bac. mycoides</i>	7	0-2	5-32	1-4	10-97	0-14
7	<i>Bac. filaris</i>	3	0-1	0-8	0-5	0-4	0
8	<i>Bac. cereus</i>	8	0-5	1-12	3-7	10-58	0-37
9	<i>Bac. adhaerens</i>	4	0-1	0-18	4-5	25-46	0
10	<i>Bac. glutinosus</i>	6	0-2	4-9	0-7	2-137	0-19
11	<i>Bac. megaterium</i>	5	0-3	4-15	2-5	10-170	0-40
12	<i>Bac. triffanti</i>	1	1	30	5	48	7
13	<i>Bac. amylozyma</i>	1	0	5	3	110	0
14	<i>Bac. natans</i>	1	4	17	4	19	49
15	<i>Bac. vitreus</i>	2	0-3	0	6-7	53-55	19-28
16	<i>Bac. cystiformis</i>	1	2	0	3	28	0
17	<i>Bac. coagulans</i>	2	0	27-30	2-3	128-146	6-13
18	<i>Bac. oligonitrophilus</i>	1	2	0	2	10	7
19	<i>Bac. quercifolius</i>	2	0-3	15-18	4-6	111-170	9-16

1	2	3	4	5	6	7	8
20	Bac. lignorum	1	0	41	5	92	0
21	Bac. vesicae	1	0	30	5	80	0
22	Bac. intermedius	1	1	10	8	303	40
23	Bac. alvei	2	0-1	10-15	0-2	0-74	0-2
24	Bac. terminalis	2	2	4-9	6-8	123-190	42-81
25	Bac. subterminalis	1	2	12	5	213	5
26	Bac. brevis	1	4	5	1	0	0
27	Bac. circulans	2	0	2-3	0-2	15-19	0-6
28	Bac. tritus	1	0	0	3	7	9
29	Bac. asterosporus	2	2	17-20	5-6	149-223	19-27
30	Bac. flavidus	1	0	6	0	0	0
31	Bac. dendrolimis	1	2	5	4	3	0
32	Bac. polymyxa	2	0	10-13	0-2	0-20	0-15
33	Bac. macerans	1	0	11	0	35	32
34	Bac. pseudotetanicus	1	1	24	2	22	22

Семейство Mycobacteriaceae

1	Mycobacterium						
	lacticalum	1	0	0	0	32	24
2	Mycobacterium sp.	6	0	0	0-1	0-35	0-21

Согласно данным, представленным в таблице 2, способностью секретировать нуклеодеполимеразы обладают многие бактерии. Наиболее активными продуцентами, особенно РНКаз, являются споровые бактерии и отдельные виды сем. *Bacteriaceae*. Представители сем. *Pseudomonadaceae*, *Mycobacteriaceae*, а также сапрофитные кокковые формы обладают низкой нуклеодеполимеразной активностью. Представители разных видов одного и того же семейства и даже разных штаммов одного вида значительно различаются по степени нуклеодеполимеразной активности.

Результаты исследования с помощью чашечного метода Джеффриса [281] ДНКазной активности 60 штаммов 133 видов из 14 семейств сапрофитных и патогенных бактерий представлены в 1963 году Вагнером [529]. Из них сапрофитные бактерии включали более 400 штаммов 70 видов следующих шести семейств: *Coccaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Bacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Mycobacteriaceae*. Автор отмечает, что наиболее активными продуцентами ДНКаз являются споровые бактерии. Некоторые штаммы таких видов, как *Bac. adhaerens*, *Bac. polymyxa*, *Bac. megaterium*, *Bac. mesentericus* и *Aerobacter aerogenes* могут быть использованы для препаративного получения ДНКаз.

Накао с соавторами в 1963 г. [376] предпринял поиски среди бактерий активных продуцентов экзонуклеаз, гидролизующих ДНК и РНК с образованием 5-моонуклеотидов. Обследовав более 95 штаммов бактерий, в основном из сем. *Bacillaceae* и *Pseudomonadaceae*, авторы установили, что бактерии 25 видов являются активными продуцентами РНКаз-трансфераз (циклизующих) и только три вида: *Bac. brevis*, *Bac. subtilis* и *Ps. aeruginosa* продуцируют экзонуклеазы, гидролизующие нуклеиновые кислоты с образованием 5-моонуклеотидов.

Большое число видов сем. *Pseudomonadaceae* было обследовано на наличие внеклеточных нуклеодеполимераз разными авторами. Из 90 видов сапрофитных и патогенных бактерий этого семейства незначительная нуклеодеполимеразная активность обнаружена у 18 видов, таких как *Ps. fluorescens*, *Ps. denitrificans*, *Ps. putrescens*, *Ps. turcosa*, *Ps. aeruginosa* и у бактерий рода *Aeromonas* [246, 487, 377, 529, 133, 134 и др.].

Более чем у 50 видов бактерий сем. *Enterobacteriaceae* также определена способность секретировать нуклеодеполимеразы. По

данным ряда авторов, энтеробактерии не продуцируют внеклеточные ДНКазы и РНКазы. Исключение составляют бактерии рода *Serratia*, большинство видов которого обладает высокой нуклеодеполимеразной активностью [529, 132, 69, 441, 517, 137, 353, 524, 134 и др.]. Сотрудники института Микробиологии АН Украинской ССР обследовали с помощью метода Джеффриса [281]. 914 штаммов 118 видов сапрофитных бактерий из сем. *Bacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Bacillaceae*, *Mycobacteriaceae* [101 - 103]. В этих работах подтвердились выводы, сделанные ранее другими авторами относительно способности бактерий разных семейств продуцировать активные нуклеодеполимеразы. Наиболее активными продуцентами нуклеодеполимераз являются споровые палочки и в особенности *Bac. cereus*, *Bac. brevis*, *Bac. circulans*, *Bac. glutinosus*, *Bac. megaterium*, *Bac. mesentericus* (обследовано 144 штамма, все они секретируют РНКазу и 19 из них - ДНКазу), *Bac. mycoides*, *Bac. subtilis* (обследовано 106 штаммов, все секретируют РНКазу и 42 штамма - ДНКазу). Среди многочисленных представителей сем. *Pseudomonadaceae* авторы нашли только два вида, имеющих нуклеодеполимеразную активность: *Ps. turcosea* и *Ps. liquida*. Не обнаружена способность продуцировать внеклеточные нуклеодеполимеразы у бактерий сем. *Enterobacteriaceae*, *Mycobacteriaceae* и у бактерий сем. *Bacteriaceae* рода *Chromobacterium*.

Разин с соавторами [425] обследовал шесть видов бактерий из сем. *Mycoplasmataceae*. Все обследованные представители этого семейства обладали ДНКазной и РНКазной активностями.

Недавно был обнаружен весьма своеобразный фермент в культуральной жидкости *Bac. sp.* - рибонуклеаза, расщепляющая РНК с образованием 5'-мононуклеотидов, которые дефосфорилируются этим же ферментом. 5'-нуклеотидаза и РНКаз не разделяются при электрофорезе в ПААГ и при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы. Эта рибонуклеаза появляется при культивировании бактерий на среде с РНК в качестве единственного источника фосфора. Фермент расщепляет полимеры от 3'-гидроксильного конца экзонуклеолитически. В отличие от большинства внеклеточных РНКаз, этот фермент имеет высокий молекулярный вес 100000 [280].

Анализируя литературные данные и результаты собственных исследований, можно сделать следующее заключение.

Способность секретировать нуклеодеполимеразы широко распространена среди сапрофитных форм бактерий разных видов и не является свойством какой-либо определенной таксономической группы. Однако в отдельных случаях тому или иному виду и даже роду бактерий в целом может быть свойственна способность секретировать весьма активные нуклеодеполимеразы. Примером тому служит род *Serratia*. Многочисленные представители этого рода бактерий обследованы на присутствие внеклеточных нуклеодеполимераз разными исследователями [28I, 132, 69, 529, 44I, 134 и др.]. Все авторы, в том числе и мы, обнаружили у этих бактерий высокую ДНКазную и РНКазную активность. При этом интересно отметить, что бактерии рода *Serratia* являются одними из немногих энтеробактерий, способных секретировать нуклеодеполимеразы. Отдельные авторы предлагают использовать этот признак для разделения родов *Serratia* и *Paracoli*. Последние, как известно, сходны с *Serratia* по морфолого-культуральным свойствам (имеются в виду беспигментные формы *Serratia*) и отличаются лишь отсутствием нуклеодеполимеразной активности. Таким образом, в отдельных случаях способность секретировать нуклеодеполимеразы может быть использована как один из таксономических признаков.

Анализ нуклеодеполимеразной активности бактерий из разных семейств показывает, что сем. *Bacillaceae* имеет наибольшее количество видов, способных секретировать нуклеодеполимеразы. РНКазная активность споровых форм выше ДНКазной. Вероятно, РНКазной активностью, в той или иной степени, обладают все сапрофитные бактерии рода *Bacillus*.

Не обладает внеклеточной нуклеодеполимеразной активностью ряд видов из сем. *Mycobacteriaceae*, сем. *Pseudomonadaceae*, сем. *Coccaceae* и почти все виды сем. *Bacteriaceae* (исключение составляют бактерии рода *Serratia*, рода *Chromobacterium* и отдельные представители рода *Proteus*).

Как правило, нуклеодеполимеразы, секретируемые сапрофитными бактериями, активнее при щелочных и нейтральных значениях pH. Кислые ДНКазы вообще не обнаружены, кислые РНКазы менее активны, чем щелочные. Этот факт, а также более высокая РНК-

азная активность сапрофитных бактерий объясняется, по-видимому, приспособительной реакцией бактерий к условиям среды обитания. Как известно, сапрофитные формы бактерий являются, в основном, обитателями нейтральных и слабощелочных почв и воды, т.е. среды, содержащей всевозможные растительные остатки, богатые РНК.

Интенсификация исследований нуклеодеполимеразной активности бактерий, наблюдавшаяся за последние 10 – 15 лет, объясняется, с одной стороны, возросшим интересом к нуклеиновым кислотам и, естественно, к ферментам, участвующим в их превращении, и, с другой стороны, разработкой сравнительно простого, чрезвычайно удобного для массовых анализов метода, основанного на кислотной преципитации нуклеиновых кислот в агаре [281]. Для получения более точной информации относительно степени нуклеодеполимеразной активности бактерий, в дополнение к чашечному методу Джеффриса, мы используем высокочувствительный для ДНКаз-эндонуклеаз вискозиметрический метод определения ДНКазной активности и спектрофотометрический метод определения РНКазной активности в культуральных жидкостях бактерий. Применение этих методов позволило выявить наличие внеклеточных нуклеодеполимераз у малоактивных в этом отношении бактерий. Так, например, с помощью вискозиметрического и спектрофотометрического методов исследования обнаружена нуклеодеполимеразная активность у отдельных штаммов *Sarcina flava*, *Micr. rubefaciens*, *Bact. agile*, *Ps. fluorescens*, *Ps. pyocyanea* и др. Методом Джеффриса у этих бактерий нуклеодеполимеразная активность не выявляется. Необходимо обратить внимание на то обстоятельство, что результаты, полученные многими исследователями, а также наши экспериментальные данные нельзя расценивать как абсолютные, так как не представляется возможным учесть все факторы, которые могут оказать существенное влияние на синтез нуклеодеполимераз тем или иным микроорганизмом. В частности, это относится к составу питательной среды, времени инкубации, а также другим условиям культивирования бактерий. Заниженные в некоторых случаях результаты могут быть также следствием отсутствия надлежащих условий постановки реакции расщепления нуклеиновых кислот при определении ферментативной активности бактерий.

Вместе с тем, подытоживая данные, приведенные во второй главе, можно с уверенностью сказать, что сапрофитные бактерии

весьма перспективны как подуценты внеклеточных нуклеодеполимераз.

Что касается биологической роли внеклеточных нуклеодеполимераз, сведения о них весьма малочисленны. Получено небольшое число экспериментальных данных, свидетельствующих в пользу "пищеварительной" роли этих ферментов. Так, показано, что РНКазы появляются в питательной среде в начале экспоненциальной фазы роста. РНКазная активность увеличивается параллельно накоплению биомассы и достигает максимального значения к концу экспоненциальной фазы роста [554, 152, 467]. На основании этого полагают, что внеклеточные РНКазы участвуют в процессах питания и являются факторами, регулирующими рост микробной популяции.

Параллельное накопление биомассы и увеличение ДНКазной активности в питательной среде обнаружено при изучении ряда патогенных и сапрофитных бактерий [532, 72 и др.]

В литературе имеются указания на способность микроорганизмов использовать нуклеиновые кислоты и их производные в качестве единственного источника основных элементов питания. Установлено, что отдельные микроорганизмы в процессе роста на средах, содержащих нуклеиновые кислоты и их производные, накапливают в культуральной жидкости промежуточные продукты гидролиза этих соединений, которые впоследствии используются непосредственно на синтез нуклеиновых кислот микробной клетки. Другие микроорганизмы производят полную минерализацию нуклеиновых кислот или нуклеотидов, используя эти соединения в качестве источников азота, углерода и фосфора [303, 42-44, 46, 62, 315 и др.].

Данных об участии внеклеточных нуклеодеполимераз в процессе усвоения нуклеиновых кислот в литературе почти не имеется.

Нами совместно с сотрудниками кафедры микробиологии Латвийского университета проведено изучение способности бактерий использовать нуклеиновые кислоты в качестве основного источника питания [44]. Особое внимание было уделено изучению роли внеклеточных нуклеодеполимераз в процессе использования бактериями нуклеиновых кислот.

При выделении микроорганизмов из различных природных источников (почва, фекалий животных) в накопительных культурах на полусинтетических средах, содержащих ДНК или РНК в качестве источников углеродного и азотного питания, мы наблюдали, что на среде с РНК рост бактерий интенсивнее, чем на среде с ДНК. Гораздо большее разнообразие видов бактерий обнаруживается на среде с РНК, которая представляет собой более доступный питательный субстрат для сапрофитных микроорганизмов.

Проверялась способность выделенных на среде с ДНК культур расти на среде с РНК и наоборот, а также нуклеополимеразная активность полученных бактерий. Установлено, что культуры, которые были выделены на синтетической среде с РНК, имели РНКазную активность, не обладали ДНКазной активностью и не росли на среде с ДНК. Напротив, культуры, полученные на среде с ДНК, имели ДНКазную активность, не обладали РНКазной активностью и не росли на среде с РНК. На основании этих результатов можно сделать предположение об участии внеклеточных нуклеополимераз в усвоении бактериями нуклеиновых кислот.

В связи с этим определенный интерес представляет исследование способности некоторых бактерий, обладающих высокой нуклеазной активностью (см. табл. 2), использовать нуклеиновые кислоты в качестве питательных веществ.

Нами было установлено, что на питательных средах, содержащих ДНК или РНК в качестве дополнительного источника питания или в качестве источника азота, либо фосфора, бактерии, обладающие высокой нуклеазной активностью, интенсивно растут. Параллельно приросту биомассы наблюдается уменьшение содержания нуклеиновых кислот в среде. К середине экспоненциальной фазы роста используется 50 - 70% исходного количества нуклеиновых кислот.

В обзорных работах по РНКазам Эгами, Накамуры [208] и Барнарда [162] обсуждается вопрос о роли внеклеточных РНКаз в метаболизме микроорганизмов. Отмечается разнообразие внеклеточных РНКаз по каталитическим свойствам. Само по себе это разнообразие свойств свидетельствует, по-видимому, в пользу не одной, а нескольких биологических функций указанных ферментов. Некоторые микроорганизмы, например *Neurospora crassa* [497], имеют внеклеточные (РНКазы N1) и внутриклеточные (РНКазы N3) РНКазы, аналогичные по свойствам. Авторы полагают, что РНКазы N3

является предшественником РНКазы №1. Противоположные данные получены для РНКаз *Bac. subtilis*. Внеклеточная и внутриклеточная РНКазы этой бактерии различаются по биохимическим, физико-химическим и иммунологическим свойствам.

Далее Эгами и Накамура обращают особое внимание на тот факт, что внеклеточные РНКазы, как правило, специфичны к ФДЭ связям, соседствующим с гуанином и аденином. Такая субстратная специфичность внеклеточных РНКаз, по мнению японских исследователей, согласуется с их функцией деполимеризации высокополимерной РНК до уровня соединений, способных проникнуть в клетку, так как богатые гуанином полинуклеотиды обладают повышенной способностью к образованию агрегатов. Продукты гидролиза гуанил- или пурин-специфичных РНКаз, обедненные гуанином или вообще не содержащие последнего, утрачивают тенденцию к агрегированию и могут свободно диффундировать через клеточную мембрану.

Приводя эти интересные данные в пользу "пищеварительной" функции внеклеточных РНКаз, авторы тем не менее считают, что эта функция указанных ферментов не является единственной.

Барнард отмечает, что у микроорганизмов не всегда имеется четкое различие между внеклеточными и внутриклеточными ферментами. Так, РНКазы *E. coli* согласно ранним исследованиям, считались ферментом, прочно связанным с рибосомами. Впоследствии этот фермент обнаружили в свободном состоянии в полости между клеточной стенкой и мембраной. Интересно, что разные штаммы *E. coli*, не имеющие внеклеточных нуклеаз, содержат РНКазы, ДНКазы, а также дециклизирующую фосфодиэстеразу, 5'-нуклеотидазу и щелочную фосфатазу в периплазме. Полимерные субстраты, каковыми являются полинуклеотиды, не способные проникать через цитоплазматическую мембрану, перевариваются этими ферментами до соединений, способных диффундировать через мембрану и проникающих, таким образом, во внутрь клетки. При ослаблении барьера проницаемости клеточной стенки эти ферменты появляются во внешней среде. Особенно это касается ДНКаз и щелочной фосфатазы, которые локализуются у поверхности клеточной стенки, и, по-видимому, слабо связаны с цитоплазматической мембраной. Барнард считает, что ферменты, не связанные с внутриклеточными структурами и локализованные непосредственно под клеточной стенкой, подобно внеклеточным ферментам, выполняют пищеварительные функции. Истин-

но внеклеточными нуклеазами, по мнению автора, можно считать те ферменты, которые появляются в среде *de novo* в ответ на присутствие соответствующего индуктора. Данные по индукции нуклеодеполимераз имеются в литературе. Так, при изучении закономерностей синтеза внеклеточной РНКазы *Ust. sphaerogena* было показано, что фермент обнаруживается только на питательных средах, содержащих РНК в качестве единственного источника углерода [234]. Резкое увеличение РНКазной активности у *Act. aureover-ticilatus* было обнаружено Татарской с соавт. [120] при добавлении в синтетическую питательную среду небольших количеств РНК.

Несколько иные данные получены сотрудниками Казанского университета [5 и др.]. В экспериментах по индукции РНКазы у *Vac. amylolytica* 9a путем добавления в питательную среду РНК не наблюдалось повышения РНКазной активности в питательной среде. Подобные результаты получили японские исследователи [497]. При добавлении в питательную среду, на которой выращивалась *Neurospora crassa*, РНК, аденина или неорганического фосфата не было замечено индукции внеклеточной РНКазы.

Мы полагаем, что к числу внеклеточных ферментов и, в частности, внеклеточных нуклеаз, следует отнести те ферменты, которые выполняют определенные функции вне клетки. Это могут быть ферменты, которые выделяются в питательную среду постоянно или в ответ на присутствие специфических индукторов. К внеклеточным следует отнести и те ферменты, которые локализованы в периплазматическом пространстве, если катализируемые ими реакции способствуют проникновению питательного материала окружающей среды в клетку, либо приводят к защите клетки от проникновения чужеродного генетического материала.

В заключение следует отметить, что вопрос о физиологической роли внеклеточных нуклеодеполимераз остается слабо изученным. Дополнительного экспериментального подтверждения требует положение об их участии в процессах питания микробной клетки, в формировании нуклеотидного пула. Совершенно невыясненными остаются другие возможные функции этих ферментов.

3. Несекретируемые нуклеодеполимеразы бактерий

В настоящее время относительно подробно изучены нуклеодеполимеразы *E. coli*. Бактерии этого вида, как и другие виды сем. *Enterobacteriaceae* (исключение составляют, как уже указывалось, представители рода *Serratia*), не способны секретировать нуклеодеполимеразы. Самые разнообразные по биохимическим, физико-химическим и, естественно, функциональным свойствам ферменты *E. coli* локализованы в периплазме, цитоплазме или связаны с определенными клеточными структурами. Как говорилось выше, нуклеазы и родственные им ферменты (фосфатазы, нуклеотидазы и др.), локализованные между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной, по-видимому, участвуют в процессах питания бактерий и в этом смысле могут рассматриваться как внеклеточные нуклеазы.

В литературе имеются сведения о наличии у *E. coli* девяти ДНК-деполимераз и шести рибонуклеаз (см. табл. 3). Подробные данные о каталитических свойствах нуклеаз *E. coli* и других бактерий приводятся в четвертой главе. Здесь мы коротко остановимся на вопросах, касающихся их биологических функций.

Эндонуклеаза I — фермент, который локализован непосредственно под клеточной стенкой и частично в цитоплазме, отличается от других микробных ДНКаз — эндонуклеаз своей способностью связываться с тРНК, приобретая при этом "nicking" активность [327, 328, 235 и др.]. Аналогичная ДНКаза обнаружена в клетках *Pr. mirabilis* [236, 237]. Предполагается, что ферменты такого типа могут участвовать в репликации ДНК. Именно их способность производить единичные разрывы ДНК наводит на эту мысль. Кроме того, имеются экспериментальные данные о повышении активности эндонуклеазы I в период активного роста бактерий и синтеза ДНК и резком снижении активности этого фермента в стационарной фазе роста [325].

Сравнительно недавно у *E. coli* обнаружена ДНКаза, особенностью которой является абсолютная потребность в АТФ [400, 158, 159, 238, 239 и др.] АТФ-зависимая экзонуклеаза преимущественно расщепляет нативную ДНК.

На основании изучения ряда мутантов, дефектных по признаку рекомбинации, и их ревертантов сделано заключение, что АТФ-зависимые ДНКазы принимают участие в процессах генетической рекомбинации. Мутанты *E. coli*, несущие *rec B* и *rec C* мутации, утрачивают этот фермент. Ревертанты одновременно с восстановлением способности к рекомбинации проявляют активность АТФ-зависимой ДНКазы [238, 564 и др.]. АТФ-зависимая ДНКаза обнаружена также у *Micr. lysodeikticus*, *Micobacterium smegmatis*, *Diplococcus pneumoniae*, *Neomophylus influenzae*, *Bac. subtilis*, [507, 271, 272, 138, 139, 542-548, 526, 527, 228, 229, 468, 188, 398 и др.].

Пехов (1970) в обзорной статье, посвященной вопросу генетической рекомбинации [99] указывает, что имеются данные об общности механизмов рекомбинации и восстановления повреждений ДНК. Как рекомбинация, так и репарация связаны с разрывами ДНК и последующим восстановительным синтезом нуклеотидных цепей.

На рис. 2 и 3 приводятся гипотетические схемы моделей рекомбинации и репарации повреждений ДНК. В обоих случаях предусматривается участие в этих процессах ДНКаз эндо- и экзонуклеолитического типа. К ферментам, участвующим в начальных этапах репарации повреждений ДНК у *E. coli*, по-видимому, относятся эндонуклеаза II, специфически гидролизующая алкилированные ДНК

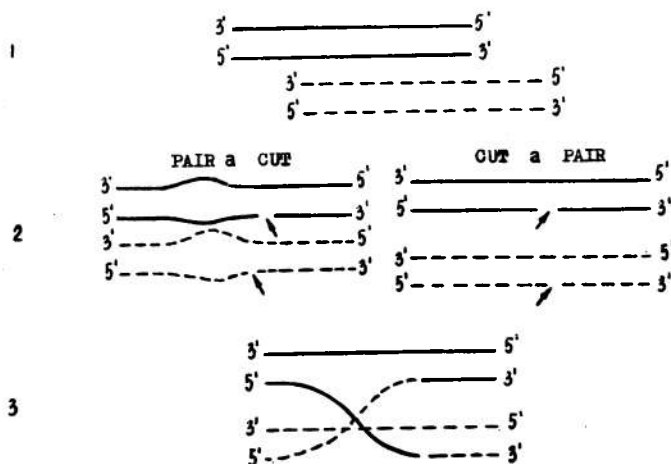


Рис. 2.

Модели возможных механизмов рекомбинации. Стрелками показаны места эндонуклеолитической атаки ДНК [204].

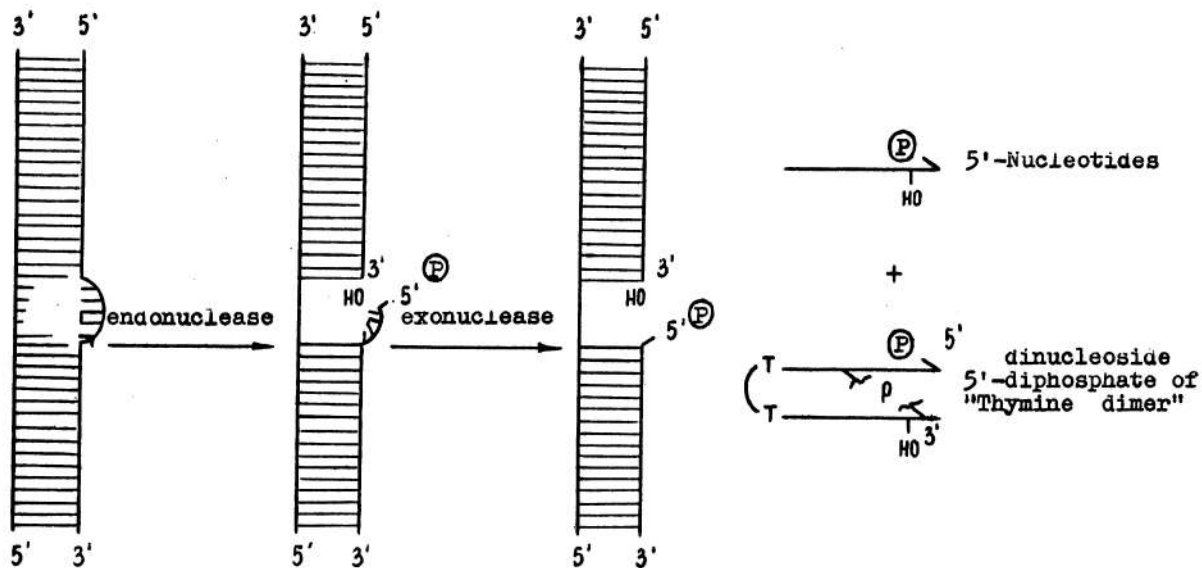


Рис. 3.

Начальные этапы энзиматической репарации УФ-облученной ДНК [222].

[224 - 227] и ДНКазы - экзонуклеазы, ассоциированные с ДНК-полимеразой *E. coli*. Один из этих ферментов - экзонуклеаза II, гидролизующий ДНК в направлении $3' \longrightarrow 5'$, вероятно, осуществляет удаление неспарившихся нуклеотидов при рекомбинации [179], второй фермент, атакующий ДНК в противоположном направлении ($5' \longrightarrow 3'$), обнаруженный сравнительно недавно [306, 198] и обозначенный как экзонуклеаза UI, ответственен за удаление фрагментов ДНК, образованных при облучении ультрафиолетом [298, 287]. $5' \longrightarrow 3'$ - экзонуклеаза *E. coli* предпочитительно гидролизует двуспиральные ДНК, активируется во время активного синтеза ДНК [298, 300]. Эти факты свидетельствуют в пользу участия данного фермента в процессах синтеза ДНК. У *Misc. lysodeikticus* также обнаружены две экзонуклеазы, ассоциированные с ДНК-полимеразой. Предполагается участие этих ферментов в процессах репликации ДНК [257, 258, 363 - 365]. Многочисленные данные об участии ДНКаз в репаративном синтезе ДНК получены относительно УФ-специфичных ДНКаз *Misc. lysodeikticus* [244, 184, 455, 351]. Из клеток этого микроорганизма выделена эндонуклеаза, которая атакует исключительно облученные ультрафиолетом ДНК [463, 290, 184]. В опытах на разных бактериальных культурах показано, что добавление УФ-специфичной эндонуклеазы приводит к восстановлению повреждений ДНК, индуцированных ультрафиолетовым облучением и повышает устойчивость к ультрафиолету [493, 244, 458, 455]. Установлена высокая специфичность "УФ-чувствительных" ДНКаз именно к тиминовым димерам. Так, ДНК, модифицированные химическими мутагенами, не атакуются этим ферментом, хотя и содержат сходные изменения вторичной структуры [97, 45 и др.]. Недавно в экстрактах *Misc. luteus* обнаружена еще одна эндонуклеазная активность, специфичная к ДНК, облученной γ -лучами [454].

Интересная группа ДНКаз обнаружена у *E. coli* [359, 564 и др.] и у ряда патогенных бактерий - *Neomorphylus influenzae*, *Neomorphylus aegyptius*, *Neomorphylus genus*, *N. parainfluenzae*, *N. gallinaum*, *N. aphirophilus* и др. [469, 299, 207, 360, 518, 498, 499, 459 и др.]. Эти, так называемые ферменты рестрикции, обладают способностью выщеплять чужеродные немодифицированные фрагменты ДНК. Вместе с тем, имеются сведения о нукле-

азах, которые локализованы вблизи клеточной стенки или выделяются в среду и защищают микробную клетку от проникновения чужеродного генетического материала. Они либо полностью разрушают ДНК, либо снижают ее трансформирующую активность, обеспечивая тем самым сохранение генома реципиента в неизменном виде [476, 407 и др.]. С другой стороны, в литературе имеются указания на то, что ДНКазы участвуют в процессах генетической трансформации. Так, нуклеаза, обнаруженная в клетках только активных по трансформации мутантов *Bac. subtilis* и производящая единичные разрывы ДНК [355], стимулирует способность бактерий к трансформации.

Ферменты типа экзонуклеазы *E. coli*, обнаруженные также у *Bac. subtilis*, *Dipl. pneumoniae* и др., отличаются от других ДНКаз абсолютной потребностью в двуспиральных структурах и присутствием, наряду с экзонуклеазной, ФМЭазной активности. Предполагается участие этих экзонуклеаз в процессах синтеза ДНК [325].

Таким образом, ДНКазы, по-видимому, принимают участие во всех генетических процессах, механизм которых предусматривает предшествующий воссоединению разрыв цепи ДНК.

Т а б л и ц а 3

Нуклеополимеразы *E. coli*

Нуклеополимеразы	Данные по локализации удельной активности в клетке и предполагае- мых функциях	Литература
I	2	3

Дезоксирибонуклеазы

Эндонуклеаза I	Локализована в периплазме и цитоплазме, удельная активность - 70. Предполагается участие в синтезе ДНК	324 - 328, 147, 382 - 384, 283, 284 и др.
----------------	--	---

I	2	3
Эндонуклеаза II	Предполагается участие в репарации повреждений ДНК, индуцированных алкилирующими агентами	224 - 227
Эндонуклеазы RK и RV	Предполагается участие в процессах рестрикции	359
АТФ-зависимая ДНКаза	Предполагается участие в процессах рекомбинации	400, 238
Экзонуклеаза I	Удельная активность - II	283, 323, 329
Экзонуклеазы, ассоциированные с ДНК-полимеразой	Удельная активность - 2I; предполагается участие в репаративном синтезе ДНК и в процессах рекомбинации	283, 179, 306, 198, 298, 300, 287 и др.
Экзонуклеаза III	Удельная активность - I - 2; предполагается участие в синтезе ДНК	283, 433, 434, 325
Экзонуклеазы IU A и B	Удельная активность 83 и 2I соответственно	283
Р и б о н у к л е а з ы		
Рибонуклеаза I	Локализована в периплазме, связана с фосфолипидным слоем мембран и частично с рибосомами	382 - 385, 394, 397, 504, 134a
Рибонуклеаза II	Обнаружена в растворимой фракции экстрактов клеток; предполагается участие в расщеплении информационной РНК	474, 155, 2II, 346

I	2	3
Рибонуклеаза III	Локализована в 30S частицах рибосом	438, 439
Рибонуклеаза IV	Обнаружена в растворимой фракции бесклеточных экстрактов	475, 366
Рибонуклеаза V	Локализована в 30S и 50S частицах рибосом, предполагает участие в расщеплении информационной РНК	312, 313
РНКазы H	Не ассоциирована с рибосомами. Предполагается участие в процессах репликации ДНК, РНК-зависимого синтеза ДНК, в регуляции транскрипции	535, 261

Как указывалось, в клетках *E. coli* обнаружено несколько типов РНКаз.

РНКазы I первоначально была названа "латентной" РНКазой, поскольку фермент проявлял активность только после разрушения 30 S субъединиц рибосом [212, 473, 500]. Позднее было показано, что РНКазы I локализуется в наружном фосфолипидном слое мембран и после разрушения клеток связывается с рибосомами [382 - 385, 394, 397, 504, 134a.]. Предполагалось, что РНКазы I является неперменной составной частью рибосом и участвует в процессах синтеза белка. Однако позднее были получены мутанты, не содержащие РНКазы I. Процесс инактивации РНК в рибосомах таких мутантов протекает с той же скоростью, что и в содержащих РНКазу I клетках *E. coli*. Рибосомы мутантных клеток, не содержащих РНКазу I, сохраняют способность участвовать в синтезе белка в бесклеточной системе Ниренбер-

га [189 и др.]. Фермент представляет собой РНКазу-трансферазу циклизующую и, вероятно, выполняет те же функции, что и секретируемые нуклеазы, расщепляя РНК среды до проникаемого в клетку состояния.

РНКазы II, обнаруженная в надосадочной фракции бесклеточных экстрактов *E. coli* не способна связываться с рибосомами [474]. В отличие от РНКазы I, не обладает трансферазной активностью. Особенности фермента, имеющими, как нам кажется, большой биологический смысл, являются способность атаковать исключительно односпиральные РНК, а также ингибирование ферментативной активности односпиральной ДНК [395, 396, 155, 464, 211]. Предполагается, что РНКазы II ответственны за деградацию *in vivo* информационной РНК, участвует в созревании рибосомальной РНК и является регулятором роста клеток [346, 332, 520, 505, 241].

РНКазы III, связанная с 30 S субъединицами рибосом, отличается тем, что атакует только двуспиральные полирибонуклеотиды [438, 439]. РНКазы IV производит единичные разрывы РНК [475, 366]. РНКазы V — фермент, который прочно связан с рибосомами и проявляет активность только в условиях, обеспечивающих нормальную функцию рибосом. Предполагается, что именно РНКазы V ответственны за селективное расщепление информационной РНК в клетке [312, 313].

Сравнительно недавно открыта новая группа рибонуклеаз, так называемые гибридазы. Особенностью этих ферментов является их способность атаковать РНК в РНК-ДНК гибридах. Никакие другие нуклеиновые кислоты не атакуются РНКазой H. Такая узкая субстратная специфичность фермента имеет, по-видимому, большой биологический смысл. Данные о роли этих ферментов пока что носят чисто гипотетический характер, однако надо думать, что в ближайшее время будет показано их участие в процессах транскрипции, РНКаз-зависимого синтеза и репликации ДНК [535, 261, 553].

В целом, можно сказать, что РНКазы, которые не связаны с клеточными структурами и особенно те, которые локализованы в периплазматическом пространстве, участвуют в процессах питания и процессах регуляции активности ДНКаз, ингибируемых РНК, типа эндонуклеазы I. Ферменты, связанные с рибосомами, участвуют в специфических процессах превращения РНК, в процессах синтеза макромолекул белка [439, 492, 186, 205 и др.].

Как указывалось, в четвертой главе приводится подробная характеристика тех бактериальных ферментов, которые являются объектом постоянного внимания ряда исследователей. Здесь мы остановимся на работах, носящих эпизодический характер. Имеется несколько сообщений об интрацеллюлярной РНКазе *Bac. cereus*, максимальная активность которой обнаружена в конце логарифмической фазы роста клеток [515], о ДНКазах *Rhizobium trifolii* и *Rhizobium meliloti* с чрезвычайно низкой активностью, обнаруженной при разрушении клеток ультразвуком [295]. Саймановой и сотр. [107 - III] определена ДНКазная активность в экстрактах механически разрушенных клеток *Bac. amylozyma*, *Bac. intermedius*, *Bac. circulans*, *Bac. quercifolius*, *Bac. megaterium*, *Bac. virgatus*, *Bac. angulans*, *Bac. glutinosus*. Оптимальная активность ДНКаз проявляется при pH 6,8-7,6 в присутствии двухвалентных катионов.

Наличие нуклеополимеразной активности в клетках бактерий из сем. *Mycoplasmataceae* было показано Разиным с соавторами [425 и др.]. Максимум РНКазной активности обнаружен во фракции клеточных мембран, ДНКазная в растворимой фракции бесклеточных экстрактов, полученных после разрушения клеток осмотическим шоком. РНКазы и ДНКазы микоплазм активны при щелочных значениях pH в присутствии Mg^{2+} . ДНКазная активность ингибируется РНК.

Вейд и Робинсон [528] обследовали 200 штаммов бактерий на присутствие Mg^{2+} -независимых РНКаз. Такие РНКазы обнаружены у 170 штаммов.

Ямазаки с соавторами [560] провели обследование разных видов бактерий на присутствие в клетках АТФ-ингибируемой рибонуклеазы - фермента, впервые обнаруженного в клетках *Bac. amyloliquefaciens* [556]. Авторы обнаружили такой фермент только у некоторых видов рода *Bacillus* (*Bac. subtilis*, *Bac. amyloliquefaciens*, *Bac. cereus* var. *mycoides*, *Bac. thuringiensis*). АТФ-ингибируемые РНКазы были подразделены на два типа. Первый тип ферментов, обнаруженный в *Bac. subtilis* и родственного вида *Bac. amyloliquefaciens*, имеет оптимум pH 5,7, полностью ингибируется 5мМ ЭДТА. Второй тип ферментов, обнаруженный у других вышеперечисленных бактерий, имеет оптимум pH 6,8 и частично ингибируется 5мМ ЭДТА.

Предполагается участие АТФ-ингибируемой РНКазы в процессе спорообразования бактерий.

Ш. ПРЕПАРАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ НУКЛЕОДЕПОЛИМЕРАЗ БАКТЕРИЙ

І. Основные методы препаративного получения нуклеодеполимераз

Значительные успехи последнего десятилетия в препаративном получении большого числа высокоочищенных ферментов, в том числе нуклеодеполимераз, объясняются появлением новых материалов, удобных для фракционирования высокомолекулярных лабильных соединений, каковыми являются ферментные белки. В 1956 г. Петерсон и Собер [410] разработали новый тип ионообменника на целлюлозной основе, выгодно отличающийся от синтетических ионообменных смол более мягкой структурой. Целлюлозоиониты широко применяются для колоночной хроматографии ферментов. Следующим важным методическим достижением явилось получение Поратом и Флодином [412, 413] продукта взаимодействия раствора — декстрана с эпихлоргидрином — универсального геля, который выпускается под торговым названием "Сефадекс". Сефадексы разных марок нашли широкое применение для колоночной геле-фильтрации ферментов. Получены также ионообменные сефадексы, применяемые для хроматографии.

Использование новых материалов для фракционирования ферментных белков не исключает применения классических методов препаративной энзимологии. Обычно все эти методы используются в совокупности [57].

Общие сведения о подготовке сефадексов и ионообменников для хроматографии, о технике эксперимента, а также основные принципы применения этих материалов для фракционирования ферментных белков изложены в работах Петерсона и Собера [410], Пората [412], Николаева [92], Гиномана [49], Горяченковой [50], Давидовой и Рачинского [53, 54], Детермана [55], Диксона [56], Диксона и Уэба [57], Либинсона [86], Самсонова [113], Маркович и Петровой [88] и других.

Указанные методические приемы выделения и очистки различных ферментных белков используются также и для получения нуклеодеполимераз.

Препаративное получение нуклеодеполимераз бактерий сопряжено с целым рядом методических трудностей. Как видно из литературных и экспериментальных данных, приведенных в первой и второй главах, в культуральной среде и тем более в клетках бактерий содержится несколько ферментов, гидролизующих нуклеиновые кислоты и их производные. В силу того, что различные по каталитическим свойствам нуклеодеполимеразы, выделяемые из одной бактериальной культуры, часто бывают близки по своим физико-химическим параметрам, процедура выделения индивидуальных нуклеодеполимераз представляет собой многоступенчатый процесс, включающий самые разные способы очистки.

В зависимости от того, с какой целью предпринимается получение препарата того или иного фермента, производится более или менее тщательная его очистка.

Как указывает А.А.Баев [8], для ферментных препаратов, которые получают с целью использования в качестве аналитических инструментов, не столько важна абсолютная физическая гомогенность, сколько полная очистка их от интерферирующих активных веществ. Незначительные примеси балластных белков, не имеющих нуклеазной активности, в этом случае не влияют на ход биохимического анализа. В отдельных случаях применяются частично очищенные, обогащенные тем или иным ферментом фракции. Так, японские исследователи Огата и сотр. [401] для препаративного получения моонуклеотидов из РНК и рибополинуклеотидов предложили использовать непосредственно культуральную жидкость некоторых микроорганизмов после селективной инактивации фосфатаз без дополнительной очистки. Использование такого ферментного раствора для этих целей экономичней, чем высокоочищенных препаратов.

С другой стороны, если перед исследователем стоит задача изучения структуры ферментного белка и его активного центра, а также механизма гидролиза или механизма воздействия на фермент специфических факторов, необходима очистка фермента до состояния физической гомогенности. Хорошим показателем ее является

однородность при электрофорезе в полиакриламидном геле и при ультрацентрифугировании.

Выделение и очистка нуклеополимераз бактерий включают те же основные операции, что и других бактериальных ферментов:

а) Получение бесклеточных экстрактов после разрушения клеток лизосимом, осмотическим шоком или механическим путем с последующим центрифугированием для разделения активных и неактивных фракций экстрактов. Если выделяется внеклеточный фермент, культуральная жидкость предварительно отделяется от клеток с помощью центрифугирования. На первом этапе препаративного получения нуклеополимераз, как и всякого другого бактериального фермента, важно, чтобы культура находилась в той стадии роста, когда происходит максимальный синтез получаемой нуклеополимеразы, и культивировалась в условиях, оптимальных для синтеза фермента.

б) Фракционное осаждение белковой фракции сульфатом аммония. Важно иметь предварительные данные о том, при каких концентрациях сульфата аммония осаждается максимальное количество фермента и каково значение изоэлектрической точки получаемого белка. В некоторых случаях этой стадии предшествует обработка стрептомицином, протаминсульфатом и реже ацетоном или спиртом.

в) Диализ или обессоливание на колонках с сефадексами G-75 и G-100.

г) Фракционирование на колонках с ионообменниками. Важно иметь некоторые предварительные данные о способности ферментов связываться с анионитами или катионитами.

д) Гельфильтрация на колонках с сефадексами после предварительной концентрации ферментных растворов с помощью вакуумных испарителей, лиофильной сушки, дополнительного осаждения сульфатом аммония или на колонках с ионообменниками.

е) Инактивация интерферирующих ферментов с помощью нагревания, кислотной обработки, если очистке подвергается термостабильный или стабильный при кислых pH среды фермент или селективная инактивация интерферирующих ферментов специфическими реагентами. Так, японские исследователи [401] используют арсенат для ингибирования фосфатаз в культуральных жидкостях некоторых микробов. Нами в отдельных случаях используется се-

лестивное ингибирование ФДЭаз, ФМЭаз и ДНКаз с помощью ЭДТА, дающее возможность работать с Me^{2+} - независимыми РНКазми, избегая их многоступенчатой очистки.

В последнее время все большее распространение получает аффинная хроматография, когда в качестве сорбента используется специфический субстрат или ингибитор, соединенные с каким-либо твердым носителем [127]. Применительно к нуклеодеполимеразам следует отметить весьма эффективный метод субстратной очистки ДНКаз *E. coli* на колонках с ДНК, иммобилизованной в агарозе [374], метод получения РНКаз на колонках с иммобилизованными дезоксиполинуклеотидами и др. Аффинная хроматография используется также для очистки и изучения активного центра и механизма атаки стафилококковой нуклеазы, панкреатической и селезеночной ДНКаз и др. [194, 193, 210, 501, 535 и др.].

2. Получение нуклеодеполимераз некоторых сапрофитных бактерий

Несмотря на то, что целый ряд нуклеодеполимераз, обнаруженных в тканях животных, в клетках и культуральных средах актиномицетов и грибов, уже получается препаративно в промышленных масштабах и используется для различных аналитических и практических целей, потребности в этих биологически активных препаратах далеко не удовлетворены и возможности их использования не исчерпаны. Как было указано во введении и первой главе, по целому ряду причин (высокой активности, разнообразию свойств, возможности использования глубинных способов культивирования, безопасности и т.д.) сапрофитные бактерии являются одним из самых перспективных источников препаративного получения нуклеодеполимераз.

При выделении внеклеточных ферментов исследователь получает возможность избежать весьма сложную процедуру разрушения клеток. Кроме того, культуральная жидкость может быть получена сравнительно просто в больших количествах и содержит значительно меньше белков, чем экстракты клеток. Не случайно поэтому, что наиболее успешны в настоящее время работы по получению высокоочищенных и гомогенных препаратов внеклеточных

нуклеодеполимераз (работы группы Анфинсена по препаративному получению и изучению структуры и функции внеклеточной нуклеазы *Misc. ruogenes* [144, 145 и др.], исследования структуры и каталитических свойств внеклеточной щелочной РНКазы *Bac. subtilis* американскими и японскими авторами и др. [322, 253-256].

Остановимся более подробно на методике получения внеклеточных нуклеаз некоторых сапрофитных бактерий.

Препаративное получение и изучение некоторых
физико-химических свойств рибонуклеазы
Bac. subtilis.

Работы по очистке внеклеточной РНКазы *Bac. subtilis* Н проводятся японскими и американскими биохимиками.

В ранних [389] работах фермент из культуральной среды *Bac. subtilis* Н с помощью дробного осаждения сульфатом аммония был очищен в 45 раз (таблица 4).

Т а б л и ц а 4
Очистка РНКазы *Bac. subtilis*.

№ п/п	Ф р а к ц и и	Объем, мл	РНКазы, ед/мл	Общая актив- ность	Удель- ная актив- ность, ед/мг тиро- зина	Вы- ход, %
1	Культуральная среда	1900	10,5	20000	0,19	100
2	Надосадочная жид- кость после осажде- ния неактивных бел- ков при добавлении НСО ₄	2000	10,5	20000	0,052	100
3	Осадок при 0,57 насы- щения сульфатом аммо- ния	250	41,0	11000	0,17	52
4	Осадок при 0,15 насы- щения	250	16,0	4000	—	19
5	Осадок между 0,48 и 0,61 насыщения	2,5	850,0	2100	0,86	10

П р и м е ч а н и е . Активность определялась по Frisch-Nig-
gemeyer a. Reddi, 1957 см. [389].

В последующих работах японских авторов была предпринята тщательная очистка РНКазы *Bac. subtilis* на колонках с КМ-целлюлозой до хроматографически гомогенного состояния. РНК аза была очищена примерно в 400 раз и получена в кристаллическом виде. Изучен аминокислотный состав препарата (табл.5), уточненный несколько позже на физически гомогенных препаратах фермента [322].

Т а б л и ц а 5

Аминокислотный состав РНКазы

Bac. subtilis H

Аминокислотные остатки	Моль аминокислотного остатка /моль РНКазы	
	<i>Bac. subtilis</i>	Панкреатическая
Аспарагин	12,0	15
Треонин	7,5	10
Серин	7,5	15
Глутамат	5,8	12
Пролин	3,3	4
Глицин	8,1	3
Аланин	6,4	12
I/2 цистеин	0,0	8
Валин	3,3	9
Метионин	0,2	4
Изолейцин	6,0	3
Лейцин	6,0	2
Тирозин	5,1	6
Фенилаланин	3,0	3
Лизин	10,1	10
Гистидин	1,8	4
Аргинин	5,4	4
Триптофан	2,6	0
NH ₃	10,8	18
104,9		124

В отличие от панкреатической РНКазы, белок РНКазы *Bac. subtilis* не содержит цистеина и имеет триптофан. Коли-

чественное соотношение отдельных аминокислот также различно у этих РНКаз.

Американские исследователи [445] добились очистки РНКазы *Bac. subtilis* в 4200 раз путем дробного фракционирования сульфатом аммония, хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой и трехкратной хроматографии на колонке с КМ-целлюлозой. Условия хроматографии приведены в таблице 6.

Т а б л и ц а 6

Хроматография раствора РНКазы *Bac. subtilis*.

Целлюлоз- ный сорбент	Размер колон- ки(см)	Начальный раствор буфера	Конечный раствор буфера	Градиент- ный объем элюции (мл)	Скорость элюции (мл/час)
ДЭАЭ, 100Г	4,4x55	0,01М АмБ, рН 8,6	0,05М АмБ, рН 8,6		100
КМ(І), 95Г	4,4x55	0,001М Амац, рН 4,35	(А) 0,1М Амац, рН 4,35 (Б) 0,1М АмБ, рН 7,6	2700	36
КМ(ІІ), 30Г	2,2x75	0,005М Амац, рН 4,35	(А) 0,05М Амац, рН 4,35 (Б) 0,2М Амац, рН 5,7	2250	32
КМ(ІІІ), 30Г	2,2x75	0,005М NaAc, рН 4,4	(А) 0,1М NaAc, рН 4,7 (Б) 0,2М NaAc, рН 5,7 с 0,1М NaCl	2250	32

П р и м е ч а н и е. Условные обозначения: АмБ - аммоний-бикарбонат, Амац - аммоний-ацетат, Ac - натрий-ацетат.

При фракционировании на колонке с КМ-целлюлозой обнаружено два пика РНКазной активности (А и В). Пик А не сорбировался на КМ-целлюлозе и был элюирован в первых фракциях уравновешивающим буфером. Пик В обнаружен во фракциях, которые элюируются с колонки после того, как через нее проходит 80% всего градиентного объема. Результаты очистки приведены в табл. 7.

Т а б л и ц а 7

Очистка РНКазы *Bac. subtilis* Н

Ф р а к ц и и	Общий белок (А ₂₈₀)	Общая актив- ность фермента ($\cdot 10^6$)	Удель- ная актив- ность	Выход (%)
Культуральная среда	460000	49	106	100
После удаления клеток	375000	56	150	114
Осадок при насыщении сульфатом аммония	91000	52	574	106
После диализа	44600	37	828	75
После хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе	12000	33	2740	66
После хроматографии на КМ-целлюлозе (I)				
пик А	10000	10	912	20
пик В	1000	17	16100	35
После хроматографии на КМ-целлюлозе (II)	122	13	105300	26
После хроматографии на КМ-целлюлозе (III)	12	5,4	446000	11

П р и м е ч а н и е . Активность определялась по продуктам гидролиза, растворимым в 3%-ной HClO_4 . За единицу принято повышение оптической плотности при λ 260 нм на 0,01.

При изучении свойств выяснилось, что РНКазы, обнаруженные в пике А и В, идентичны. Поэтому активные фракции обоих пиков объединялись и хранились в концентрации 1 мг/мл при 3°

в присутствии хлороформа без заметной потери активности в течение нескольких месяцев. Проверка препарата с помощью седиментации и электрофореза в полиакриламидном геле показала его физическую гомогенность [252]. Молекулярный вес составил 10700 ± 400 , коэффициент седиментации $S_{20,10}^0 = 1,55$.

Несколько позднее [322, 253] в этой же лаборатории РНКазы была получена из 300 л культуральной среды *Vac. subtilis* Н по упрощенной схеме очистки: осаждение неактивных белков при pH 2,0; фракционирование на колонке с фосфоцеллюлозой; фракционирование на колонке с КМ-целлюлозой. В результате был получен очищенный в 4000 раз препарат, электрофоретически гомогенный. Результаты приведены в табл. 8.

Т а б л и ц а 8

Препаративное получение и очистка РНКазы
Vac. subtilis Н из 300 л культуральной среды

Фракции	Объем (л)	Общая актив- ность (ед. $\cdot 10^6$)	Выход (%)	A ₂₈₀ (об- щее кол- во)	Удельная актив- ность ед./A ₂₈₀	Сте- пень очи- стки	Условия хро- матографии		
							кол-во адсор- бента (г.)	раз- мер ко- лон- ки (см)	ус- ло- вия элю- ции
Культу- ральная жидкость	262	430	100	$1,89 \times 10^6$	$2,3 \times 10^2$	I	-	-	-
Супернатант при pH 2 (концент- рирован- ная H_2SO_4 5,4 мл/л)	262	510	118	$1,81 \times 10^6$	$2,8 \times 10^2$	I,2	-	-	-
После хро- мато- графии на Ф-цел- люлозе	1,8	240	56	$1,32 \times 10^3$	$1,8 \times 10^5$	800	520	19x45	0,01M NH_4HCO_3 , pH 8,1, 200 л
После хро- мато- графии на КМ- целлюлозе	0,2	110	26	$1,16 \times 10^2$	$9,5 \times 10^5$	4000	28	2x60	0,05M NH_4HCO_3 , pH 8,3, 3 л

Из 1 л культуральной среды получено 0,21 мг ферментного препарата, который хранился в концентрации 250 мкг/мл в присутствии хлороформа при 5° в течение года.

В настоящее время изучается аминокислотная последовательность и структура активного центра внеклеточной щелочной РНКазы *Bac. subtilis* H и деривата этой культуры *Bac. amyloliquefaciens* H₂ [322, 253-256].

Очистка рибонуклеаз *Bac. pumilis* и *Bac. cereus*.

Рушицкий с соавторами [446] обнаружили РНКазную активность в культуральной жидкости *Bac. pumilis* и *Bac. cereus*. Авторы приводят детальное описание выделения и очистки РНКазы *Bac. pumilis*: культуральная жидкость (1 л) освобождалась от бактериальных клеток и обрабатывалась серной кислотой (10 мл конц. H₂SO₄ на 1 л). Через 17 часов инкубации раствора на холоду (при 4°С) pH доводили до 6,0 добавлением концентрированного NH₄OH, после чего фермент осаждали сульфатом аммония (0,9 насыщения). К суспензии добавляли 4 г целита и фильтровали через бумажный фильтр. Осадок растворяли в воде и диализовали против дистиллированной воды в течение 12 часов. Целит удаляли центрифугированием. Пробными опытами было обнаружено, что РНКазы прочно сорбируются на КМ-целлюлозе и не сорбируются на ДЭАЭ-целлюлозе. В связи с этим диализат (210 мл) уравнивали 0,02М Na-ацетатным буфером, pH 4,5 и помещали на колонку с КМ-целлюлозой. Объем колонки 2,2x75 см, 32 г КМ-целлюлозы уравнивали 0,02М Na-ацетатным буфером pH 4,6. Элюцию производили в градиенте концентрации и pH элюента, с помощью 9-камерного градиентного устройства. Каждая камера содержала по 500 мл следующих буферных растворов: I - смеси - тель - 0,02М Na-ацетат, pH 4,6; II - 0,05М Na-ацетат, pH 4,6; III - 0,1М Na-ацетат, pH 4,6; IV - 0,02М Na-ацетат, pH 5,7; V - 0,05М Na-ацетат, pH 5,7; VI - 0,1М Na-ацетат, pH 5,7; VII - 0,02М Na-фосфат, pH 7,0; VIII - 0,05М Na-фосфат, pH 7,0; IX - 0,1М Na-фосфат, pH 7,0.

Основная масса коричневого пигмента, присутствующего в диализате, проходит через колонку при посадке, тогда как энзим элюируется одним пиком после пропускания через колонку 4/5 градиентного объема. Фракции, содержащие РНКазную активность,

объединяли, диализовали и хранили в присутствии NH_4Cl при 4° . РНКазы очищены в 260 раз, выход фермента составил 94%.

Процедура выделения и очистки РНКазы *Vac. cereus* сходна с описанной выше для *Vac. pusillus*, с незначительным отличием: исключается стадия концентрации сульфатом аммония. РНКазы очищены в 630 раз, выход — 35%. Хранятся так же, как и РНКазы *Vac. pusillus*.

Результаты очистки суммированы в таблице 9.

Т а б л и ц а 9

Очистка РНКаз *Vac. pusillus* IFO-3028 и
Vac. cereus ATCC-10987

Ферменты	Общая актив- ность	Удельная активность, ед/А ₂₈₀					Степень очистки	Выход, %
		а	б	в	г	д		
РНКазы <i>Vac. pusillus</i>	97000	-	12	-	73	3134	260	94
РНКазы <i>Vac. cereus</i>	153000	4,2	10	15	-	2666	630	35

П р и м е ч а н и е.

1. а) бактериальная среда; б) освобождение от клеток; в) кислотная обработка; г) осаждение сульфатом аммония и диализ; д) колоночная хроматография и диализ.

2. Активность определена при pH 7,0 по продуктам гидролиза, растворимым в 3% HClO_4 . За единицу активности принято повышение А₂₆₀ на 0,01 (при инкубации в течение 15 мин. при 37° 2 мг РНК с 0,2 мл ферментного раствора).

Таким образом, из культуральных жидкостей двух споровых бактерий выделены РНКазы, свободные от интерферирующих ферментов. РНКазы *Vac. pusillus* и *Vac. cereus* имеют молекулярный вес 11000-12000 и 30000-35000 соответственно; элируются с колонки с сефадексом-G-75 острым пиком, что указывает на гомогенность ферментов по молекулярному весу.

Ферментные препараты на данной стадии очистки были предложены авторами в качестве аналитических инструментов для структурного изучения РНК.

Получение РНКазы *Vac. intermedius*.

Методика очистки РНКазы из культуральной жидкости *Vac. intermedius* 7Р [85] включает следующие операции:

Фракционное осаждение сульфатом аммония при pH 8,0 - 9,0 (0,4 - 0,9 насыщения) и диализ против дистиллированной воды для освобождения от сульфата аммония и против 0,005М Трис-НСI буфера, pH 8,5 (уравновешивающий буфер при последующей хроматографии).

Хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (2,5х60 см). ДЭАЭ-целлюлоза уравновешена 0,005М трис-НСI буфером pH 8,5. Элюция проводится ступенчато исходным буфером и 0,4М NaCl в исходном буфере. Скорость элюции 60 мл/час, фракции объемом 7 - 8 мл. Последовательно элюируются два пика РНКазы. Первый пик элюируется уравновешивающим буфером. Второй пик элюируется 0,4М NaCl вместе с основной массой белка. РНКазы первого пика, имеющая максимальную удельную активность, подвергалась дальнейшей очистке.

Хроматография на колонке с КМ-целлюлозой (2,5х45 см). КМ-целлюлоза уравновешена 0,01М ацетатно-аммиачным буфером, pH 5,0. Элюция производится при ступенчатом повышении концентрации NaCl от 0,01 до 0,30М. Скорость элюции 50 мл/час, объем фракций - 9 мл. Балластные белки элюируются двумя пиками при концентрации NaCl, равной 0,01М и 0,3М. РНКазы элюируется 0,3М раствором NaCl. На этой стадии РНКазы очищаются от интерферирующих ферментов, которые обнаруживаются в препарате РНКазы в незначительных количествах (см. табл.10).

Рехроматография на колонке с КМ-целлюлозой (1х15 см). Условия сорбции и элюции те же, что на предыдущей стадии очистки. Перед посадкой на колонку ферментный раствор диализуется для снижения ионной силы. Результаты очистки РНКазы *Vac. intermedius* приведены в таблице 8.

Таким образом, был получен ферментный препарат в состоянии, близком к физической гомогенности (однороден при электрофорезе в ПААГ). Молекулярный вес фермента, определенный с

Очистка РНКазы *Bac. intermedius* 7P

Стадии очистки	РНКаз- ная актив- ность сп. ед/мл	Удель- ная актив- ность на 1 мг белка	Сте- пень очи- стки	Выход, %	Содержание в препаратах РНКазы, %				
					РНК- аза кис- лая	Экзо- нукле- аза	ДНКазы	ФДЭазы	ФМЭазы
Получение культуральной жидкости, свободной от микробных клеток	2800	84	I	100	100	100	100	100	100
Фракционирование сульфатом аммония и диализ	24118	709	8	46	26	39	29	30	34
Хроматография на колонке с ДЭАЭ- целлюлозой I пик	12978	14917	177	27	0	3	2	0	0,3
II пик	11600	414	5	11	20	28	13	22	19
Хроматография на колонке с КМ-целлюлозой (I пик)	7956	44200	525	15	0	0	0	0	0,1
Рехроматография на колонке с КМ-целлюлозой	8488	57351	681	13	0	0	0	0	0

Примечание. Активность определена по продуктам гидролиза, растворимым в 4% HClO_4 с 0,1% уранилацетата. За единицу активности принято количество фермента, которое вызывает повышение оптического поглощения (ΔA_{260}) на одну единицу шкалы спектрофотометра за час инкубации.

Очистка нуклеазы *Ser. marcescens* Вu-2II ATCC-9986 [83]

Стадии очистки	Нуклеазная актив- ность, (сп. ед.) в мл, по действию на:		Удельная активность на 1 мг белка	Степень очистки	Выход, %	Содержание в препара- тах нуклеазы, %	
	ДНК	РНК				ФДЭаза	ФМЭаза
Получение культуральной жидкости, свободной от микробных клеток	72I	728	629	I	100	100	100
Фракционирование суль- фатом аммония	220I6	22660	3989	6	76	60	54
Гель-фильтрация на ко- лонке с сефадексом G-75	5000	5500	35964	57	50	2,8	I
Хроматография на колон- ке с ДЭАЭ-целлюлозой	4290	483I	325773	5I8	36	0,4	0
Концентрация на колонке с ДЭАЭ-сефадексом A-25	25975	30559	365808	58I	23	0,15	0
Повторная гель-фильтра- ция на колонке с сефа- дексом G-75 и концент- рация в вакууме	37238	4II40	979726	1557	16	0	0

П р и м е ч а н и е. ДНКазная и РНКазная активности определены по продуктам гидролиза, раство-
римым в 2%-ной HClO_4 (КРП). За единицу активности принято количество фер-
мента, образующее одну сп. единицу КРП за час инкубации. Удельная актив-
ность, степень очистки и выход фермента рассчитаны по средним значениям
ДНКазной и РНКазной активности.

помощью гельфильтрации на колонке с сефадексом, составляет 10000 - 11000, изоэлектрическая точка - 8,6. Фермент относительно стабилен при кислых значениях pH.

Получение нуклеазы *Ser. marcescens*.

Выше указывалось, что *Ser. marcescens* обладает чрезвычайно высокой нуклеазной активностью. В связи с этим работы по препаративному получению и изучению этого фермента проводятся в разных научных лабораториях [206, 380, 381, 73, 74, 77 - 79, 83 и др.] .

Методика, результаты выделения и очистки нуклеазы из культуральной жидкости *Ser. marcescens* ATCC-9986 (собственные данные) суммированы в табл. II.

Высокоочищенный препарат хранится при -5° в течение 2-х-3-х месяцев в присутствии меркаптоэтанола и глицерина с некоторой потерей активности, гомогенен хроматографически и имеет молекулярный вес (определен по гельфильтрации) около 30000. Нуклеаза свободна от примесей ФМЭаз и содержит незначительную примесь ФДЭазной активности.

Американские авторы [380] предложили следующую методику очистки нуклеазы из культуральной жидкости *Ser. marcescens*, включающую семь стадий обработки (табл. I2).

Т а б л и ц а I2
Очистка нуклеазы *Ser. marcescens* ATCC-274

№ п/п	Фракции	Объем (мл)	Общая актив- ность (ед.)	Общий белок (мг)	Удель- ная ак- тивность (ед/мг)	Выход (%)	Отноше- ние ак- тивно- сти на РНК/ДНК
1	Культуральная жидкость	1000	800000	4400	182	100	1,3
2	Осадок при вы- саливании суль- фатом аммония (40-80%)	24	480000	300	1590	60	1,2
3	После обессо- ливания на бюгеле Р-6	123	492000	208	2360	61	1,2

1	2	3	4	5	6	7	8
4	После фракционирования на амберлите IRC-50	305	381000	1,22	312000	48	1,3
5	После быстрой концентрации при 37°	12	225000	0,72	312000	29	1,2
6	После обессоливания на био-геле Р-6	40	228000	0,72	316000	29	1,1
7	После хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе	53	201000	0,42	475000	25	1,2

П р и м е ч а н и е. Активность определялась по продуктам гидролиза, растворимым в 2%-ной HClO_4 . За единицу активности принято количество энзима, которое повышает A_{260} на единицу за 20 мин. при 37°C.

Культуральная жидкость освобождалась от бактериальных клеток и осадка, выпавшего при 40% насыщения сульфатом аммония, которое затем доводили до 80%. Осадок, образовавшийся при 80% насыщения, собирался, растворялся в 24 мл 0,05М трис-HCl-буфера (рН 8,2) с 0,001М MgCl_2 и хранился при 4° без потери активности в течение нескольких месяцев. Эта фракция подвергалась обессоливанию на колонке с био-гелем Р-6 (размер колонки 2,5x45 см, 300 мл био-геля, уравновешенного 0,01М Na-фосфатным буфером, рН 6,8. Элюция производилась тем же буфером со скоростью 2 мл/мин. Фракции по 20 мл собирались с помощью коллектора). Активные фракции объединялись и подвергались хроматографии на колонке с амберлитом IRC-50 (колонка размером 5x12 см, 100 мл смолы, уравновешенной 0,01М Na-фосфатным буфером, рН 6,8; элюция производилась 0,1М NaCl в этом же буфере). На этой стадии происходит удаление 99% балластных белков. Активные фракции объединяли, концентрировали с помощью роторного вакуумного испарителя до 12 мл и обессоливали на колонке с био-гелем Р-6 (размер колонки 1,6x12 см, 70 мл геля, уравновешенного 0,01 М

Na-фосфатным буфером, pH 7,5). Обессоленные активные фракции объединялись и дополнительно очищались на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-50 (размер колонки 2,5x36 см, 100 мл сефадекса, уравновешенного 0,01M Na-фосфатным буфером, pH 7,5, элюция с помощью линейного градиента концентрации NaCl (0,0-0,5M) в 500 мл уравновешивающего буфера; скорость элюции 0,5 мл/мин., фракции по 10 мл). Фермент элюировался при концентрации NaCl 0,25M, степень очистки 2600 раз, выход - 25%. Ферментный препарат почти не содержит ФМЭ- и ФДЭазной активности, которые отделяются при хроматографии на амберлите. Высокоочищенный препарат нестабилен при хранении; теряет 50% активности за неделю (при 4°); хранение в запаянных ампулах обеспечивает некоторую стабилизацию. Препарат имеет сравнительно высокую удельную активность - 475000 на миллиграмм белка, тогда как удельная активность кристаллической панкреатической РНКазы, РНКазы T₁ и панкреатической ДНКазы 275000, 100000 и 50000ед. на миллиграмм ферментного белка соответственно.

Препараты нуклеазы из культуральной жидкости разных штаммов *Ser. marcescens*, полученные в нашей лаборатории и американскими авторами, имеют степень очистки примерно одного порядка, практически лишены интерферирующих активностей, имеют высокую удельную активность и могут использоваться для аналитических и практических целей.

Получение 3'-экзонуклеазы *Bac. subtilis*

Наличие экзонуклеазы, гидролизующей ДНК и РНК, в культуральной жидкости *Bac. subtilis* Марбургского штамма было показано Накаи с соавторами [375].

Методика выделения и очистки: из 200 л культуральной жидкости получена нуклеаза, частично очищенная от сопутствующих ферментов. Процедура очистки включает следующие операции: фракционное высаливание сульфатом аммония (0,26 - 0,66 насыщения) и диализ. Хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (размер колонки 0,7x11,2 см; уравновешена 0,01M ацетатным буфером pH 6,0; элюция в линейном градиенте от 0,01M до 0,34M ацетатного буфера, pH 6,0; элюционные сосуды содержат по 50 мл соответствующего буферного раствора; скорость элюции 6 мл/час при 15°C. фракции объемом по 2 мл). Во фракциях

определяли РНКазную активность при pH 5,0 и 9,3 и ДНКазную активность при pH 9,3. Как показано на рис. 4, нуклеазы разделяются на 2 пика. Первый двойной пик, элюирующийся при концентрации буфера 0,13 - 0,15M, содержит РНКазную и ДНКазную активность при pH 9,3; второй пик, элюирующийся при концентрации 0,22 - 0,26 M, содержит РНКазу, активную при pH 5,0. Подробно анализировался фермент, содержащий ДНКазную и РНКазную активность (I пик).

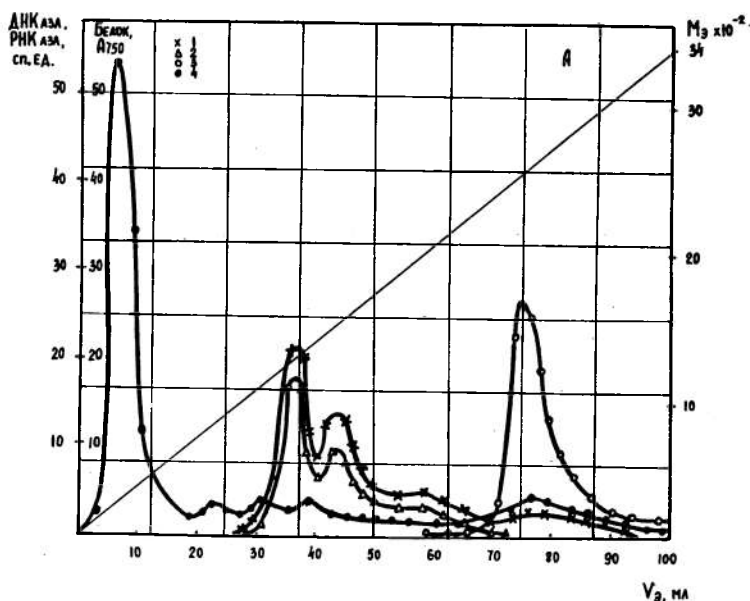


Рис. 4.

Хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой внеклеточных нуклеодеполимераз *Bac. subtilis* M I - Ca^{2+} -зависимая РНКаза, 2 - Ca^{2+} -зависимая ДНКаза, 3 - кислая РНКаза, 4 - белок [335].

Материал первого пика рехроматографировался дважды на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой. Рехроматография проводилась в тех же условиях, что и хроматография; несколько изменен градиент (0,07 - 0,25M). Удельная активность нуклеазы повысилась в 82 раза, выход составил 3,3%. Отношение РНКазной и ДНКазной ак-

Очистка нуклеазы *Bac. subtilis* М.

№ п/п	Фракции	Объем, мл ·10 ³	Активность ферментов								Содержание белка, мг		Удельная активн.: на мг белка		Выход, %		Степень очистки (сред- ние дан- ные)
			РНКаза (рН 5,0)		РНКаза (рН 9,3)		ДНКаза (рН 9,3)		ФДКаза (рН 7,0)								
			на мл.	Общ. кол- во ·10 ⁵	на мл.	Общ. кол- во ·10 ⁵	на мл.	Общ. кол- во ·10 ⁵	на мл.	Общ. кол- во ·10 ⁵	на мл.	Общ. кол- во ·10 ³	РНКаза (рН 9,3) ·10 ²	ДНКаза (рН 9,3) ·10 ²	РНК-ДНК- азы (рН 9,3)		
I	Культураль- ная жидкость	200	3I	62 28	56	25 50	69	138	I,3	256	0,2I	0,19	100	100	I,0		
II	Фильтрат при 0,26 насыще- ния сульфатом аммония	230	25	57 22	49	17 39	45	105	0,8	18I	0,27	0,2I	88	78	I,3		
III	Раствор фрак- ции, осажде- ной при 0,26- 0,66 насыще- ния сульфатом аммония	4	I380	55 950	38 825	33 2100	84	33,1	I32	0,29	0,24	68	66	I,4			
IV	Фильтрат диа- лизата фрак- ции III	5	980	49 680	34 500	25 1260	63 23,0	115	0,30	0,23	6I	49	I,4				
V	Первая хрома- тография на колонке с ДЭАЭ- целлюлозой	0,4	0	0 2400	9,5 2050	8,2 350	I,4 19,6	7,9	I,22	I,04	17,0	16,4	5,5				
		0,9	4400	39,5 535	4,8 210	I,9 680	6,1 18,1	16,3	0,29	0,11	8,6	3,8	-				
VI	Первая рехро- матогграфия на колонке с ДЭАЭ целлюлозой (I пик)	0,125	0	0 2900	3,6 2500	3,1 200	0,25 2,3	0,3	12,6	10,9	6,4	6,2	59				
VII	Вторая рехро- матогграфия на колонке с ДЭАЭ целлюлозой (I пик)	0,06	0	0 3160	1,90 2750	1,65 200	0,12 1,8	0,11	17,5	15,2	3,4	3,3	82				

П р и м е ч а н и е. I. Таблица приводится выборочно. Исключены данные, касающиеся очистки II пика. 2. Актив-
ность РНКаза и ДНКазы определялась по оптической плотности кислоторастворимой фракции
при 260 нм по действию на денатурированную ДНК и высокоочищенную РНК; ФДЭазная актив-
ность - по действию на модельный субстрат БНФФ. 3. Степень очистки рассчитана нами по
удельной активности.

Примечание оцифровщика: На 7 этапов очистки в таблице в оригинале 8 строк цифр, причём из контекста непонятно, к
какому из этапов относится лишняя строка. 5-6 строки располагаются ближе к V этапу, поэтому я оставил это так, условно
предположив, что имелись в виду I и II пики первой хроматографии.

тивности (при pH 9,3) на всех этапах очистки остается постоянным (I,I). Фермент содержит незначительную примесь неспецифической ФДЭазы (0,09% по сравнению с культуральной жидкостью), причем ФДЭаза имеет оптимум pH действия при 7,0.

Результаты очистки 3'-экзонуклеазы Марбургского штамма *Bac. subtilis* суммированы в таблице I3.

Аналогичный фермент выделен из культуральной среды *Bac. subtilis* SB I9 [30I, 302]. Процедура очистки включает концентрирование белка сульфатом аммония (600 г/л); осаждение ацетатом, повторное осаждение сульфатом аммония (22 г /90 мл); хроматографию на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (2,5xII см., уравновешена 0,0IM трис-малеатным буфером, pH 7,I элюция сначала производится 465 мл 0,075M буфера, затем в линейном градиенте: по 500 мл 0,075M и 0,2M трис-малеатного буфера, pH 7,I; скорость элюции 30 мл/час; фракции по 10 мл), рехроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе; фракционирование на сефадексе G - 200 (колонка 2x 85 см, 10г сефадекса G -200, уравновешенного 750 мл 0,025 M трис-малеатного буфера pH 7,I, элюция этим же буфером со скоростью 5 - 6 мл/час). Результаты очистки представлены в таблице I4. Фермент очищен в 70 раз, выход составил 10%. При хранении препарата при 0 или -20° около года активность уменьшается в 2 раза. Несмотря на то, что степень очистки нуклеазы сравнительно невелика, фермент содержит незначительную примесь интерферирующей фосфатазной активности, имеет высокую удельную активность, сравнительно стабилен при хранении и может использоваться для аналитических и практических целей.

Выше мы привели методические прописи выделения и очистки внеклеточных нуклеодеполимераз ряда бактерий. Не надо думать, что в настоящее время не разработаны методы препаративного получения внутриклеточных нуклеаз. Некоторые из них получены в высокоочищенном и даже физически и функционально гомогенном состоянии. Достаточно назвать экзонуклеазы, ассоциированные с ДНК-полимеразами *E. coli* и *Micr. lysodeikticus*, очищенные до гомогенного состояния; АТФ-зависимые ДНКазы ряда бактерий, которые, несмотря на высокую лабильность, очищены более чем в 1000 раз и др.

Способы получения разных нуклеаз в основном одинаковы (исключая этап разрушения клеток при выделении внутриклеточных

Очистка нуклеазы *Bac. subtilis* SB 19.

№ п/п	Фракции	Общая актив- ность,* ед. · 10 ⁻³	Удель- ная ак- тивность, ед./мг белка	Отношение активно- сти на денатуриро- ванной ДНК к актив- ности на:		
				натив- ная ДНК	РНК	фосфа- таза
I	Культуральная жидкость	938	211	-	-	-
II	Концентрация культуральной жидкости	800	330	4,5	1,0	2,4
III	Осаждение ацетоном	582	700	3,6	1,2	22,0
IV	Повторное оса- ждение сульфатом аммония	336	700	3,8	1,0	39,0
V	Хроматография на ДЭАЭ целлю- лозе					
	Пик I	132 (2)	3080	4,2	1,6	34,0
	Пик II	99 (2)	6600	3,8	2,1	390,0
VI	Хроматография на сефадексе G-200					
	Пик II	51 (2)	15000	4,0	2,0	3750,0

* Активность определялась с денатурированной ДНК в качестве субстрата. За единицу активности принято образование 10 мкмоль кислоторастворимых нуклеотидов за 30 мин. при 37°.

нуклеаз). Меняются лишь условия фракционирования и последовательность отдельных операций. Все это в каждом отдельном случае определяется свойствами исходного биологического материала, физико-химическими свойствами выделяемого фермента и, естественно, теми задачами, ради решения которых предпринимается получение данного фермента. Поэтому мы ограничились тем, что в настоящей главе описали наиболее типичные случаи очистки нуклеаз с различными физико-химическими свойствами.

IV. БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НУКЛЕОДЕПОЛИМЕРАЗ БАКТЕРИЙ

I. Анализ методов изучения биохимических свойств нуклеодеполимераз

Несмотря на чрезвычайную сложность изучения биохимических свойств ферментов, катализирующих реакции деполимеризации таких высокомолекулярных биополимеров, каковыми являются нуклеиновые кислоты, методическое решение этой задачи не получило должного обобщения и анализа. В связи с этим мы считали необходимым специально остановиться на данном вопросе.

В настоящем разделе приводятся различные методы изучения биохимических свойств нуклеодеполимераз. На основании собственного опыта экспериментальной работы и изучения литературы обсуждаются достоинства и ограничения отдельных методов. Дается сравнительный анализ методики изучения субстратной специфичности ДНКаз и РНКаз.

Изучение специфичности нуклеодеполимераз по
отношению ко вторичной структуре нуклеиновых
кислот

Изучение специфичности ДНКаз по отношению ко вторичной структуре ДНК производится путем сравнительного анализа динамики гидролиза нативной ДНК и ДНК, денатурированной нагреванием [202]. Следует учитывать, что, по данным некоторых исследователей, существует так называемый lag - период, когда на первых этапах реакции один из субстратов гидролизуетсся с меньшей скоростью, однако на последующих этапах реакции скорости гидролиза обоих субстратов выравниваются.

Для выяснения чувствительности РНКаз ко вторичной структуре субстрата изучают динамику гидролиза РНК в присутствии Mg^{2+} как агента, стабилизирующего вторичную структуру РНК, и в его отсутствие, либо используют в качестве субстрата ви-

русные РНК, имеющие двуспиральные молекулы [392, 120 и др.]

Исследование характера и механизма ферментативной атаки

Для установления типа действия нуклеополимераз применяется метод, предложенный Ласковским [316 - 318]. Метод основан на том, что при воздействии на нуклеиновые кислоты разных по характеру атаки нуклеаз происходит специфическое изменение физических свойств субстрата. Ферменты экзонуклеолитического типа действия производят последовательное отщепление мононуклеотидов или коротких олигонуклеотидов с конца цепи ДНК, что приводит к сравнительно быстрому образованию кислоторастворимых производных ДНК. Напротив, ферменты эндонуклеолитического типа действия расщепляют макромолекулу ДНК на крупные олигонуклеотиды, в результате чего при снижении вязкости ДНК вдвое образуется не более 5 - 10% кислоторастворимых нуклеотидов. В связи с этим параллельный учет динамики увеличения количества кислоторастворимых продуктов гидролиза и снижения вязкости растворов ДНК (см.рис.1) может дать представление о характере действия фермента на субстрат. Сопоставляя характер кривых с таковым для ДНКазы I ("двуударный" механизм атаки) и ДНКазы II ("одноударный" механизм атаки), можно установить механизм гидролиза двуспиральной ДНК исследуемым ферментом. На рис.5 показаны экспериментальные данные, полученные нами с ДНКазой *Vac. mesentericus*, по которым был установлен "двуударный" механизм атаки ДНК данным ферментом.

Другой метод, предложенный Берри и Кампбеллом [168], заключается в том, что параллельно учитывается нарастание двух фракций в гидролизате - растворимой в 4%-ной ТХУ и растворимой в 4%-ной ТХУ с 0,1% уранил-ацетата. В последнем реагенте растворяются в основном моно- - гексануклеотиды, в первом - более крупные фрагменты. В случае эндонуклеолитического гидролиза количество компонентов первой фракции нарастает значительно быстрее, чем второй. При экзонуклеолитическом гидролизе нарастание обеих фракций происходит одновременно (см.рис.6). Метод применим и при изучении типа действия РНКаз.

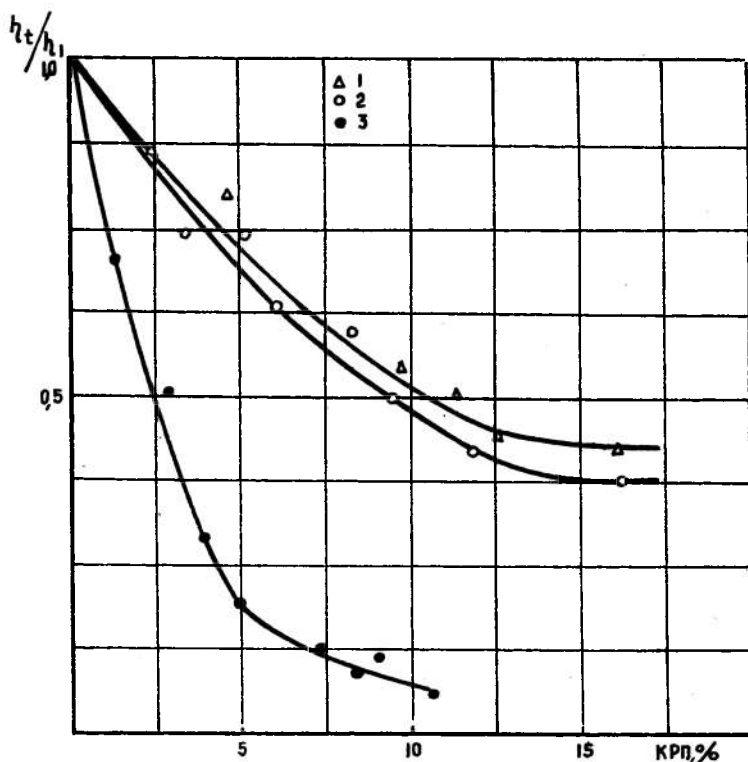


Рис.5

Изменение вязкости раствора ДНК η_t / η_1 относительно количества кислоторастворимых продуктов (КРП) гидролиза при воздействии ДНКазой *Vas. mesentericus* (1), ДНКазой I (2) и ДНКазой II (3).

Представление о характере гидролиза НК ферментом дает исследование изменения молекулярного веса гидролизата в процессе реакции по характеру хроматографического профиля при гельфильтрации на колонках с сефадексами [174]. И, наконец, наиболее точные выводы о характере действия ферментов можно сделать, имея в своем распоряжении нуклеиновые кислоты с замкнутой кольцевой структурой, которые атакуются только эндонуклеазами.

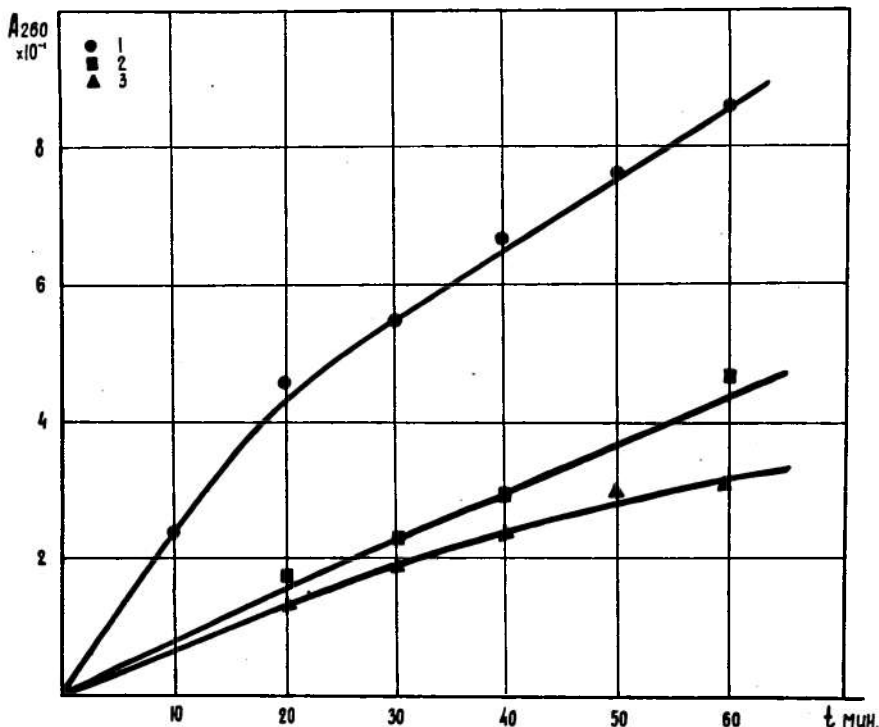


Рис.6

Накопление продуктов гидролиза, растворимых в 4% HClO_4 (1), в 4% HClO_4 с 0,125% уранилацетата (2) в 5% ТхУ с 0,1% уранилацетата (3), при воздействии на нативную ДНК нуклеазой

Количественная и качественная оценка продуктов ферментативного гидролиза нуклеиновых кислот

Ферментативный гидролизат нуклеиновых кислот представляет собой либо смесь мононуклеотидов, если в реакции участвовал фермент экзонуклеолитического типа действия, либо смесь олигонуклеотидов разной степени полимерности, если в реакции участвовала эндонуклеаза. Во втором случае анализ гидролизата начинается с фракционирования его на олигонуклеотиды, однородные по длине цепи.

Томлинсон и Тенер [506] предложили метод, сущность которого в том, что при разделении смеси олигонуклеотидов на анионообменнике в присутствии мочевины почти полностью исключается вторичное взаимодействие гетероциклов с ионообменником. Преобладающее взаимодействие, от которого зависит последующая элюция, — адсорбция за счет отрицательно заряженных фосфатных групп олигонуклеотидов. Чем больше зарядов, тем прочнее связь нуклеотида с материалом анионообменника и соответственно труднее элюция. Разделение, таким образом, происходит строго в зависимости от числа фосфатных групп. Этот метод используется в ряде лабораторий, в том числе и в нашей, для разделения продуктов ферментативного гидролиза НК. Следует учитывать, что 7М мочевины не полностью подавляет вторичное взаимодействие, особенно связывание олигорибонуклеотидов с ДЭАЭ-целлюлозой, поэтому для разделения ферментативных гидролизатов РНК лучше использовать ДЭАЭ-сефадекс. В наших экспериментах для фракционирования ферментативных гидролизаторов РНК и ДНК применяются колонки с ДЭАЭ-сефадексом А-25, средним.

В табл.15 приводятся величины концентраций, при которых элюируются разные фракции нуклеотидов.

Т а б л и ц а 15

Элюция олигонуклеотидов разной степени полимерности с колонки ДЭАЭ-сефадекса А-25 в системе 7М мочевины

Нуклеотиды	Концентрация NaCl (м)	Нуклеозид-дифосфаты	Концентрация NaCl (м)
Моно-	0,060	Моно-	0,065
ди-	0,110	ди-	0,130
три-	0,150	три-	0,170
тетра-	0,185	тетра-	0,200
пента-	0,215	пента-	0,220
гекса-	0,230	гекса-	0,240
гепта-	0,245	гепта-	0,255

По суммарным экстинкциям при 260 нм рассчитывают процентные соотношения каждой фракции в гидролизате. Для уточнения степени полимерности нуклеотидов производят количественное определение фосфора после дефосфорилирования фосфатазой *E. coli* и после полного гидролиза. В мононуклеотидной фракции отношение концевой фосфата ко всему фосфату равно 1, в динуклеотидной фракции - 1/2, в тринуклеотидной - 1/3 и т.д. Метод позволяет разделить сложные смеси олигонуклеотидов, содержащие до семи и более мономеров (рис. 7).

Перед последующим анализом фракции олигонуклеотидов подвергаютя обессоливанию.

Рушицким и Собоером [444] предложен метод обессоливания нуклеотидного материала с использованием колонок с ДЭАЭ-целлюлозой или ДЭАЭ-сефадексом. Сущность метода состоит в применении в качестве элюирующего агента карбоната аммония - легкорастворимой и летучей соли. Указанный метод нашел широкое применение в лабораторной практике.

Обессоленные нуклеотидные фракции, однородные по числу фосфатных групп и гетерогенные по составу оснований, подвергаются дальнейшему разделению на компоненты, однородные по нуклеотидному составу. Фракционирование проводится на колонках с ДЭАЭ-сефадексом при кислых значениях pH [87]. В наших экспериментах дальнейшему разделению подвергается только мононуклеотидная фракция. По количеству отдельных нуклеотидов в последней судят о специфичности фермента к природе оснований.

Смесь мононуклеотидов может быть разделена либо методом бумажной хроматографии и электрофореза, либо методом колоночной хроматографии. Основные принципы методов бумажной хроматографии нуклеотидов подробно изложены в нескольких методических статьях [352, 126, 35, 67]. Нами применяется метод бумажной одномерной и двумерной хроматографии в следующих системах растворителей:

1) бутанол-этанол-1М ацетатноаммиачный буфер, pH 3,7 (10:40:20 по объему) [125];

2) этанол-1М ацетатноаммиачный буфер, pH 7,5 (70 : 30) [408];

3) насыщенный сульфат аммония - 0,1М цитратный буфер, pH 6,3, - изопропанол (80:18:2) [352];

4) изомаслянная кислота - $0,5N \text{ NH}_4\text{OH}$ (10:6), pH 3,6-3,7 [37].

5) изопропанол - концентрированный аммиак - вода (7:1:2), [427] .

Величины R_f оснований, нуклеозидов и мононуклеотидов приведены в таблице 16.

Опыт экспериментальной работы показывает, что дезоксирибонуклеотиды наиболее четко фракционируются в системе растворителей, предложенной Феликсом с соавторами [218] при двумерной хроматографии, в I направлении - в растворителе 2 и во II направлении - в растворителе 3. Рибонуклеотиды хорошо фракционируются при использовании последовательно следующих систем растворителей: I или 2 и 4.

Идентификация мононуклеотидов после хроматографического разделения мононуклеотидных фракций гидролизата или суммарной хроматографии его производится по специфическим спектрам поглощения элюатов из соответствующих пятен [41] и по положению на хроматограмме относительно свидетелей.

Удобный и сравнительно несложный метод предложен Блатт - нером и Эриксоном (1960) для разделения сложной смеси мононуклеотидов [176] . Смесь 5'-мононуклеотидов разделяется на колонке $0,8 \times 40$ см, заполненной дауэксом - $50 \times 4 - 200 - 400$ меш. Элюцию нуклеотидов проводят $0,1M$ аммиачно-муравьинокислым буфером pH 3,2.

Для разделения смеси 3'-мононуклеотидов применяют колонку $0,8 \times 85$ см, заполненную той же смолой. В качестве элюирующего агента используют $0,25 M$ аммиачно-муравьинокислый буфер, pH 4,1.

Порядок элюции разных нуклеотидов приведен на рисунке 8.

В настоящее время все большую популярность приобретает метод тонкослойной хроматографии нуклеотидов [423, 7 и др.] .

Для определения специфичности нуклеодеполимераз к основаниям изучается также суммарный нуклеотидный состав олигонуклеотидных фракций. Обессоленные олигонуклеотидные фракции ферментативного гидролизата после предварительного гидролиза до оснований разделяются на хроматографической бумаге [37, 60, 114] .

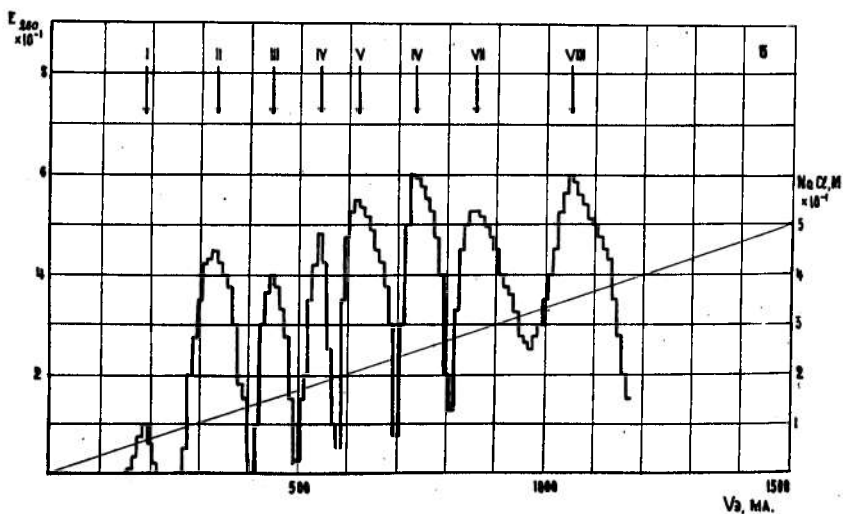


Рис. 7

Хроматография продуктов ферментативного (ДНКазы *Bac. mesentericus*) гидролиза ДНК на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-25. Размер колонки 1х20 см, элюция в градиенте концентрации NaCl (0,0 - 0,3M) в 7 М мочеvine, pH 7,5. Фракции I - УП соответствуют моно - гепта-нуклеотидам.

Т а б л и ц а 16

Величины R_F оснований, нуклеозидов и нуклеотидов при хроматографии на бумаге в разных системах растворителей

Наименование соединений	Р а с т в о р и т е л и:				
	I	2	3	4	5
Аденин	0,70	-	0,18	-	-
Урацил	0,72	-	-	-	-
Гуанин	0,50	-	0,22	-	-
Тимин	0,78	-	0,43	-	-
Цитозин	0,62	-	0,70	-	-
Д-аденозин	0,72	0,52	0,14	-	-
Д-уридин	0,81	-	0,60	-	-
Д-тимидин	0,85	0,71	0,40	-	-
Цитидин	0,63	0,58	0,67	-	-
Гуанозин	0,54	0,50	0,35	-	-
5'-д-АМФ	0,44	0,25	0,30	0,64	-
5'-д-ГМФ	0,30	0,23	0,41	0,36	-
5'-д-ЦМФ	0,40	0,28	0,68	0,48	-
5'-д-ТМФ	0,52	0,44	0,54	0,57	-
5'-УМФ	0,39	-	0,71	0,42	-
5'-ГМФ	0,26	-	0,50	-	-
3'-(2')-ГМФ	0,32	-	0,40-0,51	0,48	0,06
2',3'-ГМФ					0,25
3'-(2')-ЦМФ	0,39	-	0,77	0,59	0,10
2',3'-ЦМФ					0,32
5'-АМФ	0,34	-	0,35	-	-
3'-(2')-АМФ	0,37	-	0,18-0,27	0,71	0,11
2',3'-АМФ					0,48
3'-(2')-УМФ					0,14
2',3'-УМФ					0,39

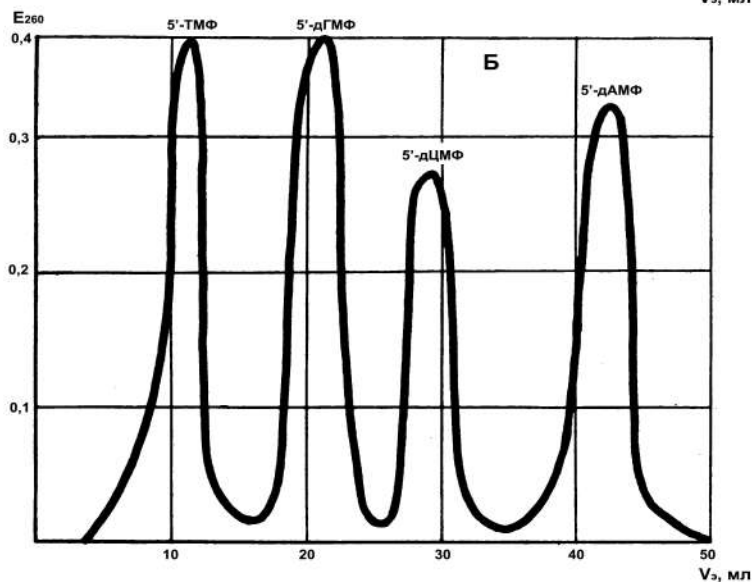
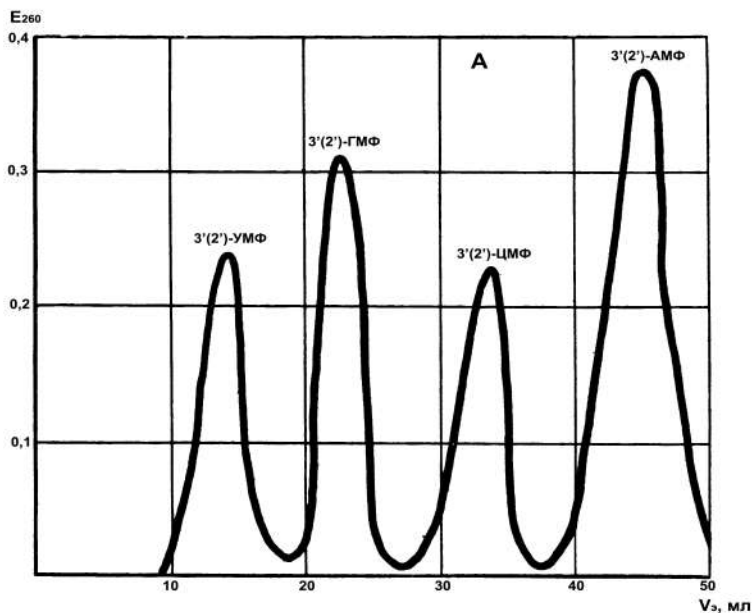
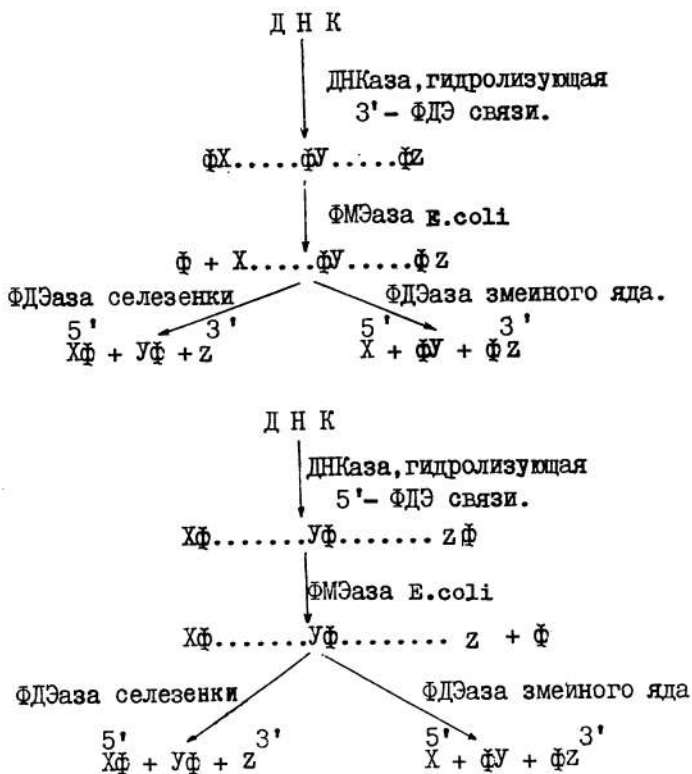


Рис. 8.

Фракционирование рибонуклеотидов (А) и дезоксирибонуклеотидов (Б) на колонке с Дауэкс-50х4 (200-400 меш.).

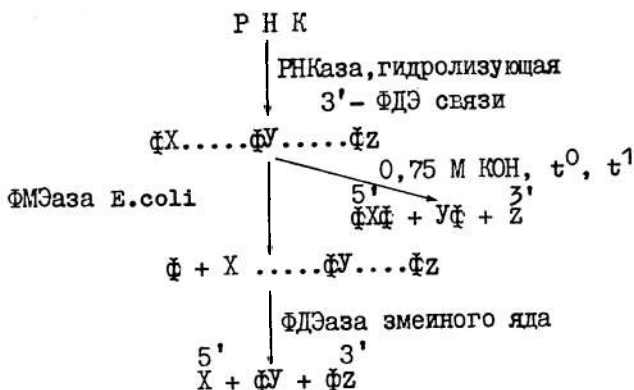
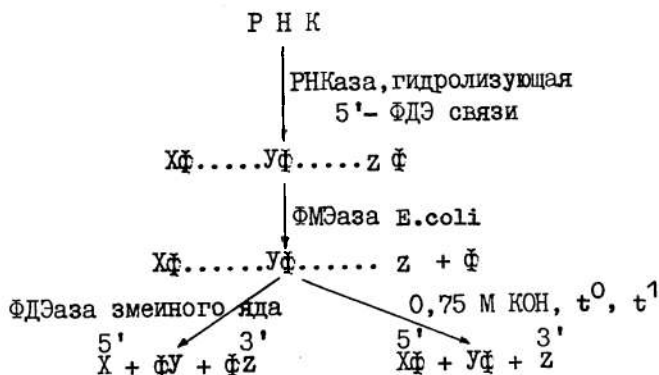
При изучении субстратной специфичности эндонуклеаз возникает необходимость анализа концевых нуклеотидов в олигонуклеотидных фракциях гидролизата, поскольку мононуклеотидная фракция, получаемая в небольших количествах, не всегда может быть идентифицирована. Последовательно обрабатывая гидролизат специфическими ФМЭазами и ФДЭазами, можно идентифицировать нуклеотиды, расположенные на фосфорилированном и на гидроксильном концах олигонуклеотидов.

С гидролизатами ДНК эксперимент проводится согласно следующим схемам:



После проведения указанных на схемах операций ферментат подвергают разделению на хроматографической бумаге (двумерная хроматография в системах растворителей II и III) и концевые нуклеотиды идентифицируют по нуклеозидной фракции.

С ферментативными гидролизатами РНК эксперимент проводится по следующим схемам:



При анализе концевых нуклеотидов в ферментатах перед добавлением ФДЭаз необходимо тщательно инактивировать ФМЭазу *E. coli*. В связи с тем, что этот фермент отличается высокой термоста-

бильностью, его инактивация достигается при автоклавировании в течение 10 мин. при 1/2 атмосферы.

К оценке результатов анализа концевых нуклеотидов следует подходить крайне осторожно. Малейшие примеси эндонуклеазной активности в препаратах ФДЭаз и ФМЭаз могут внести существенную ошибку.

Определение специфичности нуклеодеполимераз по отношению к 3' - или 5' -фосфодиэфирным связям

Известно, что деполимеразы нуклеиновых кислот строго специфичны по отношению к положению фосфорного остатка, образующего эфирную связь. Определить природу разрываемой связи можно по положению концевого фосфата в нуклеотидах, образующихся при гидролизе нуклеиновых кислот. Для этого продукты ферментативного гидролиза инкубируются в присутствии 5'-нуклеотидазы яда змей и неспецифической фосфатазы *E. coli*. Не менее распространен способ идентификации положения концевого фосфата с помощью ФДЭазы змеиных ядов, атакующей 5'-олигонуклеотиды значительно быстрее 3'-олигонуклеотидов.

Анализ количества расщепленных в ДНК ФДЭ связей определенной химической природы

Потером [374] предложен метод количественного определения Пир-ф-Пур- или Пур-ф-Пир- связей ДНК, расщепленных ДНКазами типа панкреатической или селезеночной соответственно. Метод основан на том, что при воздействии на ферментативные гидролизаты ДНК реактивом Бертона (3%-ный дифениламин в 85%-ной муравьиной кислоте) за счет разрушения пуринов освобождается F_H в количестве, адекватном числу гидролизованных связей. Если ДНКаза атакует 3' - ФДЭ связи, то F_H освобождается в случае предсуществующих разрывов Пир-ф-Пур-связей; при атаке 5' -ФДЭ связей освобождение F_H происходит за счет предсуществующих разрывов Пур-ф-Пир-связей. Указанный метод является единственным известным в литературе прямым методом анализа количества гидролизованных ДНКазой ФДЭ-связей определенной химической природы. Мы используем этот метод для характеристики ДНКаз бактерий [82].

Для количественного определения расщепления ферментами Пир-ф-Пир- и Пур-ф-Пур-связей ДНК нами используется в качестве субстратов апуриновая и апиримидиновая ДНК [11, 12]. После гидролиза модифицированных ДНК в оптимальных условиях при длительной инкубации и избыточных концентрациях фермента, количество гидролизованых связей определяется по отношению фосфора конечного фосфата к общему фосфору.

В заключение следует отметить, что описанные эксперименты дают достаточно полную информацию о характере атаки, месте атаки и специфичности фермента по отношению ко вторичной структуре нуклеиновых кислот и к природе оснований, прилегающих к ФДЭ-связям, т.е. об основных каталитических свойствах нуклеаз.

2. Основные группы нуклеодеполимераз сапрофитных бактерий

Согласно основным принципам классификации нуклеодеполимераз, изложенным в первой главе, бактериальные ферменты классифицируются на три большие группы: ДНКазы, РНКазы и нуклеазы, имеющие ряд подгрупп. В настоящем разделе детально описываются нуклеодеполимеразы сапрофитных бактерий, причем материал расположен согласно указанному выше делению ферментов на группы и степени изученности отдельных нуклеодеполимераз.

А. Дезоксирибонуклеазы

Дезоксирибонуклеинат-5'-олигонуклеотидогидролазы
КФ 3.1.4.5

а) Эндонуклеаза I *Escherichia coli*

Фермент выделен из бесклеточных экстрактов *E. coli* и изучен группой исследователей, возглавляемой Леманом [327, 328]. Максимальная активность эндонуклеазы I проявляется при pH 8,0 в присутствии Mg^{2+} или Mn^{2+} . Фермент ингибируется небольшими количествами РНК, K_i равна $10^{-8}M$.

Сравнительное изучение механизма действия ферментов показало, что кинетика гидролиза ДНК эндонуклеазой I подобна кинетике гидролиза ДНК "кислыми" ДНКазами селезенки и ти-

муса животных. Механизм гидролиза ДНК "одноударный", эндонуклеолитический. Нативная ДНК гидролизуеться в 7 - 10 раз быстрее, чем денатурированная нагреванием. Продукты гидролиза имеют среднюю длину цепи 7 нуклеотидных единиц и содержат 5'-фосфомоноэфирные концевые группы. Строгой специфичности по отношению к природе оснований не наблюдается. Относительно устойчивыми оказались связи типа дфА - фН. В комплексе с тРНК эндонуклеаза I проявляет т.н. "nicking" - активность, т.е. производит единичные разрывы двуспиральных ДНК [167, 190, 488, 235].

б) Эндонуклеаза I *Proteus mirabilis*

Из гомогената клеток *Pr. mirabilis* выделена ДНКазы, сходная по основным ферментативным свойствам с эндонуклеазой I *E. coli* [215, 216]. Фермент имеет оптимум pH выше 10,0, активируется Mg^{2+} . Атакует одно- и двуспиральные высокомолекулярные ДНК с образованием кислоторастворимых продуктов гидролиза. Ингибирующее влияние оказывает Ca^{2+} , высокие концентрации NaCl, а также тРНК. При добавлении в инкубационную смесь тРНК наблюдается образование комплекса фермент - РНК. Каталитические свойства такого комплекса существенно отличаются от свойств свободного фермента, а именно: фермент приобретает способность производить единичные двуцепочечные разрывы ДНК, которым предшествуют одноцепочечные разрывы. ДНК разных типов (двуспиральная хромосомальная ДНК *Pr. mirabilis*, сверхспиральная двуцепочечная ДНК Col E, репликативная форма ДНК фага ϕ x-174) атакуются с образованием гомогенных фрагментов с коэффициентом седиментации 8S. Механизм изменения каталитических свойств ДНКазы под воздействием тРНК не изучен.

в) Внеклеточные дезоксирибонуклеазы споровых бактерий

В культуральных жидкостях ряда споровых бактерий (*Bac. quercifolius*, *Bac. amylozyma*, *Bac. mesentericus*, *Bac. subtilis* и др.) обнаружены ДНКазы, которые по основным свойствам сходны с эндонуклеазой I *E. coli* и *Pr. mirabilis*, а именно: атакуют нативную и денатурированную ДНК при щелочных значениях pH в присутствии Mg^{2+} или Mn^{2+} . Характер атаки эндонуклеолитический, скорость гидролиза нативной ДНК несколько больше ско-

рости гидролиза денатурированной. ДНКазы гидролизуют ДНК по 3'-ФДЭ связям с образованием небольшого количества 5'-моноклеотидов (0,5 - 2,5%) и 5'-олигонуклеотидов разной степени полимерности. В отличие от эндонуклеазы I механизм атаки двухспиральных ДНК у этих ферментов сходен с таковым у панкреатической ДНКазы [34, 112, 51, 52, 28, 123 - 125 и др.].

Остановимся несколько подробнее на свойствах ДНКаз *Bac. mesentericus* и *Bac. subtilis*, изученных нами [80, 123, 124].

Биохимические свойства ДНКазы

Bac. mesentericus

Максимальная активность ДНКазы *Bac. mesentericus* проявляется при pH 9,0 в трис-HCl и боратном буферном растворе, в присутствии Mg^{2+} или других Me^{2+} (Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) в концентрации, соответствующей молярному отношению Mg^{2+} к фосфору ДНК, равному 3:1. ЭДТА вызывает полное ингибирование фермента. Частичное ингибирование вызывает неорганический фосфат и нуклеозидмонофосфаты. Концентрация субстрата в реакционной смеси выше 2,0 - 3,5 мг/мл, несколько тормозит активность фермента.

ДНКазы *Bac. mesentericus* атакуют нативные и денатурированные ДНК с предпочтением, на ранних этапах реакции, к нативным структурам.

Согласно данным, приведенным на рис. 5, фермент обладает эндонуклеолитическим действием, двуударным механизмом атаки двухспиральной ДНК.

Результаты определения количества олигонуклеотидов разной степени полимерности и расчет распределения разрывов цепи ДНК приведены в таблице I7. Распределение разрывов не соответствует среднестатистическому [33].

Фермент атакует 3'-ФДЭ связи ДНК. Результаты определения нуклеотидного состава разных фракций ферментативного гидролизата ДНК представлены в таблице I8. По мере увеличения полимерности фракций отношение суммы аденина и тимина к сумме гуанина и цитозина в них уменьшается. На ранних стадиях гидролиза кислоторастворимые и концевые фракции гидролизата содержат аденина и тимина больше, чем гуанина и цитозина. Эти

Т а б л и ц а 17

Распределение УФ-поглощающего материала во фракциях, однородных по числу нуклеотидов, в гидролизате ДНК, полученном при помощи ДНКазы *Bac. mesentericus*

Фракции	A ₂₆₀ , %	Мольные доли нук- леотидов в %		Отношение I/II
		экспери- менталь- ные дан- ные (I)	теорети- ческие данные (II)	
Мононуклеотиды	4,0	4,00	4,00	1,00
Динуклеотиды	4,2	2,10	3,20	0,66
Тринуклеотиды	7,0	2,33	2,56	0,91
Тетрануклеотиды	11,0	2,75	2,05	1,35
Пентануклеотиды	16,2	3,24	1,64	2,00
Гексануклеотиды	14,1	2,35	1,31	1,80
Гептануклеотиды	21,1	3,01	1,05	2,87

Т а б л и ц а 18

Характеристика гидролизата ДНК, полученного при помощи ДНКазы *Bac. mesentericus*

Фракции гидроли- зата ДНК	Нуклеотидный состав, мкмоль - %				A+T Г+Ц
	Г	А	Ц	Т	
Мононуклеотиды	20,35	24,02	16,03	39,60	1,76
Динуклеотиды	27,00	25,30	24,50	23,20	0,94
Тринуклеотиды	30,10	20,60	27,30	22,00	0,74
Тетрануклеотиды	32,50	18,10	29,00	20,40	0,62
Пентануклеотиды	36,90	13,40	33,70	16,00	0,41
Гексануклеотиды	39,30	11,80	35,80	13,10	0,33
Гептануклеотиды	40,10	10,00	37,00	12,90	0,29
Кислотораствори- мые олигонуклео- тиды	2% 19,10	31,40	14,00	35,50	2,01
	8% 20,80	29,30	14,50	35,40	1,83
	26% 21,70	30,00	12,30	36,00	1,94
Концевые нуклео- тиды (КРП-6%)	5'- 22,10	27,00	19,10	31,80	1,42
	3'- 17,80	35,60	26,70	19,90	1,24

данные позволяют сделать заключение о предпочтительном гидролизе ферментом межнуклеотидных связей типа дФН-ФА и дФН-ФТ.

При глубоком гидролизе фермент расщепляет 20 - 23% всех 3'-ФДЭ связей ДНК, слабо гидролизует ее модифицированные производные - апуриновую и апиримидиновую ДНК (6,0-8,5%). ФДЭ связи типа Пир-Ф-Пур гидролизует на 4,5-5,0%.

Биохимические свойства ДНКазы

Bac. subtilis

Каталитические свойства ДНКазы *Bac. subtilis* аналогичны свойствам ДНКазы *Bac. mesentericus*: оптимум pH - 9,0, активаторы - Mg^{2+} и другие Me^{2+} , ингибиторы - ЭДТА, нуклеозидмо-нофосфаты, неорганический фосфат, высокие концентрации субстрата.

На ранних этапах реакции фермент быстрее гидролизует нативную ДНК, обладает эндонуклеолитическим характером и двуударным механизмом атаки двуспиральной ДНК. ДНКазы *Bac. subtilis*, как и ДНКазы *Bac. mesentericus*, гидролизует 3'-ФДЭ связи ДНК.

Т а б л и ц а 19

Распределение УФ-поглощающего материала во фракциях, однородных по числу нуклеотидов в гидролизате ДНК, полученном при помощи ДНКазы *Bac. subtilis*

Фракции	A ₂₆₀ , %	Мольные доли нуклеотидов в %		Отноше- ние I/II
		экспери- менталь- ные дан- ные (I)	теорети- ческие данные (II)	
Мононуклеотиды	3,0	3,0	4,90	0,61
Динуклеотиды	6,0	3,0	3,82	0,78
Тринуклеотиды	9,0	3,0	2,98	1,00
Тетрануклеотиды	12,0	3,0	2,32	1,29
Пентануклеотиды	16,0	3,2	1,81	1,77
Гексануклеотиды	13,0	2,1	1,41	1,49
Гепта-, окта- и более полимерные нуклеотиды	41,0	5,0	-	-

В таблице 19 приведены данные количественного содержания отдельных фракций гидролизата. Показано, что распределение разрывов цепи ДНК отклоняется от среднестатистического.

Характеристика разных фракций гидролизата приведена в таблице 20. По этим данным можно сделать заключение о предпочтении ДНКазой *Bac. subtilis* ФДЭ связей типа дФН-ФТ и дФН-ФА.

Т а б л и ц а 20

Характеристика гидролизата ДНК, полученного при помощи ДНКазы *Bac. subtilis*

Фракции гидролизата ДНК	Нуклеотидный состав, мкмоль - %				$\frac{A + T}{G + C}$
	Г	А	Ц	Т	
Мононуклеотиды	19,3	31,0	10,0	39,6	2,41
Динуклеотиды	21,4	27,0	17,6	34,0	1,04
Тринуклеотиды	28,0	22,6	24,3	25,1	0,92
Тетрануклеотиды	32,3	20,0	27,8	19,9	0,66
Пентануклеотиды	37,9	17,1	34,0	11,0	0,39
Олигонуклеотиды	39,4	17,3	33,7	9,6	0,37
Кислотораствори- мые олигонуклео- тиды	2% 12% 20%	22,5 20,9 20,4	37,6 34,6 28,5	11,5 16,3 18,5	28,4 28,2 32,6
Концевые нуклеотиды (КРП-7%)	5' - 3' -	21,7 24,0	27,8 25,7	12,3 20,3	38,2 30,0
					1,95 1,25

При глубоком гидролизе фермент расщепляет 24 - 30% ФДЭ связей ДНК, 5 - 6% ФДЭ связей апуриновой и апириимидиновой ДНК и 6 - 8% ФДЭ связей типа дФНр-ФПур.

Дезоксирибонуклеинат-5'-олигонуклеотидогидролазы,
ферменты рестрикции - КФ 3.1.4.X, (3.1.4.32)

Из разных штаммов *E. coli* выделены ДНКазы, которые способны "узнавать" чужеродную ДНК, немодифицированную соответствующими метилазами модификации, и расщеплять ее. Собствен-

ную ДНК и чужеродную ДНК, модифицированную в определенных местах, ферменты не атакуют. Ферменты рестрикции, изолированные из разных штаммов *E. coli*, отличаются по субстратной специфичности: они узнают разные последовательности ДНК. Кроме того, ДНКазы рестрикции различаются по тому, требуют ли они в качестве кофакторов S-аденозилметионин, АТФ и Mg^{2+} (рестриктазы, выделенные из клеток *E. coli* В- ДНКазы R·В, *E. coli* К- ДНКазы R·К, *E. coli*, лизогенизированной фагом РI - ДНКазы R·РI) или они нуждаются только в ионах Mg^{2+} (рестриктазы *E. coli*, несущей RТВI - ДНКазы RI, - RТVII- ДНКазы RII и рестриктазы разных видов рода гемофилюс).

Ферменты I типа имеют очень большой молекулярный вес ~ 200000 - 500000 и состоят из 2-х - 3-х субъединиц. Они менее специфичны, чем ферменты II типа: соединяются с ДНК в строго специфических местах, но расщепляют ее в других районах, причем не установлено, требуется ли наличие специфических последовательностей в местах реального разрыва. Ферменты II типа имеют сравнительно низкий молекулярный вес ~ 70000 - 100000 и более простое строение. Они отличаются высокой специфичностью: связываются с субстратом и расщепляют его в строго специфических местах.

Месельсон, Ян и др. [359, 566, 567, 171a] получили из бесклеточных экстрактов *E. coli* К ДНКазу, специфически гидролизующую немодифицированную метилазами ДНК фага λ С (ДНКазы R·К). Фермент проявляет максимальную активность при pH 7,5 - 8,0 в присутствии SAM, АТФ, Mg , и в качестве стабилизаторов - ЭДТА, желатины и меркаптоэтанол. SAM является аллостерическим активатором фермента. Он не может быть заменен 1-метионином, 5-тиометиладенозином, S-аденозил-dl-гомоцистеином или S-аденозилэтионином. АТФ может быть заменен ДАТФ, но не ГТФ, АДФ, АМФ, аденозином, пирофосфатом или фосфатом. Фермент способен расщеплять кольцевые ДНК фага λ С и вируса SV 40, что свидетельствует об эндонуклеолитическом характере атаки. Показано, что продукты гидролиза представляют собой двуспиральные фрагменты ДНК, которые могли образоваться в результате двуспиральных "одноударных" разрывов. Однако при изучении динамики процесса деградации кольцевой ДНК фага λ С было установлено,

что двухцепочным разрывам предшествуют одноцепочные, которые образуются на каждой из комплементарных цепей взаимозависимо. Так, гетеродуплексы, состоящие из одной модифицированной и второй немодифицированной цепи, не атакуются ферментом. По-видимому, соответствующие модификации хотя бы на одной из цепей ДНК предохраняют ее от расщепления рестриктазами. Молекулы ДНК из бактериофага λ под действием ДНКазы R-K превращаются во фрагменты с молекулярным весом $\sim 7 \cdot 10^6$, что составляет около 1/5 величины интактной хромосомы фага λ . С эндонуклеазой R-K ассоциирована АТФаза, которая активна только в присутствии немодифицированной ДНК и тех же кофакторов, которые требуются для эндонуклеолитической реакции ДНКазы. Продукты гидролиза представляют собой АДФ и Фн в эквимолярных количествах. Особенность этой реакции состоит в том, что гидролиз АТФ продолжается и после окончания гидролиза ДНК. В то время как молекула ДНК расщепляется только на несколько фрагментов, более 10^5 молекул АТФ гидролизуются на каждую молекулу немодифицированной ДНК фага λ .

Сравнительно недавно появилась работа Маррея с соавторами [373], в которой обсуждается весьма сложный вопрос о субстратной специфичности ДНКазы R-K. Авторы указывают, что хотя ДНК расщепляется не в том месте, которое узнается соответствующим ферментом модификации, тем не менее разрывы образуются в ближайшем соседстве с "узнанным" местом. Для того, чтобы ДНК расщепилась рестриктазой, достаточно одного "узнанного" немодифицированного места. Правда, в этом случае фермента требуется в 10 - 40 раз больше, чем для расщепления ДНК с двумя или более "узнанными" местами (recognition sites). После того, как молекула фермента "узнает" немодифицированную последовательность ДНК, она связывается в этом месте с субстратом, но прежде, чем произвести разрыв, двигается вдоль молекулы ДНК.

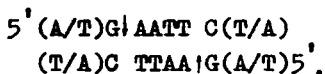
Из гомогенатов клеток другого штамма E.coliB была выделена рестриктаза (ДНКаза R·B), которая похожа по ряду свойств на ДНКазу R-K [343, 151, 442, 216, 217, 135]. Фермент требует тех же кофакторов, что ДНКаза R-K. ДНКаза R·B производит один двухцепочный разрыв немодифицированной репликативной

формы ДНК фага fd и SV 40 ДНК. Двухцепочечное расщепление ДНК происходит двухступенчато: двухцепочечным разрывам предшествуют одноцепочечные в специфических местах, симметрично на обеих комплементарных цепях. RF ДНК фага fd превращается в 2 фрагмента с 5-фосфомоноэфирными группами; ковалентно закрытая ДНК вируса SV 40 превращается в линейную форму длиной во всю молекулу.

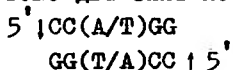
ДНКазы R-В катализируют гидролиз АТФ до АДФ и Фн. АТФ-аза, ассоциированная с ДНКазой RB, требует для проявления активности SAM и ДНК, содержащую соответствующие немодифицированные и рестриктируемые ДНКазой RB места. Подобно ДНКазе, АТФаза слабо ингибируется S-аденозилгомоцистеином. Гидролиз АТФ продолжается и после прекращения гидролиза ДНК.

Рестрикционный фермент E.coli P I (ДНКазы PI) сходен с описанными выше ДНКазой. Фермент требует тех же кофакторов для проявления активности, катализирует один двухцепочечный разрыв ДНК вируса SV 40 [135].

Из гомогенатов клеток E. coli, несущей RTFI и RTFII, выделены рестрикционные ферменты: ДНКазы RI и ДНКазы RII соответственно. Как указывалось выше, эти ферменты сходны с рестриктазами бактерий рода Neomorphilus: не нуждаются в АТФ и SAM; для проявления активности требуется только Mg^{2+} . Они расщепляют немодифицированную ДНК вируса SV 40 в нескольких специфических местах. В гидролизате ДНКазы RI идентифицировано 6 фрагментов, ДНКазы RII - 20 фрагментов. Разрывы, индуцируемые этими рестриктазами, располагаются ступенями и образуют "липкие" концы. Последовательности, узнаваемые ДНКазой RI:



ДНКазы RII узнает тоже два типа последовательностей:



[299, 261, 136, 373, 172, 177а и др.]. ДНКазы рестрикции в настоящее время широко используются для расшифровки структуры ДНК, а также в различного рода исследованиях по проблемам генной инженерии [207, 135, 136, 196, 299, 569, 118, 272 а и др.].

Дезоксирибонуклеинат-5'-олигонуклеотидо-
гидролазы, АТФ зависимые - КФ 3.1.4.X,
(3.1.4.33)

а) АТФ-зависимая ДНКазы *Micrococcus*
lysodeikticus

Из супернатантной фракции лизата клеток *Micrococcus lysodeikticus* выделена ДНКазы, гидролизующая ДНК только в присутствии АТФ [507, 271, 138, 139, 200].

ДНКазы активна при щелочных значениях pH (8,6 - 9,4) в присутствии Mg^{2+} . АТФ может быть заменен дАТФ. Другие нуклеозидтрифосфаты слабо активируют реакцию. Ингибитором является парагидрооксимеркурибензоат в концентрации 5×10^{-5} - $5 \times 10^{-4} M$. Фермент гидролизует линейные двуспиральные ДНК. Кольцевые двуспиральные ДНК фага $\phi \times 174$ полностью интакты. Односпиральные ДНК гидролизуются только при очень высоких концентрациях энзима. При полном гидролизе ДНК образуются разные по степени полимерности продукты гидролиза от моно- до пентануклеотидов в количестве 1,9; 5,1; 23,1; 21,6; 15,0; 33,3% соответственно. Короткие олигонуклеотиды отщепляются от конца цепи, причем было показано, что фермент производит разрывы полинуклеотидной цепи, следующие один за другим ("one-by-one"). Этот так называемый "процессивный" механизм гидролиза предполагает образование относительно стабильных фермент-субстратных комплексов. Последующие эксперименты показали, что фермент действительно образует стабильные комплексы с линейными двуспиральными ДНК. Было рассчитано, что 1,4 - 3,1 молекул фермента связывается с одной молекулой ДНК. По-видимому, фермент может присоединяться к макромолекулярной цепи ДНК с двух концов (в среднем 2 молекулы фермента на 1 молекулу субстрата). Для образования комплекса фермент-субстрат АТФ не требуется. Специфичность образования комплекса между ДНК и ферментом наблюдается при определении влияния конфигурации ДНК на реакцию связывания. Фермент не способен связываться с кольцевыми ДНК и с кольцевыми двуспиральными ДНК, содержащими "ники". Нестабильный комплекс образуется с односпиральной ДНК. Двуспиральная ДНК с односпиральными "хвостами" может связы-

ваться с ферментом при условии, если односпиральные фрагменты короткие. Изучается роль АТФ в реакции гидролиза ДНК. Установлено, что в процессе реакции АТФ превращается в АДФ и Фн. На гидролиз одной ФДЭ связи приходится три молекулы АТФ. Фермент имеет две активности: аденозин-трифосфатазную, зависящую от присутствия ДНК (ДНК - АТФаза) и дезоксирибонуклеазную, зависящую от присутствия АТФ (АТФ - ДНКаза). Обе активности считают принадлежностью одного ферментного белка.

б) АТФ-зависимая ДНКаза *Mycobacterium smegmatis*

Из супернатантной фракции гомогената клеток *Mycob. smegmatis*, разрушенных ультразвуком, выделена ДНКаза, активность которой проявляется только в присутствии АТФ [541 - 548, 191a]. Показано, что, кроме АТФ, хороший активирующий эффект дает АДФ, но не мононуклеотиды, нуклеозиды, основания или орто- и пирофосфаты. Максимальная активность фермента проявляется при pH 8,5 в присутствии Mg^{2+} . Другие двухвалентные ионы являются ингибиторами. Характер гидролиза экзонуклеолитический: фермент осуществляет ступенчатое отщепление моно- и олигонуклеотидов от конца полинуклеотидной цепи, имеет некоторое предпочтение к нативным структурам. Продукты гидролиза ДНК состоят из моно-, ди-, три-, тетра- и более полимерных олигонуклеотидов в количестве 4-13, 14-26, 29-45, 15-23, 5-29% соответственно. Специфичности к основаниям не имеется: динуклеотидная фракция гидролизата представлена самыми разными по химическому строению динуклеотидами. Место атаки - 3'-ФДЭ связь. Показано, что в присутствии ДНК АТФ превращается в АДФ и Фн. Для гидролиза одной ФДЭ связи используются три молекулы АТФ.

в) АТФ-зависимая (rec BC) ДНКаза (экзонуклеаза У) *E. coli*

У диких (rec⁺) и некоторых мутантных штаммов *E. coli* обнаружена АТФ-зависимая ДНКаза [182, 400, 550, 158, 393, 502, 349]. Фермент гидролизует нативную и денатурированную ДНК по экзонуклеолитическому типу. Экзонуклеолитическая активность проявляется в широком диапазоне pH от 7,5 до 9,5 только в присутствии АТФ или дАТФ (оптимальная концентрация $2 \times 10^{-4} M$;

K_m для АТФ равна $4,3 \times 10^{-5} M$, для дАТФ — $4,8 \times 10^{-5} M$). Другие нуклеозидтрифосфаты могут заменять АТФ, однако они менее эффективны. Активатором реакции является Mg^{2+} (оптимальная концентрация $5 \times 10^{-3} M$ — $2 \times 10^{-2} M$) и Mn^{2+} (оптимальная концентрация $2 \times 10^{-3} M$). Продукты экзонуклеолитической реакции представляют собой 5'-олигонуклеотиды со средней длиной цепи при — близительнo 3 нуклеотидных единицы от моно— до пентануклеотидов [502].

Гольдмарк и Линн [238, 239, 292, 293] получили гес ВС ДНКазу в состоянии, близком к гомогенному. Ферментный белок состоит из двух полипептидных цепей, которые вместе имеют молекулярный вес приблизительно 270000. В присутствии АТФ фермент гидролизует линейные односпиральные ДНК по экзонуклеолитическому типу до 5'-олигонуклеотидов средней длины цепи 4,5; причем моно- и динуклеотидов не обнаружено. Кроме экзонуклеолитической активности, гес ВС ДНКазы имеет эндонуклеолитическую активность, которая проявляется только после удаления специфического эндогенного ингибитора при фракционировании на агарозе. Она обнаружена по способности электрофоретически гомогенного фермента атаковать односпиральную кольцевую ДНК. Двуспиральные кольцевые ДНК устойчивы к действию гес ВС ДНКазы, как в нативном состоянии, так и после обработки УФ- или X-лучами. Двуспиральные кольцевые ДНК с "никами" также не атакуются, но если брешь достигает величины 5 нуклеотидов, такая ДНК гидролизуетс я гес ВС ДНКазой. Максимальная эндонуклеолитическая активность проявляется в несколько иных условиях, чем экзонуклеолитическая: экзонуклеолитическая активность максимальна при pH 9,0, эндонуклеолитическая — при pH 7,0; экзонуклеолитическая активность полностью зависит от присутствия АТФ, эндонуклеолитическая проявляется и в отсутствии АТФ, хотя АТФ повышает ферментативную активность примерно в 7 раз. Эндонуклеаза более лабильна, чем экзонуклеаза и для ее стабилизации необходимо присутствие белков.

С АТФ-зависимой ДНКазой связана ДНК-зависимая АТФаза: в присутствии ДНК АТФ превращается в АДФ и ортофосфат. При расщеплении одной ФДЭ связи гидролизуетс я от 2-х до 40 молекул АТФ.

Таким образом, гес ВС ДНКазы обладает по крайней мере четырьмя различными активностями: АТФ-зависимая двуспиральная - ДНК-эксонуклеаза, АТФ-зависимая односпиральная - ДНК-эксонуклеаза, АТФ-активируемая односпиральная - ДНК - эндонуклеаза и ДНК-зависимая АТФаза [268а].

Изучая механизм атаки двуспиральной ДНК Мак Кей, Гольдмарк, Линн и др. [293, 349а], обнаружили два типа промежуточных продуктов гидролиза: а) двуспиральные молекулы с односпиральными "хвостами" длиной по несколько тысяч нуклеотидов с 3' - или 5' - концами, б) односпиральные фрагменты длиной по несколько сот нуклеотидов. Авторы разработали схему реакции (см. рис. 9). В соответствии с приведенной на рисунке 9 схемой, гес ВС ДНКазы, состоящая, как указано выше, из двух субъединиц, прикрепляется к концу двуспиральной ДНК так,

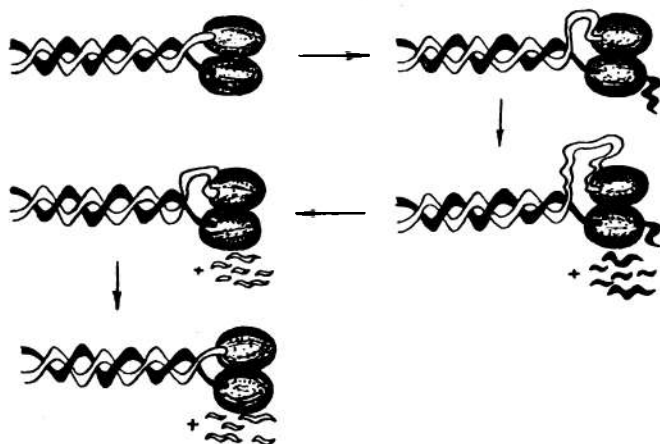


Рис. 9.

Схематическое изображение гидролиза двуспиральной ДНК гесом ВС ДНКазой *E. coli* K-12. Фермент изображен произвольно в виде двух субъединиц, каждая из которых связана с концом молекулы ДНК. Отщепленные односпиральные участки ДНК представляют собой фрагменты по несколько сот нуклеотидов длиной [349а].

что одна субъединица связана с 3' -, вторая с 5' -концом. После присоединения молекула фермента, действуя как шарнирное устройство, начинает раскручивать цепи ДНК. Именно для такого раскручивания, по предположению авторов [349a], необходима энергия, освобождающаяся при гидролизе АТФ. Далее, продвигаясь вперед вдоль цепи ДНК (для этого продвижения также, по-видимому, требуется энергия АТФ), фермент отщепляет фрагменты по несколько сот нуклеотидов длиной от одной цепи, оставаясь связанным с концом второй, нерасщепленной цепи ДНК. Когда из этой цепи образуется одноцепочечный "хвост" в несколько тысяч нуклеотидов длиной, фермент переключается на вторую цепь, расщепляет односпиральный "хвост" на фрагменты по 100 - 500 нуклеотидов длиной, образуя укороченные, полностью двуспиральные фрагменты ДНК. Затем цикл повторяется вновь и вновь до полного гидролиза ДНК. Схема вполне удовлетворительно объясняет наличие двух типов промежуточных продуктов гидролиза, предусматривает "процессивный" механизм атаки и поясняет роль АТФ в этой реакции. Авторы указывают, что односпиральные "хвосты" могут гидролизироваться также до кислоторастворимых фрагментов, причем накапливающиеся в процессе реакции длинные односпиральные фрагменты конкурируют с двуспиральной ДНК за фермент.

Изучение ДНКазной активности ряда мутантов, дефектных по признаку рекомбинации, и их ревертантов показало, что мутация по гес В и гес С или одному из этих генов ведет к полному исчезновению АТФ-зависимой ДНКазы. гес В и гес С цистроны детерминируют синтез АТФ-зависимой ДНКазы. По-видимому, синтез каждой из двух субъединиц фермента контролируется одним из этих генов. гес В и гес С мутанты обладают также повышенной чувствительностью к ультрафиолетовому облучению. Как уже отмечалось, у ревертантов вместе с приобретением способности к рекомбинации восстанавливается ДНКазная активность и устойчивость к УФ-облучению. На основании этих данных предполагается участие АТФ-зависимой ДНКазы в процессах рекомбинации и репарации [182, 158, 393, 239, 182a, 349a].

г) АТФ зависимая (rec BC) ДНКазы

Bac. subtilis

АТФ-зависимая ДНКазы обнаружена у ауксотрофного по гистидину и индолу штамма *Bac. subtilis* SB -25 his⁻, ind⁻ советскими исследователями, которые установили также, что мутанты с нарушенной способностью к рекомбинации обладают пониженной, по сравнению с диким штаммом, активностью этого фермента [188, 91, 104, 63]. АТФ-зависимая ДНКазы гидролизует нативную ДНК в 6 - 7 раз быстрее денатурированной нагреванием при pH 9 - 10 в присутствии 0,005 - 0,03 M Mg^{2+} . Максимальная активность наблюдается в узких пределах концентрации АТФ, причем оптимальная концентрация АТФ увеличивается почти пропорционально увеличению концентрации фермента. Так, при концентрации фермента 0,05 мг/мл оптимальная концентрация АТФ $\sim 1,5 \cdot 10^{-5}$ M, при концентрации фермента 0,1 мг/мл - $\sim 3 \cdot 10^{-5}$ M и при концентрации фермента 0,2 мг/мл - $\sim 5 \cdot 10^{-5}$ M. Увеличение концентрации АТФ выше оптимальных значений приводит к резкому понижению активности фермента до определенного уровня, который практически не понижается вплоть до $4 \cdot 10^{-4}$ M АТФ. АТФ может быть заменена дАТФ, но не другими нуклеотидами. АТФ-зависимая ДНКазы имеет экзонуклеолитический характер атаки.

Недавно появились сообщения о выделении и изучении свойств высокоочищенной АТФ-зависимой ДНКазы *Bac. subtilis* W 168 и 168 TT (thy⁻, try⁻). Фермент аналогичен по своим свойствам АТФ-зависимой ДНКазе штамма SB -25: активность проявляется в узких пределах концентрации АТФ и ингибируется концентрациями выше оптимальных (20 μ M). Определенный постоянный уровень активности остается при высоких концентрациях АТФ: 100 μ M - 1 mM . Для проявления активности фермента требуется Mg^{2+} , KCl - 1,02 mM [398].

Доли с соавторами [198a] провели изучение активности АТФ-зависимой ДНКазы в rec⁺ и нескольких rec⁻ мутантах *Bac. subtilis* 168 с повышенной чувствительностью к облучению (штаммы с генотипом: rec A₁, rec B₂, rec E₅, uvr -I). У штамма *Bac. subtilis* GSY -1290 (rec E₃) полностью отсутствовала АТФ-зависимая ДНКазы.

Из дикого штамма *Bac. subtilis* I68M фермент был частично очищен. Его свойства аналогичны АТФ-зависимой ДНКазе *Bac.*

subtilis SB-25 и W I68, I68 TT: абсолютная потребность в АТФ; pH-оптимум — 9,5; активируется Mg^{2+} ($10^{-2}M$) или Mn^{2+} ($2 \cdot 10^{-4}M$). Активность выше при 50° , но инкубация при этой температуре вызывает инактивацию фермента.

Дезоксирибонуклеат-5'-олигонуклеотидогидролазы,
специфичные к УФ-облученным ДНК-КФ 3.I.4.X

Дезоксирибонуклеазы *Micrococcus lysodeikticus*,
специфичные к УФ-облученной ДНК

Было подмечено, что клетки *Micrococcus lysodeikticus* не чувствительны к значительным дозам УФ-облучения и экстракты из этих клеток способны избирательно расщеплять УФ-облученные ДНК [482, 370, 183]. Механизм этого явления стал понятен, когда из клеток *Micrococcus lysodeikticus* были выделены две ДНКазы, специфичные к УФ-облученной ДНК [379, 463, 493, 290, 291]. Один из этих ферментов — эндонуклеаза, производит одноцепочечные разрывы только в нативной УФ-облученной ДНК. Количество разрывов зависит от степени облучения ДНК. Число разрывов адекватно числу пиримидиновых димеров, индуцированных в ДНК УФ-облучением. Эндонуклеаза производит лишь надрывы около поврежденных УФ-облучением мест, а именно: у 3'-конца тиминовых димеров, но не освобождает последние. Для проявления эндонуклеолитической реакции не требуется двухвалентных катионов. Эндонуклеаза имеет оптимум pH 6,5–7,5. Второй фермент — экзонуклеаза — исключает пиримидиновые димеры. Фермент не атакует нативную УФ-облученную ДНК. Его действие на этот субстрат начинается только после появления в цепи ДНК надрывов около тиминовых димеров. Для проявления активности требует присутствия Mg^{2+} . Кроме нативной УФ-облученной и обработанной эндонуклеазой ДНК, он способен атаковать денатурированную УФ-облученную и необлученную ДНК. Денатурированная необлученная ДНК атакуется от 3'-или 5'-конца с образованием 5'-мононуклеотидов. Облученную нативную ДНК экзонуклеаза атакует в направлении $5' \longrightarrow 3'$, освобождая шесть нуклеотидов

на один эндонуклеолитический разрыв. Продуктами гидролиза являются моно-, ди- и тринуклеотиды. Тиминовые димеры освобождаются в виде тринуклеотидных фрагментов.

На основании данных, полученных группой исследователей, считается, что эти ДНКазы ответственны за начальный этап репарации УФ-облученной ДНК *in vivo* [244, 184, 455, 351, 97, 45].

Ряд авторов отмечает наличие мутантов *Bac. subtilis* с пониженной чувствительностью к УФ-облучению. Предполагается, что они обладают ферментной системой, восстанавливающей индуцированные УФ-облучением повреждения ДНК и в том числе специфическими ДНКазами [429 - 431].

Дезоксирибонуклеинат-5'-олигонуклеотидогидролазы,
специфичные к модифицированным с помощью алки-
лирующих агентов ДНК-КФ 3.1.4.X

Эндонуклеаза П *Escherichia coli*

Новая ДНКаза, специфически гидролизующая алкилированную ДНК по эндонуклеолитическому типу, (эндонуклеаза П), обнаружена в клетках мутантов *E. coli*, не содержащих эндонуклеазы I. Позднее эндонуклеаза П была обнаружена и у тех штаммов *E. coli*, которые содержат эндонуклеазу I.

Максимальная активность ДНКазы проявляется при pH 8,0 - 9,0 не обнаруживает абсолютной потребности в двухвалентных катионах. Mg^{2+} в низких концентрациях ($1,3 \times 10^{-2} M$) повышает активность фермента в 2 раза, более высокие концентрации ($2,6 \times 10^{-2} M$) ингибируют фермент; Mn^{2+} ($3,3 \times 10^{-3}$ - $6,6 \times 10^{-3} M$) повышает ферментативную активность в 1,5 раза. Ингибирование активности вызывают Co^{2+} , Zn^{2+} ($1,0 \times 10^{-3}$ - $6,6 \times 10^{-3} M$), ЭДТА и сульфгидрильные реагенты. В отличие от эндонуклеазы I, ТРНК не оказывает ингибирующего эффекта по отношению к эндонуклеазе П. При использовании в качестве субстратов ДНК, слабо и интенсивно алкилированных, фермент производит единичные разрывы вблизи алкилированных мест. В интенсивно алкилированной ДНК наблюдаются двухцепочечные разрывы, каждому из которых предшествует 3 - 5 одноцепочечных разрыва. Гидролиз ДНК происходит, таким образом, по двуударному механизму, но не "наугад", а специфически около алкилированных мест. ДНКаза П

способна производить ограниченное число разрывов нативных ДНК фага T_7 и T_4 , но для этого требуется концентрация ДНК-азы примерно в 1000 раз больше, чем для гидролиза алкилированных ДНК. Кроме алкилированных ДНК, фермент способен атаковать частично депурированные ДНК. Авторы полагают, что способность эндонуклеазы Π производить единичные разрывы зависит от способности фермента "узнавать" специфические конформационные изменения в двуспиральной ДНК. Предполагается участие эндонуклеазы Π в инициации процесса репарации повреждений ДНК, индуцированных алкилирующими агентами [224 - 227, 247, 248].

Фермент, сходный с эндонуклеазой Π *E. coli*, обнаружен в клетках *Micr. lysodeikticus* [484]. ДНК-аза производит единичные разрывы около метилированных оснований ДНК фага T_7 , обработанной *in vitro* ММС. Неметилированная ДНК фага T_7 не атакуется. С помощью этой ДНК-азы можно определить степень метилирования. ДНК, содержащая 16 метильных групп на $2,5 \times 10^7$ дальтонов, является хорошим субстратом. ДНК, алкилированная в меньшей степени, не атакуется ферментом. Авторы отмечают, что ДНК-аза микрококка, гидролизующая алкилированную ДНК, не идентична ДНК-азе, специфичной к УФ-облученной ДНК. Получен мутант *Micr. lysodeikticus*, бесклеточные экстракты которого атакуют метилированную ДНК, но не действуют на УФ-облученную ДНК [486].

Способность бесклеточных экстрактов *Bac. subtilis* инактивировать трансформирующую ДНК, алкилированную *in vitro*, наблюдалась Страусом и Велом [483, 485]. Если повреждения ДНК, индуцированные ММС, восстанавливаются, то такая ДНК становится интактной. Авторы отмечают, что *Bac. subtilis* имеет ферментную систему, способную восстанавливать индуцированные ММС повреждения ДНК и что процесс восстановления этих повреждений подобен, но не идентичен процессу восстановления повреждений, индуцированных УФ-облучением. Так, были получены мутанты *Bac. subtilis*, экстракты которых восстанавливают повреждения, индуцированные алкилирующими агентами, но не УФ-облучением [430, 431].

Дезоксирибонуклеинат(односпиральный)-5'-олигонуклеотидогидролазы, экзонуклеазы - КФ 3.1.4.X,
(3.1.4.25)

Экзонуклеаза I *Escherichia coli*

Из экстрактов *E. coli* Леман с соавторами [323, 324, 329] выделили ДНКазу, обозначенную первоначально фосфодиэстеразой, а позднее - как экзонуклеаза I. Максимальная активность проявляется при pH 9,5 в присутствии Mg^{2+} . Экзонуклеаза I обладает высокой чувствительностью по отношению к вторичной структуре ДНК. Нативная ДНК атакуется ферментом в 40000 раз медленнее ДНК, денатурированной нагреванием. Авторы полагают, что в нативной ДНК гидролизуются только однонитчатые фрагменты. Начало атаки - 3'-ОН конец цепи ДНК. Дезоксиполинуклеотидные цепи с заблокированными 3'-ОН группами не атакуются экзонуклеазой I. В их присутствии скорость гидролиза доступных субстратов резко снижается. При исчерпывающем гидролизе денатурированной ДНК и дезоксиполинуклеотидов с 3'-ОН группами образуются 5'-моонуклеотиды и концевые динуклеотиды с 5'-фосфомоноэфирной группой. Устойчивость динуклеотидов и динуклеозидмонофосфатов к атаке является специфическим для этой экзонуклеазы свойством, отличающим ее от других ДНКаз - экзонуклеаз.

Другая ДНКаз *E. coli* - экзонуклеаза IV по типу гидролиза, месту атаки, условиям действия аналогична экзонуклеазе I. В отличие от последней, фермент атакует дезоксиолигонуклеотиды в 20 раз быстрее, чем нативную и денатурированную ДНК [283].

Дезоксирибонуклеинат-5'-олигонуклеотидогидролазы
экзонуклеазы, ассоциированные с ДНК-полимеразой -
КФ 3.1.4.X, (3.1.4.26)

а) Экзонуклеазы, ассоциированные с ДНК-полимеразой
Escherichia coli

Фермент, обозначенный экзонуклеазой II, обнаружен Леманом с соавторами как экзонуклеолитическая активность, присутствующая в ДНК-полимеразе [324, 435]. Позднее было показано, что обе активности связаны с одним белком [330, 307, 197, 198, 286].

Эксонуклеаза II проявляет максимальную активность при pH 8,6 в трис-HCl буфере и при pH 9,2 в глициновом буфере. В отличие от эксонуклеазы I, гидролизует нативную ДНК в 3 - 4 раза быстрее денатурированной и расщепляет динуклеотиды. При ступенчатом расщеплении 3'-ФДЭ связей ДНК и дезоксирибонуклеотидов происходит почти полное превращение их в нуклеозид-5' - монофосфаты. Реакция замедляется по мере гидролиза полимерной цепи из-за малого сродства фермента к продуктам гидролиза. Началом атаки эксонуклеазы II является 3'-ОН конец и ступенчатый гидролиз идет в направлении 3' → 5'. Для проявления активности фермента необходимо присутствие свободных 3'-ОН групп.

Несколько позднее в высокоочищенных препаратах ДНК-полимеразы E. coli была обнаружена эксонуклеаза (эксонуклеаза VI), осуществляющая ступенчатый гидролиз ДНК в противоположном направлении: 5' → 3'. Наличие такой активности показал Клет с соавторами в опытах с синтетическим сополимером д (А - Т), в котором у 3'-конца диаминопурин замещает аденин [306]. Независимо от этих исследований в лаборатории Корнберга такая же эксонуклеаза была обнаружена в экспериментах с полинуклеотидами, имеющими 3'-Ф концы [198]. В отличие от эксонуклеазы II, этот фермент активен в более широком диапазоне pH: 7,4 - 9,2, гидролизует только двуспиральные ДНК и, кроме 5' - мононуклеотидов, образует динуклеотиды и более полимерные фрагменты до гексануклеотидов. Повышение активности этой эксонуклеазы сопровождается повышением полимеразной активности [298, 300]. Способность эксонуклеазы гидролизовать двуспиральные ДНК в области надрывов в направлении 5' → 3' играет важную роль в процессах репарации [298, 287].

Фермент связывается либо с концом ДНК, либо присоединяется в месте предсуществующего надрыва цепи [214]. Обладая двумя типами эксонуклеаз, ДНК-полимераза в районе надрывов на одной из комплементарных цепей ДНК может осуществлять атаку одновременно в двух направлениях. Схематически такой гидролиз показан на рис. 10.

Путем ограниченного протеолиза макромолекула ДНК-полимеразы, имеющая молекулярный вес 109000, была расщеплена на 2 фрагмента, с молекулярным весом 76000 и 34000. Крупный фрагмент -

мент содержал полимеразную активность и экзонуклеазную активность, осуществляющую гидролиз в направлении $3' \longrightarrow 5'$. Меньший фрагмент обладал только экзонуклеазной активностью, осуществляющей гидролиз в направлении $5' \longrightarrow 3'$ [178, 304, 305, 456, 457]. Получен мутант *E. coli*, обладающий пониженной $5' \longrightarrow 3'$ экзонуклеолитической активностью [248].

б) Экзонуклеазы, ассоциированные с ДНК-полимеразой
Micrococcus lysodeikticus

Подобно ДНК-полимеразе *E. coli*, ДНК-полимераза *Micrococcus lysodeikticus* обладает экзонуклеолитической активностью [257, 258, 363 - 365]. В препаратах высокоочищенной ДНК-полимеразы обнаруживается экзонуклеаза, составляющая 1% ДНК-полимеразной активности. По ряду показателей (постоянное соотношение ДНК-полимеразной и экзонуклеазной активностей на разных стадиях очистки фермента, локализация обеих активностей в одной полосе при электрофоретическом разделении в ПААГ, совпадение рН-профилей и кривых тепловой денатурации экзонуклеазной и ДНК-полимеразной активностей) считают, что обе активности связаны с одним ферментным белком.

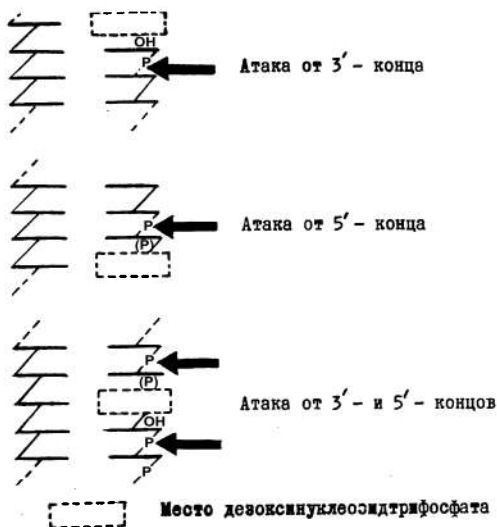


Рис. 10.

Предполагаемые участки гидролитического действия ДНК-полимеразы *E. coli*. 5'-терминальная фосфатная группа, заключенная в скобки, указывает, что ее присутствие не существенно для атаки на этом конце. [182].

Также, как в ДНК-полимеразе *E. coli*, здесь обнаружено две экзонуклеазы. Первая осуществляет экзонуклеолитический гидролиз в направлении $5' \longrightarrow 3'$, преимущественно расщепляет двуспиральные ДНК и дезоксиполинуклеотиды с образованием в качестве конечных продуктов гидролиза моно-, ди-, и тринуклеотидов, имеющих $5'$ -концевой фосфат. Фермент активен в широком диапазоне pH - 7,5 - 9,0, активируется Mg^{2+} или Mn^{2+} и дАТФ; АТФ не может заменить дАТФ, другие дезоксинуклеозидтрифосфаты оказывают активирующий эффект, степень которого зависит от химической природы субстрата. Количественное соотношение моно-, ди- и тринуклеотидов также зависит от химической природы атакуемых дезоксирибополимеров и от pH реакционной смеси. При сдвиге pH к нейтральному значению увеличивается количество динуклеотидов в гидролизате, достигающее 100% при pH 6,5.

Вторая экзонуклеаза, ассоциированная с ДНК-полимеразой *Micrococcus lysodeikticus*, осуществляет гидролиз в направлении $3' \longrightarrow 5'$, преимущественно расщепляет односпиральные ДНК и дезоксирибополинуклеотиды с образованием в качестве конечных продуктов гидролиза нуклеозид- $5'$ -монофосфатов.

Дезоксирибонуклеинат (двуспиральный)- $5'$ -олигонуклеотидогидролазы-экзонуклеазы-фосфатазы-
КФ 3.1.4.X, (3.1.4.27)

а) Экзонуклеаза III *Escherichia coli*

Фермент, обозначенный экзонуклеазой III [433, 434, 331], первоначально обнаружен как примесь экзонуклеолитической активности в препаратах ДНК-полимеразы, однако при тщательной очистке выделен как индивидуальный фермент, обладающий только деполимеразной активностью.

Оптимальные условия действия: pH 8,0, присутствие Mg^{2+} или Mn^{2+} . Экзонуклеаза III обладает абсолютной специфичностью к двуспиральной ДНК. Полинуклеотидные цепи с нарушенными водородными связями не атакуются ферментом. Экзонуклеаза III гидролизует двуспиральные ДНК по экзонуклеолитическому типу, начиная атаку только с $3'$ -ОН конца. Гидролиз ДНК завершается образованием около 40% $5'$ -мононуклеотидов и одонитчатых полинуклеотидов. Показано, что полимер д(А-Т), в котором последовательность нуклеотидов строго

чередуются и который может сохранить двуспиральную структуру даже после глубокого гидролиза ФДЭ-связей обеих цепей, почти полностью деградирует под воздействием экзонуклеазы III. Нативную ДНК фермент может атаковать с двух противоположных концов, несущих свободные 3'-ОН группы, а также у свободных 3'-ОН групп, локализованных внутри цепи ДНК, т.е. в местах одноцепочечных надрывов. В отличие от других экзонуклеаз *E. coli*, фермент имеет фосфатазную активность. Считается, что оба типа активностей связаны с одним ферментным белком. Фосфатаза строго специфична к 3'-фосфомоноэфирным связям нативных высокомолекулярных ДНК; не атакует мононуклеотиды и короткие полинуклеотидные цепи. Освобождая 3'-ОН группу, фосфатаза делает ДНК более доступной действию экзонуклеазы III *E. coli*.

б) Экзонуклеаза-фосфатаза

Bacillus subtilis

При тщательной очистке препарата ДНК-полимеразы *Bac. subtilis* был выделен фермент, подобный экзонуклеазе III *E. coli* [404]. ДНК-аза гидролизует нативную ДНК, начиная атаку с 3'-ОН концов цепи. В результате ступенчатого отщепления 5'-мононуклеотидов от одной из двух комплементарных цепей ДНК в местах с ненарушенными водородными связями образуется одностранный ДНК и около 48% 5'-мононуклеотидов. В высокоочищенных препаратах имеется и фосфатазная активность. Соотношение экзонуклеазной и фосфатазной активностей одинаково на разных стадиях очистки фермента. Фосфатаза катализирует отщепление 3'-фосфомоноэфирной группы от ДНК и крупных дезоксирибополинуклеотидов, освобождая 3'-ОН концевую группу, необходимую для начала атаки экзонуклеазы.

в) Экзонуклеаза-фосфатаза *Pseudomonas*

aeruginosa

Из бесклеточного экстракта *Ps. aeruginosa* выделена экзонуклеаза, сходная с экзонуклеазой III *E. coli*. Фермент активируется 2,5 мМ Mg^{2+} и 2-меркаптоэтанолом; ингибируется ПХМБ и ЭДТА. Образует 5'-мононуклеотиды и Фн. Направление экзонуклеолитической атаки 3' → 5'. В отличие от описанных выше экзонуклеаз этой группы, фермент *Ps. aeruginosa* может гидролизовать не

только нативную, но и денатурированную ДНК, хотя медленнее нативной в 3 - 4 раза [180] .

Б. Рибонуклеазы *

Рибонуклеинат-нуклеотидо-2'-трансферазы (циклизующие)
- КФ 2.7.7.17, (3.1.4.23)

а) Рибонуклеаза I *Escherichia coli*

Очищенный в 700 раз от балластных белков фермент представляет собой низкомолекулярный основной белок, относительно термостабильный и лабильный при хранении [212, 473, 500] .

Оптимальные условия действия фермента на РНК - pH 7,5 - 8,1 и присутствие Na^+ , K^+ и Ca^{2+} . Ингибирование ферментативной активности вызывает мочеви́на.

РНКаза I гидролизует преимущественно высокомолекулярную РНК. Характер гидролиза эндонуклеолитический, механизм - многостадийный, включающий быструю стадию гидролиза 5'-ФДЭ связей и образования нуклеозид-2',3'-циклофосфатов и медленную стадию превращения нуклеозидциклофосфатов в нуклеозид-3'-фосфаты и олигонуклеотиды с концевым 3'-фосфатом. РНКаза обладает некоторой специфичностью по отношению к природе оснований. Так, гидролиз $\text{A} > \text{Ф} > \text{Ц} > \text{Г}$ происходит в 5 раз быстрее, чем других нуклеозидциклофосфатов; эти же нуклеотиды накапливаются быстрее в первую стадию гидролиза. Диализуемая часть гидролизата на ранних этапах гидролиза обогащена аденином и обеднена гуанином [148, 149, 480] .

б) Рибонуклеазы *Enterobacter* sp.

и *Aerobacter* sp.

Из надосадочной фракции гомогената клеток *Enterobacter* sp., разрушенных механическим путем, выделена и очищена РНК-аза, обладающая сравнительной термостабильностью и молекулярным весом 24300 - 25500 [336, 335]. По характеру и механизму расщепления РНК фермент сходен с РНКазой I *E. coli*. Гидролизует РНК эндонуклеолитически, образуя олигонуклеотиды, оканчивающиеся 3'-ЦМФ и 3'-АМФ, а также $\text{Ц} > \text{Ф}$ и $\text{А} > \text{Ф}$. Количе-

* Раздел Б. Рибонуклеазы написан совместно с Р.Ш.Булгаковой и М.Н.Капановой.

ство концевых цитидинмонофосфатов в 2 - 4 раза больше аденозин-монофосфатов. В мононуклеотидной фракции гидролизата обнаружены Ц > Ф и А > Ф в соотношении 1,5 - 3,0 к 1. Другие моно-нуклеотиды не образуются. РНКазы *Enterobacter* sp. гидролизует поли-Ц, другие полинуклеотиды интакты. Таким образом, эта РНКазы отличается от РНКазы I строгой специфичностью к ФДЭ связям с цитидином и аденином.

Аналогичный фермент выделен из бесклеточного экстракта *Aerobacter* sp. [367]. РНКазы обладает эндонуклеолитическим характером атаки. Атакуют полицитидиловую кислоту; поли-У, поли-Г и поли-А не атакуются ферментом. При короткой инкубации РНКазы с РНК расщепляются только ФДЭ связи, соседние с цитидиловой кислотой. При длительной инкубации расщепляются и другие связи, однако цитидин-специфичность сохраняется: 60% концевых 3'-нуклеотидов в олигонуклеотидных фракциях гидролизата в этом случае составляет ЦМФ.

в) Внеклеточная рибонуклеаза *Bac. subtilis*

Подробным изучением свойств щелочной РНКазы из культуральной жидкости *Bac. subtilis* занимаются две группы авторов - японские исследователи Нishимура с соавторами [386 - 392] и группа американских авторов - Рушицкий, Хартли и др. [445, 252 и др.].

Максимальная активность РНКазы проявляется при pH 8,5. Фермент ингибируется Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} и Cu^{2+} . ЭДТА не влияет на ферментативную активность. Фермент не теряет активности при обработке 0,1N H_2SO_4 в течение 18 часов при 40° [446]. По характеру действия на РНК является эндонуклеазой. Механизм гидролиза изучался на синтетических полинуклеотидах в качестве субстратов [536]. Полинуклеотиды гидролизуются сначала с образованием три- и динуклеотидов с концевым 2,3-циклофосфатом. Затем наступает более медленное расщепление этих соединений с последующим крайне медленным превращением в конечные продукты - мононуклеотиды. Таким образом, механизм гидролиза субстрата включает внутримолекулярный перенос фосфатов и последующий гидролиз нуклеозид-циклофосфатов.

По данным японских авторов, фермент проявляет строгую пурин-специфичность. В мононуклеотидной фракции гидролизата и в

концевых 3'-нуклеотидных фракциях авторы обнаружили 3'-гуаниловую и 3'-адениловую кислоты в соотношении 3:1. Ими показано также, что фермент имеет предпочтение к основаниям с 6-гидроксильной группой по сравнению с основаниями, имеющими 6-кетогруппу. Однако экспериментальные результаты американских авторов свидетельствуют о том, что РНКазы не абсолютно специфичны к пуриновым связям. При больших концентрациях фермента разрушаются и пиримидиновые связи. Авторы показали, что разница в скорости гидролиза связей типа Гф-Гф и Гф-Аф по сравнению с другими составляет 100 раз. При анализе субстратной специфичности на синтетических полинуклеотидах показана относительная скорость их гидролиза, выражающаяся следующим неравенством: поли-И > поли-А > поли-У > поли-Ц.

Таким образом, по специфичности к основаниям фермент отличается от панкреатической РНКазы и гуанин-специфичных РНКаз актиномицетов и грибов. Указанная особенность делает фермент полезным аналитическим инструментом при анализе структуры РНК и рибонуклеотидов.

г) Внеклеточные рибонуклеазы некоторых споровых бактерий

Американскими исследователями [446] и советскими авторами описаны внеклеточные РНКазы ряда споровых бактерий [75, 76, 85, 84]. Установлено, что бактерии таких видов, как *Bac. mesentericus*, *Bac. intermedius*, *Bac. glutinosus* и др. образуют ферменты, сходные с РНКазой *Bac. subtilis*. Остановимся подробнее на описании свойств щелочной РНКазы *Bac. intermedius* [36, 85].

Максимальная активность РНКазы *Bac. intermedius* обнаружена при pH 8,8 в глицин-NaOH буфере. Некоторое активирование фермента вызывают Na^+ и ЭДТА. Небольшой ингибиторный эффект оказывает Ca^{2+} . Неорганический фосфат и нуклеозидмонофосфаты не влияют на активность РНКазы. При концентрации субстрата 3,6 - 4,3 мг/мл проявляется наибольшая активность фермента. Дальнейшее увеличение концентрации субстрата приводит к уменьшению скорости реакции, вероятно из-за ингибирующего влияния продуктов гидролиза.

При фракционировании ферментативного гидролизата РНК на разных стадиях гидролиза обнаружены олигонуклеотиды разной степени полимерности, что свидетельствует об эндонуклеолитическом характере атаки.

По отсутствию прироста неорганического фосфата при обработке мононуклеотидной фракции гидролизата 5'-нуклеотидазой определено, что фермент расщепляет 5'-ФДЭ связи РНК.

При хроматографическом разделении на бумаге мононуклеотидной фракции ферментата обнаружено четыре пятна, соответствующие 3'-ГМФ, 3'-АМФ и их циклическим производным.

Данные по нуклеотидному составу разных фракций ферментативного гидролизата, приведенные в таблице 2I, свидетельствуют о предпочтительном расщеплении РНКазой ФДЭ связей типа ГФ-НФ и АФ-НФ, причем связи ГФ-НФ расщепляются быстрее, чем АФ-НФ.

Т а б л и ц а 2I

Характеристика гидролизата РНК, полученного
при помощи РНКазы *Bac. intermedius*

Нуклеотиды	Содержание во фракциях, мкмоль-%		
	мононуклеотиды	3'-концевые нуклеотиды	фракция, лишенная 3'-концевых нуклеотидов
3' - ГМФ	67,1	71,4	0,0
3' - АМФ	29,2	19,9	34,8
3'-ЦМФ+3'-УМФ	3,7	8,7	65,2

Нуклеозид-2',3'-циклофосфаты гидролизуются крайне медленно. Скорость гидролиза разных нуклеозид-циклофосфатов различна: $\Gamma > \Phi > \text{А} > \Phi > \text{У} > \Phi > \text{Ц} > \Phi$.

Таким образом, внеклеточная РНКазы *Bac. intermedius* сходна по своим ферментативным свойствам (эндонуклеолитический тип атаки, механизм, включающий трансфосфорилирование, преимущественная пурин-специфичность) с внеклеточной РНКазой *Bac. subtilis* и может явиться полезным аналитическим инструментом при структурном анализе РНК.

Рибонуклеинат гуанин-нуклеотидо-2'-трансферазы (циклизующие) – КФ 2.7.7.26, (3.1.4.8)

а) Внеклеточная РНКаза *Vac. amylozyma*

Очищенная от интерферирующих активностей РНКазы *Vac. amylozyma* представляет собой термостабильный и устойчивый при кислых pH среды фермент с относительно низким молекулярным весом (9000), определенным с помощью гельфильтрации [5, 6].

Максимальная активность фермента проявляется при pH 8,6. Некоторое влияние на ферментативную активность оказывает прироста буфера, вследствие чего в трис-HCl буфере эта активность значительно выше, чем при тех же значениях pH в боратном буфере. Некоторый активирующий эффект оказывают Na^+ и ЭДТА. Mg^{2+} и Ca^{2+} вызывают некоторое понижение активности.

РНКазы проявляет различную активность в отношении суммарной дрожжевой РНК и транспортной РНК. Последняя гидролизует в 1,6 раза медленнее, что свидетельствует о предпочтительной специфичности фермента к неспирализованным структурам.

Об эндонуклеолитическом характере гидролиза субстрата свидетельствует содержание нуклеотидов разной длины цепи при полном гидролизе РНК ферментом. Содержание моно-, ди-, три-, тетра-, пента-, гекса- и более полимерных олигонуклеотидов II, 24, 22, 22, 14, 4, 4% соответственно.

Показано, что продукты гидролиза имеют 3'-концевой фосфат и содержат нуклеозид-2',3'-циклофосфаты, которые гидролизуются крайне медленно.

При хроматографическом разделении на бумаге суммарного гидролизата и его мононуклеотидной фракции оказалось, что в последней содержится только 3'-ГМФ (и $\Gamma > \Phi$) при разных сроках инкубации РНК с разными концентрациями фермента.

Изучение нуклеотидного состава олигонуклеотидных фракций гидролизата (табл. 22) показало, что содержание гуанина закономерно уменьшается по мере увеличения полимерности полинуклеотидов, что подтверждает гуанил-специфичность фермента.

Таким образом, РНКазы *Vac. amylozyma* проявляет абсолютную специфичность к природе оснований и гидролизует только ФДЭ связь типа ГФ-НФ.

Т а б л и ц а 22

Нуклеотидный состав олигонуклеотидных фракций
гидролизата РНК [5], полученного при помощи
РНКазы *Vac. amylolytica*

Фракции нуклео- тидов	Содержание оснований, мкмоль				Содержа- ние Г, моль-%	Г А+Ц+У
	Г	А	У	Ц		
Ди-	0,282	0,098	0,102	0,117	47,1	0,89
Три-	0,122	0,101	0,110	0,112	27,4	0,38
Тетра-	0,074	0,082	0,081	0,098	22,2	0,32
Пента-	0,055	0,078	0,088	0,096	18,5	0,23
РНК (субст- рат)	0,139	0,109	0,122	0,131	27,7	0,38

б) Внеклеточная рибонуклеаза *Vac. pusillus*

Рушицкий с соавторами [446] предпринял поиски рибонуклеаз у разных микроорганизмов и обнаружил сравнительно высокую РНК-азную активность в культуральной жидкости *Vac. pusillus* IFO 3028. Фермент был очищен от интерферирующих активностей и основные свойства его изучены. Молекулярный вес РНКазы *Vac. pusillus* близок к РНКазе *Vac. subtilis* и *Vac. amylolytica* (около 10-9 тыс.).

Оптимальная активность проявляется при pH 7,9 Mg^{2+} и Ca^{2+} в концентрации 0,001 M вдвое снижают ферментативную активность. ЭДТА не изменяет активности фермента.

Характер гидролиза РНК эндонуклеолитический, механизм-двухфазный с внутримолекулярным перефосфорилированием. Расщепляет 5'-ФДЭ связи только типа Гф-Нф.

Внеклеточные РНКазы обеих споровых бактерий *Vac. amylolytica* и *Vac. pusillus* сходны по своим свойствам с гуанил-специфичными РНКазами актиномицетов и грибов.

Рибонуклеинат-нуклеотидо-2'-трансферазы
(циклизующие, не гидролизующие циклофосфаты-эндо-
нуклеазы) - КФ 2.7.7.X

а) Рибонуклеаза *Azotobacter agilis*

Фермент обнаружен в нерастворимом осадке бесклеточных экстрактов *Azotobacter agilis*. РНКазы частично очищена от интерферирующих ферментативных активностей [462]. Фермент лабилен при интенсивном диализе и замораживании. Инактивируется особенно быстро при кислых значениях pH.

Максимальная активность проявляется при pH 7,5 в присутствии CaCl_2 в концентрации 1-10 мМ или Mg Cl_2 . ЭДТА и мочевины ингибируют фермент. РНКазы гидролизует высокомолекулярную дрожжевую РНК и синтетические гомополинуклеотиды по эндонуклеолитическому типу с образованием в качестве конечных продуктов реакции нуклеозид-2',3'-циклофосфатов. Раньше других появляются А > ф и Ц > ф. Нуклеозид-2',3'-циклофосфаты не подвергаются гидролизу даже при высоких концентрациях фермента и длительных сроках инкубации.

б) Внутриклеточная рибонуклеаза *Bac. subtilis*

При разрушении клеток *Bac. subtilis* с помощью лизоцима или механическим путем в экстрактах обнаружена РНКазная активность, составляющая 1/230 часть внеклеточной РНКазной активности [390, 556 - 559]. РНКазы очищена в 2100 раз до гомогенного состояния. Фермент стабилен при pH 7,0 - 8,0 и термостабилен (инактивируется при инкубации в течение 40 мин. при 37°). Максимальная активность проявляется при pH 5,5 - 5,7. Ингибиторный эффект оказывают АТФ и ДАТФ (K_i при pH 5,7 - 0,12 и 0,21 мкМ соответственно).

Фермент гидролизует дрожжевую РНК и полинуклеотиды по эндонуклеолитическому типу. Механизм гидролиза включает перенос фосфата с образованием в качестве конечных продуктов нуклеозид-2',3'-циклофосфатов. Поли-Ц и поли-А гидролизуются несколько медленнее, чем поли-У и РНК. Циклофосфаты не гидролизуются даже при высоких концентрациях фермента и при длительных сроках инкубации.

в) Внутриклеточная рибонуклеаза *Proteus mirabilis*

Фермент, выделенный из клеток *Pr. mirabilis* [185], по - добно описанным выше РНКазам, гидролизует дрожжевую РНК и син- тетические полинуклеотиды по эндонуклеолитическому типу с обра- зованием в качестве конечных продуктов гидролиза нуклеозид-2',3'- циклофосфатов, которые интактны к ферменту.

Рибонуклеазы с такими свойствами найдены только в микроб- ных клетках. Они могут быть использованы для структурного ана- лиза РНК и для препаративного получения нуклеозидциклофосфа - тов.

Рибонуклеинат-нуклеотидо-3'-гидролазы- КФ 3.1.4.X

Рибонуклеаза IIА *Thiobacillus thioparus*

Из экстрактов клеток *Thiobac. thioparus* была выделена РНК- азная фракция, которая при последующем фракционировании оказа- лась гетерогенной и состояла из трех отличающихся друг от друга по физико-химическим свойствам ферментов [405, 96, 530, 406]. До 60% РНКазной активности клеточного экстракта состав- ляет РНКаза IIА, которая была отделена от других РНКаз и бал - ластных белков по методике, описанной в третьей главе.

РНКаза IIА представляет собой термостабильный (не инак - тивируется при 100° в течение 20 мин.), кислотоустойчивый фер- мент. Оптимальная активность проявляется при pH 7,0 и темпе- ратуре 50°. Инактивируется при высокой ионной силе: 1 М рас- твор NaCl снижает активность на 75%. Некоторое снижение актив- ности вызывает бромцетат. Молекулярный вес составляет 13500. Фермент гидролизует РНК по эндонуклеолитическому типу. Produk- ты гидролиза состоят из моно-, ди-, три- и недигализуемых по - линуклеотидов. Фермент расщепляет 5'-ФДЭ связи, но без предва- рительного образования нуклеозид-2',3'-циклофосфатов. Мононук - леотидная фракция, составляющая 8% гидролизата, содержит 3'-УМФ, 3'-ЦМФ, 3'-АМФ и 3'-ГМФ. Недигализуемая фракция гидролиза- та содержит 60% гуанина, 20% аденина и по 10% урацила и цито- зина. 5'-концевые нуклеотиды олигонуклеотидных фракций гидро - лизата содержат преимущественно пурины, 3'-концевые нуклеотиды

состоят исключительно из пиримидинов. По своей специфичности к природе оснований (гидролизует предпочтительно связи типа Пир-Пур) РНКазы *Thiobac. thioparus* сходна с панкреатической РНКазой. Отличается от последней механизмом гидролиза РНК - отсутствием трансферазной активности и способности гидролизовать нуклеозидциклофосфаты. Кроме того, недиализуемая фракция гидролизата, как показано выше, обогащена гуанином. В "core" гидролизата РНК, полученного с помощью панкреатической РНКазы, примерно одинаковое содержание гуанина и аденина.

РНКазы *Th. thioparus*, вследствие ее специфических особенностей по отношению к природе оснований, прилегающих к гидролизуемым связям, может явиться полезной для анализа первичной структуры РНК.

Рибонуклеинат-нуклеотидо-5'-гидролазы-
КФ 3.1.4.X, (3.1.4.23)

а) Рибонуклеаза II *E. coli*

РНКазы II обнаружена Шпаром и Шлезингером [474]. Фермент очищен от интерферирующих активностей (степень очистки 600 раз) и подробно изучен [472, 464, 465, 480, 155, 396, 395, 523]. РНКазы лабильны при хранении, для ее стабилизации используется сывороточный альбумин. Максимальная активность проявляется при pH 7,5 только в присутствии одновалентных и двухвалентных катионов (0,1 M KCl и 3 mM $MgCl_2$). Более высокие концентрации Mg^{2+} - 60 - 100 mM ингибируют ферментативную активность. Фермент ингибируется также высокими концентрациями мочевины.

Эксонуклеолитическая атака РНК и рибополинуклеотидов начинается с 3'-ОН конца цепи и заканчивается образованием 5'-мононуклеотидов. Фермент проявляет предпочтение к неспирализованным структурам. Полинуклеотиды, содержащие свободную 3'-ОН группу, гидролизуются в 5 - 10 раз быстрее, чем полинуклеотиды с 3'-фосфатной концевой группой. Фермент обладает некоторой специфичностью к природе оснований: быстрее других полинуклеотидов гидролизует поли-А. Относительная скорость

гидролиза разных субстратов в процентах следующая: поли-А - 100, поли-У - 55, поли-Ц - 55, суммарная дрожжевая РНК - 4,6, растворимая РНК - 1.

Элей и Крофорд [211] обнаружили у *E. coli* РНКазу, активность которой значительно снижается в присутствии односпиральной ДНК. По каталитическим свойствам фермент аналогичен РНКазе II *E. coli* - гидролизует односпиральные РНК до 5' - мононуклеотидов. Поскольку, по предварительным данным [464], на РНКазу II ДНК оказывает слабое ингибирующее действие, авторы полагали, что обнаружили новый фермент, обозначенный ими РНКазой UI. Однако позднее Горелик и Апирион [240] обнаружили значительное ингибирование РНКазы II дезоксиолигонуклеотидами и денатурированной нагреванием ДНК в отличие от нативной ДНК, дающей слабый ингибирующий эффект.

Ранее было показано, что АТФ ингибирует РНКазу II [520]. Однако по мере очистки фермента ингибирующий эффект АТФ ослабевал и полностью исчезал по отношению к высокоочищенной РНКазе II [505]. Кажущийся ингибиторный эффект АТФ объясняется наличием в неочищенных препаратах фермента - аденилаткиназы, который в присутствии АТФ превращает 5'-мононуклеотиды (продукты реакции РНКазы II) в спиртонерастворимые нуклеозиддифосфаты [268].

В клетках *E. coli*, кроме двух описанных выше РНКаз, обнаружено еще три фермента - РНКазы III, IV и V, которые отличаются рядом специфических свойств.

РНКазы III (3.1.4.24) получена путем экстракции солевыми растворами высокой ионной силы из 30S субъединиц рибосом. Высокочищенный фермент обнаруживает абсолютную потребность в одновалентных катионах. Оптимальными являются концентрации 10^{-2} - 10^{-1} М. Концентрации выше 4×10^{-1} М ингибируют фермент. Двухвалентные катионы Mg^{2+} и Mn^{2+} в концентрациях 5×10^{-3} - 10^{-1} и 5×10^{-5} - 10^{-3} М соответственно дают активирующий эффект. Максимальная активность фермента проявляется в широком диапазоне pH - 7,6-9,7. РНКазы III проявляет абсолютную специфичность к двуспиральным полирибонуклеотидам. Субстраты, имеющие двуспиральные участки, фермент селективно гидролизует только по этим местам цепи. Одноцепочечные РНК, одно- и двухцепочечные ДНК интактны к действию РНКазы III, хотя и вызывают

ингибирование гидролиза двуцепочечных РНК. По анализу динамики гидролиза поли-АУ установлен эндонуклеолитический тип атаки, а также то, что продуктами гидролиза являются 3'-олигонуклеотиды без образования нуклеозид-2',3'-циклофосфатов в качестве промежуточных продуктов [438, 439, 337, 338] .

РНКаза IY получена из мутанта *E. coli* MRE-600, лишенного РНКазы I. Фермент специфически расщепляет РНК фага R I7 или M 32. Седиментационный анализ показал, что при короткой экспозиции РНК расщепляется на два фрагмента - 2IS и 15S. 15S фрагмент имеет 5'-конец молекулы РНК, 2IS фрагмент имеет 3'-конец молекулы РНК фага. При последующей длительной инкубации 2IS фрагментов с высокими концентрациями фермента образуются 15S фрагменты [475, 366] .

РНКаза Y также получена из мутанта *E. coli* 464, лишенного РНКазы I. Активность фермента проявляется только в присутствии обеих субъединиц рибосом (50S и 50S), фактора G, фактора T, ГТФ, тРНК, одновалентных и двувалентных катионов и сульфгидрильных веществ. Таким образом, только при соблюдении условий, обеспечивающих нормальную функцию рибосом, РНКазы Y способна гидролизовать поли-У, поли-А и РНК. Характер гидролиза экзонуклеолитический, начало атаки - 5' - конец цепи, продукты гидролиза - 5'-моонуклеотиды. Ферментативная активность ингибируется всеми факторами, которые ингибируют расщепление информационной РНК *in vivo* [312, 313].

б) Рибонуклеаза II *Lactobacillus plantarum*

Из разрушенных замораживанием и оттаиванием клеток *Lactobacillus plantarum* выделен и очищен фермент, сходный с РНКазой II *E. coli* и названный РНКазой II *L. plantarum* [345, 230, 231] . Частично очищенный фермент отличается стабильностью, активность не снижается при хранении в течение шести месяцев при 20°. Оптимальная активность проявляется при pH 8,6 в присутствии 0,4 М NH_4Cl . ЭДТА ингибирует фермент; Mg^{2+} несколько снижает ингибиторное влияние ЭДТА, но не активирует РНКазу.

РНКаза гидролизует полирибонуклеотиды по экзонуклеолитическому типу. Механизм гидролиза так называемый процессивный, аналогичный РНКазе II *E. coli* . Предпочтительно гидроли-

зует одноцепочечные структуры. Атакует 3'-ФДЭ связи. Продукты исчерпывающего гидролиза - нуклеозид-5'-монофосфаты. Фермент проявляет некоторую специфичность к природе оснований. Так, быстрее других гидролизуются поли-А; поли-У и поли-Ц гидролизуются крайне медленно; поли-Г устойчив к атаке фермента. Слабо гидролизуются гомополимеры 4 N-метилцитидиловой кислоты. Устойчивы к действию фермента гомополимер 6'-N-метиладениловой кислоты и тРНК. Поли-Ц и тРНК ингибируют гидролиз поли-А РНКазой по типу конкурентных ингибиторов.

РНКазы II *E. coli* и РНКазы II *L. plantarum*, а также подобные им РНКазы *L. casei* [296] и *Salmonella typhimurium* [424] могут быть использованы для препаративного получения 5'-мононуклеотидов.

в) Рибонуклеаза *Serratia* sp.

Фермент получен из гомогенатов клеток *Ser. sp.*, разрушенных механическим путем [334]. Оптимум pH - 7,5, активируется Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , ингибируется Fe^{2+} . Гидролизует РНК и рибополинуклеотиды по экзонуклеолитическому типу с образованием нуклеозид-5'-монофосфатов. Предполагается, что началом атаки является 3'-ОН конец полинуклеотидной цепи. Рибонуклеотиды, содержащие 3'-фосфатную группу, не атакуются РНКазой *Ser. sp.* Фермент проявляет предпочтение к гетерополимерам, содержащим адениловую кислоту. При гидролизе РНК и указанных гетерополимеров 5'-АМФ образуется быстрее других мононуклеотидов. Соответственно поли-А гидролизуются быстрее, чем поли-Ц и поли-У; поли-Г вообще не атакуются ферментом.

г) Рибонуклеаза *Mycobacterium smegmatis*

Из бесклеточных экстрактов *Mycobacterium smegmatis* получена РНКазы, которая преобладает в клетках этих бактерий. Максимальная активность фермента проявляется при pH 7,5-8,0 в присутствии Mg^{2+} и Na^{+} (в отличие от РНКазы II *E. coli* и *L. plantarum*, которые активируются K^{+} или NH_4^{+} в сочетании с Mg^{2+}). Отличительным свойством этой РНКазы является также ее относительная термостабильность. Остальные свойства аналогичны другим РНКазам этой группы: предпочитает односпиральные структуры; характер атаки экзонуклеолитический; гид-

полилизует полирибонуклеотиды до 5' - мононуклеотидов. Лучше других полинуклеотидов гидролизует поли-А, слабо - поли-У, еще слабее - дрожжевую РНК [436].

РНК-ДНК-гибрид-рибонуклеотидогидролазы
(3.1.4.34)

Гибрилаза (РНКазы Н) *E. coli*

Из клеток *E. coli* с использованием аффинной хроматографии [535] выделен новый фермент - РНКазы Н, который от всех известных нуклеаз *E. coli* отличается тем, что способен гидролизовать РНК только в составе РНК-ДНК гибридных структур [362, 535, 261, 160]. Максимальная активность РНКазы Н проявляется при значениях pH 7,0 - 8,0 в присутствии Mg^{2+} (оптимальная концентрация - 5-10 mM) и сульфгидрильных реагентов. Mg^{2+} не может быть заменен другими двухвалентными катионами (Mn^{2+} , Ca^{2+}). Одновалентные катионы при низких концентрациях не оказывают влияния на активность фермента, при высоких концентрациях (0,3-0,5 M) оказывают ингибирующее действие. Фермент способен превращать более 95% РНК в РНК-ДНК гибридах в кислоторастворимые продукты, которые отделяются от цепи ДНК и устойчивы к последующей атаке РНКазы Н. Продукты гидролиза представляют собой моно (~5%) и олигонуклеотиды (~75% длиннее пентануклеотидов) с 5'-ФМЭ группой. По характеру гидролиза фермент относится к эндонуклеазам: он способен атаковать сверхспиральную ДНК Col E₁, содержащую интегрированные участки рибонуклеотидов. 50% такой ДНК (23S) превращается в 17S форму после инкубации с РНКазой Н.

Из разных штаммов *E. coli* (K₁₂ - H560 pol A⁻endo I⁻; C - pol A⁺ B, D110 - pol A endo I⁻try) получены совершенно идентичные по биохимическим свойствам гибрилазы.

В. Нуклеазы, гидролизующие ДНК
и РНК

Рибонуклеинат (деоксирибонуклеинат)-5'-нуклеотидогидролазы - КФ 3.1.4.9

а) Нуклеаза *Serratia marcescens*

О наличии нуклеаз в культуральной жидкости *Ser. marcescens* сообщили Джеффрис с сотрудниками [281]. Позднее фермент был частично очищен и определены некоторые его свойства [206].

В лаборатории микробиологии Казанского университета в течение ряда лет подробно анализируются свойства нуклеазы *Ser. marcescens* [73, 78, 82, 83, 11, 12]. Нуклеаза *Ser. marcescens* изучается также американскими исследователями [380, 381].

Подробные сведения о получении и очистке нуклеазы из разных штаммов *Ser. marcescens* приводятся в третьей главе. Препараты нуклеазы были свободны от примесей интерферирующих ферментов, имели высокую удельную активность и в таком виде использовались для последующих анализов.

Высокоочищенный фермент лабилен при хранении и термолабилен (при 50-60° в течение 5 мин. инактивируется полностью).

Максимальная активность нуклеазы по действию на ДНК и РНК проявляется при pH 8,3-8,5 в трис-HCl буфере. Лучшее активирующее действие оказывает Mg^{2+} в концентрации 5×10^{-3} - 7×10^{-3} М, т.е. при молярном отношении Mg^{2+} к фосфору субстрата, равному 3:1. Несколько меньший активирующий эффект оказывает Mg^{2+} . Другие Me^{2+} не активируют фермент. Полное ингибирование вызывает ЭДТА. Некоторое ингибирующее влияние оказывают нуклеозидмонофосфаты, за исключением 5'-ЦМФ, и неорганический фосфат. Избыточные концентрации субстратов уменьшают скорость ферментативных реакций, по-видимому, за счет ингибирующего влияния продуктов деградации.

Изучалась динамика гидролиза ферментом нативной и денатурированной нагреванием ДНК. Оба субстрата атакуются нуклеазой, причем на ранних стадиях реакции нативная ДНК гидролизуеться быстрее денатурированной в 1,5-2,0 раза. Характер атаки-эндонуклеолитический, что установлено по соотношению скорости накопления кислоторастворимых продуктов гидролиза и снижения вязкости раствора нативной ДНК.

Дополнительное подтверждение эндонуклеолитического характера атаки нуклеиновых кислот ферментом дают результаты определения количества олигонуклеотидов разной степени полимерности в гидролизатах. Исходя из экспериментальных данных, по-

лученных при фракционировании гидролизата, определено распределение разрывов цепи ДНК и РНК [33]. Как видно из сравнения экспериментальных и теоретических данных, разрывы цепей ДНК и РНК распределяются не статистически (таблица 23).

Установлено, что местом ферментативной атаки являются 3'-ФДЭ связи ДНК и РНК.

Определение специфичности нуклеазы *Ser. marcescens* по отношению к химической природе оснований, прилегающих к атакуемым ФДЭ связям, оказалось крайне затруднительным. Поскольку нуклеаза не проявляет строгой специфичности, возникла необходимость характеризовать гидролизат на ранних стадиях гидролиза. В таблице 24 суммированы результаты анализа нуклеотидного состава разных фракций ферментативных гидролизатов ДНК и РНК. По мере увеличения полимерности фракций отношение суммарной концентрации пуринов к суммарной концентрации пиримидинов в них уменьшается (особенно в гидролизате ДНК). На ранних стадиях гидролиза кислоторастворимые и концевые фракции гидролизатов содержат пуринов больше, чем пиримидинов. Эти данные позволяют сделать заключение о некотором предпочтении фермента к межнуклеотидным связям, содержащим пурины.

При помощи прямого метода анализа [415] определялось количество дфПир-ф-Пур связей, гидролизovaných нуклеазой *Ser. marcescens*, а также способность фермента атаковать модифицированные производные ДНК. Фермент при длительной инкубации расщепляет 35% ФДЭ связей РНК, 25% ДНК и 20% апириимидиновой ДНК; апуриновая ДНК интактна. Связь типа дфПир-фПур расщепляется на 8,5-9,0%.

Нуклеаза *Ser. marcescens* в силу высокой активности и особенностей атаки ДНК и РНК может оказаться полезным аналитическим инструментом. В нашей лаборатории исследуется противопухоловое и противовирусное действие этого фермента. Кроме того, нуклеаза *Ser. marcescens* используется для получения нуклеотидов [30 и др.] .

б) Нуклеаза *Azotobacter agilis*.

Аналогичную по свойствам нуклеазу выделили из бесклеточных экстрактов *Azotobacter agilis* Стивинс и Хилл [479]. Фермент гидролизует ДНК и РНК по эндонуклеолитическому типу,

Распределение УФ-поглощающего материала во фракциях, однородных по числу нуклеотидов, в гидролизатах ДНК и РНК нуклеазы *Ser. marcescens* Ви-2II ATCC-9986 при глубоком гидролизе

Фракции	A ₂₆₀ , % (гидролизат ДНК)	Мольные доли нуклеотидов в %			Отношение		A ₂₆₀ , % (гидролизат РНК)	Мольные доли нуклеотидов в %			Отношение	
		эксперимент. данные (I)	данные расчета по формулам:		I/II	I/III		экспериментальные данные (I)	данные расчета по формулам:		I/II	I/III
			(II)	(III)					(II)	(III)		
Мононуклеотиды	1,2	1,20	8,70	0	0,14	-	2,7	2,70	15,05	0	0,18	-
Динуклеотиды	13,7	6,85	6,10	11,68	1,12	0,59	35,3	17,65	9,16	15,02	1,93	1,17
Тринуклеотиды	25,4	8,46	4,27	8,39	1,98	1,00	38,0	12,66	5,59	10,06	2,26	1,26
Тетрануклеотиды	29,3	7,32	2,99	4,55	2,45	1,61	20,0	5,00	3,41	4,53	1,47	1,10
Пентануклеотиды	20,1	4,02	2,09	2,46	1,92	1,63	4,0	0,80	2,08	2,04	0,38	0,39
Гексануклеотиды	10,3	1,71	1,46	1,34	1,17	1,28	0,0	0,00	1,27	0,92	0,00	-

Характеристика гидролизатов ДНК и РНК,
полученных при помощи нуклеазы
Serratia marcescens

Фракции гидролизатов ДНК и РНК		Нуклеотидный состав, мкмоль - %				$\frac{\Gamma+A}{\text{Ц}+T(\text{У})}$
		Г	А	Ц	T(У)	
ДНК:						
Динуклеотиды		31,8	29,7	23,9	14,6	1,60
Тринуклеотиды		37,0	26,1	16,6	20,3	1,72
Тетрануклеотиды		30,2	24,6	14,8	30,4	1,21
Пентануклеотиды		23,0	20,1	23,4	33,5	0,76
Гексануклеотиды		18,1	19,5	22,9	39,5	0,60
Кислоторастворимые олигонуклеотиды	9%	28,0	34,0	16,3	21,7	1,63
	20%	25,0	32,4	18,3	24,3	1,34
Концевые нуклеотиды	5' -	33,2	26,4	17,3	23,1	1,48
(КРП-8%)	3' -	27,7	31,4	17,9	23,0	1,44
РНК:						
Динуклеотиды		29,2	23,2	19,6	28,0	1,10
Тринуклеотиды		26,8	21,0	19,3	32,9	0,86
Тетрануклеотиды		25,1	19,9	23,3	31,7	0,81
Пентануклеотиды		22,2	18,6	25,2	34,0	0,68
Концевые нуклеотиды	5' -	32,4	27,2	16,9	23,5	1,22
(КРП-9%)	3' -	37,6	24,7	17,6	20,1	1,65

образуя олигонуклеотиды с концевой 5'-фосфомоноэфирной группой. При сравнительном анализе скорости гидролиза синтетических полинуклеотидов оказалось, что нуклеаза быстрее других гидролизует поли-А; поли-Г ферментом не атакуется. Более подробных сведений относительно субстратной специфичности нуклеазы *Az. agilis* не имеется.

Ферменты, способные расщеплять 3'-ФДЭ связи ДНК и РНК по эндонуклеолитическому типу, найдены также в культуральной жидкости *Str. hemolyticus* [532 - 534].

Рибонуклеинат (дезооксирибонуклеинат)-3'-нуклеотидогидролазы-экзонуклеазы - КФ 3.1.4.X, (3.1.4.18)

а) Внеклеточные экзонуклеазы *Bac. subtilis*

В культуральной жидкости разных штаммов *Bac. subtilis* (М, ВВ-19) обнаружена нуклеаза, сходная с экзонуклеазой селезенки [262, 428, 267а], которая при хроматографической очистке на ионообменниках подразделяется на несколько ферментативных фракций [375, 301, 302, 403, 289а, б]. Последние обозначены, как нуклеазы Вs 10, Вs 1А, Вs 1В и Вs II, причем все нуклеазы, кроме В10, имели аналогичные ферментативные свойства и отличались лишь своим поведением при хроматографии [289а, 289б]. Не исключено, что эти ферменты являются модифицированными производными одного ферментного белка, возникшими под действием протеаз культуральной жидкости бактерий в процессе их роста [289а].

Нуклеазы Вs 1А, Вs 1В и Вs II гидролизуют нативную и денатурированную ДНК и рРНК в присутствии Ca^{2+} при щелочных значениях pH. В отсутствие Ca^{2+} скорость гидролиза денатурированной ДНК и рРНК понижается, а нативная ДНК гидролизуется очень медленно или вообще не гидролизуется. Активность этих ферментов ингибируется ЭДТА и другими агентами, которые связывают Ca^{2+} , ингибиторный эффект вызывают также Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} . Способ действия нуклеаз преимущественно экзонуклеолитический и большая часть продуктов гидролиза ДНК представляет собой дезоксирибонуклеозид-3'-монофосфаты. Однако в очищенных ферментных препаратах обнаружена эндонуклеолитическая

активность, составляющая 1% от всей нуклеолитической активности неочищенного фермента. Она обнаружена по способности ферментов расщеплять кольцевую ДНК фага ϕ A. В настоящее время неизвестно, является ли экзонуклеаза свойством одного и того же с экзонуклеазой белка или это примесь постоянного фермента. Экзонуклеолитическая атака денатурированной ДНК начинается от 5'-конца. Нативная ДНК атакуется от 3'-конца, в результате чего, наряду с мононуклеотидами, образуется однонитчатая ДНК с 5'-концами, которая атакуется от 5'-конца. Таким образом, атака нативной ДНК происходит в двух противоположных направлениях.

Один из трех ферментов - нуклеаза BS IA был ранее подробно изучен Оказаки с сотрудниками [403]. Авторы отмечают, что в отсутствии Ca^{2+} нуклеаза не атакует нативную ДНК, в присутствии Ca^{2+} скорость гидролиза денатурированной ДНК выше, чем нативной. Оптимум pH гидролиза денатурированной ДНК и РНК - 9,5; нативной ДНК - 8,5.

В работе Керра с соавторами [301, 302] изучается действие фермента, аналогичного нуклеазе Bs II, на олигонуклеотиды с 3'- или 5'-Ф концами. Было показано, что олигонуклеотиды, имеющие 3'-фосфатную концевую группу, гидролизуются в 5-20 раз быстрее, чем олигонуклеотиды с 3'-ОН группой, причем ферментативная атака начинается с фосфатного, а не с гидроксильного конца, т.е. 3'-Ф-олигонуклеотиды атакуются с 3'-конца, 5'-Ф-олигонуклеотиды - с 5'-конца. Экзонуклеазы *Bac. subtilis* могут быть использованы для получения нуклеозид - 3'-фосфатов, для структурно-функционального исследования ДНК, а также как реагенты на 5'-концевые группы [289].

Нуклеаза Bs IO отличается от других трех ферментов тем, что гидролизует только денатурированную ДНК и обладает абсолютной потребностью в Ca^{2+} .

б) Экзонуклеаза *Lactobacillus acidophilus*

Выделенная из экстрактов клеток *L. acidophilus* и частично очищенная нуклеаза [220 - 222] отличается стабильностью при хранении при t 2° и pH 6,0-8,5;

более лабильна при кислых pH. Выдерживает нагревание до 60° при pH 1,3-3,0. Гидролизует разные субстраты при разных pH: тимидин-фосфат-нитрофенил гидролизуется при pH 7,8, бис-пара (нитрофенил) фосфат гидролизуется при pH 4,5, олигонуклеотиды - при кислых и слабо щелочных значениях pH.

Фермент атакует рибо- и дезоксирибоолигонуклеотиды исключительно с 5'-ОН конца цепи, последовательно освобождая нуклеозид-3'-фосфаты. Высокополимерные олигонуклеотиды гидролизуются медленнее низкополимерных. Высокополимерные ДНК и РНК вообще не атакуются нуклеазой *Lactobacillus acidophilus* в отличие от нуклеазы *Bac. subtilis*. Наряду с последней, этот фермент может использоваться для получения нуклеозид-3'-фосфатов и структурного анализа олигонуклеотидных цепей.

Рибонуклеинат-(дезоксирибонуклеинат)-5'-нуклеотидогидролазы-экзонуклеазы - КФ 3.1.4.1

а) Экзонуклеаза *Micrococcus sodonensis*

Фермент накапливается в среде в период логарифмического роста микробной популяции [168 - 171]. Проявляет два типа активности - нуклеазную и фосфомоноэстеразную. Оптимум pH действия - 8,8. ФМЭазная активность повышается в присутствии Mn^{2+} в концентрации $1,7 \times 10^{-3} M$, большие концентрации вызывают ингибирование. Нуклеазная активность повышается в присутствии Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} в концентрации $1,3 \times 10^{-2} M$, $1,7 \times 10^{-3} M$, $1,7 \times 10^{-3} M$ соответственно. Обе активности стимулируются хелатными агентами: такими, как глицин, гистидин, ЭДТА и сульфгидрильными компонентами: меркаптоэтанолом, цистеином. Ингибирование обеих активностей вызывают ПХМБ и аналоги пуриновых нуклеотидов: инозин-5'-хлорметилфосфонат и другие. ФМЭаза более термостабильна, чем нуклеаза. Нуклеаза *Micr. sodonensis* гидролизует нативную и денатурированную ДНК, РНК, поли-А и аденил-3',5'-аденозин. Тип гидролиза - экзонуклеолитический. Начало атаки - 3'-ОН конец. Для проявления активности необходимо наличие в подинуклеотидной цепи свободных 3'-ОН групп. Полинуклеотиды с 3'-фосфатной концевой группой не атакуются. Предпочтительно гидролизует одноцепочечные структуры. Фермент расщепляет все

3'-ФДЭ связи нуклеиновых кислот и полинуклеотидов, образуя нуклеозид-5'-фосфаты, которые немедленно дефосфолируются присутствующей здесь фосфатазой, так что продуктами гидролиза на разных стадиях являются нуклеозиды. Нуклеозид-3'-фосфаты, нуклеозид-дифосфаты, нуклеозид-трифосфаты не дефосфолируются ферментом.

Нуклеаза *Micr. sodonensis* может быть использована для препаративного получения нуклеозидов.

б) Экзонуклеаза *Thiobacillus thioararus*

Наряду с РНКазой в бесклеточном экстракте *Thiobacillus thioararus* обнаружена нуклеаза, гидролизующая ДНК и РНК [96]. Фермент очищен от РНКазы и 5'-нуклеотидазы, отличается термолabileностью и устойчивостью к высоким концентрациям NaOH. Максимальная активность проявляется при pH 9,0 в присутствии Mn^{2+} . Zn^{2+} оказывает ингибиторное действие. Кроме нативных ДНК и РНК, фермент гидролизует по экзонуклеолитическому типу "core" РНК, синтетические полинуклеотиды и Са-бис-пиранил-трофенилфосфат. Продукты гидролиза НК и нуклеотидов - нуклеозид-5'-фосфаты. По субстратной специфичности сходен с экзонуклеазой змеиных ядов [427, 38 и др.]. От вышеописанной нуклеазы *Micr. sodonensis* отличен отсутствием 5'-нуклеотидазной активности. Может использоваться для препаративного получения 5'-монынуклеотидов и для структурного анализа нуклеиновых кислот.

в) Экзонуклеаза *Lactobacillus acidophilus*

Аналогичный нуклеазе *Th. thioararus* фермент обнаружен в клетках *L. acidophilus* [448]. Максимальная активность нуклеазы проявляется при pH 8,0 в присутствии Mg^{2+} в концентрации $5 \times 10^{-4} M$ и стабилизирующего агента (дитиоловое производное). Нуклеаза гидролизует НК и олигонуклеотиды по экзонуклеолитическому типу, расщепляя 3'-ФДЭ связи и образуя в качестве конечных продуктов гидролиза 5'-монынуклеотиды. Пуриновые динуклеотиды гидролизуются с большей скоростью, чем пиримидиновые. В присутствии 5'-нуклеотидов замедляется гидролиз пара-нитро-фенил-5'-тимидинфосфата; 3'-нуклеотиды, напротив, активируют эту реакцию.

Нуклеаза *Lactobacillus acidophilus* наряду с нуклеазами *Th. thioararus* и *Micr. sodonensis* может найти применение для аналитических и практических целей.

Принятые сокращения

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота; РНК - рибонуклеиновая кислота; НК - нуклеиновые кислоты.

ДНКаз - дезоксирибонуклеаза.

РНКаз - рибонуклеаза.

ФДЭаз - фосфодиэстераза; ФМЭаз - фосфомоноэстераза.

ФДЭ связь - фосфодиэфирная связь.

АМФ, ГМФ, ЦМФ, УМФ, ТМФ, ИМФ - адениловая, гуаниловая, цитидиловая, уридилловая, тимидиловая, инозиновая кислоты соответственно;

НГФ - нуклеозидтрифосфат.

Поли-А, поли-Г, поли-Ц, поли-У, поли-Т - полиадениловый, полигуаниловый, полицитидиловый, полиуридилловый, политимидиловый кислоты.

"Д" перед символом нуклеотида или нуклеозида означает, что углеводным компонентом является дезоксирибоза.

Ф - фосфат, Фн - неорганический фосфат, Фо - общий фосфат, Фконц - концевой фосфат.

$N > \phi$ - нуклеозид-2',3'-циклофосфат, Ф - справа от символа нуклеозида - в 3'-положении, Ф - слева от символа нуклеозида - в 5'-положении, НФ-НФ и ФН - ФН - ФДЭ связь, которая атакуется в 5'- или 3'-положении соответственно, Н - означает, что к атакуемой ФДЭ связи примыкает любое основание соответствующей НК.

Пир - пиримидин, Пур - пурин.

АПир-ДНК - апириимидиновая ДНК.

АПур-ДНК - апуриновая ДНК.

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота.

УФ-облучение - ультрафиолетовое облучение.

ММС - метилметансульфонат.

КФ - классификация ферментов.

K_m - константа Михаэлиса.

K_i - константа ингибции.

КРП - кислоторастворимые продукты гидролиза.

пХМБ - п-хлормеркурибензоат.

САМ - S-аденозил-метионин.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. АБРОСИМОВА-АМЕЛЬЯНЧИК Н.М., ТАТАРСКАЯ Р.И., ВЕНКСТЕРН Т.В., АКСЕЛЬРОД В.Д., БАЕВ А.А. - Биохимия, 30, 1269, 1965.
2. АБРОСИМОВА-АМЕЛЬЯНЧИК Н.М., ТАТАРСКАЯ Р.И., БАЕВ А.А. Молекулярная биология, 1, 307, 1967.
3. АБРОСИМОВА-АМЕЛЬЯНЧИК Н.М., АРТАМОНОВА О.И., ТАТАРСКАЯ Р.И., БАЕВ А.А. Докл. АН СССР, 207, 985, 1972.
4. АГЛИУЛЛИНА Д.Г. - Сб. аспирантских работ, с.14. Казань, Изд-во КГУ, 1968.
5. АГЛИУЛЛИНА Д.Г. Выделение, очистка и изучение субстратной специфичности рибонуклеазы *Vac. amulozuma*. Автореферат канд. диссертации. Казань, 1969.
6. АГЛИУЛЛИНА Д.Г. Материалы Всесоюзного биохимического съезда, с.92. Ташкент, 1969.
7. АХРЕМ А.А., КУЗНЕЦОВА А.И. Тонкослойная хроматография. М., "Наука", 1965.
8. БАЕВ А.А. Нуклеазы, с.164. М., "Медицина", 1968.
9. БАЕВ А.А., ВЕНКСТЕРН Т.В., МИРЗАБЕКОВ А.Д., КРУТИЛИНА А.И., ЛИ Л., АКСЕЛЬРОД В.Д. - Молекулярная биология, 1, 754, 1967.
10. БАЛАБАН Н.П., ГИБАДУЛЛИНА А.Р., ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., МАЛЫЦЕВА С.В. - Сб.: Нуклеазы и некоторые аспекты их применения, с. III. Казань, Изд-во КГУ, 1968.
11. БАЛАБАН Н.П., ТАЯШИИ В.И., ЛЕЩИНСКАЯ И.Б. - Биохимия, 36, 513, 1971.
12. БАЛАБАН Н.П., ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., ТАЯШИИ В.И. - Биохимия, 36, 727, 1971.
13. БАСКАКОВА А.А., БАЛДИНА А.В., БЕЗБОРОДОВ А.М. - Микробиология, 36, 19, 1967.

14. БЕЗБОРОДОВ А.М., ИВАНОВА Г.С. - IX Международный конгресс по микробиологии. Тезисы, с. 196. М., "Медицина", 1966.
15. БЕЗБОРОДОВ А.М., БАСКАКОВА А.А., БАЛДИНА А.В. - Микробиология, 36, 390, 1967.
16. БЕЗБОРОДОВ А.М., БАСКАКОВА А.А., БАЛДИНА А.В. - Прикладная биохимия и микробиология, 4, 295, 1968.
17. БЕЗБОРОДОВА С.И., БОРОДАЕВА Л.И., ПАНКОВА Л.И. - Микробиология, 37, 10, 1968.
18. БЕЗБОРОДОВА С.И., БАГДАСАРЯН Э.Н. - Микробиология, 41, 773, 1972.
19. БЕЗБОРОДОВА С.И., БОРОДАЕВА Л.И. - Прикладная биохимия и микробиология, 7, 6, 1971.
20. БЕЗБОРОДОВА С.И., БОРОДАЕВА Л.И., ИВАНОВА Г.С., МОРОЗОВА В.Г. - Биохимия, 34, 1129, 1969.
21. БЕЗБОРОДОВА С.И., БАЗЕНКОВА Л.Б., ИЛЬИНА Т.В. - Микробиологическая промышленность, 1, 19, 1970.
22. БЕЗБОРОДОВА С.И., БОРОДАЕВА Л.И., БЕРЕЗИНА Н.Э. - Микробиология, 40, 589, 1971.
23. БЕЗБОРОДОВА С.И., ИЛЬИНА Т.В., ЗАХАРОВА Н.Г. - Биохимия, 36, 474, 1971.
24. БЕЙКА У.В., КЛЕЙНЕР Г.И., ГРЕН Э.Я. - Прикладная биохимия и микробиология, 6, 720, 1970.
25. БЕЛОВ И.С., БИКМУХАМЕТОВА А.В. - Сб.: Некоторые подходы к изучению биологической роли нуклеаз, с. 71. Казань, Изд-во КГУ, 1972.
26. БЕЛЯЕВА М.И. - Ученые записки КГУ, 124, 1, 3. Казань, Изд-во КГУ, 1964.
27. БЕЛЯЕВА М.И., ГИЗАТУЛЛИНА Н.К. - Сб.: Разрушение нуклеопротеидов и нуклеиновых кислот злокачественных опухолей с помощью микроорганизмов. Ученые записки КГУ, 118, 3, 13. Казань, Изд-во КГУ, 1958.
28. БЕЛЯЕВА М.И., НУЖИНА А.М., ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., ЮСУПОВА Д.В., САЙМАНОВА Р.А. - IX Международный конгресс по микробиологии. Тезисы. М., "Медицина", 1966.
29. БЕЛЯЕВА М.И., ТЫРЫГИНА Г.И., ЛЕЩИНСКАЯ И.Б. - Сб.: Нуклеазы и некоторые аспекты их применения, с. 125. Казань, Изд-во КГУ, 1968.

30. БЕЛЯЕВА М.И., НУЖИНА А.М., ГАБДУЛЛИНА Г.К., СОКОЛОВА Р.Б. - Сб.: Бактериальные нуклеазы и их действие на опухолевый рост, с. 97. Казань, Изд-во КГУ, 1969.

31. БЕЛЯЕВА М.И., ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., ТЫРЫГИНА Р.И., АГЛИУЛЛИНА Д.Г., БУЛГАКОВА Р.Ш. - Ферменты микроорганизмов, с. 170. М., "Наука", 1973.

32. БЕНИНГ Г.П. - Ученые записки КГУ, 124, 17. Казань, Изд-во КГУ, 1964.

33. БЕНИНГ Г.П. - Исследование биохимических свойств экстрацеллюлярной дезоксирибонуклеазы *Cory. diphtheriae*. Автореферат канд.диссертации. Казань, КГУ, 1968.

34. БОГАУТДИНОВ З.Ф. - Ученые записки КГУ, 124, 79. Казань, Изд-во КГУ, 1964.

35. БУДОВСКИЙ Э.И. - Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров, с. 320. М.-Л., "Наука", 1966.

36. БУЛГАКОВА Р.Ш. - Сб.: Изучение биологической роли нуклеаз, с. 129. Казань, Изд-во КГУ, 1971.

37. ВАНЮШИН Б.Ф. - Современные методы в биохимии, с. 236. М., "Медицина", 1964.

38. ВАСИЛЕНКО С.К. - Биохимия, 28, 602, 1963.

39. ВАСИЛЕНКО С.К., БАБКИНА Г.Т. - Биохимия, 30, 705, 1965.

40. ВЕНКСТЕРН Т.В. - Первичная структура транспортных рибонуклеиновых кислот. М., "Наука", 1970.

41. ВЕНКСТЕРН Т.В., БАЕВ А.А. - Спектры поглощения минорных компонентов и некоторых олигонуклеотидов рибонуклеиновых кислот. М., "Наука", 1967.

42. ВИТОЛ М.Я. Использование и химические превращения пиримидиновых производных аэробными почвенными микроорганизмами. Автореферат канд. диссертации. М., Изд-во МГУ, 1967.

43. ВИТОЛ М.Я., ДАКША Л.В. - Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами. П - Рига, Изд-во ЛГУ, 1973.

44. ВИТОЛ М.Я., ГАЙНУЛЛИНА Р., ЛЕЩИНСКАЯ И.Б. - Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами. I - Рига, Изд-во ЛГУ, 1972.

45. ВОЛЬДШТЕЙН Э.В., ТОМИЛИН Н.В. - Докл. АН СССР, 200, 1459, 1971.

46. ВОЛЬСКИЙ В.Х., МАКСИМОВА Л.Ф., ВИТОЛ М.Я., ЛАСМАНЕ А.А. - Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами, с. 97. Рига, Изд-во ЛГУ, 1972.
47. ГАРЕЙШИНА А.З. Бактериальные нуклеазы и их действия на опухолевый рост, с. 220. Казань, Изд-во КГУ, 1969.
48. ГАРЕЙШИНА А.З., ЮСУПОВА Д.В., БЕЛЯЕВА М.И. - Микробиология, 39, 1034, 1970.
49. ГИНОДМАН Л.М. Современные методы в биохимии, с. 37. М., "Медицина", 1964.
50. ГОРЯЧЕНКОВА Е.В. - Ферменты, с. 21. М., "Наука", 1964.
51. ГУСЕВА И.И. Изменение дезоксирибонуклеазной активности *Vas. amylozuya* под действием УФ-облучения. Автореферат канд. диссертации. Казань, Изд-во КГУ, 1965.
52. ГУСЕВА И.И. - Сб. аспирантских работ. Естественные науки, ч. I, с. 69. Казань, Изд-во КГУ, 1966.
53. ДАВИДОВА Е.Г., РАЧИНСКИЙ В.В. - Успехи химии, 34, 253, 1965.
54. ДАВИДОВА Е.Г., РАЧИНСКИЙ В.В. - Прикладная биохимия и микробиология, 3, 341, 1967.
55. ДЕТЕРМАН Г. - Гель-хроматография. М., "Мир", 1970.
56. ДИКСОН Г.Б. - Успехи биологической химии, 8, 278, 1967.
57. ДИКСОН М., УЭББ Э. - Ферменты. М., "Мир", 1966.
58. ДЭВИДСОН Дж. - Биохимия нуклеиновых кислот. М., "Мир", 1968.
59. ДЮРАН Ж., ГИТТО И. - IX Международный конгресс по микробиологии. Тезисы, с. 271. М., "Медицина", 1966.
60. ЗАЙЦЕВА Р.Н., БЕЛОЗЕРСКИЙ А.Н. - Микробиология, 26, 277, 1957.
61. ИВАНОВА Г.С. - Изучение внеклеточной рибонуклеазы актиноцетов. Автореферат канд. диссертации. Ленинград, 1969.
62. Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами. Ч. I и II. Рига, Изд-во ЛГУ, 1972, 1973.
63. КАЛИНИНА Н.А., ЧЕСТУХИН А.В., ПРОЗОРОВ Н.А., ШЕМЯКИН М.Ф. - Молекулярная биология, 7, 491, 1973.
64. КАСАТКИНА И.Д., БИСТРИЦКАЙТЕ Г.Б., ЖЕЛТОВА Е.Г. - Микробиология, 38, 41, 1969.

65. КУРИНЕНКО Б.М., ЮСУПОВА Д.В. - Некоторые подходы к изучению биологической роли нуклеаз, с. 3. Казань, Изд-во КГУ, 1972.
66. КЮНЕ М.Ф. - Бактериальные нуклеазы и их действие на опухолевый рост, с. 125. Казань, Изд-во КГУ, 1969.
67. ЛАСКОВСКИЙ М. - Методы исследования нуклеиновых кислот, с.12. М., "Мир", 1970.
68. ЛЕМАН И. - Нуклеиновые кислоты, с. 27. М., "Мир", 1966.
69. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б. - Ученые записки КГУ, 124, 39. Казань, Изд-во КГУ, 1964.
70. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б. - Ученые записки КГУ, с. 105. Казань, Изд-во КГУ, 1964.
71. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б. - Ученые записки КГУ, 124, 115. Казань, Изд-во КГУ, 1964.
72. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б. - Методы и некоторые результаты изучения нуклеиновых кислот и ферментов нуклеинового обмена, с.41. Казань, Изд-во КГУ, 1967.
73. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., БОГАУТДИНОВ З.Ф. - Микробиология, 32, 3, 412, 1963.
74. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., МАЛЫЦЕВА С.В. - Ученые записки КГУ, 125, с. 51, 1967.
75. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., ДЕГТЯРЕВА В.Н. - Микробиология, 37, 15, 1968.
76. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., БУЛГАКОВА Р.Ш. - Биохимия, 34, 1113, 1969.
77. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., ТАНЯШИН В.И., КУРИНЕНКО Б.М., КАЛАЧЕВА Н.В. - Микробиология, 35, 1094, 1966.
78. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., ТАНЯШИН В.И., КАЛАЧЕВА Н.В., ГИБАДУЛЛИНА А.Р. - Биохимия, 32, 93, 1967.
79. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., МАЛЫЦЕВА С.В., ГИБАДУЛЛИНА А.Р., ТЫРГИНА Г.И., ТАНЯШИН В.И. - Прикладная биохимия и микробиология, 3, 711, 1967.
80. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., БАЛАБАН Н.П., ГУБАЙДУЛЛИНА Т.С. - Биохимия, 34, 902, 1969.
81. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., ЮСУПОВА Д.В., САЙМАНОВА Р.А., ВЕДУНОВА Н.А., ГУБАЙДУЛЛИНА Т.С. - Сб.: Бактериальные нуклеазы и их

действие на опухолевый рост, с. 165, Казань, Изд-во КГУ, 1969.

82. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., БАЛАБАН Н.П., ТАНАШИН В.И. - Микробиология, 40, 806, 1971.

83. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., БАЛАБАН Н.П., ЕГОРОВА Г., ТАНАШИН В.И., ТРЕТЬЯК Т.М. - Биохимия, 43, 1, 1974.

84. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., БЕЛЯЕВА М.И., БУЛГАКОВА Р.Ш. - Материалы I Симпозиума по рибосомам и метаболизму РНК. Братислава, Словацкая Академия наук, 1973.

85. ЛЕЩИНСКАЯ И.Б., БУЛГАКОВА Р.Ш., БАЛАБАН Н.П., ЕГОРОВА Г.С. - Биохимия, 43, 2, 1974.

86. ЛИБИНСОН Г.С. - Физико-химические свойства карбоксильных катионитов. М., "Наука", 1969.

87. МАЗИН А.Л., ВАНЮШИН Б.Ф. - Биохимия, 32, 377, 1967.

88. МАРКОВИЧ А.В., ПЕТРОВА Л.Я. - Кн.: Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров, с. 206. М.-Л., "Наука", 1966.

89. МИХАЙЛОВА И.Ю., СПИРИДОНОВА В.А., БОГДАНОВ А.А. - Биохимия, 36, 774, 1971.

90. МОРОЗОВА В.Г., БЕЗБОРОДОВА С.И. - Биохимия, 37, 959, 1972.

91. НАУМОВ Л.С., ПРОЗОРОВ А.А., САВЧЕНКО Г.В., КАЛИНИНА Н.А., ЧЕСТУХИН А.В., ШЕМЯКИН М.Ф. - Генетика, IX, 171, 1973.

92. НИКОЛАЕВ А.Я. - Успехи химии, 32, 1087, 1963.

93. НИКОЛЬСКАЯ И.И., КИСЛИНА О.С., ТИХОНЕНКО Т.И. - ДАН СССР, 157, 475, 1964.

94. НУЖИНА А.М., БЕЛЯЕВА М.И., БАЛАБАН Н.П., ВИНТЕР В.Г. - Сб.: Бактериальные нуклеазы и их действие на опухолевый рост, с. 113, 139. Казань, Изд-во КГУ, 1969.

95. Нуклеазы микроорганизмов. М., "Наука", 1974.

96. ОСТРОВСКИЙ В., ВАЛЬЧАК З. - У Международный биохимический конгресс. Тезисы, I, 179. М., 1962.

97. ПАΡΙБОК В.П., ТОМИЛИН Н.В. Докл. АН СССР, 195, 2, 1970.

98. ПАРСНИЦКАЯ А.И. - Исследование рибонуклеаз нерестующей горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Walb. Автореферат канд. диссертации. Киев, 1972.

99. ПЕХОВ А.П. - Успехи современной биологии, 70, 192, 1970.

100. ПОММЕРЕ Д.Э., ВАБЕРЕ А.К., ВИТОЛ М.Я. - Сб.: Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами, с. 105. Рига, Изд-во ЛГУ им. П. Стучки, 1972.

101. ПРЕОБРАЖЕНСЬКА Н.Ю., БОЙКО О., МИЛЬЧЕНКО К.П. Материалы конференции, посвященной 100-летию со дня рождения акад. Заболотного Д.К., 167. Киев, "Наукова думка", 1968.

102. ПРЕОБРАЖЕНСЬКА Н.Ю., КОЛЕСОВА Е.А. - Микробиол. ж., 32, 680, 1970.

103. ПРЕОБРАЖЕНСЬКА Н.Ю., ОРИЩУК Л.Ф. - Микробиол.ж., 32, 515, 1970.

104. ПРОЗОРОВ А.А., НАУМОВ Л.С., БАРАБАНЩИКОВ Б.И., САВЧЕНКО Г.В., ЧЕСТУХИН А.В., ШЕМЯКИН М.Ф. - Генетика, 9, 118, 1973.

105. РАССКАЗОВ В.А. Дезоксирибонуклеазы камбалы желтопалосой *Ps. herzensteini*. Автореферат канд.диссертации. Владивосток, 1972.

106. Рекомендация по классификации и номенклатуре ферментов. Под ред. А.Е.Кретовича. М., "Наука", 1966.

107. САЙМАНОВА Р.А. - Сб.: Бактериальные нуклеазы, с. 62. Казань, Изд-во КГУ, 1964.

108. САЙМАНОВА Р.А. - Сб.: Бактериальные нуклеазы, с.67. Казань, Изд-во КГУ, 1964.

109. САЙМАНОВА Р.А. - Сб.: Методы и некоторые результаты изучения нуклеиновых кислот и ферментов нуклеинового обмена, с. 21, 31. Казань, Изд-во КГУ, 1967.

110. САЙМАНОВА Р.А., АМИНОВА Ф.И. - Сб.: Бактериальные нуклеазы и их действие на опухолевый рост, с. 171. Казань, Изд-во КГУ, 1969.

111. САЙМАНОВА Р.А., СОШНИКОВА Г.Д. - Сб.: Нуклеазы и некоторые аспекты их применения, с. 71. Казань, Изд-во КГУ, 1968.

112. САЙМАНОВА Р.А., ЮСУПОВА Д.В. - Микробиология, 32, 27, 1963.

113. САМСОНОВ Г.В. Физико-химические методы изучения анализа и фракционирования биополимеров, с. 187, 109. М.-Л., "Наука", 1966.

114. СКВИРСКАЯ Э.Б., ЧЕПИНОГА О.П. - Практикум по нуклеопротеидам, М., "Высшая школа", 1964.

- II5. СПИРИН А.С. Биохимия, 23, 656, 1958.
- II6. ТАНАШИН В.И. - Сб.: Нуклеазы и некоторые аспекты их применения, с. 51. Казань, Изд-во КГУ, 1968.
- II7. ТАНАШИН В.И. Тезисы симпозиума докладов III Всесоюзного Биохимического съезда. Рига, 1974, с. 44.
- II8. ТАТАРСКАЯ Р.И. Успехи биологической химии, II, 68, 1970.
- II9. ТАТАРСКАЯ Р.И., АБРОСИМОВА-АМЕЛЬЯНЧИК Н.М., АКСЕЛЬ-РОД В.Д., КОРЕНЯКО А.И., ВЕНКСТЕРН Т.В., МИРЗАБЕКОВ А.Д., БАЕВ А.А. - ДАН СССР, 157, 725, 1964.
120. ТАТАРСКАЯ Р.И., АБРОСИМОВА-АМЕЛЬЯНЧИК Н.М., АКСЕЛЬ-РОД В.Д., КОРЕНЯКО А.И., НИЕДРА Н.Я., БАЕВ А.А. Биохимия, 31, 1017, 1966.
121. ТАТАРСКАЯ Р.И., КОЛЫЦОВ В.Д., КОРЕНЯКО А.И. - ДАН СССР, 173, 463, 1967.
122. ТЫРЫГИНА Г.И. Изучение нуклеотидного состава ДНК и субстратной специфичности ДНКазы *Bac. subtilis* и его мутанта, полученного под действием азотистой кислоты. - Автореферат канд.диссертации. Казань, 1968.
123. ТЫРЫГИНА Г.И., БЕЛЯЕВА М.И., ЛЕЩИНСКАЯ И.Б. Биохимия, 35, 415, 1970.
124. ТЮРИНА Г.П. - Сб. аспирантских работ, ч. I, с. 59 и 65. Казань, Изд-во КГУ, 1966.
125. УАЙАТТ Г. Нуклеиновые кислоты, с. 443. М., ИЛ, 1957.
126. ФОДОР И. Успехи современной биологии, 71, 331, 1971.
127. ЧЕРКАСОВ И.А. Успехи химии, 41, 1911, 1972.
128. ЧУДИНОВА И.А., КРЕЧЕТОВА Г.Д., ШАПОВ В.С. Биохимия, 30, 759, 1965.
129. ШАПОВ В.С. Нуклеазы. М., "Медицина", 1968.
130. ЭГАМИ Ф., ТАКАХАСИ К., УЧИДА Г.П. Нуклеиновые кислоты, с. 144. М., "Мир", 1966.
131. ЭЙГНЕР Дж. Методы исследования нуклеиновых кислот, с. 224. М., "Мир", 1970.
132. КУСУПОВА Д.В., ЛЕЩИНСКАЯ И.Б. Микробиология, 33, 224, 1964.
133. КУСУПОВА Д.В., СТЕПАНОВА Л.Г. - Сб.: Изучение биологической роли нуклеаз. Казань, Изд-во КГУ, 1971.

134. ЮСУПОВА Д.В., САЙМАНОВА Р.А., ЛЕТИНСКАЯ И.Б., БЕЛЯЕВА М.И., СОКОЛОВА Р.Б. Ферменты микроорганизмов, с. 163.М., "Наука", 1973.
- 134a. ABRELL J.W. Arch. Biochem. Biophys., 142, 693, 1971
135. ADLER S.P., NATHANS D. Biochim. Biophys. Acta, 299, 177, 1973.
136. ALLET B., JEPPESEN P.G., KATAGIRI K.J., DELIUS H. Nature New Biol., 241, 120, 1973.
137. AMBROSOLI G., CIARLINI E., LAZZARINI. Jgeine mod., 59, 637, 1966.
138. ANAI M., HIRAHASHI T., YAMANAKA M., TAKAGI Y. J. Biol. Chem., 245, 765, 1970.
139. ANAI M., HIRAHASHI T., YAMANAKA M., TAKAGI Y. J. Biol. Chem., 245, 775, 1970.
140. ANDERSON E.P., HEPPEL L. Biochim. Biophys. Acta, 43, 59, 79, 1960.
141. ANDO T. Biochim. Biophys. Acta, 114, 158, 1966.
142. ANDREWS P. Biochem. J., 91, 222, 1964.
143. ANFINSEN C., REIDFIELD R., CHROOTE W., PAGE J., CARROL W. J. Biol. Chem., 207, 201, 1954.
144. ANFINSEN C. Pure and Appl. Chem., 17, 461, 1968.
145. ANFINSEN C., CORLEY L. J. Biol. Chem., 244, 5149, 1969.
146. ANFINSEN C., CUATRECASAS P., TANIUCHI H. The Enzymes, 4 (VII), 77, N.Y.-London, Acad. Press, 1971.
147. ANRAKU Y. J. Biol. Chem., 239, 3412, 1964.
148. ANRAKU Y., MIZUNO D. Biochem. Biophys. Res. Comm., 18, 462, 1965.
149. ANRAKU Y., MIZUNO D. Biochemistry, 61, 70, 1967.
150. AQVIST S., ANFINSEN C. J. Biol. Chem., 234, 1112, 1959.
151. ARBER W., LINN S. Ann. Rev. Biochem., 38, 467, 1969.
152. ARIMA T., UCHIDA T., EGAMI F. Biochem. J., 106, 601, 1968.
153. ARIMA T., UCHIDA T., EGAMI F. Biochem. J., 106, 613, 1968.

154. ARNONE A., BIER C., COTTON F.A., HAZEN E.E., RI -
CHARDSON D.C., RICHARDSON J.S. Proc. Nat. Acad. Sci., 64, 420,
1969.
155. ARTMAN M., SILMAN N., ENGELBERG H. Biochem. J. 104,
878, 1967.
156. BACCHETTI S., A van de PLAS, VELDNUISEN G. Biochem.
Biophys. Res. Comm., 48, 662, 1972.
157. BACOVA M., ZELINKOVA E., ZELINKA J. Biochim. Bio -
phys. Acta, 235, 335, 1971.
158. BARBOUR D.S., CLARK A.J. Proc. Nat. Acad. Sci., 65,
955, 1970.
159. BARBOUR D.S., NAGAISHI H., TEMPLIN A., CLARK A.J.
Proc. Nat. Acad. Sci., 67, 128, 1970.
160. BENKOWER I., LEIS J., HURWITZ J. J. Biol. Chem.,
248, 5914, 1973.
161. BERDYSHEV G.D., RASSKAZOV V.A., KOINUYSHINA T.V.,
Comp. Biochem. Physiol., 40, 1057, 1971.
162. BARNARD E.A. Ann. Rev. Biochem., 38, 677, 1969.
163. BERNARDI G. Advances in Enzymol. a. Related Sub-
jects. Biochem., 31, 1, 1968.
164. BERNARDI G. The Enzymes, 4 (VII), 271, N.Y.- Lon-
don, Acad. Press, 1971.
165. BERNARDI A., BERNARDI G. The Enzymes, 4 (VII) ,
329, N.Y.- London, Acad. Press., 1971.
166. BERNARDI G., GRIFFE M., APHELLA E. Nature, 198 ,
186, 1963.
167. BERNARDI G., CORDONNIER C. J. Mol. Biol., 11, 141,
1965.
168. BERRY S., CAMPBELL J. Biochim. Biophys. Acta, 132,
78, 1967.
169. BERRY S., CAMPBELL J. Biochim. Biophys. Acta, 132,
84, 1967.
170. BERRY S., CAMPBELL J. Biochim. Biophys. Acta, 220,
256, 1970.
171. BERRY S., JONSON K., CAMPBELL J. Biochim. Biophys.
Acta, 220, 269, 1970.

- 171a. BICKLE T.A., HADI S.M., YUAN R. In Abstr. Commun. 9th Meet. FEBS, Budapest, 1974.
172. BIGGER C.H., MURRAY K., MURRAY N.E. Nature New Biol., 244, 7, 1973.
173. BILLETTER M.A., DAHEBERG J.E., GOODMAN M., HINDLEY J., WEISSMAN C. Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol., 34, 635, 1969.
174. BIRNBOIM H.C. J. Bact., 91, 1004, 1966.
175. BJORK W. Biochim. Biophys. Acta, 95, 652, 1965.
176. BLATTNER F., ERIKSONN H. Inform. EXCH. Group. 7, Sci. Memo, 599, 1966.
177. BOYER H.W. Annual Rev. Microbiol., 25, 153, 1971.
- 177a. BOYER H.W., CHOW L.T., DUGAICZYK A., HEDGPETH J., GOODMAN H.M. Nature New Biology, 244, 40, 1973.
178. BRUTLAG D., ATKINSON M., SETLOW P., KORNBERG A. Biochem. Biophys. Res. Comm., 37, 982, 1969.
179. BRUTLAG D., KORNBERG A. J. Biol. Chem., 247, 241, 1972.
180. BRYAN L.E., RAZZELL W.E., CAMPBELL J.N. J. Biol. Chem., 247, 1236, 1972.
181. BURTON K. Biochem. J., 77, 547, 1960.
182. BUTTIN G., WRIGHT M. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33, 259, 1968.
183. CARRIER W.L., SETLOW R.B. Biochim. Biophys. Acta, 129, 318, 1966.
184. CARRIER W.L., SETLOW R.B. J. Bacter., 102, 178, 1970.
185. CENTER M.S., BEHAL F.J. Biochim. Biophys. Acta, 151, 698, 1968.
186. CERI H., MAEBA P.Y. Biochim. Biophys. Acta, 312, 337, 1973.
187. CHAKRABUTTY K., BURMA D. J. Biol. Chem., 243, 1133, 1968.
188. CHESTUKHIN A.V., SHEMYAKIN M.F., KALININA N.A., PROZOROV A.A. FEBS LETTERS, 24, 121, 1972.
189. COMMON K., WADE H. Biochem. J., 96, 671, 1965.
190. CORDONNIER C., BERNARDI G. Biochem. Biophys. Res. Comm., 20, 555, 1965.

191. CORDONNIER C., BERNARDI G. Biochem. J., 94, 12p, 1965.
- 191a. CREEDON I., JOHNSON A., WINDER F. In: Abstr. Commun. 9th Meet. FEBS, Budapest, 1974.
192. CROOK E., MATHIAS A., RABIN B. Biochem. J., 74, 234, 1960.
193. CUATRECASAS P. J. Biol. Chem., 245, 574, 1970.
194. CUATRECASAS P., WILCHEK M., ANFINSEN C. Proc. Nat. Acad. Sci., 61, 636, 1968.
195. CUNNINGHAM L., CATLIN W., PRIVAT DE GARILHE M. J. Am. Chem. Soc., 78, 4642, 1956.
196. DANNA K.J., SACK G.H., NATHAUS JR a. D. J. Mol. Biol., 78, 363, 1973.
197. DEUTSCHER M., KORNBERG A. J. Biol. Chem., 244, 3019, 1969.
198. DEUTSCHER M., KORNBERG A. J. Biol. Chem., 244, 3029, 1969.
- 198a. DOLY J., SASARMAN E., ANAGNOSTOPOULOS C. Mutation Research, 22, 15, 1974.
199. DONELSON J.E., WU R. J. Biol. Chem., 247, 4661, 1972.
200. DORP B.V., CEULEN M.TH.E., HEIJNEKER H.L., POWELS P.H. Biochim. Biophys. Acta, 299, 65, 1973.
201. DOSCOCIL J., SORMOVA Z. Biochim. Biophys. Acta, 95, 513, 1965.
202. DOTY P., BOEDTKER H., FRESCO J.R., HASELKORN R., LITT M. Proc. nat. Acad. Sci., 45, 482, 1959.
203. DUBO J., THOMPSON R. J. Biol. Chem., 124, 501, 1938.
204. DULANEY J., TOUSTEE O. J. Biol. Chem., 247, 1424, 1972.
205. DUNN J.J., STUDIER F.W. Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 3296, 1973.
206. EAVES C., JEFFRIES C. J. Bacter., 85, 273; 1194, 1963.
207. EDGELL M.H., HUTCHISON C.A., SCLAIR M. J. Virol., 9, 574, 1972.
208. EGAMI F., NAKAMURA K. Microbiol. ribonucleases. Berlin-N.Y. Springer - Verlag, 1969.

209. EISENBERG C. Compt. Rend. Soc. Biol., 62, 431, 1907.
210. ELEY J. Biochemistry, 8, 1502, 1969.
211. ELEY J., CRAWFORD K. Biochem. Biophys. Res. Comm., 43, 1064, 1971.
212. ELSON D. Biochim. Biophys. Acta, 36, 372, 1959.
213. EMMERICH R., LÖW O. Zeitschrift f. Hyg., 31, 1, 1899.
214. ENGLUND P., KELLY R., KORNBERG A. J. Biol. Chem., 244, 3045, 1969.
215. Enzyme Nomenclature. Recommendations (1972) of the Commission on Biochemical Nomenclature on the Nomenclature and Classification of Enzymes together with their Units and the Symbols of Enzyme Kinetics. Elsevier (Netherlands), 1973.
216. ESKIN B., LINN S. J. Biol. Chem., 247, 6183, 1972.
217. ESKIN B., LINN S. J. Biol. Chem., 247, 6192, 1972.
218. FELIX F., POTTER J., LASKOWSKI M. J. Biol. Chem., 235, 1150, 1960.
219. FIERS W., VANDENDRIESSCHE L. Arch. Intern. Biochim., 69, 339, 1961.
220. FIERS W., SINSHEIMER R. J. Mol. Biol., 5, 408, 1962.
221. FIERS W., KHORANA H. J. Biol. Chem., 238, 2780, 1963.
222. FIERS W., KHORANA H. J. Biol. Chem., 238, 2789, 1963.
223. FISKE C., SUBBAROW G. J. Biol. Chem., 66, 375, 1925.
224. FRIEDBERG E., GOLDTHWAIT D. Feder. Proc., 27, 796, 1968.
225. FRIEDBERG E., GOLDTHWAIT D. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33, 271, 1968.
226. FRIEDBERG E., GOLDTHWAIT D. Proc. Nat. Acad. Sci., 62, 934, 1969.
227. FRIEDBERG E., HADI S., GOLDTHWAIT D. J. Biol. Chem., 244, 1969.
228. FRIEDMAN E., SMITH H. J. Biol. Chem., 247, 2846, 1972.

229. FRIEDMAN E., SMITH H. J. Biol. Chem., 247, 2859,
1972.
230. GARDONIO E., LOGAN D. Biochemistry, 10, 4496, 1971.
231. GARDONIO E., LOGAN D. Biochemistry, 10, 4500, 1971.
232. GEORGATSOS J. Biochim. Biophys. Acta, 95, 544, 1965.
233. GEORGATSOS J., LASKOWSKI M. Biochemistry, 1, 288,
1962.
234. GLITZ D., DEKKER C. Biochemistry, 3, 1391; 1399,
1964.
235. GOEBEL W., HELINSKI D. Biochemistry, 9, 4793, 1970.
236. GOEBEL W., HELINSKI D. J. Biol. Chem., 246, 3851 ,
1971.
237. GOEBEL W., HELINSKI D. J. Biol. Chem., 246, 3857,
1971.
238. GOLDMARK P., LINN S., Proc. Nat. Acad. Sci., 67,
434, 1970.
239. GOLDMARK P., LINN S. J. Biol. Chem., 247, 1849 ,
1972.
240. GORELIC L., APIRION D. Biochem. Biophys. Res. Comm.,
44, 1184, 1971.
241. GORELIC L., APIRION D. FEBS Let., 30, 133, 1973.
242. GREY E.D., YASMINEH W.G., Biochemistry, 7, 98, 1968.
243. GROMKOVA R., GOODGAL S. J. Bacter., 109, 987, 1972.
244. GROSSMAN L., KAPLAN J., KUSHNER S., MAHLER L. Cold
Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33, 229, 1968.
245. GUNTHER J., GOODGAL S. J. Biol. Chem., 245, 5341,
1970.
246. GUSCHLBAUER W., HULLECK F. H.S.Z. Physiol. Chem.,
323, 121, 1961.
247. HADI S.M., GOLDTHWAIT D.A. Biochemistry, 10, 4986,
1971.
248. HADI S.M., KIRTIKAR D., GOLDTHWAIT D.A. Biochemist-
ry, 12, 2747, 1973.
249. HEIJNEKER H.L., ELLENS D.J., TJEERDE R.H., GLICKMAN
B.W., VAN DORP B., POWELS P.H. Molec. gen. Genet., 124, 83,
1973.

250. HAHN L., VON EULER N. Arch. Chem. Mineral. Geol., 2, 11pp., 1946.
251. HAKIM A.A. Enzymologia, 22, 67, 1958.
252. HARTLEY R.W., RUSHIZKY G.W., GRECO A.E., SOBER H.A. Biochemistry, 2, 794, 1963.
253. HARTLEY R.E. Biochemistry, 7, 2401, 1968.
254. HARTLEY R.W. Biochemistry, 8, 2929, 1969.
255. HARTLEY R.W. Biochim. Biophys. Res. Comm., 40, 263, 1970.
256. HARTLEY R.W., BARKER E. Nature New Biol., 235, 15, 1972.
257. HARWOOD S., SCHENDEL P., WELLS R. J. Biol. Chem., 245, 5614, 1970.
258. HARWOOD S., SCHENDEL P., MILLER L., WELLS R. Proc. Nat. Acad. Sci., 66, 595, 1970.
259. HASHIMOTO J., UCHIDA T., EGAMI F. Biochim. Biophys. Acta, 199, 535, 1970.
260. HAUSEN P., STEIN H. Eur. J. Biochem., 14, 278, 1970.
261. HEDGPETH J., GOODMAN H.M., BOYER H.W. Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 3448, 1972.
- 261a. HENRY C.M., FERDINAND F.-J., KNIPPERS R. Biochem. Biophys. Res. Comm., 50, 603, 1973.
262. HEPPEL L., HILMOE R. In: "Methods in Enzymol.", 2, 565, 1955.
263. HEPPEL L. In: "Procedures in Nucleic Acid Research" N.Y.-London, 1, 31, 1966.
264. HINO T., UOZUMI T., TAMURA G., ARIMA K. Agr. Biol. Chem., 35, 1109, 1971.
265. HIRAMURU M., UCHIDA T., EGAMI F. J. Biochem., 65, 693, 701, 1969.
266. HIROSE S., IGARASHI K., NABA T., TSUDA Y., MINATO A. J. Biochem., 69, 951, 1971.
267. HOLLEY P., APGAR J., EVERETT G., MADISON J., MAR - QUISSE M., MERRILL S., PENSWICK J., ZAMIR A. Science, 147, 1462, 1965.
- 267a. HOLÝ A. In: Ribosomes a. RNA metabolism, Bratislava, p.571, 1973.

268. HOLMES R.K., SINGER M.F. J. Biol. Chem., 248, 2014, 1973.
- 268a. HORII ZEN-ICHIRO, CLARK A.J. J. Mol. Biol., 80, 327, 1973.
269. HOSOKAWA S., TRIE M. J. Biochem., 69, 683, 1971.
270. HOTCHKISS R., NOZAWA R., GABOR M. Proc. Nat. Acad. Sci., 68, 2866, 1971.
271. HOUT A., OOSTERBAAN R., POWWELLS P., DE JOUGE A. Biochim. Biophys. Acta, 204, 632, 1970.
272. HOUT A. Biochim. Biophys. Acta, 308, 366, 1973.
- 272a. HUMPHRIES P., GORDON R.L., McCONNELL D.J., CONNOLLY P. Virology, 58, 25, 1974.
273. IMAZAWA M., IRIE M., UKITA T. J. Biochem., 64, 595, 1968.
274. IRIE M. J. Biochem., 62, 509, 1967.
275. IRIE M. J. Biochem., 63, 649, 1968.
276. IRIE M. J. Biochem., 65, 133, 1969.
277. IRIE M. J. Biochem., 66, 569, 1969.
278. IRIE M. J. Biochem., 68, 31, 1970.
279. IRIE M., HARADA S., NEGI I., SAMJIMA T. J. Biochem. 69, 881, 1971.
280. JACOBSEN G.B., RODWELL V.W. J. Biol. Chem., 247, 5811, 1972.
281. JEFFRIES G., HOLTMAN F., GUSE D. J. Bact., 73, 4, 1957.
282. JOHNSON P.H., LASKOWSKI M. J. Biol. Chem., 243, 3421, 1968.
283. JORGENSEN S., KOERNER J. J. Biol. Chem., 241, 3090, 1966.
284. JOSEFSSON L., LANGERSTEDT S. Methods Biochem. Anal., 9, 39, 1962.
285. JOSSE J., KAISER A., KORNEBERG A. J. Biol. Chem., 236, 864, 1961.
286. JOVIN T., ENGLUND P., BERTSCH L., J. Biol. Chem., 244, 2996, 1969.
287. KADOHANA N., Mc CARTER J. Biochim. Biophys. Acta, 204, 120, 1970.

288. KAGEYAMA M. J. Gen. Appl. Microbiol., 16, 61, 1970.
289. KALNITSKY G., HUMMEL J., DIERKS C. J. Biol. Chem., 234, 1512, 1959.
- 289a. KANAMORI N., SAKABE K., OKAZAKI R. Biochim. Biophys. Acta, 335, 155, 1973.
- 289b. KANAMORI N., CAZZARELLI N.R., OKAZAKI R. Biochim. Biophys. Acta, 335, 173, 1973.
290. KAPLAN J., KUSHNER S., GROSSMAN L. Proc. Nat. Acad. Sci., 63, 144, 1969.
291. KAPLAN J., KUSHNER S., GROSSMAN L. Biochemistry, 10, 3315, 1971.
292. KARU A.E., LINN S. Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 2855, 1972.
293. KARU A.E., MAC KAY V., GOLDMARK P.J., LINN S. J. Biol. Chem., 248, 4874, 1973.
294. KASAI R., UCHIDA T., EGAMI F., YOSHIDA K., NOMOTO M. J. Biochem., 66, 389, 1969.
295. KASZUBIAK H. Genetica Polon., 5, 239, 1964.
296. KEIR H., MATHOG R., CARTER C. Biochemistry, 3, 1188, 1964.
297. KELLER W., CROUCH R. Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 3360, 1972.
298. KELLY R., ATKINSON M., HUBERMAN J., KORNBERG A. Nature, 224, 495, 1969.
299. KELLY T., SMITH H. J. Mol. Biol., 51, 393, 1970.
300. KELLY R., COZZARELLI N., DEUTSCHER M., LEHMAN I., KORNBERG A. J. Biol. Chem., 245, 39, 1970.
301. KERR J., PRATT E., LEHMAN I. Biochem. Biophys. Res. Comm., 20, 154, 1965.
302. KERR I., CHIEN J., LEHMAN I. J. Biol. Chem., 242, 2700, 1967.
303. KIM V., WOLF F. Bull. Torrey Bot. Club, 88, 1, 42, 1961.
304. KLENOW H., HEENINGSEN I. Proc. Nat. Acad. Sci., 65, 168, 1970.
305. KLENOW H., OVERGARD-HAUSEN K., PATKAR S. Eur. J. Biochem., 22, 371, 1971.

306. KLETT R., CERAMI A., REICH E. Proc. Nat. Acad. Sci., 60, 943, 1968.
307. KORNBERG A. Science, 163, 1410, 1969.
308. KUNITZ M. J. Gen. Physiol., 24, 15, 1940.
309. KUNITZ M. J. Biol. Chem., 164, 563, 1946.
310. KUNITZ M. J. Gen. Physiol., 33, 349, 1950.
311. KURNICK N. In: Methods of Biochem. Anal., 2, 1, 1962.
312. KUWANO M., KWAN C., APIRION D., SCHLESSINGER D. Proc. Nat. Acad. Sci., 64, 693, 1969.
313. KUWANO M., SCHLESSINGER D., APIRION D. Nature, 226, 514, 1970.
314. LACK S., GREENBERG B. J. Biol. Chem., 242, 3108, 1967.
315. LA RUE T.A., SPENCER I.F. Canad. J. Microbiol., 14, 79, 1968.
316. LASKOWSKI M. Postepy Biochemii, VI, 3, 1960.
317. LASKOWSKI M. Enzymes 5, N.Y., Acad. Press., 1961.
318. LASKOWSKI M. Advances Enzymol. a. Related Subjects Biochem., 29, 166, 1967.
319. LASKOWSKI M. The Enzymes, IV, 289, N.Y.-London, Acad. Press., 1971.
320. LASKOWSKI M., SEIDEL M. Arch. Biochem. Biophys., 7, 465, 1945.
321. LEE S., NAKAO J., BOCK R. Biochim. Biophys. Acta, 151, 126, 1968.
322. LEES C., HARTLEY R. Biochemistry, 5, 3951, 1966.
323. LEHMAN I.R. J. Biol. Chem., 235, 1479, 1960.
324. LEHMAN I.R. Progress in Nucleic Acid Res. a. Mol. Biol., 2, 84, N.Y.-London, Acad. Press., 1963.
325. LEHMAN I.R. Ann. Rev. Biochem., 36, 645, 1967.
326. LEHMAN I.R. The Enzymes, 4 (VII), 251, N.Y., Acad. Press., 1971.
327. LEHMAN I.R., ROUSSOS G., PRATT E. J. Biol. Chem., 237, 819, 1962.
328. LEHMAN I., ROUSSOS G., PRATT E. J. Biol. Chem., 237, 829, 1962.
329. LEHMAN I., NUSSBAUM A. J. Biol. Chem., 239, 2628, 1964.

330. LEHMAN I., RICHARDSON C. J. Biol. Chem., 239 ,
233, 1964.
331. LEHMAN I., LINN S., RICHARDSON C. Federation
Proc., 24, 1466, 1965.
332. LENNETTE E.T., GORELIC L., APIRION D. Proc. Nat.
Acad. Sci., 68, 3140, 1971.
333. LEVENE P., MEDIGRECEANU F. J. Biol. Chem., 9,
389, 1911.
334. LEVY C.C. Biochim. Biophys. Acta, 246, 464, 1971.
335. LEVY C.C. Biochim. Biophys. Acta, 246, 476, 1971.
336. LEVY C.C., GOLDMANN P. J. Biol. Chem., 245, 3257,
1970.
337. LIBONATI M. Boll. Soc. It. Biol. Sper., 44, 786,
1968.
338. LIBONATI M. Boll. Soc. It. Biol. Sper., 44, 789,
1968.
339. LINDBERG U. Biochemistry, 6, 335, 1967.
340. LINDAHL T., EDELMAN G. Proc. Nat. Acad. Sci., 61,
680, 1968.
341. LINDAHL T., GALLY J., EDELMAN G. Proc. Nat. Acad.
Sci., 62, 597, 1969.
342. LINDAHL T. Eur. J. Biochem., 18, 415, 1971.
343. LINN S., ARBER W. Proc. Nat. Acad. Sci., 59, 1300,
1968.
344. LINN S., LEHMAN I. J. Biol. Chem., 240, 1287, 1965.
345. LOGAN D., SINGER M. J. Biol. Chem., 243, 6161, 1968.
346. LONGO D., KWAN C., CHERRICK H., APIRION D. Molec.
Gen. Genetics, 110, 54, 1971.
347. LORENZO F., MOLEA G., MOLINAZO M. Arch. Biochem.
Biophys., 146, 327, 1971.
348. LOWRY H., LOPEZ L. J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
349. MAC FADYEN D.A. J. Biol. Chem., 107, 297, 1934.
- 349a. MAC KAY V., LINN S. J. Biol. Chem., 249, 4286,
1974.
350. MADISON J., EVERETT G., KUNG H. Science, 153, 531,
1966.

351. MAHLER J., KUSHNER S., GROSSMAN L. Nature New Biol., 234, 47, 1971.
352. MARKHAM R., SMITH J. Biochem. J., 45, 294, 1949.
353. MARTIN W., EWING W. Canad. J. Microb., 13, 616, 1967.
354. MAVER M., GRECO A. J. Biol. Chem., 181, 853, 1949.
355. McCARTY C., NESTER E. J. Bacter., 97, 1426, 1969.
356. McFADYEN D.A. J. Biol. Chem., 107, 297, 1934.
357. MECHALI M., RECONDO A.-M., GIRARD M. Biochem. Biophys. Res. Comm., 54, 1306, 1973.
358. MENON K., SMITH M. Biochemistry, 9, 1584, 1970.
359. MESELSON M., YUAN R. Nature, 217, 1110, 1968.
360. MIDDLETON J.H., EDGELL M., HUTCHISON C. J. Virol., 10, 42, 1972.
361. MIKULSKI A.J., LASKOWSKI M. Biochem. Biophys. Res. Comm., 30, 318, 1968.
362. MILLER H.I., GILL G.N., RIGGS A.D. Fed. Proc., 31, 500 Abs., 1972.
363. MILLER L., WELLS R. Federat. Proc., 30, 1109, 1971.
364. MILLER L., WELLS R. J. Biol. Chem., 247, 2667, 1972.
365. MILLER L., WELLS R. J. Biol. Chem., 247, 2675, 1972.
366. MIN YON W., FIERIS W., GOODMAN H., SPAHR P. J. Mol. Biol., 42, 143, 1969.
367. MITCH W., LEVY C. Biochim. Biophys. Acta, 259, 69, 1972.
368. MOORE S., STEIN N. Science, 180, N4085, 458, 1973.
369. MORAIS R., BLACKSTEIN M., LAMIRANDE G. Arch. Biochem. Biophys., 121, 711, 1967.
370. MORIGUCHI E., SUZUKI K. Biochim. Biophys. Res. Comm. 24, 195, 1966.
371. MUKAI T., MATSUBARA K., TAKAGI Y. J. Biochem., 73, 1107, 1973.
372. MURRAY K. Biochem. J., 118, 831, 1970.
373. MURRAY N.E., BATTEN P.L., MURRAY K. J. Mol. Biol., 81, 395, 1973.
374. NABER J., SCHEPMAN A., RORSCH A. Biochim. Biophys. Acta, 144, 326, 1966.

375. NAKAI M., MINAMI Z., YAMAZAKI T., TSUGITA A. J. Biochem., 52, 96, 1965.
376. NAKAO Y., HOGAMI J., OGATA K. Agr. Biol. Chem., 27, 507, 1963.
377. NAKAO Y., OGATA K. Agr. Biol. Chem., 27, 116, 1963.
378. NAKAO Y., OGATA K. Agr. Biol. Chem., 27, 499, 1963.
379. NAKAYAMA H., OKUBO S., SEKIGUCHI M., TOKAGI Y. Biochem. Biophys. Res. Comm., 27, 217, 1967.
380. NESTLE M., ROBERTS W. J. Biol. Chem., 244, 5213, 1969.
381. NESTLE M., ROBERTS W. J. Biol. Chem., 244, 5219, 1969.
382. NEU N.C., HEPPEL L.A. Biochem. Biophys. Res. Comm., 17, 215, 1964.
383. NEU N.C., HEPPEL L.A. Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 1267, 1964.
384. NEU N.C., HEPPEL L.A. J. Biol. Chem., 239, 3893, 1964.
385. NEU N.C., HEPPEL L.A. J. Biol. Chem., 240, 3685, 1965.
386. NISHIMURA S. Biochim. Biophys. Acta, 45, 15, 1960.
387. NISHIMURA S. Procedures Nucleic Acid Res., p.56, 1966.
388. NISHIMURA S., NOMURA M. Biochim. Biophys. Acta, 30, 430, 1958.
389. NISHIMURA S., NOMURA M. J. Biochem., 46, 161, 1959.
390. NISHIMURA S., MARUO B. Biochim. Biophys. Acta, 40, 355, 1960.
391. NISHIMURA S., OZAWA H. Biochim. Biophys. Acta, 55, 421, 1962.
392. NISHIMURA S., NOVELLI G. Biochem. Biophys. Res. Comm., 11, 3, 1963.
393. NOBREGA F., ROLA F., PASETTO-NOBREGA M., OLSHI M. Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 15, 1972.
394. NOSSAL N., HEPPEL L. J. Biol. Chem., 241, 3055, 1966.
395. NOSSAL N., SINGER M. J. Biol. Chem., 243, 913, 1968.

396. NOSSAL N., TOLBERT M., SINGER M. *Feder. Proc.*, N1983, 1pp., 1967.
397. NOZAWA R., HORIUCHI T., MIZUNO D. *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 402, 1967.
398. OHI S., SUEOKA N. *J. Biol. Chem.*, 248, 7336, 1973.
399. OHTAKA Y., UCHIDA K., SAKAI T. *J. Biochem.*, 54, 322, 1963.
400. OISHI M. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 64, 1292, 1969.
401. OGATA K., NAKAO Y., IGARASI S., OMURA E., SUSINO Y., YONEVA M., SUHAR I. *Agr. Biol. Chem.*, 27, 110, 1963.
402. OGATA K., SONG SANG-DAB, YAMADA H. *Agr. Biol. Chem.*, 35, 58, 1971.
403. OKAZAKI R., OKAZAKI T., SAKABE K. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 22, 611, 1966.
404. OKAZAKI T., KORNBERG A. *J. Biol. Chem.*, 239, 259, 1964.
405. OSTROWSKI W., WALCZAK Z. *Acta Biochim. Polon.*, 8, 345, 1961.
406. OSTROWSKI W., WALCZAK Z., STASIAK L., LASKOWSKI M. *Acta Biochim. Polon.*, 17, 73, 1970.
407. OTTOLENGHI E., HOTCHKISS R. *J. Exp. Med.*, 111, 491, 1962.
408. PALADINI A., LELOIR L. *Biochem. J.*, 51, 426, 1952.
409. PARSNITSKAYA A., RASSKAZOV V., BERDYSHEV G. *Comp. Biochem. Physiol.*, 41, 263, 1972.
410. PETERSON E., SOBER H. *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 751, 1956.
411. PLENKE H. *H.S.Z. Physiol. Chem.*, 39, 190, 1903.
412. PORAT J. *Clin. Chim. Acta*, 4, 776, 1959.
413. PORAT J., FLODIN R. *Nature*, 183, 1657, 1959.
414. POTTER I., LASKOWSKI T. *J. Biol. Chem.*, 234, 1263, 1959.
415. POTTER I. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 124, 550, 1967.
416. PRICE P.A., LIN T., STEIN W., MOORE S. *J. Biol. Chem.*, 244, 917, 1969.
417. PRIVAT-DE-GARILHE M. *Les Nucleases*, Paris, 1964.
418. PRIVAT-DE-GARILHE M. *Enzymes in Nucleic Acid*

Research, Hermann, Paris, 1967.

419. PRIVAT-DE-GARILHE M., LASKOWSKI M. J. Biol. Chem., 215, 269, 1955.
420. PRIVAT-DE-GARILHE M., FASSINA G., POCHON F., PILLET J. Bull. Soc. Chim. Biol., 40, 1905, 1958.
421. RABIN E., TENENHOUSE H., FRASER M. Biochim. Biophys. Acta, 259, 50, 1972.
422. RAMON PINON Biochemistry, 9, 2839, 1970.
423. RANDERATH K., RANDERATH E. J. Chromatogr., 16, 111, 1964.
424. RAY R., BURMA D. Biochim. Biophys. Acta, 212, 102, 1970.
425. RAZIN S., KNYSZYNSKI A., LIFSHITZ Y. J. Gen. Microbiol., 36, 323, 1964.
426. RAZZEL W. J. Biol. Chem., 238, 3053, 1963.
427. RAZZEL W., KHORANA H. J. Biol. Chem., 234, 2105, 1959.
428. RAZZEL W., KHORANA H. J. Biol. Chem., 236, 1144, 1961.
429. REITER H., STRAUSS B. J. Mol. Biol., 14, 179, 1965.
430. REITER H., STRAUSS B., MARONE R., RIBBINS M. Biochem. Biophys. Res. Comm., 24, 892, 1966.
431. REITER H., STRAUSS B., ROBBINS M., MARONE R. J. Bacter., 93, 1056, 1967.
432. RICHARDS F., WYCKOFF H. The Enzymes, 4, (VII), 647, N.Y.-London, Acad. Press., 1971.
433. RICHARDSON C., LEHMAN I., KORNBERG A. J. Biol. Chem., 239, 251, 1964.
434. RICHARDSON C., KORNBERG A. J. Biol. Chem., 239, 242, 1964.
435. RICHARDSON C., SCHILDKRAUT C., KORNBERG A. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 9, 1963.
436. RIEBER M., PAZMINO N. Biochim. Biophys. Acta, 232, 410, 1971.
437. RILEY W. Biochemistry, 9, 4405, 4410, 1970.
438. ROBERTSON H., WEBSTER R., ZINDER N. Virology, 32, 718, 1967.

439. ROBERTSON H., WEBSTER R., ZINDER N. J. Biol.Chem., 243, 82, 1968.
440. ROGG H., STAEHELIN M. Biochim. Biophys. Acta, 262, 314, 1972.
441. ROTHBERG N., SWARTS T. J. Bacter., 90, 294, 1965.
442. ROULLAND-DUSSOIX D., BOYER H. Biochim. Biophys. Acta, 195, 219, 1969.
443. RUSHIZKY G., MOZEJKO J. Analyt. Biochem., 51, 328, 1973.
444. RUSHIZKY G., SOBER H. Biochim. Biophys. Acta, 55, 217, 1962.
445. RUSHIZKY G., GRECO A., HARTLEY R. Biochemistry, 2, 787, 1963.
446. RUSHIZKY G., GRECO A., HARTLEY R., SOBER H. J.Biol. Chem., 239, 2165, 1964.
447. RUSHIZKY G., MOZEJKO J., ROGERSON D., SOBER H. Biochemistry, 2, 4966, 1970.
448. SABATINI Z., HOTCHKISS R. Biochemistry, 8,4831,1969.
449. SADOWSKI P., GINSBERG B., YUDELEVICH A., FEINER L., HURWITZ J. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33, 165, 1968.
450. SALSER W., FRY K., BRUNK C., POON R. Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 238, 1972.
451. SATO S., EGAMI F. Biochim. Zeitschrift, 342, 437, 1965.
452. SALNIKOW J., MOORE S., STEIN W. J. Biol. Chem., 245, 5685, 1970.
453. SCHMIDT G. Methods in Enzymology, 3, 747, N.Y.-London, Acad. Press., 1957.
454. SETLOW R.B., CARRIER W.L. Nature New Biology, 241, 170, 1973.
455. SETLOW R.B., SETLOW K., CARRIER W.L. J. Bacter., 102, 187, 1970.
456. SETLOW R., BRUTLAG D., KORNBERG A. J. Biol. Chem., 247, 224, 1972.
457. SETLOW R., KORNBERG A. J. Biol. Chem., 247, 232, 1972.

458. SETLOW R., REGAN J., GERMAN J., CARRIER W. Proc. Nat. Acad. Sci., 64, 1035, 1969.
459. SHARP P.A., SUGDEN B., SAMBROOK J. Biochemistry, 12, 1855, 1973.
460. SHEMYAKIN M.F., CHESTUKHIN A.V., KALININA N.A., PROZOROV A.A. FEBS Let., 31, 31, 1973.
461. SHERRY S., GOELLER J. J. Clin. Investigation, 29, 1588, 1937.
462. SHIIO J., ICHII K., SHIMIZU S. J. Biochem., 59, 363, 1966.
463. SHIMADA K., NAKAYAMA K., OKUBO S., SEKIGUCHI H., TAKASI Y. Biochem. Biophys. Res. Comm., 27, 539, 1967.
464. SINGER M., TOLBERT G. Science, 145, 593, 1964.
465. SINGER M., TOLBERT G. Biochemistry, 4, 1319, 1965.
466. SLOR H., HODES M. Arch. Biochem. Biophys., 139, 172, 1970.
467. SMITH R. Canad. J. Microbiol., 15, 749, 1969.
468. SMITH H.O., FRIEDMAN E.A. J. Biol. Chem., 247, 2854, 1972.
469. SMITH H.O., WILCOX K.W. J. Mol. Biol., 51, 379, 1970.
470. SMITH M., KHORANA H. Methods in Enzymology, 6, 645, N.Y., Acad. Press., 1963.
471. SOEDA E., MUKAI J., AKUNE S. J. Biochem., 63, 14, 1968.
472. SPAHR P.F. J. Biol. Chem., 239, 3716, 1964.
473. SPAHR P., HOLLINGSWORTH B. J. Biol. Chem., 236, 823, 1961,
474. SPAHR P., SCHLEZINGER D. J. Biol. Chem., 238, 2251, 1963.
475. SPAHR P., GESTELAND R. Proc. Nat. Acad. Sci., 59, 876, 1968.
476. SPIZIZEN J. Federat. Proc., 18, 957, 1959.
477. STAEHELIN M. Biochim. Biophys. Acta, 87, 493, 1964.
478. STEIN H; HAUSEN P. Science, 166, 393, 1969.
479. STEVENS A., HILMOE R. J. Biol. Chem., 235, 3016, 3023, 1960.

480. STEVENS A., NIYOGI S. Biochem. Biophys. Res. Comm., 29, 550, 1967.
481. STOKLAZA J. Ctbl. Bact., 29, 385, 1911.
482. STRAUSS B. Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1670, 1962.
483. STRAUSS B. J. Gen. Microbiol., 30, 89, 1963.
484. STRAUSS B., ROBBINS M. Biochim. Biophys. Acta, 161, 68, 1968.
485. STRAUSS B., WAHL R. Biochim. Biophys. Acta, 80, 116, 1964.
486. STRAUSS B., COYLE M., ROBBINS M. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 277, 1968.
487. STREITFELD M.M., HOFFMAN E.M., JANKLOW H.M., J. Bacter., 84, 77, 1962.
488. STUDIER F.W. J. Mol. Biol., 11, 374, 1965.
489. SUGIMOTO H., IVASA T., YOKOTSUKA T. Agr. Chem. Soc. Japan., 39, 135, 1964.
490. SUHARA I. J. Biochem., 73, 1023, 1973.
491. SULKOWSKI E., LASKOWSKI M. J. Biol. Chem., 243, 651, 1968.
492. SZER W. Biochem. Biophys. Res. Comm., 35, 653, 1969.
493. TAKAGI Y., SEKIGUCHI M., OKUBO S., NAKAYAMA H., SHIMADA K., YASUDA S., NISHIMOTO T., YOSHIHARA H. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33, 219, 1968.
494. TAKAHASHI K. J. Biochem., 69, 331, 1970.
495. TAKAHASHI K., J. Biochem., 70, 945, 1971.
496. TAKAI N., UCHIDA T., EGAMI F. Biochim. Biophys. Acta, 128, 218, 1966.
497. TAKAI N., UCHIDA T., EGAMI F. J. Japan. Biochem. Soc., 39, 285, 1967.
498. TAKANAMI M. FEBS Let., 34, 318, 1973.
499. TAKANAMI M., KOJO H. FEBS Let., 29, 267, 1973.
500. TAL M., ELSON D. Biochim. Biophys. Acta, 76, 40, 1963.
501. TANIUCHI H., MORAVEK L., ANFINSEN CH.B. J. Biol. Chem., 244, 4600, 1969.

502. TANNER O., NOBREGA F., OISHI M. J. Mol. Biol., 67, 513, 1972.
503. TATARSKAYA R.I., LVOVA T.N., ABROSIMOVA-AMELYAN-CHIK N.M., KORENIAKO A., ALEXANDER A. Eur. J. Biochem., 15, 442, 1970.
504. TEUBER M., CERNY G. FEBS Letters, 8, 49, 1970.
505. THONG-SUNG K., GORELIC L., APIRION D. J. Biol. Chem., 248, 3748, 1973.
506. TOMLINSON R., TENER G. J. Amer. Chem. Soc., 84, 2644, 1962.
507. TSUDA J., STRAUSS B. Biochemistry, 3, 1678, 1964.
508. UCHIDA T. J. Biochem., 60, 115, 1966.
509. UCHIDA T., EGAMI F. Inform. Exch. Group, 7, Sci. Memo, 457, 1966.
510. UCHIDA T., EGAMI F. The Enzymes, 4 (VII), 205, N.Y.-London, Acad. Press., 1971.
511. UCHIDA T., ARIMA T., EGAMI F. J. Biochem., 67, 91, 1970.
512. UCHIDA T., SATO S. First Symp. Ribosom. a. RNA Metabol., Bratislava, Slovak Acad. Sci., 1973.
513. UKITA T., TAKAHASHI T., WAKU K., MOSHINO O. J. Biochem., 55, 298, 1964.
514. UOZUMI T., HINO T., TAMURA Y., ARIMA K. Agr. Biol. Chem., 36, 434, 1972.
515. URBA-HOLMGREN R., WEISBERG E.S. Nature, 193, 374, 1962.
516. USNER D., RICHARDSON D. Nature, 228, 663, 1970.
517. VALU J.A. J. Bacter., 91, 467, 1966.
518. VAN DEN HONDEL C.M., SCHOENMAKERS J.G.G. Mol. Biol. Reports, 1, 41, 1973.
519. VAN ORMONDT H., MAAGDENBERG J. Biochim. Biophys. Acta, 272, 141, 1972.
520. VENKOV P., SCHLESSINGER D., LONGO D. J. Bacter., 108, 601, 1971.
521. VENKOV P. Comp. Rend. Acad. Bulg. Sci., 26, 1253, 1973.
522. VOGT V.M. Eur. J. Biochem., 33, 192, 1973.
523. VOLGT H., MATTHALI H. H.S.Z. Physiol. Chem., 349,

54, 1968.

524. VOROS S. *Ann. Inst. Pasteur*, 116, 292, 1969.

525. VOVIS G.F. *J. Bacter.*, 113, 718, 1973.

526. VOVIS G.F., BUTTIN G. *Biochim. Biophys. Acta*, 224, 29, 1970.

527. VOVIS G.F., BUTTIN G. *Biochim. Biophys. Acta*, 224, 42, 1970.

528. WADE H., ROBINSON H. *Biochem. J.*, 101, 487, 1966.

529. WAGNER M. *Z. Bakter. Parasit. Inf. u. Hygiene*, 187, 499, 1963.

530. WALCZAK Z., OSTROWSKI W. *Acta Biochim. Polon.*, 11, 241, 1964.

531. WALTERS L., LORING H. *J. Biol. Chem.*, 241, 2870, 2881, 1966.

532. WANNAMAKER L. *Federat. Proc.*, 21, 231, 1962.

533. WANNAMAKER L., YASMINEH W. *J. Exptl. Med.*, 126, 475, 1967.

534. WANNAMAKER L., HAYES B., YASMINEH W. *J. Exptl. Med.*, 126, 497, 1967.

535. WEATHERFORD S.C., WEISBERG L.S., ACHORD D.T., APIRION D. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 49, 1307, 1972.

536. WHITFIELD P.R., WITZEL H. *Biochim. Biophys. Acta*, 72, 362, 1963.

537. WILLIAMS E., SUNG S., LASKOWSKI M. *J. Biol. Chem.*, 236, 1130, 1961.

538. WILSON C.M. *Plant. Physiol.*, 43, 1332, 1968.

539. WILSON C.M. *Plant. Physiol.*, 43, 1339, 1968.

540. WILSON C.M. *Plant. Physiol.*, 48, 64, 1971.

541. WINDER F. *Nature New Biol.*, 236, 75, 1972.

542. WINDER F., COUGHLAN M. *Biochem. J.*, 103, 59p., 467p., 1967.

543. WINDER F., COUGHLAN M. *Biochim. Biophys. Acta*, 134, 215, 1967.

544. WINDER F., COUGHLAN M. *Biochem. J.*, 111, 679, 1969.

545. WINDER F., LAVIN M. *Biochem. J.*, 115, 6p., 1969.

546. WINDER F., LAVIN M. *Biochem. J.*, 119, 3, 25p, 1970.

547. WINDER F., LAVIN M. Biochim. Biophys. Acta, 247, 542, 1971.
548. WINDER F., SASTRY P. FEBS Letters, 17, 27, 1971.
549. WINGERT L., HIPPEL P. Biochim. Biophys. Acta, 157, 114, 1968.
550. WRIGHT M., BUTTIN G. Bull. Soc. Chim. Biol., 51, 1374, 1969.
551. WRIGHT M., BUTTIN G., HURWITZ J. J. Biol. Chem., 246, 6543, 1971.
552. WYEN N., ERDELI S., FARKAS G. Biochim. Biophys. Acta, 232, 472, 1971.
553. WYERS F., SENTENAC A., FROMAGEOT P. Eur. J. Biochem., 35, 270, 1973.
554. YAMAGIDA M., UCHIDA T., EGAMI F. J. Agr. Chem. Soc. Japan (Nippon Nogei-Kagaku, Kaishi), 38, 551, 1964.
555. YAMAMOTO M. Biochim. Biophys. Acta, 228, 95, 1971.
556. YAMASAKI M., ARIMA K. Biochim. Biophys. Acta, 139, 202, 1967.
557. YAMASAKI M., ARIMA K. Biochem. Biophys. Res. Comm., 37, 430, 1969.
558. YAMASAKI M., ARIMA K. Biochem. Biophys. Acta, 209, 475, 1970.
559. YAMASAKI M., YOSHIDA K., ARIMA K. Biochim. Biophys. Acta, 209, 463, 1970.
560. YAMASAKI M., SUGI M., TAMURA G. Agr. Biol. Chem., 37, 2595, 1972.
561. YONEDA M. J. Biochem., 55, 469, 1964.
562. YONEDA M. J. Biochem., 55, 481, 1964.
563. YOSHIDA N., OTSUKA H. Biochim. Biophys. Acta, 228, 648, 1971.
564. YOUNGS D.A., BERNSTEIN I.A. J. Bacter., 113, 901, 1973.
565. YUAN H., MESELSOHN M. Proc. Nat. Acad. Sci., 65, 357, 1970.
566. YUAN H., HEYWOOD I., MESELSOHN M. Natur New Biol., 240, 42, 1972.

567. ZACHAU H., DUTTING D., FELDMANN H. H.S.Z.Physiol. Chem., 347, 212, 1966.

568. ZACHAU H., PHILIPPSEN P., STREECK R., HORZ W., HESS I. . Abstr. Comm. 9th FEBS Meeting, p.131, Budapest, HBS, 1974.

569. ZADRAZIL S. Chem. Listy, 66, 825, 1972.

570. ZELINCOVA E., BACOVA M., ZELINKA Y. Biochim. Biophys. Acta, 235, 335, 1971.

СО Д Е Р Ж А Н И Е

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	3
I. КЛАССИФИКАЦИЯ НУКЛЕОДЕПОЛИМЕРАЗ	7
I. Основные принципы классификации нуклеодеполи- мераз	7
2. Основные группы нуклеодеполимераз микроорга- низмов, животных и растений	II
II. НУКЛЕОДЕПОЛИМЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ САПРОФИТНЫХ БАК- ТЕРИЙ	4I
I. Методы определения нуклеодеполимеразной актив- ности. Особенности исследования нуклеодеполи- мераз бактерий	4I
2. Способность сапрофитных бактерий разных так- сономических групп секретировать нуклеодепо- лимеразы	48
3. Несекретируемые нуклеодеполимеразы бактерий..	6I
III. ПРЕПАРАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ НУКЛЕОДЕПОЛИМЕРАЗ БАКТЕРИЙ	70
I. Основные методы препаративного получения нук- леодеполимераз	70
2. Получение нуклеодеполимераз некоторых сапро- фитных бактерий	73
IV. БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НУКЛЕОДЕПОЛИМЕРАЗ БАКТЕРИЙ	9I
I. Анализ методов изучения биохимических свойств нуклеодеполимераз	9I
2. Основные группы нуклеодеполимераз сапрофит- ных бактерий	I04
А. Дезоксирибонуклеазы	I04
Б. Рибонуклеазы	I27
В. Нуклеазы, гидролизующие ДНК и РНК.....	I39

	Стр.
Принятые сокращения	148
ЛИТЕРАТУРА	149

Инна Борисовна Лецинская
Нуклеодеполимеразы сапрофитных бактерий

Редактор Шарафутдинова Р.З.
Техн. редактор Кузьмина Г.П.
Обложка художника Степанова Р.Н.

Сдано в набор 20/II-75 г. Подписано к печати II/У-75 г.
ПФ 06086. Форм.бум. 60x84 I/I6. Печ.л. II,25. Уч.-изд.л. IO,2.
Заказ 201. Тираж 600 экз. Цена 80 коп.

Издательство Казанского университета
Казань, Ленина, 4/5
Оффсетная лаборатория КГУ
Казань, Ленина, 4/5