

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного

На правах рукописи

Янчинова Зулайха Янфунковна

Внеклеточная РНКаза Acholeplasma laidlawii PG-8

03.00.07. - микробиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

К и е в - 1 9 9 3

ЛННБ України ім. В. Стефаніка



00802683 (R)

Робота виконана в відділі мікоплазмалогії Інститута мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного АН України

Научний керівник: член-кореспондент АН України, доктор біологічних наук Скрипаль І. Г.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор Захарова І. Я.

кандидат технічних наук
Стегин І. Н.

Ведуча організація: Научно-дослідницький інститут урології та нефрології МЗ України

Захист состоится [№] 14 ^{го} листопада 1993 року в 10 на засіданні спеціалізованого Ради Д. 016.06.01 при Інституті мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного АН України по адресу: 252143, Київ-143, ул. Заболотного, 154

С дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інститута мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного АН України

Автореферат розослан " 5 " октябрю 1993 г.

Учений секретар спеціалізованого ради кандидат біологічних наук *Жолт* З. А. Коваленко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время имеются многочисленные сведения о распространении в природе РНКаз дрожжей, плесневых грибов и бактерий различных таксономических групп, изучены свойства, установлена их роль в метаболизме нуклеиновых кислот. РНКазы широко применяются в научных и прикладных исследованиях. Выгодно отличаясь от химиотерапевтических средств специфической направленностью воздействия на строго определенную сторону обмена веществ организма, они находят применение в медицинской практике.

Учитывая возросший интерес к изучению микоплазм и их биологической роли, имеющихся данных о молекулярно-биологических свойствах явно недостаточно для полной характеристики этой важнейшей группы микроорганизмов. Изучение свойств РНКаз молликутов позволит более глубоко понять особенности этого класса микроорганизмов, установить их место в мире микробов и определить фундаментальные основы биологической активности.

РНКазы молликутов в силу своеобразия биологических свойств этих молликутов и трудностей их культивирования на искусственных питательных средах не исследованы. Имеются лишь единичные сведения о проявлении РНКазной активности отдельными представителями рода *Mycoplasma*. Ничего не известно о наличии этих ферментов у представителей других таксонов молликутов, в частности у представителей семейства *Acholeplasmataceae*, а также отсутствуют сведения о типах РНКаз, их структуре и нуклеотидной специфичности. Так как многие представители класса *Mollicutes* являются возбудителями заболеваний человека, животных и растений, а их РНКазы, вероятно, могут быть одним из факторов агрессии в отношении поражаемых хозяев, то изучение этих ферментов может иметь важное значение для выяснения механизма патогенности данных микроорганизмов. РНКазы молликутов могут представить также интерес как объект биотехнологии, особенно если решить вопрос об их иммобилизации на соответствующих подложках. Все вышеизложен-

ное свидетельствует о целесообразности дальнейшего поиска продуцентов и получения высокоочищенных препаратов РНКазы различной специфичности действия, а также исследования их свойств.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы было: выделение и очистка внеклеточной РНКазы *Acholeplasma laidlawii* PG-8 и изучение физико-химических и молекулярно-биологических свойств фермента. Достижение поставленной цели потребовало решения следующих задач:

- изучить способности некоторых представителей класса Mollicutes продуцировать и выделять в среду РНКазы;
- определить возраст культуры, в котором молликуты наиболее активно продуцируют РНКазу в окружающую среду
- разработать методы очистки РНКазы *A. laidlawii* PG-8;
- определить наиболее характерные основные свойства фермента.

Научная новизна. Впервые выделена и очищена до гомогенного состояния внеклеточная РНКазы молликута *Acholeplasma laidlawii* PG-8, установлена молекулярная масса фермента. Изучены физико-химические и молекулярно-биологические свойства РНКазы, определены кинетические параметры взаимодействия фермента с субстратом.

Установлены некоторые отличия и сходства РНКазы *A. laidlawii* PG-8 в свойствах с одноименными ферментами из других прокариотических организмов, что частично указывает на филогенетические связи между отдельными родами бактерий и молликутами.

Практическая ценность. Полученные экспериментальные данные являются определенным вкладом в расширение познания биологических свойств микоплазм и их биологической активности, приближают нас к пониманию метаболизма нуклеиновых кислот и механизма патогенности молликутов. Разработан метод выделения и очистки РНКазы из культуральной жидкости *A. laidlawii* PG-8.

Апробация работы. Результаты исследований обсуждались на Бессековской школе-семинаре молодых ученых (Алушта, 1990), на

конкурсах работ секции молекулярной биологии института микробиологии и вирусологии им. Заболотного (Киев, 1991, 1992).

Публикация результатов исследования. Основные положения диссертационной работы опубликованы в 4 печатных работах. Планирование и проведение экспериментов осуществлялось при участии кандидата биологических наук Д. П. Грамы, за что мы выражаем ему глубокую благодарность.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста и содержит 20 рисунков и 4 таблицы. Библиография включает 171 наименование (из них 54 - отечественных авторов и 117 - иностранных). Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований, обсуждения результатов (4 главы), выводов и списка литературы.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служил штамм *Acholeplasma laidlawii* PG-8, выращиваемый в жидкой среде СМ ИМВ-72. Микроорганизм этот был выбран, как наиболее часто встречаемый в природе и как предполагаемый предшественник фитопатогенных молликутов - возбудителей желтух растений. Кроме того, неоднократно показана его ассоциация с отдельными заболеваниями человека и животных.

РНКааную активность определяли по методу Reddi (1975). За единицу активности фермента принимали такое количество фермента, которое вызывало увеличение светопоглощения при 260 нм на одну оптическую единицу при инкубировании реакционной смеси при 37 °С в течение 15 минут.

Содержание белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм (Whitaker, 1960).

Для выделения и очистки фермента использовали гель-фильтрацию на сефадексе G-50, ионообменную хроматографию на КМ-сефадексе и аффинную хроматографию на желтый А-сефарозе. Гомогенность ферментного препарата определяли методом элект-

рофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях.

Молекулярную массу очищенной РНКазы определяли двумя методами: гель-фильтрацией на Тойоперле HW-60 и электрофорезом в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия.

Температурный оптимум фермента определяли, инкубируя стандартную смесь при температуре от 30 до 45°C.

Влияние pH на активность и стабильность РНКазы изучали в диапазоне от 2.5 до 11.5.

Максимальную скорость гидролиза РНК и константу Михаэлиса (K_m) определяли, используя уравнение Михаэлиса-Ментен в обратных координатах Лайнуивера-Берка (Виноградова, 1978).

Изучение влияния катионов на РНКазную активность проводили в интервале концентраций от 10^{-3} М до 10^{-1} М солей одно- и двухвалентных металлов в реакционной смеси.

Действие мочевины на активность РНКазы определяли, инкубируя фермент при температуре 38°C в течение 15 минут в реакционной смеси с различной концентрацией мочевины (1, 2, 4, 6 и 8 М). В качестве основного субстрата при исследовании активности и свойств РНКазы *A. laidlawii* PG-8 использовали высокополимеризованную дрожжевую РНК (Sigma, США).

При определении специфичности РНКазы были использованы следующие подинуклеотиды: полиадениловая (поли(A)), полиуридиловая (поли(U)) и полицитидиловая (поли(C)) кислоты (Serva, Германия).

Исследование продуктов гидролиза РНК проводили с помощью высокожидкостной хроматографии (ВЖХ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение динамики накопления РНКазы в клетках и культуральной жидкости молликутов.

Синтез ферментов определяется физиологическими особенностями микроорганизмов-продуцентов и происходит в определенной фазе их развития. Поэтому после установления факта наличия РНКазы, в первую очередь мы приступили к изучению динамики

образования РНКазы в клетках и культуральной жидкости *A. laidlawii* PG-8. Кроме того, знание динамики образования РНКазы дает нам возможность определения того оптимального времени культивирования ахолеплазмы, при котором образуется максимальное количество фермента.

При изучении динамики накопления РНКазы как в клетках, так и в культуральной жидкости *A. laidlawii* PG-8 мы обнаружили, что максимум РНКазной активности в обоих случаях достигался к 48 часам культивирования (рис. 1). Основной пул РНКазы экскретировался клетками в культуральную среду: в 1 л культуральной жидкости концентрация РНКазы через 48 часов составляла 17 тыс. ед по Кунитцу, а в 1 г биомассы из 1 л культуры - 140 ед. Для сравнения отметим, что 1 кг мяса цыпленка содержит 50 тыс ед по Кунитцу.

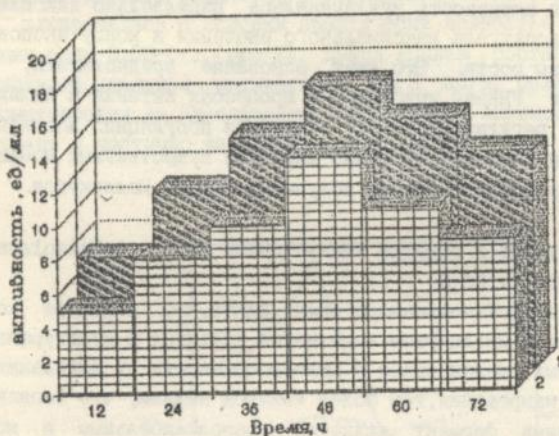


Рис. 1. Влияние продолжительности культивирования штамма *A. laidlawii* PG-8 на накопление РНКазы

1 - в культуральной жидкости; 2 - в клетках.

При исследовании в сравнительном аспекте динамика накопления РНКазы у отдельных представителей рода *Acholeplasma* и

Мycoplasma наблюдались как сходства, так и отличия. Так, отмечен общий характер накопления РНКазы у штамма *A. laidlawii* PG-8 и штаммов *A. laidlawii* шт. 118, *A. axantum* S-743 как в клетках, так и в культуральной жидкости. РНКазная активность наблюдалась в первые сутки роста и достигала максимального значения к 48 часам роста, а затем постепенно снижалась. В то же время штамм *A. granularum* BTS-39 отличался от родственных штаммов тем, что максимальная РНКазная активность наблюдалась к 72-часам культивирования. Точно такая же динамика накопления РНКазы с максимумом активности на третьи сутки культивирования присуща и для штаммов рода *Mycoplasma* - *M. capricolum californica* Kid и *M. salivarum* PG-20. Также следует отметить, что штаммы отличаются по уровню РНКазной активности.

РНКазная активность увеличивалась параллельно накоплению биомассы и достигала максимального значения к концу экспоненциальной фазы роста. Это дает основание предполагать, что внеклеточные РНКазы участвуют в процессах питания и являются факторами, регулирующие рост микробной популяции. Исследование динамики накопления РНКаз является существенным моментом в процессе разработки схемы получения РНКазы молликутов.

2. Выделение и очистка внеклеточной РНКазы *Acholeplasma laidlawii* PG-8

На основе установленного нами факта, что основное количество РНКаз у молликутов выделяется клетками в культуральную жидкость, был сделан вывод о целесообразности их выделения из среды культивирования, тем более кажется важным, что несвязанный с клетками фермент является транслокабельным и может служить потенциальным фактором патогенности микроорганизма.

Для выделения и очистки фермента использовали методы белковой химии: гель-фильтрацию, ионообменную и аффинную хроматографию. Условия выделения фермента выбирались на основе результатов экспериментальной проверки описанных в литературе методов, а также способов, впервые отработанных в процессе

проведения данного исследования.

Питательная среда СМ ИМВ-72, использованная для культивирования микоплазм, включает высокомолекулярные белки, создающие трудности при очистке фермента. С целью отделения высокомолекулярных белков была применена гель-фильтрация на сефадексе G-50.

В таблице 1 приведены некоторые характеристики фермента на различных этапах выделения и очистки. На первом этапе выделения фермента после гель-фильтрации на сефадексе G-50 выход РНКазы составил 69,8%, удельная активность возросла в 10 раз по сравнению с активностью в культуральной жидкости.

Далее для очистки РНКазы использовали КМ-сефадекс. В процессе хроматографического разделения на КМ-сефадексе РНКазы элюировалась с колонки практически полностью при концентрации соли 0,05-0,1 (рис. 2). Выход РНКазы составил 54% от исходного, удельная активность 374,3 ед/мг белка (таб. 1). Хроматография на КМ-сефадексе позволила сконцентрировать фермент и частично избавиться от примесей.

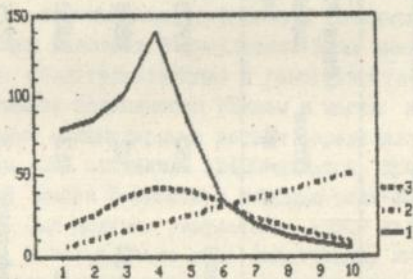


Рис. 2. Хроматография РНКазы *A. laidlawii* PG-8 на сефадексе. 1 - РНКазная активность (ед/мл); 2 - белок ($A_{220} \times 10^{-2}$); 3 - концентрация KCl ($M \times 10^{-1}$).

Таблица 1. Очистка РНКазы *A. laidlawii* PG-8

N	Этапы очистки	Объем в мл	Общая РНКазная активность ед	Общий белок мг	Удельная активность ед/мг	Степень очистки	Выход в %
1.	Культуральная жидкость	150	2700	285	9.47	1	100.0
2.	Сефадекс G-50	42	1883	19.3	97.5	10.3	69.8
3.	КМ-сефадекс	13	1460	3.9	374.3	39.5	54.0
4.	Желтый А-сефероза	3	775	1.2	645.8	68.2	28.7

1
08
1

Дальнейшую очистку проводили методом аффинной хроматографии на колонке с желтым А сефарозой. (рис. 3).

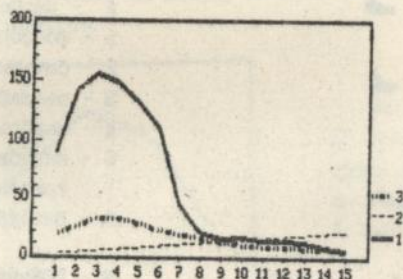


Рис. 3. Аффинная хроматография РНКазы *A. laidlawii* PG-8 на колонке с желтым А - сефарозой.
1 - РНКазная активность (ед/мл); 2 - белок ($A_{280} \times 10^{-2}$); 3 - концентрация KCl ($M \times 10^{-4}$).

Фракции с максимальной РНКазной активностью после хроматографии на колонке с краситель-матричным гелем исследовали на гомогенность с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. В результате была выявлена одна белковая полоса, свидетельствующая о гомогенности фермента (рис. 4). На основании подвижности РНКазы и шести маркерных белков с известными молекулярными весами определили молекулярную массу РНКазы. Она составила 12400 дальтон. При определении молекулярной массы фермента с помощью гель-фильтрации на TOYO PEARL HW-60 был получен результат - 13500 дальтон.

Таким образом, использование гель-фильтрации, ионообменной и аффинной хроматографии, позволило получить из сапрофитного штамма *A. laidlawii* PG-8 внеклеточную РНКазу: препарат был получен в гомогенном состоянии с удельной активностью 845.8 ед/мг (таб. 1).



Рис. 4. Электрофореграмма
в ПААГ РНКазы
A. laidlawii PG-8

- А - маркерные белки:
1 - фосфоорилаза (94 кД);
2 - бычий альбумин (67кД);
3 - овалбумин (43 кД);
4 - карбоангидраза (30 кД);
5 - ингибитор химотрипсина (20.1 кД);
6 - цитохром С (12.3 кД).

Б - РНКазы *A. laidlawii* PG-8

Для того, чтобы убедиться, что очищенный нами фермент является именно РНКазой, в качестве субстрата были использованы как РНК, так и ДНК (линейная, кольцевая и денатурированная). При инкубировании фермента и РНК при 37°С уже в течение 5 минут субстрат был гидролизован полностью, в то время как инкубация фермента с ДНК в течение 90 минут показала, что ДНК осталась нерасщепленной. Эти результаты подтверждают, что очищенный нами фермент является гомогенно чистой РНКазой без примеси нуклеаз и ДНКаз.

Установлено, что РНКазы *A. laidlawii* PG-8 является эндонуклеазой, т.е. она осуществляет одновременно несколько разрывов на всем протяжении полинуклеотидной цепи. Дополнительным подтверждением служит тот факт, что РНКазы не расщепляет денатурированную ДНК.

3. Физико-химические свойства РНКазы *A. laidlawii* PG-8

Как показали исследования, интервал значений температур, при которой проявляется наибольшая активность фермента, составляет 38-40°С (рис. 5.). Фермент полностью стабилен при температуре 40°С в течение 40 минут, а через 120 минут теряет всего лишь 3% активности.

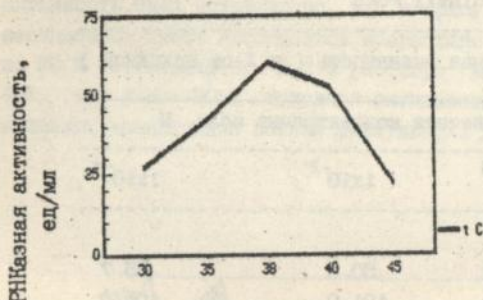


Рис. 5.
Влияние температуры на активность РНКазы *A. laidlawii* PG-8

Установлено, что РНКаза *A. laidlawii* PG-8 имеет оптимум pH 5.5 (рис. 6.). В этих условиях фермент полностью стабилен в течение 3 часов. Более 40% активности сохраняется при нейтральных значениях pH в течение 5 часов.

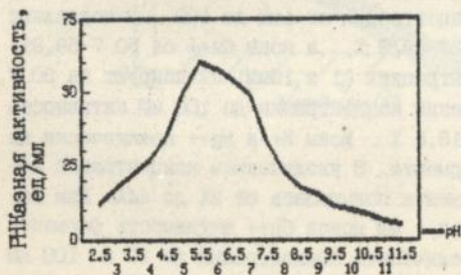


Рис. 6. Влияние pH на активность РНКазы *A. laidlawii* PG-8

Константа Михаэлиса (Km) для РНКазы *A. laidlawii* PG-8 составила 2.2×10^{-3} мг РНК.

Зависимость активности фермента от концентрации ионов металлов представлены в таблице 2.

Таблица 2. Влияние катионов на активность РНКазы *A. laidlawii* PG-8

Катион	РНКазная активность (в % от исходной)		
	Конечная концентрация соли, М		
	1×10^{-3}	1×10^{-2}	1×10^{-1}
Mn ⁺⁺	73.0	60.0	55.7
Mg ⁺⁺	100.0	101.0	105.0
Ca ⁺⁺	49.3	46.6	40.2
Zn ⁺⁺	109.3	118.6	144.0
Fe ⁺⁺	33.3	69.3	118.6
Cu ⁺⁺	186.6	313.3	400.0
K ⁺	100.0	97.7	96.0
Na ⁺	100.0	98.7	99.0

Так, ионы Mn⁺⁺ в концентрации от 1мМ до 100 мМ подавляют активность фермента на 27-44,3 %, а ионы Ca⁺⁺ от 50.7-59,8%. Ионы Fe⁺⁺ в малых концентрациях (1 и 10мМ) ингибируют на 30.7-66.7%, а при увеличении концентрации до 100 мМ активность фермента повышается на 18,6 %. Ионы K⁺ и Mg⁺⁺ практически не влияют на активность фермента. С увеличением концентрации ионов Zn⁺⁺ активность фермента повышалась от 9% до 44%. При наличии в реакционной смеси 1 мМ ионов Cu⁺⁺ активность фермента увеличилась на 86%. С увеличением концентрации до 10 и 100 мМ активность изменилась скачкообразно и достигала 313,3 и 400 % от исходной, соответ - ственно.

Итак, по степени ингибирования фермента катионы можно расположить следующим образом: $Fe^{++} > Ca^{++} > Mn^{++}$. Zn^{++} и Cu^{++} являются активаторами фермента. Ионы K^+ , Na^+ и Mg^{++} не влияют на активность фермента.

В результате изучения влияния мочевины на РНКазную активность, было установлено, что в присутствии 1 М мочевины в реакционной смеси наблюдалось возрастание активности фермента на 20 % от исходной. В 2 М растворе мочевины сохранялось 40%, а в 4 М - 20 % исходной активности. В 6 и 8 М растворе мочевины происходила полная инактивация РНКазы (рис. 7).

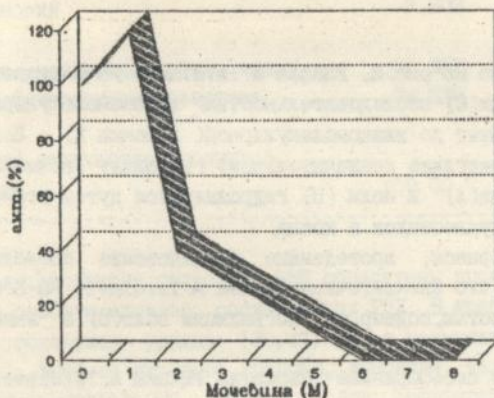
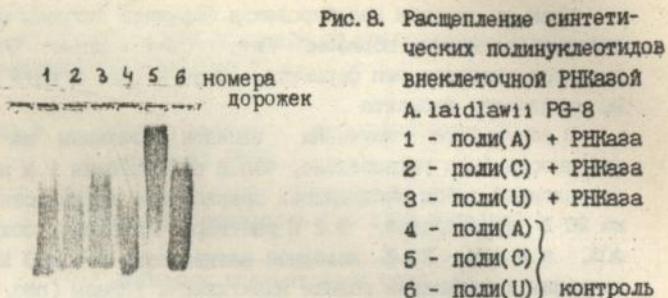


Рис. 7. Действие мочевины различной концентрации на РНКазную активность *A. laidlawii* PG-8

На рис. 8 представлены результаты исследования специфичности РНКазы *A. laidlawii* PG-8 к полинуклеотидам.



Как видно из рис. 8, РНКаза *A. laidlawii* PG-8 отдает предпочтение поли(C)-последовательностям: высокомолекулярная поли(C) деградирует до низкомолекулярной (дорожка 2). Поли (A) и поли(U) подверглись незначительному гидролизу, возможно, потому что поли(A) и поли (U) гидролизуются путем ступенчатого отщепления нуклеотидов с конца.

Таким образом, проведенные исследования позволяют нам заключить, что внеклеточная РНКаза *A. laidlawii* PG-8 обладает C-специфичностью, подвергая деградации поли(C) в наибольшей степени.

Учитывая своеобразные свойства РНКазы *A. laidlawii* PG-8 и особенно ее специфичность к цитидиновым связям, небезинтересно было испытать способность этого фермента гидролизовать природные РНК и изучить состав этого гидролиза. В качестве субстрата для ферментативного гидролиза была взята дрожжевая РНК. В качестве источника фермента использовали культуральную жидкость *A. laidlawii* PG-8, которая представляла собой ферментный препарат в комплексе с белками-кофакторами.

Результаты исследований продуктов гидролиза РНК приведены в таблице 3.

Таблица 3 . Исследование продуктов гидролиза дрожевой РНК
методом ВЖХ

N n/n	Наименование продукта	Количество веществ (в % от общего продукта гидролиза)
1.	Уридина фосфат	3.854
2.	Цитидин	2.037
3.	Уридин	33.475
4.	Аденозина фосфат	8.720
5.	Гуанозина фосфат	2.198
6.	Аденозин	2.839
7.	Гуанозин	8.203
	Суммарное количество нуклеотидов	61.327
	Неидентифицированные вещества	38.673
	Суммарное количество продуктов гидролиза	100.00

Среди продуктов гидролиза РНК обнаружены производные всех четырех рибонуклеотидов, составляющих РНК. В наибольшем количестве обнаружен уридин (33,4%) , в наименьшем - цитидин (2.03%). Высокое значение уридина, вероятно, является следствием деаминации цитидина. Для подтверждения нашего предположения мы вносили в реакционную смесь избыток цитидина и наблюдали его деаминацию, в результате которой было получено свыше 45% уридина. Следовательно, в культуральной жидкости *A. laidlawii* PG-8 находятся в активном состоянии цитидиндеаминазы, катализирующие превращение цитидина в уридин.

Среди продуктов гидролиза установлено также более 38% не-

идентифицированных веществ, к которым относятся промежуточные продукты распада РНК: фрагменты олигонуклеотидов, фосфаты и различные циклофосфаты. Это свидетельствует о неполном гидролизе РНК, несмотря на длительную инкубацию фермента и субстрата. Наличие в продуктах гидролиза фрагментов олигонуклеотидов также подтверждает эндонуклеазный характер РНКазы.

Изучение состава продуктов гидролиза РНК имеет прикладное значение. Культуральная жидкость, как источник комплекса ферментов, катализирующих реакцию расщепления нуклеиновых кислот в перспективе (при подборе соответствующих условий) может успешно применяться для гидролиза РНК и получения нуклеотидов и нуклеосидов для научно-исследовательских целей.

В таблице 4 мы приводим физико-химические свойства РНКазы *A. laidlawii* PG-8 в сравнительном аспекте со свойствами РНКаз некоторых микроорганизмов. Так, сравнение свойств показало, что исследуемая нами РНКаза сходна по молекулярной массе с ферментами бактерий рода *Bacillus*.

Оптimum температуры для всех приведенных РНКаз составляет 38-40°C, что характерно для РНКаз прокариот и эукариот.

В отличие от РНКазы *A. laidlawii* PG-8, которая является кислой РНКазой, у всех остальных РНКаз optimum pH находится в нейтрально-щелочном диапазоне.

РНКаза *A. laidlawii* PG-8 активируется ионами Cu^{++} и Zn^{++} . По этому свойству она сходна с РНКазой *Lactobacillus plantarum*.

По специфичности к полинуклеотидам РНКаза сходна с РНКазами *B. cereus* и *E. coli*. Подобно РНКазе *A. laidlawii* PG-8, они также предпочтительно расщепляют поли(С)-последовательности.

Итак, сравнение свойств РНКаз показало, что имеются как сходства, так и отличия между ферментами отдельных микроорганизмов и исследованной нами РНКазы.

Сравнение фермента с изученными РНКазами других микроорганизмов дает нам право сделать вывод о том, что РНКаза *A. laidlawii* является оригинальным ферментом, имеющим фундаментальное отличие от РНКаз других микроорганизмов, в том числе и филогенетически близких. Наиболее отличительным свойством является потребность РНКазы ахолеплазмы в кислой среде для проявления максимальной активности и зависимость ее активности от ионов Cu^{++} .

Таблица 4. Некоторые физико-химические свойства РНКаз
микроорганизмов и молликута *Acholeplasma laidlawii* PG-8

N/N	Продуцент РНКазы	Молекулярная масса кД	Специфичность к полинуклео- тидам	Условия действия			
				температура	оптимум pH	актива- торы	инги- биторы
1.	<i>Bacillus subtilis</i> (1)	10.1	поли(I)	38° С	7.5	-	Me++
2.	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>subtoxigenus</i> (2)	12.0	поли(Б) поли(I)	38° С	9.5	-	Me++
3.	<i>B. cereus</i> (3)	12.0	поли(С) поли(U)	40° С	7-8	-	Me++
4.	<i>Lactobacillus plantarum</i> (4)	90.0	поли(А)	38° С	8.6	Mg++	ЭДТА
5.	<i>Escherichia coli</i> (5)	27.0	поли(С)	40° С	7.6-9.7	K ⁺ , NH ₄ ⁺	-
6.	<i>Acholeplasma laidlawii</i> PG-8	12.4	поли(С)	38° С	5.6	Cu ⁺⁺ , Zn ⁺⁺	ЭДТА

Примечание: 1. Reich, 1986
2. Деметьев и др., 1992
3. Татарская, 1984
4. Татарская, 1984, Locard, 1978
5. Meador, 1990

ВЫВОДЫ

1. Впервые выделена и изучена внеклеточная РНКазы *Acholeplasma laidlawii* PG-8 - представителя семейства *Acholeplasmataceae* (класс *Mollicutes*)
2. РНКазы *A. laidlawii* PG-8 получена в гомогенном состоянии с удельной активностью 645,8 ед/мг белка.
3. Молекулярная масса РНКазы в нативном состоянии составляла 13,5 кД, в денатурированном состоянии 12,4 кД.
4. Максимальная ферментативная активность РНКазы *A. laidlawii* PG-8 проявляется при температуре 38-40° С и оптимальном значении pH 5,5.
5. Константа Михаэлиса для РНКазы *A. laidlawii* PG-8 составляет $2,22 \times 10^{-3}$ мг РНК.
6. Эффективным активатором РНКазы являются ионы Cu^{++} в концентрации 100 мМ, в присутствии которых активность фермента повышается в 4 раза. По степени ингибирования РНКазы катионы можно расположить следующим образом: $\text{Fe}^{++} > \text{Ca}^{++} > \text{Mn}^{++}$.
7. Установлено, что среди синтетических полирибонуклеотидов РНКазы *A. laidlawii* предпочтительно расплетает поли(С)-последовательности.
8. По специфичности действия на нуклеиновые кислоты РНКазы *A. laidlawii* PG-8 является эндонуклеазой.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Янчинова З. Я., Грама Д. П., Скрипаль И. Г. РНКазы молликута *Acholeplasma laidlawii* PG-8: обнаружение и динамика накопления // Микробиол. журн. - 1991. - 53, N 5. - С. 26-30.
2. Янчинова З. Я., Грама Д. П., Скрипаль И. Г. Субстратная специфичность РНКазы *Acholeplasma laidlawii* PG-8 // Микробиол. журн. - 1992. - 54, N 1. - С. 58-61.
3. Янчинова З. Я. РНКазная активность в микоплазмах различного таксономического положения // Микробиол. журн. - 1992. - 54, N 4. - С. 34-38.
4. Янчинова З. Я., Грама Д. П., Скрипаль И. Г., Бабичев В. В. Очистка и физико-химические свойства РНКазы *Acholeplasma laidlawii* PG-8 // Микробиол. журн. - 1993. - 55, N 5. - С. 65-69

Подписано в печать 29.09.93г Формат 60x84/16
Бумага писчая. Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ № 1892
Отпечатано ЦУОЛ ГНПП "Плодвинконсерв" г. Киев, Саксаганского, 1

AB 28.197