

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА УРОВНЯ ВКЛЮЧЕНИЯ ДЕЙТЕРИЯ И УГЛЕРОДА-13 В МОЛЕКУЛЫ АМИНОКИСЛОТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ

О. В. МОСИН

ВВЕДЕНИЕ

Обогащение молекул стабильными изотопами (^2H , ^{13}C , ^{15}N и другие) в настоящее время является важным методом в разнопрофильных биохимических и метаболических исследованиях с использованием аминокислот и других биологически активных соединений (БАС) [1-3]. Тенденции к предпочтительному применению стабильных изотопов по сравнению с их радиоактивными аналогами обусловлены отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации метки в молекуле методами высокого разрешения, включая ЯМР [4], ИК- [5] и лазерную спектроскопию [6] и масс-спектрометрию [7]. Развитие этих методов детекции стабильных изотопов за последние годы позволило повысить эффективность биологических исследований, а также изучать структуру и механизм действия клеточных БАС на молекулярном уровне [8, 9]. В частности, аминокислоты, меченные ^2H , ^{13}C , ^{15}N с различными уровнями изотопного включения, применяются для изучения пространственной структуры и конформационных изменений белков [10], взаимодействия белковых молекул [11], а также в химических синтезах широкого круга изотопномеченных соединений на их основе. Например, меченый *L*-фенилаланин использован в синтезах пептидных гормонов и нейротрансмиттеров [12].

Важным моментом в исследованиях с применением меченых аминокислот, является их доступность. Изотопномеченные аминокислоты могут быть получены с использованием химических, ферментативных и биосинтетических методов. Однако химические синтезы часто многостадийны, требуют больших расходов ценных реагентов и меченых субстратов и приводят в результате к продукту, представляющему собой рацемическую смесь *D*- и *L*- форм, для разделения которых требуются специальные методы [13]. Более тонкие синтезы меченых аминокислот связаны с использованием комбинации химических и ферментативных подходов [14-16].

Для многих целей и прежде всего для структурных исследований белков биотехнология предлагает альтернативный химическому синтезу путь получения аминокислот, меченных стабильными изотопами, который приводит к высоким выходам синтезируемых продуктов, к

эффективному включению изотопов в молекулы, и, самое главное, к сохранению природной конфигурации синтезируемых соединений. При биосинтетическом получении меченых аминокислот используют несколько подходов, один из которых заключается в равномерном обогащении синтезируемых соединений по всему углеродному скелету молекулы за счёт выращивания штаммов продуцентов на средах, содержащих в качестве источников стабильных изотопов следующие субстраты: $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ [17], (^{13}C) метанол, (^2H) метанол [18], и $^2\text{H}_2\text{O}$ [19]. Этот подход включает в себя также комплексное использование химических компонентов биомассы, выращенной в присутствии стабильных изотопов, для выделения и фракционирования нужных изотопномеченых соединений. Другой подход заключается в сайт-специфическом обогащении аминокислот по определённым положениям молекул за счёт ассимиляции клеткой меченых предшественников, например, [1,4- ^{13}C]сукцината, [1, 2- ^{13}C]ацетата, [1- ^{13}C]лактата и др. [20, 21]. Методы получения изотопномеченых аминокислот в аспекте их использования для ЯМР-исследований белков более подробно изложены в работах ЛеМастера [22].

Настоящая работа является продолжением исследований [23-25], направленных на биосинтетическое получение $[^2\text{H}]$ - и $[^{13}\text{C}]$ аминокислот за счёт утилизации низкомолекулярных меченых субстратов - (^2H) метанола, (^{13}C) метанола и $^2\text{H}_2\text{O}$ в клетках микроорганизмов и реализацию возможности определения стабильных изотопов методом масс-спектрометрии электронного удара. Чувствительность масс-спектрометрии составляет 10^{-9} - 10^{-11} нмоль, что существенно выше, чем при использовании ИК- и ЯМР-спектроскопии. Данный метод в сочетании с обращённо-фазовой ВЭЖХ хорошо зарекомендовал себя для исследования уровня изотопного обогащения молекул аминокислот в составе их мультикомпонентных смесей, каковыми являются препараты культуральных жидкостей штаммов-продуцентов аминокислот и гидролизаты белков, полученные со сред, содержащих стабильные изотопы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объектами исследования служили полученные в результате мутагенеза *L*-фенилаланинпродуцирующий штамм факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum*, ассимилирующий метанол по рибулозо-5-монофосфатному пути фиксации углерода, и *L*-лейцинпродуцирующий штамм облигатных метилотрофных бактерий *Methylobacillus flagellatum*, реализующий 2-кето-3-дезоксиглюконатальдозазный вариант рибулозо-5-монофосфатного пути фиксации углерода. Для компенсации ауксотрофности по *L*-лейцину и *L*-изолейцину эти аминокислоты добавляли в ростовые среды в протонированном виде. При этом уровни накопления *L*-фенилаланина и *L*-лейцина в культуральных жидкостях штаммов-продуцентов достигали величины 0.8 и 1.0 г/л соответственно [23]. Включение дейтерия в молекулы секретируемых аминокислот и суммарных белков биомассы осуществляли за счёт выращивания штамма *B. methylicum* на средах с $^2\text{H}_2\text{O}$ и обычным метанолом, так как уровень включения ^2H в молекулы аминокислоты за счёт ассимиляции (^2H) метанола незначителен [25].

Поскольку в клетке происходит ассимиляция водорода (дейтерия) из H_2O ($^2\text{H}_2\text{O}$) среды, мы подбирали условия включения дейтерия в молекулы аминокислот и белков при ступенчатом возрастании концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах, как показано в табл. 1. Рост бактерий на $^2\text{H}_2\text{O}$ -содержащих средах характеризуется увеличением продолжительности лаг-фазы, времени клеточной генерации и снижением выходов микробной биомассы (табл. 1), поэтому было необходимо проводить адаптацию бактерий к $^2\text{H}_2\text{O}$. Метод адаптации штамма *B. methylicum* к росту на $^2\text{H}_2\text{O}$ при сохранении способности к биосинтезу *L*-фенилаланина описан в работе [23]. В данной работе были исследованы образцы культуральной жидкости *B. methylicum* и гидролизаты биомассы, полученные в ходе многоступенчатой адаптации бактерий к тяжелой воде на средах с различным содержанием $^2\text{H}_2\text{O}$ (от 24.5 до 98% $^2\text{H}_2\text{O}^*$). Поскольку данный штамм метилотрофных бактерий удалось адаптировать к росту на $^2\text{H}_2\text{O}$, исследование уровней включения дейтерия в молекулы аминокислот представлялось наиболее интересным.

В отличие от культивирования на $^2\text{H}_2\text{O}$ -среде, где необходимо проводить клеточную адаптацию к дейтерию, при получении [^{13}C]аминокислот за счет утилизации $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ данный этап не является обязательным, поскольку этот изотопный субстрат не оказывает негативного биостатического эффекта на ростовые характеристики метилотрофов (см. табл. 1). Поэтому в случае *M. flagellatum* включение ^{13}C в молекулы аминокислот осуществляли в одну стадию при выращивании бактерий на водных средах, содержащих 1% (^{13}C)метанол.

Таблица 1

Влияние изотопного состава среды на рост штаммов B. methylicum и M. flagellatum

Номер опыта	Среда выращивания	Величина лаг-фазы, ч	Выход биомассы, % от контроля	Время генерации, ч
1	0	24.0	100	2.2
2	24.5	32.1	90.6	2.4
3	49.0	40.5	70.1	3.0
4	73.5	45.8	56.4	3.5
5	98.0	60.5	32.9	4.4
6	CH_3OH	0	100	1.1
7	$^{13}\text{CH}_3\text{OH}$	0.1	72.0	1.0

В качестве другой модельной системы для включения изотопной метки в молекулы белков, использовали бактериородопсин [26], синтезируемый в мембране *Halobacterium halobium ET 1001*. Выбор для этих целей бактериородопсина, функционирующего как АТФ-зависимая транслоказа в клетках галофильных бактерий, был продиктован возможностью исследования с его помощью процессов функционирования мембранных белков *in vivo* в условиях изотопного обогащения

среды дейтерием. Для включения дейтериевой метки в молекулу бактериородопсина использовали метод сайт-специфического обогащения белка за счёт выращивания *H. halobium ET 1001* на синтетической среде с дейтерийсодержащими аналогами ароматических аминокислот - *L*-[2,3,4,5,6- ^2H]фенилаланином, *L*-[3,5- ^2H]тирозином и *L*-[2,4,5,6,7- ^2H]триптофаном.

Основные этапы при выделении [^2H]-и [^{13}C]-аминокислот заключались в выращивании штаммов-продуцентов на средах с мечеными субстратами - (^2H)метанолом, (^{13}C)метанолом и $^2\text{H}_2\text{O}$ или *L*-[2,3,4,5,6- ^2H]фенилаланином, *L*-[3,5- ^2H]тирозином и *L*-[2,4,5,6,7- ^2H]триптофаном (бактериородопсин), отделении культуральных жидкостей, содержащих секретиреваемые аминокислоты, от микробной биомассы, разрушении клеток, выделении фракции суммарных белков биомассы и бактериородопсина с последующим их гидролизом, дериватизации смесей аминокислот дансилхлоридом, бензилоксикарбонилхлоридом и diazometаном, разделении метиловых эфиров *N*-Dns-производных аминокислот и *N*-Cbz-производных аминокислот методом обращённо-фазовой ВЭЖХ, масс-спектрометрии электронного удара полученных производных аминокислот.

^2H - и ^{13}C -Содержащие аминокислоты выделяли из лиофилизированных культуральных жидкостей штаммов-продуцентов аминокислот *B. methylicum* и *M. flagellatum*, а также в составе гидролизатов суммарных белков биомассы. При выделении фракции суммарных белков необходимо учитывать наличие в них углеводов, липидов и пигментов. В работе использовали богатые по белку штаммы бактерий со сравнительно небольшим содержанием углеводов в них. Гидролизу в качестве фракции суммарных белков подвергали остаток после исчерпывающего отделения липидов и пигментов экстракцией органическими растворителями (метанол-хлороформ-ацетон). В редких случаях для полного отделения от сопутствующих компонентов прибегали к солюбилизации белков в SDS или высаливанию их сульфатом аммония.

Выделение и очистку индивидуальных белков с целью дальнейшего изучения их пространственной структуры целесообразно осуществлять методом солюбилизации с использованием подходящих детергентов (см. [27]) что особенно важно для бактериородопсина, являющегося высокоспиральным белком. Поэтому при выделении бактериородопсина из пурпурных мембран галофильной бактерии *H. halobium ET 1001* мы солюбилизовали его в 0.5% растворе SDS с сохранением α -спиральной конфигурации белка [28], а далее осаждали его метанолом. Гомогенность очищенного бактериородопсина была подтверждена электрофорезом в 12.5% ПААГ в присутствии 0.1% SDS.

Гидролиз дейтериймеченых белков проводили в условиях предотвращения реакций изотопного обмена водорода на дейтерий в ходе гидролиза и сохранения остатков ароматических аминокислот в белке. Были рассмотрены два альтернативных варианта проведения гидролиза - кислотный и щелочной. Кислотный гидролиз белка в стандартных условиях (6 М HCl, 24 ч, 110 $^\circ$ C), как известно, приводит к полному разрушению триптофана и частичному разрушению серина, треонина и некоторых других аминокислот [29]. Другим значительным недостатком при проведении гидролиза в HCl является изотопный (^1H - ^2H)-обмен ароматических протонов

(дейтеронов) в молекулах триптофана, тирозина и гистидина, а также протонов (дейтеронов) при атоме С3 аспарагиновой и С4 глутаминовой кислот [30]. Поэтому, чтобы получить реальные данные о биосинтетическом включении дейтерия в молекулы аминокислот необходимо проводить гидролиз белка с использованием дейтерированных реагентов (6 М ^2HCl с 3% фенолом (в $^2\text{H}_2\text{O}$)). Другой вариант гидролиза белка заключался в использовании 2 М $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (110° С, 24 ч). В этих условиях гидролиза белков реакция изотопного обмена водорода на дейтерий в ароматических аминокислотах - тирозине и триптофане не происходит, а триптофан не разрушается. Оба метода гидролиза показали хорошие результаты по сохранению ароматических аминокислот в гидролизатах белка и содержанию дейтерия в молекулах аминокислот. Необходимо подчеркнуть, однако, что для препаративного получения дейтерированных аминокислот из белка микроорганизмов целесообразнее использовать гидролиз в ^2HCl в $^2\text{H}_2\text{O}$ (в присутствии добавки фенола для сохранения ароматических аминокислот), позволяющего избежать рацемизации. Для изучения же уровня включения стабильных изотопов в остатки ароматических кислот бактериородопсина и в аналитических целях лучше применять гидролиз белка в растворе $\text{Ba}(\text{OH})_2$, при котором отсутствует (^1H - ^2H)-обмен в аминокислотах и сохраняются остатки фенилаланина, тирозина и триптофана. При щелочном гидролизе возможная рацемизация аминокислот не влияет на результат последующего масс-спектрометрического определения уровней включения дейтерия в аминокислоты.

Для получения летучих производных аминокислоты переводили в метиловые эфиры N-Dns-аминокислот или N-Cbz-аминокислоты, которые затем разделяли методами обращенно-фазовой ВЭЖХ. Условия N-derivатизации аминокислот отработывали таким образом, чтобы получить в масс-спектрах как можно более интенсивные пики их молекулярных ионов M^+ на уровне фона метаболитов среды. Для этого проводили прямую derivатизацию аминокислот в составе лиофилизированных культуральных жидкостей и гидролизатов суммарных белков биомассы пятикратным избытком дансилхлорида или бензилоксикарбонилхлорида.

В этих условиях для лизина, гистидина, тирозина, серина, треонина и цистеина наряду с монопроизводными образовывались ди-Dns и ди-Cbz-производные. Кроме этого, из аргинина синтезировался N-три-Dns-(Cbz)-аргинин. Поэтому в масс-спектрометрических исследованиях молекулярные ионы M^+ этих соединений соответствовали ди- или три- производным.

Эффективность использования N-Cbz-производных аминокислот в обращенно-фазовой ВЭЖХ и в масс-спектрометрических исследованиях была показана ранее [31, 32]. Летучесть N-производных аминокислот при масс-спектрометрическом анализе может быть повышена за счет дополнительной derivатизации по карбоксильной группе, поэтому N-Dns-аминокислоты были переведены в их метиловые эфиры. Для предотвращения обратного изотопного обмена ароматических протонов (дейтеронов) при этерификации дейтериймеченых аминокислот, в данной работе отдали предпочтение использованию диазометана для этих целей [33]. Свежеприготовленным раствором диазометана в диэтиловом эфире обрабатывали сухие остатки смесей аминокислот. При derivатизации аминокислот диазометаном происходило

дополнительное N-метилирование по α -NH-(Dns)-группе аминокислот, что приводило к появлению в масс-спектрах метиловых эфиров N-Dns-аминокислот дополнительных пиков, соответствующих соединениям с молекулярной массой на 14 массовых единиц больше исходных.

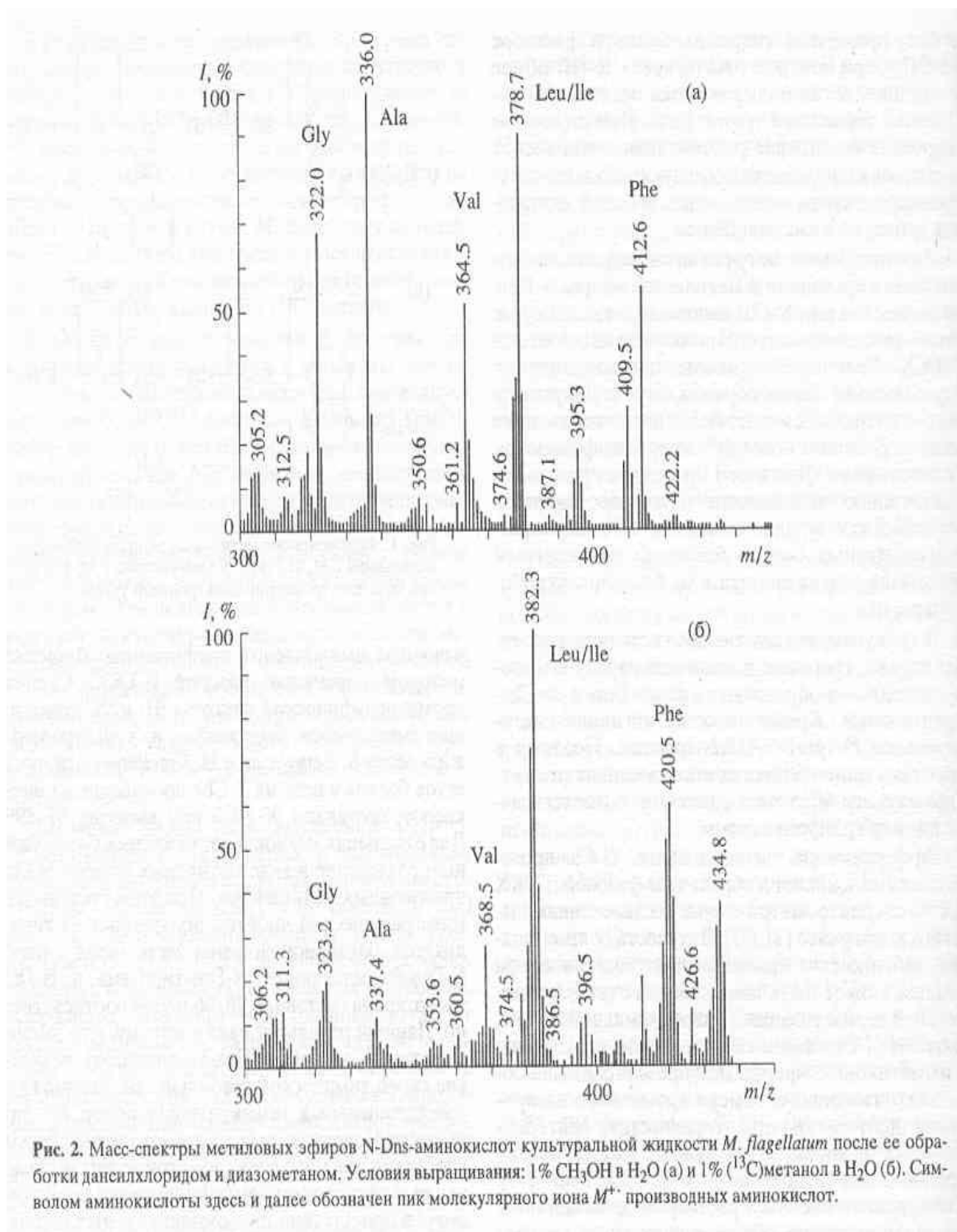
В данной работе включение изотопов ^2H и ^{13}C в молекулы аминокислот мультикомпонентных смесей в составе культуральных жидкостей и белковых гидролизатов определяли методом масс-спектрометрии электронного удара. Метиловые эфиры N-Dns-производных аминокислот или N-Cbz-производные аминокислот препаративного разделяли методом обращённо-фазовой ВЭЖХ. Степени хроматографической чистоты ^2H - и ^{13}C -содержащих аминокислот, выделенных из культуральных жидкостей *B. methylicum* и *M. flagellatum* и гидролизатов белков в виде их N-Cbz-производных аминокислот составили 96-98%, при выходах - 67-89%. Для отдельных аминокислот оказалось более удобным разделение в виде метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот. При этом степень хроматографической чистоты полученных из гидролизатов бактериородопсина метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина, N-Dns-тирозина и N-Dns-триптофана составили 96, 97 и 98% соответственно. Данный результат важен потому, что именно метиловые эфиры N-Dns-аминокислот вследствие своей химической стабильности, наличия высокоинтенсивных молекулярных ионов M^+ при высоких молекулярных массах оказались весьма удобными для масс-спектрометрических исследований и позволяют идентифицировать аминокислоты в присутствии низкомолекулярных метаболитов среды и других продуктов дериватизации. Последний факт очень важен для изучения состава пула аминокислот, секретируемых в культуральные жидкости штаммов-продуцентов.

Пути фрагментации метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина и N-Dns-лейцина при масс-спектрометрии электронного удара приводят к формированию пиков их молекулярных ионов при m/z 412 и m/z 378 и к образованию дансильных фрагментов и продуктов их дальнейшего распада до N-диметиламинонафталина, а также к получению аминных A^+ и аминокацильных фрагментов B^+ (рис. 1). Показанная на рис. 1 фрагментация метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина и N-Dns-лейцина характерна для этих производных всех других аминокислот, что позволяет проводить масс-спектрометрический мониторинг изотопномеченых аминокислот в составе интактных культуральных жидкостей штаммов-продуцентов, содержащих сумму аминокислот и других метаболитов среды, до стадии их хроматографического разделения, а также исследовать включение стабильных изотопов в аминокислоты белковых гидролизатов.



Рис. 1. Фрагментации метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина с M_r 412 (а) и N-Dns-лейцина с M_r 378 (б) при масс-спектрометрии электронного удара.

При использовании в качестве источников стабильных изотопов (^{13}C)метанола и 2H_2O , в клетке синтезируются изотопнозамещённые аминокислоты, различающиеся количеством атомов, замещённых на ^{13}C и 2H . При этом, чем выше молекулярная масса аминокислот, тем возможен больший набор ионов, соответствующих изотопнозамещённым формам. Пики при m/z 323.2; 337.4; 368.5; 382.3; 420.5 в масс-спектре [^{13}C]аминокислот дериватизованной культуральной жидкости *M. flagellatum*, полученной с водной среды, содержащей 1% (^{13}C)метанол (рис. 2 б), соответствуют по массе метиловым эфирам N-Dns-глицина, N-Dns-аланина, N-Dns-валина, N-Dns-лейцина/изолейцина и N-Dns-фенилаланина. Следует подчеркнуть, что величина m/z для молекулярного иона метиловых эфиров N-Dns-лейцина и изолейцина в масс-спектрах электронного удара одинакова, поэтому данным методом нельзя точно идентифицировать эти аминокислоты. Максимальные уровни включения ^{13}C в молекулы аминокислот, измеренные по увеличению усреднённого значения m/z для молекулярного иона изотопномеченного образца в сравнении с молекулярной массой природной аминокислоты варьируют от 35% для [^{13}C]аланина до 95% для [^{13}C]фенилаланина (табл. 2). Учитывая ауксотрофность штамма по *L*-изолейцину, разброс значений может быть объяснён вкладом экзогенного *L*-изолейцина в уровень изотопного включения лейцина, а также других метаболически связанных с ним аминокислот (см. текст ниже).



Для штамма *B. methylicum* наблюдалось специфическое возрастание уровней изотопного включения дейтерия в молекулы индивидуальных аминокислот культуральных жидкостей (табл. 2) при ступенчатом увеличении концентраций ²H₂O в ростовой среде. Уровни включения дейтерия в молекулы разных аминокислот при одинаковых условиях культивирования различаются. Такой результат зафиксирован во всех экспериментах, где источником стабильных изотопов служила ²H₂O.

Из масс-спектра метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот культуральной жидкости, полученной со среды, содержащей 49% ²H₂O (рис. 3 б) видно, что молекула

фенилаланина содержала 6 изотопнозамещённых форм со средним значением m/z 414.2, которое возрастает по сравнению с контрольными условиями (m/z 412.0, рис. 3 а) на 2.2 единицы, т. е. 27.5% от общего количества атомов водорода в молекуле замещены на дейтерий. Область масс-спектра со значениями m/z 90-300 соответствует продуктам дериватизации метаболитов ростовой среды. Пик с m/z 431.0, зафиксированный в масс-спектре культуральной жидкости и проявляющийся во всех опытах, соответствует продукту дополнительного метилирования фенилаланина по α -NH-(Dns)- группе. Пик с m/z 400 (рис. 3 б) вероятнее всего отвечает продукту отщепления метильной группы от дейтерированного производного фенилаланина.

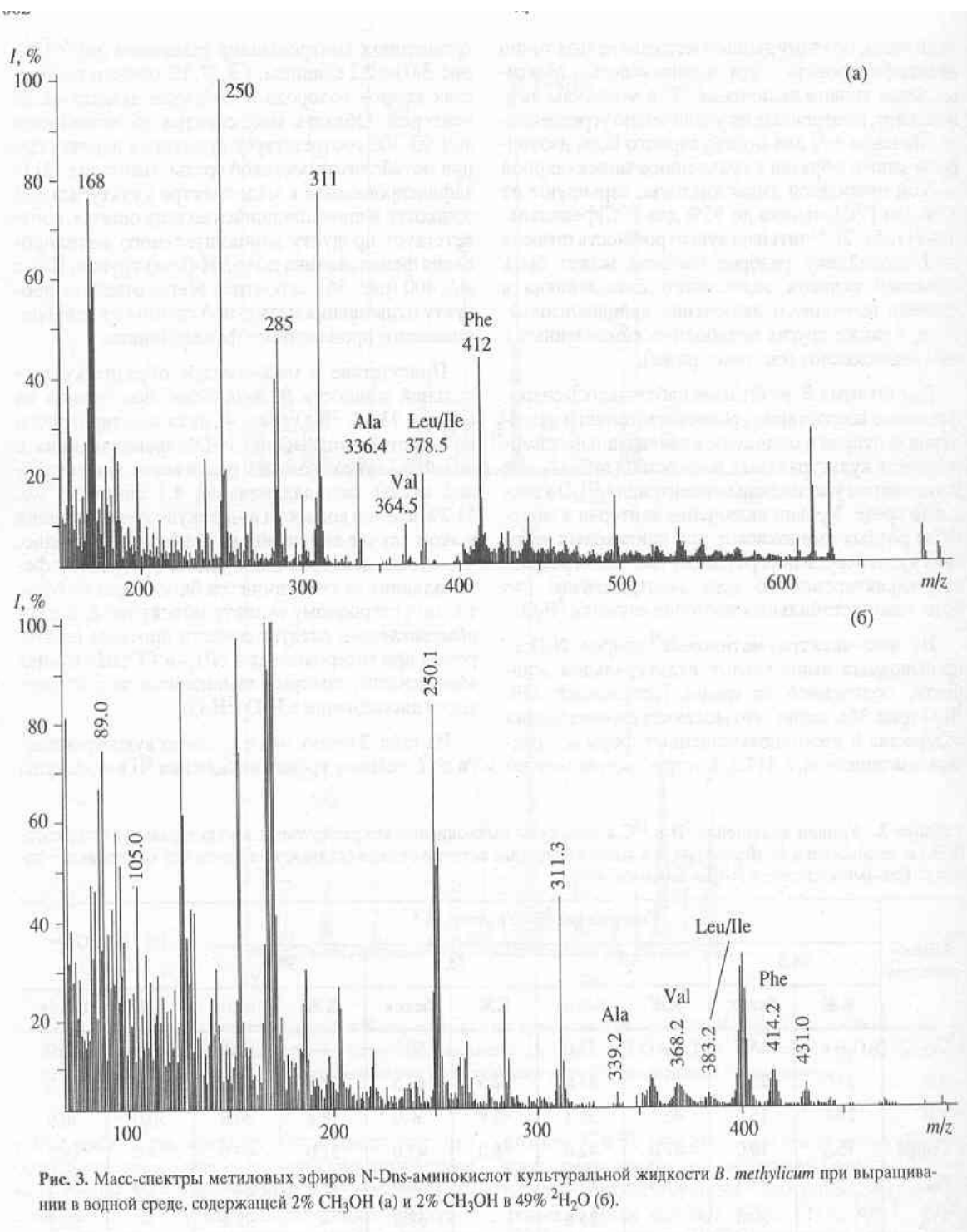


Рис. 3. Масс-спектры метиловых эфиров N-Dns-аминокислот культуральной жидкости *B. methylicum* при выращивании в водной среде, содержащей 2% CH₃OH (а) и 2% CH₃OH в 49% ²H₂O (б).

Присутствие в масс-спектре образца культуральной жидкости *B. methylicum*, полученной на среде с 73.5% ²H₂O (рис. 4) пика молекулярного иона метилового эфира N-Dns-фенилаланина с m/z 416.1 указывает на увеличение молекулярной массы фенилаланина на 4.1 единицу, т. е., 51.2% атомов водорода в молекуле фенилаланина в этом случае замещены на дейтерий. Очевидно, что вышеобозначенные атомы дейтерия включились в молекулу фенилаланина за счет процесса биосинтеза *de novo*, т. е. по углеродному скелету молекулы. К легко обмениваемым следует отнести протоны (дейтероны) при гетероатомах в NH₂- и COOH- группах аминокислот, которые

замещаются за счёт лёгкости диссоциации в H_2O ($^2\text{H}_2\text{O}$).

Таблица 2

Уровни включения ^2H и ^{13}C в молекулы аминокислот, секретируемых в культуральную жидкость (КЖ) *B. methylicum* и *M. flagellatum*, и в аминокислотные остатки белков (данные получены для метиловых эфиров *N*-Dns-аминокислот и *N*-Cbz-аминокислот)

Аминокислоты	Содержание $^2\text{H}_2\text{O}$ в среде, %*								$1\%^{13}\text{CH}_3\text{OH}^{**}$	
	24.5		49.0		73.5		98.0			
	КЖ	белок	КЖ	белок	КЖ	белок	КЖ	белок	КЖ	белок
Глицин	-	15.0	-	35.0	-	50.0	-	90.0	60.0	90.0
Аланин	24.0	20.0	37.5	45.0	62.5	62.5	77.5	97.5	35.0	95.0
Валин	20.0	15.0	46.3	36.3	43.8	50.0	58.8	50.0	50.0	50.0
Лейцин/изолейцин	15.0	10.0	47.0	42.0	46.0	45.0	51.0	49.0	38.0	49.0
Фенилаланин	15.0	24.5	27.5	37.5	51.2	50.0	75.0	95.0	95.0	80.5
Тирозин	-	20.0	-	25.6	-	68.8	-	92.8	-	53.5
Серин	-	15.0	-	36.7	-	47.6	-	86.6	-	73.3
Аспарагиновая кислота	-	20.0	-	36.7	-	60.0	-	66.6	-	33.3
Глутаминовая кислота	-	20.0	-	40.0	-	53.4	-	70.0	-	40.0
Лизин	-	10.0	-	35.3	-	40.0	-	58.9	-	54.4

Из табл. 2 видно, что условиях ауксотрофности по *L*-лейцину уровни включения ^2H в молекулы лейцина/изолейцина ниже, чем для фенилаланина. Отмеченная особенность отчётливее всего проявляется на среде с максимальной концентрацией $^2\text{H}_2\text{O}$. Ещё раз этот результат подтвердили рис. 5, где показан масс-спектр [^2H]аминокислот культуральной жидкости в виде метиловых эфиров *N*-Dns-производных аминокислот после выращивания бактерий *B. methylicum* в указанных условиях. Видно, что величина m/z 418.0 пика молекулярного иона метилового эфира *N*-Dns-фенилаланина увеличивается по сравнению с контрольными условиями на 6 единиц, что соответствует замещению 75% от общего количества атомов водорода в молекуле. В отличие от фенилаланина уровень включения дейтерия в лейцин/изолейцин составил 51.0%, а в валин - 58.8%. Примечательно, что в масс-спектре этого образца фиксируется пик обогащённого дейтерием бензильного фрагмента при m/z 97.0 (вместо m/z при 91.0 в контроле), что указывает на частичную локализацию атомов дейтерия в молекуле фенилаланина в положениях C2-C6 ароматического кольца и сопредельном с ними положении при углеродном атоме β . Несмотря на то, что в остальных опытах пики бензильных фрагментов не были зафиксированы, логично предположить, что при других концентрациях $^2\text{H}_2\text{O}$ дейтерий также включается в ароматическое кольцо фенилаланина, так как в $^2\text{H}_2\text{O}$ метаболизм у штамма *B. methylicum* не претерпевает существенных изменений [25].

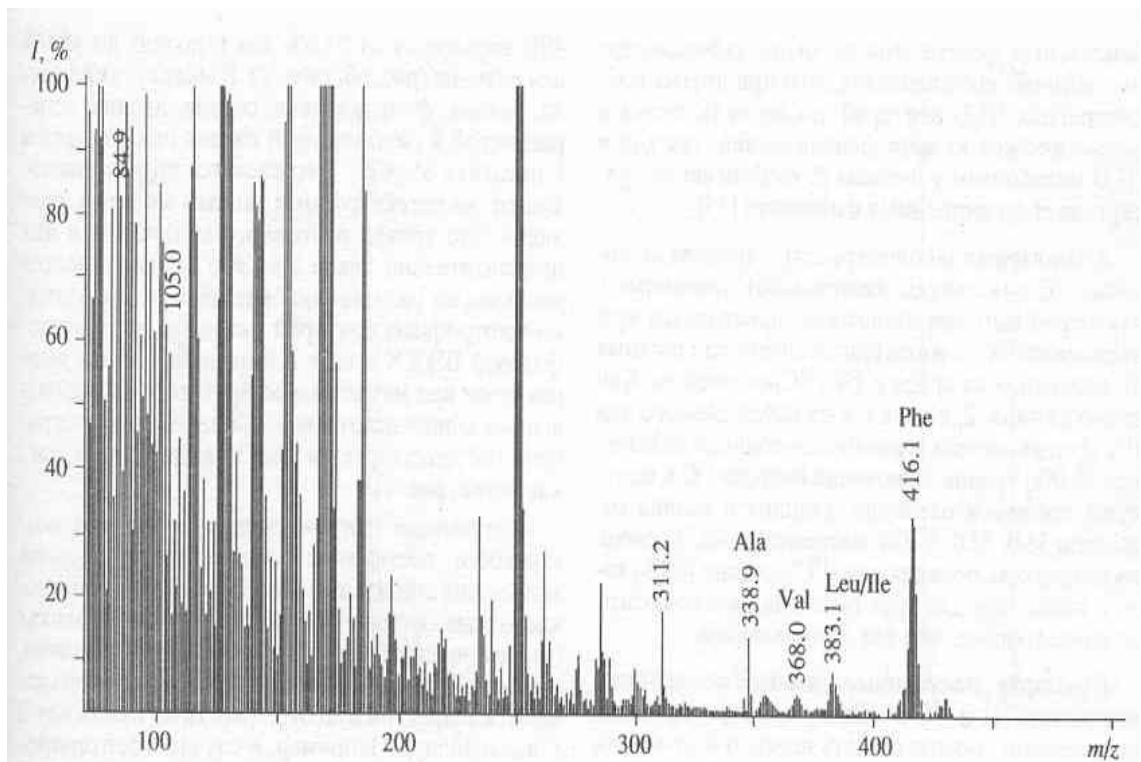


Рис. 4. Масс-спектр метиловых эфиров N-Dns-аминокислот культуральной жидкости *B. methylicum* при выращивании в водной среде, содержащей 2% CH_3OH в 73.5% $^2\text{H}_2\text{O}$.

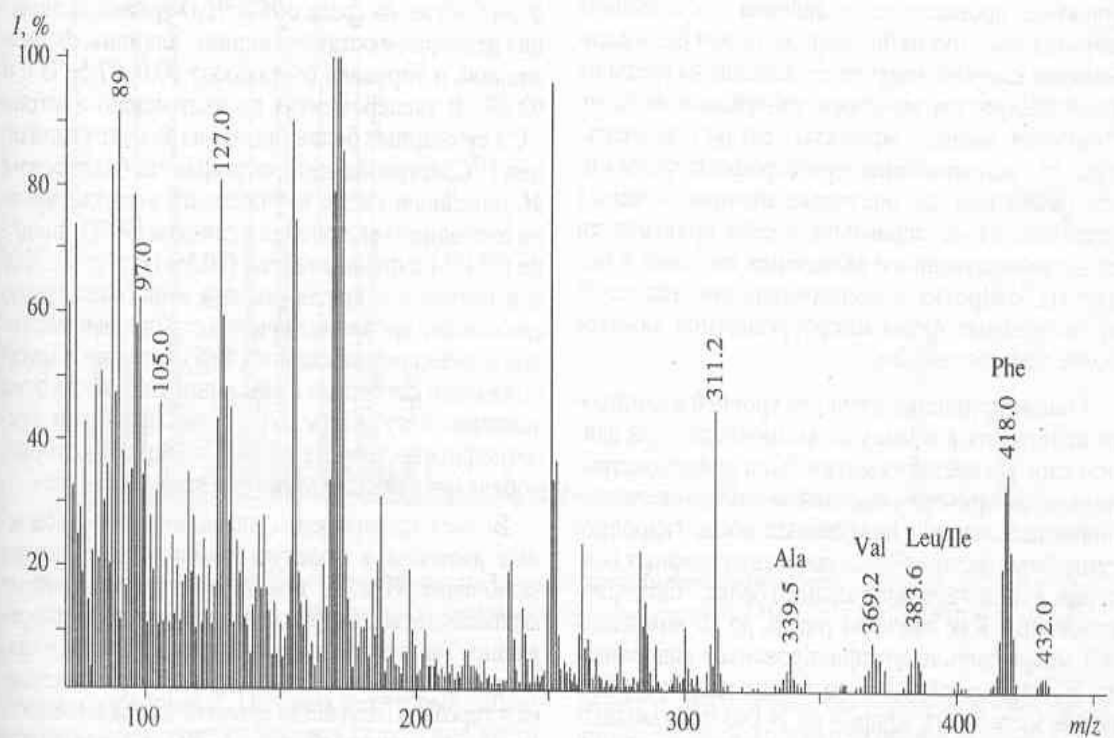


Рис. 5. Масс-спектр метиловых эфиров N-Dns-аминокислот культуральной жидкости *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2% CH_3OH в 98% $^2\text{H}_2\text{O}$.

Аналогичная закономерность в уровнях включения ^{13}C в молекулы аминокислот, связанных с ауксотрофным метаболизмом, проявляется при выращивании *L*-изолейцинзависимого

штамма *M. flagellatum* на среде с 1% (^{13}C)метанолом. Как видно из табл. 2, в отличие от наблюдаемого для [^{13}C]фенилаланина (уровень изотопного включения - 95.0%), уровни включения изотопа ^{13}C в молекулы лейцина/изолейцина, аланина и валина составили 38.0; 35.0; 50.0% соответственно. Уровень изотопного включения для [^{13}C]глицина (60%) хотя и выше, чем для трёх последних аминокислот, но намного ниже, чем для фенилаланина.

Суммируя полученные данные по уровням включения ^2H -и ^{13}C в молекулы секретируемых аминокислот, можно сделать вывод о сохранении минорных путей метаболизма, связанных с биосинтезом лейцина и метаболически родственных с ним аминокислот *de novo*. Другим логическим объяснением наблюдаемого эффекта, если принять во внимание происхождение лейцина и изолейцина по различным путям биосинтеза, может быть ассимиляция клеткой немеченого лейцина из среды на фоне биосинтеза меченого изолейцина *de novo*. Учитывая данные эффекты следует подчеркнуть, что использование аукоотрофных форм микроорганизмов для получения изотопномеченых аминокислот не оправдывает себя практически из-за множественного включения изотопов в молекулы. Напротив, использование для этих целей прототрофных форм микроорганизмов кажется более перспективным.

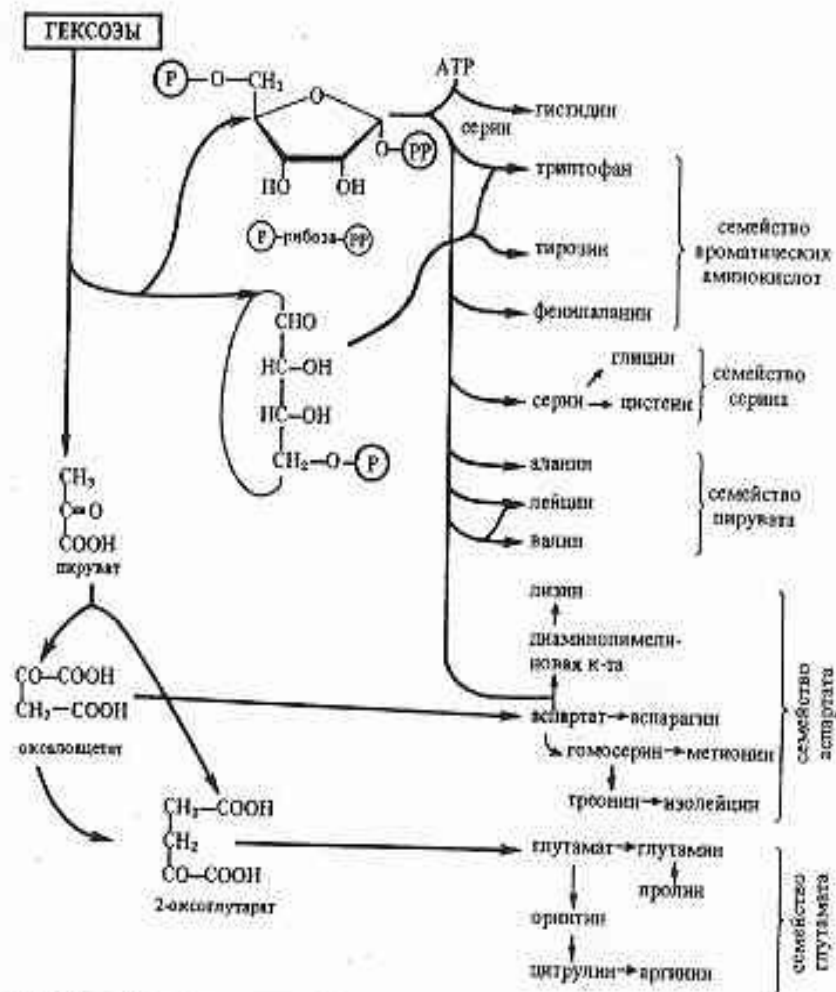


Рис. 22. Аминокислоты, необходимые для синтеза белков, образующиеся из простых соединений — продуктов промежуточного обмена (Г. Шлегель, 1987)

Общие принципы изучения уровней изотопного включения в молекулы аминокислот при данном способе введения метки были продемонстрированы на примере анализа сложных мультикомпонентных смесей, полученных после гидролиза суммарных белков биомассы метилотрофных бактерий, а также индивидуального белка – бактериородопсина, выполняющего роль АТФ-зависимой транслоказы в клетках галофильной бактерии *Halobacterium halobium*. Как видно из рис. 6, до десяти аминокислот могут быть идентифицированы в гидролизате белка *B. methylicum* по пикам молекулярных ионов метиловых эфиров их N-Dns-производных аминокислот.

Как и в случае с секретируемыми аминокислотами, пики M^+ соответствовали смесям изотопнозамещённых форм аминокислот. Для лизина и тирозина пики M^+ соответствовали метиловым эфирам ди-производных аминокислот - α , ϵ -ди-Dns-лизину (с M^+ при m/z 631.0) и O, N-ди-Dns-тирозину (с M^+ при m/z 663.9). Уровни изотопного включения дейтерия в молекулы аминокислот при содержании 2H_2O в ростовой среде 49% варьируют от 25.6% для тирозина до 45.0% для аланина (рис. 6 б и табл. 2). В молекулах глицина, валина, фенилаланина, серина, лизина, аспарагиновой и глутаминовой кислот они находятся в пределах 35 - 40%. Что касается других аминокислот, не детектируемых данным методом, очевидно, что уровни изотопного включения в них приблизительно такие же. Это подтверждается данными по разделению белковых гидролизатов метилотрофных бактерий методами обращённо-фазовой ВЭЖХ в виде N-Cbz-производных аминокислот или метиловых эфиров их N-Dns-производных аминокислот и ионообменной хроматографии, где детектируется уже 15 аминокислот (см., например, рис. 7).

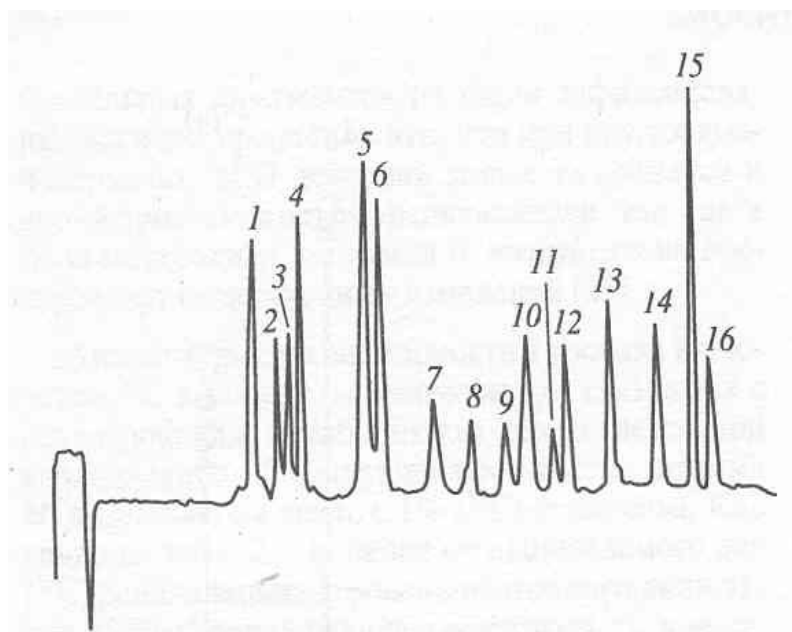


Рис. 7. Ионообменная хроматография гидролизата суммарных белков *B. methylicum*. Условия выращивания: 2% CH_3OH в 98% 2H_2O : 1 – Asp; 2 – Thr; 3 – Ser; 4 – Glu; 5 – Gly; 6 – Ala; 7 – Val; 8 – Met; 9 – Ile; 10 – Leu; 11 – Tyr; 12 – Phe; 13 – His; 14 – Lys; 15 – аммиак; 16 – Arg.

Полученные данные свидетельствуют о возможности достижения максимальных уровней включения стабильных изотопов ^2H и ^{13}C в аминокислотные остатки суммарных белков биомассы (за исключением лейцина/изолейцина и валина, сниженные уровни включения для которых объясняются эффектом ауксотрофности по *L*-лейцину и по *L*-изолейцину). Например, в случае с дейтерированными аминокислотами полного замещения на стабильные изотопы удалось достичь за счет использования в качестве источника дейтерия 98% $^2\text{H}_2\text{O}$ (табл. 2). Как видно из табл. 2, при росте *B. methylicum* на среде с 98% $^2\text{H}_2\text{O}$, уровни включения дейтерия в остатки глицина, аланина, фенилаланина и тирозина составляют 90.0; 97.5; 95.0 и 92.8%. В экспериментах по включению изотопа ^{13}C в суммарные белки биомассы за счёт утилизации (^{13}C)метанола метилотрофными бактериями *M. flagellatum* также наблюдались высокие уровни изотопного включения в глицине (90%), аланине (95.0%) и фенилаланине (80.5%) (табл. 2). Как и в случае с секретируемыми аминокислотами, сниженные уровни включения стабильных изотопов в лейцине/изолейцине (49%), а также в метаболически связанных с ним аминокислотах в этих условиях могут быть объяснены эффектом ауксотрофности штамма по *L*-изолейцину, который добавляли в ростовую среду в немеченом виде.

Во всех экспериментах по включению стабильных изотопов в молекулы аминокислот уровни включения ^2H и ^{13}C в метаболически связанные аминокислоты обнаружили определённую корреляцию. Так, уровни изотопного включения для валина и лейцина (семейство пирувата), фенилаланина и тирозина (семейство ароматических аминокислот) коррелируют (см. табл. 2). Уровни изотопного включения для глицина и серина (семейство серина), аспарагиновой кислоты и в лизина (семейство аспарагина) также имеют близкие величины. Из данных табл. 2 видно, что уровни изотопного включения секретируемых аминокислот и соответствующих аминокислотных остатков суммарного белка при выращивании бактерий на средах с одинаковым изотопным насыщением, в целом, также коррелируют. Причина некоторых наблюдаемых расхождений в уровнях включения изотопов в молекулы аминокислот до конца не изучена.

Данный биосинтетический подход показал хорошие результаты по изучению введения дейтериевой метки в молекулу бактериородопсина, выращенного на среде, содержащей *L*-[2,3,4,5,6- ^2H]фенилаланин, *L*-[3,5- ^2H]тирозин и *L*-[2,4,5,6,7- ^2H]триптофан (рис. 8). Как видно из рис. 8, в масс-спектре дериватизованного гидролизата бактериородопсина детектируются пики, соответствующие молекулярным ионам обогатённых дейтерием метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина с молекулярным ионом при m/z 417 (ср. m/z 412 для немеченого производного фенилаланина), N-Dns-тирозина с M^+ при m/z 429 (ср. m/z 428 для производного тирозина) и N-Dns-триптофана с M^+ при m/z 456 (ср. m/z 451 для производного триптофана). Все они отвечают смеси изотопозамещённых форм аминокислот, различающихся количеством атомов водорода, замещённых на дейтерий. Множественный характер включения дейтерия свидетельствует о возможном вкладе биосинтеза *de novo* в уровни дейтерированности ароматических аминокислот, но также не исключено, что он определяется самим способом получения изотопномеченых молекул. Кроме вышеобозначенных аминокислот в масс-спектре фиксируются пики

молекулярных ионов метиловых эфиров *N*-Dns-глицина (m/z 322), *N*-Dns-аланина (m/z 336), *N*-Dns-валина (m/z 364) и *N*-Dns-лейцина/изолейцина (m/z 378). Как и следовало ожидать, эти аминокислотные остатки в бактериородопсине не содержат дейтерия.

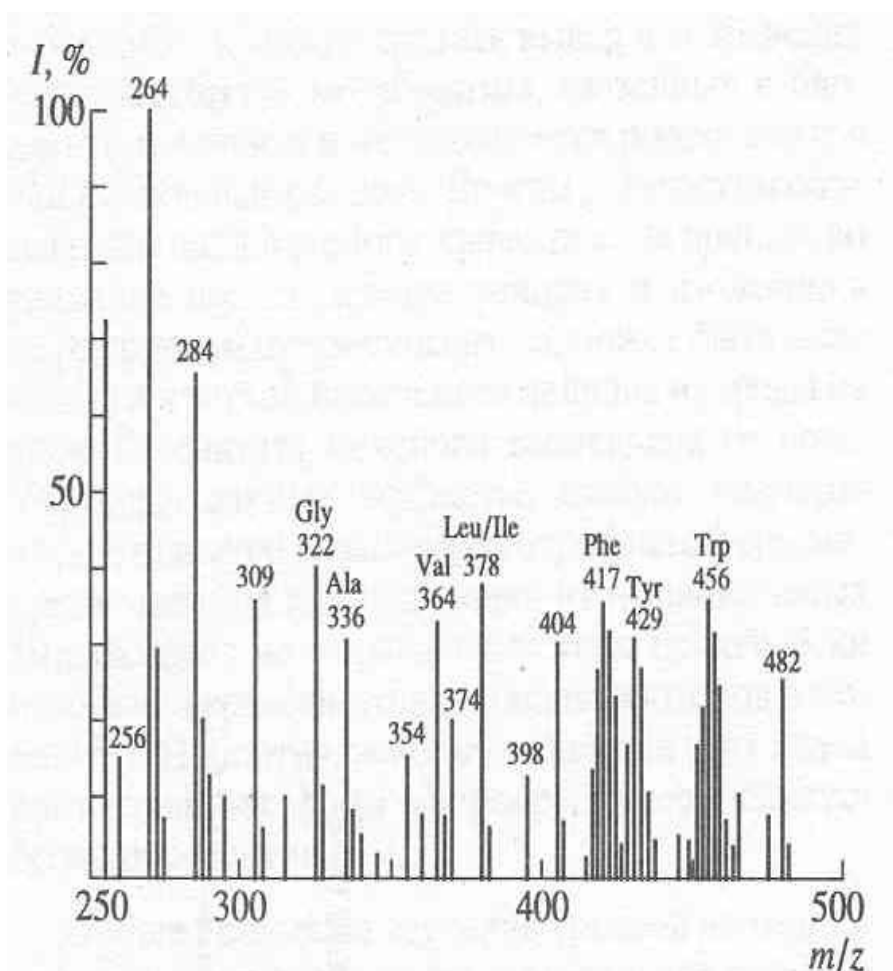


Рис. 8. Масс-спектр гидролизата бактериородопсина, полученного на среде, содержащей *L*-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]фенилаланин, *L*-[3,5- $^2\text{H}_2$]тирозин и *L*-[2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]триптофан в виде метиловых эфиров *N*-Dns-производных аминокислот.

Таким образом, проведённые исследования продемонстрировали эффективность масс-спектрометрии электронного удара *N*-Cbz-производных аминокислот и метиловых эфиров *N*-Dns-производных аминокислот для исследования уровней изотопного обогащения молекул аминокислот в составе их мультикомпонентных смесей, полученных биосинтетически с использованием микроорганизмов. Метод незаменим для изучения состава пула аминокислот, секретируемых в культуральные жидкости штаммов-продуцентов, выращенных на средах со стабильными изотопами.

Экспериментальная часть

В работе использовали *D*, *L*-аминокислоты (Reanal, Венгрия), аденозин- и уридин-5-монофосфаты (Sigma, США), панкреотическую телячью дезоксирибонуклеазу I (Fluka Chemie AG, Швейцария), додецилсульфат натрия (Chemapol, Чехо-Словакия). *L*-[2,3,4,5,6-²H₅]фенилаланин (90 ат.% ²H), *L*-[3,5-²H₂]тирозин (96 ат.% ²H) и *L*-[2,4,5,6,7-²H₅]триптофан (98 ат.% ²H) (способы получения указаны в работах [34, 35]), были предоставлены А. Б. Пшеничниковой (МИТХТ им. М. В. Ломоносова). Для синтеза производных аминокислот использовали *N*-диметиламинонафталин-5-сульфохлорид (дансилхлорид) (Sigma, США), бензилоксикарбонилхлорид (Войковский химзавод, РФ) и диазометан, получаемый из *N*-нитрозометилмочевины (Merck, Германия).

Исследования проводили с генетически маркированными штаммами бактерий, полученными из коллекции культур Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов:

Brevibacterium methylicum ВКПМ В 5652, *L*-лейцинзависимый штамм факультативных метилотрофных бактерий, продуцент *L*-фенилаланина;

Methylobacillus flagellatum КТ, *L*-изолейцинзависимый штамм облигатных метилотрофных бактерий, продуцент *L*-лейцина;

Halobacterium halobium ET 1001, пигментсодержащий штамм галофильных бактерий, способный синтезировать бактериородопсин;

Выращивание метилотрофных бактерий *B. methylicum* и *M. flagellatum* осуществляли на минеральной среде М9 [36] в колбах Эрленмейера объёмом 250 мл с наполнением средой 50 мл по методике [23], используя в качестве источников стабильных изотопов (²H)метанол, (¹³C)метанол и ²H₂O в присутствии *L*-лейцина для *B. methylicum* и *L*-изолейцина для *M. flagellatum* в концентрациях 10 мг/л. Клетки отделяли центрифугированием (10000 г, 20 мин). В культуральной жидкости анализировали секретируемые аминокислоты.

Для выделения фракции суммарных белков биомассы клетки дважды промывали дистиллированной водой с последующим центрифугированием (10000 г, 20 мин), экспонировали ультразвуком при 40 кГц (3 x 15 мин) и центрифугировали. Полученный осадок (10 мг) после отделения липидов и пигментов смесью органических растворителей хлороформ-метанол-ацетон (2:1:1) использовали в качестве фракции суммарных белков биомассы.

Для получения дейтериймеченого бактериородопсина использовали синтетическую среду, содержащую 18 аминокислот, в которой немеченые *L*-аминокислоты фенилаланин, тирозин и триптофан были заменены их дейтерированными аналогами - [2,3,4,5,6-²H]фенилаланином, [3,5-²H]тирозином, и [2,4,5,6,7-²H]триптофаном (количества компонентов приведены в г/л): (*D*, *L*-аланин 0.43, *L*-аргинин 0.4, *D*, *L*-аспарагиновая кислота 0.45; *L*-цистеин 0.05; *L*-глутаминовая кислота 1.3; *L*-глицин 0.06; *D*, *L*-гистидин 0.3; *D*, *L*-изолейцин

0.44; *L*-лейцин 0.8; *L*-лизин 0.85; *D*, *L*-метионин 0.37; *D*, *L*-фенилаланин 0.26; *L*-пролин 0.05; *D*, *L*-серин 0.61; *D*, *L*-треонин 0.5; *L*-тирозин 0.2; *D*, *L*-триптофан 0.5, *D*; *L*-валин 1.0); нуклеотиды (аденозин-5-монофосфат 0.1; уридин-5 монофосфат 0.1); соли (NaCl 250; MgSO₄ × 7H₂O 20; KCl 2; NH₄Cl 0.5; KNO₃ 0.1; KH₂PO₄ 0.05; K₂HPO₄ 0.05; цитрат натрия 0.5; MnSO₄ × H₂O 3 × 10⁻⁴; CaCl₂ × 6H₂O 0.065; ZnSO₄ × 7H₂O 4 × 10⁻⁵; FeSO₄ × 7H₂O 5 × 10⁻⁴; CuSO₄ × 5H₂O 5 × 10⁻⁵); глицерин 1.0; ростовые факторы (биотин 0.1 × 10⁻³; фолиевая кислота 10 × 10⁻³; витамин B₁₂ 0.02 × 10⁻³).

Для выделения фракции пурпурных мембран клетки, полученные после отделения культуральной жидкости и двухкратной промывки дистиллированной водой (100-150 мг), суспендировали в 100 мл 0.1 М буфера трис-HCl (pH 7.6), добавляли 1 мг дезоксирибонуклеазы I и инкубировали в течении 5-6 ч при 37 °С, затем разбавляли дистиллированной водой до 200 мл и инкубировали 15 ч при 4 °С. Осадок промывали дистиллированной водой с последующим отделением водной фракции до получения бесцветных промывных вод. Чистоту полученной суспензии пурпурных мембран (в H₂O) контролировали на спектрофотометре Beckman DU-6 (США) по соотношению полос поглощения 280/568 нм (ϵ_{280} 1.1 × 10⁵ М⁻¹см⁻¹ [37] и ϵ_{568} 6.3 × 10⁴ М⁻¹ см⁻¹ [38]).

Бактериородопсин выделяли по методу [39], солюбилизируя препараты пурпурных мембран (50 мг) в 2 мл 0.5% раствора SDS в H₂O и осаждая продукт 5-кратным избытком метанола на холоду (0° С). Выход бактериородопсина составил 17-20 мг.

Электрофорез препаратов бактериородопсина проводили в 12.5% ПААГ с 0.1 % SDS. Образцы для электрофореза готовили стандартным способом (протокол фирмы LKB, Швеция). Для количественного определения содержания синтезированного в клетке белка проводили сканирование покрашенного в растворе Кумасси-голубой R-250 электрофоретического геля на лазерном денситометре CDS-200 (Beckman, США).

Липиды и пигменты экстрагировали смесью хлороформ-метанол-ацетон (2:1:1) по методу Блайя и Дайера [40].

Гидролиз белка проводили 6 М ²HCl (3% фенола в ²H₂O) или 2 М Ba(OH)₂ (110°С, 24 ч) [41].

***N*-Dns-аминокислоты.** К 4-5 мг лиофилизированных препаратов культуральной жидкости и белковых гидролизатов в 1 мл 2 М NaHCO₃ pH 9-10 порциями при перемешивании добавляли 25.6 мг дансилхлорида в 2 мл ацетона. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при перемешивании при 40° С, затем подкисляли 2 М HCl до pH 3.0 и экстрагировали этилацетатом (3 × 5 мл). Объединенный экстракт промывали водой до значения pH 7.0, сушили безводным сульфатом натрия, растворитель удаляли при 10 мм. рт. ст.

Метилловые эфиры *N*-Dns-аминокислот. Для получения diaзометана к 20 мл 40% KOH в 40 мл диэтилового эфира добавляли 3 г влажной нитрозометилмочевины и перемешивали на водяной бане со льдом в течении 15-20 мин. После окончания интенсивного газовыделения

эфирный слой отделяли, промывали ледяной водой до pH 7.0, сушили безводным сульфатом натрия и использовали для обработки препаратов N-дансиламинокислот в составе культуральной жидкости или гидролизатов суммарных белков биомассы.

N-Cbz-аминокислоты. К 1.5 мл охлажденного до 0°C раствора культуральной жидкости (50 мг) или белковых гидролизатов (4-5 мг) в 4 М NaOH добавляли порциями при перемешивании 2 мл 4 М NaOH и 28.5 мг бензилоксикарбонилхлорида. Реакционную смесь выдерживали при 0°C, перемешивали 3 ч, подкисляли 2 М HCl до pH 3 и продукты экстрагировали этилацетатом (3 x 5 мл). Объединенный экстракт промывали водой до pH 7.0, сушили безводным сульфатом натрия, растворитель удаляли при 10 мм. рт. ст.

ТСХ производных аминокислот осуществляли на пластинках Silufol UV-254 (Чехо-Словакия) в системах растворителей: хлороформ-метанол-уксусная кислота, 10:1:0,3 (А) для N-Cbz-аминокислот и хлороформ-метанол-ацетон, 7:1:1 (Б) для метиловых эфиров N-Dns-аминокислот.

N-Cbz-аминокислоты детектировали по поглощению при 254 нм. Метиловые эфиры N-Dns-аминокислот детектировали по флуоресценции в УФ-свете.

Аналитическое и препаративное разделение смеси N-Cbz-аминокислот культуральной жидкости и белковых гидролизатов осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ [31].

Метиловые эфиры N-Dns-аминокислот разделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Knauer (ФРГ), снабженным насосом Knauer, УФ-детектором 2563 и интегратором C-R 3A (Shimadzu, Япония). Использовали неподвижную фазу: Separon SGX C₁₈; 18.7 мкм; 150 x 3.3 мм (Kova, Чехо-Словакия); система растворителей: (А) - ацетонитрил-трифторуксусная кислота, (20:80 об/об) и (В) - ацетонитрил. Использовали градиентное элюирование: от 0 до 20% В 5 мин, 20 до 100% В 30 мин, 100% В 5 мин, от 100 до 0% В 2 мин, 0% В 10 мин.

Ионнообменную хроматографию белковых гидролизатов осуществляли на приборе Biotronic LC 5001 (ФРГ); 230 x 3,2 мм; рабочее давление 50-60 атм; скорость подачи натрий-цитратного буфера 18,5; нингидрина - 9,25 мл/ч; детекция при 570 и 440 нм (для пролина).

Секретируемый L-фенилаланин и L-лейцин определяли на приборе Beckman DU- 6 (США) при 540 нм, в образцах культуральной жидкости, объемом 10 мкл после её обработки нингидрином.

Масс-спектры электронного удара производных аминокислот снимали на приборе MB-80 A (Hitachi, Япония) при ионизирующем напряжении 70 эВ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Beaufriere B., Fournier V., Salle B., Putet G. // *American Journal of Physiology*. 1992. V. 263. N^o. 1. P. 214-220.
2. McIntosh L. P., Dahlquist F. W. // *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1990. V. 23. P. 1-38.

3. Young V. R., Tu Y. M., Krempf M. // *New techniques in nutritional research*/ Ed. Whitehead R. G. New York. Academic Press. 1990. V. 9. P. 17-72.
4. Fesic S. W. & Zuiderweg E. R. // *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1990. V. 23. N 2. P. 97-131.
5. Haris P. I., Robillard G. T., Vandijk A. A., Chapman D. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. N 27. P. 6279-6284.
6. Rothschild K. J., Braiman M. S., Yi-Wu He., Marti T. and Khorana H. G. // *J. of Biological Chemistry*. 1990. V. 121. P. 16985-16990.
7. Raap J., Winkel C., de Wit A. H. M., van Houten A. H. H., Hoff A. J., Lugtenburg J. // *Anal. Biochem.* 1990. V. 191. P. 9-18.
8. Stockman B. J., Reily M. D., Westler W. M., Ulrich E. L., Markley J. L. // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 230-236.
9. Ellman J. A., Volkman B. F., Mendel D. // *J. Am. Chem. Soc.* 1992. V. 114. P. 7959-7961.
10. Redfield C., Dobson C. M. // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 122-136.
11. Zuiderweg E. R. P., McIntosh L. P., Dahlquist F. W., Fesic S. W. // *J. Magn. Reson.* 1986. V. 2. P. 210-216.
12. Hruby V. J. // *J. Synth. and Appl. Isot. Labelled Compounds*. 1985. V. 4. P. 287-292.
13. Berger A., Smolarsky M., Kurn N., Bosshard H. R. // *J. Org Chem.* 1973. V. 38. P. 457-460.
14. Raap J., Wolthuis W. N. E., Hehenkamp J. J. J., Lugtenburg J. // *Amino Acids*. 1995. V. 8. P. 171-186.
15. Lugwig S. N., Unkefer C. J. // *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 1992. V. 31. P. 95-102.
16. van der Berg E. M. M., van Liemt J. H., Willem B. S. // *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*. 1989. V. 108. N 9. P. 304-313.
17. McIntosh L. P., Griffey R. H., Muchmore D. C., Nielson C. P., Redfield A. G., Dahlquist F. W. // *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*. 1987. V. 84. P. 1244-1248.
18. Karnaukhova E. N., Reshetova O. S., Semenov S. Y., Skladnev D. A., Tsygankov D. Y. // *Amino Acids*. 1994. V. 6. N 2. P. 165-176.
19. Katz J. J., Crespi H. L. // *Pure Appl. Chem.* 1972. V. 32. P. 221-250.
20. Patel G. B., Sprott G. D., Ekiel I. // *Applied and Environmental Microbiology*. 1993. P. 1099-1103.
21. LeMaster D. M., Cronan J. E. // *Journal of Biological Chemistry*. 1982. V. 257. N 3. P. 1224-1230.
22. LeMaster D. M. // *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1990. V. 23. P. 133-174.
23. Мосин О. В., Карнаухова Е. Н., Пшеничникова А. Б., Складнев Д. А., Акимова О. Л. // *Биотехнология*. 1993. N. 9. С. 16-20.
24. Егорова Т. А., Мосин О. В., Ерёмин С. В., Карнаухова Е. Н., Звонкова Е. Н., Швец В. И. // *Биотехнология*. 1993. N. 8. С. 45-50.
25. Мосин О. В., Складнев Д. А., Егорова Т. А., Юркевич А. М., Швец В. И. // *Биотехнология*. 1996. N 3. С. 3-12.
26. Stoeckenius W., Bogomolni R. A. // *Annu. Rev. Biochem.* 1982. V. 51. P. 587-616.
27. Первушин К. В., Арсеньев А. С. // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21. N 2. С. 83-111.
28. Steel J. C. H., Reynolds J. A. // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. P. 1633-1638

29. Звонкова Е. Н., Зотчик Н. В., Филлипович Е. И., Митрофанова Т. К., Мяжкова Г. И., Серебренникова Г. А. // *Химия биологически активных природных соединений*. М.: Химия, 1970. С. 65-68.
30. Cohen J. S., Putter I. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1970. V. 222. P. 515-520.
31. Egorova T. A., Eremin S. V., Mitsner B. I., Zvonkova E. N., Shvets V. I. // *Journal of Chromatography B*. 1995. V. 665. P. 53-62.
32. Daniely B. // *J. Org. mass spectrometry*. 1989. V. 24. P. 225-229.
33. Физер Л. Ф., Физер М. // *Реагенты для органического синтеза*. М.: Мир, 1971. Т. 2. С. 92.
34. Griffiths D. V., Feeney J., Roberts G. C., Burgen A. S. // *Biochim. et Biophys. Acta*. 1976. V. 446. P. 479-585.
35. Matthews H. R., Kathleen S., Matthews K. and Stanley J. // *Biochim. et Biophys. Acta*. 1977. V. 497. P. 1-13.
36. Miller J. H. // *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1976. P. 393.
37. Oesterhelt D., Hess B. // *Eur. J. Biochem.* 1973. V.37. N .1. P. 316-326.
38. Tokunada F., Ebrey T. // *Biochemistry*. 1978. V.17. N .10. P. 1915-1922..
39. Oesterhelt D., Stoeckenius W. // *Methods Enzymol*. 1974. V. 31. P. 660-668.
40. Bligh E. G., Dyer W. J. // *Can. J. Biochem. Physiol*. 1959. V. 37. 1. 8. P. 911-918.
41. Мосин О. В., Егорова Т. А., Чеботаев Д. В., Складнев Д. А., Юркевич А. М., Швец В. И. // *Биотехнология*. 1996. N 4. С. 27-32