

关于酶及其活性中心在溶液中构型的探测

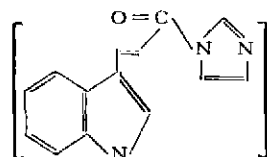
许根俊 钱元任 施建平

自从 Perutz 和 Kendrew 用 X 光晶体衍射方法做出了肌红蛋白和血红蛋白的三度空间模型以后,人们能够直接地看到肽链的走向、折叠和侧链基团的精确的相互关系,对于蛋白的空间构型有了更为深刻的了解。这项技术很快的用到酶的研究上来,现在这方面的研究,成了空间构型研究中最活跃和最吸引人的领域,被认为是解决蛋白质空间构型问题的最有力的手段,好象 X 光衍射可以代替其他的物理化学研究方法。但是随着酶的结构与功能研究的深入,人们运用其他物理化学方法发现生物高分子溶液及生物膜上普遍存在着变构作用,特别是由于对变构作用的生理调节功能有了进一步的认识,人们对于 X 光衍射技术的作用才有了比较全面的看法。如同一切技术一样,也是一分为二的,它有不可低估的解决空间构型的能力,也有它的局限性。Blow 和 Steitz^[1] 对此作了比较客观的分析,他们指出:一方面, X 光衍射要求蛋白是一个完整的晶体,尤其是在进行高分辨率工作时,对晶体的要求更为严格。即使很好的晶体,目前分辨率的上限为 $1.5 \text{ \AA}$ 。在 $2.0 \text{ \AA}$ 分辨率的 X 光衍射工作中比较好的例子是羧肽酶 A, 它的侧链基团可以确定的程度也只有 60%。对于低分辨率的工作如 $4 \text{ \AA}$ 和 $2.8 \text{ \AA}$ 则仅能看到螺旋的程度和肽链的走向,要确定侧链基团的位置还需要一级结构和溶液构型工作的配合。

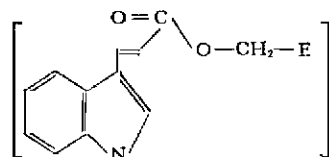
另一方面,由于酶本身的特点,把一个运动着的酶分子和酶与底物、抑制剂相互作用的运动过程模型化了,也必然会产生一些局限性,这至少表现在下列两个问题上:

第一,酶的自由度较小的晶体构型和它在稀溶液中的构型是否完全相同?

对于这个问题, X 光衍射分析和其他物理化学分析相比较表明:胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、核糖核酸酶、溶菌酶等的晶体结构和它们在溶液中的构型基本一致。如 Ross 和 Bernhard^[2] 用 N-[β -(3-吡啶)丙烯酰]咪唑

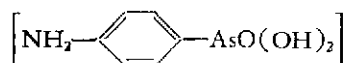


和 α -胰凝乳蛋白酶作用,产生 O-[β -(3-吡啶)丙烯酰]-Ser-195- α -胰凝乳蛋白酶



具有 360 nm 的特征吸收高峰,并可以脱酰产生胰凝乳蛋白酶。用酶的晶体与酰化试剂一起浸泡反应,或酶与酰化试剂先反应再结晶,都可以得到相同晶系的均一产物。溶液中和晶体中的酶酰化物吸收峰的特征和脱酰反应速度常数都是相同的,这说明了晶体和溶液中的构型是一致的。

但是 Johanson 和 Vallee 的工作表明,用重氮化的对氨基苯砷酸



和羧肽酶 A (根据 Petra 和 Neurath 方法制备,无 N 端 7 肽^[3]) 的 Tyr-248 作用产生的衍生物,其结晶状态和溶液状态的颜色不同,前者为黄色后者为明显的红色,也就是在溶液状态下除了和晶体状态同样有 325 nm 的吸收高峰外,还有一个 510 nm 的吸收高峰,表明了 Tyr-248 的

酚基和 Zn^{++} 的相互作用仅存在于溶液中,不存在于晶体中,它反映了此种羧肽酶 A 制剂溶液状态和晶体状态构型上存在着差别^[4,5]。至少目前认为在微环境上差别是可能存在的。对于这一问题的全面看法还有待于进一步对晶体和溶液构型进行研究和比较。

第二,对于酶在起催化作用时,构型的变化只能(最多只能)在 X 光衍射工作中看到一个初态和一个终态。如 DIP-对甲苯磺酰化的、以及含一系列作用在 Ser-195 位置上的不可逆抑制剂的胰凝乳蛋白酶的衍生物和天然的酶比较,其活性中心区域,His-57、Met-192 和 Asp-194 等残基所构成的区域有一定的变化^[6,7]。但是 X 光衍射技术不能了解酶在起催化作用时构型变化的过程,而这一过程对于阐明酶的作用原理,无疑是十分重要的。

鉴于这些原因,近来对于溶液中酶的构型的研究工作又增多起来,特别是注意到活性中心微区的构型变化和酶催化反应过程中的构型变化。我们认为酶的作用原理的阐明,必须要各方面工作相互配合、补充才行,而溶液中构型的研究就是其中的一个很重要的方面。

I. 用物理化学的方法观察酶在溶液中的构型和环境变化或变性因子对酶构型的影响

一些物理化学方法如测定粘度、光散射、超离心、氢同位素交换、旋光色散和圆二色光谱、紫外光谱和紫外差光谱、荧光光谱、红外光谱、顺磁和核磁共振谱等等,在阐明酶的分子外形、聚合状态、 α 螺旋和 β 折叠的程度、维系酶空间构型的各种作用力,以及金属和辅基与酶的相互作用等等方面,都起了重要的作用。用这些方法所得到的结果,对于 X 光衍射结果的分析 and 立体模型的建立,起了一定的作用。胰凝乳蛋白酶原紫外吸收、旋光色散和圆二色性的测定表明其构型与 pH 无关,而胰凝乳蛋白酶的构型在高 pH 时变成与酶原构型相似^[8,9,10]。根据构型变化的结果和化学改变胰凝乳蛋白酶 N 端 α 氨基以及动力学的研究,提出了在酶原活

化时活性中心部分变化的机制,给 X 光衍射结果的分析 and 解释提供了有用的知识,起了相互补充的作用^[6,7]。

核糖核酸酶经枯草杆菌蛋白酶限制性酶解后,s-蛋白与 s-肽能以非共价键形式重新组合成有活力的核糖核酸酶,因此是研究结构与功能关系的一个很好的对象。应用紫外差光谱、旋光色散、微热法等技术,研究 s-蛋白与化学合成的 s-肽及其类似物重组后结构变化和活力的关系,把一级结构、二级结构和三级结构与活力的关系联系起来^[11],可以说明更多的问题。对于酶在溶液中构型的观察,在胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶、溶菌酶、核糖核酸酶、羧肽酶 A 等方面的工作较多,对于以前研究较少的一些酶,近年来也有一些报导。如有人用 ^{13}C 核磁共振方法测定大肠杆菌色氨酸合成酶 α 亚基中四个组氨酸残基的状态变化^[12];光谱方法测定二价离子对大肠杆菌谷氨酰胺合成酶构型的影响^[13];比较 K_{12} 野生型和 $C_{10}F_{18}$ 型大肠杆菌中碱性磷酸酯酶 Zn^{++} 的存在与否和其构型的关系^[14],以及比较马、牛、鸽、火鸡、金枪鱼和蛾中细胞色素 C 的圆二色光谱,比较不同进化阶段的动物的细胞色素 C 的构型差异^[15] 等。

变性因子对构型的影响以及在变性过程中构型的变化,是酶溶液构型研究一开始就注意到的问题。有人研究了在脲变性、胍变性、热变性和酸碱变性等条件下酶构型变化的过程和某些可逆变性条件解除以后的恢复过程,说明了在不同条件下存在不同构型,并计算出其构型变化的能量关系和暴露与埋藏的色、酪氨酸残基的数目。

Bradbury 等^[16]测定核磁共振的质子弛豫速度来研究溶菌酶的脲变性过程,发现精氨酸残基聚集起来的“侧链群”的松散发生在其余部分之前。这启发我们可能用它来研究变性前的变化,因此是一个值得注意的方法。

把快速反应动力学的方法和构型变化的测定结合起来,特别是对于变构酶构型变化的研究,是一个新的重要的方向。这些变化,速度比较快,有的在毫秒内完成,有的更快。高丝氨酸

脱氢酶需要 K^+ ，而苏氨酸是它的变构抑制剂。当这种酶和 NADPH（还原辅酶 II）结合时，290 nm 激发的荧光增加，加 K^+ 荧光进一步增加。而加苏氨酸则比加 K^+ 引起的荧光增加要小。这表明这个酶存在二个不同状态。根据 Monod 的模型，称 K^+ 存在时的状态叫 R 态，苏氨酸存在时的状态为 T 态。酶加 NADPH 和 KCl 时，处于 R 态，这时用停流法和苏氨酸混合，从荧光的变化可以看出酶从 R 态到 T 态的转变。同样使酶与 NADPH 和苏氨酸混合处于 T 态，用停流法和 K^+ 混合，可以看出从 T 态到 R 态的转化，从而可以计算出速度常数^[17,18]。

II. 对于微区的构型的研究

酶在和底物或抑制剂作用的过程中往往伴随有局部的构型的变化，特别是活性中心部分的构型变化，这一方面的研究，可以较深入地了解活性中心和作用机制的特性。

另外，酶的变构作用和它的调节功能有关。变构的调节通常是通过解离、聚合来影响酶的活力，在四级结构发生变化时，伴随有三级结构的变化和活性中心部分的构型变化。揭示这些构型变化的过程有助于对酶作用原理的进一步了解。

由于上述两方面对构型工作提出的要求，局部区域构型变化的研究虽然刚刚开始，但非常活跃，研究报导越来越多。现在分几个方面简介如下：

1. 酶与底物、抑制剂和假底物相互作用时的构型变化

用氢同位素交换的方法观察可交换氢数目的变化，说明了磷酸化酶 b 在与磷酸吡哆醛和它的类似物结合时，有构型的变化^[19]。同样，核糖核酸酶 A 与竞争性抑制剂 3'-胞嘧啶核苷酸和 2'-胞嘧啶核苷酸结合时^[20]，以及丙酮酸脱羧酶与底物、抑制剂结合时，氢同位素交换的变化^[21]，也说明了有构型的变化。

酶和底物或抑制剂的结合引起的构型变化，也反映到圆二色光谱和旋光色散的变化上，如核糖核酸酶 T_1 与 2'-鸟嘌呤核苷酸结合的差

圆二色光谱在 250 nm 有一正的和在 280 nm 有一负的“外 Cotton 效应”，表明了底物的嘌呤部分和酶的活性中心酪氨酸或色氨酸残基有电子的相互作用^[22]，硫氰酸酶在加第一个底物时，也发现圆二色光谱的椭圆率大大增加的现象^[23]。

对于一些具有金属和黄素的酶，可以用顺磁共振和核磁共振的技术观察底物、配基和酶结合时活性中心部分的变化。关于顺磁共振对一些氧化还原酶（有血红素的和金属-黄素的酶）的研究，Beinert 和 Palmer 作了综述^[24]。

核磁共振由于测定质子弛豫时间比较灵敏，而且易于解释，在研究酶与底物结合后构型的变化上有较为重要的意义。Mildvan 综述了含锰的酶的核磁共振光谱，说明 Mn^{++} 对底物的结合有一定的贡献^[25]。对于核糖核酸酶 T_1 在重水中与 3'-鸟嘌呤核苷酸相互作用的核磁共振谱的观察，指出靠近 N 端的组氨酸残基可能与磷酸基团结合，而靠近 C 端的组氨酸残基可能与鸟嘌呤碱基结合^[26]。核糖核酸酶 A 与 5'-腺嘌呤核苷酸（5'-AMP）结合后核磁共振谱的观察表明，5'-AMP 的磷酸基团在酶上的结合点与 3'-嘧啶核苷酸的磷酸基团在酶上的结合点是相同的^[27]。Sykes 等研究了 N-乙酰- α 和 β -D-葡萄糖亚胺与溶菌酶结合的核磁共振谱，在不同 pH 的条件下观察到抑制剂和酶的 C 中心（单糖的结合中心）的结合有三个特点，即 1) Asp-52 和 Glu-35 是相当地接近“C 中心”的；2) 抑制剂的羟基的方向，对于它和酶的凹形窟中的侧链形成氢键很重要；3) 氢键的形成与否可以影响到乙酰基的质子和 Trp-108 的位置的变化，这些特点对于了解溶菌酶的作用机制有一定的帮助^[28]。

Vallee 等在磷酸吡哆醛活化的门冬氨酸氨基转移酶上观察到一个有趣的现象^[29]：在没有底物存在的情况下，酪氨酸残基不易被四硝基甲烷（TNM）硝化，但是在有二个底物存在的情况下，有一个酪氨酸残基很容易被 TNM 硝化，硝化后酶活力丧失。从光谱的研究知道，酪氨酸残基的活化是在酶的辅助因子磷酸吡哆醛变成醛亚胺到酮亚胺这一阶段或此阶段以后才出

现的。Vallee 把这种变化过程叫做“共催化构型变化”(syncatalytic conformation changes)。他还报导了羧肽酶 A 在加抑制剂和不加抑制剂时,圆二色谱有显著的不同,也表明“共催化构型变化”的存在。应该指出这种“共催化构型变化”是一个比较普遍的现象。Vallee 的工作为我们提供了一个深入了解酶催化过程中构型变化的方法。

2. 用探测剂或化学改变的方法研究微环境的变化

在这一方面,荧光探测、磁探测比较重要。荧光探测可用二类方法引入荧光生色基团,一类是非共价键的结合,一类是共价键的结合。前一类的化合物有 ANS (1-anilino naphthalene 8-sulfonate, 即 1-苯氨基-萘-8-磺酸)和它的类似物,它可以结合在蛋白的疏水区;有一些酶和它结合是在活性中心附近,例如 ANS 结合在谷氨酸脱氢酶的活性中心附近,结合后荧光增加,但不影响酶催化、旋光色散和沉降等性质。当加入 NADH (还原辅酶 I) 和鸟嘌呤核苷三磷酸 (GTP),则引起荧光进一步的增加,可以在一定浓度的谷氨酸脱氢酶、NADH 和 ANS 的条件下,用 GTP 滴定,或者在一定浓度 GTP、谷氨酸脱氢酶和 ANS 存在下,用 NADH 滴定,计算出二种不同构型变化的平衡常数。用化学改性的方法使一个亚基上的一个酪氨酸残基和 TNM 或 N-乙酰-咪唑作用,可以使谷氨酸脱氢酶脱敏而失去变构现象。用 ANS 作为探测剂,同样用 GTP 进行滴定,从饱和曲线的 1/2 GTP 浓度,可以看出酪氨酸残基的化学改性影响了 GTP 的结合中心^[30]。

非共价结合的荧光探测剂的另一例是 N-arylamino naphthalene sulfonate。它的荧光效率、发射荧光的最大波长、峰宽和溶剂环境都有密切的关系,可以用来“报告”活性中心的极性^[31]。其他如用荧光探测剂 aurovertin 研究牛心线粒体 ATP 酶的活性中心,发现探测剂与酶有两个结合中心,其中之一参与抑制酶的活力^[32]。

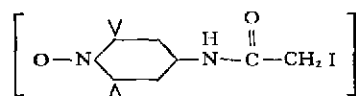
酶本身的侧链基团酪氨酸和色氨酸残基的

荧光性质,也可以用来研究局部区域的构型变化。溶菌酶的 Trp-108 和 Trp-62 就被利用来作这种测定^[33]。对溶菌酶-糖络合物进行荧光偏振研究,表明第 2 个糖分子与活性中心 E-F 结合后加速了 Trp-108 及 Trp-62、63 的旋转,使酶的构型发生变化,从而影响酶的活力^[34]。此外对马肝醇脱氢酶、酵母醇脱氢酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶也进行了这方面研究^[35]。

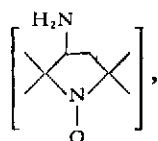
另一种是用化学改性的方法,引进一个共价结合的荧光探测剂,把酶中的酪氨酸用 TNM 硝化,然后还原成氨基,在 pH5.6 的条件下,可以专一的把 1-二甲氨基-萘-6-磺酰氯作用到此氨基上,从而引入荧光探测基团。通过对胰蛋白酶原引进 1-二甲氨基-萘-6-磺酰基 (1-dimethylaminonaphthalene-6-sulfonyl, DNS) 以后的活化过程的研究,发现胰蛋白酶原活化时,有一个相当于 DNS-酪氨酸从非极性环境转入极性环境的变化。与此同时,胰蛋白酶原的色氨酸荧光变化很小,说明了这个变化是局部的^[36]。1-chloro-4-nitrobenzoxadiazole 也可以作为一个和蛋白巯基作用的共价结合荧光探测剂^[37]。

其他化学改性方法:如对溶菌酶的精氨酸残基用烷己二酮或苯乙二醛作用测定圆二色性、旋光色散的变化^[38],用溴化氰使溶菌酶在甲硫氨酸处断链以后和将酶的二硫键还原以后进行圆二色性、旋光色散观察^[39],以及将溶菌酶的 Tyr-20 和 Tyr-23 硝化、还原,引入 DNS 测定旋光色散,并与二硫键可还原程度比较,都有一些报导^[40]。

顺磁标记的探测剂由于有很高的灵敏度,可用于局部区域构型变化的研究。Mc Connell 综述了这个方法^[41]。常用的顺磁标记探测剂有: N-(1-oxy-2, 2, 6, 6-tetramethyl-4 piperidinyl) iodoacetamide



及其衍生物和 1-oxy-3-amino-2, 2, 5, 5-tetramethyl pyrrolidine



它们都是稳定的氧化氮型自由基。

另外采用了顺磁双标记方法研究门冬氨酸氨基转移酶的构型变化,如果一个顺磁标记中心的信号发生了变化,另一个标记中心不变,则可以认为是局部区域的构型变化,用以和整个分子的构型变化区别开来^[42]。

测定 ANS 荧光标记的磷酸果糖激酶与 ATP、AMP 的结合表明,酶与两者各有其结合中心;ATP 的结合中心可能即为催化中心;酶羧甲基化后 ATP 使荧光增强的作用减弱^[43]。用氧化氮化合物顺磁标记磷酸果糖激酶的活性中心巯基,发现金属-ATP 与酶的催化中心和调节中心分别以两种不同的方式结合,并计算出金属与标记氧化氮之间的距离,以及 ATP 上 H-2、H-8、H-1' 与氧化氮之间的距离^[44]。看来将荧光探测和磁探测结合起来能得到更多的资料。

应该提到的还有:溶菌酶的核磁共振谱和 80°C 变性的核磁共振谱不同;变性的溶菌酶的核磁共振谱和与它相同组成的氨基酸混合物的核磁共振谱极为相似。溶菌酶和变性的溶菌酶之间核磁共振谱的差别,被解释为是由于二级、三级结构的形成所引起的磁矩的相互作用的结果。分析二者的低磁场核磁共振谱发现在 1910 Hz 处,变性的溶菌酶有一个峰,这个峰是由 His-15 上的 C-2 质子形成的,天然的溶菌酶则没有这个峰。另外变性的溶菌酶在 2200 Hz 有一个高峰,它是色氨酸的吡啶环上 N 的质子产生的,天然的酶此峰向 2400 Hz 移动,并分裂为 5 个峰,表示天然的酶的 6 个色氨酸处于不同的构型位置。第六个峰看不见(或很弱),表明它处在分子内部。从酶与抑制剂 N-乙酰葡萄糖胺结合后的核磁共振谱和氢同位素交换的结果,分析出从 2400 Hz 到 2200 Hz 的 5 个峰依次为 Trp-28 或 111、Trp-108、Trp-62、Trp-123 和 Trp-63^[45,46]。

对于核糖核酸酶 A 的核磁共振谱的研究表明,在低磁场下 His-C₂ 质子分裂为 4 个峰,从 pH 对这四条谱线的影响表明四个峰相应的 pK 值为:① 6.7、② 6.2、③ 5.8、④ 6.4。在抑制剂存在下②和③受影响,①和④不受影响。因此②和③为活性中心 His-12 和 His-119。由 X 光衍射结果了解 His-48 是埋藏在分子内部,所以有反常的 pH 滴定曲线,应该是峰④,剩下的峰①为 His-105。为了区别 His-12 和 His-119,则可用枯草杆菌蛋白酶限制性酶解分出 s-肽,使 s-肽在重水中充分交换,测定重组的核糖核酸酶各峰的变化证明:②为 His-12,③为 His-119。

上述的结果表明,核磁共振光谱可区别不同位置残基,因此在研究局部构型的变化上,可能是一项有效的技术^[47-50]。

参 考 文 献

- [1] Blow, D. M. & Steitz, T. A.: *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 63, 1970.
- [2] Rossi, G. L. & Bernhard, S. A.: *J. Mol. Biol.*, **49**, 85, 1970.
- [3] Petra, P. H. & Neurath, H.: *Biochemistry*, **8**, 2466, 1969.
- [4] Johanson, J. T. & Vallee, B. L.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **68**, 2532, 1971.
- [5] Johanson, J. T., Livingston, D. M. & Vallee, B. L.: *Biochemistry*, **11**, 2584, 1972.
- [6] Sigler, P. B., Blow, D. M., Matthews, B. W. & Henderson, R.: *J. Mol. Biol.*, **35**, 143, 1968.
- [7] Binktoft, J. J., Blow, D. M., Henderson, R. & Steitz, T. A.: *Phil. Trans. Roy. Soc., B*, **257**, 67, 1970.
- [8] McConn, J., Fasman, G. D. & Hess, G. P.: *J. Mol. Biol.*, **39**, 551, 1969.
- [9] Oppenheim, H. L., Labouesse, B. & Hess, G. P.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 2720, 1966.
- [10] Rupley, J. A., Dreyer, W. J. & Neurath, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **18**, 162, 1955.
- [11] Rocchi, R. et al.: *Biochemistry*, **11**, 50, 1972.
- [12] Browne, D. T., Kenyon, G. L. & Packer, E. L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 42, 1973.
- [13] Segal, A. & Stadtman, E. R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 367, 1972.
- [14] Trotman, C. N. A. & Greenwood, C.: *Biochem. J.*, **114**, 82p, 1969.
- [15] Myer, Y. P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **214**, 94, 1970.
- [16] Bradbury, J. H. & King, N. L. R.: *Aust. J. Chem.*, **24**, 1703, 1971.

- [17] Bright, H. J.: in *"Probes of Structure and Function of Macromolecules and Membranes"*, ed by B. Chance et al., Academic Press, Vol. II, p. 123, 1971.
- [18] Epstein, N.: *F.E.B.S. Lett.*, **25**, 46, 1972.
- [19] Weisshaar, H. D. & Palm, D.: *Biochemistry*, **11**, 2146, 1972.
- [20] Nonnenmacher, G., Viala, E., Thierry, J. M. & Calvet, P.: *Eur. J. Biochem.*, **21**, 393, 1971.
- [21] Printz, M. P. & Gounaris, A. D.: *Fed. Proc.*, **31**, Abstr. 1463, 1971.
- [22] Sander, C. & Tso, Paul, O. P.: *Biochemistry*, **10**, 1953, 1971.
- [23] Volini, M. & Wang, S. F.: *Fed. Proc.*, **30**, Abstr. 1244, 1971.
- [24] Beinert, H. & Palmer, G.: *Adv. Enzymol.*, **27**, 105, 1965.
- [25] Mildvan, A. S.: *Adv. Chem. Ser. No. 100*, 390, 1970.
- [26] Ruterjans, H. & Pongs, P.: *Eur. J. Biochem.*, **18**, 313, 1971.
- [27] Haffner, P. H. & Wang, J. H.: *Biochemistry*, **12**, 1608, 1973.
- [28] Sykes, B. D., Studebaker, J. F. & Wien, R.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 4579, 1971.
- [29] Vallee, B. L., Riordan, J. F., Johansen, J. T. & Livingston, D. M.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **36**, 517, 1971.
- [30] Brocklehurst, J. R.: in *"Probes of Structure and Function of Macromolecules and Membranes"*, ed. by B. Chance et al., Academic Press, Vol. II, p. 59, 1971.
- [31] Turner, D. C. & Brand, L.: *Biochemistry*, **7**, 3381, 1968.
- [32] Chang, T. M. & Penefsky, H. S.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 2746, 1973.
- [33] Imoto, T., Forster, L. S., Rupley, J. A. & Fanka, F.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.*, **69**, 1151, 1972.
- [34] Teichberg, V. I. & Shinitzky, M.: *J. Mol. Biol.*, **74**, 519, 1973.
- [35] Purkey, R. M. & Galley, W. C.: *Biochemistry*, **9**, 3569, 1970.
- [36] Kennen, R. A. & Neurath, H.: *Biochemistry*, **10**, 551, 1971.
- [37] Freedman, R. B.: in *"Probes of Structures and Function of Macromolecules and Membranes"*, ed. by B. Chance et al., Academic Press, Vol. II, p. 325, 1971.
- [38] Habeeb, A. F. S. A., Suliman, A. M. & Atassi, M. Z.: *Fed. Proc.*, **30**, Abstr. 1492, 1970.
- [39] Ohta, Y., Hibino, Y., Ssaba, K., Sugima, K. & Samejima, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 802, 1971.
- [40] Atassi, M. Z., Perlstein, M. T. & Habeeb, A. F. S. A.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 3291, 1971.
- [41] Mc Connell, H. M.: *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 227, 1971.
- [42] Тимофеев, В. П. и Подиновский, О. Р.: *Мол. Биол.*, **6**, 377, 1972.
- [43] Bloxhan, D. P.: *Biochemistry*, **12**, 1602, 1973.
- [44] Jones, R., Dwek, R. A. & Walker, I. O.: *Eur. J. Biochem.*, **34**, 28, 1973.
- [45] McDonald, C. C. & Phillips, W. D.: in *"Biological Macromolecules"* (Fasman, G. ed), Dekker, New York, 1970.
- [46] Glickson, J. D., McDonald, C. C., Phillips, W. D.: *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 492, 1969.
- [47] Meadows, D. H., Markley, J. L. & Cohen, J. S.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **58**, 1307, 1967.
- [48] Meadows, D. H., Jardetzky, O., Epan, R. M., Ruterjans, H. H. & Scheraga, H. A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **60**, 766, 1968.
- [49] Meadows, D. H. & Jardetzky, D.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **61**, 406, 1968.
- [50] Bovey, F. A. in *"High Resolution NMR of Macromolecules"*, p. 354—356, Academic Press, 1972.