



УДК 577.11.088.3:579.222.083.33

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ МИКРОБНОГО ПРОДУЦЕНТА ПАЛИТОКСИНА

© 2000 г. Г. М. Фролова[#], Т. А. Кузнецова, В. В. Михайлов, Г. Б. ЕляковТихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, 690022,
Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 18.03.99 г. Принята к печати 05.07.99 г.

Разработан метод конкурентного иммуноферментного определения палитоксина, отличающийся от известных методов использованием нативного токсина в качестве антигена связывания. Метод позволяет определять палитоксин в интервале от 6 до 250 нг/мл. Чувствительность определения соизмерима с чувствительностью радиоиммунологического метода определения палитоксина, но в 3 раза ниже иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител. Серологическая специфичность связывания палитоксина с антителами доказана в конкурентном ИФА с некоторыми токсинами морских беспозвоночных. Методы непрямого и конкурентного ИФА были использованы для обнаружения палитоксинпродуцирующих бактерий среди 420 изолятов морских микроорганизмов. Установлено, что грамтрицательные бактерии *Aeromonas* sp. и *Vibrio* sp., ассоциированные с токсичными образцами мягкого коралла *Palythoa* sp., продуцировали соединения, имеющие антигенное родство с палитоксином.

Ключевые слова: палитоксин; морские микроорганизмы; иммуноферментный анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Палитоксин – один из наиболее сильных морских токсинов [1] был впервые выделен из токсичных видов мягкого коралла рода *Palythoa*: *P. toxica* [2], *P. tuberculosa* [3], *P. caribaeorum* [4]. Обнаружение токсина в морских организмах различных систематических групп, в частности в двух видах крабов *Lophozozymus pictor* и *Demania toxica*, рыбе *Melichthys vidua* [6], актинии *Radianthus macrodactylus* [7] и микроводоросли *Ostreopsis siamensis* [8], предполагает возможность его микробного происхождения. Известно, что некоторые морские токсины, например тетродотоксин и сакситоксин, синтезируются бактериями, симбионтными с макроорганизмами, и концентрируются в органах хозяина [9, 10]. Первое подтверждение микробного пути биосинтеза РТХ было получено учеными Гавайского университета, которые выделили из коралла *P. toxica* штамм *Vibrio* sp., синтезирующий токсичную фракцию с аналогичным палитоксину УФ-спектром [11]. Однако бактериальная культура продуцировала малое количество токсина и теряла это свойство при повторных пересевах.

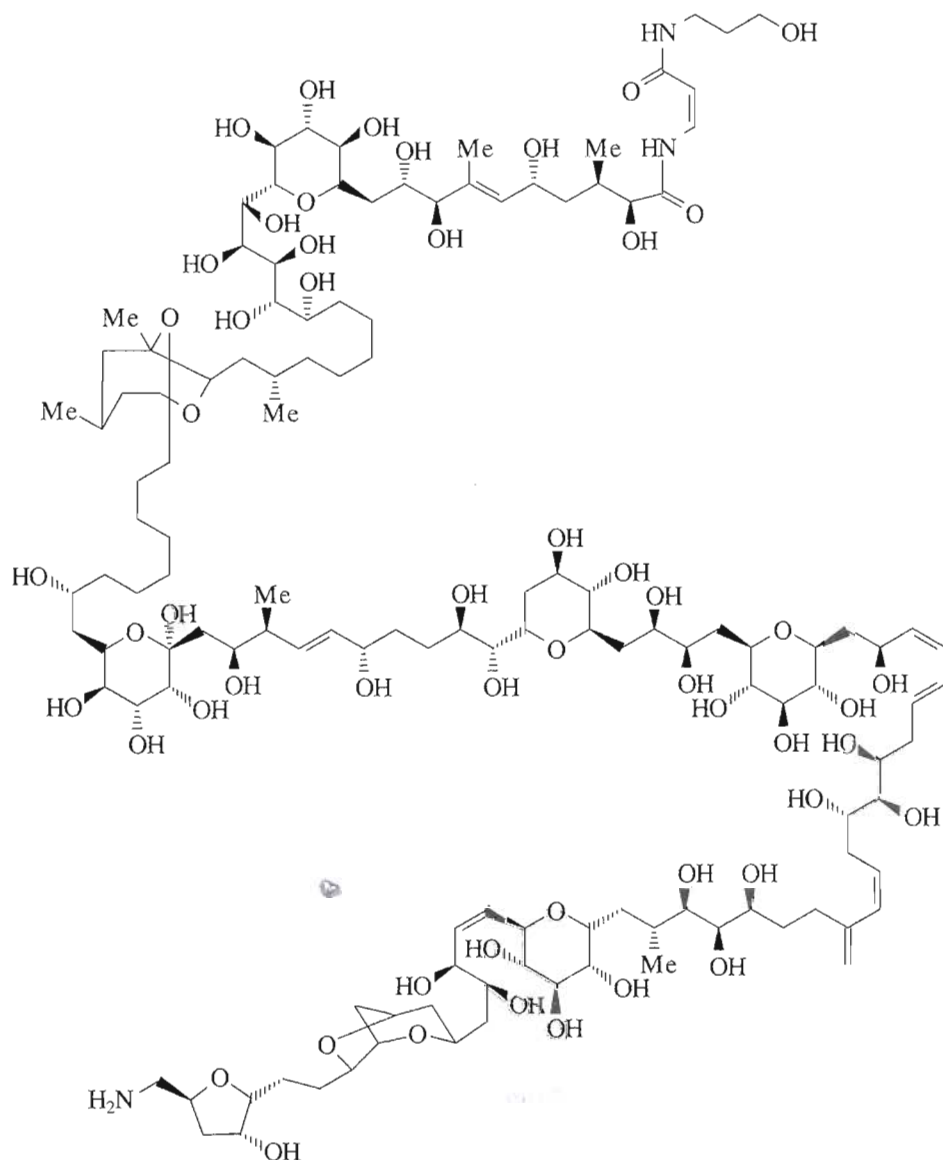
Низкое содержание палитоксина или его аналогов в бактериальных культурах требовало применения высокочувствительных методов их тестирования. Известно, что иммунохимические методы в силу высокой специфичности и чувствительности являются наиболее перспективными для идентификации небольших количеств токсинов, в том числе и в морских объектах [12]. Ранее для определения РТХ в биологических жидкостях разработаны радиоиммунологический метод с использованием поликлональных антител [13] и пять вариантов иммуноферментного анализа с использованием поликлональных и моноклональных антител [14]. Однако во всех вышеперечисленных методах в качестве антигена использован модифицированный по первичной аминогруппе инактивированный РТХ. Цель данной работы – разработка иммуноферментного метода определения РТХ с использованием нативного токсина в качестве антигена связывания и применение этого метода для обнаружения палитоксинподобных соединений в экстрактах бактериальных культур.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выделения РТХ выбран ранее описанный метод [15], включающий обращенно-фазовую хроматографию водно-этанольного экстракта мягких кораллов с последующей анионо- и катионообменной хроматографией полученной токсичной фракции. В качестве гидрофобного сор-

Сокращения: РТХ – палитоксин; ИФА – иммуноферментный анализ; РИА – радиоиммунологический анализ; BSA – бычий сывороточный альбумин; PBS – фосфатно-солевой буфер.

[#] Автор для переписки (факс: 7 (4-232) 32-40-50; e-mail: kuzta@piboc.marine.su).



Палитоксин (РТХ) [5].

бента использован Полихром-1, который имеет высокую сорбционную емкость по отношению к РТХ [16]. В УФ-спектре полученного токсина имелись два максимума поглощения при 233 (λ_{233} 36.300) и 264 нм (λ_{264} 21.720), характерные для всех выделенных ранее образцов палитоксина [5]. РТХ имел $[\alpha]_{578} + 26^\circ$ (с 0.1; вода). LD_{50} для мышей при внутривенной инъекции его водного раствора была равна 0.4 мкг/кг. 1H -ЯМР-спектр токсина содержал сигналы протонов, характерные для палитоксина (ср. [5]).

Известно, что РТХ является гаптеном и в комплексе с белком-носителем может индуцировать выработку специфических антител, способных нейтрализовать его биологическую активность [17]. Ранее высокоаффинные антитела бы-

ли получены против конъюгатов как нативного РТХ [17], так и его инактивированных производных [14]. Для получения специфической антисыворотки использован конъюгат нативного РТХ с альбумином (18 моль/моль), полученный по стандартной методике [17]. Конъюгат сохранял токсичность, и высокоаффинные антитела удалось получить только у двух из пяти иммунизированных кроликов. Полученная антисыворотка полностью нейтрализовала токсичность РТХ.

Для молекулы РТХ характерна высокая неспецифическая сорбция [13], что позволило нам использовать это свойство для разработки твердofазного ИФА. Известно, что факторами, определяющими чувствительность этого метода, являются условия связывания антигена с твердой

фазой. В связи с этим было изучено влияние pH среды, температуры и времени инкубации на сорбцию RTX на полистирольные планшеты. Линейный участок кривой связывания RTX с антителами в ИФА в условиях сорбции антигена в нейтральной и щелочной средах (pH 7.2 и 8.2) находился в пределах концентрации от 5 до 500 нг/мл независимо от условий инкубации: в течение 2 ч при 35 или 16 ч при 4°C. Незначительное снижение оптического поглощения при 492 нм (с пероксидазой хрена) наблюдали при сорбции 500 нг/мл RTX при pH 5.5. Для конкурентного ИФА нами были выбраны следующие условия: сорбция RTX в нейтральной среде, сенсбилизация доза 250 нг/мл, фракция иммуноглобулинов в разведении 1 : 7500.

Серологическая специфичность разработанной тест-системы была доказана конкурентным ИФА с некоторыми морскими токсинами. Так, ризохалин и макролид, выделенные из губок *Rhizochalina incrustata* [18] и *Theonella swinhoii* [19] соответственно, а также сульфатированный стероид из дальневосточной офиуры *Ophiura sarsi* [20] и стероидный гликозид морской звезды *Patiria pectinifera* [21] не взаимодействовали с антителами к RTX при концентрации 1 мг/мл. В то же время палитоксины, выделенные из различных образцов мягкого коралла *Palythoa* sp., имели подобную серологическую активность и ингибировали тест-систему полностью.

Стандартная кривая ингибирования, приведенная на рис. 1, позволяет определить концентрацию RTX от 6 до 250 нг/мл (0.3–12.5 нг в лунке). Чувствительность метода, т.е. концентрация, при которой наблюдается 50% ингибирование (CI_{50}), составляет 20 нг/мл (1.0 нг в лунке). Коэффициент вариации между параллелями достигает 6%, между экспериментами – 15%. Чувствительность разработанного нами конкурентного ИФА соизмерима с чувствительностью ранее описанного РИА, CI_{50} которого составляет 30 нг/мл [13], но в 3 раза ниже ИФА с использованием моноклональных антител (CI_{50} равно 6 нг/мл) [14].

Два варианта ИФА – непрямой метод и метод конкурентного связывания – использованы для скрининга палитоксинпродуцирующих бактерий среди микроорганизмов, ассоциированных с различными морскими организмами. Оба метода позволяют выявить структуры, антигенно родственные RTX, но последний дает возможность определить также степень их антигенного родства. Для непрямого варианта ИФА готовили взвеси микроорганизмов с одинаковой концентрацией клеток. В конкурентном ИФА в качестве ингибиторов использовали клетки бактерий и их водные экстракты. Известно, что морские микроорганизмы являются продуцентами высокоактивных протеиназ, присутствие которых может существенно исказить результаты реакции ингибирования.

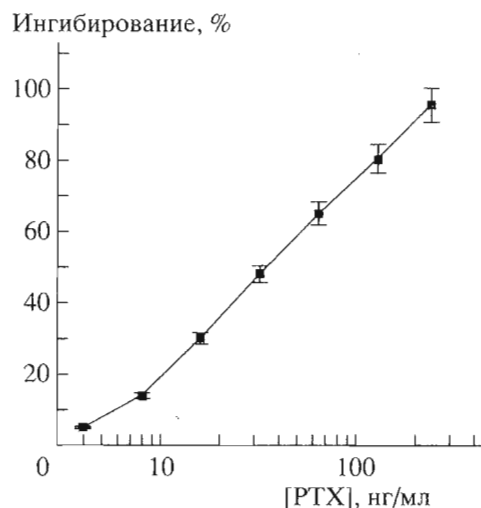


Рис. 1. Калибровочная кривая для определения палитоксина методом конкурентного ИФА. Среднее из трех измерений.

В связи с этим реакцию связывания с антителами проводили в присутствии ингибитора протеиназ – диизопропилфторфосфата, что позволило исключить ложноположительные реакции.

Четыреста двадцать изолятов морских гетеротрофных бактерий, выделенных из морских губок, мидий, иглокожих (80 изолятов), токсичных и нетоксичных образцов мягких кораллов *Palythoa* sp. (340 изолятов), собранных во время экспедиционных рейсов научно-исследовательского судна “Академик Опарин”, были протестированы на способность продуцировать палитоксинподобные соединения. В экстрактах бактерий, ассоциированных с губками, мидиями, иглокожими и нетоксичными образцами мягких кораллов *Palythoa* sp., нам не удалось обнаружить соединений, антигенно родственных RTX. Все микроорганизмы, так же как и их экстракты, не взаимодействовали с антителами к RTX. Однако 7 изолятов бактерий, выделенных из токсичных образцов мягких кораллов *Palythoa* sp., являлись потенциальными продуцентами RTX, поскольку при тестировании их в непрямом ИФА наблюдалось увеличение значений A_{492} в пределах 0.3–0.9 (таблица). Экстракты этих изолятов были также токсичны для мышей. Как показал конкурентный ИФА, только штаммы 13 и 34, отнесенные нами к видам *Vibrio* sp. и *Aeromonas* sp. соответственно, полностью ингибировали связывание RTX с антителами (рис. 2).

При культивировании выделенных изолятов на искусственной питательной среде мы столкнулись с проблемой, характерной для большинства морских бактерий, – потерей способности к продукции RTX при повторных пересевах. Тем не менее, из водно-этанольного экстракта бактериальных клеток *Aeromonas* sp., использовав комбинацию хроматографических методов, применяемых

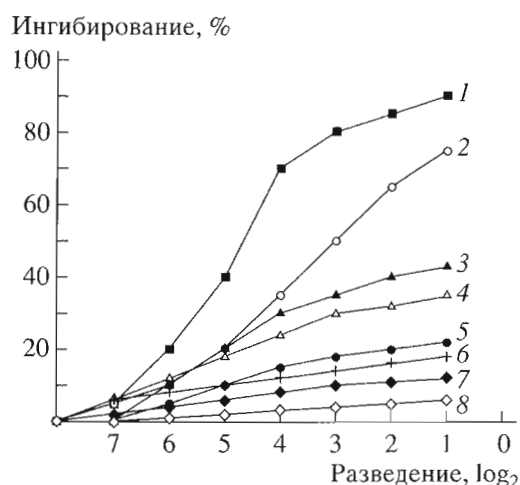


Рис. 2. Ингибирование морскими бактериями — потенциальными продуцентами РТХ (штаммы 34 (1), 13 (2), 10 (3), 41 (4), 33 (5), 44 (6), 106 (7), 210 (8) (см. таблицу)) реакции связывания РТХ с антителами. Среднее из трех измерений.

для выделения РТХ, мы смогли получить токсичную фракцию, которая полностью ингибировала связывание РТХ с антителами. Содержание РТХ, определенное методом конкурентного ИФА, составляло 5–10 мкг/мл экстракта, что не позволило выделить токсин в количестве, необходимом для структурных исследований.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что изоляты *Aeromonas* sp. и *Vibrio* sp., выделенные из токсичного образца мягкого коралла

Связывание изолятов морских микроорганизмов, выделенных из токсичного образца *Palythoa* sp., с антителами к РТХ в непрямом ИФА*

| Штамм | A_{492}^A | A_{492}^S | ΔA_{492} | Токсичность |
|-------|-------------|-------------|------------------|-------------|
| 10 | 0.10 | 0.40 | 0.70 | + |
| 13 | 0.60 | 0.20 | 0.40 | + |
| 29 | 0.40 | 0.20 | 0.20 | – |
| 33 | 1.00 | 0.40 | 0.60 | + |
| 34 | 0.70 | 0.20 | 0.50 | + |
| 41 | 1.30 | 0.40 | 0.90 | + |
| 44 | 1.20 | 0.60 | 0.60 | + |
| 61 | 0.90 | 0.70 | 0.20 | – |
| 75 | 0.25 | 0.20 | 0.05 | – |
| 106 | 0.40 | 0.10 | 0.30 | + |
| 210 | 1.30 | 0.60 | 0.70 | – |

* A_{492}^A , A_{492}^S , ΔA_{492} — оптическое поглощение при 492 нм в условиях эксперимента для среды, содержащей антитела к РТХ, антитела нормальной кроличьей сыворотки, и их разность, соответственно.

Palythoa sp., являются продуцентами соединений, обладающих антигенным родством с палитоксином. Подтверждением этому служит тот факт, что антитела к РТХ полностью нейтрализовали токсичность экстрактов из бактерий этих видов. Таким образом, разработанный метод иммуноферментного анализа может быть успешно применен для поиска и отбора палитоксинпродуцирующих бактерий среди микроорганизмов, ассоциированных с различными морскими объектами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Были использованы: бычий сывороточный альбумин (Reanal, Венгрия), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодииимид, гидрохлорид (BIO-RED, Richmond, CA, США), диизопропилфторфосфат (Merck, Германия), Полихром-1 (тетрафторэтилен, фракция 0.5–1.0, Олайне, Латвия), антитела против иммуноглобулинов кролика, меченные пероксидазой (ИЭМ им. В.Ф. Гамалеи, Россия), Твин-20 (Ferak, Германия), DEAE-сефадекс А-25 и СМ-сефадекс С-25 (Pharmacia, Fine Chemicals, Швеция), полистирольные планшеты для ИФА (Dynatech Laboratories, Chantilly VA, США). Буферы: PBS (10 мМ фосфатный буфер, 150 мМ NaCl, pH 7.2); PBS-T — PBS + 0.05% Твин-20, буфер А — PBS-T + 0.25% BSA.

Выделение палитоксина из экстракта мягких кораллов (по методике [15]). Водно-этанольный экстракт мягких кораллов упаривали досуха, растворяли в воде и наносили на колонку с Полихромом-1. Сырой токсин элюировали 50% этиловым спиртом. Для дальнейшей очистки использовали хроматографию на DEAE-сефадексе А-25 (0.01 М фосфатный буфер, pH 7.2) и три рехроматографии на СМ-сефадексе С-25 в градиенте 0.01–0.2 М ацетатного буфера, pH 5.4. РТХ элюировали 0.02 М ацетатным буфером.

Выделение суммарной токсичной фракции из микробных клеток. Палитоксинпродуцирующие бактерии *Vibrio* sp. и *Aeromonas* sp. культивировали при 30°C в течение 72 ч на твердой питательной среде следующего состава (г/л): пептон — 5.0, дрожжевой экстракт — 2.5, глюкоза — 1.0, K_2HPO_4 — 0.5, $MgSO_4$ — 0.05, агар — 15, морская вода — 750 мл, дистиллированная вода — 250 мл, pH 7.2 [25].

Микробную массу (20 г) суспендировали в 10 мл воды и разрушали ультразвуком (22 кГц, 0.4 А) в течение 2 мин. К суспензии добавляли 30 мл этилового спирта и перемешивали в течение 30 мин на магнитной мешалке. Осадок отделяли центрифугированием, водно-спиртовой экстракт концентрировали, растворяли в воде и наносили на колонку с Полихромом-1. Для дальнейшей очистки токсина использовали комбинацию хроматографических методов, описанных выше для выделения РТХ из кораллов.

Приготовление конъюгата RTX-BSA. К 5 мл раствора BSA (1 мг/мл в воде, pH 8.0, доведен триэтиламино) добавляли 1.4 мг RTX и 40 мг карбодиимида. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч и диализовали против воды (pH 7.3, доведен триэтиламино) при 4°C. Образовавшийся осадок удаляли, а конъюгат анализировали на содержание RTX спектрофотометрически по интенсивности поглощения при 264 нм и методом Лоури [22], используя в качестве стандарта BSA.

Получение антисыворотки. Для иммунизации одного кролика использовали эмульсию 25 мкл конъюгата RTX-BSA в 500 мкл изотонического раствора и 500 мкл полного адъюванта Фрейнда, которую вводили в спину (подкожно) и лимфоузлы задней лапки. Инъекцию проводили дважды с интервалом 10 сут. Через месяц после последней инъекции 30 мкл конъюгата в 500 мкл стерильного изотонического раствора вводили внутривенно. Забор крови проводили на 5–10 сут. Иммунную сыворотку двух кроликов, содержащую высокоаффинные антитела к RTX, использовали для разработки ИФА. Фракция иммуноглобулинов была получена ионообменной хроматографией на сефадексе А-25 как описано в работе [23]. В разведении 1 : 50 при внутрибрюшинной инъекции она полностью защищала мышей от летальной дозы RTX (10^{-3} мг/кг).

Непрямой вариант ИФА проводили согласно [24]. Для сенсibilизации планшета RTX использовали его растворы в следующих буферах: PBS, карбонатном (10 мМ, pH 8.6) и цитратном (10 мМ, pH 5.5). В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл RTX (2000–20 нг/мл) в соответствующем буфере и инкубировали 2 ч при 35 или 16 ч при 4°C. Оставшиеся участки связывания блокировали 0.5% раствором BSA в рабочем буфере PBS-T в течение 1–2 ч при 20°C. Затем по 100 мкл фракции иммуноглобулинов в последовательных двукратных разведениях буфером А вносили в лунки планшета, реакцию связывания проводили при 35°C в течение 2 ч. Специфические антитела выявляли диагностическими антителами против иммуноглобулинов кролика, мечеными пероксидазой хрена, разведенными в 1000 раз буфером PBS-T. После каждой стадии планшеты 3 раза промывали буфером PBS-T, чередуя с промывкой водой. Результаты анализа учитывали на сканирующем спектрофотометре Multiscan Reader (Labsystems, PLUS, Финляндия) при 492 нм, применяя в качестве хромогена *o*-фенилендиамин (1 мг/мл), растворенный в 10 мМ цитратном буфере, pH 5.5, с 0.06% H₂O₂. Анализ проводили в трех параллелях.

Концентрацию иммобилизованных на планшете микробных клеток определяли с помощью спектрофотометра (Spekol 11, Германия). Гото-

вили взвесь клеток в PBS, которая имела 50%-ное пропускание при 660 нм. В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл взвеси клеток и инкубировали 16 ч при 4°C. Оставшиеся участки связывания блокировали как описано выше. Затем по 100 мкл иммуноглобулиновой фракции в разведении 1 : 3000 в буфере А вносили в каждую лунку и инкубировали 2 ч при 35°C. Дальнейшую процедуру проводили как описано выше. Для доказательства специфичности реакции связывания клеток с антителами параллельно была использована контрольная нормальная кроличья сыворотка в таком же разведении. Увеличение значения A₄₉₂ свыше 0.3 принимали за положительный результат.

Конкурентный ИФА. Планшеты сенсibilизировали ночь при 4°C, внося в каждую лунку оптимальную концентрацию RTX (250 нг/мл) в PBS. Оставшиеся участки связывания блокировали как описано выше. К аликвотам (50 мкл) ингибитора, последовательно разведенным в 2 раза буфером PBS-T, прибавляли по 100 мкл иммуноглобулиновой фракции антисыворотки в разведении 1 : 7500 в буфере А. Планшеты инкубировали 2 ч при 35°C. В качестве ингибитора использовали RTX (начальная концентрация 250 нг/мл), взвесь бактериальных клеток (начальное T₆₆₀ 50) и их водные экстракты. Дальнейшую процедуру проводили как описано выше.

Определение токсичности RTX. Белые мыши (25–30 г) были использованы для определения LD₅₀. Токсичность определяли через 24 ч после введения 0.2 мл RTX в воде (внутривенно) или 0.5 мл экстракта микробных клеток (см. ниже) в PBS (внутрибрюшинно).

Работа поддержана грантом РФФИ № 98-04-48000.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Habermann E. // *Toxicon*. 1989. V. 27. P. 1171–1187.
2. Moore R. E., Scheuer P. J. // *Science*. 1971. V. 172. P. 495–498.
3. Kimura S., Hashimoto Y., Yamazato K. // *Toxicon*. 1973. V. 10. P. 611–617.
4. Beress L., Zwick J., Kolkenbrock H.J., Kaul P.N., Wassermann O. // *Toxicon*. 1983. V. 21. P. 285–290.
5. Moore R.E. // *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 1985. V. 48. P. 81–202.
6. Fukui M., Yasumura D., Murata M., Alcalá A.C., Yasumoto T. // *Toxicon*. 1988. V. 26. P. 20–21.
7. Mahnir V.M., Kozlovskaya E.P., Kalinovskiy A.I. // *Toxicon*. 1992. V. 30. P. 1449–1456.
8. Usami M., Satake M., Ishida S., Inoue A., Kan Y., Yasumoto T. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 5389–5390.
9. Yasumoto T., Yasumura D., Yotsu M., Michishita T., Endo A., Kotaki Y. // *Agric. Biol. Chem.* 1986. V. 50. P. 793–795.

10. Kodama M., Ogata T., Sato Sh. // *Agri. Biol. Chem.* 1988. V. 52. P. 1075–1079.
11. Moore R.E., Helfrich P., Patterson G.M.L. // *Oceanus.* 1982. V. 25. P. 54–63.
12. Hokama Y. // *J. Toxicology – Toxin Reviews.* 1991. V. 10. P. 1–35.
13. Levine L., Fujiki H., Gjike H.B., van Vunakis H. // *Toxicol.* 1988. V. 26. P. 1115–1121.
14. Bignami G.S., Raybould T.J.G., Sachinvala N.D., Grothaus P.G., Simpson S.B., Lazo C.B., Byrnes J.B., Moore R.E., Vann D.C. // *Toxicol.* 1992. V. 30. P. 687–700.
15. Uemura D., Hirata Y., Iwashita T., Naoki H. // *Tetrahedron.* 1985. V. 41. P. 1007–1017.
16. Еляков Г.Б., Стоник В.А., Мальцев И.И., Калинин В.И. А. с. 237662 СССР // *Б. И.* 1986.
17. Levine L., Fujik H., Gjika H.B., van Vunakis H. // *Toxicol.* 1987. V. 25. P. 1273–1282.
18. Makarieva T.N., Denisenko V.A., Stonik V.A., Milgrom Yu.M., Rashkes Ya.V. // *Tetrahedron Lett.* 1989. V. 30. P. 6581–6584.
19. Carmely S., Kashman Y. // *Tetrahedron Lett.* 1985. V. 26. P. 511–515.
20. Левина Э.В., Калиновский А.И., Стоник В.А., Федоров С.Н., Исаков В.В. // *Химия природ. соед.* 1988. Т. 3. С. 375–379.
21. Kicha A.A., Kalinovskiy A.I., Levina E.V., Stonik V.A., Elyakov G.B. // *Tetrahedron Lett.* 1983. V. 24. P. 3893–3896.
22. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
23. Sela M., Givol D., Mozes E. // *Biochem. Biophysica Acta.* 1963. V. 78. P. 649–657.
24. Карулин А.Ю., Дзантиев Б.Б., Орлова Г.Г., Егоров А.М. // *Журн. микробиол.* 1987. № 9. С. 12–18.
25. Youshimizu M., Kimura T. // *Fish Pathol.* 1976. V. 10. P. 243–259.

An Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detecting Palytoxin-producing Bacteria

G. M. Frolova[#], T. A. Kuznetsova, V. V. Mikhailov, and G. B. Elyakov

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Division, Russian Academy of Sciences,
pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia*

A competitive ELISA using the intact palytoxin as a coating antigen for detecting palytoxin was developed. This immunoassay allows palytoxin (PTX) to be determined in the range of 6–250 ng/ml. In sensitivity, this determination is comparable with RIA but is three times inferior to ELISA using monoclonal antibodies. Inhibition experiments using some toxins of marine invertebrates proved the serological specificity of the palytoxin binding to antibodies. Both the indirect and competitive ELISA were used to find PTX-producing bacteria among 420 isolates of sea bacteria. It was found that gram-negative bacteria *Aeromonas* sp. and *Vibrio* sp. associated with toxic samples of the soft coral *Palythoa* sp. produced compounds antigenically related to PTX.

Key words: ELISA, palytoxin, sea microorganisms

[#] To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (4232) 32-4050; e-mail: kuzta@piboc.marine.su.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 4. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.

Сдано в набор 27.12.99 г.

Подписано к печати 28.02.2000 г.

Формат бумаги 60 × 88¹/₈

Офсетная печать

Усл. печ. л. 10.0

Усл. кр.-отт. 2.7 тыс.

Уч.-изд. л. 10.7

Бум. л. 5.0

Тираж 256 экз.

Зак. 3462

Свидетельство о регистрации № 0110214 от 08.02.93 г. в Министерстве печати и информации Российской Федерации
Учредители: Российская академия наук, Отделение биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений РАН, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Адрес издателя: 117864, Москва, Профсоюзная ул., 90

Отпечатано в ППП "Типография "Наука", 121099, Москва, Шубинский пер., 6