

УДК 543.544.6 : 678.54

ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ НА ЦЕЛЛЮЛОЗОИОНИТАХ

А. Я. Николаев

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	1087
I. Ионобменники на основе целлюлозы	1088
II. Природа взаимодействия белков с целлюлозоионитами	1091
III. Влияние концентрации нейтральных солей и водородных ионов на сорбцию белков целлюлозоионитами	1097
IV. Механизм разделения белков на колонках целлюлозоионитов	1100
V. Элюирование белков с колонок целлюлозоионитов	1101
VI. Техника хроматографии белков	1104
VII. Некоторые результаты и перспективы	1107

ВВЕДЕНИЕ

Хроматография белков на целлюлозоионитах (ЦИ), впервые успешно примененная в 1956 г. Питерсоном и Собером¹⁻³ и Эллисом и Симпсоном⁴, в последние годы стала наиболее распространенным приемом в препаративной химии белков, особенно на последних стадиях очистки. ЦИ обладают рядом свойств, весьма благоприятных для хроматографии белков. Сюда относится прежде всего высокая разделяющая способность колонок ЦИ: многие кристаллические белки, а также белковые препараты, гомогенные по данным электрофореза и ультрацентрифугирования, оказались неоднородными при хроматографии на колонках ЦИ⁵⁻¹⁰. Белки очень мало повреждаются на колонках ЦИ, и выходы часто достигают 100%. Существенное значение имеют также химическая стойкость ЦИ, незначительная сорбируемость на них низкомолекулярных веществ и небольшое сопротивление колонок ЦИ току жидкости.

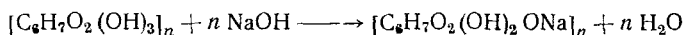
Экспериментальный материал по хроматографии белков на ЦИ суммирован в ряде обзоров¹¹⁻¹⁴. Однако до сих пор не было попыток последовательного рассмотрения опытных данных с целью выяснения механизма сорбции и разделения белков на колонках ЦИ. Отсутствие таких сведений сильно тормозит развитие этого перспективного метода, а необходимость эмпирически подбирать условия эксперимента не позволяет в полной мере использовать все возможности хроматографии на колонках ЦИ.

Мы не ставили перед собой цель охватить в настоящей статье всю имеющуюся по данному вопросу литературу. Здесь собраны и обобщены главным образом литературные данные, проливающие некоторый свет на механизм сорбции и разделения белков на ЦИ и позволяющие сделать ряд рациональных предложений относительно планирования и постановки эксперимента. Не все положения статьи имеют достаточно надежную экспериментальную базу и поэтому носят отчасти гипотетический характер. Однако их обсуждение оправдывается почти полным отсутствием специальных исследований по хроматографии белков и, мы надеемся, будет способствовать развитию такого рода исследований.

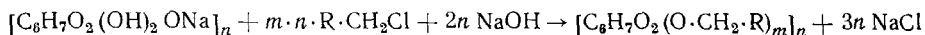
1. ИОНООБМЕННИКИ НА ОСНОВЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

1. Синтез целлюлозоионитов

В нативной целлюлозе волокна частично ориентированы (полукристаллическая структура). При обработке целлюлозы концентрированным раствором щелочи (мерсеризации) образуется алкогольат — алкалицеллюлоза:



После разбавления водой вновь образуется свободная целлюлоза, однако ориентированность волокон полностью нарушается. Это сопровождается увеличением гидрофильности и реакционной способности целлюлозы. Общий способ получения эфиров целлюлозы, к которым относятся и применяемые в настоящее время ЦИ, заключается в действии галоидалкилов на алкалицеллюлозу в присутствии избытка щелочи:



Здесь $m = 1, 2$ или 3 , n зависит от степени полимеризации целлюлозы и равно обычно 6000—10 000. Если R содержит ионогенные группы, то эфир целлюлозы будет целлюлозоионитом. Количество образовавшихся эфирных связей (число m) определяется концентрацией галоидалкила в реакционной смеси. Адсорбционная емкость ЦИ тем больше, чем больше он содержит ионизирующих групп, но слишком большое содержание таких групп ведет к желатинизации или даже растворению целлюлозы. Содержание ионогенных групп в обычно применяемых ЦИ, как правило, не превышает 1—2 *мэкв* на 1 *г* адсорбента, т. е. одна ионизирующая группа приходится приблизительно на 4—8 глюкозных остатков целлюлозы.

Фосфоцеллюлоза представляет собой сложный эфир фосфорной кислоты и целлюлозы. Были синтезированы и применялись в качестве ионообменников также сложные эфиры целлюлозы и органических кислот^{15–17}.

Диэтиламиноэтилцеллюлозу впервые синтезировал Гартман в 1930 г.¹⁸ В последующие годы были получены аминоэтилцеллюлоза¹⁹, *n*-аминобензилцеллюлоза²⁰, триэтиламиноэтилцеллюлоза²¹, эктесла, катиониты²¹, в том числе карбоксиметилцеллюлоза²². На ионообменные свойства ЦИ впервые указали Мак-Интайр и Шенк¹⁷. Гофпауэру и Гутри принадлежит первая попытка применения ЦИ для очистки белков²³. Описание синтеза наиболее употребительных в настоящее время ЦИ содержится в статьях Питерсона и Собера² и Эллиса и Симпсона⁴, а также в сборнике²⁴. Хорошие перспективы имеет, по-видимому, применение ЦИ в виде ионообменной бумаги^{25, 26}.

В недавнее время синтезирован и применяется для фракционирования белков и других веществ диэтиламиноэтилсефадекс^{27–31}, отличающийся от соответствующего ЦИ структурой нерастворимого иона: диэтиламиноэтилсефадекс получен на основе полисахарида декстрана, цепи которого «сшиты» поперечными связями. Таким образом, этот адсорбент имеет структуру трехмерной сетки.

Были сделаны попытки получения ферментспецифических сорбентов, в которых ионогенная группа является аналогом субстрата выделяемого фермента³². Для ферментов, гидролизующих целлюлозу, таким

специфическим сорбентом является просто немодифицированная целлюлоза³³. Для ферментов, действующих на ионизирующие субстраты, такие попытки вряд ли можно считать достаточно обоснованными, так как неспецифическое электростатическое взаимодействие между белком и ЦИ будет преобладать над взаимодействием между ЦИ и активным центром фермента.

2. Общие свойства целлюлозоионитов

Все ЦИ представляют собой слабые кислоты или основания. Количество ионогенных групп и константы ионизации можно определить по данным титрования со стеклянным электродом суспензии ЦИ в 1 М растворе NaCl_2 . Типичные кривые титрования приведены на рис. 1. Количество ионогенных групп можно также определить по содержанию азота, фосфора или серы.

Наличие одноименных зарядов на молекуле ЦИ приводит к взаимному отталкиванию участков цепочки. Вследствие этого ионогенные группы становятся легко доступными даже для крупных обменивающихся ионов.

Скорость ионного обмена на синтетических ионообменных смолах определяется временем диффузии ионов внутрь зерен сорбента как наиболее медленным процессом. Этот фактор имеет особенно большое значение при сорбции таких высокомолекулярных веществ, как белки³², вследствие чего при хроматографии белков на колонках синтетических смол необходимо применять чрезвычайно низкие скорости протекания растворов через колонку: ~ 2 мл/час на 1 см^2 поперечного сечения колонки. Целлюлозная матрица ЦИ представляет собой не трехмерную сетку, как матрицы синтетических ионообменных смол, а «одномерные» волокна, отделенные в колонке друг от друга слоем гидратной и капиллярной воды, через который свободно проходят белковые молекулы. Вследствие этого устраняется фактор внутренней диффузии в кинетике сорбции белков на ЦИ, что без ухудшения результатов позволяет применять очень высокие скорости протекания растворов через колонки ЦИ — до 50 мл/час на 1 см^2 поперечного сечения колонки.

В водных суспензиях ЦИ вследствие гидрофильности целлюлозы не образуется резкой границы жидкость — твердое тело (как в случае минеральных сорбентов) или жидкость — масло (как в случае синтетических ионообменных смол), сорбент как бы одет чехлом гидратационной воды. Это имеет два важных следствия: 1) исключается сорбция белков на поверхностях и 2) исключается поверхностная денатурация. Как уже указывалось, выходы белков при хроматографии на колонках ЦИ достигают 100%. Так, при хроматографии тиротропина на амберлите потери составляют $\sim 50\%$, в то время как с колонки карбоксиметилцеллюлозы выход количественный при одинаковой степени очистки³⁵.

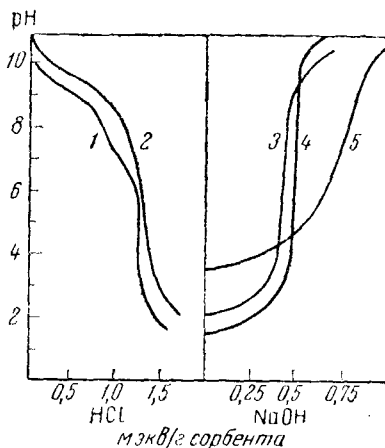


Рис. 1. Кривые титрования ЦИ. 1 — Диэтиламиноэтилцеллюлоза; 2 — триэтиламиноэтилцеллюлоза; 3 — сульфометилцеллюлоза; 4 — сульфэтилцеллюлоза; 5 — карбоксиметилцеллюлоза

Величины pK для целлюлозокатионитов (ЦК) колеблются в пределах 2—2,5; для целлюлозоанионитов (ЦА) — в пределах 7—9,5. Таким образом, ЦИ являются слабыми кислотами или основаниями. Следовательно, их соли, особенно со слабыми же кислотами или основаниями (например, с аминокислотами) должны быть сильно гидролизрованы. При хроматографии низкомолекулярных веществ на колонках ЦИ это проявляется в том, что такие вещества перемещаются вдоль колонки либо со скоростью протекания растворителя, либо со скоростью, мало от нее отличающейся^{36, 37}. Белки также являются слабыми кислотами или основаниями, тем не менее сорбируемость их на ЦИ велика, так как вследствие многозарядности белкового иона в этом случае возможно образование множественных связей между белками и ЦИ.

Увеличение содержания ионогенных групп на ЦИ повышает его сорбционную емкость и качество разделения³, однако склонность к желатинизации ЦИ с большой емкостью приводит к увеличению сопротивления колонки току жидкости, что затрудняет или делает невозможным применение хроматографической техники. Полностью растворимые полисахариды с большим содержанием ионогенных групп (1—3 на остаток глюкозы) можно применять для фракционирования белков осаждением^{38, 39}.

Размер частиц ЦИ не оказывает заметного влияния на сорбционные свойства. Обычно применяемые сорбенты имеют размер частиц 200—400 мкш. Если частицы представляют собой длинные волокна (свыше 1 мм), то затрудняется равномерная упаковка колонок, так как такие ЦИ образуют комки; кроме того, после упаковки колонки и снятия внешнего давления объем колонки может сильно увеличиться вследствие механической упругости волокон. Некоторое влияние на свойства ЦИ оказывает сорт целлюлозы, из которой приготовлен сорбент².

3. Целлюлозоаниониты (ЦА)

Диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭЦ) получается при реакции целлюлозы с гидрохлоридом 2-хлортриэтиламина в концентрированном растворе щелочи. В водной суспензии образуется гидрат, диссоциирующий с образованием иона гидроксила, который и является обменным ионом ДЭАЭЦ:



ДЭАЭЦ является слабощелочным анионитом ($pK' = 9,5$) и наиболее универсальным ЦИ. Он широко применяется для фракционирования белков; возможно также разделение нуклеиновых кислот⁴⁰, нуклеотидов^{41—43}, вирусов⁴⁴, пептидов^{45—48}, полисахаридов⁴⁹ и других веществ^{50, 51}.

Триэтиламиноэтилцеллюлоза (ТЭАЭЦ) получается при реакции ДЭАЭЦ с этилбромидом²¹. Ионогенная группа, по-видимому, имеет строение четырехзамещенного аммониевого основания с гидроксилом в качестве обменного иона. По свойствам и области применения мало отличается от ДЭАЭЦ^{52—54}.

Аминоэтилцеллюлоза (АЭЦ) $\text{Ц} \cdot \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{NH}_2$ является несколько менее щелочным анионитом, чем ДЭАЭЦ; $pK' = 9,3$ ^{55, 56}.

Эктеола-целлюлоза (эктеола) — продукт реакции эпихлоргидрина и триэтанолamina с целлюлозой в концентрированном растворе щелочи. Строение ионогенной группы эктеолы неизвестно. Она является менее щелочным анионитом, чем ДЭАЭЦ; $pK' = 7,6$. Эктеола наиболее пригод-

на для фракционирования нуклеиновых кислот⁵⁷⁻⁶⁰ и нуклеопротеидов⁶¹⁻⁶³, применяется также для выделения нуклеотидов^{64,65}, гепарина и гиалуроновых кислот^{66,67}, вирусов⁶⁸⁻⁷⁰. Любопытно отметить, что хроматографическое поведение бактериофага на колонке эктеола определяется белками, а не нуклеиновыми кислотами⁷¹. Эктеола была с успехом использована для очистки щелочной фосфатазы из почек свиньи; однако этот фермент, по-видимому, не является белком⁷².

Парааминобензилцеллюлоза (ПАБЦ) $\text{Ц} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH}_2$ является еще менее щелочным анионитом, чем эктеола. Применяется главным образом при изготовлении белковых ионообменников для выделения антител и фракционирования нуклеиновых кислот⁷³⁻⁷⁵.

Гуанидоэтилцеллюлоза (ГЭЦ) $\text{Ц} - \text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{NH} \cdot \text{C} = \text{NH} \cdot \text{NH}_2$ получается гуанидированием аминоэтилцеллюлозы. Ионогенные группы титруются при pH 8,5—10⁵⁶.

4. Целлюлозокаатиониты (ЦК)

Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) $\text{Ц} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ получается при реакции целлюлозы с монохлоруксусной кислотой в концентрированном растворе щелочи. КМЦ является слабокислым катионитом $\text{pK}' = 3,6$, применяется для выделения щелочных, нейтральных и слабокислых белков⁷⁶⁻⁸², а также пептидов⁸³⁻⁸⁵ и вирусов⁸⁶.

Фосфоцеллюлоза (ФЦ) представляет собой сложный эфир фосфорной кислоты и целлюлозы: $\text{Ц} \cdot \text{PO} \cdot (\text{OH})_2$. Синтезируется при реакции целлюлозы с хлорокисью фосфора в концентрированном растворе щелочи. ФЦ — более кислый катионит, чем КМЦ. Каждый остаток фосфорной кислоты имеет два диссоциирующих гидроксила: $\text{pK}'_1 \approx 3$; $\text{pK}'_2 \approx 7$. ФЦ применяется для хроматографии белков^{3,87} и некоторых других веществ^{54,88}.

Сульфозетилцеллюлоза (СЭЦ) $\text{Ц} \cdot \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2\text{OH}$ и сульфометилцеллюлоза (СМЦ) $\text{Ц} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{SO}_2\text{OH}$ — еще более кислые катиониты, чем ФЦ²¹, они применяются для фракционирования белков⁸⁹⁻⁹².

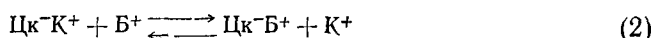
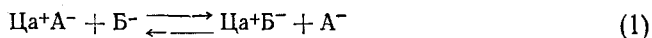
II. ПРИРОДА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ С ЦЕЛЛЮЛОЗОАНИОНИТАМИ

1. Сорбция по ионному механизму

В сорбции белков на ЦИ основную роль играют, по-видимому, электростатические силы. В пользу такого предположения говорят следующие факты: 1) подавляющее большинство сорбирующихся на ЦИ белков не сорбируется на исходной, не содержащей ионизирующих групп, целлюлозе; 2) сорбционная емкость ЦИ возрастает с увеличением числа ионогенных групп; 3) скорость сорбции велика: равновесие достигается за несколько минут⁹³; 4) при элюировании белков с целлюлозокаатионита раствором с возрастающим pH компоненты появляются в порядке убывающей электрофоретической подвижности; при элюировании с целлюлозоанионитов элюентом с убывающим pH фракции появляются в элюате в порядке возрастающей электрофоретической подвижности^{3,94,95}.

Миц и Шлюетер⁹⁶ отметили стехиометрические отношения при взаимодействии белка с ЦИ: 1 г ДЭАЭЦ, содержащей 0,8 мг · экв/г ионогенных групп, связывает 0,8 г пепсина (эквивалентный вес 1000); если половина карбоксильных групп пепсина не заряжена, то же количество сорбента связывает вдвое больше пепсина; если увеличить вдвое число активных групп сорбента, количество связанного пепсина также увеличивается вдвое.

Таким образом, сорбцию белков на ЦИ можно представить уравнениями ионного обмена:



где Ca^+ и Цк^- — нерастворимые ионы целлюлозоанионита и целлюлозокатионита соответственно, A^- и K^+ — их обменивающиеся ионы, B^- и B^+ — анионная и катионная формы белка.

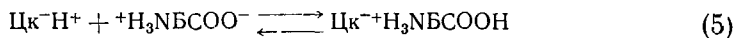
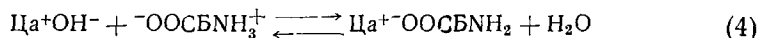
При ионном обмене белков необходимо учитывать специфические особенности белковой молекулы. Основные из этих особенностей следующие: 1) амфотерность; 2) многозарядность белкового иона; 3) большие размеры белковой молекулы и распределение активных (ионизирующих) групп по всей поверхности молекулы.

В случае сорбции биполярных ионов в отличие от сорбции ионов с одноименными зарядами наряду с электростатическим притяжением должно наблюдаться и электростатическое отталкивание. Однако Самсонов и Кузнецова⁹⁷ показали, что сорбция биполярных ионов на Н-обменниках протекает по следующей схеме:



т. е. обменный ион водорода переходит на отрицательно заряженную группу биполярного иона, в результате чего этот ион превращается в катион и сорбируется без электростатических помех. Такое представление приводит к выводу, что биполярные ионы (типа аминокислот) должны значительно хуже сорбироваться на ионитах в солевой форме, так как соль всегда диссоциирована, и в этом случае будет иметь место конкуренция электростатического притяжения и отталкивания. Этот вывод подтвержден экспериментально в той же работе Самсонова и Кузнецовой. Белки на ЦИ также лучше сорбируются в безсолевой среде^{93, 96}, что позволяет применить к этому случаю уравнение (3). Влияние отталкивания сказывается тем слабее, чем больше удалены друг от друга противоположно заряженные группы. Так, триглицин и диглицин сорбируются смолой СБС-2 и ДЭАЭЦ значительно лучше глицина^{36, 97}. Хотя ионогенные группы полипептидной цепи белковой молекулы отделены друг от друга, как правило, многими остатками аминокислот, они могут сближаться при скручивании полипептидной цепочки (при образовании вторичной и т. д. структур).

С учетом особенностей ионного обмена биполярных ионов сорбцию белков на ЦИ в водородной и гидроксильной форме можно представить следующими уравнениями:



где ${}^-\text{OOCBNH}_3^+$ — биполярный ион белка. Однако эти уравнения нельзя рассматривать как точное описание процесса, поскольку, с одной стороны, количества положительно и отрицательно заряженных групп на ионе белка могут быть неодинаковыми, и с другой, — пространственное расположение заряженных групп, осуществляющих отталкивание, может быть таково, что при сорбции иона белка они остаются диссоциированными.

Особенностью ионного обмена биполярных ионов является также то, что один и тот же ион может сорбироваться как на катионите, так и на анионите. В частности, методы выделения некоторых белков включают в качестве последовательных этапов сорбцию на ЦА и ЦК^{94, 95, 98, 99}. Это свойство отражено в уравнениях (4) и (5), где ионы белка идентичны.

Многозарядность иона белка совместно с большими размерами белковой молекулы приводит к другой особенности сорбции белков: реагирующей единицей при сорбции является не вся молекула, а лишь ограниченный участок ее поверхности. Поскольку ионогенные группы распределены по белковой молекуле неравномерно, то очевидно, что один и тот же ион белка в одних и тех же условиях может удерживаться одним и тем же сорбентом с различной силой, в зависимости от его ориентации на поверхности сорбента. Этот фактор может быть одной из причин размывания зон при элюировании белков с колонок ЦИ.

Понятно, что и свойства белковой молекулы как целого также оказывают влияние на сорбируемость. Здесь прежде всего следует отметить величину суммарного заряда молекулы. Как уже указывалось, при хроматографии белковой смеси компоненты часто элюируются в порядке возрастания (с колонок ЦК) или убывания (с колонок ЦА) электрофоретической подвижности, причем рН элюента при элюировании с колонок ЦА несколько ниже изоэлектрической точки белка, при элюировании с колонок ЦК — несколько выше. Таким образом, белок может оставаться в сорбированном состоянии даже при суммарном заряде, одноименном с зарядом нерастворимого иона ЦИ. С другой стороны, суммарный заряд белковой молекулы, противоположный заряду нерастворимого иона ЦИ, не обязательно означает, что такой белок будет сорбироваться. Так, тетингомощистеинметилфераза с изоэлектрической точкой 6,4 не сорбируется на ДЭАЭЦ при рН 6,8¹⁰⁰. Следовательно, величина суммарного заряда хотя и влияет на сорбируемость белков, но не определяет ее полностью.

Наличие дипольного момента на белковой молекуле также может оказывать влияние на сорбируемость: очевидно, с возрастанием дипольного момента сорбируемость также будет возрастать.

Поскольку ЦИ представляют собой либо слабые кислоты, либо слабые основания, то, казалось бы, их солеобразные соединения с белками (тоже слабыми кислотами и основаниями) должны быть сильно гидролизованы, т. е. сорбируемость белков на ЦИ в водной среде должна быть ничтожной. Наблюдаемую прочность соединения белок — ЦИ в водных суспензиях можно объяснить, по-видимому, многозарядностью иона белка и, следовательно, возможностью образования множества солеобразных связей с ЦИ. Аминокислоты и небольшие пептиды, несущие те же ионогенные группы, что и белки, либо совсем не сорбируются на ЦИ, либо их связь с ЦИ очень непрочна. Так, на КМЦ сорбируются только самые щелочные аминокислоты — гистидин, лизин и аргинин; на ДЭАЭЦ — только аспарагиновая и глутаминовая кислоты³⁷. Диглицин и триглицин сорбируются на ДЭАЭЦ, но весьма легко элюируются: первый — водой, второй — раствором CO_2 (1 атм)³⁶. То же наблюдается и в обратном опыте: растворимые ионизирующие производные полисахаридов образуют комплексы с белками, в то время как такие же производные олигосахаридов (до четырех углеводных остатков) не связываются^{101–103}. Очень ярко проявляется влияние количества заряженных групп на сорбируемость при хроматографии полимеров адениловой кислоты на ЦИ: полимеры от димера до гексамера элюируются в порядке удлинения цепи и, следовательно, возрастания

количества заряженных групп молекулы¹⁰⁴. Статистически прочность множественной связи объясняется таким образом: для обмена одного многозарядного иона на несколько однозарядных требуется одновременное сближение этих нескольких ионов с пунктами связи, что мало вероятно; с другой стороны, образование одного солевого мостика между белком и ЦИ, фиксируя их друг около друга, способствует образованию следующих.

Все сказанное выше относительно электростатического взаимодействия между белком и ЦИ можно суммировать в следующих уравнениях. Если X — сумма всех ионогенных групп белковой молекулы, образующих на ней заряды, противоположные по знаку заряду нерастворимого иона ЦИ, x и x' — ионогенные группы того же типа, что и X , но не участвующие в образовании связей с ЦИ по стерическим причинам (x) или потому, что они в данных условиях не диссоциированы (x'), то количество солевых мостиков Z будет равно

$$Z = X - x - x' \quad (6)$$

В дальнейшем величину Z , т. е. количество солевых связей, образующихся между ЦИ и молекулой белка, будем называть эффективной валентностью белковой молекулы. Основными свойствами эффективной валентности являются зависимость от pH и от ориентации белковой молекулы на поверхности сорбента.

Суммарный заряд E белковой молекулы равен:

$$E = (X - x') + (Y - y') \quad (7)$$

где Y — сумма всех ионогенных групп белковой молекулы, приобретающих при ионизации заряды, противоположные по знаку зарядам групп X ; y — неионизированные группы типа Y . Обозначив дипольный момент символом D , можно выразить сорбируемость m как функцию эффективной валентности, суммарного заряда и дипольного момента:

$$m = f(Z, E, D) \quad (8)$$

Введем величину N электростатического заряда, который осуществляет такой же силы притяжение между белком и ЦИ, как совокупное действие факторов Z , E и D . Тогда

$$m = f(N) \quad (9)$$

Величину N в дальнейшем будем называть эффективным зарядом белковой молекулы. Эффективный заряд может принимать положительные, нулевое и отрицательные значения.

Отметим далее, что суммарный заряд белкового иона в комплексе ЦИ — белок в соответствии с уравнениями (4) и (5) отличается от суммарного заряда иона в растворе. Обозначив заряд сорбированного иона E_a , можем написать:

$$E_a = (X - x') + (Y - y' - y'') \quad (10)$$

где y'' — группы типа Y , утратившие ионизацию при сорбции.

Очевидно, что всегда имеет место такое соотношение:

$$E_a > E \quad (11)$$

и следовательно,

$$N_a > N \quad (12)$$

где N_a — эффективный заряд сорбированного белка.

Неравенство (11) при хроматографии проявляется в том, что белки элюируются с колонок ЦА при рН ниже изоэлектрической точки, с колонок ЦК — выше изоэлектрической точки. Однако это не всегда имеет место, так как величина эффективного заряда, определяющая сорбируемость, содержит еще факторы Z и D .

Из неравенства (12) следует, что при $N=0$ белок может сорбироваться и на ЦК, и на ЦА: в первом случае N_a имеет положительные значения, во втором — отрицательные. При положительном N белок сорбируется только на ЦК, при отрицательном — только на ЦА, причем N сохраняет знак, но имеет большую абсолютную величину. При всех этих отношениях наиболее вероятным состоянием системы является состояние, когда белок сорбирован на ЦИ, поскольку в момент сорбции взаимодействие между белком и ЦИ усиливается, и для десорбции необходимо преодолеть большие силы, чем те, которые привели к сорбции.

Величины Z , E и D могут изменяться от белка к белку независимо друг от друга, причем Z и D могут зависеть от размеров и формы белковой молекулы (увеличиваться с увеличением размеров и удалением формы от шарообразной), а E не зависит от этих свойств. Соответственно изменяется и сорбируемость. Так, цитохром С, имеющий молекулярный вес 97 000, на ДЭАЭЦ лучше сорбируется, чем гемопротейд RHP с молекулярным весом 36 000, хотя изоэлектрические точки обоих белков одинаковы¹⁰⁵. γ -Глобулин и γ -макроглобулин с константами седиментации 6,6 и 18 S соответственно электрофоретически не различаются, а сорбируемость на ДЭАЭЦ у макроглобулина выше, чем у глобулина^{106, 107}.

Прекрасно иллюстрирует влияние эффективной валентности и суммарного заряда на сорбцию следующий пример. Дифосфопиридиннуклеотиды, имеющие по два фосфатных остатка на молекулу, сорбируются на ДЭАЭЦ хуже, чем трифосфопиридиннуклеотиды, имеющие по три фосфатных остатка. С другой стороны, окисленные формы этих нуклеотидов, имеющие положительно заряженный четвертичный азот в пиридиновом кольце, сорбируются хуже восстановленных форм, не имеющих положительно заряженных групп на молекуле¹⁰⁸. Влияние электростатических зарядов на сорбцию в приведенном примере тем более убедительно, что по строению и размерам молекул эти четыре вещества различаются незначительно.

2. Другие механизмы сорбции

Поведение и взаимодействие макромолекул в растворах и суспензиях находится в настоящее время в стадии активного изучения. Вопросы хроматографии белков на ЦИ являются частью этой общей проблемы. Уже на первых порах исследователи столкнулись с рядом «аномалий» в термодинамике растворов полимеров¹⁰⁹. Особый интерес для нас представляют следующие результаты. Ряд авторов отметил положительное или очень малое отрицательное изменение энтропии при ассоциации белковых молекул друг с другом^{110–112} или с полиионами углеводной природы¹⁰¹. Возрастание энтропии трудно объяснить освобождением гидратной воды, так как свободная энергия при ассо-

циации уменьшается. Можно провести аналогию между этими данными и сорбцией белков на ЦИ, поскольку и в том, и в другом случае имеет место электростатическое взаимодействие двух гидрофильных макроионов. Такая аналогия тем более оправдана, что в обоих случаях связь между ионами чрезвычайно чувствительна к изменению рН. Например, при изменении рН от 8 до 4,4 константа ассоциации ингибитора трипсина из соевых бобов с трипсином изменяется в 100 000 раз¹¹³; с другой стороны, сорбируемость белков на ЦИ при изменении рН изменяется настолько резко, что ряд авторов считает возможным говорить о сорбции по принципу «все или ничего».

На целлюлозе, не содержащей ионогенных групп, белки не сорбируются, однако в колонках из такой целлюлозы они осаждаются при меньшей концентрации сульфата аммония, чем требуется для осаждения из раствора^{114, 115}. Следовательно, происходит какое-то взаимодействие между белком и целлюлозой, которое может увеличивать сорбируемость белков на ЦИ. Это взаимодействие можно объяснить Ван-дер-Ваальсовыми силами или образованием водородных связей. При сорбции на карбоксильных ионитах кроме обычных водородных связей возможны также связи между карбоксильными группами белка и ЦИ, тем более что сорбируемость на таких ионитах выше в кислой среде, когда диссоциация карбоксильных групп в значительной мере подавлена. Такого типа связи образуются при взаимодействии белков¹¹⁶. Водородная связь карбоксил — карбоксил чрезвычайно чувствительна к изменению рН: даже незначительное изменение рН ведет к массовому разрушению связей такого типа — «взрыву ионизации». Это могло бы объяснить резкое изменение сорбируемости белков на ЦИ при изменении рН. Однако так же резко зависит от рН сорбируемость и на ЦИ, не содержащих карбоксильных групп.

Таким образом, очевидно, что строгая теория хроматографии белков на ЦИ весьма сложна. Специальных исследований такого рода в настоящее время нет, и мы вновь вынуждены обратиться к результатам изучения более широкой проблемы о взаимодействии полиэлектролитов. Общие вопросы взаимодействий белков (теория полиравновесия) рассмотрены в обзоре Клотца¹¹⁷.

Харрис и Райс предложили теорию взаимодействия гибких полиэлектролитов с зарядами одного знака, в которой наиболее полно учитываются все возможные влияния структуры и зарядов полимера на взаимодействие^{118, 119}. ЦИ относятся к полиэлектролитам именно такого типа. Позднее эта теория была распространена и на полиамфолиты¹²⁰. Теория взаимодействия, сопровождающегося разделением фаз, разработана Овербеком и Ворном¹²¹. Все предложенные уравнения чрезвычайно сложны, несмотря на ряд упрощающих ограничений, принятых авторами. Поскольку упрощения сводятся к устранению из рассмотрения таких факторов, как гидратация, водородные связи, пространственные ограничения, то и эти уравнения не могут быть применены к реальным системам.

Сорбция белков на ЦИ характеризуется многообразием действующих сил и сложностью механизма. Тем не менее совершенно отчетливо проявляется преобладание электростатических сил, о чем убедительно говорят экспериментальные данные, приведенные в начале главы. Поэтому становится целесообразным и полезным использовать для получения хотя бы качественных результатов законы ионного обмена при интерпретации результатов экспериментов по сорбции и хроматографии белков на колонках ЦИ.

III. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ НЕЙТРАЛЬНЫХ СОЛЕЙ И ВОДОРОДНЫХ ИОНОВ НА СОРБЦИЮ БЕЛКОВ ЦЕЛЛЮЛОЗОИОНИТАМИ

1. Сорбция в бессолевой среде

Сорбируемость белков на ЦИ наибольшая в бессолевой среде или в разбавленных буферных растворах. Чрезвычайно важно отметить, что при этом сорбируемость не зависит от концентрации белка: до момента достижения сорбционной емкости сорбируется весь белок, имеющийся в растворе^{93, 96}. На этом свойстве может быть основан метод концентрирования белковых растворов. С другой стороны, здесь мы находим подтверждение применимости законов ионного обмена к сорбции белков на ЦИ. Обмен разнозарядных ионов описывается уравнением Никольского¹²²:

$$\frac{\frac{1}{m_1^{z_1}}}{\frac{1}{m_2^{z_2}}} = K \frac{\frac{1}{c_1^{z_1}}}{\frac{1}{c_2^{z_2}}} \quad (13)$$

где m_1 и m_2 — количества сорбировавшихся ионов с зарядами z_1 и z_2 соответственно; c_1 и c_2 — их концентрации в растворе. Можно показать, что разбавление раствора всегда приводит к увеличению сорбции многозарядного иона. Если $\frac{c_1}{c_2} = P$ (P — постоянная), то уравнение (13) принимает следующий вид:

$$\frac{\frac{1}{m_1^{z_1}}}{\frac{1}{m_2^{z_2}}} = K P^{\frac{1}{z_1} \frac{1}{c_2^{z_1}} - \frac{1}{z_2}} = A \quad (14)$$

Если $z_1 > z_2$, то $\lim_{c_2 \rightarrow 0} A = \infty$, что может быть выполнено лишь при $m_2 = 0$ и $m_1 = m$ (m — обменная емкость)¹²³.

Неравенство (12) дает другое объяснение преимущественной сорбции белков из разбавленных растворов солей (см. стр. 1095).

2. Влияние нейтральных солей

Если

$$c_1 + c_2 = c_0 \quad (15)$$

и

$$m_1 + m_2 = m \quad (16)$$

то зависимость m_1 от c_1 однозначно выражается уравнением¹²³:

$$\frac{\frac{1}{m_1^{z_1}}}{(m - m_1)^{\frac{1}{z_2}}} = K \frac{\frac{1}{c_1^{z_1}}}{(c_0 - c_1)^{\frac{1}{z_2}}} \quad (17)$$

где m — сорбционная емкость и c_0 — концентрация вводимого в систему иона-вытеснителя. Подстрочным индексом (1) отмечены параметры вытесняемого иона, индексом (2) — иона-вытеснителя. Поскольку кривая зависимости m_1 от c_1 не имеет перегиба, то кривизна изотермы сорбции $m_1 = f(c_1)$ будет всегда либо только положительной (кривая обращена выпуклостью к оси концентраций), либо только отрицательной. Изменяя параметры c_0 , m , z_1 и z_2 , можно переходить от выпуклых изотерм сорбции к вогнутым. При постоянных m , z_1 и z_2 такой переход совершается при некоторой величине $c_0 = c_{кр}$ (критическая концентрация), при которой изотерма линейна. Следовательно, график зависимости m_1 от c_0 должен иметь S-образную форму, причем критической концентрации соответствует точка перегиба этой кривой. Графики сорбируемости рибонуклеазы¹²⁴ и других белков⁹³ на ЦИ при различных концентрациях поваренной соли имеют S-образную форму (рис. 2). Это вновь подтверждает применимость законов ионного обмена к сорбции белков на ЦИ.

Поскольку $c_{кр}$ для данных m , z_1 и z_2 связано с константой обмена выражением¹²⁵

$$c_{кр} = mK \frac{z_1 z_2}{z_1 - z_2}, \quad (18)$$

то здесь открывается возможность определения константы обмена, исходя из зависимости m_1 от c_0 . Экспериментальной проверки этой возможности в литературе нами не найдено.

Теоретически изменение сорбируемости от нуля до максимальной, равной сорбционной емкости ЦИ, происходит в бесконечно широком интервале концентраций нейтральной соли. Однако величина этого

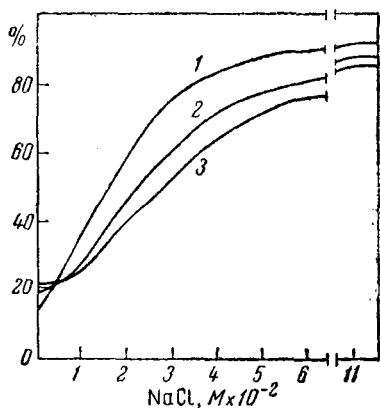


Рис. 2

Рис. 2. Сорбируемость рибонуклеазы на КМЦ в зависимости от pH и концентрации соли. По оси ординат — количество несорбировавшейся рибонуклеазы. 1 — pH 8,8; 2 — pH 7,5; 3 — pH 7,1

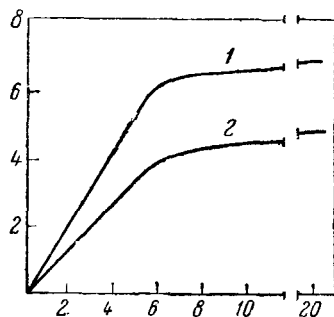


Рис. 3

Рис. 3. Изотермы сорбции аспарагиназы на ДЭАЭЦ. По оси абсцисс — количество аспарагиназы в исходном растворе, по оси ординат — количество сорбировавшейся аспарагиназы (условные единицы). 1 — безсолевая среда; 2 — 0,08 M раствор NaCl

изменения резко падает при приближении к экстремальным значениям сорбируемости и велика в некотором узком интервале концентраций. Назовем интервал концентраций нейтральной соли (или значений pH),

в котором сорбируемость изменяется от величины, мало отличающейся от нуля, до величины, близкой к сорбционной емкости, интервалом перехода. Легко показать, что величина этого интервала перехода уменьшается при увеличении эффективной валентности вытесняемого иона. В самом деле, обращаясь к уравнению (14), отмечаем, что если $z_1 \gg z_2$, то при уменьшении c_2 величина m_1 быстрее приближается к предельному значению, равному обменной емкости m . Небольшая величина интервала перехода при сорбции белков на ЦИ позволила некоторым авторам говорить о соответствии сорбции принципу «все или ничего»^{11, 126}. Изотермы сорбции из растворов нейтральной соли различной концентрации представляют прямое опровержение этого принципа: если в отсутствие солей сорбируется весь имеющийся в растворе белок, независимо от его концентрации, то при сорбции из солевых растворов количество сорбированного белка зависит от его концентрации в растворе, т. е. имеет место равновесный процесс (рис. 3). В бессолевой среде равновесие сдвинуто в сторону сорбированного белка, а при добавлении солей все более смещается в сторону растворенного белка⁹³. Статистически это объясняется таким образом: при повышении концентрации вытесняющего иона увеличивается количество сложных столкновений, необходимых для вытеснения многозарядного иона белка.

Необходимо также отметить, что в присутствии солей снижается не только восходящая ветвь изотермы, но и горизонтальная, т. е. уменьшается сорбционная емкость ЦИ. Этот фактор может являться одной из причин размывания зон при элюировании белков с колонок ЦИ.

Возможен и другой механизм влияния солей на сорбируемость: ионы соли могут связываться белком, изменяя его электростатический заряд и, следовательно, сорбируемость. Некоторое значение могут иметь изменение активности ионов и состояния ионизации ЦИ и белка, вызванные изменением ионной силы раствора.

3. Влияние pH

Механизм влияния pH среды существенно иной, так как изменение pH ведет к изменению ионизации ЦИ и белка. Поскольку сорбируемость на ЦК выше в кислой зоне, а на ЦА — в щелочной, т. е. в условиях, когда ЦИ наименее диссоциированы, а участвующие в сорбции ионогенные группы белка наиболее диссоциированы, то очевидно, что основное значение имеет состояние ионизации белка, а не ЦИ. Изменение pH ведет к изменению эффективной валентности, суммарного заряда и дипольного момента белковой молекулы, т. е. всех трех величин, составляющих эффективный заряд. Если pH изменяется таким образом, что эффективная валентность уменьшается, то при определенном значении pH ионы буферной смеси и белок начинают обмениваться как ионы, мало или совсем не отличающиеся по количеству зарядов. Очевидно, что в этом случае белок может вытесняться с ЦИ при малой концентрации элюента, что и наблюдается в многочисленных работах по хроматографии белков на колонках ЦИ. Здесь также имеет место равновесное распределение белка между сорбентом и раствором⁹³. При дальнейшем изменении pH эффективный заряд может стать по знаку одноименным с зарядом ЦИ, что полностью исключает возможность сорбции.

И в этом случае необходимо отметить весьма небольшую величину интервала pH, в котором сорбируемость изменяется от нуля до мак-

симальной. Однако причина этого совершенно иная, чем при элюировании растворами нейтральных солей, и заключается она, по-видимому, именно в одновременном изменении всех компонентов эффективного заряда.

IV. МЕХАНИЗМ РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ НА КОЛОНКАХ ЦИ

Основным процессом любого из множества хроматографических методов является ряд последовательных перераспределений хроматографируемого вещества между двумя рабочими телами, перемещающимися друг относительно друга — между сорбентом и растворителем или между двумя растворителями, двумя фазами и т. п. Согласно мнению о соответствии сорбции белков на ЦИ принципу «все или ничего», сорбируемость белка должна быть равна либо нулю, либо сорбционной емкости ЦИ, а скорость перемещения белковой зоны вдоль колонки — либо нулю, либо скорости протекания самого растворителя. Это означает, что здесь не происходит перераспределения белка между ЦИ и растворителем, т. е. отсутствует собственно хроматографический процесс. Такой взгляд не может объяснить чрезвычайно высокую эффективность применения ЦИ для фракционирования белков и, главное, огромные преимущества колоночной техники по сравнению с разделением в статических условиях. Кроме того, некоторые экспериментальные данные прямо подтверждают возможность перемещения белковых зон со скоростями, промежуточными между нулем и скоростью протекания растворителя. Так, Боман и Калетта отметили, что при хроматографии змеино-го яда на колонке ДЭАЭЦ увеличение рН или уменьшение концентрации элюента ведет к удлинению хроматограммы и лучшему разделению компонентов¹²⁷. Принцип «все или ничего» исключает применение элюиционного анализа; между тем метмиоглобин и карбоксимиоглобин разделяются на колонке ДЭАЭЦ методом элюиционного анализа¹²⁸.

Равновесный характер сорбции белков на ЦИ в некотором интервале рН или концентраций нейтральной соли позволяет утверждать наличие ряда последовательных сорбций и десорбций, т. е. собственно хроматографического процесса, в качестве основного механизма разделения. Следовательно, проведение процесса в равновесных условиях и несовпадение интервалов перехода являются основными условиями возможности разделения белков. Положение интервала перехода при элюировании растворами солей определяется величиной эффективного заряда белка, а при элюировании растворами с изменяющимся рН — величинами pK ионогенных групп белка, образующих эффективный заряд. Поскольку природа таких групп у всех белков практически одинакова, то из этого следует, что избирательность элюирования растворами с изменяющимся рН должна быть невелика. Это и нашло отражение в меньшем распространении такого способа элюирования по сравнению с элюированием растворами нейтральных солей.

Другим механизмом разделения может быть вытеснение белка белком, особенно в начальной фазе хроматографии, сразу же после нанесения белковой смеси на колонку^{129–131}. Однако вряд ли этому механизму можно придавать большое значение, так как на выходе колонки зоны белков очень часто отделены друг от друга значительными безбелковыми зонами, и, следовательно, всякое взаимодействие между белками в этом случае исключается.

V. ЭЛЮИРОВАНИЕ БЕЛКОВ С КОЛОНОК ЦИ

1. Общие принципы. Ступенчатое элюирование

Как известно, существуют три основных способа элюирования: элюционный, фронтальный, вытеснительный.

При хроматографии белков элюционный способ применяется редко. В качестве примера укажем на работу Брауна по разделению миоглобинов на колонке ДЭАЭЦ¹²⁸. Одноступенчатый метод элюирования представляет собой комбинацию элюционного и вытеснительного способов^{131, 132}.

Фронтальный метод для препаративных целей мало пригоден. Однако он нашел применение для анализа состава смеси веществ, в том числе белков¹³¹.

При хроматографии белков применяется главным образом метод вытеснения. Вытеснение осуществляется либо повышением концентрации соли, либо изменением рН в пределах, близких к физиологическим значениям.

Изменение рН или концентрации соли может быть либо ступенчатым, либо плавным. Последний способ носит название градиентного элюирования.

Как уже отмечалось выше, главным условием разделения белков на колонке является несовпадение интервалов перехода различных белков смеси. Рассмотрим следующий модельный опыт.

В верхней части колонки сорбирован белок А, характеризующийся кривой a зависимости m_1 от c_0 и интервалом перехода a' (рис. 4).

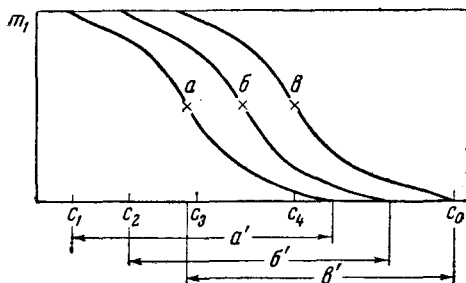


Рис. 4

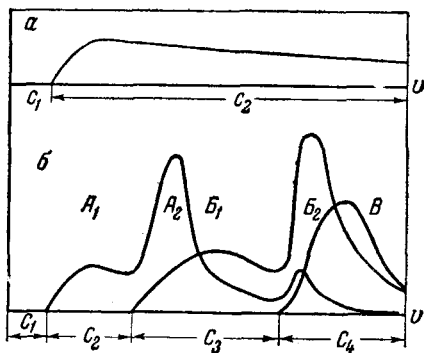


Рис. 5

Рис. 4. Интервалы перехода белков. По оси абсцисс — концентрация иона-вытеснителя, по оси ординат — количество сорбированного белка. Крестиками отмечены точки перегиба кривых, соответствующие критическим концентрациям

Рис. 5. Элюирование смеси белков (Пояснения в тексте)

При промывании колонки элюентом с концентрацией c_1 границы зоны не изменяются. Если концентрацию увеличить до c_2 , то белковая зона размывается (вследствие уменьшения емкости ЦИ) и начинает перемещаться вдоль колонки со скоростью, меньшей скорости протекания элюента (вследствие равновесного распределения белка между сорбентом и жидкой фазой). В процессе перемещения происходит дополнительное размывание передней границы зоны, поскольку концентрация элюента ниже критической¹²⁵ и задней границы, так как изотермы

сорбции белков на ЦИ в присутствии солей имеют форму кривых, выпуклых от оси концентраций. График элюирования (хроматограмма) имеет вид, представленный на рис. 5, а. Весь белок можно элюировать только очень большим объемом раствора с концентрацией c_2 .

Если в момент, когда через колонку протечет объем v_1 элюента с концентрацией c_2 , повысить концентрацию до c_3 , то остатки белка образуют в колонке новую зону перед фронтом нового элюента, а на хроматограмме получается второй пик A_2 того же белка А (рис. 5, б). Фронт новой зоны обостряется, поскольку $c_3 > c_{кр}$. Задняя граница новой зоны по-прежнему размывается.

Рассмотрим теперь элюирование смеси белков А, Б и В, характеризующихся кривыми a , b и v зависимости m_1 от c_0 и интервалами перехода a' , b' и v' (рис. 4). При промывании колонки раствором с концентрацией c_2 элюируется только белок А (пик A_1 , рис. 5, б). При увеличении концентрации до c_3 элюируются остатки белка А (пик A_2) и часть белка Б (пик B_1). При концентрации элюента c_4 элюируются остатки белка Б (пик B_2) и белок В. Таким образом, в данной модели в чистом виде получается только белок А (пик A_1).

На рис. 5, б схематизированы результаты хроматографического разделения трех фракций тиглобулина на колонке ДЭАЭЦ¹³³. В случае более сложных смесей и меньшей «высоты ступенек» концентрации элюента одно и то же вещество может образовать не два, а несколько пиков^{134, 135}. Отсюда становятся очевидными недостатки элюирования со ступенчатым изменением условий. Некритический подход к этому методу может быть причиной необоснованных выводов (см., например,¹³⁶).

Теоретически на достаточно высоких колонках методом ступенчатого элюирования можно разделить любой сложности смеси веществ, различающихся интервалами перехода. Однако сильное размывание зон вследствие необходимости применения концентраций элюента ниже $c_{кр}$ часто приводит к практической неприемлемости этого способа. Тем не менее при хроматографировании несложных белковых смесей (на последних этапах очистки) ступенчатое элюирование часто дает хорошие результаты^{137–139}. Очевидно, что главным условием возможности успешного применения ступенчатого элюирования является значительное различие интервалов перехода. Так, если из рассмотренной модели исключить белок Б, то оставшиеся белки А и В могут быть разделены ступенчатым способом без значительного размывания: белок А элюируется раствором с концентрацией c_3 ($c_3 > c_{кр}^a$), зона белка В при этом не изменяется, так как интервал перехода его лежит при концентрациях, больших c_3 . Белок В после этого можно элюировать в виде компактной зоны элюентов с концентраций $> c_4$ ($c_4 = c_{кр}^b$).

2. Градиентное элюирование

Градиентное элюирование можно рассматривать как автоматизированный подбор концентраций соли или водородных ионов, при которых происходит хроматографическое разделение белков. Такой способ тем более выгоден, что экспериментатору заранее не известны интервалы перехода разделяемых белков. С другой стороны (и это более существенно), при градиентном элюировании имеется механизм активного сужения зоны вещества, поскольку задняя граница зоны движется в условиях меньшей емкости.

Впервые элюирование с градиентом емкости применили Хартек и Сур¹⁴⁰. Альм, Тизелиус и сотрудники^{141–143}, а также другие авто-

ры^{144, 145} создавали градиент емкости путем изменения концентрации компонентов элюента. Для разделения белков градиентное элюирование впервые использовали Собер и Питерсон¹⁴⁶. Жуховицкий и Туркельтауб дали теорию этого метода^{147, 148}.

Физическая сущность явления сужения зон сводится к следующему. При случайном отставании от зоны вещество попадает в условия худшей сорбируемости (при хроматографии белков — высокая концентрация соли или неблагоприятное значение pH), вследствие чего начинает двигаться ускоренно. При опережении зоны вещество попадает в область высокой сорбируемости и движение его замедляется. В некоторый момент вся зона оказывается в условиях сорбируемости, равной нулю (верхний предел интервала перехода), и начинает перемещаться вдоль колонки со скоростью растворителя (т. е. все вещество зоны находится в жидкой фазе). Механизм хроматографического разделения и активного сужения зон действует только до достижения максимальной скорости перемещения зоны.

Процесс хроматографии белков при градиентном элюировании отчетливо разделяется на три фазы.

1. *Фаза сорбции*, иногда сопровождающейся разделением компонентов вследствие вытеснения белка белком. В этой фазе в зависимости от концентрации белкового раствора и емкости сорбента может происходить как разбавление, так и концентрирование белка.

2. *Фаза разделения*. Белковые зоны перемещаются вдоль колонки с ускорением, причем пределом скорости является скорость протекания самого растворителя. Компоненты разделяются вследствие собственно хроматографического процесса. Зоны имеют тенденцию к размыванию, так как некоторое время перемещаются при концентрации элюента ниже критической, а также вследствие непостоянства эффективного заряда одного и того же белка и уменьшения емкости сорбента. Размыванию противодействует наличие градиента емкости, перемещающегося со скоростью, большей скорости перемещения зон.

3. *Фаза пассивного переноса зон*. Скорость перемещения зон равна скорости протекания растворителя. Дальнейшего разделения не происходит. Зоны размываются вследствие гидродинамических эффектов.

Отсюда следует, что для наилучшего разделения компонентов соотношение высоты колонки и величины градиента емкости должно быть таким, чтобы к моменту выхода из колонки скорость перемещения зоны была максимальной. В этом случае концентрация (или pH) растворителя, при которой элюируется данный белок — назовем ее концентрацией (или pH) элюирования (c_z или pH_z) — является характерной для этого белка и, следовательно, может служить для хроматографической идентификации белков. Очевидно, что величина c_z (или pH_z) — верхний предел интервала перехода и близка к значению минимальной концентрации соли (или водородных ионов), при которой белок уже полностью не сорбируется на ЦИ. Например, Хьюзман нашел, что гемоглобины при хроматографии на колонке КМЦ с различной величиной градиента pH (прочие условия одинаковы) выходят из колонки в разных объемах элюата, но при одном и том же pH⁹⁴. Понятно, что на величину c_z оказывает влияние обменная емкость сорбента. Так, увеличение емкости ДЭАЭЦ ведет к возрастанию концентрации NaCl, при которой элюируются пепсин и пепсиноген¹⁴⁹.

Если принять, что изотерма сорбции асимптотически приближается к пределу, то теоретически для достижения максимальной скорости колонка должна быть бесконечно высокой. Однако, как показывает

опыт, колонки высотой даже в несколько сантиметров оказываются достаточными, чтобы получить большую часть вещества в виде компактной зоны, перемещающейся со скоростью элюента^{150, 151}. Это можно объяснить весьма незначительной величиной интервала перехода белков.

VI. ТЕХНИКА ХРОМАТОГРАФИИ БЕЛКОВ НА ЦИ

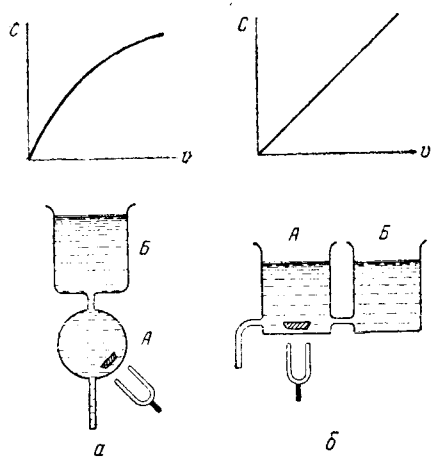
1. Техника градиентного элюирования

Наиболее употребительный способ создания градиента концентрации в колонке состоит в следующем. Сосуд *A* (рис. 6, *a*) — смеситель — содержит раствор с концентрацией c_1 . Смеситель снабжен мешалкой и нижней выпускной трубкой соединяется с колонкой. Сосуд *B* — питающий сосуд — содержит раствор с концентрацией c_2 . По мере вытекания раствора из *A* в него поступает раствор из *B*. Концентрация вытекающего из прибора раствора изменяется от c_1 до c_2 , в соответствии с уравнением¹⁵²

$$c = c_2 + (c_1 - c_2) \cdot e^{-\frac{v}{q}}, \quad (19)$$

где c — концентрация в момент, когда вытек объем жидкости, v , q — объем смесителя и e — основание натуральных логарифмов. Графически градиент концентрации выражается кривой, асимптотически приближающейся к c_2 .

Другой способ элюирования позволяет получать линейное изменение концентрации¹⁵³. Состоит он в следующем. Сообщающиеся сосуды — смеситель *A* и питающий сосуд *B* — содержат растворы с концентрациями c_1 и c_2 соответственно (рис. 6, *b*). Убыль раствора в смесителе пополняется раствором из питающего сосуда, но объем раствора в смесителе при этом уменьшается. Изменение концентрации вытекающего из смесителя раствора описывается уравнением¹⁵⁴



$$c = c_2 - (c_2 - c_1) \left(1 - \frac{v}{V}\right)^{S_2/S_1}, \quad (20)$$

где S_2 и S_1 — площади поперечного сечения питающего сосуда и смесителя соответственно и V — общий объем раствора в обоих сосудах. При $S_1 = S_2$ уравнение становится линейным:

$$c = c_1 + \frac{v}{V} (c_2 - c_1) \quad (21)$$

Рис. 6. Схемы приборов для создания гиперболического (*a*) и линейного (*b*) градиента концентрации

Были предложены и другие методы создания градиента^{155–158}, в том числе приборы, позволяющие произвольно изменять величину градиента концентрации в процессе опыта^{159, 160}. Кочент построил номограммы для определения концентрации элюента в любой момент опыта при различных способах создания градиента¹⁶¹.

Формулы (19) — (21) отражают изменение концентрации раствора, вытекающего из смесителя. Однако разделение веществ зависит от фактического градиента концентрации по высоте колонки, который изменяется не только в зависимости от параметров прибора для создания градиента, но и от площади поперечного сечения колонки, и от плотности упаковки сорбента. Поэтому уравнения (19) — (21) не дают полной характеристики условий разделения при градиентном элюировании. Применение линейного градиента концентрации имеет то преимущество, что позволяет предложить простую формулу для выражения изменения концентрации элюента по высоте колонки, т. е. именно там, где происходит хроматографический процесс^{162, 163}. Если h — высота колонки, c — концентрация элюента у выхода колонки и c' — концентрация элюента у верхней поверхности колонки, то величина градиента G , т. е. изменение концентрации на единицу высоты колонки, будет равна

$$G = \frac{c' - c}{h} \quad (22)$$

Из уравнения (25) следует:

$$c' = c_1 + \frac{v + v_m}{V} (c_2 - c_1) \quad (23)$$

где v_m — объем подвижной жидкости в порах колонки с высотой h . Подставляя в уравнение (22) значения c и c' из уравнений (21) и (23), получим

$$G = \frac{v_m}{h} \cdot \frac{c_2 - c_1}{V} \quad (24)$$

Множитель $\frac{v_m}{h}$ представляет собой объем жидкости в порах колонки высотой 1 см. Обозначив его через α , получаем

$$G = \alpha \frac{c_2 - c_1}{V} \quad (25)$$

Таким образом, для создания одинаковых условий разделения, необходимо, чтобы величина градиента G во всех опытах была одинаковой. Для двух опытов A и B , например, должно быть соблюдено условие

$$\alpha_A \frac{c_{2A} - c_{1A}}{V_A} = \alpha_B \frac{c_{2B} - c_{1B}}{V_B} \quad (26)$$

Начальную концентрацию c_1 в смесителе подбирают таким образом, чтобы скорость перемещения зоны белка в начальный момент хроматографии была равна нулю. Если в опытах A и B начальная концентрация одинакова, то уравнение (26) перепишется следующим образом:

$$\alpha_A \frac{c_{2A} - c_1}{V_A} = \alpha_B \frac{c_{2B} - c_1}{V_B} \quad (27)$$

В этом случае можно показать, что в опытах A и B концентрации элюента, вытекающего из колонки, станут одинаковыми в тот момент, когда выполнится условие

$$\frac{v_A}{\alpha_A} = \frac{v_B}{\alpha_B} = K, \quad (28)$$

Поскольку положение интервала перехода на шкале концентраций и концентрации элюирования (стр. 1103) не зависят от размеров колонки, то для одного и того же белка величина K_e — константа элюирования, полученная на колонках разного размера при соблюдении условия (27), будет одинаковой, характерной для данного белка, и наряду с концентрацией элюирования может применяться для идентификации белков.

2. Другие вопросы техники хроматографии

Выбор сорбента. Наиболее часто для хроматографии белков применяют анионит ДЭАЭЦ и катионит КМЦ, причем первый значительно чаще второго. Большую универсальность ЦА по сравнению с ЦК следует объяснить, вероятно, тем, что подавляющее большинство белков при значениях pH, применяемых в хроматографии, является анионами. Этим и должен определяться выбор сорбента (ЦА или ЦК) при начале работы по выделению белка с неизвестными свойствами.

Ограниченная литература по применению других ЦИ не позволяет сделать какие-либо выводы относительно их преимуществ. Укажем лишь, что мальтаза и сахараза слизистой кишечника несколько лучше разделяются на ТЭАЭЦ, чем на ДЭАЭЦ¹³¹. Однако хроматография тиротропинов на этих же сорбентах дает одинаковые результаты¹⁶⁴. Одинаковые результаты получаются также при хроматографии фосфопротеидов на ТЭАЭЦ и эктеола¹³⁴.

Приготовление колонок. Для хроматографии белков необходима равномерная и достаточно плотная упаковка ЦИ.

Размер и форма колонки определяются составом и количеством разделяемой смеси и способом элюирования. При градиентном элюировании разделение можно улучшить путем увеличения высоты колонки (см., например,¹⁶⁵) или уменьшения величины градиента при постоянной высоте колонки (см., например,¹²⁴). Если соблюдать условие (27), то от диаметра колонки зависит только ее производительность, измеряемая количеством разделяемой смеси, а от высоты — производительность и, до известного предела, разделяющая способность колонки. В литературе приводятся случаи удовлетворительного разделения белков даже на очень коротких колонках (~ 3 см)^{166, 167}.

Предварительная обработка колонок ЦИ. Сорбционная емкость ЦИ выше всего в безсолевой среде, однако при элюировании белков из незабуференной колонки растворами солей резко изменяется pH, что может привести к денатурации белков, а на колонках ЦК, когда среда подкисляется, еще и к выпадению в осадок большого количества белков. Для предотвращения этого колонку необходимо промыть до опыта разбавленным (0,001—0,05 М) буферным раствором до уравнивания pH вытекающей жидкости с pH исходного раствора («уравновешивание колонки»). Концентрацию и pH исходного буфера подбирают таким образом, чтобы в фазе сорбции подвижность белковых зон была равна нулю (при этом получают наиболее узкие зоны). При хроматографии легко окисляющихся белков в буферный раствор добавляют антиоксиданты (меркаптоэтанол или цистеин). Однако следует иметь в виду, что это может привести к образованию нескольких зон одного и того же белка^{100, 168}.

Количество и концентрация наносимого белка. Количество наносимого белка лучше выражать в мг на 1 см² сечения колонки. В этом случае ширина зон на колонках разного диаметра при прочих равных условиях будет одинаковой. Обычно наносят 50—150 мг белка на 1 см²

сечения колонки. При больших количествах зоны получаются слишком широкими, и, следовательно, возникает необходимость увеличения фазы разделения путем удлинения колонки или уменьшения величины градиента. Так, при нанесении на колонку КМЦ размером $0,9 \cdot 10$ см 40 мг рибонуклеазы фракции разделяются полностью; если же нанести 200 мг — накладываются друг на друга; если в последнем случае уменьшить величину градиента — фракции вновь разделяются¹²⁴.

Концентрация белка в исходной смеси не имеет значения, если фаза сорбции проводится в условиях полной сорбируемости белков.

Рехроматография. При хроматографии белков на ЦИ возможны случаи, когда один и тот же белок образует несколько зон. Образование множественных зон при ступенчатом элюировании отмечено выше (стр. 1102). Имеются указания на возможность обратимых изменений белков в процессе хроматографии, причем образующиеся модификации обладают различной подвижностью в колонке⁴. Антиоксиданты могут взаимодействовать с белками, изменяя их сорбируемость^{100, 169}. С другой стороны, известно, что в ряде случаев белки с одной и той же биологической активностью могут различаться по физико-химическим свойствам, в том числе по сорбируемости на ЦИ. Во всех этих случаях на вопрос о гомогенности или о причине гетерогенности препарата поможет ответить повторная хроматография отдельных фракций в тех же условиях. Понятно, что окончательные выводы можно сделать только на основе изучения фракций разными методами.

VII. НЕКОТОРЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

1. Хроматография белков на ЦИ как критерий гомогенности

Как уже указывалось, в ряде случаев белковые препараты, гомогенные по данным электрофореза и ультрацентрифугирования, оказывалось возможным разделить на фракции методом хроматографии на колонках ЦИ. Так, кристаллический препарат миоглобина, гомогенный при ультрацентрифугировании, хроматографией на КМЦ и ДЭАЭЦ удалось разделить на три компонента, различающихся по аминокислотному составу⁶. В препарате ингибитора трипсина из лимской фасоли, гомогенном при ультрацентрифугировании, при электрофорезе обнаружено четыре компонента, а при хроматографии на ДЭАЭЦ — шесть компонентов, имеющих приблизительно одинаковый аминокислотный состав, но различающихся строением⁸. Ингибитор трипсина из бычьей крови при хранении теряет 20—30% активности, но по данным электрофореза и ультрацентрифугирования препарат остается гомогенным, в то время как хроматографией на колонке ДЭАЭЦ с градиентным элюированием активную часть удается отделить от инертной⁹. К настоящему времени такого рода результатов получено достаточно много^{7, 10, 106, 133}. Таким образом, хроматография на ЦИ может быть одним из наиболее эффективных критериев гомогенности белкового препарата и хорошим методом идентификации. По-видимому, это следует объяснить тем, что подвижность белков на колонках ЦИ определяется и величиной суммарного заряда, и количеством заряженных групп на молекуле белка, и их распределением по поверхности молекулы, и рядом других свойств, таких как размеры и форма молекулы, простетические группы и т. п., в то время как при электрофорезе и ультрацентрифугировании основными свойствами, определяющими разделение белков, являются только величина суммарного заряда и только плотность белковой молекулы соответственно.

2. Семейства белков¹⁷⁰

Вопрос о семействах ферментов, о существовании в одном и том же организме или даже органе более чем одного белка, обладающих одной и той же ферментативной активностью (изоферменты¹⁷¹), обсуждается в печати уже давно, однако в последнее время он привлекает особое внимание благодаря ряду новых экспериментальных данных, полученных главным образом методом хроматографии белков на ЦИ, а также методом электрофореза в гелях¹⁷²⁻¹⁷⁸. Количество изоферментов достигает иногда значительных цифр. Так, Таборский хроматографией на колонке КМЦ выделил семь изорибонуклеаз, различающихся по константе седиментации и изоионной точке¹²⁴. Пресс и сотрудники обнаружили 15 изокатепсинов Д в селезенке крупного рогатого скота методом хроматографии на колонках ДЭАЭЦ и КМЦ¹⁷⁹. Поскольку различия между фракциями в пределах семейства часто обнаруживаются и другими методами^{5, 180, 181}, то можно считать, что в этих случаях речь идет о действительном существовании семейств ферментов. Однако остается нерешенным другой вопрос: возникают ли эти семейства как результат воздействий на белки в процессе выделения или предсуществуют в организме? По-видимому, следует признать обе возможности. Широко известно, что частичный гидролиз молекулы фермента, при котором иногда удаляется свыше 50% аминокислотных остатков, не приводит к потере ферментативной активности, тогда как для изменения физико-химических свойств и, следовательно, хроматографической подвижности достаточны и менее значительные изменения. Вполне возможно, что в процессе выделения в результате воздействия эндогенных протеаз или другими путями происходят такого рода изменения белка. Следует также иметь в виду возможность изменения только вторичной, третичной и четвертичной структур белка^{182, 183}, ведущих к изменению сорбируемости на ЦИ. Обратимые превращения компонентов семейства друг в друга¹⁸⁴⁻¹⁸⁷ относятся, по-видимому, к этой категории явлений. Интересный пример обратимых изменений представляют самопроизвольные синхронные изменения ферментов^{188, 189}, сопровождающиеся изменением сорбционной способности¹⁹⁰.

Имеется ряд данных, указывающих на предсуществование семейств ферментов в организме. Так, лактикодегидрогеназа, полученная одним и тем же методом из различных органов, оказывается гомогенной в одних органах и гетерогенной в других¹⁹¹, причем кристаллические препараты этого фермента, полученные из разных органов одного и того же животного, по продуктам триптического гидролиза различаются больше, чем препараты из одного и того же органа различных видов животных¹⁹². Компоненты эстеразы и дегидрогеназ лактата, малата, изоцитрата, глицерофосфата также неодинаковы в различных органах и у разных животных^{193, 194}.

3. Применение хроматографии белков на ЦИ в клиническом анализе

Исследование специфических изменений активности ферментов при различных патологических состояниях все более входит в практику клинического анализа¹⁹⁵. Высокая разделяющая способность колонок ЦИ и чрезвычайная простота метода делают возможным применение хроматографии для обнаружения патологических изменений белков в условиях клиники. Так, хроматограммы сыворотки больных лейкемией, раком, миеломой во многих случаях отличаются от хроматограмм сыворотки здоровых людей¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Гесс и Вальтер с применением сорбции

на ДЭАЭЦ обнаружили количественные различия изолактодегидрогеназ в сыворотке людей при гепатите, инфаркте миокарда и гемолитической анемии¹⁹⁹. Авторы полагают, что анализ изолактодегидрогеназ сыворотки может быть использован для дифференциального диагноза. При макроглобулинемии хроматографией на ДЭАЭЦ легко выделяются макроглобулины²⁰⁰. Хроматографией на колонках КМЦ и ДЭАЭЦ удастся выделить ряд патологических гемоглобинов^{12, 94, 95, 201}. Возможность выделения антител²⁰²⁻²⁰⁴ позволяет применить ЦИ для изучения явлений иммунитета^{205, 206}. Таким образом, применение хроматографии на ЦИ может оказаться весьма перспективным методом клинического анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. E. A. Peterson, H. A. Sober, *Federat. Proc.*, **13**, 273 (1954).
2. E. A. Peterson, H. A. Sober, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 751 (1956).
3. H. A. Sober и другие, Там же, **78**, 756 (1956).
4. S. Ellis, M. E. Simpson, *J. Biol. Chem.*, **220**, 939 (1956).
5. S. Aquist, C. B. Anfinsen, Там же, **234**, 1112 (1959).
6. A. Åkeson, H. Theorell, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **91**, 319 (1960).
7. H. Mueller, S. V. Perry, *Biochim. biophys. acta*, **40**, 187 (1960).
8. B. Jirgensons и другие, *Makromolek. Chem.*, **39**, 149 (1960).
9. Y. L. Gray и другие, *J. Biol. Chem.*, **235**, 56 (1960).
10. A. Garen, C. Levinthal, *Biochim. biophys. acta*, **38**, 470 (1960).
11. F. Turba, *Advances Enzymol. and Related Subjects. Biochem.*, **22**, 417 (1960).
12. H. K. Prins, *J. Chromatography*, **2**, 445 (1959).
13. H. A. Sober, E. A. Peterson, *Federat. Proc.*, **17**, 1116 (1958).
14. H. A. Sober, E. A. Peterson, C. Organic and Biochemistry, ed. by C. Calmon, T. R. E. Kressman. Interscience Publ. Inc., N. Y., 1957.
15. J. F. Jurgens и другие, *Text. Res. J.*, **18**, 42 (1948).
16. H. A. Levi, *J. Industr. and Engng. Chem.*, **12**, 743 (1920).
17. F. C. McIntire, J. R. Schenk, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1193 (1948).
18. M. Hartmann, *Am. pat.* 1777970 (1930); *C. A.*, **25**, p204 (1931).
19. J. D. Guthrie, *Text. Res. J.*, **17**, 625 (1947).
20. D. H. Campbell и другие, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **37**, 575 (1951).
21. J. Porath, *Arkiv. kemi*, **11**, 97 (1957).
22. J. D. Reid, G. C. Daul, *Text. Res. J.*, **18**, 551 (1948).
23. C. L. Hoffpauir, T. D. Guthrie, *J. Biol. Chem.*, **178**, 207 (1949).
24. *Biochemical Preparation*, ed. A. Meister, N. Y., **8**, стр. 39—49, 1961.
25. H. V. Street, *J. Chromatography*, **7**, 64 (1962).
26. H. V. Street, S. K. Niyogi, *Nature*, **190**, 718 (1961).
27. J. Porath, E. B. Lindner, *Nature*, **191**, 69 (1961).
28. P. O. Nyman, *Biochim. et biophys. acta*, **52**, 1 (1961).
29. P. R. Carnegie, *Nature*, **192**, 658 (1961).
30. M. L. Stephenson, P. C. Zamecnik, *Proc. Nat. Acad. sci, USA*, **47**, 1627 (1961).
31. E. R. Berman, *Biochim. et biophys. acta*, **58**, 120 (1962).
32. L. S. Lerman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **39**, 232 (1953).
33. P. Reinouts van Haga, *Nature*, **182**, 1232 (1958).
34. Г. В. Самсонов, Р. Б. Пономарева, *Биохимия*, **24**, 63 (1959).
35. P. G. Condliffe, R. W. Bates, *J. Biol. Chem.*, **223**, 843 (1956).
36. S. Yanari и другие, *Biochim. et biophys. acta*, **54**, 595 (1960).
37. D. L. Buchanan, R. T. Markow, *Analyt. Chem.*, **32**, 1400 (1960).
38. J. L. Onley и другие, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4666 (1957).
39. P. Bernfield и другие, *J. Biol. Chem.*, **223**, 51 (1957).
40. R. Monier и другие, *Biochim. et biophys. acta*, **43**, 1 (1960).
41. J. G. Moffat, H. G. Khorana, *J. Chem. Soc.*, **80**, 3756 (1958).
42. M. Stechelin, E. A. Peterson, H. A. Sober, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **85**, 289 (1958).
43. A. Stevens, R. A. Hilme, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3016 (1960).
44. O. Levin, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **78**, 33 (1958).
45. J. E. Liener, T. Viswanatha, Там же, **36**, 250 (1959).
46. J. A. Glader и другие, *J. Biol. Chem.*, **234**, 62 (1959).
47. L. Colobert, G. Dirrheimer, *Biochim. et Biophys. acta*, **54**, 455 (1961).
48. C. Nolan, E. L. Smith, *J. Biol. Chem.*, **237**, 446 (1968).

49. N. Neukomт и другие, *Helv. chim. acta*, **43**, 64 (1960).
50. E. B. Kearny и другие, *J. Biol. Chem.*, **235**, 865 (1960).
51. G. Thoenen, Ph. M. Phillips, Там же, **234**, 2369 (1959).
52. I. Glomset, *Acta chem. scand.*, **12**, 641 (1958).
53. E. Usdin, *J. Biol. chem.*, **234**, 2373 (1959).
54. J. Pawelkiewicz и другие, *J. Chromatography*, **3**, 359 (1960).
55. G. Semenza, *Biochim. et biophys. acta*, **24**, 401 (1958).
56. G. Semenza, *Helv. chim. acta*, **43**, 1057 (1960).
57. S. Kit, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **87**, 318 (1960).
58. L. Bosh и другие, *Biochem. et biophys. acta*, **41**, 444 (1960).
59. D. A. Goldthwait, L. Starr, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2025 (1960).
60. S. Osawa, *Biochem. et biophys. acta*, **43**, 110 (1960).
61. A. Taussig, E. N. Creaser, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **83**, 436 (1959).
62. G. W. Cochran и другие, *Nature*, **180**, 1281 (1957).
63. B. H. Hoyer и другие, *Science*, **127**, 859 (1958).
64. G. M. Tener и другие, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6223 (1958).
65. H. Baer, U. Rasmussen, *Federat. Proc.*, **19**, 69 (1960).
66. H. R. Ringertz, P. Reichard, *Acta chem. scand.*, **13**, 1467 (1959).
67. H. R. Ringertz, P. Reichard, Там же, **14**, 303 (1960).
68. B. H. Hoyer и другие, *Science*, **127**, 859 (1958).
69. P. V. Tavel, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **85**, 491 (1959).
70. L. Levintow, J. E. Darnell, *J. Biol. Chem.*, **235**, 70 (1960).
71. E. H. Greaser, A. Taussig, *Virology*, **4**, 200 (1957).
72. F. Binkley, *J. Biol. Chem.*, **236**, 735 (1961).
73. D. H. Campbell и другие, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **37**, 575 (1951).
74. G. Senenza и другие, *Helv. chim. acta*, **42**, 669 (1959).
75. Т. И. Тихоненко, *Биохимия*, **27**, 131 (1962).
76. O. Sköld, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3273 (1960).
77. M. Shimomura, M. Laskowski, *Biochim. et biophys. acta*, **26**, 198 (1957).
78. T. A. McGuire и другие, *Cereal Chem.*, **37**, 324 (1960).
79. R. Kluthe, H. Isliker, *Helv. physiol. et pharmacol. acta*, **18**, 404 (1960).
80. A. Baich и другие, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3130 (1960).
81. A. Bezkorovain, D. G. Doerty, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **96**, 491 (1962).
82. E. W. Yons, I. A. V. Bulter, *Biochem. J.*, **82**, 15 (1962).
83. E. Helmerich и другие, *J. Biol. Chem.*, **236**, 464 (1961).
84. S. Hsiao, F. W. Putnam, Там же, **236**, 122 (1961).
85. J. V. Pierce, M. E. Webster, *Biochem. biophys. Res. Comm.*, **5**, 353 (1961).
86. G. W. Cochran и другие, *Nature*, **180**, 1281 (1957).
87. M. Marschall и другие, *J. Biol. Chem.*, **233**, 102 (1958).
88. G. Roussier и другие, *Federat. Proc.*, **19**, 233 (1960).
89. J. Porach, *Arkiv kemi*, **11**, 259 (1957).
90. B. J. Malmstrom, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **70**, 58 (1957).
91. S. Herbertson и другие, *Acta chem. scand.*, **12**, 737 (1958).
92. E. M. Press и другие, *Biochem. J.*, **74**, 501 (1960).
93. А. Я. Николаев, *Биохимия*, **27**, 487 (1962).
94. Т. Н. Y. Huisman и другие, *J. Lab. and Clin. Med.*, **52**, 312 (1958).
95. Т. Н. Y. Huisman, A. M. Dozy, *J. Chromatography*, **7**, 180 (1962).
96. M. A. Mitz, R. J. Schlueter, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4024 (1959).
97. Г. В. Самсонов, Н. П. Кузнецова, *ДАН*, **115**, 351 (1957).
98. M. Rovery и другие, *Biochim. et biophys. acta*, **42**, 454 (1960).
99. A. M. Snoswell, Там же, **35**, 574 (1959).
100. W. A. Klee, Там же, **45**, 537 (1960).
101. F. C. Houck, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **71**, 336 (1957).
102. P. T. Mora, B. G. Young, Там же, **82**, 6 (1959).
103. P. T. Mora и другие, *Makromolek. Chem.*, **38**, 212 (1960).
104. M. Staechelin, *Biochim. et biophys. acta*, **49**, 11 (1961).
105. R. G. Bartsch, M. D. Kamen, *J. Biol. Chem.*, **235**, 825 (1960).
106. J. L. Faneu, A. P. Horbett, Там же, **234**, 2645 (1959).
107. J. L. Faneu, Там же, **237**, 440 (1962).
108. E. J. Pastore, M. Friedkin, Там же, **236**, 2314 (1961).
109. P. Y. Flory, *J. Chem. Phys.*, **10**, 51 (1942).
110. R. F. Steiner, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **44**, 120 (1953).
111. P. Doty, G. E. Myers, *Disc. Faraday Soc.*, **13**, 51 (1953).
112. R. F. Steiner, *Arch. Biochem. Biophys.*, **49**, 71 (1954).
113. M. Laskowski, M. Laskowski, *Advances in protein Chem.* **9**, 229 (1954).
114. H. K. Mitchell и другие, *J. Biol. Chem.*, **180**, 1071 (1949).
115. A. Tiselius, *Chem. and Engng News*, **27**, 1041 (1949).

116. M. Laskowski, H. A. Scheraga, J. Am. Chem. Soc., **76**, 6305 (1954).
117. И. Клотц, Белки, т. 2, под ред. Г. Нейрат и К. Бейли, ИЛ, М., 1956, стр. 521.
118. F. E. Harris, S. A. Rice, J. Phys. Chem., **58**, 733 (1954).
119. S. A. Rice, J. Am. Chem. Soc., **78**, 5247 (1956).
120. S. A. Rice, F. E. Harris, J. Chem. Phys., **24**, 336 (1956).
121. J. T. G. Overbeek, M. J. Voorn, J. Cellular and Compar Physiol., **49**, suppl. 1, 7 (1957).
122. Б. П. Никольский, В. И. Парамонова, Усп. химии, **8**, 1535 (1939).
123. Г. В. Самсонов, Ионный обмен и его применение, Изд. АН СССР, М., 1959, стр. 223.
124. G. Taborsky, J. Biol. Chem., **234**, 2652 (1959).
125. Г. В. Самсонов, ДАН, **97**, 707 (1954).
126. S. Moore, W. H. Stein, Advances Protein Chem., **11**, 191 (1956).
127. H. G. Boman, U. Kaletta, Biochim. et biophys. acta, **24**, 619 (1957).
128. W. D. Brown, J. Biol. Chem., **236**, 2238 (1961).
129. B. D. Polis, H. W. Shmukler, Там же, **201**, 475 (1953).
130. H. G. Boman, Symposium on protein structure, ed. A. Neuberger, N. Y., 1958, стр. 100.
131. A. Dahlquist, Acta chem. scand., **13**, 1817 (1959).
132. H. G. Boman, L. E. Westlund, Arch. Biochem. and Biophys., **64**, 217 (1956).
133. J. Robbins, Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg, **32**, 215 (1961).
134. J. Glomset, Acta chem. scand., **11**, 512 (1957).
135. E. Y. Youbert, Arch. Biochem. and Biophys., **91**, 11 (1960).
136. A. Spector, Biochim. et biophys. acta, **38**, 191 (1960).
137. K. Dalziel, Acta chem. scand., **12**, 459 (1958).
138. R. C. Woodworth, A. L. Schade, Arch. Biochem. and Biophys., **82**, 78 (1959).
139. C. Connolly, G. Taborsky, J. Biol. Chem., **236**, 1364 (1961).
140. P. Harteck, K. Suhr, Angew. Chem., **56**, 120 (1943).
141. R. S. Alm, R. I. P. Williams, A. Tiselius, Acta chem. scand., **6**, 826 (1952).
142. R. S. Alm, Там же, **6**, 1186 (1952).
143. A. Tiselius, Endeavour, **11**, 5 (1952).
144. H. Bush и другие, J. Biol. Chem., **196**, 717 (1952).
145. L. M. Marshall и другие, Analyt. Chem. Soc., **24**, 773 (1952).
146. H. Sober, E. Peterson, J. Am. Chem. Soc., **76**, 1711 (1954).
147. А. А. Жуховицкий и другие, ДАН, **77**, 435 (1951).
148. А. А. Жуховицкий, Н. М. Туркельтауб, ДАН, **94**, 77 (1954).
149. Л. М. Гиноман, Актуальные вопросы совр. биох., **8**, 54 (1962).
150. R. J. Williams, Analyst., **77**, 905 (1952).
151. J. R. Davis, H. Busch, Cancer Res., **19**, 1157 (1959).
152. H. Svensson, Sci. Tools, **5**, 37 (1958).
153. C. W. Parr, Biochem. J., **56**, № 3, XXVII (1954).
154. R. M. Bock, N. S. Ling, Analyt. Chem., **26**, 1543 (1954).
155. T. K. Lakshmann, S. Sieberman, Arch. Biochem. and Biophys., **45**, 235 (1953).
156. A. Cherkin и другие, J. Chem. Soc., **75**, 1244 (1953).
157. V. Desreux, Proc. internat. Colloq. Macromolec. Amsterdam, 1949, стр. 346.
158. M. P. Tombs и другие, Biochem. J., **80**, 284 (1961).
159. E. A. Peterson, H. A. Sober, Analyt. Chem., **31**, 857 (1959).
160. C. C. Curtain, J. Chromatography, **7**, 24 (1962).
161. A. Kočent, Там же, **6**, 324 (1962).
162. А. Я. Николаев, S. R. Mardashev, Там же, **6**, 53 (1961).
163. А. Я. Николаев, С. Р. Мардашев, Биохимия, **27**, 330 (1962).
164. L. K. Winston и другие, J. Biol. Chem., **235**, 85 (1960).
165. F. C. Brown, D. N. Ward, Там же, **233**, 77 (1958).
166. A. Taussig, E. H. Creaser, Biochim. et biophys. acta, **24**, 448 (1957).
167. M. Rhodes и другие, J. Biol. Chem., **235**, 1686 (1960).
168. А. Я. Кульберг, Биохимия, **24**, 46 (1959).
169. N. Ressler, D. Rolander, Clin. chim. acta, **6**, 433 (1961).
170. T. Wieland, G. Pfeleiderer, Angew. Chem., **74**, 261 (1962).
171. C. L. Markert, F. Miller, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **45**, 753 (1959).
172. M. E. Carsten, J. G. Pierce, J. Biol. Chem., **235**, 78 (1960).
173. R. Richterich и другие, Biochim. et biophys. acta, **56**, 240 (1962).
174. K. A. Trayser, S. P. Colowick, Arch. Biochem. and Biophys., **94**, 177 (1961).
175. С. Р. Мардашев, Ван Шао-хуа, ДАН, **142**, 709 (1962).
176. D. Rogers, F. J. Reithel, Arch. Biochem. and Biophys., **89**, 97 (1960).
177. E. Heilbronn, Biochim. et biophys. acta, **58**, 222 (1962).
178. R. D. Gaines, K. J. Goering, Biochem. J., **96**, 13 (1962).
179. E. M. Press и другие, Там же, **74**, 501 (1960).

180. J. S. McGuire, G. M. Tomkins, *J. Biol. Chem.*, **235**, 1634 (1960).
181. M. Ottesen, A. Spector, *Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg*, **32**, 63 (1960).
182. C. Tanford, Symposium on protein structure, ed. A. Neuberger, N. Y., 1958 стр. 35.
183. S. R. Dickman и другие, *J. Biol. Chem.*, **235**, 169 (1960).
184. Л. Х. Эйдус, Г. К. Отарова, *Биохимия*, **24**, 982 (1959).
185. А. А. Yunis и другие, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3163 (1960).
186. M. J. Spiro, Там же, **236**, 2901 (1961).
187. J. Brahm, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4997 (1959).
188. С. Э. Шноль, *Вопр. мед. химии*, **4**, 443 (1958).
189. J. A. Christiansen, *Acta chem. scand.*, **14**, 107 (1960).
190. С. Э. Шноль и другие, *Вопр. мед. химии*, **5**, 259 (1959).
191. T. Wieland и другие, *Biochem. Ztschr.*, **331**, 103 (1959).
192. T. Wieland и другие, *Naturforsch.*, **15b**, 434 (1960).
193. J. Paul, P. Fottrell, *Biochem. J.*, **78**, 418 (1961).
194. M. U. Tsao, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **90**, 234 (1960).
195. А. А. Покровский, *Вопр. мед. химии*, **6**, 228 (1960).
196. J. L. Faney и другие, *J. Clin. Invest.*, **36**, 272 (1958).
197. M. D. Prager и другие, *J. Labor. and Clin. Med.*, **54**, 694 (1959).
198. M. D. Prager, I. C. Atkins, *Biochim. et biophys. acta*, **54**, 495 (1961).
199. B. Hess, S. J. Walter, *Klin. Wochenschr.*, **39**, 213 (1961).
200. A. Albert, P. Johnson, *Biochem. J.*, **81**, 218 (1961).
201. C. Baglioni, *J. Biol. Chem.*, **237**, 69 (1962).
202. R. J. Speer и другие, *J. Lab. and Clin. Med.*, **54**, 685 (1959).
203. J. H. Humphrey, R. R. Paster, *Lancet*, **1**, 196 (1957).
204. C. C. Curtain, *J. Histochem. and Cytochem.*, **9**, 484 (1961).
205. A. Saha, *J. Chromatography*, **7**, 155 (1962).
206. A. Saha, Там же, **7**, 165 (1962).

Лаборатория биохимии
азотистого обмена микроорганизмов
Ин-та биологической и медицинской
химии АМН СССР