

УДК 543.544 : 541,641 : 546.183.1

ХРОМАТОГРАФИЯ БИОПОЛИМЕРОВ НА ФОСФАТ-КАЛЬЦИЕВЫХ ГЕЛЯХ

C. A. Кибардин

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1472
II. Методы получения и характеристика фосфат-кальциевых сорбентов	1472
III. Способы элюирования и особенности хроматографии на фосфат-кальциевых колонках	1475
IV. Применение фосфат-кальциевых гелей для хроматографии ферментативных белков	1477
V. Хроматография на фосфате кальция белков сыворотки и некоторых других белков	1480
VI. Хроматография на фосфат-кальциевых гелях нуклеиновых кислот и вирусов	1482
VII. Дальнейшее развитие и перспективы фосфат-кальциевой хроматографии биополимеров	1484

I. ВВЕДЕНИЕ

Одним из существенных факторов, определяющих успех хроматографического опыта, является выбор подходящего адсорбента. Прогресс в этой области за последние годы привел к появлению двух главных типов или групп адсорбентов¹, широко используемых в настоящее время для хроматографии самых различных биополимеров.

Одна из этих групп — фосфат-кальциевые сорбенты или гели — относится к типу молекулярных адсорбентов.

В другую группу входят различные ионообменники, главным образом на целлюлозной основе².

Обе группы этих адсорбентов обладают большой хорошо гидратированной поверхностью, но процесс адсорбции биополимеров на них проходит по-разному. Принцип действия этих адсорбентов также различен³, их хроматографическая селективность по отношению к биополимерам, по-видимому, неодинакова¹. Обе группы этих адсорбентов в настоящее время находят широкое применение в хроматографии самых различных биополимеров.

Относительно ионообменников на целлюлозной основе опубликован ряд обзоров^{4, 5, 6}. О применении фосфат-кальциевых гелей для хроматографии биополимеров работы обзорного характера совершенно отсутствуют.

В настоящей статье мы поставили перед собой задачу, по возможности, собрать и обобщить имеющиеся литературные данные по хроматографии биополимеров на фосфат-кальциевых сорбентах.

II. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ФОСФАТ-КАЛЬЦИЕВЫХ СОРБЕНТОВ

В хроматографической практике до последнего времени обычно применялись только трехзамещенный фосфат кальция $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и двухзамещенный фосфат кальция или бруцит $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. В последнее время в хроматографии белков начинают широко применять особую форму фосфата кальция — гидроксилапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. В свое время

трехзамещенный фосфат кальция как адсорбент довольно широко использовался для хроматографии белков. Можно, например, указать на выделение и очистку каталазы с использованием трехзамещенного фосфата кальция^{8, 9}.

В настоящее время трехзамещенный фосфат кальция сравнительно редко используется для хроматографии белков в колоночных опытах. Поэтому мы не будем останавливаться на этой модификации фосфата кальция. Следует только отметить, что в состав $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ обычно входит значительное количество гидроксилапатита¹⁰. Это происходит потому, что первичным продуктом, образующимся при получении трехзамещенного фосфата кальция, является псевдоапатит¹¹, который впоследствии превращается в одну из модификаций трикальцийфосфата, а отчасти в гидроксилапатит¹².

Второй представитель фосфат-кальциевых гелей, и до настоящего времени еще используемый в хроматографии белков, это двухзамещенный фосфат кальция или брушит. Следует отметить, что на структуру брушита, получаемого слиянием растворов CaCl_2 и Na_2HPO_4 , большое влияние оказывает pH. Обычно образование осадка происходит при pH 6,3—6,5. Между тем известно¹⁰, что двухзамещенный фосфат кальция при pH +6,2 и выше может медленно гидролизоваться в другую форму фосфата кальция, обладающую структурой гидроксилапатита.

Поскольку хроматография белков и других биополимеров обычно ведется в области pH около 6,8—7,2 (т. е. выше pH 6,2), то фактически экспериментатор имеет дело с нестабильной, меняющейся структурой адсорбента со значительной примесью гидроксилапатита.

Бесспорным преимуществом в этом отношении обладает другой представитель фосфат-кальциевых гелей, широко применявшийся в настоящее время в колоночной хроматографии биополимеров, гидроксилапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Гидроксилапатит устойчив в широкой области pH и обладает хорошей стабильностью.

Современная хроматография биополимеров на фосфат-кальциевых колонках датой своего рождения может считать 1956 г., когда Тизелиус, после ряда предварительных экспериментальных работ^{13—16}, опубликовал метод получения гидроксилапатита, пригодного для хроматографии белков¹⁰. Метод заключается в слиянии 0,5 M растворов CaCl_2 и Na_2HPO_4 с одинаковой скоростью в сосуд при постоянном перемешивании, после декантации и промывания образовавшегося осадка брушита (CaHPO_4) дистиллированной водой осадок кипятят с 40%-ным раствором NaOH в течение 1 часа; затем осадок многократно промывают серией фосфатных буферных растворов различной молярности. В этом методе весьма существенна операция кипячения осадка CaHPO_4 с раствором щелочи, так как при этом происходит гидролиз двухзамещенного фосфата кальция в новую разновидность фосфата кальция — в гидроксилапатит.

Кислый осадок брушита, обычно образующий грубые формы кристаллов при этой операции в щелочной среде, превращается в мелкие кристаллы гидроксилапатита, пригодные для хроматографии белков. Рентгенографическое исследование полученного адсорбента¹⁰ показало, что это гидроксилапатит, но молярное отношение Ca/P оказалось равным 1,53 вместо обычного 1,67 для гидроксилапатита¹⁰. Последнее, по-видимому, объясняется способностью Na или PO_4^{2-} ионов вступать в кристаллическую решетку адсорбента в различных отношениях.

Гидроксилапатит, полученный по Тизелиусу, в настоящее время широко используется в хроматографии белков. Однако сам процесс получе-

ния адсорбента включает значительное число операций и требует много времени. Для получения удовлетворительной скорости тока обычно необходимо прибегать к внешнему давлению. В недавно опубликованной работе¹⁷ указывается, что для получения гидроксилапатита по Тизелиусу с удовлетворительной скоростью тока из колонки следует не допускать оседания высокодисперсного материала после промывок адсорбента водой. Указывается также на необходимость весьма тщательного перемешивания осадков при кипячении адсорбента¹⁷.

Несколько позднее в 1959 г. Мейн с сотрудниками предложили новый способ получения гидроксилапатита¹⁸ со свойствами, подобными гидроксилапатиту Тизелиуса. В этом методе осадок, полученный после слияния растворов CaCl_2 и натрий-фосфатного буфера с $\text{pH} 6,7$, кипятят в концентрированном растворе NH_4OH . При этой операции происходит превращение осадка в гидроксилапатит. Рентгенографическое изучение полученного адсорбента показало¹⁸, что это чистый гидроксилапатит с отношением $\text{Ca}/\text{P}=1,53$. Следует, однако, указать, что гидроксилапатит, полученный по этому методу, сравнительно слабо сорбирует белки¹⁷. Сами авторы¹⁸ использовали этот адсорбент преимущественно для хроматографии нуклеиновых кислот.

В недавно опубликованной работе Анакер и Стоу¹⁹ предложили еще один метод получения гидроксилапатита, пригодного для хроматографии белков. Здесь исходными растворами являются: 0,1 M раствор $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)_2$, к которому при постоянном перемешивании приливают 1,5 M раствор K_2HPO_4 и 1,4 M раствор CaCl_2 . Превращение полученного таким образом осадка в гидроксилапатит ведут в 0,05 M растворе NaOH при $+40^\circ$ в течение нескольких суток. Полученный осадок является чистым гидроксилапатитом.

Сравнение адсорбционной способности гидроксилапатитов, полученных разными методами по отношению к белкам, показывает, что адсорбенты, полученные по Тизелиусу¹⁰ и по Анакеру¹⁹, имеют близкие кривые адсорбции.

Гидроксилапатит же, полученный по способу Мейн¹⁸, показывает, наоборот, кривую адсорбции, резко отличающуюся от кривых, полученных для гидроксилапатитов по Тизелиусу и Анакеру. Способность этого гидроксилапатита сорбировать белки значительно понижена.

Таким образом, хотя гидроксилапатиты, полученные различными методами, и имеют одинаковый химический состав,— способность к адсорбции белков у них различна. Существенно также отличается и скорость тока жидкости через колонку, наполненную фосфат-кальциевыми гелями, полученными по разным методам. Для адсорбента, полученного по Тизелиусу¹⁰, скорость тока через стандартную колонку может достигать в среднем 20—22 мл/час с применением внешнего давления. Для гидроксилапатита по Мейну¹⁸ авторы дают среднюю скорость тока через стандартную колонку 25—30 мл/час без давления, тогда как для колонок, заполненных гидроксилапатитом, полученным по Анакеру¹⁹, скорость тока достигает до 200 мл/час без применения давления.

Указанные выше различия в адсорбционной способности гидроксилапатитов, полученных различными методами, говорят о том, что величина адсорбции белков на фосфат-кальциевых гелях зависит, по-видимому, не только от химической природы адсорбентов (химическая формула всех трех гидроксилапатитов одинакова), но и от физической неоднородности поверхности адсорбента.

Известно²⁰, что в общем случае величина адсорбции растворенного вещества определяется как адсорбией на единице поверхности раздела: адсорбент — раствор, так и удельной поверхностью единицы массы

адсорбента, доступной для молекул растворенного вещества. При сравнении величин адсорбции на различных адсорбентах с неизвестной удельной поверхностью всегда остается неопределенной причина, обуславливающая различие в величине адсорбции. В некоторых случаях различие в величине адсорбции может быть обусловлено и различием в величине удельных поверхностей адсорбентов²⁰.

Гидроксилапатиты, полученные разными методами, обладают различной степенью дисперсности осадков. Они, вероятно, имеют различные удельные поверхности и, по-видимому, характеризуются различной физической неоднородностью своей поверхности, что, возможно, и обуславливает их различие в адсорбционной способности по отношению к белкам.

Все это говорит о необходимости тщательной стандартизации методов получения фосфат-кальциевых сорбентов для достижения воспроизводимых результатов при хроматографии биополимеров на колонках.

III. СПОСОБЫ ЭЛЮИРОВАНИЯ И ОСОБЕННОСТИ ХРОМАТОГРАФИИ БИОПОЛИМЕРОВ НА ФОСФАТ-КАЛЬЦИЕВЫХ КОЛОНКАХ

1. О методах элюирования

В качестве элюирующих растворов при хроматографии биополимеров на фосфате кальция в настоящее время употребляются почти исключительно фосфатные буферные растворы различных концентраций. Обычно сорбцию белков на колонках проводят при низких концентрациях фосфатного буферного раствора, а элюирование ведут при более высоких концентрациях этого же буфера; чаще всего при одном и том же значении pH.

Изменение величины pH при хроматографии на фосфат-кальциевые сорбентах сравнительно с изменением концентрации буфера оказывается на результатах опыта весьма незначительно¹⁰.

В настоящее время используют два основных метода элюирования биополимеров с фосфатом кальция — метод градиентного элюирования (непрерывное увеличение концентрации фосфатного буфера, вводимого в колонку) и метод ступенчатого элюирования (повышение концентрации фосфата в колонке происходит скачками, ступенями).

Метод градиентного элюирования при известных условиях позволяет обычно выявить все компоненты хроматографируемой смеси. Вместе с тем при использовании этого метода, вследствие эффекта взаимного влияния белков при хроматографии¹⁰, часто на фосфат-кальциевых сорбентах происходит значительное перекрывание смежных фракций и в ряде случаев, даже при наличии в испытуемом растворе нескольких белковых компонентов, при выходе из колонки может получиться одна сильно растянутая зона белка. Оценку однородности подобного материала проводят при помощи рехроматографии.

Обычно в таких случаях удается выделить отдельные компоненты хроматографируемой смеси. Один из таких примеров приведен в работе Тизелиуса¹⁰ при хроматографии гамма-глобулина сыворотки человека на гидроксилапатите.

При ступенчатом элюировании всегда существует опасность, что компоненты, выходящие из колонки, могут быть сложными по своему составу; внутри отдельных фракций могут находиться различные по своей природе белки. С другой стороны, белки, имеющие широкую область элюирования, могут при выходе из колонки дать более чем один компонент для одного и того же белка, особенно если для элюирования применяются концентрации буферных растворов, мало отличающиеся друг от друга.

Появление таких «ложных» компонентов и условия их образования при хроматографии белков на фосфат-кальциевых колонках подробно обсуждаются в работе³.

В большинстве случаев, при хроматографии биополимеров на фосфате кальция для оценки полученных результатов основным методическим приемом является рехроматография продуктов опыта. В случае действительного реального разделения биополимеров на компоненты, последние при рехроматографии всегда элюируются из колонки теми же концентрациями буферного раствора, как и в условиях первоначального хроматографического опыта. В настоящее время при хроматографии исследуемого материала на фосфат-кальциевых колонках обычно пользуются обоими методами элюирования, в известной мере дополняющими один другого. Помимо рехроматографии, для оценки полученного материала желательно, конечно, привлечение и других методов оценки белковых компонентов.

Каков механизм элюирования белковых полимеров с фосфат-кальциевых колонок? Специальные исследования по этому вопросу почти отсутствуют. Все же на основании работ, главным образом Гизелиуса и сотрудников^{10, 16}, сейчас можно представить механизм элюирования белков с фосфат-кальциевых сорбентов как процесс замещения хроматографируемых белков на ионы фосфата. Способность фосфата кальция к глубокому взаимному обмену своих ионов на ионы кальция и фосфата из окружающей среды показана²¹ непосредственно на примерах с обменом радиоактивных изотопов ионов Р³² и Са⁴⁵. Особенно хорошо эта тенденция выражена у ионов РО₄. Эти ионы способны эффективно замещать ионы фосфата кальция не только в пределах гидратного слоя, но и проникать во внутреннюю часть кристаллической решетки адсорбента²¹.

В недавно появившейся работе Бэрли и Кук²², используя другой экспериментальный прием, прямо показали, что наличие фосфатных групп у белков в сущности определяет поведение последних при хроматографии на фосфат-кальциевых колонках. Так, α - и β -липовителлины яичного желтка, имеющие разное содержание фосфата при хроматографии на гидроксилапатите, также элюируются различно. β -Липовителлин выходит из колонки при 0,6 M, а α -липовителлин только при 2,0 M концентрации фосфатного буфера. После же обработки α -липовителлина фосфатазой (отщепление части фосфатных групп) этот белок ведет себя уже как β -липовителлин и элюируется из колонки при 0,6 M фосфатного буфера. Необходимы вместе с тем и дальнейшие исследования в этом направлении с целью выяснения всех деталей механизма элюирования белков с фосфат-кальциевых колонок.

2. Особенности хроматографии биополимеров на фосфат-кальциевых колонках

При хроматографии белков на фосфат-кальциевых арсorbентах определенное значение имеют электростатические связи между белком и адсорбентом. Помимо последних, по-видимому, имеют значение связи Ван-дер-Ваальса, а также и водородные связи^{1, 7}.

В результате образования многочисленных связей между белком и адсорбентом одновременная диссоциация их при десорбции белка мало вероятна¹. Вследствие этого при известных условиях может возникнуть опасность частичной обратимой денатурации белка с возможным изменением различных структур (третичной и четвертичной) белковой молекулы²³.

Помимо этого, неодновременность диссоциации многочисленных и разнообразных по характеру связей между хроматографируемыми белками и поверхностью адсорбента может создавать сложную картину, пока не поддающуюся интерпретации, и приводить к эффектам внутреннего взаимодействия белков между собой при движении последних вниз по колонке в процессе хроматографии.

Эффекты внутреннего взаимодействия, взаимного влияния белков при хроматографии на фосфат-кальциевых колонках играют значительную роль¹⁰.

Обычно хроматографии подвергают различные белковые смеси с целью отделения определенного белка от других посторонних белков, находящихся в смеси. Часто хроматография является окончательным этапом, завершающим очистку, или же одной из предшествующих очистке операций. Поэтому присутствующие в опытной смеси балластные белки могут находиться в различных количественных соотношениях с выделяемым белком.

Работы последних лет в области хроматографии белков на колонках показали, что нередко величина сродства белка к сорбенту зависит от присутствия в растворе других белков¹⁰. Обычно белок, обладающий большим сорбционным сродством, вытесняет с поверхности сорбента другой белок, обладающий меньшим сродством к сорбенту; происходит взаимное замещение белков на колонке. Эффект взаимного замещения белков на фосфате кальция впервые использован в работе Полис и Шмуклер²⁴ по очистке пероксидазы молока. При эффекте взаимного замещения белков на фосфат-кальциевых колонках важную роль играют следующие основные моменты. Во-первых, величина сродства хроматографируемых белков по отношению к сорбенту. Существенно, чтобы между вводимым в колонку замещающим белком и белком, вытесняемым из колонки, имелось значительное различие по степени их сродства к сорбенту. Только при этом условии можно получить удовлетворительные результаты по методу взаимного замещения белков. Существенное значение имеют количество замещающего белка, вводимого в колонку, и, наконец, концентрация буферного раствора, в котором растворен замещающий белок. Все эти моменты довольно подробно разобраны в работе Боман²⁵. Помимо эффекта замещения белков при хроматографии на фосфат-кальциевых колонках могут проявляться также и эффекты, вызванные взаимным влиянием белков. Было замечено¹⁰, что часто белок (обычно сильно сорбируемый на колонках) в присутствии другого белка (имеющего меньшую степень сорбируемости) сам показывал пониженную сорбируемость при хроматографии на колонках. Очевидно, эффекты взаимного влияния белков при хроматографии на фосфат-кальциевых колонках играют значительную роль и могут существенно отражаться на результатах хроматографических экспериментов. Поэтому важно правильное понимание и учет всех факторов, влияющих на хроматографию белков, расширение наших знаний в этой области, где до настоящего времени господствует чисто эмпирический подход к подбору оптимальных условий для хроматографии биополимеров.

IV. ПРИМЕНЕНИЕ ФОСФАТ-КАЛЬЦИЕВЫХ ГЕЛЕЙ ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ БЕЛКОВ

В последние годы адсорбционные хроматографические методы получили очень широкое распространение в препаративной биохимии и, в частности, для очистки и выделения самых различных ферментативных белков.

В настоящее время редкая работа по фракционированию ферментов не обходится без применения хроматографии. Часто хроматографическая процедура является основным методическим приемом, обеспечивающим успех всей работы по выделению ферментативных белков.

Не ставя своей задачей полностью охватить всю литературу по применению фосфат-кальциевых сорбентов для хроматографии ферментов, мы ограничимся в основном работами только последнего десятилетия. Именно за последние десять лет особенно широко начали применять методы адсорбционной хроматографии на колонках в работах с ферментативными белками. Так, сравнительно недавно французские авторы опубликовали работы по выделению, очистке и изучению липазы поджелудочной железы свиньи^{26,27}. В этих работах использованы хроматографические колонки с различными адсорбентами: трехзамещенным фосфатом кальция, брушитом, гидроксилапатитом, а также колонки с ионообменной целлюлозой. При хроматографии на фосфат-кальциевых сорбентах на хроматограмме элюированного фермента имеется один пик, независимо от способа элюирования; на ионообменной целлюлозе было получено несколько активных фракций фермента. Появление мультикомпонентности у липазы при хроматографии ее на ионообменной целлюлозе авторы принимают за артефакт²⁷. Эти работы методически интересны тем, что здесь использованы различные адсорбенты для хроматографии одного и того же объекта и, по-видимому, фосфат кальция для липазы поджелудочной железы имеет определенное преимущество перед ионообменной целлюлозой.

Холинэстераза из сыворотки крови человека была получена при помощи хроматографии на гидроксилапатите²⁸. В этой работе для хроматографии фермента применялась также и ионообменная смола дауэкс-2, причем гидроксилапатит показал значительное преимущество перед ионообменными смолами. Из ферментов, расщепляющих эфирные связи, хроматографии на фосфат-кальциевых гелях подвергались ферменты, гидролизующие эфиры фосфорной кислоты: фосформоноэстераза из красных кровяных телец человека²⁹, а также щелочная фосфатаза из почек свиньи³⁰. В последнем случае при хроматографии получено несколько фракций, обладающих ферментативной активностью. Вопрос об их природе остается открытым. Эстераза из печени свиньи при помощи колонок с гидроксилапатитом была отделена от балластных белков и получена в очищенном состоянии³¹. Поведение очищенной эстеразы печени на колонках с гидроксилапатитом показало, что фермент может быть разделен на 2–3 фракции, обладающие близкой удельной активностью³². Анализ этих фракций показал, что их появление обусловливается не различиями в их первичной структуре, а, по-видимому, частичной ассоциацией молекул этого фермента^{32,33}. Этот пример, в частности, показывает, как важно проводить, по возможности, всестороннюю оценку продуктов хроматографического опыта. Хроматографии на фосфат-кальциевых гелях подвергались и другие ферменты — амилаза из пшеничной муки³⁴, фенолаза³⁵, где было получено несколько фракций, обладающих крезолазной активностью. Наличие нескольких активных фракций было показано у никотинамидазы³⁶ при хроматографии на гидроксилапатите. В этой работе была проведена оценка полученных фракций как в ультрацентрифуге, так и рехроматографией. Авторы приходят к выводу, что существование таких фракций является не чем иным, как артефактом, возникающим вследствие автолиза на первых стадиях выделения фермента. Из группы ферментов, осуществляющих реакции переноса — трансфераз, были подвергнуты хроматографии на фосфат-кальциевых сорбентах различные дегидрогеназы^{37–45}. Из ферментов,

относящихся к оксидазам, хроматография на фосфат-кальциевых гелях была успешно использована для выделения моноаминооксидазы крови крупного рогатого скота⁴⁶. В этом случае получено несколько активных фракций фермента с близкой удельной активностью. Другой фермент этой группы — аминоксидаза крови крупного рогатого скота — также недавно была хроматографирована на колонке с гидроксилапатитом⁴⁷. В этой работе была применена комбинация колоночных методов с различными адсорбентами — с фосфатом кальция и с ионообменной целлюлозой. Отмечено преимущество гидроксилапатита перед целлюлозой в отношении этого фермента.

Из группы трансаминаэз ферментов, переносящих аминогруппы на фосфат-кальциевые гелях, были подвергнуты хроматографии тирозин — кетоглутарат — трансаминоэза⁴⁸ и аланин — глютамат — трансаминаэза⁴⁹. В обоих случаях было обнаружено существование нескольких активных фракций фермента, различающихся хроматографически.

Дальнейшее исследование и оценка полученных фракций авторами, к сожалению, не проводились. Хроматографии на фосфат-кальциевых гелях подвергались также ферменты: бактериальная полинуклеотид-фосфорилаза⁵⁰, транскетолаза печени свиньи⁵¹, трансфераза печени кролика⁵² и другие. Интересна попытка применения хроматографии на колонке с гидроксилапатитом к разделению ферментов мозга⁵³. Было достигнуто некоторое разделение ферментативных пиков, хотя более полное разделение последних может быть достигнуто, по-видимому, путем повторной хроматографии. Эта работа интересна тем, что является первой попыткой применить хроматографию на фосфате кальция к выделению и фракционированию ферментов из мозговой ткани.

Из приведенных выше работ видно, что при хроматографии ферментов на фосфат-кальциевых колонках часто отмечается наличие нескольких фракций, обладающих одинаковой ферментативной активностью. Такое же явление наблюдается, как известно, и при хроматографии ферментов на ионообменной целлюлозе⁷. Вопрос о хроматографической гетерогенности ферментативных белков при элюировании их из колонок безусловно заслуживает внимания. Следует сказать, что результаты хроматографических опытов на колонках далеко не всегда поддаются однозначному истолкованию, часто причина появления хроматографически различных, но одинаковых по активности фракций фермента остается неясной.

Работы последних лет в области колоночной хроматографии биополимеров показали, что помимо трудностей в интерпретации результатов опытов, вызываемых самой техникой элюирования (подробнее см. раздел III), существует еще ряд других факторов, независимых от метода элюирования, которые затрудняют однозначное объяснение опытных данных. При хроматографии они могут быть причиной появления ряда белковых фракций, обладающих одинаковой ферментативной (или иной) активностью.

Ниже приводятся примеры подобных случаев и дается оценка причин, вызывающих появление мультикомпонентности белковых полимеров при хроматографии последних на колонках с фосфатом кальция. Так, при хроматографии на гидроксилапатите фикоцианина и фикоэритрина возможно появление хроматографически различных фракций у этих белков, вызываемых эффектами ассоциации — диссоциации¹⁰.

В другом случае на примере рибонуклеазы из поджелудочной железы свиньи⁵⁴ появление хроматографической гетерогенности у фермента обусловливалось отщеплением связанных с белком полианионов.

Изменения вторичной, третичной или четвертичной структуры белка,

вызываемые различными причинами, также могут быть факторами, обусловливающими мультикомпонентность хроматографируемого белка^{23, 55}.

В других случаях мультикомпонентность может быть вызвана различной степенью свежести испытуемого препарата⁵⁶. Иногда на характер хроматографической кривой может влиять спонтанный гидролиз хроматографируемого белкового препарата⁵⁷. Различие в количестве фосфатных групп у хроматографируемого белка, по-видимому, также может быть причиной появления разных компонентов при элюировании с фосфат-кальциевых колонок¹⁷. Наконец, существование отдельных активных форм одного и того же белка может соответствовать его истинному состоянию. В последнее время это было показано в ряде работ при хроматографии различных белков на различных адсорбентах^{48, 58-60}.

Таким образом, из приведенного выше материала видно, какие разнообразные причины могут приводить к появлению мультикомпонентности у одного и того же белка при хроматографии на колонках. Во всех таких случаях для оценки полученных результатов желательно проводить специальное исследование мультифракций белка различными независимыми методами. Эти дополнительные данные позволяют установить в каждом отдельном случае причины мультикомпонентности хроматографируемых белков. По-видимому, необходимо признать наличие ряда факторов, вызывающих появление указанной гетерогенности у белковых полимеров при хроматографии их на колонках.

V. ХРОМАТОГРАФИЯ НА ФОСФАТЕ КАЛЬЦИЯ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ БЕЛКОВ

За последние годы отмечается значительное увеличение числа работ по хроматографии белков плазмы и сыворотки с применением фосфат-кальциевых гелей.

Хроматографию белков нормальной сыворотки человека на колонках с гидроксилапатитом подробно изучал Жертен³. Наблюдалась определенная последовательность выхода белковых компонентов из колонки. Интересно сопоставить поведение белков сыворотки на колонках с гидроксилапатитом с поведением этих же белков при хроматографии на ионообменной целлюлозе.

ТАБЛИЦА 1

Адсорбент	Компоненты белков сыворотки, элюируемые из колонки				
	1	2	3	4	5*
Гидроксилапатит	α_1^{**}	Al***	α_2^{**}	γ^{**}	β^{**}
ДЭАЭ-целлюлоза	γ^{**}	β^{**}	α_1^{**}	Al***	α_2^{**}

* Цифры обозначают последовательность выхода белков из колонки.

** Глобулин.

*** Альбумин.

Табл. 1 дает представление о поведении белков сыворотки при хроматографии последних на гидроксилапатите и на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой.

Из табл. 1 видно, что последовательность выхода белков сыворотки из колонок с гидроксилапатитом и с ДЭАЭ-целлюлозой различна. Если при элюировании с гидроксилапатита первыми появляются α_1 -глобулин и альбумин, а последними выходят γ - и β -глобулины, то на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой, наоборот, первыми выходят γ -глобулин и β -глобулин и последними альбумин и α_2 -глобулин. При элюировании из колонок с ионообменной целлюлозой белки, обладающие более высокими изоточками, выходят раньше, чем белки, имеющие меньшие изоэлектрические

точки, тогда как при элюировании с гидроксилапатита такой зависимости от изоэлектрических точек белков не наблюдается.

Из сказанного выше следует, что фосфат-кальциевые гели и ионообменники на целлюлозной основе разделяют белки на основании различных принципов, характер хроматографии белков на них разный и эти группы сорбентов не могут заменять одна другую³.

Поведение отдельных белковых компонентов сыворотки при хроматографии последних на фосфат-кальциевых колонках изучалось в ряде работ. Хроматографии подвергались альбумины сыворотки человека^{3, 34}, быка^{10, 62, 63}, лошади¹⁷.

Приводим сводную таблицу (табл. 2) по хроматографии альбуминов сыворотки, полученных из различных источников на колонках с гидроксилапатитом.

Из табл. 2 видно, что альбумины различного происхождения при хроматографии на гидроксилапатите дают три компонента, элюирующихся из колонок всегда при определенных концентрациях фосфатного буфера. Некоторое различие в процентном соотношении вымываемых компонентов, по-видимому, можно объяснить как различной степенью чистоты исходных препаратов альбуминов, так и различием в методике получения гидроксилапатитов у разных авторов.

Интересно, что хроматография альбумина сыворотки человека на ионообменной целлюлозе⁶¹ также дает не менее трех различных компонентов. Вместе с тем до настоящего времени нет полной ясности в вопросе о том, какова же причина, обусловливающая появление хроматографической гетерогенности у альбумина сыворотки.

Отдельные авторы изучали поведение на фосфат-кальциевых колонках также и других белков сыворотки: α -глобулина^{3, 65}, β -глобулина³ и γ -глобулина^{3, 10}. γ -Глобулин при хроматографии на колонках с гидроксилапатитом обычно давал 3 компонента, реальное существование которых было подтверждено рехроматографией¹⁰. При помощи колонок с гидроксилапатитом был отделен электрофоретически быстрый компонент γ -глобулина от компонента, обладающего меньшей подвижностью³. Предложена схема выделения γ -глобулина непосредственно из сыворотки при помощи колонок с гидроксилапатитом^{3, 64}.

Ряд работ посвящен хроматографии церулоплазмина на фосфат-кальциевых колонках^{3, 66–68}. Показана хроматографическая гетерогенность этого белка⁶⁸. В нескольких работах изучали поведение на колонках с фосфатом кальция фибриногена из плазмы человека^{69, 70}. Интересно, что хроматография фибриногена при комнатной температуре оказалась предпочтительнее, чем при +4°⁶⁹.

Таким образом, к настоящему времени поведение белков как цельной сыворотки, так и ее отдельных компонентов, было довольно подробно изучено на фосфат-кальциевых колонках и была показана гетерогенность ряда компонентов.

Помимо белков сыворотки, хроматография на фосфат-кальциевых колонках с успехом была применена и к другим белкам — к таким, как альбумин молока⁷¹, яичный альбумин^{10, 17}, белки молока^{72, 73}, белки яиц⁷⁴, белки слюны⁷⁵, белки сои^{76, 77}. Фосфат-кальциевые гели были

ТАБЛИЦА 2*

Альбумин из сыворотки	Молярность фосфатного буфера, применяемого для элюирования, М			Ссылки на литературу
	0,07	0,11	0,40	
Быка	50	30	20	10
»	50	37	13	62
»	67	25	8	63
Лошади	67	21	12	17
Человека	50	30	20	3
»	62	28	10	34

* Цифры обозначают процент белка, элюируемый из колонок

использованы также для хроматографии кислых мукополисахаридов (гиалуроновая кислота и хондроитин сульфат⁷⁸).

Найдено, что только фосфат кальция, осаждаемый при определенных условиях, при рН 9,2 может удовлетворительно сорбировать кислые мукополисахариды, тогда как гидроксилапатит, полученный по Тизелиусу¹⁰, сорбирует эти белки весьма слабо. Это еще раз показывает большое значение стандартизации методов получения фосфат-кальциевых сорбентов и возможность варьирования свойств последних.

Наконец, ряд работ был посвящен использованию фосфат-кальциевых гелей для хроматографии гормонов: инсулина⁷⁹, лактогенного гормона из гипофизы овцы⁸⁰, а также лютеинизирующего гормона из гипофиза⁸¹, фолликулстимулирующего гормона из гипофиза свиньи⁸², гормона, который стимулирует образование эритроцитов плазмы овцы⁸³.

Эти работы показывают возможность успешного разделения и выделения различных гормональных белков при помощи фосфат-кальциевых колонок. При этом для инсулина⁷⁹ и для лютеинизирующего гормона из гипофиза овцы⁸¹ хроматография показала наличие нескольких фракций, обладающих гормональной активностью. Хроматография на фосфате кальция была использована также и для выделения и очистки некоторых белковых токсинов^{84, 85}.

VI. ХРОМАТОГРАФИЯ НА ФОСФАТ-КАЛЬЦИЕВЫХ ГЕЛЯХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ВИРУСОВ

Фосфат-кальциевые гели для хроматографии нуклеиновых кислот начали применять сравнительно недавно. В этой области одна из первых — работа Семенца⁸⁶, который использовал гидроксилапатит для хроматографии ДНК из тимуса теленка. Интересно, что ДНК сорбируется на гидроксилапатите значительно сильнее, чем обычные белки. Хроматографию ДНК из тимуса теленка на фосфат-кальциевых колонках проводили также и другие авторы⁸⁷.

Показано⁸⁶, что ДНК, элюирируемая из колонки, выходит одним острым пиком в противоположность результатам, получаемым, например, на эктеол-целлюлозе⁸⁸, где была показана значительная гетерогенность ДНК.

По современным представлениям, ДНК клеток обладают очень большими молекулярными весами и, по-видимому, не делятся на субъединицы, а образуют непрерывные полинуклеотидные цепи⁸⁹. При хроматографии таких образований, конечно, возникает реальная опасность фрагментации и дезагрегации молекул ДНК. Не исключено, что значительная гетерогенность у ДНК одного сорта, получаемая при хроматографии на эктеол-целлюлозе, связана именно с разрушением единой молекулы ДНК⁹⁰. В этом отношении фосфат-кальциевые гели, по-видимому, имеют преимущество, так как при хроматографии на последних обычно получается только один (максимум 2—3) пик для ДНК⁸⁷. Фосфат-кальциевые гели применяли для хроматографии ДНК также и в работах^{18, 91}.

Недавно было показано, что при помощи хроматографии на фосфат-кальциевых колонках можно успешно разделить смеси ДНК и РНК^{92, 93}. В одной из работ оказалось возможным разделить смесь ДНК из тимуса теленка и РНК из вируса табачной мозаики⁹² при помощи одной операции на колонке с фосфатом кальция.

В другой работе⁹³ было достигнуто хорошее разделение смесей ДНК и РНК, выделенных из бактерий *Salmonella Typhimurium*. При этом для РНК получаются два пика, а для ДНК один пик при выходе из колонки. Эти работы показывают большое значение хроматографических методов

разделения с использованием фосфат-кальциевых колонок для разделения таких сложных биологических смесей, как смеси нуклеиновых кислот. При этом достигается достаточно хорошее разделение нуклеиновых кислот.

Заслуживает внимания работа по хроматографии дезоксирибонуклеотидов, выделенных из селезенки нормальных мышей и мышей, предварительно подвергавшихся облучению⁹⁴, в которой показано существенное различие в профилях элюирования дезоксирибонуклеопротеидов у облученных и нормальных животных. Эта работа указывает на новые возможности применения фосфат-кальциевых колонок, на способность отражать структурные изменения между нормальными и патологическими дезоксирибонуклеопротеидами клеток. Помимо ДНК, хроматографии на фосфат-кальциевых колонках подвергались также и РНК, выделенные из различных источников, высокомолекулярная РНК из клеток асцитной опухоли Эрлиха⁹⁵, РНК из печени кроликов⁹⁶, растворимые РНК из печени крыс⁹⁷ и из микробных телец *Escherichia Coli*⁹⁸.

В последней работе⁹⁸ при помощи хроматографии на колонках с гидроксилапатитом одной операцией были разделены растворимые РНК, специфичные для аминокислот валина и фенилаланина. Развитие работ в этом направлении представляет определенный интерес для получения различных типов растворимых РНК, специфичных для отдельных аминокислот.

Заслуживают внимания появившиеся недавно работы по хроматографии вирусных РНК на фосфат-кальциевых гелях. Инфекционной РНК, полученной из асцитных опухолевых клеток Кребса, инфицированных вирусом энцефаломиокардита⁹⁹, вирусной РНК, выделенной из вируса ящура¹⁰⁰, РНК из вируса табачной мозаики^{92, 101}. В некоторых из этих работ^{99, 100} РНК элюировалась из колонки несколькими пиками. Следует, однако, отметить, что фосфат-кальциевые гели пока еще сравнительно мало используются для выделения и характеристики нуклеиновых кислот; между тем эти сорбенты весьма эффективны для хроматографического изучения как РНК, так и ДНК, полученных из самых различных источников.

Применение адсорбционных колоночных методов для хроматографии вирусов было успешно осуществлено только за последние годы. Хроматографии на фосфат-кальциевых колонках подвергались вирусы гриппа^{102, 103}, герпеса¹⁰⁴, энцефаломиокардита¹⁰⁵, энцефалита^{106, 107}, арборвирусы¹⁰⁸, аденоvирусы¹⁰⁹, вирус кори¹¹⁰, а также вирусы растений^{101, 111}. Применение колоночных хроматографических методов к таким макромолекулам, как молекулы вирусов, обладающих очень большим молекулярным весом и сложной структурой, представляло значительные трудности, однако были найдены методические приемы и подходящие адсорбенты, позволяющие выделять вирусные нуклеопротеиды из сложной смеси веществ при помощи хроматографии на колонках.

Эксперименты с отдельными вирусами¹⁰⁰ показали, что для хроматографии имеет значение, на какой среде выращивался испытуемый вирус. Например, хроматографический характер вируса герпеса менялся в зависимости от того, выращивался ли вирус в культуре клеток или в полости куриного эмбриона. Имела значение также и предварительная обработка испытуемого материала версеном¹⁰⁰.

Интересна работа с арборвирусами¹⁰⁸, где было показано, что хроматография на фосфат-кальциевых колонках может быть удобным и простым средством получения стабильных гемаглютининовых и комплемент-связывающих антигенов как для диагностики этих вирусов, так и для детального изучения их физико-химических свойств.

Для аденоовирусов, например, хроматография на фосфат-кальциевых гелях может быть использована для быстрого типирования этих вирусов при помощи типо-специфических сывороток¹⁰⁹ и для выделения трех различных компонентов аденоовирусов, дающих реакцию связывания комплемента¹⁰⁹. Последнее было показано также и при хроматографии аденоовирусов на ДЭАЭ-целлюзозе¹¹².

Наконец, в заключение можно указать еще на хроматографию колифагов на колонках с фосфатом кальция¹¹³. Интересно, что способность фосфат-кальциевых гелей к адсорбции вирусных нуклеопротеидов выражена значительно сильнее, чем в отношении бактериальных фагов¹¹³.

VII. ДАЛЬНЕЙШЕЕ РАЗВИТИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ФОСФАТ-КАЛЬЦИЕВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ БИОПОЛИМЕРОВ

В последние годы опубликованы работы, показывающие новые возможности использования фосфат-кальциевых гелей в хроматографии биополимеров. В некоторых из этих работ^{10, 99, 114} показано, что хроматография на фосфат-кальциевых колонках может, по-видимому, дифференцировать молекулы биополимеров также и в зависимости от их молекулярного веса. Небольшие по размерам белковые молекулы требуют для элюирования из колонки более низкой концентрации фосфатного буферного раствора, сравнительно с молекулами, обладающими большими молекулярными весами. Таким образом, хроматография на фосфат-кальциевых колонках может быть использована как прием для приблизительной оценки молекулярных размеров и веса хроматографируемых белковых веществ.

Интересное применение фосфат-кальциевые сорбенты было найдено в работах^{10, 22}. В этих работах отмечалось, что хроматография на фосфат-кальциевых колонках может быть с успехом использована для выявления и наблюдения феномена ассоциации — диссоциации белковых полимеров, в тех случаях, когда эти процессы происходят в той же (или близкой) области рН, при которой проводится и хроматографический процесс.

В совершенно другой области явлений фосфат-кальциевые сорбенты использованы в работах^{115, 116}. Эти работы показывают, что хроматография на фосфате кальция может быть применена для наблюдения за изменением белковых компонентов в сыворотке крови при некоторых заболеваниях организма. Так, в зависимости от наличия в крови больного различных фракций белка — церулоплазмина изменяется хроматографическая кривая¹¹⁵, показывая различную степень патологического процесса. По-видимому, хроматография на колонках с фосфатом кальция является достаточно чувствительным и гибким методом исследования и, вероятно, может быть широко использована для выявления различных патологических сдвигов в белках крови при некоторых заболеваниях.

Очень интересное применение нашли фосфат-кальциевые гели при исследовании серологических реакций^{117, 118}. В этих работах показана возможность изучения взаимодействия антигена с антителом непосредственно на колонках. Наконец, в последнее время указано на новое свойство фосфат-кальциевых гелей, на их способность адсорбировать из окружающей среды некоторые элементы¹¹⁹, а также ионы тяжелых металлов¹²⁰.

Недавно открыта интересная особенность фосфат-кальциевых гелей по переносу кальциевых фосфатных остатков нуклеозидов на поверхность этих гелей¹²¹. Этот процесс трансфосфорилирования может идти при широких диапазонах температуры и рН. По-видимому, он имеет

определенное значение и в процессе хроматографии соединений, содержащих свободные фосфатные группы, которые могут участвовать в этой реакции.

Из приведенного обзора по хроматографии биополимеров на фосфат-кальциевых гелях видно, в каких различных областях исследования могут быть использованы колонки с фосфат-кальциевыми гелями. Желательно дальнейшее изучение свойств этих гелей, расширение области их применения, а также выяснение деталей механизма хроматографии биополимеров на фосфат-кальциевых колонках.

ЛИТЕРАТУРА

1. E. A. Peterson, H. A. Sober, Сб. The Plasma Proteins. v. I, стр. 105, Putnam F. W. Ac. Press, N. Y.—London, 1960.
2. E. A. Peterson, H. A. Sober, J. Am. Chem. Soc., **78**, 751 (1956).
3. S. Hjerten, Biochim. et biophys. acta, **31**, 216 (1959).
4. H. A. Sober, E. A. Peterson, Federat. Proc., **17**, 1116 (1958).
5. F. Turba, Advances Enzymol. and Related Subjects. Biochem., **22**, 417 (1960).
6. H. A. Sober, E. A. Peterson, Organic and Biochemistry, ed. C. Calmon, T. E. R. Kressman, N. Y., 1957.
7. А. Я. Николаев, Усп. химии, **32**, 1087 (1963).
8. K. Agner, Biochem. J., **32**, 1702 (1938).
9. D. Herbert, J. Pinsent, Там же, **43**, 203 (1948).
10. A. Tiselius, S. Hjerten, O. Levin, Arch. Biochem. and Biophys., **65**, 132 (1956).
11. C. Fabry, Biochim. et biophys. acta, **14**, 401 (1954).
12. Ван-Везер, Фосфор и его соединения, гл. 9. М., ИЛ, 1962.
13. A. Tiselius, Arkiv kemi, **7**, 443 (1954).
14. A. Tiselius, Ann. Acad. Sci. Fennicae A, **11**, № 60, 257 (1955).
15. A. Tiselius, Angew. Chem., **67**, 245 (1955).
16. S. M. Swingl, A. Tiselius, Biochem. J., **48**, 171 (1951).
17. О. С. Циперович, И. П. Галич, Укр. биохим. ж., **34**, 666 (1962).
18. R. K. Main, M. J. Wilkins, L. J. Cole, J. Am. Chem. Soc., **81**, 6490 (1959).
19. V. T. Anacker, V. Stoy, Biochem. Ztschr., **330**, 141 (1958).
20. М. М. Дубинин, Физико-химические основы сорбционной техники, ОНТИ, 1935.
21. У. Ньюман, М. Ньюман, Минеральный обмен кости, М., ИЛ, 1961.
22. R. W. Burley, W. H. Cook, Canad. J. Biochem. and Physiol., **40**, 373 (1962).
23. C. Tanford, Symposium in Protein Structure, N. Y., 1958.
24. B. D. Polis, H. W. Shmukler, J. Biol. Chem., **201**, 475 (1953).
25. H. G. Boman, Symposium in Protein Structure, Paris, 1957, стр. 100.
26. G. Marhis-Mouren, M. J. Constantin, P. Desnuelle, Bull. Soc. chim. biol., **40**, 2019 (1958).
27. G. Marhis-Mouren, L. Sorda, P. Desnuelle, Arch. Biochem. and Biophys., **83**, 309 (1959).
28. B. G. Malmstrom, O. Levin, H. G. Boman, Acta chem. scand., **10**, 1077 (1956).
29. R. K. Tsuboi, R. B. Hudson, Arch. Biochem. and Biophys., **53**, 341 (1954).
30. E. F. Alvarez, M. Lora-Tamayo, Biochem. J., **69**, 312 (1958).
31. С. А. Кибардин, Биохимия, **27**, 101 (1962).
32. С. А. Кибардин, Там же, **27**, 636 (1962).
33. С. А. Кибардин, ДАН, **140**, 482 (1961).
34. Е. С. Зуева, Л. С. Маркосян, Н. И. Прокуряков, Биохимия, **26**, 209 (1961).
35. I. L. Smith, R. C. Krueger, J. Biol. Chem., **237**, 1121 (1962).
36. I. G. Joshi, P. Handler, Там же, **237**, 929 (1962).
37. G. R. Julian, R. G. Wolfe, F. I. Reithel, Там же, **236**, 754 (1961).
38. W. H. Bradshan, H. A. Barker, Там же, **235**, 3620 (1960).
39. H. R. Mahler, J. Raw, R. Molinari, D. F. Do-Amaral, Там же, **233**, 230 (1958).
40. H. Boser, G. Pawelke, Naturwiss., **48**, 572 (1961).
41. G. W. Schwert, D. B. S. Millor, L. Takenaka, J. Biol. Chem., **237**, 2131 (1962).
42. H. N. Kirkman, Там же, **237**, 2364 (1962).
43. Z. B. Rose, E. Racker, Там же, **237**, 3279 (1962).

44. B. S. Baliga, G. M. Bhatnagar, V. Jagannathan, Biochim. et biophys. acta, **58**, 384 (1962).
45. V. Bonavì, R. Guarneri, Там же, **59**, 634 (1962).
46. H. Yamada, K. T. Yasuobi, J. Biol. Chem., **237**, 1511 (1962).
47. B. З. Горкин, в кн. Актуальные вопросы современной биохимии, Медгиз, 1962, т. II, стр. 110. М.
48. F. T. Кеппенеу, J. Biol. Chem., **237**, 1605 (1962).
49. Ю. М. Торчинский, Биохимия, **27**, 916 (1962).
50. S. Ochoa, S. Mii, J. Biol. Chem., **236**, 3303 (1961).
51. F. J. Simonson, Canad. J. Biochem. and Physiol., **38**, 115 (1960).
52. K. J. Isselbacher, M. F. Chrabas, R. C. Quinn, J. Biol. Chem., **237**, 3033 (1962).
53. E. G. Brunngraben, V. Aguilar, J. Neurochem., **9**, 451 (1962).
54. S. E. G. Aqvist, C. B. Anfinsen, J. Biol. Chem., **234**, 1112 (1959).
55. R. Shapira, S. Parker, Biochem. and Biophys. Res. Comm., **3**, 200 (1960).
56. N. K. Boardman, S. M. Partridge, Biochem. et biophys. acta, **59**, 543 (1955).
57. W. Bjork, H. G. Boman, Biochim. et biophys. acta, **34**, 503 (1959).
58. T. Wieland, G. Pfleiderer, Angew. Chem., **74**, 261 (1962).
59. C. L. Markert, F. Miller, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **45**, 753 (1959).
60. E. Heilbronn, Biochim. et biophys. acta, **58**, 222 (1962).
61. H. A. Sober, F. L. Gutter, M. M. Wyckoff, E. A. Peterson, J. Am. Chem. Soc., **78**, 756 (1956).
62. M. Sogami, J. Biochem. (Tokyo), **45**, 367 (1958).
63. M. Sogami, S. Takemoto, M. Kawasaki, Там же, **48**, 464 (1960).
64. С. А. Кибардин, Т. А. Николаева, Лабор. дело, **1963**, № 6, 24.
65. U. S. Seal, R. F. Doe, J. Biol. Chem., **237**, 3136 (1962).
66. A. G. Morell, I. H. Scheinberg, Science, **131**, 930 (1960).
67. L. Bromann, Nature, **182**, 1655 (1958).
68. R. Richterich, A. Temperli, H. Aebl, Biochim. et biophys. acta, **56**, 240 (1962).
69. H. G. Godal, E. F. Luscher, Scand. J. Clin. and Labor. Investig., **12**, 47 (1960).
70. Z. Brada, Dtsch. med. Wochenschr., **44**, 561 (1957).
71. B. Johansson, Nature, **181**, 996 (1958).
72. B. Johansson, Acta chem. scand., **14**, 510 (1960).
73. W. G. Gordon, J. Zeigler, J. J. Basch, Biochim. et biophys. acta, **60**, 410 (1962).
74. G. Bernardi, W. H. Cook, Там же, **44**, 96 (1960).
75. D. I. Millin, M. H. Smith, Там же, **62**, 450 (1962).
76. W. J. Wolf, G. E. Babcock, A. K. Smith, Arch. Biochem. and Biophys., **99**, 265 (1962).
77. J. Birk, A. Gertler, S. Khalef, Biochim. et biophys. acta, **67**, 326 (1963).
78. J. M. Bowness, Arch. Biochem. and Biophys., **91**, 86 (1960).
79. W. Dickinson, Nature, **178**, 994 (1956).
80. C. H. Li, J. Biol. Chem., **229**, 157 (1957).
81. D. N. Word, R. F. McGregor, A. C. Griffin, Biochim. et biophys. acta, **32**, 305 (1959).
82. S. L. Stelman, Там же, **27**, 405 (1958).
83. E. Goldwasser, W. F. White, K. B. Toyolor, Там же, **64**, 487 (1962).
84. H. Smith, J. L. Stanley, J. Gen. Microbiol., **29**, 517 (1962).
85. A. Yoshida, Biochim. et biophys. acta, **71**, 544 (1963).
86. G. Semenza, Arkiv Kemi, **11**, 89 (1957).
87. R. K. Main, L. I. Cole, Arch. Biochem. and Biophys., **68**, 186 (1957).
88. H. M. Klouwen, H. Weissenbach, J. Chromatogr., **7**, 45 (1962).
89. А. С. Спирин, в Сб. Успехи биологической химии, 1962, М., Изд. АН ССР, т. IV, стр. 93.
90. С. Е. Бреслер, Введение в молекулярную биологию, М.—Л., Изд. АН ССР, 1963, стр. 256.
91. G. Bernardi, Biochim. and Biophys. Res. Comm., **6**, 54 (1961).
92. R. K. Main, M. I. Wilkins, L. I. Cole, Science, **129**, 331 (1959).
93. T. A. Hudnik, V. R. Glisin, M. M. Simic, Bull. Inst. Nucl. Sci., **10**, 141 (1960).
94. R. K. Main, L. I. Cole, M. E. Ellis, Nature, **180**, 1285 (1957).
95. G. Bernardi, S. Timasheff, Biochim. Biophys. Res. Comm., **6**, 58 (1961).
96. О. П. Чепинога, С. П. Надеждина, Р. М. Серба, Укр. биох. ж., **35**, 643 (1963).
97. E. S. Canellakis, E. Herbert, Biochim. et biophys. acta, **45**, 133 (1960).
98. G. Hartman, U. Coy, Там же, **47**, 612 (1961).
99. A. D. Vizoso, A. T. Burnes, Biochem. Biophys. Res. Comm., **2**, 102 (1960).
100. F. Brown, J. F. E. Newman, D. L. Stewart, Nature, **197**, 590 (1963).

101. И. Г. Атабеков, Г. А. Карпенко, В. К. Новиков, Биохимия, **28**, 517 (1963).
102. J. Taverne, J. H. Marshall, F. Fulton, J. Gen. Microbiol., **19**, 451 (1958).
103. С. А. Кибардин, В. К. Болдасов, Вопр. мед. химии, **8**, 634 (1962).
104. J. Taverne, R. Wildy, Nature, **184**, 1655 (1959).
105. P. Faulkner, E. M. Martin, S. Sved, T. S. Worgk, Там же, **186**, 908 (1960).
106. С. Я. Гайдамович, Дуан Суан Мноу, Acta Virol., **7**, 377 (1963).
107. G. L. Ada, S. G. Anderson, A. Abbott, J. Gen. Microbiol., **24**, 177 (1961).
108. C. E. Smith, D. Holt, Bull. World Health. Org., **24**, 749 (1961).
109. M. Simon, Acta Virol., **6**, 302 (1962).
110. P. Holopainen, M. Ryhtila, Ann. med. exptl. et biol. fenniae, **40**, 365 (1962).
111. J. H. Venekamp, W. H. M. Mosch, Virology, **19**, 316 (1963).
112. H. G. Klempner, H. G. Pereira, Там же, **9**, 536 (1959).
113. I. B. Robinson, R. I. Douglas, I. Grinjer, E. H. Garrard, Canad. J. Microbiol., **6**, 565 (1960).
114. A. T. H. Burness, A. D. Vizoso, Biochim. et biophys. acta, **49**, 225 (1961).
115. R. Richterich, E. Gautier, H. Stillhart, E. Rossi, Helv. paediatr. acta, **15**, 424 (1960).
116. M. D. Prager, J. C. Atkins, J. Labor. and Clin. Med., **58**, 278 (1961).
117. A. Saha, J. Chromatogr., **7**, 155 (1962).
118. A. Saha, Там же, **7**, 165 (1962).
119. М. Д. Морачевский, В. С. Злобин, Б. В. Птицын, Биохимия, **23**, 564 (1958).
120. С. А. Кибардин, Там же, **28**, 622 (1963).
121. S. M. Krane, M. I. Glimcher, J. Biol. Chem., **237**, 2991 (1962).

Ленинградский институт им. Пастера