

УСПЕХИ ХИМИИ

Т. XXXVIII

1969 г.

Вып. 12

УДК 543.544

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

С. А. Кибардин и В. Б. Лазуркина

Рассматривается современное состояние метода хроматографии в тонких слоях применительно к белкам, нуклеиновым кислотам и их производным. Тонкослойная хроматография — новое методическое направление в хроматографическом анализе, бурно развивающееся за последние годы. В статье отмечается недостаточное развитие метода тонкослойной хроматографии белков по сравнению, например, с тонкослойной хроматографией низкомолекулярных соединений и анализируются причины такого положения. Дано сравнение тонкослойной хроматографии с другими хроматографическими методами, а также критическая оценка работ, опубликованных к настоящему времени по тонкослойной хроматографии биополимеров и их производных. Описаны новые методические направления в тонкослойной хроматографии белков, появившиеся за последнее время.

Библиография — 97 наименований.

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|------|
| I. Введение | 2279 |
| II. Тонкослойная хроматография, ее развитие и сравнение с другими методами хроматографии | 2280 |
| III. Техника тонкослойной хроматографии белков | 2282 |
| IV. Тонкослойная хроматография белков, аминокислот и их производных | 2284 |
| V. Тонкослойная хроматография нуклеиновых кислот и их производных | 2288 |
| VI. Некоторые новые методические направления в тонкослойной хроматографии белков | 2289 |

I. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время хроматографические методы чрезвычайно широко используются в самых различных областях науки и техники. Особенно большое значение эти методы приобрели в биохимии, молекулярной биологии и смежных с ними областях. В последние годы начинает развиваться новое методическое направление — хроматография в тонких слоях.

Тонкослойная хроматография (TCX) оказалась весьма эффективным средством разделения и анализа смесей самых различных соединений. Этот метод представляет интерес для химиков, биологов и медиков, работающих со сложными смесями природных веществ.

Возникнув впервые как метод разделения экстрактов из лекарственных растений¹, TCX в дальнейшем получила значительное развитие. Сейчас ежегодно публикуется по несколько сотен работ в этой области. Следует, однако, отметить, что хроматография в тонких слоях используется пока преимущественно для анализа различных низкомолекулярных соединений. Только за последние годы, в основном начиная с 1962 г., в литературе появляются работы по применению TCX для разделения высокомолекулярных соединений биологического происхождения, таких, как белки и их производные^{2, 3}.

Применение метода хроматографии в тонких слоях к белкам и нуклеиновым кислотам развивается значительно медленнее, чем в случае низкомолекулярных соединений; так, общее число работ, приведенных в библиографии J. of Chromatography за последние два года по ТСХ низкомолекулярных соединений достигает приблизительно 1700. Число же работ, посвященных ТСХ белков, нуклеиновых кислот и их производных, не превышает 80. Такую неравномерность в развитии метода следует отметить особенно по сравнению, например, с колоночной хроматографией белков, которая получила очень широкое развитие и применение. По-видимому, отчасти это объясняется тем, что до последнего времени ТСХ применительно к белкам использовалась главным образом только как метод ориентировочной оценки возможности разделения белковых смесей с тем, чтобы в последующем разделение этих смесей проводить уже в условиях колоночных опытов. При этом, естественно, ТСХ играла подсобную, вспомогательную роль. Как метод препартивного выделения белков ТСХ также не могла конкурировать с колонками.

Сдерживает развитие ТСХ белков, по-видимому, и недостаточная пока теоретическая и техническая разработка этого метода применительно к белкам.

В последние годы, однако, было показано, что ТСХ белков отнюдь не только вспомогательный метод, он может иметь и самостоятельное значение. Например, ТСХ на сефадексах может быть использована для оценки молекулярных весов испытуемых белков. Весьма существенно, что для такого определения нужно всего 0,1—0,2 мг белка⁴. Удалось показать также, что при помощи ТСХ в сыворотке крови человека можно быстро определить присутствие различных групп белков. При этом требуется всего 1—2 мл сыворотки. Метод может иметь, по-видимому, и диагностическое значение^{5, 6}.

Определенный интерес представляют также данные, указывающие на возможность использования метода ТСХ для оценки различных денатурационных изменений в белковых молекулах, вызванных влиянием внешних факторов. Все это показывает перспективность дальнейшего развития ТСХ белков как самостоятельного метода исследования.

Задача настоящей статьи заключается в том, чтобы рассмотреть современное состояние ТСХ белков, нуклеиновых кислот, а также их производных, указать на новые направления в развитии этой области исследования, с учетом, по возможности, всех экспериментальных работ, появившихся за последние годы.

II. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, ЕЕ РАЗВИТИЕ И СРАВНЕНИЕ С ДРУГИМИ МЕТОДАМИ ХРОМАТОГРАФИИ

Первые работы по ТСХ принадлежат отечественным ученым Измайлову и Шрайбер, которые в 1938 г. применили тонкие слои окиси алюминия для разделения алкалоидов лекарственных растений¹.

Однако потребовалось еще более 20 лет, прежде чем метод получил всеобщее признание. С 1958 г., в основном в связи с работами Штадля⁷⁻¹³, начинается новый этап в развитии ТСХ. В этих работах автор использовал хроматографию в тонких слоях для разделения самых разнообразных групп органических соединений с применением различных адсорбентов. Только после этих работ, приблизительно с 1960—1961 гг., начинается быстрый рост публикаций по применению ТСХ для разделения и идентификации различных, главным образом низкомолекулярных, соединений биологического происхождения.

К настоящему времени метод ТСХ был применен практически почти ко всем классам соединений, имеющим биологическое значение.

Исторически хроматография в тонком слое начала развиваться уже после того, как были разработаны и получили широкое признание такие методы, как хроматография белков на колонках и бумажная хроматография аминокислот.

По сравнению с хроматографией на колонках ТСХ имеет свои особенности. Весь процесс проводят в открытом слое, а не в замкнутой колонке. Существенным отличием тонкослойной хроматографии от колончной является также то обстоятельство, что в первом случае слой адсорбента сухой (наиболее часто применяемая — въсходящая хроматография). Следствием этого является непостоянство относительных скоростей перемещения как элюирующего буфера, так и хроматографируемых веществ, и изменение величины R_f в процессе хроматографии на пластинах¹⁴. Эти особенности ТСХ необходимо учитывать при количественной оценке подвижности испытуемых соединений.

При сравнении ТСХ с хроматографией на бумаге следует указать, что в случае бумажной хроматографии результаты опыта очень сильно зависят от свойств и структуры самого бумажного листа; кроме того, хроматография на бумаге требует больше времени по сравнению с ТСХ. Необходимо также отметить, что бумажную хроматографию широко применяют сейчас для разделения низкомолекулярных соединений, таких, как аминокислоты, но этот метод не получил развития для разделения белков.

Метод ТСХ лишен недостатков, присущих бумажной хроматографии. Сочетая высокую чувствительность бумажных хроматограмм и возможность использования очень небольшого количества испытуемого вещества, ТСХ обладает большой разрешающей способностью благодаря возможности применения сверхтонких адсорбентов. ТСХ характеризуется также очень небольшим расширением пятен испытуемого соединения и высокой концентрацией вещества в центре пятна¹⁵. Весь процесс хроматографии требует очень мало времени, а аппаратура и техника ТСХ отличаются крайней простотой и доступностью и могут быть использованы практически в любой лаборатории.

В этом отношении ТСХ выгодно отличается от многих других методов анализа белка, где часто требуется сложная и дорогостоящая аппаратура. Интересно, что вообще успехи хроматографии в целом были достигнуты с применением относительно простых технических средств. В еще большей степени это относится к методу ТСХ, где хорошие результаты достигаются с использованием весьма простой техники¹⁶.

В ряде появившихся в последнее время монографий и обзоров, посвященных ТСХ, довольно широко рассмотрены методические и отчасти теоретические вопросы, связанные с применением этого нового метода^{14, 15, 17–22}, однако до последнего времени ТСХ использовалась преимущественно для разделения различных низкомолекулярных соединений, главным образом биологического происхождения. Чрезвычайно существенным было бы распространение этого метода для анализа и исследования соединений с высоким молекулярным весом, таких, как белки.

Основные принципы, а также технические приемы в ТСХ, в сущности, одинаковы как для белковых веществ, так и для соединений сравнительно низкого молекулярного веса. Существенное различие здесь заключается в том, что для хроматографии белков применяются другие адсорбенты, а также иные элюирующие системы, чем в случае низкомолекулярных соединений. В ряде обзоров и монографий по ТСХ приводятся исчерпывающие сводки используемых в этом методе адсорбентов, а так-

же применяемых элюирирующих систем и буферных растворов^{14-19, 22}, поэтому здесь нет необходимости детально останавливаться на этих вопросах. Следует, однако, отметить, что весь приведенный там материал относится почти исключительно к ТСХ низкомолекулярных соединений.

Ниже излагаются основные технические приемы, используемые в ТСХ белков, нуклеиновых кислот и их производных.

III. ТЕХНИКА ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ БЕЛКОВ

1. Адсорбенты

В отличие от ТСХ низкомолекулярных соединений, где используются такие адсорбенты, как силикагель, кизельгур, окись алюминия и др., для хроматографии белков в тонких слоях применяются различные типы сепадексов (в основном G-75, G-100 и G-200, сверхтонкие), ионообменные целлюлозы (ДЭАЭ- и ТЭАЭ-целлюлоза, эктеола-целлюлоза, фосфоцеллюлоза), а из неорганических адсорбентов преимущественно гидроксилапатит.

2. Нанесение адсорбента на пластинку

Ручной способ: применяются разные приемы: а) поливка суспензией адсорбента пластинки, установленной в горизонтальном положении; б) погружение пластинки в суспензию адсорбента; в) опрыскивание пластинки разбавленной суспензией адсорбента.

Механический способ связан с применением приборов различной конструкции. Наиболее часто употребляется для нанесения тонких слоев прибор, разработанный Шталем^{9, 22}.

3. Способы ТСХ белков

В зависимости от того, в каком направлении поступает элюирирующий раствор на пластинку, различают восходящую и нисходящую хроматографию.

Восходящая хроматография. При восходящей хроматографии растворитель поднимается по пластинке снизу вверх за счет капиллярных сил¹⁴. Камера для восходящей хроматографии представляет собой сосуд, на дно которого наливают элюирирующий раствор так, чтобы поставленная в вертикальном положении пластинка с адсорбентом погружалась в него приблизительно на 5 мм. Сверху камеру плотно закрывают крышкой. Скорость движения элюента по пластинке не является в данном случае постоянной, она зависит от длины пробега растворителя, так как капиллярные силы по мере подъема жидкости уравновешиваются гидростатическим давлением.

Нисходящая хроматография. При нисходящей хроматографии движение элюирирующего раствора вдоль слоя адсорбента происходит за счет гидростатических сил¹⁵. Нисходящая хроматография требует несколько более сложной техники, чем восходящая. В простейшем варианте для нее необходима хроматографическая лодочка (запаянная с двух сторон трубка со щелью). В лодочку наливают элюент и опускают мостик фильтровальной бумаги, который осуществляет контакт между буфером и верхним краем пластинки, поставленной под определенным углом. Нисходящая хроматография характеризуется обычно постоянством линейной скорости движения элюента. Нисходящую хроматографию на сепадексе осуществлял ряд авторов²³⁻²⁵. Для белков применяют нисходящую

дящую проточную хроматографию, основанную на непрерывном поступлении свежего элюирующего буфера на пластинку, который продвигается до конца пластинки и свободно стекает с нее³.

Помимо восходящей и нисходящей хроматографии существуют еще и другие способы хроматографии в тонких слоях: горизонтальная, а также круговая¹⁴. Эти способы пока еще не были использованы в ТСХ белков.

4. Элюирующие системы для хроматографии белков в тонких слоях

Для ТСХ белков наиболее часто используют фосфатные буферные растворы разной концентрации и с различными значениями рН^{3, 9, 23–27}.

В зависимости от того, происходит ли в процессе хроматографии на пластинках изменение концентрации элюирующего буфера, ТСХ можно рассматривать как хроматографию с постоянным или же с переменным составом буфера.

Обычно для разделения белков элюирующий раствор пропускают по пластинке один раз. Однако существуют также способы и многократного хроматографирования с одним и тем же или с разными элюирующими буферами.

Повторное хроматографирование в одной и той же элюирующей системе применяют для большего продвижения веществ, характеризующихся низким значением R_f . Перед повторным хроматографированием пластинку просушивают.

При ступенчатом хроматографировании используют многократное пропускание элюирующего буфера с возрастающей молярной концентрацией.

Градиентная хроматография в тонких слоях. В этом случае элюирование осуществляется в условиях градиента концентрации, т. е. концентрация элюирующего буфера во время хроматографии на пластинках изменяется обычно в сторону повышения.

Детерманн²⁸ разработал прибор для такого градиентного элюирования, пригодный в условиях хроматографии в тонких слоях. Прибор представляет собой стеклянный цилиндр, установленный на магнитной мешалке. На высоте 1 см он делится пористой пластинкой на две части. В нижней части помещается магнитная мешалка. В стенку цилиндра впаяна капиллярная трубка для подачи буфера. На расстоянии 1 см выше пористой пластиинки впаяна трубка для слива избытка жидкости. Пластинку с адсорбентом и с нанесенной на нее пробой помещают на пористую пластинку так, чтобы она погружалась в буфер на 1 см.

5. Обнаружение белковых пятен на пластинках после хроматографии

Если при тонкослойной хроматографии низкомолекулярных соединений для идентификации пятен используют самые разнообразные реакции, в зависимости от вида соединений, то при работе с белками и аминокислотами обнаружение пятен на пластинках производят обычно при помощи опрыскивания нингидрином^{2, 28}. Иногда пластинки покрывают фильтровальной бумагой для получения отпечатков белковых пятен, и затем уже производят окраску бумаги^{3, 23, 29}.

Предложено также использовать флуоресцирующие метки для обнаружения пятен белков на тонких слоях. Для этого испытуемый белок предварительно обрабатывают флуорохромом и за расположением пятен после хроматографии наблюдают по флуоресценции их в ультрафиолете²³.

Можно использовать также флуоресцирующие подложки с нанесенным на них слоем адсорбента³⁰. Иногда флуоресцирующие краски предварительно смешивают с адсорбентом перед нанесением его на пластинку¹⁴. Можно также опрыскивать хроматограмму после разделения смеси испытуемых веществ растворами флуоресцирующих красок²². Во всех этих случаях исследуемые соединения обнаруживаются в виде темных пятен на флуоресцирующем фоне.

Интересный способ идентификации испытуемых веществ предложили Гейнс и Грютцмахер³¹. Эти авторы использовали комбинацию ТСХ и масс-спектрометрии для определения производных аминокислот и некоторых других низкомолекулярных соединений. Содержимое пятен после соксока с хроматограмм непосредственно вводили в масс-спектрометр для измерения.

Количественные методы в ТСХ обычно связаны с вымыванием вещества из пластиинки с последующим определением его концентрации; или же основаны на определении размеров и интенсивности пятен, образованных испытуемыми соединениями на пластиинке с адсорбентом^{14, 15, 22}.

Так, например, количественное определение белковых фракций сыворотки крови после хроматографии на пластиинках с сефадексом (G-100 и G-200 сверхтонкие) продемонстрировано в работе японских авторов⁶.

Следует, однако, отметить, что количественные методы в ТСХ белков применяются пока недостаточно широко по сравнению, например, с определением низкомолекулярных соединений.

IV. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ, АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

1. Тонкослойная хроматография аминокислот и их производных

Для ТСХ аминокислот в качестве адсорбента использовался главным образом силикагель; в меньшей степени применяли ионообменные целлюлозы или порошки целлюлозы.

В одной из первых работ такого рода смесь из 24 аминокислот успешно разделили на пластиинках силикагеля с помощью нескольких систем растворителей³². Наилучшие результаты были получены при использовании смеси *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, а также смеси фенола и воды. Очень хорошие результаты были достигнуты при разделении аминокислот на силикагеле с помощью двухмерной хроматографии в системах растворителей хлороформ — метанол — аммиак в одном направлении и фенол — вода в другом³³. В этой работе удалось разделить 14 различных аминокислот, в то время как в тех же условиях на бумаге выявляют 10 аминокислот. Разделение аминокислот на силикагеле при помощи двухмерной хроматографии проводили также в работах^{34, 35}. На тонких слоях целлюлозы были успешно разделены 15 аминокислот в системах растворителей: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, метанол — вода — пиридин и некоторых других³⁶. Хорошее разделение аминокислот было получено на тонких слоях ионообменной ДЭАЭ-целлюлозы³⁷, а также на целлюлозе при помощи двухмерной хроматографии³⁸. Таким образом, ТСХ аминокислот, особенно с использованием двухмерной хроматографии, оказалась значительно более эффективным (приблизительно в 10 раз³⁰) методом разделения аминокислот, чем хроматография на бумаге.

По-видимому, в ТСХ с успехом можно использовать и метод «отпечатков пальцев» («фингерпринт»). В работе³⁹ ферментативные гидролизаты гамма-глобулина человека, цитохрома из сердца лошади и некоторых других белков были подвергнуты обработке диметиламинонаф-

тилсульфохлоридом (флуорохромом). После удаления избытка реактива продукты гидролиза разделяли двухмерной хроматографией на тонких слоях силикагеля. Показано, что полученные при этом результаты совпадают с данными других методов. При этом количество белка, необходимого для анализа, в 10 раз меньше ($\sim 20 \text{ мкг}$). Исследование пептидных карт с помощью ТСХ проводили также в работах^{40, 41}.

Очень перспективным оказалось применение метода ТСХ для разделения и идентификации динитрофенил- и фенилтиогидантиновых производных аминокислот. В этих случаях наиболее часто используют силикагель. Так, было показано, что почти все динитрофенилпроизводные аминокислот могут быть успешно разделены в тонком слое силикагеля, при помощи как восходящей, так и двухмерной хроматографии в различных системах растворителей^{42–44}.

Тонкослойная хроматография динитрофенилпроизводных аминокислот была использована в работах^{45, 46}, а также Фигге⁴⁷ и Бурги⁴⁸. Эти авторы применили хроматографию в тонких слоях для исследования мочи и других физиологических жидкостей организма.

Для изучения процессов, происходящих в виноградном сусле, была использована ТСХ меченых ^{14}C динитрофенил-аминокислот на тонких слоях силикагеля⁴⁹.

Сочетание ТСХ и количественного ультрамикроанализа аминокислот в виде ^{14}C -метиловых эфиров их динитрофенилпроизводных было удачно использовано недавно в работе⁵⁰.

Интересное применение ТСХ сделано в работе⁵¹, где для идентификации N-концевых аминокислот использованы их сульфонафтилпроизводные. Флуоресцирующие пятна аминокислот можно определить в концентрации 10^{-10} моль/л . В последнее время определение N-концевых аминокислот в виде их динитрофенилпроизводных на тонких слоях силикагеля было осуществлено в работе⁵².

ТСХ была использована также и для разделения фенилтиогидантиновых производных аминокислот. Так, в работе⁴² удалось успешно разделить смеси фенилтиогидантиновых производных 19 аминокислот двухмерной или одномерной хроматографией на слоях силикагеля с помощью различных систем растворителей. В другой работе⁵³ применяли комбинацию ТСХ и электрофореза для разделения смесей фенилтиогидантинов аминокислот также на слоях силикагеля.

В недавно опубликованной работе⁵⁴ была успешно осуществлена ТСХ фенилтиогидантиновых производных аминокислот на силикагеле.

В ряде работ^{55–57} ТСХ фенилтиогидантиновых производных аминокислот была использована для анализа пептидов. Необходимо заметить, что ТСХ динитрофенил- и тиогидантиновых производных аминокислот имеет определенные преимущества перед бумажной хроматографией. Во-первых, при работе в тонких слоях наблюдается значительная экономия времени, затрачиваемого на хроматографию. Во-вторых, отмечается высокая чувствительность ТСХ, приблизительно в 10 раз больше по сравнению с хроматографией на бумаге. В последнее время появились данные⁵⁸, что использование оптимального зернения силикагеля в пределах 2–5 $\mu\text{м}$ и ограничение расстояния пробега растворителя до 4–5 см позволяет резко улучшить (в 5–10 раз по сравнению с обычными методиками) чувствительность ТСХ динитрофенильных и фенилтиогидантиновых производных аминокислот, а также сократить время анализа.

Все это бесспорно свидетельствует о перспективности метода ТСХ для идентификации и анализа аминокислот и их производных, а также для разделения продуктов гидролиза белков и исследования сложных смесей пептидов и полипептидов.

2. Тонкослойная хроматография белков

Для ТСХ белков в настоящее время используют 3 группы адсорбентов. Это сефадексы различных марок, ионообменные целлюлозы, а также гидроксилапатиты. Наибольшее распространение пока получила ТСХ белков на сефадексах.

Первые публикации по ТСХ белков появились в 1962 г. Это работы Иогансона и Римо³ с использованием тонких слоев сефадекса и Гофмана^{2, 59} с применением гидроксилапатита. Иогансон и Римо одни из первых применили сефадексы для разделения ряда белков в тонких слоях^{3, 23}. Эти авторы использовали для тонкослойной гельфильтрации различные типы сефадексов: G-50, G-75, G-100 и G-200. Для белков с относительно небольшими молекулярными весами употребляли сефадексы G-50 и G-75, тогда как для белков с молекулярными весами 100 000 и выше применяли слабо сшитые сефадексы G-100 и G-200. На сефадексе G-25 была оценена подвижность церулоплазмина из человеческой сыворотки в смеси с различными пептидами и аминокислотами. В слоях сефадекса G-25 этот белок легко отделяется от аминокислот, подвижность которых значительно меньше. На пластинах с сефадексом G-75 удалось хорошо разделить смеси белков альбумина из бычьей сыворотки, а также β - и α -лактоглобулинов с молекулярными весами соответственно 69 000, 35 000 и 15 000. Достигнуто также хорошее разделение триптического гидролизата гамма-глобулина из сыворотки человека на пластинах с сефадексом G-75. В этих работах приводится детальное описание условий приготовления слоев сефадекса на пластинах.

Представляет также интерес применение сефадексов в тонких слоях для оценки молекулярного веса различных белков. В работах^{4, 28} показано, что при помощи тонкослойной гельфильтрации можно проводить ориентировочную оценку молекулярного веса испытуемых белков, используя сефадексы G-75 и G-200. Были использованы белки: лизоцим, гемоглобин, гамма-глобулин и др. Это направление получило дальнейшее развитие в работе Детерманна²⁷, который показал, что объем элюирующего буферного раствора находится в линейной зависимости от логарифма молекулярного веса испытуемого белка. Были также оценены молекулярные веса рибонуклеазы, химотрипсина, трипсина, цитохрома С и некоторых других белков. В качестве адсорбента применяли сефадекс G-200, сверхтонкий.

Различные типы сефадексов для тонкослойной гельфильтрации белков и мукополисахаридов были использованы в работе⁶⁰, в которой приводится описание техники приготовления пластинок и приемы идентификации белков на пластинах с сефадексом.

Таким образом, ТСХ белков на сефадексах, по-видимому, может быть с успехом использована в качестве простого приема сравнительной оценки молекулярных весов испытуемых белков. Хотя этот метод дает только ориентировочные величины молекулярных весов, все же, вероятно, в ряде случаев он предпочтительнее (большой выигрыш во времени), чем определение молекулярного веса другими методами, где требуется сложная аппаратура.

В литературе, появившейся за последнее время, ряд работ посвящен разделению белков сыворотки крови при помощи ТСХ. Так, при разделении белков сыворотки крови человека на слоях сефадекса G-75 наблюдается только одна растянутая зона белка, тогда как на сефадексе G-100 сывороточные белки делятся обычно на три фракции²³. Интересно, что колоночная хроматография белков сыворотки на сефадексе также дает три фракции⁶¹. В работе²⁶ показано, что смесь альбумина и гамма-

глобулина сыворотки человека может быть успешно разделена на пластинках с фосфоцеллюзой. При этом оптимальные условия для разделения этих белков достигаются при определенном содержании воды в тонком слое адсорбента, т. е. 70—75 %. Уменьшение или увеличение концентрации воды в пластинках с адсорбентом значительно ухудшает разделение. Эта работа показывает, что для получения оптимальных результатов необходимо контролировать степень влажности адсорбента при ТСХ.

Интересное применение тонкослойной гельфильтрации белков сыворотки крови на сефадексах (G-200, сверхтонкий) найдено Бергстромом⁵. Автор использовал гельфильтрацию для анализа патологических белков сыворотки человека в клинике. Было найдено, что белки нормальной сыворотки человека при разделении на пластинках давали три зоны, соответствующие по константам седиментации 4,5 S, 7,0 S, 19,0 S. При этом содержание этих групп белка в нормальной сыворотке составляло соответственно 69,7; 24,6; 5,7 %, тогда как патологические сывороточные белки давали при гельфильтрации иные процентные соотношения в зависимости от заболевания. Аналогичные результаты по тонкослойной гельфильтрации белков сыворотки крови человека на сефадексах получены и в работе⁶. Здесь были использованы пластинки с сефадексом (G-100 и G-200 сверхтонкий), на которых авторы получили разделение белков нормальной сыворотки на три зоны, соответственно константам седиментации: 4,0 S, 7,0 S и 19,0 S. В работе приводятся также данные по гельфильтрации белков 5 патологических сывороток крови человека.

В работе итальянских авторов⁶² предложено использовать метод ТСХ на сефадексе G-200 для исследования сывороток больных парапroteinиемией.

Приведенные выше данные показывают, что при помощи тонкослойной гельфильтрации на сефадексах за сравнительно короткое время (5—6 часов) можно получить сведения об изменении белкового состава крови, что, безусловно, должно представлять интерес для клиницистов.

Тонкослойная хроматография некоторых индивидуальных белков сыворотки крови (гемоглобин, альбумин и др.) с целью оценки их подвижности на пластинках с сефадексом (G-100 и G-200) была осуществлена в работах^{24, 25}.

В недавно появившейся статье⁶³ авторам удалось с помощью тонкослойной гельфильтрации (сверхтонкий сефадекс G-200) в комбинации с электрофорезом разделить белки нормальной сыворотки крови человека на 10 фракций, тогда как при обычном электрофорезе на бумаге получается только 5 белковых компонентов.

Успешное разделение гемоглобина и миоглобина на сверхтонких слоях сефадекса недавно было продемонстрировано в работах^{64, 65}.

Белки, обладающие ферментативной активностью, также подвергались ТСХ на пластинках. Виланд и др.⁶⁶ использовали в качестве адсорбента ДЭАЭ-сефадекс для разделения молочнокислых дегидрогеназ.

В других работах^{23, 29} хроматографии на различных типах сефадексов подвергали рибонуклеазу, лизоцим, химотрипсин, трипсин, пепсин, щелочную фосфатазу печени и некоторые другие ферментативные белки. В этих работах использовались очищенные препараты индивидуальных белков с целью сравнительной оценки их поведения на пластинках с сефадексом. При этом было показано, что соответствующие сорта сефадекса могут служить подходящим материалом для разделения различных ферментативных белков.

Применение в качестве адсорбента гидроксилапатита для ТСХ ферментов продемонстрировано в работах^{67, 68}, где были использованы трип-

син, полученный из различных источников, рибонуклеаза и некоторые другие ферменты. Показано, что гидроксилапатит в тонких слоях может быть успешно использован для оценки возможности разделения белковых смесей, а также для характеристики однородности и подвижности различных ферментативных белков.

Недавно⁶⁹ ТСХ на эктеола-MN-300 была применена для разделения некоторых коферментов. Приводятся значения R_f для 11 коферментов. Было показано, что часть из них группируется в одном пятне. В работе приведены составы элюирующих смесей, наиболее удобных для четкого разделения индивидуальных коферментов.

V. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Только сравнительно недавно тонкослойную хроматографию начали применять для разделения нуклеиновых оснований, нуклеотидов и нуклеозидов. В качестве адсорбентов для хроматографии в тонких слоях использовались главным образом различные сорта целлюлоз, в меньшей степени применяется силикагель. Другие адсорбенты употребляют для этой цели значительно реже⁷⁰⁻⁷⁴.

Рандерат^{70, 71} первый использовал ТСХ для анализа нуклеиновых оснований нуклеотидов и нуклеозидов. ТСХ этих соединений выгодно отличается от хроматографии их на бумаге. Границы пятен на тонких слоях адсорбента по сравнению с бумажной хроматографией получаются значительно менее размытыми⁷³. Другим преимуществом ТСХ является меньшая затрата времени для разделения испытуемых соединений, чем при хроматографии на бумаге.

Отмечается также высокая чувствительность метода ТСХ⁷⁵. Для разделения и анализа нуклеотидов и нуклеозидов наиболее часто применялась эктеола-целлюлоза. Используя этот адсорбент, удалось получить хорошее разделение 16 нуклеотидов за короткое время от 4 до 60 мин⁷⁶. Эктеола-целлюлозу применяли также в работах^{70, 71, 77, 78}. Недавно эктеола-целлюлоза была применена для ТСХ ДНК⁷⁹.

Ряд работ относится к ТСХ производных нуклеиновых кислот, на ДЭАЭ-целлюлозе⁷⁷⁻⁸¹.

В одной из этих работ⁸¹ предложен метод двумерной ТСХ, с помощью которого можно разделить смесь моно-, ди- и трифосфатов аденоцистозина, цитидина, гуанозина и уридурина.

Тонкие слои ПЭИ-целлюлозы были использованы для восходящей хроматографии дезоксирибоолигонуклеотидов^{82, 83}. Слои MN-300-целлюлозы применяли для разделения нуклеиновых оснований и нуклеозидов в работах^{72, 73, 82}.

Для разделения нуклеотидов методом тонкослойной хроматографии был использован также ДЭАЭ-сепадекс А-25⁸⁴.

Значительно меньше работ опубликовано по применению силикагеля для тонкослойной хроматографии нуклеиновых оснований и производных нуклеиновых кислот^{71, 85}.

Из неорганических адсорбентов для тонкослойной хроматографии производных нуклеиновых кислот применяли также и окись алюминия⁸⁶.

Таким образом, для разделения и анализа нуклеиновых кислот и их производных методом ТСХ пока было использовано сравнительно небольшое число адсорбентов.

Мангольд⁷⁵ отмечает, что хроматография нуклеотидов и нуклеиновых кислот в тонких слоях ионообменных целлюлоз превосходит все примененные до настоящего времени аналитические методы разделения. Осо-

бенно следует указать на значительную экономию времени при использовании этого метода. Высокая емкость ионообменных адсорбентов позволяет работать с микроточествами вещества. Нужно отметить, что ТСХ до настоящего времени применяли в основном для разделения пуриновых и пиридиновых оснований нуклеозидов и мононуклеотидов. Пока неизвестно применение этого метода для анализа продуктов гидролиза нукleinовых кислот.

Если попытаться оценить различные адсорбенты, применяемые в тонкослойной хроматографии, то опубликованные данные показывают, что на слоях эктеола-целлюлозы и других целлюлоз нукleinовые основания лучше отделяются от соответствующих нуклеозидов, чем на силикагеле.

С другой стороны, для разделения самих оснований неорганический адсорбент дает лучшие результаты. При разделении нуклеозидов эти адсорбенты оказываются примерно одинаковыми⁷⁵. Следует, однако, заметить, что, несмотря на свои положительные стороны, ТСХ нуклеотидов и других производных нукleinовых кислот в настоящее время находится в сущности на своей начальной стадии развития и разработана еще очень слабо по сравнению, например, с колоночной хроматографией нукleinовых кислот. До настоящего времени практически почти нет работ по ТСХ самих нукleinовых кислот и продуктов их гидролиза. Отсутствуют также работы по разделению углеводных компонентов нукleinовых кислот методом ТСХ, хотя этот метод, вероятно, мог бы оказаться вполне пригодным для анализа таких соединений.

VI. НЕКОТОРЫЕ НОВЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ НАПРАВЛЕНИЯ В ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ БЕЛКОВ

В последние годы в работах, посвященных ТСХ белков и их производных, были продемонстрированы некоторые новые возможности использования этого метода. Так, в работе⁸⁷ было показано, что в тонких слоях адсорбента можно непосредственно на пластинках проводить оценку ферментативных реакций. Здесь в качестве адсорбента служили слои ПЭИ-целлюлозы.

Как уже отмечалось, ТСХ была с успехом использована также и для анализа «пептидных карт» гидролизатов белков. Возможность разделения продуктов гидролиза белков при помощи ТСХ на силикагеле была показана в работе⁸⁸ на примере миозина и протамина.

Обычно разделение сложной смеси продуктов гидролиза проводят при помощи бумажной хроматографии. Определенные преимущества ТСХ перед хроматографией на бумаге заключаются в значительно большей чувствительности метода⁴¹ (приблизительно в 10 раз).

Весьма перспективной оказалась комбинация метода ТСХ с электрофорезом в тонких слоях^{63, 69–91}.

В одной из этих работ⁸⁹ было показано, что при помощи хроматографии и электрофореза на пластинках с сефадексами (G-100 и G-200 сверхтонкие) можно разделить белки сыворотки крови на 12 компонентов.

При помощи сочетания электрофореза и хроматографии Глезмеру и др.⁹¹ удалось на пластинках с силикагелем разделить смесь продуктов гидролиза гемоглобина на 28 пептидов.

В качестве адсорбентов в работах, сочетающих электрофорез с хроматографией в тонких слоях, были использованы для белков — сефадексы, для разделения пептидов — силикагель.

Таких работ пока очень немного. Между тем, дальнейшее развитие этого направления, вероятно, было бы перспективным. Учитывая техни-

ческую простоту ТСХ, этот метод, по-видимому, можно было бы успешно использовать и в условиях клинических лабораторий^{62, 92}. Работы в этом направлении пока немногочисленны.

Заслуживают внимания также работы, в которых была предложена комбинация метода ТСХ с иммунодиффузией^{93, 94}. В этих работах на примере серологически активных белков была показана возможность тонкослойной иммунохроматографии. В качестве адсорбентов использовались различные сорта ДЭАЭ-сепадексов. Необходимо отметить, однако, что тонкослойная иммунохроматография пока не получила дальнейшего развития. Этот метод по своим возможностям пока, по-видимому, уступает широко известному методу иммуноэлектрофореза по Грабару⁷⁵.

Интересное применение ТСХ в условиях так называемого «барьерного» метода было продемонстрировано в работе⁹⁶. В этом случае на пластинах с целлюлозой может быть достигнуто разделение олигонуклеотидов в зависимости от длины их цепи и состава, а также температуры, при которой проводится хроматография. В работе показана возможность обнаружения при помощи ТСХ специфических молекулярных комплексов, образующихся между исследуемыми поли- и олигонуклеотидами.

В последнее время была также показана возможность при помощи ТСХ оценить различные модификационные и денатурационные изменения, происходящие в белках под воздействием внешних агентов. Иммунные гамма-глобулины человека, обработанные растворами мочевины различной концентрации, уменьшают свою подвижность при хроматографии на пластинах с гидроксилапатитом. При этом уменьшение подвижности белков на пластинах идет параллельно с глубиной денатурирующего воздействия мочевины на молекулу гамма-глобулина. Соответствующим образом изменялась и биологическая активность этих белков. Интересно также, что ренатурация иммунных глобулинов сопровождается также восстановлением их подвижности на пластинах с адсорбентом до нормального уровня⁹⁷.

В другой работе показано, что обработка гамма-глобулина сыворотки человека растворами солей тяжелых металлов приводит к изменению подвижности этого белка при хроматографии в тонких слоях гидроксилапатита по сравнению с контрольными опытами⁶⁸.

Эти работы показывают, что ТСХ, по-видимому, может также служить для оценки таких изменений в белках, которые отражаются на поверхностных и адсорбционных свойствах испытуемых белковых соединений.

* * *

Данные, изложенные выше, с достаточной убедительностью свидетельствуют о распространении метода ТСХ на область белковой химии. В заключение необходимо кратко остановиться на основных моментах, определяющих дальнейшее развитие ТСХ белков.

В настоящее время мы находимся на начальном этапе развития этого метода применительно к белкам и нуклеиновым кислотам. Бесспорные преимущества метода — быстрота, высокая чувствительность, а также возможность использования метода для массовых анализов. Все это делает развитие ТСХ белков весьма перспективным. Очередные задачи, стоящие сейчас в этой области, заключаются в необходимости дальнейшей теоретической и практической разработки метода, отработки техники исследования, подбора новых адсорбентов и расширения спектра испытуемых белков. Чрезвычайно существенно также развитие новых методических направлений в ТСХ белков, особенно на стыках различ-

ных методов; использование их комбинаций, например, тонкослойный электрофорез — хроматография, иммунохроматография в тонких слоях и др. Более широко следует применять ТСХ флуоресцирующих коньюгатов белков и использовать новые методические приемы. Эти новые направления обеспечат окончательное превращение ТСХ из подсобного метода в метод, имеющий самостоятельное значение в исследовании биополимеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. А. Иэмайллов, М. С. Шрайбер, Фармация, 3, 1 (1938).
2. A. F. Hofmann, Biochim. et biophys. acta, **60**, 458 (1962).
3. B. G. Johansson, L. Ryumo, Acta chem. scand., **16**, 2067 (1962).
4. P. Andrews, Biochem. J., **91**, 222 (1964).
5. Bergström, Acta Med. Scand., **179**, Suppl. № 445, 127 (1966).
6. S. Migita, Annual Rept. Inst., Virus Res. Kyoto Univers., 8, 130 (1965); Реферат. ж. Биохимия, 1967, № 3, реф. 77.
7. E. Stahl, Parfum. u. Kosmetik, **39**, 564 (1958).
8. E. Stahl, Arch. Pharmaz., **292**, 411 (1959).
9. E. Stahl, Pharmaz. Rundsch., **1**, 1 (1959).
10. E. Stahl, Arch. Pharmaz., **293**, 531 (1960).
11. E. Stahl, Ztschr. Analyt. Chem., **181**, 303 (1961).
12. E. Stahl, Angew. Chem., **73**, 646 (1961).
13. E. Stahl, U. Kaltenbach, J. Chromatogr., **5**, 458 (1961).
14. Э. Шталь, Хроматография в тонких слоях, «Мир», М., 1965.
15. Б. Г. Беленский, Э. С. Ганкина, в кн. Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров, «Наука», М.—Л., 1966, стр. 273.
16. N. Pelick, H. R. Bolliger, H. K. Mangold, Adv. in Chromatogr., **3**, 85 (1966).
17. K. Randerath, Dünnschicht-Chromatographie, Verlag Chemie, Weinheim, 1962.
18. J. M. Bobbitt, Thin-Layer Chromatography, Reinhold, N. Y., 1963.
19. E. V. Truter, Thin Film Chromatography, Cleaver-Hume Press, London, 1963.
20. L. Labler, V. Z. Schwarz, Thin-Layer Chromatography, Prague, 1965.
21. T. Wieland, H. Determann, J. Chromatogr., **28**, 2 (1967).
22. А. А. Ахрем, А. И. Кузнецова, Тонкослойная хроматография, Наука, М., 1964, стр. 91.
23. G. Johansson, L. Ryumo, Acta chem. scand., **18**, 217 (1964).
24. P. Fasella, A. Giartosio, C. Turano, Thin-Layer Chromatography. Elsevier Publishing Company, Amsterdam—London,—N.-Y., 1964, стр. 205.
25. C. I. O. R. Morris, J. Chromatogr., **16**, 167 (1964).
26. E. Simonianova, M. Rybak, Biochim. et biophys. acta, **93**, 194 (1964).
27. H. Determann, W. Michel, Ztschr. Analyt. Chem., **212**, 211 (1965).
28. H. Determann, Experientia, **18**, 389 (1962).
29. C. I. O. R. Morris, Biochem. J., **92**, № 1, 6 (1964).
30. И. А. Вайнтрауб, Авт. свид. СССР, 176590 (28. XII. 1965).
31. K. Heyns, H. F. Grutzmacher, Angew. Chem., **74**, 387 (1962).
32. M. Brenner, A. Niederwieser, Experientia, **16**, 378 (1960).
33. A. R. Fahmy, A. Niederwieser, G. Pataki, M. Brenner, Helv. chim. acta, **44**, 2022 (1961).
34. E. Nürnberg, Arch. Pharmaz., **292**, 610 (1959).
35. E. Mutschler, H. Rochelmeier, Там же, **292**, 449 (1959).
36. P. Wollenweber, J. Chromatogr., **9**, 369 (1962).
37. P. de la Zlosa, C. Tertrin, H. Jutisz, Там же, **14**, 136 (1964).
38. E. von Arx, R. Meher, Там же, **12**, 329 (1963).
39. G. Schmer, G. Kreil, Там же, **28**, 458 (1967).
40. T. Willand, D. Georgopoulos, Biochem. Ztschr., **340**, 476 (1964).
41. G. Pataki, J. Chromatogr., **16**, 541 (1964).
42. M. Brenner, A. Niederwieser, G. Pataki, Experientia, **17**, 145 (1961).
43. M. Brenner, A. Niederwieser, Там же, **17**, 237 (1961).
44. D. Walz, A. R. Fahmy, G. Pataki, A. Niederwieser, B. Brenner, Там же, **19**, 213 (1963).
45. G. Pataki, M. Keller, Ztschr. Klin. Chim., **1**, 158 (1963).
46. G. Pataki, M. Keller, Helv. chim. acta, **47**, 787 (1964).
47. K. Figge, Clin. chim. Acta, **12**, 605 (1965).
48. W. Burgi, I. P. Colombo, R. Richterich, Klin. Wochenschr., **43**, 1202 (1965).
49. F. Drawert, O. Bachmann, K. H. Reuther, J. Chromatogr., **9**, 376 (1962).
50. K. Heyns, R. Hauber, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem., **348**, 357 (1967).

51. Z. Deyl, I. Rosmus, J. Chromatogr., **20**, 514 (1965).
 52. I. M. Dellacha, A. V. Fontanive, Experientia, **21**, 351 (1965).
 53. C. G. Honegger, Helv. chim. acta, **44**, 173 (1961).
 54. J. O. Jeppsson, I. Sjöquist, Analyt. Biochem. J., **18**, 264 (1967).
 55. E. Cherbilez, Br. Bachler, J. Rabinowitz, Helv. chim. acta, **18**, 1871 (1960).
 56. G. Pataki, Там же, **47**, 1763 (1964).
 57. G. Pataki, J. Chromatogr., **21**, 133 (1966).
 58. Б. Г. Беленький, Э. С. Ганкина, С. Н. Прянишникова, Д. П. Эрастов, Молекулярная биология, **1**, 184 (1967).
 59. A. F. Hofmann, в кн. New Biochem. Separations, Ed. A. T. James a. L. J. Morris. D. Van Nostrand Company, London, 1964, стр. 117.
 60. G. P. Roberts, J. Chromatogr., **22**, 90 (1966).
 61. P. Flodin, J. Killander, Biochim. et biophys. acta, **63**, 403, (1962).
 62. A. Agostini, C. Vergani, E. Cirila, Farmaco Ed. prat., **21**, 508 (1966).
 63. C. Vergani, R. Stabilini, A. Agostini, J. Chromatogr., **28**, 135 (1967).
 64. Z. Stránský, M. Šrčí, Там же, **28**, 146 (1967).
 65. M. Šrčí, Z. Stránský, Soudní lékar, **12**, 17 (1967).
 66. T. Willand, H. Determann, Experientia, **18**, 432 (1962).
 67. С. А. Кибардин, В. Б. Лазуркина, Биохимия, **30**, 559 (1965).
 68. В. Б. Лазуркина, С. А. Кибардин, Укр. биохим. ж., **38**, 212 (1966).
 69. V. Amozmino, E. Cingolani, Ann. Ist. supersanita, **2**, 545 (1966).
 70. K. Randerath, Angew. Chem., **73**, 436 (1962).
 71. K. Randerath, Там же, **73**, 674 (1961).
 72. K. Randerath, H. Stuck, J. Chromatogr., **6**, 365 (1961).
 73. K. Randerath, Biochem. Biophys. Res. Commun., **6**, 452 (1961/62).
 74. Э. В. Дятловицкая, В. В. Воронова, Л. Д. Бергельсон, ДАН, **145**, 325 (1962).
 75. Х. Мангольд, в кн. Хроматография в тонких слоях, под ред. Э. Штадля. М., 1965, стр. 436.
 76. Н. С. Пантелеева, Вестник ЛГУ, **1964**, № 9, 73.
 77. K. Randerath, Angew. Chem., **74**, 484 (1962).
 78. Е. Р. Давидова, В. В. Рачинский, Усп. хим. **34**, 253 (1965).
 79. R. D. Baugé, K. D. Martin, J. Chromatogr., **16**, 519 (1964).
 80. K. Randerath, Nature, **194**, 768 (1962).
 81. R. G. Stickland, Analyt. Biochem., **10**, 108 (1965).
 82. G. Weimann, K. Randerath, Experientia, **19**, 49 (1963).
 83. K. Randerath, E. Randerath, J. Chromatogr., **22**, 110 (1966).
 84. Hashizuma, Agric. a Biol. Chem., **27**, 881 (1963).
 85. R. L. Scheig, R. Appunziata, Le Roy A. Pesch, Analyt. Biochem., **5**, 291 (1963).
 86. Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский, В. Н. Шибаев, Изв. АН СССР, сер. хим., **1962**, 1035.
 87. K. Randerath, E. Randerath, Angew. Chem., **76**, 494 (1964).
 88. W. I. Ritschard, J. Chromatogr., **6**, 327 (1964).
 89. B. G. Johansson, L. Rymo, Biochem. J., **92**, № 1, 5p. (1964).
 90. L. A. Hanson, B. G. Johansson, L. Rymo, Clin. Clin. Acta, **14**, 391 (1966).
 91. R. Glaesmer, K. Ruckpaul, W. Jung, Ztschr. Med. Lab. Techn., **6**, 175 (1965).
 92. P. Audrin, F. C. Foussard, Ch. Baurgoine, L. Jung, P. Morand, Rev. franc. etudes clin. et biol., **8**, 507 (1963).
 93. P. R. Carnegie, G. Pacheco, Biochem. J., **92**, № 1, 7p., (1964).
 94. P. R. Carnegie, G. Pacheco, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **117**, 137 (1964).
 95. П. Грабар, П. Буртэн, Иммуноэлектрофоретический анализ. Применение для исследования биологических жидкостей человека, ИЛ, М., 1963.
 96. K. Randerath, G. Weimann, Biochim. et biophys. acta, **76**, 129 (1963).
 97. С. А. Кибардин, В. Б. Лазуркина, Автореф. и краткие сообщения итоговой конференции ин-та им. Пастера, Ленинград, 1968.

Институт эпидемиологии
и микробиологии им. Пастера,
Ленинград