

УДК 543.544; 543.866

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ФЕРМЕНТОВ

И. А. Черкасов

Рассмотрены основные предпосылки и области применения нового метода хроматографии ферментов — так называемой «аффинной» хроматографии. Метод основан на том, что в качестве сорбента используется нерастворимый лиганд фермента (субстрат, ингибитор, кофактор и др.), то есть сорбция происходит за счет специфических сил сродства, лежащих в основе биологической функции фермента. Использование сорбентов на основе таких лигандов позволяет по сравнению с обычными типами сорбентов, например ионообменными смолами, более избирательно и эффективно выделять чистые ферменты из различных источников. Дополнительно в обзоре рассмотрены некоторые другие методические приемы, использующие специфическое сродство фермента к лиганду в хроматографии ферментов. Метод аффинной хроматографии может быть применен также для фракционирования продуктов химической модификации ферментов и для изучения физико-химических свойств фермент-лигандных комплексов.

Библиография — 144 наименования.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1911
II. Общие вопросы аффинной сорбции	1912
III. Использование сродства фермента к лиганду в препаративных целях	1916
IV. Аналитическое применение аффинной хроматографии	1927
V. Хроматографическая характеристика физико-химических свойств комплекса фермент — лиганд	1929

I. ВВЕДЕНИЕ

В периодической литературе, особенно за последние годы, появилось большое количество работ, посвященных использованию принципа избирательного связывания ферментов с лигандами (субстратами, ингибиторами, коферментами и др.) для очистки ферментов с помощью адсорбционных, главным образом хроматографических методов. Поскольку образование комплекса фермента с лигандом происходит за счет так называемых сил сродства, этот метод получил название «аффинной» хроматографии (от латинского корня «affinis» — родственный, имеющий сродство), т. е. хроматографического разделения ферментов по сродству к субстрату.

Сама по себе тенденция к изысканию селективных сорбентов для ферментов вполне понятна, так как обычные типы хроматографии, например ионообменная или гель-хроматография, лишены специфичности относительно природы ферментов; очистка ферментов с помощью этих методов представляет собой многостадийную процедуру и обычно дает невысокий выход чистого продукта. В то же время аффинная хроматография, как правило, позволяет извлекать ферменты из сложных смесей в одну стадию, с высокой степенью очистки и с выходом, близким к количественному.

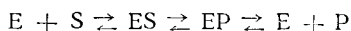
Кроме того аффинная хроматография является одним из наиболее прямых и в то же время простых методов изучения комплексообразования фермента с лигандом, благодаря чему она может быть использована

для детального выяснения физико-химического аспекта ферментативного катализа.

Настоящий обзор представляет собой попытку суммировать и систематизировать работы в этой области и оценить возможности данного метода.

II. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ АФФИННОЙ СОРБЦИИ

Согласно современным представлениям, ферментативная реакция в общем виде описывается уравнением:



где E, S и P — молекулы фермента, субстрата и продукта реакции соответственно. Как видно из этого уравнения, элементарный акт ферментативной реакции в простейшем случае протекает с образованием двух комплексов — фермент-субстрат и фермент-продукт.

Первая стадия ферментативной реакции — образование фермент-субстратного комплекса — осуществляется за счет сил специфического взаимодействия между молекулами фермента и субстрата, называемого фермент-субстратным сродством. Немногочисленные пока данные о структурах ферментов и фермент-субстратных комплексов¹⁻⁴ показывают, что при связывании фермента и субстрата между ними возникает ряд лековалентных связей различных типов (водородные связи, полярные и неполярные взаимодействия и др.). Такой многосторонний контакт между молекулами фермента и субстрата, приводящий к высокой избирательности взаимодействия, обеспечивается определенным пространственным расположением функциональных групп фермента, обусловленным его уникальной структурой. В данном случае принято говорить о комплементарности молекулярных структур фермента и субстрата.

Комплекс фермент-продукт образуется в результате химического превращения субстрата. Поскольку в ходе этого превращения субстрат остается связанным на поверхности молекулы фермента, очевидно, что комплекс фермент — продукт стабилизируется, в общем, теми же силами (или частью тех же взаимодействий), которые участвуют в стабилизации фермент-субстратного комплекса.

Помимо комплексов с субстратом и продуктом реакции многие ферменты в силу своей функциональной специфики образуют весьма прочные комплексы с иными типами лигандов. Сюда относятся коферменты, аллостерические активаторы, ингибиторы и др.

В том случае, если лиганд находится в твердой, нерастворимой фазе, он может быть использован как специфический сорбент соответствующего фермента. Как и всякий сорбент, используемый в хроматографии, аффинный сорбент должен обладать достаточно развитой поверхностью, относительной механической прочностью, отсутствием склонности к плотному слипанию или, наоборот, к образованию коллоидных растворов. Находясь в хроматографической колонке, такой сорбент должен обеспечивать практически приемлемую скорость потока элюента.

Если природный лиганд удовлетворяет указанным требованиям, он может быть непосредственно использован в качестве сорбента. Однако число таких сорбентов невелико и ограничивается некоторыми биополимерами, в основном, субстратами пищеварительных ферментов (крахмал, эластин, целлюлоза и др.). В большинстве же случаев лиганды представляют собой растворимые вещества и переводятся в нерастворимое состояние искусственным путем. Здесь возможны следующие варианты: а) лиганд химически модифицируют, вводя в него гидрофобные

группы, придающие ему нерастворимость; б) лиганд переводят в нерастворимое состояние путем включения в нерастворимый полимер, проводя для этого полимеризацию в растворе, содержащем лиганд; в) лиганд фиксируют (ковалентно или нековалентно) на нерастворимом носителе. Чаще всего используется вариант с ковалентной фиксацией лиганда.

Главное требование, предъявляемое к аффинному сорбенту, — это специфичность сорбции. В принципе, аффинный сорбент должен содержать лишь такие функциональные группы, которые обеспечивают избирательное связывание одного определенного фермента при отсутствии сорбции посторонних веществ. В том случае, если используется природный лиганд, дело сводится к проверке его гомогенности и нативности, т. е. отсутствия в нем неспецифических для данного лиганда функциональных групп, которые могут появиться в нем в результате побочных химических превращений, например, при очистке или при хранении.

Получение синтетического сорбента требует правильного выбора лиганда, носителя и способа присоединения лиганда к носителю. Что касается лиганда, то специфичность и прочность его связывания с ферментом может быть предварительно оценена различными методами, например кинетическими.

Для того чтобы лиганд, который эффективно связывается с ферментом в растворе, сохранял эту способность, будучи присоединенным к носителю, необходимо чтобы это присоединение осуществлялось за счет групп, не участвующих во взаимодействии с ферментом. Точные сведения в этом отношении могут быть получены методом рентгеноструктурного анализа соответствующих фермент-лигандных комплексов. Эти сведения имеют большое значение для практики аффинной сорбции, поскольку создают основу для наиболее полной реализации сил родства и помогают избежать эмпирического поиска при получении сорбента. Следует, однако, отметить, что сведения подобного рода пока что весьма ограничены¹⁻⁴.

При присоединении лиганда к носителю необходимо также следить, чтобы его функциональные группы, ответственные за комплексообразование, оставались не только свободными, но и доступными для связывания с ферментом, находящимся в растворе. Здесь речь идет о возможных стерических препятствиях при подходе молекулы фермента к активной поверхности сорбента. В частности, такие препятствия могут возникнуть, если место присоединения лиганда к носителю находится в непосредственной близости от его функциональных групп, участвующих в связывании с ферментом. В таких случаях нецелесообразно присоединять лиганд к носителю посредством промежуточных реагентов с подходящей длиной молекулярной цепи, выполняющих роль своеобразных «вставок», удаляющих активные группировки лиганда от поверхности сорбента.

При выборе носителя нужно учитывать, чтобы он не оказывал существенного влияния на специфичность сорбента, т. е. не содержал бы функциональных групп, которые могли бы обусловить сорбцию посторонних веществ. То обстоятельство, что лиганд связывается с ферментом, как правило, несколькими нековалентными связями уже до некоторой степени гарантирует минимальное связывание примесей таким сорбентом, в котором лиганд присоединен к достаточно нейтральному носителю. К числу носителей такого типа можно отнести, например, молекулярные сита (Сефадекс, Биогель и т. п.), сам принцип действия которых рассчитан на отсутствие неспецифической сорбции белков. Кроме того, выбор нейтрального носителя позволяет не только устранить сорбцию примесей, но и избежать возможного неспецифического связывания самого

фермента. На практике специфичность и эффективность синтетических и природных сорбентов в каждом случае необходимо проверять опытным путем.

Следующий вопрос касается условий проведения сорбции и десорбции фермента. Как уже указано выше, образование комплекса фермента с лигандом обеспечивается определенной пространственной структурой (конформацией) белковой молекулы фермента, которая может меняться при изменении условий среды. В связи с этим оценить заранее оптимальные условия сорбции и десорбции весьма трудно. Исходя из общих соображений, можно ожидать, что оптимум сорбции фермента на аффинном сорбенте будет близок к оптимуму его каталитической активности, а то или иное отклонение от этих условий будет приводить к ослаблению прочности комплекса фермент — лиганд и десорбции фермента.

Если для связывания фермента с лигандом существенное значение имеют электростатические взаимодействия между ионогенными группами их молекул, то прочность такого комплекса будет изменяться с изменением рН среды и падать с ростом ионной силы. Прочность комплексов, стабилизированных водородными связями, по-видимому, является обратной функцией температуры. Кроме того, прочность таких комплексов будет уменьшаться в присутствии реагентов, склонных к образованию водородных связей (например, мочевины, гуанидина и т. п.). Аналогичный подход, очевидно, применим и к комплексам, стабилизированным «гидрофобными» контактами. Таким образом, один из путей десорбции состоит в ослаблении отдельных типов связей между ферментом и лигандом в комплексе. При наличии связей различных типов для распада комплекса потребуется комбинированное воздействие различных факторов; следует учесть, что при этом условия десорбции могут оказаться весьма жесткими и вести к денатурации фермента.

Другой путь десорбции, более свойственный именно для фермент-лигандных комплексов, состоит в том, чтобы, изменяя условия среды (рН, ионную силу, температуру и др.), ослаблять суммарное сродство фермента к лиганду, например, обратимо изменять конформацию фермента из комплементарной в некомплементарную. Поскольку конформация белковой молекулы фермента, как правило, чувствительна к условиям среды, а ее изменения носят кооперативный характер, эти обратимые конформационные изменения могут происходить в весьма мягких условиях, сохраняющих нативную структуру фермента. Помимо этого сорбированный фермент может быть конкурентно десорбирован под действием свободного лиганда, присутствующего в растворе.

Следует отметить, что изучение влияния каждого из условий среды в отдельности на связывание фермента с лигандом может в некоторых случаях привести к определенным отклонениям от указанных общих правил сорбции и десорбции. В принципе, для достижения оптимальных результатов в опытах по выделению и очистке ферментов такое исследование следует предварительно проводить для каждого отдельного фермента. Оптимизация условий среды в данном случае может обеспечить не только эффективную сорбцию и десорбцию самого фермента, но и способствовать устранению возможных примесей.

Еще один вопрос, который следует рассмотреть, касается устойчивости сорбента. Сюда относится, во-первых, устойчивость по отношению к условиям среды; во-вторых, устойчивость к действию фермента. Первым обстоятельством, как правило, можно пренебречь, поскольку выбор условий среды определяется в первую очередь стабильностью самих ферментов; оно может быть принято во внимание лишь на стадии подготовки сорбента к работе или на стадии его регенерации, которые, в случае

необходимости, можно проводить в более жестких условиях, чем сорбция и десорбция*.

Что касается устойчивости сорбента по отношению к ферменту, то здесь следует учитывать возможность его химических превращений под действием фермента в тех случаях, когда берется сорбент на основе субстрата. Очевидно, что по мере увеличения продолжительности контакта такого сорбента с ферментом, емкость и специфичность первого могут заметно снизиться, хотя это обстоятельство не является общим для всех фермент-субстратных систем. В частности, не исключено, что в определенных условиях среды фермент полностью сохраняет сродство к субстрату, однако не обладает при этом каталитической активностью. Вообще же предпочтение следует отдать таким сорбентам, в которых в качестве лиганда используется не субстрат, а конкурентный ингибитор, образующий с ферментом так называемый «непродуктивный» (то есть не подвергающийся химическим превращениям) комплекс.

Устойчивость к действию фермента имеет значение не только для сохранения сорбционных свойств сорбента, но и для выбора способа сорбции. Способ может быть статическим («резервуарным») или динамическим (хроматография). Если используется сорбент на основе субстрата, то сорбция фермента может сопровождаться химическим превращением субстрата с освобождением в окружающий раствор продуктов реакции. Поскольку продукты реакции также обладают сродством к ферменту и образуют с ним относительно прочные комплексы, это может приводить к конкурентному ингибированию связывания фермента с сорбентом и удерживанию части фермента в растворе. В тех случаях, когда субстрат превращается довольно интенсивно, а способ сорбции статический, ингибирующее влияние растворимых продуктов реакции на сорбцию фермента может оказаться весьма значительным. В то же время, в динамических условиях образующиеся продукты постоянно удаляются потоком элюента, протекающего через слой сорбента, и гораздо меньше влияют на сорбцию фермента. В связи с этим, статический способ можно применять лишь в случае сорбентов, устойчивых к действию фермента, либо следует проводить сорбцию в тех условиях, в которых фермент каталитически неактивен; в остальных случаях целесообразно использовать динамический способ.

Рассмотренные выше условия получения и применения сорбентов на основе лигандов относятся, в общем, и к сорбентам на основе ферментов (которые иногда называют «ферментативными смолами»). Сорбенты на основе ферментов могут быть использованы для выделения и очистки соответствующих лигандов, а также для изучения связывания лиганда с ферментом (хотя сорбенты на основе лигандов в последнем случае представляются более приемлемыми). Относительная структурная лабильность ферментов требует при получении и применении этих сорбентов соблюдать условия, исключающие необратимую денатурацию ферментов.

В следующем разделе рассмотрены работы, касающиеся использования сродства фермента к лиганду, главным образом, в препаративных целях, и данные о приготовлении сорбентов. В основу систематизации излагаемого ниже материала положены различия в выборе системы «сорбент — сорбат», что представлялось наиболее целесообразным, исходя из рассмотренных общих представлений об аффинной сорбции.

* Автор в цикле работы сорбента различает подготовку сорбента к работе, сорбцию, десорбцию фермента и регенерацию сорбента. (Прим. ред.).

III. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СРОДСТВА ФЕРМЕНТА К ЛИГАНДУ В ПРЕПАРАТИВНЫХ ЦЕЛЯХ

1. Природные сорбенты ферментов

Впервые сорбцию фермента на нерастворимом субстрате обнаружил в 1910 г. Штаркенштейн⁵, она относилась к сорбции амилазы печени на картофельном крахмале. Позднее подобные данные описали Амбар⁶ — для амилазы слюны, Шода и Филна⁷ — для «диаастазы» солода и Бёкестейн⁸ — для амилазы поджелудочной железы; в последней работе в качестве сорбентов были испытаны крахмал картофеля, риса и пшеницы.

Впоследствии сорбцию на крахмале широко применяли для выделения и очистки амилаз из различных источников^{9–20}. Оказалось, что крахмал является избирательным сорбентом α -амилазы и не сорбирует β -амилазу. Так, Холмберг^{9, 10} нашел, что α -амилаза солода может быть отделена от β -амилазы путем сорбции на крахмале из 50%-ного этилового спирта в присутствии мальтозы; по данным Холмберга, сорбируемость α -амилазы увеличивалась с ростом концентрации спирта и с понижением pH и температуры. Как известно, α -амилаза является эндогликозидазой, т. е. расщепляет внутрицепные гликозидные связи в крахмале, в отличие от β -амилазы, отщепляющей остатки мальтозы с невосстанавливающего конца углеводной цепи. В связи с этим, мальтоза как продукт действия β -амилазы, возможно, являлась ингибитором ее связывания с крахмалом.

Швиммер и Боллз¹⁴, исследуя сорбируемость α -амилазы солода на различных образцах крахмала и гликогена («животном крахмале»), установили, что наиболее эффективным сорбентом является крахмал, свежееосажденный спиртом; однако наиболее высокой была сорбируемость α -амилазы на гликогене. Учитывая это, Швиммер и Боллз¹⁴ пришли к выводу, что эффективность сорбции α -амилазы определяется площадью поверхности сорбента, образованной мальтозидными цепями длиной порядка 8–10 звеньев и доступной для фермента в растворе.

Для очистки α -амилазы солода Швиммер и Боллз¹⁵ применяли хроматографию на колонке с пшеничным крахмалом. Сорбцию проводили при 5° в присутствии 40%-ного этилового спирта и солей кальция; десорбировали фермент водой, насыщенной сульфатом кальция, при комнатной температуре. Из полученного элюата α -амилазу удалось выделить в кристаллическом состоянии.

Тэйер¹⁷ разделил α - и β -амилазы *Pseudomonas saccharophila* хроматографией на колонке со смесью картофельного крахмала и целита. При пропускании культуральной жидкости через промытую водой колонку при 4° сорбировалась лишь α -амилаза. Буферные растворы с различным значением pH, различным содержанием солей кальция и мальтозы не элюировали сорбированного фермента. Элюирование достигалось при промывании колонки градиентом растворимого крахмала и было очень эффективным: фермент выходил острым пиком (в 3 мл элюата содержалось 75% от общего количества сорбированного фермента) и концентрировался в 100 раз по сравнению с исходным раствором. Интересно отметить, что обе амилазы имели одинаковый pH-оптимум активности, однако резко различались по способности сорбироваться на крахмале¹⁷.

Марковитц и сотр.¹⁸ воспроизвели методику Тэйера¹⁷ и получили высокоочищенный кристаллический препарат α -амилазы *P. saccharophila*. Вариант этой же методики использовали Нейман и сотр.²⁰ для выделения амилазы из печени собаки; фермент удавалось очистить в 23–147 раз с выходом 45–75%.

Относительно недавно появилось сообщение Вайнера и Шульмана²¹ о возможности применения крахмала для выделения амилазы в прикладных целях.

Лелуар и сотр.²² обнаружили, что нерастворимый крахмал может быть использован также как сорбент для очистки крахмалсинтетазы бобов. Аказава и Мурата²³ и Танака и Аказава²⁴ показали, что крахмалсинтетаза более предпочтительно связывается с линейным полисахаридом, амилозой, нежели с разветвленной цепью амилопектина; максимальная сорбция крахмалсинтетазы на амилозе происходила при нейтральных значениях pH и низкой температуре, но резко падала при понижении pH (до pH 5,0) и повышении температуры (свыше 25°).

Де ла Хаба²⁵ применил сорбцию на крахмале для очистки гликогенфосфорилазы мышцы кролика. При пропускании цельного экстракта мышцы через колонку с картофельным крахмалом при 3° фермент полностью связывался с сорбентом; десорбция достигалась промыванием колонки растворимым субстратом (0,4%-ным раствором гликогена) при одновременном повышении температуры до 14°. Таким путем фермент был очищен в 33 раза с выходом 100%; удельная активность полученного препарата соответствовала активности дважды перекристаллизованного фермента. Хаба²⁵ отмечает, что поведение гликогенфосфорилаз *a* и *b* в испытанных условиях было одинаковым.

Ханабуса и Коно²⁶ описали вариант метода Хаба²⁵, в котором десорбция фермента достигалась за счет только одного повышения температуры колонки; авторы находят данный вариант более удобным, так как при этом получается фермент без примеси гликогена, и дальнейшей очистки не требуется.

Селинджер и Шрамм²⁷ изучали связывание гликогенфосфорилазы с гликогеном. Было найдено, что фосфорилаза *a* при pH 6,8 и температуре ~0° образует с гликогеном нерастворимый фермент-субстратный комплекс (осаждалось до 62% фермента). С декстраном, маннаном и леваном подобный комплекс не образовывался, что указывало на специфичность связывания фосфорилазы *a* с гликогеном. При изменении pH до 5,0 или до 9,0 комплекс сохранял устойчивость, но при pH 4,0 распадался с потерей активности фермента. Рост температуры способствовал диссоциации комплекса. Интересно, что добавление к нерастворимому комплексу α -амилазы даже при 0° приводило к его полному распаду за несколько минут. По мнению авторов²⁷, это означает, что фосфорилаза *a* дает нерастворимый комплекс только с нативным гликогеном, но не дает его с продуктами амилолиза гликогена, среди которых присутствуют устойчивые к действию амилазы высокомолекулярные макродекстрины²⁸. Фосфорилаза *b* в сравнимых условиях осаждалась лишь в присутствии солей магния²⁷. (Это обстоятельство, по-видимому, может быть использовано для разделения фосфорилаз *a* и *b*.)

Лелуар и Голдемберг^{29,30} использовали избирательное соосаждение гликогенсинтетазы с гликогеном для очистки этого фермента из различных источников. Гликогенсинтетаза печени крысы была очищена таким путем в 300 раз и содержала в качестве примесей лишь небольшие количества гликогенфосфорилазы и амилазы; выход фермента, однако, был невысок и составлял 12%²⁹.

Лойтер и Шрамм³¹ обнаружили способность гликогена связывать α -амилазу и использовали это свойство для выделения и очистки данного фермента. Максимальное соосаждение α -амилазы с гликогеном происходило при pH 8,0; температуре 0—3° и добавлении этилового спирта до концентрации 40%. Впоследствии Шрамм и сотр.³² нашли, что не только гликоген, но и макродекстрины, являющиеся продуктами амилолиза

гликогена и устойчивые к дальнейшему действию амилазы²⁸, также способны образовывать нерастворимый комплекс с амилазой. Интересно, что ионы кальция, требующиеся для проявления ферментативной активности α -амилазы, были необходимы и для ее связывания с гликогеном и макродекстрином. Так, если ионы кальция удалялись из раствора этилендиаминтетраацетатом, нерастворимый комплекс не образовывался. Подобным же активирующим действием обладали ионы стронция и бария; у ионов кадмия и магния эта способность отсутствовала. Шрамм и сотр.³² предположили, что ионы кальция требуются либо для поддержания активной конформации фермента, либо непосредственно участвуют в связывании субстрата.

Приведенные данные по связыванию ферментов, активных в отношении α -1 \rightarrow 4-глюкозидной связи (т. е. расщепляющих или синтезирующих эту связь), с различными α -1 \rightarrow 4-полиглюкозидами показывают, что это связывание, с одной стороны, является весьма избирательным. Например, крахмал хорошо сорбирует α -амилазу, но не сорбирует β -амилазу; определенной избирательностью в отношении природы полисахарида обладает крахмалсинтетаза, связывающаяся с амилозой, но не связывающаяся с амилопектином. С другой стороны, эта избирательность не является абсолютной. Так, крахмал помимо α -амилазы эффективно сорбирует крахмалсинтетазу и гликогенфосфорилазу; подобно этому, гликоген («животный крахмал») кроме гликогенфосфорилазы связывает также гликогенсинтетазу и α -амилазу.

Можно было бы ожидать, что все ферменты, действующие на α -1 \rightarrow 4-полиглюкозиды, в силу близости химической природы субстрата, будут обладать и сходными функциональными свойствами в отношении связывания с субстратом. В какой-то степени это, по-видимому, имеет место, хотя в ряде случаев проявляется свойственная ферментам избирательность, относящаяся к особенностям пространственного строения молекул субстрата, а возможно, и к надмолекулярным структурным факторам. Кроме того, условия среды, в которых происходит оптимальное связывание, оказываются различными для различных ферментов, что, очевидно, связано с индивидуальными особенностями строения их белковых молекул. Это обстоятельство, по-видимому, и дает возможность выделять в чистом виде какой-либо один фермент без примесей (или с минимальными примесями) других, родственных ферментов.

Природные сорбенты применяли для выделения и очистки ряда других ферментов. Женио³³⁻³⁵ выделял хитиназу стрептомицетов почвы путем избирательной сорбции на хитине из цельной культуральной жидкости. После того как происходило связывание хитиназы, хитин с сорбированным на нем ферментом извлекали и промывали. Десорбцию фермента не проводили; вместо этого хитин подвергали полному гидролизу хитиназой и растворимые продукты гидролиза удаляли диализом. Таким путем хитиназа была очищена в 70 раз с выходом 27%. В полученном препарате отсутствовали протеазы, целлюлазы, пигменты и восстанавливающие сахара, а белковые примеси, не обладающие хитинолитической активностью, составляли менее 5%.

В работе Гранта и Робинса³⁶, посвященной очистке эластазы из поджелудочной железы свиньи, найдено, что не только активный фермент, но и зимоген, проэластаза, с одинаковой эффективностью связываются с эластином; это наблюдение позволило авторам сделать весьма важный вывод о функциональной автономности центра связывания субстрата и собственно каталитического центра в молекуле эластазы. Гертлер и Берк³⁷ использовали способность проэластазы сорбироваться на эластине для ее очистки.

Орехович и сотр.³⁸ изучали связывание некоторых протеаз (пепсина, трипсина, химотрипсина и папаина) с измельченной шерстью овец и фиброином шелка. Опыты проводили при двух значениях pH: 3,9 и 7,9. В этих условиях пепсин и папаин не связывались ни с шерстью, ни с шелком. Трипсин и химотрипсин довольно хорошо связывались как с тем, так и с другим сорбентом при обоих значениях pH (количество связанного трипсина доходило до 83%, а химотрипсина — до 75%). Десорбция трипсина достигалась раствором цистеина в присутствии мочевины, а химотрипсина — раствором гистидина в присутствии хлористого натрия. Вероятно, что различия в поведении изученных протеаз отражают различия в специфичности этих ферментов.

Огава и Тойяма³⁹, применяя хроматографию на колонке с порошкообразной целлюлозой, разделили коммерческий препарат целлюлазы *Trichoderma viride* на три активных компонента, — за счет различий в их родстве к субстрату.

Риз и Авигад⁴⁰ описали способ очистки левансахаразы, основанный на избирательном соосаждении фермента с леваном. Фермент был очищен более, чем в 2000 раз с выходом 31%. Соосаждения других ферментов (целлюлазы, β -галактозидазы, α -амилазы, галактозооксидазы и рибонуклеазы) при этом не происходило, что подтверждает специфичность связывания левансахаразы с леваном. Подобную методику применили Бауер и Авигад⁴¹ для очистки фруктангидролазы.

Черкасов и сотр.^{42–44} изучили условия образования и распада фермент-субстратного комплекса лизоцима с хитином методом хроматографии фермента на колонке с субстратом. При этом было обнаружено существование двух типов комплексов, зависящих от pH среды. Один из комплексов преобладает в слабо кислой среде; он устойчив лишь в присутствии солей в растворе и распадается в бессолевой среде. Другой комплекс, преобладающий в слабо щелочной среде, устойчив в отсутствие солей и распадается при подкислении раствора. На основании этого было предложено два варианта выделения лизоцима из различных природных источников:

а) сорбция при pH ~ 5 в солевом растворе с последующей десорбцией водой и б) сорбция при pH 8–9 с последующей промывкой колонки водой и десорбцией разбавленной уксусной кислотой. Хитин, получаемый по известным методикам, обычно содержит свободные аминогруппы за счет его частичного деацетилирования в ходе очистки. Наличие аминогрупп придает такому хитину свойства анионообменника и приводит к неспецифической сорбции белков кислого характера (типа альбуминов), десорбирующихся уксусной кислотой. В связи с этим при использовании обычного хитина приемлем только первый вариант^{45, 46}. Обработка обычного хитина разбавленной азотистой кислотой, при которой происходит замена аминогрупп на нейтральные гидроксильные группы, устраняет неспецифическую сорбцию и позволяет реализовать второй вариант, имеющий то преимущество, что при pH 8–9 лизоцим не оказывает на хитин гидролитического действия, а образующийся комплекс более прочен^{47, 48}. Описанным методом лизоцим был выделен из белка куриных яиц и водных экстрактов хрена и репы с практически количественным выходом^{45–48}. Хроматографию на хитине также успешно применили Йенсен и сотр.^{49, 50} для очистки фагового лизоцима. Авторы отмечают, что данный метод позволяет концентрировать исчезающе малые количества фермента и одновременно освобождать его от ингибиторов, мешающих определению активности в неочищенном фаголизате. Так, выход лизоцима при его выделении данным методом

составил 300%, судя по балансу активности, что можно объяснить не иначе, как освобождением фермента от ингибиторов⁵⁰.

Среди рассмотренных выше работ не везде была использована типично адсорбционная методика. Так, например, при связывании ферментов с гликогеном исходные компоненты находились в растворе и лишь при взаимодействии давали осадок; то же самое относится к левансахаразе и левану. Однако рассмотрение этих работ представлялось целесообразным, учитывая, с одной стороны, их некоторую методическую близость к варианту статической адсорбции, с другой стороны, — принципиальную возможность использования полученных результатов по условиям связывания фермента и субстрата в опытах с синтетическими адсорбентами.

2. Синтетические адсорбенты ферментов

Эрлангер⁵¹ изучил возможность выделения и очистки химотрипсина путем связывания его с дипептидным ингибитором, переведенным в водонерастворимое состояние: бензиловым эфиром N-карбобензоксид-*L*-лейцил-*D*-фенилаланина (БЭКЛФ). Нерастворимость достигалась за счет введения в молекулу дипептида гидрофобных групп: бензильной (по карбоксильной группе фенилаланина) и бензилоксикарбонильной (по аминогруппе лейцина). Учитывая субстратную специфичность химотрипсина (химотрипсин гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами ароматических аминокислот), можно было ожидать, что БЭКЛФ будет адсорбировать химотрипсин из раствора. Действительно, Эрлангер обнаружил, что химотрипсин, а также химотрипсиноген и пепсин количественно связываются с БЭКЛФ; трипсин и трипсиноген также связывались, но менее эффективно. Другие испытанные белки (рибонуклеаза, сывороточные альбумины человека и быка, β-лактоглобулин) связывались в незначительных количествах. Примерно одинаковую способность химотрипсина и пепсина к связыванию с БЭКЛФ, по мнению Эрлангера, следовало ожидать ввиду близости их субстратной специфичности. Однако адсорбцию трипсина (и трипсиногена) вряд ли можно объяснить специфическим взаимодействием, учитывая, что его действие направлено на гидролиз пептидных связей, образованных карбоксильными группами диаминокарбоновых кислот (аргинина и лизина). «Гидрофобные» лиганды того типа, который использовал Эрлангер, как сорбенты не получили широкого распространения.

Большее практическое значение для сорбции и хроматографии ферментов приобрели сорбенты, в которых лиганд ковалентно связан с нерастворимым носителем. Впервые такие сорбенты получил и применил для выделения тирозиназы грибов Лерман⁵². В качестве лигандов были выбраны некоторые азофенолы, известные как ингибиторы тирозиназы. Эти азофенолы присоединялись эфирной связью к целлюлозе. Способностью избирательно сорбировать тирозиназу обладали лишь сорбенты, лиганды которых содержали на свободном конце пара-оксифенильную группу, то есть ту самую группу, которая присутствует в субстрате тирозиназы — тирозине:

- 1) целлюлоза $\text{—O—C}_6\text{H}_3(\text{OH})\text{—N=N—C}_6\text{H}_4\text{—C}_6\text{H}_4\text{—N=N—C}_6\text{H}_4\text{—OH}$
- 2) целлюлоза $\text{—O—C}_6\text{H}_3(\text{OH})\text{—N=N—C}_6\text{H}_4\text{—N=N—C}_6\text{H}_4\text{—OH}$
- 3) целлюлоза $\text{—O—CH}_2\text{—C}_6\text{H}_4\text{—N=N—C}_6\text{H}_4\text{—OH}$

Наиболее эффективным оказался сорбент 3), который был применен для хроматографического выделения тирозиназы. Фермент удалось очистить в 61 раз с выходом 56%.

Арсенис и Маккормик⁵³ очищали флавокиназу печени крысы хроматографией на флавинзамещенной целлюлозе. В качестве лигандов были испытаны 6-амино-9-(1-*D*-рибитил)изоаллоксазин, являющийся субстратом флавокиназы, и 7-амино-6,9-диметилизоаллоксазин — ее конкурентный ингибитор. При реакции этих аминов с хлоркабонилметилцеллюлозой (хлорангидридом карбоксиметилцеллюлозы) получались соответствующие ацетамидные производные. Оба адсорбента оказались эффективными для получения высокоочищенных препаратов флавокиназы.

В другой работе Арсениса и Маккормика⁵⁴ изучалась возможность очистки апоферментов некоторых оксидоредуктаз, имеющих в качестве кофермента флавинмоноклеотид (рибофлавинфосфат). В основу работы было положено наблюдение, что не только флавинмоноклеотид, но и его монометиловый эфир может активно функционировать как кофермент НАДФ·Н₂-цитохром-*C*-редуктазы, пиридоксин- или пиридоксаминфосфатоксидазы и гликолатоксидазы. Учитывая это, авторы получили эфиры флавинмоноклеотида с целлюлозой, фосфоцеллюлозой и диэтиламиноэтилцеллюлозой и испытали их в качестве адсорбентов. Оказалось, что при хроматографии на колонке указанных апоферментов на флавинзамещенных целлюлозах наблюдается более сильное удерживание их по сравнению с контрольными образцами целлюлоз, обусловленное, по-видимому, дополнительным взаимодействием апофермента с коферментом. Практически полное отделение апофермента от примесей наблюдалось для апогликолатоксидазы; ее удалось очистить более, чем в 400 раз, с количественным выходом⁵⁴.

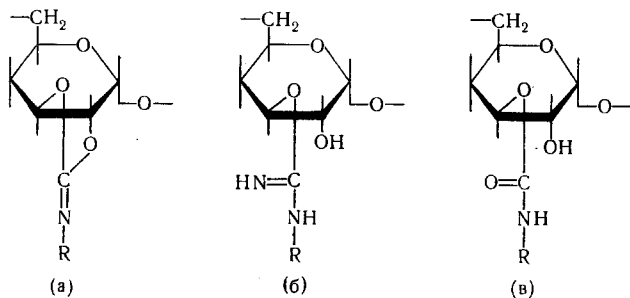
Лоу и Дин⁵⁵ применили для очистки оксидоредуктаз адсорбенты на основе других коферментов — никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ), фиксированных на целлюлозе. Эти адсорбенты оказались пригодными для выделения глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы и треониндегидрогеназы, причем одной стадии хроматографии достаточно для разделения этих ферментов.

Мосолов и Лушникова⁵⁶ описали метод очистки некоторых пептидогидролаз, основанный на их избирательном связывании с природными ингибиторами белкового происхождения, фиксированными на целлюлозе. Для получения адсорбентов ингибиторы вводили в реакцию азосочетания с пара-дiazобензоилцеллюлозой (данный способ предполагает наличие в белковых ингибиторах ароматических групп, не существенных для их функционирования). Таким путем были получены адсорбенты на основе ингибитора трипсина из бобов сои и ингибитора протеаз из клубней картофеля. Адсорбент на основе ингибитора трипсина избирательно и полностью связывал трипсин из раствора при 0—3°, рН 7,7 ($1/15$ *M* фосфатный буфер); десорбцию проводили разбавленной соляной кислотой при рН 2,3, при котором фермент-ингибиторный комплекс полностью диссоциирован, а сам фермент максимально стабилен и не подвергается автолизу. Другие испытанные белки (сывороточный альбумин быка, яичный альбумин, рибонуклеаза) связывались в незначительной степени, что указывало на специфичность адсорбента. Об эффективности этого адсорбента для очистки трипсина говорит тот факт, что удельная активность кристаллического препарата трипсина после адсорбции и десорбции возрастала в 1,5—2 раза, причем полученный препарат был полностью свободен от продуктов автолиза. Сорбент на основе ингибитора протеаз из клубней картофеля был исполь-

зован⁵⁶ для очистки суммарного препарата протеаз из *Actinomyces fra-diae*. После сорбции и десорбции протеолитическая активность препарата возрастала также в 1,5—2 раза; однако раствор сохранял значительный процент активности, так как не все фракции данного препарата обладали достаточно высоким средством к ингибитору.

Наибольшее распространение в последнее время получил способ приготовления сорбентов, предложенный Поратом и сотр.⁵⁷⁻⁶⁰. Метод состоит в ковалентном присоединении лиганда * к нерастворимому полисахаридному носителю с помощью галоидцианов, например бромциана, и включает две стадии: а) обработка полисахарида водным раствором галоидциана в щелочной среде с образованием промежуточного реакционноспособного соединения и б) сочетание этого промежуточного соединения с лигандом в нейтральной или слабо щелочной среде. В качестве носителей могут быть использованы крахмал, целлюлоза, а также фирменные продукты «Сефадекс» (сшитый декстран) и «Сефароза» (сшитая агароза), — применяемые обычно как молекулярные сита. Лучшим носителем, по мнению Пората и сотр., является Сефароза, образующая в водных растворах зерна очень пористого геля, так что не только поверхность, но и внутренний объем зерен оказываются доступными для молекул ферментов; благодаря этому на основе Сефарозы можно получать адсорбенты с высокой емкостью.

Необходимым условием метода Пората и сотр. является наличие в лиганде свободной и несущественной для связывания с ферментом первичной (алифатической или ароматической) аминогруппы, по которой происходит его присоединение к носителю; если эти группы отсутствуют, их вводят специально. Механизм реакции галоидциана с полисахаридом и последующей реакции присоединения первичного амина к активированному полисахариду до конца не выяснен. Показано лишь, что при реакции галоидциана с полисахаридом образуется продукт, содержащий введенный азот, но не содержащий галогена; при реакции же этого промежуточного продукта с амином выделяется аммиак. Порат⁵⁹ предполагает, что при этом могут образовываться следующие структуры:



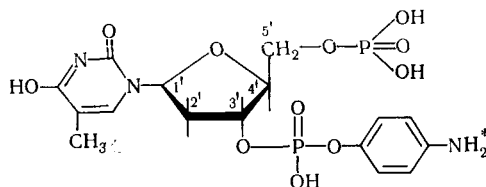
Адсорбенты, полученные по способу Пората с сотр., вполне устойчивы в области pH от 2 до 12, охватывающей область стабильности практически всех ферментов. В 0,1 N соляной кислоте за 4 дня от носителя отщепляется всего 1,81% присоединенных групп лиганда, хотя

* Метод используется для присоединения к сорбенту не только лиганда, но и фермента. Он используется, в частности, для аффинной хроматографии ингибиторов, транспортных РНК и пр. — см. 4th International Fermentation Symposium, March 1972, Kyoto, Japan, Abstracts p. 64—65. Прим. ред.

в 0,1 *N* растворе едкого натра за то же время успевает отщепиться 42,7% этих групп; в последнем случае потери происходят, вероятно, за счет разрушения самого носителя⁶⁰.

В целом, метод Пората и сотр., несмотря на некоторые ограничения, обеспечивает возможность достаточно широкого выбора и варьирования исходных веществ при сочетании лиганда с носителем и в этом смысле может рассматриваться как один из наиболее универсальных способов получения аффинных сорбентов. Ниже будет рассмотрено получение и применение сорбентов по методу Пората и сотр.⁵⁷⁻⁶⁰.

Катреказас и сотр.⁶¹ впервые получили этим методом сорбенты ферментов: нуклеазы *Staphylococcus aureus*, α -химотрипсина и карбоксипептидазы А. Субстратом нуклеазы является тимидин-3',5'-ди-(*p*-нитрофенил)фосфат. Нуклеаза легко отщепляет от него *p*-нитрофенилфосфат из положения 5', но слабо действует на эту же группу в положении 3'. Соединения же со свободной (не этерифицированной) фосфатной группой в положении 5' являются мощными ингибиторами нуклеазы. С учетом этих данных в качестве лиганда для присоединения к Сефарозе был выбран 3'-(*p*-аминофенилфосфорил)-дезокситимидин-5'-фосфат:



Константа ингибирования для этого вещества, определенная из кинетических данных, была весьма низкой (10^{-6} *M*), что обеспечивало прочность связывания нуклеазы; само вещество было стабильным в области pH от 5 до 10; *pK* аминогруппы было достаточно низким для эффективного взаимодействия с Сефарозой, активированной бромцианом, а сама аминогруппа достаточно удалена от той части молекулы лиганда, которая связывается с ферментом*. Хроматографией на колонке с полученным сорбентом удалось в одну стадию и с количественным выходом выделить нуклеазу из цельной культуральной жидкости. Сорбцию проводили при pH 8,0 (0,05 *M* боратный буфер с добавкой 0,01 *M* хлористого кальция) и после промывания колонки тем же буферным раствором фермент десорбировали 0,01 *M* уксусной кислотой.

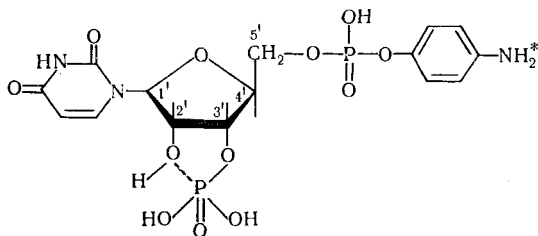
Для приготовления сорбента, специфичного к химотрипсину⁶¹, в качестве лиганда был выбран энантиомерный аналог субстрата — метиловый эфир *D*-триптофана. Однако полученный сорбент оказался недостаточно удовлетворительным, по-видимому, из-за малых размеров лиганда и связанных с этим стерических препятствий при подходе фермента к активной поверхности сорбента. Учитывая это был испытан другой лиганд — метиловый эфир ϵ -аминокапроилтриптофана. В этом лиганде остаток триптофана, связывающийся с химотрипсином, значительно удален от места присоединения к Сефарозе, в связи с чем он более доступен для фермента в растворе. Полученный сорбент оказался весьма эффективным как для очистки самого химотрипсина, так и для удаления примесей этого фермента из препаратов других ферментов, в частности, рибонуклеазы. Сорбцию проводили в 0,5 *M* *трис*-HCl буфере при pH 8,0, а десорбцию — 0,1 *M* уксусной кислотой. Выход чистого

* Здесь и далее индекс * обозначает группу, присоединяемую к носителю.

фермента составлял более 90%. Константа диссоциации комплекса химо tripsина с этим лигандом составляет $\sim 10^{-4}$ М, т. е. на два порядка больше той же величины для фермент-ингибиторного комплекса нуклеазы. Тем не менее, и в данном случае адсорбируемость фермента была достаточно полной и прочной. Таким образом, требование очень высокой прочности фермент-лигандного комплекса не является строго обязательным.

При получении сорбента карбоксипептидазы А в качестве лиганда был использован дипептид *L*-тирозил-*D*-триптофан⁶¹. Сорбция проводилась в 0,05 М *трис*-HCl буфере, pH 8,0, с добавкой хлористого натрия до 0,3 М (очевидно, для устранения неспецифической сорбции примесей свободными карбоксильными группами остатков триптофана). Десорбировали фермент 0,1 М уксусной кислотой. Сорбция карбоксипептидазы А (в пределах рабочей емкости сорбента) и ее десорбция проходили количественно. Специфичность сорбента была доказана отсутствием связывания карбоксипептидазы В в тех же условиях.

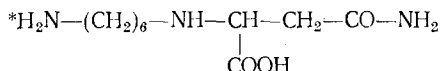
Уилчек и Горецки⁶² описали получение и применение сорбента рибонуклеазы. Субстратом рибонуклеазы является рибонуклеиновая кислота и циклические пиримидин-2':3'-фосфаты; такие соединения, как цитидин-2'-монофосфат, цитидин-3'-монофосфат и уридин-2'-монофосфат известны как конкурентные ингибиторы фермента. Однако попытка присоединить цитидин-2'-монофосфат к Сефарозе по методу Пората и сотр. оказалась неудачной, по-видимому, из-за низкой нуклеофильности аминогруппы в положении 4. В связи с этим был испытан другой класс ингибиторов-2'(3'), 5'-дифосфаты: во-первых, для их ингибирующего действия важна только 2'(3')-фосфатная группа, а группа в положении 5' могла быть модифицирована; во-вторых, ингибиторы этого типа были наиболее мощными из известных (константа ингибирования, определенная из кинетических данных, составляет приблизительно 10^{-5} М). Учитывая это, в качестве лиганда был выбран 5'-(*p*-аминофенилфосфорил)-уридин-2'(3')-фосфат:



Полученный сорбент прочно удерживал рибонуклеазу в 0,02 М ацетатном буфере, pH 5,2; десорбцию фермента проводили 0,2 М уксусной кислотой (рис. 1). С помощью этого сорбента оказалось возможным очищать рибонуклеазу от различных примесей, в том числе от фосфатов различной природы, а также избирательно удалять примеси рибонуклеазы из других препаратов. Авторы подчеркивают важность разработанного ими метода для фракционирования и очистки синтетических препаратов рибонуклеазы⁶².

Порат и сотр.⁶³ синтезировали сорбент аспарагиназы. Субстратом аспарагиназы является *L*-аспарагин, в то время как энантиомерная форма, *D*-аспарагин, ингибирует фермент. Учитывая это, в качестве лиганда был взят продукт конденсации амида *L*(+)-β-хлорантарной кис-

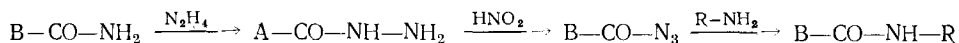
лоты с гексаметилендиаминном:



Последний играл роль «вставки» между функциональными группами лиганда и Сефарозой для устранения стерических препятствий при сорбции фермента. Оптимальная сорбция происходила в 0,05 М боратном буфере при pH 8,6, с добавкой хлористого натрия до 0,3 М; при более высокой ионной силе фермент слабее связывался с сорбентом, а снижение ионной силы приводило к увеличению сорбции примесей. Фермент десорбировали 0,001 М раствором *D*-аспарагина в том же буфере. Удельная активность полученного препарата аспарагиназы превосходила активность препаратов, полученных другими методами. Устойчивость сорбента к действию фермента была вполне удовлетворительной.

Сорбенты, полученные по методу Пората и сотр.⁵⁷⁻⁶⁰, успешно применяли для выделения и очистки ряда других ферментов: химотрипсиноподобных ферментов⁶⁴, плазминогена⁶⁵, протеаз пшеницы⁶⁶, папаина^{67, 68}, β-галактозидазы⁶⁹, β-ксилозидазы⁷⁰, ДНК-полимеразы⁷¹, 3-дезоксид-*D*-арабиногептулозонат-7-фосфатсинтетазы⁷², лецитинхолестеринацилтрансферазы⁷³, ацетилхолинэстеразы^{74, 75} и хоризматмутазы⁷⁶. Каше⁷⁷ и Фейнштейн⁷⁸ получили этим методом сорбент на основе ингибитора трипсина из бобов сои и показали, что он связывает не только трипсин, но и химотрипсин (ср.⁵⁶).

Инман и Динчис⁷⁹ описали способ получения аффинных сорбентов на основе Биогеля (сшитого полиакриламида), — используемого так же, как и Сефароза, в качестве молекулярного сита. Способ состоит в том, что карбоксамидная группа Биогеля действием гидразингидрата переводится в гидразидную, которая при последующей обработке азотистой кислотой переходит в ацилазидную; последняя легко реагирует с первичными алифатическими и ароматическими аминами с образованием амидов:



Таким образом, способ Инмана и Динчиса, как и способ Пората с сотр., требует присутствия в лиганде свободной и несущественной для связывания с ферментом аминоксигруппы; отличие состоит в том, что полиакриламид имеет углеродный скелет и в этом отношении более химически устойчив, чем Сефароза или Сефадекс.

Развивая методы Пората и сотр. и Инмана и Динчиса, Катрекас⁸⁰⁻⁸² описал синтезы различных производных Сефарозы и Биогеля, позволяющих присоединять к ним лиганды не только по аминоксигруппе, но и по карбоксильной, сульфгидрильной, фенольной и имидазольной

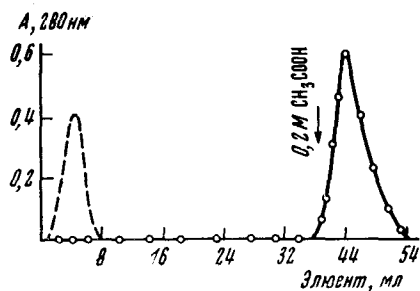
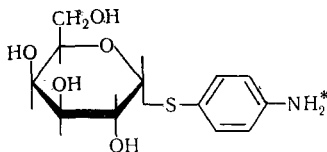
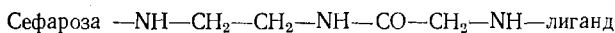


Рис. 1. Аффинная хроматография рибонуклеазы А (по⁶²). Пунктиром обозначено место выхода рибонуклеазы, инактивированной окислением и восстановлением, а также ферментов с иной субстратной специфичностью (трипсина и химотрипсина). Стрелкой указана смена элюента. Детали в тексте

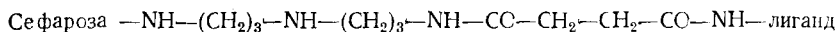
группам, а также варьировать при этом расстояние между лигандом и носителем путем введения между ними алифатических цепочек с различным количеством атомов («вставок»). Как упоминалось выше, длина «вставки» в некоторых случаях имеет решающее значение, например, при синтезе адсорбента химотрипсина⁶¹. Другой пример, описанный Катреказасом^{69, 80}, относится к бактериальной β -галактозидазе. В качестве исходного лиганда был взят *p*-аминофенил- β -D-тиогаляктопиранозид:



Если этот лиганд непосредственно присоединялся к Сефарозе, сорбции фермента не происходило. При сочетании этого лиганда с бромацетамидоэтилпроизводным Сефарозы получался сорбент, который лишь слабо удерживал галактозидазу:



На сорбенте с более длинной «вставкой»:



фермент сорбировался очень прочно.

Сравнивая сорбенты на основе одних и тех же лигандов, но с разными носителями, Катреказас показал (на примере сорбентов нуклеазы⁸⁰ и β -галактозидазы⁶⁹), что на основе Биогеля получают менее емкие адсорбенты, чем на основе Сефарозы, что объясняется, по-видимому, меньшей пористостью Биогеля.

3. Другие способы использования средства фермента к лиганду в хроматографии ферментов

Кавалиери и Кэрролл⁸³ показали, что полимеризуя акриламид в растворе, содержащем ДНК, можно получить гель, прочно удерживающий включенную ДНК и пригодный для выделения и очистки ДНК-полимеразы.

Другой способ применения лигандов состоит в том, что неспецифический сорбент насыщают растворимым лигандом; например, лиганды, содержащие основные или кислые группы, фиксируют на подходящих ионообменниках. Такой способ описал Беерс⁸⁴ и применил его для очистки полинуклеотидфосфорилазы на колонке с полиадениловой кислотой, фиксированной на ДЭАЭ-целлюлозе. Свойства таких сорбентов почти не изучены и неясно, всегда ли у сорбированных на носителе молекул лиганда будет сохраняться способность к избирательному связыванию фермента. Учитывая данные Катреказаса^{61, 69, 80} о роли «вставки» между лигандом и носителем, можно думать, что эта способность будет в значительной степени ослаблена. Кроме того очевидно, что сорбенты такого типа менее стабильны, чем сорбенты с ковалентно связанным лигандом.

Еще одно использование средства фермента к лиганду в хроматографии ферментов состоит в избирательном элюировании фермента,

сорбированного на неспецифическом сорбенте, растворимым лигандом. Как впервые показал Хеппель⁸⁵, пироглутамат, сорбированный на алюмогеле, избирательно и эффективно элюируется раствором пироглутамата. Впоследствии этот принцип применили для очистки фруктозо-1,6-дифосфатазы^{86–88}, альдолазы^{87, 89}, малатдегидрогеназы⁹⁰, нуклеазы⁹¹ и пируваткиназы⁹². Иосида⁹³ выделял этим методом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, псевдохоллинэстеразу, лактатдегидрогеназу и аламиндегидрогеназу. При хроматографии карбоксипептидазы А на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой в присутствии конкурентного ингибитора — β -фенилпропионата — она разделилась на пять фракций, отличающихся аминокислотным составом и термостабильностью⁹⁴.

IV. АНАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Интересный аналитический аспект применения аффинной хроматографии описан Уилчек и сотр.⁹⁵ и относится к исследованию активных центров ферментов методом направленной химической модификации. Направленность реакции в область активного центра (точнее, в область связывания лиганда) достигается тем, что в качестве реагента берется лиганд, несущий химически реакционноспособную группу. Благодаря этому данный реагент вступает в реакцию с теми группами фермента, которые находятся в области связывания лиганда. Пептиды, полученные при последующем расщеплении модифицированного фермента, фракционируют на колонке с нативным ферментом, фиксированным на нерастворимом носителе*. При этом из всех пептидов на колонке задерживаются лишь те, которые содержат модифицированные аминокислотные остатки, — за счет наличия в них группы лиганда. Анализируя эти пептиды, можно локализовать область активного центра в аминокислотной последовательности молекулы фермента. В упомянутой работе Уилчека и сотр.⁹⁵ рибонуклеазу вводили в реакцию азосочетания с диазотированным ингибитором — 5'-(*p*-аминофенилфосфорил), уридин-2'(3)'-фосфатом. Это соединение реагировало с рибонуклеазой в молярном отношении 1 : 1. После расщепления модифицированного фермента трипсином смесь пептидов фракционировали на колонке с нативной рибонуклеазой, фиксированной на Сефарозе по методу Пората и сотр.^{57–60}. Хроматографию проводили при pH 5,0, оптимальном для связывания фермента с лигандом⁶². Окрашенный продукт прочно удерживался на колонке и после отмывки примесей десорбировался 0,8 М раствором гидроксида аммония. Анализ показал, что этот продукт представляет собой один пептид, включающий аминокислотные остатки с 67 до 85 и содержащий модифицированный остаток тирозина. Авторы отмечают быстроту и удобство примененного метода по сравнению с методами ионообменной хроматографии и электрофореза.

Этот же способ, получивший название «аффинной метки», применили Уилчек⁹⁷ и Катреказас⁹⁸ для выделения модифицированного пептида нуклеазы стафилококков. Аффинной метке подвергались также ацетилхолинэстераза⁹⁹, аспаратаминотрансфераза¹⁰⁰, лизоцим¹⁰¹ и β -галактозидаза¹⁰².

Кравченко с сотр.^{103, 104} применили аффинную хроматографию для разделения продуктов фотоокисления лизоцима, проводимого в присутствии метиленовой сини в условиях преимущественного окисления ос-

* Сорбентам, содержащим фиксированные на нерастворимых носителях ферменты, посвящена обширная литература. Методы их получения и различные аспекты применения описаны в обзорах Силмана и Качальского⁹⁶, Гришкевича¹⁴¹ и Гольдмана¹⁴².

татков триптофана. Хроматографией на ионообменной смоле Амберлит CG-50 удавалось лишь отделить суммарный продукт фотоокисления от неизмененного нативного фермента (рис. 2). Учитывая, что модификация остатков триптофана в лизоциме могла отразиться на его сродстве к субстрату¹⁻⁴, был применен метод хроматографии лизоцима на хитине^{42, 43}. Результаты хроматографии показаны на рис. 3¹⁰³. На хроматограмме явно видны три пика, X, Y и Z, причем пик Z выходит почти с

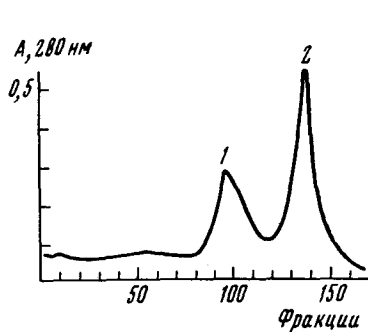


Рис. 2. Хроматография фотоокисленного лизоцима на катионите Амберлит CG-50 (по¹⁰³). Колонка $2,7 \times 28,8$ см; $0,2$ М натрий-фосфатный буфер, pH 6,72. Скорость элюирования 35 мл/час. 1 — смесь продуктов фотоокисления; 2 — нативный лизоцим. Фракции по 10 мл

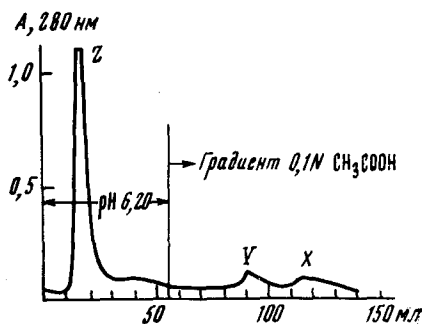


Рис. 3. Хроматография смеси продуктов фотоокисления лизоцима (пик 1 на рис. 2) на хитине (по¹⁰³). Колонка $0,9 \times 22,5$ см с хитином дисперсностью 50 мк. Начальные условия: $1/15$ М натрий-фосфатный буфер, pH 6,20. Объем смесителя при градиенте — 200 мл. Скорость элюирования 15 мл/час.

фронтом элюента. Поскольку пики, выходящие с фронтом, могут иметь сложный состав, пик Z был подвергнут дальнейшему анализу. При ре-хроматографии этого пика в условиях, повышающих сродство лизоцима к хитину (повышенная ионная сила среды⁴³), его удалось разделить еще на несколько фракций¹⁰⁴. Как показали Кравченко и Лапук¹⁰⁵, главная фракция пика Z представляет собой индивидуальный продукт модификации, в котором окислен остаток триптофана 28. Интересно отметить, что остаток триптофана 28 удален от активной области фермента и не принимает непосредственного участия в связывании субстрата¹⁻⁴; тем не менее, как показал опыт, его окисление приводит к существенному снижению сродства. Отсюда следует, что возможности метода аффинной хроматографии в данном аспекте не ограничиваются лишь теми случаями, когда модификации подвергается активная область фермента.

Аналогичный подход применил Каше⁷⁷ для фракционирования и характеристики функциональных свойств продуктов модификации химотрипсина, подвергнутого тепловой обработке и действию γ -радиации. Хроматографию проводили на колонке, содержащей ингибитор трипсина из бобов сои, присоединенный к Сефарозе по методу Пората и сотр. (о том, что такой сорбент кроме трипсина специфически связывает химотрипсин, сообщалось также в работе Фейнштейна⁷⁸). Нативный химотрипсин обнаруживал заметное сродство к ингибитору и выходил со значительным запаздыванием по сравнению с движением фронта элюента. После тепловой обработки в растворе фермент разделялся на две фракции, одна из которых выходила с фронтом и была совершенно неактивна, а другая соответствовала нативному химотрипсину. После

γ -облучения как в растворе, так и в сухом виде также получались две фракции, одна из которых выходила с фронтом и была неактивна. Однако второй пик занимал на хроматограмме промежуточное положение между инактивированным и нативным ферментом. Измерение ферментативной активности во фракциях показало, что по мере выхода фермента с колонки она плавно нарастает от 0 до 100%.

Применение аффинной хроматографии в аналитических целях пока что не получило широкого распространения, хотя предыдущая глава показывает, что для таких исследований имеется достаточно широкая база, а немногочисленные примеры, приведенные в данной главе, говорят о больших возможностях этого метода.

V. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТ — ЛИГАНД

Хроматография является одним из наиболее прямых и простых методов изучения термодинамики сорбции и комплексообразования^{106–108}.

Черкасов и Кравченко^{109, 110} впервые применили этот метод для изучения термодинамических свойств фермент-субстратного комплекса лизоцима с хитином. В предварительных исследованиях^{42, 43} найдено, что в зависимости от pH среды лизоцим образует с хитином комплексы двух типов, отличающиеся условиями существования, о чем упоминалось выше (стр. 1919). Поскольку существование двух типов комплексов не регистрировалось другими методами, для этой цели был применен хроматографический подход^{109, 110}. Константу равновесия находили по зависимости удерживаемого объема от молярной концентрации лизоцима в максимуме пика выходной кривой, а теплоту комплексообразования — по зависимости удерживаемого объема от температуры колонки^{106–108}. Определения проводили при pH 4,7 и 8,4, соответствующих преимущественному существованию одного и другого типа комплекса (при промежуточных значениях pH лизоцим распределяется между комплексами обоих типов). Полученные результаты приведены в таб-

ТАБЛИЦА

Термодинамические параметры образования комплекса лизоцима с субстратом

pH	$-\Delta G^\circ$, ккал/моль	$-\Delta H^\circ$, ккал/моль	$-\Delta S^\circ$, э. ед.	Метод	Ссылки на литературу
4,7	6,9	14,0	23,8	Хроматография	109, 110
5,0	7,0	12,8	19,7	Калориметрия	111
5,3	7,0	16,6	32,2	Кинетика	112
5,3	7,2	14,3	23,0	УФ-фотометрия	113
8,4	8,1	9,6	5,0	Хроматография	109, 110

лице, где для сравнения приведены также данные, полученные другими методами при pH ~ 5 (численные значения величин, относящихся к pH 8—9 в литературе отсутствуют; имеются лишь графические зависимости прочности комплекса от pH, определенные методами дифференциальной УФ-спектрофотометрии¹¹³ и флуоресценции^{114, 115}).

Как видно из таблицы, результаты, полученные хроматографическим методом при pH 4,7, весьма удовлетворительно согласуются с результатами, полученными при pH ~ 5 другими методами. Отсюда следует, что аффинная хроматография вполне применима для изучения термодинамики связывания фермента с субстратом.

Данные о свойствах комплекса при рН 8—9 противоречивы. Из работ Рапли и сотр.¹¹³, Чипмэна и сотр.¹¹⁴ и Лерера и Фасмана¹¹⁵ следует, что с ростом рН от 5 до 8—9 прочность комплекса снижается (зависимость других термодинамических величин от рН в этих работах не приводится). В то же время, результаты хроматографического определения показывают, что прочность комплекса при рН 8,4 почти на порядок выше, чем при рН 4,7 (ср. величины ΔF^0 в таблице). Причины этих расхождений состоят, по-видимому, в недостаточности спектроскопических методов исследования комплексов. Действительно, эти методы являются косвенными и основаны на регистрации эффектов, связан-

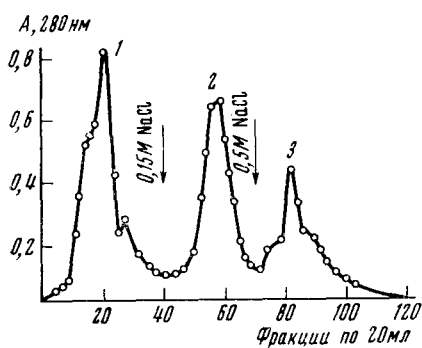


Рис. 4. Разделение карбоксипептидаз А и В хроматографией на Сефарозе 4В, замещенной ϵ -аминокапроил-*D*-триптофаном (по¹²⁸)

Исходный элюент: 0,02 М трис-НСl буфер, рН 7,5, с добавкой 0,05 М NaCl; далее — ступенчатый градиент концентрации NaCl; смена элюента указана стрелками; 1 — примеси; 2 — карбоксипептидаза В; 3 — карбоксипептидаза А

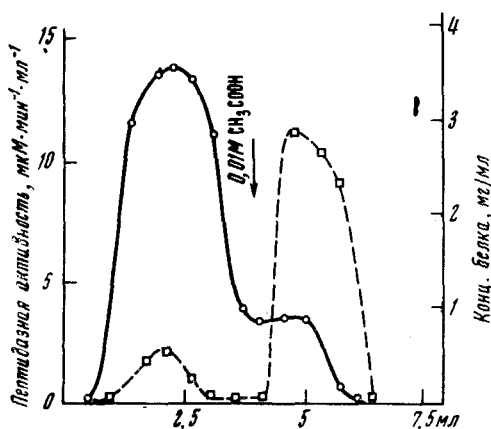


Рис. 5. Выделение карбоксипептидазы А из смеси белков хроматографией на пористом стекле, замещенном глицил-*D*-фениланином (по¹²⁷)

На колонку с гранулированным (200 меш) пористым стеклом (диаметр пор 200 нм) загружена смесь карбоксипептидазы А, лизоцима, рибонуклеазы А и сычороточного альбумина быка. Исходный элюент: 0,02 М трис-НСl буфер, рН 7,5, с добавкой 0,2 М NaCl. Стрелкой указана смена элюента. Сплошная линия — белок. Пунктир — пептидазная активность

ных с изменением конформации лизоцима при образовании фермент-субстратного комплекса. В то же время, анализ различий в величинах энтальпии и, в особенности, энтропии комплексообразования при рН 4,7 и 8,4 (таблица) указывает на то, что конформация лизоцима заметно изменяется лишь при образовании комплекса в кислой среде, но мало или совсем не изменяется в основной¹¹⁰. Таким образом, очевидно, что косвенные методы в силу особенностей конформационных свойств лизоцима регистрируют лишь комплекс, образующийся при рН ~5, и приводят к неправильным выводам о снижении прочности комплекса с ростом рН до 8—9. Подобные ситуации могут иметь место и для ряда других фермент-субстратных систем.

Применимость кинетических методов в данных целях ограничивается областью, в которой фермент проявляет свою активность; напри-

мер, в случае лизоцима и хитина эти методы применимы при pH ~5, но не применимы при pH выше 8.

Таким образом, прямой метод аффинной хроматографии более информативен, чем кинетические и спектроскопические методы, широко используемые в данной области в настоящее время.

Разработки последних лет в области аффинной хроматографии показывают, что этот метод может быть плодотворно применен в самых различных аспектах работы с ферментами. В целом, современное состояние аффинной хроматографии позволяет рассматривать ее как перспективный аналитический и препаративный метод химии ферментов.

*
* * *

За время подготовки обзора к печати появились сообщения о применении аффинной хроматографии для очистки тирозингидроксилазы¹¹⁶, нейраминидазы¹¹⁷, дигидрофолат-редуктазы¹¹⁸⁻¹²⁰, плазминогена¹²¹⁻¹²⁴, тромбина¹²⁵, пепсина¹²⁶, карбоксипептидазы A^{127, 128}, карбоксипептидазы B^{128, 129}, трансаминаз¹³⁰, трипсиноподобных ферментов¹³¹ и некоторых протеаз¹³². На рис. 4 и 5 приведены примеры выделения и разделения карбоксипептидаз A и B.

Метод «аффинной метки» активного центра фермента описан для карбоксипептидазы A^{133, 134} и альдолазы¹³⁵.

Аканума с сотр.¹³⁶ использовали аффинную хроматографию для изучения свойств комплекса карбоксипептидазы B с различными аналогами основных и ароматических аминокислот.

Уилчек и сотр.¹³⁷ сообщили о некоторых изменениях функциональных свойств протеинкиназы при ее хроматографии на Сефарозе, замещенной циклическим аденозинмонофосфатом.

Мосбах и сотр.¹³⁸ и Вайбель и сотр.¹³⁹ описали получение адсорбентов для дегидрогеназ, имеющих в качестве кофермента никотинамидадениндинуклеотид.

Следует отметить появление нового типа неагглютинирующего носителя — пористого гранулированного стекла^{127, 139}. Активацию пористого стекла производят обработкой его аminosиланами, используя затем введенную аминогруппу для ковалентного присоединения лигандов.

По аффинной хроматографии ферментов и некоторых других биоорганических соединений опубликовано несколько обзорных статей^{140, 143, 144}.

ЛИТЕРАТУРА

1. L. Stryer, *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 25 (1968).
2. A. C. T. North, D. C. Phillips, *Progr. Biophys. and Molec. Biol.*, **19** (1), 5 (1969).
3. D. E. Koshland, мл., K. E. Neet, *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 359 (1968).
4. H. R. Hollaway, *Ann. Reports Progr. Chem. (London)*, **65**, sec. B, 601 (1968).
5. E. Starkenstein, *Biochem. Ztschr.*, **24**, 210 (1910).
6. B. Ambard, *Bull. Soc. chim. biol.*, **3**, 51 (1921).
7. I. Chodat, M. Philia, *C. r. Soc. phys. et hist. nat. Genève*, **41**, 118 (1924).
8. P. T. Boekestein, *Acta Brev. Neerl.*, **2**, 132 (1932).
9. O. Holmberg, *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, **11**, B(4) (1932).
10. O. Holmberg, *Biochem. Ztschr.*, **258**, 134 (1933).
11. J. Bloom, A. Bak, B. Brae, *Ztsch. Physiol. Chem.*, **250**, 104 (1937).
12. Y. Tokuoka, *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, **13**, 586 (1937).
13. D. Hockenhull, D. Herbert, *Biochem. J.*, **39**, 102 (1945).
14. S. Schwimmer, A. K. Balls, *J. Biol. Chem.*, **180**, 883 (1949).
15. S. Schwimmer, A. K. Balls, *Там же*, **179**, 1063 (1949).
16. B. Hagihara, *Proc. Japan Acad.*, **27**, 346 (1951).
17. Ph. S. Thayer, *J. Bacteriol.*, **66**, 656 (1953).
18. A. Markowitz, H. P. Klein, E. H. Fisher, *Biochim. biophys. acta*, **19**, 267 (1956).
19. F. B. Straub, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **12**, 295 (1957).
20. G. J. Neumann, S. Skupp, J. T. Farrar, *Biochim. biophys. acta*, **85**, 296 (1964).
21. Л. М. Вайнер, М. С. Шульман, *Прикл. биохим. микробиол.*, **5**, 364 (1969).
22. L. F. Leloir, M. A. Rongine de Fekete, C. E. Cardini, *J. Biol. Chem.*, **236**, 631 (1961).

23. T. Akazawa, T. Murata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 21 (1965).
24. Y. Tanaka, T. Akazawa, *J. Technol. Soc. Starch*, **17**, 229 (1969).
25. G. de la Haba, *Biochim. biophys. acta*, **59**, 672 (1962).
26. K. Hanabusa, H. Kohno, *Keyo J. Med.*, **17**, 75 (1968).
27. Z. Selinger, M. Schramm, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 208 (1963).
28. J. Heller, M. Schramm, *Biochim. biophys. acta*, **81**, 96 (1964).
29. L. F. Leloir, S. H. Goldemberg, *J. Biol. Chem.*, **235**, 919 (1960).
30. L. F. Leloir, S. H. Goldemberg, *Methods Enzymology*, **5**, 145 (1962).
31. A. Loyter, M. Schramm, *Biochim. biophys. acta*, **65**, 200 (1962).
32. A. Levitzky, J. Heller, M. Schramm, Там же, **81**, 101 (1964).
33. Ch. Jeuniaux, *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, **64**, 522 (1956).
34. Ch. Jeuniaux, Там же, **65**, 135 (1957).
35. Ch. Jeuniaux, *Biochem. J.*, **66**, 29P (1957).
36. N. H. Grant, K. C. Robins, *Arch. biochem. biophys.*, **66**, 396 (1957).
37. A. Gertler, Y. Birk, *Europ. J. Biochem.*, **12**, 170 (1970).
38. B. H. Орехович, О. С. Хохлова, М. П. Черников, *Биохимия*, **24**, 353 (1959).
39. K. Ogawa, N. Toyama, *J. Ferment. Technol.*, **42**, 199 (1964).
40. E. T. Reese, G. Avigad, *Biochim. Biophys. acta*, **113**, 79 (1966).
41. S. Bauer, G. Avigad, *Israel J. Chem.*, **1**, 211 (1963).
42. И. А. Черкасов, Н. А. Кравченко, Е. Д. Каверзнева, *ДАН*, **170**, 213 (1966).
43. И. А. Черкасов, Н. А. Кравченко, *Молек. биол.*, **1**, 381 (1967).
44. И. А. Черкасов, Н. А. Кравченко, *Биохимия*, **33**, 761 (1968).
45. И. А. Черкасов, Н. А. Кравченко, Е. Д. Каверзнева, *Молек. биол.*, **1**, 41 (1967).
46. И. А. Черкасов, Н. А. Кравченко, *Авт. свид. СССР*, 178771, *Бюлл. Изобр.*, **1966**, № 4.
47. И. А. Черкасов, Н. А. Кравченко, *Биохимия*, **34**, 1089 (1969).
48. И. А. Черкасов, Н. А. Кравченко, *Авт. свид. СССР*, 220920, *Бюлл. Изобр.*, **1968**, № 21.
49. H. B. Jensen, K. Kleppe, *Abstracts of the 6th FEBS Meeting, Madrid. 1969*, стр. 287.
50. I. F. Pryme, P. E. Jones, H. B. Jensen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 676 (1969).
51. B. F. Erlanger, *Biochim. biophys. acta*, **27**, 646 (1958).
52. L. S. Lerman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **39**, 232 (1953).
53. C. Arsenis, D. B. McCormick, *J. Biol. Chem.*, **239**, 3093 (1964).
54. C. Arsenis, D. B. McCormick, Там же, **241**, 330 (1966).
55. C. R. Lowe, P. D. G. Dean, *FEBS Letters*, **14**, 313 (1971).
56. В. В. Мосолов, Е. В. Лушникова, *Биохимия*, **35**, 440 (1970).
57. R. Axén, J. Porath, S. Ernback, *Nature*, **214**, 1302 (1967).
58. J. Porath, R. Axén, S. Ernback, Там же, **215**, 1491 (1967).
59. J. Porath, Там же, **218**, 834 (1968).
60. T. Kristiansen, L. Sundberg, J. Porath, *Biochim. biophys. acta*, **184**, 93 (1969).
61. P. Cuatrecasas, M. Wilchek, C. B. Anfinsen, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**, 636 (1968).
62. M. Wilchek, M. Gorecki, *Europ. J. Biochem.*, **11**, 491 (1969).
63. T. Kristiansen, M. Einarsson, L. Sundberg, J. Porath, *FEBS Letters*, **7**, 294 (1970).
64. K. J. Stevenson, A. Landman, *Canad. J. Biochem.*, **49**, 119 (1971).
65. E. T. Mertz, D. G. Deutsch, *Science*, **170**, 1095 (1970).
66. G. K. Chua, W. Bushuk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 545 (1969).
67. L. Slyterman, J. Wijdenes, *Biochim. biophys. acta*, **200**, 593 (1970).
68. S. Blumberg, I. Schechter, A. Berger, *Europ. J. Biochem.*, **15**, 97 (1970).
69. E. Steers, P. Cuatrecasas, H. B. Pollard, *J. Biol. Chem.*, **246**, 196 (1971).
70. M. Claeysens, H. Kersters-Hilderson, J. P. Van Wauwe, C. K. De Bruyne, *FEBS Letters*, **11**, 336 (1970).
71. M. S. Poonian, A. J. Schlachach, A. Weissbach, *Biochemistry*, **10**, 424 (1971).
72. W. Chan, M. Takahashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 272 (1969).
73. Y. Akanuma, J. Glomset, Там же, **32**, 639 (1969).
74. N. Kalderon, I. Silman, S. Blumberg, Y. Dudai, *Biochim. biophys. acta*, **207**, 560 (1970).
75. J. D. Berman, M. Young, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 395 (1971).
76. B. Sprossler, F. Lingens, *FEBS Letters*, **6**, 232 (1970).
77. V. Kasche, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 875 (1970).
78. G. Feinstein, *Biochim. Biophys. Acta*, **214**, 224 (1970).

79. J. K. Inman, H. M. Dintzis, *Biochemistry*, **8**, 4074 (1969).
80. P. Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3059 (1970).
81. P. Cuatrecasas, *Nature*, **228**, 1327 (1970).
82. P. Cuatrecasas, C. B. Anfinsen, *Methods Enzymology*, **21**, (1971).
83. L. F. Cavalieri, E. Caroli, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 807 (1970).
84. R. F. Beers, мл., *Chem. Abstracts*, **64**, 11501 c (1966).
85. L. A. Heppel, *Methods Enzymology*, **2**, 570 (1955).
86. B. M. Pogell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 225 (1962).
87. S. Pontremoli, *Methods Enzymology*, **9**, 625 (1966).
88. O. M. Rosen, S. M. Rosen, B. L. Horecker, Там же, **9**, 632 (1966).
89. R. Blostein, W. J. Rutter, *J. Biol. Chem.*, **238**, 3280 (1963).
90. M. B. Rhodes, C. L. Marsh, G. W. Kelley, мл., *Exptl. Parasitol.*, **15**, 403 (1964).
91. J. Eley, *Biochemistry*, **8**, 1502 (1969).
92. H. Carminatti, E. Rosengurt, L. Jiménez de Asua, *FEBS Letters*, **4**, 307 (1969).
93. A. Yoshida, *Anal. Biochem.*, **37**, 357 (1970).
94. P. H. Pétra, H. Neurath, *Biochemistry*, **8**, 2466 (1969).
95. D. Givol, Y. Weinstein, M. Gorecki, M. Wilchek, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 825 (1970).
96. I. Silman, E. Katchalski, *Ann. Rev. Biochem.*, **35**, 873 (1966).
97. M. Wilchek, *FEBS Letters*, **7**, 161 (1970).
98. P. Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.*, **245**, 574 (1970).
99. T. Podleski, J. C. Meunier, J. P. Changeux, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **63**, 1239 (1969).
100. Y. Morino, M. Okamoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 600 (1970).
101. E. W. Thomas, *Carbohydrate Res.*, **13**, 225 (1970).
102. J. Yariv, K. J. Wilson, J. Hildesheim, S. Blumberg, *FEBS Letters*, **15**, 24 (1971).
103. Н. А. Кравченко, В. Х. Лапук, Н. Б. Степанова, И. А. Черкасов, *Молек. биол.*, **1**, 47 (1967).
104. Н. А. Кравченко, В. Х. Лапук, *Биохимия*, **34**, 832 (1969).
105. Н. А. Кравченко, В. Х. Лапук, Там же, **35**, 64 (1970).
106. А. В. Киселев, Я. И. Яшин, *Газо-адсорбционная хроматография*, «Наука», М., 1967.
107. В. В. Фомин, *Усп. химии*, **24**, 1010 (1955).
108. Ф. Россотти, X. Россотти, *Определение констант устойчивости и других констант равновесия в растворе*, «Мир», М., 1965.
109. И. А. Черкасов, Н. А. Кравченко, *Биохимия*, **35**, 182 (1970).
110. I. A. Cherkasov, N. A. Kravchenko, *Biochim. biophys. acta*, **206**, 289 (1970).
111. C. Bjurulf, J. Laynez, I. Wadsö, *Europ. J. Biochem.*, **14**, 47 (1970).
112. A. Marzotto, L. Galzigna, *Ztschr. Physiol. Chem.*, **350**, 427 (1969).
113. J. A. Rupley, L. G. Butler, M. Gerring, F. W. Hartdegen, R. Pecoraro, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **57**, 1088 (1967).
114. D. M. Chipman, V. Grisaro, N. Sharon, *J. Biol. Chem.*, **242**, 4388 (1967).
115. S. S. Lehrer, G. D. Fasman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 133 (1966).
116. W. N. Poillon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 64 (1971).
117. P. Cuatrecasas, G. Illiano, Там же, **44**, 178 (1971).
118. B. T. Kaufman, J. V. Pierce, Там же, **44**, 608 (1971).
119. P. C. H. Newbold, N. G. L. Harding, *Biochem. J.*, **124**, 1 (1971).
120. J. S. Erickson, Ch. K. Mathews, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1164 (1971).
121. D. Deutsch, E. T. Mertz, *Federat. Proc.*, **29**, 2253 (1970).
122. T. H. Lui, E. T. Mertz, *Canad. J. Biochem.*, **49**, 1055 (1971).
123. W. J. Brockway, F. J. Castellino, *J. Biol. Chem.*, **246**, 4671 (1971).
124. E. E. Rickli, P. A. Cuendert, *Biochim. biophys. acta*, **250**, 447 (1971).
125. A. R. Thompson, E. W. Davie, Там же, **250**, 210 (1971).
126. B. Nevaldine, B. Kassell, Там же, **250**, 207 (1971).
127. P. J. Robinson, P. Dunnill, M. D. Lilly, Там же, **242**, 659 (1971).
128. G. R. Reeck, K. A. Walsh, M. A. Hermondson, H. Neurath, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1226 (1971).
129. M. Sokolowsky, N. Zisapel, *Biochim. biophys. acta*, **250**, 203 (1971).
130. R. Collier, G. Kohlhaw, *Anal. Biochem.*, **42**, 48 (1971).
131. N. C. Robinson, R. W. Tye, H. Neurath, K. A. Walsh, *Biochemistry*, **10**, 2743 (1971).
132. J. R. Uren, *Biochim. biophys. acta*, **236**, 67 (1971).
133. G. M. Hass, H. Neurath, *Biochemistry*, **10**, 3535 (1971).
134. G. M. Hass, H. Neurath, Там же, **10**, 3541 (1971).
135. Y. Lin, R. D. Kobes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 34 (1971).

136. H. Akanuma, A. Kasuga, T. Akanuma, M. Yamasaki, Там же, **45**, 27 (1971).
137. M. Wilchek, Y. Salomon, N. Lowe, Z. Selinger, Там же, **45**, 1177 (1971).
138. K. Mosbach, H. Guilford, P.-O. Larsson, R. Ohlsson, M. Scott, *Biochem. J.*, **125**, 20P (1971).
139. M. K. Weibel, H. H. Weetall, H. J. Bright, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 347 (1971).
140. G. Feinstein, *Naturwiss.*, **58**, 389 (1971).
141. J. Gryszkiewicz, *Folia Biologica*, **19**, (№ 1), 119, (1971).
142. R. Goldman, L. Goldstein, E. Katchalsky, *Biochemical Aspects of reactions on Solid Supports*. Acad. Press, N.—Y., 1971, стр. 1.
143. R. H. Reiner, A. Walch, *Chromatogr.*, **4**, 578 (1971).
144. P. Cuatrecasas, C. B. Anfinsen, *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 259 (1971).

Институт органической химии
им. Н. Д. Зелинского АН СССР,
Москва
