

УДК 543.544; 547.963.3

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ КОМПОНЕНТОВ

Л. И. Гусржова и В. П. Демушкин

В обзоре рассматриваются литературные данные по хроматографическому разделению нуклеиновых кислот (НК) и их компонентов. Особое внимание уделено наиболее распространенным видам хроматографии на колонках, в тонких слоях различных сорбентов и электрофорезу. Показана применимость каждого вида хроматографии для исследования первичной структуры НК, комплексообразования НК с другими классами природных веществ.

Библиография — 597 наименований.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1241
II. Нуклеиновые кислоты	1242
III. Олигонуклеотиды	1250
IV. Нуклеотиды	1255
V. Нуклеиновые основания и нуклеозиды	1264
VI. Смеси нуклеотидов, нуклеозидов и нуклеиновых оснований	1270

I. ВВЕДЕНИЕ

Развитие молекулярной биологии, которое привело к многим важнейшим открытиям было бы невозможно без развития микроаналитических методов. Хроматография и электрофорез на бумаге и ионообменная колоночная хроматография сыграли выдающуюся роль в становлении этой науки, позволив выяснить наиболее общие закономерности строения нуклеиновых кислот и белков. Однако дальнейшее расширение и углубление знаний в этой области требовало решения конкретных задач, выделения и установления структуры конкретных индивидуальных молекул нуклеиновых кислот и белков, количество молекул которых в клетке подчас измеряется единицами. Прежние микрометоды мало пригодны для решения новых проблем и, хотя в установлении структуры первых индивидуальных нуклеиновых кислот еще пользовались старыми методами, совершенно очевидной стала необходимость разработки и использования новых, значительно более чувствительных методов анализа.

В настоящее время использование хроматографии в тонких слоях в сочетании с мечеными соединениями позволяет анализировать количество соединений не менее 10^{-12} г. Колоночная хроматография обладает пока меньшей чувствительностью (10^{-7} — 10^{-9} г), однако часто позволяет проводить необходимый спектральный анализ вещества. Удельный вес ультрамикрометодов в современных исследованиях непрерывно увеличивается.

В данном обзоре обобщены достижения в области методов анализа нуклеиновых кислот за последние 10 лет. Читатели, интересующиеся работами предыдущих лет, могут познакомиться с ними в ранее опубликованных обзорах¹⁻⁵.

Основное внимание в данном обзоре уделено ультрамикрометодам. Поскольку принципы и хроматографические системы, использующиеся в ультрамикроанализе носят общий характер, в обзор включены также и менее чувствительные методы, которые можно применять и в ультрамикроварианте.

Методы анализа нуклеиновых кислот носят общий характер и могут быть использованы также в других областях исследований. Авторы надеются, что обзор будет полезен не только химикам, физикам и биологам, работающим в области молекулярной биологии, но и химикам-органикам, применяющим в своей работе микрометоды.

Для облегчения использования обзора в практической работе материал разбит на разделы, объединяющие одинаковые типы анализируемых соединений. Сокращения и символы нуклеиновых кислот и их компонентов, применяемые в статье, рекомендованы комиссией IUPAC и IUB⁶.

Для проведения анализов НК и их компонентов употребляют большое число разного типа сорбентов. С подробной характеристикой и названиями фирм, выпускающих эти сорбенты, можно ознакомиться в справочнике Лурье⁷.

II. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Число различных типов НК в клетке довольно велико, поэтому выделить индивидуальные компоненты чрезвычайно трудно. Кроме того, ограниченная растворимость в водных растворах, способность к агрегации и неспецифическому взаимодействию с сорбентами, сильно сужают набор методов фракционирования НК. Однако в литературе приводится довольно большое число систем для хроматографического разделения НК на индивидуальные компоненты. Опыт их применения свидетельствует о том, что для успешного выделения гомогенного вещества недостаточно использования одной хроматографической процедуры. Наиболее целесообразен метод ступенчатого фракционирования НК. Сначала смесь НК делят на фракции, обладающие одинаковой специфичностью — транспортные РНК (т-РНК), рибосомальные РНК (р-РНК), информационные РНК (и-РНК), ДНК и т. д. Для этого часто используют избирательную экстракцию, комбинации различных способов осаждения, центрифугирование⁸ и хроматографические методы. Далее фракции НК подвергают более тонкому разделению.

Из хроматографических методов наибольшее распространение получили: разделение на ионообменных смолах, распределительная, аффинная хроматография и другие.

1. Ионообменная хроматография

А. Сорбенты, содержащие белки

Один из видов такой хроматографии — фракционирование на колонках с метилированным альбумином, сорбированным на кизельгуре (МАК-хроматография), получил большое распространение для разделения всех типов НК. Их подвижность на колонках с МАК определяется, в основном, тремя факторами: 1) длиной полинуклеотидной цепи (суммарный заряд молекулы), 2) конформацией НК в растворе и 3) ее нуклеотидным составом. Первый фактор определяет силу ионного связывания хроматографируемого вещества с сорбентом. Второй и третий — степень гидрофобного взаимодействия и взаимодействия за счет водо-

родных связей. Хроматографическое поведение НК на колонках с МАК показывает, что второй и третий факторы при разделении НК играют более существенную роль.

При элюции в градиенте концентраций NaCl от 0,2 до 1,2 М НК делятся на фракции, соответствующие их функции в клетке т-РНК, ДНК и т. д.^{9, 10}. Разделение проводят при 15—25°, иногда при 35°. Повышение температуры нецелесообразно, так как при этом часть нуклеотидного материала удерживается сорбентом. Понижение температуры тоже нежелательно ввиду менее четкого разделения. Необходимо помнить, что концентрация NaCl, при которой элюируется данный тип НК, может варьировать для разных партий кизельгура и метилированного альбумина, что можно объяснить разной степенью его метилирования. Однако порядок элюции — т-РНК — ДНК — (р-РНК, и-РНК), как правило, не меняется⁹⁻¹².

Профиль элюции зависит от источника НК. Так, при разделении бактериальных НК на колонках с МАК, т-РНК и обе р-РНК (16 S и 23 S) хорошо отделяются друг от друга, а быстро метящиеся РНК разделяются на несколько фракций. В случае НК из животных тканей, р-РНК разделяются несколько хуже, а и-РНК элюируются смешанной фракцией¹⁰⁻¹¹. Если НК находится в денатурированном состоянии, то она вымывается с колонки при больших концентрациях соли, чем нативная. Это положение справедливо как для ДНК¹³⁻¹⁵, так и для РНК¹⁶⁻¹⁸. Выход вещества с колонки для нативных препаратов, обычно составляет 90—100%, для денатурированных НК он значительно ниже (50—70%)^{13, 14}, а при перегрузке колонки, например, ДНК нуклеотидный материал может вообще не элюироваться¹⁹.

Оптимальные условия разделения на колонке с МАК — 0,5—2 мг смеси НК на 10 мл суспензии МАК при общем объеме градиента 800 мл. Со способом приготовления сорбентов и техникой хроматографии можно ознакомиться в работах^{9, 10, 20-25}. Для приготовления колонок можно использовать как бычий альбумин^{10, 20, 23-25}, так и альбумин человека^{26, 27}. Вместо кизельгура можно использовать силикагель^{17, 28-31} (МАСА-хроматография), при этом емкость сорбента по количеству нуклеотидного материала существенно возрастает^{30, 32}.

Хроматографию на колонках с МАК и МАСА используют также для разделения фракций НК на индивидуальные компоненты. При разделении ДНК положение элюируемой ДНК зависит от длины молекулы, конформации и нуклеотидного состава. ДНК с большей длиной и содержащая больше пар гуанин-цитозин (ГЦ-пар) элюируется при более высоких концентрациях соли^{24, 32}. Некоторые ДНК, такие, например, как ДНК *B. subtil.*, тимуса теленка и мышей элюируются при одинаковых концентрациях соли³³. ДНК *E. coli* и фагов Т2 и Т4 хорошо отделяются друг от друга. ДНК фага Т5 можно разделить на два компонента^{8, 34}. Гликозилирование оснований ДНК приводит к более прочному связыванию с сорбентом³⁵.

Широкое распространение хроматография на колонках с МАК и МАСА получила для разделения нативной и денатурированных форм ДНК^{13, 15, 36-43}. С помощью этого метода можно выделять гибриды ДНК-РНК, репликативные формы фаговых ДНК и комплементарные нити ДНК⁴⁴⁻⁴⁷. Для разделения т-РНК хроматография на МАК предложена японскими исследователями⁴⁸ и успешно используется для фракционирования т-РНК⁴⁹⁻⁵⁸ из самых различных источников^{16, 22, 25, 26, 49-58} и ее химически модифицированных производных^{30, 31, 59}.

Для хроматографии НК в качестве носителя используют также основные белки и полипептиды, сорбированные на кизельгуре⁶⁰⁻⁶⁷. Про-

филь хроматографии и закономерности, отмеченные ранее (влияние молекулярного веса, нуклеотидного состава и т. д.) при фракционировании на этих сорбентах те же, что и для хроматографии на колонках с МАК и МАСА⁶⁸⁻⁷¹. Интересной модификацией метода является разделение на целите рибонуклеопротеидного комплекса (РНП-комплекс)⁷². При этом белки РНП сорбируются на целите и не вымываются с колонки, а РНК фракционируется аналогично разделению на МАК. Описана хроматография ДНК на белковых порошках из шерсти⁷³. Поведение ДНК на таких колонках напоминает хроматографию на МАК.

Следует отметить, что принцип хроматографии НК на белках, сорбированных на носителях типа кизельгура или силикагеля весьма перспективен, так как разделение в данном случае определяется в первую очередь специфическими силами адсорбции и водородных связей. Использование для этих целей других белков, например иммуноглобулинов и др., могло бы, как нам кажется, существенно расширить возможности фракционирования НК.

Б. Сорбенты на основе целлюлозы и сефадекса

При разделении НК на ионообменных полисахаридах связывание НК со смолой за счет ионных взаимодействий более прочное, чем для сорбентов, содержащих метилированные и основные белки. Поэтому влияние на разделение других факторов (конформация НК, ее состав и не-ионные взаимодействия с сорбентом) оказывается существенным лишь для НК с низким молекулярным весом. Высокополимерные НК сорбируются анионитами настолько прочно, что для элюции требуются высокие концентрации солей. Поэтому разделение ДНК и высокополимерных РНК на ионообменных целлюлозах и сефадексах используется сравнительно редко^{8, 74, 75}. Широкое распространение эти сорбенты нашли лишь при фракционировании т-РНК⁷⁶⁻⁷⁸. Хроматография т-РНК на диэтиламиноэтилцеллюлозе (ДЭАЭ-целлюлозе)^{76, 77-79-85}, триэтиламиноэтилцеллюлозе (ТЭАЭ-целлюлозе)⁸⁶ и ДЭАЭ-сефадексе^{76-78, 87-99} известна во многих вариантах (см. табл. 1).

Наиболее хорошо исследовано поведение на ионообменниках для т-РНК из *E. coli* и дрожжей. т-РНК из *E. coli* элюируются с колонки при более высоких концентрациях соли, однако порядок элюции т-РНК по их специфичности к определенной аминокислоте сохраняется. Хроматография на полисахаридных анионитах используется в настоящее время на первой стадии очистки т-РНК. Метод позволяет разделить за один прием до 100 г суммарной т-РНК¹⁰⁰.

Наиболее эффективное разделение для т-РНК наблюдается при хроматографии на бензоилированной ДЭАЭ-целлюлозе (БД-целлюлозе). Применение такого гидрофобного сорбента позволяет повысить вклад адсорбционных сил в процессе хроматографического разделения. БД-целлюлоза для разделения т-РНК впервые предложена группой Тенера^{101, 102}. При элюции солями при низких температурах наблюдается хорошее фракционирование т-РНК (см. рис. 1). Метод получил широкое распространение для выделения индивидуальных т-РНК^{85, 97, 103-109}. Хроматографические профили для т-РНК из разных источников, в основном, дают аналогичные картины. Фен-, цис-, тир-, сер- и лей-специфичные т-РНК удерживаются БД-целлюлозой прочнее, чем другие т-РНК. Фенилаланиновая т-РНК из дрожжей и печени крысы элюируется при больших концентрациях соли, чем аналогичная т-РНК из *E. coli*^{102, 107} и галофильных бактерий¹⁰⁹. Меньшая сила сорбции объясняется, по-ви-

ТАБЛИЦА 1

Условия разделения т-РНК на ионообменных смолах

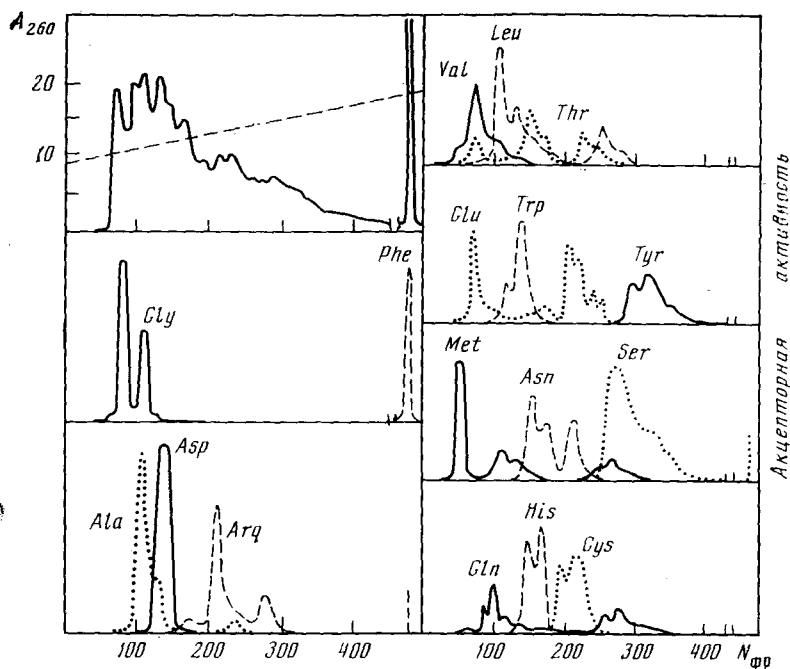
Сорбент	Условия разделения	Концентрация элюирующего вещества для т-РНК		Ссылки на литературу
		<i>E. coli</i>	дрожжи	
ДЭАЭ-целлюлоза	pH 5,0; градиент соли	0,4—0,7 М NaCl	0,4—0,65 М NaCl	76
	pH 7,5; мочеви́на, градиент соли	0,33—0,40 М NaCl	0,28—0,35 М NaCl	76
	pH 7,5; 0,36 М NaCl градиент мочевины	2—5 М мочеви́на	2—6 М мочеви́на	76
	pH 4,2; 7 М мочеви́на	0,35—0,45 М NaCl	0,30—0,40 М NaCl	76
	pH 4,2; 0,40 М NaCl градиент мочевины	1—6 М мочеви́на	1—6 М мочеви́на	76
	pH 4,2 4 М мочеви́на градиент соли	0,42—0,53 М NaCl	0,38—0,50 М NaCl	76
	pH 6,0; 65°, градиент соли	0,8—1,6 М NaCl	0,8—1,3 М NaCl	77
ТЭАЭ-целлюлоза	pH 3,6; 38—40°, 7 М мочеви́на, градиент соли	—	0,35—0,55 М NaCl	86
ДЭАЭ-сефадекс	pH 6,0; 0,9 М NaCl градиент температуры	65—20°	65—20°	77
	pH 7,5; 7 М мочеви́на градиент соли	0,45—0,65 М NaCl	0,40—0,60 М NaCl	76
	pH 4,2; 7 М мочеви́на градиент соли	0,55—0,75 М NaCl	0,49—0,65 М NaCl	76
	pH 4,5; градиент соли	0,5—0,80 М NaCl	0,5—0,85 М NaCl	76
	pH 5,3; 1% диметилформамид, градиент соли	0,75—1,6 М (NH ₄) ₂ SO ₄	—	94
	pH 6,2; 5% диметилформамид 1 М фосфат, 33°, градиент соли	0,45—0,4 М KCl *	—	94
	pH 7,5; градиент соли	—	0,37—0,52 М NaCl	95
	pH 7,2; градиент соли	0,375—0,525 М NaCl **	0,008—0,016 М HgCl ₂	97

* т-РНК из *I. utillis*.

** т-РНК из печени крысы.

димому, отсутствием у этих т-РНК гидрофобного основания У, найденного в т-РНК^{фен} дрожжей и печени крысы.

Использование дополнительных приемов — элюирование градиентными растворами спирта^{110, 111} и простых эфиров^{112, 113} во многих случаях улучшает разделение и увеличивает выход с колонки. БД-целлюлоза

Рис. 1. Фракционирование т-РНК *E. coli* на БД-целлюлозе¹⁰²

оказалась весьма эффективной при хроматографии ДНК и других видов РНК^{8, 114–117}. Аналогичный БД-целлюлозе сорбент предложен недавно Остерманом для фракционирования т-РНК¹¹⁸.

В. Гидроксилпатит

Гидроксилпатит (ГА) является слабым анионообменником, что позволяет использовать его для хроматографии анионов. Спектр использования ГА-хроматографии достаточно велик: хорошо изучено поведение на колонках с ГА низкомолекулярных и высокополимерных РНК и ДНК из различных источников^{119–144}. При элюции НК с ГА-колонок обычно используют фосфатный буфер pH 6,8 (см. табл. 2). Однако для элюции используют и более кислые растворы¹³³.

Существенным моментом при хроматографии на ГА является то, что сорбция НК практически не зависит от концентрации анионов, кроме фосфата. Поэтому данный метод очень удобно использовать для рехроматографии после других процедур разделения и концентрирования НК из солевых растворов. Необходимо следить, чтобы в растворе отсутствовали вещества, дающие комплексы с Ca^{2+} . Если при элюции вещества с ГА-колонок используют фосфатный буфер, содержащий другие анионы (например Cl^-), то концентрация фосфата, при которой НК вымывается с колонки, увеличивается^{138, 144}. Разделение обычно проводят при $+4^\circ$ или при $\sim 20^\circ$.

В большинстве случаев разделение не зависит от температуры. Однако для некоторых полинуклеотидов, например, полиуридиловой и полицитидиловой кислот, обладающих при низких температурах упорядоченной структурой, элюирующая концентрация при низких температурах выше, чем при 20° ¹³⁸. Создается впечатление, что полинуклеотид, обладающий упорядоченной структурой, элюируется позже, чем тот же

ТАБЛИЦА 2

Концентрация фосфатного буфера и возврат нуклеотидного материала с колонки при хроматографии на ГА

Вещество	Концентрация фосфатного буфера рН 6,8 М	Возврат с колонки, %
Мононуклеотиды	0,001	100
Олигонуклеотиды	0,01—0,02	100
Полинуклеотиды		
полипиримидиновые	0,1—0,12	100
полипуриновые	0,22—0,25	60—80
Полинуклеотиды в 1% формальдегиде	0,05—0,17	100
РНК	0,11—0,18	100
Денатурированная ДНК	0,11—0,18	50—100
Нативная ДНК		
высших организмов	0,11—0,18	50—100
бактерий	0,20—0,22	90
фагов	0,25—0,27	90

полинуклеотид, когда его вторичная и третичная структуры разрушены^{128, 138, 139, 144}. Метод позволяет отделять денатурированную форму ДНК от нативной^{128, 135, 139, 144—154}, разделять различные изоакцепторные т-РНК^{123, 129, 130, 131, 133, 140, 143, 155, 156} и различные формы циклических ДНК^{157, 158}. Гликозилированные ДНК Т-четных фагов более прочно удерживаются ГА, чем ДНК *E. coli* или нечетных фагов^{138, 159}.

Поведение ДНК на колонках с ГА зависит также от нуклеотидного состава. Чем больше молекула содержит ГЦ-пар, тем прочнее она связывается с ГА^{128, 139, 144}.

Для фракционирования нуклеотидного материала на ГА используют как градиентную, так и ступенчатую элюцию. При ступенчатом фракционировании НК на ГА необходимо помнить о наличии «фальшивых фракций», т. е. фракций вещества, которые при рехроматографии элюируются при меньшей молярности фосфатного буфера^{128, 144}. Чтобы избежать этого, целесообразно использовать градиентную элюцию.

Для получения хорошего разделения на 1 мг нуклеотидного материала необходимо 10 мл ГА при общем объеме градиента 200—300 мл. Оптимальная скорость элюции 0,1—0,2 мл/мин·см². С приготовлением сорбента и техникой хроматографии можно ознакомиться в работах^{138, 144, 160—162}.

Г. Катиониты, уравновешенные катионами поливалентных металлов

Ионообменники, уравновешенные катионами поливалентных металлов по свойствам должны напоминать слабые анионообменники типа ГА. Было отмечено, что ДНК сорбируется из растворов амберлитом IRC-50, уравновешенным Mg^{2+} . При элюции удалось выделить несколько фракций ДНК, отличающихся составом и коэффициентом седиментации^{163, 164}. Хроматография ДНК на колонках с амберлитом IR-120, уравновешенным Al^{3+} , приводит к выделению семи фракций ДНК, сильно различающихся по хроматографическим свойствам^{165—167}. Профиль разделения не зависит от количества белковых примесей¹⁶⁸, РНК¹⁶⁹ и рН¹⁷⁰, но сильно меняется в зависимости от метода выделения ДНК¹⁷¹, что связано, по-видимому, с деградацией ДНК при ее выделении.

Хроматография на катионитах, уравновешенных Al^{3+} кажется весьма перспективной, так как позволяет проводить разделение в мягких условиях и не сопровождается деградацией ДНК. Элюция нуклеотидного материала со смолы — полная.

2. Противоточное распределение и хроматография в обращенной фазе

Разделение нуклеиновых кислот методом противоточного распределения было предложено в начале шестидесятых годов и сразу же хорошо зарекомендовало себя как качественный метод для фракционирования ДНК и различных типов РНК^{172–179}. Наибольшее распространение этот вид хроматографии получил для т-РНК^{180–182}.

Однако сложность оборудования, малые количества разделяемых веществ и довольно низкая разрешающая способность сильно ограничивали возможности метода. Принцип противоточного распределения был использован при хроматографии в водно-органических системах на различных сорбентах. При этом сорбент насыщался органической фазой и далее переносился в колонку и уравновешивался водной фазой. Первоначально системы для такой хроматографии были взяты из работ по противоточному распределению нуклеиновых кислот^{183–190}. Распределительная хроматография на колонках — хроматография в обращенной фазе позволила устранить недостатки противоточного распределения, на которые указывалось выше.

Введение в органическую фазу аммонийных солей, содержащих жирные углеводородные остатки, существенно улуч-

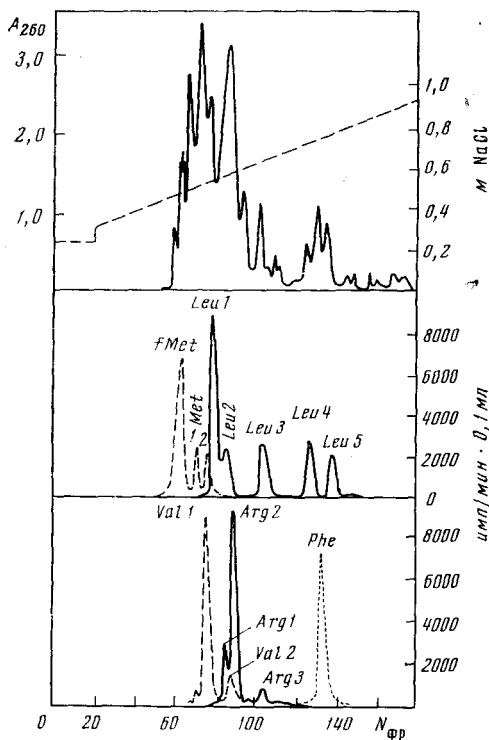


Рис. 2. Хроматография т-РНК *E. coli* на фторопласте¹⁹⁹

шило разрешающую способность метода^{191–194}. Наибольшее распространение получила хроматография на хромосорбе, пропитанном метилтрикаприламмоний бромидом в тетрафторпропане (фреон)^{192, 195–198}. Применение специального фторопласта, пропитанного триоктилпропиламмоний бромидом^{199, 200}, предложенное в последнее время, позволяет хорошо разделять т-РНК (см. рис. 2). Кривые разделения наглядно показывают, что разделение т-РНК в «обращенной фазе» является весьма перспективным.

Следует отметить, что хроматография «в обращенной фазе», по-видимому, может быть использована для фракционирования и других видов нуклеиновых кислот, так как хорошо известно, что соли жирных аминов различных видов нуклеиновых кислот растворимы в водных растворах при разных концентрациях NaCl²⁰¹.

3. Аффинная хроматография

Название этого метода разделения происходит от английского слова «affinity» (сродство, близость), так как этот вид хроматографии использует взаимодействие между двумя веществами, обладающими сродством друг к другу. Одно из них находится в растворе, второе на нерастворимой матрице — сорбенте. Исследуемую смесь пропускают через колонку, содержащую этот сорбент, в условиях оптимальных для взаимодействия закрепленного вещества и одного компонента смеси. При этом взаимодействии сорбентом удерживается лишь тот компонент, который обладает сродством к веществу, находящемуся на сорбенте. Остальные компоненты смеси сорбентом не задерживаются. Таким образом, вещество, обладающее сродством к веществу, закрепленному на сорбенте, отделяется от остальных компонентов исследуемой смеси.

Появление аффинной хроматографии для разделения полинуклеотидов и НК относится к 1962 г., когда были предложены сразу два типа сорбентов. Первый из них — гели, содержащие нуклеиновые кислоты (механическая сорбция)²⁰² и второй — целлюлоза с ковалентно присоединенными моно- и полинуклеотидами (химическое связывание)^{203, 204}. Механическая сорбция в гелях агар-агара^{202, 205–208} ацетилированной фосфоцеллюлозы²⁰² и полиакриламида²⁰⁹ позволяет готовить сорбенты с высоким содержанием нуклеотидного материала. НК и полинуклеотиды находятся внутри гранулы.

Гели обладают высокой избирательностью к и-РНК и сорбируют из растворов лишь собственную и-РНК, «чужая» и-РНК гелями не удерживается^{202–208}. Удержанная и-РНК может быть удалена из геля элюцией градиентом температуры или уменьшением ионной силы. При этом фракции и-РНК, богатые ГЦ-вымываются с колонки при большей температуре²⁰⁷. Полиуридиловая кислота в полиакриламидном геле дает комплексы с олиго- и поли-адениловой кислотой²⁰⁹.

Простота приготовления гелей, содержащих полинуклеотиды, и довольно мягкие условия их приготовления, способствующие сохранению нативности НК, безусловно являются достоинствами механического способа приготовления аффинных сорбентов. Следует отметить, что в этом случае сорбция из растворов может наблюдаться лишь для веществ, обладающих меньшим молекулярным весом, чем у нуклеотидного вещества в геле. Этот недостаток может быть устранен при использовании гелей, гранулы которых покрыты снаружи молекулами полинуклеотида, которые затем «сшиты» друг с другом под действием УФ-облучения^{210–212}. Следует отметить, что гели часто обладают низкой механической прочностью. Указанные недостатки необходимо учитывать при работе с ними.

В качестве сорбента для аффинной хроматографии НК используют также нитроцеллюлозу. Известно, что нитроцеллюлоза в определенных условиях необратимо связывает денатурированную ДНК. Природа связывания неизвестна, однако ни нативная ДНК, ни РНК не удерживаются нитроцеллюлозой. Низкомолекулярные фрагменты денатурированной ДНК не сорбируются нитроцеллюлозой²¹³. Денатурированная ДНК, иммобилизованная нитроцеллюлозой, избирательно связывает полинуклеотиды, обладающие сродством с ДНК. Этим методом возможно исследовать комплексообразование с ДНК^{214–223}.

Белки, иммобилизованные нитроцеллюлозой, в частности аминокислота т-РНК-лигазы, позволяют исследовать комплексы этих ферментов с т-РНК и выделять обогащенные препараты т-РНК^{224, 225}.

Из механических аффинных сорбентов следует отметить также ДНК, иммобилизованную целлюлозой^{225, 226}. Однако этот сорбент широко используется пока лишь для очистки белков, дающих специфические комплексы с НК^{226—229}.

Большое распространение аффинная хроматография НК и полинуклеотидов получила на сорбентах, содержащих ковалентно связанные полинуклеотиды. Синтез таких сорбентов осуществляется конденсацией целлюлозы или фосфоцеллюлозы с моно-^{203, 230—232}, олиго- и поли-нуклеотидами^{204, 230, 232—235}, РНК^{204, 230, 232} и ДНК^{236—238} в присутствии циклогексилкарбодимида или сефарозы, обработанной бромцианом²³⁹. Хроматографией на таких сорбентах возможно исследование комплексов РНК — ДНК^{236—238}, очистка т-РНК²³⁵ и разделение поли- и олиго-нуклеотидов^{231, 233—235}.

Для хроматографии НК описано также использование ферментов, ковалентно связанных с сефадексом²⁴⁰, а также Hg-содержащих сорбентов, специфически связывающих ДНП-комплексы, имеющие в своем составе SH-группы^{241, 242}. Для выделения полинуклеотидов со свободной *цис*-гликольской группой на 3'-конце молекулы можно использовать борат-содержащую целлюлозу^{243, 244}.

Таким образом, видно, что аффинная хроматография с успехом может быть использована для фракционирования различных НК и полинуклеотидов. В отличие от методов, приведенных ранее, этот вид хроматографии позволяет использовать для разделения более тонкие механизмы — сродство выделяемого вещества к специально приготовленному сорбенту. Для реализации этого сродства можно использовать определенную реакционноспособную группу (к SH-группам ДНК, к концевому остатку рибозы), силы комплементарного взаимодействия (РНК — ДНК комплексы, взаимодействия полинуклеотидов) и комплексобразование с белками.

4. Гельфильтрация и другие методы разделения

Разделение НК на гелях сефадекса и полиакриламида используется лишь для частичной очистки от других видов НК, и от низкомолекулярных соединений. Наибольшее распространение гелъхроматография получила для очистки т-РНК^{245—255}, при этом наблюдается даже частичное фракционирование т-РНК^{256, 257}. Метод пригоден также для выделения крупных фрагментов т-РНК и исследования их взаимодействия друг с другом^{258, 259}. Для нуклеиновых кислот с большим молекулярным весом гелъфильтрация находит ограниченное применение, так как их водные растворы обладают большой вязкостью, что, как известно, сильно затрудняет хроматографическое разделение этим методом.

Такие методы фракционирования НК, как хроматография на бумаге и в тонких слоях получили ограниченное распространение^{260—262}.

III. ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ

В последнее время развитие методов фракционирования олигонуклеотидов определялось направлениями, связанными с выяснением структуры НК и их фрагментов, ответственных за важные биохимические функции и работами по синтезу олигонуклеотидов и НК. Успехи в этих областях: установление структуры более чем 50 т-РНК, нескольких 5S РНК и крупных фрагментов рибосомальных и вирусных РНК, синтез ДНК-копии аланиновой т-РНК и др. во многом объясняются до-

стижениями в разработке микрометодов фракционирования олигонуклеотидов. При разделении олигонуклеотидов широкое распространение получили методы ионообменной хроматографии на колонках, бумаге и в тонком слое, распределительной хроматографии на бумаге и в тонком слое и комбинации этих методов с электрофорезом.

1. Ионообменная хроматография

Метод обладает хорошей разрешающей способностью и позволяет работать как в препаративном, так и в аналитическом вариантах. Основным фактором, определяющим разделение, является суммарный заряд олигонуклеотида. Эту величину легко вычислить^{263, 264} при различных рН, используя значения рК ионных групп нуклеотидов. Поскольку сила связывания с сорбентом в первую очередь определяется величиной заряда олигонуклеотида (чем больше величина заряда, тем прочнее связывание), то, оценив эту величину, можно предсказать подвижность олигонуклеотидов друг относительно друга в условиях разделения. Порядок выхода олигонуклеотидов с колонки, полученный на основании расчета величин зарядов, будет, несомненно, приблизительным, так как кроме ионного взаимодействия с сорбентом наблюдается также гидрофобное взаимодействие и взаимодействие, обусловленное водородными связями. Однако расчет зарядов олигонуклеотидов во многих случаях, безусловно, полезен, так как позволяет подобрать оптимальное значение рН для разделения.

На основании описанных в литературе данных по системам хроматографического фракционирования олигонуклеотидов можно сделать вывод, что однократная ионообменная хроматография на колонке дает хорошие результаты лишь в случае простых смесей олигонуклеотидов и оказывается недостаточно эффективной для сложных смесей. В таких случаях необходимо повторное фракционирование.

Принципы выбора двойных систем (двумерная хроматография на колонках), предложенные в 1963 г.²⁶³ оправдали себя при разделении сложных смесей олигонуклеотидов^{265–270}.

При выборе двойных систем желательно использовать разные виды сорбентов и проводить разделение при существенно отличных рН. Хорошие результаты получаются при последовательном разделении сначала при нейтральных значениях рН в водных растворах солей в 7 М мочевины (хроматография по Тенеру)^{271–273} на ДЭАЭ-целлюлозе или ДЭАЭ-сефадексе, а затем — либо в кислой, либо в щелочной среде на сорбентах любого типа. В 7 М растворе мочевины в области рН 5,4–8,0 смеси олигонуклеотидов разделяются на фракции, каждая из которых содержит одинаковое число нуклеотидных остатков (моно- и ди-, три-нуклеотиды и т. д.). Эта система может быть использована для разделения как рибо-, так и дезоксирибоолигонуклеотидов^{271–276} и дает хорошее разрешение фракций, вплоть до декануклеотидов. Лучшие результаты при прочих равных условиях достигаются на ДЭАЭ-сефадексе^{266, 270}. Для гомеолигонуклеотидов использование мочевины не обязательно^{277, 278}.

Разделение в кислой среде, проводят обычно при рН 2–5. Среди сорбентов, которые приводят к хорошим результатам, следует отметить, дауэкс-1^{263, 268, 279}, ДЭАЭ-целлюлозу^{275, 280, 281}, ДЭАЭ-сефадекс^{263, 264, 270} и ТЭАЭ-целлюлозу²⁸². При фракционировании в щелочной среде, как правило, используют ДЭАЭ-сефадекс и ДЭАЭ-целлюлозу. Хорошее разрешение наблюдается при рН 8,5–9,0^{263, 283, 284}. В качестве примера двумерного фракционирования олигонуклеотидов можно провести разделе-

ние олигонуклеотидов пиридилрибонуклеазного (пиридил-РНК-азного) гидролизата т-РНК^{вал} из дрожжей²⁸⁵ (см. рис. 3).

Следует отметить, что как в кислой, так и в щелочной среде, наблюдается разделение отдельных изомерных олигонуклеотидов^{283, 286}.

Несколько слов о хроматографии на гидроксилпатите. Для олигонуклеотидов этот сорбент предложен недавно^{144, 287, 288}. Эффективность разделения олигонуклеотидов на ГА в 7 М мочеvine в градиенте фосфатного буфера (0,001—0,2 М) при рН 6,8 выше, чем при хроматографии по Тенеру на ДЭАЭ-сефадексе.

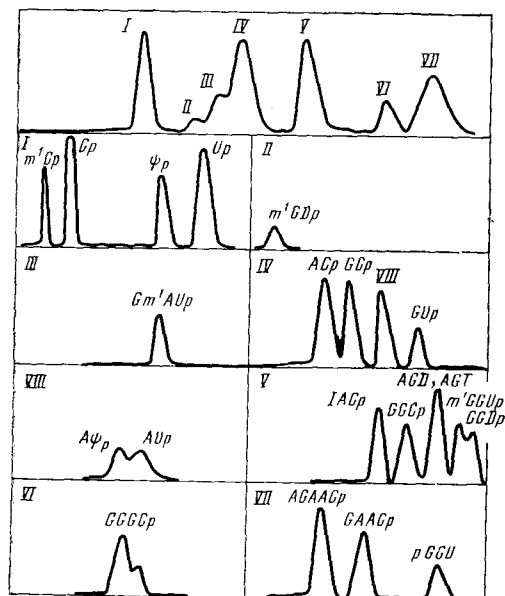


Рис. 3. Разделение олигонуклеотидов пиридил-РНК-азного гидролизата т-РНК^{вал} из дрожжей в ультрамикромасштабе²⁸⁵

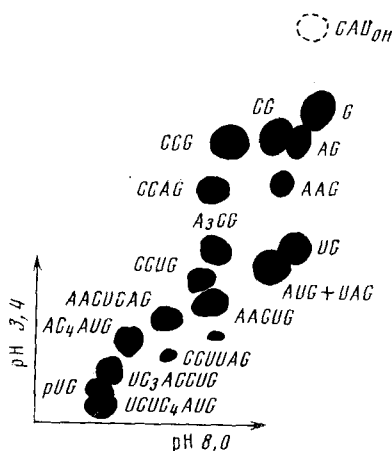


Рис. 4. Разделение пиридил-РНК-азного гидролизата 5S РНК *E. coli* на пластинках с ПЭИ-целлюлозой³⁰⁷

Для получения хорошего разрешения при фракционировании олигонуклеотидов на ионитах обычно проводят разделение на колонках с соотношением диаметр — высота от 1:10 до 1:50, объем градиента — 100—200 объемов колонки и скорости элюции 0,2—0,6 мл/мин·см². При этом желательно использовать сорбент, частицы которого имеют одинаковые размеры. Для знакомства с методами фракционирования ионообменников по размерам можно рекомендовать работы^{289, 290}. Гомогенность размеров частиц сорбента (разброс 5—10 мк) особенно необходима при работе на колонках в ультрамикромасштабе.

Увеличение чувствительности колоночных методов хроматографии может быть достигнуто двумя способами — увеличением чувствительности детектора²⁹¹ и уменьшением масштаба хроматографии. Уменьшение масштаба хроматографии позволяет снизить количество разделяемых веществ на 2—3 порядка при одной и той же чувствительности детектора^{285, 291}. Так, при работе на колонках размером 0,6×100 мм при объеме градиента 300 мкл удается разделить 10⁻⁷—10⁻⁹ моля НК и олигонуклеотидов^{285, 292—294}. Существенным моментом при работе в ультрамикромасштабе является то, что при работе могут быть использованы хроматографические системы, опубликованные и проверенные на больших количествах веществ^{285, 292—294}.

Фракционирование олигонуклеотидов на ионообменных бумагах^{295–298} получило меньшее распространение, чем колоночная хроматография, так как не позволяет использовать градиентную элюцию и обладает малой разрешающей способностью. Кроме того, механическая непрочность ионообменных бумаг делает этот метод мало перспективным. Следствием этого явилось то, что в настоящее время хроматография на ионообменных бумагах как самостоятельный метод практически не употребляется.

Недостатки фракционирования на ионообменных бумагах удалось устранить использованием фракционирования олигонуклеотидов в тонких слоях ионообменной целлюлозы. Своим появлением в применении к компонентам нуклеиновых кислот этот метод обязан Рандерату^{299–302}. Легкость приготовления сорбентов и простота изготовления пластинок делают этот метод очень привлекательным. Хроматография олигонуклеотидов в тонких слоях проводится в большинстве случаев на полиэтиленминцеллюлозе (ПЭИ-целлюлозе) в двумерном варианте. Чувствительность метода при детекции фракций по поглощению в УФ-области очень высока и составляет 0,5–1 мкг вещества в пятне и может быть существенно повышена при использовании радиоактивных препаратов *in vivo*, либо искусственным введением радиоактивной метки, как это предложено для олигонуклеотидов^{303, 304}. Хроматография в тонких слоях ПЭИ-целлюлозы отличается хорошей разрешающей способностью^{305–307} (см. рис. 4) и не требует ни сложного оборудования, ни длительного времени для разделения. Кроме того для приготовления пластинок можно использовать смеси ПЭИ-целлюлозы с другими сорбентами, например с целлюлозой³⁰⁸, что открывает большие возможности для варьирования условий разделения.

Для проявления хроматограмм используют различные солевые системы^{305, 306, 309, 310}. Для удобства работы часто используют летучие буферные растворы на основе пиридина, либо соли лития, так как они хорошо экстрагируются метанолом. Это позволяет легко обессоливать олигонуклеотиды непосредственно на пластинках. К сожалению, хроматография в тонких слоях ПЭИ-целлюлозы еще недостаточно широко используется для фракционирования олигонуклеотидов. Однако успехи при разделении различных смесей олигонуклеотидов^{305–310}, исследование комплексобразования полинуклеотидов с олигонуклеотидами³¹¹, а также прекрасные результаты по разделению сложных смесей длинных олигонуклеотидов при комбинации с электрофорезом (см. ниже) позволяют с уверенностью сказать, что фракционирование олигонуклеотидов в тонких слоях ПЭИ-целлюлозы является одним из самых перспективных методов разделения. Приготовление сорбентов для тонкослойной хроматографии и технику разделения см.^{305, 312–314}.

2. Распределительная хроматография

Хроматография олигонуклеотидов на различных сорбентах в водно-органических средах не является новым методом. Ее появление относится к началу пятидесятих годов, однако этот метод и в настоящее время не потерял своего значения при изучении НК и их компонентов. Классический вариант такой хроматографии — двумерная хроматография на бумаге, сыграла существенную роль при изучении строения т-РНК^{315–319} и анализе продуктов расщепления ДНК^{320, 321}. Наиболее распространенная система — изомасляная кислота: 0,5 М NH_3 , pH 3,7 в первом направлении, для второго направления используют либо смесь бутанола — муравьиная кислота (1 : 1) pH 3,8^{315, 317–319, 321}, либо смеси бутанола с лету-

чими буферами^{316, 320, 322}. Для разделения простых смесей олигонуклеотидов кроме указанных систем можно рекомендовать растворители, содержащие ацетонитрил³²³ и этиловый спирт³²⁴. Большую помощь синтетикам может оказать знание величин R_f в различных системах для синтетических олигонуклеотидов и их производных³²⁵⁻³³⁶.

Системы растворителей, используемые для хроматографии на бумаге, оказались весьма эффективными и при разделении олигонуклеотидов в тонких слоях целлюлозы³³⁷⁻³³⁹ и силикагеля^{336, 340}. Несмотря на это, распределительная хроматография в настоящее время используется редко, так как на фоне других методов разделения трудности, связанные с обессоливанием олигонуклеотидов до и после разделения, делают работу по разделению олигонуклеотидов этим методом весьма трудоемкой.

3. Электрофорез и различные комбинации хроматографических методов

Наличие у олигонуклеотидов отрицательного заряда делает возможным разделение этих веществ методом электрофореза. При градиенте напряжения E молекула олигонуклеотида движется к аноду. Скорость движения (V) достаточно хорошо описывается уравнением $V = \frac{E \cdot Q}{K}$,

где E — градиент напряжения, Q — суммарный заряд олигонуклеотида, а K — константа, зависящая от размеров и формы молекулы и от среды, в которой проводят разделение (сорбент, состав ионов и т. д.). Величина K возрастает с увеличением ионной силы буферного раствора, в котором проводится разделение и уменьшается с повышением температуры^{341, 342}. При этом, если электрофорез проводят на нейтральном носителе, например на бумаге или в тонком слое целлюлозы, скорость движения тем выше, чем больше суммарный заряд вещества. Иная картина наблюдается при проведении электрофореза на ионообменных носителях. В этом случае скорость движения вещества тем больше, чем меньше у него заряд. Замедление скорости движения у веществ, имеющих большой заряд, объясняется тем, что они прочнее удерживаются ионными группами носителя. Для фракционирования олигонуклеотидов используются оба типа носителей.

Наилучшие результаты получают при проведении электрофореза в кислой среде в двух перпендикулярных направлениях на ацетилированной целлюлозе и ДЭАЭ-бумаге. В данном варианте метод впервые предложен Сангером³⁴³ для ^{32}P -олигонуклеотидов. Разделение на ацетилированной целлюлозе проводят в пиридин-ацетатном буфере pH 3,5, либо в том же буфере в 7 М мочеvine³⁴³⁻³⁴⁸. Технику электрофореза см.³⁴²⁻³⁴⁵.

Вместо ацетата целлюлозы используют также ДЭАЭ-бумагу³⁴⁹ при pH 9,7. Замена ацетилированной целлюлозы на бумагу «ватман» 3 ММ несколько ухудшает разделение³⁵⁰.

Для разделения во втором направлении в качестве растворителя используют смесь 2,5% муравьиной и 8,7% уксусной кислот (по объему) (pH 1,9), 7% муравьиную кислоту³⁴⁴⁻³⁴⁷ или буферные растворители с pH 3,5 и 6,5^{346, 349}. Электрофорез проводят на ДЭАЭ-³⁴³⁻³⁴⁹, аминоктил-целлюлозе и эктеолацеллюлозе (Э-целлюлозе)³⁴⁹.

Метод Сангера дает хорошее разделение с разрешением до 200 фракций олигонуклеотидов (см. рис. 5) и получил широкое распространение для анализа структуры нуклеиновых кислот.

Интересными модификациями этого метода является использование электрофореза в комбинации с ионообменной хроматографией в тонких слоях ПЭИ-целлюлозы^{306, 308} и метод «гомохроматографии»³⁵¹⁻³⁵⁶. Сущ-

ность «гомохроматографии» состоит в следующем. Если пластинку с тонким слоем ионообменной целлюлозы поместить одним концом в раствор смеси олигонуклеотидов и дать этому раствору подняться на некоторое расстояние, то олигонуклеотиды распределяются вдоль пластинки следующим образом. Вверху пластинки будут находиться мононуклеотиды, ниже — динуклеотиды и т. д., т. е. олигонуклеотиды распределяются по зонам с гомогенной длиной. Отсюда и название метода — «гомохроматография». Следует отметить, что такое распределение по зонам одинаковой длины возможно только в случае, если количество олигонуклеотидов больше, чем емкость зон ионообменника, так как только в этом случае олигонуклеотиды с большей длиной вытесняют менее длинные олигонуклеотиды вследствие более прочного связывания с ионитом.

При хроматографии ^{32}P -олигонуклеотидов в «гомосмесях» нерадиоактивных олигонуклеотидов получается хорошее разделение для длинных олигонуклеотидов (до 40—50 нуклеотидных остатков и ниже). Фракционирование проводят при повышенных температурах (50—60°), что дает лучшее установление равновесия и исключает возможность комплексообразования комплементарных олигонуклеотидов. Состав «гомосмесей» можно найти в работах ^{294, 345, 351, 352}.

Метод двумерного фракционирования олигонуклеотидов позволил провести работы по определению структуры ряда, т-РНК ^{354, 357—367}, низкомолекулярных РНК ^{317, 351, 368—370} крупных фрагментов 16S и 23S рибосомальных РНК ^{346, 371, 372, 379} и РНК фагов ^{353, 373—378}. Показана также возможность использования этого метода для анализа структуры ДНК ^{349, 355, 356}. Имеющийся недостаток, связанный с невозможностью идентификации вещества по УФ-спектрам, что особенно важно для минорных компонентов, носит принципиальный характер. Для нуклеиновых кислот, которые трудно получить в радиоактивном варианте, возможно введение радиоактивной метки в концевой нуклеотид ^{303, 304, 379}, что существенно расширяет возможности метода. Метод безусловно является одним из лучших для фракционирования олигонуклеотидов.

IV. НУКЛЕОТИДЫ

1. Хроматография в тонких слоях

А. Целлюлоза

Этот метод в настоящее время, по-видимому, наиболее широко используется для анализа смеси нуклеотидов, нуклеозидов и оснований нуклеиновых кислот. Приготовление целлюлозных слоев довольно подробно описано в обзорах ^{305, 360—383} и работах ^{384—387}.

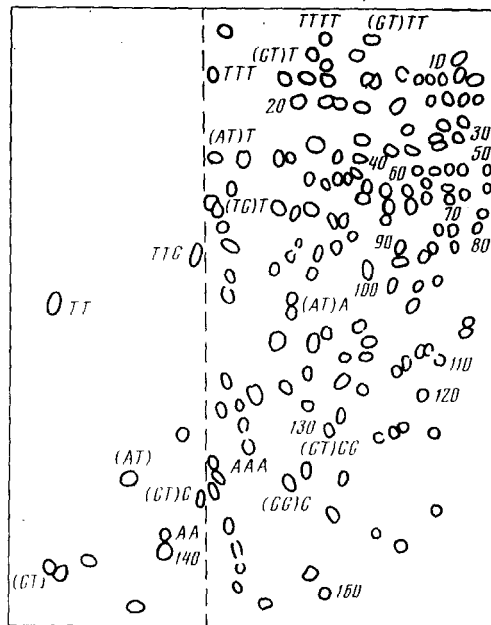


Рис. 5. Разделение ^{32}P -дезоксирiboолигонуклеотидов двумерным высоковольтным электрофорезом ³⁴⁹

Сравнительное разделение нуклеотидов в тонком слое целлюлозы и на бумаге в четырех различных растворителях при одинаковых условиях провел Рандерат^{384, 388}. При этом было установлено, что для разделения в тонком слое могут быть применены те же системы растворителей, которые разработаны для бумаги.

Для фракционирования нуклеотидов в тонком слое целлюлозы было использовано множество систем^{380, 382, 385—390}. Соответствующие значения R_f для некоторых растворителей приведены в табл. 3. В большинстве

ТАБЛИЦА 3

Величины R_f при хроматографии рибо- и дезоксирибонуклеотидов в тонком слое целлюлозы^{385, 395}

Нуклеотид	Растворители				Нуклеотид	Растворители			
	I	II	III	IV		I	II	III	IV
AMP	0,34	0,34	—	0,38	dAMP	0,25	0,27	0,07	0,54
CMP	0,39	0,73	—	0,34	dCMP	0,53	0,63	0,09	0,49
GMP	0,26	0,53	—	—	dGMP	0,15	0,47	0,05	0,33
UMP	0,62	0,71	—	0,37	dTMP	0,89	0,54	0,18	0,58

I — изопропанол (HCl) — вода (65:16, 7:18,3).
 II — *n*-бутиловый спирт — вода (86:14).
 III — *n*-бутиловый спирт — вода — 90% муравьиная кислота (60:30:10).
 IV — *n*-бутиловый спирт — ацетон, уксусная кислота — 5%-ный водный аммиак — вода (3,5:2,5:1,5:1,5:1,0) для дезоксирибонуклеотидов (4,5:1,5:1:1:2) для рибонуклеотидов.

систем происходит разделение нуклеотидов как по основаниям, так и по типу углеводного остатка. Для хорошего воспроизведения результатов образец для хроматографирования должен быть нейтрализован и освобожден от солей и белков³⁸⁵. При разделении нуклеотидов с близкими значениями R_f можно использовать повторное пропускание растворителя в том же направлении.

Хорошее разделение нуклеотидов происходит при двумерном хроматографировании^{385, 390—395} или при сочетании тонкослойной хроматографии с тонкослойным электрофорезом^{337, 396—398}. Так, например, Бергюст³³⁷ для разделения энзиматического гидролизата т-РНК использовал в первом направлении электрофорез (фосфатный буфер, pH 2,45). Во втором — хроматографию в системе *трет.*-бутиловый спирт — 0,08 М муравьиная кислота — изоамиловый спирт (50:50:2) и затем *n*-бутиловый спирт — вода (86:14) в том же направлении. Тонкослойным электрофорезом и последующей хроматографией на целлюлозе в системе насыщенный сульфат аммония — 1 М ацетат натрия — изопропиловый спирт (80:18:2) были разделены все четыре рибонуклеотида и изомерные 3'- и 3'-фосфаты адениловой и гуаниловой кислот³⁹⁶. Этот метод использовался для определения нуклеотидного состава РНК. В работе³⁹⁶ приведены значения R_f для каждого нуклеотида.

Двумерная хроматография в различных системах позволяет успешно разделять щелочные гидролизаты РНК^{396—400} или ферментативные гидролизаты ДНК⁴⁰¹.

Б. Силикагель

Из неорганических сорбентов в хроматографическом анализе компонентов нуклеиновых кислот наиболее часто используется силикагель. Обычно его используют без цементированья^{402—420}, хотя в некоторых случаях используют и закрепленные слои^{421—428}. Разделение на силика-

геле, как правило, хуже, чем на целлюлозе^{300, 381, 384, 426, 427} и поэтому его редко используют как для аналитических целей, так и для разделения незащищенных производных. Однако, поскольку емкость слоев силикагеля значительно превосходит емкость целлюлозы, то разделение на силикагеле часто используется для препаративных целей, особенно в случае синтетических производных нуклеиновых кислот^{402, 415, 418, 419, 426}. Для разделения используют различные силикагели⁴²⁶⁻⁴³². Величины R_f нуклеотидов приведены в работе⁴²⁶. Нуклеозид-2'(3')-монофосфаты отделяются от 5'-фосфатов, однако как те, так и другие практически не разделяются по основаниям. Повторное пропускание растворителя в том же направлении улучшает разделение. Для фракционирования смеси, содержащей аденозин, 3'- и 5'-адениловую кислоту и циклофосфат адениловой кислоты было предложено использовать силикагель, обработанный 5%-ным тетраборатом⁴¹¹.

Разделение нуклеотидов щелочного гидролизата РНК было достигнуто применением смеси (9:1) целлюлозы и силикагеля⁴³³. При этом наличие солей в гидролизате практически не влияло на разделение нуклеотидов.

В. Ионообменные смолы

В течение последних 10 лет интенсивно развиваются и осваиваются методы хроматографии нуклеотидов и их производных в тонком слое ионообменных целлюлоз. Ионообменные целлюлозы могут быть приготовлены обработкой немодифицированной или модифицированной целлюлозы высокомолекулярными основными или кислотными производными^{391, 434}.

Сравнительное изучение фракционирования нуклеотидов и олигонуклеотидов на разных сортах ионообменной целлюлозы¹³⁴⁻¹³⁷ показало, что целлюлоза, обработанная ПЭИ, превосходит другие ионообменные целлюлозы по четкости разделения соединений. Очевидно, что результаты разделения зависят от содержания ПЭИ, который определяет емкость слоя⁴³⁸. Хорошее разделение получается на слоях, содержащих 0,5—1% ПЭИ^{380, 388, 435, 438}. Обычно используют целлюлозные пластинки, приготовленные согласно Рандерату^{309, 311, 380, 388, 391, 435, 436, 438}.

В отличие от слоев немодифицированной целлюлозы на пластинку с ПЭИ-целлюлозой можно наносить большой объем раствора без подсушивания, поскольку нуклеотиды прочно связываются с ионообменником и поэтому концентрируются в центре пятна. Было отмечено, что для оптимального разделения нуклеотидов рН наносимого образца должен быть приблизительно равен рН первого растворителя⁴³⁹. Анализируемые растворы должны быть весьма разбавленными. Для аналитической работы лучше всего использовать концентрации от 0,0005 до 0,005 М, для микропрепаративных исследований (с несколькими миллиграммами вещества) — 0,005 до 0,02 М³⁶⁵.

Нуклеотиды разделяются на пластинках с ПЭИ-целлюлозой при провлении водными растворами электролитов^{305, 438, 440-449}. В некоторых случаях к растворам электролитов добавляют органические растворители³⁰⁵. Для фракционирования нуклеотидов обычно проводят градиентную элюцию как ступенчатую, так и непрерывную. Подвижность каждого вещества в основном определяется величиной отрицательного заряда, которая зависит от рН. Наиболее хорошие и четкие результаты при разделении нуклеотидов получаются при кислых значениях рН (1—3 М муравьиная кислота с добавлением LiCl)^{305, 438, 439, 443}. В таблице 4 приведены величины R_f для различных мононуклеотидов.

ТАБЛИЦА 4

Величины R_f ($\times 100$) нуклеотидов и их производных при тонкослойной хроматографии на ПЭИ-целлюлозе^{380, 438}

Веще- ство	Растворители *												
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
AMP	11	52	65	68	80	80	80	80	80	80	61	69	74
IMP	13	59	74	40	60	73	80	19	53	78	04	52	72
GMP	06	40	51	28	45	57	65	41	50	72	07	45	62
CMP	15	64	75	70	80	80	80	80	80	80	76	79	80
UMP	20	74	80	51	72	80	80	20	64	80	06	62	77
ADP	00	26	54	03	10	32	75	03	29	70	00	19	52
IDP	00	30	63	00	04	14	49	00	03	55	00	05	30
GDP	00	17	45	00	02	03	34	00	13	61	00	05	27
CDP	00	33	64	03	20	45	80	04	35	73	00	26	56
UDP	00	41	71	02	07	24	60	00	11	60	00	08	40
ATP	00	00	34	00	00	04	24	00	04	33	00	01	12
ITP	00	09	39	00	00	02	11	00	02	17	00	00	05
GTP	00	05	25	00	00	00	07	00	02	24	00	00	05
CTP	00	11	41	00	02	05	29	00	04	37	00	02	16
UTP	00	14	49	00	00	02	17	00	02	20	00	01	07

* Состав растворителей: I — 0,25 M LiCl; II — 1,0 M LiCl; III — 1,6 M LiCl; IV — 0,5 M натрий-форматный буфер, pH 3,4; V — 1,0 M натрий-форматный буфер, pH 3,4; VI — 2,0 M натрий-форматный буфер, pH 3,4; VII — 4,0 M натрий-форматный буфер, pH 3,4; VIII — 1,0 N HCOOH; IX — 2,0 N HCOOH — 0,5 M LiCl; X — 2,0 N HCOOH — 2,0 M LiCl (1:1); XI — 1,0 N CH₃COOH; XII — 1,0 N CH₃COOH — 3 M LiCl (9:1); XIII — 1,0 N CH₃COOH — 4 M LiCl (8:2).

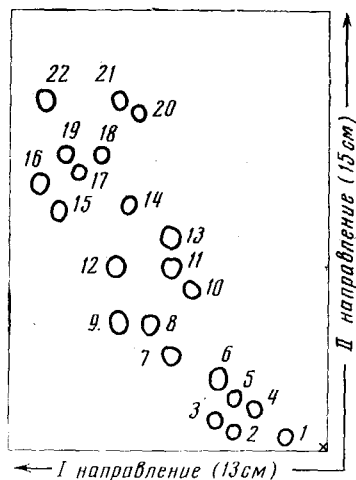
Смеси нуклеотидов успешно разделяются при ступенчатом элюировании растворителями с возрастающей концентрацией электролита⁴³⁸. Первому растворителю дают подняться на определенную высоту, затем пластинку, не высушивая, переносят в камеру с другим растворителем и т. д. Щелочные гидролизаты РНК и смеси нуклеозид-5'-монофосфатов, разделяют с помощью одномерной хроматографии на слоях ПЭИ-целлюлозы путем ступенчатого элюирования растворами уксусной кислоты и LiCl^{309, 444}. Скорость перемещения компонентов щелочного гидролизата РНК уменьшается в следующем порядке: нуклеозиды > (2'-+3'-CMP), 2'-AMP > 3'-AMP > (2'-+3'-UMФ) > (2'-+3'-GMP). Тот же порядок элюирования сохраняется для 5'-изомеров и соответствующих производных, содержащих дезоксирибозу^{380, 444}. Иногда используют также элюирование при градиенте концентрации соли⁴⁴⁰⁻⁴⁴⁵.

При ступенчатом хроматографировании смеси нуклеозидмоно-, ди-, и трифосфатов в 0,6 M; 0,8 M и 1,25 M NaCl без промежуточного высушивания пластинок достигается четкое разделение этих производных^{310, 436, 446, 447}.

Особенно хорошо разделяются компоненты щелочных гидролизатов РНК при восходящей непрерывной хроматографии^{380, 440}. Техника с использованием непрерывного линейного солевого градиента достаточно подробно описана в работе⁴⁴⁸.

В растворителях, содержащих борат, можно отделять дезоксирибонуклеотиды от рибонуклеотидов^{437, 438, 450-452}. Боратные комплексы рибонуклеотидов имеют дополнительный отрицательный заряд и двигаются медленнее дезоксирибонуклеотидов⁴³⁸. Обычно для разделения рибо- и дезоксирибонуклеотидов применяют системы: 2% H₃BO₃—2 M LiCl (2:1) — для нуклеозидмонофосфатов и 4% H₃BO₃—4 M LiCl (4:3) — для ну-

Рис. 6. Двумерная хроматография нуклеотидов на ПЭИ-целлюлозном слое. Первое направление: 2 мин. 0,2 М LiCl; 6 мин. 1 М LiCl и 1,6 М LiCl до 13 см. Второе направление: 30 сек. 0,5 М буфер; 2 мин. 2 М буфер и 4 М буфер до 15 см (буфер, формиат натрия, pH 3,4) ⁴⁵⁵.
 1 — GTP, 2 — ITP, 3 — UTP, 4 — ATP,
 5 — CTP, 6 — GDP, 7 — IDP, 8 — UDP,
 9 — UDPGA, 10 — ADP, 11 — CDP, 12 — GDPM, 13 — GMP, 14 — IMP + TPN,
 15 — UDPG, 16 — UDPAG, 17 — ADPG,
 18 — UMP, 19 — CDPG, 20 — AMP, 21 — CMP, 22 — DPN



клеозидтрифосфатов ^{438, 453}. Поскольку в обратной системе наблюдается хорошее фракционирование дезоксирибонуклеотидов, то ее иногда используют для разделения ферментативных гидролизатов ДНК ^{442, 453, 454}.

Смеси нуклеотидов или гидролизаты РНК можно фракционировать также путем двумерной хроматографии на слоях ПЭИ-целлюлозы ^{439, 449}. Перед пропусканием второго растворителя с пластинки важно удалить первый. Ранее Рандерат ^{380, 438} для этой цели предложил промывку пластинки после высушивания метанолом. Если, однако, для первого направления использовать летучий растворитель, например, муравьиную кислоту, то перед вторым хроматографированием достаточно просто высушить пластинку ⁴³⁹. Смесь рибонуклеотидов, содержащая моно-, ди- и трифосфаты различных нуклеозидов, была фракционирована восходящей двумерной хроматографией на ПЭИ-целлюлозе ⁴⁵⁵ (рис. 6). В первом направлении проводилось ступенчатое элюирование растворами LiCl, во втором — ступенчатое элюирование натрий-формиатным буфером (pH 3,4). Весь процесс разделения смеси нуклеотидов занимает около 3 часов. Фракционирование сложной смеси рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов с помощью двумерной хроматографии описано в работе ⁴⁵⁰. В более поздних работах ^{452, 456—458} аналогичное хроматографирование использовано для разделения биологических материалов. Для наилучшего разделения экстракты из биологического материала перед хроматографией иногда предварительно очищают, однако в большинстве случаев хроматографию проводят без предварительной очистки. Хроматография образцов, содержащих большое количество солей, описана в работе Фостера ⁴⁴¹.

Поскольку ПЭИ-целлюлоза обладает высокой емкостью, она может быть использована и для микропрепаративных разделений. Для этой цели используют слои толщиной 1—1,5 мм, которые позволяют фракционировать миллиграммовые количества ^{305, 438}. Обессоливание фракций в случае ТСХ проводят промывкой всей пластинки метанолом и последующей элюцией (обычно летучими буферами или разведенными растворами HCl) отдельных пятен ^{380, 438, 439}. При стандартном способе приготовления пластинок средние отклонения в значениях R_f не превышают отклонения для обычной ТСХ и составляют $\pm 0,005—0,025$ из 10 определений ⁴⁵⁹. Воспроизводимость R_f , однако, зависит от качества целлюлозы. При хранении пластинок в течение ~ 100 дней (в темноте, комнатная температура) величины R_f практически не меняются ⁴⁵⁹.

Количественная экстракция нуклеотидов с ПЭИ-целлюлозного слоя довольно подробно описана в работах^{380, 382, 442, 443, 458, 460}. Оптимальная концентрация веществ для количественного определения составляет 5—50 мкмоль^{380, 442}. Чувствительность метода можно значительно повысить и определять вещества в концентрации до 1 мкмоль и менее, уменьшая объем элюента и измеряя поглощение в микрокуветах или применяя радиоактивную метку^{443, 458}.

Наряду с целлюлозой для анализа рибо- и дезоксирибонуклеотидов, фосфорилированных в разной степени, применяются ДЭАЭ- и Э-целлюлозные слои^{385, 392, 440, 461—481}. Главное достоинство этих целлюлоз — быстрота разделения. Например, смесь 10^{-2} мкмоль АДФ и АТФ на Э-целлюлозе разделяется за 4—5 мин.^{461, 464, 467}. Приготовление пластинок с ДЭАЭ- и Э-целлюлозой описано в работах^{302, 385, 440, 463} и^{462, 475} соответственно. В качестве элюирующих растворителей обычно используют разбавленные растворы соляной или муравьиной кислот^{302, 385, 392, 461, 463, 464, 467}. Применение разбавленных растворов хлористого натрия дает менее четкое разделение⁴⁶¹. По утверждению Рандерата^{461, 464}, ДЭАЭ- и Э-целлюлозные слои дают примерно одинаковые результаты. На Э-целлюлозном слое фракционирование проходит быстрее.

Скорость движения разных нуклеотидов падает в ряду: $C > A > G > U$. Адениновые и цитидиновые нуклеотиды с одинаковым содержанием фосфатных групп плохо разделяются в разбавленной кислоте; их можно разделить в 0,1 М NaCl^{461, 464}. Значения R_f моно-, ди- и три-нуклеотидов на ДЭАЭ-целлюлозе в разбавленных растворах муравьиной или соляной кислот приведены в табл. 5.

ТАБЛИЦА 5

Величины R_f нуклеозидмоно-, ди- и -трифосфатов при тонкослойной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе^{461, 463, 467}

Вещество	В соляной кислоте				В муравьиной кислоте		
	0,01 N	0,02 N	0,03 N	0,04 N	1%	4%	10%
AMP	0,45	0,65	—	—	0,87	0,96	0,97
ADP	0,24	0,48	0,68	—	0,19	0,49	0,68
ATP	0,06	0,11	0,20	0,56	0,01	0,03	0,11
GMP	0,36	0,60	0,75	—	0,55	0,73	0,87
GDP	0,09	0,27	0,51	—	0,04	0,18	0,56
GTP	0,05	0,07	0,14	0,41	0,01	0,01	0,06
СМР	0,46	0,65	—	—	0,90	0,96	0,97
CDP	0,31	0,53	—	—	0,35	0,55	0,71
СТР	0,09	0,13	0,31	0,64	0,10	0,05	0,16
UMP	0,31	0,49	—	—	0,33	0,51	0,68
UDP	0,07	0,15	0,25	—	0,02	0,06	0,14
UTP	0,04	0,04	0,08	0,18	0,01	0,01	0,02
IMP	—	—	—	—	0,33	0,54	0,76
IDP	—	—	—	—	0,03	0,07	0,23
ITP	—	—	—	—	0,01	0,01	0,04
Неорганический фосфат					0,44	0,67	0,81

Хорошие результаты получаются при анализе смеси рибо- и дезоксирибонуклеотидмоно-, ди- и трифосфатов с одинаковыми гетероциклическими основаниями при двумерном хроматографировании на ДЭАЭ-целлюлозе. В первом направлении происходит четкое разделение по коли-

честву фосфатных групп, во втором — по типу сахарного остатка^{385, 465}.

Применение двумерной градиентной элюции (1,0 М NH_4HCO_3 — 0,15 М NH_4HCO_3 — для первого направления и 2,0 М NH_4HCO_3 рН 4,2 — 0,2 М NH_4HCO_3 рН 2,8 — для второго) позволяет разделить смесь моно-, ди- и трифосфатов четырех основных нуклеотидов, за исключением СТР и UDP⁴⁴⁰. Этот метод может быть использован для анализа биологических материалов^{462, 463, 466, 476}. Перед хроматографированием последних для отделения от полисахаридов и флюоресцирующих веществ, которые всегда содержатся в них, авторы предлагают гель-фильтрацию в тонком слое на сефадексе G-25⁴⁴⁰. Нуклеотидный материал элюируют с сефадекса водой и лиофилизируют.

ДЭАЭ-целлюлозный слой можно применять также и для разделения рибо- и дезоксирибонуклеозид-2'- и 3'-фосфатов в щелочных или энзиматических гидролизатах РНК и ДНК^{385, 477, 478}. Хроматографирование нуклеотид-2'- и -3'-фосфатов проводят в 0,05 N HCl для рибо- и дезоксирибопроизводных в первом направлении и в 0,035 N HCl для рибо- и 0,02 N HCl для дезоксирибонуклеотидов — во втором^{385, 464, 477}. При этом происходит фракционирование 2'- и 3'-адениловой кислот^{385, 464}. Разделение 2'- и 3'-изомеров всех нуклеотидов достигается на ДЭАЭ-целлюлозе, содержащей 10% CaSO_4 ⁴⁷⁸.

2. Электрофорез на бумаге и в тонком слое целлюлозы

Нуклеотиды и их производные содержат различные ионизируемые группы, так что электрофорез на бумаге и в тонком слое целлюлозы является ценным способом для их аналитического и препаративного разделения. Относительные подвижности нуклеотидов можно рассчитать при любом значении рН по величинам их зарядов, используя значения pK_a ионизируемых групп, которые известны²⁶⁵.

Четыре основных рибо- или дезоксирибонуклеотида разделяются при рН 3,5. При этом значении рН 2'- и 3'-изомеры гуаниловой кислоты имеют разные подвижности^{265, 343, 482, 483}.

С помощью электрофореза на бумаге можно отделить от других нуклеотидов и некоторые минорные нуклеотиды, однако для полного анализа, например, гидролизата т-РНК, его необходимо дополнительно разделять с помощью хроматографии в тонком слое или на колонках (см. соотв. разделы)^{343, 482, 483}. Подвижности рибонуклеотидов приведены в табл. 6.

Моно-, ди- и трифосфаты лучше всего разделяются в цитратном буфере с рН 5,0 или 7,0 в соответствии с числом диссоциированных фосфатных групп. В присутствии двухвалентных катионов подвижность нуклеозидтрифосфатов понижается²⁶⁵.

В боратном буфере с рН 9,2 можно отделить 2'- и 3'-рибонуклеотиды от 5'-рибонуклеотидов.

Электрофоретическое разделение нуклеотидов после гидролиза можно использовать для определения включения различных аналогов нуклеотидов в нуклеиновые кислоты. Например, рК 5-фтор, 5-бром, 5-хлор и 5-иодуридиловых кислот, 2-тиоуридиловой и 8-азогуаниловой кислоты ниже, чем у уридиловой, гуаниловой и тимидиловой кислот, и поэтому при рН 9,0 эти нуклеотиды движутся быстрее всех природных нуклеотидов²⁶⁵.

Компоненты гидролизатов РНК или ДНК могут быть разделены также с помощью электрофореза на слоях целлюлозы^{397, 461, 483-486}. Лучшее разделение при этом получается на хорошо дегазированной и промытой трилоном целлюлозе⁴⁸⁵.

Фракционирование 2',3'-рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов достигается при pH 3,4—3,5^{397, 484, 486}. Адениновые и инозиновые нуклеотиды разделяются при pH 5,1⁴⁸⁶. Моно-, ди- и тридезоксирибонуклеозидфосфаты каждого основания легко отделяются друг от друга при pH 5,5⁴⁸⁴.

ТАБЛИЦА 6

Относительные подвижности рибонуклеотидов* при электрофорезе на бумаге²⁶⁵

Нуклеотид	pH 3,5 **	pH 2,1 ***
4,5-Дигидроуридиловая кислота	1	—
Риботимидиловая кислота	0,98	—
Псевдоуридиловая кислота	0,98	—
Инозиновая кислота	0,90	—
Гуаниловая кислота	0,73	0,38
7-Метилгуаниловая кислота	0,98	—
1-Метилгуаниловая кислота	—	0,30
N ² -Метилгуаниловая кислота	—	0,30
N ² , N ² -Диметилгуаниловая кислота	0,76	0,25
Адениловая кислота	0,50	0
N ⁶ -Метиладениловая кислота	0,46	—
N ⁶ , N ⁶ -Диметиладениловая кислота	0,42	—
2-Метиладениловая кислота	0,25	—
Цитидиловая кислота	0,41	0

* За единицу принята подвижность уридиловой кислоты.

** 0,05 М формат аммония pH 3,5^{343, 483}.

*** 0,05 М фосфатный буфер с pH 2,1⁴⁸².

Применение электрофореза в тонком слое позволяет улучшить разделение некоторых нуклеотидных смесей, трудно поддающихся фракционированию распределительной или ионообменной хроматографией. Для этих целей электрофорез обычно проводят в одном из направлений при двумерном хроматографировании^{337, 396—398}. Микровариант электрофореза был применен Эдстромом для анализа нуклеотидов, полученных из нуклеиновых кислот одной клетки^{487, 488}.

3. Ионообменная хроматография на колонках

Как известно, ионообменная колоночная хроматография на полистироловых смолах, введенная Коном¹, успешно применяется для фракционирования различных производных нуклеиновых кислот в аналитическом и препаративном варианте. Общие основы и принципы разделения посредством ионообменной хроматографии на колонках были рассмотрены Коном еще в 1955 г. Методы колоночной ионообменной хроматографии довольно подробно описаны в трех статьях серии «Методы в энзимологии»⁴⁸⁹.

Разделение смеси рибо- или дезоксирибонуклеотидов^{490, 491} весьма удобно проводить на сильном анионите типа дауэкс-1 в кислых⁴⁹² или щелочных^{493—496} системах. В кислых системах порядок элюции нуклеотидов следующий: цитидиловая, адениловая, уридиловая и гуаниловая кислоты. В случае колонок с большим соотношением высота: диаметр иногда гуаниловая кислота опережает уридиловую⁴⁹⁷. Изомерные нуклеотиды делятся на 5'-, 2'- и 3'-фосфаты и выходят с колонки в указанном порядке⁴⁹⁷.

В щелочных системах порядок выхода нуклеотидов меняется на следующий: цитидиловая, уридиловая, адениловая и гуаниловая кислоты⁴⁹⁵.

В простейших случаях соотношение размеров колонки не имеет существенного значения, однако при разделении сложных многокомпонентных смесей к хорошему разделению приводит применение высоких колонок (высота : диаметр 50 : 1)⁴⁹⁷.

В большинстве систем, используемых для разделения известной смеси производных нуклеиновых кислот на колонках, концентрация или pH элюата увеличивается ступенчато. Однако для подбора условий разделения или разделения сложной смеси применяют метод градиентной элюции, при котором состав элюента меняется плавно с заданным градиентом. Чаще всего используют линейный градиент.

Более подробно хроматографическое разделение нуклеотидов на ионообменных колонках описано в обзорах^{4, 5, 491, 497}.

Свойство пуриновых и пиримидиновых производных интенсивно поглощать в области 260—290 нм было использовано для разработки микрометодов хроматографирования нуклеотидов, позволяющих определять небольшие количества последних и значительно сократить время фракционирования^{498—504}. Так, Андерсон^{498, 499} и несколько позже Хори⁵⁰⁰ описали метод автоматического анализа нуклеиновых кислот, при помощи которого на одной колонке со смолой даукс-1×8 (200—400 меш), используя линейный градиент концентрации ацетатного буфера при pH 4,4 можно разделить и проанализировать азотистые основания, нуклеозиды и нуклеотиды за 24 часа. Для проведения качественного анализа достаточно 0,02 мкмоль вещества. Образцы, содержащие большие количества соли (например, гидролизат РНК и ДНК), предварительно обессоливают гель-фильтрацией, а затем растворяют в буферном растворе. Сначала элюируются пиримидиновые, пуриновые основания и нуклеозиды, а затем нуклеотиды. При этих условиях не происходит полного отделения 2'-UMP от 3'-UMP; 5'-нуклеотиды за исключением 5'-CMP не отделяются от 2'-3'-нуклеотидов, а 5'-IMP и 5'-AMP не разделяются. Однако это почти не снижает практического значения метода. Его можно использовать для разделения 5'-нуклеотидов, которые получают из РНК при нуклеазном гидролизе и 2'-, 3'-нуклеотидов, которые образуются при щелочном гидролизе РНК. В аналогичных условиях разделяются дезоксирибонуклеотиды⁴⁹⁸.

Применение катионита AG-50W×4 для фракционирования рибо- и дезоксирибонуклеотидов было описано в 1967 г. Блатнером и Эриксоном⁵⁰². Авторы получили четкое разделение 4-основных 5'-дезоксирибонуклеотидов после ферментатического гидролиза ДНК и 2', 3'-рибонуклеотидов после щелочного гидролиза РНК. В качестве элюирующего раствора в первом случае использовали 0,1 М формиат аммония pH 3,2, во втором — 0,25 М формиат аммония pH 4,1. Порядок, в котором вы-

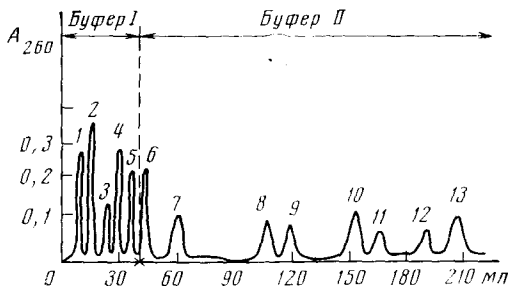


Рис. 7. Хроматография нуклеотидов, нуклеозидов и оснований на катионообменной смоле *aminex* A-4 (колонка 0,9×50 см). Для разделения использовали цитратный буфер (I) и ацетатный буфер (II). Скорость элюции 60 мл/час⁵⁰³

1 — UMP-5' + IMP-5' + UMP-2' и UMP-3' + АТР; 2 — GMP-5' + ADP + GMP-2' + GMP-3'; 3 — CMP-5'; 4 — уридин + AMP-2', 5 — AMP-5' + CMP-2' + CMP-3' + AMP-3', 6 — урацил, 7 — инозин + тимин; 8 — гипоксантин; 9 — гуанозин; 10 — аденозин; 11 — цитозин; 12 — гуанин; 13 — аденин

ходят нуклеотиды с колонки для дезокси- и рибонуклеотидов одинаков: $T(U) > G > C > A$. Присутствие ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , фосфодиэстеразы змеиного яда и панкреатической ДНК-азы в образце не мешает разделению. Изменение pH или молярности буфера ухудшает разделение. Использование летучего буфера для элюции дает возможность после упаривания растворов получать нуклеотиды в чистом виде.

Четкое разделение четырех 5'-моонуклеотидов было получено и на другой катионообменной смоле *aminex A-4*⁵⁰³ (рис. 7).

Количественное разделение фосфорилированных в различной степени нуклеотидов легко достигается с помощью ДЭАЭ-сефадекса А-25 в градиенте бикарбоната аммония или триэтиламмонийацетата при pH 7,0^{504, 505}. Нуклеотиды элюируются с колонки в порядке увеличения кислотности⁵⁰⁴.

Эффективность колоночной хроматографии и скорость анализа были в дальнейшем существенно увеличены использованием очень мелких анионо- и катионообменных смол и применением высоких давлений⁵⁰⁶⁻⁵⁰⁹. Для этой цели были разработаны новые типы смол, такие как *ziraх*⁵⁰⁷⁻⁵¹⁰, АА-15⁵⁰⁶, поверхностнослойная катионообменная смола⁵¹¹. Применение высокочувствительных детекторных систем позволяет в настоящее время проводить количественный анализ гидролизатов нуклеиновых кислот на уровне 10^{-12} моля без использования радиоактивной метки⁵¹¹.

V. НУКЛЕИНОВЫЕ ОСНОВАНИЯ И НУКЛЕОЗИДЫ

1. Хроматография в тонких слоях

Для аналитического определения и идентификации оснований нуклеиновых кислот и нуклеозидов наиболее широко применяется распределительная хроматография в тонком слое целлюлозы^{380, 382, 385-401}. Обычными системами для разделения оснований и нуклеозидов так же, как и при бумажной хроматографии, являются смеси воды или водных растворов солей, кислот или оснований с органическими растворителями (спиртами, кислотами и др.). В табл. 7 приводятся значения R_f различных оснований нуклеиновых кислот, их производных и нуклеозидов в ряде растворителей³⁸⁵. Эти системы довольно просты и дают надежно воспроизводимые результаты. Сравнение величин R_f в приведенных системах дает представление о влиянии pH раствора и концентрации солей в системах на хроматографическую подвижность разделяемых веществ. Важную роль при этом играет то обстоятельство, что нуклеиновые основания амфотерны, а изменение pH системы меняет полярность оснований и нуклеозидов и, соответственно, коэффициент распределения. Введение заместителей существенно изменяет полярность и константы диссоциации, так что, зная положение и природу заместителя, можно, хотя бы по аналогии, предсказать изменение R_f .

Хорошее разделение оснований методом тонкослойной хроматографии получено при использовании различных вариантов системы Кирби^{380, 401}, широко используемой при бумажной хроматографии оснований. Так, при одномерной хроматографии в смеси $MeOH - HCl - H_2O$ (65:17:18) было получено разделение всех четырех оснований после кислотного гидролиза ДНК^{380, 401}. Успешно используется также стандартная для бумажной хроматографии система изопропанол — HCl — вода^{385, 512}.

Основания и соответствующие нуклеозиды могут быть легко разделены на целлюлозе при элюировании водой³⁸⁶. Ряд других менее рас-

ТАБЛИЦА 7

Величины R_f оснований и нуклеозидов при хроматографии в тонком слое целлюлозы³⁸

Вещество	Растворители *					
	I	II	III	IV	V	VI
Аденин	0,31	0,38	0,88	0,35	0,40	0,10
2-Метиладенин	0,38	0,43	0,91	0,45	0,49	0,08
6-Диметиладенин	0,50	0,68	0,88	0,65	0,55	0,08
6-Метиладенин	0,45	0,52	0,91	0,52	0,52	0,08
Цитозин	0,41	0,24	0,59	0,31	0,39	0,59
5-Метилцитозин	0,51	0,27	0,64	0,35	0,44	0,51
5-Гидроксиметилцитозин	0,39	0,10	0,64	0,25	0,33	0,66
Урацил	0,70	0,31	0,57	0,35	0,47	0,54
6-Метилурацил	0,72	0,36	0,63	0,44	0,55	0,44
1,3-Диметилурацил	0,98	0,70	0,82	0,80	0,73	0,56
Тимин	0,80	0,45	0,65	0,57	0,57	0,44
Гуанин	0,26	0,33	0,87	0,39	0,41	0,10
1-Метилгуанин	0,16	0,06	0,50	0,13	0,25	0,15
2-Метилгуанин	0,53	—	0,74	—	—	0,11
2,2-Диметилгуанин	0,32	—	0,75	0,32	—	0,10
Аденозин	0,23	—	—	—	0,41	—
Дезоксиаденозин	0,27	—	0,82	0,37	0,42	0,09
Цитидин	0,36	—	0,65	0,27	—	0,52
Дезоксцитидин	0,50	—	0,65	0,35	—	0,47
Метилдезоксцитидин	0,59	—	0,73	0,40	0,42	0,39
Гуанозин	0,22	—	0,50	0,09	0,26	0,27
Дезоксигуанозин	0,14	—	0,59	0,17	0,36	0,23
Уридин	0,62	—	—	—	—	—
Дезоксиуридин	0,77	—	0,61	0,33	0,47	0,45
Тимидин	0,88	—	0,66	0,52	0,55	0,37
Псевдоуридин	0,42	—	0,42	0,08	0,24	0,57

* Состав растворителей:

- I. Изопропанол — HCl — H₂O (65:16,7:18,3)
 II. n-Бутанол — H₂O (86:14)
 III. Изомасляная кислота — H₂O — 25% NH₄OH (400:208:0,4)
 IV. Изопропанол — H₂O — конц. (28%) NH₄OH (85:15:1,3)
 V. n — Бутанол — H₂O — муравьиная кислота (77:13:10)
 VI. Насыщенный (NH₄)₂SO₄ — 1 M ацетат натрия — изопропанол (80:18:2).

пространенных систем для разделения оснований и нуклеозидов можно найти в работах^{386, 390, 392, 393, 515-523}.

Величины R_f для метилированных пуринов и пуриновых нуклеозидов приводятся в работе Брума и др.^{517, 520}. Данные по разделению дезоксирибонуклеозидов и значения их R_f приведены в работах^{395, 402, 524}. Отделение рибонуклеозидов от дезоксирибонуклеозидов или рибонуклеозидов с замещенными *цис*-гликольными гидроксильными группами легко осуществляется в основных системах, содержащих борат³⁸². Образование боратных комплексов с *цис*-гликольной группой остатка рибозы резко сказывается на хроматографической подвижности.

В том случае, если смесь оснований сложнее, так что одномерное разделение не дает удовлетворительного разделения, можно использовать двумерную хроматографию. Примером успешного применения этого способа является разделение смеси оснований с использованием системы MeOH—HCl—H₂O (70:20:10) в первом направлении и BuOH—MeOH—H₂O—NH₄OH (конц.) (60:20:20:2)—во втором^{380, 525}. Смесь 6-метиладенина, аденина, цитозина и 5-метилцитозина легко разделяется на индивидуальные соединения при двумерном хроматографировании в системах I—первое направление и II—второе направление (системы I и II, см. табл. 7), в то время как использование только одной системы не приводит к четкому разделению смеси³⁸⁵.

При двумерном фракционировании энзиматического гидролизата т-РНК из *E. coli* и дрожжей происходит четкое разделение восьми нуклеозидов, в том числе и минорных: дегидроуридина, инозина, псевдоуридина, работимидина⁵²¹. Иногда в качестве одного из направлений при двумерном хроматографировании в тонком слое применяют электрофорез^{401, 484}. Этим методом, например, была разделена смесь пяти основных и восьми метилированных оснований, найденных в ДНК и РНК, и было показано, что он дает лучшие результаты, чем метод одномерного хроматографирования³⁸⁵. Использование высоковольтного электрофореза и двумерной хроматографии позволяет разделять большинство оснований и дезоксирибонуклеозидов, содержащихся в гидролизатах ДНК⁴⁰¹.

Таким образом, фракционирование производных нуклеиновых кислот в тонком слое целлюлозы используется в последнее время во всех тех случаях, в которых раньше использовалась хроматография на бумаге, но разделение в тонком слое целлюлозы дает по сравнению с бумажной хроматографией большой выигрыш времени, более четкое разделение и приблизительно 10-кратное повышение чувствительности.

Использование меченых препаратов НК, а также химических методов введения радиоактивных изотопов в компоненты нуклеиновых кислот, позволяет повысить чувствительность метода до 10^{-12} моля^{343, 526-528}. В частности, для введения изотопной метки в рибонуклеозиды при анализе гидролизатов РНК, Рандерат использовал окисление *цис*-гликольной группы рибозного остатка периодатом с последующим восстановлением бортритидом натрия. Полученная смесь меченых тритием соединений была разделена на компоненты двумерной хроматографией в тонких слоях целлюлозы или силикагеля^{304, 529-533}. Положение отдельных соединений на хроматограммах определялось методом радиоавтографии. Количественный анализ проводился измерением радиоактивности элюированных веществ. Метод обладает высокой разрешающей способностью и чувствительностью^{304, 529-531}. Этот метод разработан и применяется для определения нуклеотидного состава РНК в тех случаях, когда имеется минимальное количество РНК, метка в которую *in vivo* введена быть не может. Чувствительность метода авторы оценивают в несколько пикомолей³⁰⁴. Нижний предел спектрофотометрического анализа — 1 *нонмолей*. Проведя исследование факторов, влияющих на чувствительность метода, Рандерат получил такой уровень чувствительности, который оказался достаточным для выявления минорных компонентов т-РНК^{530, 532, 533}. Однако, 2-О-метилнуклеозиды не могут быть идентифицированы этим методом, так как они не окисляются периодатом, а при восстановлении бортритидом 4-тиоуридин превращается в (³H)-уридин^{530, 531, 534}. В силу нестойкости бортритида реакцию восстановления проводят в щелочной среде. Известно, что некоторые минорные основания в т-РНК при этом разрушаются^{531, 534}. Частично разрушается имидазольное кольцо 7-метилгуанина (~35%), 1-метиладенин превращается в N⁶-метиладенин. 3-Метилцитозин также подвергается разложению на 10—15%^{531, 534, 535}.

Разработанный высокочувствительный ультрамикрометод Рандерат использовал для систематического исследования состава оснований т-РНК, выделенной из различных нормальных и неопластических мозговых тканей млекопитающих⁵³⁶. Разделение производных нуклеозидов в основном проводилось на слоях целлюлозы.

Из других сорбентов, дающих хорошие результаты при фракционировании оснований нуклеиновых кислот и нуклеозидов в тонком слое, может быть назван полиамид^{382, 392, 537}. В табл. 8 приведены величины

ТАБЛИЦА 8

Величины R_f оснований и нуклеозидов при хроматографии на полиамидных слоях⁵³⁷

Вещество	Растворители *				Вещество	Растворители *			
	I	II	III	IV		I	II	III	IV
Аденин	0,75	0,85	0,54	0,51	Инозин	0,32	0,30	0,23	0,85
Гипоксантин	0,48	0,52	0,37	0,74	Гуанозин	0,22	0,17	0,17	0,74
Гуанин	0,00	0,00	0,00	0,44	Уридин	0,39	0,50	0,37	0,90
Урацил	0,58	0,72	0,54	0,83	Цитидин	0,30	0,37	0,23	0,90
Аденозин	0,65	0,80	0,50	0,65	Тимидин	0,56	0,75	0,51	0,78

* Состав растворителей:

I. Гептан — бутанол — уксусная кислота (4:4:1)

II. Четыреххлористый углерод — уксусная кислота — ацетон (4:1:4)

III. Толуол — пиридин — этиленхлоргидрин — 0,8 M NH₄OH (5:1:5:3:3)

IV. 0,5 M водный NaCl.

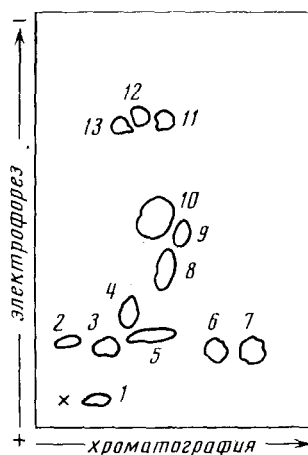
R_f для десяти оснований и нуклеозидов. Использование дистиллированной воды в качестве растворителя приводит к значительному увеличению подвижности всех соединений, добавление соли понижает подвижность⁵³⁷. Лучшие результаты были получены в водных растворах хлористого натрия, хотя можно использовать также ацетат или борат натрия⁵³⁷. Полиамидные слои могут быть использованы многократно⁵³⁷.

Для разделения синтетических аналогов и некоторых производных нуклеозидов и оснований иногда применяют хроматографию в тонком слое силикагеля^{402, 404, 414, 418, 419, 426, 427, 538, 539}. Для фракционирования свободных оснований и нуклеозидов слои силикагеля хотя и применяют^{300, 410, 426}, однако они дают худшие результаты, чем целлюлоза^{300, 426, 427}.

2. Электрофорез на бумаге и в тонком слое целлюлозы

Фракционирование оснований нуклеиновых кислот и нуклеозидов с помощью электрофореза на бумаге или в тонком слое целлюлозы не имеет особых преимуществ перед распределительной тонкослойной или бумажной хроматографией этих соединений. Однако, комбинируя этот метод с хроматографией в тонких слоях целлюлозы, можно иногда улучшить разделение некоторых смесей, содержащих, помимо четырех основных компонентов, минорные компоненты — метилированные по основанию или по 2'-гидроксильной группе рибозы^{382, 484}. Наиболее ярким примером подобного применения электрофореза и хроматографии является разделение смеси 5 основных и 8 метилированных оснований методом двумерной хроматографии⁴⁸⁴ (рис. 8).

Рис. 8. Разделение метилированных оснований на тонком слое микрокристаллической целлюлозы *Avicel*. Первое направление: электрофорез в 0,1 M ацетате натрия (pH 3,5), 1000 в, 20 ма — 3 часа. Второе направление: хроматография в системе изопропанол — HCl — вода (65:16,7:18,3)⁴⁸⁴. 1 — гуанин; 2 — 1-метилгуанин; 3 — 2-диметилгуанин; 4 — аденин; 5 — 2-метилгуанин; 6 — урацил; 7 — тимин; 8 — 6-метиладенин; 9 — 6-диметиладенин; 10 — 2-метиладенин; 11 — 5-метилцитозин; 12 — цитозин; 13 — 1-метиладенин



В боратном буфере при pH 9,2 можно отделить дезоксирибонуклеозиды и 2'-О-метилрибонуклеозиды от рибонуклеозидов^{265, 484}. Боратные комплексы рибонуклеозидов движутся как анионы, и относительные подвижности аденозина, цитидина, гуанозина и уридина равны соответственно 0,64; 0,74; 0,88 и 1,0²⁶⁵. Четыре главных рибо- и дезоксирибонуклеозиды разделяются с помощью электрофореза на бумаге при pH 3,2. Подвижности уридина (тимидина), гуанозина и аденозина равны соответственно 0; 0,05 и 0,29 (подвижность цитидина принята за 1,0)²⁶⁵. Аденин, гуанин, цитозин и урацил также можно разделить электрофорезом при pH 3,2²⁶⁵.

3. Ионообменная хроматография

Принципы и методы разделения на ионообменных смолах оснований нуклеиновых кислот и нуклеозидов довольно подробно описаны в работах и обзорах Кона^{11, 489, 491, 497}. Поскольку все данные, опубликованные до сих пор в области фракционирования этих компонентов на ионообменных смолах оказались сравнимыми между собой и с данными Кона (во всех случаях были использованы одни и те же или близкие ионообменники), наше обсуждение будет ограничено здесь теми немногими ионообменными смолами, которые применяются в настоящее время для микропрепаративных исследований. Несколько более подробно в данном разделе будет рассмотрен вопрос разделения нуклеозидов и оснований методом адсорбционной хроматографии на гелифльтрационных материалах типа сефадексов и биогелей, которые успешно применяются для этих целей в последнее время.

В 1968 г. Кон и Узиел модифицировали нуклеотидный анализатор Андерсона^{498, 499} и использовали его для разделения нуклеозидов на катионообменных смолах, типа амберлит GG-120, тип III, Bio-Rad A-6 и дауэкс 50×4⁵⁴⁰. Четыре основных нуклеозиды, полученные гидролизом РНК, хорошо отделяются друг от друга при элюции 0,4 М формиатом аммония, pH 4,65. Порядок, в котором выходят нуклеозиды с колонки, следующий: U>G>A>C. Минорные нуклеозиды такие, как N⁶-метиладенозин, 7-метилгуанозин, N²-диметилгуанозин хорошо отделяются друг от друга и не мешают разделению основных нуклеозидов. Псевдоуридин, риботимидин, уридин, инозин и 4-тиоуридин разделяются не полностью. Хотя авторы исследуют только разделение нуклеозидов, подобный нуклеозидный анализатор, по-видимому, можно использовать и для анализа оснований нуклеиновых кислот^{502, 541-543}. Например, в 1970 г. был предложен микрометод фракционирования смеси нуклеотидов, нуклеозидов и оснований на катионообменной смоле *aminex* A-4⁵⁰³ (рис. 7). Разделение проводили, используя ступенчатую элюцию, сначала цитратом натрия при pH 3,0, а затем 0,25; 0,50; 1,00 М ацетатом натрия, pH 6,4. Все четыре 5'-моонуклеотида отделяются друг от друга при пропускании первого буфера. При пропускании второго буфера получаются индивидуальные пики нуклеозидов и оснований нуклеиновых кислот. Использование этого катионообменника было описано и ранее для отделения пуриновых оснований от пиримидиновых и разделения гипоксантина, гуанина и аденина⁵⁴⁴.

Удобный метод выделения и разделения пуриновых оснований из биологических экстрактов предложен с использованием катионообменной смолы AG50W×4 (H⁺)⁵⁴⁵. Элюцию проводят 0,05 М HCl. При этом происходит разделение не только пуриновых оснований, но и всего нуклеотидного материала, содержащегося в экстракте.

4. Гельфилтрация и адсорбционная хроматография на гелях

Гельфилтрация или фракционирование соединений на молекулярных ситах (декстрановых гелях) типа сефадексов, описанная еще в 1959 г.⁵⁴⁶, широко используется для разделения различных производных нуклеиновых кислот, согласно их молекулярному весу. Так, нуклеотиды легко отделяются от РНК или олигонуклеотидов^{547, 549} и всегда элюируются перед нуклеозидами и основаниями, что является быстрым и технически очень простым способом для разделения этих производных на группы примерно равного молекулярного веса^{548, 550}. Сефадекс — относительно инертный, нерастворимый и гидрофильный материал, выпускается с различной пористостью (G-10; -15; -25; -50; -75; -100 и -200) и в форме ионообменных целлюлоз CM- и ДЭАЭ-сефадекса, которые объединяют свойства молекулярных сит и ионообменников^{551, 552}. Выход веществ с колонок практически количественный. За счет необратимой адсорбции соединений теряется ~3%⁵⁵³.

Вскоре после введения гель-филтрации Желоттом было показано, что производные нуклеиновых кислот задерживаются гелем с разной силой и вымываются с него различными объемами элюента в зависимости от строения⁵⁵³⁻⁵⁵⁷. Показано, что кроме молекулярного веса на разделение соединений на сефадексах большое влияние оказывают как ионная сила и pH элюирующего буфера, так и обратимая адсорбция веществ^{549, 550, 554-561}. Механизм адсорбции на сефадексе пока не установлен, однако, предполагают, что адсорбция происходит за счет образования водородных связей между гетероциклическими основаниями и эфирными мостиками матрицы^{553, 556, 557}. Пуриновые производные, как правило, имеют более сильное сродство к сефадексам, чем пиримидиновые^{549, 550, 553, 556, 557}. Разделение на G-10, G-15 и G-25 практически одинаково для пиримидиновых производных, а для пуриновых при использовании более смитых гелей, например G-10, сродство к матрице увеличивается^{549, 550, 553, 556}.

Относительный объем элюента или константа элюции (R_m) для разных производных не зависит от количества геля и при стандартизации условий может служить первым критерием идентификации соединения⁵⁵⁶. В этой работе приведены константы элюции для 50 пуриновых и пиримидиновых производных на колонке с G-10 в 0,01 М карбонате аммония при pH 9. За один прием можно разделить до 16 соединений⁵⁵⁶. Константы элюции нуклеозидов и оснований при других значениях pH приведены в работах^{559, 561}. При pH 10,4 на сефадексах G-25 или G-10 успешно разделяются все четыре основных дезокси- и рибонуклеозида^{141, 547, 550, 562}. Количество каждого нуклеозида в смеси составляло $1-10 \times 10^{-9}$ моля. Отношение диаметра колонки к высоте для четкого разделения должно соблюдаться в пределах $1 \div 50-1 \div 150$ ^{547, 562}. Порядок, в котором выходят нуклеозиды с колонки, при этих условиях следующий: $U(T) > C > G > A$. Основания делятся в таком же порядке, но в присутствии нуклеозидов происходит неполное разделение аденозина и гуанина^{553, 556}.

Смесь нуклеозидов и оснований может быть проанализирована и в присутствии нуклеотидов, так как последние в этих условиях выходят отдельным пиком перед нуклеозидами^{547, 553}. Количество нуклеотидов при этом не должно превышать 50% от общего количества наносимого вещества. Но если использовать более длинные колонки, то при низких скоростях элюции можно разделить смесь нуклеотидов и нуклеозидов в отношении 12:1⁵⁴⁷.

Фракционирование нуклеозидов на G-10 может быть достигнуто и при нейтральных значениях pH. Однако при этом требуется дополнительное разделение уридина и цитидина, которые частично (элюция фосфатным буфером pH 7,0) или полностью (элюция водой) перекрываются. Аденозин и гуанозин разделяются полностью^{549, 558}.

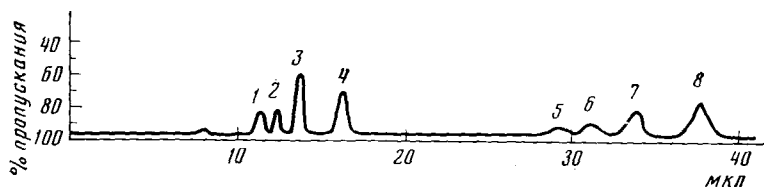


Рис. 9. Хроматография смеси дезоксирибонуклеозидов и рибонуклеозидов на фракционированном биогеле Р-2 (колонка 0,8×68 см). Скорость элюции 2,8 мл/час. Объем элюата 50 мкл. 1 — уридин, 2 — гуанозин, 3 — дезоксигуанозин, 4 — тимидин, 5 — цитидин, 6 — аденозин, 7 — дезоксицитидин, 8 — дезоксиаденозин⁵⁶⁶

Аналогичная картина при этих значениях pH наблюдается и для оснований нуклеиновых кислот⁵⁵⁷. Элюция 0,05 М фосфатным буфером при pH 7,0 приводит к четкому фракционированию пуриновых оснований, в том числе и минорных, и к неполному разделению пиримидиновых. Следует отметить, что при этих условиях происходит разделение не только гипоксантина, ксантина, аденина и гуанина, но и различных метилированных производных пуринов. Разделение метилированных пуринов показывает, что введение метильной группы уменьшает обратимую адсорбцию соединения⁵⁵⁷.

Достаточно успешно на колонке с сефадексом G-10 могут быть разделены и нуклеозид циклофосфаты 2':3'-гуаниловой и адениловой кислот⁵⁴⁹. Нуклеотиды между собой не разделяются^{141, 557, 562-565}.

Другим материалом, наиболее часто применяемым в последнее время для разделения щелочных и кислотных гидролизатов ДНК, является полиакриламидный гель (биогель Р-2, Р-6)^{136, 158, 566-574}. Преимущество полиакриламидного геля перед сефадексами заключается в том, что для разделения требуются меньшие объемы геля, что сокращает время элюции; соединения выходят в значительно меньших объемах и количественно⁵⁶⁶. Разделение нуклеозидов рекомендуется проводить на фракционированном биогеле Р-2 при высоких значениях pH^{158, 566, 572, 573}. Фракционирование биогеля и приготовление колонок описано в работах^{566, 572}. Разделение смеси рибо- и дезоксирибонуклеозидов было проведено в 0,1 М бикарбонатаммонийном буфере, 1 mM Na₂B₄O₇ при pH 10,1^{566, 573} (рис. 9). Присутствие нуклеотидов или высоких концентраций солей в исходной смеси не мешает хорошему разделению нуклеозидов, так как и нуклеотиды и соли легко отделяются от них^{566, 572, 575, 576}.

VI. СМЕСИ НУКЛЕОТИДОВ, НУКЛЕОЗИДОВ И НУКЛЕИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ

Для фракционирования сложных смесей различных компонентов нуклеиновых кислот, также как и для разделения однотипных соединений, можно использовать распределительную^{518, 519} или ионообменную тонкослойную хроматографию^{438, 577}, электрофорез^{484, 487}, ионообменную^{498-504, 543} или адсорбционную^{549, 553, 556, 568, 570} хроматографию на колонках.

Для быстрого анализа микроколичеств смеси нуклеотидов, нуклеозидов и оснований в последнее время в основном применяется тонкослой-

ная хроматография на целлюлозе и целлюлозных ионообменниках. Четкое фракционирование большого числа соединений на целлюлозе происходит при использовании двумерной хроматографии^{518, 519}.

В качестве примера можно привести разделение 22 соединений на целлюлозе MN-300 в системах: изомасляная кислота — концентрированный аммиак — вода (57:4:39) — первое направление и метанол — 1 М

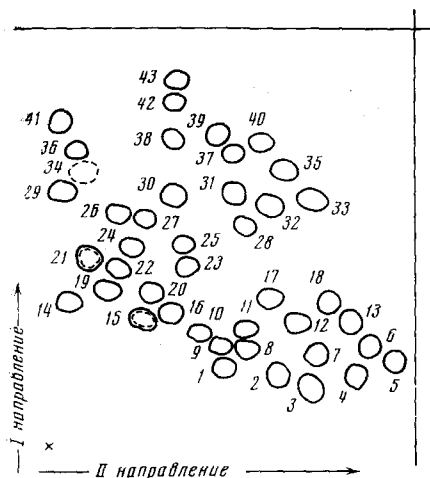


Рис. 10

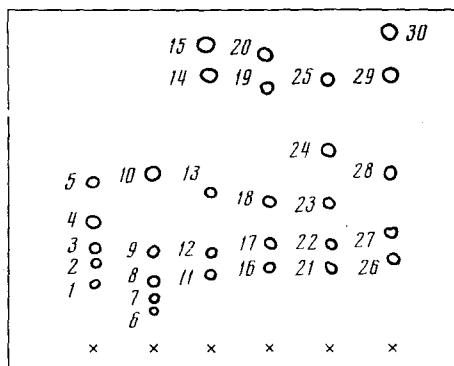


Рис. 11

Рис. 10. Двумерная хроматография сложной смеси нуклеотидов, нуклеозидов и оснований нуклеиновых кислот на тонком слое целлюлозы. Первое направление: *n*-пропанол — 25% аммиак — вода (6:3:1). Второе направление: изопропанол — насыщенный сульфат аммония — вода (2:79:19)⁵¹⁹.

1 — АТФ; 2 — GDP; 3 — GTP; 4 — ИТФ; 5 — СТР+УТР; 6 — CDP+UDP; 7 — IDP+ТТР; 8 — GMP-5'; 9 — ТРН; 10 — GMP-3'+АТФ; 11 — GMP-2; 12 — IMP-5'+ТДР; 13 — CMP-5'+CMP-2'+CDPG+UMP-5'; 14 — мочевая кислота; 15 — ТРНН; 16 — AMP-5'+DPN+ADPG; 17 — TMP-5'; 18 — CMP-3'+UMP-2'+UMP-3'; 19 — AMP-3'; 20 — AMP-2'; 21 — DPNH; 22 — гуанин; 23 — оротовая кислота; 24 — ксантин+GMP-2':3'; 25 — гуанозин; 26 — 7-метилксантин; 27 — дезоксигуанозин+ксантозин; 28 — 5-аминотимин; 29 — аденин; 30 — гипоксантин; 31 — инозин; 32 — изоцитозин; 33 — уридин; 34 — 2-аминопурин; 35 — урацил+цитидин+цитозин+дезокссуридин; 36 — аденозин; 37 — 4-метилурацил; 38 — 2-тиоурацил; 39 — тимидин+тимин; 40 — 3-метилцитозин+дезоксидитидин; 41 — дезоксиаденозин; 42 — никотиновая кислота; 43 — никотинамид

Рис. 11. Хроматография смеси нуклеотидов, нуклеозидов и оснований на ПЭИ-целлюлозном слое⁵⁷⁷. Градиент: 0,6 мл 0,1 М LiCl; 0,6 мл 0,2 М LiCl; 0,6 мл 0,5 М LiCl; 0,6 мл 1 М LiCl и 1,2 мл 2 М LiCl.

1 — АТФ; 2 — ADP; 3 — AMP; 4 — аденин; 5 — аденозин; 6 — GTP; 7 — GDP; 8 — GMP; 9 — гуанин; 10 — гуанозин; 11 — УТР; 12 — UDP; 13 — UMP; 14 — урацил; 15 — уридин; 16 — ИТФ; 17 — IDP; 18 — CMP; 19 — цитозин; 20 — цитидин; 21 — ИТР; 22 — IDP; 23 — IMP; 24 — гипоксантин; 25 — инозин; 26 — ТТР; 27 — ТДР; 28 — ТМР; 29 — тимин; 30 — тимидин

ацетат аммония (7:3) — двукратное пропускание во втором направлении⁵¹⁸. При этом довольно отчетливо отделились друг от друга не только моно-, ди- и трифосфаты нуклеозидов, но и 3'- и 5'-нуклеотиды.

На рис. 10 приведено хроматографическое разделение более 60 нуклеотидных производных⁵¹⁹. Особенно следует отметить хорошее фракционирование оснований и соответствующих рибонуклеозидов, рибо- и дезоксирибонуклеозидов, моно-, ди- и трифосфатов разных нуклеозидов, 2'-, 3'- и 5'-фосфатов рибонуклеозидов. Соединения с одинаковой хроматографической подвижностью могут быть подвергнуты повторному фракционированию в другом растворителе.

Разделение оснований, нуклеозидов и нуклеотидов с хорошим разрешением на ПЭИ-целлюлозе было достигнуто с использованием солевого градиента⁵⁷⁸ (рис. 11). Поскольку значения R_f нуклеотидов зависят от концентрации солей⁴³⁸, основания и нуклеозиды можно легко отделить от нуклеотидов пропусканием в качестве начального растворителя дистиллированной воды или смеси метанол — вода (1:1)^{438, 442, 578}.

Разделение сложной смеси оснований нуклеозидов и нуклеотидов на колонках описано в работах^{498—500, 503, 504, 543, 549, 553, 556, 557, 568, 570}.

Для разделения производных НК в последнее время используют также и метод газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ), предложенной вначале лишь для разделения ацетильных, метильных и изопропилиденовых производных нуклеозидов⁵⁷⁹ и метилированных оснований^{580, 581}. Вследствие низкой летучести и неустойчивости разделяемых веществ в процессе хроматографии эти производные можно было использовать лишь для качественного анализа. Указанные трудности частично удалось устранить при хроматографировании триметилсилильных производных нуклеозидов^{581—585}. Метод используется во многих модификациях^{581, 583—591}. Наибольшее распространение получила хроматография *бис*-(триметилсилил)-трифторацетамидных производных^{589, 590, 592—596}. Однако и в этом случае некоторые нуклеозиды (цитидин, аденозин) после силилирования дают несколько продуктов^{595, 596}. Для цитидина эту трудность удалось устранить, используя реакцию модификации цитидиновых производных перед силилированием производными гидроксилamina⁵⁹⁶. ГЖХ можно использовать для анализа нуклеотидного состава ДНК и РНК^{589, 593}, однако чувствительность метода еще недостаточно высока (1—5 мкг НК на анализ). Метод ГЖХ целесообразно использовать для анализа состава синтетических олигонуклеотидов. С разделением редких компонентов НК можно ознакомиться в работах^{586, 590, 594, 596, 597}.

ЛИТЕРАТУРА

1. W. E. Cohn, *Nucleic Acids*, Academic Press, N. Y., 1955, т. 1, стр. 211.
2. G. R. Wyatt, Там же, стр. 243.
3. R. Markham, *Modern Methods of Plant Analysis*, Springer, Berlin, 1955, т. IV, стр. 246.
4. C. J. O. R. Morris, P. Morris, *Separation Methods in Biochemistry*, Sir Isaak Pitman & Sons, London, 1963.
5. Э. И. Будовский, Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров, «Наука», М.—Л., 1966, стр. 320.
6. Мол. биология, 6, 167 (1972).
7. А. А. Лурье, Сорбенты и хроматографические носители, «Химия», М., 1972.
8. R. M. Kothari, *Chrom. Rev.*, 12, 127 (1970).
9. A. Sibatani, N. Mizuno, *Biochim. biophys. acta*, 76, 188 (1963).
10. S. Osawa, A. Sibatani, *Meth. in Enzymol.*, 12, 678 (1967).
11. E. Otake, H. Mitsui, S. Osawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48, 425 (1962).
12. K. Kimura, I. Tomoda, A. Sibatani, *Biochim. biophys. acta*, 108, 546 (1965).
13. M. Roger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 51, 189 (1964).
14. M. Roger, C. O. Beckmann, R. D. Hotchkiss, *J. Mol. Biol.*, 18, 156 (1966).
15. M. Roger, C. O. Beckmann, R. D. Hotchkiss, Там же, 18, 174 (1966).
16. T. Ishida, N. Sueoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 58, 1080 (1967).
17. M. Aubert, J. F. Scott, M. Reynier, R. Monier, Там же, 61, 292 (1968).
18. H. A. Panč, M. Gruber, *FEBS Letters*, 8, 45 (1970).
19. S. Lacks, *J. Mol. Biol.*, 5, 119 (1962).
20. J. D. Mandel, A. D. Hershey, *Anal. Biochem.*, 1, 66 (1960).
21. T. Yamade, N. Sueoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 50, 1093 (1963).
22. N. Sueoka, T. Yamade, *Meth. in Enzymol.*, 12, 658 (1967).
23. В. Мукарами, Методы исследования нуклеиновых кислот, «Мир», М., 1970, стр. 113.
24. Н. Суюека, Чень Цай-Инь, Методы исследования нуклеиновых кислот, «Мир», М., 1970, стр. 122.
25. G. Carel, G. Nullans, P. Mandel, *J. Chromatogr.*, 56, 154 (1971).

26. Г. Н. Зайцева, Р. Н. Глебов, Л. О. Матвеева, Л. А. Юodka, А. Н. Белозерский, Биохимия, 31, 740 (1966).
27. M. J. Modak, S. Modak, A. Venkataraman, Anal. Biochem., 34, 284 (1970).
28. T. Okamoto, Y. Kawade, Biochem. Biophys. Res. Commun., 13, 324 (1963).
29. Г. Н. Зайцева, Т. М. Ермохина, А. П. Сургучев, И. Г. Сургучева, Е. И. Ценов, Биохимия, 34, 325 (1969).
30. R. Stern, U. Z. Littauer, Biochemistry, 7, 3469 (1968).
31. R. Stern, L. E. Zutra, U. Z. Littauer, Там же, 8, 313 (1969).
32. N. Sueoka, T. Y. Cheng, J. Mol. Biol., 4, 161 (1962).
33. T. Y. Cheng, N. Sueoka, Science, 141, 1194 (1963).
34. M. G. Smith, K. Burton, Biochem. J., 98, 229 (1966).
35. Д. Эйнер, см. ²³, стр. 215.
36. A. Aurisichio, E. Dore, C. Frontali, F. Gaeta, G. Toschi, Biochim. biophys. acta, 80, 514 (1964).
37. S. R. Ayad, G. R. Barker, J. Weigold, Biochem. J., 107, 387 (1968).
38. M. Rodger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 59, 200 (1968).
39. R. Rundar, J. D. Kurkas, E. Chargaff, Там же, 60, 630 (1968).
40. R. Rundar, J. D. Kurkas, E. Chargaff, Там же, 60, 921 (1968).
41. J. D. Kurkas, R. Rundar, E. Chargaff, Там же, 60, 915 (1968).
42. G. R. Barker, P. Hodges, Biochem. J., 112, 14 (1969).
43. K. A. O. Ellem, S. L. Rhode, Biochim. biophys. acta, 174, 117 (1969).
44. M. N. Hayashi, M. Hayashi, S. Spiegeman, Biophys. J., 5, 231 (1965).
45. R. Benzinger, R. Jaenisch, P. H. Hofschneider, J. Mol. Biol., 21, 493 (1966).
46. M. Arca, E. DiMauro, L. Frontali, G. Tecce, Europ. J. Biochem., 5, 466 (1968).
47. W. Szybalski, H. Kubinski, Z. Hradeena, W. C. Summers, Meth. in Enzymol., 21, 383 (1971).
48. N. Sueoka, T. Yamane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48, 1415 (1962).
49. N. Sueoka, T. Kano-Sueoka, Там же, 52, 1535 (1964).
50. J. A. Carbon, L. Hung, D. S. Jones, Там же, 53, 979 (1965).
51. Т. М. Ермохина, М. А. Стамболова, Г. Н. Зайцева, А. Н. Белозерский, ДАН, 164, 688 (1955).
52. K. Matsuzaki, Biochim. biophys. acta, 114, 222 (1966).
53. Т. Kano-Sueoka, M. Nirenberg, N. Sueoka, J. Mol. Biol., 35, 1 (1968).
54. Т. Kano-Sueoka, N. Sueoka, Там же, 35, 475 (1968).
55. Л. О. Дынга, Г. Н. Зайцева, В. П. Ермишкин, М. Б. Банохин, А. Н. Белозерский, ДАН, 181, 1493 (1968).
56. Л. О. Дынга, Е. А. Карнаухова, Г. Н. Зайцева, А. С. Зубатов, А. Н. Белозерский, Биохимия, 83, 831 (1968).
57. Г. Н. Зайцева, Т. М. Ермохина, Л. П. Сургучев, И. Г. Сургучева, Е. И. Ценов, Там же, 34, 325 (1969).
58. E. Lodemann, I. Niedenthal, A. Wacker, Naturforsch., 25, 845 (1970).
59. R. Tiebe, H. G. Zachau, Europ. J. Biochem., 5, 546 (1968).
60. J. L. Demare, N. Rebeyrotte, A. Leprieur, J. Roussaux, Biochim. biophys. acta, 87, 165 (1964).
61. T. Y. Huhn, C. W. Helleiner, Anal. Biochem., 19, 150 (1967).
62. S. R. Ayad, J. Blamire, Biochem. Biophys. Res. Comm., 30, 207 (1968).
63. S. R. Ayad, R. W. Bonsall, S. Hunt, Anal. Biochem., 22, 533 (1968).
64. A. Masen, M. Champagne, Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1601 (1969).
65. S. R. Ayad, J. Blamire, J. Chromatogr., 42, 248 (1969).
66. G. W. Rushizky, Analyt. Biochem., 29, 459 (1969).
67. D. Jarvis, R. Loeser, P. Herrlich, R. Rösenthaller, J. Chromatogr., 52, 158 (1970).
68. S. R. Ayad, J. Blamire, Biochem. J., 112, 186 (1969).
69. C. W. Helleiner, Canad. J. Biochem., 47, 1199 (1969).
70. S. R. Ayad, J. Blamire, J. Chromatogr., 48, 456 (1970).
71. S. R. Ayad, A. E. Wilkinson, Там же, 66, 277 (1972).
72. A. V. Lichtenstein, R. P. Alechina, V. S. Schapot, FEBS Letters, 23, 254 (1972).
73. G. N. Freeland, R. M. Hoshkinson, J. Chromatogr., 56, 147 (1971).
74. W. D. Skidmore, R. K. Main, L. G. Cole, Biochim. biophys. acta, 76, 534 (1963).
75. R. H. Symons, Там же, 103, 298 (1965).
76. R. M. Bock, J. D. Cherayll, Meth. in Enzymol., 12A, 638 (1967).
77. P. L. Bergquist, B. C. Baguley, R. K. Ralf, Там же, 12, 660 (1967).
78. Л. А. Остерман, Усп. совр. биологии, 71, 353 (1971).
79. B. Baguley, P. Bergquist, R. Ralf, Biochim. biophys. acta, 108, 139 (1965).
80. P. L. Bergquist, B. C. Baguley, J. M. Robertson, R. K. Ralf, Там же, 108, 531 (1965).
81. B. C. Baguley, P. L. Bergquist, R. K. Ralf, Там же, 95, 510 (1965).
82. А. Д. Мирзабеков, А. И. Крутилина, А. А. Баев, ДАН, 169, 1199 (1966).
83. D. M. Brown, B. F. C. Clark, M. J. A. Tanner, Europ. J. Biochem., 5, 492 (1968).
84. J. D. Cherayll, R. M. Bock, Biochemistry, 4, 1174 (1965).

85. М. А. Грачев, Н. И. Мензорова, Л. С. Сандахчиев, Э. И. Будовский, Д. Г. Кнорре, Биохимия, 31, 840 (1966).
86. С. К. Василенко, Ф. Ф. Димитрова, Л. В. Обухова, В. Ф. Подгорный, Н. А. Себро, Мол. биология, 4, 205 (1970).
87. Y. Kawade, T. Okamoto, Y. Yamamoto, Biochem. Biophys. Res. Commun., 10, 200 (1963).
88. D. W. E. Smith, J. Biol. Chem., 241, 4487 (1966).
89. M. Miyazaki, M. Kawada, S. Takemura, J. Biochem. (Tokyo), 60, 519 (1966).
90. M. Miyazaki, S. Takemura, Там же, 60, 526 (1966).
91. M. Miyazaki, S. Takemura, Там же, 62, 161 (1967).
92. K. Takeishi, S. N. Nishimura, T. Ukita, Biochim. biophys. acta, 145, 605 (1967).
93. P. L. Bergquist, O. J. W. Burns, C. A. Plinston, Biochemistry, 7, 1751 (1968).
94. K. Takeishi, T. Ukita, J. Biol. Chem., 243, 5761 (1968).
95. M. Miyasaki, S. Takemura, J. Biochem. (Tokyo), 63, 637 (1968).
96. T. Sekiya, K. Takeishi, T. Ukita, Biochim. biophys. acta, 182, 411 (1969).
97. S. Nishimura, I. Weinstein, Biochemistry, 8, 832 (1969).
98. Р. П. Броун, И. С. Стенанова, Ф. Куанг-Тунг, Укр. биохим. ж., 41, 82 (1969).
99. J. F. Mushinsky, I. Galizzi, G. Ehrenstein, Biochemistry, 9, 489 (1970).
100. C. W. Hancher, E. F. Phares, G. D. Novelli, A. D. Kelmars, Biotechnol. Bioeng., 11, 1055 (1969).
101. G. M. Tener, I. Gillam, M. Tigerstrom, S. Millward, E. Wimmer, Fed. Proc., 25, 519 (1966).
102. I. Gillam, S. Millward, D. Blew, M. Tigerstrom, E. Wimmer, G. M. Tener, Biochemistry, 6, 3043 (1967).
103. M. Litt, Biochem. Biophys. Res. Comm., 32, 507 (1968).
104. L. M. Fink, T. Goto, Там же, 32, 563 (1968).
105. T. Seno, M. Kobajashi, S. Nishimura, Biochim. biophys. acta, 169, 80 (1968).
106. T. Sekiya, K. Takeishi, T. Ukita, Там же, 182, 411 (1969).
107. R. L. Roy, D. Söll, Там же, 161, 572 (1968).
108. P. Lirquin, P. Metzger, J. Buchet-Mahien, FEBS Letters, 5, 265 (1969).
109. E. Griffiths, Там же, 10, 225 (1970).
110. K. P. Garen, J. Mol. Biol., 47, 393 (1970).
111. C. Henes, M. Kraiskopf, J. Ofengand, Biochemistry, 8, 3024 (1969).
112. M. S. Jonson, R. J. Young, Virology, 38, 607 (1969).
113. В. П. Демушкин, О. Д. Нелидова, Э. И. Будовский, Мол. биология, 5, 858 (1971).
114. J. W. Sedat, R. B. Kelly, R. L. Sinsheimer, J. Mol. Biol. 26, 537 (1967).
115. R. B. Kelly, R. L. Sinsheimer, Там же, 29, 229 (1967).
116. R. B. Kelly, R. L. Sinsheimer, Там же, 29, 237 (1967).
117. R. Stern, R. M. Friedman, J. Virol., 4, 356 (1969).
118. L. A. Osterman, Anal. Biochem., 43, 254 (1971).
119. G. Samensa, Ark. Kemi, 11, 89 (1957).
120. R. K. Main, L. J. Cole, Arch. biochem. biophys., 68, 186 (1957).
121. R. K. Main, M. J. Wilkins, L. J. Cole, Science, 129, 331 (1959).
122. R. Main, M. Wilkins, L. Cole, J. Am. Chem. Soc., 81, 6490 (1959).
123. G. Hartmann, U. Coy, Biochim. biophys. acta, 47, 612 (1961).
124. R. L. Erikson, M. L. Fenwick, R. M. Franklin, J. Mol. Biol., 10, 519 (1964).
125. G. Bernardi, Biochim. biophys. acta, 91, 686 (1964).
126. E. G. Brunnager, K. G. Occomy, Biochem. J., 97, 689 (1965).
127. R. M. Chevallier, G. Bernardi, J. Mol. Biol., 11, 658 (1965).
128. G. Bernardi, Nature, 206, 779 (1965).
129. U. Harding, H. Schauer, G. Hartmann, Biochem. Ztschr., 346, 212 (1966).
130. P. L. Pearson, A. D. Kelmars, J. Biol. Chem., 241, 767 (1966).
131. K. Muench, P. Berg, Biochemistry, 5, 982 (1966).
132. D. Bourgaux-Ramoisy, N. Van tiegem, P. Bourgaux, J. Gen. Virol., 1, 589 (1967).
133. G. Dirheimer, Bull. soc. chim. biol., 50, 1221 (1968).
134. L. Pinck, L. Hirth, G. Bernardi, Biochem. Biophys. Res. Commun., 31, 481 (1968).
135. M. R. Chevallier, G. Bernardi, J. Mol. Biol., 32, 437 (1968).
136. G. Bernardi, F. Carnevali, A. Nicolaeff, G. Piperno, G. Tecce, Там же, 37, 493 (1968).
137. I. L. Ryan, H. J. Morowitz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63, 1282 (1969).
138. G. Bernardi, Biochim. biophys. acta, 174, 423 (1969).
139. G. Bernardi, Там же, 174, 435 (1969).
140. P. Lurquin, P. Metzger, J. Buchet-Maheiu, FEBS Letters, 5, 265 (1969).
141. C. Soave, E. Galante, G. Torti, Bull. soc. chim. biol., 52, 857 (1970).
142. J. C. Siebke, T. Ekren, Europ. J. Biochem., 12, 380 (1970).
143. A. Zimmer, G. R. Hartmann, Bull. soc. clin. biol., 52, 867 (1970).
144. G. Bernardi, Meth. in Enzymol., 21, 95 (1971).
145. R. Barzilai, C. A. Thomas, J. Mol. Biol., 51, 145 (1970).
146. H. Berger, G. L. Irvin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 65, 152 (1970).
147. R. Dasgupta, S. Mitra, Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 793 (1970).

148. J. Laslo, D. S. Miller, O. Brown, E. Baril, Там же, 38, 112 (1970).
149. J. F. Habener, B. S. Bynum, J. Shack, J. Mol. Biol., 49, 157 (1970).
150. A. T. Leffler, E. Cleskoff, S. W. Luborsky, V. McFarland, P. T. Mora, Там же, 48, 455 (1970).
151. E. W. Lusby, S. R. DeKloet, Biochim. biophys. acta, 209, 263 (1970).
152. S. Sato, M. Tanaka, T. Sugimura, Там же, 209, 43 (1970).
153. D. Doenecke, C. E. Sekeris, FEBS Letters, 8, 61 (1970).
154. S. Jansson, E.-R. Lochmann, Там же, 8, 113 (1970).
155. A. B. Legocki, J. Pawelkiewicz, Bull. Acad. Polon. Sci., 15, 517 (1967).
156. R. Giege, J. Heinrich, J. H. Weil, J. P. Ebel, Biochim. biophys. acta, 174, 43 (1967).
157. P. Bourgaux, D. Bourgaux-Ramoisy, G. Gen. Virol., 1, 323 (1969).
158. G. Bernardi, M. Fauris, G. Piperno, P. Slonimski, J. Mol. Biol., 48, 23 (1970).
159. M. Oichi, J. Bacteriol., 98, 104 (1969).
160. O. Lewin, Meth. in Enzymol., 5, 25 (1962).
161. H. W. Siegelman, E. F. Fieser, Biochemistry, 3, 418 (1964).
162. H. W. Siegelman, G. A. Wiezorek, Anal. Biochem., 13, 402 (1965).
163. L. Mindlich, R. D. Hotchkiss, Biochim. biophys. acta, 80, 73 (1964).
164. L. Mindlich, R. D. Hotchkiss, Там же, 80, 93 (1964).
165. R. M. Kothari, J. Chromatogr., 64, 85 (1972).
166. R. M. Kothari, Там же, 52, 119 (1970).
167. R. M. Kothari, Там же, 53, 580 (1970).
168. R. M. Kothari, Там же, 56, 151 (1970).
169. R. M. Kothari, Там же, 57, 83 (1971).
170. R. M. Kothari, Там же, 59, 194 (1971).
171. R. M. Kothari, Там же, 54, 239 (1971).
172. K. S. Kirby, J. R. B. Hastings, M. A. O'Sullivan, Biochim. biophys. acta, 61, 978 (1962).
173. C. Kidson, K. S. Kirby, Там же, 76, 624 (1963).
174. H. Wiesmeijer, K. Kjellin, H. G. Boman, Там же, 61, 625 (1962).
175. B. P. Doctor, J. Apgar, R. W. Holley, J. Biol. Chem., 236, 1117 (1961).
176. J. Apgar, R. W. Holley, S. H. Merril, Там же, 237, 796 (1962).
177. M. Tada, M. Schweiger, H. G. Zachau, Ztschr. physiol. Chem., 328, 85 (1962).
178. M. Tada, J. Biochem. (Tokyo), 51, 92 (1962).
179. L. Rubin, Biochim. biophys. acta, 76, 624 (1963).
180. B. P. Doctor, Meth. in Enzymol., 12, 644 (1967).
181. D. M. Brown, B. F. Clark, M. J. A. Tanner, Europ. J. Biochem., 5, 492 (1968).
182. N. Imura, G. B. Weiss, R. W. Chambers, Biochemistry, 8, 4776 (1969).
183. M. Tanaka, H. H. Richards, G. L. Cantoni, Biochim. biophys. acta, 61, 846 (1962).
184. P. L. Bergquist, J. F. Scott, Там же, 87, 199 (1964).
185. K. H. Muench, P. Berg, Fed. Proc., 23, 477 (1964).
186. W. A. Winsten, Biopolymers, 2, 337 (1964).
187. P. L. Bergquist, J. M. Robertson, Biochim. biophys. acta, 95, 357 (1965).
188. M. Schweiger, H. G. Zachau, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem., 342, 93 (1965).
189. H. G. Zachau, Там же, 342, 98 (1965).
190. A. D. Kelmers, M. P. Stulberg, Fed. Proc., 24, 482 (1965).
191. A. D. Kelmers, G. D. Novelli, M. P. Stulberg, J. Biol. Chem., 240, 3979 (1965).
192. J. F. Weiss, A. D. Kelmers, Biochemistry, 6, 2507 (1967).
193. J. F. Weiss, R. L. Pearson, A. D. Kelmers, Там же, 7, 3479 (1968).
194. R. L. Pearson, J. F. Weiss, A. D. Kelmers, Biochim. biophys. acta, 228, 770 (1971).
195. S. Nishimura, I. B. Weinstein, Biochemistry, 8, 832 (1969).
196. W. F. Anderson, J. M. Gilbert, Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 456 (1969).
197. L. Schugart, B. Chastain, G. D. Novelli, Biochim. Biophys. Acta, 186, 384 (1969).
198. J. F. Mushinsky, I. Galizzi, G. Ehrenstein, Biochemistry, 9, 489 (1970).
199. R. L. Pearson, J. F. Weiss, A. D. Kelmers, Biochim. biophys. acta, 228, 770 (1971).
200. D. W. Holladay, R. L. Pearson, A. D. Kelmers, Там же, 240, 541 (1971).
201. A. R. Bellami, R. K. Ralf, Meth. in Enzymol., 12B, 156 (1968).
202. E. T. Bolton, B. J. McCarthy, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 48, 1390 (1962).
203. P. T. Gilham, J. Am. Chem. Soc., 84, 1311 (1962).
204. A. J. Adler, A. Rich, Там же, 84, 3977 (1962).
205. E. T. Bolton, B. J. McCarthy, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 50, 156 (1963).
206. A. J. Bendich, E. T. Bolton, Meth. in Enzymol., 12B, 635 (1966).
207. E. T. Bolton, B. J. McCarthy, J. Mol. Biol., 8, 201 (1964).
208. B. J. McCarthy, E. T. Bolton, Там же, 8, 184 (1964).
209. A. Wada, A. Kishizaki, Biochim. biophys. acta, 166, 29 (1968).
210. R. J. Britten, Science, 142, 963 (1963).
211. P. P. Hung, Там же, 149, 639 (1965).
212. Д. Джилесин, см. ²³, стр. 147.
213. J. B. Hadson, Canad. J. Biochem., 49, 631 (1971).
214. A. P. Nygaard, Biochem. Biophys. Res. Commun., 12, 98 (1963).

215. A. P. Nygaard, B. D. Hall, J. Mol. Biol., 9, 125 (1964).
216. R. L. Armstrong, J. A. Boezi, Biochim. biophys. acta, 103, 60 (1965).
217. D. Gillespie, S. Spiegelman, J. Mol. Biol., 12, 829 (1965).
218. J. A. Wohlhieter, S. Falkow, R. V. Citarella, Biochim. biophys. acta, 129, 475 (1966).
219. F. Ritossa, K. Atwood, S. Spiegelman, Genetics, 54, 663 (1966).
220. E. K. F. Batuz, E. Reilly, Science, 151, 138 (1966).
221. W. S. Riggsby, Fed. Proc., 27, 804 (1968).
222. W. S. Riggsby, Biochemistry, 8, 222 (1969).
223. Д. Боези, Р. Армстронг, см. ²³, стр. 125.
224. M. Jarus, P. Berg, J. Mol. Biol., 28, 479 (1967).
225. R. M. Litman, J. Biol. Chem., 243, 6222 (1968).
226. B. Alberts, G. Herrick, Meth. in Enzymol., 21, 198 (1971).
227. J. Tonisawa, N. Anzaku, Y. Iwama, J. Mol. Biol., 21, 247 (1966).
228. E. K. F. Bautz, Nature, 221, 43 (1969).
229. B. M. Alberts, L. M. Frey, Там же, 227, 1313 (1970).
230. P. T. Gilham, Meth. in Enzymol., 21, 191 (1971).
231. E. Sander, D. McCormick, L. Wright, J. Chromatogr., 21, 419 (1966).
232. P. T. Gilham, Biochemistry, 8, 2809 (1968).
233. P. Gilham, W. Robinson, J. Am. Chem. Soc., 86, 4985 (1964).
234. P. T. Gilham, Там же, 86, 4982 (1964).
235. S. Erham, N. Northrup, F. Leach, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 53, 646 (1965).
236. E. K. F. Bautz, B. D. Hall, Там же, 48, 400 (1962).
237. E. K. F. Bautz, Biochem. Biophys. Res. Commun., 9, 192 (1962).
238. E. K. F. Bautz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 49, 68 (1963).
239. A. Wagner, R. Bugianesi, T. Shen, Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 484 (1971).
240. J. Denburg, M. DeLuca, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67, 1057 (1970).
241. E. Jellum, L. Eldjarn, Biochim. biophys. acta, 100, 144 (1965).
242. E. Jellum, O. F. Nygaard, H. Harrington, L. Eldjarn, Там же, 114, 612 (1966).
243. P. Gilham, Там же, 246, 337 (1971).
244. H. Schott, Angew. Chem., 17, 819 (1972).
245. Г. Детерман, Гельхроматография, «Мир», М., 1970.
246. T. C. Laurent, J. Killander, J. Chromatogr., 14, 317 (1964).
247. P. G. Square, Arch. biochem. biophys., 107, 471 (1964).
248. T. Schleich, J. Goldstein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 52, 744 (1964).
249. H. G. Zachau, Biochim. biophys. acta, 108, 355 (1965).
250. R. Rosenthaler, P. Fromageot, J. Mol. Biol., 11, 458 (1965).
251. A. D. Kelmers, G. D. Novelli, M. P. Stulberg, J. Biol. Chem., 240, 3979 (1965).
252. J. Ahonen, E. Kulonen, J. Chromatogr., 24, 197 (1966).
253. T. Schleich, J. Goldstein, J. Mol. Biol., 15, 136 (1966).
254. A. D. Kelmers, J. Biol. Chem., 241, 3540 (1966).
255. P. Flodin, J. Chromatogr., 5, 103 (1967).
256. B. Egan, R. Rhear, A. Kelmers, Biochim. biophys. acta, 174, 23 (1969).
257. R. Rosenthaler, P. Fromageot, J. Mol. Biol., 11, 458 (1965).
258. J. Schmidt, B. R. Reid, Biochem. Biophys. Res. Commun., 41, 1261 (1970).
259. J. Schmidt, B. R. Reid, Anal. Biochem., 39, 162 (1971).
260. C. E. Sekeris, N. Lang, P. Karlson, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem. 341, 36 (1965).
261. C. Davila, P. Charles, L. Ledoux, J. Chromatogr., 19, 382 (1965).
262. K. Bauer, Там же, 32, 529, 538 (1968).
263. Э. И. Будовский, В. П. Демушкин, Биохимия, 29, 1063 (1964).
264. А. Л. Мазин, Б. Ф. Ванюшин, Там же, 32, 377 (1967).
265. Д. Смит, см. ²³, стр. 49.
266. G. W. Rushizky, E. M. Bartos, H. A. Sober, Biochemistry, 3, 626 (1964).
267. G. W. Rushizky, H. A. Sober, Biochem. Biophys. Res. Commun., 14, 276 (1964).
268. В. Д. Аксельрод, Т. В. Венкстерн, А. А. Баев, Биохимия, 30, 999 (1965).
269. G. W. Rushizky, I. H. Skavenski, H. A. Sober, J. Biol. Chem., 240, 3984 (1965).
270. J. C. Lee, V. M. Ingram, J. Mol. Biol., 41, 431 (1969).
271. R. V. Tomlinson, G. M. Tener, J. Am. Chem. Soc., 84, 2644 (1962).
272. R. Tomlinson, G. Tener, Biochemistry, 2, 697 (1963).
273. R. V. Holley, J. T. Madison, A. Zamir, Biochem. Biophys. Res. Commun., 17, 389 (1964).
274. G. B. Petersen, J. M. Reeves, Biochim. biophys. acta, 179, 510 (1969).
275. R. Cerný, E. Cerna, J. H. Spencer, J. Mol. Biol., 46, 145 (1969).
276. А. Л. Мазин, Г. Е. Сулимов, Д. Х. Кадырова, Б. Ф. Ванюшин, А. Н. Белозерский, ДАН, 199, 1443 (1971).
277. J. B. Hall, R. L. Sinsheimer, J. Mol. Biol., 6, 115 (1963).
278. H. G. Zachau, Hoppe Seyler's Ztschr. physiol. Chem., 342, 98 (1965).
279. К. Мура, Ю. Халиш, см. ²³, стр. 81.
280. G. W. Rushizky, H. A. Sober, Biochem. Biophys. Res. Commun., 10, 304 (1963).

281. U. L. RajBhandary, S. H. Chang, J. Biol. Chem., 243, 598 (1968).
282. С. К. Василенко, В. П. Демушкин, Д. Г. Кнорре, Э. И. Будовский, ДАН, 162, 694 (1965).
283. M. Staehelin, J. Mol. Biol., 8, 470 (1964).
284. U. L. RajBhandary, J. Biol. Chem., 243, 584 (1968).
285. V. V. Vlasov, N. I. Grineva, D. G. Knorre, FEBS Letters, 20, 66 (1972).
286. K. Satoh, Y. Inoue, Anal. Biochem., 39, 263 (1971).
287. K. W. Mundry, Bull. soc. clin. biol., 52, 873 (1970).
288. K. W. Mundry, Mol. Gen. Genet., 105, 361 (1969).
289. P. Hamilton, J. Anal. Chem., 30, 914 (1958).
290. V. Koprda, M. Fojtik, Chem. Listy, 62, 679 (1968).
291. С. В. Кузьмин, В. В. Матвеев, Е. К. Прессман, Л. С. Сандахчиев, Биохимия, 34, 706 (1969).
292. В. В. Власов, М. А. Грачев, Н. И. Комарова, С. В. Кузьмин, Н. Н. Мензорова, Мол. биология, 6, 809 (1972).
293. Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот, «Наука», М., 1973.
294. P. G. Bollum, J. Biol. Chem., 237, 1945 (1962).
295. A. Osaka, J. I. Miura, M. Laskowski, Там же, 239, 3498 (1964).
296. R. B. Setlow, W. L. Carrier, F. J. Bollum, Biochim. biophys. acta, 91, 446 (1964).
297. R. L. Tyndall, K. B. Jacobson, E. Teeter, Там же, 87, 335 (1964).
298. R. L. Tyndall, K. B. Jacobson, E. Teeter, Там же, 108, 11 (1965).
299. K. Randerath, Angew. Chem., 73, 436 (1961).
300. K. Randerath, Там же, 73, 674 (1961).
301. K. Randerath, Nature, 194, 768 (1962).
302. K. Randerath, Angew. Chem., 74, 484 (1962).
303. C. C. Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 54, 158 (1965).
304. E. Randerath, J. W. T. Brocke, K. Randerath, FEBS Letters, 2, 10 (1968).
305. К. Рандерат, Е. Рандерат, см. 23, стр. 31.
306. E. M. Southern, A. R. Mitchell, Biochem. J., 123, 613 (1971).
307. A. D. Mirsabekov, B. F. Griffin, J. Mol. Biol., 72, 633 (1972).
308. B. E. Griffin, FEBS Letters, 15, 165 (1971).
309. E. Randerath, K. Randerath, J. Chromatogr., 31, 485 (1967).
310. E. Randerath, K. Randerath, Там же, 31, 500 (1967).
311. K. Randerath, G. Weimann, Biochim. biophys. acta, 76, 129 (1963).
312. Э. Шталь, Хроматография в тонких слоях, «Мир», М., 1963, стр. 15.
313. Д. Вальди, Там же, стр. 37.
314. Х. Мангольд, Там же, стр. 436.
315. А. И. Крутилина, Т. В. Венкстерн, А. А. Баев, Биохимия, 29, 333 (1964).
316. A. Armstrong, H. Hagopian, V. M. Ingram, I. Sjöquist, J. Sjöquist, Biochemistry, 3, 1194 (1964).
317. А. А. Баев, Т. В. Венкстерн, А. Д. Мирзабеков, А. И. Крутилина, L. Li, V. D. Axelrod, Biochim. biophys. acta, 108, 162 (1965).
318. А. И. Крутилина, А. Д. Мирзабеков, Т. В. Венкстерн, А. А. Баев, Биохимия, 30, 1225 (1965).
319. Л. Ли, Т. В. Венкстерн, А. Д. Мирзабеков, А. И. Крутилина, А. А. Баев, Там же, 31, 117 (1966).
320. J. H. Spencer, E. Chargaff, Biochim. biophys. acta, 68, 9 (1963).
321. H. S. Shapiro, E. Chargaff, Там же, 76, 1 (1963).
322. P. L. Bergquist, J. F. Scott, Там же, 87, 199 (1964).
323. T. F. Gabriel, J. Chromatogr., 36, 518 (1968).
324. S. Suzuki, N. Takahashi, M. Sugiyama, Y. Nakanishi, Biochim. biophys. acta, 91, 648 (1964).
325. J. Lapidot, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 85, 1363 (1963).
326. H. Schadler, H. G. Khorana, Там же, 85, 3828 (1963).
327. J. Lapidot, H. G. Khorana, Там же, 85, 3852 (1963).
328. C. Coutsoegeorgopolos, H. G. Khorana, Там же, 86, 2926 (1964).
329. R. Lohrmann, H. G. Khorana, Там же, 86, 4188 (1964).
330. D. Söll, H. G. Khorana, Там же, 87, 350 (1965).
331. T. M. Jacob, H. G. Khorana, Там же, 87, 368 (1965).
332. E. Ohtsuka, M. W. Moon, H. G. Khorana, Там же, 87, 2956 (1965).
333. T. M. Jacob, H. G. Khorana, Там же, 87, 2971 (1965).
334. S. A. Narang, H. G. Khorana, Там же, 87, 2981 (1965).
335. S. A. Narang, T. M. Jacob, H. G. Khorana, Там же, 87, 2988 (1965).
336. A. Franke, F. Eckstein, K. H. Scheit, F. Cramer, Chem. Ber., 101, 944 (1968).
337. P. L. Bergquist, J. Chromatogr., 19, 615 (1965).
338. D. Lando, J. Rudder, M. P. Garilhe, Там же, 34, 202 (1968).
339. H. G. Gassen, Там же, 39, 147 (1969).
340. D. Lando, J. Rudder, M. P. Garilhe, Там же, 30, 143 (1967).
341. Z. Stansky, Там же, 10, 456 (1963).

342. Д. Смит, см. ²³, стр. 49.
343. F. Sanger, G. G. Brownlee, B. G. Barrell, J. Mol. Biol., 13, 373 (1965).
344. Ф. Сангер, Г. Браунли, см. ²³, стр. 59.
345. B. G. Barrell, Procedures in NA Res., 2, 751 (1971).
346. P. Fellner, F. Sanger, Nature, 219, 236 (1968).
347. G. G. Brownlee, F. Sanger, J. Mol. Biol., 23, 337 (1967).
348. J. Kindley, Там же, 30, 125 (1967).
349. K. Murray, Biochem. J., 118, 831 (1970).
350. J. Gangloff, G. Keith, G. Dirheimer, Bull. soc. chim. biol., 52, 125 (1970).
351. G. Brownlee, F. Sanger, B. G. Barrell, J. Mol. Biol., 34, 379 (1968).
352. G. Brownlee, F. Sanger, Europ. J. Biochem., 11, 395 (1969).
353. J. M. Adams, P. G. N. Jeppesen, F. Sanger, B. G. Barrell, Nature, 223, 1009 (1969).
354. S. Cory, K. A. Marcker, Europ. J. Biochem., 12, 177 (1970).
355. V. Ling, J. Mol. Biol., 64, 87 (1972).
356. V. Ling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 742 (1972).
357. H. M. Goodman, J. Abelson, A. Landy, S. Brenner, J. Smith, Nature, 217, 1019 (1968).
358. S. K. Dube, K. A. Marcker, P. F. C. Clark, S. Cory, Там же, 218, 232 (1968).
359. S. Cory, K. A. Marcker, S. K. Dube, B. F. C. Clark, Там же, 220, 1039 (1968).
360. M. Janiv, B. G. Barrell, Там же, 222, 278 (1969).
361. S. K. Dube, K. A. Marcker, Europ. J. Biochem., 8, 256 (1969).
362. J. Abelson, L. Barnett, S. Brenner, M. Gefter, A. Landy, R. Rassel, J. D. Smith, FEBS Letters, 3, 1 (1969).
363. B. G. Barrell, F. Sanger, Там же, 3, 275 (1969).
364. J. N. Abelson, M. L. Gefter, L. Barnett, A. Landy, R. L. Sussel, J. D. Smith, J. Mol. Biol., 47, 15 (1970).
365. S. Arnott, Progr. Biophys. Mol. Biol., 22, 179 (1971).
366. J. Gangloff, G. Keith, J. P. Ebel, Biochim. biophys. acta, 259, 210 (1972).
367. Z. Ohashi, F. Harada, S. Nishimura, FEBS Letters, 20, 239 (1972).
368. G. G. Brownlee, F. Sanger, B. G. Barrell, Nature, 215, 735 (1967).
369. G. Forget, S. M. Weissman, Science, 158, 1695 (1967).
370. K. Ohe, S. M. Weissman, Там же, 167, 879 (1970).
371. P. Fellner, Europ. J. Biochem., 11, 12 (1969).
372. P. Fellner, J. P. Ebel, FEBS Letters, 6, 102 (1970).
373. P. Fellner, C. Ehresmann, J. P. Ebel, Nature, 225, 26 (1970).
374. P. F. Spahr, R. F. Gesteland, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 59, 876 (1968).
375. J. A. Steitz, Nature, 224, 957 (1969).
376. J. Kindley, D. H. Stapled, Там же, 224, 964 (1969).
377. M. A. Billeter, J. E. Dahlberg, H. M. Goodman, J. Hindley, C. Weissmann, Там же, 224, 1083 (1969).
378. J. L. Nichols, Там же, 225, 147 (1970).
379. M. Szelely, F. Sanger, J. Mol. Biol., 43, 607 (1969).
380. K. Randerath, E. Randerath, Meth. in Enzymol., 12A, 323 (1967).
381. K. Randerath, Thin layer chromatog., Verlag chemie, 1963, N 4.
382. G. Pataki, Adv. in Chromatog., 7, 47 (1968).
383. H. K. Mangold, H. O. Schmid, E. Stahl, Meth. of Biochem. Anal., 12, 393 (1964).
384. K. Randerath, Biochem. Biophys. Res. Commun., 6, 452 (1961/62).
385. P. Grippo, M. Iaccarino, M. Rossi, E. Scarano, Biochim. biophys. acta, 95, 1 (1965).
386. K. Randerath, H. Y. Struck, J. Chromatogr., 6, 365 (1961).
387. Т. С. Ломакина, Л. И. Гуськова, Н. И. Гринева, Хим. природ. соед. АН Узб. ССР, 1965, 335.
388. K. Randerath, E. Randerath, J. Chromatogr., 22, 110 (1966).
389. G. Pataki, Там же, 29, 126 (1967).
390. W. L. Wechter, Collect. Czechoslov. Chem. Commun., 35, 2003 (1970).
391. K. Randerath, Angew. Chem., 74, 780 (1962).
392. J. E. Franklin, E. G. Trams, Biochim. biophys. acta, 230, 105 (1971).
393. E. Hannecart-Pokorni, D. Dokegel, F. Depuydt, J. Dirckx, Там же, 201, 155 (1970).
394. J. G. Jacobi, S. H. Zbarsky, Canad. J. Biochem., 44, 9 (1966).
395. Z. F. Chmielewicz, M. Acara, Anal. Biochem., 9, 94 (1964).
396. W. Hibi, H. Kröger, J. Chromatogr., 26, 545 (1967).
397. F. M. DeFilippes, Science, 144, 1350 (1964).
398. J. M. Gebicki, S. Freed, Anal. Biochem., 14, 253 (1966).
399. J. L. Starr, B. Ramberg, Nature, 211, 414 (1966).
400. A. M. Tometsko, N. Delihias, Anal. Biochem., 18, 72 (1964).
401. K. Keck, U. Hagen, Biochim. biophys. acta, 87, 685 (1964).
402. B. B. Baker, D. H. Buss, J. Org. Chem., 31, 217 (1966).
403. R. F. Derr, C. S. Alexander, H. T. Nagasana, J. Chromatogr., 21, 146 (1966).
404. J. A. Montgomery, K. Hawson, S. J. Clayton, H. J. Thomas, J. Org. Chem., 31, 2202 (1966).
405. E. R. Garrett, J. K. Seydel, A. J. Sharp, Там же, 31, 2219 (1966).

406. K. H. Scheit, *Tetrahedron Letters*, 1965, 1031.
407. K. H. Scheit, A. Holy, Там же, 1966, 4303.
408. K. H. Scheit, Там же, 1967, 113.
409. K. A. Watanabe, J. J. Fox, *Angew. Chem.*, 78, 589 (1966).
410. J. J. Lech, *J. Chromatogr.*, 42, 136 (1969).
411. J. D. Upton, Там же, 52, 171 (1970).
412. C. J. Pollard, *Biochim. biophys. acta*, 201, 511 (1970).
413. R. L. Scheig, R. Annunziata, L. A. Pesch, *Anal. Biochem.*, 5, 291 (1963).
414. B. R. Barker, W. F. Wood, *J. Med. Chem.*, 11, 644 (1968).
415. B. R. Barker, J. L. Kelley, Там же, 11, 682 (1968).
416. M. J. Dickinson, Там же, 10, 1165 (1967).
417. K. H. Scheit, *Chem. Ber.*, 101, 1147 (1968).
418. K. G. Kowolli, P. Langen, Там же, 101, 235 (1968).
419. K. H. Scheit, A. Holy, *Biochim. biophys. acta*, 149, 344 (1967).
420. B. Sorbo, B. Lundberg, Там же, 157, 445 (1968).
421. G. Balle, P. Cerutti, B. Witkop, *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 3946 (1966).
422. A. Massaglia, U. Rosa, S. Sosi, *J. Chromatogr.*, 17, 316 (1965).
423. A. Holy, K. H. Scheit, *Ber.*, 99, 3778 (1966).
424. F. Echstein, *Tetrahedron Letters*, 1965, 531.
425. G. Kresze, E. Lodeman, A. Wachter, *Naturforsch.*, 22B, 285 (1967).
426. K. H. Scheit, *Biochim. biophys. acta*, 134, 217 (1967).
427. K. H. Scheit, *Ber.*, 99, 3884 (1966).
428. P. Remy, G. Dirheimer, J. P. Ebel, *J. Chromatogr.*, 31, 609 (1967).
429. W. B. Elliott, J. D. Klingman, *Nature*, 206, 1044 (1965).
430. G. Marzullo, J. W. Lash, *Anal. Biochem.*, 18, 579 (1967).
431. I. Mizuno, T. Sasaki, *Tetrahedron Letters*, 1965, 4579.
432. E. Bancher, J. Washüttl, *Mikrochim. Acta*, 1967, 223.
433. J. M. Gebich, F. Freed, *Anal. Biochem.*, 14, 253 (1966).
434. E. Randerath, K. Randerath, *J. Chromatogr.*, 10, 509 (1963).
435. K. Randerath, *Biochim. biophys. acta*, 62, 852 (1962).
436. G. Weimann, K. Randerath, *Experientia*, 19, 19 (1963).
437. K. Randerath, E. Randerath, *Anal. Biochem.*, 15, 575 (1965).
438. K. Randerath, E. Randerath, *J. Chromatogr.*, 16, 111 (1964).
439. G. Sautini, V. Ulzich, Там же, 49, 560 (1970).
440. R. G. Sticland, *Anal. Biochem.*, 10, 108 (1965).
441. J. M. Foster, H. Abbott, M. L. Terry, Там же, 16, 149 (1970).
442. P. Derumes, G. Biserte, *J. Chromatogr.*, 49, 563 (1970).
443. D. L. Greemann, R. Ch. C. Huang, M. Smith, M. Furrab, *Anal. Biochem.*, 31, 348 (1969).
444. E. Randerath, K. Randerath, Там же, 12, 83 (1965).
445. G. A. Aboot, *Biochim. biophys. acta*, 153, 531 (1968).
446. D. D. Christianson, H. B. Sinclair, J. W. Paulis, Там же, 121, 412 (1966).
447. A. P. Remenchik, J. Bernsohn, *Anal. Biochem.*, 18, 1 (1967).
448. A. Neiderwieser, G. G. Honegger, *Adv. Chromatogr.*, 2, 123 (1966).
449. K. Randerath, *Experientia*, 20, 406 (1964).
450. J. Neuhaard, E. Randerath, K. Randerath, *Anal. Biochem.*, 13, 211 (1965).
451. K. Randerath, *Biochim. biophys. acta*, 76, 622 (1963).
452. J. Neuhaard, Там же, 129, 104 (1966).
453. M. Swindlemirst, S. J. Berry, W. Tiecheln, Там же, 228, 313 (1971).
454. G. H. Butean, J. E. Simmons, *Anal. Biochem.*, 37, 461 (1970).
455. E. Randerath, K. Randerath, *J. Chromatogr.*, 16, 126 (1964).
456. G. Edlin, J. Neuhaard, *J. Mol. Biol.*, 24, 225 (1967).
457. J. Neuhaard, A. Munch-Petersen, *Biochim. biophys. acta*, 114, 61 (1966).
458. E. Konik, *J. Chromatogr.*, 137, 128 (1968).
459. G. Pataki, H. Zürcher, Там же, 33, 103 (1968).
460. M. F. Turchinsky, L. P. Shershneva, *Anal. Biochem.*, 54, 315 (1973).
461. K. Randerath, *Thin-Layer Chromatogr.*, Academic Press, 1966.
462. C. P. Dietrich, S. M. C. Dietrich, *J. Chromatogr.*, 15, 277 (1964).
463. S. Fahn, R. W. Albers, G. J. Koval, *Anal. Biochem.*, 10, 468 (1965).
464. K. Randerath, *Nature*, 194, 768 (1962).
465. K. Jazoszewicz, *J. Chromatogr.*, 24, 279 (1966).
466. P. M. Carroll, J. C. Graham, *Canad. J. Biochem.*, 44, 529 (1966).
467. H. С. Пантелеева, *Вестн. Ленингр. ун-вер.*, Сер. биол., 9, 73 (1964).
468. T. V. Waehneltdt, S. W. Fox, *Biochim. biophys. acta*, 134, 1 (1967).
469. B. Arreguen, *J. Chromatogr.*, 26, 527 (1967).
470. R. G. Coffey, H. Morse, R. W. Newburgh, *Biochim. biophys. acta*, 114, 547 (1966).
471. G. Weimann, K. Randerath, *Experientia*, 19, 49 (1963).
472. M. J. Morton, W. J. Rogers, *Anal. Biochem.*, 13, 108 (1965).
473. G. Marechal, G. Bechers-Bleukx, *Biochem. Ztschr.*, 345, 286 (1966).

474. J. Wachüttl, E. Banches, *Mikrochim. Acta*, 1967, 395.
475. R. D. Baner, K. D. Martin, *J. Chromatogr.*, 16, 519 (1964).
476. A. Sanderson, C. E. Bodwell, A. M. Pearson, *Nature*, 206, 938 (1965).
477. T. A. Dyer, *J. Chromatogr.*, 11, 414 (1963).
478. R. C. Coffey, R. W. Newburgh, Там же, 11, 376 (1963).
479. I. A. Shafritz, J. R. Senion, *Biochim. biophys. acta*, 141, 332 (1967).
480. M. A. Ryzak, *Anal. Biochem.*, 20, 192 (1967).
481. Н. С. Толмачева, А. Н. Николенко, *Ж. аналит. химии*, 22, 299 (1967).
482. R. Markham, J. D. Smith, *Biochem. J.*, 52, 552 (1952).
483. J. W. Littfield, D. B. Dunn, *Biochem. J.*, 70, 642 (1958).
484. A. M. Tometsko, N. Delihass, *Anal. Biochem.*, 18, 72 (1967).
485. G. Augusti-Tocco, C. Carestia, P. Grippo, E. Parisi, E. Scarana, *Biochim. biophys. acta*, 155, 8 (1968).
486. A. Schweüger, H. Cünther, *J. Chromatogr.*, 19, 440 (1965).
487. J. E. Edström, *Methods in Cell Physiology*, Academic Press, 1, 417 (1964).
488. J. E. Edström, *Biochim. biophys. acta*, 80, 399 (1964).
489. W. E. Cohn, *Methods in Enzymol.*, 3, 724 (1957).
490. W. E. Cohn, E. Volkin, J. X. Khym, *Biochem. Preparations*, 5, 49 (1957).
491. W. E. Cohn, *Methods in Enzymol.*, 3, 724 (1957).
492. W. E. Cohn, *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 1471 (1950).
493. M. Staehelin, *Biochim. biophys. acta*, 49, 11 (1961).
494. C. Davey, Там же, 61, 538 (1962).
495. W. E. Cohn, F. Bollum, Там же, 48, 588 (1961).
496. R. Nilsson, M. Syunnesson, *Acta Chem. Scand.*, 15, 1017 (1968).
497. В. Кон, *Нуклеиновые кислоты*, ИЛ, 1, 464 (1957).
498. N. G. Anderson, S. F. C. Ladd, *Biochim. biophys. acta*, 55, 275 (1962).
499. N. G. Anderson, J. C. Green, M. L. Barber, S. F. C. Ladd, *Anal. Biochem.*, 6, 153 (1963).
500. M. Hori, E. Konichi, *J. Biochem.*, 56, 375 (1964).
501. W. Sachsemaier, H. Immich, J. Grunst, *Europ. J. Biochem.*, 8, 557 (1969).
502. F. R. Blattner, H. P. Erickson, *Anal. Biochem.*, 18, 220 (1967).
503. F. Murakami, S. Rokushika, H. Hatano, *J. Chromatogr.*, 53, 584 (1970).
504. T. Rosett, J. G. Smith, J. Jr. I. Matsuo, P. A. Bailey, D. B. Smith, S. Surakiat, Там же, 49, 309 (1970).
505. F. M. Rossenbloom, J. F. Henderson, J. C. Caldwell, W. N. Kelley, J. E. Seegmiller, *J. Biol. Chem.*, 243, 1166 (1968).
506. B. E. Bonnellycke, K. Dus, S. L. Miler, *Anal. Biochem.*, 27, 262 (1969).
507. J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, 8, 72 (1970).
508. J. J. Kirkland, Там же, 7, 361 (1969).
509. J. J. Kirkland, Там же, 7, 7 (1969).
510. J. J. Kirkland, *Anal. Chem.*, 41, 218 (1969).
511. C. Horvath, S. R. Lipsky, Там же, 41, 1227 (1969).
512. D. P. Holdgate, T. W. Goodwin, *Biochim. biophys. acta*, 91, 328 (1964).
513. H. J. Shikura, Y. Yamamada, S. Nishimura, Там же, 228, 471 (1971).
514. L. Josefsson, Там же, 72, 133 (1963).
515. R. Shapiro, R. S. Klein, *Biochem.*, 5, 2358 (1966).
516. A. Massaglia, U. Rosa, S. Sosi, *J. Chromatogr.*, 17, 316 (1965).
517. A. D. Broom, L. B. Townsend, J. W. Jones, *Biochemistry*, 3, 494 (1964).
518. C. V. Cole, C. Ross, *Anal. Biochem.*, 17, 526 (1966).
519. G. Pataki, *J. Chromatogr.*, 29, 26 (1967).
520. G. Shaw, Smallwood, *J. Chem. Soc. (C)*, 1970, 2206.
521. H. Charles, J. Myron, *Anal. Biochem.*, 25, 55 (1968).
522. M. Miyamoto, H. Tarayama, *Biochim. biophys. acta*, 228, 324 (1971).
523. S. C. Mutha, T. L. Brown, *J. Chromatogr.*, 52, 496 (1970).
524. M. Downing, A. Adams, L. Hellenga, *Biochim. biophys. acta*, 108, 233 (1965).
525. K. Randerath, *Nature*, 205, 908 (1965).
526. K. Randerath, E. Randerath, *Experientia*, 24, 1192 (1968).
527. H. Fraenkel-Conrat, *Meth. in Enzymol.*, 12B, 224 (1968).
528. R. F. Greene, R. A. Flickiger, *Biochim. biophys. acta*, 217, 447 (1970).
529. K. Randerath, E. Randerath, *Anal. Biochem.*, 28, 110 (1969).
530. K. Randerath, K. M. Flood, E. Randerath, *FEBS Letters*, 5, 31 (1969).
531. K. Randerath, *Cancer. Res.*, 31, 658 (1971).
532. K. Randerath, *Analyt. Chem.*, 41, 991 (1969).
533. K. Randerath, *Anal. Biochem.*, 34, 188 (1970).
534. P. Cerutti, J. W. Holt, N. Miller, *J. Mol. Biol.*, 34, 505 (1968).
535. U. L. RajBhandary, *J. Biol. Chem.*, 243, 556 (1968).
536. K. Randerath, S. K. Mackinnon, E. Randerath, *FEBS Letters*, 15, 81 (1971).
537. K. T. Wang, I. S. Wang, *Biochim. biophys. acta*, 142, 280 (1967).
538. G. Etzold, R. Hintsche, *Chem. Ber.*, 101, 226 (1968).

539. O. W. Wagner, H. A. Lee, P. A. Frey, J. Biol. Chem., 241, 1751 (1966).
540. M. Uziel, C. K. Koh, W. E. Cohn, Anal. Biochem., 25, 77 (1969).
541. M. Uziel, Biochem. Biophys. Res. Comm., 25, 105 (1966).
542. J. X. Khym, M. Uziel, Biochemistry, 7, 422 (1968).
543. B. G. Moore, Can. J. Biochem., 48, 702 (1970).
544. A. Carisano, M. Riva, A. Bonocchi, J. Chromatogr., 40, 386 (1969).
545. L. Sweetman, W. L. Nyhan, Anal. Biochem., 31, 358 (1969).
546. J. Porath, P. Flodin, Nature, 183, 1657 (1959).
547. S. D. Ehrlich, J. P. Thiely, G. Bernardi, Biochim. biophys. acta, 246, 161 (1971).
548. H. Ishikura, J. Biochem., 52, 324 (1962).
549. R. Brown, Biochim. biophys. acta, 142, 267 (1967).
550. T. Hohn, H. Schaller, Там же, 138, 466 (1967).
551. C. McMartin, J. Vinter, J. Chromatogr., 41, 188 (1969).
552. F. M. Rosenbloom, J. F. Henderson, I. C. Caldwell, W. N. Kelley, J. E. Seegmiller, J. Biol. Chem., 243, 1166 (1968).
553. G. Gorbach, J. Henke, J. Chromatogr., 37, 225 (1968).
554. B. Gelotte, Там же, 3, 330 (1960).
555. B. Gelotte, Naturwiss., 48, 554 (1961).
556. C. Wasternach, H. Reinbothe, J. Chromatogr., 48, 551 (1970).
557. L. Sweetman, W. L. Nyhan, Там же, 32, 662 (1968).
558. G. Dirheimer, J. P. Ebel, Bull. soc. chim. biol., 49, 447 (1967).
559. S. Zadrazil, Z. Sormova, F. Sorm. Coll. Czech. Chem. Commun., 26, 2643 (1961).
560. J. Porath, Biochim. biophys. acta, 39, 193 (1960).
561. J. De Bersagles, J. Chromatogr., 31, 222 (1967).
562. S. D. Ehrlich, G. Torti, G. Bernardi, Biochemistry, 10, 2000 (1971).
563. M. E. Ittel, M. Wentzerith, J. P. Lahnd, Eur. J. Biochem., 17, 415 (1970).
564. T. Hohn, W. Pollmann, Naturforsch., 18b, 919 (1963).
565. J. L. Hoffman, Anal. Biochem., 33, 209 (1970).
566. G. Piperno, G. Bernardi, Biochim. biophys. acta, 238, 388 (1971).
567. M. Carrara, G. Bernadi, Biochem., 7, 1121 (1968).
568. A. N. Schwartz, A. W. G. Lee, B. A. Zabin, J. Chromatogr., 20, 154 (1965).
569. R. Braun, Biochim. et Biophys. Acta, 149, 601 (1967).
570. I. Reijer, K. Strzalka, E. Machowicz, Bull. de l'academ. Pol. des Science, 19, 1 (1971).
571. M. Uziel, W. E. Cohn, Biochim. biophys. acta, 103, 539 (1965).
572. M. Carrara, G. Bernardi, Там же, 155, 1 (1968).
573. R. C. Van Den Bos, G. J. Van Kamp, R. J. Planta, Anal. Biochem., 35, 32 (1970).
574. F. J. Kull, M. Soodak, Там же, 32, 10 (1969).
575. M. Uziel, W. E. Cohn, Federation Proc., 24, 668 (1965).
576. М. Узел, см. ²³, стр. 90.
577. J. MacGee, Anal. Biochem., 14, 305 (1965).
578. G. Pataki, A. Niederwiser, J. Chromatogr., 29, 133 (1967).
579. H. T. Miles, H. M. Fales, Anal. Biochem., 34, 860 (1962).
580. J. MacGee, Federation Proc., 23, 531 (1964).
581. R. L. Hancock, D. L. Goleman, Anal. Biochem., 10, 365 (1966).
582. R. L. Hancock, J. Chromatogr. Sci., 4, 363 (1966).
583. T. Hashizume, Y. Sasaki, Anal. Biochem., 15, 199 (1966).
584. R. L. Hancock, J. Gas. Chromatogr., 4, 363 (1966).
585. R. L. Hancock, Там же, 6, 431 (1968).
586. V. Pacakova, V. Miller, I. J. Cernohorsky, Anal. Biochem., 42, 549 (1971).
587. T. Hashizume, Y. Sasaki, Там же, 24, 232 (1968).
588. T. Hashizume, Y. Sasaki, Там же, 21, 316 (1967).
589. C. W. Gehrke, C. Ruyle, J. Chromatogr., 38, 473 (1968).
590. M. Jacobson, J. F. O'Brien, C. Hedgcoth, Anal. Biochem., 25, 363 (1968).
591. D. L. Stalling, C. W. Gehrke, A. W. Zumwalt, Biochim. biophys. acta, 31, 616 (1968).
592. C. W. Gehrke, D. B. Lakings, J. Chromatogr., 61, 45 (1971).
593. D. B. Lakings, C. W. Gehrke, Там же, 62, 347 (1971).
594. S. V. Alam, R. H. Hall, Anal. Biochem., 40, 424 (1971).
595. R. L. Hancock, J. Chromatogr. Sci., 7, 366 (1969).
596. W. C. Butts, Там же, 8, 474 (1970).
597. D. F. Babcock, R. O. Morris, Biochem., 9, 3701 (1970).

Ин-т биоорганической химии
им. М. М. Шемякина
АН СССР, Москва