

УДК 543.544.8

ХЕМОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ (КОВАЛЕНТНАЯ) ХРОМАТОГРАФИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

В. И. Лозинский, С. В. Рогожин

Приведен обзор литературы по применению одного из современных методов выделения и тонкой очистки биополимеров — хемоспецифической (ковалентной) хроматографии, основанной на химическом взаимодействии веществ из раствора и хроматографического носителя.

Библиография — 164 ссылки.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	879
II. Общая схема процесса. Терминология	879
III. Химические основы метода	880
IV. Носители для хроматографического процесса	885
V. Области применения хемоспецифической хроматографии	892
VI. Некоторые методологические вопросы хроматографического процесса	898

I. ВВЕДЕНИЕ

Методы современной биохимии позволяют выделять в индивидуальном состоянии из разнообразных источников и исследовать строение, свойства и механизм действия практически всех классов биополимеров, присутствующих в тканях и жидкостях организмов даже в крайне незначительных количествах. Однако очень часто разработанные схемы выделения и очистки целевого вещества слишком громоздки и трудновоспроизводимы. Неудивителен поэтому успех таких новых, не столь трудоемких, но значительно более эффективных методов, как биоспецифическая (аффинная) хроматография, аффинный электрофорез и т. п., которые позволили существенно упростить и удешевить (что также немаловажно) процессы выделения и очистки пептидов, белков, ферментов, нуклеиновых кислот и т. д.

Вместе с тем, как будет показано ниже, существует ряд задач, которые трудно, а иногда и просто невозможно решить, основываясь только на физических свойствах веществ или на принципах биологического средства, так как в них требуется «химическое участие» тех или иных функциональных групп биомолекул. Процессы выделения и очистки природных соединений, основанные на обратимых химических реакциях между нерастворимым носителем и выделяемыми веществами, получили название «ковалентной хроматографии».

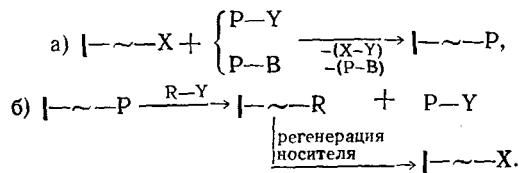
В настоящем обзоре описываются основные достижения этого метода, области его применения, обсуждаются некоторые специфические проблемы данного способа разделения веществ.

II. ОБЩАЯ СХЕМА ПРОЦЕССА. ТЕРМИНОЛОГИЯ

«Ковалентная хроматография» — сравнительно новый метод выделения и очистки биополимеров. Первая публикация в этой области относится к 1963 г.¹, в последующие десять лет появилось всего лишь несколько работ²⁻⁸, затем, начиная с 1973 г., интерес к этому методу за-

метно повысился, и основное количество публикаций приходится на последние пять лет. Следует отметить, что обзоров метода в литературе практически нет.

Общая схема ковалентной хроматографии включает следующую последовательность операций *:



Смесь биополимеров, один или несколько компонентов которой являются целевыми продуктами выделения (на схеме это Р—Y), вводится в контакт с нерастворимым носителем, имеющим химически активную «якорную» группировку X, способную избирательно реагировать только с группами Y; в результате иммобилизованным оказывается материал, несущий доступные остатки Y, а несвязавшиеся ковалентно продукты (Р—B) отмываются. Ковалентная связь: носитель — биомолекула (отсюда и название метода — ковалентная хроматография) устойчива в отсутствие специфического реагента (Р—Y), но легко разрушается при его введении в систему на следующем этапе — стадии дейммобилизации (б), в результате чего целевой продукт выделения переходит в раствор. Носитель по возможности регенерируется и используется вновь.

Для приведенной выше схемы предложено несколько названий: «ко-валентная аффинная хроматография»^{7,8}, «ковалентная хроматография»⁹, «обратимая иммобилизация»¹⁰. Вероятно, более точным названием рассматриваемого метода явился бы термин: «хемоспецифическая хроматография», как отражающий основную идею процесса — специфическое обратимое химическое взаимодействие веществ с нерасторимым носителем. Поэтому в дальнейшем изложении мы будем придерживаться предложенной здесь терминологии.

III. ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

Основная часть публикаций в данной области относится к работе с белками и пептидами, вследствие чего сначала необходимо рассмотреть вопрос о том, какие функциональные группы белковых молекул и какие обратимые химические реакции с ними были использованы при хемоспецифической хроматографии (ХСХ) белков.

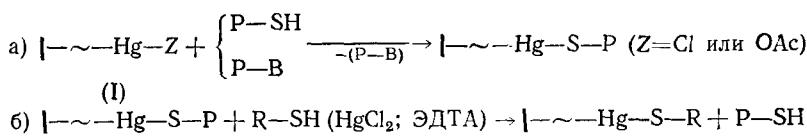
Прежде всего к таким функциональным группам следует отнести сульфидильные группы остатков цистеина, входящих в состав тех или иных белков. В то время как другие группы: амино-, окси-, фенокси-, карбокси- и т. д. имеются, кроме белков, и у других биополимеров (нуклеиновые кислоты, полисахариды), тиольные и дисульфидные группы являются почти исключительно химической видовой особенностью белков как класса макромолекул биологических систем¹¹. Сейчас известно большое количество белков, обладающих доступными SH-группами, показано участие остатков цистеина в осуществлении энзиматического катализа многими ферментами (например, тиоловыми протеиназами, креатинкиназами, З-fosфоглицеральдегидгидрогеназами и др.¹²). Обратимые модификаторы тиольных групп белков также хорошо изучены¹³. Неудивительно поэтому, что впервые¹ для ХСХ была использована

* Здесь и далее знаком | — обозначена матрица хемоспецифического носителя, а знаком ~ — обозначена промежуточная группировка («ножка»).

обратимая иммобилизация по SH-группам белков, да и большая часть публикаций по данному методу также посвящена выделению и очистке на различных носителях тиолсодержащих белков и пептидов.

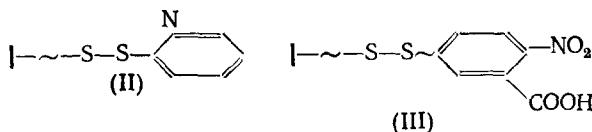
Однако не только реакции с SH-группами можно применять в XCX биополимеров. Это было показано в ряде случаев, которые подробнее будут рассмотрены ниже. Здесь же необходимо подчеркнуть, что принципиально возможно использование обратимых реакций любых доступных группировок биомолекул, лишь бы эти реакции проходили высокоспецифично и в достаточно мягких условиях, не разрушающих самих объектов или носителей. Поэтому всегда требуется предварительная информация относительно действия низкомолекулярного реагента, нерастворимым аналогом которого собираются воспользоваться, т. е. XCX основывается на данных, полученных из исследований химической модификации биополимеров. Таким образом, этот тип хроматографии также можно рассматривать как обратимую модификацию функциональных групп биологических макромолекул нерастворимыми реагентами.

Что касается химических процессов с участием SH-групп, то для XCX использовали либо реакции образования меркаптидных (Hg—S), либо дисульфидных (S—S), либо тиоэфирных (CO—S) связей. Ковалентная связь между атомом ртути нерастворимого носителя и тиольной группой белка или пептида может быть мягко разрушена низкомолекулярными тиолами, растворимыми солями ртути или комплексонами типа этилендиаминететрауксусной кислоты (ЭДТА) ⁴:

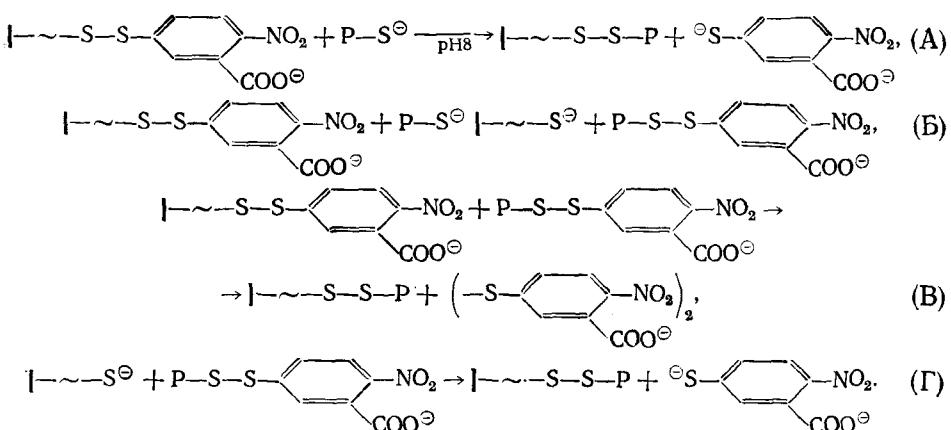


Следует, однако, иметь в виду, что ртутьсодержащие носители надо применять с достаточной осторожностью, так как существующее всегда медленное вымывание металла (частичное разрушение материала носителя во время манипуляций, постепенный гидролиз связей носитель — лиганд) загрязняет белок, что особенно нежелательно, если выделяемый биополимер предполагается вводить в какие-либо организмы. Кроме того, ртутными носителями станут задерживаться и нетиоловые белки, если они несут сильно комплексующие группировки, которые могут включаться в координационную сферу атома ртути, что будет мешать основному процессу выделения SH-продуктов.

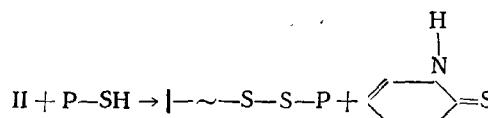
Для XCX, основанной на реакциях тиол-дисульфидного обмена, в качестве якорных групп носителей использовались нерастворимые аналоги известных реагентов на SH-группы: 2,2'-дипиридилидисульфида ¹⁴ и 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислоты) ¹⁵:



Дисульфидные связи таких носителей активированы вследствие электроноакцепторного действия ароматической системы и легко вступают в реакции тиол-дисульфидного обмена с сульфгидрильными группами белков. Отмечалось ¹⁶, что для носителей типа (III) кроме основной реакции по схеме XCX (A) возможны также и другие сопутствующие процессы (Б), (В) и (Г):

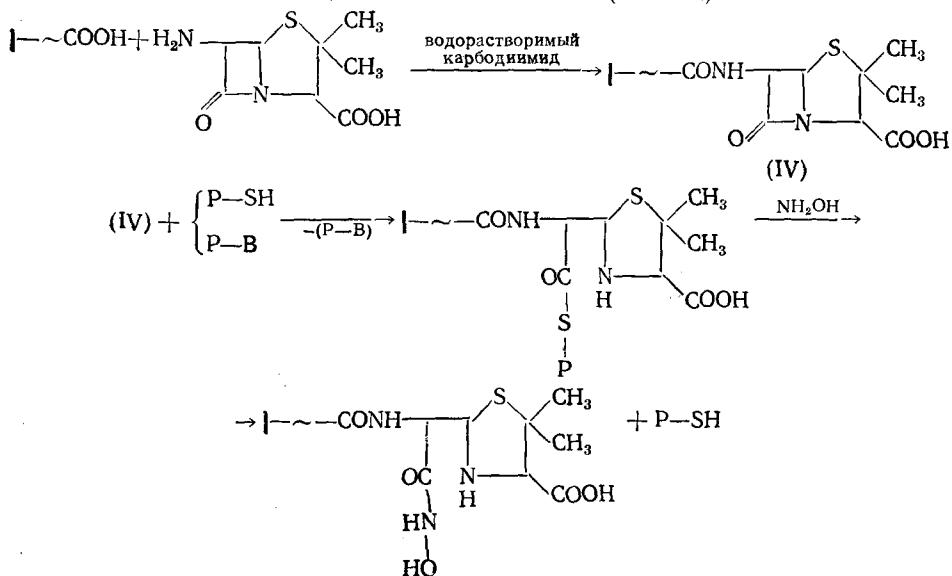


Такая множественность реакций тиол-дисульфидного обмена отсутствует при работе с носителями типа (II), несущими пиридиндисульфидную активную группировку, поскольку выделяющийся 2-тиопиридин немедленно изомеризуется в 2-тиопириден, который уже не участвует в обменных процессах, и равновесие реакции практически нацело сдвинуто вправо^{9, 17, 18}:



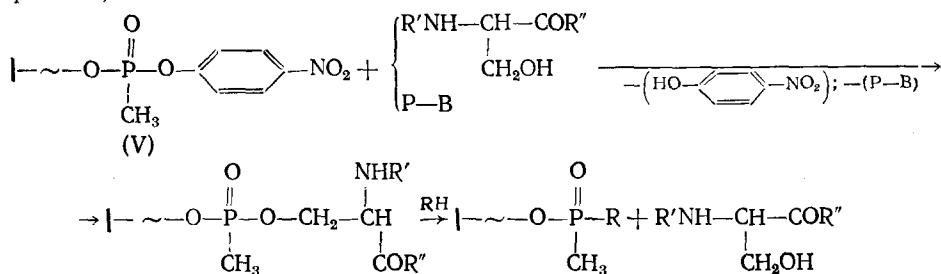
Деиммобилизация SH-белка достигается при действии избытка низкомолекулярного тиола (цистеина, 2-меркаптоэтанола, дитиотреитола).

Интересный вариант XCX осуществлен при изучении пенициллин-связывающих компонентов мембран *Bac. subtilis*^{8, 19, 20}. Эти белковые компоненты, как было показано ранее²¹, ацилируются пенициллином по SH-группам остатков цистеина, причем полученные сложнотиоэфирные связи могут быть разрушены или гидроксиламином, или тиолами, или перекисью водорода. На основании этих данных разработан хроматографический процесс, который проводили на носителе (IV) с иммобилизованной 6-аминопенициллановой кислотой (6-АПК):



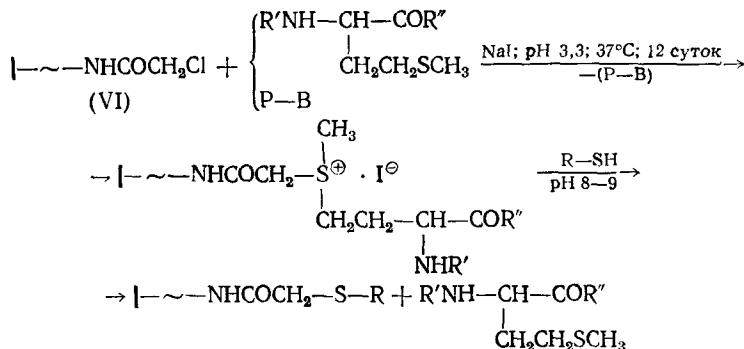
Вышеприведенная схема носит в некоторой степени предположительный характер, так как условия конденсации 6-АПК с COOH-носителем, которые приводят авторы работы⁸, не исключают образования соединенных амидными связями нескольких подряд молекул 6-АПК на нерастворимой фазе. Поэтому трудно сказать, какой собственно тип носителя истинно участвует в процессе — с мономерным пенициллином или с олигомерным. Важно другое — подобный хемохроматографический подход, видимо, может оказаться полезным для изучения механизма взаимодействия различных лекарств с компонентами клеток, так как образование стабильных ковалентных связей: лиганд — белок дает возможность тщательно отмыть все остальные вещества, а затем выделить лишь рецепторы лиганда и изучать их отдельно.

Как уже отмечалось выше, схема XCX может быть применена не только для SH-белков. Обратимое фосфорилирование OH-групп остатков серина использовалось^{7, 22} при выделении ферментов, содержащих эту аминокислоту в активном центре (ацетилхолинэстераза, α -химотрипсин):



Здесь RH = 2-(оксиiminометил)-1-метилпиридинийиодид; 1,1'-треметилен-бис-(4-оксиiminометил)-пиридинийдибромид; гидроксиламин; R' и R'' — полипептидные цепи. По-видимому, присутствие серина в активированном виде является необходимым условием для реакции с носителем типа (V), так как белок, не относящийся к классу сериновых ферментов, но содержащий в своем составе серин (сывороточный альбумин), не задерживался носителем.

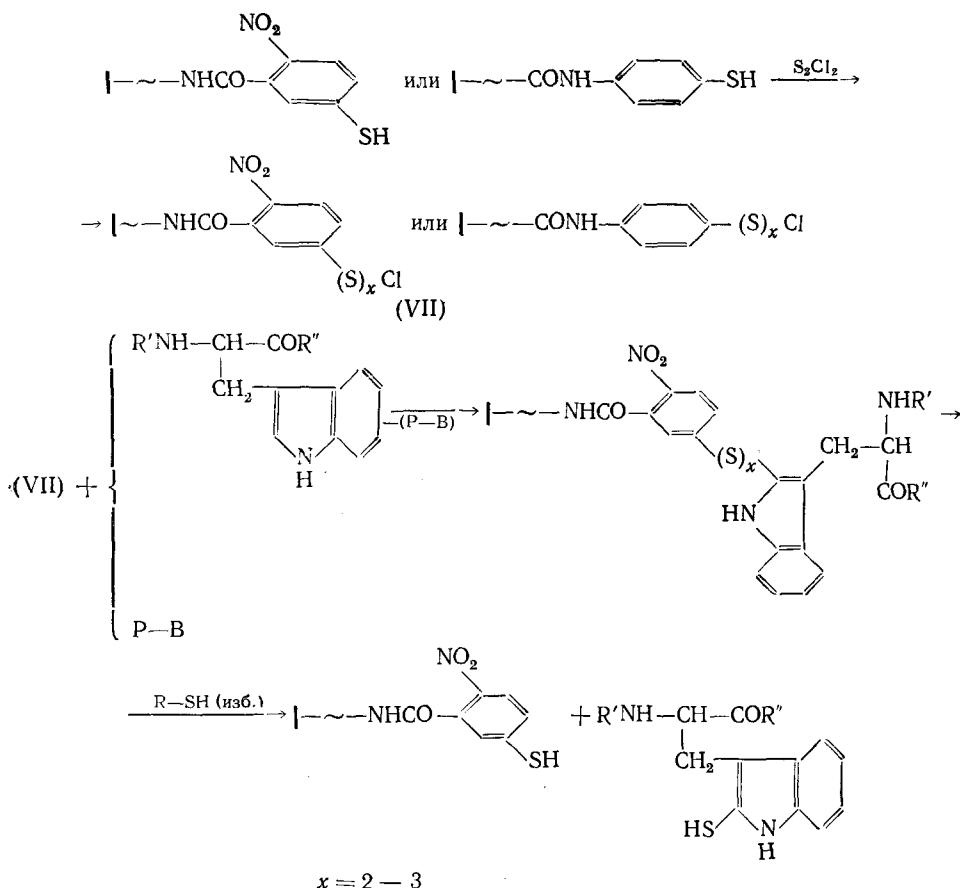
Образование сульфониевых производных при взаимодействии в кислой среде тиоэфирной группы остатка метионина с α -галогенкислотами и последующее их разрушение низкомолекулярными тиолами недавно использовано²³ при XCX по остаткам метионина:



Необходимо, чтобы остаток метионина не был C-концевой аминокислотой, иначе он превращается в остаток гомосерина, и белок или пептид не фиксируется на носителе. Следует отметить, что довольно жесткие

условия иммобилизации метионинсодержащих веществ, вероятно, будут ограничивать применимость данной схемы к малоустойчивым белкам. Для пептидов это, видимо, не так существенно, если они не содержат лабильных связей типа Асп—Про²⁴. Вызывает также некоторые сомнения устойчивость материала носителя в условиях фиксации. Кроме того, данная схема не предусматривает регенерации носителя.

Способность сульфенилхлоридов²⁵ и монохлористой серы²⁶ модифицировать остатки триптофана по положению 2 индольного цикла была применена²⁷ для хемоспецифического выделения триптофансодержащих соединений:



В конечном итоге происходит модификация остатка триптофана — появляется SH-группа в индольном цикле. По-видимому, введение такой удобной для дальнейшей модификации группы окажется полезным и при исследовании роли остатков Трп в молекулах ферментов. Поскольку носители (VII) связывают ковалентно также и тиольные группы, то, если требуется провести процесс только по остаткам триптофана, необходимо соответствующим образом заблокировать SH-группы цистеина.

Имеются также работы, где применялся видоизмененный вариант XCX, в котором якорные группировки X входили в состав биополимера, а группы Y содержали носитель. Так, например, SH-белок обрабатывали дипиридилидисульфидом, избыток реагента удаляли гель-фильтрацией, белок гидролизовали протеолитическим ферментом и раствор полученных пептидов пропускали через колонку с тиолсодержащим носителем²⁸.

При работе с полинуклеотидами применяли как выделение меркапто-производных нуклеиновых кислот на Hg-носителе²⁹, так и наоборот — выделение меркурированных РНК и ДНК на SH-носителе^{30—32}.

Выбор химического пути проведения хроматографического процесса в основном диктуется специфическими условиями каждой конкретной задачи. Поэтому сделать однозначное заключение о том, какой из вариантов лучше (с якорной группой на носителе или на биополимере), конечно, не представляется возможным. Можно только отметить, что с точки зрения сохранности носителя (в случае тиольных нерастворимых фаз) предпочтительнее использовать хемосорбенты с защищенной SH-группой — в таком виде она значительно меньше подвержена опасности окисления. Также была показана³³ меньшая эффективность фиксации дитио-2-нитробензоатного производного белка на SH-носителе по сравнению с реакцией SH-белка и носителя типа (III).

IV. НОСИТЕЛИ ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Хемоспецифическая хроматография, как и всякий хроматографический процесс, предъявляет определенные требования к носителю: 1) химическая, физическая, механическая и биологическая стойкость; 2) достаточная проницаемость для макромолекул, обеспечивающая свободу их подхода к активным группировкам носителя; 3) гидрофильтность носителя, позволяющая работать в водной среде; 4) однородность формы — предпочтительнее применение носителей сферической формы и одинаковой величины гранул; 5) коммерческая доступность материала матрицы носителя и, по возможности, невысокая его стоимость.

Кроме этих, вообще говоря, одинаковых для всех хроматографических процессов с участием биополимеров свойств матриц, которые довольно подробно обсуждались в специальной литературе (см. например^{34, 35}), для ХСХ необходимы носители с функциональными группировками, легко подвергаемыми превращениям для присоединения якорных групп.

Из табл. 1, где суммированы литературные данные по носителям, использованным в ХСХ, видно, что в большинстве случаев применялись хемосорбенты на основе гелей агарозы, хорошо себя зарекомендовавших для аффинной хроматографии и иммобилизации биополимеров. Агарозные матрицы имеются в продаже, обладают низкой неспецифической сорбицией, методы введения на них различных группировок хорошо отработаны^{36—38}. Однако этот носитель не лишен и ряда недостатков: а именно: у него не очень высокая механическая прочность, структура полисахаридной матрицы нарушается под действием органических растворителей и температур выше 50—60° С, скорость протекания жидкости через колонку с гелем заметно падает даже при небольшом избыточном давлении, носитель подвержен микробному заражению и, наконец, это — довольно дорогой продукт. Вероятно, поперечно-сшитые агарозные гели типа «Sephadose-CL»^{39, 40}, обладающие улучшенными физико-механическими свойствами, окажутся очень удобными в рассматриваемом процессе, как это было продемонстрировано⁴¹ применением хемосорбента на основе данного производного сефарозы (№ 10, табл. 1). Похожий сшитый агарозный носитель (№№ 9 и 18, табл. 1) получался⁴² при обработке полисахаридной матрицы эпихлоргидрином (для введения эпоксидных групп). Однако, так как степень сшивки не контролировалась и образование поперечных связей в геле являлось сопутствующим процессом при получении активных групп на носителе, то не ясно, в какой степени такая сшивка происходила.

ТАБЛИЦА I

Номер	Матрица	Хемоспецифическая группировка с «ножкой»	Емкость по активным группам	Ссылки
1	Сепадекс Г-25	Тип (I) 	0,15 ммоль/г	1
2*	Сополимер малеинового ангидрида с этиленом, сшитый гексаметилендиамином		1,62 мкмоль/г	3
3	Целлюлоза		0,2—0,7 ммоль/г	5
4	Сепароза 4Б		0,2—0,5 ммоль/мл	6
5	То же		0,2—1,2 мкмоль/мл	36, 82
6	»		1,2 мкмоль/мл	110
7а	Оксиалкилметакрилатный гель (сферон)		0,03—0,10 ммоль/мл	72
7б	То же		0,02—0,20 ммоль/мл	72
8	Сепароза 4Б	Тип (II) 	0,6—1,0 мкмоль/мл	9

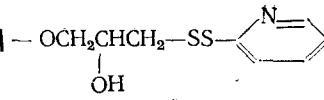
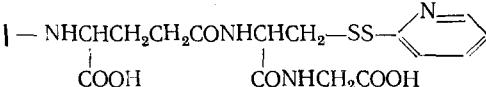
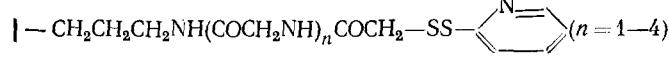
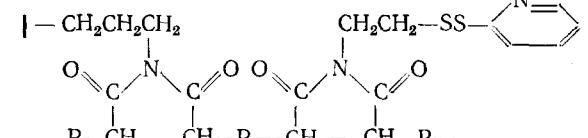
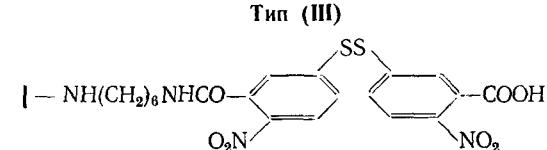
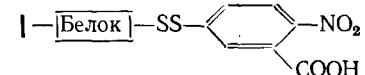
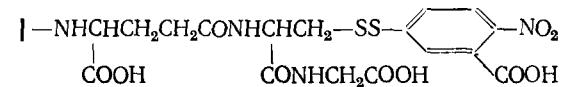
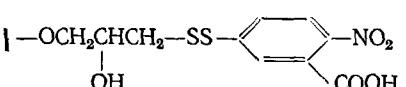
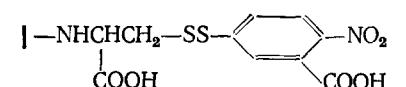
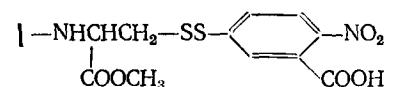
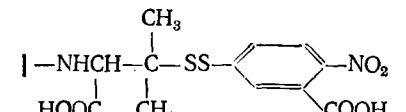
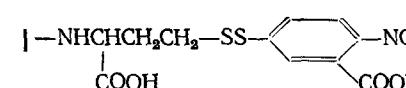
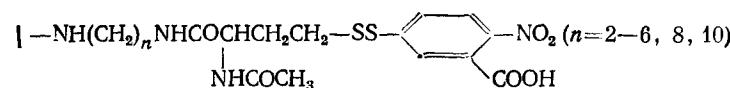
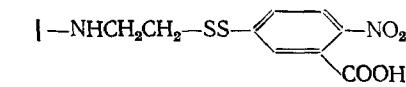
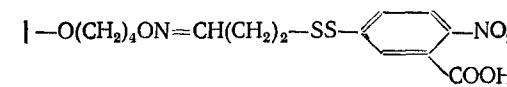
9	То же		20 мкмоль/мл	42
10	Сепароза ЦЛ 4Б		3,9 мкмоль/мл	41
11	Макропористый кремнезем (силохром)		40 мкмоль/г	48–51
12	То же		10–20 мкмоль/г	51
13**	»		до 160 мкмоль/г	50,145
14	Сепароза 4Б	 Тип (III)	3–10 мкмоль/мл	111
15	Сепароза 4Б		0,14 ммоль/г ***	16
16****	То же		0,2–0,3 мкмоль/мл	83
17	»		0,95 мкмоль/мл	84

ТАБЛИЦА I (продолжение)

Номер	Матрица	Хемоспецифическая группировка с «ножкой»	Емкость по активным группам	Ссылки
18	Сепароза 4Б		5,1 мкмоль/мл	33
19	»		0,048 мкмоль/мл	33
20	»		0,063 мкмоль/мл	33
21	»		0,033 мкмоль/мл	33
22	Сепароза 4Б		0,19 мкмоль/мл	33
23	То же		—	59
24	»		0,045 мкмоль/мл	85
25	Целлюлоза		—	112

26	Сепароза 4Б	Тип (IV)		—	8
27	То же			—	8
28	»			—	113
29	Целлюлоза			—	114
30	Сепароза 4Б	Тип (V)		0,2—1,0 мкмоль/мл	7
31	Сшитый полиакриламид	Тип (VI)		0,77 ммоль/г ***	23
32	Сшитый полиакриламид	Тип (VII)		0,8 ммоль/г ***	27
33	То же			—	27

* Носитель обладает значительной неспецифической сорбцией по основным белкам. ** Заместитель R—N-винилпирролидон, винилэтиловый эфир, стирол, этилен.
 *** Емкость дана на сухую массу носителя. **** Белок — легкая цепь иммуноглобулина κ -типа.

Носители на основе сшитых гелей полиакриламида также нашли применение в ХСХ (№№ 31—33, табл. 1). Они были использованы при работе с белками небольшой молекулярной массы и пептидами. Здесь ограничения накладывает сама матрица — биополимеры с высокими молекулярными массами (выше 100 000 для «Bio-Gel P-100» и выше 300 000 для «Bio-Gel P-200», на основе которых были приготовлены хемосорбенты^{23, 27)} не могут проникнуть⁴³ внутрь частиц набухшего геля. Кроме того, механическая прочность слабосшитых полиакриламидных матриц невысока.

В последние годы при иммобилизации различных биологически активных соединений^{44, 45}, а также для специфического выделения ферментов⁴⁶ и фрагментов генов⁴⁷ с помощью аффинной хроматографии все шире применяются носители на неорганической основе. Такие материалы, как пористое стекло, макропористые кремнеземы, металлы, окислы металлов, керамики и т. п., обладают высокой механической прочностью, стандартностью характеристики, устойчивостью к микробному заражению, доступностью; при работе с ними можно использовать любые хаотропные агенты, высокие концентрации солей и органические растворители.

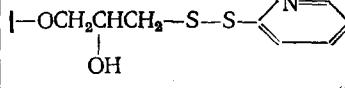
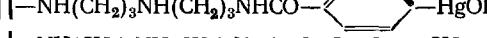
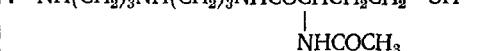
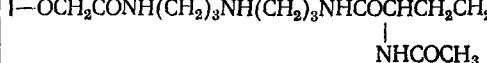
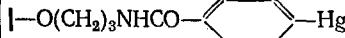
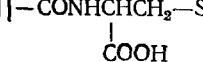
Мы получили^{48—51} ряд носителей для ХСХ белков и пептидов (№№ 11—13, табл. 1) на основе макропористого кремнезема — силохрома⁵². Носители, содержащие привитый к неорганической поверхности полимер (№ 13, табл. 1) (R — винилэтиловый эфир; N-винилпирролидон и др.), наряду с повышенной емкостью по пиридиндисульфидным группам, характеризуются низкой неспецифической сорбцией белков, улучшенной стабильностью матрицы в щелочных средах. На наш взгляд, неорганические носители, поверхность которых покрыта гидрофильным полимером, являются перспективными для работы с биополимерами фазами, поскольку в них сочетаются полезные физико-механические свойства неорганических матриц с адсорбционной пассивностью (при правильном выборе) выстилающего полимера. Получение и использование такого типа комбинированных носителей описано в ряде работ по иммобилизации^{53, 54} и аффинной хроматографии^{55—57} ферментов.

В последнее время при изучении свойств применяемых носителей большое внимание уделяется исследованию влияния удаленности от матрицы иммобилизованного аффинного лиганда на эффективность хроматографического процесса и на возможность неспецифических взаимодействий. Такие взаимодействия (гидрофобные, электростатические, сорбционные и т. д.) обычно мешают основной процедуре и поэтому всегда желательно их исключить насколько возможно. Суммируя результаты этих исследований, можно сделать вывод, что удлиняющие группировки — так называемые «ножки» или вставки (*spacers*) —, несомненно, должны быть гидрофильными, потому что просто длинные полиметиленовые системы заметно взаимодействуют с гидрофобными участками белковых молекул, как наглядно было показано, например, в работе⁵⁸. Или же, по крайней мере, в применяемых условиях (ионная сила раствора, pH среды, температура) гидрофобные взаимодействия должны быть минимальными, но это всегда необходимо показать в предварительных контрольных экспериментах. Также лучше, если «ножка» не будет содержать ионогенных группировок. В противном случае, во-первых, накладывается ионный обмен, и, во-вторых, носители гелевой природы, имеющие заряженные группы, сильно меняют свой объем, а, следовательно, и размер пор геля при изменении состава буфера.

Нередко, хотя ионогенные группы и не входят в состав предполагаемой «ножки», но выбранная цепь химических превращений при иммо-

ТАБЛИЦА 2

Коммерческие носители для хемоспецифической хроматографии

Номер	Фирма-изготовитель	Название продукта	Матрица	Хемоспецифическая группировка с «ножкой»	Емкость по активным группам
1	Pharmacia Fine Chemicals (Швеция)	Activated Thiol-Sepharose	сепароза 4Б		1,0 мкмоль/мл
2	То же	Thiopropyl-Sepharose	сепароза 6Б		20 мкмоль/мл
3	Serva (ФРГ)	Servachrom-A-Hg	агароза		—
4	То же	Servachrom-A-SH	то же		—
5	Bio-Rad Laboratories (США)	Affi-Gel 401	»		6,0 мкмоль/мл
6	То же	Affi-Gel 501	»		3,0 мкмоль/мл
7	Pierce (США)	Thiol/CPG	пористое стекло ($d_{\text{пор}}=550 \text{ \AA}$)		30 мкмоль/г
8	Koch-Light Ltd. (Англия)	Enzacryl-Polythiol	поперечно-сшитый поликариламид		—
9	Sigma (США)	Cysteamine-agarose	агароза		0,1 мкмоль/мл
10	То же	L-Cysteine-agarose	то же		2–10 мкмоль/мл

билизации лиганда допускает побочные пути течения реакций; они-то и могут «неожиданно» дать нежелательный эффект. Так, например, при использовании очень популярного метода присоединения аминов к BrCN-активированной агарозе³⁷ в случае аминотиолов могут идти реакции как по NH₂⁻, так и по SH-группам¹⁷. При этом снижается емкость носителя по тиольным группам и вводятся ненужные ионогенные аминогруппы. Что касается размера «ножки», то литературные данные довольно разноречивы. Вероятнее всего, оптимальная длина определяется объектом выделения и очистки, его строением и свойствами. Отмечалось³⁴, что слишком протяженная «ножка» малоэффективна вследствие ее конформационных изгибов, спирализации и т. п.

В XCX влияние длины и строения «ножки» изучено пока недостаточно, хотя имеются уже некоторые интересные данные. Так, при исследовании кинетики деиммобилизации липоамиддегидрогеназы с носителями типа (III) (№ 23, табл. 1) было установлено⁵⁹, что фермент переходит в раствор при действии восстановителя тем быстрее, чем длиннее «ножка»; т. е. стерически облегчается подход расщепляющего агента к ковалентной связи носитель — фермент. Важное значение также имеет химическая структура «ножки» около активной группировки. Показано³³, что носитель с дитио-2-нитробензоатной группой у четвертичного атома углерода (№ 21, табл. 1) в очень незначительной степени реагирует с SH-белками — оказывается экранирующее влияние заместителей, в то время как разветвление у следующего атома углерода основной цепи (№№ 17—20, табл. 1) уже практически не препятствует фиксации белка. Таким образом, при синтезе активных группировок на носителях необходимо учитывать все рассмотренные выше факторы.

Сейчас ряд носителей для XCX уже производится некоторыми фирмами. В табл. 2 приведены характеристики этих хемосорбентов по данным фирм-изготовителей (по каталогам 1977—1978 гг.). Также приводятся сведения о некоторых имеющихся в продаже SH-носителях, поскольку известными превращениями они легко могут быть переведены в производные с активированной тиольной функцией. Следует только отметить, что все эти носители довольно дороги, поэтому разработка и внедрение в практику хемосорбентов меньшей стоимости является актуальной задачей, решение которой значительно расширит применение метода XCX не только в лаборатории, но, возможно, и в биотехнологии.

V. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ХЕМОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Теперь уже достаточно ясно определились направления исследований по XCХ биополимеров и области применения этого интересного высокоселективного метода тонкой очистки веществ. Как уже отмечалось, основная часть опубликованных материалов посвящена работе с белками или пептидами. Сообщалось об использовании XCХ для выделения полинуклеотидов³⁰, фрагментов генов^{29, 31, 32}, а также низкомолекулярных кофакторов⁶⁰. Задачи по выделению и очистке биополимеров, которые решались с применением XCХ, можно классифицировать следующим образом.

1. Разделение на фракции по химическому составу (например, отделение белков с доступными SH-группами от всех остальных компонентов смеси).

2. Выделение индивидуальных белков и ферментов, выделение изоферментов.

3. Разделение неидентичных по химическому составу субъединиц олигомерных белков.

4. Хемоспецифическое выделение пептидов, содержащих аминокислоты с реакционноспособным боковым радикалом.

5. Очистка синтетических пептидов.

6. Очистка белков от веществ небелковой природы.

7. Выделение модифицированных нуклеиновых кислот и фрагментов генов.

Обратимая иммобилизация использовалась также при химической модификации временно зафиксированного на нерастворимом носителе фермента с последующим переведением его в раствор^{41, 61}. Такой подход⁴¹ дает возможность избежать межмолекулярных сшивок, если требуется осуществить модификацию бифункциональным реагентом группировок молекулы белка в изолированном виде.

В табл. 3 собраны данные о конкретных объектах, выделение или очистка которых проводилась с помощью ХСХ. Необходимо иметь в виду, что стадия хемоспецифической очистки практически никогда не является единственной. Если имеются простые методы предварительного фракционирования и концентрация целевого продукта, то их осуществление, безусловно, желательно; особенно это касается удаления низкомолекулярных компонентов, так как среди них вполне могут оказаться вещества, либо мешающие химической фиксации биополимера на носителе, либо способные расщеплять образовавшуюся ковалентную связь носитель — биополимер.

Хорошие результаты дает сочетание ХСХ с другими селективными методами, если необходимо получить, к примеру, особо чистый и активный препарат фермента. Так, при выделении фосфолипазы-А₂ из сыворотки крови человека⁶² после нескольких стадий предварительной очистки были последовательно применены три аффинные колонки: хроматография на конканавалин-А-сефарозе — для извлечения гликопротеинов, в числе которых находилась и искомая фосфолипаза; хроматография на колонке с иммобилизованной антисывороткой к γ-иммуноглобулину, во фракции которого детектировалась активность,— для отделения иммуноглобулина; и, наконец, ХСХ на активированной тиол-сефарозе (№ 1, табл. 2). В результате был получен фермент более чем с 10 000-кратной степенью очистки. Приведенный пример относится к выделению белка, присутствующего в исходном материале в крайне незначительных количествах. Когда же целевой продукт — один из главных компонентов (например, папаин в высушеннем латексе папайи⁹), то его удается выделять с помощью ХСХ достаточно просто и быстро с минимальным числом стадий. Особенно это удобно для тонкой очистки коммерческих препаратов белков. Например, выделение меркаптопапаина из коммерческого папаина^{9, 17} или выделение высокоактивной уреазы из коммерческого препарата фермента⁶³ быстро и эффективно осуществлено на хемоспецифических носителях, в то время как выделение только SH-компонентов указанных белков обычными методами трудоемко и ведет к большим потерям ценного ферментного материала.

Показано, что с помощью хемоспецифических сорбентов можно быстро разделять неидентичные субъединицы олигомерных белков, когда одни субъединицы содержат, а другие нет, какие-либо реакционноспособные аминокислотные остатки. Таким образом, выделяли: SH-субъединицу ломбрицинкиназы⁶⁴, α-субъединицу фенилаланил-tРНК-синтетазы дрожжей⁶⁵, κ-казеин и α_s-казеин из цельного казеина⁶⁶, β-цепь гемоглобина крупного рогатого скота⁶⁹, α-субъединицу фактора XIII системы свертывания крови⁶⁷. В последнем случае обратимо иммобилизованная на Hg-носителе (№ 6, табл. 2) SH-α-субъединица использовалась также для изучения ее нековалентных взаимодействий с β-субъединицей.

ТАБЛИЦА 3

Выделение и очистка биополимеров с помощью ХСХ

Объект выделения и очистки	Источник биополимера	Носитель		Ссылки
		Тип	Номер по табл. 1	
1. Разделение на фракции по химическому составу				
Фракция SH-белков	гомогенат печени крысы	(I)	1	1
SH-Содержащие ДНК-нуклеопротеиды	ядра клеток печени крысы	(I)	1	2
Гистонная фракция F3	тимус теленка	(I)	5	82,86
Отделение SH-белков от кислой пролилкарбоксипептида-зы	аденогипофиз быка	(I)	6*	88
Фракция полипептидов полосы 3	мембранны эритроцитов человека	(II)	1*	87
Фракция пенициллин-связывающих белков	мембранны <i>Bac. subtilis</i>	(IV)	26,27	8,19,20
Пенициллин-связывающие белки	<i>Salmonella typhimurium</i>	(IV)	28	113
2. Выделение индивидуальных белков и ферментов				
Гемоглобин, альбумин сыворотки крови человека, глицеральдегид-3 - фосфатдегидрогеназа, альдолаза	разделение искусственной смеси	(I)	1	1
Альдолаза	мышца крысы	(I)	1	1
Тиолированный γ-глобулин быка	—	(I)	3	5
Меркаптопапайн	препарат	(I)	4	6,89
То же	то же	(II)	8	9,17,18
»	»	(II)	9	115
»	высушенный латекс папайи	(II)	8	8,17,18
Меркаптофицин	<i>Ficus glabrata</i>	(I)	4	96
То же	то же	(II)	8	97
Катепсин B ₁	печень человека	(I)	4	90
То же	селезенка быка	(I)	4	91,92
Катепсин B ₂	то же	(I)	4	92
Катепсин H	лизосомы печени человека	(I)	4	102
Катепсин N	селезенка быка	(I)	4	116
Протеиназа стрептококка	—	(I)	4	93
Клостротрипин	<i>Clostridium</i>	(I)	4	103
SH-Протеаза	зеленая масса бобов	(I)	7	72
SH-Протеаза	<i>Phaseolus vulgaris</i>	(I)	7	104
SH-Протеаза кровесосущих насекомых	<i>Phodnius prolixus</i>	(I)	4	117
Дипептидиламинопептидаза I	селезенка быка	(I)	4	118
L - Пирролидонкарбоксипептидаза	<i>Bac. amyloliquefaciens</i>	(I)	5	119
Тиолсубтилидин	—	(I)	4	68
Тиолтрипсин	—	(I)	4	69
17β-Эстрадиолдегидрогеназа	—	(I)	5	94
S-Аденозил - L-метиониндекарбоксилаза	печень крысы	(I)	5	95
То же	икра морского ежа	(I)	5	95
Креатинфосфокиназа	грудная мышца курицы	(I)	5	98
То же	скелетная мышца человека	(I)	5	99
Цистеинсодержащий гистон	тимус теленка	(I)	5	100
ARE-Гистон	то же	(I)	5	101
Фактор XIII системы свертывания крови	плазма крови человека	(I)	6*	67
То же	тромбоциты человека	(I)	6*	67
5 - Метилтиоаденозиннуклеозидаза	плацента человека	(I)	6	120
Пиридоксамин(пиридоксин) -5-fosfatoksidaza	пекарские дрожжи	(I)	6*	121

ТАБЛИЦА 3 (Продолжение)

Объект выделения и очистки	Источник биополимера	Носитель		Ссылки
		Тип	Номер по табл. 1	
Холинацетилтрансфераза	<i>Drosophila melanogaster</i>	(I)	5	122
То же	мозг мыши	(I)	5	123
Селенопротеин глицинередуктазного комплекса	<i>Clostridium sticklandii</i>	(I)	6*	124
Металлотионеин	печень крысы	SH—	—	125
Меркаптоальбумин	сыворотка крови быка	(II)	8	105
То же	то же	(III)	15	16
Уреаза	<i>Canavalia ensiformis</i>	(II)	8	63, 106
То же	то же	(II)	9	107
Коллаген типа III	кожа человека и теленка	(II)	1*	108
Фосфолипаза A ₂	плазма крови человека	(II)	1*	62
Орнитиндекарбоксилаза	печень крысы	(II)	1*	126
γ-Глутамилцилотрансфераза	то же	(II)	1*	127
Металлотионеин	полисомы печени крысы	(II)	1*	128
Медьсвязывающий металлотионеин	печень человека	(II)	2*	129
Ферредоксин	<i>Lactuca sativa</i>	(II)	2*	130
α ₁ -Антитрипсин	плазма крови человека	(III)	16	83, 109
α ₁ -Антитрипсины типов M, S и Z	то же	(III)	16	131
SH-белки плазмы крови (разделение)	то же	(III)	16—22	33
Преальбумин человека	плазма крови	(III)	17	84
Преальбумин быка	то же	(III)	17	132
F ₁ -ATФаза	митохондрии сердца свиньи	(III)	15	133
D-Аланинкарбоксипептидаза	мембранны <i>Bac. subtilis</i>	(IV)	26, 27	8, 19, 20
DD-Карбоксипептидаза	мембранны <i>Proteus mirabilis</i>	(IV)	29	114
Ацетилхолинэстераза	электрический орган угря	(V)	30	7, 22
α-Химотрипсин	препарат	(V)	30	7, 22

Объект выделения и очистки	Носитель		Ссылки
	Тип	Номер по табл. 1	

3. Разделение неидентичных субъединиц олигомерных белков

SH-Субъединица ломбрицинкиназы	(I)	4	64
SH-Субъединица фенилаланил-тРНК-сингтетазы дрожжей	(I)	4	65
SH-Субъединица α -кристаллина хрусталика глаза теленка	(I)	4	134
α -Субъединица фактора XIII системы свертывания крови	(I)	6*	67
κ -Казеин и α_s -казеин	(II)	1*	66
β -Цепь гемоглобина крупного рогатого скота	(II)	11	49

4. Хемоспецифическое выделение пептидов

Цистеинсодержащие пептиды пепсинового гидролизата инсулина	(I)	2	4
Цистеинсодержащий пептид трипсинового гидролизата SH-субъединицы ломбрицинкиназы	(I)	4	64
Цистеинсодержащие пептиды трипсинового гидролизата фактора «Ти» элонгации полилептидной цепи	(I)	5	71
Цистеинсодержащий пептид химотрипсинового гидролизата альбумина сыворотки крови человека	(I)	7	72
Цистеинсодержащий пептид BrCN-гидролизата 3-fosфоглицераткиназы дрожжей	(I)	4	135
Цистеинсодержащие пептиды пепсиновых гидролизатов: парвальбумина мерлuzzi, сывороточного альбумина быка, церулоплазмина человека	(II)	1*	74
Цистеинсодержащие пептиды, полученные различными способами гидролиза β -цепи гемоглобина крупного рогатого скота	(II)	11	49

ТАБЛИЦА 3 (Окончание)

Субъект выделения и очистки	Носитель		Ссылки
	Тип	Номер по табл. 1	
Цистеинсодержащие пептиды цитоплазматической аспартатаминотрансферазы сердца курицы	(II)	1*	76—78
Цистеинсодержащие пептиды 2-пиридилдисульфидных производных альбумина и рибонуклеазы	SH—	—	28
Цистеинсодержащий пептид BrCN-гидролизата альбумина сыворотки крови быка	(III)	15	16
Метионинсодержащие пептиды трипсинового гидролизата лизоцима	(VI)	31	23
Триптофансодержащие пептиды трипсиновых гидролизатов глюкагона и альбумина сыворотки крови человека	(VII)	33	27
5. Очистка синтетических пептидов			
Синтетические пептиды последовательностей: 111—124 рибонуклеазы и 1—37 гистона H4	(I)	5	79
Синтетический пептид последовательности 33—48 аллера-гена M Кбз—Три—Ала	(II)	2*	73,136
	(VII)	33	27
6. Очистка белков от веществ небелковой природы			
Очистка суммарного белка пекарских дрожжей от остальных компонентов клетки	(II)	11	80
Очистка восстановленного лизоцима от небелковых примесей	(II)	11	48
Освобождение белков от поверхностно-активных веществ и липидоподобных соединений	(II)	11	81
7. Выделение модифицированных нуклеиновых кислот и фрагментов генов			
2-Тиурацилсодержащая РНК	(I)	6*	29
6-Тиогуанозинсодержащая РНК	(I)	3	137
Меркурированные РНК из различных источников (химическое меркурирование)	SH—	—	30—32, 138—141
Меркуриуридинсодержащая РНК	SH—	—	142
Меркурированные ДНК (химическое меркурирование)	SH—	—	30,138,143
8. Выделение кофакторов			
Флавинадениндинуклеотид	(I)	4	60
Коэнзим A из <i>Sarcina lutea</i>	(I)	4	60

* Приведен номер по табл. 2.

При исследовании свойств «необычных» протеолитических ферментов — тиолсубтилизина⁶⁸ и тиолтрипсина⁶⁹, полученных химическим превращением остатка серина активного центра в остаток цистеина по способу⁷⁰, ХСХ позволила в одну стадию выделить активный модифицированный белок.

Интересные перспективы открывает хемоспецифическое выделение веществ при определении первичной последовательности белков и особенно больших белков, для которых разделение сложных пептидных смесей, основанное на различии зарядов, размера молекул, гидрофобности и т. д., оказывается зачастую малоэффективным. Имеются два варианта хемоспецифического извлечения пептидов для дальнейших структурных исследований. Первый — взаимодействие активного носителя со смесью пептидов, полученных энзиматическим или химическим гидролизом. В зависимости от типа носителя и аминокислотного состава фрагментов белка реакция будет идти с соответствующими боковыми

группами пептидов: тиольной группой цистеина^{4, 16, 84, 71–73}, тиоэфирной группой метионина²³, индольным кольцом триптофана²⁷. После отмычки непрореагированного материала ковалентно фиксированные хемосорбентом пептиды переводятся в раствор действием подходящего расщепляющего агента.

Второй путь — фрагментация (ферментативная или химическая) обратимо иммобилизованного белка непосредственно на носителе^{49, 74–78}. В этом случае хорошо себя зарекомендовали⁴⁹ предложенные нами носители на неорганической основе (№ 11, табл. 1)⁴⁸, поскольку матрица из макропористой двуокиси кремния (силохрома) устойчива в условиях таких обработок иммобилизованных полипептидных цепей, как пепсинолиз, трипсинолиз, расщепление бромцианом, разрушение связей аспартил — пролин (рН 2,2, 37° С; 36 час), а также при твердофазном варианте определения последовательности пептидов по Эдману. Фрагментация обратимо иммобилизованного фермента позволяет упростить выделение и идентификацию пептидов, несущих функционально важные (существенные) химические группы в активном центре, если удается подобрать условия, обеспечивающие ковалентную фиксацию на хемосорбенте только этих групп активного центра.

Вообще говоря, нетрудно себе представить химическую сепарацию пептидов на серии носителей, избирательно «вылавливающих» из смеси пептид (или пептиды), содержащий какую-либо конкретную трифункциональную аминокислоту.

Одной из проблем в твердофазном пептидном синтезе является очистка пептида создаваемой последовательности от так называемых «ложных» пептидов, которые образуются в ходе синтеза главным образом вследствие неполного протекания реакций на различных этапах многостадийного процесса. Предложен способ⁷⁹ выделения целевого пептида с помощью ХСХ. Суть метода заключается в том, что после окончания синтеза желаемой последовательности пептид наращивается еще на фрагмент Цис—Мет (или последовательно по одному остатку, или сразу присоединением дипептида), а затем проводится снятие всей суммы полученных пептидов с нерастворимой подложки с одновременным удалением защитных группировок (например, действием HF). Обработка этой суммы пептидов хемоспецифическим в отношении SH-групп сорбентом убирает Цис — Мет-пептиды из раствора. Все остальные продукты отмываются. Пептиды с хемосорбента снимаются низкомолекулярным тиолом, избыток восстановителя удаляется гель-фильтрацией. Далее следует отщепление N-концевого дипептида бромцианом и повторная гель-фильтрация. В результате удается отделить многие «ложные» пептиды, в особенности те, наращивание цепи которых в ходе синтеза по разным причинам (N-ацилирование, образование пироглутаминового производного, недоступность растущей цепи реагентам вследствие стерических затруднений и пр.) было приостановлено. Таким методом очищали синтетические пептиды на Hg-содержащем носителе⁷⁹ и на пиридилдисульфидном носителе⁷³. Ясно, что пептиды, содержащие остатки метионина в основной последовательности, так выделять нельзя; в этом случае придется применять другой избирательно отщепляемый концевой фрагмент.

Недавно показано^{80, 81}, что ХСХ может быть использована при очистке белков и пептидов от веществ небелковой природы. При этом применялся носитель на неорганической основе, что позволило для промывки временно иммобилизованного белка от поверхностно-активных веществ и липидоподобных соединений употреблять органические растворители и концентрированные растворы мочевины⁸¹.

VI. НЕКОТОРЫЕ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

При проведении двух главных стадий ХСХ: а) ковалентной фиксации веществ из раствора на носителе, а затем б) деиммобилизации этих веществ — необходимо помнить, что химические реакции, по крайней мере на известных пока носителях, не идут мгновенно — для большей полноты превращений необходимо некоторое время. Поэтому, особенно в случае колоночного варианта процесса, поток жидкости через материал насадки колонки должен быть не очень быстрым; хорошие результаты на стадии (а) дает применение рециркуляции. В литературе имеется мало данных о градиентной подаче расщепляющего агента для снятия иммобилизованных биомолекул с носителей. Тем не менее, видимо, такой способ деиммобилизации значительно улучшает разрешающую способность метода в целом.

Элюция со ступенчатой сменой силы расщепляющего агента использовалась уже в первых работах по ХСХ^{1,2}. На ртутьсодержащем носителе (№ 1, табл. 1) таким методом разделена модельная смесь SH-белков: меркаптоальбумин, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гемоглобин и альдолаза¹. В⁶⁷ для разрушения меркаптидных связей носитель — белок на колонку подавали восстановитель (меркаптоэтанол или дитиотреит), обеспечивая линейный градиент концентрации, что позволило отделить целевое SH-соединение (фактор XIII системы свертывания крови) от других связанных хемосорбентом тиоловых белков «благодаря их различной реакционной способности в отношении расщепляющего агента»⁶⁷. Строго говоря, именно такой вариант процесса и является хроматографическим разделением веществ, а не просто последовательностью двух операций: хемоспецифической сорбции и десорбции. Можно надеяться, что в ХСХ разделение биополимеров градиентной подачей расщепляющего агента будет применяться все более широко.

Наши данные⁸⁰ показывают, что наличие градиента концентрации восстановителя при работе с носителями типа (II) позволяет смыть белок с нерастворимой фазы минимально необходимым для этого количеством низкомолекулярного тиола, что значительно уменьшает опасность нарушения внутримолекулярных дисульфидных связей самого белка.

Необходимо обратить внимание на одно неудобство, с которым приходится сталкиваться в случае использования носителей типа (II) и (III). Когда SH-содержащий продукт, первоначально зафиксированный на нерастворимой фазе, снимается тиолом, то трудно детектировать биополимер на выходе с колонки, так как оставшиеся «неиспользованные» активные группировки носителя также расщепляются восстановителем и смываются вместе с целевым продуктом, делая практически невозможной из-за сильного поглощения 2-тиопиридона или 2-нитро-5-тиобензоата УФ-регистрацию элюируемого белка или пептида обычными проточными фотометрами. Поэтому приходится анализировать материал уже какими-то другими способами (например, гель-электрофорезом фракций; измерением, когда это возможно, ферментативной активности, хроматографией — для пептидов и т. д.). Думается, что, по крайней мере для белков и полипептидов, это неудобство может быть устранено использованием послеколоночного мембранныго концентратора элюата (типа «Model CEC1», «Amicon» Голландия), который отсекает низкомолекулярные вещества в потоке. Важно только, чтобы изменение при этом также и солевого состава буфера не вызывало резкого ухудшения растворимости биополимеров.

И последнее замечание, относящееся к работе с SH-биополимерами или серусодержащими носителями; необходимо всегда применять дез-

аэрированные буферные растворы; также крайне нежелательно присутствие даже следов ионов тяжелых металлов. Поэтому обычно, чтобы связать такие ионы, в состав буфера вводят ЭДТА. Соблюдение этих предосторожностей гарантирует сохранность тиольных и дисульфидных групп используемых соединений.

* * *

В заключение следует отметить, что хемоспецифическая хроматография в настоящее время уже заняла достойное место среди других высокоселективных методов выделения и очистки биологически активных соединений; она интенсивно развивается, совершенствуется и все более широко применяется к разнообразным объектам исследований.

За время подготовки обзора к публикации в литературе появились работы, в которых изложены синтезы некоторых хемосорбентов¹⁴⁴⁻¹⁴⁸, относящихся к описанным выше типам (I)-(IV), и выделение методом ХСХ пептидов¹⁴⁹, белков^{144, 145, 148-161}, нуклеиновых кислот^{147, 162}, фрагментов мембран¹⁶³, а также изучены некоторые методические вопросы процесса^{157, 164}.

ЛИТЕРАТУРА

1. L. Eldjarn, E. Jellum, *Acta Chem. Scand.*, **17**, 2610 (1963).
2. E. Jellum, L. Eldjarn, *Biochim. Biophys. Acta*, **100**, 144 (1965).
3. I. E. Liener, *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 67 (1967).
4. I. E. Liener, L.-P. Chao, *Analyt. Biochem.*, **25**, 317 (1968).
5. J. R. Shainoff, *J. Immunol.*, **100**, 187 (1968).
6. L. A. A. Sluyterman, J. Wijdenes, *Biochim. Biophys. Acta*, **200**, 593 (1970).
7. Y. Ashani, I. B. Wilson, Там же, **276**, 317 (1972).
8. P. M. Blumberg, J. L. Strominger, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 3751 (1972).
9. K. Brocklehurst, J. Carlsson, M. P. J. Kierstan, E. M. Crook, *Biochem. J.*, **133**, 573 (1973).
10. J. Carlsson, R. Axén, T. Unge, *Europ. J. Biochem.*, **59**, 567 (1975).
11. Ю. М. Торчинский, Сера в белках, «Наука», М., 1977.
12. Ю. М. Торчинский, Там же, стр. 157.
13. Ю. М. Торчинский, Там же, стр. 118.
14. D. R. Grassetti, J. F. Murray, *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 41 (1967).
15. G. L. Ellman, Там же, **82**, 70 (1959).
16. L. J. Lin, J. F. Foster, *Analyt. Biochem.*, **63**, 485 (1975).
17. K. Brocklehurst, J. Carlsson, M. P. J. Kierstan, E. M. Crook, *Meth. Enzymol.*, **34B**, 531 (1974).
18. J. Carlsson, *Protides Biol. Fluides*, **23**, 537 (1976).
19. P. M. Blumberg, *Federation Proc.*, **32**, 482 (1973).
20. P. M. Blumberg, J. L. Strominger, *Meth. Enzymol.*, **34B**, 401 (1974).
21. P. J. Lawrence, J. L. Strominger, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3653 (1970).
22. H. F. Voss, Y. Ashani, I. B. Wilson, *Meth. Enzymol.*, **34B**, 581 (1974).
23. Y. Schechter, M. Rubinstein, A. Patchornik, *Biochemistry*, **16**, 1424 (1977).
24. D. Piszkiewicz, M. London, E. L. Smith, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1173 (1970).
25. E. Scoffone, A. Fontana, R. Rocchi, *Biochemistry*, **7**, 971 (1968).
26. T. Wieland, O. Weinberg, W. Dilger, *Ann.*, **592**, 69 (1955).
27. M. Rubinstein, Y. Schechter, A. Patchornik, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 1257 (1976).
28. A. Svenson, J. Carlsson, D. Eaker, *FEBS Letters*, **73**, 171 (1977).
29. M. Ono, M. Kawakami, *J. Biochem.*, **81**, 1247 (1977).
30. R. M. K. Dale, D. C. Ward, *Biochemistry*, **14**, 2458 (1974).
31. M. M. Smith, R. C. C. Huang, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 775 (1976).
32. G. F. Crouse, E. J. B. Fodor, P. Doty, Там же, **73**, 1564 (1976).
33. C.-B. Laurell, E. Thulin, R. P. Bywater, *Analyt. Biochem.*, **81**, 336 (1977).
34. Б. А. Кляцкий, В. С. Шапот, *Успехи биол. химии*, **17**, 234 (1976).
35. Иммобилизованные ферменты, ред. И. В. Березин, В. К. Антонов, К. Мартинек, т. 1, Изд. МГУ, М., 1976, стр. 68.
36. R. Axén, J. Porath, S. Ernback, *Nature*, **214**, 1302 (1967).
37. P. Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3059 (1970).

38. Affinity Chromatography. Principles and Methods, Изд. «Pharmacia Fine Chemicals» Uppsala (Швеция), 1977.
39. T. Laas, Protides Biol. Fluids, 23, 495 (1976).
40. Sepharose-CL for gel filtration and affinity chromatography, Изд. «Pharmacia Fine Chemicals» Uppsala (Швеция), 1975.
41. G. P. Royer, S.-i. Ikeda, K. Aso, FEBS Letters, 80, 89 (1977).
42. R. Axén, H. Drevin, J. Carlsson, Acta Chem. Scand., B29, 471 (1975).
43. Г. Детерман, Гель-хроматография, «Мир», М., 1970, с. 52.
44. H. H. Weetall, Analyt. Chem., 46, 602A (1974).
45. G. Baum, M. Lynn, Process Biochem., 10, 14 (1975).
46. H. H. Weetall, A. M. Filbert, Meth. Enzymol., 34B, 59 (1974).
47. K. G. Skryabin, T. V. Venkstern, V. N. Zaharyev, V. P. Varlamov, S. V. Rogozhin, A. A. Bayev, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 337 (1976).
48. В. И. Лозинский, Б. Ю. Заславский, Ю. А. Давидович, С. В. Рогожин, Авт. свид. ССР № 540870 (1975); Бюлл. изобр., 1976, № 48, с. 72.
49. Ц. А. Егоров, М. И. Шахпаронов, Ю. А. Давидович, В. И. Лозинский, Б. Ю. Заславский, С. В. Рогожин, Биоорганская химия, 3, 1111 (1977).
50. В. И. Лозинский, А. В. Ильина, Ю. А. Давидович, С. В. Рогожин, в сб. II Всес. конф. по методам получения и анализа биохимических препаратов, г. Олайне, 1977, с. 105.
51. В. И. Лозинский, И. Г. Цой, Ю. А. Давидович, С. В. Рогожин, Изв. АН ССР, Сер. хим., 1979, 1358.
52. Н. К. Бебрис, А. В. Киселев, Ю. С. Никитин, Коллоидн. ж., 29, 326 (1967).
53. G. P. Royer, Chem. Technol., 4, 694 (1974).
54. G. P. Royer, G. M. Green, B. K. Sinha, J. Macromol. Chem., A10, 289 (1976).
55. В. П. Варламов, Г. Е. Банникова, А. В. Власов, Б. Е. Гадас, Б. Л. Цетлин, С. В. Рогожин, в сб. II Всес. симп. по Получению и применению иммобилизованных ферментов, г. Абовян, 1977, с. 1.
56. G. P. Royer, F. A. Liberatore, G. M. Green, W. E. Schwartz, W. E. Meyers, Polymer Preprints, 16, 76 (1975).
57. P. A. Anderson, L. Jervis, Biochem. Soc. Trans., 5, 728 (1977).
58. P. O'Carra, S. Barry, T. Griffin, FEBS Letters, 43, 169 (1974).
59. C. R. Lowe, Europ. J. Biochem., 76, 411 (1977).
60. Y. Matuo, R. Sano, T. Tosa, I. Chibata, Analyt. Biochem., 68, 349 (1975).
61. S.-i. Ikeda, S. Fukui, Biochem. Biophys. Res. Commun., 52, 482 (1973).
62. R. Scherer, W. Huber-Friedberg, A. Salem, G. Ruchenstroth-Bauer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 897 (1976).
63. R. Norris, K. Brocklehurst, Biochem. J., 159, 245 (1976).
64. E. Der-Terrossian, L.-A. Pradel, R. Kassab, G. Desvages, Europ. J. Biochem., 45, 243 (1974).
65. A. Murayama, J. P. Raffin, P. Remy, J. P. Ebel, FEBS Letters, 53, 23 (1975).
66. H. Nijhuis, H. Klostermeyer, Milchwissenschaft, 30, 531 (1975).
67. J. McDonagh, W. C. Waggoner, E. G. Hamilton, B. Hindenach, R. P. McDonagh, Biochim. Biophys. Acta, 446, 345 (1976).
68. L. Polgár, Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung., 11, 81 (1976).
69. H. Yokosawa, S. Ojima, S. Ishii, J. Biochem., 82, 869 (1977).
70. J. Photaki, V. Bardakos, J. Am. Chem. Soc., 87, 3489 (1965).
71. S. Nakamura, K.-i. Arai, K. Takahashi, Y. Kaziro, Biochem. Biophys. Res. Commun., 66, 1069 (1975).
72. J. Turková, S. Vavreinová, M. Kriváková, J. Čoupek, Biochim. Biophys. Acta, 386, 503 (1975).
73. Thiopropyl-Sepharose 6B, Изд. «Pharmacia Fine Chemicals» Uppsala (Швеция), 1977.
74. T. A. Egorov, A. Svenson, L. Rydén, J. Carlsson, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 72, 3029 (1975).
75. Ц. А. Егоров, М. И. Шахпаронов, С. В. Рогожин, в сб. Советско-американский симп. по химии и физике белка, Рига, 1976, стр. 59.
76. Т. В. Демидкина, М. И. Шахпаронов, Ц. А. Егоров, Ю. М. Торчинский, в сб. IV Всес. симп. по химии белков и пептидов, Минск, 1977, с. 100.
77. Ц. А. Егоров, М. И. Шахпаронов, И. В. Назимов, Там же, с. 34.
78. Ц. А. Егоров, М. И. Шахпаронов, Т. В. Демидкина, Ю. М. Торчинский, Биохимия, 42, 2253 (1977).
79. D. E. Krieger, B. W. Erickson, R. B. Merrifield, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 73, 3160 (1976).
80. В. И. Лозинский, Б. Ю. Заславский, Ю. А. Давидович, С. В. Рогожин, Авт. свид. ССР № 533631 (1975); Бюлл. изобр., 1976, № 40, с. 70.
81. В. И. Лозинский, Ю. А. Давидович, Б. Ю. Заславский, Ц. А. Егоров, С. В. Рогожин, Биохимия, 43, 257 (1978).

82. A. Ruiz-Carrillo, V. G. Allfrey, Arch. Biochem. Biophys., 154, 185 (1973).
83. C.-B. Laurell, J. Pierce, U. Persson, E. Thulin, Europ. J. Biochem., 57, 107 (1975).
84. G. Fex, C.-B. Laurell, E. Thulin, Там же, 75, 181 (1977).
85. W. W.-C. Chan, K. Mosbach, Biochemistry, 15, 4215 (1976).
86. A. Ruiz-Carrillo, Meth. Enzymol., 34B, 547 (1974).
87. A. Kahlenberg, C. Walker, Analyt. Biochem., 74, 337 (1976).
88. Л. П. Алексеенко, В. Н. Орехович, Биоорганическая химия, 3, 1387 (1977).
89. L. A. A. Sluyterman, J. Wijdenes, Meth. Enzymol., 34B, 544 (1974).
90. A. J. Barrett, Biochem. J., 131, 809 (1973).
91. H. Keilová, V. Tomášek, FEBS Letters, 29, 335 (1973).
92. K. Otto, H. Riesenköning, Biochim. Biophys. Acta, 379, 462 (1975).
93. A. A. Kortt, T. Y. Liu, Biochemistry, 12, 320 (1973).
94. J. C. Nicolas, Meth. Enzymol., 34B, 552 (1974).
95. C.-A. Manen, D. H. Russell, Biochemistry, 13, 4729 (1974).
96. C. D. Anderson, P. L. Hall, Analyt. Biochem., 60, 417 (1974).
97. J. P. G. Malthouse, K. Brocklehurst, Biochem. J., 159, 221 (1976).
98. R. J. Boegman, FEBS Letters, 53, 99 (1975).
99. V. Madelian, W. A. Warren, Analyt. Biochem., 64, 517 (1975).
100. K. Ishikawa, K. Iwai, J. Biochem., 77, 391 (1975).
101. J. Bode, K. G. Wagner, Biochem. Biophys. Res. Commun., 62, 868 (1975).
102. H. Kirschke, J. Langner, B. Wiederanders, S. Ansorge, P. Bohley, H. Hanson, Acta biol. med. Germ., 36, 185 (1977).
103. I. Emöd, B. Keil, FEBS Letters, 77, 51 (1977).
104. S. Vavreinová, J. Turková, Biochim. Biophys. Acta, 403, 506 (1975).
105. J. Carlsson, A. Svenson, FEBS Letters, 42, 183 (1974).
106. J. Carlsson, R. Axén, K. Brocklehurst, E. M. Crook, Europ. J. Biochem., 44, 189 (1974).
107. J. Carlsson, I. Olsson, R. Axén, H. Drevin, Acta Chem. Scand., B30, 180 (1976).
108. B. C. Sykes, FEBS Letters, 61, 180 (1976).
109. C.-B. Laurell, Protides Biol. Fluids, 23, 359 (1976).
110. R. Porta, C. Esposito, G. Della Pietra, Int. J. Biochem., 8, 347 (1977).
111. J. Grunwald, L. J. Berliner, Biochim. Biophys. Acta, 523, 53 (1978).
112. А. А. Недоспачов, Р. М. Хомутов, Тезисы Всесоюзной конф. по методам получения высокоочищенных ферментов, Вильнюс, 1978, с. 89.
113. S. T. Shepherd, H. A. Chase, P. E. Reynolds, Europ. J. Biochem., 78, 521 (1977).
114. H. H. Martin, W. Schilf, C. Maskos, Там же, 76, 585 (1976).
115. T. Stuchbury, M. Shipton, R. Norris, J. P. G. Malthouse, K. Brocklehurst, J. A. L. Herbert, H. Suschitzky, Biochem. J., 151, 417 (1975).
116. A. Ducastaing, D. I. Etherington, Biochem. Soc. Trans., 6, 938 (1978).
117. E. S. Garcia, J. A. Guimaraes, J. L. Prado, Arch. Biochem. Biophys., 188, 315 (1978).
118. R. M. Metrione, Biochim. Biophys. Acta, 526, 531 (1978).
119. D. Tsuru, K. Fujiwaka, K. Kado, J. Biochem., 84, 467 (1978).
120. G. Cacciapuoti, A. Oliva, V. Zappia, Int. J. Biochem., 9, 35 (1978).
121. T. Tsuge, K. Sen-Maru, K. Ohashi, FEBS Letters, 93, 331 (1978).
122. W. J. Driskell, B. H. Weber, E. Roberts, J. Neurochem., 30, 1135 (1978).
123. L.-P. Chao, Neurochem. Res., 3, 549 (1978).
124. J. E. Cone, R. M. del Rio, T. C. Stadtman, J. Biol. Chem., 252, 5337 (1977).
125. S. G. Shapiro, K. S. Squibb, L. A. Markowitz, R. J. Cousins, Biochem. J., 175, 833 (1978).
126. M. F. Obenrader, W. F. Prouty, J. Biol. Chem., 252, 2860 (1977).
127. N. Taniguchi, A. Meister, Там же, 253, 1799 (1978).
128. K. S. Squibb, R. J. Cousins, Biochem. Biophys. Res. Commun., 75, 806 (1977).
129. L. Rydén, H. F. Deutsch, J. Biol. Chem., 253, 519 (1978).
130. A. de la Torre, A. Chueca, J. L. Gorgé, Phytochemistry, 17, 35 (1978).
131. J.-O. Jeppsson, C.-B. Laurell, M. Fagerhol, Europ. J. Biochem., 83, 143 (1978).
132. G. Fex, R. Lindgren, Biochim. Biophys. Acta, 493, 410 (1977).
133. C. Godinot, A. DiPietro, B. Blanchy, F. Penin, D. C. Gautheron, J. Bioenerg. Biomembr., 9, 255 (1977).
134. K. Malinowski, W. Manski, Immunochemistry, 14, 603 (1977).
135. A. Fattoum, C. Roustan, J. Feinberg, G. Desvages, C.-A. Pradel, Europ. J. Biochem., 82, 161 (1978).
136. G. Lindeberg, J. Tengborn, H. Bennich, U. Ragnarsson, J. Chromatogr., 156, 366 (1978).
137. W. T. Melvin, H. M. Keir, Biochem. J., 168, 595 (1977).
138. R. M. K. Dale, E. Martin, D. C. Livingston, D. C. Ward, Biochemistry, 14, 2447 (1974).
139. H. Biessmann, R. A. Gjerset, D. Lewy, B. J. McCarthy, Там же, 15, 4356 (1976).
140. A. R. Thomason, F. M. Rottman, Anal. Biochem., 89, 501 (1978).

141. D. J. Goss, L. J. Parkhurst, J. Biol. Chem., 253, 7804 (1978).
142. H. C. Towle, M.-J. Tsai, S. Y. Tsai, B. W. O'Malley, Там же, 252, 2396 (1977).
143. G. P. Georgiev, Yu. A. Illyin, A. P. Ryskov, N. A. Tchurikov, G. N. Yenikolopov, V. A. Gvozdev, E. A. Anantiev, Science, 195, 394 (1977).
144. J. Coyette, J.-M. Ghuyse, R. Fontana, Europ. J. Biochem., 88, 297 (1978).
145. А. В. Ильина, В. И. Лозинский, Ю. А. Давыдович, С. В. Рогожин, Авт. свид. СССР № 687081 (1977); Бюлл. изобр., 1979, № 35, с. 109.
146. В. И. Лозинский, С. В. Рогожин, в сб. I Всес. симп. по Молекулярной жидкостной хроматографии, г. Дзержинск, 1979, с. 13.
147. W. T. Melvin, H. M. Keir, Analyt. Biochem., 92, 324 (1979).
148. H. Horitsu, Y. Banno, S. Kimura, H. Shimizu, M. Tomoyeda, Agr. Biol. Chem., 43, 663 (1979).
149. M. Fukuda, Y. Eshdat, G. Tarone, V. T. Marchesi, J. Biol. Chem., 253, 2419 (1978).
150. H. Singh, G. Kalnitsky, Там же, 253, 4319 (1978).
151. C.-B. Laurell, J. Chromatogr., 159, 25 (1978).
152. L. Polgár, P. Halász, Europ. J. Biochem., 88, 513 (1978).
153. N. Ninomiura, K. T. Yasunobu, Biochem. Pharmacol., 27, 2737 (1978).
154. K. Hosoi, S. Kobayashi, T. Ueda, Biochem. Biophys. Res. Commun., 85, 558 (1978).
155. I. R. Cottingham, C. J. Ragan, Biochem. Soc. Trans., 6, 1307 (1978).
156. J. H. Keen, W. B. Jakoby, Analyt. Biochem., 90, 136 (1978).
157. E. Noguchi, M. Nishikimi, K. Yagi, Там же, 91, 367 (1978).
158. P. D. Chantler, W. B. Gratzer, Там же, 91, 626 (1978).
159. J. Carlsson, Hindustan, Antibiot. Bull., 20, 105 (1976—1978).
160. D. Prigent, C. Geoffroy, J. E. Alouf, C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D, 287, 951 (1978).
161. M. Shipton, K. Brocklehurst, Biochem. J., 171, 385 (1978).
162. D. J. Goss, L. J. Parkhurst, J. Biol. Chem., 253, 7804 (1978).
163. Y. Eshdat, A. Pruijansky — Jakobovits, FEBS Letters, 101, 43 (1979).
164. J. Lasch, R. Koelsch, Europ. J. Biochem., 82, 181 (1978).

Институт элементоорганических соединений
АН СССР, Москва