



УДК 547.963.3

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИАНУРХЛОРИДА
ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**Куриненко В. М., Шаги-Мухаметова Ф. Ф., Нужина А. М.**Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина*

При помощи ЦНХ получены иммобилизованные на различных марках сефадексов и целлюлозе препараты нуклеиновых кислот. Иммобилизацию проводили непосредственно на матрице сорбента и через «вставки» различной длины — этилендиамин, путресцин и гексаметилендиамин. Непрореагировавшие с нуклеиновыми кислотами вторичные хлоридные группы ЦНХ нейтрализовали при помощи диэтиламина. Это позволило снизить уровень неспецифической адсорбции белков препаратами, содержащими иммобилизованные нуклеиновые кислоты, до 2—4,8%. Показано, что иммобилизованные нуклеиновые кислоты взаимодействуют с ферментами нуклеинового обмена — ДНКазой I и нуклеазой *S. marcescens*.

Возможность использования иммобилизованных нуклеиновых кислот в качестве аффинных адсорбентов была показана в целом ряде исследований [1—5].

Характерной особенностью известных способов иммобилизации нуклеиновых кислот является их узкая специфичность, проявляющаяся в возможности иммобилизации либо одно-, либо двухцепочечных форм. В случае химических методов иммобилизации нуклеиновых кислот это обусловлено использованием специфических иммобилизующих реагентов. В то же время для изучения ферментов нуклеинового обмена полезно использовать различные типы нуклеиновых кислот, иммобилизованных одним способом. При этом результаты экспериментов не зависят от различий в носителях и иммобилизующих реагентах.

На наш взгляд, универсальный метод иммобилизации нуклеиновых кислот может быть основан на использовании в качестве иммобилизующих реагентов соединений, которые обладают способностью взаимодействовать с различными функциональными группами компонентов нуклеиновых кислот. Таким реагентом является, например, ЦНХ — производное триазина. В задачу настоящей работы входило изучение возможности использования ЦНХ для ковалентного связывания нуклеиновых кислот с нерастворимыми носителями и выяснение способности полученных этим методом иммобилизованных нуклеиновых кислот к взаимодействию с ферментами нуклеинового обмена.

Получение препаратов нуклеиновых кислот, иммобилизованных с применением ЦНХ. Процесс получения аффинных адсорбентов с использо-

* Сокращения: poly(A), poly(U), poly(C) — соответственно полиадениловая, полиуридинловая и полицитидиловая кислоты; ЦНХ — хлорангидрид циануровой кислоты (цианурхлорид); ЭД — этилендиамин; ПТ — путресцин; ГМД — гексаметилендиамин; ВМЕ — вискозиметрические единицы.

ванием иммобилизующих реагентов (активаторов) обычно состоит из двух стадий: 1) активации носителя, 2) связывания лиганда с активированным носителем.

В качестве инертных носителей нами были испытаны целлюлоза и различные марки сефадексов. Было обнаружено, что активированные ЦНХ сефадексы G-75 и G-100 связывают максимальное количество нуклеиновых кислот (табл. 1.) С ДНК, иммобилизованными на этих сефадексах, была отмечена также наиболее высокая способность к взаимодействию с ферментами нуклеинового обмена (ДНКазой I и нуклеазой *S. marcescens*). Для экспериментов в качестве носителя для иммобилизации нуклеиновых кислот мы использовали сефадекс G-75.

Количество иммобилизованных нуклеиновых кислот и их функциональная активность зависят не только от качества носителя, но и от степени активации, которая определяется, в частности, при прочих равных условиях длительностью процесса активации и соотношением носителя и активатора. При использовании ацетонового раствора ЦНХ (конечная концентрация ЦНХ — 1,8%) и стабилизации pH в процессе активации на уровне pH 11 при помощи раствора 4 н. NaOH достаточно высокая степень активации носителя достигается в течение 30 мин. Последующее увеличение длительности активации сопровождается лишь незначительным увеличением степени активации носителя (табл. 2).

Активацию сефадекса при 30-минутной экспозиции проводили при различных молярных соотношениях ЦНХ и сефадекса (в пересчете на редуцирующие остатки после кислотного гидролиза сефадекса). Результаты этих исследований приведены в табл. 3.

Как видно из данных табл. 3, увеличение количества используемого активатора сопровождается увеличением количества иммобилизованной нуклеиновой кислоты. Однако максимальная степень взаимодействия полученных иммобилизованных нуклеиновых кислот с нуклеазами отмечалась при отношении ЦНХ : носитель, равном 1 : 1,5.

Рядом автором описано применение ЦНХ в качестве активатора полимеров при получении иммобилизованных ферментов [6—10]. Во всех случаях связывание с активированными носителями проводили при 20—30°. Необходимость выбора такой температуры обусловлена лабильностью ферментов. Однако Шеффер [11] отмечал, что при температуре 40—45° атомы хлора молекулы ЦНХ становятся более реакционноспособными. При этой температуре и при полной силе μ 0,42 нуклеиновые кислоты не претерпевают изменений. Поэтому связывание нуклеиновых кислот активированным сефадексом проводили при 40°. Динамика связывания нуклеиновых кислот в этих условиях представлена на рисунке. В течение 6—8 ч связывание происходит наиболее интенсивно, после чего существенно замедляется. В наших экспериментах стадию связывания проводили в течение 16 ч.

Возможность иммобилизации различных типов нуклеиновых кислот в подобранных условиях была показана на примере нативной и денатури-

Таблица 1

Количество нативной ДНК тимуса теленка, ковалентно связанной с различными носителями

Носитель	Количество ДНК в препарате, мг фосфора/г носителя
Сефадекс	
G-25	7,3
G-50	9,0
G-75	11,3
G-100	11,0
G-150	10,6
G-200	6,0
Целлюлоза (FN 3)	9,0

Таблица 2

Влияние времени активации на количество иммобилизованной ДНК

Время активации при 10°, мин	Количество иммобилизованной ДНК, мг фосфора/г сефадекса
10	2,1
30	11,3
90	13,0

Влияние относительных количеств ЦНХ и носителя на иммобилизацию ДНК и ее взаимодействие с нуклеодеполимеразами

Молярные отношения ЦНХ и носителя	ДНК*, мг фосфора/г носителя	Взаимодействие с ферментами, % адсорбции		Молярные отношения ЦНХ и носителя	ДНК**, мг фосфора/г носителя	Взаимодействие с ферментами, % адсорбции	
		нуклеаза <i>S. marcescens</i>	ДНКаза I			нуклеаза <i>S. marcescens</i>	ДНКаза I
1 : 3	11,0	68,9	56,2	1 : 3	9,0	36,1	44,2
1 : 1,5	11,3	70,1	79,7	1 : 1,5	9,2	46,2	52,8
1 : 1	13,0	55,3	68,3	1 : 1	11,0	27,9	30,8

Таблица 4

Содержание нуклеиновых кислот в иммобилизованных препаратах

Наименование препарата	Количество фосфора НК, мг/г сефадекса
Сефадекс-ЦНХ-ДНК тимуса *	11,0
Сефадекс-ЦНХ-ДНК тимуса **	9,2
Сефадекс-ЦНХ-ДНК фага Т-2 *	7,8
Сефадекс-ЦНХ-РНК	16,5

* Нативная.

** Денатурированная,

Таблица 5

Содержание нуклеиновых кислот в иммобилизованных препаратах гомополимеров

Наименование препаратов	Содержание гомополимера, мг фосфора/г носителя
Сефадекс-ЦНХ-poly(A)	2,9
Сефадекс-ЦНХ-poly(U)	2,5
Сефадекс-ЦНХ-poly(C)	2,7

рованной ДНК тимуса теленка, ДНК фага Т-2, дрожжевой РНК. Полученные результаты представлены в табл. 4.

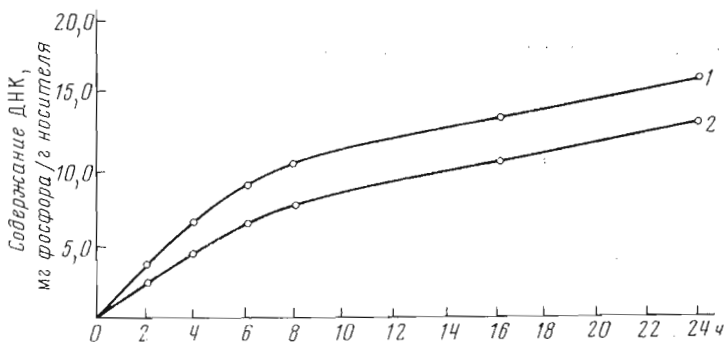
Как видно из данных табл. 4, препараты иммобилизованной ДНК тимуса теленка содержат наибольшее количество ДНК.

Была предпринята попытка выяснить специфичность процесса иммобилизации одноцепочечных нуклеиновых кислот на активированном носителе при 16-часовой экспозиции. С этой целью была проведена иммобилизация гомополимеров — poly(A), poly(U) и poly(C). Результаты исследований представлены в табл. 5.

Как видно из данных табл. 5, существенного различия в содержании иммобилизованных гомополимеров не наблюдается.

Полученные данные не могут быть интерпретированы однозначно при обсуждении механизма связывания одноцепочечных форм нуклеиновых кислот. Тем не менее они свидетельствуют об отсутствии влияния природы оснований на связывание и, следовательно, о том, что иммобилизация одноцепочечных нуклеиновых кислот, и тем более нативной ДНК, происходит статистически.

Получение иммобилизованных нуклеиновых кислот с использованием «вставок». Влияние расстояния между иммобилизованным лигандом и носителем на способность системы лиганд — носитель специфически взаимодействовать с выделяемым ферментом было изучено Катреказасом и другими исследователями [12, 13]. Ими было показано, что введение углеводородных «вставок» между носителем и иммобилизуемым лигандом необходимо для устранения возможного стерического несоответствия между аффинным адсорбентом и энзимом. В связи с этим, помимо получения иммобилизованных нуклеиновых кислот указанным выше способом, нами были получены препараты с использованием «вставок». В качестве «вставок» применялись диамины различной длины: ЭД, ПТ и ГМД.



Динамика связывания нативной и денатурированной ДНК с сефадексом, активированным ЦНХ: 1 — ДНК нативная, 2 — ДНК денатурированная

Получение препаратов нуклеиновых кислот со «вставками» заключалось в том, что после активации носителя ЦНХ проводили связывание «вставки». Далее повторяли активацию ЦНХ с последующим связыванием нуклеиновых кислот. Условия этих процессов аналогичны условиям, используемым для получения препаратов без «вставок».

Как видно из данных табл. 6, увеличение содержания иммобилизованной ДНК в полученных препаратах находится в прямой зависимости от длины используемой «вставки» — наибольшее содержание ДНК отмечалось при использовании в качестве «вставки» ГМД.

Введение ГМД сопровождалось усилением взаимодействия иммобилизованных нуклеиновых кислот с ДНКазой I. Эти данные указывают на то, что такие факторы, как длина «вставки», существенным образом влияют на содержание иммобилизованного лиганда и на его взаимодействие с ферментом.

Устранение неспецифической адсорбции белка препаратами, содержащими иммобилизованные нуклеиновые кислоты. Препараты иммобилизованных нуклеиновых кислот, полученные на основе сефадексов, обладали способностью к неспецифической адсорбции белков, обусловленной, по-видимому, неполным взаимодействием активированного носителя с иммобилизованным лигандом. Неспецифическую адсорбцию такого рода обычно устраняют нейтрализацией непрореагировавших групп активаторов [14, 15]. Первоначально нейтрализацию непрореагировавших групп ЦНХ после иммобилизации нуклеиновых кислот проводили по методу Кэя с соавт. [8] — отмыванием препаратов аммиачным буфером. Однако такая обработка снижала уровень неспецифической адсорбции весьма незначительно, поэтому для ее устранения нами была испытана нейтрализация соединениями, указанными в табл. 7. Нейтрализацию проводили при 40° в течение 24 ч с последующей отмывкой нейтрализованных препаратов 0,14 М раствором NaCl.

Из представленных в табл. 7 результатов видно, что значительный эффект уменьшения неспецифической адсорбции достигается при обработке 1 М диэтиламмонием. В этом случае неспецифическая адсорбция понижается до 2—4,8%. Естественно предположить, что уровень неспецифической адсорбции препаратов иммобилизованных нуклеиновых кислот будет ниже этих значений, поскольку часть активирующих групп реагирует с иммобилизуемым лигандом.

Взаимодействие иммобилизованных препаратов ДНК с нуклеодеполимеразой. Полученные иммобилизованные ДНК обладают способностью к специфическому взаимодействию с ДНКазой I и внеклеточной нуклеазой *S. marcescens*. В табл. 3, 6, 8 и 9 представлены результаты исследований, из которых следует, что в статических условиях в результате контакта

Таблица 6

Содержание ДНК тимуса теленка в препаратах со «вставками»

Наименование препарата	Количество ДНК, мг фосфора/г носителя		Взаимодействие иммобилизованных препаратов нативной ДНК с ДНКазой I, % адсорбции
	нативная	денатурированная	
Сефадекс-ЦНХ-ДНК	11,3	9,2	78,7
Сефадекс-ЦНХ-ЭД-ЦНХ-ДНК	12,5	11,5	81,2
Сефадекс-ЦНХ-ПТ-ЦНХ-ДНК	13,6	—	—
Сефадекс-ЦНХ-ГМД-ЦНХ-ДНК	15,4	12,3	98,1

Таблица 7

Нейтрализующее действие различных соединений на неспецифическую адсорбцию ДНКазы I сефадексом С-75, активированным ЦНХ

Нейтрализующее соединение (концентрация 1 М)	Неспецифическая адсорбция, %	Нейтрализующее соединение (концентрация 1 М)	Неспецифическая адсорбция, %
Диметиламин (9,0) *	15,2	Боратный буфер (9,0)	96,6
Диэтиламин (9,0)	4,8	Ацетатный буфер (4,5)	56,3
Аммиачный буфер (9,0)	70,5		

* В скобках величина рН.

Таблица 8

Взаимодействие нуклеаз с препаратами иммобилизованной ДНК

Наименование препарата	Адсорбция фермента, %		Наименование препарата	Адсорбция фермента, %	
	нуклеаза S. marcescens	ДНКазы I		нуклеаза S. marcescens	ДНКазы I
Сефадекс G-75	0	0	Сефадекс-ЦНХ-ГМД-ЦНХ	4,0	2,7
Сефадекс-ЦНХ	4,8	4,4	Сефадекс-ЦНХ-ГМД-ЦНХ-ДНК *	82,1	98,1
Сефадекс-ЦНХ-ДНК *	70,1	78,7	Сефадекс-ЦНХ-ГМД-ЦНХ-ДНК **	54,8	91,0
Сефадекс-ЦНХ-ДНК **	46,2	63,7			

* Нативная.

** Денатурированная.

Таблица 9

Влияние ДНКазы I на стабильность иммобилизованных нативных ДНК

Длительность обработки ДНКазой, ч	Препарат иммобилизованной ДНК без «вставки»		Препарат иммобилизованной ДНК со «вставкой»	
	содержание ДНК в препаратах, %	взаимодействие препаратов с ДНКазой, % адсорбции	содержание ДНК в препаратах, %	взаимодействие препаратов с ДНКазой, % адсорбции
Контроль (без обработки)	100	71	100	93,6
0,5	100	71	100	93,0
2	83,0	—	86	—
24	83,0	60	78	74,2
48	83,4	58	25	57,4

с иммобилизованными ДНК происходит уменьшение активности нуклеазы *S. marcescens* и ДНКазы I. Для обоих ферментов взаимодействие наиболее полно наблюдается с препаратами со «вставками». Это, как уже говорилось выше, вероятно, обусловлено уменьшением стерических препятствий со стороны носителя для взаимодействующих фермента и лиганда.

Препараты иммобилизованных ДНК обладают способностью к повторному взаимодействию с нуклеолитическими ферментами без существенного снижения интенсивности этого взаимодействия. Так, например, после 30—40-кратного контакта с ферментами в условиях, описанных в экспериментальной части для изучения взаимодействия иммобилизованных препаратов ДНК с нуклеодеполимеразами, не наблюдалось достоверного снижения способности препаратов специфически адсорбировать нуклеазы. В связи с этим была изучена возможность расщепления иммобилизованных нативных ДНК со «вставками» и без «вставки» панкреатической ДНКазой (табл. 9). Для этого к иммобилизованным ДНК добавляли ДНКазу I, способную провести исчерпывающий гидролиз равного количества растворимой нативной ДНК в течение 2—3 ч.

В течение первых 30 мин количество ДНК в иммобилизованных препаратах не изменяется. Однако спустя 2 ч в препаратах без «вставки» содержание ДНК уменьшается примерно на 18% и остается на этом уровне в течение последующих 48 ч. В препаратах со «вставкой» содержание ДНК в процессе обработки ДНКазой уменьшается пропорционально времени обработки и спустя 48 ч достигает 25% исходного количества.

Для выяснения механизма иммобилизации нуклеиновых кислот прежде всего имеет значение способ связывания — «вдоль цепи» или «в конец цепи». По данным Риквуда [16], при иммобилизации нативной ДНК «в конец цепи» с помощью карбодимида получают препараты, чувствительные к обработке панкреатической ДНКазой (гидролизует 95% иммобилизованной ДНК). Иммобилизованная ЦНХ «без вставки» высокополимерная ДНК при обработке большими концентрациями ДНКазы гидролизует 18% в течение 2 суток всего лишь на 18%. Это может быть объяснено тем, что связывание ДНК с сефадексом в последнем случае осуществляется способом «вдоль цепи».

Что касается различий в стабильности препаратов со «вставкой» и без «вставки», то они объясняются, вероятно, не различиями в способах иммобилизации, а различиями в расстоянии между иммобилизуемым лигандом и носителем. Более высокая стабильность препаратов без «вставки» может рассматриваться как следствие ее более тесного контакта с носителем, что создает определенные стерические препятствия для «выщепления» немобилизованных фрагментов ДНК.

Значительный интерес представляет зависимость специфической адсорбционной способности иммобилизованной ДНК от предшествующей обработки ДНКазой. Из табл. 9 видно, что в результате обработки адсорбционная способность препаратов без «вставки» уменьшается на 10—13% и сохраняется на постоянном уровне в соответствии с неизменным содержанием в них ДНК. В зависимости от изменения в содержании остаточной ДНК изменяется и адсорбционная способность препаратов со «вставкой». Таким образом, гидролиз иммобилизованных ДНК наблюдается при очень больших концентрациях фермента и при длительном его контакте с ДНК.

Другой весьма интересной особенностью взаимодействия является преимущественное связывание ферментов с препаратами иммобилизованных нативных ДНК (табл. 3 и 8). Взаимодействие ферментов с немодифицированными нуклеиновыми кислотами также характеризуется их предпочтительностью по отношению к нативной ДНК [17, 18]. Сохранение этой предпочтительности после иммобилизации ДНК можно рассматривать как сохранение иммобилизованными нуклеиновыми кислотами некоторых функциональных особенностей, присущих немодифицированным нуклеиновым кислотам. Кроме того, учитывая специфичность взятых для исследо-

бания ферментов, предпочтительность ферментов к иммобилизованным нативным ДНК можно рассматривать как доказательство сохранения нативности ДНК после ее иммобилизации.

Экспериментальная часть

В качестве нерастворимых носителей использовали различные марки сефадексов (фирма «Pharmacia», «Uppsala», Швеция) и целлюлозу F N 3 («Filtrak», ГДР) после предварительного ее дезинтегрирования в растворе 0,5 н. NaOH.

В экспериментах использовали коммерческий препарат панкреатической ДНКазы Ленинградского мясокомбината (дезоксирибонуклеинат-5'-олигонуклеотидогидролаза, КФ 3.1.4.5), нуклеазу *S. marcescens* (рибонуклеинат (дезоксирибонуклеинат)-5'-олигонуклеотидогидролаза, КФ 3.1.4.9), полученную по методу, разработанному в нашей лаборатории [19], ЦНХ — Львовского завода химреактивов. РНК — фирмы «Reanal» после ее предварительного переосаждения подкисленным спиртом [20], гомополимеры poly(A), poly(U) и poly(C) — препараты фирмы «Reanal».

ДНК тимуса телят выделяли по методу Кэя в модификации Беринга [21]. Молекулярный вес ДНК — $6,5 \cdot 10^6$, содержание белка — 0,5%.

ДНКазную активность определяли вискозиметрически по методу Ласковского и Зайдель в модификации Бенинга [22].

Получение препаратов иммобилизованных нуклеиновых кислот. К охлажденной до 10° суспензии 300 мг сефадекса G-75 в 6 мл 0,05 н. NaOH приливали 5 мл 4%-ного раствора ЦНХ в ацетоне. Тотчас же добавляли по каплям раствор 4 н. NaOH (до исчезновения мути и достижения значения pH 11). Суспензию периодически осторожно встряхивали и через 30 мин, в течение которых постоянно контролировали pH, активированный сефадекс промывали 200 мл холодной смеси ацетона с дистиллированной водой (1 : 1), далее 0,5 л холодной дистиллированной воды и 100 мл холодного боратного буфера (0,14 М, pH 9,6).

Связывание нуклеиновых кислот с активированным сефадексом проводили при 40°. Для этого к суспензии 300 мг активированного сефадекса в 3 мл боратного буфера приливали раствор ДНК в 0,14 М растворе NaCl (5 мл, 2 мг/мл) и добавляли несколько капель хлороформа. Суспензию перемешивали на роторной мешалке 16 ч. Спустя 16 ч к препарату иммобилизованной ДНК, отмытому от несвязавшейся ДНК боратым буфером, добавляли 10 мл 1 М раствора диэтиламина (pH 8,6) и оставляли при осторожном перемешивании на 16 ч при 40°. Затем препарат иммобилизованной ДНК промывали раствором 0,14 М NaCl или буфером и хранили при 4° с несколькими каплями хлороформа.

Получение препаратов со «вставкой» отличалось тем, что к активированному, как описано выше, носителю добавляли 10 мл 10%-ного раствора диамина, периодически суспендировали при 40° в течение 30 мин, отмывали водой, ацетоном. Далее проводили повторную активацию и связывание ДНК, как описано выше, для препаратов без «вставки».

В полученных препаратах определяли содержание фосфора по методу Боссе [23].

Изучение взаимодействия водонерастворимых препаратов ДНК с нуклеодеполимеразами. О взаимодействии судили по остаточной активности после контакта ферментов с препаратами иммобилизованных нуклеиновых кислот. К 0,3—0,5 мл суспензии препарата иммобилизованной ДНК в 0,05 М трис-HCl-буфере (pH 7,5), содержащем 0,005 М CaCl₂ и 0,017 М MgCl₂, добавляли 0,5 мл раствора соответствующего фермента с активностью 200—210 ВМЕ/мл. Затем через 30 мин контакта при 20° суспензию центрифугировали при 1000 g в течение 3—5 мин и в надосадочной жидкости проверяли остаточную активность. Контролем служили препараты не обработанного ЦНХ сефадекса G-75.

Определение неспецифической адсорбции. Определение неспецифической адсорбции проводили так же, как и определение способности иммобилизованных нуклеиновых кислот связывать ферменты. Но вместо препаратов иммобилизованных нуклеиновых кислот к ферментам добавляли активированные и различным способом обработанные носители. В качестве контролей использовали исходный неактивированный носитель и буфер, добавляемый к ферменту для учета разведения фермента суспензией иммобилизованной ДНК. Адсорбционную способность активированных носителей выражали в процентах уменьшения активности ферментов, добавленных к соответствующему носителю по сравнению с контролем.

Изучение влияния ДНКазы на стабильность иммобилизованных ДНК. К 1 мл суспензии ДНК, иммобилизованной на сефадексе G-75 (количество фосфора в суспензии от 95 до 250 мкг) в 0,05 М трис-HCl-буфере (рН 7,5), содержащем 0,005 М CaCl₂ и 0,017 М MgCl₂, добавляли 2 мл раствора панкреатической ДНКазы на этом же буфере (2000 ВМЕ, 0,14 мг ферментного белка). Буфер предварительно консервировали добавлением кристаллика тимола. Суспензию ДНК с ферментом помещали на горизонтальную роторную мешалку (40 об/мин) и перемешивали при 37°. Каждые 10—12 ч в обрабатываемых образцах контролировали уровень активности фермента и при ее снижении добавляли новую порцию фермента. Через 0,5; 2; 24 и 48 ч в образце определяли содержание фосфора и способность препарата специфически взаимодействовать с ДНКазой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Naber J., Scherman M., Rösch A. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **114**, 326—337.
2. Ablerts B., Amodio F., Jenkins M., Gutman E., Ferris F. (1968) *Cold Spring Harbour Symp. on Quant. Biology*, **33**, 289—307.
3. Litman R. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 6222—6233.
4. Poonian M., Schlabach A., Weissbach A. (1971) *Biochemistry*, **10**, 424—427.
5. Humphries P., McConnel D., Gordon R. (1973) *Biochem. J.*, **133**, 201—203.
6. Суринов Б. П., Манойлов С. Е. (1966) *Биохимия*, **31**, 387—395.
7. Kay G., Crook E. (1967) *Nature*, **216**, 514—515.
8. Kay G., Lilly M., Scharp A., Wilson R. (1968) *Nature*, **217**, 641—642.
9. Smith N., Lenhoff H. (1974) *Anal. Biochem.*, **61**, 392—415.
10. Куриненко Б. М., Попова Т. Я. (1974) *Получение и применение иммобилизованных ферментов*, Тезисы симпозиума, стр. 34, Таллин.
11. Schaeffer F. (1951) *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 2990—2991.
12. Cuatrecasas P., Anfinsen C. B. (1971) *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 259—279.
13. Lowe S., Harvey M., Cravin D., Dean P. (1973) *Biochem. J.*, **133**, 499—507.
14. Fritz H. (1970) *Z. Physiol. Chem.*, **351**, 571—574.
15. Sundberg L., Porath J. (1974) *J. Chromat.*, **9**, 87—98.
16. Rickwood D. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **269**, 47—50.
17. Kurnick N. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 15—25.
18. Беляева М. И., Лещинская И. Б. (1968) в сб. *Нуклеазы и некоторые аспекты их применения* (под редакцией Беляевой М. И.), стр. 6—51, изд-во КГУ, Казань.
19. Балабан П. П., Гибадуллина А. Р., Лещинская И. Б., Мальцева С. В. (1968) там же, стр. 111—124.
20. Сквирская Э. Б., Чепинога О. П. (1964). *Практикум по нуклеопротеидам и нуклеиновым кислотам*, стр. 23, изд-во «Высшая школа», М.
21. Бенинг Г. П. (1969) в сб. *Бактериальные нуклеазы и их действие на опухолевый рост* (под редакцией Беляевой М. И.), стр. 226—231, изд-во КГУ, Казань.
22. Бенинг Г. П. (1964) в сб. *Бактериальные нуклеазы* (под редакцией Беляевой М. И.), стр. 17—33, изд-во КГУ, Казань.
23. Bosse T. (1925) *J. Biol. Chem.*, **66**, 322—326.

Поступила в редакцию
5.III.1975

THE USE OF S-TRIAZINECHLORIDE FOR IMMOBILISATION
OF NUCLEIC ACIDS

KURINENKO B. M., SHAGI-MUKHAMETOVA F. F., NUZHINA A. M.

V. I. Ulyanov-Lenin State University, Kazan

A method for preparation of immobilized nucleic acids has been proposed based on the use of s-triazinechloride for the activation of inert carriers. A number of diamines were used as spacers. Non-specific adsorption constituted 2—4.8%. The immobilized nucleic acids were found to react with the nucleases (DNase I and nuclease *S. marcescens*).
