



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.155.2:543.544

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НУКЛЕАЗ

Ванникова Г. Е., Варламов В. П., Рогожин С. В.

*Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова
Академии наук СССР, Москва*

В обзоре приведены сведения о выделении и очистке нуклеолитических ферментов методом аффинной хроматографии. Рассмотрены возможные стационарные лиганды и сопоставлены различные способы иммобилизации их на носителях, а также различные элюенты и типы элюции нуклеаз с аффинных сорбентов. Приведены данные по использованию аффинной хроматографии для определения констант диссоциации комплексов фермента с иммобилизованным и растворимым лигандом.

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	293
2. Носители, используемые в аффинной хроматографии нуклеаз.	294
3. Лиганды.	295
3.1. Биоспецифические сорбенты с нуклеотидными лигандами, присоединенными через фосфатные группы.	295
3.2. Биоспецифические сорбенты с нуклеотидными лигандами, присоединенными через рибозную часть молекулы.	302
3.3. Биоспецифические сорбенты с нуклеотидными лигандами, присоединенными через гетероциклическое основание.	307
3.4. Биоспецифические сорбенты с лигандами ненуклеотидной природы.	313
4. Применение аффинной хроматографии для количественной оценки специфического связывания нуклеаз с лигандами.	314

1. Введение

Ферментативная активность нуклеаз проявляется в расщеплении межнуклеотидных связей с образованием фрагментов нуклеиновых кислот без освобождения неорганического фосфата. Различают два основных типа нуклеаз: 1) эндонуклеазы, расщепляющие фосфодиэфирные связи в цепи молекул нуклеиновых кислот, 2) экзонуклеазы, отщепляющие по одному нуклеотиду от конца полинуклеотидной цепи. В зависимости от положения фосфата в мононуклеотидах, образовавшихся в результате гидролиза, экзонуклеазы подразделяют на 5'-экзонуклеазы и 3'-экзонуклеазы [1].

Нуклеазы, уникальные реагенты для расшифровки структуры нуклеиновых кислот, применяются в препаративных биохимических работах для освобождения ДНК от РНК и, наоборот, используются для ферментативного получения мононуклеотидов и олигонуклеотидов различной длины. В последние годы нуклеазы нашли применение и в медицине в качестве противоопухолевых и противовирусных препаратов.

В качестве специфических реагентов нуклеазы могут быть использованы только в индивидуальном состоянии. Традиционные схемы очистки и выделения ферментов обычно многостадийны и сложны, поэтому все чаще при очистке нуклеаз используют биоспецифическую, или так называемую аффинную, хроматографию. В основе этого метода лежит способность ферментов обратимо связываться со специфическими лигандами, в качестве которых можно использовать субстраты или их аналоги, ингибиторы, кофакторы, антитела и др. Обычно специфический лиганд ковалентно присоединяют к нерастворимому носителю, получая таким образом биоспецифический сорбент. Как правило, константа взаимодействия фермента с иммобилизованным лигандом меньше 10^{-4} М [2]. Компоненты разделяе-

мой смеси, не обладающие достаточным сродством к аффинному сорбенту, при хроматографии остаются в растворе, в то время как белок, обнаруживающий сродство к биоспецифическому сорбенту, будет удерживаться. Элюция связанного фермента происходит либо при изменении ионной силы или pH, либо при добавлении в элюирующий раствор конкурентного ингибитора, кофактора или субстрата [2]. Методу аффинной хроматографии посвящено много обзоров и монографий [2—11], но аффинной хроматографии нуклеаз — лишь один обзор [12], охватывающий работы до 1978 г., и то недостаточно полно.

2. Носители, используемые в аффинной хроматографии нуклеаз

Носитель — нерастворимая основа, к которой ковалентно присоединяют биоспецифический лиганд, получая при этом сорбент для аффинной хроматографии. Для успешного применения метода необходимо, чтобы носитель обладал следующими свойствами:

- 1) минимальной адсорбционной способностью по отношению к балластным белкам;
- 2) достаточной проницаемостью для макромолекул нуклеаз;
- 3) механической и химической стабильностью как в течение процессов адсорбции, так и при регенерации;
- 4) химическая структура носителя должна позволять легко и прочно присоединять специфический лиганд в относительно мягких условиях;
- 5) микробиологической устойчивостью.

Носителя, полностью удовлетворяющего всем перечисленным требованиям, не существует, однако целый ряд носителей достаточно успешно применяется в аффинной хроматографии.

Наиболее широко в настоящее время используются сорбенты на основе агарозы (сефароза, Pharmacia, Швеция; биогель А, Bio-Rad Labs., США) и ее производных. На основе агарозы создан ряд коммерчески доступных биоспецифических сорбентов, о которых будет сказано ниже. Агароза устойчива в диапазоне pH 4—9 и может использоваться при 0—50°С; устойчива к высоким концентрациям нехаотропных солей [13]. Агарозные гели обладают низкой неспецифической сорбцией. К недостаткам следует отнести невысокую механическую прочность и возможность микробного заражения. Поперечные сшитые агарозные гели (сефароза CL), обладающие улучшенными физико-механическими свойствами [14], используются наиболее широко.

Из других полисахаридов в аффинной хроматографии нуклеаз находят применение целлюлоза (фирмы Whatman, Англия, Serva, ФРГ, и др.) и ее производные. Целлюлоза устойчива в диапазоне pH 3—10, ее гликозидные связи подвержены кислотному гидролизу, она легко заражается микробами [2].

Применяются биоспецифические сорбенты и с полиакриламидной основой. Главный производитель полиакриламидных гелей (торговое название — биогель Р) — фирма Bio-Rad Labs. (США). Полиакриламидные гели устойчивы при pH 2—11 и позволяют использовать все обычные элюенты. Небольшое количество карбоксильных групп, имеющих даже в свежем геле, не влияет на разделение при использовании элюентов, содержащих соли [15]. Полиакриламидные гели устойчивы к действию микроорганизмов. Недостатками их является невысокая механическая прочность и прилипание частиц гели к чистым стеклянным поверхностям.

В последнее время в аффинной хроматографии нуклеаз стали использоваться биоспецифические сорбенты на неорганической основе: модифицированном пористом стекле, выпускаемом фирмой Corning Glass Works (США), и макропористом кремнеземе (силохроме) отечественного производства. Силохромы характеризуются высокой степенью химической чистоты (более 99% SiO₂), узким распределением по размерам пор, превосходящим по этим показателям пористые стекла с тем же диаметром пор. Сорбенты на неорганической основе механически прочны, жесткая структура носителя не изменяется при переходе от одного растворителя к другому, что часто наблюдается в случае органических носителей, не подвер-

жены действию микроорганизмов. Но неорганическим носителям присущи недостатки, мешающие их широкому использованию: невысокая стабильность в водных растворах при $pH > 7$ и неселективная сорбция. Эти недостатки в значительной степени устранены у неорганических носителей, поверхность которых покрыта гидрофильными полимерами. Подобные носители, а именно сиохром ($d_{пор} 1130 \text{ \AA}$) с привитым полимерным покрытием (полиакриловая кислота или полиметилакрилат), применялись в аффинной хроматографии [16, 17] и хемоспецифической (ковалентной) хроматографии биополимеров [18].

Из всех перечисленных носителей в аффинной хроматографии нуклеаз наиболее широко используются агарозные гели.

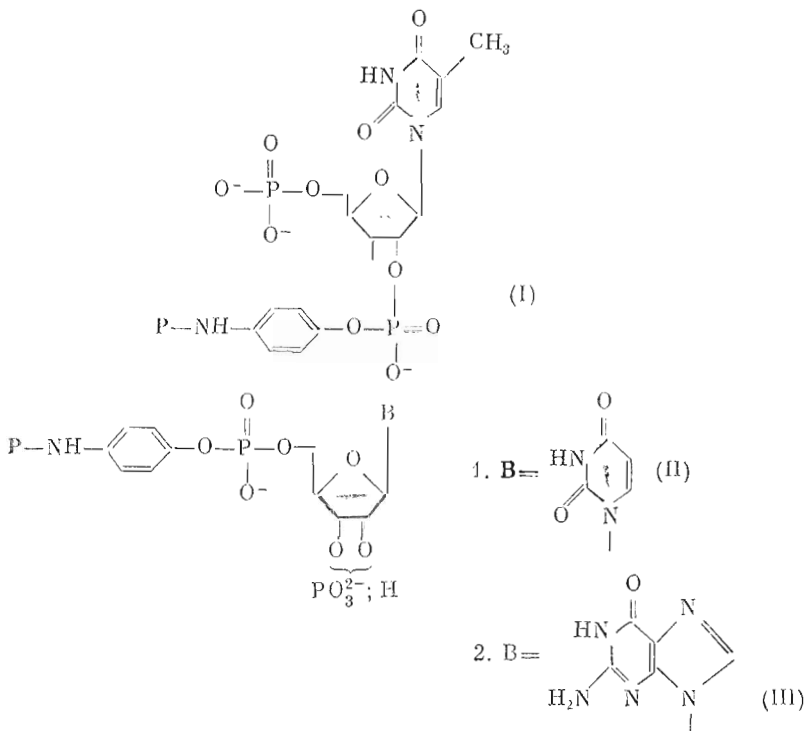
3. Лиганды

Биоспецифические сорбенты, применяемые для выделения и очистки нуклеаз, в качестве стационарного лиганда могут содержать нуклеотиды, олигонуклеотиды, нуклеиновые кислоты, а также соединения ненуклеотидной природы. Нуклеотидные стационарные лиганды можно разделить на три группы: лиганды, присоединенные через фосфатные группы; лиганды, присоединенные через рибозную часть молекулы; лиганды, присоединенные через гетероциклическое основание.

3.1. Биоспецифические сорбенты с нуклеотидными лигандами, присоединенными через фосфатные группы

Первая работа по использованию аффинной хроматографии стафилококковой нуклеазы была опубликована в 1968 г. [19]. Стафилококковая нуклеаза способна гидролизовать ДНК и РНК. Ее активность ингибируется тимидин-3',5'-дифосфатом (pdHp). Тимидин-3',5'-ди-*n*-нитрофенилфосфат для этого фермента является субстратом, в котором *n*-нитрофенилфосфат из 5'-положения отщепляется быстро, а из 3'-положения медленно. Присутствие свободной 5'-фосфатной группы увеличивает ингибирующую способность нуклеотида. Поэтому в качестве лиганда для биоспецифического сорбента был выбран 3'-(4-аминофенилфосфорил)-тимидин-5'-фосфат. Этот ингибитор имеет $K_i 10^{-6}$ М (константа диссоциации фермент-ингибиторного комплекса), его 3'-фосфодиэфирная связь не разрушается ферментом и устойчива в диапазоне pH 5–10; рК аминогруппы имеет низкое значение и аминогруппа относительно удалена от основной структурной единицы (pdTp), узнаваемой связывающим центром фермента. Получение сорбента достаточно трудоемко и включает синтез тимидин-3',5'-ди-*n*-нитрофенилфосфата с последующим отщеплением нитрофенола из 5'-положения с помощью фосфодиэстеразы змеиного яда. После восстановления нитрогруппы 3'-(4-аминофенилфосфорил)-тимидин-5'-фосфат присоединяли к BrCN-активированной сефарозе [20]. На колонке с таким сорбентом (I) (схема 1) адсорбировались образцы чистой и частично очищенной нуклеазы. Элюция нуклеазы происходила при промывке колонки буферами с $pH < 6$. Выход белка и активности $> 90\%$. Удобным элюентом оказался водный раствор уксусной кислоты с pH 3, так как в этом случае полученный раствор белка можно лиофилизировать. Такой же аффинный сорбент был использован для отделения модифицированной стафилококковой нуклеазы от исходного фермента [21], для отделения нуклеазы А от нуклеаз В-серии [22], для выделения полусинтетических аналогов стафилококковой нуклеазы Т и панкреатической РНКазы крупного рогатого скота, а также синтетических фрагментов РНКазы А [23].

При выделении панкреатической РНКазы крупного рогатого скота использовали биоспецифический сорбент (II) (схема 1), приготовленный химическим связыванием 5'-(4-аминофенилфосфорил)-уридин-2' (3')-фосфата с сефарозой [24]. Лиганд получали превращением уридин-2' (3'),5'-дифосфата в уридин-2' (3'),5'-ди-*n*-нитрофенилфосфат с последующим ферментативным отщеплением нитрофенола из 3'-положения и восстановлением нитрогруппы. Панкреатическая РНКаза А способна гидролизовать РНК и пиримидиновые нуклеозид-2',3'-циклофосфаты и конкурентно ингибируется цитидин-2'-монофосфатом, ортофосфатами и другими фосфатными



P — полимер.

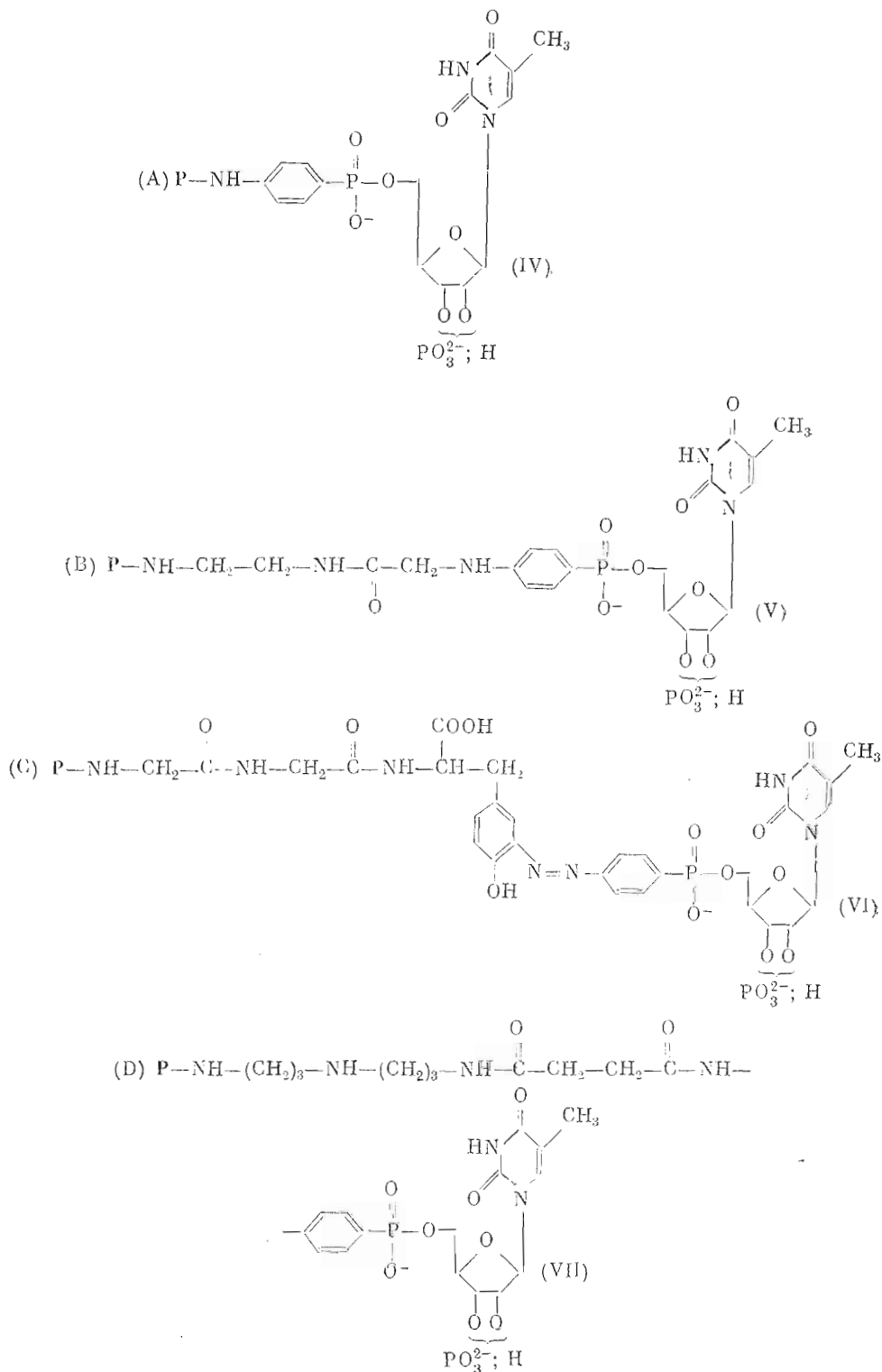
ми производными. Авторы отмечают, что эксперименты, в которых пытались ковалентно связать цитидин-2'-монофосфат с BrCN-активированной сефарозой, оказались безуспешными, вероятно, из-за слабых нуклеофильных свойств аминогруппы в четвертом положении цитозина в условиях реакции.

Исследование цитидин-2'(3'),5'-дифосфата и уридин-2'(3'),5'-дифосфата в качестве ингибиторов нуклеаз показало, что они имеют K_i 10^{-5} М. Наличие свободной 2'(3')-фосфатной группы усиливает ингибирующие свойства. 5'-Фосфат менее эффективен как ингибитор и может быть модифицирован без существенного уменьшения ингибирующей способности нуклеотида. Выбранный в качестве лиганда 5'-(4-аминофенилфосфорил)-уридин-2'(3')-фосфат имеет K_i $7 \cdot 10^{-5}$ М. 5'-Фосфодиэфирная связь не разрушается ферментом и устойчива в интервале pH 3—11. Этот ингибитор, будучи присоединен к BrCN-активированной сефарозе, проявляет высокое сродство к РНКазе. Наиболее сильное связывание наблюдалось при pH 5,2 в 0,02 М ацетатном буфере, тогда как в таких же условиях на незамещенной сефарозе РНКазе не адсорбировалась. Элюировали фермент 0,2 М уксусной кислотой. Выход белка и активности превышал 90%. Колонка с аффинным сорбентом, выпускаемым фирмой Miles Biochemicals (Англия), могла использоваться повторно без заметного ухудшения свойств.

Авторы установили, что полностью восстановленная, окисленная или инактивированная РНКазе не адсорбировалась на аффинной колонке, в то время как частично восстановленный (S—S-мостик в 65—72-м положении) и карбоксилированный, сохранивший активность фермент адсорбировался на колонке и затем легко элюировался 0,2 М уксусной кислотой.

Этот же биоспецифический сорбент использовали для выделения РНКазы А бизона [25]. Однако в данном случае элюировать нуклеазу с аффинной колонки 0,2 М уксусной кислотой не удалось, оставшийся на колонке фермент десорбировали 0,2 М уксусной кислотой с добавлением 0,2 М KCl. Проведенные в этой работе исследования подтвердили наличие неспецифических взаимодействий между сефарозой и белковыми молекулами. Природа этих взаимодействий в основном ионная. Замена ацетатного

Схема з



Емкость (мг нуклеазы/мл геля) агарозных и полиакриламидных сорбентов для стафилококковой нуклеазы: для агароз А, В, С, D — 2, 8, 8, 10 соответственно, для полиакриламидов А, В, С — 0,6; 2 и 3 соответственно

буфера на пиперазин-НСl с целью исключения неспецифических взаимодействий позволила десорбировать фермент полностью. Некоторое несоответствие между этими данными и результатами работы [19] авторы связы-

вают с увеличением более чем в 13 раз размеров колонки. Быстрой и полной десорбции РНКазы удавалось добиться при использовании 0,25 М фосфорной кислоты, рН которой доводили до 3 с помощью 1 М NaOH. Это обусловлено комбинацией эффектов низкого значения рН, высокой ионной силы и конкурентного связывания $H_2PO_4^-$ -иона. Такая же аффинная колонка оказалась полезной для отделения следовых количеств РНКаз из препаратов панкреатической ДНКазы I, которую использовали как биохимический реагент [26]. Этот же лиганд, присоединенный к агарозе, использовали для удаления примесей РНКаз из препаратов РНК-зависимой АТРазы [27] и для удаления примесей РНКаз из коммерческих препаратов ДНКаз [28]. На таком же биоспецифическом сорбенте в работах [29, 30] успешно осуществляли выделение, очистку и идентификацию синтетических аналогов РНКазы А, а в работе [31] этот сорбент применили для выделения панкреатической РНКазы человека, панкреатических РНКаз из тканей свиньи [32], жирафа [33], красного кенгуру [34], гипнопотама и ленивца [35]. Десорбция перечисленных ферментов осуществлялась добавлением 4 М NaCl в 0,23 М ацетатный буфер (рН 5,2) или линейным градиентом концентрации от 0,2 до 6 М NaCl. Такой же биоспецифический сорбент использовали для выделения щелочной эндонуклеазы [36] и уридинспецифической эндонуклеазы VI [37]. 5'-(4-Аминофенилфосфорил)-уридин-2'(3')-фосфат, присоединенный к частицам геля (агарозы или полиакриламида), активированными различными методами, использовали также и для аффинного электрофореза рибонуклеаз [38].

Для успешной очистки с помощью аффинной хроматографии лиганды должны быть достаточно удалены от носителя, с тем чтобы уменьшить стерические затруднения в процессе связывания. Для этого либо используют ингибитор с длинной углеводородной цепью, который затем присоединяют к носителю, либо к носителю присоединяют углеводородные вставки, а затем ингибитор. В работе [39] важность вставки была подтверждена следующим образом. Были синтезированы производные агарозы и полиакриламида, содержащие конкурентный ингибитор стафилококковой нуклеазы — рdTr-аминофенил, присоединенный к носителям различными путями. Хотя аффинный сорбент, содержащий лиганд, непосредственно присоединенный к носителю А (схема 2), достаточно эффективен в процессе выделения фермента из разбавленных растворов, емкость геля по белку повышается с удалением лиганда на некоторое расстояние от носителя. Однако степень удаления лиганда на расстояние, большее, чем в производном В (схема 2), не приводит к дальнейшему повышению емкости. Значение вставки увеличивается в случае лиганд-белкового взаимодействия при низком средстве.

Влияние длины вставки и разных способов присоединения ингибитора к носителю на связывание нуклеазы с аффинным сорбентом исследовалось на примере РНКазы листьев табака, специфичной к пуриновым основаниям, и ее ингибитора гуанозин-2'(3')-монофосфата [40]. Авторами были синтезированы три сорбента. Первый синтезировали присоединением к BrCN-активированной сефарозе 5'-(4-аминофенилфосфорил)-гуанозин-2'(3')-монофосфата (III) (схема 1). Для второго сорбента к сефарозе предварительно присоединяли вставку — аминоксепановую кислоту, а затем с помощью карбодимида — гуанозин-2'(3')-монофосфат. Третий сорбент получали присоединением гуанозин-2'(3')-монофосфата к BrCN-активированной сефарозе. В случае второго и третьего сорбентов присоединение лиганда, вероятно, происходило преимущественно через гетероциклическое основание. Первый и второй сорбенты активно связывали РНКазу листьев табака, а третий практически не связывал. Второй сорбент наряду со специфической адсорбцией проявлял и ионообменные свойства, обусловленные в основном карбоксильными группами носителя, не вступившими в реакцию с гуанозин-2'(3')-монофосфатом. Ионообменные свойства оказались возможным подавить, тщательно контролируя условия присоединения или защищая карбоксильные группы после реакции с лигандом. Помимо РНКазы сорбент проявлял сродство к фосфомоноэстеразе и фосфодиэстеразе при выделении РНКазы из неочищенного препарата. Однако оба этих

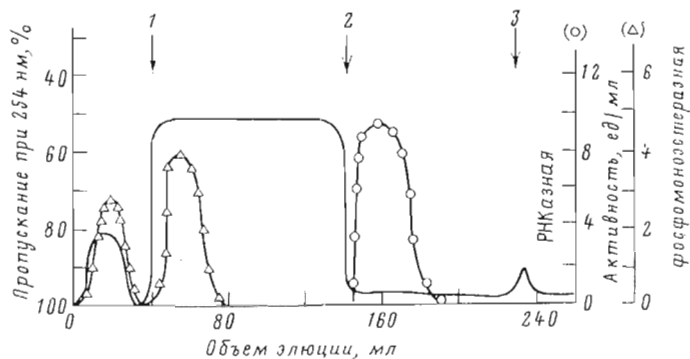


Рис. 1. Специфическая элюция фосфомоноэстеразы с аффинной колонки: 1 — 4-нитрофенилфосфат (1 мг/мл) в 20 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ -KCl, pH 5,4; 2 — 2'(3')-GMP (10^{-6} М) в 20 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ -KCl, pH 5,4; 3 — 0,2 М трис-HCl, pH 9,0

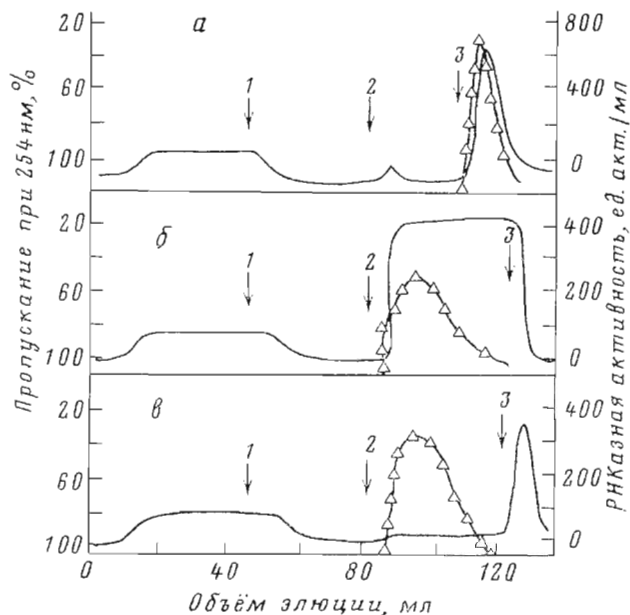
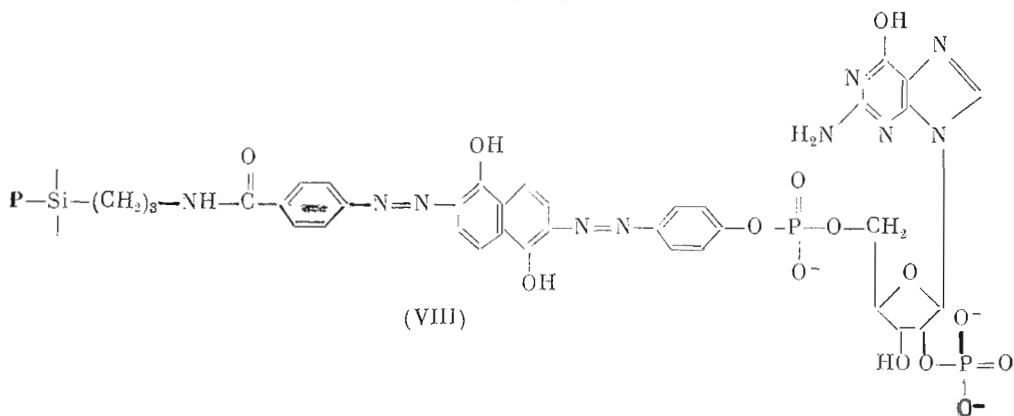


Рис. 2. Хроматография РНКазы T_1 на 5'-(4-аминофенилфосфорил)-гуанозин-2'(3')-монофосфате, иммобилизованном на пористом стекле. а — элюция РНКазы T_1 в повышенном pH: 1) 50 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 5,4; 2) 200 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$; 3) 200 мМ трис-HCl, pH 9,0. б — элюция РНКазы T_1 раствором РНК: 1) 50 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ -KCl, pH 5,4; 2) раствор РНК (5 мг/мл) в 50 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ -KCl, pH 5,4; 3) 200 мМ трис-HCl, pH 9,0. в — элюция РНКазы T_1 раствором 2'(3')-GMP: 1) 50 мМ KCl-ацетатный буфер, pH 5,4; 2) 10^{-6} М 2'(3')-GMP в 50 мМ KCl-ацетатном буфере, pH 5,4; 3) 200 мМ трис-HCl, pH 9,0

фермента селективно удаляли субстратной элюцией, оставляя связанной с сорбентом только РНКазу. Условия элюции фермента подробно описаны в работе [41]. Связанный фермент десорбировали при повышении pH до 9 (трис-HCl), а также при увеличении концентрации соли в элюенте до 150 мМ KCl. Понижение pH до 3 уксусной кислотой не дало положительного результата. Специфический характер взаимодействия РНКазы с сорбентом подтверждается элюцией 20 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ -KCl-буфером (pH 5,4), содержащим гуанозин-2'(3')-монофосфат. Уже при концентрации ингибитора 10^{-6} М в буфере элюируется вся РНКазы. Раствор РНК в исходном буфере (2 мг/мл) может также элюировать фермент. Даже при использовании частично очищенной РНКазы все методы элюции (рис. 1) давали РНКазу с примесью фосфомоноэстеразы, которая могла быть отделена предварительной промывкой колонки раствором 4-нитрофенилфосфата

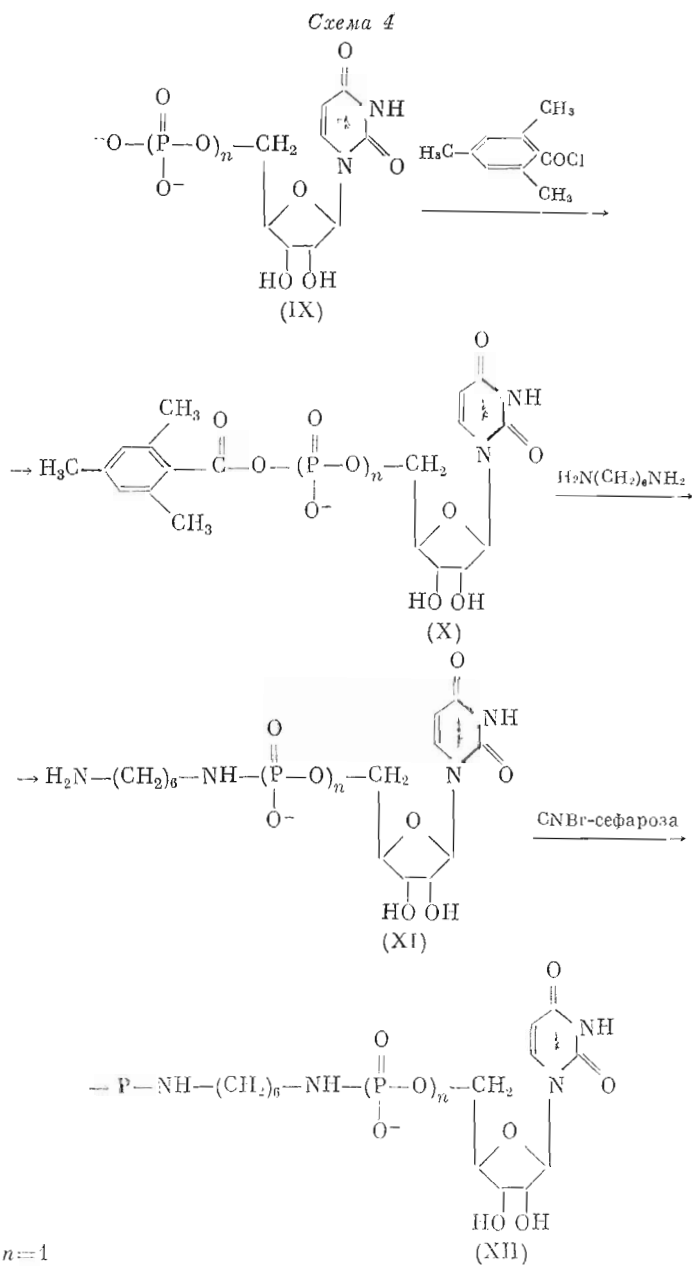


в исходном буфере. Емкость сорбента менялась от опыта к опыту, но колонки размером 0,8×10 см было достаточно для очистки РНКазы, экстрагируемой из 1 кг табачных листьев. Этот же сорбент использовали для очистки РНКазы из экстракта листьев гороха, а также для удаления РНКазных примесей из коммерческого препарата ингибитора трипсиона соевых бобов [41].

Колонки с агарозными гелями имеют ряд ограничений для использования их в большом масштабе. К тому же агароза подвергается микробному заражению и не регенерируется. При использовании аффинной хроматографии для препаративных целей удобнее работать с сорбентами на неорганической основе, отличающимися высокой механической прочностью и способностью длительное время сохранять постоянной скорость потока в колонке, а также устойчивыми к действию микробов. Носители в таких сорбентах, например на основе пористого стекла, после обработки концентрированной азотной кислотой могут повторно использоваться. В работе [42] в очистке РНКазы T₁ использовали сорбент, полученный в результате присоединения 5'-(4-аминофенилфосфорил)-гуанозин-2'(3')-монофосфата к 1,5-дигидрокси-нафталиновому производному стекла с диаметром пор 550 Å (схема 3). Сорбент содержал 3–8 мкмоль лиганда/г стекла. После предварительной очистки фракции, содержащей РНКазу T₁, наносили на аффинную колонку. Десорбция чистого фермента достигалась либо изменением pH (рис. 2 а), либо специфической элюцией субстратом (рис. 2 б) или ингибитором (рис. 2 в). Увеличение концентрации соли от 50 мМ до 1 М KCl положительного результата не дало. Наиболее эффективным оказался элюирующий буфер, содержащий 10⁻⁶ М 2'(3')-GMP, так как в этом случае не элюировались неспецифически связанные белки. Фермент после аффинной хроматографии оказался гомогенным по данным электрофореза в полиакриламидном геле. Сорбент на основе пористого стекла столь же эффективен, как и аналогичный сорбент на основе сефарозы. Небольшая потеря лиганда имела место при высоких значениях pH. Однако с этой проблемой сталкиваются и при использовании сорбентов на сефарозной основе. При pH 7 сорбент использовался в течение нескольких месяцев без ощутимой потери емкости. В высушенном виде такие сорбенты хранились в течение 2 лет и затем успешно использовались для очистки РНКазы T₁.

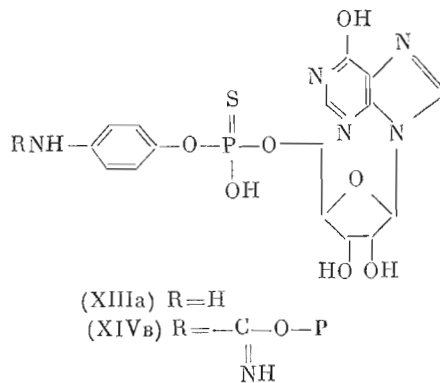
Известно присоединение к сефарозе UMP и UDP через фосфатную группу [43]. Сорбенты получали с использованием соответствующих нуклеотидов (IX), которые превращали в смешанные ангидриды (X) и затем в фосфамидные производные гексаметилендиамина (XI), которые иммобилизовали на BrCN-активированной сефарозе (схема 4). Описаны сорбенты с n=1, содержащие 4,8 мкмоль лиганда (XIIа), и с n=2, содержащие 5,2 мкмоль лиганда (XIIб) на 1 мл геля. Полученные сорбенты оказались устойчивыми в условиях аффинной хроматографии при pH 8,1–8,5 и при хранении в нейтральных растворах при пониженной температуре.

Схема 4



Как считают авторы, эти сорбенты могут оказаться полезными при выделении и исследовании ферментов, проявляющих сродство к уридиновым нуклеотидам. Однако лабильность фосфамидной связи ограничивает их использование. Известен также способ получения аффинных сорбентов с иммобилизацией 5'-ди- или -трифосфатов с помощью водорастворимого карбодимида с образованием также фосфамидной связи [44].

Интересный сорбент был использован в аффинной хроматографии гуаниловой РНКазы из *Streptomyces aureofaciens* [45] на основе тиопроизводного инозина, присоединенного к сефарозе. Лиганд (XIIIa) был приготовлен из 2',3'-О-изопропилденинозила реакцией с димпдазolidом O-4-нитрофенилового эфира тиофосфорной кислоты и с последующим гидролизом O-(4-нитрофенил)-инозин-5'-фосфоротиоата и восстановлением на палладиевом катализаторе (схема 5).



3.2. Биоспецифические сорбенты с нуклеотидными лигандами, присоединенными через рибозную часть молекулы

Присоединение лиганда к носителю через рибозный остаток молекулы возможно, если в нем есть вицинальные свободные гидроксильные группы, которые легко подвергаются окислению до альдегида. Окисленный лиганд можно присоединять к производным агарозы, имеющим свободную аминогруппу, с образованием шиффова основания, которое затем обычно восстанавливают NaBH_4 . Можно использовать и гидразидные производные агарозы. При этом за одну стадию получают достаточно стабильные продукты.

Оба метода нашли применение для синтеза биоспецифических сорбентов. Например, присоединением окисленного периодата 5'-АМР к гексаметилендиамин-агарозе был получен сорбент, использованный в очистке РНКазы L из *Aspergillus* sp. [46].

В другой работе [47] биоспецифические сорбенты были получены присоединением окисленных периодатом лигандов — АТР, АМР, аденина, СМР и цитидина к дигидразиду адипиновой кислоты, связанному с сефарозой. Емкости сорбентов по отношению к пиримидин-специфической РНКазе из семенной жидкости быка представлены в табл. 1. Пиримидин-специфическую РНКазу выделяли на АТР-сефарозе в виде гомогенного белка с выходом 74%.

Окисленный периодатом NADP^+ присоединяли к дигидразиду адипиновой кислоты, иммобилизованному на агарозе [48]. Связывание лиганда с носителем в данном случае может осуществляться только через рибозу, соединенную с никотинамидом (схема 6). Сорбент (XV) оказался эффективным для выделения внеклеточной пуклеазы табака, способной гидролизовать ДНК и РНК до 3'-нуклеотидов. Для десорбции фермента использовали неорганический пирофосфат и концентрированный раствор NaCl , добавляли в элюирующий буфер субстрат, продукт гидролиза или конкурентный ингибитор, а также изменяли pH от значений, при которых NADP сильно ингибирует (pH 5,5), до значений, при которых NADP ингибирует слабо (pH 7,6). Как оказалось, NADP -агароза способна связывать и некоторые другие пуклеазы. Результаты работы подтверждают возможность использования NADP -агарозы для очистки многих пуклеаз (табл. 2).

РНКазы А была очищена с помощью аффинной хроматографии на коммерчески доступном сорбенте, полученном в результате присоединения окисленного периодатом УТР к АН-сефарозе и выпускаемом фирмой P. L. Biochemicals, Milwaukee [49].

В работе [50] ДНКазы А и ДНКазы N из *Aspergillus niger* были очищены на 5'-GMP-сефарозе в 26 и 29 раз соответственно, после чего были исследованы некоторые их свойства.

Аффинную хроматографию гуанилспецифических РНКаз осуществляли на гуанилил-2',5'-гуанозине, присоединенном после окисления периодатом к АН-сефарозе (XVI) [51].

Сродство и емкость сефарозных гелей с разными лигандами по отношению к пиримидин-специфической РНКазе из семенной жидкости быка [48]

Лиганд	Ед. акт. фермента /мл геля	% от емкости АМР-сефарозы	Концентрация NaCl, необходимая для элюции 50% фермента
Дигидразид адипиновой кислоты	2,6	0,7	0,3
С	8	2,4	0,3
А	9,7	2,9	0,4
АМР	340	100	1,7
СМР	310	91	1,2
АТР	300	88	11,3

Таблица 2

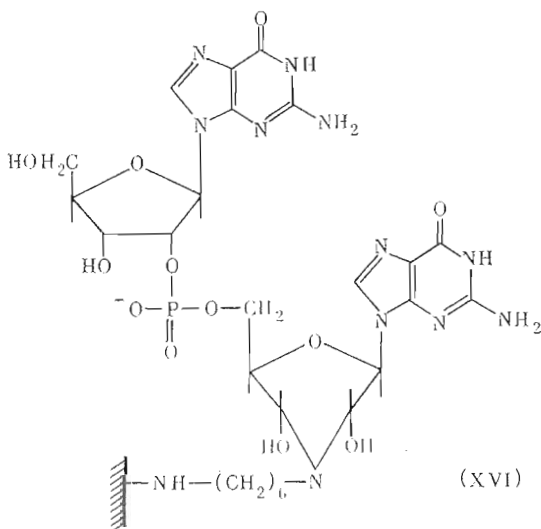
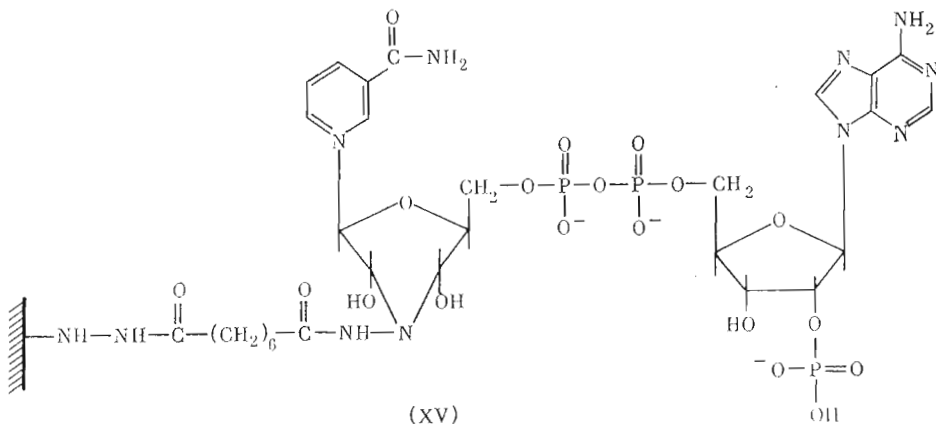
Сродство различных нуклеаз к NADP-агарозе [49]

Фермент	Буфер, использованный для адсорбции фермента на NADP-агарозе (рН)	Элюирующий буфер (рН)	Связывание, %
Внеклеточная нуклеаза табака	Ацетатный (5,5)	3'-АМР в ацетатном буфере (5,5)	96
Нуклеаза I золотистой фасоли	» (5,0)	То же (5,0)	57
Нуклеаза P ₁	» (5,5)	» (5,5)	98
Стафилококковая нуклеаза	Трис (8,8)	1 М NaCl в 0,1 М CH ₃ COOH	95
Эксонуклеаза змеиного яда	» (8,8)	1 М NaCl в трис-буфере (8,8)	96
<i>РНК-специфические нуклеазы</i>			
Панкреатическая Barley РНКазы I	Ацетатный (5,3)	0,2 М CH ₃ COOH	96
РНКазы T ₁	» (5,5)	0,01 М трис (7,6)	99
РНКазы T ₁	» (4,5)	3'-GMP в ацетатном буфере (4,5)	97
РНКазы T ₂	» (4,5)	3'-АМР в ацетатном буфере (4,5)	100
<i>ДНК-специфические нуклеазы</i>			
Панкреатическая	Трис (7,6)	—	0
<i>Другие</i>			
Неочищенный белок <i>E. coli</i>	Ацетатный (5,5)	1 М NaCl в ацетатном буфере (5,5)	10

Гуанил-РНКазы гидролизуют РНК по 3'-положению остатка гуаниловой кислоты. Все известные гуанил-РНКазы T₁ из *Aspergillus oryzae*, РНКазы N₁ из *Neurospora crassa*, РНКазы U₁ из *Ustilaga sphaerogena*, РНКазы St из *Streptomyces erythreus*, РНКазы F₁ из *Fusarium moniliforme* и РНКазы Ch из *Chalaropsis species* имеют близкие молекулярные веса (~11 000), но различаются изоэлектрическими точками (от 2,9 для кислоты T₁ до 7,5 для слабоосновной РНКазы Ch). Подробно изучалось связывание РНКазы T₁ с G-2'-pG-АН-сефарозой. Было показано, что элюция РНКазы T₁ ускоряется в присутствии 2'(3')- или 5'-GMP, которые являются конкурентными ингибиторами фермента.

Это наблюдение подтверждает биоспецифический характер взаимодействия между РНКазой T₁ и аффинным сорбентом. Гуанил-РНКазы одинаковой специфичности взаимодействуют с этим сорбентом по-разному. По-видимому, ферменты узнают иммобилизованный лиганд различными путями. Взаимодействия гуанил-РНКаз с аффинным сорбентом достаточно слабы, что позволяет десорбировать ферменты в мягких условиях. Например, РНКазы F₁ может быть элюирована при повышении рН от 5,0 до 7,5. Авторы [51] считают, что синтезированный ими сорбент может быть полезен для выделения и других РНКаз (рис. 3, 4).

Схема 6



Для аффинной хроматографии гуанил-РНКазы F_1 был использован сорбент, полученный присоединением окисленного периодатом 5'-GMP к АН-сефарозе [52]. Такой сорбент представляет собой часть структуры сорбента (XVI), но, как оказалось, проявляет значительно более сильное сродство к гуанил-РНКазам. Если для колонки с сорбентом (XVI) из-за его слабого сродства к ферментам использовали в качестве исходного материала препарат с 50% чистотой, полученный комбинацией других подходящих хроматографических методов, то для работы с рG-АН-сефарозой благодаря сильному сродству к ферментам можно использовать и менее очищенный препарат. Для десорбции ферментов использовали раствор конкурентного ингибитора 2'(3')-GMP. В результате проведения аффинной хроматографии была получена смесь РНКазы F_1 и F_2 , которую затем разделили с помощью ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой (рис. 5).

Этот же сорбент — 5'-GMP-АН-сефарозу использовали для выделения гуанил-РНКазы T_1 [53]. Фермент специфически связывался с сорбентом при pH 5 и элюировался при одновременном использовании NaCl (>1 M) и 1 mM 2'(3')-GMP (рис. 6). В результате проведенного исследования было обнаружено наличие в препарате и другой формы РНКазы T_1 . Эти же авторы в своей дальнейшей работе для очистки РНКазы T_2 использовали 5'-AMP, связанный с АН-сефарозой [54]. РНКазы T_2 классифицируется как неспецифическая рибонуклеаза, предпочтительно гидролизующая фосфодиэфирные связи между 3'-AMP и другими нуклеотидами в

Сродство и емкость сефарозных гелей с разными лигандами по отношению к пиримидин-специфической РНКазе из семенной жидкости быка [48]

Лиганд	Ед. акт. фермента/ /мл геля	% от емкости АМР-сефарозы	Концентрация NaCl, необходимая для элюции 50% фермента
Дигидразид адипиновой кислоты	2,6	0,7	0,3
С	8	2,4	0,3
А	9,7	2,9	0,4
АМР	340	100	1,7
СМР	310	91	1,2
АТР	300	88	11,3

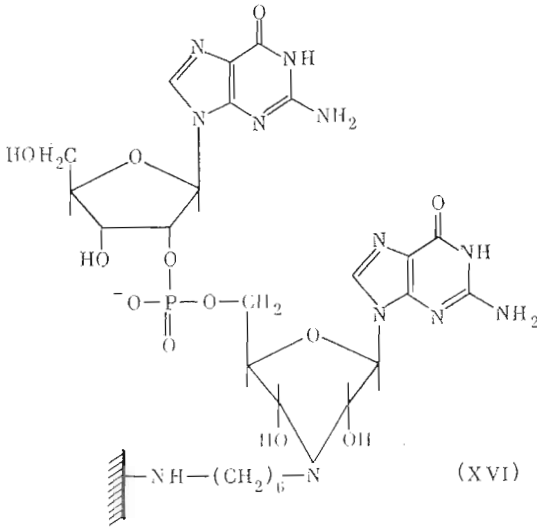
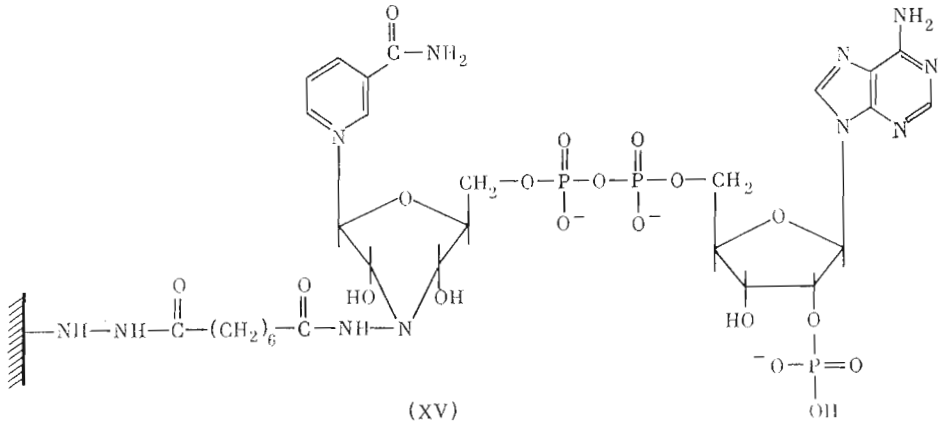
Таблица 2

Сродство различных нуклеаз к NADP-агарозе [49]

Фермент	Буфер, использованный для адсорбции фермента на NADP-агарозе (рН)	Элюирующий буфер (рН)	Связывание, %
Внеклеточная нуклеаза табака	Ацетатный (5,5)	3'-АМР в ацетатном буфере (5,5)	96
Нуклеаза I золотистой фасоли	» (5,0)	То же (5,0)	57
Нуклеаза Р ₁	» (5,5)	» (5,5)	98
Стафилококковая нуклеаза	Трис (8,8)	1 М NaCl в 0,1 М СН ₃ СООН	95
Экзонуклеаза змеяного яда	» (8,8)	1 М NaCl в трис-буфере (8,8)	96
<i>РНК-специфические нуклеазы</i>			
Панкреатическая Barley РНКазы I	Ацетатный (5,3)	0,2 М СН ₃ СООН	96
РНКазы Т ₁	» (5,5)	0,01 М трис (7,6)	99
РНКазы Т ₁	» (4,5)	3'-GMP в ацетатном буфере (4,5)	97
РНКазы Т ₂	» (4,5)	3'-АМР в ацетатном буфере (4,5)	100
<i>ДНК-специфические нуклеазы</i>			
Панкреатическая	Трис (7,6)	-	0
<i>Другие</i>			
Неочищенный белок <i>E. coli</i>	Ацетатный (5,5)	1 М NaCl в ацетатном буфере (5,5)	10

Гуанил-РНКазы гидролизуют РНК по 3'-положению остатка гуаниловой кислоты. Все известные гуанил-РНКазы Т₁ из *Aspergillus oryzae*, РНКазы N₁ из *Neurospora crassa*, РНКазы U₁ из *Ustilaga sphaerogena*, РНКазы St из *Streptomyces erythreus*, РНКазы F₁ из *Fusarium moniliforme* и РНКазы Ch из *Chaloropsis species* имеют близкие молекулярные веса (~11 000), но различаются изоэлектрическими точками (от 2,9 для кислоты Т₁ до 7,5 для слабоосновной РНКазы Ch). Подробно изучалось связывание РНКазы Т₁ с G-2'-pG-АИ-сефарозой. Было показано, что элюция РНКазы Т₁ ускоряется в присутствии 2'(3')- или 5'-GMP, которые являются конкурентными ингибиторами фермента.

Это наблюдение подтверждает биоспецифический характер взаимодействия между РНКазой Т₁ и аффинным сорбентом. Гуанил-РНКазы одинаковой специфичности взаимодействуют с этим сорбентом по-разному. По-видимому, ферменты узнают иммобилизованный лиганд различными путями. Взаимодействия гуанил-РНКаз с аффинным сорбентом достаточно слабы, что позволяет десорбировать ферменты в мягких условиях. Например, РНКазы F₁ может быть элюирована при повышении рН от 5,0 до 7,5. Авторы [51] считают, что синтезированный ими сорбент может быть полезен для выделения и других РНКаз (рис. 3, 4).



Для аффинной хроматографии гуанил-РНКазы F_1 был использован сорбент, полученный присоединением окисленного периодатом 5'-GMP к АН-сефарозе [52]. Такой сорбент представляет собой часть структуры сорбента (XVI), но, как оказалось, проявляет значительно более сильное сродство к гуанил-РНКазам. Если для колонки с сорбентом (XVI) из-за его слабого сродства к ферментам использовали в качестве исходного материала препарат с 50% чистотой, полученный комбинацией других подходящих хроматографических методов, то для работы с рG-АН-сефарозой благодаря сильному сродству к ферментам можно использовать и менее очищенный препарат. Для десорбции ферментов использовали раствор конкурентного ингибитора 2'(3')-GMP. В результате проведения аффинной хроматографии была получена смесь РНКазы F_1 и F_2 , которую затем разделили с помощью ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой (рис. 5).

Этот же сорбент — 5'-GMP-АН-сефарозу использовали для выделения гуанил-РНКазы T_1 [53]. Фермент специфически связывался с сорбентом при pH 5 и элюировался при одновременном использовании NaCl (>1 M) и 1 mM 2'(3')-GMP (рис. 6). В результате проведенного исследования было обнаружено наличие в препарате и другой формы РНКазы T_1 . Эти же авторы в своей дальнейшей работе для очистки РНКазы T_2 использовали 5'-AMP, связанный с АН-сефарозой [54]. РНКазы T_2 классифицируется как неспецифическая рибонуклеаза, предпочтительно гидролизующая фосфодиэфирные связи между 3'-AMP и другими нуклеотидами в

Рис. 3. Хроматография гуанил-РНКаза на G-2pG-АН-сефарозе. 1 - РНКаза St (1,4 мг), 2 - РНКаза T₁ (0,8 мг), 3 - РНКаза F₁ (10 000 ед.), 4 - РНКаза N₁ (1000 ед.). По 2 мл каждого белкового раствора в 0,05 М ацетатном буфере (рН 5,0) наносили на колонку (0,8 × 10 мл), уравновешенную тем же буфером

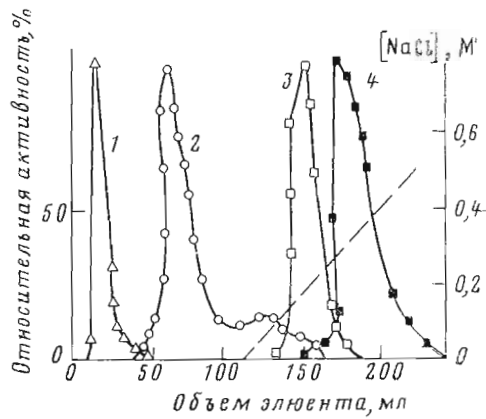


Рис. 3

Рис. 4. Хроматография РНКаза на G-2pG-АН-сефарозе. а - РНКаза А (1,6 мг), б - РНКаза T₂ (200 ед.); в - РНКаза U₂ (0,96 мг)

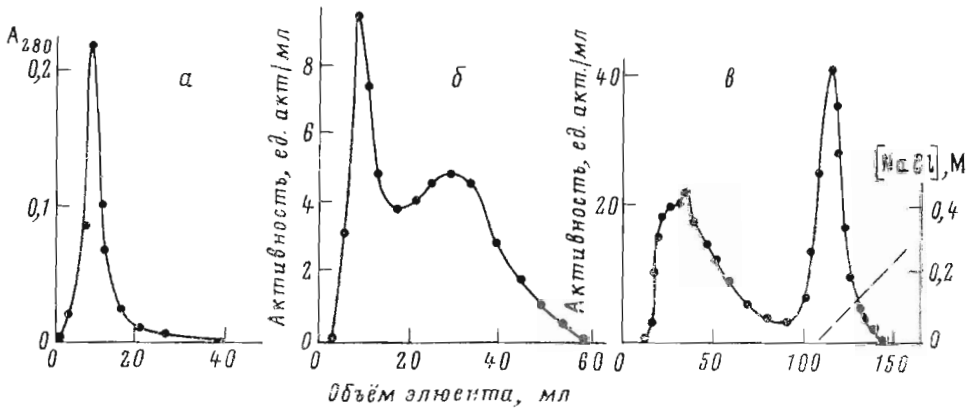


Рис. 4

молекуле РНК. Для РНКазы T₂ также была обнаружена другая форма фермента - РНКаза T₂-L с большей молекулярной массой.

Сорбент рG-АН-сефароза оказался эффективным и для выделения РНКазы U₂ [55]. РНКаза U₂ - пурипспецифическая РНКаза, выделенная из *Ustilago Sp. haerogena*. 5'-AMP был выбран в качестве подходящего лиганда, так как РНКаза U₂ имеет наибольшее сродство к адениловому остатку среди четырех нуклеотидов РНК и наибольшую степень связывания с 5'-производными среди адениловых изомеров. Поскольку чувствительность РНКазы U₂ к аденилату полностью теряется при замене аминогруппы в шестом положении аденина на объемный заместитель, присоединять лиганд через основание не имело смысла, а присоединение через рибозную часть молекулы позволяло сохранить способность лиганда связываться с ферментом. РНКаза U₂ специфически адсорбировалась при рН 4,5 и элюировалась при рН 5,9 в присутствии 1 М NaCl. Другая форма РНКазы U₂ с низкой специфичной активностью, названная РНКазой U₂-В, была десорбирована при небольшом повышении рН.

Для очистки синтетического полипептида с последовательностью РНКазы T₁ и ее аналога [Tyr⁵⁹]РНКазы T₁ была использована хроматография на ацетилированной фосфоцеллюлозе, содержащей 2'(3')-GMP [56]. Вероятно, в данном случае сорбент был получен присоединением GMP через положение 5' рибозного кольца к фосфату фосфоцеллюлозы. После уравновешивания колонки 0,02 М ацетатным буфером (рН 5,5) для элюции использовали 0,2 М трис-HCl (рН 7,5). На этой же колонке природная РНКаза T₁ (1,1 мг) разделялась на два фермента: белок первого (0,75 мг) имел такой же аминокислотный состав и нуклеазную активность, что и РНКаза T₁, а белок второго (0,07 мг) проявлял цуклеазную активность, но по аминокислотному составу отличался от РНКазы T₁.

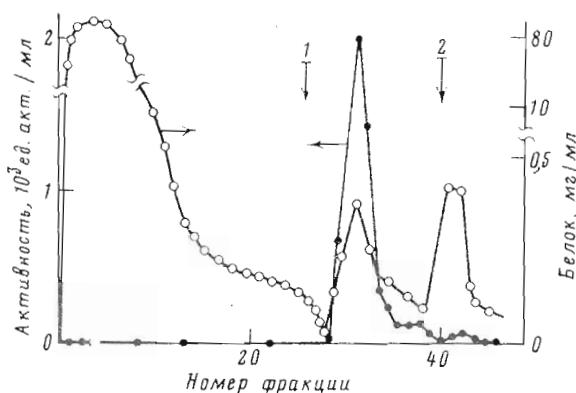


Рис. 5. Хроматография гуанил-РНКазы F_1 на pG-AH-сефарозе. Раствор гуанил-РНКазы F_1 содержал 1,41 г белка и 19 300 ед. акт. в 17,4 мл 0,05 М ацетатного буфера (рН 5,3), содержащего 0,2 М NaCl. Колонка размером $0,8 \times 4$ см. Фракции по 3,2 мл. Скорость элюции 30 мл/ч. 1 — 1 мМ 2'(3')-GMP в 0,05 М ацетатном буфере, 2 — 0,1 М натрий-боратный буфер (рН 9,0), содержащий 1 М NaCl

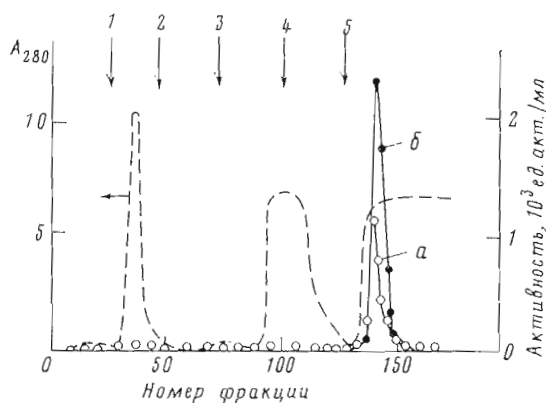
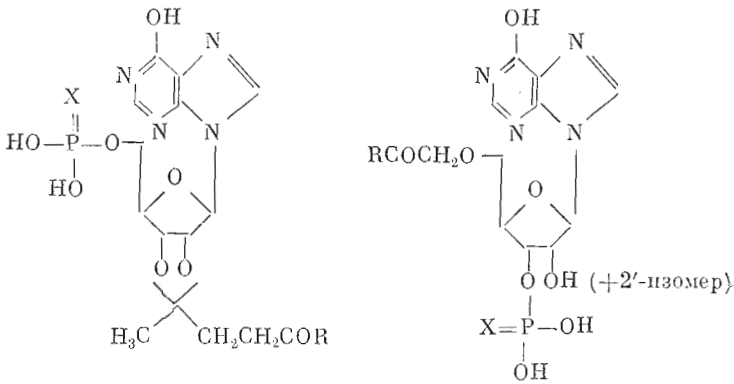


Рис. 6. Хроматография гуанил-РНКазы T_1 на pG-AH-сефарозе. Раствор фермента содержал 400 мг белка и 95 000 ед. акт. Колонка ($2,2 \times 8,5$ см) уравновешена 0,025 М ацетатным буфером (рН 5,3), в который последовательно добавляли: 1 — 1 М NaCl, 2 — 5 М NaCl, 3 — 5 М NaCl и 1 мМ 5'-GMP, 4 — 5 М NaCl, 5 — 5 М NaCl и 1 мМ 2'(3')-GMP. Фракции по 8 мл. Скорость элюции 12 мл/ч. а — активность при рН 4,5, б — при рН 7,5

В работе [57] авторами предложен ряд аффинных сорбентов для гуаниловой РНКазы из *Streptomyces aureofaciens*, полученных в результате присоединения производных инозина к сефарозе через рибозный остаток молекулы. Соединения (XVIIa) — (XXa) конденсировали с АН-сефарозой с использованием метода смешанных ангидридов с этилхлорформиатом. Авторами было также показано, что в этих условиях не происходит десульфирования Р=S-связи в фосфоротиоатах (схема 7). Производное (XXIв) связывается с эпокси- или BrCN-активированной сефарозой. Оптимум рН связывания фермента с сорбентами находится при нейтральных значениях рН. Контрольные эксперименты с незамещенной сефарозой показали отсутствие неспецифической сорбции. Емкость сорбента зависит от лиганда. Из полученных результатов следует, что фермент специфически связывается с лигандами, близкими по структуре к инозин-2'(3')-фосфотиоату (XXIв), а также инозин-5'-фосфотиоату (XVIII). У этих сорбентов емкости приблизительно равны, однако степени замещения различны.

Разработка пригодного для аффинной хроматографии сорбента проводилась на аналитическом уровне, но в условиях, моделирующих условия препаративной хроматографии. Наибольшая степень очистки (50–70 раз) была достигнута на сорбентах (XXв) и (XXIв). С точки зрения практического применения наиболее удобным авторы считают сорбент типа



(XVIIa) X=O, R=OH

(XIXa) X=O, R=OH

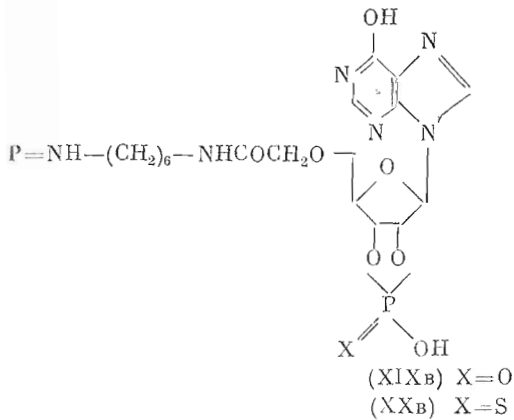
(XVIIb) X=O, R=NH(CH₂)₆NH-P

(XXa) X=S, R=OH

(XVIIa) X=S, R=OH

(XX1a) X=S, R=NH(CH₂)₆NH₂(XVIIb) X=S, R=NH(CH₂)₆NH-P(XX1b) X=S, R=NH(CH₂)₆NHCO-P

NH



(XIXb) X=O

(XXb) X=S

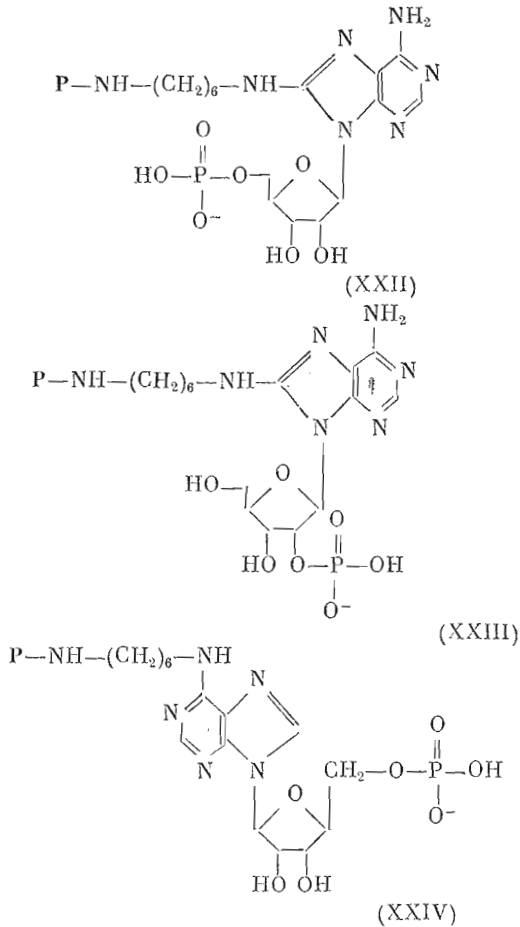
(XXIb). Вероятно, сорбенты с лигандами типа (XXIb) и (XXb) могут быть применены в аффинной хроматографии других гуанилспецифических РНКаз, способных связываться с производными инозина.

3.3. Биоспецифические сорбенты с нуклеотидными лигандами, присоединенными через гетероциклическое основание

В тех случаях, когда для связывания с нуклеазой важную роль играют фосфатные группы, целесообразно присоединять лиганд к носителю через гетероциклическое основание. Такой подход был использован для синтеза общего сорбента, содержащего в качестве лиганда 8-(6-аминогексил)-аденозин-5'-фосфат (XXII) для выделения нуклеолитических ферментов [58]. Смесь панкреатических РНКазы и ДНКазы I была отделена от α -химотрипсина с помощью хроматографии на этом сорбенте (XXII). Для разделения РНКазы и ДНКазы I авторы использовали хроматографию на 8-(6-аминогексил)-аденозин-2'-фосфат-сефарозе (XXIII). РНКазы удерживалась на колонке, а затем легко десорбировалась 0,1 М 2-(N-морфолино)-этансульфокислотным буфером. Авторы предлагают использовать сорбент (XXII) для отделения панкреатических РНКазы и ДНКазы I из коммерческих препаратов от примесей протеолитических ферментов. Сорбенты (XXII) и (XXIII) были получены присоединением соответствующих нуклеотидов к BrCN-активированной сефарозе, концентрация лигандов составляла 2 мкмоль/мл геля, причем с ферментом связывалось не более 0,1 мкмоль/мл сефарозы (схема 8).

Процесс очистки РНКазы L из *Aspergillus* sp. был осуществлен на коммерчески доступном сорбенте, содержащем 5'-АМР, который был иммобили-

Схема 8



лизован через шестое положение аденилового основания на сефарозе (XXIV) [59].

РНКаза из растительного сырья была очищена в 180 раз с выходом 17,6% на 5'-GMP, связанном с BrCN-активированной сефарозой [60]. В данном случае лиганд, по-видимому, также присоединяется через гетероциклическое основание.

В качестве лигандов для сорбентов, специфичных к РНКазам, описано использование N⁴-аминоалкильных производных цитидина [61]. Авторами были синтезированы два биоспецифических сорбента: присоединением N⁴-(7-аминогептил)-цитидин-2'(3')-монофосфата к BrCN-активированной агарозе (биогель А-15 М) в первом случае, к СН-сефарозе — во втором. Свойства полученных сорбентов сравнивались с коммерческим сорбентом — 5'-(4-аминофенилфосфорил)-уридин-2'(3')-фосфат-агарозой (Miles Yeda, Израиль). Количество связанного лиганда, определенного по содержанию фосфата, составило 2,5; 6,25; 2,1 мкмоль лиганда/мл геля для первого, второго и коммерческого сорбентов соответственно. Хотя концентрации лигандов различаются для трех сорбентов, емкость по РНКазе различается незначительно. В оптимальных условиях в 0,1 М ацетатном буфере (рН 5,2) все три сорбента связывали ~5 мг панкреатической РНКазы на 1 мл сорбента. Авторы отмечают, что более длинная вставка позволяет лиганду легче связываться и увеличивает его доступность. Однако наличие шести метиленовых звеньев должно создавать дополнительные гидрофобные взаимодействия.

В очистке А-, В-, С- и D-форм панкреатической РНКазы была использована аффинную хроматографию на N⁴-(6-аминогептил)-цитидин-2'(3')-монофосфате, присоединением к активированной СН-сефарозе (Pharmacia, Швеция) [62].

Сравнение биоспецифических сорбентов (XXVII) и (XXX) [64] Таблица 3

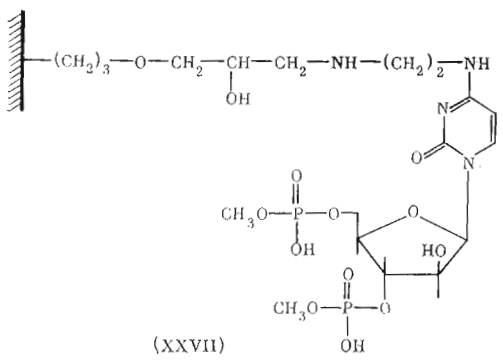
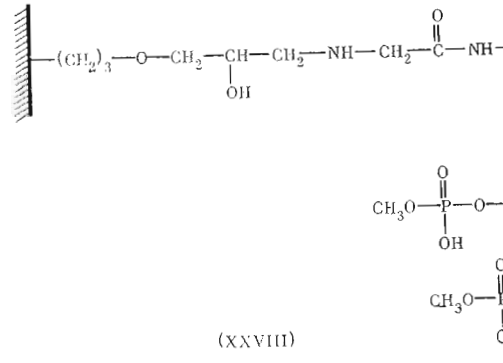
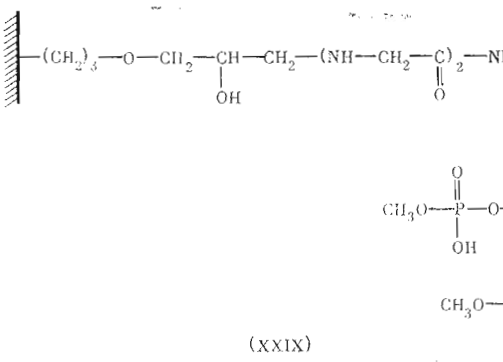
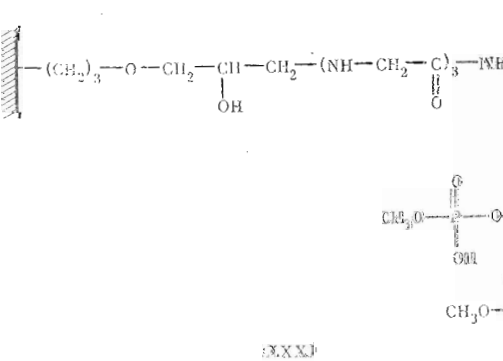
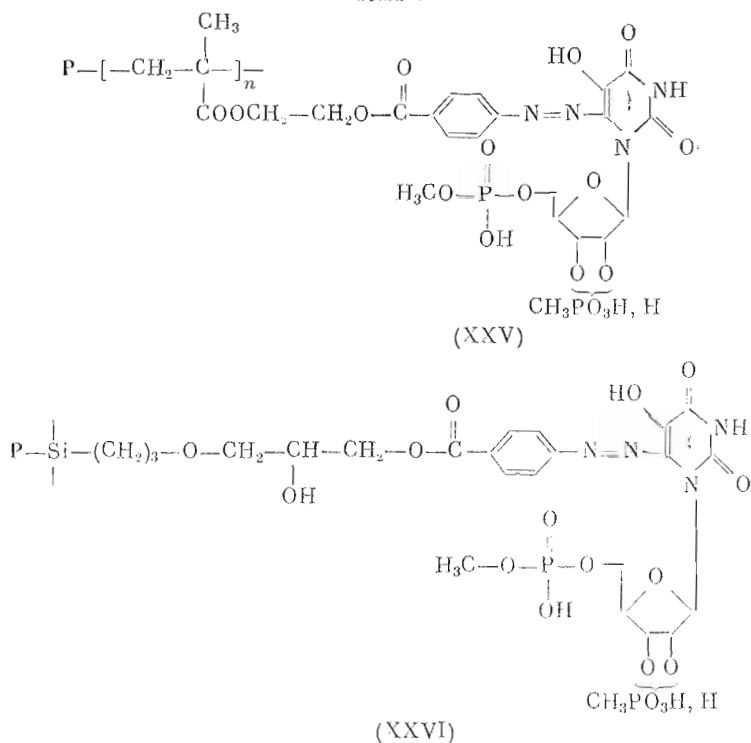
Сорбент	Концентрация лиганда, мкмоль/г	Емкость	
		по белку, мг/г	по нуклеазной активности, ед. акт./г
 <p>(XXVII)</p>	4,5	4,5	5100
 <p>(XXVIII)</p>	4,9	9,72	11 400
 <p>(XXIX)</p>	3,7	10,44	12 300
 <p>(XXX)</p>	4,5	9	5400

Схема 9



Синтез биоспецифических сорбентов на органокремнеземной основе, содержащих в качестве лиганда 5-оксиуридин-2'(3'),5'-дифосфат, описан в работе [63]. Сорбенты применяли для очистки экзонуклеазы А5. Для повышения устойчивости силохрома в водных растворах его обрабатывали солями алюминия, а для уменьшения неспецифической сорбции белков покрывали органическими полимерами. Использовали два органокремнеземных сорбента. Сорбент (XXV) был получен обработкой силохрома ($d_{\text{пор}}$ 1130 Å, $S_{\text{уд}}$ 34,1 м²/г, размер частиц 0,315–0,500 мм) 3-(2',3'-эпоксипропоксид)-пропилтриметоксисиланом. После раскрытия эпоксидного цикла аминоарильное производное получали с помощью хлорангидрида *n*-нитробензойной кислоты с последующим восстановлением нитрогруппы. Сорбент (XXVI) был получен присоединением к силохрому 3,5% полиэтиленгликольметакрилата с последующим превращением оксигрупп в аминоарильные группы (схема 9). 5-Оксиуридин-2'(3'),5'-дифосфат присоединяли к аминоарилсодержащим сорбентам с помощью реакции азосочетания. С целью предохранения нуклеотидных лигандов от действия фосфатазы, присутствующей в препарате, они были превращены в метиловые эфиры. Концентрация лигандов достигала 17,5 и 11,3 мкмоль/г сухого сорбента для сорбентов (XXV) и (XXVI) соответственно. Фермент был очищен в 74 раза.

Биоспецифические сорбенты на органокремнеземной основе, содержащие в качестве лигандов производные N⁴-(2-аминоэтил)-цитидин-2'(3'),5'-дифосфата, присоединенные к носителю через гетероциклическое основание, также использовались для очистки экзонуклеазы А5 [64]. Для выбора оптимального биоспецифического сорбента был синтезирован ряд сорбентов, имеющих вставки различной длины между носителем и лигандом. В качестве вставок использовали глицин, диглицин и триглицин. Хроматографию проводили на сорбенте (XXIX) (табл. 3).

Для получения фосфодиэстеразы змеиного яда, полностью свободной от 5'-нуклеотидазы, был разработан простой метод [65], включающий в себя хроматографию на иммобилизованном NAD⁺, присоединенном к АН-сефарозе через шестое положение аденилового основания. При использовании NAD⁺-сефарозы фосфодиэстераза не задерживалась на колонке, в то

время как 5'-нуклеотидаза сильно адсорбировалась. Ее десорбировали 0,2 М бикарбонатом натрия, содержащим 1 мМ β -NADH. Аффинная колонка могла быть использована по крайней мере 4 раза без заметного ухудшения своих свойств. Описанный метод оказался применим для приготовления фосфодиэстераз из ядов гремучей змеи (*Grotalus adamanteus*) и *Japanesa tamushi* (*Agkistrodon halys blomhoffi*). Другие ферменты из ядов *A. contortrix mokasen* и *B. atroz* полностью очистить от 5'-нуклеотидазы этим методом не удалось.

При выделении нуклеазы TT1 из *Thermus thermophilus* HB8, представляющей собой фермент, обладающий как эндо-, так и экзонуклеазной активностью, на последней стадии очистки была применена аффинная хроматография на коммерчески доступном сорбенте, полученном иммобилизацией N^6 -(6-аминогексил)-аденозин-2',5'-дифосфата на BrCN-активированной сефарозе (Pharmacia, Швеция) [66].

РНКаза из плазмы человека, предпочитительно гидролизующая межнуклеотидные связи, содержащие цитидиловую кислоту, была очищена в 2700 раз на poly(G)-сефарозе [67]. На этом же сорбенте была выделена из *Citrobacter* и очищена в 1500 раз термостабильная РНКаза, катализирующая превращение полиуридиловой кислоты в циклическую 2',3'-уридилловую кислоту, но не гидролизующая poly(C)-, poly(G)- и poly(A)-кислоты [68]. На этом же сорбенте выделяли РНКазу из мочи человека, РНКазу С, которая предпочитительно гидролизует синтетический гоморибополимер poly(C) [69]. Две РНКазы из ячменных семян (I и II) были очищены до гомогенного состояния с помощью аффинной хроматографии также на poly(G)-сефарозе [70]. Poly(G) не гидролизуется РНКазой I и II и, как было показано, является сильным ингибитором активности этих ферментов. Эти нуклеазы по своему действию относятся к эндонуклеазам. РНКаза, в результате действия которой образуется 2',3'-циклические пиримидиновые нуклеотиды в качестве конечных продуктов, должна быть классифицирована как РНКаза I, а вторая РНКаза, способная гидролизовать 2',3'-циклические пиримидиновые нуклеотиды, как РНКаза II. Для приготовления сорбента использовали BrCN-активированную сефарозу. В данном случае, вероятно, имеет место многоточечное присоединение полинуклеотида через функциональные группы оснований [70]. Аналогично присоединяют и молекулы ДНК к BrCN-активированной сефарозе. На иммобилизованной одионитовой ДНК тимуса теленка была проведена хроматография панкреатической ДНКазы быка и ДНКазы селезенки свиньи в различных экспериментальных условиях [71]. В работе [72] авторы проводили хроматографию ДНК-специфичных ферментов на однонитевой ДНК-агарозе. Среди выделенных на такой колонке ферментов была и экзонуклеаза III. Такой же сорбент использовали для выделения РНКазы II, III и *H. E. coli*, которые затем разделяли хроматографией на оксидантите и DEAE-целлюлозе [73].

Использование цианурхлорида для иммобилизации нуклеиновых кислот изучалось в работе [74]. Активированные цианурхлоридом сефадексы G-75 и G-100 связывают максимальное количество нуклеиновых кислот. При этом отмечалась наиболее высокая способность к взаимодействию с ферментами нуклеинового обмена — ДНКазой I и нуклеазой *S. marcescens*. Как показали исследования, увеличение содержания иммобилизованной ДНК в полученных препаратах находится в прямой зависимости от длины вставки. При использовании цианурхлорида без вставки связывание ДНК с сефадексом осуществляется вдоль цепи молекулы ДНК.

С помощью хроматографии на ДНК-целлюлозе был выделен фермент с эндонуклеолитической активностью из клеток молочной железы [75]. В данном случае связывание эндонуклеолитической активности имело место только тогда, когда ДНК была модифицирована облучением или алкилированием. Вероятно, специфичность фермента состоит в способности узнавать конформационные изменения, вызванные изменением в первичной или вторичной структуре ДНК. ДНК-целлюлозная колошка может быть использована многократно.

Неочищенный экстракт *E. coli* содержит по крайней мере две эндонук-

Сродство различных нуклеаз к ДНК-сефарозе [72]

Нуклеазы	Буфер для адсорбции фермента на ДНК-сефарозе	Сохранение фермента, %		Расщепление связанной ДНК
		Не адсорб.	Элюиров.	
ДНКазы II	0,05 М $\text{CH}_3\text{COONa} - \text{HCl}$ (рН 3,0) + 50 мМ Na_2SO_4	0	90	Не определяемо
	0,05 М трис- HCl (рН 7,0) + 50 мМ Na_2SO_4	95	0	»
Микрококковая	0,05 М $\text{CH}_3\text{COONa} - \text{HCl}$ (рН 4,0)	0	89	»
Нуклеаза S_1	0,05 М трис- HCl (рН 7,0)	0	91	»
	0,05 М $\text{CH}_3\text{COONa} - \text{HCl}$ (рН 3,5)	30	53	Существенное
Нуклеаза P_1	0,05 М трис- HCl (рН 7,0)	0	82	Не определяемо
	0,05 М $\text{CH}_3\text{COONa} - \text{HCl}$ (рН 4,0)	49	7	Существенное
Эндонуклеазы рестрикции <i>EcoRI</i> , <i>BamIII</i> и <i>HindIII</i>	0,05 М трис- HCl (рН 7,0)	0	76	Не определяемо
	0,05 М $\text{CH}_3\text{COONa} - \text{HCl}$ (рН 4,0) + 20% глицерина + 0,1% неопентона	0	70	»
	0,05 М трис- HCl (рН 7,0) + 20% глицерина + 0,1% неопентона	0	80	Слабое

леазы, способные специфически взаимодействовать с УФ-облученной ДНК. В очистке *contendonuclease II E. coli*, обладающей двумя эндонуклеазными активностями, использовалась хроматография на ДНК-целлюлозе [76].

ДНКазы I из поджелудочной железы свиньи, гидролизующая как одонитевую, так и двуниевую ДНК, как свободную, так и связанную с сефарозой в присутствии Mg^{2+} , эффективно адсорбировалась на ДНК-сефарозе в отсутствие Mg^{2+} [77]. Адсорбированный фермент мог быть эффективно элюирован буфером, содержащим 1 М KCl . В результате этой простой операции ДНКазы I была очищена в 300 раз с выходом 95%. Для приготовления сорбентов с одонитевой и двуниевой ДНК использовали BtCN -активированную сефарозу. Изучалось также сродство нуклеаз к ДНК-сефарозе в условиях, при которых ДНК не гидролизуется [78]. Все семь исследуемых нуклеаз наносили на колонку с двуниевой ДНК, иммобилизованной на сефарозе в условиях, исключающих гидролиз ДНК. Все адсорбированные нуклеазы были сняты с колонки в градиенте концентрации KCl без изменения рН (табл. 4). Активность нанесенного фермента была принята за 100%. Деграцию двуниевой ДНК определяли по увеличению поглощения при 260 нм в элюате. Иммобилизацию двуниевой ДНК проводили путем инкубации BtCN -активированной сефарозы с ДНК в присутствии 10 мМ фосфата калия (рН 8,0). Предполагалось, что ДНК-сефароза может действовать как ионообменник за счет не связанных с сефарозой фосфатных групп. Очевидно, что адсорбция ДНКазы II, микрококковой нуклеазы и эндонуклеаз рестрикции в данном случае была обусловлена полным обменом. Однако сродство микрококковой нуклеазы и эндонуклеаз рестрикции к ДНК-сефарозе было значительно выше, чем сродство к этому сорбенту ДНКазы. Это свидетельствует о наличии и специфического сродства к субстрату. При рН 7,0 нуклеазы S_1 и P_1 были адсорбированы, несмотря на то что они имеют отрицательный заряд, как и ДНК. Наиболее вероятно, что они адсорбировались вследствие специфического сродства к субстрату.

В очистке РНКазы II также использовали аффинную хроматографию на ДНК-агарозе [79].

3.4. Биоспецифические сорбенты с лигандами нуклеотидной природы

Как известно, ряд нуклеаз представляют собой гликопротеины, для которых существуют удобные схемы очистки, основанные на их сродстве к лектинам. Лектины — группа белков, обладающих способностью специфически обратимо связываться с остатками сахаров. Эта специфичность позволяет им связывать полисахариды и гликопротеины. К лектинам относится широко применяемый в аффинной хроматографии конканавалин А (Con.A), связывающий молекулы, содержащие α -D-маннопиранозил-, α -D-глюкопиранозил- и стерически родственные остатки. Для присоединения Con.A к сефарозе обычно используют бромциановый метод.

Con.A-сефароза применялась для очистки экзонуклеазы — фосфодиэстеразы змеиного яда *Crotalus Adamanteus* [80]. Фосфодиэстераза змеиного яда была очищена в 350 раз с выходом 35%, при этом фермент в значительной степени освободился от 5'-нуклеотидазы, неспецифической фосфатазы и эндонуклеаз. При хроматографии фосфодиэстеразы селезенки теленка на Con.A-сефарозе были удалены рибоцуклеазы, обнаруженные в препарате [81]. Метод может быть использован для отделения эндонуклеазных примесей из коммерческих препаратов фосфодиэстеразы селезенки. В работе [82] было установлено, что фосфодиэстераза, выделенная из суспензии культуры клеток табака, обнаруживает высокое сродство к Con.A-сефарозе и является гликопротеином. Фермент наносили на колонку с Con.A-сефарозой в 10 мМ трис-HCl-буфере (pH 7,5), а десорбировали в линейном градиенте концентрации от 0 до 1 М метил- α -D-маннопиранозида в этом же буфере.

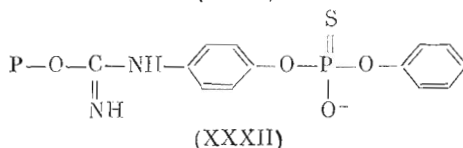
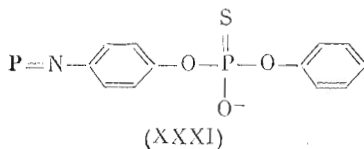
Фосфодиэстераза — фосфомоноэстераза из *Fusarium moniliforme*, уникальный фермент, гидролизующий как фосфодиэфиры, так и моноэфиры, был очищен на колонке с Con.A-сефарозой [83]. При изоэлектрофокусировании полученного фермента были обнаружены четыре изофермента.

В схему очистки ДНКазы I эпидермиса морской свинки была включена стадия аффинной хроматографии на Con.A-сефарозе [84]. Очищенный фермент не содержал кислой ДНКазы, щелочной РНКазы, фосфодиэстеразы, а также кислой или щелочной фосфатазы, но содержал кислую РНКазу. Метод очистки энзоцуклеазы селезенки, описанный в работе [85], также включает в себя стадию аффинной хроматографии на Con.A-сефарозе. Полученный фермент оказался практически свободным от примесей эндонуклеаз и фосфомоноэстераз.

Хроматография на Con.A-агарозе была использована в разделении панкреатических РНКаз быка [62]. Было установлено, что в соке поджелудочной железы содержится 94% РНКазы А, 5% РНКазы В, 0,7% РНКазы С, 0,5% РНКазы D. После хроматографии на СМ-целлюлозе были получены фракции, соответствующие РНКазам В с примесью А и С+D. Поскольку РНКазы А не содержат сахаров, она не задерживается на Con.A-агарозе и, таким образом, может быть отделена. РНКазы В удерживались на колонке и элюировались раствором 10% метил- α -D-глюкопиранозида. Для разделения РНКазы С и D применяли хроматографию на СМ-целлюлозе в градиенте от 0,02 до 0,075 М NaCl в трис-HCl (pH 7,0), в дальнейшем для очистки РНКазы С использовали колонку с Con.A-агарозой.

К биоспецифическим сорбентам с лигандом нуклеотидной природы следует отнести сорбент с иммобилизованным O-(4-нитрофенил)-O'-фенилтиофосфатом (XXXI) — ингибитором фосфодиэстеразы змеиного яда из *Botrops atrox* [86, 87]. Ингибитор имеет $K_i 10^{-3}$ М. Попытка получить чистый фермент из неочищенного яда за одну стадию на аффинной колонке оказалась безуспешной. Фактор очистки был равен 30. Невысокая степень очистки связана с неспецифическим связыванием основных белков яда с анионным заместителем сефарозы. Использование хроматографии на фосфоцеллюлозе перед аффинной колонкой позволило увеличить степень очистки до 200. Полученный фермент содержал очень незначительные следы других белков. Для удаления фосфатазы авторы использовали хроматографию на оксиапатите. Этим же методом пытались очистить фосфодиэстеразу из яда *Crotalus Adamanteus*. Аффинная хроматография в одну

Схема 10



стадию дала фактор очистки 5. Комбинация же хроматографии на фосфоцеллюлозе и на аффинной колонке позволила увеличить его до 100, но полученный препарат не был гомогенным. Близкий по строению сорбент (XXXII) испытывался в аффинной хроматографии гуанилрибонуклеазы из *Streptomyces aurefaciens* [57] (схема 10).

Две рибосомные нуклеазы после предварительной стадии очистки были выделены аффинной хроматографией на гепарин-сефарозе [88]. Гепарин содержит в среднем пять сульфогрупп на четыре моносахаридных звена. Структурной единицей самого полисахарида является 4-О- α -D-глюкопиранозил-2-амино-2-дезоксиглюкопираноза. Молекула гепарина содержит цепь, состоящую из ~50 остатков этого дисахарида, соединенных α -(1 \rightarrow 4)-гликозидными связями.

Рибонуклеазная активность в дрожжевых рибосомах обусловлена двумя различными ферментами: 5'-РНКазой и 3'-РНКазой. Оба фермента проявляют сродство к гепарин-сефарозе. Для элюции 5'-РНКазы использовали 0,2 М КСl, а 3'-РНКазу десорбировали 1,0 М КСl.

Аффинной хроматографией на текспламин-сефарозе была очищена в 880 раз эндонуклеаза из яда *Chrysaora quinquecirrha* [89].

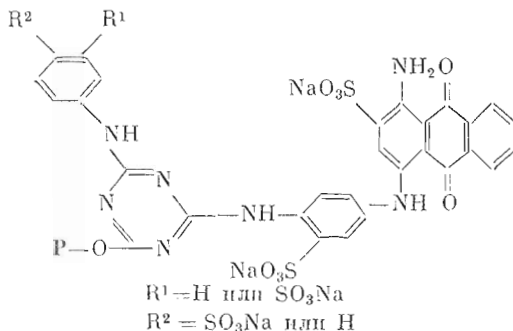
В качестве аффинных сорбентов для очистки фосфодиэстеразы змеиного яда описано применение голубой сефарозы, или голубого декстрана, иммобилизованного на сефарозе [90] (схема 11). Голубая сефароза содержит краситель цибакрол голубой F3G-A. В последнее время аффинная хроматография на голубой сефарозе была применена для очистки различных ферментов, которые взаимодействуют с NAD и другими нуклеотидами. Сродство ферментов к красителю является следствием структурного подобия между хромофором красителя и NAD. Цибакрол голубой, иммобилизованный на агарозе, использовали в очистке РНКазы I из *E. coli* [91].

4. Применение аффинной хроматографии для количественной оценки специфического связывания нуклеаз с лигандами

Метод аффинной хроматографии использовали для определения констант связывания нуклеаз с иммобилизованным и растворенным конкурентным ингибитором. Например, уравнения, предложенные в работе [92], позволили количественно определить связывание стафилококковой нуклеазы с 3'-(4'-аминофенилфосфорил)-тимидин-5'-фосфат-сефарозой в конкуренции с тимидин-3',5'-дифосфатом.

$$V = V_0 + \frac{(V_0 - V_m)([I-M]/K_{I-M})}{1 + [I]/K_I}$$

где [I] — концентрация растворенного лиганда; [I-M] — концентрация иммобилизованного лиганда; V — объем элюирования нуклеазы; V_m — свободный объем, определяемый по голубому декстрану; V₀ — объем элюирования нуклеазы при отсутствии взаимодействия с носителем; K_I — константа диссоциации комплекса фермента с лигандом в растворе; K_{I-M} — константа диссоциации комплекса фермента с иммобилизованным лигандом.



Преобразование уравнения

$$\frac{1}{V - V_0} = \frac{K_{1-M}}{(V_0 - V_m)[1 - M]} + \frac{K_{I-M}[I]}{K_I(V_0 - V_m)[1 - M]}$$

позволяет по данным объемов элюирования построить зависимость $1/(V - V_0)$ от $[I]$. Она представляет собой прямую, тангенс угла наклона которой дает возможность вычислить K_I , а величина отсекаемого на оси ординат отрезка и независимо определенные параметры V_0 и V_m позволяют вычислить K_{I-M} . Дальнейшие исследования, проведенные на этой же модели, показали близкое соответствие между значениями констант диссоциации комплекса нуклеазы с присоединенным к носителю и растворенным 3'-(4-аминофенилфосфорил)-тимидин-5'-фосфатом, т. е. показали, что взаимодействие фермента с лигандом, присоединенным к носителю, — процесс, достаточно близкий процессу, имеющему место в растворе [93].

Аффинная хроматография с использованием 5'-(4-аминофенилфосфорил)-уридин-2' (3')-фосфата была использована для количественной оценки связывания образцов РНКаз с нуклеотидными лигандами [94]. Элюция образцов нативных РНКаз А и S с аффинного сорбента осуществлялась 0,4 М ацетатом аммония (рН 5,2), содержащим различные количества растворенного конкурентного ингибитора — 2'-СМР. Определяли изменение объема элюирования в зависимости от концентрации растворенного 2'-СМР. Анализ полученных результатов позволил подсчитать константы ингибирования для растворенного и иммобилизованного лиганда. Значения хроматографически полученных констант оказались близкими значениям, полученным в растворе из кинетики ингибирования цитидин-2'-монофосфата и 5'-(4-аминофенилфосфорил)-уридин-2' (3')-фосфата.

Константы диссоциации белково-лигандных комплексов были определены для РНКазы S и ее полусинтетического аналога. Эта же хроматографическая система позволила определить характеристики центра связывания с лигандом у ферментативно неактивного полусинтетического аналога РНКазы S' [95].

Таким образом, аффинная хроматография нуклеаз не только позволяет решать сложные задачи, связанные с выделением и очисткой ферментов, но и помогает изучать механизм их действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шанор В. С. Нуклеазы. М.: Медицина, 1968.
2. Туркова Я. Аффинная хроматография. М.: Мир, 1980.
3. Черкасов И. А. Успехи химии, 1972, т. 41, вып. 10, с. 1911–1934.
4. Weetall H. H. Separat. Purif. Methods, 1973, v. 2, № 2, p. 199–229.
5. Кляшницкий Б. А., Шанор В. С. Успехи биол. химии, 1976, т. 17, № 2, с. 234–267.
6. Theory and practice in affinity techniques/Eds Sundaram P. V., Eckstein F. London: Acad. Press, 1978.
7. Affinity chromatography/Eds Hoffmann-Ostenhof O. Oxford: Pergamon Press, 1978.
8. Chromatography of synthetic and biological polymers/Ed. Epton R. Chichester: The Chemical Society Macromolecular Group by Ellis Horwood, 1978, v. 2, part 3, p. 131–134.
9. Porath J. J. Chromatogr., 1981, v. 218, № 20, p. 241–259.

10. Affinity chromatography and related techniques/Ed. Gribnau T.C.J. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ. Co, 1982.
11. Lowe C. R. In: Laboratory techniques in biochemistry and molekular biology/Eds Work T. S., Work E. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biochemical Press, 1979, v. 7, part 2, p. 269-501.
12. Yoshida H. T. Kakusan Koso, 1980, v. 22, № 1, p. 52-56.
13. Affinity chromatography, principles and methods. Uppsala: Pharmacia Fine Chemicals, 1974.
14. Sepharose-CL for gel filtration and affinity chromatography. Uppsala: Pharmacia Fine Chemicals, 1975.
15. Дегерман Г. Гель-хроматография. М.: Мир, 1970.
16. Евстратова Н. Г., Василенко И. А., Кондрагьева Н. Ю., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П., Варламов В. П., Семенова Н. Н., Рогожин С. В. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1355-1360.
17. Евстратова Н. Г., Мирошников А. И., Айнян А. Е., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Биохимия, 1982, т. 47, вып. 9, с. 1547-1551.
18. Лозинский В. И., Рогожин С. В. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1981, № 8, с. 1879-1884.
19. Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, v. 61, № 2, p. 636-643.
20. Wilchek M., Gorecki M. In: Methods in enzymol./Eds Jakoby W. B., Wilchek M. N.Y.: Acad. Press, 1974, v. 34, part B, p. 492-496.
21. Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 16, p. 4316-4329.
22. Dawis A., Moore I. B., Parker D. S., Tanuichi H. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 18, p. 6544-6553.
23. Chaiken I. M. In: Methods in enzymol./Eds Jakoby W. B., Wilchek M. N.Y.: Acad. Press, 1974, v. 34, part B, p. 631-638.
24. Wilchek M., Gorecki M. Eur. J. Biochem., 1969, v. 11, № 3, p. 491-494.
25. Stewart G. R., Stevenson K. J. Biochem. J., 1973, v. 135, № 3, p. 427-441.
26. Wang D., Moore S. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 20, p. 7216-7219.
27. Belhadj O., Sentenac A., Fromageat P. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 24, p. 11704-11709.
28. Brison O., Chambon P. Anal. Biochem., 1976, v. 75, № 2, p. 402-409.
29. Gutte B. Biochem. Soc. Transactions, 1975, v. 3, № 6, p. 897-899.
30. Gutte B. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 2, p. 663-670.
31. Weickmann J. L., Elson M., Glitz D. G. Biochemistry, 1981, v. 20, № 5, p. 1272-1278.
32. Wierenga P. K., Huiringa J. D., Gaastra W., Welling G. W., Beintema J. J. FEBS Lett., 1973, v. 31, № 2, p. 181-185.
33. Gaastra W., Groen G., Welling G. W., Beintema J. J. FEBS Lett., 1974, v. 41, № 2, p. 227-232.
34. Gaastra W., Welling G. W., Beintema J. J. Eur. J. Biochem., 1978, v. 86, № 1, p. 209-217.
35. Havinga J., Beintema J. J. Eur. J. Biochem., 1980, v. 110, № 1, p. 131-142.
36. Button E. E., Guggenheimer R., Kull F. J. Arch. Biochem. and Biophys., 1980, v. 219, № 2, p. 249-260.
37. Quintamilla M., Renart J. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 21, p. 12594-12599.
38. Hořejší V., Tichá M., Tichý P., Holý A. Anal. Biochem., 1982, v. 125, № 2, p. 358-369.
39. Cuatrecasas P. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 12, p. 3059-3065.
40. Jervis L. Biochem. J., 1972, v. 127, № 1, p. 29-30.
41. Jervis L. Phytochem., 1974, v. 13, № 4, p. 723-727.
42. Jervis L., Pettit N. M. J. Chromatogr., 1974, v. 97, № 1, p. 33-38.
43. Шубаев В. Н., Кусов Ю. Ю., Калинин Н. А., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 1, с. 120-125.
44. А.с. 977463 (СССР). Имобилизованные на полимерной матрице β- и γ-амидные производные нуклеозид-5'-ди- или трифосфатов в качестве сорбентов для аффинной хроматографии и способ их получения/Бабкина Г. Т., Кнорре Д. Г., Сербо Н. А. Заявл. 10.01.80 г., № 2868371/23-04. Оpubл. в Б.И., 1982, № 44.
45. Koiš P., Holý A. Coll. Czech. Chem. Commun., 1980, v. 45, № 10, p. 2830-2838.
46. Horitsu H., Nakashima K., Tomoyeda M. Agr. Biol. Chem., 1975, v. 39, № 11, p. 2253-2254.
47. Krietsch W. K. G., Simm F. C., Hertenberger B., Kuntz G. W., Wachter E. Anal. Biochem., 1983, v. 128, № 1, p. 213-216.
48. Janski A. M., Oleson A. E. Anal. Biochem., 1976, v. 71, № 2, p. 471-480.
49. Smith G. K., Schray K. J., Shaffer S. W. Anal. Biochem., 1978, v. 84, № 2, p. 406-414.
50. Saruno R., Tanaka M., Kato F. Agr. Biol. Chem., 1979, v. 43, № 11, p. 2227-2232.
51. Ishiwata K., Yoshida H. J. Biochem., 1978, v. 83, № 3, p. 783-788.
52. Yoshida H., Fukuda I., Hachiguchi M. J. Biochem., 1980, v. 88, № 6, p. 1813-1818.
53. Kanaya S., Ushida T. J. Biochem., 1981, v. 89, № 2, p. 591-597.
54. Kanaya S., Ushida T. J. Biochem., 1981, v. 90, № 2, p. 473-481.
55. Ushida T., Shibata Y. J. Biochem., 1981, v. 90, № 2, p. 463-471.
56. Waki M., Mitsuyasu N., Terada S., Matsuura S., Kato T., Izumiya N. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 61, № 2, p. 576-582.
57. Koiš P., Rosenberg I., Holý A. Coll. Czech. Chem. Commun., 1980, v. 45, № 10, p. 2839-2846.

58. *Lazarus L. H., Lee C.-Y., Wermuth B.* Anal. Biochem., 1976, v. 74, № 1, p. 138—144.
59. *Tomoyeda M., Eto Y., Horitsu H.* Agr. Biol. Chem., 1977, v. 41, № 12, p. 2447—2453.
60. *Baumgartner B., Kende H., Matile P.* Plant. Physiol., 1975, v. 55, p. 734—737.
61. *Scofield R. E., Werner R. P., Wold F.* Anal. Biochem., 1977, v. 77, № 1, p. 152—157.
62. *Baynes J. W., Wold F. J.* Biol. Chem., 1976, v. 251, № 19, p. 6016—6024.
63. *Банникова Г. Е., Варламов В. П., Самсонова О. Л., Рогожин С. В.* Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 212—219.
64. *Банникова Г. Е., Варламов В. П., Рогожин С. В.* Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 11, с. 1505—1510.
65. *Tatsuki T., Iwanaga S., Suzuki T. J.* Biochem., 1975, v. 77, № 4, p. 831—836.
66. *Takahashi M., Kobayashi M., Uchida T.* Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 23, p. 5611—5622.
67. *Schmukler M., Jewett P. B., Levy C. C. J.* Biol. Chem., 1975, v. 250, № 6, p. 2206—2212.
68. *Levy C. C., Mitch W. E., Schmukler M. J.* Biol. Chem., 1973, v. 248, № 16, p. 5712—5719.
69. *Cranston J. W., Perini F., Crisp E. R., Hixson C. V.* Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 616, № 2, p. 239—258.
70. *Pietrzak M., Cudny H., Maluszynski M.* Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 614, № 1, p. 102—112.
71. *Schabert J. C. J.* Chromatogr., 1972, v. 73, № 2, p. 253—256.
72. *Schaller H., Husslein C., Bonhoeffer F. J., Kurz C., Nietzsche I.* Eur. J. Biochem., 1972, v. 26, № 4, p. 474—481.
73. *Weatherford S. C., Weisberg L. S., Achord D. T., Apirion D.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1972, v. 49, № 5, p. 1307—1315.
74. *Куриненко В. М., Шагу-Мухамедова Ф. Ф., Нужица А. М.* Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 11, с. 1624—1631.
75. *Caputo A., Zupi G., Cianciuli A.* Nucl. Acids Res., 1975, v. 2, № 6, p. 905—913.
76. *Braun A. G., Radman M., Crossman L.* Biochemistry, 1976, v. 15, № 18, p. 4116—4120.
77. *Tanaka H., Sasaki I., Yamashita K., Miyazaki K., Matuo Y., Yamashita J., Horio T. J.* Biochem., 1980, v. 88, № 3, p. 797—806.
78. *Tanaka H., Sasaki I., Yamashita K., Matuo Y., Yamashita J., Horio T. J.* Biochem., 1982, v. 91, № 4, p. 1411—1417.
79. *Itoh T., Tomizawa J.* Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 19, p. 5949—5965.
80. *Dolapchiev L. B., Sulkowski E., Laskowski M.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 61, № 1, p. 273—281.
81. *Silverman S., Soll D.* Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 10, p. 3511—3517.
82. *Shinshi H., Kato K., Miwa M., Matsushima T., Noguchi M., Sugimura T.* Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 495, № 1, p. 71—76.
83. *Kanaya S., Yoshida H. J.* Biochem., 1979, v. 85, № 3, p. 791—797.
84. *Anai M., Sasaki M., Muta A., Miyagawa T.* Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 656, № 2, p. 183—188.
85. *Dolapchiev L. B., Bakalova A.* Preparative Biochem., 1982, v. 12, № 2, p. 121—136.
86. *Frischauf A.-M., Eckstein F.* Eur. J. Biochem., 1973, v. 32, № 3, p. 479—485.
87. *Eckstein F., Frischauf A. M.* In: *Methods in enzymology*/Eds Jakoby W. B., Wilchek M. N.Y.: Acad. Press, 1974, v. 34, part B, p. 605—610.
88. *Swida U., Schulz-Harder B., Kucherer C., Kaufer N.* Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 652, № 1, p. 129—138.
89. *Neeman L., Calton G. J., Burnett J. W.* Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1981, v. 166, p. 374—382.
90. *Oka J., Ueda K., Hayaishi O.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1978, v. 80, № 4, p. 841—848.
91. *Cudny H., Zaniewski R., Deutscher M. R. J.* Biol. Chem., 1981, v. 256, № 11, p. 5627—5632.
92. *Dunn B. M., Chaiken I. M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 6, p. 2382—2385.
93. *Dunn B. M., Chaiken I. M.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 11, p. 2343—2349.
94. *Chaiken I. M., Taylor H. C. J.* Biol. Chem., 1976, v. 251, № 7, p. 2044—2048.
95. *Taylor H. C., Chaiken I. M. J.* Biol. Chem., 1977, v. 252, № 20, p. 6991—6994.

Поступила в редакцию
13.V.1983
После доработки
9.VIII.1983

AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF NUCLEASES

BANNIKOVA G. E., VARLAMOV V. P., ROGOZHIN S. V.

*A. N. Nesmeyanov Institute of Organo-Element Compounds,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The review concerns isolation and purification of nucleases by affinity chromatography. Different stationary ligands and the methods for their immobilization on supports are described, along with diverse eluents and various procedures for a nuclease-detachment from the affinity sorbents. The data on the affinity chromatography application for measuring the dissociation constants of the enzyme complexes with either immobilized or soluble ligands are compiled.