



УДК 577.112.088.3:543.544

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БИОПОЛИМЕРОВ МЕТОДОМ  
АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИVIII \*. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АДсорбЕНТОВ:  
НА ОСНОВЕ СЕФАРОЗЫ И СФЕРОНА ДЛЯ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ  
ФИБРОНЕКТИНА*Митина В. Х., Французова Н. А., Куценко Н. Г.,  
Золотов И. Н., Кляшницкий Б. А.**Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Осуществлен синтез и проведено сравнительное изучение биоспецифических адсорбентов с иммобилизованным желатином на основе агарозных и оксиэтилметакрилатных гелей, содержащих или не содержащих полисахаридные вставки. Введение полисахаридной вставки между желатином и сефарозой существенно увеличивает количество иммобилизованного желатина. Сорбенты обоих типов с декстрановой вставкой характеризовались более высокой емкостью по связыванию фибронектина в расчете на иммобилизованный желатин. С использованием сорбента «желатин — сферон 300» (фракция частиц менее 25 мкм) осуществлено биоспецифическое выделение фибронектина из плазмы крови человека в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В последнее время фибронектин (гликопротеин, в растворимой форме обнаруженный в крови, а в нерастворимой — в соединительной ткани и базальных мембранах) привлекает внимание исследователей в связи с возможными важными и разнообразными биологическими функциями, в частности с его участием во взаимодействии клеток с компонентами внеклеточного матрикса [2]. Характерным свойством этого белка является его высокое сродство к коллагену. Хотя биологическое значение этого сродства до конца не ясно, специфическое взаимодействие этих двух белков нашло широкое применение в практике для простого и быстрого выделения фибронектина из различных источников методом АФХ на иммобилизованном денатурированном коллагене (желатине) [3]. Для этой цели используются адсорбенты на основе агарозных гелей. Недавно «желатин — агароза» стала доступной в качестве коммерческого препарата ряда фирм (Bio-Rad, США; Pharmacia Fine Chemicals, Швеция и др.).

Настоящая работа предпринята в рамках дальнейшего изучения возможностей использования биоспецифического взаимодействия коллагена и фибронектина или их фрагментов в АФХ. Основными целями работы являлись: 1) сравнение свойств сорбентов с иммобилизованным желатином на основе агарозных (сефароза) и оксиэтилметакрилатных (сферон) гелей; 2) сравнительное изучение указанных сорбентов и аналогичных сорбентов с полисахаридными вставками [4]; 3) реализация возможности проведения АФХ фибронектина на оксиэтилметакрилатных биоадсорбентах в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Иммобилизацию желатина на активированных бромистым цианом сефарозе 4В или сфероне 1000 проводили по методике [5] и получили сорбенты «желатин — сефарозу» (адсорбент А) и «желатин — сферон» (адсорбент Б). Для получения биоспецифических сорбентов с декстрановой вставкой присоединяли АЕС-декстран [6] к бромцианактивированным носителям, как описано ранее [7]. После дальнейшей активации декстра-

\* Сообщение VII см. [1]. Сокращения: АФХ — аффинная хроматография; АЕС-декстран — O-[N-(2-аминоэтил)карбамоил]декстран; УБР — уравнивающий буферный раствор (0,05 М трис-HCl, 0,15 М NaCl, 0,5 мМ фенолметилсульфонилфторид, pH 4,7), Fn — фибронектин.

**Сравнительная характеристика адсорбентов, содержащих  
иммобилизованный желатин**

Адсорбент	Количество иммобилизованного желатина, мг/мл упакованного геля	Количество связанного Fp, мг/мл адсорбента	Емкость адсорбента, мг Fp/мг иммобилизованного желатина
А	0,86	1,175	1,3
Б	0,93	1,054	1,13
В	1,67	2,786	1,67
Г	0,83	2,06	2,48
Д	2,04	1,902	0,93

новой вставки бромцианом и присоединения желатина получили сорбенты «желатин-декстран-сефарозу» (адсорбент В) и «желатин-декстран-сферон» (адсорбент Г). Сорбент с амилопектиновой вставкой — «желатин-амилопектин-сефароза» (адсорбент Д) — получен присоединением периодатокисленного амилопектина (окисление 5—10% остатков ангидроглюкозы полисахарида) к гидразидосукцинилсефарозе по методике, описанной ранее [4], с последующей активацией полисахаридной вставки бромистым цианом и иммобилизацией желатина.

Содержание желатина в адсорбентах А—Д было установлено после кислотного гидролиза аликвот сорбентов и определения количества оксипролина в гидролизатах по методу Бергмана и Локсли [8]. Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что к бромцианактивированным сефарозе и сферону присоединяется при прочих равных условиях примерно одинаковое количество желатина — около 1 мг на 1 мл упакованного геля. Введение полисахаридных вставок между желатином и сефарозой приводит к значительному увеличению количества иммобилизованного желатина, что соответствует данным, полученным ранее при иммобилизации других лигандов через полисахаридные вставки [4]. В случае оксиэтилметакрилатного носителя (сорбент Г) подобного увеличения содержания желатина не наблюдалось.

Существуют многочисленные модификации АФХ фибронектина на иммобилизованном желатине. Они касаются главным образом способов элюирования белка, связанного с адсорбентом. Для этой цели были использованы буферные растворы, содержащие различные концентрации мочевины или ее градиент [3, 9], бромид калия [10], аргинин [5], глюкозу [11], растворы с низким значением рН [12] и т. д. В настоящей работе элюирование фибронектина проводили с использованием 4 М мочевины после предварительной промывки колонки УБР, содержащим 1 М мочевины.

АФХ на сорбентах А—Д проводили в одинаковых условиях в небольших силиконизированных стеклянных колонках (объем адсорбента 1 мл). Сорбент предварительно инкубировали с сывороткой крови человека в условиях насыщения по фибронектину при 20° С в течение 1 ч, затем упаковывали в колонку и последующие промывки и элюирование белка проводили при 4° С. Полученные фракции исследовали методом электрофореза на пластинках с полиакриламидным гелем в присутствии додецилсульфата натрия [13]. В этих условиях фибронектин дает на пластинках характерную широкую полосу или две близко расположенные полосы в области 220 кДа [14, 15]. Насыщение сорбентов по фибронектину было доказано присутствием этого белка во фракции, не связанной с адсорбентами; повторная АФХ этой фракции на тех же сорбентах приводила к выделению дополнительного количества фибронектина после элюирования растворами с 4 М мочевиной.

Известно, что полученный после АФХ фибронектин может содержать белковые примеси [16, 17]. Их содержание резко увеличивается при исключении из используемых растворов фенилметилсульфонилфторида, что указывает на вероятность частичного протеолитического расщепления молекулы фибронектина в процессе хроматографии. Поэтому все использованные нами при работе буферные растворы содержали 0,5 мМ фенилме-

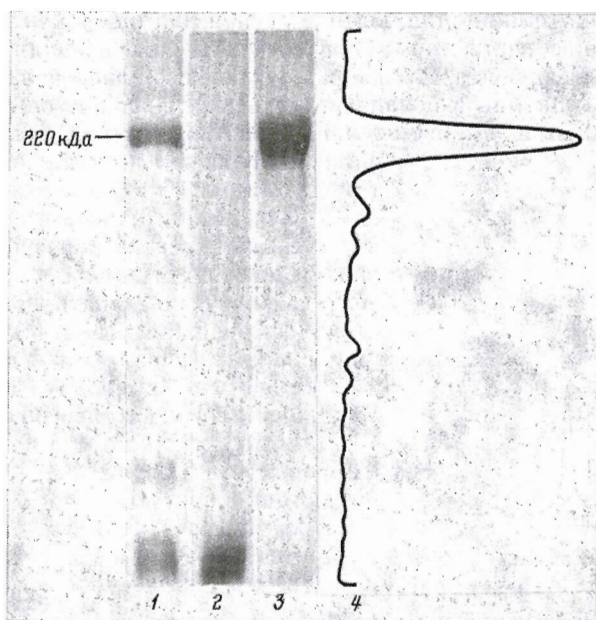


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия препаратов белка после АФХ сыворотки крови человека. Условия электрофореза и АФХ приведены в тексте. 1 – фракции, элюированные 4 М мочевиной в УБР с адсорбента Г; 2 – фракции, элюированные 8 М мочевиной в УБР с адсорбента Г; 3 – фракции, элюированные 4 М мочевиной в УБР с адсорбента Б; 4 – результаты денситометрии полосы 3

тилсульфонилфторид. Для получения высокоочищенного фибронектина разработан ряд простых дополнительных стадий, предшествующих или чаще всего следующих за стадией АФХ. Так, используют дополнительную хроматографию фибронектина на аргинин- [5] или гепарин-сефарозе [18], ионообменную хроматографию на DEAE-целлюлозе [19], гель-фильтрацию на сефакриле S-300 [20] или сефарозе 4В [21], препаративный электрофорез в полиакриламидном геле [16], избирательное осаждение сульфатом аммония [22]. Во многих работах выделенный в результате АФХ фибронектин был достаточно чистым для использования в дальнейших экспериментах без дополнительной очистки [14, 15]. Полученные нами в настоящей работе препараты фибронектина также отличались высокой степенью чистоты, о чем свидетельствуют данные электрофореза (рис. 1). Фракции, элюированные со всех сорбентов 4 М мочевиной в УБР, как правило, более чем на 90% состояли из фибронектина (рис. 1, полоса 3). Фракция, элюированная далее с сорбента Г 8 М мочевиной в УБР, не содержала фибронектина (рис. 1, полоса 2). Расчет емкости сорбентов по фибронектину на 1 мг иммобилизованного желатина проводился по поглощению при 280 нм фракций, элюированных с биоадсорбентов 4 М мочевиной, без дополнительной очистки выделенного фибронектина. Как видно из таблицы, адсорбенты связывали примерно 1–2,5 мг белка на 1 мг иммобилизованного желатина, причем природа носителя не играет, по-видимому, существенной роли. Для сравнения можно отметить, что емкость желатин-сефарозы, использованной в работе [3], составляла 0,5 мг фибронектина на 1 мг иммобилизованного желатина, а коммерческие препараты желатин-сефарозы, по данным фирм Bio-Rad, Pierce (США), Pharmacia: Fine Chemicals (Швеция) связывают 1 мг фибронектина на 1 мл сорбента. Обращает на себя внимание тот факт, что сорбенты с декстрацовой вставкой отличаются более высокой емкостью от аналогичных сорбентов без вставки. При биоспецифическом взаимодействии двух таких больших белков, как фибронектин и коллаген, стерические факторы могут иметь весьма существенное значение. Вполне вероятно, что желатин, иммобилизованный на значительном расстоянии от поверхности твердого носителя,

стерически и конформационно более доступен для фибронектина, чем присоединенный непосредственно к носителю. Особенно очевидным это становится в случае адсорбента Г, содержащего наименьшее количество иммобилизованного желатина и обладающего наибольшей емкостью. Вероятно, для адсорбентов А и Б значительная часть участков связывания для

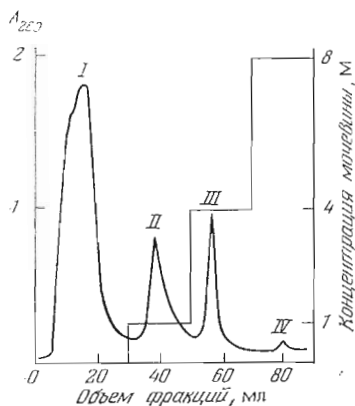


Рис. 2. Хроматография плазмы крови человека на адсорбенте Е. Условия хроматографии см. в тексте

препаратах, мы предприняли попытку улучшить качество препарата, выделенного на сорбенте Г, путем введения в процесс очистки предварительной стадии хроматографии на «декстран—сфероне», т. е. на сорбенте, содержащем только полисахаридную вставку. Эта идея была предложена ранее [4] для АФХ на сорбентах с полисахаридными вставками с целью предварительного удаления из разделяемой белковой смеси компонентов, имеющих сродство к самой вставке. Действительно, АФХ на сорбенте Г фракции, не связавшейся с «декстран—сфероном», привела к препарату фибронектина, чистота которого была сравнима с чистотой белка, выделенного на соответствующем сорбенте без полисахаридной вставки (сорбент Б), причем емкость сорбента Г по фибронектину при этой схеме очистки уменьшалась незначительно.

Количественное определение фибронектина в биологических жидкостях представляет собой актуальную задачу, поскольку изменение его содержания может быть связано с рядом патологических состояний, таких, как болезни печени [23], опухолевые заболевания [24] и др. Чаще всего для этих целей используют иммунохимические методы [3, 15, 25]. В последнее время для количественного определения состава сложных белковых смесей все большее применение находит метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [26]. В ряде работ описана высокоэффективная АФХ с применением биоадсорбентов на основе жестких или полужестких носителей [27]. Успешное использование сорбентов на основе сферона для АФХ фибронектина позволило нам впервые осуществить его выделение из плазмы крови человека на «желатин—сфероне» в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии. С этой целью аналогично получению сорбента Б был получен сорбент на основе сферона 300 (фракция частиц менее 25 мкм) (адсорбент Е). Этот сорбент содержал 1,17 мг желатина на 1 мл геля.

Высокоэффективную АФХ фибронектина на сорбенте Е проводили по обычной методике (рис. 2). Объем геля составлял 10 мл. На колонку вводили 10 мл плазмы крови человека. После выхода несвязавшихся белков (пик I) колонку промывали 1 М мочевиной в УБР (пик II). Фибронектин элюировали 4 М мочевиной в УБР (пик III). После этого колонку промывали 8 М мочевиной в УБР (пик IV). Известно, что плазма крови человека содержит фибронектин в концентрации ~0,3 мг/мл [2]. Использованное нами при высокоэффек-

фибронектина в иммобилизованном желатине остается не использованной при АФХ. С другой стороны, высокое содержание желатина и высокоразветвленный характер амилопектиновой вставки в адсорбенте Д могут создавать дополнительные стерические препятствия для взаимодействия белка с участками связывания на желатине, что приводит к некоторому уменьшению емкости этого сорбента.

Данные электрофореза показывают, что фибронектин, полученный на адсорбенте без вставки (рис. 1, полоса 3), был более чистым, чем препарат, выделенный на аналогичном сорбенте с декстрановой вставкой (рис. 1, полоса 1). Хотя в задачу настоящего исследования не входило получение электрофоретически однородного фибронектина и изучение природы белковых примесей в получаемых после АФХ

тивной АФХ соотношение геля и плазмы обеспечивает количественное связывание с адсорбентом фибронектина, содержащегося в плазме. Действительно, по данным электрофореза, фракции пиков I, II и IV не содержали фибронектина, а препарат фибронектина во фракциях пика III отличался высокой степенью чистоты. Выход фибронектина составлял 2,8 мг. После промывки 8 М мочевиной и затем УБР колонка с сорбентом Е может быть использована повторно.

Высокоэффективная АФХ фибронектина — простой, быстрый и легко воспроизводимый процесс, который может быть рекомендован для выделения фибронектина из различных биологических жидкостей.

### Экспериментальная часть

В работе использовали сефарозу 4В (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), сферыны 1000 (63—100 мкм) и 300 (<25 мкм) (Lachema — Chemapol, ЧССР). ВгСN, фенилметилсульфонилфторид, хлоргидрат 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и силиконовый раствор были получены от фирмы Serva (ФРГ). Для силиконизации стеклянные колонки нагревали в силиконовом растворе 1 ч при 100° С. Амилопектин из крахмала — Олайнского завода химреактивов. Акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, аммоний надсерноокислый, глицин — фирмы Reanal (Венгрия). АЕС-декстран ( $\gamma^{NH}$ : 12) был получен по методике [6], а коллаген выделен из кожи крыс в соответствии с методикой [28].

Поглощение фракций в УФ-области определяли на спектрофотометре СФ-26. Концентрацию фибронектина во фракциях рассчитывали по поглощению при 280 нм ( $A_{280}^{1\%} = 12,8$  [29]). Анализ фракций при хроматографическом процессе осуществляли с помощью УФ-монитора Uvicord S при длине волны 280 нм и самописца 2210 (ЛКВ, Швеция). Для высокоэффективной АФХ фибронектина использовали хроматографическую систему FPLC на колонке HR 10/10 (Pharmacia Fine Chemicals).

Электрофорез проводили на пластинках в 5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [13]. Образцы предварительно нагревали 3 мин при 100° С в 0,06 М трис-НСl, рН 6,8, содержащем 2% додецилсульфата натрия, 3% меркаптоэтанола, 0,01% бромфенолового голубого и 6% глицерина. Гели окрашивали кумаси бриллиантовым голубым G. Сканирование электрофореграмм проводили на хромоскане Chromoscan 200 (Jouce hoebi, Великобритания).

*Получение биоспецифических адсорбентов А, В и Д.* Адсорбент А был получен по известной методике [5]. Лиюфилизированный коллаген перед иммобилизацией денатурировали нагреванием в течение 30 мин при 65° С в 0,1 М бикарбонате натрия, содержащем 0,2 М хлористый натрий. «АЕС-декстран—сефарозу» и «амилопектин—сефарозу» получали по методикам [7] и [4]; после активации полисахаридных вставок ВгСN присоединяли раствор денатурированного коллагена с получением сорбентов В и Д соответственно. При активации соотношение ВгСN и геля составляло 1,5 г на 10 мл упакованного объема. Последующее сочетание с желатином проводили, используя около 25 мг белка на 10 мл активированного геля.

*«Желатин—сферон» (адсорбенты В и Е).* Сферон 1000 (20 мл упакованного объема) промывали 50 мл 5 М калий-фосфатного буферного раствора, рН 12, суспендировали в 20 мл того же буферного раствора и добавляли раствор 3 г ВгСN в 1,5 мл ацетонитрила, смесь перемешивали 6—8 мин при 4° С, гель отделяли, быстро промывали ледяной водой и холодным 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> с 0,2 М NaCl (по 200 мл) и немедленно переносили в раствор 50 мг денатурированного коллагена в 0,1 М NaHCO<sub>3</sub>, содержащем 0,5 М NaCl. Суспензию перемешивали 16 ч при 20° С, гель отделяли на пористом фильтре, промывали 300 мл 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> с 0,2 М NaCl, затем 0,1 М натрий-ацетатным буферным раствором с 1 М NaCl (рН 4) и 0,1 М натрий-боратным буферным раствором с 1 М NaCl, рН 9 (по 100 мл; последние две промывки повторяли 3 раза). Гель инкубировали 2 ч при 20° С с 20 мл 1 М этаполамина (рН 9 с помощью 6 н. HCl), отделяли и промывали водой (100 мл). Полученный адсорбент может хранить-

ся в виде водной суспензии при 4°С. Аналогично на основе сферона 300 получили адсорбент Е.

«Желатин-декстран-сферон» (адсорбент Г). 20 мл упакованного объема сферона 1000 активировали ВгСN, как описано выше, промытый гель суспендировали в растворе 1 г АЕС-декстрана в 20 мл 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> с 0,5 М NaCl и перемешивали 16 ч при 4°С. Затем гель промывали 1 л воды, 200 мл 0,2 М NaCl и 200 мл воды и перемешивали 2 ч при 20°С с 20 мл 1 М этаноламина (рН 9). После этого промытый 200 мл воды гель инкубировали 72 ч при 20°С в 20 мл воды с двумя каплями ледяной уксусной кислоты и 10 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида, промывали 200 мл воды, затем 50 мл калий-фосфатного буферного раствора, рН 12. Последующую активацию «декстран-сферона» ВгСN и иммобилизацию желатина проводили как описано в предыдущем эксперименте. Сорбент Г хранили в водной суспензии в присутствии 0,02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> при 4°С.

*Определение содержания иммобилизованного желатина в адсорбентах А — Е.* Образцы сорбентов (0,8—1,0 мл упакованного объема) нагревали 24 ч при 110°С в запаянных ампулах с 1 мл 6 н. HCl, затем гидролизат упаривали, остаток несколько раз упаривали с 5 мл воды и фильтровали. В аликвотах фильтратов (0,2 мл) определяли содержание оксипролина по методике [30]. Результаты определения содержания желатина приведены в таблице.

*АФХ фибронектина на адсорбентах А — Д.* Перемешивали 1 ч при 20°С 10 мл сыворотки крови человека с 1 мл соответствующего сорбента, суспензию упаковывали в стеклянную силиконизированную колонку (0,4×8 см). Последующую хроматографию проводили при 4°С. Колонку промывали 15 мл УБР, затем 10 мл УБР, содержащего 1 М мочевины. Фибронектин элюировали с колонки УБР с 4 М мочевиной (10 мл). Окончательно колонку промывали 10 мл УБР с 8 М мочевиной. Объем фракций 0,5 мл. Фракции, содержащие фибронектин, диализовали против 0,1 М уксусной кислоты и раствор белка (2—3 мл) лиофилизовали. Результаты определения емкости сорбентов А — Д приведены в таблице. При повторном использовании сорбентов А — Д не обнаружено заметного уменьшения их емкости.

*Высокоэффективная АФХ фибронектина на адсорбенте Е.* Колонку HR 10/10 заполняли сорбентом Е (10 мл) в УБР со скоростью 2 мл/мин, используя хроматографическую систему FPLC. 10 мл плазмы крови человека вводили в колонку при помощи дозирующей петли (Superloop, 10 мл) и 7-ходового крана-дозатора V-7. Скорость при введении плазмы 0,2 мл/мин. Объем собираемых фракций 2 мл. Дальнейшую промывку сорбента УБР, УБР с 1 М мочевиной и элюирование фибронектина УБР с 4 М мочевиной (по 20 мл) проводили со скоростью 0,5 мл/мин. Давление в системе в процессе хроматографии составляло 1,5—2,0 МПа. Объем фракции, содержащей фибронектин, не превышал 7 мл. Затем колонку промывали УБР с 8 М мочевиной, уравнивали посредством УБР и использовали повторно.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Черникевич И. П., Воскобоев А. И., Кляцицкий Б. А. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 2, с. 209—216.
2. Yamada K. M. In: Ann. Rev. Biochem. / Ed. Snell E. E. Palo Alto: Annual Reviews Inc., 1983, v. 52, p. 761—799.
3. Engvall E., Ruoslahti E. Int. J. Cancer, 1977, v. 20, № 1, p. 1—5.
4. Klyashchitsky B. A., Mitina V. Kh. J. Chromatogr., 1981, v. 210, № 3, p. 55—65.
5. Vuento M., Vaehri A. Biochem. J., 1979, v. 183, № 2, p. 331—337.
6. Кузнецова Е. А., Шишканова Л. С., Королева Г. Е., Сиягина Е. Д., Шлимак В. М., Васильев А. Е. Журн. общ. химии, 1978, т. 48, № 6, с. 1410—1413.
7. Klyashchitsky B. A., Mitina V. Kh., Morozevich G. E., Yakubovskaya R. I. J. Chromatogr., 1981, v. 210, № 3, p. 67—76.
8. Bergman I., Loxley A. Analyt. Chem., 1963, v. 35, № 12, p. 1961—1965.
9. Scorstengaard K., Thogersen H. C., Vibe-Pedersen K., Petersen T. E., Magnusson S. Eur. J. Biochem., 1982, v. 128, № 2—3, p. 605—623.
10. Dessau W., Jilek F., Adelman B. C., Hormann H. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 523, № 2, p. 227—237.

11. Agin P. P., Gartner T. K. *Biochim. et biophys. acta*, 1982, v. 716, № 3, p. 443-445.
12. Clark R. A. F., Dvorak H. F., Colin R. B. J. *Immunol.*, 1981, v. 126, № 2, p. 787-793.
13. Laemmli U. K. *Nature*, 1970, v. 227, № 5259, p. 680-685.
14. Hall W. M., Ganguly P. J. *Cell. Physiol.*, 1981, v. 109, № 2, p. 271-280.
15. Clemmensen I., Andersen R. B. *Arthr. Rheumat.*, 1982, v. 25, № 1, p. 25-31.
16. Vartio T., Vaheri A. J. *Biol. Chem.*, 1981, v. 256, № 3, p. 13085-13090.
17. Златопольский А. Д., Зыкова Т. А., Мазуров В. И. *Вопр. мед. химии*, 1983, т. 29, № 3, с. 116-119.
18. Molnar J., Gelder F. B., Lay M. Z., Siefring C. J., Jr., Credo R. B. *Biochemistry*, 1979, v. 18, № 18, p. 3909-3916.
19. Norris D. A., Clark R. A. F., Swigart L. M., Huff J. C., Weston W. L., Howell S. E. *J. Immunol.*, 1982, v. 129, № 4, p. 1612-1618.
20. Scott D. L., Redford P. A., Walton K. W. J. *Immunol. Meth.*, 1981, v. 43, № 1, p. 29-33.
21. Weiss R. F., Reddi A. H. *Biochem. J.*, 1981, v. 197, № 2, p. 529-534.
22. Зыкова Т. А., Златопольский А. Д., Мазуров В. И. *Вопр. мед. химии*, 1983, т. 29, № 5, с. 114-118.
23. Matsuda M., Yamanaka T., Matsuda A. *Clin. chim. acta*, 1982, v. 118, № 2/3, p. 191-199.
24. Vartio T., Vaheri A., De Petro G., Barlati S. *Invas. Metast.*, 1983, v. 3, № 2, p. 123-138.
25. Beaulieu A. D., Valet J. P., Strevey J. *Arthr. Rheumat.*, 1981, v. 24, № 11, p. 1381-1388.
26. Mocek K., Deyl Z., Coupek J., Sanitrak J. J. *Chromatogr.*, 1981, v. 222, № 1, p. 284-290.
27. Small D. A. P., Atkinson A., Lowe C. R. J. *Chromatogr.*, 1983, v. 266, № 1, p. 151-156.
28. Piez K. A., Eigner E. A., Lewis M. S. *Biochemistry*, 1963, v. 2, № 1, p. 58-66.
29. Mossesson M. W., Chen A. B., Huseby R. M. *Biochim. et biophys. acta*, 1975, v. 386, № 2, p. 509-524.
30. Замарева Т. В. В кн.: *Современные методы в биохимии* / Ред. Орехович В. Н. М.: Медицина, 1977, с. 262-264.

Поступила в редакцию  
10.VII.1984

#### ISOLATION AND PURIFICATION OF BIOPOLYMERS BY BIOSPECIFIC AFFINITY CHROMATOGRAPHY. VIII. COMPARATIVE STUDIES OF BIOSPECIFIC ADSORBENTS BASED ON SEPHAROSE AND SPHERON FOR AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF FIBRONECTIN

MITINA V. KIL., FRANTSUZOVA N. A., KUTSENKO N. G.,  
ZOLOTOV N. N., KLYASHCHITSKY B. A.

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences  
of the USSR, Moscow*

Synthesis of gelatin-containing biospecific adsorbents based on agarose or hydroxyethylmethacrylate gels with or without a polysaccharide spacer was carried out and the adsorbents prepared were studied for further application in affinity chromatography of fibronectin. The adsorbents having polysaccharide spacer between gelatin and Sepharose were characterized by higher gelatin concentrations. The sorbents with the dextran spacer possessed higher capacity for fibronectin binding, as compared to those without the spacer. Biospecific isolation of human plasma fibronectin was carried out for the first time under conditions of high performance liquid chromatography using the «gelatin-Spheron 300» sorbent.