



## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.154.07:543.544

### АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ГЛИКОЗИДАЗ

*Кляццкий В. А.*

*Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Обзор посвящен выделению и очистке гликозидаз методом АФХ\*. Обсуждены вопросы синтеза биоспецифических адсорбентов и выбора оптимальных условий адсорбции и элюции ферментов. Рассмотрены механизмы и роль неспецифических эффектов в АФХ гликозидаз, приведены примеры применения АФХ для очистки конкретных ферментов. Приведены данные по использованию АФХ для разделения различных форм гликозидаз и изучения некоторых аспектов ферментативных реакций.

#### Содержание обзора

Введение . . . . .	486
Общие положения АФХ гликозидаз . . . . .	486
Носители . . . . .	486
Лиганды . . . . .	487
Вставки . . . . .	488
Синтез адсорбентов . . . . .	488
Адсорбция . . . . .	490
Элюция . . . . .	491
Применение АФХ для очистки гликозидаз . . . . .	493
$\alpha$ -Глюкозидазы . . . . .	493
$\beta$ -Глюкозидазы . . . . .	494
Лизоцим . . . . .	496
Нейраминидаза . . . . .	498
$\alpha$ -Галактозидаза . . . . .	501
$\beta$ -Галактозидаза . . . . .	502
$\alpha$ -D-Маннозидаза . . . . .	505
N-Ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидаза . . . . .	506
$\beta$ -Глюкуропидаза . . . . .	509
$\alpha$ -L-Фукозидаза . . . . .	510
Прочие гликозидазы . . . . .	512
Неспецифические эффекты при АФХ гликозидаз . . . . .	514
Заключение . . . . .	522

\* Сокращения: АФХ — аффинная хроматография; УБР — уравнивающий буферный раствор; ЭБР — элюирующий буферный раствор; ЕДС — 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбодимид; СоnА — конканавалин А; СНА — циклогексаамилоза; СНРА — циклогептаамилоза; Ар — *n*-аминофенил; АН —  $\omega$ -аминогексил; АС —  $\epsilon$ -аминокапроил.

Для адсорбентов приняты следующие сокращения: Seph — сефароза, Suc-DA-Seph — сукцинил-диаминодипропиламин-Seph. В названиях адсорбентов производные лиганда отделены от производных носителя знаком связи: Call $\beta$ -Ar — Seph — *n*-ами-

## Введение

К числу наиболее эффективных современных методов выделения и очистки биополимеров относится АФХ. Возможности этого метода позволяют использовать его также в качестве тонкого инструмента биохимического исследования. Интересы дальнейшего развития метода настоятельно требуют систематизации и осмысления большого фактического материала, накопленного за последнее десятилетие со времени основополагающей работы [1]. К настоящему времени имеется ряд монографий [2–5] и обзоров [6–13] по АФХ, систематически проводятся симпозиумы [14–16] и коллоквиумы [17], посвященные тем или иным аспектам метода (приведенный список ни в коей мере не претендует на полноту).

На нынешнем этапе развития метода АФХ становится актуальным не только анализ общих тенденций, но и обобщение и обсуждение проблем, возникающих при биоспецифической очистке отдельных классов и групп биополимеров. Первым примером такого рода обзоров является настоящая статья, посвященная АФХ важного класса ферментов — гликозидаз [18].

Выбор указанной темы обусловлен не только ключевой ролью, которую играют гликозидазы в процессах жизнедеятельности [18]. АФХ гликозидаз интересна тем, что в ней находят отражение общие сегодняшние проблемы метода, связанные прежде всего с неспецифическими эффектами, осложняющими процесс очистки фермента, с выбором носителя, лиганда и химического способа получения биоспецифического адсорбента, с трудностями элюции фермента с адсорбента и т. д. В этой связи можно надеяться, что ознакомление с настоящим обзором окажется полезным не только для специалистов, работающих с гликозидазами, но и для исследователей, перед которыми стоят задачи выделения и очистки ферментов других классов.

### Общие положения АФХ гликозидаз

В этой главе рассмотрены принципы выбора и синтеза аффинных адсорбентов для очистки гликозидаз, условия адсорбции и методы элюции ферментов при АФХ.

*Носители.* Широкое применение при АФХ гликозидаз нашли биоспецифические носители [13], представляющие собой нерастворимые или иммобилизованные поперечной сшивкой полимерные субстраты или ингибиторы ферментов. Еще в 1910 г. этот принцип продемонстрировал Штаркенштейн [19], обнаруживший адсорбцию  $\alpha$ -амилазы на нерастворимом крахмале. Для АФХ гликозидаз применялись следующие биоспецифические носители: сефадексе G-100 [20] и G-200 [21], биогель А [22], целлюлоза [23], пахиман [24], ламинарин [25],  $\beta$ -(1–3) глюкоза из *Candida utilis* [26], хитин и его производные [27–29], поперечно синтезы эпихлоргидрином крахмал [30] и амилоза [31], декстрин, поперечно сшитый органическими диизоцианатами [32], гликоген (после обработки  $\text{BrCN}$  и гексаметилендиамном) [33] и др. Следует указать также на возможность приготовления бионосителей из растворимых полисахаридов, таких, как гуаран и декстраны, поперечной сшивкой их с помощью дивинилсульфона [34]. Перечисленные носители, как правило, высокоспецифичны для гликозидаз; фермент легко десорбируется с помощью биоспецифической элюции.

Однако физико-химические свойства некоторых из перечисленных полимеров не всегда соответствуют требованиям, предъявляемым к носителю [13]. Имеется несколько приемов для улучшения свойств бионосителей.

нофенил- $\beta$ -D-галактопиранозид — Seph; Gal1 $\beta$ S-AN — Seph —  $\omega$ -аминогексил-1-тио- $\beta$ -D-галактопиранозид — Seph; Gal1 $\beta$ N-AC — Seph — N-( $\epsilon$ -аминокапроил)- $\beta$ -D-галактозил-амин — Seph; GalNAc1 $\beta$ S-Ap-AC-SepH — *n*-аминофенил-1-тио- $\beta$ -D-N-ацетилгалактозаминид — аминокапроил-SepH; Gal1 $\beta$ N — SepH —  $\beta$ -D-галактозил-амин — SepH. Так же сокращаются названия аналогичных адсорбентов, содержащих другие сахара (где не указано — сахара D-конфигурации).

Так, ввиду желатинообразной природы СМ-хитина Имото и Ягишита [35] приготовили целлюлозу, покрытую СМ-хитином. Адсорбент отличался высокой прочностью и обеспечивал лучшую по сравнению с СМ-хитином скорость тока через колонку. Адсорбенты на основе бионосителей могут быть разбавлены коммерческими твердыми носителями, например целлюлозой [32].

Другой фактор, с которым приходится считаться при АФХ на биоспецифических носителях, — возможность их ферментативной деградации. В одних случаях такая деградация незначительна [32], в других (например, [24, 25]) приводит к резкому ухудшению адсорбционных свойств полимера.

Несмотря на широкое использование бионосителей, основным способом получения биоспецифических адсорбентов для АФХ гликозидаз остается ковалентное присоединение полимерного или низкомолекулярного лиганда к твердому носителю. Качество применявшихся в ранних работах носителей, таких, как поперечносшитые нерастворимые белки [36], уже не может считаться удовлетворительным. В настоящее время используются главным образом коммерчески доступные носители различной природы — сефароза 6В, 4В и 2В [37], целлюлоза, пористое стекло и др. Преимущества агарозных носителей известны достаточно хорошо. Как достоинства целлюлозного носителя рассматриваются отсутствие свойств молекулярного сита и ионообменных свойств, а также высокое удельное содержание лиганда [38]. К шарикам из пористого стекла также присоединяется значительно большее количество лиганда, чем к сефарозе [39]. В качестве носителей в аффинных адсорбентах для очистки гликозидаз использовались также полиакриламид [40] и хлорметилированный полистирол [41].

*Лиганды.* В АФХ гликозидаз в качестве биоспецифических лигандов широко используются высокомолекулярные и низкомолекулярные субстраты: гликопротеины и гликопептиды, углеводная часть которых специфична для данной гликозидазы [42, 43], олигосахариды [44], соответствующие Ар-гликозиды [45] и т. д. Как и биоспецифические носители, перечисленные выше лиганды обеспечивают высокую биоспецифичность процесса очистки, но многие из них разрушаются при действии фермента, в результате чего аффинные адсорбенты использовались иногда лишь однократно [42].

В этом плане более надежными, хотя часто и менее эффективными, представляются лиганды, являющиеся ингибиторами фермента. Выбор лигандов этого типа для гликозидаз зачастую сопряжен с трудностями, связанными с отсутствием достаточно эффективных ингибиторов для ряда ферментов этого класса. Хроматография на адсорбентах с тиогликозидами — слабыми ингибиторами гликозидаз [46], как будет показано ниже, сопровождается неспецифическими взаимодействиями фермента с адсорбентом. Предпочтительно использовать более сильные ингибиторы гликозидаз, например лактоны углеводов [47], СНА (для  $\beta$ -амилазы (КФ 3.2.1.2)  $K_i$   $1,7 \cdot 10^{-4}$  М) [48]. В качестве лигандов нашли применение и высокомолекулярные ингибиторы гликозидаз, такие, как белковые ингибиторы  $\alpha$ -амилазы (КФ 3.2.1.1) из зерен пшеницы [49] или лизоцимный лиганд клеточных стенок *Micrococcus lysodeikticus* [50].

Гликопротеиновая природа большинства гликозидаз послужила основой их биоспецифической очистки на иммобилизованных лектинах [51, 52]. *n*-Хлормеркурибензоат, иммобилизованный на сефарозе, использован для разделения  $\alpha$ -галактозидазы (КФ 3.2.1.22) и  $\beta$ -галактозидазы (КФ 3.2.1.23) [53]. Следует упомянуть о возможности применения для АФХ иммобилизованных эффекторов ферментов. Так, низкомолекулярный эффекторный гликопротеин использован для очистки глюкоцереброзидазы (КФ 3.2.1.45) [54].

Природа специфического (?) связывания гликозидаз с некоторыми лигандами остается невыясненной. *N*-ацетил- $\beta$ -*D*-гексозаминидаза (КФ

3.2.1.30) адсорбировалась на иммобилизованном Ар-1-тио-β-*L*-фукопиранозиде [55], иммобилизованный гепарин связывал α-*L*-идуронизидазу (КФ 3.2.1.76) [56], а овальбумин — β-галактозидазу и α-*D*-маннозидазу (КФ 3.2.1.24) [57]. Последний лиганд связывал также протеиназы и галактозилтрансферазу и наряду с феилацетатом [58] может быть отнесен к общим лигандам в АФХ [13]. Во многих работах для очистки гликозидаз нашла применение иммуноадсорбция [59, 60].

*Вставки* [13]. Метод ковалентного присоединения выбранного лиганда к твердому носителю зависит от природы лиганда. Низкомолекулярные вещества чаще всего присоединяют через вставку для устранения стерических препятствий при взаимодействии лиганда с активным центром фермента. Однако становится все более очевидным, что во многих случаях увеличение сродства гликозидазы к лиганду при использовании вставок определяется не стерическими эффектами, а гидрофобной и заряженной природой самой вставки. В результате процесс очистки приобретает характер гидрофобной и ионообменной хроматографии. Вследствие этого остается актуальным применение в аффинных адсорбентах гидрофильных и незаряженных вставок.

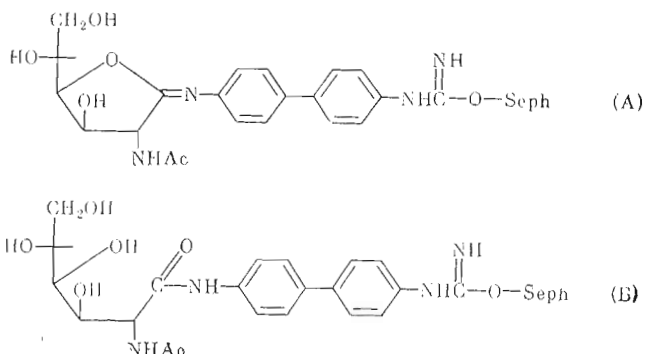
В АФХ гликозидаз нашли применение ω-аминоалкильные [61], ω-карбоксиялкильные [62], пептидные [63], бензидиновые [64], гидразидные [65], а также гидрофильные вставки, содержащие на конце реакционно-способную эпокси-группу [48]. Представления о желательности и даже необходимости вставок в аффинных адсорбентах для очистки гликозидаз в значительной степени поколеблены недавней работой [42], авторы которой присоединяли Ар-тиогликозиды к BrCN-Seph без вставки и успешно использовали полученные адсорбенты для очистки β-галактозидазы и *N*-ацетил-β-*D*-гексозаминидазы. Авторы пришли к заключению, что вставки не являются необходимым компонентом аффинных адсорбентов для «узнавания» лигандов гликозидазами. Этот вывод противоречит результатам других исследователей [66, 67] и нуждается в дополнительной экспериментальной проверке.

*Синтез адсорбентов.* В рамках настоящего обзора невозможен подробный анализ химических методов иммобилизации веществ углеводной природы на твердых носителях. Проблема синтеза биоадсорбентов для АФХ гликозидаз будет рассмотрена лишь в общих чертах. При синтезе адсорбентов предпочтительнее следует отдать тем методам, которые обеспечивают первоначальное получение аддукта лиганд — вставка с последующим его присоединением к твердому носителю [68]. Этот путь сводит к минимуму количество заряженных или реакционноспособных групп в аффинном адсорбенте. Его недостаток — необходимость довольно сложной синтетической работы. Более простой путь — присоединение вставки к носителю с последующей конденсацией с тем или иным лигандом. В одних случаях свойства полученных адсорбентов не отличаются от аналогичных адсорбентов, синтезированных по первому способу [69], в других — остаточные активные группы вставок на адсорбенте могут легко блокироваться стандартными методами [64].

Синтез аффинного адсорбента часто сводится к созданию ковалентной связи между амино- и карбоксильными компонентами, в связи с чем широкое применение для решения этой проблемы получили методы пептидного синтеза. Так, для получения системы лиганд — вставка гликозиламины конденсировали с *N*-защищенными ω-аминокислотами методом смешанных ангидридов с последующим удалением *Z*- или *Boc*-защитных групп и присоединением продуктов к BrCN-Seph [70, 71]. Лиганды с ароматической или алифатической аминогруппой присоединяли к карбоксипроизводным сефарозы с помощью водорастворимых карбодимидов или дициклогексилкарбодимида [67, 72]. В работе [72] продемонстрирована возможность дезацетилирования Ар-2-амино-2-дезокситетраацетил-β-*D*-тиоглюкопиранозильного лиганда с помощью NaOMe в MeOH после его

присоединения к сефарозе. Карбодимидный метод был использован и для присоединения лактонов углеводов, например 2-ацетидамо-2-дезоксид-*D*-глюконо-1,4-лактона, к бензидин-Seph, причем предполагают два типа связи в полученном адсорбенте — иминоэфирную (А) или амидную (Б) [47] (схема 1).

С х е м а 1

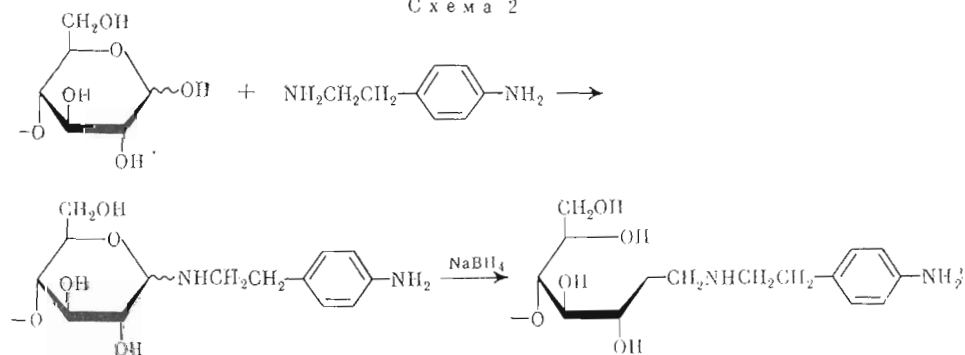


Авторы полагают, что лишь циклическая структура А ответственна за связывание *N*-ацетил- $\beta$ -*D*-гексозаминазы.

Метод активированных эфиров применен в работе [73] при присоединении *Ar*- $\beta$ -*D*-тио-*N*-ацетилглюкозаминида к *N*-оксисукцинимидному эфиру Suc-амидаалкил-Seph. Лиганды с первичной аминогруппой могут быть непосредственно присоединены к сефарозе триазинным методом [41]. В ряде работ лиганды с ароматической аминогруппой присоединяли к пептидным вставкам с концевым тирозином через диазосвязь [63, 66]. Реакция алкилирования использована для иммобилизации фетуина на бром-ацетилцеллюлозе [38].

Взаимодействие гидразионосителей с лигандами, содержащими альдегидные группы, — удобный метод синтеза аффинных адсорбентов [65]. Следует отметить, что альдегидные группы легко вводятся в олиго- и полисахариды с помощью контролируемого периодатного окисления [74]. Недавно Хамазаки и Хотта [40] синтезировали новый адсорбент для очистки  $\beta$ -галактозидазы, отличающийся высоким удельным содержанием лиганда (27–30 мкмоль/мл геля). Адсорбент был получен конденсацией лактозы с гидразидным производным полиакриламида. Авторы предполагают гидразоновый тип связи между дисахаридом и полиакриламидом. Другой простой метод для присоединения восстанавливающих олигосахаридов к носителю основан на их реакции с алкиламинами, впервые описанной Степаненко с сотр. [75]. Образующиеся *N*-алкил-*N*-гликозиды легко гидролизуются, но могут быть восстановлены в устойчивые вторичные амины. Учитывая, что олигосахариды не реагируют с ариламинами в отсутствие катализатора, Джеффри и др. [76] предложили способ иммобилизации олигосахаридов путем их реакции с 2-*Ar*-этиламином, восстановления и конденсации с BrCN-Seph (схема 2).

С х е м а 2



Недавно этот способ использован для иммобилизации лактозы и очистки на полученном адсорбенте  $\beta$ -галактозидазы [77].

Заслуживает особого внимания синтез адсорбентов для АФХ гликозидаз с использованием эпоксиактивированной сефарозы. После того как Порат и Саидберг [78] разработали метод активации сефарозы бифункциональными оксирапами, а фирма Pharmacia Fine Chemicals начала выпускать коммерческий препарат «эпоксиактивированная сефароза 6В», указанный метод нашел применение и для иммобилизации углеводов, олиго- и полисахаридов [48, 79]. Преимущества этого метода очевидны: отпадает необходимость модификации углеводного лиганда, поскольку присоединение может проходить по ОН-группам, лиганд присоединяется к носителю прочной простой эфирной связью через гидрофильную и незаряженную вставку. Наиболее подробно химические аспекты присоединения углеводов к эпокси-Seph рассмотрены в работе [80]. Авторы установили, что невосстанавливающие сахара достаточно устойчивы в жестких щелочных условиях присоединения, причем реакция протекает главным образом по первичной ОН-группе. Модельные эксперименты с глюкозамином показали, что аминогруппа в 6 раз более реакционноспособна в реакции с эпоксигруппой, чем первичная ОН-группа. В работах [81, 82] сообщаются оптимальные условия иммобилизации углеводов на сефарозе с помощью эпихлоргидрина.

Недавно Ототани и Ёсизава [83] сообщили о получении адсорбентов нового типа путем обработки АН-Seph, содержащей ковалентно связанные гликозаминогликаны (например, дерматансульфат — АН-Seph или гепарин — АН-Seph), раствором дерматансульфата. В результате взаимодействия иммобилизованного гликозаминогликана с находящимся в растворе дерматансульфатом полученные адсорбенты содержали как ковалентно связанный гликозаминогликан (39,17 мкг/мг сухого геля в случае дерматансульфат — АН-Seph), так и нековалентно связанный (5,63 мг/мл адсорбента). Наличие «покрывающего» дерматансульфата существенно увеличивает емкость адсорбента. Так, емкость адсорбента, содержащего только ковалентно связанный дерматансульфат, по отношению к хондроитиназе (гиалуроноглюкозаминидаза, КФ 3.2.1.35) составляла лишь 10% емкости «покрытого» дерматансульфатом адсорбента. Другое преимущество адсорбентов с нековалентно связанными гликозаминогликанами — возможность полного удаления «покрывающего» полисахарида (совместно с балластными белками и продуктами ферментативного гидролиза) с помощью 0,6 М NaCl; затем адсорбент может быть вновь покрыт гликозаминогликаном и использован повторно.

*Адсорбция.* В большинстве работ адсорбцию гликозидаз на аффинных сорбентах проводили при низкой ионной силе УБР и оптимальном для данного фермента значении рН [72, 84]. Использование для адсорбции УБР с низкой ионной силой (или даже воды) [24, 80, 85] создает предпосылки для нежелательных неспецифических ионообменных взаимодействий при очистке фермента. Как правило, повышение ионной силы УБР обеспечивает возможность последующей биоспецифической элюции фермента [55, 86, 87]. Вместе с тем при АФХ на лиганде с низким сродством к гликозидазе при повышенной ионной силе УБР способность фермента связываться с адсорбентом может существенно уменьшаться [72].

Варьируя значения рН УБР, можно добиться повышения биоспецифичности процесса АФХ и степени очистки гликозидазы. Так, при АФХ нейраминидазы (КФ 3.2.1.18) на адсорбенте с иммобилизованной Ар-оксаминовой кислотой в УБР с рН~5,5 очищенный препарат фермента содержал значительное количество балластных белков [88, 89]; в УБР с рН 7,5 на том же адсорбенте фермент выделен в высокоочищенном виде [88]. Кравченко и Черкасов [29] изучали механизм образования фермент-субстратного комплекса лизоцима (КФ 3.2.1.17) с хитином методом АФХ при различных рН. Авторы обнаружили два вида комплекса: один из них

(рН УБР 4–5) разрушался в воде, в то время как другой (рН УБР 8–9) был стабилен в воде и для элюции лизоцима требовалась 0,1 М АсОН.

Еще один фактор адсорбции в АФХ — температура УБР. Чаще всего в АФХ гликозидаз адсорбцию проводят при пониженной температуре, вплоть до 0° С [90]. В тех случаях, когда сродство фермента к лиганду увеличивается при повышенной температуре, процесс адсорбции ведут при комнатной температуре [54] или даже при незначительном нагревании [85]. Что касается скорости тока при нанесении раствора фермента на аффинный адсорбент, то она зависит от сродства гликозидазы к лиганду и кинетических параметров образования комплекса фермент — лиганд. Укажем лишь на некоторые специальные приемы. В работе [85] для адсорбции лизоцима на хитозане инкубировали раствор фермента с адсорбентом 30 мин при 30° С в воде при рН 9. При введении N-ацетил-β-D-гексозаминидазы на иммуноадсорбент применяли перколяцию раствора неочищенного фермента через колонку в течение 20 ч [91].

В некоторых работах для обеспечения растворимости и стабилизации активности мембраносвязанных гликозидаз АФХ проводили в присутствии 0,05–0,15% детергентов. Для этой цели применяли, например, неионные детергенты тритон X-100 [54, 90] и тритон WR 1339 [92]. С целью стабилизации α-галактозидазы ее адсорбцию осуществляли в буферном растворе на основе 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты, содержащем 5% бутанола [93]. Другой прием стабилизации гликозидазы применили Эдвард и Старгеон [24], введя в УБР при АФХ α-D-маннозидазы 2 мМ ZnSO<sub>4</sub>. В отсутствие Zn<sup>2+</sup> в УБР фермент элюировался с колонки при низкой ионной силе (0,03 М NaCl), что приводило к его дезактивации. В присутствии Zn<sup>2+</sup> сродство фермента к аффинному адсорбенту возрастало и для элюции требовался уже 0,5 М NaCl, при этом активность сохранялась. В заключение вновь отметим работу Хоу [54], в которой автор вводил в УБР помимо тритона X-100 фосфатидилсерин, фосфатидную кислоту или фосфоинозитид в концентрации 1 мг/мл, поскольку в отсутствие этих фосфолипидов солибилизованная глюкоцереброзидаза утрачивала сродство к лиганду.

Таким образом, адсорбция фермента на аффинный сорбент — важный этап АФХ. Правильно подобранные условия адсорбции — необходимый компонент для успеха всего процесса биохроматографической очистки гликозидаз.

*Элюция.* На заключительной стадии АФХ гликозидаз, элюции связанного с аффинным адсорбентом фермента, нашли применение неспецифические, биоспецифические и специальные методы. Очевидно, что при прочих равных условиях биоспецифическая элюция имеет преимущества по сравнению с неспецифическими методами, обеспечивая высшую степень очистки фермента [61, 62]. К сожалению, указанный вид элюции не всегда оказывается возможным. Причина этого заключается в участии неспецифических сил в связывании фермента с адсорбентом, что приводит к необходимости довольно жестких условий для элюции.

Ниже мы кратко остановимся на неспецифических приемах элюции. К их числу относятся увеличение ионной силы ЭБР [45, 94], изменение рН [95, 96], температуры [33, 90], введение в ЭБР веществ (до 40%), уменьшающих гидрофобные взаимодействия [97] (этиленгликоля [42, 98], изопропанола [99], диметилформамида [100] и т. д.), введение в ЭБР детергентов [89, 101]. Иногда десорбция гликозидазы достигается лишь при критических значениях рН или в денатурирующих условиях. Так, элюцию лизоцима с хитозана проводили 2% раствором пропиламина (рН 11,5), при АФХ того же фермента из видов *Bacillus ML-208* на иммобилизованном лизоцимном лигате бактериальных клеточных стенок элюцию осуществляли 2 М гуанидинхлоридом, рН 5,8. (Следует отметить, что другой бактериальный лизоцим из видов *Streptomyces P-51* легко десорбировался с идентичного сорбента 0,5 М NaCl при рН 5 [50]. Подобные

различия в поведении при АФХ одного и того же фермента из различных источников встречаются довольно часто [45, 87].) Особенно жесткие условия элюции необходимы при иммуноадсорбционной очистке гликозидаз (5–8 М мочевины) [37]. При критических условиях элюции с целью сохранения активности фракции, содержащие фермент, немедленно диализуют, подвергают гель-фильтрации или разбавляют соответствующим концентрированным буферным раствором [102].

В ряде работ при неспецифической элюции используется «batch»-процесс. Так,  $\alpha$ -амилаза из *Helix pomatia* десорбирована с поперечноспитого гликогена суспендированием адсорбента в ЭБР при 37°С [33]. В случае неэффективности перечисленных выше приемов неспецифической элюции применяют их комбинации, например одновременное изменение рН и увеличение ионной силы [102] или изменение трех факторов — рН, ионной силы и температуры [42] и т. д. Необходимость применения неспецифических способов элюции свидетельствует о том, что процесс очистки в рассматриваемых случаях, по-видимому, не является подлинно биоспецифическим.

К специальным методам элюции следует отнести широко используемую при АФХ гликозидаз десорбцию с помощью боратных буферных растворов. Десорбция фермента при этом достигается не только и не столько за счет щелочных значений рН, сколько в результате образования комплекса боратного иона с углеводным лигандом. Например, десорбция нейраминидазы с иммобилизованного  $\alpha$ -кислого гликопротеина человека достигалась 0,1 М боратным буфером, рН 8,5, в то время как бикарбонатный буфер с рН 9,1 был неэффективным [103]. Автор предполагает образование боратного комплекса с полиоксидепью N-ацетилнейраминной кислоты гликопротеина. Еще один пример такого рода представлен в работе Баума [39]:  $\beta$ -галактозидаза элюировалась с аффинного адсорбента 0,1 М боратным буфером, рН 7,5, но не трис-буфером той же молярности и рН. К специальным методам можно отнести также элюцию  $\beta$ -галактозидазы с *n*-хлормеркурибензоат-Seph 0,1 М раствором цистеина [53].

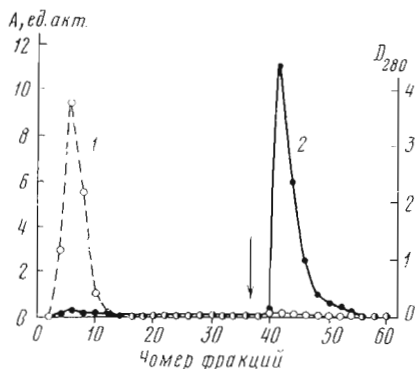
Только биоспецифическая элюция может рассматриваться как надежное доказательство биоспецифичности процесса очистки, когда добавление субстрата [57] или ингибитора [61] в ЭБР в количествах, которые не могут повлиять на ионообменные или гидрофобные взаимодействия, вызывает десорбцию гликозидазы. Для десорбции нейраминидазы с фетуинсефарозы достаточно было присутствия в ЭБР ингибитора фермента — 2-дезоксиде-2,3-дегидро-N-трифторацетилнейраминной кислоты ( $K_i$   $5 \cdot 10^{-6}$  М) в 0,1 мМ концентрации [90]. На рис. 1 представлена АФХ частично очищенной 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -D-галактозид- $\beta$ -галактозидазы из печени человека на Gal1 $\beta$ S-АН — Seph [86]. Фермент элюировался в электрофоретически гомогенном виде при добавлении в УБР (10 мМ Na-ацетатный буфер (рН 5), 100 мМ NaCl) ингибитора — D-галактозо- $\gamma$ -лактона (100 мМ).

Особенно эффективна биоэлюция при АФХ на полимерных лигандах. Более того, часто в этих случаях неспецифическая элюция в довольно жестких условиях не приводит к цели. Так, не удалось десорбировать  $\alpha$ -амилазу из *Tenebrio molitor* L. с иммобилизованного белкового ингибитора при высокой ионной силе (до 2 М) или низком рН (до 4), однако фермент элюировался при добавлении 0,5 М мальтозы или 1% желатинизированного крахмала в УБР [49]. Като с сотр. [31] не смогли элюировать изоамилазу (КФ 3.2.1.68) с амилозного геля при рН 3–7,5 или при 1–20% концентрации NaCl в ЭБР; количественная десорбция была достигнута 5% раствором мальтодекстрина в УБР в присутствии 0,5 М NaCl.

Высокобиоспецифична АФХ гликозидаз на иммобилизованных лектинах. Кислотная  $\beta$ -галактозидаза из печени человека десорбируется с ConA-Seph 0,7 М метил- $\alpha$ -D-маннозидом при 20°С (при 2°С фермент не



Рис. 1. АФХ частично очищенной 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -D-галактозид —  $\beta$ -галактозидазы (451 мг белка) из печени человека на GalHS-AH — Serph. Объем колонки 2x2 см. Объем фракций 21 мл. Стрелкой указан момент добавления 100 мМ D-галактоно- $\gamma$ -лактона в ЭБР. 1 — абсорбция при 280 нм, 2 — активность фермента [86]



элюируется), в то время как неспецифическая элюция (1 М NaCl, 1% тритона X-100, 0,5% цетилпиридинийхлорида и др.) была неэффективной [104]. Подобные примеры можно было бы продолжить. В свете вышесказанного трудно объяснить результат Мейера и Хепкеля [32], которые десорбировали  $\alpha$ -амилазу с поперечносшитого декстрина 6 М мочевиной.

Для десорбции  $\alpha$ -амилазы с гликоген-сефарозы Ткачук [84] применил 0,4% раствор гликогена и назвал этот вид хроматографии конкурентной АФХ. Виолие вероятно, что при АФХ гликозидаз может найти применение также «динамическая биоспецифическая элюция», использованная при очистке гликогенфосфорилазы на гликоген-сефарозе [105]. Смысл последнего способа заключается в создании, после адсорбции фермента на аффинном адсорбенте с иммобилизованным субстратом, благоприятных условий для ферментативной реакции, что приводит к частичной деградации лиганда и десорбции фермента.

В ряде работ [31, 84] показано, что перед биоэлюцией целесообразно промыть колонку различными буферными системами для удаления неспецифически связанных балластных белков. Для отделения полимерного субстрата, использовавшегося для биоспецифической элюции гликозидазы, проводят его ферментативную деградацию с последующей ультрафильтрацией, диализом [84] или гель-фильтрацией [96].

Следует упомянуть еще об одной возможности биоэлюции — десорбции отдельных ферментов, связанных на одном адсорбенте с общим лигандом. В работе [58] для этой цели использованы соответствующие ингибиторы: с феилацетилгидразидадипинил-Serph индолем вымывали химотринсин, а 1,5 М имидазолом — лизоцим; при градиентной элюции имидазолом разделяли лизоцим и хитиназу (КФ 3.2.1.14).

Некоторые гликозидазы, элюированные с аффинного адсорбента в высокоочищенном виде, весьма неустойчивы. Для их стабилизации в соответствующие фракции добавляют ингибиторы или субстраты ферментов [86, 100], белки,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  [106] или применяют другие способы стабилизации ферментных препаратов.

### Применение АФХ для очистки гликозидаз

В главе рассмотрены примеры очистки конкретных ферментов этого класса.

**$\alpha$ -Глюкозидазы.** При АФХ  $\alpha$ -глюкозидаз широкое применение нашли биоспецифические носители. Для очистки экзомальтотетраогидролазы (КФ 3.2.1.60) из *Pseudomonas stutzeri* в качестве бионосителя был использован сефадекс G-100 [20]. Несмотря на то что фермент специфичен к  $\alpha$ -1,4-связи, он адсорбировался на сефадексе, поскольку растворимый декстран — конкурентный ингибитор этой глюкозидазы. Аналогичные ферменты из *Aspergillus oryzae* и *B. subtilis* лишь слегка задерживались

на сефадексе G-100. Фермент из *Ps. stutzeri* элюировали с сефадекса 1% раствором крахмала или градиентом (0→2 М) NaCl.

Другой пример применения сефадекса описан в работе [99]: для отделения кислой  $\alpha$ -глюкозидазы ( $\gamma$ -амилазы, КФ 3.2.1.3) от примеси  $\alpha$ -галактозидазы,  $\alpha$ -L-фукозидазы (КФ 3.2.1.51) и N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы применяли хроматографию на сефадексе G-200.  $\gamma$ -Амилаза задерживалась на адсорбенте за счет образования комплекса, подобного фермент-субстратному, а примесные гликозидазы выходили с колонки в соответствии со своим молекулярным весом.

$\alpha$ -Амилаза бактериального и растительного происхождения адсорбировалась на крахмале, поперечно сшитом эпихлоргидрином, и элюировалась раствором, содержащим 2 М мальтозу [30].  $\beta$ -Амилаза не связывалась с крахмалом, что позволило разделить эти ферменты. Като с сотр. [31] описали получение амилозного геля обработкой амилозы эпихлоргидрином и очистили на полученном адсорбенте изоамилазу (гликоген-6-глюканогидролазу) из *Ps. amyloclavata*.  $\alpha$ -Амилаза из *H. pomatia* очищена на нерастворимом гликогене, полученном после активации полисахарида BrCN и обработки гексаметилендиаминном [33]. Емкость адсорбента была весьма высокой — 33 мг фермента/мл геля. Авторы отмечают, что связывание  $\alpha$ -амилазы с гликогеновым адсорбентом не является полностью обратимым, выход фермента на стадии АФХ не превышал 50%.

Высокоэффективные адсорбенты для  $\alpha$ -глюкозидаз получены при соединении СНА [48] или СНРА (Шардингер- $\beta$ -декстрин) [79, 80, 107] к эпоксиактивированной сефарозе. На СНА-Seph была очищена  $\beta$ -амилаза картофеля [48]. Элюцию осуществляли добавлением в УБР 10 мг/мл СНА. Близкий по субстратной специфичности фермент ( $\alpha$ -амилаза) не связывался с СНА-Seph. На том же адсорбенте проведена очистка пуллулан-6-глюканогидролазы (R-фермент, КФ 3.2.1.41) из солодового ячменя [108]. Для данного фермента лиганд — более слабый ингибитор, чем для  $\beta$ -амилазы, поэтому элюцию R-фермента проводили при концентрации декстрина в УБР 11,75 мкг/мл, а затем при концентрации 10 мг/мл выделяли  $\beta$ -амилазу. На адсорбенте СНРА-Seph Сильванович и Хилл [79, 107] провели очистку  $\alpha$ -амилазы из гибрида пшеницы и ржи, элюируя фермент раствором СНРА (8 мг/мл). В аналогичных условиях на СНРА-Seph очищена  $\alpha$ -амилаза из панкреатического сока быка [80]. АФХ  $\alpha$ -амилазы пшеницы проведена на гликоген-Seph (BrCN-активированный гликоген на АН-Seph) [84].

Применение иммобилизованных субстратов для АФХ гликозидаз таит в себе опасность ферментативного гидролиза лиганда в процессе хроматографии. Вероятность дегградации адсорбента исключена при использовании в качестве лигандов полимерных ингибиторов. Так, на белковых ингибиторах из зерен пшеницы очищены  $\alpha$ -амилазы из *T. molitor* L. (лиганд — альбумин с  $M$  12 000), из слюны человека (лиганд — альбумин с  $M$  24 000) и из поджелудочной железы цыпленка (лиганд — суммарная фракция альбуминов) [49].

$\alpha$ -Глюкозидаза (КФ 3.2.1.20) из *Drosophila melanogaster* очищена многостадийным процессом, включавшим АФХ на ConA-Seph, причем  $\alpha$ -глюкозидазы I и II адсорбировались на ConA-Seph, а  $\alpha$ -глюкозидаза III не задерживалась на колонке [109].

Лишь в одной работе [99] для АФХ  $\alpha$ -глюкозидазы применен мономерный лиганд — Ар- $\alpha$ -D-глюкопиранозид, присоединенный к AC-Seph. Хроматография  $\gamma$ -амилазы из селезенки человека на этом адсорбенте была осложнена жесткой неспецифической адсорбцией. Десорбция фермента была достигнута лишь введением в ЭБР 1 М NaCl и 20% изопропанола. В этих условиях элюировались и неспецифически связанные с адсорбентом N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидаза,  $\alpha$ -L-фукозидаза и  $\alpha$ -галактозидаза.

В табл. 1 представлены некоторые результаты по АФХ  $\alpha$ -глюкозидаз.  $\beta$ -Глюкозидазы. Для очистки  $\beta$ -глюкозидаз, так же как и для  $\alpha$ -глюко-

Очистка  $\alpha$ -глюкозидаз методом АФХ

Фермент	Источник фермента	Адсорбент	Выход, %	Степень очистки	Литература
$\alpha$ -Амилаза	Поджелудочная железа человека	Декстрин, поперечно сшитый органическими диизоцианатами	55	—	[32]
	Слюна человека	Белковые ингибиторы—Seph	58	5	[49]
	Панкреатический сок быка	СНРА—Seph	95	—	[80]
	Поджелудочная железа цыпленка	Белковые ингибиторы—Seph	—	90	[49]
	Пшеница	Гликоген—Seph	82–85	93	[84]
	<i>Triticosecale Wittmack</i>	СНРА—Seph	92	5,5	[79]
	<i>H. pomatia</i>	Поперечносшитый гликоген (СNBr + гексаметилендиамин)	33 *	184 *	
		Поперечносшитый гликоген (СNBr + гексаметилендиамин)	44	17	[33]
	Бактериального или растительного происхождения	Крахмал, поперечно сшитый эпихлоргидрином	60	—	[30]
$\gamma$ -Амилаза	Селезенка человека	Glc1 $\alpha$ -Ap—AC-Seph	62	108	[99]
Изоамилаза	<i>Ps. amylocleramosa</i>	Амилоза, обработанная эпихлоргидрином	70	93	[31]
Экзомальтотетраогидролаза	<i>Ps. stutzeri</i>	Сефадекс G-100	—	60	[20]
Пулдулан-6-глюкогидролаза	Солодовый ячмень	СНА—Seph	45	24,5	[108]

\* Здесь и далее в таблицах звездочкой отмечены величины, вычисленные суммарно на весь процесс очистки.

зидаз, часто использовался принцип АФХ на нерастворимом субстрате. Еще в 1961 г. Халливел [110], а позднее японские авторы [111] провели очистку целлюлазы (КФ 3.2.1.4) АФХ на целлюлозе. Недавно Халливел с сотр. [23] описали АФХ целлюлазной системы *Trichoderma koningii* (целлобиаза, СМ-целлюлаза, компонент С<sub>2</sub> и целлобиогидролаза) на целлюлозе, причем элюция ферментов проведена при уменьшенной ионной силе ЭБР по сравнению с УБР. В ряде работ [24, 112] проведена биоспецифическая очистка  $\beta$ -(1→3)глюкангидролазы (КФ 3.2.1.6) из *H. pomatia* хроматографией на колонке с пахиманом. Для удаления примеси  $\beta$ -(1→3)-глюканазы из  $\beta$ -(1→4)глюканазы (КФ 3.2.1.4) использовали адсорбцию первого фермента на нерастворимом ламинарине [25]. Отмечая в качестве недостатка использования ламинарина и пахимана их низкую степень полимеризации и быстрый ферментативный гидролиз, Вилла с сотр. [26] провели очистку  $\beta$ -(1→3)глюкангидролазы из *C. utilis* на нерастворимом  $\beta$ -(1→3)глюкане из тех же дрожжей, причем высота колонки не превышала 2 см. Если в работах [24, 112] элюцию проводили боратным буфером, то в работе [26] десорбция достигалась добавлением 2 М NaCl в УБР.

В некоторых работах по АФХ  $\beta$ -глюкозидаз в качестве лиганда использовали гликопротеины. Например, гликопротеин клеточных стенок хлебопекарных дрожжей, содержащий разветвленный полисахарид с 1→3- $\beta$ -D-глюкопиранозильными остатками, был иммобилизован на сефарозе и использован для очистки (1→3)- $\beta$ -D-глюкангидролаз из *H. pomatia*,

Очистка  $\beta$ -глюкозидаз методом АФХ

Фермент	Источник фермента	Адсорбент	Выход, %	Степень очистки	Литература
Глюкоцереброзидаза	Селезенка человека	Эффекторный гликопротеин-Seph	—	188	[54]
»	Плацента человека	Фосфатидилсерин-Seph	60 *	6000 *	[98]
Глюкозилцерамид- $\beta$ - <i>D</i> -глюкозидаза	Селезенка быка	<i>D</i> -Глюконолактон-бензидин-Seph	100	337	[101]
Глюкозилсфингозин- $\beta$ - <i>D</i> -глюкозидаза	То же	То же	100	758	[101]
4-Метилумбеллиферил- $\beta$ - <i>D</i> -глюкозидаза	»	»	100	550	[101]
$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)Глюкангидролаза	<i>C. utilis</i>	$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)Глюкан из <i>C. utilis</i>	40	41	[26]
$\beta$ - <i>D</i> -Глюкозидаза	<i>C. guilliermondii</i>	$\beta$ - <i>D</i> -Глюкозид салицилового альдегида — гидразидоадипинил-Seph	27 *	12,5 *	[65]
$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)Глюкангидролаза	<i>Tr. viride</i> QM 9414	Антисыворотка-Seph	47	26	[113]

*Bacidiomycete* QM 806 и других источников [24]. Хоу [54] осуществил АФХ мембраносвязанной глюкоцереброзидазы на адсорбенте с эффекторным гликопротеином, выделенным из селезенки пациента с болезнью Гаушера. Все буферные растворы содержали 0,05% тритона X-100, а адсорбцию фермента проводили при 20°С (при 4°С связывается лишь 10% фермента) и в присутствии 1 мг/мл кислых глицеринфосфатидов. Тот же фермент из плаценты человека очищен АФХ на ConA-Seph [92] с последующим осаждением смесью спирт-хлороформ (9:1). По-видимому, большая степень очистки данного фермента достигнута Дэйлом и др. [98], включившими на заключительной стадии процесса очистки АФХ на фосфатидилсерин-Seph. Выбор лиганда определялся тем фактом, что глюкоцереброзидаза взаимодействует с кислыми фосфолипидами. Однако процесс очистки наряду с истинно биоспецифическим средством включает, вероятно, и гидрофобные взаимодействия. Для облегчения элюции фермента аффинный адсорбент разбавляли незамещенной сефарозой до концентрации лиганда 20 нмоль/мл геля, а десорбцию проводили в присутствии 1 М NaCl и 40% этиленгликоля.

$\beta$ -*D*-Глюкозидазы из селезенки быка выделены на глюконолактоне, присоединенном к бензидин-Seph [101]. Имобилизованный ингибитор связывал глюкозилцерамид- $\beta$ -*D*-глюкозидазу, глюкозилсфингозин- $\beta$ -*D*-глюкозидазу и 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -*D*-глюкозид- $\beta$ -глюкозидазу, причем выход каждого фермента превышал 100% (удаление ингибирующих веществ). Элюция осуществлена в присутствии 1% тритона X-100. Для АФХ  $\beta$ -*D*-глюкозидазы (КФ 3.2.1.21) из *C. guilliermondii* в качестве лиганда использован низкомолекулярный субстрат: салицин окисляли кислородом воздуха в присутствии платинового катализатора и полученный альдегид присоединяли к гидразидоадипинил-Seph [65].

Иммуноадсорбция  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)глюканазы из *Trichoderma viride* QM 9414 описана в работе [113]. Десорбция фермента проведена при pH 2,5.

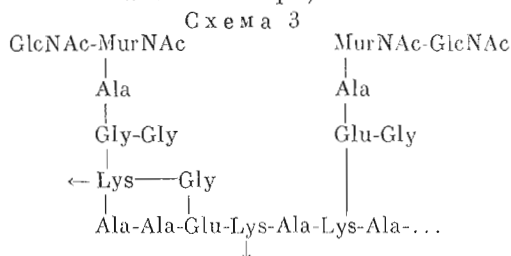
Данные по очистке  $\beta$ -глюкозидаз методом АФХ приведены в табл. 2.

*Лизоцим*. Широкое применение для выделения и очистки лизоцима из различных источников получила АФХ на хитине и его производных. Хи-

гин — нерастворимый и медленно гидролизуемый субстрат лизоцима. Впервые об адсорбции лизоцима на хитине сообщил Нозу [114]. В серии работ Кравченко с сотр. [27, 29, 115—118] исследовали различные аспекты АФХ лизоцима на производных хитина. В частности, была изучена зависимость сорбции лизоцима от pH, ионной силы и температуры [116], выделены продукты избирательного фотоокисления лизоцима по триптофану [117]. Аналогичной хроматографией был выделен лизоцимоподобный фермент из культуральной жидкости *S. aureus*, который в отличие от лизоцима оказался не мурамидазой, а эндо- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-ацетилглюкозаминидазой [119]. На колонке с хитином удалось отделить лизоцим от ингибитора [120]. Был выделен лизоцим, связанный с фагом T2, спустя 8 мнп после инфицирования клеток *E. coli* [120], причем активность фермента увеличивалась в 3 раза по сравнению с активностью в экстракте клеток. Аналогично выделен T4-лизоцим [124, 122]. В работе [123] определены изотермы адсорбции лизоцима и хитиназы на хитине при двух температурах, измерены скорости гидролиза хитина при действии указанных ферментов при различных температурах и концентрациях.

Для выделения лизоцима использовались также амфотерный полиэлектролит карбоксиметилхитин [28, 124] и дезаминированный хитин (глюкохитин) [29, 124], а также целлюлоза, покрытая хитином [35]. В работе [29] при АФХ лизоцима для исключения неспецифического связывания яичного альбумина с адсорбентом за счет  $\text{NH}_2$ -групп, присутствующих в хитине в результате его частичного дезацетилирования при выделении, проводили предварительное дезаминирование хитина азотистой кислотой. Эта обработка не препятствовала последующей адсорбции лизоцима. Емкость дезаминированного адсорбента составляла 15—30 мг лизоцима/г. Недавно [85] для АФХ лизоцима из яичного белка был использован недеградируемый ферментом хитозан. В работе [125] предложен простой, одностадийный метод очистки лизоцима. Авторы обнаружили, что лизоцим в отличие от других белков смеси задерживается на биогеле А и выходит значительно позже полного объема колонки. Связывание лизоцима с агарозой объяснено сходством последней с хитином и мукополисахаридными компонентами бактериальных клеточных стенок.

В 1974 г. было обнаружено [126], что лизоцим эффективно сорбируется на лизоцимном лизате клеточных стенок *M. lysodeikticus*, присоединенном к BrCN-Seph. Сорбция фермента объясняется тем, что ди- и тримеры N-ацетилглюкозамина, а также GlcNAc-MurNAc (MurNAc — N-ацетилмурамовая кислота), представляющие собой компоненты лизата, являются ингибиторами лизоцима. Фермент адсорбировался даже при 2 M концентрации NaCl в УБР. Предполагаемая структура лиганда изображена на схеме 3 [126] (стрелки указывают место присоединения пептидогликана через  $\epsilon$ -аминогруппы лизина к BrCN-Seph):



При помощи хроматографии на указанном адсорбенте лизоцима, окисленного N-бромсукцинимидом или обработанного  $\text{I}_2$ , показана важность Trp-62 и Trp-108 для связывания субстрата. На том же адсорбенте проведена очистка лизоцима яичного белка перепела, молока и слюны человека, *Bacillus* sp. ML-208, *Pseudomonas*-литического фермента из *Streptomyces* sp. P-51 [50], а также из слез, сыворотки и мозга пациентов с различными заболеваниями, в частности лейкемией [127]. Если лиганд

## Очистка лизоцима методом АФХ

Источник фермента	Адсорбент	Выход, %	Степень очистки	Литература
Молоко человека	Лизоцимный лизат клеточных стенок <i>M. lysodeikticus</i> -Seph	61	25	[50]
Слюна человека	То же	80	18	[50]
Сыворотка больных лейкоемией	»	80	100-200	[127]
Белок куриного яйца	»	90	—	[126]
Белок перепелиного яйца	»	82	250	[50]
<i>Bacillus</i> sp. ML-208	»	60	500	[50]
<i>Streptomyces</i> sp. P-51 (Pseudomonas-литический фермент)	»	70	11	[50]
Молоко человека	Фенилацетил-гидразидадипинил-Seph	340 *	74 *	[58]
Белок куриного яйца	То же	94	52,8	[58]
Репа	»	22,4	672	[58]
Слюна человека	GlcNAc1 $\beta$ -Ap-Suc-DA-Seph	100	90	[129]
Белок куриного яйца	То же	100	20,3	[129]
То же	Хитозан	55	—	[85]
»	Биогель А	100	74	[125]
Фаг Т4	Хитин	—	150	[122]
<i>A. rubens</i>	Хитотетраоза-эпоксидированная сефароза	80	3,7	[128]

предварительно N,O-ацетилировали, а затем присоединяли к аминоксил-Seph по  $\alpha$ -COOH-группам глицина с помощью EDC, адсорбент терял свойство связывать лизоцим. Авторы работы [127] полагают, что это результат стерических затруднений. Новый тип лизоцима беспозвоночных выделен из морской звезды *Asterias rubens* АФХ на хитотетраозе, присоединенной к эпоксидированной сефарозе [128].

Из низкомолекулярных лигандов для очистки лизоцима применялся Ар- $\beta$ -D-N-ацетилглюкозаминид [129], являющийся ингибитором фермента. Описана также хроматография лизоцима на лиганде небioхимической природы — фенилацетате [58]. Авторы сравнивают фенилацетат с другими общими лигандами, такими, как Cibachrome F3GA, применяемый для очистки некоторых киназ и дегидрогеназ.

В табл. 3 приведены некоторые данные по очистке лизоцима методом АФХ.

**Нейраминидаза.** Нейраминидаза — важный фермент, используемый как инструмент для изучения клеточной поверхности и роли сialовой кислоты *in vivo*. Корректная интерпретация биологических результатов, полученных при исследованиях с нейраминидазой, возможна лишь при работе с чистыми препаратами фермента.

Для очистки нейраминидазы впервые АФХ была применена в 1971 г. [63, 130]. В качестве лиганда использовался конкурентный ингибитор фермента — Ар-оксаминная кислота, присоединенная после диазотирования к сефарозе через Tyr-Gly-Gly-вставку. Полученный адсорбент эффективно связывал фермент при pH 5,5, элюция проводилась при pH 9,1. Таким образом были очищены нейраминидазы из *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, вируса гриппа [63], а также неагглютинирующего (НАГ)-вибриона [131]. С тем же адсорбентом связывались и интактные вирусные частицы, что обусловлено локализацией нейраминидазы на

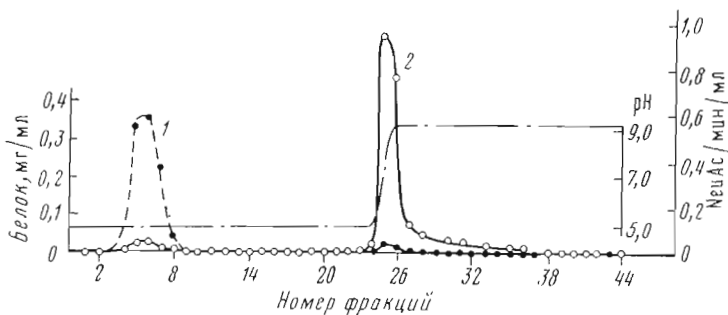


Рис. 2. АФХ нейраминидазы из вируса гриппа, штамм X-7, на адсорбенте Ар-оксаминовая кислота — Tyr-Gly-Gly-Seph. Объем колонки  $2,5 \times 10$  см, скорость тока 180 мл/ч. 1 — белок, 2 — нейраминидазная активность [134]

поверхности частицы [63]. Обращал на себя внимание тот факт, что, несмотря на известные различия в каталитическом оптимуме pH ферментов из этих трех источников, оптимум pH их адсорбции на сорбенте Ар-оксаминовая кислота — Tyr-Gly-Gly-Seph был одинаков ( $\sim 5,5$ ) [63]. Это могло указывать на неспецифический характер адсорбции белков на сорбентах такого типа. Действительно, позднее было показано, что нейраминидаза из *Cl. perfringens*, очищенная на аналогичном адсорбенте с Tyr-Gly-вставкой [88], и нейраминидаза из *V. cholerae* после АФХ на адсорбенте с Tyr-Gly-Gly-вставкой в описанных выше условиях [89] содержали ряд балластных белков. Ден и др. [132] экспериментально подтвердили, что при введении на адсорбент Ар-оксаминовая кислота — Tyr-Gly-Gly-Seph коммерческой нейраминидазы из *Cl. perfringens* при pH 7,5 вместо 5,5 (уменьшение количества катионных зарядов на адсорбенте) очищенный препарат содержал меньше белковых примесей, хотя и был все еще негомогенным.

Киэхара и сотр. [133] получили нейраминидазу в электрофоретически гомогенном состоянии, применив для очистки фермента из *Streptococcus* K 6646 последовательную хроматографию на адсорбенте Ар-оксаминовая кислота — Tyr-Gly-Seph и затем на GlcNAc $1\beta$ S-Ar—Suc-DA-Seph. На первом адсорбенте сорбировалась нейраминидаза,  $\beta$ -галактозидаза и N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидаза. После промывки колонки элюировали N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазу при pH 8 и затем нейраминидазу и  $\beta$ -галактозидазу при pH 9. Последнюю смесь вводили на второй сорбент, причем адсорбировалась лишь  $\beta$ -галактозидаза, а нейраминидаза не связывалась с адсорбентом.

При АФХ нейраминидазы из вируса гриппа на адсорбенте Ар-оксаминовая кислота — Tyr-Gly-Gly-Seph Бухеру [134] удалось добиться увеличения степени очистки фермента более чем в 30 раз по сравнению с работой [63], хотя условия хроматографии были очень близки (рис. 2). Увеличение степени очистки и отсутствие балластных белков в очищенном препарате объясняются: 1) солиubilизацией фермента анионным детергентом — додецилсульфатом натрия — с последующей стабилизацией активности и растворимости с помощью 0,1% тритона X-100 в УБР и ЭБР; 2) использованием очищенного вируса в качестве исходного материала, что уменьшает сложность белковой смеси; 3) возможной селективной инактивацией других белковых фракций в результате применения детергента, что приводит к ослаблению их неспецифического связывания. Недостатком применения детергентов является уменьшение емкости адсорбента, что может быть обусловлено образованием большого активного комплекса нейраминидаза — детергент, проникновение которого в поры агарозного носителя затруднено.

В ряде работ для АФХ нейраминидазы использовали адсорбенты с иммобилизованным фетуином. Фетуин — сиалогликопротеин муцинового

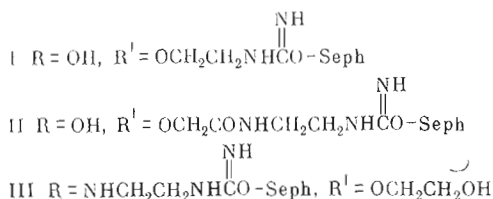
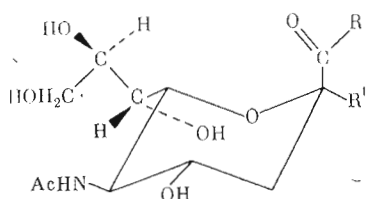
типа. На адсорбенте фетуин — Seph выделены агрегаты геагглютинина и нейраминидазы из вируса гриппа [135]. Индивидуальные гликопротеины выделить не удалось. На том же адсорбенте выделен [90] NH-белок (гликопротеин) вириона парамиксовируса SV5. Указанный гликопротеин обладает как нейраминидазной, так и геагглютинирующей активностью. В процессе очистки во все буферные растворы для предотвращения агрегации гликопротеинов добавляли тритон X-100, не влияющий на активность фермента. Адсорбцию проводили при 0°, а элюцию — при 25° С (ослабление сродства нейраминидазы к лиганду). В указанных условиях авторы обнаружили отщепление небольшого, но измеряемого количества нейраминовой кислоты от адсорбента. В связи с неспецифической сорбцией других белков (что может быть причиной загрязнения последующих препаратов) и постепенным разрушением лиганда не было предпринято попытки повторного использования адсорбента.

Более перспективной представляется биоспецифическая элюция 10<sup>-4</sup> М раствором ингибитора нейраминидазы — 2-дезоксиде-2,3-дегидро-N-трифтор-ацетилнейраминовой кислоты. Для очистки коммерческой нейраминидазы недавно [38] был использован фетуин, иммобилизованный на бромацетилцеллюлозе. Удельное содержание фетуина на этом адсорбенте было в ~4 раза больше, чем в адсорбенте на основе сефарозы. Элюцию осуществляли изменением pH и ионной силы, причем в результате очистки 99% протеиназ удалялось из препарата фермента. Адсорбент мог быть использован по крайней мере 3 раза без заметного уменьшения емкости.

В работе [103] описана АФХ нейраминидазы из *Cl. perfringens* на иммобилизованном на сефарозе α<sub>1</sub>-кислом гликопротеине человека (0,56 мкмоль/мл геля). При перегрузке колонки ферментом наблюдалось отщепление N-ацетилнейраминовой кислоты от лиганда даже при 4° С. При систематической очистке гликозидаз из *Str. (Diplococcus) pneumoniae* для АФХ нейраминидазы в качестве лиганда был выбран гликопротеин из подчелюстного муцина овцы [42], полученный обработкой муцина термолизисом. Десорбцию фермента проводили при 37° С и pH 9 в присутствии 1 М NaCl. Проблемой АФХ нейраминидазы на гликопротеиновых лигандах является ферментативное отщепление от них N-ацетилнейраминовой кислоты с появлением концевой D-галактозы, в результате чего с адсорбентом начинает связываться β-галактозидаза. Поэтому в данном случае ключевое значение имеют количество вводимого на колонку фермента и время процесса. В связи с деградацией лиганда в процессе хроматографии и его доступностью аффинный адсорбент в работе [42] использовался однократно.

Новый тип аффинного адсорбента для очистки нейраминидазы получен поперечной сшивкой колониновой кислоты (гомополимер N-ацетилнейраминовой кислоты — субстрат нейраминидазы) и крахмала с помощью эпихлоргидрина [136]. На этом адсорбенте проведена очистка фермента из *Arthrobacter ureafaciens*, причем полученный препарат не содержал примесей балластных белков.

Хольмквист [137] описал получение ряда α-кетозидов N-ацетилнейраминовой кислоты и их иммобилизацию на сефарозе (адсорбенты I—IV).



Адсорбент IV получали окислением адсорбента II периодатом натрия с последующим восстановлением боргидридом натрия. Показательно, что



## Очистка нейраминидазы методом АФХ

Источник фермента	Адсорбент	Выход, %	Степень очистки	Литература
Вирус гриппа	Ар-оксаминовая кислота-Tyr-Gly-Seph	91	2,2	[63]
»	То же	123	77	[134]
<i>Cl. perfringens</i>	»	105	45	[63]
<i>V. cholerae</i>	»	97	420	[63]
НАГ-вибрион	»	—	120	[131]
<i>Cl. perfringens</i>	Фетуин-бромацетилцеллюлоза	95	10-25	[38]
»	$\alpha_1$ -Кислый гликопротеин человека-Seph	80	200	[103]
Str. K 6646	Ар-оксаминовая кислота-Tyr-Gly-Seph	11 *	1500 *	[133]
	GlcNAc1 $\beta$ S-Ar-Suc-DA-Seph			
<i>Str. pneumoniae</i>	Гликопротеин подчелюстного муцина овцы-Seph	27-80	—	[42]
<i>Arthr. ureafaciens</i>	Коломиновая кислота-крахмал	90,9	5,25	[136]

Таблица 5

Очистка  $\alpha$ -галактозидазы методом АФХ

Источник фермента	Адсорбент	Выход, %	Степень очистки	Литература
Почка человека	Ар-мелибиозид-Suc-DA-Seph	—	16072	[93]
Плазма крови человека	То же	—	48989 (форма А) 12676 (форма Б)	[93]
Плацента человека	ConA-Seph Бутил-Seph	20 *	40000 *	[141]
Фицин	D-Галактонат-бензидин-Seph	—	76	[64]
Бобы какао	Gal1 $\alpha$ N-AC-AC-Seph	—	8600	[139]
Соевые бобы	Gal2 $\alpha$ N-AC-Seph	90	4100	[140]

адсорбенты I, II и IV сильно связывали нейраминидазу из *V. cholerae* при pH 5,5, а адсорбент III был неэффективен, что подтверждает важность COOH-группы субстрата для образования фермент-субстратного комплекса. Емкость сорбента IV была несколько ниже, чем у I и II. Интересно, что при pH 9 не происходила элюция фермента с указанных адсорбентов. Десорбция достигалась биоспецифически при pH 5,5 с помощью бензил- $\alpha$ -кетозида N-ацетилнейраминовой кислоты (200 мкг/мл) в ЭБР. Позднее [138] на подобных адсорбентах была проведена очистка вируса гриппа, содержащего нейраминидазу на поверхности вирусной частицы.

В табл. 4 приведены некоторые данные по АФХ нейраминидазы.

$\alpha$ -Галактозидаза. На галактонат-бензидин-Seph, полученной присоединением D-галактоно- $\gamma$ -лактона к бензидин-Seph с помощью EDC, была очищена  $\alpha$ -галактозидаза фицина [64]. Биоспецифическая элюция была безуспешной; не удалось также разделить  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактозидазы на этом адсорбенте. Тем не менее ни тот, ни другой фермент не связывался с бензидин-Seph (без лиганда). Подчеркивается, что для успешной очистки необходимо предварительно ацетилировать незамещенные NH<sub>2</sub>-группы бензидаина.

Мэйпс и Свилл [93] сообщили о разделении множественных форм  $\alpha$ -галактозидазы (церамидтригексозидазы) из плазмы, почки и мочи человека

и об очистке  $\alpha$ -галактозидазы фицина на Ар-мелибиозиде, присоединенном к Suc-DA-SepH с помощью EDC. Авторы утверждают, что это первый пример присоединения олигосахарида к нерастворимой матрице. Десорбцию фермента проводили добавлением в УБР 0,1% тритона X-100.

В двух работах по АФХ  $\alpha$ -галактозидазы из бобов какао [139] и соевых бобов [140] в качестве лиганда был использован  $\alpha$ -D-галактопиранозиламин, причем в обеих работах элюция ферментов достигалась *n*-нитрофенил- $\alpha$ -D-галактопиранозидом (50 мМ [139]) или D-галактозой (0,1 М [139] и 0,2 М [140]). Синтез адсорбента осуществили конденсацией методом смешанных ангидридов лиганда последовательно с двумя молекулами N-Z- $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты [139], удалением защитной группы и присоединением продукта BrCN-SepH. Позднее [140] был использован адсорбент лишь с одной AC-вставкой (9 мкмоль лиганда/г геля). Разделение и очистка двух основных изоферментов  $\alpha$ -галактозидазы из плаценты человека описаны в работе [141]. Многостадийный процесс наряду с классическими методами включал хроматографию на ConA-SepH и бутил-SepH.

Данные по очистке  $\alpha$ -галактозидазы методом АФХ суммированы в табл. 5.

**$\beta$ -Галактозидаза.** Одной из первых гликозидаз, очищенных методом АФХ, была  $\beta$ -галактозидаза. В 1970 г. Томино и Пайген [36] использовали для этой цели поперечносшитый нерастворимый бычий  $\gamma$ -глобулин с присоединенной в качестве лиганда  $\beta$ -тио-галактозой. Гранулярный, нерегулярный характер и недостаточная пористость этого адсорбента, наличие на нем заряженных групп побудили исследователей искать новые подходы к АФХ  $\beta$ -галактозидазы. Спустя год фермент из *E. coli* был очищен [66] на производных сефарозы и полиакриламида, содержащих слабый конкурентный ингибитор ( $K_i$   $5 \cdot 10^{-3}$  М) — Ар- $\beta$ -D-тио-галактозид, причем наиболее эффективным адсорбентом оказалась Cal1 $\beta$ S-Ap-Suc-DA-SepH, в которой лиганд был отделен от поверхности носителя на 21 Å (на адсорбентах с более короткими вставками фермент лишь задерживался). Элюция достигалась боратным буфером, рН 10. Невозможность биоспецифической элюции фермента с данного адсорбента указывала на участие неспецифических сил в связывании фермента. В условиях повышенной ионной силы УБР (*I* 0,055) фермент только задерживался на колонке, что позволило предложить так называемый одностадийный процесс очистки  $\beta$ -галактозидазы [142] (в отличие от двухстадийного: адсорбция — элюция). Авторы указывают на преимущества одностадийной очистки для препаративного выделения фермента, однако, на наш взгляд, одностадийный процесс имеет мало общего с АФХ в современном понимании этого термина.

Неспецифический характер адсорбции  $\beta$ -галактозидазы на Gal1 $\beta$ S-Ap-Suc-AH-SepH доказан хроматографией модифицированного иодацетамидом препарата (алкилирование метионина вблизи активного центра с потерей ферментативной активности) [143]. Модифицированный фермент по-прежнему связывался с адсорбентом и элюировался, как и нативный фермент, лишь 4 М гуанидинхлоридом. Хроматография на Gal1 $\beta$ S-Ap-Suc-DA-SepH включена в многостадийный процесс очистки  $\beta$ -галактозидазы из *Kluyveromyces fragilis* [144].

С позиций описанных выше работ трудно интерпретировать результаты, полученные Глазгоу и др. [42] при очистке нескольких гликозидаз из *Str. pneumoniae*.  $\beta$ -Галактозидаза из указанного источника была очищена на адсорбенте, полученном прямым присоединением Ар-1-тио- $\beta$ -D-галактопиранозид к BrCN-SepH (4 мкмоль лиганда/мл геля), причем фермент не десорбировался при промывании колонки УБР с 1 М NaCl, а биоспецифически элюировался при 37° С буфером, содержащим 15 мМ Ар-1-тио- $\beta$ -D-галактопиранозид. Элюция могла быть достигнута также добавлением 20% этиленгликоля. Авторы связывают неспецифическую адсорбцию, наблюдавшуюся в предыдущих работах, с наличием вставок в биоспецифических адсорбентах.

Несмотря на очевидные недостатки такого рода адсорбентов, они были применены еще в ряде работ для очистки  $\beta$ -галактозидаз из различных источников [94, 145—149] (см. табл. 6). Наблюдались определенные различия в поведении указанных ферментов на аффинных адсорбентах. Так,  $\beta$ -галактозидаза из *B. megaterium* КМ разделялась при хроматографии на три формы, одна из которых (задерживающаяся) отражала изменения, происходящие в препарате фермента при хранении [145]; фермент из семенников быка в отличие от  $\beta$ -галактозидазы из *E. coli* обладал свойством связываться с незамещенной сефарозой [146]. Комбинация колонки с Gal1 $\beta$ S-Ap-Suc-DA-SepH и Ap-оксаминовая кислота-Tyr-Gly-SepH использована [94] для разделения  $\beta$ -галактозидазы, N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы и пейрамидазы из Str. 6646 K.  $\beta$ -Галактозидаза адсорбировалась на обоих сорбентах; элюция с первого адсорбента достигалась добавлением в УБР 1 M NaCl.

Ap-1-тио- $\beta$ -D-галактопиранозид был присоединен также к шарикам из пористого стекла. При очистке  $\beta$ -галактозидазы из *Asp. niger* присоединение осуществляли через диазосвязь [148] к шарикам с размером пор  $700 \pm 70 \text{ \AA}$  (120—200 меш), а Баум [39] использовал для этой цели азелаиноил (или маловил)-аминоалкил-стекло (лучшие результаты были получены на шариках 550  $\text{\AA}$ , 40—80 меш). Применение стеклянных шариков вместо сефарозы позволило существенно увеличить содержание лиганда на адсорбенте (50 мкмоль/г). По данным работ [39] и [148], емкость адсорбентов составляла 2,5 и 6 мг фермента/г адсорбента соответственно. Однако, как и в случае аналогичных адсорбентов на основе сефарозы, био-специфическая элюция фермента в обоих случаях оказалась невозможной [39, 148].

Недостаточное сродство  $\beta$ -галактозидазы к Ap-1-тио- $\beta$ -D-галактопиранозиду вызвало необходимость поиска аффинных адсорбентов с другими лигандами. В работе [45] применен для этой цели субстрат Ap- $\beta$ -D-галактопиранозид. На полученном адсорбенте на основе Suc-DA-SepH обратимо сорбировалась  $\beta$ -галактозидаза из *E. coli* и печени крысы; фермент из последнего источника также необратимо связывался с аналогичными адсорбентами, содержащими в качестве лигандов глюкуроновую кислоту или N-ацетилглюкозамин (неспецифическая адсорбция). Адсорбент D-галактонат-бензидин-SepH оказался пригодным для очистки как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -галактозидаз [64]. Авторы отмечали, что хроматография на адсорбентах с углеводными лактонами может быть общим методом выделения и очистки лизосомных кислотных гликозидаз. Для разделения  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактозидаз из тонкой кишки свиньи на заключительном этапе многостадийного процесса [53] была использована АФХ на *n*-хлормеркурибензоат-SepH. Основой для разделения послужил тот факт, что лиганд ингибирует только  $\beta$ -галактозидазную активность, поэтому  $\alpha$ -галактозидаза не задерживалась на колонке.

В 1974 г. Норден и О'Брайен [104] изучили связывание  $\beta$ -галактозидазы из печени человека с растительными лектинами, иммобилизованными на сефарозе. Они установили, что свыше 95% кислотных  $\beta$ -галактозидаз А и В связывается с ConA-SepH и 65% — с агглютинином из пшеницы, присоединенным к сефарозе. Нейтральная  $\beta$ -галактозидаза ( $\beta$ -глюкозидаза) не адсорбировалась на ConA-SepH. Хроматография на этом адсорбенте включена в процесс очистки  $\beta$ -галактозидазы из мозга обезьяны [149].

Для очистки  $\beta$ -галактозидазы из бобов была применена АФХ Gal1 $\beta$ S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-AC-AC-SepH [150]. Фермент лишь задерживался на колонке. Более интересными представляются результаты Миллера и др. [86, 151] по очистке  $\beta$ -галактозидазы печени человека АФХ на ConA-SepH и затем на Gal1 $\beta$ S-AH-SepH. Была достигнута наивысшая удельная активность для 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -D-галактозид- $\beta$ -галактозидазы и C<sub>6</sub>M-ганглиозид- $\beta$ -галактозидазы (83 400 и 18 527 нмоль/мг/с соответственно).

Очистка  $\beta$ -галактозидазы методом АФХ

Источник фермента	Адсорбент	Выход, %	Степень очистки	Литература
Мозг кошки	Gal1 $\beta$ S-Ap-Suc-DA-SepH	36 *	20000 *	[147]
Печень кошки	То же	40 *	30000 *	[147]
<i>E. coli</i>	»	90	—	[66]
»	»	60	—	[142]
		77 **		
<i>B. megaterium</i>	»	90	250	[145]
<i>Kl. fragilis</i>	»	72	4	[144]
Семячки быка	Gal1 $\beta$ S-Ap-Suc-DA-Bio-GelA-15m	80	35	[146]
Печень крысы	Gal1 $\beta$ -Ap-Suc-DA-SepH	60	36	[45]
Печень человека	ConA-SepH Gal1 $\beta$ S-AH-SepH	78	21720 * (4-Ме-ум-беллиферил-Gal1 $\beta$ - $\beta$ -галактозидаза); 21951 * (G <sub>M1</sub> - $\beta$ -галактозидаза)	[86, 151]
То же	То же	14 * (A <sub>2</sub> -форма) 1,4 * (A <sub>3</sub> -форма)	5110 * (A <sub>2</sub> -форма) 2310 * (A <sub>3</sub> -форма)	[153]
Печень кошки	»	53	28	[152]
Печень человека	ConA-SepH Gal1 $\beta$ N-AC-SepH	—	1900 * (N <sub>1</sub> -изо-фермент) 2500 * (N <sub>2</sub> -изо-фермент)	[95]
Str. 6646 K	Gal1 $\beta$ S-Ap-Suc-DA-SepH Ap-оксаминовая кислота-Tyr-Gly-SepH	—	11000 *	[94]
<i>A. niger</i>	Gal1 $\beta$ S-Ap- <i>n</i> -диазобензоиламинопропил-стекло	—	2	[148]
<i>Str. pneumoniae</i>	Gal1 $\beta$ S-Ap-SepH	20-80	—	[42]
Проростки пшеницы	Лактоза-гидразида-Bio-Gel P-300	40 23 *	292 3560 *	[40]
<i>Canavalia</i> sp.	D-Галактонат-бензидин-SepH	—	46	[64]
»	Gal1 $\beta$ S-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH-AC-AC-SepH	22	2,5	[150]
»	6-N-(2-Ар-этиламино)-3-O- $\beta$ -D-галактопиранозил-6-дезоксиг-L-гулит-SepH	64	111	[77]

\* См. примечание к табл. 1.

\*\* Одностадийный процесс.

Таблица 7

Очистка  $\alpha$ -D-маннозидазы методом АФХ

Источник фермента	Адсорбент	Выход, %	Степень очистки	Литература
Печень человека	Man1 $\alpha$ N-AC-SepH	—	360	[67]
То же	ConA-SepH Man1 $\alpha$ N-AC-SepH L-Fuc1 $\beta$ DN-AC-SepH	—	1370 *	[155]
<i>Canavalia</i> sp.	Дрожжевой маннан-эпокси-активированная SepH	100	30	[80]
То же	Гликопротеин <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -SepH	—	80	[24]

В отличие от других исследователей авторам удалось биоспецифически элюировать фермент введением конкурентного ингибитора в буферный раствор (рис. 1). На тех же адсорбентах очищена  $\beta$ -галактозидаза из печени кошки (биоспецифическая элюция *D*-галактозой (50 мМ) в УБР) [152], а также из печени человека [153]. Биоспецифическая элюция описана также в работе [40] по очистке  $\beta$ -галактозидазы из зерен пшеницы на новом аффинном адсорбенте — «лактоза—полиакриламид», полученном сочетанием лактозы с гидрозидным производным биогеля Р-300. Для элюции использовали 0,1 М раствор галактозил- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гулилта (полученного восстановлением лактозы  $\text{NaBH}_4$ ) в УБР. Были выделены две формы  $\beta$ -галактозидазы, из которых одна не связывалась с адсорбентом.

Две формы нейтральной  $\beta$ -галактозидазы из печени человека выделены в работе [95] в результате многостадийного процесса, включавшего в себя АФХ на ConA-Seph (отделение от двух кислотных  $\beta$ -галактозидаз, связывающихся на адсорбенте), фракционирование  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , хроматографию на DEAE-целлюлозе и затем на сефадексе G-100, препаративное изоэлектрофокусирование и, наконец, АФХ на Gal1 $\beta$ N-AC-Seph (адсорбция при pH 7,5, элюция при pH 3,5).  $\beta$ -Галактозидаза из *Aerobacter cloacae* при АФХ на гетерологичном иммуноадсорбенте с антителом к ферменту из *E. coli* задерживалась на колонке и элюировалась УБР значительно позже исключаящего объема [154].

Заканчивая рассмотрение работ по АФХ  $\beta$ -галактозидаз (некоторые данные приведены в табл. 6), следует отметить, что для очистки этого фермента использовалось большое количество различных адсорбентов. Не все они удовлетворяют требованиям, предъявляемым к аффинным адсорбентам. Лишь в ограниченном числе случаев имеет место истинная АФХ, в других процесс осложняется неспецифическими эффектами. Продолжаются поиски новых адсорбентов для АФХ  $\beta$ -галактозидазы. Недавно, например, получена [77] 6-N-(2-Ар-этиламино)-3-О- $\beta$ -*D*-галактопиранозил-6-дезоксигулилт-Seph новым методом, включающим конденсацию лактозы с 2-Ар-этиламино. На этом адсорбенте удалось очистить  $\beta$ -галактозидазу бобов. Биоспецифическая элюция *D*-галактоно- $\gamma$ -лактоном, как в работе [86], была безуспешной.

$\alpha$ -*D*-Маннозидаза. В двух работах Робинсона с сотр. [67, 155] описана АФХ маннозидазы на иммобилизованном *D*-маннозиламине. Были изучены два адсорбента: Man1 $\alpha$ N-Seph и Man1 $\alpha$ N-AC-Seph. Последний адсорбент оказался эффективным для связывания фермента. Если на колонку вводили все три формы маннозидазы (А, В и С), то связывалась только С-форма (нейтральная гидролаза). В отсутствие С-формы происходила адсорбция А- и В-форм, т. е. связывание различных форм фермента адсорбентом носит конкурентный характер. На том же адсорбенте очищали маннозидазы А и В из печени человека, однако полученные препараты не были гомогенны. Лучшие результаты были достигнуты год спустя [155] введением перед АФХ на Man1 $\alpha$ N-AC-Seph дополнительной стадии хроматографии на ConA-Seph, а после АФХ — стадии хроматографии на аналогичном адсорбенте с фукозиламином (поскольку единственной примесью в ферменте оставалась  $\alpha$ -*L*-фукозидаза). При указанной модификации очищенная маннозидаза содержала лишь два минорных неактивных белка в качестве примеси.

В нескольких работах по АФХ маннозидаз нашли применение полимерные лиганды [24, 80]. На дрожжевом маннине, присоединенном к эпоксиактивированной сефарозе, проведена очистка фермента из бобов. Количественный выход маннозидазы подтверждает высокую биоспецифичность процесса. Адсорбент был весьма устойчив и не подвергался ферментативной атаке при 4° С, однако емкость его была лишь 0,15 мг маннозидазы/мл геля [80]. Гликопротеин из клеточных стенок *Saccharomyces cerevisiae*, углеводная часть которого представляет собой высокоразветвленный маннан, был присоединен к BrCN-Seph и использован для очист-

ки маннозидазы бобов [24]. Без предварительной очистки маннозидаза не отделялась от  $\beta$ -галактозидазы и  $N$ -ацетил- $\beta$ - $D$ -гексозаминидазы, а емкость адсорбента была низкой. Высокоочищенный препарат маннозидазы был получен после предварительного удаления из смеси  $\text{ConA}$  хроматографией на сефадексе G-75.

Иммуноадсорбция была использована для очистки маннозидазы формы I и II из *Phaseolus vulgaris* [102]. Лиганд — аптитела к маннозидазе-I. Адсорбент связывал обе формы фермента, поскольку они иммунологически идентичны. Десорбция маннозидазы протекала в жестких условиях (0,1 М  $\text{NaHCO}_3$ , pH 10; 1 М  $\text{NaCl}$ ), после чего активные фракции сразу разбавляли 1 М трис-HCl (pH 7,4) для предотвращения денатурации.

Следует, по-видимому, упомянуть об очистке маннозидазы хроматографией на бензидил-Seph [156], на основе которой ранее был получен ряд биоспецифических адсорбентов для очистки гликозидаз [64]. Процесс хроматографии носил в основном ионообменный характер (элюция добавлением 0,2 М  $\text{NaCl}$  в УБР); другие гликозидазы ( $\beta$ - $D$ -маннозидаза,  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкозидазы,  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактозидазы,  $N$ -ацетил- $\beta$ - $D$ -гексозаминидаза и  $\alpha$ - $L$ -фукозидаза) не элюируются в этих условиях.

Некоторые результаты по очистке  $\alpha$ - $D$ -маннозидазы методом АФХ приведены в табл. 7.

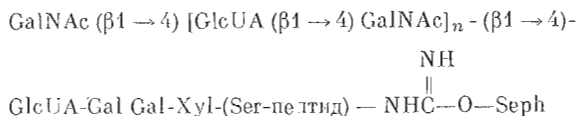
*N*-Ацетил- $\beta$ - $D$ -гексозаминидаза. Рассматривая работы по АФХ этого фермента, нельзя не отметить различные, зачастую противоречивые результаты, полученные исследователями при очистке  $N$ -ацетил- $\beta$ - $D$ -гексозаминидазы на идентичных или близких адсорбентах. Одно из возможных объяснений этого явления — существенные различия свойств ферментов, выделенных из различных источников. Так, адсорбент  $\text{GlcNAc1}\beta\text{S-Ar-Suc-DA-Seph}$  был использован для очистки гексозаминидазы из мочи человека [72] и эпидидимисов хряка [73], в то время как фермент из Str. 6646 К связывается с указанным адсорбентом необратимо [94]. Неожиданно оказалось [55], что гексозаминидаза из камчатского краба связывается с  $\text{Fuc1}\beta\text{S-Ar-Suc-DA-Seph}$  и биоспецифически десорбируется растворами  $N$ -ацетилглюкозамина, а гексозаминидазы из эпидидимисов крысы, соевых бобов и других источников не связывались с этим адсорбентом. Подобные примеры можно было бы продолжить.

В качестве лигандов при получении аффинных адсорбентов для очистки гексозаминидазы нашли применение аналоги субстратов —  $\text{Ar}(\beta$ - $D$ - $N$ -ацетилглюкозаминид или  $N$ -ацетилгалактозаминид [45, 87, 106], тример  $N$ -ацетилглюкозамина, присоединенный к активированной эпихлоргидрином сефарозе 6В [81]; конкурентных ингибиторов — 2-ацетамидо-2-дезоксид- $\beta$ - $D$ -глюкопиранозиламин [106, 157],  $n$ -аминобензил- $\beta$ - $D$ -тио- $N$ -ацетилглюкозаминид [41, 46],  $\text{Ar}$ - $\beta$ - $D$ -тио- $N$ -ацетилглюкозаминид [72, 73, 94, 106],  $\text{AH}$ - $\beta$ - $D$ -тио- $N$ -ацетилгалактозаминид [61, 158], 2-ацетамидо-2-дезоксид- $D$ -глюконо-1,4-лактон и аналогичные лактоны на основе  $D$ -галактозы и  $D$ -маннозы [47]. В случае лактоновых лигандов [47] наилучшие результаты были достигнуты с 2-ацетамидо-2-дезоксид- $D$ -манноно-1,4-лактоном, несмотря на то что соответствующие глюконо- и галактонолактоны на три порядка более сильные ингибиторы. Авторы предполагают, что при использовании 2-ацетамидо-2-дезоксид- $D$ -манноно-1,4-лактона  $N$ -ацетил- $\beta$ - $D$ -гексозаминидаза не так сильно связывается с адсорбентом, что может приводить к улучшению очистки [47]. Стадия АФХ на сефарозе, содержащей 2-ацетамидо-2-дезоксид- $D$ -глюконо-1,4-лактон, была использована недавно для удаления примеси гексозаминидазы из препарата маннозидазы [159].

В поисках новых адсорбентов для АФХ гексозаминидазы Дин изучил свойства альбумин-Seph [57]. Адсорбент биоспецифически связывал гексозаминидазу, так как овальбумин содержит на невосстапавливающем конце углеводной части остаток  $N$ -ацетилглюкозамина. В одной из первых работ по АФХ гексозаминидазы [43] в качестве лиганда был использован гликопептид, полученный из протеогликана (хондроитин-4-сульфата) но-

совой перегородки быка обработкой трипсином, химотрипсином, 0,05 н.НСI в сухом MeOH (десульфатирование), гиалуронидазой и β-глюкуронидазой (КФ 3.2.1.31), в результате чего на невосстанавливаемом конце гликопептида оказывается N-ацетилгалактозамин. Этот гликопептид — селективный субстрат для гексозаминидазы А. Предполагаемая структура адсорбента приведена на схеме 4 [43]:

С х е м а 4



Адсорбция β-галактозидазы на этом сорбенте объяснена присутствием в лиганде небольшого количества кератансульфата. В ряде работ [61, 155, 160—165] в качестве лиганда выбран ConA, имеющий сродство к углеводной части фермента. Для очистки гексозаминидазы была использована также иммуноадсорбция [59, 91].

Такое разнообразие использованных адсорбентов вызвано, по-видимому, поисками оптимальных условий очистки N-ацетил-β-D-гексозаминидазы, поскольку в большинстве случаев АФХ этого фермента сопровождается неспецифическими эффектами. На решающий вклад неспецифических взаимодействий в адсорбцию фермента указывает невозможность биоспецифической элюции гексозаминидазы и применение для этой цели высокой ионной силы [45, 46, 106] или чаще всего щелочных значений рН ЭБР (рН 8—10) [41, 45—48, 72, 73]. Интересна в этом плане работа [72], где показано, что лучше всего гексозаминидаза А из мочи адсорбируется на GlcNAc1βS-Ap-Suc-DA-Seph в 0,06 М фосфатном буфере, рН 6,1. При понижении ионной силы УБР до 0,01 М с колонкой связываются все введенные белки, а если концентрация УБР превышает 0,06 М, то гексозаминидаза частично проскакивает через колонку вместе с балластными белками. На упомянутых выше адсорбентах обнаружена сорбция других гликозидаз в условиях проведения АФХ: с адсорбентом с Ap-β-D-N-ацетилглюкозаминидом связывается β-глюкуропидаза [45], на сефарозе, содержащей *n*-аминобензил-β-D-тио-N-ацетилглюкозаминид, адсорбируется маннозидаза [46] и т. д.

Используя два аффинных адсорбента — Gal1βS-Ap-Suc-DA-Seph и Ap-оксаминовая кислота — Tyr-Gly-Seph, Кнехара и др. [94] описали очистку гексозаминидазы из Str. 6646 К. Процесс также основан на неспецифическом взаимодействии различных форм гексозаминидазы с этими адсорбентами, не содержащими специфичных для гексозаминидазы лигандов. В работе [42] гексозаминидаза из Str. pneumoniae очищена на Ap-β-D-тио-N-ацетилглюкозаминиде, непосредственно присоединенном к BrCN-Seph.

Одна из первых попыток использования биоспецифической элюции при АФХ N-ацетил-β-D-гексозаминидазы описана в работе [166]. Авторам удалось десорбировать 44% фермента, связавшегося с Glc1βN-AC-Seph, с помощью 10 мМ раствора N-ацетилглюкозамина — конкурентного ингибитора фермента.

В последние годы появилось несколько сообщений об успешном применении биоэлюции при АФХ гексозаминидазы. В двух работах Саидхоффа с соавт. [61, 158] десорбция гексозаминидазы с адсорбента, содержащего AN-β-D-тио-N-ацетилглюкозаминид, достигалась 0,1 мМ раствором конкурентного ингибитора — 2-ацетидамо-2-дезоксид-D-глюконолактона. Показательно, что десорбция фермента повышением ионной силы буферного раствора до 0,1 или при рН > 8 приводила к значительно менее чистому препарату фермента (очистка всего 2—6 раз). Аналогичный результат получен [57] при АФХ гексозаминидазы на овальбумин-Seph. При элюции изменением рН степень очистки составляла 7 раз, а при биоспецифической элюции 2,5 мМ *n*-нитрофенил-β-D-N-ацетилглюкозаминидом — 15—20 раз.

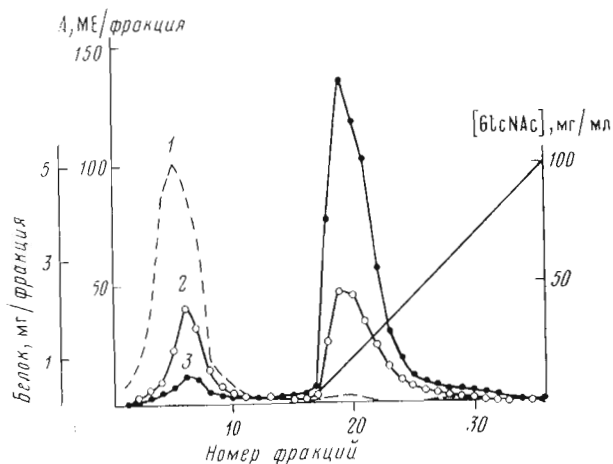


Рис. 3. АФХ N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы из мозга быка на GalNAc1 $\beta$ -Ar-AC-Seph. УБР — 0,05 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0,9% NaCl; ЭБР — градиент GlcNAc в УБР. 1 — белок; 2 — гексозаминидазная активность при pH 6,5; 3 — гексозаминидазная активность при pH 4,4 [87]

Лисман и Овердик [87] при очистке гексозаминидазы из мозга быка на GalNAc1 $\beta$ -Ar-AC-Seph проводили адсорбцию фермента при pH 7,4 в присутствии 0,9% NaCl, что, вероятно, позволило осуществить десорбцию фермента с выходом 100% линейным градиентом N-ацетилглюкозамина (0—100 мг/мл) в УБР (рис. 3). Гексозаминидаза С, для которой лиганд не является субстратом, не задерживалась на колонке. К удивлению авторов, в указанных условиях аналогичный адсорбент с N-ацетилгалактозаминосом в качестве лиганда не связывал ни одну из форм фермента. Этот факт может обусловливаться в 4 раза большим значением  $K_m$  для *p*-нитрофенил- $\beta$ -D-N-ацетилглюкозамида по сравнению с аналогичным производным галактозы. Тем не менее гексозаминидаза из печени крысы эффективно связывается с подобным адсорбентом с  $\beta$ -D-глюкозаминосом при pH 5 и десорбируется добавлением в УБР 1 М NaCl [45].

Джейн и др. [55], проводя адсорбцию гексозаминидазы из мозга быка на Fuc1 $\beta$ S-Ar-Suc-DA-Seph в УБР с высокой ионной силой (0,2 М натрий-цитратный буфер, 0,02% NaN<sub>3</sub>, pH 6), биоспецифически десорбировали фермент раствором, содержащим 2 мг/мл N-ацетилглюкозамина, причем использование других сахаров (манноза, галактоза, L-фукоза, сорбит и др.), но в более высокой концентрации (40 мг/мл) также вызывало десорбцию фермента.

АФХ гексозаминидазы на ConA-Seph может быть как промежуточной стадией многоступенчатого процесса очистки [61, 158, 163], так и основной и эффективной стадией [162, 164]. В работе [164] подробно изучены условия АФХ на ConA-Seph гексозаминидазы из человеческих тканей в зависимости от температуры, времени, pH, а также концентрации метил- $\alpha$ -D-маннопиранозида в ЭБР. Оптимальные условия АФХ: УБР — 0,1 М фосфатный буфер, pH 7, 25°С; ЭБР — 0,5 М метил- $\alpha$ -D-маннопиранозид, 37°С.

Высокоспецифичный одностадийный метод очистки гексозаминидазы А из плаценты человека — иммуно-АФХ с использованием иммобилизованной антисыворотки к антигенной детерминанте « $\alpha$ » гексозаминидазы А [91]. Элюция фермента проведена 8 М мочевиной после промывания колонки до исчезновения поглощения при 280 нм (степень очистки 283) или до исчезновения ферментативной активности в элюате (степень очистки



## Очистка N-ацетил-β-D-гексозаминидазы методом АФХ

Источник фермента	Адсорбент	Выход, %	Степень очистки	Литература
Плацента человека	GlcNAc1βN-AC-Seph	—	1220* (гексозаминидаза А) 1470* (гексозаминидаза В)	[157]
То же	ConA-Seph	56	16 (гексозаминидаза А)	[163]
»	(Антисыворотка к антигенной детерминанте «α» гексозаминидазы А)–Seph	50	283 или 417 (гексозаминидаза А)	[91]
Печень человека	GalNAc1βS-AH-Seph	50*	—	[61]
То же	»	40	14	[158]
Моча человека	GlcNAc1βS-Ap-Suc-DA-Seph	50	4 (гексозаминидаза А)	[72]
То же	ConA-Seph	13*	1000*	[162]
<i>Canavalia</i> sp.	GlcNAc1βS-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> -n-Suc-DA-Seph	60–70	150	[46]
Печень крысы	Овальбумин-Seph	95	15–20	[57]
Мозг быка	GalNAc1β-Ap-AC-Seph	100	125	[87]
Печень быка	GlcNAc1βS-Ap-AC-Seph GlcNAc1β-Ap-AC-Seph	53 78	—	[106]
Эпидидимис быка	D-Глюконо-, D-галактоно- или D-манноно-1,4-лактон-бензидин-Seph	82–90	120–310	[47]
Мозг барана	ConA-Seph	—	30–180	[160]
Эпидидимис хряка	GlcNAc1βS-Ap-Suc-DA-Seph	40	35	[73]
Печень мышцы	(Антитела к гексозаминидазе печени человека)–Seph	—	79	[59]
Печень крысы	То же	—	44	[59]
Камчатский краб	Fuc1βS-Ap-Suc-DA-Seph	40	130	[55]
<i>Astaea pallida</i>	GlcNAc1βS-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> -n-Suc-AC-гептаметилендиамин-Seph	—	600	[41]
Str. 6646 K	Gal1βS-Ap-Suc-DA-Seph Ap-Оксаминовая кислота-Tyr-Gly-Seph	—	23* (гексозаминидаза I) 800* (гексозаминидаза II) 12500* (гексозаминидаза III)	[94]

417). Выход гексозаминидазы А не превышал 50%, возможно, из-за денатурации фермента в жестких условиях элюции. Для проведения элюции при иммуно-АФХ гексозаминидазы из печени мышцы или крысы в более мягких условиях Эрикссон и Сандман [59] использовали «гетерологичный» иммуноадсорбент — антитела к гексозаминидазе печени человека, присоединенные к сефарозе, что ослабило сродство фермента к адсорбенту и позволило элюировать гексозаминидазу 0,01 М цитратным буфером с 1 М NaCl (рН 4,6).

Некоторые данные по очистке N-ацетил-β-D-гексозаминидазы с использованием метода АФХ представлены в табл. 8.

β-Глюкуронидаза. В 1973 г. появились две работы [45, 167], в которых были предприняты попытки очистки β-глюкуронидазы АФХ на низкомолекулярном ингибиторе или субстрате, ковалентно связанном с сефарозой. Фермент из печени крысы хроматографировали [45] на GlcUA1β-Ap-Suc-DA-Seph. Оказалось, что β-глюкуронидаза в равной степени связывается с

аналогичными адсорбентами на основе Ар-β-D-N-ацетилглюкозаминида или -N-ацетилгалактозаминида. Со всех трех адсорбентов элюция достигалась добавлением в УБР 0,2 М NaCl.

Харрис с сотр. [167] для очистки β-глюкуронидазы из печени быка, а также из ряда нормальных и опухолевых тканей использовали сахаропо-1,4-лактон—DA-SepH. Лиганд — сильный ингибитор фермента с  $K_i$   $5,4 \cdot 10^{-7}$  М. УБР — 0,002 М трис-HCl, 0,005 М NaCl, pH 7,3; элюцию проводили 0,1 М AcOH. Аналогичный адсорбент с этилендиаминовой вставкой оказался менее эффективным. Авторы предположили, что в этом случае сильное связывание фермента и ингибитора вблизи поверхности геля необратимо в условиях элюции.

Результаты, описанные в статье [167], вскоре подверглись серьезной критике в работе Дина [168]. Автор указывал, что 6-COOH-группа ингибитора, необходимая для биоспецифического взаимодействия, амидирована в адсорбенте сахаропо-1,4-лактон—DA-SepH. Он установил, что сам адсорбент не ингибирует ферментативную активность, т. е. β-глюкуронидаза не имеет сродства к иммобилизованному лактону. Небольшая степень очистки, низкая солевая концентрация УБР и, наконец, элюция 0,1 М AcOH свидетельствуют в пользу неспецифической адсорбции фермента на указанном адсорбенте. Автор утверждал далее [168], что в 0,1 М AcOH β-глюкуронидаза активна, а лиганд устойчив; следовательно, если имеет место биоспецифическое взаимодействие фермент — лиганд, β-глюкуронидаза должна оставаться на колонке в условиях элюции. Дин не обнаружил адсорбции фермента в оптимальных условиях в присутствии 0,5 М NaCl. Все эти данные позволили ему сделать вывод, что в работе [167] адсорбция β-глюкуронидазы была обусловлена ионообменными или гидрофобными силами.

Данные работы [168] в значительной степени способствовали тому, что во всех последующих работах по очистке β-глюкуронидазы, начиная с работы самого Дина [169], была использована иммуноадсорбция [37, 60, 170—172]. В качестве лиганда применяли Ig G против β-глюкуронидазы препуциальных желез крысы. Для очистки β-глюкуронидазы из мочи мыши использовали Ig G против F(ab)<sub>2</sub>-фрагмента β-глюкуронидазы печени мыши [173]. Элюцию фермента проводили 5—8 М мочевиной. Ввиду стабильности β-глюкуронидазы в мочеvine выход при иммуноадсорбции был высоким. Брот и др. [60] обнаружили, что выход увеличивается при повторном использовании аффинного геля. Они предположили, что участки сильного необратимого сродства на адсорбенте постепенно насыщаются в ходе повторных циклов очистки. Выход фермента был также выше в случае предварительной обработки Ig G папаином [170].

Недостаточную очистку при иммуно-АФХ β-глюкуронидазы в некоторых работах объясняли присутствием фракции неактивного фермента, способного взаимодействовать с Ig G [169]. Впервые в электрофоретически гомогенном виде микросомный фермент из печени крысы выделен японскими авторами [170]; для этого требовалась заключительная стадия изоэлектрофокусирования. Та же цель достигалась проведением после иммуно-АФХ гель-фильтрации на сефарозе 4В в 6 М мочеvine [171]. С применением иммуноадсорбции были выделены β-глюкуронидазы из печени кролика [169], крысы [37, 170, 171, 173], мочи, почек [173] и сыворотки крысы [171], а также различных тканей человека [60, 171, 174]. Данные по очистке β-глюкуронидазы методом АФХ приведены в табл. 9.

*α-L-Фукозидаза.* После того как Блумберг и др. [70] синтезировали L-Fuc1βN-AC-SepH для выделения белков, связывающих L-фукозу, указанный адсорбент неоднократно использовался для выделения α-L-фукозидазы из различных источников. Причина сродства фермента к лиганду, имеющему β-конфигурацию, до конца не выяснена. Установлено, в частности, что N-AC-β-L-фукопиранозиламин — слабый ингибитор фермента ( $K_i$   $2,6 \cdot 10^{-3}$  М) [163]. С другой стороны, предполагают [175], что β-L-фуко-

Очистка  $\beta$ -глюкуронидазы методом АФХ

Источник фермента	Адсорбент	Выход, %	Степень очистки	Литература
Печень крысы	GlcUA1 $\beta$ -Ap-Suc-DA-Seph	95	58	[45]
Плацента, моча, печень человека	(IgG против $\beta$ -глюкуронидазы препуциальных желез крысы) - Seph	60-100	30-180	[60]
Печень крысы	То же	60-80	80-100	[37]
То же	»	65-75	210	[171]
			1709 *	
Печень кролика	»	35-40	125	[169]
Печень крысы	»	50-70	7800	[170]
	Лиганд предварительно обработан папаином	90-100	9500	
Моча мыши	(IgG против F(ab) <sub>2</sub> -фрагмента $\beta$ -глюкуронидазы печени мыши) - Seph	60-80	-	[173]

пиранозиламин может содержать примесь  $\alpha$ -аномера (до 10%), обеспечивающего адсорбцию  $\alpha$ -L-фукозидазы. В подтверждение этого предположения показано, что рабочая емкость адсорбента (2,3 мг фермента/5 мл) составляет лишь 10% емкости того же адсорбента для лектина, связывающего L-фукозу [175]. Следует учитывать также, что сама L-фукоза слабо ингибирует фермент (для фукозидазы из печени человека  $K_i$   $0,8 \cdot 10^{-3}$  М [62, 175]; для фукозидазы из эпидидимисов крысы  $K_i$   $2,77 \cdot 10^{-4}$  М [176]).

К настоящему времени методом АФХ очищены фукозидазы из многих источников (см. табл. 10). Адсорбцию фермента проводили при pH 5,5 [62, 177, 178], 6 [179, 180] и 6,8 [175], а элюцию — добавлением в УБР L-фукозы. Степень очистки колебалась от 50 [179] до нескольких тысяч раз [178, 180], что может быть обусловлено различной степенью чистоты исходных препаратов фермента.

В ранних работах очищенные препараты фукозидазы не были гомогенными. Так, фермент из плаценты человека содержал 3,7% N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы [177]. Впервые фукозидаза млекопитающих в гомогенном состоянии (менее 0,007% других гликозидаз) получена Алхадеффом и др. [62]. На электрофореграмме очищенного фермента было обнаружено 6 полос, каждая из которых проявила фукозидазную активность. В некоторых работах для получения гомогенного фермента проводили повторную АФХ на L-Fuc1 $\beta$ N-AC-Seph фракции с фукозидазной активностью [62, 178]. Недавно подобной двухступенчатой АФХ очищена фукозидаза из печени [181] и сыворотки человека [182].

Одной из проблем, с которой следует считаться при очистке фукозидазы методом АФХ, является нестабильность высокоочищенного фермента, особенно в разбавленных растворах (0,2 мг белка/мл). Это, например, стало причиной низкого выхода фукозидазы из мозга человека [178] по сравнению с тем же ферментом из печени [62]. Для стабилизации фермента применяли альбумин человека (3 мг/мл), растворы L-фукозы (100 мМ) [60, 96, 165] или высокую солевую концентрацию [183].

Адсорбент L-Fuc1 $\beta$ N-AC-Seph характеризуется неспецифическим связыванием белков, особенно при низкой ионной силе УБР. Имеются указания на неспецифическую адсорбцию  $\beta$ -галактозидазы [175] и гексозаминидазы [177, 178], а также ряда других гликозидаз [100]. Вместе с тем процесс очистки носит в основном биоспецифический характер, на что указывает возможность биоэлюции растворами L-фукозы. Это подтверждается и тем фактом, что фукозидаза из *Trichomonas foetus*, не гид-

ролизующая арил- $\alpha$ -*L*-фукопиранозиды, не адсорбируется на указанном сорбенте [184].

Исследователи продолжают с успехом использовать *L*-Fuc1 $\beta$ N-AC-Seph для очистки фермента как в комбинации с классическими методами (из плаценты человека [185]), так и в сочетании с АФХ на ConA-Seph [186]. Хроматография на ConA-Seph применена на одной из стадий очистки фукоксидазы из мозга обезьяны [187].

Были предприняты попытки создания других, теоретически более селективных адсорбентов для АФХ  $\alpha$ -*L*-фукозидазы. Так, Даусон и Цэй [44] присоединили декасахарид [Fuc( $\alpha$ , 1 $\rightarrow$ 2)-Gal-GlcNAc-Man]<sub>2</sub>-Man-GlcNAc к стеклянным шарикам, обработанным фенилгидразином. Фукозидаза сильно связывалась с полученным адсорбентом, однако десорбировать фермент биоспецифической элюцией (до 1М *L*-фукозы в ЭБР) или с помощью детергентов (тритон X-100) не удалось. Десорбция достигалась лишь буфером с pH 3,1, причем выход и чистота фермента уступали образцам, полученным на *L*-Fuc1 $\beta$ N-AC-Seph.

Недавно Джейн и др. [176] провели очистку фукозидазы из различных источников на *L*-Fuc1 $\alpha$ S-Ap-Suc-DA-Seph. Полученные препараты не содержали других гликозидаз и протеолитических ферментов и отличались высокой удельной активностью (15,6 ед/мг). Адсорбент оставался эффективным в течение 2 лет. Лиганд — слабый ингибитор фукозидазы с  $K_i$  12,5 $\cdot$ 10<sup>-4</sup> М, тем не менее фермент не адсорбируется на соответствующем производном сефарозы, не содержащем лиганда. Адсорбция отсутствует и в случае аналогичного сорбента с Ap-тио- $\beta$ -*L*-фукозидом. Вместе с тем фермент из *Cl. perfringens*, который не расщепляет *n*-нитрофенил- $\alpha$ -*L*-фукозид, связывается с *L*-Fuc1 $\alpha$ S-Ap-Suc-DA-Seph.

Отсутствие адсорбции других гликозидаз на последнем сорбенте может быть связано с использованием УБР достаточно высокой ионной силы (0,2 М) [176]. В работе [100] подробно исследована АФХ фукозидазы из почки человека на нескольких аффинных адсорбентах, содержащих производные *L*-фукозы.

Недавно описана [183] АФХ  $\alpha$ -*L*-фукозидазы из мозга обезьяны на новом биоспецифическом адсорбенте, полученном присоединением *L*-фукозы к сефарозе 4В с помощью эпихлоргидрина. Адсорбент оказался высокоспецифичным для очистки  $\alpha$ -*L*-фукозидазы. Более того, на этом адсорбенте удалось разделить фермент на две формы: задерживающуюся и адсорбирующуюся. Предполагают, что они представляют собой соответственно мономерную и тетрамерную формы  $\alpha$ -*L*-фукозидазы. Элюция последней формы достигнута добавлением *L*-фукозы (2 мМ) в УБР. В работе [188] также сообщается с гетерогенности  $\alpha$ -*L*-фукозидазы из почек человека при АФХ на *L*-Fuc1 $\beta$ N-AC-Seph в отсутствие азида натрия в буферных растворах.

В табл. 10 приведены выход и степень очистки  $\alpha$ -*L*-фукозидазы при АФХ.

*Прочие гликозидазы.* В 1959 г. было продемонстрировано [189] связывание хитиназы из видов *Streptomyces* с хитином; десорбция осуществлена продолжительной инкубацией фермент-субстратного комплекса. Хитиназа из культуральной жидкости *Str. albidoflavus* разделена на фракции с различной специфичностью хроматографией на хитине [112] (ЭБР — 0,1 М боратный буфер, pH 8,2).

Впервые АФХ для очистки гиалуронидазы (КФ 3.2.1.25) использовали Янг и Сривастава [190]. Основываясь на том, что фермент — гликопротеин, содержащий до 5% маннозильных остатков, они провели на заключительной стадии очистки гиалуронидазы из спермы быка хроматографию на ConA-Seph. Идентичный адсорбент был использован и в работе [191]. В обеих работах [190, 191] для элюции фермента необходимо было присутствие в ЭБР не только специфического углевода — метил- $\alpha$ -*D*-гликопиранозида, но и 1 М NaCl. Гиалуронидаза, связанная с бактериофагом группы

Очистка  $\alpha$ -L-фукозидазы методом АФХ

Источник фермента	Адсорбент	Выход, %	Степень очистки	Литература
Печень человека	<i>L</i> -Fuc1 $\beta$ N-AC-Seph	90	250	[175]
То же	То же	66 **	6300 **	[62]
»	»	38 **	7600 **	[181]
Плацента человека	»	57	670	[177]
Мозг человека	»	25 **	9388 **	[178]
То же	»	95	—	[44]
Сыворотка человека	»	35 **	241200 **	[182]
Почка человека	»	40–50	2600	[100]
Эпидидимис крысы	»	20	50	[179]
Печень крысы	»	20 *	27000 *	[180]
Печень человека	ConA-Seph	100	28,5	[186]
	<i>L</i> -Fuc1 $\beta$ N-AC-Seph	86	21	
Эпидидимис крысы	<i>L</i> -Fuc1 $\alpha$ S-AP-Suc-DA-Seph	102	59	[176]
Мозг обезьяны	<i>L</i> -Фукоза-эпоксиактивированная сефароза	70–75	22	[183]

\* См. примечание к табл. 1.

\*\* Двухступенчатая хроматография.

А, типа 49 *Streptococci*, была очищена на иммобилизованном лектине чечевицы [51]. Процесс очистки включал фракционирование  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , хроматографию на DEAE- и CM-целлюлозе и АФХ. Препаративную очистку проводили «batch»-методом.

В нескольких работах описана АФХ эндо-*D*-галактуронапазы (поли- $\alpha$ -1,4-*D*-галактуронид — гликаногидролаза, КФ 3.2.1.15). Отделение указанного фермента от других пектолитических ферментов *Asp. niger* было проведено на колонке с пектовой кислотой, поперечно сшитой эпихлоргидрином [96]. Предполагают, что поперечная сшивка проходит по ОН-группам при  $\text{C}_{(2)}$  и  $\text{C}_{(3)}$  углеводных остатков; степень поперечного связывания определена не была. Авторы обнаружили, что в первые 20–30 мин в ходе адсорбции фермент атакует периферические области молекулы нерастворимой пектовой кислоты, в результате чего происходит отщепление *D*-галактуроносовой кислоты. Однако эта незначительная деградация не влияла на свойства адсорбента. Элюция фермента достигалась изменением рН буферного раствора от 4,2 до 6 или использованием 0,5% натрийпектата. Аналогичный адсорбент применен и в работе [192] для очистки эндо-*D*-галактуронапазы из *H. pomatia*. Адсорбция балластных белков обусловлена ионообменным взаимодействием, в частности с  $\text{COOH}$ -группами адсорбента. Недавно на том же адсорбенте проведено разделение эндо-*D*-галактуронапазы и пектинэстеразы из томатов [193]. Фермент из данного источника — основной белок, в связи с чем его взаимодействие с адсорбентом носит наряду с биоспецифическим и ионообменный характер. Градиентом рН (4,5→6,9) элюированы три молекулярные формы фермента. Эндо-*D*-галактуронапаза из препаратов целлюлазы *Geotrichum candidum* была очищена в 13–15 раз хроматографией на поперечно сшитом эпихлоргидрином свекловичном лектине [194], причем в условиях элюции пектинэстераза оставалась на колонке.

Для очистки  $\beta$ -маннапазы В (КФ 3.2.1.78) из семян люцерны применена [195] АФХ на манване или более доступном глюкоманнани, присоединенных к АН-Seph. Фермент биоспецифически элюировали 0,2% раствором маннана. Несмотря на то что лиганд — субстрат  $\beta$ -маннапазы, адсор-

бент был использован 4 раза без заметной деградации или ухудшения адсорбционных свойств.

Агароза (КФ 3.2.1.81) из *Littorina mandshurica* очищена Усовым и Мирошниковой [22] АФХ на биогеле А. Адсорбцию фермента проводили при 5° С, а элюцию — увеличением ионной силы и температуры (20° С). Выход фермента составлял 300%; авторы предполагают удаление ингибитора в процессе хроматографии. Для очистки того же фермента из *Pseudomonas*-подобной бактерии была использована сефароза 4В, поперечно сшитая дивинилсульфоном [196, 197]. Модифицированная сефароза оказалась устойчивой к микробной деградации и ферментативной атаке, обладала высокой механической прочностью и обеспечивала хорошую скорость тока через колонку. Элюцию агарозы проводили 1% раствором олигосахаридов агарозы в УБР [197].

В работе [198] описан метод очистки трегалазы (КФ 3.2.1.28), включающий хроматографию на *СonA-Seph*. АФХ на сефадексе G-200 применялась для выделения комплекса сахаразы—изомальтазы из тонкой кишки кролика [199—201]. Разделение изомальтазы и сахаразы из тонкой кишки человека также осуществили хроматографией на сефадексе G-200 [21], поскольку лишь первый фермент имел сродство к адсорбенту.

В числе гликозидаз, присутствующих в *Str. pneumoniae*, методом АФХ была очищена эндо- $\alpha$ -N-ацетилгалактозаминидаза [42]. В качестве лиганда использовали деградируемый ферментом антифризный гликопротеин, а десорбцию проводили повышением температуры до 37° С. Четырехстадийная очистка  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидазы (КФ 3.2.1.50) из плаценты человека включала иммуно-АФХ на антителе против фермента из мочи [202]. Элюцию проводили 6 М мочевиной. Для АФХ хондритиназы В и С из *Flavobacterium heparinum* использовались соответственно дерматансульфат—АН-Seph и гепарин—АН-Seph, «покрытые» дерматансульфатом [83]. Элюцию проводили градиентом NaCl в УБР.

Для очистки  $\alpha$ -L-идуронидазы из мочи [56] и почки [203] человека оказалась эффективной хроматография на гепарин-Seph. Хотя причина селективного связывания фермента с адсорбентом остается неустановленной, авторы отмечают простоту и воспроизводимость указанного метода. В табл. 11 представлены некоторые данные по очистке прочих гликозидаз методом АФХ.

### Неспецифические эффекты при АФХ гликозидаз \*

В предыдущих разделах настоящего обзора мы неоднократно упоминали факты неспецифического взаимодействия гликозидаз с аффинными адсорбентами. Вопрос о неспецифических эффектах настолько важен для метода АФХ вообще, и для АФХ гликозидаз в особенности, что заслуживает обсуждения в отдельной главе.

Указанные эффекты — явление в целом нежелательное в АФХ. Они затрудняют интерпретацию результатов АФХ, достижение высокой степени очистки фермента, а также осложняют использование АФХ для изучения некоторых аспектов ферментативных реакций. В настоящее время, например, спустя всего 6 лет после опубликования работы Джуновича и Париса [45], их выводы представляются весьма спорными. При проведении АФХ ряда гликозидаз на Ар-гликозидах, присоединенных к *Suc-DA-Seph*, они сделали некоторые заключения о механизме узнавания гликозидазами углеводных лигандов. Факт адсорбции  $\beta$ -глюкуронидазы на сорбентах с Ар- $\beta$ -D-галактозидом и Ар- $\beta$ -D-N-ацетилглюкозаминидом объяснен отсутствием специфичности узнавания ферментом  $C_{(1)}$ - и  $C_{(2)}$ -положений углеводного лиганда. Более того, авторы предположили, что  $\beta$ -глюкуронидаза не различает, свободна или амидирована COOH-группа при  $C_{(6)}$ , на том осно-

\* Глава написана при участии В. Х. Митиной.

## Очистка прочих гликозидаз методом АФХ

Фермент	Источник фермента	Адсорбент	Выход, %	Степень очистки	Литература
Гналуронидаза	Семенники быка	ConA-Septh	41	24	[191]
»	Фермент, связанный с бактериофагом группы А	Лектин чечевицы—Septh	12 *	44 *	[51]
Эндо-D-галактуроназа	<i>Asp. niger</i>	Пектовая кислота, поперечно сшитая эпихлоргидрином	—	5—6	[96]
»	<i>H. pomatia</i>	То же	85	140	[192]
»	Томаты	»	86,5	—	[193]
»	<i>G. candidum</i>	Свекловичный пектин, поперечно сшитый эпихлоргидрином	—	13—15	[194]
Агараз	<i>L. mandshurica</i>	Биогель А	300	—	[22]
»	<i>Pseudomonas</i> -подобная бактерия	Сефароза 4В, поперечно сшитая дивинилсульфоном	—	43	[197]
β-Манназа	Семела люцерны	Маннан (или глюкоманнан)—АН-Septh	95	64	[195]
Трегалаза	<i>S. cerevisiae</i>	ConA-Septh	38 *	733 *	[198]
α-N-Ацетилглюкозаминидаза	Плацента человека	(IgG против α-N-ацетилглюкозаминидазы из мочи)—Septh	30 *	182,7	[202]
Хондроитиназа В	<i>Fl. heparinum</i>	Гепарин—АН-Septh, «покрытая» дерматансульфатом	48,8	4	[83]
Хондроитиназа С	»	Дерматансульфат—АН-Septh, «покрытая» дерматансульфатом	81	6,7	[83]

ванши, что в аффинном адсорбенте карбоксильная группа глюконовой кислоты блокирована этаноламином в присутствии ЕДС, а адсорбция фермента тем не менее имеет место. В заключение в работе [45] сделан вывод, что трудность полного разделения гликозидаз методом АФХ объясняется сходством требований для узнавания ими субстрата и близостью их физико-химических свойств. Трудно согласиться, что выводы авторов достаточно обоснованы экспериментальным материалом. С позиций современных представлений о неспецифических эффектах при АФХ ясно, что, так как использованные в работе [45] адсорбенты характеризуются наличием гидрофобных и заряженных групп, интерпретация полученных результатов должна проводиться с большой осторожностью, поскольку адсорбция той или иной гликозидазы на указанные аффинные сорбенты может не иметь прямого отношения к биоспецифическому «узнаванию» лиганда.

Другой опасностью, связанной с неспецифическими эффектами в АФХ, является возможность присутствия в «очищенном» препарате гликозидазы баглатных белков, неспецифически элюированных с колонки в процессе очистки, в связи с чем результаты последующей биохимической работы с «очищенным» ферментом могут оказаться ошибочными. Показано, например, что нейраминидаза, очищенная методом АФХ на адсорбентах с Ар-оксаминной кислотой, иммобилизованной на сефарозе через Tug-Gly-Gly- [89] или Tug-Gly-вставку [88], содержала в виде примесей гемоглиутинин, гемолизин, фосфолипазу С [88], β-галактозидазу, α-L-фукозидазу и α-D-N-ацетилгалактозаминидазу (КФ 3.2.1.49) [89]. Естественно, что биологические результаты, полученные с такими гетерогенными препара-

тами нейраминидазы [204—206], должны оцениваться с большой осторожностью.

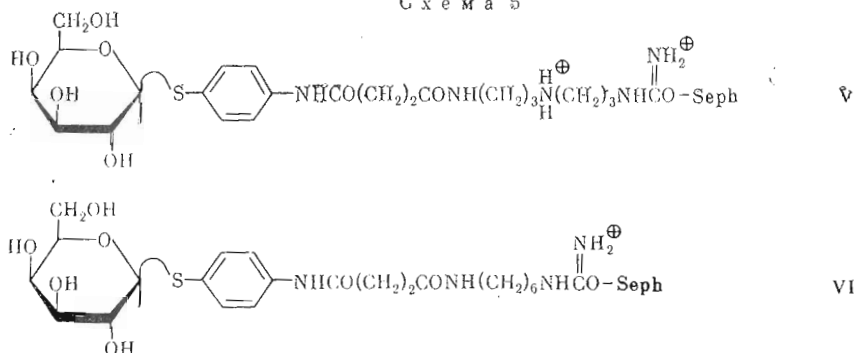
Причина неспецифического связывания белков с аффинными адсорбентами, как отмечалось выше, заключается в наличии на адсорбентах гидрофобных и заряженных групп, вводимых в процессе синтеза, в частности при активации полисахаридных носителей BrCN. Механизм связывания изучался многими исследователями. Первоначально считалось, что первичны гидрофобные взаимодействия [207, 208]. Однако на основании данных последних лет все больше склоняются к мнению о решающей роли катионных зарядов [209, 210]. Согласно работам Вильчека и Мирон [209], неспецифическая адсорбция белков протекает в две фазы: 1) образование ионной пары между анионными группами фермента и катионными группами адсорбента; 2) связывание гидрофобных участков молекулы белка с гидрофобной частью адсорбента. Увеличение силы связывания белка с увеличением гидрофобности адсорбента при сохранении количества катионных групп следует объяснить с точки зрения изложенного выше механизма не первичной ролью гидрофобных сил, а усилением взаимодействия карбоксильных групп на поверхности фермента с изомочевинными катионными группами при наличии гидрофобных цепей на адсорбенте.

В работе [210] показано, что при активации полисахаридных носителей BrCN появление катионных зарядов на адсорбенте обусловлено не только образованием изомочевинных групп (рК 9,6) [209] при последующем присоединении лиганда, но и до конца не выясненным механизмом, не зависящим от реакции с лигандом.

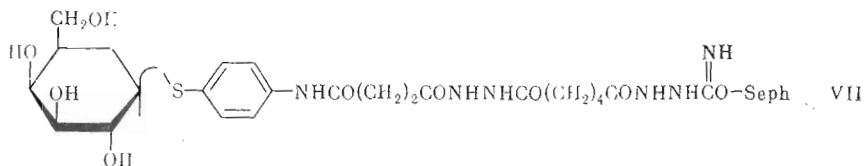
Участие катионных зарядов адсорбента в неспецифическом связывании белков подтверждается многими работами по АФХ гликозидаз. Именно эти взаимодействия, на наш взгляд, являются основной причиной загрязнения препаратов нейраминидазы балластными белками при АФХ [88, 89], а не гидрофобные, как предполагают авторы работы [89] на основании адсорбции нейраминидазы на контрольном адсорбенте тирамин — BrCN-Seph, который ошибочно рассматривается ими как незаряженный. Трудно в этом плане согласиться и с выводом Руда и Вилкинсона [88], относящих неспецифическое связывание за счет карбоксильной группы тирозина. В пользу участия катионных изомочевинных групп, образующихся на адсорбентах с Ар-оксиаминовой кислотой при присоединении пептидных вставок к BrCN-Seph, свидетельствует значительное уменьшение неспецифического связывания при использовании УБР с рН 7,5 [88, 132].

Еще более убедительное доказательство роли катионных групп в неспецифических эффектах представлено в работе [143]. Авторы изучали три адсорбента (V—VII) (схема 5).

Схема 5







Как видно из схемы 5, адсорбент V в условиях адсорбции имел два положительных заряда на эквивалент лиганда, VI—1, а VII был незаряженным (рК иминогруппы при присоединении гидразидов к BrCN-Seph — 4,2 [211]). Оказалось, что адсорбенты V и VI связывали β-галактозидазу, в то время как незаряженный адсорбент VII, содержащий на 50% больше лиганда, не связывал фермент. Участие электростатических взаимодействий в адсорбции β-галактозидазы на Gal1βS-Ap—Suc-DA-Seph побудило Махоней и Уайтакера [144] назвать этот вид хроматографии псевдоаффинной хроматографией. Попытки биоспецифической элюции были безуспешны, но фермент элюировался градиентом УБР (0,02→0,2 М фосфатный буфер, содержащий 0,1 мМ MnCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,5 мМ дитиотреит и 0,02% NaN<sub>3</sub>).

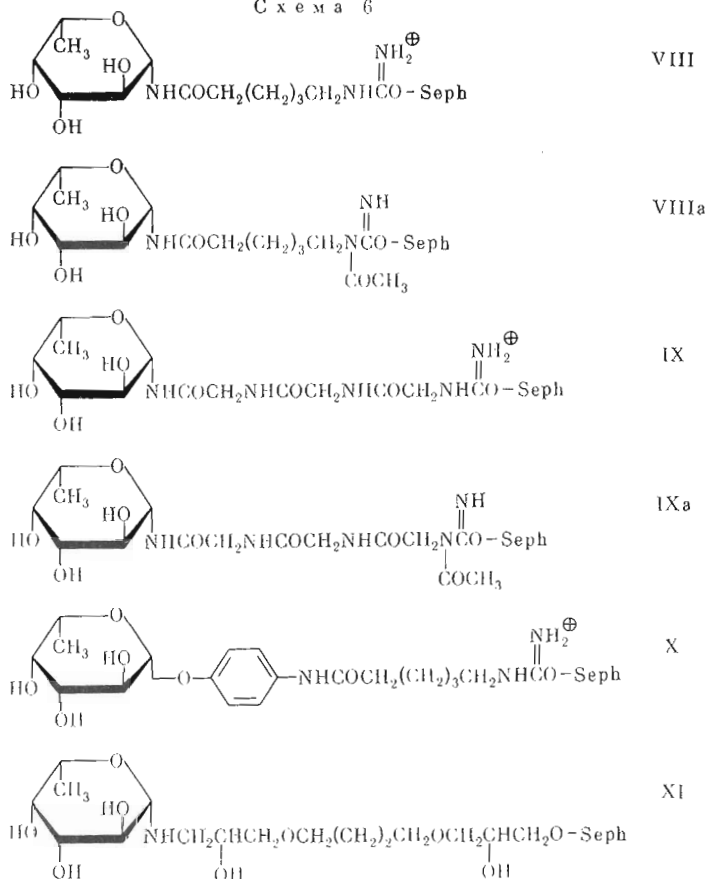
Участие гидрофобных взаимодействий в неспецифических эффектах при АФХ гликозидаз также не вызывает сомнений. На это указывает прежде всего необходимость использования веществ, уменьшающих гидрофобные взаимодействия, для элюции некоторых гликозидаз [98, 99]. Продемонстрировав адсорбцию лизоцима на иммобилизованном фенолацетате, Байлон и Нишикава [58] предполагают, что связывание фермента с GlcNAc1β-Ap—Suc-DA-Seph [129] обеспечивается не углеводным лигандом, а Ap-группой. В ряде случаев отмечено существенное ослабление связывания гликозидаз с аффинными адсорбентами на основе AN-гликозидных лигандов по сравнению с аналогичными Ap-гликозидными адсорбентами [150]. Этот факт может объясняться большей гидрофобностью бензольного кольца. В работе [61] осуществлена биоспецифическая элюция N-ацетил-β-D-гексозаминадазы с GalNAc1βS-AN—Seph, в то время как биоэлюция на подобных адсорбентах с Ap-группой оказывалась невозможной [72].

Гидрофобные эффекты могут иметь место и при межполипептидных взаимодействиях, например при очистке гликозидаз на ConA-Seph [191]. Есть основания полагать, что гидрофобные взаимодействия ответственны за жесткое связывание белков на гидрофобных адсорбентах при длительной инкубации [209]. Для десорбции жестко связанных гликозидаз приходится прибегать к критическим условиям элюции. Так, в работе [106] после выхода основного пика гексозаминадазы из печени быка при промывании колонки с GlcNAc1βS-Ap—Suc-DA-Seph 0,1 М боратным буфером, содержащим 1 М NaCl (рН 10), дополнительная активная фракция получена при элюции 5 М мочевиной. Конечно, такого рода элюция имеет мало общего с очисткой ферментов, основанной на принципе биохимического сродства. Поэтому некоторые исследователи придерживаются мнения, что неспецифическая элюция не должна применяться при АФХ [143].

Для исключения ионообменных взаимодействий при АФХ целесообразно применять УБР достаточно высокой ионной силы, а также использовать гидразидные вставки [143, 208, 211]. Кроме того, показано, что ацетилирование вторичного атома азота изомочевинной группы на аффинном адсорбенте приводит к незаряженным производным [209]. Но наиболее радикальным средством является использование гидрофильных и незаряженных вставок. Обнадешивающие результаты при АФХ гликозидаз, полученные при применении адсорбентов на основе эпоксиактивированной сефарозы [48, 80, 81], являются косвенным подтверждением участия заряженных и гидрофобных групп в неспецифической адсорбции белков на аффинных адсорбентах.

Метод исследования вклада неспецифических взаимодействий в адсорбцию фермента предложен нами в работе [100]. Он заключается в изучении поведения фермента на нескольких аффинных адсорбентах, содержащих различное количество катионных и гидрофобных групп. Для АФХ  $\alpha$ -L-фукозидазы из почки человека были синтезированы 6 адсорбентов (схема 6).

Схема 6



Адсорбент VIII содержит гидрофобную и заряженную АС-вставку, IX — гидрофильную заряженную триглицановую вставку. Аналогичные незаряженные адсорбенты VIIIa и IXa получены ацелированием VIII и IX уксусным ангидридом [209]. Адсорбент X содержит катионные группы и отличается повышенной гидрофобностью ввиду наличия бензольного кольца. Адсорбент с незаряженной и гидрофильной вставкой (XI) получен присоединением фукозилamina к эпоксиактивированной сефарозе 6В. Поведение фукозидазы на этих адсорбентах было различным: если на адсорбенте X имела место жесткая и необратимая адсорбция фермента, то адсорбент XI не связывал фукозидазу при различных условиях адсорбции. Таким образом, связывание фермента с адсорбентом, содержащим лиганд с низким сродством к фукозидазе ( $K_d > 10^{-4}$  M), становится, по-видимому, невозможным без участия неспецифических взаимодействий. Авторы подтвердили [100], что оптимальными адсорбентами для очистки фукозидазы являются VIII и IX. Кривая элюции фукозидазы из почки человека при хроматографии на адсорбенте VIII приведена на рис. 4а. Дополнительная элюция фермента 1 M NaCl и затем 1 M NaCl + L-фукоза свидетельствует о неспецифическом связывании части фермента. Была проведена оптимизация условий АФХ фукозидазы, основанная на модификации [180]. Введение фермента на колонку проводили

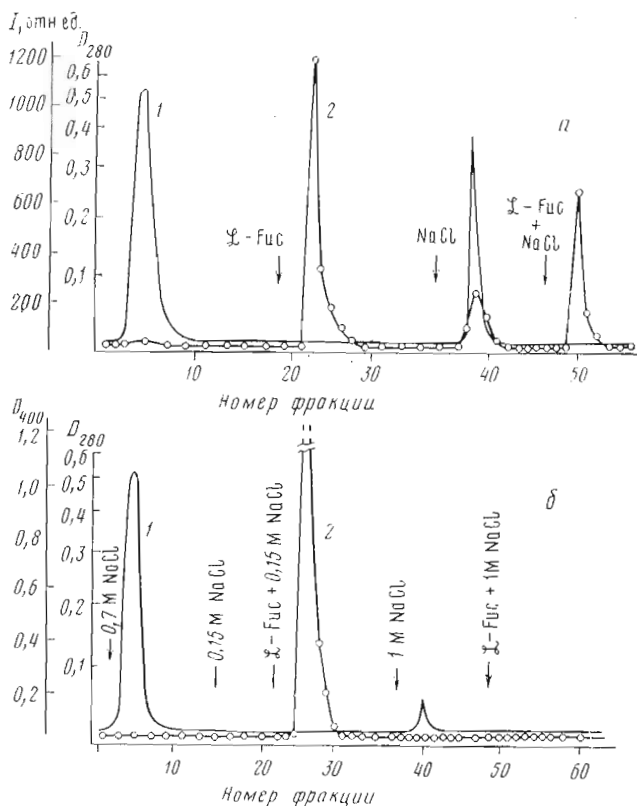


Рис. 4. АФХ  $\alpha$ -L-фукозидазы из почки человека на L-Fuc1 $\beta$ N-AC-Seph. На колонку (0,6 $\times$ 11 см) вводили частично очищенную фукозидазу (360 ед/мл адсорбента). УБР — 0,01 М натрий-фосфатный буфер (рН 5,5) с 0,02% NaN<sub>3</sub>. Стрелками отмечено добавление в УБР: а — 60 мМ L-фукозы, 1 М NaCl и 60 мМ L-фукозы 1 М NaCl; б — 0,7 М NaCl, 0,15 М NaCl, 60 мМ L-фукозы 0,15 М NaCl, 1 М NaCl и 60 мМ L-фукозы 1 М NaCl. Объем фракций 1 мл, скорость тока через колонку 15 мл/ч. 1 — абсорбция при 280 нм, 2 —  $\alpha$ -L-фукозидазная активность по 4-метилумбеллиферил- $\alpha$ -L-фукопиранозиду (а) или по *n*-нитрофенил- $\alpha$ -L-фукопиранозиду (б) [100]

в УБР+0,7 М NaCl, после промывания адсорбента УБР с 0,15 М NaCl фукозидазу элюировали УБР+60 мМ L-фукоза (рис. 4б). Последующее промывание колонки УБР с 1 М NaCl или УБР с 1 М NaCl и 60 мМ L-фукозой не приводило к появлению в элюатах  $\alpha$ -L-фукозидазной активности. Таким образом, изменение соотношения заряженных и гидрофобных групп на аффинных адсорбентах позволяет выбрать наиболее оптимальный тип адсорбента для очистки данного фермента. Аналогичный подход был использован и при АФХ ферментов других классов [212].

Важным аспектом данного подхода является сохранение в основном биоспецифического характера хроматографического процесса. В работе [100] биоспецифичность хроматографии  $\alpha$ -L-фукозидазы подтверждается тем фактом, что из пяти сахаров, использовавшихся в ЭБР, лишь L-фукоза вызывала эффективную десорбцию фермента. Позднее было показано [213], что  $\alpha$ -L-фукозидаза может быть элюирована с L-Fuc1 $\beta$ N-AC-Seph также при добавлении D-арабинозы в УБР. Оказалось, что  $\alpha$ -L-фукозидаза способна расщеплять не только *n*-нитрофенил- $\alpha$ -L-фукопиранозиды, но и соответствующие  $\beta$ -D-арабинопиранозиды, а D-арабиноза, как и L-фукоза, является ингибитором фермента. Следовательно, элюция  $\alpha$ -L-фукозидазы раствором D-арабинозы может рассматриваться как биоспецифическая.

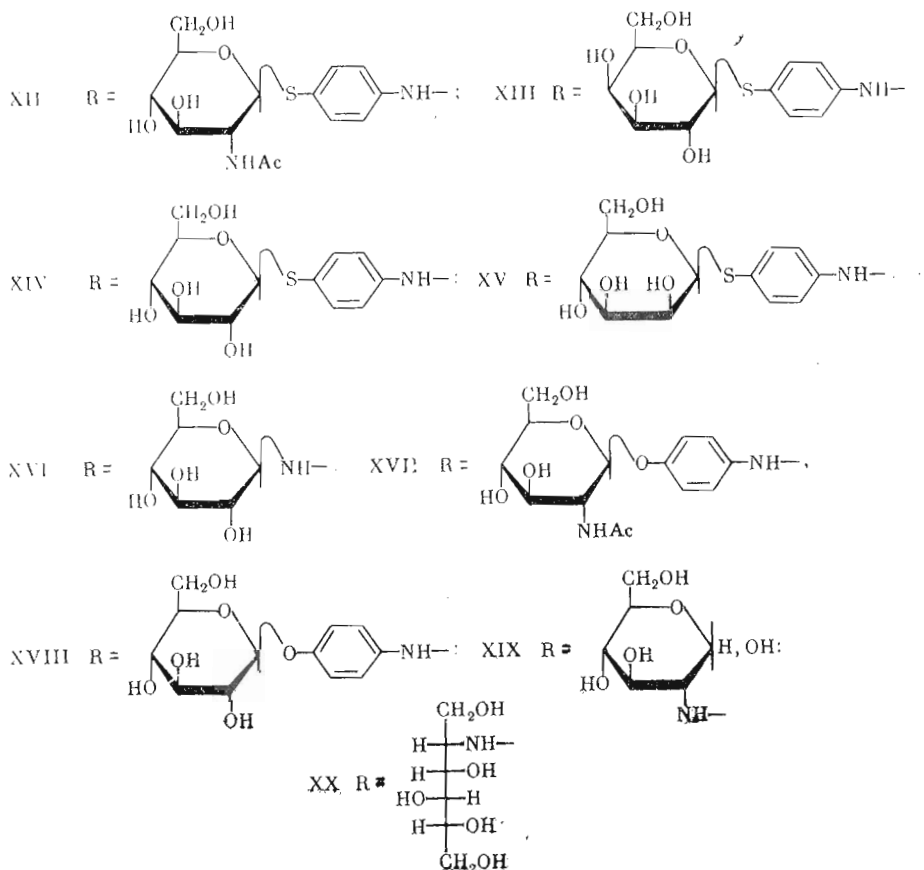
В работе [100] сформулирован общий принцип АФХ на лигандах с низким сродством к выделяемому биополимеру: «достижение связывания биополимера с аффинным адсорбентом путем введения в последний подобранного количества заряженных и/или гидрофобных групп при сохранении биоспецифической природы процесса очистки». Этот принцип продемонстрирован многими исследователями при АФХ гликозидаз [55, 61, 67]. Так, маннозидаза не связывалась с Man1αN—Seph, но адсорбировалась на аналогичном сорбенте с АС-вставкой. Элюция маннозидазы достигалась 0,3 М *D*-маннозой (сохранение биоспецифического характера процесса), хотя последующее промывание колонки буферами с высокой ионной силой приводило к дополнительной фракции с α-*D*-маннозидазной активностью (участие неспецифических взаимодействий) [67].

В целом можно выделить три типа поведения гликозидаз при АФХ на иммобилизованных лигандах с низким сродством к ферменту: 1) адсорбция гликозидазы имеет место на заряженной и/или гидрофобной вставке в отсутствие лиганда, 2) адсорбция возможна лишь при наличии лиганда, специфичного к данной гликозидазе, 3) для адсорбции достаточно наличия на сорбенте лиганда углеводной природы. Последний случай подробно исследован в работах [69, 214]. Японские исследователи изучали поведение частично очищенной смеси гликозидаз такадиастазы, соевых бобов и моллюска на адсорбентах (XII—XX) (схема 7) и установили, что

Схема 7



XII—XX



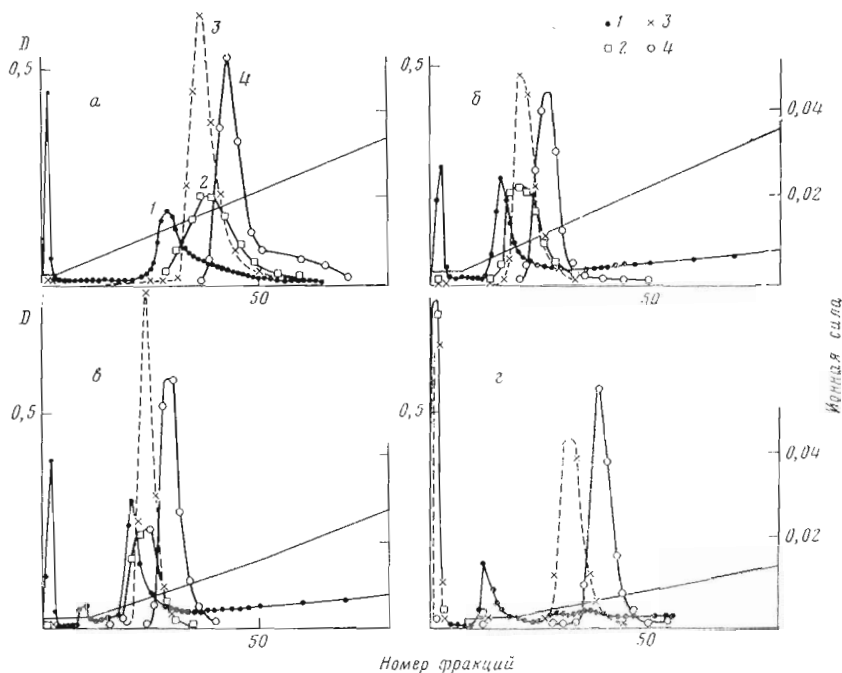


Рис. 5. Профиль элюции гликозидаз такадиастазы при хроматографии на адсорбентах: а — XVII, б — XVIII, в — XIX, г — XX. УБР — 0,02 М трис-буфер, pH 7,2 (для а — в) и вода (для г). 1 мл така-гликозидаз (~ 8 мг белка) вводили на колонки с адсорбентами XVII—XX (1,2×2,5—3 см). Объем фракций 5 мл. 1 — абсорбция при 280 нм, 2 —  $\beta$ -галактозидаза, 3 —  $\beta$ -глюкозидаза, 4 — N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидаза; пики абсорбции при 280 нм во фракциях 39 (а), 46 (б), 21 (в) и 12 (г) соответствуют элюции така-амилазы [214]

при низкой ионной силе УБР лишь адсорбент XII, по-видимому, биоспецифически связывал гексозаминидазу, другие же адсорбенты не проявили специфичности к соответствующим гликозидазам.

Оказалось, что все адсорбенты связывали N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазу,  $\beta$ -D-глюкозидазу и  $\beta$ -галактозидазу, а элюция этих гликозидаз достигалась линейным градиентом ионной силы, как правило, в одной и той же последовательности —  $\beta$ -галактозидаза,  $\beta$ -D-глюкозидаза, гексозаминидаза (рис. 5). Принимая во внимание, что гликозидазы, связанные с адсорбентами, сохраняют ферментативную активность и не элюируются субстратами или соответствующими углеводами в высокой концентрации, сделан вывод, что взаимодействие между гликозидазами и адсорбентами XII—XX не включает активный центр ферментов. Вместе с тем сефароза, содержащая лишь вставку (ди-AC-Seph), не связывала ферменты, что, по мнению авторов, указывает на необходимость для адсорбции гликозидаз присутствия лиганда углеводной природы. К сожалению, не был проведен более адекватный опыт по хроматографии гликозидаз на ди-AC-Seph с амидированной (например, этаноламином) концевой COOH-группой.

Отсутствие связывания по активному центру фермента обнаружено еще в целом ряде работ по АФХ гликозидаз [106, 143, 144]. В этой связи следует упомянуть, что некоторые ферменты, в частности амилаза, имеют на поверхности отдельные «центры сорбции» и «центры катализа» [116], причем центры сорбции могут связывать широкий спектр лигандов углеводной природы, в то время как центры катализа отличаются строгой специфичностью к субстрату. Способность модифицированных по активному центру и инактивированных гликозидаз адсорбироваться на заряженных и гидрофобных сорбентах также свидетельствует в пользу

неучастия активного центра фермента в адсорбции [143], причем предполагают [144], что связывающий центр денатурированного фермента может оставаться интактным, хотя каталитическая реакция идти не может. Перечисленные выше механизмы адсорбции гликозидаз на аффинных сорбентах при участии неспецифических взаимодействий можно дополнить предположением Беленького и Кузнецова [99], объяснивших активность кислой  $\alpha$ -глюкозидазы в адсорбированном состоянии наличием в молекуле фермента более чем одного активного центра.

Адсорбция гликозидаз на неспецифическом углеводном лиганде находит иногда и структурное обоснование. Так, связывание фукозидазы с  $\text{Man1}\alpha\text{N-AC-Seph}$  может быть обусловлено тем, что *D*-манноза в *C*1-конформации и *L*-фукоза в *1C*-конформации имеют одинаковую конформацию при  $\text{C}_{(2-4)}$  в пиранозном кольце [155].

Заканчивая обсуждение неспецифических эффектов при АФХ гликозидаз, необходимо отметить, что эффекты не всегда играют отрицательную роль, особенно при АФХ на лигандах с низким сродством к ферменту. В последнем случае адсорбенты, не содержащие заряженных и гидрофобных групп, часто оказываются неэффективными [100, 212]. Используя АФХ на адсорбентах  $\text{Gal1}\beta\text{S-Ap-Suc-DA-Seph}$  и  $\text{Ap-оксаминовая кислота-Tyr-Gly-Seph}$ , неспецифическую адсорбцию гликозидаз на этих адсорбентах и различные виды элюции, удалось успешно очистить *N*-ацетил- $\beta$ -*D*-гексозаминидазу, нейраминидазу и  $\beta$ -галактозидазу из Str. 6646 K [94]. Ионнообменные взаимодействия галактуроназазы из томатов с поперечношпигтой пектовой кислотой наряду с биоспецифической адсорбцией способствовали очистке и разделению трех форм фермента [193]. Таким образом, при умелом подходе неспецифические эффекты при АФХ не только не являются непреодолимым препятствием, но и могут содействовать достижению эффективной очистки ферментов.

### Заключение

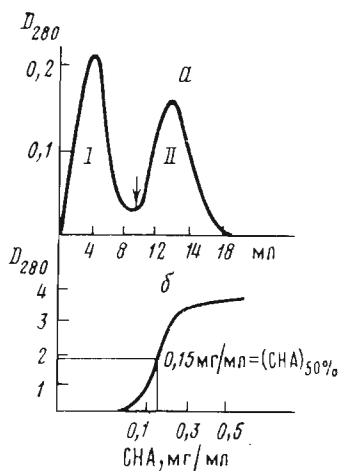
Ознакомление с современным состоянием АФХ гликозидаз дает все основания рассчитывать на успех при решении самых сложных задач выделения и очистки представителей этого класса ферментов. Кроме того, АФХ позволяет проводить более тонкое разделение различных форм гликозидаз [43, 93, 145, 193], нативных и модифицированных форм ферментов [117]. В решении указанных задач АФХ имеет неоспоримое преимущество перед методами, основанными на различных в физико-химических свойствах биополимеров. Принципы биоспецифического средства проникают в классические методы разделения белков. Выделение двух типов  $\gamma$ -амилазы проведено аффинным электрофорезом [215], причем разделение изоферментов зависело не от заряда или размера молекулы белка, а от различий в сродстве к носителю, на котором проводится электрофорез (например, к крахмальному гелю).

АФХ дает возможность изучать вопросы, связанные с механизмом ферментативного действия гликозидаз. Так, изучение структуры активных центров лизоцима проведено с привлечением метода АФХ [126]. В работе [119] методом АФХ определены константы связывания лизоцима с хитином, свободная энергия, теплота и энтропия связывания.

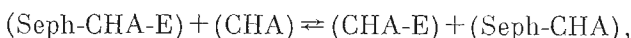
Изучение АФХ  $\beta$ -галактозидазы из *E. coli* и неполных полипептидных цепей данного фермента из мутантных штаммов продемонстрировало [216], что связывающие положения для субстрата присутствуют в ряде мутантных фрагментов фермента. Авторы пришли к заключению, что неполная пептидная цепь  $\beta$ -галактозидазы не препятствует достижению нативной или близкой к нативной конформации.

Значительный интерес представляет работа [217] по термодинамическому изучению связывания  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -амилаз на СНА-эпоксиактивированной сефарозе и влияния модификации функциональных групп фермен-

Рис. 6. Определение  $(\text{СНА})_{50\%}$  для  $\beta$ -амилазы при АФХ на адсорбенте СНА-Seph. Объем колонки  $0,5 \times 4$  см, скорость тока  $3,5-4$  мл/ч. УБР —  $0,01$  М ацетатный буфер, рН  $4,8$ ;  $a$  — профиль элюции  $\beta$ -амилазы; I — неактивный пик ( $52,3\%$  белка); II — активный пик ( $47,5\%$  белка); стрелкой показано начало добавления СНА в ЭБР;  $b$  — интегральная кривая [217]



тов на адсорбцию. Были экспериментально определены константы равновесия ( $K_e$ ) при элюции указанных ферментов растворами, содержащими СНА. Процессы, протекающие при элюции, можно выразить следующим уравнением:



где E — фермент, (Seph-СНА) — эффективное (способное взаимодействовать с ферментом) количество СНА на адсорбенте, моль/колонка. Отсюда

$$K_e = \frac{(\text{СНА-E}) \cdot (\text{Seph-СНА})}{(\text{Seph-СНА-E}) \cdot (\text{СНА})}.$$

В случае  $50\%$  элюции адсорбированного фермента

$$\frac{(\text{СНА-E})}{(\text{Seph-СНА-E})} = \frac{1}{1}, \text{ т. е. } K_e = \frac{(\text{Seph-СНА})}{(\text{СНА})}.$$

На основании кривых элюции были построены интегральные кривые и на их основе определены концентрации  $(\text{СНА})_{50\%}$ , соответствующие элюции  $50\%$  фермента (рис. 6). В результате были определены  $K_e$  для указанных ферментов (табл. 12). Можно предполагать дальнейшее увеличение количества исследований и совершенствование методологической основы использования АФХ для кинетического и термодинамического изучения ферментативных реакций.

Важное значение имеет применение АФХ гликозидаз для изучения некоторых наследственных заболеваний, связанных с нарушением углеводного обмена. При разделении множественных форм  $\alpha$ -галактозидазы было обнаружено [93], что в плазме пациентов с болезнью Фабри три церамидтригексозидазы с оптимумом рН  $7,2$  (В-формы) отсутствуют, а формы А-1 и А-2 присутствуют лишь в незначительных количествах. Метод АФХ использован для выделения N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы из нормальной печени и печени пациента с АВ-С<sub>M2</sub>-ганглиозидозом [158], характеризующимся нормальным или даже повышенным содержанием фермента. Авторам не удалось обнаружить различий в свойствах гексозаминидазы, выделенной из указанных источников. В связи с этим сделан вывод, что причиной болезни может быть недостаток или отсутствие активирующего белка, необходимого для проявления активности гексозаминидазы *in vivo*.

Недавно Миллер [218] изучил связывание кислотных гликозидаз печени человека на SepA-Seph, пытаясь найти подход к пониманию молекулярных механизмов болезни «I-cell», связанной, в частности, с уменьшением или отсутствием  $\beta$ -галактозидазной активности. Было обнаружено

Значения  $K_e$ , определенные методом АФХ амилаз на адсорбенте СНА-Seph

Амилаза	(Seph-СНА) · 10 <sup>7</sup> , моль/колонка	(СНА) <sub>50%</sub> , мг/мл	(СНА) <sub>50%</sub> · 10 <sup>4</sup> , моль/л	$K_e$
$\alpha$	5,83	1,58	15,8	0,45
$\beta$	0,276	0,15	1,5	0,89
$\gamma$	1,03	0,11	1,1	4,56

31 и 37% уменьшение в связывании соответственно 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -D-галактозид— $\beta$ -галактозидазы и  $G_{M1}$ - $\beta$ -галактозидазы на Seph-Seph при «I-cell»-болезни по сравнению с нормой. Это уменьшение может указывать на изменение углеводного состава  $\beta$ -галактозидазы при «I-cell»-болезни.

Принципы иммуноадсорбции использованы при определении содержания кислой  $\alpha$ -глюкозидазы в моче пациентов с болезнью Помпе [219]. Показано, что при инфантильной форме указанной болезни фермент полностью отсутствует в моче, в то время как при «поздней» форме удалось обнаружить 5% остаточной  $\alpha$ -глюкозидазной активности по сравнению с контролем.

Теоретические аспекты АФХ гликозидаз, как и АФХ в целом, развиты в недостаточной степени. Такие этапы работы, как выбор адсорбента, поиск оптимальных условий процесса очистки и т. д., носят в настоящее время в основном эмпирический характер. Можно надеяться, что теоретическая база АФХ будет пополняться новыми исследованиями, что несомненно приведет к расширению масштабов применения метода и даст возможность теоретического предсказания результатов хроматографического процесса.

Выражаю искреннюю благодарность Г. Я. Видершайну, Е. М. Бейер и В. Х. Митиной за помощь в работе над настоящим обзором.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 61, 636–643.
2. Lowe C. D., Dean P. D. G. (1974) Affinity Chromatography, A Miles Interscience, London.
3. Methods in Enzymology (1974) Jakoby W. B., Wilchek M., eds, vol. XXXIV, Acad. Press, N. Y.
4. Turková J. (1978) Affinity Chromatography, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York.
5. Безверщенко И. А. (1978) Аффинная хроматография, «Наукова думка», Киев.
6. Wilchek M. (1974) in: Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography (Dunlap R. B., ed), pp. 15–31, Plenum Press, N. Y.
7. Porath J., Kristiansen T. (1975) in: The Proteins (Neurath H., Hill R. L., eds), Third Ed., vol. 1, pp. 95–180, Acad. Press, N. Y.
8. Turková J. (1975) J. Chromatogr. Library (Deyl Z., Macek K., Janak J.), vol. 3, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York.
9. Porath J. (1976) J. Macromol. Sci.—Chem., A10, 1–14.
10. Nishikawa A. H., Bailon P., Ramel A. H. (1976) J. Macromol. Sci.—Chem., A10, 149–190.
11. Porath J., Caldwell K. D. (1977) in: Biotechnological application of proteins and enzymes (Bohak Z., Sharon N., eds), pp. 83–102, Acad. Press, N. Y.
12. Черкасов И. А. (1972) Усп. химии, 41, 1911–1934.
13. Кляцкиий Б. А., Шапог В. С. (1976) в сб.: Успехи биологической химии (Степаненко Б. Н., ред.), т. XVII, с. 234–267, «Наука», М.
14. Adv. in Exp. Med. Biol. (1974) Dunlap R. B., ed., Plenum Press, N. Y.
15. Affinity Chromatography (1978) Hoffman-Ostenhof O., Breitenbach M., Koller F., Kraft D., Scheiner O., eds, Pergamon Press, Oxford, New York.
16. Методы получения высокоочищенных ферментов (1978) Тез. Всес. симпоз. (Глемжа А. А., ред.), Вильнюс.
17. Biochem. Soc. Trans. (1975) 2, 1289–1328.



18. Видершайн Г. Я. (1977) в сб.: Успехи биологической химии (Степаненко Б. Н., ред.), т. XVIII, с. 185–210, «Наука», М.
19. Starkenstein E. (1910) *Biochem. Z.*, **24**, 210–216.
20. Dellweg H., John M., Schmidt J. (1975) *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **1**, 191–198.
21. Asp N.-G., Dahlqvist A. (1973) *FEBS Lett.*, **35**, 303–304.
22. Usov A. I., Miroshnikova L. I. (1975) *Carbohydr. Res.*, **43**, 204–207.
23. Halliwell G., Griffin M. (1978) *Biochem. J.*, **169**, 703–715.
24. Edward M., Sturgeon R. J. (1977) *Carbohydr. Res.*, **57**, 3–13.
25. Clarke A. E., Stone B. A. (1965) *Biochem. J.*, **96**, 793–801.
26. Villa T. G., Notario V., Villanueva J. P. (1976) *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 185–187.
27. Черкасов Н. А., Кравченко Н. А., Каверзнева Е. Д. (1966) Докл. АН СССР, **170**, 213–215.
28. Imoto T., Hayashy K., Funatsu M. (1968) *J. Biochem. (Tokyo)*, **64**, 387–392.
29. Черкасов Н. А., Кравченко Н. А. (1969) Биохимия, **34**, 1089–1091.
30. Weber M., Foglietti M.-J. (1976) *Biochimie*, **58**, 1299–1302.
31. Kato K., Konishi Y., Amemura A., Harada T. (1977) *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2077–2080.
32. Meier H., Henkal E. (1978) *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **290**, 187–192.
33. Marshall J. J., Woloszczuk W. (1978) *Carbohydr. Res.*, **61**, 407–417.
34. Young N. M., Leon M. A. (1978) *Carbohydr. Res.*, **66**, 299–302.
35. Imoto T., Yagishita K. (1973) *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 465–470.
36. Tomino A., Paigen K. (1970) in: *The Lac Operon* (Zipser D., Beckwith J., eds), pp. 233–249, Cold Spring Harbor, N. Y.
37. Owens J. W., Gammon K. L., Stahl P. D. (1975) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **166**, 258–272.
38. Winkelhake J. L., Nicolson C. L. (1976) *Anal. Biochem.*, **71**, 281–289.
39. Baum G. (1975) *J. Chromatogr.*, **104**, 105–111.
40. Hamazaki H., Hotta K. (1977) *FEBS Lett.*, **76**, 299–301.
41. Артюков А. А., Молодцов Н. В. (1975) Биоорг. химия, **1**, 1577–1582.
42. Glasgow L. R., Paulson J. C., Hill R. L. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 8615–8623.
43. Dawson G., Propper R. L., Dorfman A. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **54**, 1102–1110.
44. Dawson G., Tsay G. (1977) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **184**, 12–33.
45. Junowicz E., Paris J. E. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **321**, 234–245.
46. Rafestini M. E., Obrenovitch A., Oblin A., Monsigny M. (1974) *FEBS Lett.*, **40**, 62–66.
47. Pokorny M., Glaudemans C. P. J. (1975) *FEBS Lett.*, **50**, 66–69.
48. Vretblad P. (1974) *FEBS Lett.*, **47**, 86–89.
49. Buonocore V., Poerio E., Gramenzi F., Silano V. (1975) *J. Chromatogr.*, **114**, 109–114.
50. Yoshimoto T., Hayashida S., Tobiishi M., Kado K., Tsuru D. (1975) *J. Biochem. (Tokyo)*, **78**, 253–259.
51. Benchetrit L., Gray E. D., Edsrom R. D., Wannamaker L. W. (1978) *J. Bacteriol.*, **134**, 221–228.
52. Fiddler M. B., Ben-Yoseph Y., Nadler H. I. (1979) *Biochem. J.*, **177**, 175–180.
53. Sato M., Jamashina J. (1974) *J. Biochem. (Tokyo)*, **76**, 1155–1163.
54. Ho M. W. (1975) *FEBS Lett.*, **53**, 243–247.
55. Jain R. S., Binder R. L., Walz C., Buck C. A., Warren L. (1977) *J. Chromatogr.*, **136**, 141–146.
56. Shapiro L. J., Hall C. W., Leder I. G., Neufeld E. F. (1976) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **172**, 156–161.
57. Dean R. T. (1978) *J. Chromatogr.*, **150**, 279–283.
58. Bailon P., Nishikawa A. H. (1977) *Prep. Biochem.*, **7**, 61–87.
59. Erickson R. P., Sandman R. (1977) *Experientia*, **33**, 14–15.
60. Brot F. E., Glaser J. H., Roozen K. J., Sly W. S., Stahl P. D. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **57**, 1–8.
61. Sandhoff K., Conzelmann E., Nehr Korn H. (1977) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 779–787.
62. Alhadef J. A., Miller A. L., Wenaas H., Vedvick T., O'Brien J. S. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 7106–7113.
63. Cuatrecasas P., Illiano G. (1971) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **44**, 178–184.
64. Kanfer J. N., Petrovich G., Mumford R. A. (1973) *Anal. Biochem.*, **55**, 301–305.
65. Roth W. W., Srinivasan V. R. (1978) *Prep. Biochem.*, **8**, 57–71.
66. Steers E., Jr., Cuatrecasas P., Pollard H. B. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 196–200.
67. Robinson D., Phillips N. C., Winchester B. (1975) *FEBS Lett.*, **53**, 110–112.
68. Guilford H. (1973) *Chem. Soc. Rev.*, **2**, 249–270.
69. Mega T., Matsushima Y. (1976) *J. Biochem. (Tokyo)*, **79**, 185–194.
70. Blumberg S., Hildesheim J., Yariv J., Wilson K. J. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **264**, 171–176.
71. Кляцицкий Б. А., Позднев В. Ф., Бейер Е. М., Видершайн Г. Я. (1979) Тезисы докладов 2-й Московской конференции по органической химии и технологии, с. 83.

72. Grebner E. E., Parikh I. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **350**, 437-441.
73. Bamberg E., Dorner F., Stöckl W. (1975) *Experientia*, **31**, 516-518.
74. Клящицкий Б. А., Королева Г. Е., Митина В. Х., Алексина Р. П., Зборовская И. Б., Лихтенштейн А. В. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 92-99.
75. Щербухин В. Д., Грешных Р. Д., Степаненко Б. Н. (1966) *Докл. АН СССР*, **170**, 362-365.
76. Jeffrey A. M., Zopf D. A., Ginsburg V. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **62**, 608-613.
77. Wagh P. V. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **522**, 515-520.
78. Sundberg L., Porath J. (1974) *J. Chromatogr.*, **90**, 87-98.
79. Silvanovich M. P., Hill R. D. (1976) *Anal. Biochem.*, **73**, 430-433.
80. Uy R., Wold F. (1977) *Anal. Biochem.*, **81**, 98-107.
81. Matsumoto I., Mizuno Y., Seno N. (1978) Abstracts of IXth International Symposium on Carbohydrate Chemistry, p. 345, London.
82. Matsumoto I., Mizuno Y., Seno N. (1979) *J. Biochem.*, **85**, 1091-1098.
83. Ototani N., Yosizawa Z. (1979) *Carbohydr. Res.*, **70**, 295-306.
84. Tkachuk R. (1975) *FEBS Lett.*, **52**, 66-68.
85. Muzzarelli R. A. A., Borontini G., Rocchetti R. (1978) *Biotechnol. and Bioeng.*, **20**, 87-94.
86. Miller A. L., Frost R. G., O'Brien J. S. (1976) *Anal. Biochem.*, **74**, 537-545.
87. Lisman J. J. W., Overdijk B. (1978) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1019-1022.
88. Rood J. I., Wilkinson R. G. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **334**, 168-178.
89. Huang C. C., Aminoff D. (1974) *J. Chromatogr.*, **371**, 462-469.
90. Sheid A., Choppin P. W. (1974) *Virology*, **62**, 125-133.
91. Vladutiu G. D., Carmody P. J., Rattazzi M. C. (1975) *Prep. Biochem.*, **5**, 147-159.
92. Braidman J. P., Gregoriadis G. (1977) *Biochem. J.*, **164**, 439-445.
93. Mapes C. A., Sweeley C. C. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 2461-2470.
94. Kiyohara T., Terao J., Shiori-Nakano K., Osawa T. (1976) *J. Biochem. (Tokyo)*, **80**, 9-17.
95. Ben-Yoseph Y., Shapira E., Edelman D., Burton B. K., Nadler H. L. (1977) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **184**, 373-379.
96. Rexová-Benková L., Tibensky V. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **268**, 187-193.
97. Lowe C. R., Mosbach K. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **52**, 99-105.
98. Dale G. L., Beutler E. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 4672-4674.
99. Белецкий Д. М., Кузнецов А. А. (1978) *Биохимия*, **43**, 1764-1775.
100. Бейер Е. М., Клящицкий Б. А., Видершайн Г. Я. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 268-279.
101. Kanfer J. N., Mumford R. A., Ragnavan S. S., Byrd J. (1974) *Anal. Biochem.*, **60**, 200-209.
102. Paus E. (1976) *FEBS Lett.*, **72**, 39-42.
103. Geisow M. J. (1975) *Biochem. J.*, **151**, 181-183.
104. Norden A. G. W., O'Brien J. S. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **56**, 193-198.
105. Викторова Л. Н., Клящицкий Б. А., Рамевский Е. В. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 100-104.
106. Tanaka M., Kyosaka S., Murata S. (1978) *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1188-1199.
107. Silvanovich M. P., Hill R. D. (1977) *Cereal Chem.*, **54**, 1270-1281.
108. Maedo I., Nikuni Z., Taniguchi H., Nakamura M. (1978) *Carbohydr. Res.*, **61**, 309-320.
109. Tanimura T., Kitamura K., Fukuda T., Kikuchi T. (1979) *J. Biochem.*, **85**, 123-130.
110. Halliwell G. (1961) *Biochem. J.*, **79**, 185-192.
111. Ogawa K., Tayama N. J. (1964) *Ferment. Technol.*, **42**, 199-204.
112. Noble D. W., Sturgeon R. J. (1968) *Biochem. J.*, **110**, 7P-8P.
113. Näkansson U., Fägerstam L. G., Pettersson L. G. (1979) *Biochem. J.*, **179**, 141-149.
114. Nozu H. (1960) *Osaka Daigaku Igaku Zasshi*, **12**, 1531-1532 [Chem. Abstr. (1961) **55**, 10564f].
115. Черкасов И. А., Кравченко Н. А., Каверзнева Е. Д. (1967) *Молекулярн. биология*, **1**, 41-46.
116. Черкасов И. А., Кравченко Н. А. (1967) *Молекулярн. биология*, **1**, 381-389.
117. Кравченко Н. А., Лапук В. Х. (1969) *Биохимия*, **34**, 832-838.
118. Cherkasov I. A., Kravchenko N. A. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **206**, 289-294.
119. Леоненко В. А., Кравченко Н. А., Черкасов И. А., Афанасьева Т. И., Ермольева З. В. (1974) *Биохимия*, **39**, 1097-1102.
120. Pryme J. F., Jøner P. E., Jensen H. B. (1969) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **36**, 676-681.
121. Jensen H. B., Kleppe K. (1969) Abstracts of the 6th FEBS Meeting, p. 287, Madrid.
122. Jensen H. B., Kleppe K. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **26**, 305-312.
123. Skujins J., Pukite A., McLaren A. D. (1973) *Moll. Cell. Biochem.*, **2**, 221-228.
124. Katz F., Fishman L., Lery H. (1976) *Brit. patent* **1**, 418, 738.
125. Fernandez-Sousa J. M., Perez-Castells R., Rodriguez R. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **523**, 430-434.

126. Yoshimoto T., Tsuru D. (1974) *J. Biochem. (Tokyo)*, **76**, 887—889.
127. Yoshimoto T., Tobiishi M., Tsuru D. (1976) *J. Biochem. (Tokyo)*, **80**, 703—709.
128. Jolles J., Jolles P. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **54**, 19—23.
129. Junowicz E., Charm S. E. (1975) *FEBS Lett.*, **57**, 219—221.
130. Cuatrecasas P. (1972) in: *Methods in Enzymology* (Ginsburg V., ed.), vol. 28, pp. 897—902, Acad. Press, N. Y.—London.
131. Бергисв Ю. В., Езепчук Ю. В. (1977) *Биохимия*, **42**, 1621—1625.
132. Den H., Malinzak D. A., Rosenberg A. (1975) *J. Chromatogr.*, **111**, 217—222.
133. Kiyohara T., Terao T., Shiori-Nakano K., Osawa T. (1974) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **164**, 575—582.
134. Bucher D. J. (1977) *Biochem. et biophys. acta*, **482**, 393—399.
135. Becht H., Rott R. (1972) *Med. Microbiol. Immunol.*, **158**, 67—70.
136. Uchida Y., Tsukada Y., Sugimori T. (1977) *J. Biochem.*, **82**, 1425—1433.
137. Holmquist L. (1974) *Acta chem. scand.*, **28B**, 1065—1068.
138. Holmquist L., Nilsson G. (1979) *Acta pathol. et microbiol. scand.*, Sect B, **87**, 129—135.
139. Harpaz N., Flowers H. M., Sharon N. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **341**, 213—221.
140. Harpaz N., Flowers H. M., Sharon N. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **77**, 419—426.
141. Kusiak J. W., Quirk J. M., Brady R. O. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 184—190.
142. Robinson P. J., Dunnill P., Lilly M. D. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **285**, 28—35.
143. Nishikawa A. H., Bailon P. (1975) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **168**, 576—584.
144. Mahoney R. R., Whitaker J. R. (1978) *J. Food Sci.*, **43**, 584—591.
145. Pollard H. B., Steers E. (1973) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **158**, 650—661.
146. Distler J. J., Jordian G. W. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 6772—6780.
147. Anderson J. K., Mole J. E., Baker H. J. (1978) *Biochemistry*, **17**, 467—473.
148. Woychik J. H., Wondolowski M. V. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **289**, 347—351.
149. Alam T., Balasubramanian A. S. (1978) *J. Neurochem.*, **30**, 1199—1202.
150. Li S.-C., Mazzota M. Y., Chien S.-F., Li Y.-T. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 6786—6791.
151. Miller A. L., Frost R. G., O'Brien J. S. (1977) *Biochem. J.*, **165**, 591—594.
152. Holmes E. W., O'Brien J. S. (1979) *Biochemistry*, **18**, 952—960.
153. Frost R. G., Holmes E. W., Norden A. G. W., O'Brien J. S. (1978) *Biochem. J.*, **175**, 181—188.
154. Erikson R. P., Steers E., Jr. (1970) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **137**, 399—408.
155. Phillips N. C., Robinson D., Winchester B. (1976) *Biochem. J.*, **153**, 579—587.
156. Wagh P. V. (1978) *J. Chromatogr.*, **152**, 565—568.
157. Geiger B., Ben-Yoseph Y., Arnon R. (1974) *FEBS Lett.*, **45**, 276—281.
158. Conzelmann E., Sandhoff K., Nehr Korn H., Geiger B., Arnon R. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **84**, 27—33.
159. Opheim D. J., Touster O. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 1017—1023.
160. Bishayee S., Bachhawat B. K. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **334**, 378—388.
161. Bishayee S., Bachhawat B. K. (1974) *Neurobiol.*, **4**, 48—56.
162. Bancrjee D. K., Basu D. (1975) *Biochem. J.*, **145**, 113—118.
163. Cohen C. M., Weissmann G., Hoffstein S., Awasthi Y. C., Srivastava S. K. (1976) *Biochemistry*, **15**, 452—460.
164. Brattain M. G., Kimball P. M., Pretlow T. G., Marks M. E. (1977) *Biochem. J.*, **163**, 247—251.
165. Marinkovic D. V., Marinkovic J. N. (1978) *Biochem. Med.*, **20**, 422—433.
166. Koshy A., Robinson D., Stirling J. L. (1975) *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 244—246.
167. Harris R. G., Rowe J. J. M., Stewart P. S., Williams D. C. (1973) *FEBS Lett.*, **29**, 189—192.
168. Dean R. T. (1974) *Biochem. J.*, **138**, 395—405.
169. Dean R. T. (1974) *Biochem. J.*, **138**, 407—413.
170. Himeno M., Nishimura Y., Tsuji H., Kato K. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **70**, 349—359.
171. Owens J. W., Stahl P. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **438**, 474—486.
172. Elangovan S., Ganschow R. E. (1976) *Fed. Proc.*, **35**, 1550.
173. Lusic A. J., Paigen K. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 7336—7345.
174. Brot F. E., Bell C. E., Jr., Sly W. S. (1978) *Biochemistry*, **17**, 385—391.
175. Robinson D., Thorpe R. (1974) *FEBS Lett.*, **45**, 191—193.
176. Jain R. S., Binder R. L., Levy-Benshimol A., Buck C. A., Warren L. (1977) *J. Chromatogr.*, **139**, 283—290.
177. Alhadeff J. A., Miller A. L., O'Brien J. S. (1974) *Anal. Biochem.*, **60**, 424—430.
178. Alhadeff J. A., Janowsky A. J. (1977) *J. Neurochem.*, **28**, 423—427.
179. Wright K., Northcote D. H., Davey R. M. (1976) *Carbohydr. Res.*, **47**, 141—150.
180. Opheim D. J., Touster O. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 739—743.
181. Alhadeff J. A., Cimino G., Janowsky A. J. (1978) *Molec. Cell. Biochem.*, **19**, 171—180.
182. Alhadeff J. A., Janowsky A. J. (1978) *Clin. chim. acta*, **82**, 133—140.
183. Alam T., Balasubramanian A. S. (1979) *Biochim. et biophys. acta*, **566**, 327—334.
184. Thorpe R., Oates M. D. G. (1978) *Carbohydr. Res.*, **60**, 407—411.

185. Di Matteo G., Orfeo M. A., Romeo G. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **429**, 527—537.
186. Thorpe R., Robinson D. (1978) *Clin. chim. acta*, **86**, 21—30.
187. Alam T., Balasubramanian A. S. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **524**, 373—384.
188. Бейер Е. М., Клящицкий Б. А., Видершайн Г. Я. (1979) *Биохимия*, **44**, 1936—1943.
189. Jeuniaux C. (1959) *Arch. Int. Physiol. and Biochem.*, **65**, 173—181.
190. Yang C.-H., Srivastava P. N. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **391**, 382—387.
191. Balasubramanian K. A., Abraham D., Bachhawat B. K. (1975) *Ind. J. Biochem. and Biophys.*, **12**, 204—206.
192. Foglietti M. J., Girerd H., Percheron F. (1975) *Biochimie*, **57**, 667—668.
193. Rexová-Benková L., Markovic O., Foglietti M. J. (1977) *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **42**, 1736—1741.
194. Алиева Дж., Родионова Н. А., Аймухамедова Г. Б., Шелухина И. П., Мартипович И. И. (1978) *Прикл. биохимия и микробиол.*, **14**, 232—235.
195. McCleary B. V. (1978) *Phytochemistry*, **17**, 651—653.
196. Carlsson J., Malmquist M. (1977) *In vitro*, **13**, 417—422.
197. Malmquist M. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **537**, 31—43.
198. Kelly P. J., Catley B. J. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 353—358.
199. Kolinska J., Semenza G. (1967) *Biochim. et biophys. acta*, **146**, 181—195.
200. Cogoli A., Mosimann H., Vock C., Balthazar A. K., Semenza G. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **30**, 7—14.
201. Cogoli A., Eberle A., Sigrist H., Joss C., Robinson E., Mosimann H., Semenza G. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **33**, 40—48.
202. Röhrborn W., von Figura K. (1978) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1353—1362.
203. Rome L. H., Garvin A. J., Neufeld E. F. (1978) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **189**, 344—355.
204. Bach M. K., Brashler J. R. (1973) *J. Immunol.*, **110**, 1599—1608.
205. Constantopoulos A., Najjar V. A. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 3819—3822.
206. Mapes C. A., Sweely C. C. (1973) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **158**, 297—304.
207. Jennissen H. P., Heilmeyer L. M. G., Jr. (1975) *Biochemistry*, **14**, 754—760.
208. Jost R., Miron T., Wilchek M. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **362**, 75—82.
209. Wilchek M., Miron T. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **72**, 108—113.
210. Schnaar R. L., Sparks T. F., Roseman S. (1977) *Anal. Biochem.*, **79**, 513—525.
211. Wilchek M., Miron T. (1974) *Moll. Cell. Biochem.*, **4**, 181—187.
212. Grant D. A. W., Hermon-Taylor J. (1976) *Biochem. J.*, **155**, 243—254.
213. Видершайн Г. Я., Бейер Е. М., Клящицкий Б. А. (1979) *Докл. АН СССР*, **249**, 495—499.
214. Mega T., Matsushima Y. (1977) *J. Biochem. (Tokyo)*, **81**, 571—578.
215. Swallow D. M., Corney G., Harris H., Hirschhorn R. (1975) *Ann. Hum. Gen.*, **38**, 391—398.
216. Villarejo M. R., Zabin I. (1973) *Nature New Biol.*, **242**, 50—52.
217. Hoschke A., Laszlo E., Hollo J. (1976) *Stärke*, **28**, 426—432.
218. Miller A. L. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **522**, 174—186.
219. Schram A. W., Brouwer-Kelder B., Donker-Koopman W. E., Loonen C., Namers M. N., Tager J. M. (1979) *Biochim. et biophys. acta*, **567**, 370—383.

Поступила в редакцию  
4.IV.1979

После доработки  
26.VI.1979

## AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF GLYCOSIDASES

KLYASHCHITSKY B. A.

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

The review concerns the isolation and purification of glycosidases by affinity chromatography. The preparation of biospecific absorbents and the choice of optimal conditions for adsorption and elution of enzymes are discussed. Some examples of the affinity chromatography of concrete enzymes are given. The review also describes nonspecific effects in affinity chromatography of glycosidases. The data on utilization of affinity chromatography both for the resolution of different forms of glycosidases and for the study of some aspects of enzymic reactions are provided.