



УДК 577.152.313'2:543.544:547.1'128

ЛИГАНДОБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ФЕРМЕНТОВ

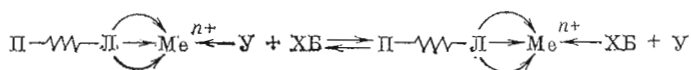
I. СИНТЕЗ ХЕЛАТНЫХ СОРБЕНТОВ И ОЧИСТКА ЭКЗОНУКЛЕАЗЫ А5 АКТИНОМИЦЕТОВ

Варламов В. П., Лопатин С. А., Рогожин С. В.

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

Описан синтез хелатных сорбентов для лигандообменной хроматографии ферментов. В качестве исходного носителя использованы неорганический носитель силохром и органический TSK-Gel HW-55. Хелатные сорбенты содержали в качестве стационарного лиганда остатки иминодиуксусной и иминодиметилфосфоновой кислот. Показана эффективность хелатного сорбента на основе TSK-Gel HW-55 (Ni^{2+} -форма) в очистке экзонуклеазы А5 актиномицетов.

В последние годы появился целый ряд новых методов очистки ферментов, в частности разные виды хроматографии: аффинная, основанная на сродстве между иммобилизованным стационарным лигандом и выделяемым объектом [1], гидрофобная — на взаимодействии гидрофобных группировок сорбентов с гидрофобными участками белков [2], хемоспецифическая — на тиолдисульфидном обмене [3]. Именно с развитием этих методов в значительной степени связаны успехи в выделении целого ряда гомогенных ферментов и белков. В 1961 г. Гельферихом [4] для разделения аминов был применен так называемый лигандный обмен, впоследствии положенный в основу метода лигандообменной хроматографии [5, 6]. Этот метод базируется на взаимодействии разделяемых соединений со стационарной фазой, осуществляемом путем образования координационных связей в координационной сфере комплексообразующего иона металла. ЛОХ применима для разделения тех соединений, которые способны образовывать комплексы с ионами металлов. Впервые метод ЛОХ для разделения белков применили Порат с сотр. [7]. Были синтезированы хелатные сорбенты на основе агарозы, заряженные ионами Zn^{2+} и Cu^{2+} .



P — полимерный носитель, L — хелатообразующий лиганд,
 Me^{n+} — ион металла, Y — обмениваемый лиганд, XB — белок
с хелатируемым остатком X

Метод ЛОХ белков иллюстрируется схемой 1. В области нейтральных рН (6–8) белки взаимодействуют с переходными металлами преимущественно за счет имидазольной группы гистидина и тиольной группы цистеина. При понижении рН это взаимодействие существенно ослабляется. В области щелочных рН с ионами металлов могут реагировать аминогруппы, что делает сорбцию более эффективной, но менее селективной [7, 8].

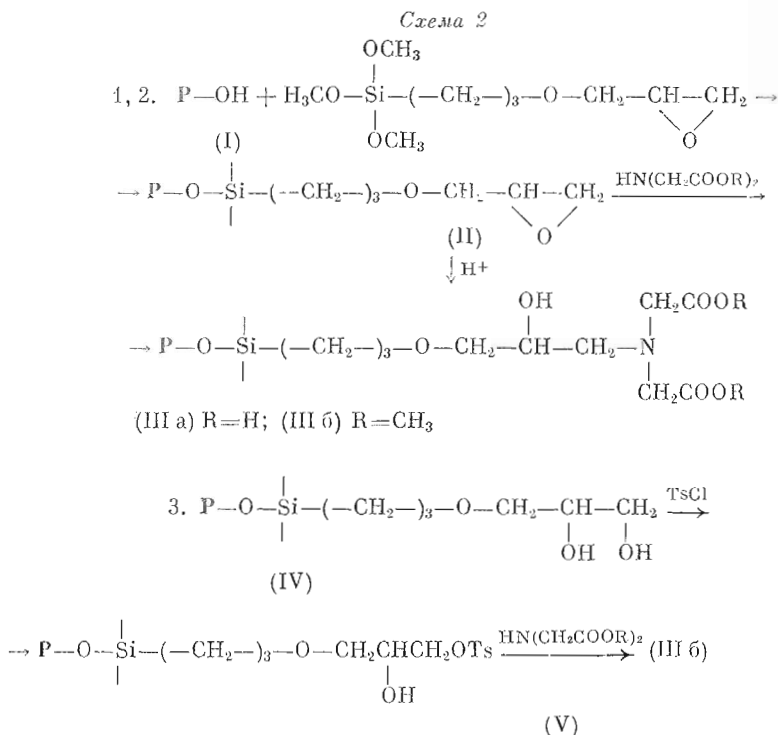
Основными преимуществами метода ЛОХ являются высокая селективность к хелатируемому белку, определяемая свойствами белка и введенным в хелатообразующий сорбент ионом металла, стабильность образующихся комплексов, возможность использования одного сорбента для выделения ферментов различных классов путем варьирования рН и иона металла [8].

Сокращения: ЛОХ — лигандообменная хроматография, ИДК — иминодиуксусная кислота, ПААГ — полиакриламидный гель, P — OH — силохром, T — OH — TSK-Gel HW-55.

В данном сообщении описан синтез хелатных сорбентов на основе силохрома и органического сорбента TSK-Gel HW-55, а также продемонстрировано применение сорбента на основе TSK-Gel HW-55 (Ni^{2+} -форма) для очистки экзонуклеазы А5 актиномицетов. Использование хелатных сорбентов на основе силохрома в ЛОХ ферментов будет показано в следующих статьях этой серии.

Выбор носителя и способа иммобилизации стационарного лиганда во многом определяют качество сорбента для ЛОХ. Первоначально мы использовали макропористый кремнезем силохром, успешно применяемый нами в синтезе сорбентов для аффинной хроматографии экзонуклеазы А5 [9]. Для повышения устойчивости силохрома в водных растворах при $\text{pH} > 7$ проводилась его обработка солями алюминия [10], а подавление неспецифической сорбции белков, основной причиной которой являются силанольные группы поверхности силохрома, достигалось обработкой носителя 3-(2',3'-эпоксипропоксипропил)триметоксисиланом и образованием на поверхности гидрофильного продукта поликонденсации. Наличие продуктов поликонденсации подтверждается появлением углерода в таких сорбентах, содержание которого достигает более 4% [9].

В качестве основного стационарного лиганда были выбраны группировки иминодиуксусной кислоты (ИДК), образующие с ионами металла прочные хелатные комплексы состава ИДК— Me^{2+} (1:1), причем энергия связывания катионов металлов в данном случае составляет 15–25 вместо 2–3 ккал/моль для обычных катионитов [11].



Присоединение группировок иминодиуксусной кислоты проводили различными способами. При получении сорбента (IIIa) (схема 2) нам не удавалось добиться удовлетворительной емкости по содержанию стационарного лиганда, так как оптимум реакции присоединения иминогруппы к оксирановому циклу лежит в диапазоне pH 11–12, при которых алюминированный силохром недостаточно устойчив. Некоторое увеличение выхода реакции достигалось при использовании большого избытка иминодиуксусной кислоты, а также при проведении реакции в среде безводного метанола. Учитывая возможность побочной реакции оксиранового цикла со свободной карбоксильной группой, мы применяли также синтезированный нами метиловый эфир иминодиуксусной кислоты. Хелатные

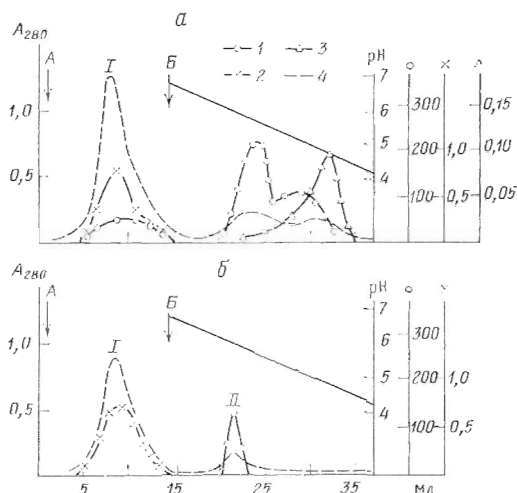


Рис. 1. ЛОХ полуочищенного препарата экзонуклеазы А5 (1000 мкг белка) на сорбенте (X) в Ni^{2+} -форме. Колонка размером $2 \times 0,8$ см. Скорость элюции 10 мл/ч. *а* – первая очистка, *б* – рехроматография фракции I рнс. *а*. А – нанесение образца и начало элюции 5 мМ трис-HCl, содержащим 1 М NaCl (раствор 1), Б – начало линейного градиента: раствор 1 → → раствор 2 (5 мМ NH_4OAc , содержащий 1 М NaCl, рН 4,2). Контроль по активности (ед. акт./мл) нуклеазной (1), нуклеотидазной (2), фосфатазной (3) и по белку (4)

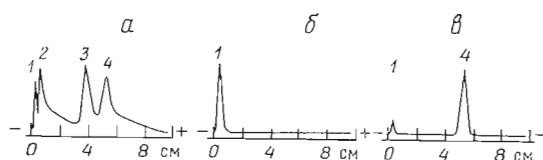


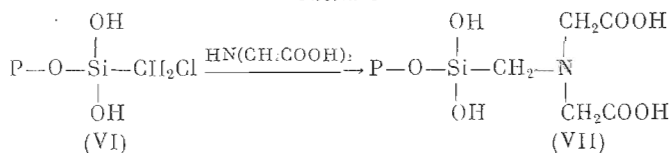
Рис. 2. Электрофорез в ПААГ полуочищенного препарата экзонуклеазы А5 (30 мкг) (*а*), экзонуклеазы А5 после двукратной очистки на сорбенте (X) в Ni^{2+} -форме (10 мкг, фракция II, рнс. 1б) (*б*) и белка фракции I рнс. 1б (20 мкг) (*в*). Условия см. в «Экспер. части». 1, 3, 4 – зоны, обладающие соответственно нуклеазной, фосфатазной и 5'-нуклеотидазной активностью, 2 – примесный белок

сорбенты, полученные таким образом, затем подвергались обработке в мягких условиях в присутствии ацетата меди, так как гидролиз эфирной группы в сильнощелочных условиях, обычно используемых в этих случаях, приводит к структурно кремнеземной основе.

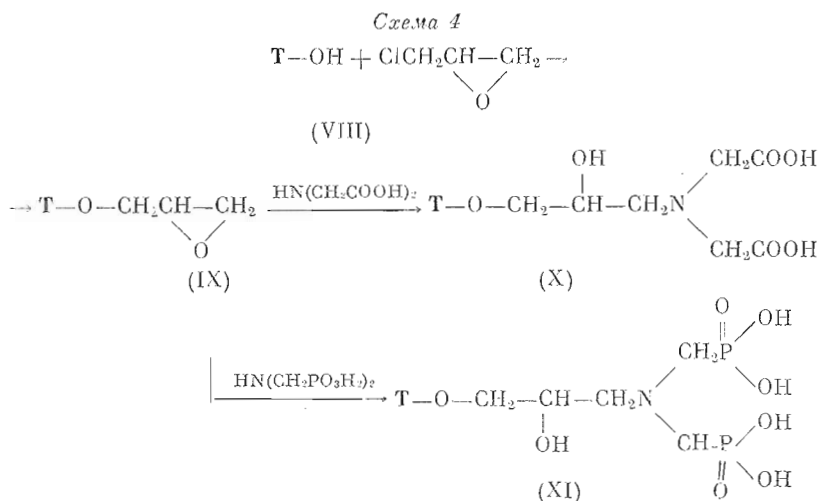
Получение сорбента (IIIа) с активацией предварительно раскрытого оксианового цикла на сорбенте (IV) с помощью тозилхлорида [12] дало удовлетворительное содержание группировок иминодиуксусной кислоты на сорбенте (IIIа). Преимуществом последнего способа является также простой спектрофотометрический контроль на стадии активации тозилхлоридом и возможность регулировать степень активации, изменяя количество взятого тозилхлорида (табл. 1).

Синтез сорбента (VII) (схема 3), исходя из хлорметилированного силохрома (VI)*, позволил избежать щелочной обработки и получить

Схема 3



* Сорбент (VI) с содержанием $-\text{CH}_2\text{Cl}$ -групп 300 мкмоль/г предоставлен И. А. Ямсковым (ИНЭОС АН СССР).



сорбент с удовлетворительной емкостью по хелатным группам, но близость стационарного лиганда к поверхности носителя ограничит, вероятно, область применения этого сорбента.

Были также синтезированы сорбенты (X) и (XI) на основе гидрофильного органического носителя TSK-Gel Toyopearl HW-55 (схема 4). Эти сорбенты устойчивы в диапазоне pH 1–14 и обладают низкой неспецифической сорбцией белков и ионов металлов.

Ряд ферментов содержит в своих молекулах ионы металлов, например цинка и магния. В тех случаях, когда ионы металла, входящего в структуру белка, обладают большим сродством к иминодиуксусной кислоте, чем ионы металла, которыми заряжен сорбент, при ЛОХ может происходить инактивация фермента, обусловленная потерей ионов металла. Для работы с такими ферментами мы синтезировали сорбент (XI) с иминодиметилфосфоновыми группировками, которые обладают существенно меньшим сродством к ионам магния и цинка, чем иминодиуксусная кислота, хотя сильно хелатируют ионы меди [13]. Некоторые характеристики сорбентов для ЛОХ приведены в табл. 1.

Для проверки применимости синтезированных нами носителей в качестве объекта был выбран препарат экзонуклеазы А5 актиномицетов. Ранее для очистки этого фермента мы применяли аффинную хроматографию на иммобилизованных нуклеотидных лигандах [9, 14]. В препарате этой нуклеазы основными нежелательными примесями являются неспецифическая фосфатаза и 5'-нуклеотидаза, также имеющие сродство к используемым лигандам, что, возможно, и является причиной получения

Таблица 1

Характеристики сорбентов

Сорбент	Способ получения	Содержание групп ИДК, мкмоль/г	Емкость по Cu^{2+} , мкмоль/г
(IIIa)	1 *	80	70
	2 *	30	30
	3 *	50	50
	3	50	45
	3	25	20
(VII)	**	40	50
(X)	***	150	150
(XI)	***	—	30

* См. схему 2, три примера для способа 3 соответствуют содержанию тозилных групп на сорбенте (V) (последовательно) 200, 140 и 95 мкмоль/г.

** См. схему 3.

*** См. схему 4.

Зависимость нуклеазной и фосфатазной активности в препарате очищенной экзонуклеазы А5 от катионов металлов и их концентрации *

Катион	Концентрация, мМ	Активность, % от исходной	
		нуклеазная	фосфатазная
Cu ²⁺	1	89	87
	10	73	50
Ni ²⁺	1	99	48
	10	75	23
Mn ²⁺	1	80	78
	10	66	53
Zn ²⁺	1	66	32
	10	34	18

* Инкубация ферментного препарата в 0,05 М трис-НСI-буфере (рН 8,9) 30 мин в присутствии ионов металла.

эксонуклеазы А5 с примесными активностями [9, 14]. Мы рассчитывали, что применение метода ЛОХ, не связанного с субстратной специфичностью разделяемых ферментов, а использующего способность белков взаимодействовать с ионами металлов, весьма перспективно для очистки экзонуклеазы А5. В настоящее время данные о структуре экзонуклеазы А5 отсутствуют, поэтому мы изучили влияние ионов металлов на активность самой экзонуклеазы и сопутствующих ферментов (табл. 2).

Как видно из табл. 2, наибольшее ингибирование ферментов наблюдается в присутствии ионов Zn²⁺. При использовании ионов Cu²⁺ и Ni²⁺ нуклеазная активность теряется в незначительной степени, поэтому при осуществлении ЛОХ препарата экзонуклеазы А5 предпочтение было отдано именно этим катионам.

Сопоставляя сродство экзонуклеазы А5, фосфатазы и 5'-нуклеотидазы к хелатному сорбенту (X), заряженному ионами металлов, мы нашли, что эти ферменты располагаются в следующий ряд: фосфатаза > нуклеаза >> 5'-нуклеотидаза. Причем сродство фосфатазы к сорбенту (X) в Mn²⁺-форме настолько велико, что элюция достигается только в денатурирующих условиях при рН < 4 или при добавлении в элюент 10 мМ EDTA. Учитывая минимальное влияние ионов Ni²⁺ на нуклеазную активность (табл. 2), хроматографию экзонуклеазы осуществляли на сорбенте (X) в Ni²⁺-форме (рис. 1).

Данные электрофореза в ПААГ очищенного препарата экзонуклеазы А5 свидетельствуют о том, что препарат содержит четыре основные белковые зоны (рис. 2а), причем ранее [9] было установлено, что зона 1 обладает нуклеазной активностью. Определяя ферментативную активность остальных белковых зон, мы установили, что зона 3 отвечает фосфатазе, а зона 4—5'-нуклеотидазе.

Очистка экзонуклеазы А5 на сорбенте (X) в Ni²⁺-форме была проведена в две стадии. На первой стадии на сорбенте полностью отделялась фосфатаза, которая обладает самым сильным сродством к сорбенту, тогда как 5'-нуклеотидаза не сорбировалась в условиях нанесения (фракция I, рис. 1а). Эта фракция, содержащая также нуклеазу (~25% общего ее содержания в препарате), была подвергнута рехроматографии на том же сорбенте. Так как фракция I была свободна от белков, обладающих сильным сродством к сорбенту (X), на сорбенте стала задерживаться нуклеаза, обладающая более слабым сродством (рис. 1б, пик II). Таким образом, в несорбированной фракции I содержание 5'-нуклеотидазы более 90% (рис. 2в), а при элюции в градиенте рН был получен пик II, белок которого, обладающий нуклеазной активностью, практически гомогенен по данным электрофореза в ПААГ (рис. 2б).

Экспериментальная часть

В работе использованы: силохром С-80 отечественного производства с диаметром пор 680 Å, $S_{уд}$ 68 м²/г, размером частиц 0,16–0,32 мм; сорбент TSK-Gel Toyorearl HW-55 (Toyo Soda, Япония) с размером частиц 30–60 мкм, 3-(2',3'-эпоксипропоксипропилтриметоксисилан (Serva, ФРГ), трис(гидроксиэтил)аминометан (Reanal, Венгрия), *n*-нитрофенилфосфат натрия (Feinchemie К.-Н. Kallies KG, ФРГ), суммарная дрожжевая РНК (Sigma, США), *n*-толуолсульфохлорид и иминодиуксусная кислота (Merck, ФРГ), набор реактивов для электрофореза в ПААГ (Serva, ФРГ).

Экзонуклеазу А5 (КФ 3.1.4.1) выделяли из технического препарата («Биохимреактив», Олайне). Полученный препарат фермента получали высаливанием сульфатом аммония и обессоливанием на сефадексе G-75 [9]. Содержание белка определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (Serva, ФРГ). Нуклеазную, фосфатазную и 5'-нуклеотидазную активности определяли согласно работам [9, 15], используя в качестве субстратов суммарную дрожжевую РНК, *n*-нитрофенилфосфат и гуанозин-5'-монофосфат соответственно. Полученный очищенный препарат экзонуклеазы А5 содержал 200 мкг белка в 1 мл и имел следующие активности (ед. акт./мл): нуклеаза — 280, фосфатаза — 0,12, 5'-нуклеотидаза — 0,8. Нуклеазную и фосфатазную активности в присутствии катионов определяли как обычно, но раствор фермента предварительно инкубировали с соответствующим катионом 30 мин при 20° С.

Оптическое поглощение растворов измеряли с помощью спектрофотометра СФ-16 отечественного производства и спектроколориметра Spescol (ГДР). Регистрацию хроматографии осуществляли с помощью фотометра Uvicord-II (ЛКВ, Швеция). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Spesord UV VIS (ГДР), а ИК-спектры — на приборе Hitachi 210-10 (Япония). Линейный градиент создавали с помощью системы Ultrograd (ЛКВ, Швеция).

Электрофорез проводили в 7,2% ПААГ при pH 8,3 в течение 4 ч при токе 3 мА на трубку. Белковые зоны окрашивали красителем СВВ-В-250 (Serva, ФРГ) и сканировали на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) при 750 нм (размер щели 0,2×6 мм).

Неорганические сорбенты после получения высушивали при 0,1 мм рт. ст.

Количество групп иминодиуксусной кислоты на хелатных сорбентах определяли методом обратного титрования. Для определения емкости сорбентов по ионам меди сорбенты обрабатывали 10 мин раствором хлорида меди (5 мг/мл), отмывали водой от избытка ионов меди, связанные ионы Cu^{2+} снимали 0,05 н. HCl, к раствору добавляли концентрированный аммиак до pH 10. Измеряли поглощение образовавшегося тетрааммиаката меди при 600 нм и по калибровочной кривой определяли содержание ионов меди (см. табл. 1). Наличие ионов Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} на хелатных сорбентах определяли качественно по выпадению осадков гидроокисей этих металлов при щелочных pH. Для этого сорбенты промывали 0,05 н. HCl и по каплям добавляли в элюат 0,4 н. NaOH до выпадения осадков.

Метилловый эфир иминодиуксусной кислоты. Суспендировали 20 г (0,15 моль) иминодиуксусной кислоты в 300 мл охлажденного до 0° С безводного метанола и при перемешивании в течение 15 мин добавляли 20 мл (0,28 моль) хлористого тионила. Выдерживали 2 ч при 0° С, а затем кипятили 1 ч до полного растворения кислоты. При охлаждении выпали белые игольчатые кристаллы, которые перекристаллизовали из метанола. Выход 9,7 г (33%). Т. пл. 182–183° С (метанол).

Сорбент (IIIa). Способ 1. К 15 г алюминированного силохрома, полученного по методике [10], в 250 мл толуола добавляли 10 мл 3-(2',3'-эпоксипропоксипропилтриметоксисилана и кипятили при перемешивании 5 ч, затем взвесь переносили на пористый фильтр, сорбент промывали толуолом (150 мл), ацетоном (200 мл) и высушивали. Получили сорбент (II)

с содержанием углерода 4,32%. 5 г сорбента (II) суспендировали в 30 мл 0,4 М NaOH, добавляли 3 г (22,5 ммоль) иминодиуксусной кислоты, доводили pH до 10,5 с помощью 4 М NaOH и перемешивали 1,5 ч при 50° С. Сорбент (IIIa) промывали на пористом фильтре 500 мл воды, 100 мл ацетона и высушивали.

Способ 2. Сорбент (II) суспендировали в 30 мл безводного метанола, содержащего 3,75 г (18,8 ммоль) метилового эфира иминодиуксусной кислоты, перемешивали 16 ч при 20° С. Полученный сорбент (IIIб) промывали на пористом фильтре 200 мл метанола, 200 мл воды, суспендировали 1 ч в 30 мл насыщенного раствора ацетата меди при 50° С. Взвесь промывали на фильтре 200 мл воды, 100 мл 0,5 н. HCl, 200 мл воды, 100 мл ацетона и высушивали.

Способ 3. К 3 г сорбента (II) добавляли 100 мл 0,1 н. HCl, выдерживали 1 ч, промывали на пористом фильтре 300 мл воды, 50 мл ацетона, высушивали при 0,1 мм рт. ст. Полученный сорбент (IV) суспендировали в 15 мл безводного диоксана, добавляли 0,57 г (3 ммоль) тозилхлорида, 0,57 мл безводного пиридина и перемешивали 1 ч при 20° С. Полученный сорбент (V), содержащий 200 мкмоль/г тозильных групп, промывали на пористом фильтре 200 мл диоксана, суспендировали в 15 мл диоксана, добавляли 0,6 г (4,5 ммоль) иминодиуксусной кислоты, 1,2 мл (4,5 ммоль) пиридина и после перемешивания в течение 24 ч при 20° С взвесь промывали на фильтре 200 мл воды, 100 мл 0,5 н. HCl, 200 мл воды, 100 мл ацетона и высушивали.

Определение количества тозильных групп на сорбенте (V). Навески сорбента (0,1–0,3 г) суспендировали в 4 мл 0,4 М NaOH, выдерживали 4 ч при 20° С и определяли поглощение при 261 нм. Содержание тозильных групп (*c*) рассчитывали по формуле

$$c = \frac{A_{261}V}{\epsilon_{261}P},$$

где *V* — объем пробы (4 мл), *P* — навеска сорбента (V) в граммах, ϵ_{261} — коэффициент молярного поглощения *n*-толуолсульфокислоты, равный $370 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Сорбент (VII). 1 г хлорметилированного силохрома (VI) суспендировали в 100 мл безводного метанола, добавляли 0,5 г (3,75 ммоль) иминодиуксусной кислоты, 0,1 г KI и перемешивали 4 ч при кипении. Полученный сорбент (VII) промывали на пористом фильтре 50 мл метанола, 100 мл воды, 50 мл ацетона и высушивали.

Сорбент (X). К 1,3 г сорбента TSK-Gel HW-55 (VIII) добавляли 1 мл 15 М NaOH, 2,5 мл эпихлоргидрина и перемешивали 2 ч при 50° С. Полученный сорбент (IX) промывали на пористом фильтре 200 мл воды, суспендировали в 4 мл 0,4 М NaOH, добавляли 0,2 г (1,5 ммоль) иминодиуксусной кислоты, доводили pH до 11,7 с помощью 4 М NaOH и перемешивали 20 ч при 20° С. Полученный сорбент (X) промывали на пористом фильтре 500 мл воды.

Сорбент (XI). К 1,3 г сорбента (IX), полученного как описано выше, в 4 мл 0,4 М NaOH добавляли 0,2 г (1 ммоль) иминодиметилфосфоновой кислоты, доводили pH до 11,7 с помощью 4 М NaOH и перемешивали 20 ч при 20° С. Полученный сорбент (XI) промывали на пористом фильтре 200 мл воды.

Проведение ЛОХ. Колонку объемом 5 мл заполняли хелатным сорбентом (~1 г) и пропускали 20–30 мл раствора хлорида соответствующего металла (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+}) с концентрацией 5 мг/мл. Затем колонку промывали 5 мМ NH_4OAc -буфером, содержащим 1 М NaCl (pH 4,2), и уравнивали 5 мМ трис-HCl-буфером с 1 М NaCl (pH 6,8). Полуочищенный препарат экзонуклеазы А5 (1000 мкг белка, 1400 ед. акт. нуклеазы) в 5 мл того же буфера наносили на сорбент (X) в Ni^{2+} -форме со скоростью 15 мл/ч. Элюцию проводили в линейном градиенте pH раствора 1 (pH 6,8) до раствора 2 (pH 4,2). Фракцию I (500 мкг белка, 350 ед. акт. нуклеазы в 10 мл раствора 1) подвергали рехроматографии на той же колонке в тех же условиях. Содержание белка во фракции II 15 мкг/мл,

нуклеазная активность 100 ед. акт./мл, удельная — 6700 ед. акт./мг. Таким образом, в результате двукратной ЛОХ на сорбенте (X) в Ni²⁺-форме достигнута пятикратная очистка фермента с выходом 20%. Фермент гомогенен по данным электрофореза в ПААГ (рис. 2в) и не содержит примесных активностей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Туркова Я. Аффинная хроматография. М.: Мир, 1980.
2. Shaltiel S. Methods in Enzymol./Eds Jacoby W. B., Wilchek M. N. Y.: Acad. Press, 1974, v. 34, p. 126—140.
3. Лозинский В. И., Рогожин С. В. Успехи химии, 1980, т. 49, вып. 5, с. 879—902.
4. Helfferich F. Nature, 1961, v. 189, № 4769, p. 1001—1002.
5. Рогожин С. В., Даванков В. А. Докл. АН СССР, 1970, т. 192, № 6, с. 1288—1290.
6. Davankov V. A., Semechkin A. V. J. Chromatogr., 1977, v. 141, № 2, p. 313—353.
7. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Beljrage G. Nature, 1975, v. 258, № 5536, p. 598—599.
8. Lönnnerdal B., Keen C. L. J. Appl. Biochem., 1982, v. 4, № 3, p. 203—208.
9. Банникова Г. Е., Варламов В. П., Самсонова О. Л., Рогожин С. В. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 212—219.
10. А. с. 688431 (СССР). Способ получения модифицированного кремнеземного носителя/Артемова А. А., Варламов В. П., Киселев А. В., Кустова Г. Л., Липкин Б. А., Никитин Ю. С., Рогожин С. В., Фалина А. С. Оpubл. в Б.И., 1979, № 36, с. 69.
11. Schtuckler G. Talanta, 1965, v. 12, № 3, p. 281—290.
12. Nilsson K., Norrlöv O., Mosbach K. Acta chem. scand., 1981, v. B35, № 1, p. 19—27.
13. Дятлова Н. М., Темкина В. Я., Колпакова И. Д. Комплексоны. М.: Химия, 1970, с. 164.
14. Банникова Г. Е., Варламов В. П., Рогожин С. В. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 11, с. 1505—1510.
15. Львова Т. Н., Артамонова О. Н., Татарская Р. И. Биохимия, 1975, т. 40, № 4, с. 703—710.

Поступила в редакцию
29.XI.1983
После доработки
30.I.1984

LIGAND-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY OF ENZYMES. I. SYNTHESIS OF CHELATING SORBENTS AND PURIFICATION OF EXONUCLEASE A5 FROM ACTINOMYCES

VARLAMOV V. P., LOPATIN S. A., ROGOZHIN S. V.

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

Ligand-exchange supports based on silochrome and TSK-Gel Toyopearl HW-55 with iminodiacetic and iminodimethylphosphonic acids as stationary ligands were synthesized. The efficacy of the TSK-Gel HW-55 based chelating sorbent (Ni²⁺-form) for purification of exonuclease A5 from actinomyces was demonstrated.