



УДК 547.963.32 + 547.458

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БИОПОЛИМЕРОВ МЕТОДОМ  
АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ****I. НОВЫЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЕ БИОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АДсорбЕНТЫ  
ДЛЯ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ POLY(A)-мРНК***Кляццкий Б. А., Королева Г. Е., Митина В. Х.**Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР, Москва**Алехина Р. П., Зборовская И. В., Дихтенштейн А. В.**Онкологический научный центр Академии медицинских наук СССР, Москва*

Синтезированы новые высокоэффективные биоспецифические адсорбенты для аффинной хроматографии poly(A)-мРНК: poly(U)-аминоэтилкарбамоилдекстран-сефароза (адсорбент А) и poly(U)-гликоген-гидразидосукцинилсефароза (адсорбент Б). Указанные адсорбенты содержали poly(U) соответственно 1,47 и 1,45 мг/мл геля, а их poly(U)-связывающая емкость составляла 1,44 и 1,48 мг/мл. При хроматографии poly(A) и poly(U) на этих адсорбентах выяснена электростатическая природа неспецифического связывания полинуклеотидов с адсорбентами А и Б. Осуществлено выделение poly(A)-мРНК из ядер и цитоплазмы клеток печени мышей на адсорбенте Б — первый пример применения биоспецифических адсорбентов с полисахаридными вставками в аффинной хроматографии. Обсуждены оптимальные условия проведения аффинной хроматографии poly(A)-мРНК для достижения количественного выхода биополимера.

Аффинная хроматография poly(A)-мРНК на poly(U)-сефарозе [1] или на oligo(dT)-целлюлозе [2] основана на гибридизации комплементарных пар соответствующих оснований. Недавно установлено [3], что при хроматографии poly(A)-мРНК на oligo(dT)-целлюлозе имеют место неспецифические эффекты различной природы. К недостаткам хроматографии на poly(U)-сефарозе относятся незначительный выход при элюции адсорбированной на колонке poly(A)-мРНК и малая емкость адсорбента.

С целью повышения удельного содержания лигандов в биоспецифических адсорбентах, а также исключения или уменьшения ионных и гидрофобных взаимодействий (4) при аффинной хроматографии мы предложили использовать водорастворимые, разветвленные и нейтральные полисахариды в качестве вставок в биоспецифических адсорбентах [5].

В настоящем сообщении описан первый пример применения аффинных адсорбентов с полисахаридными вставками — выделение poly(A)-мРНК из клеток печени мышей линии СЗНА на двух новых адсорбентах:

---

Сокращения: АЭД — О-[N-(2-аминоэтил)карбамоил]декстран; ГСФ — гидразидсукцинилсефароза; ГБР — гибридационный буферный раствор (0,02 М трис-НСl, 0,3 М NaCl, 0,001 М EDTA, pH 7,6); ЭБР — элюционный буферный раствор (0,02 М трис-НСl, 0,001 М EDTA, pH 7,6).

«poly(U)-АЭД-сефароза» (адсорбент А) и «poly(U)-гликоген-ГСФ» (адсорбент Б). В модельных экспериментах при хроматографии poly(A) и poly(U) на адсорбентах А, Б и poly(U)-сефарозе (адсорбент В) [1] выяснена электростатическая природа неспецифического связывания указанных полинуклеотидов, а также обсуждены оптимальные условия проведения аффинной хроматографии poly(A)-мРНК на полученных адсорбентах.

Для синтеза адсорбента А присоединяли АЭД [6], содержащий 12 N-(2-аминоэтил)карбамоильных групп на 100 остатков ангидроглюкозы, к сефарозе 4 Б, активированной бромцианом. Активацию сефарозы проводили по модифицированным методикам [7, 8]. Количество присоединенного к носителю декстрана определяли дифференциальным методом по содержанию азота в исходном растворе полисахарида и в промывных водах после присоединения АЭД и диализа. Согласно полученным данным, с сефарозой связывалось 15—20 мг АЭД/мл геля. Блокирование оставшихся активных групп на сефарозе проводили с помощью этаноламина. Непрореагировавшие группы  $\text{NH}_2$  на полисахаридной вставке ацетилировали 72 ч уксусной кислотой в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида. Полноту ацетилирования контролировали цветной реакцией с тринитробензолсульфокислотой [9]. Присоединение poly(U) к АЭД-сефарозе осуществляли после активации полисахаридной вставки бромцианом [4]. Содержание poly(U) в полученном адсорбенте (1,47 мг/мл геля) определяли дифференциальным методом по абсорбции при 260 нм в исходном растворе poly(U) и в промывных водах после присоединения, а также методом солюбилизации адсорбента в 1 н. NaOH в присутствии 0,1%  $\text{NaBH}_4$  с последующим измерением абсорбции раствора при 260 нм [10] (рис. 1).

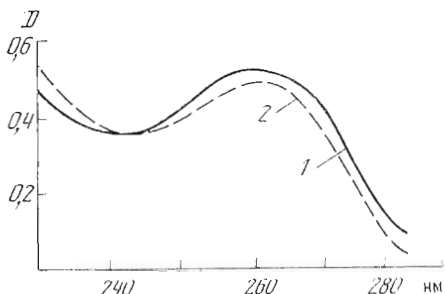


Рис. 1. УФ-спектры солюбилизованных адсорбентов: 1 — адсорбент А; 2 — адсорбент Б. Условия солюбилизации приведены в тексте

Следует отметить, что при применении стандартных условий [10] не было достигнуто полного растворения адсорбентов с полисахаридными вставками. Это вызвало необходимость центрифугирования реакционных смесей перед спектрофотометрированием. Повышение устойчивости агарозных шариков может быть обусловлено присутствием полисахаридной вставки и поперечной сшивкой при ее присоединении. Это не влияет, однако, на корректность определения содержания poly(U) в адсорбенте, поскольку в условиях солюбилизации происходит полный гидролиз присоединенной poly(U).

При получении адсорбента Б присоединение к сефарозе гликогеновой вставки проводили другим методом, сводящим к минимуму количество положительно заряженных групп на адсорбенте. Гидразидосукцинилсефарозу, полученную стандартным методом из активированной бромцианом сефарозы и избытка дигидразида янтарной кислоты, инкубировали с гликогеном, окисленным периодатом натрия, при pH 4,8. Окисление гликогена проводили из расчета модификации лишь 5—10% остатков ангидроглюкозы полисахарида. После присоединения гликогена к ГСФ остаточные альдегидные группы на адсорбенте восстанавливали избытком  $\text{NaBH}_4$ ; при этом происходило и восстановление связи носитель — вставка. Количество присоединившегося гликогена определяли по содержанию полисахарида в исходном растворе и промывных водах после присоединения. Содержание гликогена в геле составляло 25—30 мг/мл. Последующее присоединение poly(U) проводили так же, как при получении адсорбента А. Остаточные активные группы блокировали с помощью гид-

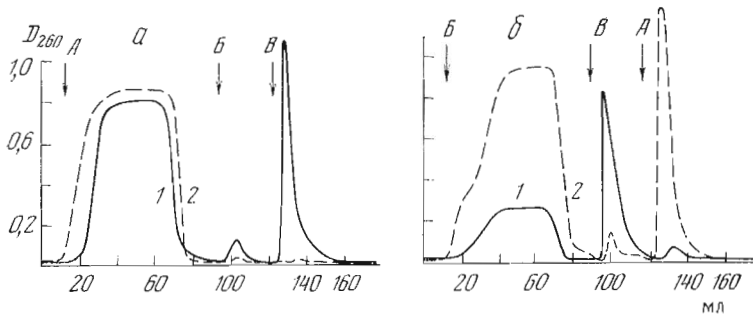


Рис. 2. Хроматография полинуклеотидов на адсорбенте А (а и б). 1 — poly(A); 2 — poly(U). Стрелки указывают на изменение условий элюции: А — ГБР; Б — ЭБР, 20°; В — ЭБР, 50°. Полинуклеотиды наносили на колонки в соответствующем буферном растворе (40—60 мкг/мл)

разида уксусной кислоты. Согласно спектрофотометрическому анализу, после солиubilизации (рис. 1) адсорбент В содержал poly(U) 1,45 мг/мл геля.

Адсорбент В получен в соответствии с описанной методикой [11] и содержит 0,4 мг poly(U)/мл адсорбента. Коммерческий препарат poly(U)-цефараза (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) содержит 0,5 мг poly(U)/мл адсорбента.

Для оценки емкости и биоспецифичности полученных адсорбентов проведены модельные эксперименты по хроматографии poly(A) и poly(U). При введении poly(A) в буферном растворе с высокой ионной силой (ГБР) на колонки с адсорбентами А и Б наблюдалось эффективное связывание полинуклеотида. Poly(A)-связывающая емкость адсорбентов А и Б, определенная при заведомом их насыщении poly(A), составляла соответственно 1,44 и 1,48 мг/мл геля, что значительно превышает емкость адсорбента В (0,4 мг/мл). Однако значительную часть адсорбированной poly(A) (61,1% для адсорбента А и 16,8% для адсорбента Б) не удалось десорбировать с колонки в условиях, обычно используемых для элюции poly(A)-мРНК [11]. В то же время первоначальное связывание poly(A) на адсорбентах А и Б носит биоспецифический характер, поскольку poly(U) в тех же условиях не задерживается на адсорбентах (рис. 2а). Для достижения количественной элюции poly(A) адсорбенты промывали 90% формамидом в ЭБР в присутствии 0,5% додецилсульфата натрия при 50°. Затем отмывали формамид с колонки с помощью ЭБР и часть промытого адсорбента анализировали спектрофотометрически, как указано выше. Полученные результаты свидетельствовали о количественной десорбции poly(A) в указанных условиях.

Было изучено поведение poly(A) и poly(U) при нанесении на адсорбенты А и Б в буферном растворе с низкой ионной силой (ЭБР), т. е. в условиях, неблагоприятных для гибридизации комплементарных пар оснований. В случае обоих адсорбентов было обнаружено значительное связывание полинуклеотидов. Более того, количественная десорбция poly(U) достигалась с помощью ГБР (рис. 2б).

Результаты модельных экспериментов (таблица) позволяют предположить, что в условиях низкой ионной силы создается возможность для электростатического взаимодействия полинуклеотидов с положительно заряженными группами на адсорбенте [12]. Эти взаимодействия, по-видимому, многоточечны, так как при хроматографии АМР в условиях низкой ионной силы уравнивающего буферного раствора неспецифического связывания мононуклеотида не наблюдалось. Количество неспецифически связанной poly(A) на адсорбентах А и Б (см. таблицу) коррелирует с количеством катионных групп на этих адсорбентах. Действительно, при

### Сравнительная характеристика адсорбента А и Б

Адсорбент	Емкость * мкг poly(A)/ мл адсор- бента	Неспецифиче- ская адсорб- ция ** poly(A), % к связанной с адсорбентом	Адсорбция poly(U), мкг/мл адсорбента в условиях высо- кой ионной силы (ГБР)	Адсорбция poly(A), мкг/мл адсорбента в условиях низкой ионной силы (ЭБР)	Адсорбция poly(U), мкг/мл адсорбента в условиях низкой ионной силы (ЭБР)
А	1440	61	0	760	650 ***
Б	1480	16,2	0	440	480 ***

\* Емкость адсорбента В — 360 мкг poly(A)/мл адсорбента.

\*\* Не элюируется ЭБР при 50°.

\*\*\* Количественно элюируется ГБР.

многоточечном присоединении первичных аминогрупп АДД к активированной бромцианом сефарозе в случае адсорбента А на нем образуется соответствующее количество положительно заряженных иминогрупп (рК 10,4) [13]. С другой стороны, при присоединении дигидразида янтарной кислоты к активированной бромцианом сефарозе образующаяся связь в адсорбенте Б при физиологических значениях рН оказывается незаряженной (рК 4,2) [13]. По этой же причине при получении адсорбента Б блокирование остаточных активных групп после присоединения poly(U) проводили не этаноламином, а гидразидом уксусной кислоты.

Недавно было показано [12], что обработка полисахаридов бромцианом сопровождается появлением на них неидентифицированных катионных групп, образование которых не связано с последующим присоединением лиганда. Кроме того, при хранении такого рода адсорбентов могут происходить нежелательные процессы отщепления лиганда и увеличения количества положительно заряженных групп. Нами обнаружено, что выход полинуклеотида при хроматографии poly(A) на свежеприготовленном адсорбенте В составляет 90%, а после хранения адсорбента в течение года при рН 7 и 4° не превышает 50%. Такое же ухудшение свойств адсорбента наблюдалось и при многократном его использовании.

Таким образом, в ходе модельных экспериментов показано, что адсорбент Б дает лучшие результаты при хроматографии, чем адсорбент А, а оптимальный выход poly(A) достигается при использовании для элюции 90% формамида в ЭБР, содержащем 0,5% додецилсульфата натрия, при 50°. При этих условиях элюции не только нарушается биоспецифическая А·U-гибридизация [11], но и значительно ослабляются ионообменные взаимодействия. Выделение poly(A)-мРНК из цитоплазмы и ядер клеток печени мышей было осуществлено в указанных оптимальных условиях.

РНК выделяли фенольно-температурным фракционированием по методике [14]. ДНК-подобные РНК метили [<sup>14</sup>С]оротовой кислотой (30 мКи на мышь) 60—90 мин в присутствии малых доз актиномицина D (5 мг на мышь) для избирательного блокирования синтеза рРНК. При хроматографии цитоплазматических и ядерных РНК с адсорбентом Б связывалось соответственно около 2 и 30% общего количества введенной РНК. Количество тотальной РНК в отдельных фракциях определяли спектрофотометрически, а долю быстрометящейся нерибосомной РНК — по радиоактивной метке. В случае цитоплазматической РНК была проведена последовательная элюция ЭБР при 20, 50° и далее 90% формамидом в ЭБР с 0,5% додецилсульфата натрия при 50° (в указанных фракциях содержалось соответственно 4,3; 1,9 и 0,35% общего количества РНК). Полученные данные свидетельствовали о том, что использование для элюции буферного раствора, содержащего формамид, обеспечивает количественный выход связанной с адсорбентом poly(A)-мРНК.

Элюированные с колонки цитоплазматические и ядерные РНК, содержащие poly(A), осаждали двумя объемами этанола с 2% ацетата натрия

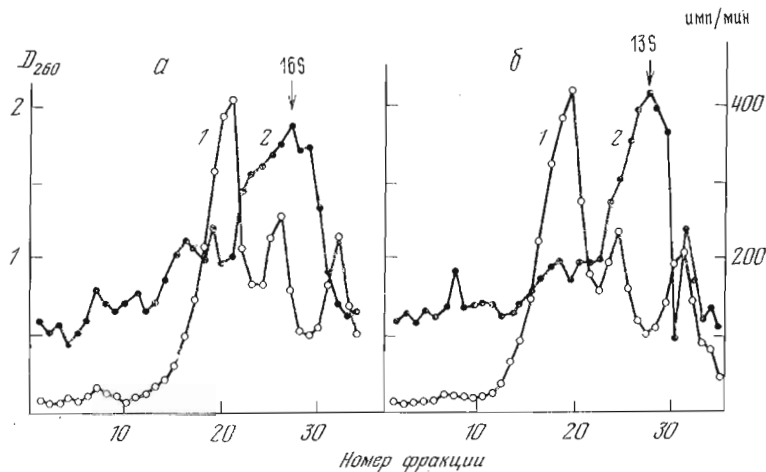


Рис. 3. Ультрацентрифугирование (ротор SW 25.2; 23 000 об/мин, 18 ч, 4°) в градиенте концентрации сахарозы РНК печени мышей, меченых 90 мин в условиях частичного актиномицинового блока. *a* — ядерные РНК; *b* — цитоплазматические РНК. 1 — оптическая плотность РНК-носителя; 2 — радиоактивность

(конечная концентрация). Меченый материал при центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы (10—35%) при 23 000 об/мин и 4° давал характерное для высокомолекулярной РНК распределение (рис. 3) (в качестве маркеров использовали 18S- и 28S-рРНК).

Количественная десорбция poly(A)-мРНК с биоспецифического адсорбента имеет существенное значение при изучении метаболизма информационных РНК. Неспецифические эффекты при аффинной хроматографии осложняют процесс выделения poly(A)-мРНК [3]. В настоящей работе показана возможная роль электростатических взаимодействий. Решающий вклад катионных групп на адсорбенте в неспецифическое связывание белков при аффинной хроматографии в настоящее время не вызывает сомнений [15, 16]. При аффинной хроматографии poly(A)-мРНК в условиях адсорбции (ГБР, высокая ионная сила) ионообменные взаимодействия не играют существенной роли. В условиях последующей элюции (низкая ионная сила) часть материала может оставаться на колонке в результате многоточечного электростатического взаимодействия ионизованных фосфатных групп с катионными группами адсорбента. При повторном использовании адсорбента или его регенерации в буферных растворах с высокой ионной силой часть электростатически связанного материала будет вновь специфически гибридизоваться с иммобилизованной poly(U). При последующей элюции возможно загрязнение препаратов меченым материалом предыдущего эксперимента. Следовательно, при аффинной хроматографии poly(A)-мРНК важное значение имеет исключение или сведение к минимуму количества положительно заряженных групп на биоспецифическом адсорбенте.

Наряду с предложенными выше оптимальными условиями проведения хроматографии poly(A)-мРНК на новых высокоэффективных poly(U)-содержащих адсорбентах с полисахаридными вставками заслуживает внимания проведение элюции при pH 9 [17]. Другие способы уменьшения количества катионных групп на биоспецифических адсорбентах [12] также могут оказаться полезными при проведении аффинной хроматографии poly(A)-мРНК. Представляется целесообразным и поиск новых методов иммобилизации poly(U) на сефарозе, исключающих активацию бромцианом.

## Экспериментальная часть

В работе использовали сефарозу 4Б (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (Sigma, США), poly(U) и poly(A) (Reanal, Венгрия), BrCN (Serva, ФРГ).

Ацетонитрил перегоняли несколько раз над  $P_2O_5$  и в заключение над поташом. Гликоген выделяли из печени кролика по методике [18]. УФ-спектры снимали на спектрофотометрах СФ-4 и Spesord (ГДР). Хроматографию проводили с использованием коллектора Mini-Rac и денситометра Uvicord (LKB, Швеция). Центрифугирование проводили на ультрацентрифуге Spinco L-2-65B (Beckman, США) и MSE (Англия). Радиоактивность подсчитывали в сцинтилляционном спектрометре Nuclear Chicago Mark 2 после осаждения радиоактивных проб 10% трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация) на фильтрах HUFFS (ЧССР). Коррекцию гашения проводили методом отношения каналов при помощи компьютера Olivetti Programma 101. Коэффициенты седиментации при центрифугировании мРНК в градиенте плотности сахарозы рассчитывали по методу [19].

Присоединение лигандов к сефарозе проводили при осторожном перемешивании на магнитной мешалке при минимальном числе оборотов. Солюбилизацию адсорбентов А и Б и контрольных производных сефарозы (АЭД-сефарозы и гликоген-ГСФ соответственно) осуществляли по следующей методике: 0,2 мл производного сефарозы в 12 мл 1 н. NaOH, содержащего 0,1%  $NaNH_4$ , нагревали 2 ч при 75–80°, реакционную смесь центрифугировали при 7000 об/мин в течение 15 мин и надосадочную жидкость использовали для измерения поглощения при 260 нм.

Азот определяли по Кьельдалю.

При работе использовали калий-фосфатные буферные растворы: 5 М, рН 11,9 (буфер 1) и 0,1 М, рН 7,5 (буфер 2); 0,1 М натрий-ацетатный, рН 4,8 (буфер 3).

*Активация сефарозы 4Б бромцианом.* Сефарозу (20 мл) промывали 0,2 л дистиллированной воды и переносили в колбу, содержащую 20 мл буфера 1. К перемешиваемой суспензии в течение 2 мин при 4° добавляли раствор BrCN (получен растворением 5 г BrCN в 2,5 мл ацетонитрила с последующим разбавлением водой до 10 мл). Смесь энергично перемешивали 2 мин при 4°, затем гель переносили на пористый фильтр, быстро промывали 0,2 л холодного 0,1 М  $NaHCO_3$  и холодной водой (0,2 л) или буферным раствором, используемым для присоединения лиганда (0,2 л). Активированную сефарозу немедленно смешивали с раствором соответствующего лиганда.

*АЭД-сефароза.* Суспензию 18 мл активированной бромцианом сефарозы в 18 мл 0,1 М  $NaHCO_3$ , содержащего 0,5 М NaCl, рН 9, и 2,7 г АЭД ( $\gamma^{NH_2}$  12), перемешивали 16 ч при 4°. Затем гель промывали 1 л воды, 0,2 л 0,2 н. NaCl и 0,2 л воды и перемешивали 2 ч при 20° с 2 объемами 1 М этаноламина при рН 9. Промывали водой, суспендировали в равном объеме воды и перемешивали 72 ч при 20° с 2–3 каплями уксусной кислоты и 20 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида. После промывания 0,2 л 1 н. HCl и 0,5 л воды АЭД-сефарозу хранили в водной суспензии при 4° в присутствии 0,02%  $NaN_3$ .

*Гидразидосуцинил-сефароза.* 20 мл сефарозы, активированной BrCN, перемешивали 5 ч при 20° с раствором 5,85 г (40 ммоль) дигидразида янтарной кислоты в 20 мл воды при рН 8,0–8,5. После окончания реакции гель промывали водой до отрицательной реакции фильтрата с тринитробензолсульфокислотой, затем 0,2 л 0,2 н. NaCl и 0,2 л воды.

*Периодатное окисление гликогена.* К раствору 2,41 г гликогена в 15 мл воды постепенно при охлаждении и перемешивании в темноте добавляли раствор 321 мг  $NaIO_4$  в 3 мл воды. Смесь перемешивали 1,5 ч при 20° в темноте, поддерживая рН 6,5 добавлением 0,1 н. NaOH, затем разбав-

ляли до 35 мл буфером 3 и использовали для присоединения к ГСФ.

*Гликоген-ГСФ.* 30 мл ГСФ промывали 150 мл буфера 3 и перемешивали 16 ч при 4° с 35 мл раствора гликогена, окисленного периодатом натрия (см. предыдущий эксперимент). Затем гель промывали 5 л воды, 0,2 л 2 н. NaCl и 0,2 л воды, суспендировали в 30 мл 0,1 М NaHCO<sub>3</sub>, добавляли при охлаждении 600 мг NaBH<sub>4</sub> и перемешивали 3 ч при 4°. Адсорбент промывали 1 л воды и хранили в водной суспензии в присутствии 0,02% NaN<sub>3</sub> при 4°.

Промывные воды после присоединения гликогена концентрировали в вакууме при 40° и определяли содержание несвязавшегося полисахарида фенол-сульфатным методом.

*Poly(U)-АЭД-сефароза (адсорбент А).* К охлажденной до 4° суспензии 10 мл АЭД-сефарозы в 10 мл буфера 1 добавляли при перемешивании за 2 мин при 4° раствор 2 г ВгСN в 1 мл ацетонитрила, разбавленный водой до 5 мл. Суспензию энергично перемешивали 2 мин при 4°, выливали на пористый фильтр, быстро промывали 200 мл 0,1 М NaHCO<sub>3</sub>, 100 мл воды и 100 мл буфера 2. Гель немедленно суспендировали при 4° в растворе 15 мг poly(U) в 10 мл буфера 2, перемешивали 16 ч при 4°, адсорбент промывали 0,5 л буфера 2 до отсутствия поглощения при 260 нм в промывных водах, затем 0,1 л воды. Адсорбент перемешивали 2 ч при 20° с 1 М раствором этаноламина (рН 9), промывали водой и хранили при 4° в виде суспензии в буфере 2 в присутствии 0,02% NaN<sub>3</sub>.

*Poly(U)-гликоген-ГСФ (адсорбент В).* Активировали 10 мл гликоген-ГСФ с помощью 2 г ВгСN, как описано в предыдущем эксперименте, и переносили в раствор 15 мг poly(U) в 10 мл буфера 2. Суспензию перемешивали 20 ч при 4°, адсорбент промывали 0,5 л буфера 2 и 0,1 л воды, суспендировали в 10 мл воды и перемешивали 2 ч при 20° с 3 мг гидразида уксусной кислоты. Затем адсорбент промывали 0,5 л воды и 0,2 л буфера 2 и хранили так же, как адсорбент А.

Аффинную хроматографию проводили на стеклянных колонках (7,0 × × 0,6 см). Объем адсорбента 1 мл. Скорость тока через колонку 15 мл/ч. Фракции анализировали по поглощению при 260 нм или по радиоактивной метке.

Авторы выражают благодарность А. Е. Васильеву (Москва) за предоставление препарата АЭД.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Lindberg U., Persson T. (1972) Eur. J. Biochem., 31, 246—254.
2. Aviv H., Leder P. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 1408—1412.
3. Bantle J. A., Maxwell I. H., Hahn W. E. (1976) Anal. Biochem., 72, 413—427.
4. Кляццкий Б. А., Шапот В. С. (1976) в сб.: Успехи биологической химии (Стенаненко Б. Н., ред.), т. XVII, с. 234—267, «Наука», М.
5. Кляццкий Б. А., Митина В. X. (1976) Авт. свид. № 520370; Бюл. изобретений, 53 (25), с. 78.
6. Кузнецова Е. А., Шижканова Л. С., Королева Г. Е., Свиягина Е. Д., Шлимак В. М., Васильев А. Е. (1978) Ж. общ. химии, 48, 1410—1413.
7. Porath J., Aspberg K., Drevin H., Axen R. (1973) J. Chromatogr., 86, 53—56.
8. March S. C., Parikh I., Cuatrecasas P. (1974) Anal. Biochem., 60, 149—152.
9. Cuatrecasas P. (1970) J. Biol. Chem., 245, 3059—3065.
10. Failla D., Santi D. V. (1973) Anal. Biochem., 52, 363—368.
11. Ihle J. N., Lee K. L., Kenney F. T. (1974) J. Biol. Chem., 249, 38—42.
12. Schaar R. L., Sparks T. F., Roseman S. (1977) Anal. Biochem., 79, 513—525.
13. Wilchek M., Miron T. (1974) Mol. Cell. Biochem., 4, 181—187.
14. Georgiev G. P., Mantuyeva V. L. (1962) Biochim. et biophys. acta, 61, 153—156.
15. Nishikawa A. H., Bailon P., Ramel A. H. (1976) J. Macromol. Sci., A10, 149—190.
16. Wilchek M., Miron T. (1976) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 72, 108—113.
17. Brykina E. V., Podobed O. V., Chernovskaya T. V., Lerman M. I. (1974) Molec. Biol. Rep., 1, 417—422.
18. Stetten M. R., Katzen H. M., Stetten D., Jr. (1956) J. Biol. Chem., 222, 587—599.
19. Martin R. C., Ames B. N. (1961) J. Biol. Chem., 236, 1379—1388.

Поступила в редакцию  
11.IV.1978

ISOLATION AND PURIFICATION OF BIOPOLYMERS BY BIOSPECIFIC  
AFFINITY CHROMATOGRAPHY. I. NEW HIGHLY EFFECTIVE BIOSPECIFIC  
ADSORBENTS FOR BIOAFFINITY CHROMATOGRAPHY OF POLYADENYLATED  
mRNA

KLYASHCHITSKII B. A., KOROLEVA G. E., MITINA V. Kh.,  
ALYOKHINA R. P., ZBOROVSKAYA I. B., LIKHTENSTEIN A. V.

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy  
of Medical Sciences of the USSR, Moscow; Cancer Research Center,  
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

New highly effective biospecific adsorbents for affinity chromatography of poly(A)-RNA have been prepared: poly(U)-aminoethylcarbamoyldextran-Sepharose (adsorbent A) and poly(U)-glycogen-hydrazidosuccinyl-Sepharose (adsorbent B). The poly(U) content was 1.47 and 1.45 mg/ml, and poly(A) binding capacity was 1.44 and 1.48 mg/ml for the adsorbents A and B, respectively. The chromatographic studies of poly(A) and poly(U) using both these adsorbents demonstrated the electrostatic nature of non-specific polynucleotide-adsorbent binding. Isolation of poly(A)-mRNA from mouse liver cells was performed on adsorbent B, which is the first example of application of biospecific adsorbents with polysaccharide spacers for affinity chromatography. Optimal conditions for poly(A)-mRNA affinity chromatography, aimed at obtaining the biopolymer in a quantitative yield, are discussed.