



УДК 577.155.07:543.544:547.1'128'854.4'455.522'118.07

## БИОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НУКЛЕАЗ

2\*. ОЧИСТКА ЭКЗОНУКЛЕАЗЫ А5 АКТИНОМИЦЕТОВ  
НА ОРГАНОКРЕМНЕЗЕМНЫХ СОРБЕНТАХ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ  
5-ОКСИУРИДИН-2'(3'),5'-ДИФОСФАТОМ*Банникова Г. Е., Варламов В. П., Самсонова О. Л.,  
Рогожин С. В.**Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова  
Академии наук СССР, Москва*

Описан синтез биоспецифических сорбентов на органокремнеземной основе, содержащих в качестве лиганда 5-оксиуридин-2'(3'),5'-дифосфат, присоединенный к носителю через гетероциклическое основание. С помощью полученных сорбентов препарат экзонуклеазы А5 очищен в 74 раза. Синтезированные сорбенты обладали незначительной неспецифической сорбцией и были стабильны при многократном использовании.

Неуклонно возрастающая потребность в чистых ферментных препаратах микробного происхождения стимулирует развитие и совершенствование методов их выделения и очистки. Для этой цели все чаще используют биоспецифические сорбенты, содержащие в качестве лигандов нуклеотиды, аминокислоты, липиды и другие соединения.

Данное сообщение посвящено синтезу биоспецифического сорбента для очистки экзонуклеазы А5 актиномицетов [2]. Этот фермент расщепляет РНК и депатурированную ДНК, действуя с 3'-конца молекулы. Он не специфичен к сахару нуклеиновых кислот, структура гетероциклического основания также не оказывает заметного влияния на скорость гидролиза [3]. Экзонуклеаза А5 оказалась полезным реагентом как при исследовании нуклеиновых кислот [3, 4], так и для решения практических задач, например для гидролиза суммарных дрожжевых РНК до нуклеозид-5'-монофосфатов, являющихся интенсификаторами вкуса и запаха пищевых продуктов [5].

Наиболее нежелательные и трудноотделимые примеси в препаратах 5'-экзонуклеаз — неспецифическая фосфатаза и 5'-нуклеотидаза. В исходном препарате, с которым мы работали, соотношение нуклеазной и фосфатазной активностей равно 3. Для освобождения от фосфатазной активности ранее [6] использовали избирательную тепловую инактивацию при рН 5,5 в присутствии 2-меркаптоэтанола с последующим частичным отделением фосфатазы на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой. При этом получали препарат с уд. акт. 4000 ед. акт./мг белка и соотношением нуклеаза — фосфатаза (н/ф) 10 000. Однако, как оказалось, при длительном хранении, в процессе которого препарат подвергался замораживанию и оттаиванию, нуклеазная активность в нем сохранялась, а фосфатазная в значительной степени возрастала и соотношение нуклеаза — фосфатаза достигало 200. Мы предполагали, что биоспецифическая хроматография позволит разделить эти две активности и получить более чистый препарат экзонуклеазы А5.

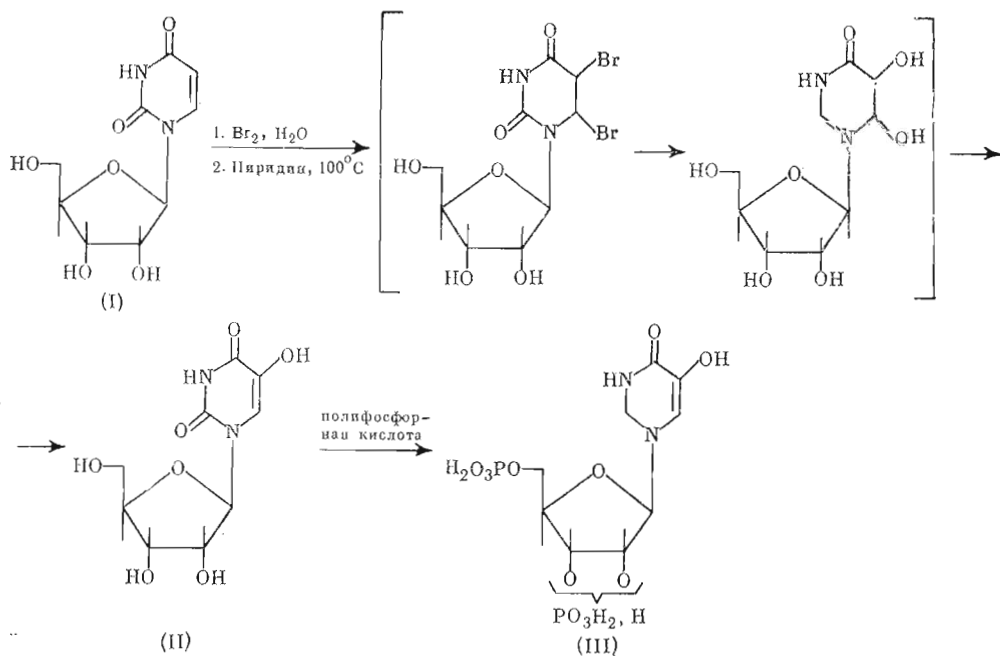
Ранее нами исследовались конкурентные ингибиторы экзонуклеазы А5 типа рNp, дифосфаты уридина, цитидина и их производных.  $K_i$  для исследованных соединений оказались близкими по величине и составляли  $10^{-5}$  М, что позволяет использовать их в качестве лигандов для биоспецифической хроматографии [1].

\* Сообщение 1 см. [1].

Было установлено [7], что введение заместителя (R) по 5'-фосфатному остатку, т. е. превращение  $pNp$  в  $RpNp$  резко снижает ингибирующую способность соединения, а введение заместителя по 3'-фосфатной группе с образовавшимся  $pNpR$  делает соединение субстратом, если R имеет нуклеозидную природу. Поэтому мы считали целесообразным присоединить ингибитор к носителю через гетероциклическое основание.

Известно, что уридин, имеющий в 5-положении электронодонорные заместители, способен взаимодействовать с арилдазониевыми солями, об-

Схема 1



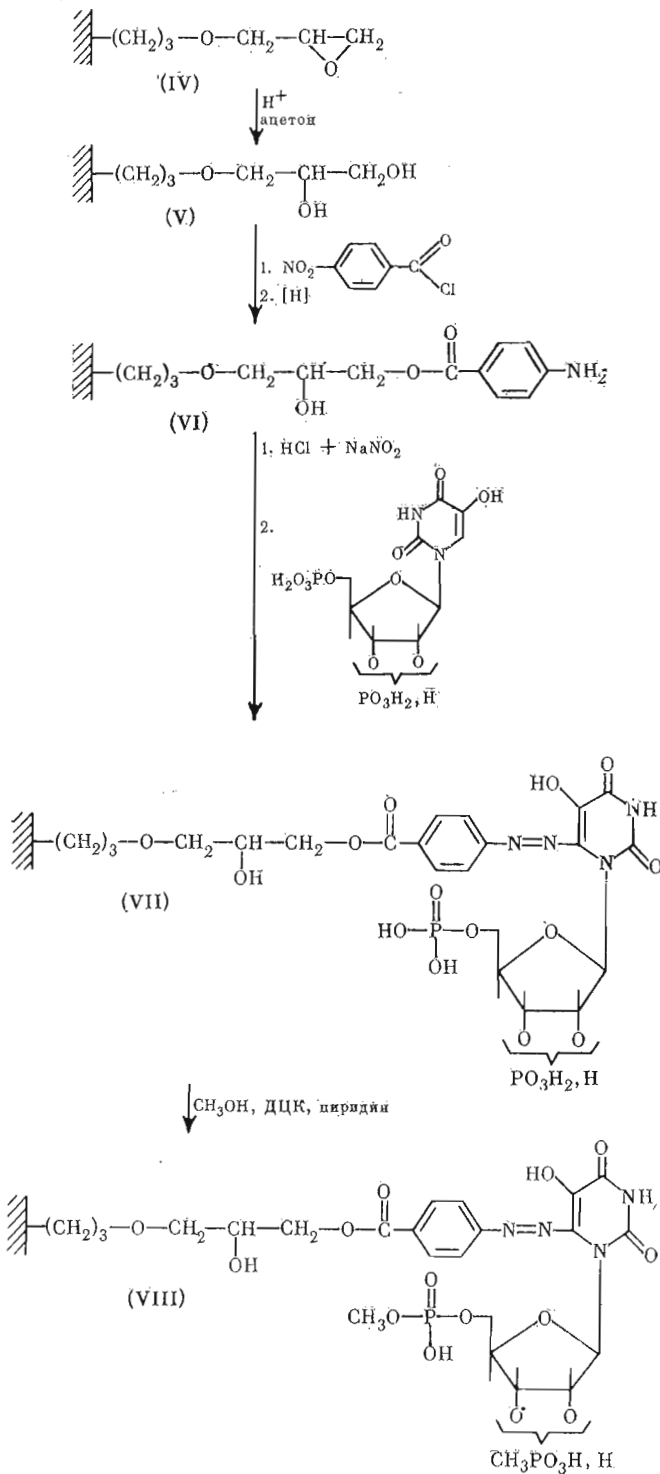
разуя 6-арилдазуридиновые производные [8]. Мы использовали это свойство для присоединения нуклеотидного лиганда к аминоарилсодержащим сорбентам с помощью реакции азосочетания. С этой целью синтезировали 5-оксиуридин-2'(3')5'-дифосфат (III) по схеме 1.

Для иммобилизации лиганда были выбраны аминоарилсодержащие органокремнеземные сорбенты на основе силохрома. Силохром предварительно обрабатывали солями алюминия для увеличения его устойчивости в водных растворах [9]. Сорбенты на неорганической основе имеют жесткую структуру, не меняющуюся при различных значениях pH, полной силы, температуры, механически прочны и не подвержены микробному заражению. Для подавления неспецифической сорбции белков обработанный солями алюминия силохром (алюсил) покрывали органическими полимерами. Подобные сорбенты успешно использовались для аффинной и ковалентной хроматографии белков [10, 11]. В данной работе мы использовали два органокремнеземных сорбента. Первый (VIII) — был получен из алюсила после предварительной обработки 3-(2',3'-эпоксипропокси)пропилтриметоксисиланом. Эпоксидный цикл далее раскрывали в кислом растворе ацетона; аминоарильное производное (VI) получали с помощью хлорангидрида *n*-нитробензойной кислоты с последующим восстановлением нитрогруппы (схема 2). Второй сорбент (IX) был получен с помощью присоединения к алюсилу 3,5% полиэтиленгликольметакрилата [12] с последующим превращением оксигруппы в аминоарильные группы.

С целью предохранения нуклеотидов-лигандов от действия фосфатазы, присутствующей в препарате, они были превращены в метиловые эфиры [13]. Реакцию метанолиза проводили на полученных сорбентах.

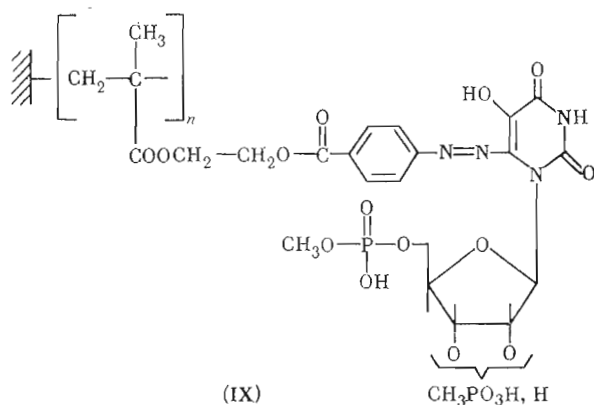
Схема очистки экзонуклеазы A5 представлена в таблице. В случае использования на последней стадии сорбента (IX) был получен препарат с

Схема 2



близкими характеристиками — 60 000 ед. акт./мг белка и  $n/\phi$  250. Предварительную очистку осуществляли с помощью высаливания и гель-хроматографии. Для элюции с сефадекса G-75 использовали буфер А (5 мМ трис-НСl, рН 6,8, содержащий 100 мМ NaCl и 1 мМ MgCl<sub>2</sub>), необходимый для связывания фермента с биоспецифическим сорбентом.

Интересно, что зависимость специфической сорбции от рН имеет максимум не только при рН ~9 (оптимум работы фермента), но и при рН 6,8



(рис. 1). Это значение и было выбрано в качестве оптимального, так как синхром — основа биоспецифического сорбента — более устойчив в нейтральной области, чем в щелочной. Предварительно было показано, что неспецифическая сорбция в этих условиях на сорбенте без лиганда (V) составляла 0,5 мг белка/г, или ~2% общего количества белка, причем эта величина уменьшалась до 0, если сорбент использовали повторно. Биоспецифический сорбент достаточно устойчив в работе, после шести циклов работы на колонке сорбент (VIII) сохранял 98,3% лигандов.

После насыщения препаратом фермента биоспецифический сорбент промывали буфером А до отсутствия поглощения в элюате при 280 нм. К сожалению, на колонке сорбировалась не только нуклеаза, но и фосфатаза, поэтому необходимо было подобрать условия их разделения. Было исследовано несколько вариантов элюции. При градиентной элюции (рис. 2а) первый пик соответствовал препарату с соотношением н/ф ~30. Значительная часть нуклеазной активности в этих условиях оставалась на колонке, и ее удавалось снять только с помощью буфера с высокой (1 М) концентрацией трис (гидроксиметил) аммонметана.

Исследовались возможности специфической элюции фосфатазы с использованием в качестве элюента растворов ее субстратов и ингибиторов, например *p*-нитрофенилфосфата, фруктозо-1,6-дифосфата или двузамещенного фосфата натрия. Препараты с наилучшими соотношениями н/ф были получены при использовании для элюции раствора 20 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> в буфере А (рис. 2б). При этом вместе с фосфатазой элюируется частично и нуклеаза, что подтверждает отмеченный ранее [14] факт — трудность хроматографического разделения этих ферментов в случае использования культуры, выращенной, как в нашем случае, в присутствии CaCO<sub>3</sub>. После удаления большей части фосфатазы при элюции раствором 20 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,

**Схема очистки экзонуклеазы А5**

Стадия очистки	Суммарная нуклеазная активность, ед. акт.	Удельная нуклеазная активность, ед. акт./мг белка	н/ф	Выход, %
Исходный препарат	80 000	1310	2,5	100
Высаливание суммарного белка с сульфатом аммония	47 360	5980	3,3	59,2
Гель-хроматография на сефадексе G-75	41 900	6120	10,2	52,4
Биоспецифическая хроматография (0,5 г сорбента (VIII)) *	21 219	96 000	212	26,5

\* Элюция трис-CH<sub>2</sub>COOH-буфером, pH 5 (0,05 → 1М) — см. рис. 2а.

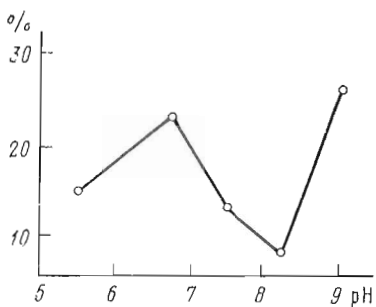


Рис. 1. Зависимость биоспецифической сорбции экзонуклеазы А5 от pH. На оси ординат отложено отношение разности нуклеазных активностей циркулирующего раствора после сорбции фермента на колонке с сорбентом (V) (без лиганда) и на колонке с сорбентом (VIII) (с лигандом) к нуклеазной активности исходного раствора в процентах

(соотношение н/ф в первом пике определить не удалось из-за присутствия неорганического фосфата, не полностью удаляемого при диализе против буфера А) использовали градиентную элюцию. Последний пик, элюируемый 1,5 М трис- $\text{CH}_3\text{COOH}$ -буфером, pH 5, соответствовал препарату с соотношением н/ф 780. При электрофорезе этого препарата экзонуклеазы А5 в 9% полиакриламидном геле при pH 8,9 в присутствии денатурирующих агентов (додецилсульфата натрия и 2-меркаптоэтанола) получили две белковые зоны — одну четкую и интенсивную, вторую слабую. Можно предположить, что вторая, слабая, зона соответствует присутствующей в препарате фосфатазе.

Очищенный нами препарат экзонуклеазы А5, характеристика которого представлена в таблице, имел удельную активность в 24 раза выше, чем ранее полученный [6]. Он пригоден как для получения 5'-нуклеотидов, так и для структурных исследований нуклеиновых кислот.

### Экспериментальная часть

В работе был использован силихром отечественного производства с диаметром пор 1130 Å,  $S_{уд}$  34,1 м<sup>2</sup>/г, размером частиц 0,5–0,315 мм. Обработку силихрома солями алюминия проводили по методу [9], присоединение полиэтиленгликольметакрилата в сорбенте (IX) — по методу [12]. Использовали 3-(2',3'-эпоксипропоксипропил)триметоксисилан (Serva, ФРГ), монобариевую соль фруктозо-1,6-дифосфорной кислоты (Reanal, Венгрия), *n*-нитрофенилфосфат натрия (Feinchemie K.-H. Kallies KG, ФРГ), двузамещенный фосфат натрия марки ос.ч. отечественного производства, трисгидроксиметиламинметан (Koch-Light, Англия), сефадекс G-75 (Pharmacia, Швеция).

Фермент выделяли из препарата экзонуклеазы А5 актиномицетов (КФ 3.1.4.1) отечественного производства. Препарат содержит  $\leq 1\%$  белка, соотношение нуклеаза — фосфатаза  $\sim 3$ , удельная нуклеазная активность  $\sim 1000$  ед. акт./мг белка.

ТСХ осуществляли в системе *n*-пропиловый спирт — аммиак — вода, 11 : 7 : 2, на готовых стеклянных пластинках со слоем целлюлозы фирмы «Merck» (ФРГ). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре «Spectord UV-VIS», ПМР-спектры — на приборе «Bruker WP-60» при 25° С с внешним стандартом гексаметилидисилоксаном в  $(\text{C}^2\text{H}_5)_2\text{SO}$ .

Нуклеазную и фосфатазную активности фермента определяли как описано в работе [6], но для определения неорганического фосфата пользовались методом Аялена-Баргмета [15]. Соотношение между экзонуклеазной и фосфатазной активностями (н/ф) рассчитывали как мольное отношение продуктов основной и побочной реакций, согласно работе [6].

Содержание белка определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (Serva, ФРГ).

Количество иммобилизованного нуклеотида на носителе вычисляли по содержанию неорганического фосфата в растворе [15] при обработке сорбента 72% хлорной кислотой при 200–250° С в течение 15 мин.

Электрофорез с додецилсульфатом натрия и 2-меркаптоэтанола в трисглициновом буфере (pH 8,3) проводили по методу [16]. Образцы инкуби-

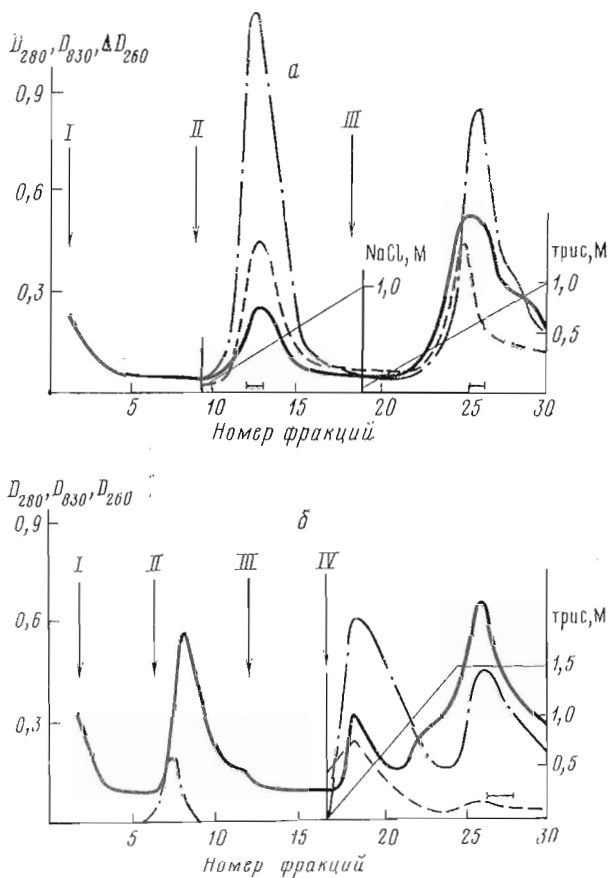


Рис. 2. Биоспецифическая хроматография экзонуклеазы А5 на сорбенте (VIII). Колонка 0,8×2 см, скорость элюции 17 мл/ч, объем фракций 8,5 мл. I – экзонуклеазная активность, пропорциональная  $\Delta D_{260}$  [6], 2 – фосфатазная активность, пропорциональная  $D_{830}$ , 3 – содержание белка,  $D_{280}$ . Стрелки указывают смену элюентов: (а) I – буфер А, II – линейный градиент NaCl (100 мМ – 1 М) в буфере 50 мМ трис- $\text{CH}_3\text{COOH}$ , pH 5, содержащем 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , III – линейный градиент (50 мМ – 1 М) трис- $\text{CH}_3\text{COOH}$ -буфера, pH 5, содержащего 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; (б) I – буфер А, II – 20 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  в буфере А, III – буфер А, IV – линейный градиент (50 мМ – 1,5 М) трис- $\text{CH}_3\text{COOH}$ -буфера, pH 5, содержащего 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ . Отмечены фракции, отбираемые для дальнейших анализов

ровали 30 мин на кипящей водяной бане с додецилсульфатом натрия (2%) и 2-меркаптоэтанолом (5%). Электрофорез вели 4,5 ч в 9% полиакриламидном геле при токе 3 мА на трубку.

*Определение зависимости биоспецифической сорбции экзонуклеазы А5 от pH.* По 10 мл раствора фермента (0,28 мг белка/мл, 400 ед. акт./мл) диализовали против 5 мМ трис- $\text{HCl}$ -буферов, содержащих 1 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 100 мМ NaCl с pH 5,5; 6,8; 7,5; 8,2; 9,0. Сорбенты (V) и (VIII) (100 мг) одновременно со скоростью 50 мл/ч насыщали в одинаковых колонках растворами фермента (5 мл) с одинаковыми значениями pH в течение 1 ч. Определяли нуклеазную активность раствора до и после циркуляции раствора через колонку с сорбентом.

*Определение неспецифической сорбции сорбента (V).* В колонке насыщали 1 г сорбента (V) со скоростью 56 мл/ч раствором фермента (65 мл, 0,4 мг белка/мл, 1200 ед. акт./мл) в буфере А в течение 1 сут. Сорбент промывали буфером А до отсутствия поглощения в элюате при 280 нм и определяли содержание белка в растворе фермента после циркуляции через колонку с сорбентом и во фракциях, собранных при промывании сорбента буфером А.

*Выделение и очистка препарата экзонуклеазы А5.* Белок высаливали из раствора 1 г препарата в 15 мл раствора 100 мМ NaCl, содержащего 4 мМ

MgCl<sub>2</sub>, с помощью сульфата аммония, концентрацию которого повышали до 90% насыщения. Получившийся после центрифугирования осадок растворяли в течение 1 сут в 3 мл раствора 100 мМ NaCl, содержащего 1 мМ MgCl<sub>2</sub>. Нерастворившийся осадок отделяли центрифугированием, раствор (2,7 мг белка/мл; 2,9 мл) пропускали через колонку с сефадексом G-75 (колонка 1,5×36 см, скорость элюции 30 мл/ч, объем фракций 15 мл), элюировали буфером А.

Фракции, обладающие нуклеазной активностью, объединяли и получали 163 мл препарата, содержащего 0,042 мг белка/мл и 257 ед. акт./мл. 0,5 г сорбента (VIII) в колонке со скоростью 50 мл/ч при 40°С в течение 12 ч насыщали раствором ферментного препарата (163 мл) с использованием циркуляции (за 6,5 ч достигается 90% насыщения). Десорбцию фермента с биоспецифического сорбента проводили при 20°С (см. рис. 2а).

После промывки сорбента буфером А до отсутствия поглощения в элюате при 280 нм использовали элюцию в линейном градиенте NaCl (100 мМ — 1 М) в трис-CH<sub>3</sub>COOH-буфере, pH 5, содержащем 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. При этом пик (12-я и 13-я фракции) соответствовал препарату с активностью 2000 ед. акт./мл (7740 ед. акт./мг белка) и величиной и/ф ~30. При элюции в линейном градиенте (50 мМ — 1 М) трис-CH<sub>3</sub>COOH-буфера, pH 5, содержащего 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, был получен ферментный препарат (25-я и 26-я фракции), имеющий активность 1248 ед. акт./мл (96 000 ед. акт./мг белка) и и/ф 212.

Второй способ элюции — см. рис. 2б.

*5-Оксиуридин (II)*, полученный по известной методике [17] с выходом 50%, перекристаллизовывали из водного этанола, т. пл. 236—238°С, *R<sub>f</sub>* 0,53. УФ [H<sub>2</sub>O, λ<sub>макс</sub>, мм (ε)]: pH 6,8—2,81 (7942), pH 2—280 (8211), pH 9,1—306 (6887), 243 (5792). ПМР, δ, м.д.: 5,77 (C5—OH), 7,40 (C6—H). Вещество дает голубое окрашивание с раствором FeCl<sub>3</sub>. Найдено, %: С 41,72, Н 4,65, N 10,55. C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Вычислено, %: С 41,70, Н 4,28, N 10,81.

*5-Оксиуридин-2'(3'),5'-дифосфат (III)* был получен, как описано ранее, с помощью полифосфорной кислоты [6]. Раствор нуклеотида давал голубую окраску с FeCl<sub>3</sub>. *R<sub>f</sub>* 0,28. УФ (H<sub>2</sub>O, λ<sub>макс</sub>, мм): pH 6,8—281, pH 9,1—306, 243. ПМР, δ, м.д.: 6,00 (C5—OH), 7,5 (C6—H). Найдено P 15,38%. Вычислено P 14,7%.

*Сорбент (VIII)*. К 25 г алюсила в 350 мл толуола добавляли 10 мл 3-(2',3'-эпоксипропокс)пропилтриметоксисилана и кипятили при перемешивании 8 ч, затем переносили на стеклянный пористый фильтр № 3, промывали 300 мл толуола, 600 мл ацетона и сушили на фильтре.

К полученному производному (IV) добавляли 500 мл раствора HCl в ацетоне (0,1 моль/л), перемешивали 2 ч при 20°С, затем переносили на фильтр, промывали до нейтрального значения pH, сушили в вакууме при 80°С. Найдено, %: С 2,64, Н 0,89.

Соединение (V) суспендировали в 250 мл абсолютного хлороформа, содержащего 12,5 г хлорангидрида *n*-нитробензойной кислоты, затем добавляли 9,4 мл триэтиламина. Смесь кипятили при перемешивании в течение 1,5 ч, переносили на пористый фильтр № 3, промывали 1 л хлороформа, 0,5 л ацетона, 0,5 л воды, вновь ацетоном и сушили на воздухе. Нитроарильное производное кипятили 1 ч в 300 мл 10% водного пиридина, содержащего 12,5 г растворенного Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. Амипоарильное производное (VI) промывали 2 л воды, 0,5 л 0,1 н. HCl, 1% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, водой, ацетоном и сушили в вакууме при 80°С. Концентрация NH<sub>2</sub>-групп 133 мкмоль/г.

К 3 г сорбента (VI) добавляли 60 мл 2,5 н. HCl и 1,26 г NaNO<sub>2</sub>, перемешивали 30 мин при 4°С, промывали водой и 0,2 М ацетатным буфером, pH 5, затем добавляли 15 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 7,6, содержащего 168 мг 5-оксиуридин-2'(3'),5'-дифосфата (399 мкмоль), и перемешивали 12 ч при 4°С. Непрореагировавший нуклеотид выделяли из раствора на колонке с сефадексом G-10. Сорбент промывали водой, 1 М NaCl, водой, ацетоном и сушили в вакууме. Сорбент (VII) содержал 15 мг нуклеотида/г (36,5 мкмоль нуклеотида/г).

К 3 г сорбента (VII) добавляли 5 мл абс. пиридина и упаривали на роторном испарителе (повторяли 3 раза). К сухому сорбенту добавляли

30 мг абс. метанола, 0,39 мл триэтиламина и 1,9 мл 1 М дициклогексилкарбодимида в пиридине. Реакционную массу перемешивали 24 ч при 20°С. Раствор сливали и к оставшемуся сорбенту приливали воду и перемешивали 1 ч, воду сливали и сорбент промывали многократно горячим метанолом, добавляли метанол, подкисленный HCl до pH 2, и кипятили 1 ч. Промывали на пористом фильтре № 3 метанолом, водой, ацетоном и сушили в вакууме. Сорбент (VIII) содержал 7,8 мг нуклеотида/г (17,5 мкмоль нуклеотида/г).

Сорбент (IX) был получен из алюсила с присоединенным полиэтиленгликольметакрилатом [12] по аналогичной схеме. После стадии получения метиловых эфиров он содержал 5,1 мг нуклеотида/г (11,3 мкмоль нуклеотида/г).

Авторы благодарны А. И. Гамзаде за методическую помощь при работе с 3-(2',3'-эпоксипропокс)пропилтриметоксисилоном.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Банникова Г. Е., Варламов В. П., Рогожин С. В. Биоорганич. химия, 1978, т. 4, № 6, с. 825-831.
2. Tatarskaya R. I., Lvova T. N., Abrossimova-Amelyanchik N. M., Korenyako A. I., Bayev A. A. Eur. J. Biochem., 1970, v. 15, № 3, p. 442-449.
3. Львова Т. Н., Татарская Р. И. Мол. биол., 1976, т. 10, вып. 1, с. 792-798.
4. Львова Т. Н., Татарская Р. И. Биохимия, 1976, т. 41, вып. 8, с. 1426-1434.
5. Варламов В. П., Львова Т. Н., Вальковский Д. Г., Моксеев В. Я., Татарская Р. И., Рогожин С. В. Биоорганич. химия, 1975, т. 1, № 6, с. 816-820.
6. Львова Т. Н., Артамонова О. И., Татарская Р. И. Биохимия, 1975, т. 40, вып. 4, с. 703-710.
7. Львова Т. Н., Татарская Р. И., Воюшина Т. Л., Симонян С. З., Варламов В. П., Вальковский Д. Г., Рогожин С. В., Баев А. А. Биохимия, 1978, т. 43, вып. 2, с. 350-364.
8. Kazuyoshi Ikeda, Takahiko Sumi, Kunio Yokoi, Yoshinisa Mizuno. Chem. Pharm. Bull., 1973, v. 21, № 6, p. 1327-1332.
9. А. с. 688431 (СССР). Способ получения модифицированного кремнеземного носителя/Артемова А. А., Варламов В. П., Киселев А. В., Кустова Г. Л., Липкинд Б. А., Никитин Ю. С., Рогожин С. В., Фалина А. С. Оpubл. в Б. И., 1979, № 36.
10. Евстратова Н. Г., Василенко И. А., Кондрагьева П. Ю., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П., Варламов В. П., Семенова И. И., Рогожин С. В. Биоорганич. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1355-1360.
11. Лозинский В. П., Рогожин С. В. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1981, № 8, с. 1879-1884.
12. А. с. 689200 (СССР). Способ получения водонерастворимых биологически активных соединений/Варламов В. П., Власов А. В., Банникова Г. Е., Цетлин Б. Л., Рогожин С. В. Оpubл. в Б. И., 1980, № 44.
13. Khorana H. G. Amer. Chem. Soc., 1959, v. 81, № 17, p. 4657-4660.
14. Татарская Р. И., Львова Т. Н., Артамонова О. И., Кореньяко А. И. Микробиология, 1972, т. 41, вып. 4, с. 621-625.
15. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975, с. 78-80.
16. Laemmli U. K. Nature, 1970, v. 227, p. 680-685.
17. Tohru Ueda. Chem. Pharm. Bull., 1960, v. 8, № 5, p. 455-458.

Поступила в редакцию  
16.VII.1981  
После доработки  
17.VIII.1981

#### BIOSPECIFIC CHROMATOGRAPHY OF NUCLEASES. 2. PURIFICATION OF EXONUCLEASE A5 FROM ACTINOMYCES ON ORGANO-SILICA SUPPORTS [WITH IMMOBILIZED 5-HYDROXYURIDINE-2'(3'),5'-DIPHOSPHATE

BANNIKOVA G. E., VARLAMOV V. P., SAMSONOVA O. L., ROGOZHIN S. V.

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

Biospecific sorbents have been synthesized by attaching 5-hydroxyuridine-2'(3')5'-diphosphate through heterocyclic base to organo-silica supports. Exonuclease A5 was purified 74-fold by affinity chromatography on these sorbents. The latter showed insignificant non-specific binding of proteins and high stability on the repeated use.