



УДК 541.64:542.954:547.28

Изучение олигомеризации белков методом гельпроникающей хроматографии

Кузнецова Н.П., Мишаева Р.Н., Гудкин Л.Р.

Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 20.05.2011 г.

Аннотация

На примере гемоглобина и сывороточного альбумина исследована реакция поликонденсации белков с глутаровым альдегидом. Изучена кинетика поликонденсации. Показано влияние концентрации компонентов и величины рН на процесс олигомеризации. Определено влияние электрохимического состояния белковой макромолекулы на образование межмолекулярных связей и показано, что олигомеризация белков с получением высокомолекулярных продуктов проходит в 2 этапа.

Ключевые слова: поликонденсация, олигомеры белков, гельпроникающая хроматография, глутаровый альдегид, гемоглобин, сывороточный альбумин.

Polycondensation of hemoglobin and serum albumin with glutaraldehyde was investigated. The kinetics of polycondensation has been studied. The influence of component concentration and pH value on process oligomerization of proteins was shown. The effect of the electrochemical state of the protein macromolecule on formation of intermolecular bonds was determined. Oligomerization of proteins up to high molecular products was shown to proceed in two stages.

Keywords: polycondensation, protein oligomers, gel-penetrating chromatography, glutaraldehyde, hemoglobin, serum albumin

Введение

Химическая сшивка белков с помощью бифункционального сшивающего агента – глутарового альдегида (ГА) широко используется при иммобилизации биологических объектов, для получения новых видов полимерных лекарственных и диагностических средств и моделирования биологических явлений [1-4]. Однако до сих пор из-за сложности структуры компонентов неясна химическая природа сшивания белков с помощью ГА. Известно, что при взаимодействии ГА с белками реакция идет с участием аминогрупп N-концевых и ε-лизиновых аминокислотных остатков через образование шиффовых оснований. Альдиминная связь, которая образуется в результате взаимодействия аминогрупп белка с альдегидной группой ГА, оказывается сопряженной с двойной этиленовой связью (на молекуле ГА), что приводит к стабилизации продукта сшивки к кислотному гидролизу [1,5]. Кроме того, альдиминная связь способна медленно переходить в более стабильную кетоаминную связь за счет перегруппировки Амадори [6]. Поэтому процесс модификации аминогрупп белков глутаровым альдегидом практически необратим.

Поскольку все функциональные группы при поликонденсации реагируют независимо, то обычно в результате реакции образуются олигомеры [7]. В образовании олигомеров белков с ГА участвуют как внутримолекулярные химические мостики между функциональными группами белка, так и межмолекулярные ковалентные связи между функциональными группами, принадлежащими разным белковым макромолекулам. Конечный баланс связей зависит от количества доступных реакционноспособных (непротонированных) аминогрупп белка, их расположения на поверхности белковой глобулы, а также от величины общего заряда диполярного белкового макроиона в условиях сшивки. В результате образования межмолекулярных связей увеличивается молекулярная масса (ММ) белка, при этом образуются разветвленные макромолекулы полидисперсные по размеру.

Целью работы является - определение ММ олигомеров белков с помощью ГПХ для сравнительной оценки условий формирования олигобелков.

Эксперимент

В работе использовали гемоглобин крови человека ($MM=65 \cdot 10^3$, pI 6.8), полученный осмотическим гемолизом эритроцитов донорской крови с последующим удалением стромальных элементов скоростным центрифугированием [8]. Концентрацию гемоглобина (Гб) определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм с ацетонциангидрином [9]. Сывороточный альбумин плацентарной крови человека (10%-ный раствор) (молекулярная масса $69 \cdot 10^3$, pI 5.0). Определение количества аминогрупп проводили реакцией с 2,4,6-тринитробензолсульфоокислотой [10]. Количество модифицированных аминогрупп оценивали по разности между количеством определяемых аминогрупп в исходном и модифицированном белках. Водный раствор ГА получали перегонкой под вакуумом коммерческого 25%-ного водного раствора ГА (марки Реанал) и хранили в виде 8-10% -ного водного раствора, подкисленного до pH 3.8. Альдегид имел степень чистоты (по спектральным данным) $D_{235}/D_{280} < 0.3$, соответствующую мономерной форме [11]. Концентрацию альдегидных групп определяли методом дифференциальной pH -метрии с гидроксиламином [12], считая, что молекула ГА ($MM=100$) содержит две альдегидные группы. Для точного тестирования количества NH_2 -групп белка и молекулярной массы олигомеров реакцию поликонденсации останавливали добавлением боргидрида натрия. В результате реакции поликонденсации белков с глутаровым альдегидом образуется набор макромолекул полидисперсных по размеру и гетерогенных по форме. Смесь таких белковых олигомеров можно рассматривать как полимергомологическую систему и, как для любых полидисперсных полимерных систем, к ним можно применять известные способы молекулярно-массового усреднения, а именно, использовать среднечисловую M_n и средневесовую M_w величины молекулярных масс. Для оценки ММР белковых олигомеров нами [13] была применена методика определения величин M_n и M_w с использованием ГПХ, предложенная для определения кажущегося ММР в многокомпонентной низкомолекулярной системе (смеси пептидов белкового гидролизата) [14]. Для исследуемых систем в качестве гелевой фазы использовали сефарозу 6Б с разрешающей способностью разделения по белкам в диапазоне $MM=1 \cdot 10^6 - 25 \cdot 10^3$, уравновешенную 0.05м фосфатным буферным раствором pH 7.1. Методика расчета величин M_n и M_w предполагает предварительную калибровку колонки по монодисперсным белковым маркерам с

известными ММ. Колонка с сефарозой 6В (h=62, d=1.8 см) была откалибрована с применением следующих маркеров (в скобках указана ММ в кДа) : декстран синий (2000), уреазы (480), каталазы (250), альдолазы (147), сыв.альбумин (68), химотрипсиноген А (25), рибонуклеаза (14), КJ (170 Да). В смеси полимергомологов концентрация любого вида белковых олигомеров с ММ=(M_i) предполагается пропорциональной величине оптической плотности D_i. Гельхроматограмма в координатах D_i-V_i, преобразованная в графическую зависимость D_i - M_i, позволяет получить картину ММР олигобелка. Выходные кривые гельхроматографии представляют собой зависимость концентрации (оптической плотности) олигомерного белка от LgММ. На основании построенного ММР смеси олигомеров белка можно определить величины среднечисленной - M_n и средневесовой - M_w молекулярных масс, используя следующие формулы:

$$M_w = \frac{\sum (D_i \cdot M_i)}{\sum D_i}; \quad M_n = \frac{\sum D_i}{\sum (D_i / M_i)};$$

На рис. приведено распределение по размерам олигомерных Гб в процессе поликонденсации.

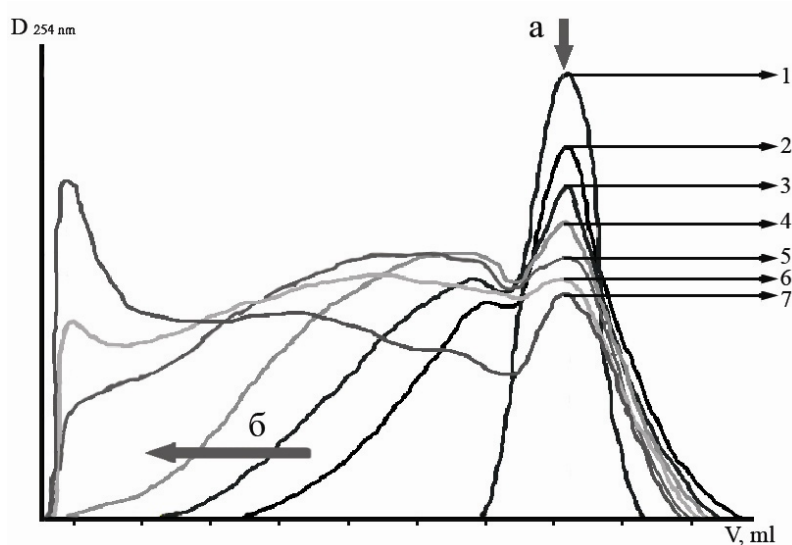


Рис. 1. Гельхроматография на сефарозе 6В олигомерного гемоглобина, полученного в ходе поликонденсации Гб с ГА в координатах D₂₅₄-V (мл). 1- немодифицированный (нативный) Гб. Время синтеза: 2 – 10 мин, 3 – 15 мин, 4 – 20 мин, 5 – 30 мин, 6 – 45 мин, 7 – 60 мин. Стрелками показаны последовательные изменения хроматограммы олигомерного Гб от времени синтеза: а – снижение концентрации мономерного Гб, б – нарастание концентрации олигомерных форм Гб. Таким же образом получали ММР олигомеров белков и на основании вычисления величины M_w проводили сравнительную оценку их формирования в зависимости от условий поликонденсации

Обсуждение результатов

Закономерности модификации белковых макромолекул при поликонденсации можно выявить, исследуя кинетику процесса [15], характеризующей изменение молекулярной массы и количества прореагировавших функциональных групп в ходе реакции. Реакцию проводили при избытке ГА. В табл. 1 представлены данные по изменению во

времени ММ олигомеров Гб (ОГб) и СА (ОСА) и доли прореагировавших NH₂-групп.

Таблица 1. Изменение величины M_w и доля модифицированных аминокрупп в процессе поликонденсации Гб и СА с ГА

Время	Доля прореагировавших NH_2 – групп, %		$M_w \cdot 10^{-3}$	
	ОГб	ОСА	ОГб	ОСА
0	0	0	65	68
2 мин		28		-
10 мин	38	60	95	77
15 мин		70		81
20 мин	64	70	121	85
30 мин		77		88
45 мин	66	77	193	-
1 ч	65	85	284	108
2ч		85		125
6 ч		85		200
48 ч		100		>350

$$C_{Гб} = 1.7 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}; \quad C_{СА} = 7.5 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$$

Для процесса поликонденсации Гб из представленных в табл. 1 данных следует, что модификация NH_2 - групп во времени протекает быстро. Количество модифицированных групп практически достигает своего предельного значения через 20 мин реакции, а молекулярная масса ОГб продолжает возрастать. Аналогично при поликонденсации СА с ГА в условиях эксперимента уже через 15-30 мин реакции модифицируется около 80% из способных реагировать аминокрупп, при этом ММ ОСА практически не меняются, вероятно, появляется только незначительное количество димеров СА. Далее процесс межмолекулярной сшивки развивается во времени. В обоих случаях появление высокомолекулярных олигомеров и нарастание величины M_w происходит при практически неизменной степени модификации аминокрупп белка. Можно предположить, что межмолекулярная сшивка осуществляется не за счет образования основания Шиффа. Ранее на примере изучения поликонденсации в двух системах Гб и СА с ГА было показано отсутствие стехиометрического соответствия между расходом аминокрупп белка и исчезновением из раствора альдегидных групп (их расходуется в 6-10 раз больше) [16]. По всей вероятности, это может происходить по той причине, что образование альдиминной связи ГА с белком инициирует процесс собственной олигомеризации ГА с образованием «пришитых» к белку олигомеров ГА или присутствие функциональных групп белка катализирует образование олигомерных форм ГА в растворе. Тогда межмолекулярная сшивка, как можно предположить, осуществляется в результате реакции между альдегидными группами, принадлежащими разным молекулам белка. Известна способность ГА к медленной олигомеризации в результате альдольной конденсации [17]. Японскими исследователями были обнаружены три-, пента- и гептамеры ГА при выдерживании его в слабощелочных растворах [18]. Выдвигалось предположение, что именно такой полимерный ГА, возможно, играет главную роль в реакции сшивки белков [19]. Подтверждением образования химических сшивок между белковыми молекулами за счет реакции альдольной конденсации или присоединения, осуществляющегося между олигомерами ГА, «повешенными» на белке, может служить соконденсация двух модифицированных под действием ГА белков: бычьего сывороточного альбумина (БСА), в котором модифицированы все 14 возможных аминокрупп, и

трипсина, производные которого содержат 3, 5 и 8 модифицированных ГА аминокрупп из всех доступных. Было показано, что при одной и той же степени модификации БСА увеличение степени модификации аминокрупп трипсина приводит к усилению соконденсации этих белков, увеличению количества трипсина, связанного в конъюгат с БСА. При модификации более половины аминокрупп в молекуле трипсина фермент полностью связывается с БСА [20].

Интересно проследить реакцию поликонденсации белков с точки зрения образования олигомерных продуктов. Степень превращения белков в олигомеры (K) при поликонденсации определяли отношением концентраций образованных высокомолекулярных производных белка к общей концентрации белка в растворе (в расчете на мономерный белок) и оценивали прежде всего в зависимости K от концентрации компонентов (белка и ГА) и их соотношения. При $K < 1$ существует только набор растворимых продуктов конденсации олигобелков различных ММ. Степень превращения $K = 1$ соответствует образованию геля. Количественные результаты по поликонденсации Гб и СА с ГА сведены в табл. 2. Представлена зависимость степени превращения Гб от исходного соотношения [ГА]:[Гб] варьируемого от 4 до 110 для концентрации Гб $(0.12-1.2) \cdot 10^{-3}$ моль/л. С увеличением концентрации Гб одна и та же степень превращения наблюдается при более низких соотношениях [ГА]:[Гб].

Таблица 2. Условия поликонденсации и значения M_w образующихся олигобелков

Исходная концентрация белка $C \cdot 10^3$ моль/л	Мольное соотношение [ГА] : [белок]	$K = [ОБ] : [Б]$	$M_w \cdot 10^{-3}$
Олигогемоглобин (время реакции 1ч, 10^0 С)			
0.12-0.15	52	0.7	-
	70	0.84	280
	110	1.0	гель
0.3-0.4	40	0.7	-
	45	0.8	320
	53	1.0	гель
1.1-1.2	4	0.4	65
	8	0.5	90
	10	0.7	170
	12	0.75	230
	13	0.8	265
	14	0.85	385
	17	1.0	гель
Олигоальбумин (время реакции 2ч, 22^0 С)			
0.37	13.5	0.6	205
0.37	23.8	0.65	237
0.37	29.7	0.73	-
0.36	48.6	0.74	259
0.35	83.0	0.84	281
0.51	82.3	0.87	296
0.74	82.0	0.93	335

При концентрации Гб $C = 0.15 \cdot 10^{-3}$ моль/л величина M_w ОГб, равная $280 \cdot 10^3$ достигается при соотношении компонентов=70, а для $C = 1.1 \cdot 10^{-3}$ моль/л близкое

значение $M_w=265$ при соотношении 13. При высоких концентрациях Гб (1.1-1.2) моль/л резко возрастает ММ олигомеров Гб при изменении исходного соотношения компонентов от 12 до 17. При низкой концентрации ГА (соотношение 4-8) ММ олигомеров практически не меняется. Для СА увеличение исходного мольного соотношения [ГА]:[СА] в 6 раз (с 13,5 до 83) в реакционной смеси при сравнительно низких концентрациях альбумина $0.37 \cdot 10^{-3}$ моль/л сопровождается незначительным ростом ММ олигомеров. ГА тратится в основном на внутримолекулярную модификацию СА, а за счет межмолекулярных мостиков образуются три- и тетрамеры ($M_w=205 \cdot 10^3 - 280 \cdot 10^3$). Повышение концентрации альбумина с $0.36 \cdot 10^{-3}$ моль/л до $0.74 \cdot 10^{-3}$ моль/л приводит к повышению выхода олигомерных компонентов, а рост концентрации ГА – к интенсификации внутримолекулярной сшивки. Полученные результаты относятся к разным условиям поликонденсации – более благоприятным для получения олигомеров СА (время реакции 2ч и $t 22^0C$).

Таблица 3. Олигомеризация белков ходе поликонденсации

Доля оставшегося мономерного белка в растворе	$M_w \cdot 10^{-3}$ олигомеров белков	
	ОГб	ОСА
1.0	65	69
0.8	75	69
0.7	80	75
0.6	90	75
0.55	100	80
0.4	120	90
0.35	150	100
0.2	220 (20мин)	120
0.15	320	140 (2ч)
0.1	470 (1ч)	280
0.03	-	470 (сутки)

$$C_{Гб} = 77 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}; \quad C_{СА} = 73 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$$

Поэтому провели изучение образования олигомеров Гб и СА в идентичных условиях. Нарастание величины средневесовой молекулярной массы в ходе поликонденсации Гб и СА с ГА в зависимости от доли оставшегося мономера проиллюстрировано в табл. 3. В процессе поликонденсации четко прослеживается наличие 2-х этапов олигомеризации. На первом этапе при добавлении в белковый раствор раствора ГА начинается реакция между аминогруппами белка и альдегидными группами ГА с образованием шиффовых оснований, при этом значительно убывает доля оставшегося мономера белка до 0.15-0.2 от исходного количества, т.е. основной белковый компонент находится в олигомерной форме (в основном ди- и тримеры). Первый этап для Гб протекает за 20 мин, а для системы СА-ГА за 2 часа. Когда в ходе поликонденсации мономер практически израсходован, начинается вторая стадия – резко увеличивается M_w , т.е. при достижении значительной концентрации белковых олигомеров начинается их сшивание друг с другом (образование межмолекулярных мостиков) с появлением высокомолекулярных продуктов. Образование альдиминной связи и наличие микроокружения белковой молекулы, как уже отмечалось выше, активируют вероятно присоединенную молекулу ГА [21] и инициируют наращивание олигомерной цепочки за счет избыточного ГА в растворе, т.е. межмолекулярная сшивка осуществляется в основном между олигомерными производными ГА, связанными с разными молекулами белка. Для обеих систем эти процессы идут

параллельно, но с большой разницей во времени. Так $M_w \sim 500 \cdot 10^3$ достигается для системы Гб-ГА за 1 час, а в случае СА-ГА необходимы сутки. Вторым этапом в сшивании белковых макромолекул также был обнаружен для системы α -химотрипсин по изменению параметров светорассеяния [22]. Представленные результаты свидетельствуют о слабом межмолекулярном взаимодействии в системе СА-ГА. Это подтверждает и тот факт, что для получения одинаковых средних молекулярных масс ОГб и ОСА при прочих равных условиях необходима концентрация СА, равная $1.0 \cdot 10^{-3}$ моль/л, а Гб $1.6 \cdot 10^{-4}$, т.е. концентрации различаются почти в 6 раз [23].

Слабое межмолекулярное взаимодействие в этой системе можно объяснить тем, что процесс поликонденсации протекает в нейтральных водных растворах, где молекула СА имеет избыточный отрицательный заряд ($pI = 5.0$) и их взаимное отталкивание может препятствовать межмолекулярным контактам. Для гемоглобина поликонденсация протекает в благоприятной для межмолекулярного взаимодействия изoeлектрической области белка ($pI = 6.8$). Это различие проявляется и в характере зависимости ММ ОГб и ОСА от pH раствора (таб.4).

Таблица 4. Влияние pH раствора на ММ образующихся олигобелков

pH раствора	M_w	
	ОГб	ОСА
5.0	-	240
6.0	130	180
6.5	180	160
7.0	220	150
7.5	300	150
8.0	400	150

$$C_{Гб} = 77 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}; \quad C_{СА} = 73 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$$

При повышении pH раствора с 6.5 до 8.0 молекулярная масса ОГб возрастает, а ОСА остается на уровне ди- и тримеров несмотря на повышение степени модификации СА. Это может быть связано с различным распределением NH_2 -групп в молекуле Гб и СА, а также со значительным влиянием общего заряда белка на процесс образования олигомеров. Повышение ММ ОСА в ходе реакции наблюдается при уменьшении избыточного отрицательного заряда СА, вызванного смещением pH раствора в сторону изoeлектрической области СА. Роль электрохимического состояния СА подтверждает влияние ионной силы раствора на ММ ОСА, повышение которой приводит к экранированию избытка отрицательного заряда ОСА и снижает эффект электростатического отталкивания белковых макромолекул. Удаление от изoeлектрической точки альбумина за счет возрастания отрицательного заряда альбумина происходит «расталкивание» белковых молекул и межмолекулярная сшивка на данном этапе осуществляется в результате реакции между альдегидными группами олигомерного ГА, принадлежащими разным молекулам СА. Следовательно, наиболее благоприятным условиям образования высокомолекулярных олигомеров отвечает проведение поликонденсации при pH вблизи изoeлектрической области белков. Влияние электрохимического состояния белка проявилось и при получении гетероконъюгатов на основе ОГб и супероксиддисмутазы (СОД)($pI = 5.0$) [24]. При повышении pH среды от 6.6 до 8.0 снижается степень связывания фермента с 33% до 21%. Увеличение ионной силы раствора способствует включению фермента в гетероконъюгат за счет экранирования заряда белковой макромолекулы. Кроме того, образование

олигомеров СОД было возможно только при высоких исходных соотношениях $[GA]:[СОД] = 200$ моль/ моль с получением в основном ди- и тримеров фермента. Повышение концентрации компонентов связано с перераспределением содержания олигомерной фракции СОД - появляются высокомолекулярные олигомеры в результате сшивки ди- и тримеров, так как при этом количество оставшегося мономера СОД не меняется. Аналогично сшивка Cat (pI 5.4-5.8) [25] с ГА привела в основном, к получению внутримолекулярно сшитых макромолекул фермента, несмотря на высокую степень конверсии NH_2 -групп, ММ модифицированной Cat менялась незначительно даже при избытке ГА и фермента. Наибольшее значение M_w олигомерной каталазы, равное 450кДа соответствует двум связанным макромолекулам белка. Четкая зависимость влияния суммарного заряда прослеживается в системе разнозарядных белков при их сшивке ГА. Так полное связывание трипсина (pI -10.8) с олигомерным СА достигается при соотношении $[ОСА]:[трипсин] = 20$ моль/моль, в то время как при сшивке белков с одинаковыми значениями pI: СА и стрептокиназы не удается достичь полного включения стрептокиназы в гетероконъюгат с ОСА даже при высоко молярном соотношении компонентов [20]. Надежность применение метода ГПХ для определения ММ олигомеров белков подтверждается данными, полученными физическими методами. Определенное из ММР ОГб значение M_w , равное $280 \cdot 10^3$, по экспериментальным результатам седиментации и диффузии $M_{sd} = 250 \cdot 10^3$, а из данных диффузии и вискозиметрии $M_{Dn} = 270 \cdot 10^3$ [23].

Заключение

На основании изучения поликонденсации гемоглобина и сывороточного альбумина с глутаровым альдегидом показано, что процесс химической сшивки белков проходит в два этапа. На первом этапе в результате реакции между аминными группами белка и альдегидными группами ГА образуются основания Шиффа, при этом в белковой макромолекуле часть аминогрупп заменяется олигомерным ГА (предположительно трех-пяти мерами). Второй этап реакции с образованием высокомолекулярных олигомеров белка осуществляется в основном между олигомерными производными альдегида, связанными с разными молекулами белка. Превращение белков в олигомеры зависит от исходной концентрации белка, альдегида и их соотношения. Показана важная роль общего заряда макроиона белка в условиях сшивки на образование его олигомеров.

Список литературы

1. Платэ Н.А., Васильева А.Е. Физиологически активные полимеры М.:Химия, 1986.С.296.
2. Штильман М.И. Реакции в системе полимер-белок, применяемые при иммобилизации ферментов // Успехи химии, 1979. Т.48. №11. Р.2061-208.
3. Peters K., Richard F.M. Chemical cross-linking reagents and problems in studies of membrane structure // Ann.Rev.Biochem.,1977. V.46. P.523-551. 4.Hermann R., Jaekicke R., Rudolph R. Analysis of the reconstitution of oligomeric enzymes linking with glutaraldehyde. Kinetics of reassociation of lactic dehydrogenase //Biochemistry, 1981. V. 20. № 18. P.5195-5201.

5. Monsan P., Puzo G., Mazarguil H. Etude du mecanisme d'etalissement des liaisons glutaraldehyde proteins // Biochemie, 1975.V.57. №.11-12. P.1281-1292.
6. Acharya A.S., Sussman L.G., Manning J.M. Schiff base adducts of glyceraldehydes with hemoglobin //J.Biol.Chem., 1983. V.258. № 4. P.2296-2302.
7. Бреслер С.Е., Ерусалимский Б.Л. Физика и химия макромолекул. М.-Л.: Наука 1965.С. 509.
8. Rabiner S.P. Evaluation of a stroma-free hemoglobin solution for use as plasma expander // J.Exp.Med., 1967. №.126. P. 1127-1142.
9. Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина Л.: Медицина,1968. С.325.
10. Fields R. «The measurement of aminogroups in proteins and peptides» // Biochem. J., 1971. V.124. № 3. P. 581-590.
11. Hardy P.M., Nichols A.C., Rydon H.N. The nature of glutaraldehyde in aqueous solution // Chem. Commun., 1969. № 10. P.565-566.
12. Roe H.R., Mitchell G. Determination of small concentration on carbonyl compounds by a differential pH-method // Analyt. Chem., 1951. V.23. №.12. P.1758-1760.
13. Кузнецова Н.П., Самсонов Г.В. Исследование поликонденсации макромолекул биополимеров //Высокомолек.соед., А.1985. Т.27. №12. С.2611-2614.
14. Catsimpoilas N. Rapid analytical gelfiltration chromatography. . III. Apparent molecular weight distribution of peptides produced by proteolysis // Analyt. Biochem., 1974. V.61. № 1. P.101-111.
15. Гаммет Л. Основы физической органической химии М.: Мир, 1972. С.534.
16. Кузнецова Н.П., Гудкин Л.Р., Кольцова С.В., Мишаева Р.Н. Особенности поликонденсации белков с глутаровым альдегидом //Высокомолек.соед., А. 1996. Т.38. №10. С.1668-1673.
17. Richard F.M., Knowles J.R. Glutaraldehyde as a protein cross- linking reagent // Molec.Biol., 1968. V.37. №.1. P.231-233.
18. Toshio Tashima, Nasahiro Imai, Yoshihiro Kuroda, Shigemasa Yagi, Terumichi Nakaga. Structure of a New Oligomer of Glutaraldehyde Reaction //J.Organic Chemistry, 1991. V.56. №2. P.694-697.
19. Казанская Н.Ф., Кост О.А., Березин И.В. Свойства трипсина модифицированного глутаровым альдегидом // Биоорганическая химия, 1975. Т.1. № 9. С.1337-1344.
20. Кольцова С.В. Влияние электростатических взаимодействий на формирование растворимых гетеробелковых конъюгатов на основе протеолитических ферментов // Биоорганическая химия, 1995. Т.21. №6. С.408-420.
21. Сайкс П.А. Механизмы реакций в органической химии М.: Химия, 1977. С.319.
22. Tomimatsu Y., Jansen E.F. Gaffield W., Olson A.C. Physical-chemical observation on the α -chymotrypsin glutaraldehyde system during formation of insoluble derivative // J.Colloid Interface Sci., 1971. V.36. №1. P.51-64.
23. Кузнецова Н.П., Кленин С.И., Волкова Л.А., Гудкин Л.Р., Самсонов Г.В. Поликонденсация биополимеров и морфология образующихся макромолекул // Высокомолек. соед., А. 1989. Т.31. №7. С.1539-1543.
24. Мишаева Р.Н., Кузнецова Н.П. Получение и исследование гетеробелковых конъюгатов гемоглобина с супероксиддисмутазой //Хим.-фарм., журнал, 1996. Т.30. №4. С.6-10.

25. Мишаева Р.Н., Гудкин Л.Р., Кузнецова Н.П. Модификация каталазы глутаровым альдегидом // Прикладная биохимия и микробиология , 2006. Т.42. №4. С.404-408.

Кузнецова Нина Петровна - д.х.н., главный научный сотрудник, Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург.

Мишаева Римма Никодимовна - к.х.н., старший научный сотрудник, Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Гудкин Лев Романович - к.х.н., старший научный сотрудник, Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Kuznetsova Nina P. – Dr.Sci., the main scientific researcher, the Institute of Macromolecular Compounds RAS, St. Petersburg.

Mishaeva Rimma N. – Ph.D., senior researcher, the Institute of Macromolecular Compounds RAS, St.Petersburg

Gudkin Lev R. – Ph.D., senior researcher, the Institute of Macromolecular Compounds RAS, St. Petersburg