



УДК 577.154.04

**РАЗДЕЛЕНИЕ СОЛЮБИЛИЗИРОВАННЫХ ФОРМ
СИАЛИЛТРАНСФЕРАЗ ИЗ ПЕЧЕНИ ЛЯГУШКИ
RANA TEMPORARIA И ПЕЧЕНИ КРЫС***Ланца Е. В., Габриэли Н. Д., Хорлин А. Я.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шелыгина
Академии наук СССР, Москва*

Предложен метод разделения солибилизованных форм сиалилтрансфераз печени лягушки и печени крыс с помощью изоэлектрофокусирования в градиенте плотности сахарозы.

Сиалилтрансферазы участвуют в терминальной стадии биосинтеза сиалогликопротеинов и гликолипидов. Они представляют собой семейство ферментов, различающихся по акцепторной специфичности и по типу связи в синтезируемых ими сиалоолигосахаридах [1–5]. Ранее нами было проведено сравнительное изучение акцепторной специфичности мембраносвязанных форм сиалилтрансфераз из печени лягушки *Rana temporaria* и печени крыс, а также печени крыс в состоянии активной пролиферации (регенерирующая печень крыс) [6–8]. Такое сравнение сиалилтрансфераз из печени эволюционно отдаленных животных и печени в разных физиологических состояниях позволило обнаружить общие черты акцепторной специфичности по отношению к низкомолекулярным акцепторам у исследованных ферментных систем — строгую специфичность к структуре концевого моносахарида и его аномерной конфигурации и к структуре второго от невозстанавливающего конца моносахарида (оптимальным дисахаридом-акцептором является Gal β 1+4GlcNAc).

Однако при изучении высокомолекулярных акцепторов мы установили, что сиалилтрансфераза печени лягушки практически не сиалирует гликопротеины теплокровных животных. При этом был обнаружен высокий уровень включения N-ацетилнейраминовой кислоты (14 C) в эндогенные акцепторы, присутствующие в микросомах печени лягушки [8].

Детальное изучение акцепторной специфичности сиалилтрансфераз, необходимое для понимания механизма биосинтеза концевых детерминант сиалогликопротеинов, требует выделения и характеристики как самих сиалилтрансфераз, так и их эндогенных акцепторов, являющихся истинными предшественниками синтезируемых в клетке гликопротеинов. Следует отметить, что если в выделении и характеристике сиалилтрансфераз за последнее время достигнуты значительные успехи [9, 10], то изучение эндогенных акцепторов только начинается [11–12].

В настоящей работе получены результаты по разделению и характеристике солибилизованных форм сиалилтрансфераз и их эндогенных акцепторов из мембран микросом печени крыс и лягушки с помощью изоэлектрофокусирования в градиенте плотности сахарозы.

Акцепторная специфичность мембраносвязанных и солюбилизованных сиалилтрансфераз

Акцептор (40 мМ)	Включение [¹⁴ C]AcNeu (за 90 мин), %		Акцептор (40 мМ)	Включение [¹⁴ C]AcNeu (за 90 мин), %	
	мембрано- связанная форма	солюби- лизиро- ванная форма		мембрано- связанная форма	солюби- лизиро- ванная форма
Печень лягушки			Печень крысы		
Galβ1 → 4GlcNAc	100	100	Galβ1 → 4GlcNAc	100	100
Galβ1 → 6GlcNAc	32	35	Galβ1 → 6GlcNAc	14	11
Galβ1 → 4Glc	100	100	Galβ1 → 4Glc	50	48
Galβ1 → 6Glc	<5	<5	Galβ1 → 6Glc	<5	<5

Примечание. Включение в N-ацетиллактозамин составляло 1500—3000 имп/мин.

Солюбилизация сиалилтрансферазных систем и их акцепторная специфичность по отношению к дисахаридам. При выборе условий солюбилизации мы ставили перед собой задачу получения нативного препарата фермента с сохранением основных особенностей акцепторной специфичности. Для солюбилизации использовали неионный детергент тритон X-100 в концентрации 0,2%. Предварительное изучение влияния тритона X-100 на мембраносвязанные формы сиалилтрансфераз печени лягушки и крысы показало, что детергент обладает активирующим действием на сиалилтрансферазную активность, причем максимальная активация (в 2 раза) наблюдалась при концентрации тритона X-100 0,2% (вес/объем); при больших концентрациях наблюдался эффект ингибирования.

Сравнение акцепторной специфичности мембраносвязанных и солюбилизованных форм сиалилтрансфераз печени лягушки и печени крыс по отношению к наиболее эффективным дисахаридам — N-ацетиллактозамину и лактозе и их алло-изомерам — показывает (таблица), что особенности акцепторной специфичности полностью сохранились, так как дисахариды с β1→6-связью значительно менее активны, чем с β1→4-связью, как с мембраносвязанным, так и с солюбилизованным препаратом фермента. Этот результат хорошо коррелировал с сохранением всех белковых компонентов в спектре белковых зон солюбилизата по сравнению с аналогичным спектром полностью солюбилизованного препарата микросом (данные электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии 1% додецилсульфата натрия).

Следует отметить, что при солюбилизации происходило увеличение удельной активности сиалилтрансфераз при использовании дисахаридов в качестве акцепторов. Одновременное возрастание общей сиалилтрансферазной активности свидетельствовало о том, что тритон X-100 обладает активирующим действием на реакцию сиалирования дисахаридов. Возможно также, что увеличение удельной активности связано с наличием в мембранах микросом ингибитора, концентрация которого снижается в солюбилизате.

Изоэлектрофокусирование в градиенте плотности сахарозы. Нами было проведено разделение солюбилизованных сиалилтрансфераз из печени крыс и печени лягушки с помощью изоэлектрофокусирования в градиенте плотности сахарозы в интервале рН 3—10. В полученных фракциях определяли сиалилтрансферазную активность по отношению к экзогенному акцептору асиалофетуину (экзогенная активность) и к эндогенному акцептору (эндогенная активность).

Профиль экзогенной активности при разделении детергентного экстракта печени крыс (рис. 1а) свидетельствует о присутствии в микросомах печени крыс по крайней мере трех сиалилтрансфераз, способных ресиалировать асиалофетуин. Наибольшей удельной активностью облада-

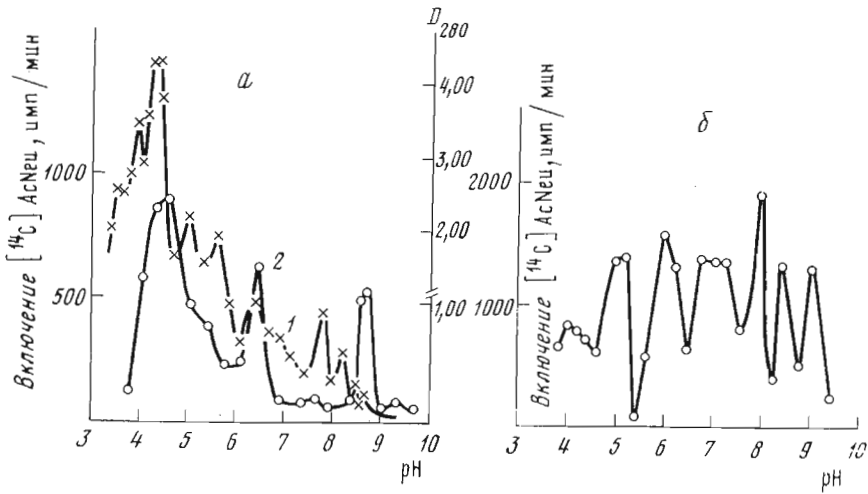


Рис. 1. Разделение солиubilизированной сиалилтрансферазы печени крыс методом изоэлектрофокусирования (препаративный вариант, см. «Экспериментальную часть»): а — контроль по экзогенной активности (1) и по белку (2); б — контроль по эндогенной активности

ет последний пик (рН 8,5—8,7), так как основная масса белка фокусировалась в области рН 3,5—6,5. В точках максимумов активности определяли структуру продуктов сиалирования N-ацетиллактозамина. Анализ с помощью ТСХ в сочетании с радиоавтографией показал, что эти три сиалилтрансферазы сиалируют N-ацетиллактозамин с образованием $\alpha 2 \rightarrow 6$ -изомера. Этот результат свидетельствует о разделении трех форм фермента, различающихся по *pI* (4,5; 6,4; 8,7), но синтезирующих один тип связи ($\alpha 2 \rightarrow 6$).

Определение в тех же фракциях включения радиоактивной АсНеu в эндогенный акцептор показало присутствие семи пиков эндогенной активности в области рН от 4,0 до 9,0 (рис. 1б). Следовательно, при разделении в градиенте рН происходит распределение по изоэлектрическим точкам не только сиалилтрансфераз, но и их эндогенных акцепторов, входящих в мембраны микросом.

Природа эндогенных акцепторов специально нами не исследовалась, однако из литературных данных известно, что с фракцией микросом печени крыс ассоциированы предшественники некоторых гликопротеинов плазмы крови [13]. Кроме того, в настоящее время обнаружено, что многие гликозилтрансферазы, в том числе и сиалилтрансферазы, являются гликопротеинами [14], что не исключает возможности самосиалирования этих ферментов. Одновременное распределение ферментов и акцепторов с возможным взаимоперекрыванием затрудняет точную оценку числа форм фермента на основании только профиля эндогенной активности. Однако в условиях препаративного электрофокусирования удастся получить высокую степень разрешения белковых зон и совпадение большинства максимумов профиля белка с профилями эндогенной и экзогенной активностей. Существование максимумов эндогенной активности (*pI* 7,0—7,2; 7,9—8,0), находящихся на значительном расстоянии по градиенту рН от максимумов экзогенной активности, говорит о присутствии форм фермента, более специфичных к эндогенным акцепторам, чем к использованному нами асиалофетуину. В связи с этим мы предполагаем наличие в печени крыс по крайней мере шести форм фермента с *pI* 4,5; 5,9; 6,4; 7,2; 7,9; 8,6.

Как уже упоминалось выше, нами было показано, что использованные асиалогликопротеины животного происхождения (фетуин, муцин подчелюстных желез свиньи и быка, лактозиллизоцим, иммуноглобулин М) яв-

Рис. 2. Зависимость от pH эндогенной активности мембраносвязанной сиалилтрансферазной системы печени лягушки

Рис. 3. Разделение солюбилизированной сиалилтрансферазы печени лягушки методом изоэлектрофокусирования: 1 — поглощение при 280 нм, 2 — эндогенная сиалилтрансферазная активность

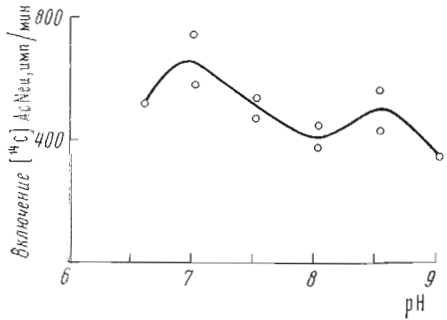


Рис. 2

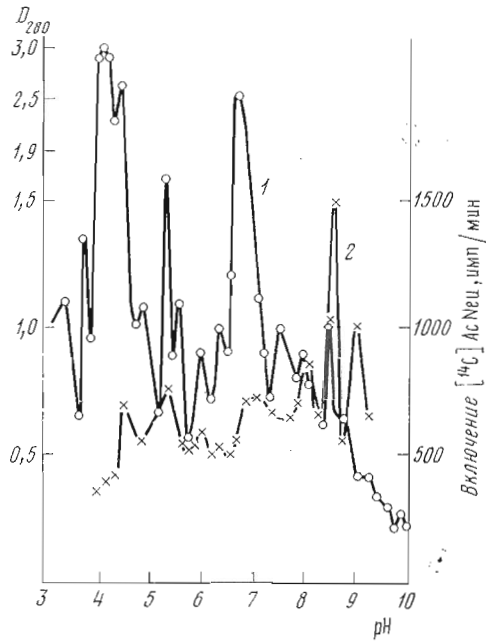


Рис. 3

лиются чрезвычайно малоэффективными акцепторами для мембраносвязанной и растворимой форм сиалилтрансферазы печени лягушки. Однако в присутствии низких концентраций детергента был обнаружен высокий уровень включения N-ацетилнейраминовой кислоты в эндогенные акцепторы [8]. Условия сиалирования эндогенных акцепторов были исследованы как для мембраносвязанных, так и для растворимых форм сиалилтрансферазы печени лягушки.

Нам удалось обнаружить, что для тестирования эндогенной активности требуется в 2 раза меньшая концентрация донора, чем для экзогенной, что эндогенная активность подавляется в присутствии асиалофетуина и имеет два оптимума pH — 7,0 и 8,5 (рис. 2).

С учетом этих особенностей мы тестировали эндогенную активность при изоэлектрофокусировании солюбилизированной сиалилтрансферазы печени лягушки. Из полученных результатов видно (рис. 3), что профиль эндогенной активности обладает восьмью максимумами в области pH от 4,5 до 9,0. Наибольшая удельная активность наблюдалась в пиках, располагающихся в щелочной области градиента pH, так как основная масса белка фокусировалась в кислой области (pH 3,0—5,0). Во фракциях, обладающих максимальной удельной активностью (пики с pH 7,0; 8,3; 8,6; 9,1), идентифицировали продукты сиалирования лактозы и N-ацетиллактозамина (рис. 4). Как видно из рис. 4, фракция с pH 8,6 сиалирует как лактозу, так и N-ацетиллактозамин с образованием только $\alpha 2 \rightarrow 6$ -продукта реакции. Остальные фракции сиалировали оба дисахарида, образуя смесь изомеров $\alpha 2 \rightarrow 3$ и $\alpha 2 \rightarrow 6$ со значительным преимуществом $\alpha 2 \rightarrow 6$ -продукта.

Определение числа множественных форм проводили, исходя из числа совпадающих максимумов в профилях белка и эндогенной активности. Такая оценка давала возможность уверенно обнаружить в печени лягушки по крайней мере шесть форм фермента: с pI 4,5; 5,3; 6,0; 6,9; 8,1; 8,6.

Во фракциях с pH 5,3 и 8,6 мы идентифицировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия сиалированные в условиях препаративной тест-пробы эндогенные акцепторы. После разделения в полиакриламидном геле и окрашивания по кумасси гели разрезали на диски толщиной 1 мм и просчитывали радио-

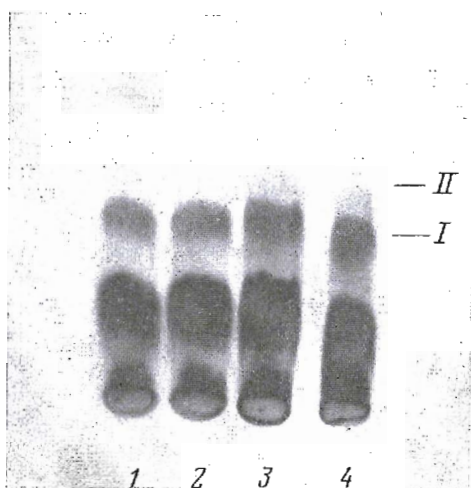


Рис. 4. ТСХ продуктов сиакирования N-ацетиллактозамина ферментными препаратами фракций изофокусирования (см. рис. 3) с рН 9,1 (1), 8,6 (2), 8,3 (3) и 7,0 (4) в системе *n*-пропанол — метанол — вода, 15:3:1. I и II — положение на хроматограмме заведомых образцов $\alpha 2 \rightarrow 6$ -нейраминозиллактозамина и $\alpha 2 \rightarrow 3$ -нейраминозиллактозамина соответственно

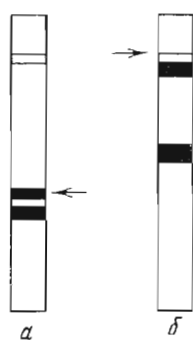


Рис. 5. Электрофорез в полиакриламидном геле продуктов сиакирования эндогенных акцепторов ферментными препаратами фракций изоэлектрофокусирования с рН 5,3 (а) и 8,6 (б) (рис. 3). Отмечены фракции, содержащие радиоактивность

активность. Результаты (рис. 5) показывают, что вся радиоактивность сосредотачивалась в одной зоне белка. В случае кислой фракции подвижность этой белковой зоны соответствовала приблизительно $M 15\ 000$, в случае щелочной — $M 60\ 000$ — $70\ 000$ (согласно градуировке со стандартными белками). Таким образом, эндогенные акцепторы, соответствующие разным максимумам эндогенной активности, различаются и по молекулярному весу.

Сравнивая картины разделения в градиенте рН солиобилизованных сиалилтрансферазных систем из печени лягушки и печени крысы, можно отметить наличие близких по *pI* форм фермента в обоих источниках и присутствие высокоактивных щелочных форм в области рН 7,0—8,6. Полученные нами результаты по разделению сиалилтрансфераз не позволяют пока однозначно определить, являются ли разные по *pI* формы истинными изоферментами [17]. Однако воспроизводимость профиля активности, широкий интервал значений *pI*, наличие форм, специфичных только к эндогенному или только к экзогенному акцепторам, говорят о том, что среди них есть не только множественные формы, но и истинные изоферменты. В пользу этого предположения свидетельствуют опубликованные недавно результаты разделения методом изоэлектрофокусирования солиобилизованных сиалилтрансфераз нормальной и пораженной кистозным фиброзом печени человека [16, 17]. Характерно, что в патологическом состоянии исчезают щелочные формы сиалилтрансфераз в интервале 7,6—8,6.

Существование множественных и изоферментных форм сиалилтрансфераз в печени животных и человека, а также выделение двух разных сиалилтрансфераз (СМР-АсNeu(β)-галактозид-($\alpha 2 \rightarrow 6$)-сиалилтрансфера-

за н СМР-АсНеu(β)-галактозид-($\alpha 2 \rightarrow 3$)-сиалилтрансфераза, КФ 2.4.99.1) из молозива коров и подчелюстных желез овец [9, 10] говорят о большом разнообразии этих ферментов, участвующих в терминальной стадии биосинтеза сиалобиополимеров. Возможно, это является одной из причин микрогетерогенности гликоконъюгатов.

Предложенный нами подход разделения сиалилтрансфераз одновременно с разделением их эндогенных акцепторов и определением структуры продуктов реакции сиалирования может быть полезен при установлении принципов регуляции биосинтеза олигосахаридных цепей гликоконъюгатов.

Экспериментальная часть

Субстраты. В качестве акцепторов для сиалилтрансферазной реакции использовали лактозу отечественного производства и дисахариды Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc (N-ацетиллактозамин), Gal $\beta 1 \rightarrow 6$ GlcNAc и Gal $\beta 1 \rightarrow 6$ Glc, синтезированные в нашей лаборатории [18]. Донор остатка сиаловой кислоты — СМР-АсНеu получали из АсНеu (Koch-Light, Англия) и СТР (Koch-Light, Англия) с помощью синтетазы СМР-АсНеu из печени лягушки разработанным ранее методом [6]. Полученный образец разбавляли высокоочищенным препаратом СМР-[14 C]АсНеu (удельная радиоактивность 259 мКи/ммоль) до удельной радиоактивности 1,0–1,5 мКи/ммоль. Определение белка проводили методом Лоури [19]. Количество белка в растворе в присутствии детергента определяли модифицированным методом Лоури [20]. Десиалирование асиалофетуина проводили по методу [21].

Определение сиалилтрансферазной активности. Экзогенную сиалилтрансферазную активность по отношению к дисахаридам определяли описанным ранее методом с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге (Whatman ЗММ, Англия) [6].

При определении активности по отношению к асиалофетуину в пробу объемом 200–400 мкл вносили 0,1 мкмоль СМР-[14 C]АсНеu (100 000–300 000 имп/мин), асиалофетуин — 20–80 нмоль акцепторных сайтов, доступных для энзиматического сиалирования (расчет проводили как описано ранее [8]), 40–100 мкл 0,2 М К-фосфатного буфера, pH 7,0, содержащего 0,2% тритона X-100, и 150–350 мкл препарата фермента, содержащего не более 1 мг белка. При определении эндогенной активности в пробы не добавляли асиалогликопротеин и тритон X-100.

Контрольные пробы содержали препарат фермента, инактивированный нагреванием при 100° С в течение 5 мин. После инкубации (60 мин, 37° С) в пробы вносили равный объем 1% раствора фосфорновольфрамовой кислоты в 0,5 н. НСl и оставляли на 15 мин при 4° С. Затем осадок переносили на фильтр GF/C (Whatman, Англия) и промывали 10-кратным объемом раствора фосфорновольфрамовой кислоты. Фильтры подсушивали при 70° С и определяли радиоактивность в толуольном сцинтилляторе на счетчике SL-40.

Идентификация продуктов реакции. Сиалирование дисахаридов проводили в следующих условиях: смесь, содержащую в объеме 1,2 мл 1 мкмоль СМР-[14 C]АсНеu ($2 \cdot 10^6$ имп/мин), 5 мкмоль акцептора и 1 мл препарата фермента, доведенного до pH 7,0 К-фосфатным буфером, инкубировали 3 ч при 37° С. Затем смесь разбавляли дистиллированной водой до 10 мл и наносили на колонку с дауэксом 1 \times 8 (Serva, ФРГ) в HCO $_3^-$ -форме (объем смолы 2, мл). Колонку промывали водой до исчезновения в элюате нейтральных сахаров (реакция с антроном), а затем элюировали продукт реакции 0,11 М триэтиламмонийбикарбонатным буфером, pH 7,3. Элюат упаривали, сушили лиофильно для удаления триэтиламмонийбикарбоната и растворяли в небольшом объеме воды. Идентификацию проводили с помощью ТСХ на силикагеле G (Merck, ФРГ) в условиях, описанных нами ранее [6]. После высушивания на воздухе пластинки накрывали рентгеновской пленкой РТ-1 и экспонировали в течение месяца. В качестве стан-

дарт использовали пейраминозиллактозу (Sigma, США), которую обнаруживали методом Свеннерхольма [22].

Инкубационная смесь для сиапирования эндогенного акцептора содержала 1 мкмоль СМР- ^{14}C AcNeu ($2 \cdot 10^6$ имп/мин) и 1 мл препарата фермента, рН смеси доводили до 7,3 с помощью 0,5 М К-фосфатного буфера. После инкубации (3 ч, 37° С) белки осаждали 7% раствором трихлоруксусной кислоты, полученный осадок растворяли в диссоциирующем буфере, содержащем 1% додецилсульфата натрия и 1% меркаптоэтанола, и диализовали против этого же буфера. Образцы подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле в системе Вебер и Осборн [23]. По окончании электрофореза (14–16 ч при токе 40 А) гель извлекали из трубок, окрашивали с помощью кумасси и разрезали на диски толщиной 1 мм, каждый из которых помещали в сцинтиллятор Unisolve, и определяли радиоактивность на счетчике SL-40.

Получение солюбилизированной формы сиапилтрансфераз. Суспензию микросом получали методом, описанным в предыдущей работе [8]; удельная активность препарата фермента 1500–3000 имп/мин·мг белка. Солюбилизацию проводили в 0,2% растворе тритона X-100. Микросомальную фракцию суспендировали в буфере, содержащем 0,01 М трис-HCl (рН 7,0), 0,25 М сахарозу, 0,001 М EDTA и 0,2% тритона X-100. Суспензию перемешивали 40 мин при 4° С, а затем центрифугировали 1 ч при 120 000 g. Супернатант (удельная активность 10 000–150 000 имп/мин·мг белка) использовали для характеристики акцепторной специфичности по отношению к низкомолекулярным акцепторам и для разделения методом изоэлектрофокусирования.

Изоэлектрофокусирование в градиенте плотности сахарозы. В аналитическом варианте разделения использовали колонку 8101 LKB (410 мл), на которую наносили от 10 до 30 мг белка экстракта. Preparative разделение осуществляли на колонке 8102 LKB (440 мл), количество наносимого белка 50–100 мг. При изоэлектрофокусировании использовали 2% раствор амфолинов в интервале рН 3–10 в градиенте плотности сахарозы 0–60%. Время фокусирования 40 ч при напряжении 600 В. Во фракциях определяли поглощение при 280 нм и сиапилтрансферазную активность по отношению к эндо- и экзогенному субстрату. рI фракции устанавливали, определяя рН каждой фракции на радиометре рНЗМ Digital (Швеция).

Электрофорез в полиакриламидном геле проводили в гелевых пластинках или трубках в системе Вебер и Осборн (условия см. идентификацию продукта). Белки в геле обнаруживали с помощью окрашивания кумасси.

Для определения молекулярных весов белков в полиакриламидном геле строили калибровочную кривую по набору белков с известным молекулярным весом (Serva, ФРГ): цитохром с — 17 800, овальбумин — 45 000, бычий сывороточный альбумин — 67 000, альдолаза мышц кроликов — 147 000.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hudgin R. L., Schachter H. (1971) Can. J. Biochem., 9, 829–837.
2. Bartholomew B. A., Jourdan G. W., Roseman S. (1973) J. Biol. Chem., 248, 5751–5762.
3. Schachter H., Jabbal J., Hudgin R. L., Pinteric L., McGuire E., Roseman S. (1970) J. Biol. Chem., 245, 1090–1100.
4. Hudgin R. L., Schachter H. (1972) Can. J. Biochem., 50, 1024–1028.
5. Ng S.-S., Dain J. A. (1977) J. Neurochem., 29, 1075–1083.
6. Лапина Е. Б., Дробинская И. Е., Комалева Р. Л., Габриэлян Н. Д., Хорлин А. Я. (1975) Биоорганическая химия, 1, 1169–1175.
7. Габриэлян Н. Д., Валякина Т. И., Комалева Р. Л., Лапина Е. Б., Хорлин А. Я. (1977) Вестн. АМН СССР, 3, 50–54.
8. Лапина Е. Б., Габриэлян Н. Д., Хорлин А. Я. (1979) Биохимия, 44, 1648–1656.
9. Paulson J. C., Rearick J. R., Hill R. L. (1977) J. Biol. Chem., 252, 2363–2371.
10. Хиял Р. Л. (1979) Тр. симпозиума «Успехи биоорганической химии и молекулярной биологии», «Наука», М.
11. Ng S.-S., Dain J. A. (1977) J. Neurochem., 29, 1085–1093.

12. Madapally M. M., Wilson G. R., Zimmerman E. F. (1976) Arch. Biochem and Biophys, **173**, 1-10.
13. O'Brien B. J., Canady M. R., Hall C. W., Neufeld E. F. (1966) Biochim. et biophys. acta, **117**, 331-341.
14. Lin C.-K., Schmied R., Greenspan E. M., Waxman S. (1978) Biochim. et biophys. acta, **522**, 375-384.
15. Nomenclature of Multiple Forms of Enzymes. Recommendations of IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature. (1977) J. Biol. Chem., **252**, 5939-5943.
16. Alhadeff J. A., Cimino G., Janowsky A., O'Brien J. (1977) Biochim. et biophys. acta, **484**, 307-321.
17. Alhadeff J. A., Cimino G. (1978) Clin. Genetics, **13**, 207-212.
18. Khorlin A. Ya., Nesmeyanov V. A., Zurabian S. E. (1975) Carbohyd. Res., **43**, 69-77.
19. Lowry H. O., Rosenbrough N. I., Farr A. L., Randolf K. I. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
20. Kusov Yu. Yu., Kalinchuk N. A. (1978) Anal. Biochem., **88**, 256-262.
21. Patt L. H., Grimes W. J. (1974) J. Biol. Chem., **249**, 4157-4165.
22. Swennerholm L. (1957) Biochim. et biophys. acta, **24**, 1971-1975.
23. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., **244**, 4406-4411.

Поступила в редакцию
16.IV.1979

THE RESOLUTION OF SOLUBILIZED SIALYLTRANSFERASES FROM FROG (*RANA TEMPORARIA*) AND RAT LIVER

LAPINA E. B., GABRIELIAN N. D., KHORLIN A. YA.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Membrane-bound sialyltransferases from frog and rat liver were solubilized using Triton X-100. Solubilization did not affect the acceptor specificity. The resolution of solubilized sialyltransferases by isoelectric focusing in sucrose density gradient showed the presence of at least six forms within pH range 4.0-9.0 in both frog and rat liver. Identification of sialylation products revealed α -(2-6)- β -galactoside sialyltransferase to be the main form in both sources. Identification of endogeneous acceptors from frog liver showed the differences between them in the molecular weight.