



УДК 577.154.5.07

ФЕРМЕНТЫ БИОСИНТЕЗА О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ  
САЛМОНЕЛЛI. ИССЛЕДОВАНИЕ СОЛЮБИЛИЗАЦИИ И АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ  
ГАЛАКТОЗИЛФОСФАТТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ *SALMONELLA ANATUM*

Кусов Ю. Ю., Шibaев В. Н., Калинин Н. А.,  
Курьянов В. В., Гоголашвили Л. М., Кочетков Н. Б.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва

Изучено влияние неионных детергентов на сольubilизацию и активность галактозилфосфаттрансферазы из *Salmonella anatum*. Активный препарат фермента может быть получен при сольubilизации низкими концентрациями политергента S 305 LF и тритона X-114. Продемонстрировано влияние концентрации детергента на сродство фермента к иммобилизованному на сефарозе уридин-5'-фосфоамиду; с помощью аффинной хроматографии на этом сорбенте получен препарат галактозилфосфаттрансферазы, удельная активность которого в 330 раз превышала активность исходного фермента. Элюция фермента уридиндифосфатгалактозой привела к однородному препарату галактозилфосфаттрансферазы с  $M$  73 000.

Биосинтез повторяющегося звена О-специфических полисахаридов салмонелл осуществляется гликозилтрансферазами, катализирующими последовательный перенос гликозильных остатков от соответствующих нуклеозиддифосфатсахаров вначале на полипренилфосфат, а затем на его моно- и олигосахаридные производные [1]. Этот путь биосинтеза продемонстрирован с использованием либо фракции мембран, либо суммарного препарата трансфераз, сольubilизированных неионным детергентом [2]. До сих пор не описано выделение индивидуальных гликозилтрансфераз биосинтеза О-специфических полисахаридов, что связано, по-видимому, с трудностью очистки мембраносвязанных ферментов, сольubilизация которых достигается обработкой детергентами [3—5]. В тех немногочисленных успешных примерах очистки сольubilизированных детергентами гликозилтрансфераз животного происхождения наряду с традиционной ионообменной и гельпроникающей хроматографией [6—8] в последнее время нашла применение также и аффинная хроматография [7].

Этой статьей мы начинаем серию работ, направленных на очистку ферментов биосинтеза О-специфических полисахаридов салмонелл. Цель данной работы — исследование сольubilизации и аффинной хроматографии галактозилфосфаттрансферазы (UDP-Gal: ундекапренилфосфат-галактозилфосфаттрансферазы) — фермента, катализирующего первую реакцию биосинтеза повторяющегося звена *Salmonella anatum*, состоящую в переносе

Привытые сокращения: Gal — галактоза; Galp —  $\alpha$ -D-галактопиранозилфосфат; GalppU —  $P^1$ -( $\alpha$ -D-галактопиранозил)- $P^2$ -(уридин-5'-ил)пирофосфат или уридиндифосфатгалактоза; pPre<sub>11</sub> — ундекапренилфосфат; GalppPre<sub>11</sub> —  $P^1$ -( $\alpha$ -D-галактопиранозил)- $P^2$ -(ундекапренил)пирофосфат.

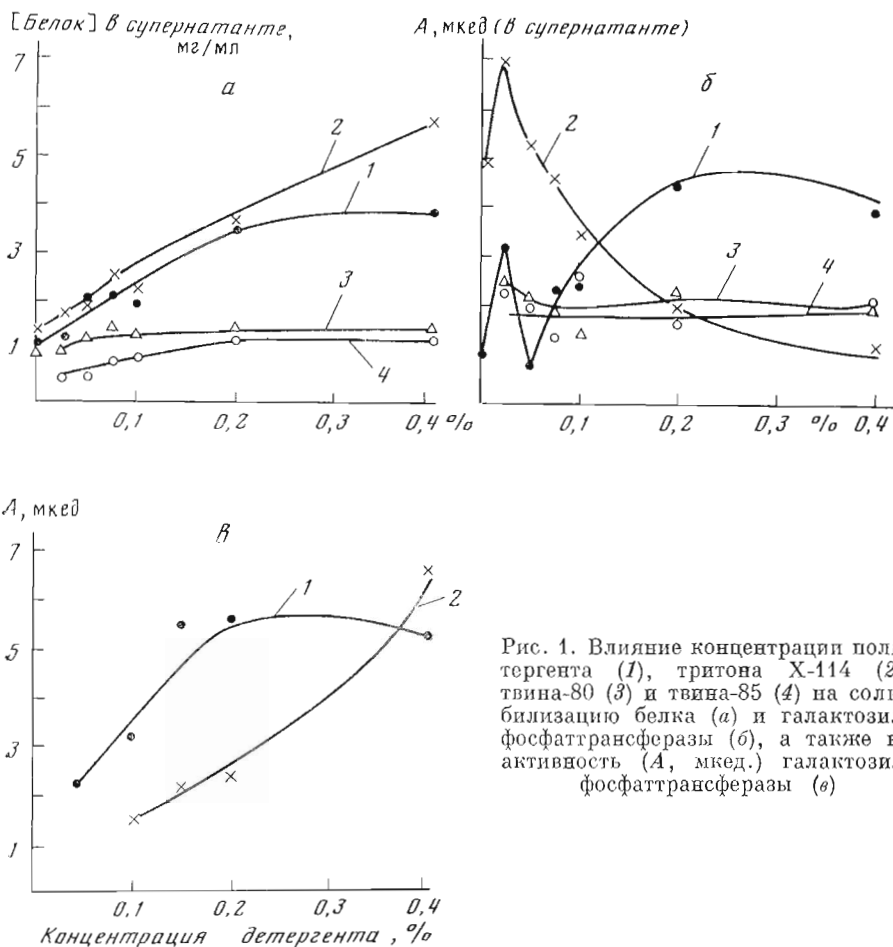
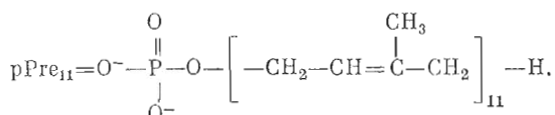


Рис. 1. Влияние концентрации поли-  
тергента (1), тритона X-114 (2),  
твина-80 (3) и твина-85 (4) на солю-  
билизацию белка (а) и галактозил-  
фосфаттрансферазы (б), а также на  
активность (А, мкед.) галактозил-  
фосфаттрансферазы (в)

остатка  $\alpha$ -D-галактозилфосфата (Galp) от уридиндифосфатгалактозы (UDP-Gal) на ундекаprenилфосфат (pPre<sub>11</sub>) с образованием галактозилпи-рофосфатундекапrenoла (GalppPre<sub>11</sub>): GalppU + pPre<sub>11</sub>  $\rightleftharpoons$  GalppPre<sub>11</sub> + + pU, где



По аналогии с известными примерами [6—8] было целесообразно проверить возможность солюбилизации галактозилфосфаттрансферазы разбавленными растворами детергентов (0,025—0,1%). Помимо политергента, применение которого для солюбилизации этого фермента описано в литературе, была изучена солюбилизующая способность и ряда других неионных детергентов: тритона X-114, твина-80 и твина-85.

Как видно из рис. 1а, возрастание концентрации детергента приводит к увеличению количества солюбилизованного белка при неизменном составе растворяемых белков. Наблюдаемая сложная зависимость галактозилфосфаттрансферазной активности в супернатанте от концентрации солюбилизующего детергента, в частности политергента и тритона X-114 (рис. 1б), может объясняться влиянием трех факторов: собственно растворением галактозилфосфаттрансферазы; снятием с мембраны ингибитора галактозилфосфаттрансферазной активности и, наконец, влиянием детергента на ферментативную активность, поскольку определение активности

солюбилизованного фермента происходит в присутствии разных концентраций детергента в инкубационных смесях. Проверка влияния детергента на ферментативную активность показала (рис. 1*б*), что как политергент, так и тритон X-114 активируют галактозилфосфаттрансферазу в пределах изученных концентраций, что вызывает наблюдаемое повышение активности препаратов, солюбилизованных 0,1—0,4% политергентом. Падение активности препаратов, солюбилизованных тритоном X-114 возрастающей концентрации, является, по-видимому, следствием ингибирующего влияния одного из компонентов мембраны, степень растворения которого возрастает по мере увеличения концентрации детергента. В случае политергента в области концентраций 0,2—0,4% наблюдается эффект «насыщения» как по солюбилизации белка и ферментативной активности, так и по активирующему влиянию на галактозилфосфаттрансферазу (ср. кривые 1 на рис. 1). Такой эффект характерен для детергентов, избирательно взаимодействующих с компонентами мембран [9]. Следует отметить, что обработка мембран как 0,025, так и 0,65% политергентом приводит лишь к частичной солюбилизации галактозилфосфаттрансферазы (3 и 11% соответственно). Высокий уровень остаточной активности препарата мембран позволяет проводить повторную солюбилизацию, в результате которой удается получить дополнительную порцию фермента.

Как видно из данных рис. 1, переход белка и галактозилфосфаттрансферазы в раствор при обработке мембран детергентами существенно зависит от природы детергента. Солюбилизации практически не наблюдается при использовании твина-80 и твина-85, которые имеют значения гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ-индексы [10]), равные 11 и 15 соответственно. В то же время растворение происходит при применении тритона X-114 (ГЛБ-индекс 12,4) и политергента (нам не удалось найти в литературе данные о ГЛБ-индексе этого детергента, однако его приближенное определение по температуре помутнения 5% водного раствора [10] дает величину 11,5—12,0). Таким образом, оптимальные значения ГЛБ-индекса детергента для солюбилизации галактозилфосфаттрансферазы — компонента мембран грамотрицательных бактерий — близки к интервалу 12—14, отмеченному для мембран грамположительных бактерий [11] и высших животных [12].

Из приведенных выше данных видно, что высокоактивные препараты галактозилфосфаттрансферазы могут быть получены при обработке мембран низкими концентрациями политергента и тритона X-114. В дальнейшей работе применялся политергент, активирующее влияние которого на галактозилфосфаттрансферазу (см. рис. 1*б*) было использовано при определении ферментативной активности. Более того, политергент оказался способным частично реактивировать препараты, потерявшие ферментативную активность в процессе хранения. Так, было показано возрастание активности галактозилфосфаттрансферазы с 0,07 до 1,0 мкед. при повышении концентрации политергента с 0,12 до 0,4% в инкубационной смеси при определении активности ферментного препарата, хранившегося в течение 10 сут при  $-70^{\circ}$ . Высокоактивные препараты галактозилфосфаттрансферазы, солюбилизованные низкими концентрациями политергента, быстро теряли ферментативную активность при хранении, а также при замораживании и оттаивании препаратов (рис. 2). Столь высокая лабильность фермента в этих препаратах потребовала разработки условий его стабилизации. Сульфгидрильные соединения не оказали стабилизирующего влияния, хотя дитиотреит в первоначальный момент вызывал некоторое активирование фермента; добавление 2-меркаптоэтанола приводило вначале к частичной, а затем и полной инактивации фермента. Напротив, добавление глицерина способствовало стабилизации галактозилфосфаттрансферазы; так, в отсутствие глицерина фермент полностью инактивировался через 10 сут, в то время как при хранении в растворе 20%-ного глицерина наблюдалась даже небольшая активация фермента (табл. 1).

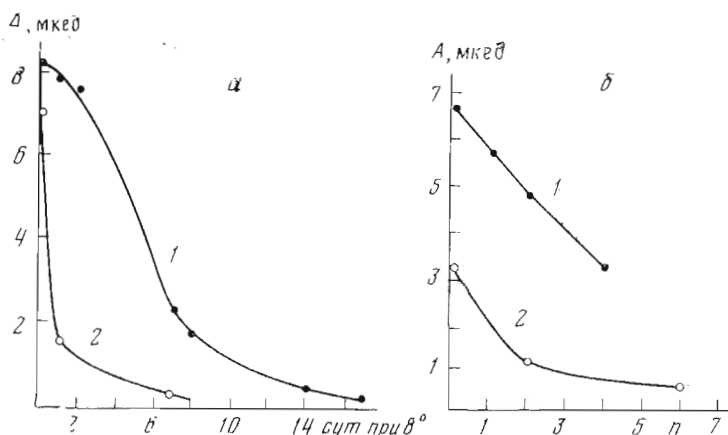


Рис. 2. Стабильность галактозилфосфаттрансферазы в препаратах, солиобилизованных 0,65% (1) и 0,05% (2) политергентом при хранении при 8° (а) и повторном замораживании и оттаивании препарата (б) (по оси абсцисс — число операций, n)

Таким образом, в итоге этой части исследования были определены условия солиобилизации галактозилфосфаттрансферазы низкими концентрациями политергента и последующей стабилизации ферментного препарата глицерином и политергентом. Следующий этап работы состоял в изучении возможности очистки фермента с помощью аффинной хроматографии.

В качестве лигандов для аффинной хроматографии галактозилфосфаттрансферазы были использованы фрагменты молекулы UDP-Gal — уридин-5'-моно- и пирофосфат, иммобилизация которых на сефарозе 4В в виде фосфоамидных производных описана нами ранее [13]. Результаты, представленные на рис. 3а и б, показывают, что взаимодействие фермента с уридин-5'-монофосфоамидным адсорбентом существенно зависит от концентрации детергента в препарате. При использовании препаратов, солиобилизованных 0,65% политергентом (рис. 3а), фермент практически не адсорбируется на колонке, в то время как при применении препарата, полученного в разбавленном растворе детергента, значительная часть фермента связывается с аффинным сорбентом (рис. 3б). Эти данные впервые наглядно демонстрируют влияние концентрации неионного детергента на сорбцию фермента к лиганду и показывают принципиальную возможность выделения галактозилфосфаттрансферазы аффинной хроматографией в разбавленных растворах детергентов.

Адсорбированная на аффинной колонке галактозилфосфаттрансфераза может быть элюирована 1 M NaCl (рис. 3б); полученный препарат (фракция № 12) содержит около 1,5% белка и ~ 25% ферментативной активности, нанесенных на колонку, и ~ 80% ферментативной активности, обнаружен-

Таблица 1

Активность (A, мкед) галактозилфосфаттрансферазы из *S. anatum* в присутствии сульфгидрильных соединений и глицерина

Время хранения фермента в присутствии реагента при -70°	Сульфгидрильные соединения			Глицерин, %	
	без добавок	дитиотреит 0,1 мМ	2-меркаптоэтанол 1,0 мМ	без добавок	20%
20 мин	4,2	6,9	1,8	0,8	0,8
2 сут	4,7	0,0	0,4	—	—
10 сут	—	—	—	0,0	1,0

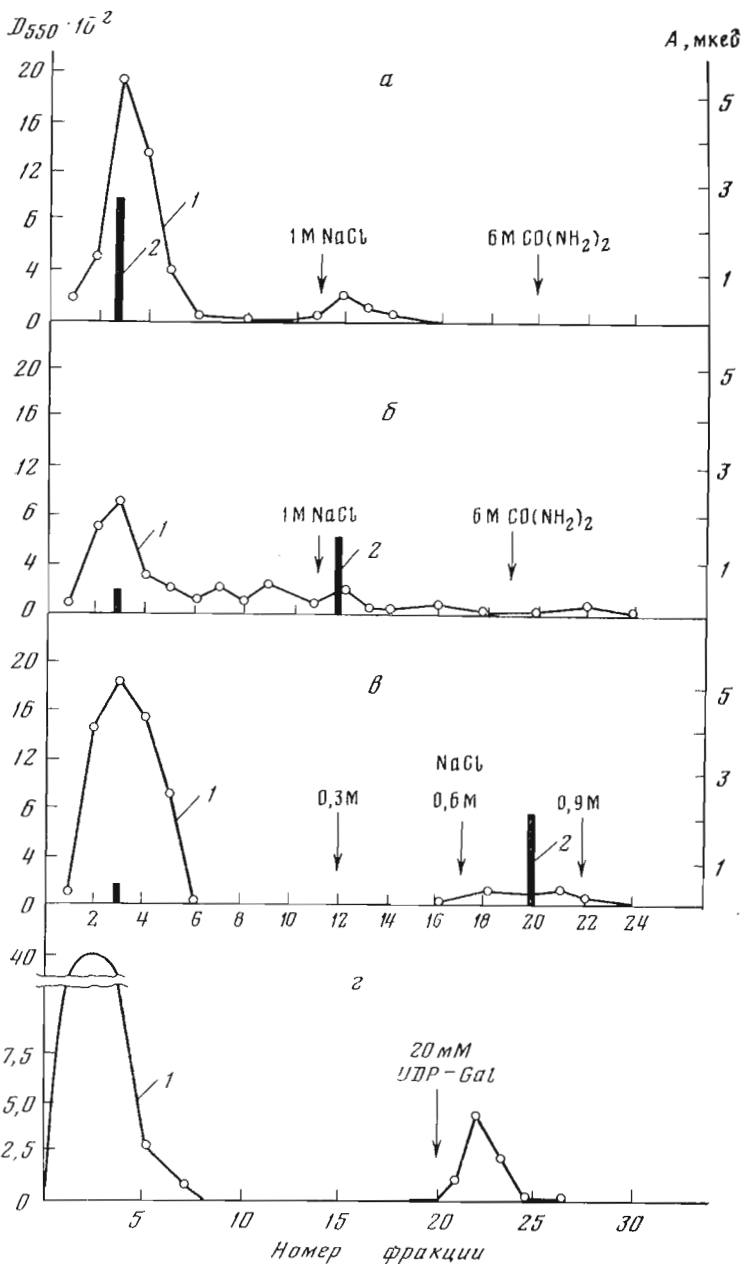


Рис. 3. Аффинная хроматография галактозилфосфаттрансферазы в 0,65% (а) и 0,05% (б, в и г) политергенте на иммобилизованном уридин-5'-фосфоамиде [13]; стрелками указано внесение в элюирующий буфер соответствующего компонента: 1 — оптическая плотность при определении белка, 2 — активность галактозилфосфаттрансферазы ( $A$ , мкед)

ной во фракциях 3 и 12 (табл. 2). Препарат галактозилфосфаттрансферазы с существенно более высокой удельной активностью удалось получить при элюции ступенчатым градиентом NaCl (рис. 3в и табл. 2). Около 80% ферментативной активности (55% активности, нанесенной на колонку) обнаружено во фракции, элюируемой 0,6 M NaCl; она содержит всего 0,2% исходного количества белка. Столь незначительные количества белка не позволили, к сожалению, оценить однородность данного препарата галактозилфосфаттрансферазы методом гель-электрофореза. Кажущаяся

Результаты аффинной хроматографии галактозилфосфаттрансферазы из *S. anatum*

Лиганд	Поли-тер-гент, %	Элюент	Ферментный препарат	Безош, мг	Активность галактозилфосфаттрансферазы			Степень очистки, в раз	
					общая, мтед.	удельная, мтед./мг	выход, %		
Уридин-5'-фосфоамид	0,65	NaCl, 1 М	Исходный фермент	1,8	400	220	100	0	
			Фракция № 3	0,68	100	150	24		
	0,05	То же	Фракция № 12	0,15	0	0	0		
			Исходный фермент	2,04	120	60	100		
	0,05	NaCl, ступенчатый градиент	Фракция № 3	0,44	8	18	6,7		15
			Фракция № 12	0,033	30	909	24		
0,05	UDP-Gal, 20 мМ	Исходный фермент	1,8	134	74	100	333		
		Фракция № 3	0,46	19	41	14			
Уридин-5'-пирофосфоамид	0,05	То же	Фракция № 20	0,003	74	24600	24	3,3	
			Исходный фермент	3,9	80	20	100		
	0,05	То же	Фракции № 1-7	1,7	70	41	89	1,8	
			Фракции № 20-27	0,03	2	66	2,4		
	0,05	То же	Исходный фермент	3,9	520	130	100	1,8	
			Фракции № 1-5	2,4	200	83	36		
Фракции № 22-26	0,025	6	240	1,1					

степень очистки галактозилфосфаттрансферазы составила в этом случае около 330.

Поскольку неспецифической элюцией растворами NaCl не удалось получить гомогенный препарат фермента (рис. 4), была изучена возможность неспецифической десорбции фермента под действием UDP-Gal (рис. 3з). В этом случае элюат, полученный при пропускании 20 мМ раствора нуклеотидсахара, содержит ~ 0,7% белка, нанесенного на колонку. Аналогичные результаты получены при использовании аффинной колонки с иммобилизованным в виде фосфоамида уридин-5'-пирофосфатом (табл. 2). Из этих данных видно, что главную роль при адсорбции фермента на аффинных сорбентах играют взаимодействия с участием остатка нуклеозид-5'-фосфата; присутствие в молекуле лиганда дополнительной фосфатной группы не приводит к значительному изменению сродства фермента к лиганду.

Следует отметить, что приведенные в табл. 2 величины удельной активности препаратов фермента и кажущейся степени очистки являются лишь минимальными оценками вследствие нестабильности очищенного фермента. Определения ферментативной активности, на которых основаны эти данные, проводились через 1—3 ч после элюции фермента с колонки, причем для стабилизации фермента во фракции добавляли глицерин и поли-тер-гент. Однако даже в этих условиях повторное определение через 4—5 ч показывает значительное уменьшение ферментативной активности. Особенно велики потери ферментативной активности при анализе элюатов, полученных с помощью UDP-Gal, так как в этом случае для определения активности необходимо было предварительно удалить перадиоактивный субстрат из препарата фермента, что осуществлено 8-кратной ультрафильтрацией, занимающей довольно продолжительное время.

Анализ однородности полученных препаратов галактозилфосфаттрансферазы методом электрофореза в полиакриламидном геле потребовал предварительного удаления избытка детергента из скопированных фракций, для чего нами был разработан способ, основанный на ультрафильтра-

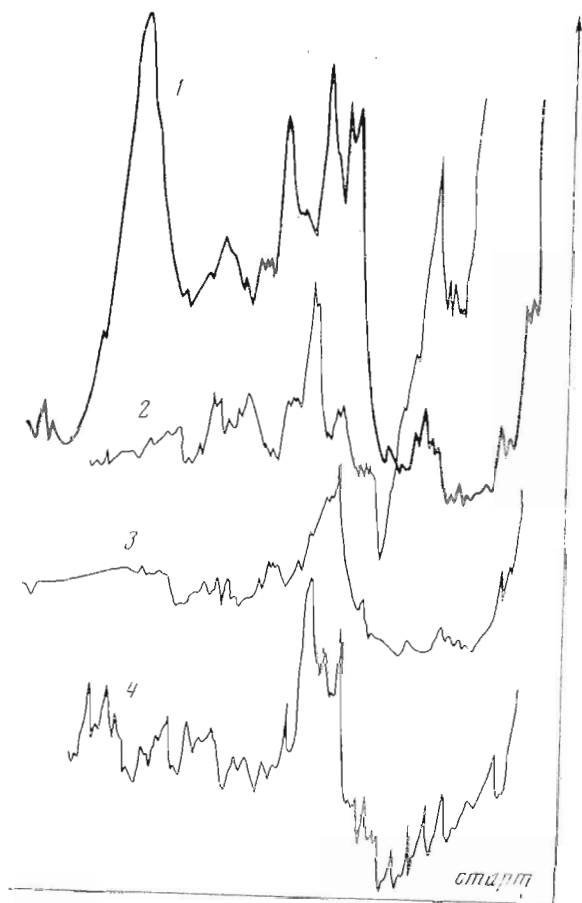


Рис. 4. Гель-электрофорез препаратов галактозилфосфаттрансферазы после обработки 2-меркаптоэтанолом: 1 — исходный препарат, солиобилизованный 0,05% политергентом, 2 — фракция № 12 (рис. 3б), 3 и 4 — фракции № 20—27 (рис. 3а) и 22—26 (рис. 3а) соответственно. Образцы после электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия окрашивали кумаси R-250, обесцвечивали и сканировали на спектрофотометре Gifford 2400-2

ции растворов в присутствии 20% глицерина [14]. Сканирование электрофореграмм разных фракций фермента, полученных после аффинной хроматографии галактозилфосфаттрансферазы (рис. 4), показало, что в результате хроматографии достигается значительная очистка фермента; препарат, полученный элюцией UDP-Gal с колонки с иммобилизованным уридин-5'-фосфатом, является электрофоретически однородным (рис. 4, 3). Сопоставление электрофоретической подвижности фермента с подвижностью стандартных белков позволяет сделать вывод о том, что молекулярная масса его полипептидной цепи близка к 73 000.

Таким образом, результаты настоящей работы показывают, что с помощью аффинной хроматографии на колонках с иммобилизованным уридин-5'-фосфатом удается получить электрофоретически однородный препарат галактозилфосфаттрансферазы из *S. anatum*. Насколько нам известно, это первый пример очистки с помощью аффинной хроматографии гликозилтрансферазы, участвующей в образовании полирибозофосфосахаров. Препаративное выделение галактозилфосфаттрансферазы требует, однако, дальнейшей разработки оптимального сочетания различных стадий очистки и стабилизации очищенных препаратов фермента, что служит предметом наших исследований в настоящее время.

## Экспериментальная часть

Получение морапренилфосфата фосфорилированием морапренола и извлечение бактериального ундекапренилфосфата из *S. anatum* и *E. coli* описаны в работах [15 и 16] соответственно. Радиоактивная UDP-[<sup>3</sup>H]Gal получена по методике [17] с предложенными модификациями [16]. В работе использованы неионные детергенты: политергент S 305 LF (Olin Chem. Corp., Connecticut, США), тритон X-114 (Sigma, США), твин-80 и твин-85 (Schuchardt, ФРГ). Микробиологическая техника и способ получения препарата мембран описаны ранее [16]. Определение белка в препарате мембран проведено по методу Лоури [18] с предварительным осаждением белка трихлоруксусной кислотой. Белок в присутствии неионных детергентов определяли с помощью автоматического анализатора Technicon Autoanalyzer при 550 нм [19] или следующим образом: к смеси 1 мл 1%-ного раствора додецилсульфата натрия и 1 мл раствора тартрата, приготовленного смешением 1 мл 3,2% CuSO<sub>4</sub>, 1 мл 10% тартрата натрия и 98 мл 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, добавляли 0,16 мл анализируемого раствора и через 10 мин при комнатной температуре 0,7 мл реактива Фолина [18], разбавленного двумя частями воды. Измерение поглощения против холостой пробы проводили через 30 мин при 700 нм (Spectromot, Венгрия). При построении калибровочного графика альбумин сыворотки человека (Reanal, Венгрия) растворяли в том же буфере, в котором находился анализируемый белок. Методика определения детергентов описана ранее [14]. Электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия осуществлен по методу [20] после нагревания анализируемых образцов (100°, 3—5 мин или 40°, 2 ч с последующим диализом в течение 18 ч) в смеси 1% 2-меркаптоэтанола и додецилсульфата натрия. Окрашивание гелей на белок осуществлено с помощью кумаси R-250 (Ferak, ГДР) с последующим сканированием при 600 нм на спектрофотометре Gilford 2400-2. Аналогичным образом обрабатывали белки-стандарты: альбумин (*M* 67 000), овальбумин (*M* 45 000), химотрипсиноген А (*M* 25 000), миоглобин (*M* 17 800), цитохром *c* (*M* 12 400) (Collection MS-II, Serva, ФРГ).

*Общая методика определения галактозилфосфаттрансферазной активности.* 25—75 нмоль раствора морапренил- или ундекапренилфосфата упаривали в токе N<sub>2</sub>, добавляли 10 мкл MeOH или PrOH, 15 мкл 0,5% водного твина-85 и кратковременно перемешивали (миксер, модель ВП, ОКП ЭМИБ, Киев). В полученную смесь добавляли 5 мкл 1 М трис-ацетата (рН 8,5), 10 мкл 0,1 М MgCl<sub>2</sub>, 5 мкл 2,5 мМ UDP-[<sup>3</sup>H]Gal (50 мКи/ммоль) и 25—50 мкл ферментного препарата. Объем инкубационной смеси составлял 0,1 мл. Через 15—25 мин инкубации при 25° добавляли 2 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1) и перемешивали до гомогенности; через 10 мин проводили экстракцию (3 × 0,4 мл) верхней фазой по Фольчу [21] с интенсивным перемешиванием в течение 15 с. Аликвоту органической фазы упаривали под лампой (300 Вт), добавляли 0,5 мл воды, 5 мл сцинтиллятора Брэя [22] и определяли радиоактивность на жидкостно-сцинтилляционном счетчике Изокап-300 (Nuclear-Chicago, США). За единицу активности галактозилфосфаттрансферазы принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль ундекапренилпирофосфатгалактозы за 1 мин в условиях определения.

*Методика солюбилизации галактозилфосфаттрансферазы.* 0,5 мл препарата мембран (20—25 мг белка/мл) [16] интенсивно перемешивали 5 мин при 0° без детергента (контрольный образец) и с определенными аликвотами 10% детергента так, чтобы конечная концентрация детергента составляла 0,025—0,40 об. %. Остаточные мембраны отделяли центрифугированием (VAC-601, ГДР) в тефлоновых адаптерах при 160 000 *g* 40 мин при —20°. Супернатант использовали для определения белка (аликвоты по 100 мкл; исключение — препараты с тритоном X-114 — по 20 мкл) (рис. 1а), галактозилфосфаттрансферазной активности (аликвоты по 50 мкл, рис. 1б) и



изучения качественного состава белков электрофорезом в полиакриламидном геле (по 50—100 мкл).

При изучении влияния детергентов на галактозилфосфаттрансферазную активность в инкубационную смесь (см. выше) добавляли 1% детергент для создания необходимой концентрации. В качестве источника фермента применяли препарат гликозилтрансфераз (20 мкл), солиобилизованный 0,025% детергентом (рис. 1в).

Стабильность галактозилфосфаттрансферазы при хранении при 8° и при замораживании-оттаивании изучена для двух препаратов, содержащих 0,05 и 0,65% политергент; аликвоты (15—25 мкл, 40—50 мкг белка) препаратов фермента инкубировали с 15 нмоль морапренилфосфата в соответствии с общей методикой определения активности. Результаты приведены на рис. 2.

Изучение влияния дитиотреита, 2-меркаптоэтанола и глицерина на активность галактозилфосфаттрансферазы проведено по общей методике определения активности с одинаковыми количествами морапренилфосфата (25 нмоль) и ферментного препарата (32,5 мкг белка), солиобилизованного 0,025—0,05% политергентом. В табл. 1 указаны концентрации использованных реагентов в ферментных препаратах при их хранении.

Удаление избытка политергента проводили ультрафильтрацией через мембрану (PSED, Pellicon, США), пропускающую глобулярные полимеры с  $M$  25 000 с использованием ячейки диаметром 24 мм фирмы «Миллипор» при 8° под давлением азота 2 атм [14].

Аффинную хроматографию проводили при 10°, получение аффинных адсорбентов описано ранее [13].

Изучение влияния концентрации политергента на сродство галактозилфосфаттрансферазы к иммобилизованному уридин-5'-P-[N-(6-аминогексил)]фосфоамиду. На колонку (0,4 × 4 см), содержащую 1 мл адсорбента (2—2,9 мкмоль лиганда), наносили солиобилизованный 0,65% политергентом в 50 мМ трис-ацетатном буфере (рН 8,5) препарат галактозилфосфаттрансферазы (1,8 мг белка) в 0,01 М  $MgCl_2$  и инкубировали в течение 1 ч при 10°. Колонку промывали (0,5 мл/мин) 10 мл 50 мМ трис-ацетатного буфера, рН 8,5, содержащего 0,01 М  $MgCl_2$  и 0,65% политергент (буфер А) и далее по 10 мл буфера А с 1 М  $NaCl$ , с 6 М мочевиной и с 6 М хлоргидратом гуанидина. Во фракциях (1 мл) определяли белок [19], а в аликвотах по 50 мкл галактозилфосфаттрансферазную активность по общей методике с 25 нмоль морапренилфосфата (рис. 3а). Для стабилизации фермента фракции разбавляли равным объемом 40% глицерина.

Аналогичный опыт проведен для солиобилизованного 0,05% политергентом препарата галактозилфосфаттрансферазы (2,04 мг белка); концентрация политергента во всех буферах составляет 0,05%. Результаты определения белка и ферментативной активности с 25 нмоль морапренилфосфата для аликвот (25 мкл) из фракций представлены на рис. 3б. Во фракции (1 мл) добавляли 1 мл раствора 40% глицерина, содержащего 1,2% политергент.

При элюции ступенчатым градиентом  $NaCl$  после нанесения на указанную выше колонку 1,8 мг солиобилизованного 0,05% политергентом препарата галактозилфосфаттрансферазы, инкубации (1 ч, 10°) и элюции балластных белков 12 мл 50 мМ трис-ацетата (рН 8,5) с 0,05% политергентом и 0,01 М  $MgCl_2$  (буфер Б) колонку промывали по 5 мл буфера Б с 0,3; 0,6; 0,9 и 1 М  $NaCl$  и далее с 6 М мочевиной и с 6 М хлоргидратом гуанидина. После элюции с колонки фракции разбавляли равным объемом смеси 40% глицерин — 1,2% политергент. В аликвотах из фракции определяли белок и галактозилфосфаттрансферазную активность, как указано выше. Результаты приведены на рис. 3в.

Аффинная хроматография с биоспецифической десорбцией фермента  $UDP-Gal$  проведена в 50 мМ трицине (триоксиметил-метилглицине), рН 8,15 (Serva, ФРГ) на колонке (0,5 × 10 см), содержащей 2,5 мл адсорбента

(23,4 мкмоль уридин-5'-P-[N-(6-аминогексил)]фосфоамида, предварительно промытой 20 мл 50 мМ трицина с 0,05% политергентом (буфер В). 3 мл (3,9 мг белка) препарата галактозилфосфаттрансферазы, солюбилизированной 0,025% политергентом в 50 мМ трис-буфере, нанесли на колонку, инкубировали 1 ч и промыли 16 мл буфера В; затем на колонку нанесли 1,45 мл 20 мМ UDP-Gal в буфере В и далее промывали буфером В со скоростью 0,5 мл/мин, собирая фракции по 1 мл. Часть элюата (0,05 мл/мин) непрерывно подавали на автоматический анализ белка [19]; график элюции представлен на рис. 3г. Фракции, содержащие белок, объединяли и концентрировали ультрафильтрацией на мембране РТНЖ (Pellicon, США), пропускающей глобулярные полимеры с  $M 1 \cdot 10^5$ . Из объединенных фракций № 20—27 ультрафильтрацией удаляли UDP-Gal, добавляя на каждом цикле по 5 мл буфера В и концентрируя до 0,2 мл. В фильтраатах спектрофотометрически (Uvicam SP-8000, Англия) определяли количество UDP-Gal, концентрация которой после 8 циклов снизилась до 14 мкМ. Аликвоты остаточных растворов использовали для определения белка (150 мкл), галактозилфосфаттрансферазной активности (25 мкл) и после обработки 2-меркаптоэтанолом в додецилсульфате натрия качественного состава белков гель-электрофорезом [20]. Результаты представлены в табл. 2 и на рис. 3г и 4.

Аффинная хроматография галактозилфосфаттрансферазы на адсорбенте с иммобилизованным  $P^1$ -(уридин-5'-ил)- $P^2$ -[N-(6-аминогексил)]пирофосфоамидом [13] проведена на колонке (0,5—10 см) с 3,0 мл адсорбента, содержащего 5,4 мкмоль лиганда/мл геля в условиях, аналогичных предыдущему опыту. После нанесения препарата галактозилфосфаттрансферазы на колонку, инкубации и промывки колонки 16 мл буфера В элюцию фермента с колонки осуществляли введением 1,76 мл 20 мМ UDP-Gal в буфере В; далее колонку промывали 18 мл буфера В. При автоматическом анализе белка в потоке элюата с колонки получен график элюции, близкий к представленному на рис. 3г. Объединение содержащих белок фракций (№ 22—26), удаление UDP-Gal и определение галактозилфосфаттрансферазной активности осуществлено как описано выше. Результаты представлены в табл. 2; качественный состав белков, определенный гель-электрофорезом, приведен на рис. 4. Перед повторным использованием адсорбенты промывали 0,5 М NaCl, 0,1 М AcONa, 0,1 М NaHCO<sub>3</sub>, 2 М мочевиной и, наконец, 1 М NaCl и проверяли на содержание лигандов (гидролиз 0,6 н. HCl, 20°, 18 ч); за 1,5 года не обнаружено заметной десорбции УФ-поглощающего материала при хранении адсорбентов при 4°.

Авторы выражают искреннюю благодарность Л. Л. Данилову за предоставление морапренилфосфата и С. Ш. Рожновой за помощь, оказанную при выращивании микроорганизмов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Robbins P. W., Wright A. (1971) in: *Microbial Toxins*, vol. IV, *Bacterial Endotoxins* (Weinbaum G., Kadis S., Aje S. J., eds.), pp. 351—368, Acad. Press, N. Y.—London.
2. Osborn M. J., Cynkin M. A., Gilbert I. M., Muller G. L., Singh M. (1972) in: *Methods in Enzymology* (Colowick S. P., Kaplan N. O., eds.), vol. 28 (Complex Carbohydrates, part B), pp. 583—601, Acad. Press, N. Y.—London.
3. Gulik-Krzwycki T. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, 415, 1—28.
4. Yasukochi Yu., Masters B. S. S. (1960) *J. Biol. Chem.*, 251, 5337—5344.
5. Bucher D. J. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, 482, 393—399.
6. Schwartz N. B., Roden L. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 5200—5207.
7. Schwyzer M., Hill R. L. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 2338—2345.
8. Heifetz A., Elbein A. D. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 3057—3063.
9. Helenius A., Simons K. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, 415, 29—79.
10. Шенфельд Н. (1965) Неионовые моющие средства, с. 172, «Химия», М.
11. Umbreit J. N., Strominger J. L. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 2997—3001.
12. Egan R. W., Jones M. A., Lehninger A. L. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 4442—4447.
13. Шibaев В. Н., Кусов Ю. Ю., Калинин Н. А., Кочетков Н. К. (1977) *Биоорганическая химия*, 3, 120—125.

14. Кусов Ю. Ю., Калинин Н. А., Гогилашвили Л. М. (1978) Биорган. химия, 4, 832—834.
15. Вергунова Г. И., Глуходед И. С., Данилов Л. Л., Елисеева Г. И., Кочетков Н. К., Троицкий М. Ф., Усов А. И., Шашков А. С., Шибает В. Н. (1977) Биорган. химия, 3, 1484—1492.
16. Шибает В. Н., Кусов Ю. Ю., Дружинина Т. Н., Калинин Н. А., Кочетков Н. К., Килессо В. А., Рожнова С. Ш. (1978) Биорган. химия, 4, 47—56.
17. Nelsestuen G. L., Kirkwood S. (1971) J. Biol. Chem., 246, 3828—3834.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.
19. Kusov Yu. Yu., Kalinchuk N. A. (1978) Anal. Biochem., 88, 256—262.
20. Weber K., Osborn M. J. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406—4412.
21. Folch J., Less M., Sloan-Stanly G. H. (1952) J. Biol. Chem., 226, 497—509.
22. Bray G. A. (1960) Anal. Biochem., 1, 279—285.

Поступила в редакцию  
27.VII.1978

**ENZYMES OF THE SALMONELLA O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE  
BIOSYNTHESIS. I. STUDIES ON SOLUBILIZATION AND AFFINITY  
CHROMATOGRAPHY OF GALACTOSYL PHOSPHATE TRANSFERASE FROM  
*SALMONELLA ANATUM***

KUSOV Yu. Yu., SHIBAIEV V. N., KALINCHUK N. A., KUPRIJANOV V. V.,  
GOGILASHVILI L. M., KOCHETKOV N. K.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of  
Sciences of the USSR, Moscow*

The effect of nonionic detergents on solubilization and activity of galactosyl phosphate transferase from *Salmonella anatum* was studied. The enzyme was solubilized by treatment of the membranes with low concentration of Poly-Tergent S 305 LF and Triton X-114. The effect of detergent concentration on affinity of the enzyme towards uridine-5-phosphoramidate immobilized on Sepharose 4B was demonstrated. Affinity chromatography on this adsorbent afforded the enzyme having 330-fold higher activity than the initial enzyme. Elution with uridine diphosphate galactose gave rise to homogeneous galactosyl phosphate transferase of molecular weight 73 000.