



УДК 577.154.02

**ИЗОФЕРМЕНТЫ β -D-ГАЛАКТОЗИД- α -2 \rightarrow
6-СИАЛИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ ПЛАЗМАЦИТОМЫ МОРС-104Е***Анфимова М. Л., Габриэлян Н. Д., Хорлин А. Я.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва**Гусов Ю. Ю. ***Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва*

С помощью изоэлектрофокусирования с последующей аффинной хроматографией на новом аффинном сорбенте, N¹-(цитидин-5'-фосфорил)-1,6-диаминогексан-сефарозе, выделены две формы сиалилтрансферазы из мышинной плазмацитомы МОРС-104Е. Введение метаболической метки для белка и углеводов, а также определение оптимума рН показали, что формы фермента с рI 6,1 и 7,8 являются истинными изоферментами.

В настоящее время показано, что ферменты, осуществляющие посттрансляционную модификацию полипептидной цепи, например гликозилирование, как правило, существуют в виде множественных форм [1—3]. Среди них обнаружены как истинные изоферменты, так и множественные формы, структура которых различается только по степени гликозилирования [4, 5].

Ранее нами методом изоэлектрофокусирования были обнаружены множественные формы сиалилтрансфераз (КФ 2.4.99.1) в лимфоидных тканях животных: в селезенке крыс и перевиваемой опухоли мышей — плазмацитоме МОРС-104Е [6]. Мы показали [6], что обработка нейраминидазой *Cl. perfringens* практически не влияла на количество множественных форм фермента в нейтральной и щелочной областях градиента рН, поэтому было важно выяснить, не являются ли по крайней мере некоторые из форм сиалилтрансфераз разными белками. Для работы была выбрана плазмацитома МОРС-104Е как богатый источник высокоактивных сиалилтрансфераз.

Препаративное изоэлектрофокусирование солюбилизатов плазмацитомы МОРС-104Е. Для получения требуемых для работы количеств исследуемых ферментов мы применяли препаративный вариант метода изоэлектрофокусирования в градиенте концентрации сахарозы в интервале рН 3,5—10, использованного нами ранее [6]. Чтобы анализировать распределение белков и углеводов во фракциях после изоэлектрофокусирования, мы вводили метаболическую метку в клетки до солюбилизации. Белок метили [³H]лейцином (неглюкозогенной аминокислотой), а угле-

* Настоящее место работы — Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР.

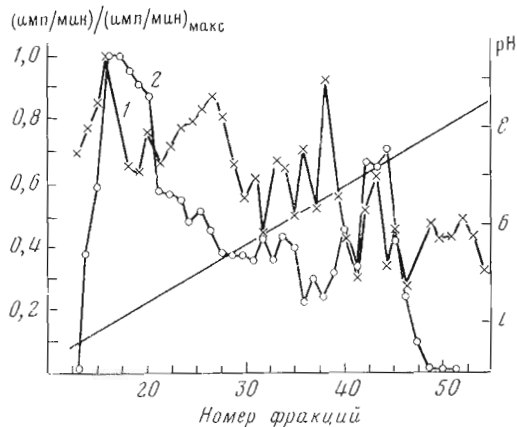


Рис. 1. Распределение белков при препаративном изоэлектрофокусировании суммарной мембранной фракции клеток плазмацитомы МОРС-104Е на колошке 8100 LKB (440 мл). Объем фракции 5 мл. Контроль по включению [^{14}C]ManNac (1) и [^3H]Leu (2)

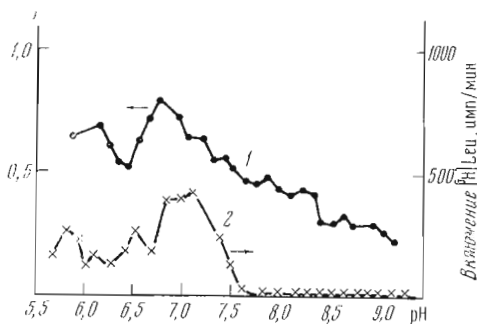


Рис. 2. Распределение белков, определяемых по поглощению при 280 нм (1) и включению [^3H]лейцина (2), при изоэлектрофокусировании солилизата суммарной мембранной фракции клеток плазмацитомы МОРС-104Е

водные цепи — N-ацетил-D- [^{14}C]маннозаминном ([^{14}C]ManNac), так как он преимущественно включается в сиаловые кислоты [7]. Такая двойная метка позволяла повысить чувствительность методов определения гликопротеинов после изоэлектрофокусирования.

Из результатов препаративного изоэлектрофокусирования (рис. 1) видно, что включение [^{14}C]ManNac происходит по всему градиенту pH, т. е. даже самые щелочные белки являются сиалосодержащими гликопротеинами. По включению [^3H]лейцина все белки вдоль градиента pH можно разбить на 3 группы: с pI 3,5–5,0 и 5,0–7,8 (включающие [^3H]лейцин), 7,8–9,5 (не включающая [^3H]лейцин). В последней области белки можно определить по поглощению при 280 нм и по данным электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (рис. 2, бб). Мы не исследовали конкретно природу этого явления, которое можно объяснить либо отсутствием в этих белках лейцина, либо меньшей скоростью их биосинтеза.

Важно, что профили распределения белковой и углеводной метки совпадают по положению отдельных пиков. Однако [^3H]лейцин особенно интенсивно включается в белки с pI в областях 3,5–4,5 и 6,8–7,4, в то время как максимальное включение [^{14}C]ManNac наблюдается в белках с pI 4,5–6,8, где включение [^3H]лейцина относительно низкое.

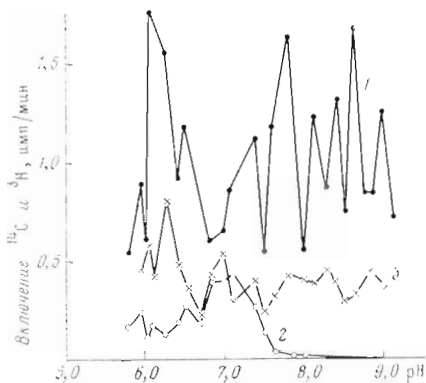


Рис. 3

Рис. 3. Профиль экзогенной активности салилтрансферазы по отношению к асиало-IgM (1) при изоэлектрофокусировании; 2 — распределение белков, включающих $[^3\text{H}]$ лейцин, 3 — распределение гликопротеинов, включающих $[^{14}\text{C}]$ ManNAc

Рис. 4. Распределение экзогенной (1) и эндогенной (2) активности салилтрансфераз при изоэлектрофокусировании

Рис. 5. Хроматография белков (~100 мкг) фракции с рI 7,8 (рис. 3) на аффинном сорбенте: 1 — профиль поглощения белка, 2 — экзогенная, 3 — эндогенная салилтрансферазная активность. Колонка 1,5 мл, объем фракции 2 мл

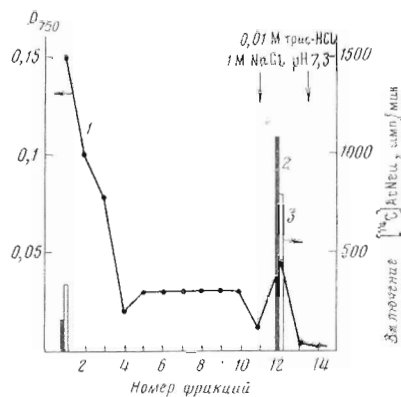


Рис. 5

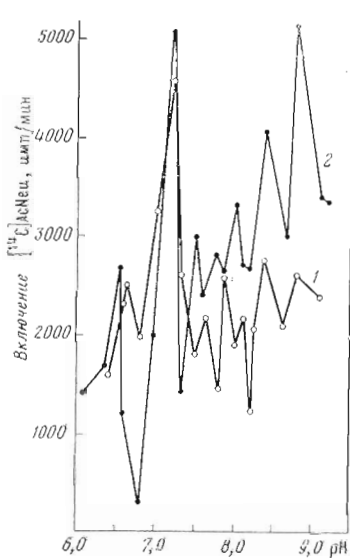


Рис. 4

Полученные результаты свидетельствуют о том, что практически все белки солиобилизата суммарной мембранной фракции клеток плазматомы являются сialogликопротеинами, которые различаются как по интенсивности биосинтеза, так и по степени гликозилирования.

В предыдущей работе мы показали, что в области градиента pH 6—9 находятся высокоактивные и стабильные формы $\alpha 2 \rightarrow 6$ -салилтрансфераз [6]. Поэтому в дальнейшем детально изучали именно эту область. В качестве акцептора меченой N-ацетилнейраминной кислоты использовали асиало-IgM [6], так как в будущем предполагалось использовать очищенные ферменты для ресалирования мембраносвязанных IgM. Распределение салилтрансферазной активности вдоль градиента pH представлено на рис. 3. Однако сложный профиль салилтрансферазной активности не всегда соответствует сложности профилей по поглощению при 280 нм и включению $[^3\text{H}]$ лейцина, что может свидетельствовать о микрогетерогенности углеводных цепей одной и той же полипептидной цепи. Это особенно четко прослеживается для белков в областях pH 6,1—6,5 и 8,0—8,7 (рис. 2, 3).

Определение эндогенной активности во фракциях после изоэлектрофокусирования показало совпадение некоторых максимумов с максимумами

экзогенной активности (рис. 4). Ранее мы предположили, что эндогенная активность может отражать как включение в эндогенные акценторы, фракционирование которых происходит параллельно с ферментами, так и в сами ферменты, которые, по всей видимости, являются сиалилглицопротеинами (фракции, обладающие сиалилтрансферазной активностью, выделяют [^{14}C]ManNAc). В первом случае правильная оценка величины удельной активности каждой формы сиалилтрансферазы осложняется конкурентными отношениями между экзогенными и эндогенными акценторами. С этим явлением мы встречались и при выделении множественных форм этого фермента из печени крыс и лягушек [8]. Однако иногда нам удавалось дифференцировать пики экзогенной и эндогенной активности (см. рис. 4).

В правомочности второго предположения мы убедились в дальнейшем эксперименте по аффинной хроматографии, так как практически гомогенный фермент обладал эндогенной активностью (рис. 5, 7). Подробнее это будет обсуждаться ниже.

В нашем исследовании мы стремились к выявлению истинных изоферментных форм сиалилтрансфераз, что могло свидетельствовать о генетически детерминированной регуляции процесса сиалирования углеводных цепей. Из результатов по включению [^3H]лейцина можно сделать вывод о том, что белки с rI до 7,8 и после 7,8 имеют различный состав, поэтому для исследования были выбраны две формы сиалилтрансферазы с rI 6,1 и 7,8, которые в наших экспериментах были достаточно активными.

Очистка двух форм сиалилтрансфераз с помощью аффинной хроматографии. Для окончательного доказательства различий между сиалилтрансферазами с rI 6,1 и 7,8 необходимо было выделить их в максимально очищенном виде и изучить их свойства. Для этого был выбран метод аффинной хроматографии. Таким методом Хиллу [9—11] удалось очистить до гомогенного состояния несколько сиалилтрансфераз из разных источников, которые различались по своей специфичности. В качестве аффинного сорбента автор использовал CDP-гексаноламин, иммобилизованный на агарозе. Нами был применен N^1 -(цитидин-5'-фосфорил)-1,6-диаминогексан, иммобилизованный на активированной бромцианом сефарозе 4В. Этот тип сорбента вместо фосфоэфирной связи между нуклеотидом и спейсером в лиганде содержит фосфоамидную связь. Применимость уридиновых аналогов подобных сорбентов была продемонстрирована на примере выделения одного из ферментов биосинтеза О-антигена липополисахарида *Salmonella anatum* [12].

Схема синтеза фосфоамидного сорбента с CMP аналогична схеме синтеза подобных сорбентов с UMP [13]. При конденсации CDP с хлорангидридом мезитиленкарбоновой кислоты (MesCOCl) были получены смешанные ангидриды, как CMP (MesCOPCyD), так и CDP (MesCAPPyCyD), разделение которых осуществляли ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе. Идентичность УФ-спектров этих соединений в сравнении со спектрами исходных цитидиновых нуклеотидов свидетельствовала об отсутствии не только N-ацилирования, но и какого-либо изменения гетероциклического основания [14]. Аналитические и хроматографические параметры, а также данные спектроскопии ИМР подтверждали структуры, предложенные для полученных смешанных ангидридов.

Для дальнейшего превращения в фосфоамидное производное был выбран более устойчивый ангидрид — MesCOPyCyD , при взаимодействии которого с гексаметилендиамином получен N^1 -(цитидин-5'-фосфорил)-1,6-диаминогексан (CMP-гексаметилендиамин). В отличие от UMP-гексаметилендиамина фосфоамидное производное CMP не удалось выделить ионообменной хроматографией на дауэксе 1×8 (ср. [13]). Хроматографически и электрофоретически однородный продукт был получен препаративным электрофорезом в триэтиламонийбикарбонатном буфере. Аналитические и хроматографические данные соответствуют предполагаемой структуре;

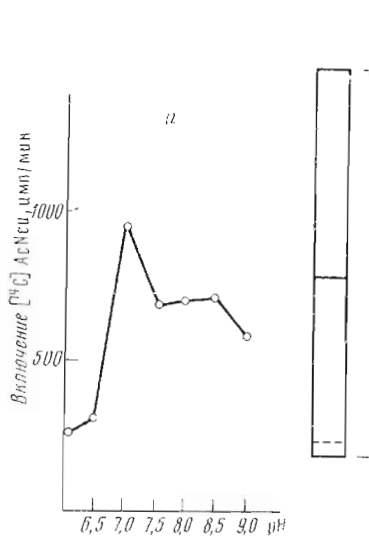


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость активности от рН (а) и электрофокаграмма (б) очищенной сиалилтрансферазы из фракции с рИ 7,8

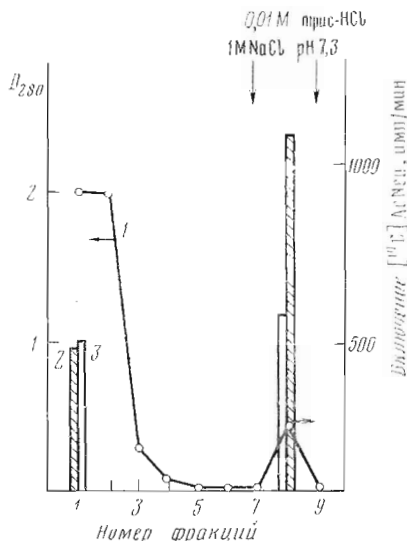


Рис. 7

Рис. 7. Хроматография белков фракции с рИ 6,1 (рис. 3) на аффинном сорбенте: 1 — профиль элюции белка, 2 — экзогенная, 3 — эндогенная сиалилтрансферазная активность. Условия см. в подписи к рис. 5

Рис. 8. Зависимость от рН активности очищенной сиалилтрансферазы от фракции с рИ 6,1

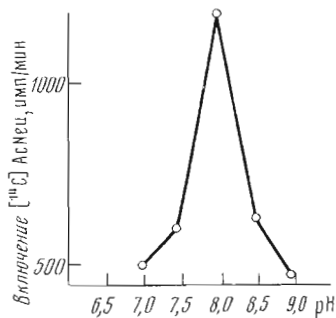


Рис. 8

в спектре ПМР имеются сигналы, характерные для гетероциклического ядра и остатка гексаметилендиамина.

Сорбент для аффинной хроматографии был получен при взаимодействии фосфоамида с активированной бромцианом сефарозой 4В в условиях, описанных ранее при получении уридиновых сорбентов [13]. Степень иммобилизации фосфоамида составила при этом около 7,5 мкмоль СМР-гексаметилендиамина на 1 мл геля сефарозы. Этот сорбент оказался устойчивым как при хранении, так и при неоднократном его использовании в условиях аффинной хроматографии.

С помощью этого сорбента мы попытались очистить сиалилтрансферазы с рИ 6,1 и 7,8. Большая часть белка во фракции с рИ 7,8 не является искомым ферментом и не сорбируется на колонке (рис. 5). После элюции 1 М NaCl выходит небольшой пик белка, в котором сосредоточена основная часть ферментативной активности. Этот белок практически не включает [³H] лейцин, но включает [¹⁴C] МалАс. Степень очистки этого препарата равна 10 по сравнению с исходной фракцией после изоэлектрофокусирования. Степень общей очистки этой формы сиалилтрансферазы точно рассчитать невозможно, так как ферментативная активность в исходном препарате складывается из активностей нескольких форм сиалилтрансфераз. Анализ фермента с помощью электрофореза в полиакриламидном ге-

ле с додецилсульфатом натрия по методу Лэмпли [15] показал наличие одной полосы белка с M 50 000. Полученный препарат имеет один основной рН-оптимум, равный 7,0, при определении активности по отношению к асиало-Ig M (рис. 6а).

При очистке белков фракции с rI 6,1 наблюдается аналогичная картина распределения белка и сialилтрансферазной активности (рис. 7), однако этот фермент включает в себя [3H]лейцин (см. рис. 3), более лабилен по сравнению с ферментом с rI 7,8 и имеет рН-оптимум 8,0, определенный по отношению к асиало-Ig M (рис. 8). Именно такой рН-оптимум мы наблюдали для солиобилизата суммарной мембранной фракции плазматитомы [6]. Общая сialилтрансферазная активность в элюатах составляет 77% от исходной, нанесенной на колонку, в случае формы с rI 7,8 и 70% в случае формы с rI 6,1.

При изучении экзогенной и эндогенной активности обеих форм фермента после аффинной хроматографии мы убедились, что даже высокоочищенные сialилтрансферазы обладают эндогенной активностью. Эту активность в данном случае трудно отнести за счет примесей эндогенного акцептора по ряду причин: 1) высокая степень очистки форм фермента, 2) четкое совпадение профилей экзогенной и эндогенной активности, 3) увеличение соотношения экзогенной к эндогенной активности после обработки нейрамнидазой, 4) изменение этого соотношения при хранении. Следовательно, эндогенная активность высокоочищенных форм может свидетельствовать о самосиалировании.

Таким образом, в данной работе с помощью препаративного изоэлектрофокусирования и аффинной хроматографии на новом аффинном сорбенте СМР-гексаметилендиамин — сефарозе нам удалось выделить и очистить две формы сialилтрансферазы и показать, что они являются разными белками. Из наших данных следует, что среди множественных форм β -D-галактозид- α 2 \rightarrow 6 — сialилтрансфераз есть истинные изоферменты [16].

Обнаружение изоферментных форм сialилтрансфераз позволяет предположить наличие сложной регуляции терминальных стадий биосинтеза углеводных цепей. Так как в последнее время показано, что терминация углеводных цепей может определять целый ряд важных биологических функций молекул гликопротеинов [17], выяснение такой сложной регуляции приобретает особое значение. Нематричный механизм биосинтеза углеводных цепей предполагает наличие узкоспецифических гликозилтрансфераз, резко различающихся по своим свойствам и по локализации во внутренних мембранах клетки.

Экспериментальная часть

Субстраты. Асиало-Ig M и СМР-[^{14}C]AcNeu получали стандартными способами, описанными в предыдущей работе [6]. В работе использовали СМР и СДР (Reanal, ВНР), дауэкс 50 \times 2 и 1 \times 8 (Serva, ФРГ), сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция), DEAE-целлюлозу (Whatman, Англия), гексаметилендиамин («Союзреактив»).

Для аналитической хроматографии, а также для электрофореза применяли бумагу FN-11 (Filtrak, ГДР); препаративную хроматографию проводили на бумаге Ватман 3 ММ (Англия). В качестве системы растворителей для хроматографии на бумаге использовали этанол—1 М $AcONH_4$ (5:3), для электрофореза — 0,05 М триэтиламмонийбикарбонат (ТЕАВ), рН 7,5. Для обнаружения на хроматограммах веществ, содержащих фосфорильную и амногруппы, применяли реактив Хайнса — Ишервуда [18] и раствор нингидрина в *n*-бутаноле [19]. Первичную аминогруппу (n_{NH_2}), общий ($P_{общ}$) и кислотолабильный ($P_{кл}$) фосфор определяли согласно описанным методикам [19—21], цитидин (n_{Cyt}) — по поглощению при 272 нм.

В работе использовали абсолютные растворители, перегнанные перед употреблением над P_2O_5 (пиридин), CaH_2 (ацетонитрил), Na (бензол) и Mg (этанол). Хлорангидрид мезитиленкарбоновой кислоты получен по методу [22].

УФ-спектры снимали на спектрофотометре «Uniscam SD-8000», а спектры ПМР — на приборе «Varian 100» в D_2O .

Введение метаболической метки. Изолированную опухоль MOPC-104E [6] измельчали на кусочки размером 2–3 мм и инкубировали 2 ч при $37^\circ C$ в среде 199⁺, содержащей по 10 мкКи/мл [3H]лейцина и [^{14}C]ManNAc (Amersham, Англия). После инкубации кусочки опухолей отмывали центрифугированием при 3000 g. Отмывку проводили 2 раза средой 199 и 1 раз 0,1 М трис-HCl-буфером (pH 7,4), содержащим 0,2 М сахарозу и 0,005 М EDTA. После этого опухоль гомогенизировали и выделяли суммарную мембранную фракцию описанным ранее методом [6].

Препаративное изоэлектрофокусирование проводили в колонке 8100 LKB (440 мл), на которую наносили до 35 мг белка солиобилизата. При фокусировании использовали 0,5% раствор амфолинов (LKB, Швеция) с интервалом pH 3,5–10 в градиенте концентрации сахарозы 60–0%. Время фокусирования 40 ч при напряжении 600 В. Во всех фракциях определяли pH и поглощение при 280 нм, а во фракциях с pH 6–9 — салилтрансферазную активность по отношению к эндо- и экзогенным субстратам.

Получение солиобилизатов и определение салилтрансферазной активности проводили по ранее описанному способу [6]. Соотношение триглицерид-белок при солиобилизации было равно 1. В состав инкубационной смеси (общий объем 200 мкл, время инкубации 60 мин) входили следующие компоненты: 0,1 ммоль СМР- [^{14}C]AcNeu (170 000 имп/мин), 40–90 мкл 0,5 М трис-HCl-буфера с pH 7,5, аспало-Ig M [6] в количестве 10 нмоль акцепторных сайтов, определенных по отщеплению AcNeu при кислотном гидролизе (0,1 н. H_2SO_4 , $80^\circ C$, 1 ч) и 50–100 мкл препарата фермента. При определении эндогенной активности в инкубационную смесь не добавляли акцептор. Активность выражали в количестве включившейся меченой AcNeu (имп/мин).

Конденсация хлорангидрида мезитиленкарбоновой кислоты с СДР. Раствор 0,8 ммоль натриевой соли СДР в 10 мл H_2O пропускали через колонку (1,2×15 см) с дауэксом 50×2 (H^+ -форма), колонку промывали водой до нейтральной реакции. Элюат и промывные воды нейтрализовали пиридином и лиофилизировали; остаток растворяли в 1 мл H_2O , добавляли раствор 1,2 ммоль три-*n*-октиламина в 2,5 мл пиридина и кратковременно нагревали (50 – $60^\circ C$) при встряхивании до получения гомогенной смеси. Из полученного раствора отгоняли пиридин и H_2O , остаток высушивали отгонкой со смесью (8×2 мл) абс. бензола и абс. этанола (1:1). Сухой остаток растворяли в 8 мл смеси абс. пиридин — абс. ацетонитрил (3:1), быстро добавляли, избегая влаги, Me_3COCl , встряхивали в течение 5 мин, смесь охлаждали до $4^\circ C$ и выливали в 32 мл H_2O ($0^\circ C$). Полученный раствор экстрагировали эфиром (4×10 мл) и промывали эфирный слой водой (1×10 мл). Объединенный водный слой и промывные воды разбавляли водой до 1 л и наносили на колонку (2,5×50 см) с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- -форма), колонку промывали водой, а затем триэтиламонийбикарбонатом с линейным градиентом от 0 до 0,4 М (по 1 л). Контроль за хроматографией осуществляли спектрофотометрически (254 нм) с помощью проточного денситометра. Фракции, содержащие УФ-поглощающий материал, объединяли, лиофилизировали с водой (4×5 мл). Смешанные ангидриды $Me_3COPSCy_d$ и $Me_3COPPCy_d$, полученные в виде триэтиламониевых солей, оказались однородными при хроматографии и электрофокусе на бумаге. $Me_3COPSCy_d$: выход 0,17 ммоль (21%); R_f 0,9; $M_{СМР}$ 0,41; $n_{Сyt}$: $n_{Pобщ}$ равно

* Институт полиомелита и вирусных энцефалитов АМН СССР.

1,00 : 0,98 : ПМР (δ , м.д.): 8,02 д (6-Н, $J_{6,5}$ 8 Гц), 7,0 с (протоны бензольного ядра), 6,00 д (5-Н, $J_{5,6}$ 8 Гц), 5,77 д (1'-Н, $J_{1',2'}$ 3 Гц); 2,44 с (2(CH₃) в орто-положениях), 2,38 с (СН₃ в пара-положении). MesCOPPCyд: выход 0,12 ммоль (16%); R_f 0,77; $M_{СМР}$ 0,87, $n_{Сyt}$: $n_{Pобщ}$: n_{NH} равно 1,00 : 2,02 : 0,90; ПМР (δ , м.д.): 7,90 д (6-Н, $J_{6,5}$ 8 Гц), 6,9 с (протоны бензольного ядра); 5,9 д (5-Н, $J_{5,6}$ 8 Гц), 5,70 д (1'-Н, $J_{1',2'}$ 3 Гц), 2,30 с (2(CH₃) в орто-положениях); 2,24 с (СН₃ в пара-положении).

*N*¹-(Цитидин-5'-фосфорил)-1,6-диаминогексан (СМР-гексаметилендиамин). К раствору 81 мкмоль MesCOPPCyд в 0,5 мл воды при 20° С в течение 10 мин по каплям прибавляли 1 ммоль свежеперегнанного гексаметилендиамина в 0,5 мл воды. Через 20 ч при 20° С смесь разбавляли водой до 1,1 л, наносили на колонку (2,5×23 см) с дауэксом 1×8 в НСО₃⁻-форме и промывали водой (200 мл). Элюцию вещества с колонки осуществляли линейным градиентом раствора бикарбоната триэтиламмония от 0 до 0,4 М (по 1 л). Основное вещество (60 мкмоль, 74%) оказалось в промывных водах, в то время как в первой фракции обнаружена СМР (8 мкмоль, 10%). Промывные воды после многократной лиофилизации с водой разделяли препаративным электрофорезом на бумаге Ватман 3ММ размером 24×39 см в 0,05 М бикарбонате триэтиламмония, pH 8,0, при градиенте напряжения 17 В/см. Обнаруженные УФ-поглощающие зоны элюировали водой при 4° С, элюат лиофилизовали, растворяли в воде и многократно (4×5 мл) отгоняли с водой. Получено 26 мкмоль (32%) хроматографически однородного СМР-гексаметилендиамина, R_f 0,65; $M_{СМР}$ 0,23; $n_{Сyt}$: $n_{Pобщ}$: n_{NH} равно 1,00 : 1,08 : 1,04; ПМР (δ , м.д.): 8,2 д (6-Н, $J_{6,5}$ 8 Гц), 6,30 д (5-Н, $J_{5,6}$ 8 Гц); 6,20 д (1'-Н, $J_{1',2'}$ 3 Гц); 1,40—1,58 м (СН₂-группы).

Иммобилизация СМР-гексаметилендиамина на сефарозе 4В. К 1 мл свежеективированной бромцианом сефарозы 4В [13] добавляли 26 мкмоль СМР-гексаметилендиамина в 1 мл 0,5 М NaHCO₃, pH 8,2. Через 20 ч механического перемешивания при 4° С смесь центрифугировали в течение 5 мин при 2000 об/мин, гель промывали водой (2×20 мл) для удаления непрореагировавшего фосфоамида и добавляли 1 мл 0,5 М этаноламина. Через 2 ч при 20° С гель промывали следующими растворами (по 10 мл): 0,1 М СН₃COONa с 0,5 М NaCl, 4 М мочевиной с 0,5 М NaCl и, наконец, 1 М NaCl. По данным УФ-поглощения и количеству общего фосфора, обнаруженного в гидролизате (0,6 н. HCl, 20° С, 20 ч при перемешивании) сорбента, степень ковалентного присоединения фосфоамида составила 7,2 и 8,0 мкмоль/мл геля соответственно.

Аффинная хроматография. Перед употреблением колонку (1,5 мл) промывали последовательно 1 М NaCl и 6 М мочевиной с 0,5 М NaCl. Элюаты проверяли на отсутствие поглощения при 272 нм. После этого колонку уравнивали рабочим буфером (0,01 М трис-HCl, pH 7,5, с 0,05% тритоном X-100). Исследуемый препарат фермента перед нанесением на колонку диализовали против того же буфера и наносили в объеме 3—4 мл (содержание белка 100—150 мкг). Закрытую колонку оставляли на встряхивателе на 1 ч при 4° С. Затем колонку промывали исходным буфером и следили за количеством выходящего белка по поглощению при 280 нм или модифицированному методу Лоури [23]. По достижении отсутствия белка в элюате колонку промывали 10 мл 1 М NaCl с 0,05% тритоном X-100, а затем опять буфером до отсутствия белка в элюате (рис. 5.7). После этого колонку промывали 6 М мочевиной с 0,5 М NaCl. Пик белка, выходящий после 1 М NaCl, собирали, разделяли в нем спалилтрансферазную активность и использовали как препарат фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bauer Ch., Reutter W., Koltgen E., Beroc W. Human α -2- and α -3-scrum fucosyltransferase: significance for the efficiency of tumor therapy. Glycoconjugates. Proc. Vth Int. Symp., 1979, Kiel, p. 645—646.
2. Peak A., Katz F., Bauer Ch., Reutter W. Characterization of human serum fucosyltransferases. Glycoconjugates. Proc. of Vth Int. Symp., 1979, Kiel, p. 276—277.

3. Alkadeff J. A., Cimino G. Cystic fibrosis liver sialyltransferases.— Clin. Genet., 1978, v. 13, № 1, p. 207–212.
4. Gerber A. Ch., Kosdrowski J., Wyss S. R., Berger E. G. Charge heterogeneity of soluble human galactosyltransferase isolated from milk, amniotic fluid and malignant ascite.— Eur. J. Biochem., 1979, v. 93, № 1, p. 453–460.
5. Kishi K., Takizawa H., Tsiki S. Isoelectric analysis of B-gene-associated α -galactosyltransferase in human serum and saliva.— Proc. Japan Acad., 1977, v. 53, № 1, p. 172–177.
6. Анфимова М. Л., Габриэлян Н. Д., Хорлин А. Я. Сравнительное изучение сialил-трансферазных систем из селезенки и плазмацитомы МОРС-104Е.— Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1693–1702.
7. Harms E., Reutter W. Half-life of N-acetylneuraminic acid in plasma membranes of rat liver and morris hepatoma 7777.— Cancer Res., 1974, v. 34, № 12, p. 3165–3172.
8. Лапина Е. В., Габриэлян Н. Д., Хорлин А. Я. Разделение солюбилизованных форм сialилтрансфераз из печени лягушки и печени крыс.— Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 11, с. 1720–1727.
9. Sadler J. I., Rearick J. F., Paulson J. C., Hill R. L. Purification to homogeneity of a β -galactoside α 2–3 sialyltransferase and partial purification of α -N-acetylgalactosaminide α 2–6 sialyltransferase from porcine submaxillary glands.— J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 11, p. 4434–4443.
10. Paulson J. C., Beranek W. E., Hill R. L. Purification of a sialyltransferase from bovine colostrum by affinity chromatography on CDP-agarose.— J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 7, p. 2356–2362.
11. Sadler E. J., Rearick J. I., Hill R. L. Purification to homogeneity and enzymatic characterization of an α -N-acetylgalactosaminide α 2–5 sialyltransferase from porcine submaxillary glands.— J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 3, p. 5934–5941.
12. Кусов Ю. Ю., Шибасов В. П., Калинин Н. А., Куприянов В. В., Гоголашвили Л. М., Кочетков Н. К. Ферменты биосинтеза О-специфических полисахаридов сальмонелл. I. Исследование солиubilизации и аффинная хроматография галактозил-трансферазы из *Salmonella anatum*.— Биоорган. химия, 1973, т. 5, № 3, с. 438–447.
13. Шибасов В. П., Кусов Ю. Ю., Калинин Н. А., Кочетков Н. К. Новые сорбенты для аффинной хроматографии — производные фосфамидов уридиновых нуклеотидов.— Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 1, с. 120–125.
14. Носова В. В., Ивановская М. Г., Соколова Н. И., Шабарова З. А. Синтез амидов цитидинсодержащих олигонуклеотидов через смешанные ангидриды с мезитилкарбонной кислотой.— Вестн. МГУ, 1975, т. 1, с. 87–90.
15. Laemli V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.— Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680–687.
16. Nomenclature of Multiple Forms of Enzymes. IUPAC–IUB CBN Recommendations.— J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 16, p. 5939–5941.
17. Jeanloz R. W., Codington J. F. Role of sialic acids on the surface of the cell.— In: Biological role of sialic acids. New York – London: Plenum Press, 1976, p. 201–238.
18. Хайнс И. М., Мацек К. Хроматография на бумаге. М.: Иностранная литература, 1962, с. 437.
19. Satake K., Okuyama T., Ohashi M., Sinoda T. The spectrophotometric determination of amine, amino acid and peptide with 2,4,6-trinitrobenzene 1-sulfonic acid.— J. Biochem., 1960, v. 47, № 5, p. 654–660.
20. Vaskowsky V. E., Kostetsky E. J., Vasendin V. M. A universal reagent for phospholipid analysis.— J. Chromatogr., 1973, v. 114, № 1, p. 129–141.
21. Кочетков Н. К., Будосский Э. П., Шибасов В. П., Лебедева К. С. Аналоги коферментов углеводного обмена. Сообщение 10. Изучение фосфоамидного метода синтеза нуклеотидифосфатсахаров.— Изв. АН СССР. Сер. хим., 1969, № 4, с. 897–903.
22. Барнес Р. Сплетзы органических препаратов, сб. 3. М.: Иностранная литература, 1952, с. 462–464.
23. Kusov Yu. Yu., Kalinchuk N. A. Automated Lowry method for microdetermination of protein in samples and effluents containing nonionic detergents.— Analyt. Biochem., 1978, v. 88, № 2, p. 256–262.

Поступила в редакцию
13.II.1981

β -D-GALACTOSIDE — α 2 — 6 SIALYLTRANSFERASE ISOENZYMES FROM PLASMACYTOMA MOPC-104E

§ ANFIMOVA M. L., GABRIELYAN N. D., KHORLIN A. Ya., KUSOV Yu. Yu.

† M. M. Shemyakin Institute of Biorganic Chemistry and N. D. Zelinsky

‡ Institute of Organic Chemistry, Academy of Science of the USSR, Moscow

Two sialyltransferase forms were isolated from the mouse plasmacytoma MOPC-104E by preparative isoelectric focusing and subsequent affinity chromatography on a new sorbent, N¹-(cytidine-5'-phosphoryl)-1,6-diaminohexane-Sepharose 4B. The data on the incorporation of [³H]leucine/[¹⁴C]mannosamine and determination of the pH-optimum clearly demonstrated that the enzyme forms with pI 6,1 and 7,8 are true isoenzymes.