БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 1 * № 8 * 1975

УДК 577.15.154

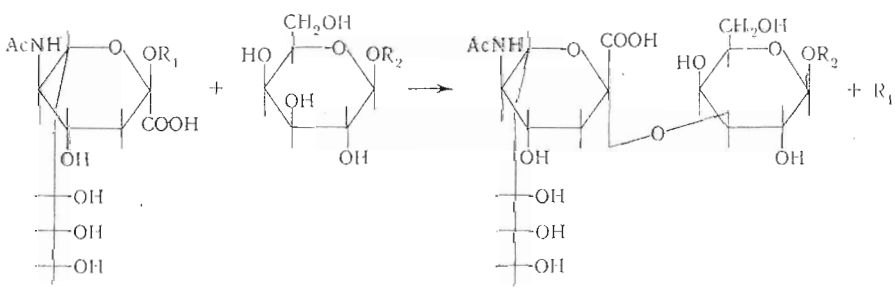
ИЗУЧЕНИЕ АКЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ СИАЛИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ ЛЯГУШКИ *RANA TEMPORARIA*

Лапина Е. Б., Дробинская И. Е., Комалева Р. Л., Габриэлян Н. Д., Хорлин А. Я.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

Исследована акцепторная специфичность мембранносвязанной формы сиалилтрансферазы из печени лягушки *Rana temporaria* по отношению к природным и синтетическим дисахаридам. Показано, что в исследованной сиалилтрансферазной системе дисахариды с последовательностью моносахаридов Gal → GlcNAc; Gal → Glc; GalNAc→ → Gal могут служить акцепторами остатка сиаловой кислоты. В работе использован меченный ^{14}C субстрат-донор цитидинмонофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (CMP-NAcNeu), синтезированный с помощью CMP-NAcNeu-синтетазы из печени лягушки *Rana temporaria*. Сиалилтрансфераза и CMP-NAcNeu-синтетаза в этом источнике обнаружены впервые.

В настоящее время известно, что сиаловые кислоты, занимающие концевое положение в олигосахаридных цепях смешанных биополимеров (гликопротеины, гликолипиды), в ряде случаев определяют их биологическую функцию [1—3]. Включение остатка сиаловой кислоты в олигосахаридные цепи осуществляется специфическими сиалилтрансферазами по принципу, общему для всех гликозилтрансфераз [4—6]. Субстратом-донором остатка сиаловой кислоты является CMP-NAcNeu, субстратом-акцептором — свободный олигосахарид или олигосахаридная цепь смешанного биополимера, например:



где R_1 — остаток CMP, R_2 — остаток олигосахарида или олигосахаридной цепи.

Важной проблемой, связанной с исследованием биосинтеза олигосахаридных цепей смешанных биополимеров, является выяснение механизма узнавания последовательности моносахаридов в олигосахаридных цепях,

который в конечном итоге и определяет структуру олигосахаридных детерминант смешанных биополимеров. Изучение акцепторной специфичности соответствующих гликозилтрансфераз с помощью природных и синтетических олигосахаридов известной структуры является необходимым этапом в решении этой проблемы.

В настоящей работе исследовали акцепторную специфичность сиалилтрансферазы из печени лягушки *Rana temporaria*. При этом были разработаны препаративные методы получения меченой и немеченой CMP-NAcNeu — субстрата-донора для сиалилтрансферазной системы; изучены разные источники для выделения высокоактивной сиалилтрансферазы; подобраны высокочувствительные методы идентификации и количественного определения сиалоолигосахаридов; изучен ряд природных и синтетических олигосахаридов заданной структуры в качестве субстратов-акцепторов в сиалилтрансферазной системе.

Биосинтез [^{14}C] CMP-NAcNeu был осуществлен с помощью CMP-NAcNeu-синтетазы [7]. Этот фермент катализирует образование CMP-NAcNeu из цитидинмонофосфата и N-ацетилнейраминовой кислоты по следующей схеме:

$$\text{CTP} + \text{NAcNeu} \xrightarrow[\text{pH } 9{,}0]{Mg^{2+}} \text{CMP-NAcNeu} + PP_i$$

Известно, что CMP-NAcNeu-синтетаза содержится в подчелюстных железах свиньи и быка [7, 8], в щитовидной железе и в ткани мозга телят [9, 10], в печени крысы [11] и в ткани мозга овец [12]. При проверке активности CMP-NAcNeu-синтетазы в некоторых из перечисленных выше источников мы обнаружили резкие индивидуальные колебания величин активности, особенно в тех случаях, когда источником фермента служили железы внутренней секреции. Так, выход CMP-NAcNeu, синтезированной с помощью CMP-NAcNeu-синтетазы из подчелюстных желез свиней или щитовидных желез телят, варьировал от 5 до 60%. Далее оказалось, что удельная активность препарата фермента из мозга телят чрезвычайно зависит от их возраста; это также затрудняло получение стабильно высоких количеств продукта реакции. В связи с этим нами был предпринят поиск нового, более удобного источника фермента. Высокая удельная активность CMP-NAcNeu-синтетазы была обнаружена в печени лягушки *Rana temporaria*. В качестве препарата фермента использовали надосадочную фракцию, получаемую при центрифугировании гомогената печени лягушки при 50 000 *g*. Фермент, содержащийся в надосадочной жидкости, при хранении на холоду (—5°) практически не теряет активности в течение длительного времени. Было установлено, что свойства CMP-NAcNeu-синтетазы из печени лягушки (pH-оптимум — 9,0, оптимум температуры — 30—37°, необходимость для протекания синтетазной реакции ионов Mg^{2+}) характерны и для CMP-NAcNeu-синтетаз из других источников [7—12]. Как видно из рис. 1, максимальный выход продукта ферментативной реакции происходит через 60 мин инкубации, когда содержание [^{14}C] CMP-NAcNeu достигает 30—40% от количества исходной [^{14}C] NAcNeu. В препарате фермента из печени лягушки была обнаружена также альдолаза NAcNeu. Однако присутствие альдолазы не оказывало заметного влияния на выход CMP-NAcNeu, так как в подобранных условиях инкубации она расщепляла не более 5—10% свободной NAcNeu. Выделение и очистку [^{14}C] CMP-NAcNeu из инкубационной смеси проводили с помощью хроматографии на дауэксе 1 × 8 с последующей препаративной хроматографией на бумаге; использование только ионообменной хроматографии не позволяет полностью отделить от [^{14}C] CMP-NAcNeu примесь CMP. Полученный таким образом препарат CMP-NAcNeu практически не содержал примеси свободной NAcNeu и CMP и имел удельную радиоактивность 2,0—3,0·10^6 имп/мин/мкмоль. Препарат [^{14}C] CMP-NAcNeu сохранялся длительное время в виде аммонийной соли при 4° без заметного разложения.

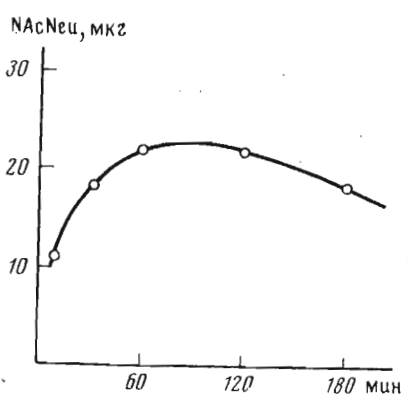


Рис. 1

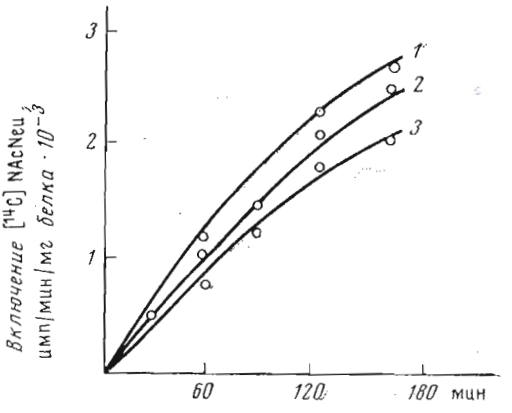


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика CMP-NAcNeu-синтетазной реакции

Рис. 2. Кинетика сиалилтрансферазной реакции. *1* — лактоза, *2* — N-ацетиллактозамин, *3* — лактоза + N-ацетиллактозамин. В 60 мкл инкубационной смеси содержалось 4,0 мкмоль лактозы или N-ацетиллактозамина, 0,06 мкмоль [^{14}C]CMP-NAcNeu ($2{,}1 \cdot 10^4$ имп/мин), 1—1,5 мкг белка ферментного препарата, 3,5 мкмоль К-фосфатного буфера (pH 7,0)

Для определения сиалилтрансферазной активности в основном использовали метод высоковольтного электрофореза на бумаге [13]. Метод заключается в регистрации включения радиоактивной метки в продукт реакции после электрофоретического разделения инкубационной смеси. Кроме того, для идентификации сиалоолигосахаридов использовали ТСХ на силикагеле. Было найдено, что сиалотрисахариды хорошо разделяются в системе *н*-пропанол — метанол — вода (5 : 3 : 1) (табл. 1). Так как ТСХ применяли для идентификации микроколичеств сиалотрисахаридов, необходимо было установить пороговую чувствительность этого метода. С этой целью проводили денситометрическое определение сиалоолигосахаридов *in situ* после проявления резорциновым реактивом [14]. Количественную оценку сиалоолигосахаридов проводили относительно внутреннего стандарта — ксилозы. Статистическая обработка полученных результатов показала, что минимальное количество сиалоолигосахарида, определяемое с 10%-ной ошибкой измерения, составляет 1—2 мкг.

В связи с тем, что в печени лягушки *Rana temporaria* была обнаружена высокоактивная CMP-NAcNeu-синтетаза, этот же источник использовали для изучения другого фермента обмена сиаловых кислот — сиалилтрансферазы. Большинство описанных в настоящее время сиалилтрансфераз является мембранносвязанными ферментами [13—19]. Нами было показано, что суммарная фракция митохондрий и микросом печени лягушек, полученная методом ультрацентрифугирования при 120 000 *g*, обладала в стандартных условиях [13] относительно высокой сиалилтрансферазной активностью при использовании в качестве субстратов-акцепторов лактозы и N-ацетиллактозамина. Оказалось, что в данной сиалилтрансферазной системе лактоза и N-ацетиллактозамин имеют близкие величины K_m и V (K_m = = 6,45 и $5{,}55 \cdot 10^{-2}$ М, V = 14 и 12,7 нмоль сиалотрисахарида в 1 мин соответственно). Каждый из этих дисахаридов давал лишь один продукт реакции, которым, по данным ТСХ на силикагеле с использованием свидетеля, в случае лактозы, по-видимому, является α - N-ацетилнейраминозил-(2 → 3)-лактоза. Изучение кинетики реакции в присутствии N-ацетиллактозамина и лактозы показало, что оба субстрата взаимодействуют с одним и тем же ферментом. Кривая зависимости образования продукта реакции от времени сохраняет линейный характер в течение 90 мин инкубации (рис. 2).

Таблица 1

Относительная подвижность компонентов модельной смеси

Компонент	R_f	R_{Xyl}
NAcNeu	0,22±0,02	0,25±0,02
N-ацетилнейраминозиллактоза		
α 2 → 3	0,52±0,06	0,64±0,01
α 2 → 6	0,42±0,02	0,48±0,02
Лактоза	0,76±0,03	0,88±0,03
Ксилоза	0,82±0,02	—

Таблица 2

Акцепторная специфичность сиалилтрансферазы из печени лягушки *Rana temporaria*

Акцептор	Концентрация мкмоль/мл	Включение [^{14}C]NAcNeu	
		имп/мин/мг белка *	%
Galβ 1 → 4 GlcNAc	36	1500	100
Galβ 1 → 3 GlcNAc	40	1300	85
Galβ 1 → 6 GlcNAc	40	350	25
Galβ 1 → 4 Glc	36	1450	100
Galβ 1 → 3 Glc	40	800	55
Glcβ 1 → 4 Glc	40	<100	<10
GalNAcβ 1 → 6 Glc	40	<100	<10
GalNAcβ 1 → 3 Glc	20	<100	<10
GalNAcβ 1 → 6 Gal	20	500	30

* Разброс величин включения радиоактивности не превышал 10—15%.
** Все аналоги исследовали параллельно с природными дисахаридами в одинаковых условиях.

Для исследования акцепторной специфичности сиалилтрансферазной системы использовали природные и синтетические дисахариды заданной структуры (табл. 2), синтез которых был осуществлен ранее [20—22]. Их можно условно разделить на три группы. I. N-Ацетиллактозамин и его изомеры, отличающиеся положением гликозидной связи: Gal β1 → 3 GlcNAc, Gal β 1 → 6 GlcNAc. II. Лактоза и ее изомер Gal β 1 → 3 Glc. III. Дисахариды с различными концевыми моносахаридами Glc β 1 → 4 Glc; GalNAc β1 → 6Glc; GalNAc β1 → 3 Glc; GalNAc β1 → 6Gal. Как видно из представленных в табл. 2 данных, изменение положения гликозидной связи в молекуле олигосахарида-акцептора резко снижает скорость реакции в следующей последовательности: β1 → 4 > β 1 → 3 > β | → 6, что полностью согласуется с данными, полученными при исследовании мембранносвязанных сиалилтрансфераз из других источников [18]. Мы не обнаружили столь характерной для растворимой формы сиалилтрансферазы [13, 15] строгой специфичности ко второму с невосстанавливающего конца моносахариду. Лактоза и N-ацетиллактозамин были в равной степени активными акцепторами остатка сиаловой кислоты. Однако сиалилтрансфераза из печени лягушки оказалась строго специфичной по отношению к концевому остатку β-*D*-галактопиранозы (табл. 2). Исключение составляет лишь олигосахарид из группы III GalNAc β1 → 6Gal, поэтому в данном случае чрезвычайно важно установить специальным исследованием место присоединения остатка N-ацетилнейраминовой кислоты в образовавшемся сиалотрисахариде.

Таким образом, на основании полученных результатов минимальные «требования» сиалилтрансферазной системы из печени лягушки к последовательности концевых остатков олигосахаридных цепей можно оценить следующим образом: Gal → GlcNAc, Gal → Glc; GalNAc → Gal. Положение гликозидной связи между остатками моносахаридов, по-видимому, не играет решающей роли, хотя и оказывает существенное влияние на скорость реакции.

Экспериментальная часть

В работе использовали в качестве субстратов ряд олигосахаридов, синтезированных ранее [20—22]: Galβ 1 → 4GlcNAc (т. пл. 170—171°, $[\alpha]_D$ + +29°); Galβ 1→ 3 GlcNAc (т. пл. 193—194, $[\alpha]_D$ + 14,5°); Gal β 1 → 6 GlcNAc (т. пл. 148—149, $[\alpha]_D$ + 27°); GalNAc β 1 → 6 Gal (т. пл. 204—206°, $[\alpha]_D$ +44°); GalNAc β 1 → 6 Glc (т. пл. 186—187°, $[\alpha]_D$ + 18°); GalNAc β 1 → 3 Glc (т. пл. 208—210°, $[\alpha]_D$ + 50°); Gal β 1 → 3 Glc (т. пл. 214 — 218°, $[\alpha]_D$ + 38°). Использовали также NAcNeu («Koch-Light», Англия), радиоактивную NAcNeu 236 мкКи/мкмоль («Amersham», Англия), CMP («Reanal», Венгрия), N-ацетилнейраминозиллактозу («Sigma», США), дауэкс 1 × 8 («Serva», ФРГ), DEAE-целлюлозу («Whatman», Англия), силикагель G («Merck», ФРГ).

NAcNeu определяли по методу Уоррена [23], белок — по методу Лоури [24]. Препаративную БХ проводили на бумаге ватман 3 ММ в системе этанол — 1М ацетат аммония, 7 : 3 (pH 7,6).

[^{14}C] *CMP-NAcNeu* получали из CTP и NAcNeu с помощью CMP-NAcNeu-синтетазы из печени лягушки. Лягушек забивали, печень быстро удаляли и помещали в ледяной раствор 0,1 М трис-HCl буфера (pH 7,6), содержащий 10^{-4} М меркаптоэтанол из расчета 1 : 1 (вес/объем) и гомогенизировали. Гомогенат центрифугировали в течение 1 ч при 27 000 об/мин в центрифуге VAC-60 и надосадочную жидкость использовали в качестве препарата фермента. CMP-NAcNeu синтетазную активность определяли по ранее описанному методу [12]. В контрольные пробы CTP не добавляли. Инкубационная смесь для препаративного получения [^{14}C] CMP-NAcNeu содержала, мкмоль: NAcNeu — 25 (5 мкКи), CTP — 250, $MgCl_2$ — 400, трис-HCl буфер — 10 (pH 9,0), а также препарат фермента — 20 мл. Инкубацию проводили в течение 60 мин при 37°. После окончания инкубации смесь после добавления равного объема ацетона центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость разбавляли в 5—6 раз водой и наносили на колонку с 70 мл дауэкса 1×8 в HCO_3^--форме. Колонку промывали водой до исчезновения в элюате поглощения при 280 нм. Элюцию проводили, используя градиент триэтиламмонийбикарбонатного буфера, pH 7,6 (вода — 1,0 М буфер). Контроль за элюцией осуществляли спектрофотометрически при 272 нм; радиоактивность проб определяли в диоксановом сцинтилляторе в счетчике SL-40 (Франция) и по содержанию свободной и связанной NAcNeu. Фракции, соответствующие максимуму радиоактивности, оптической плотности и связанной NAcNeu объединяли, упаривали и подвергали препаративной БХ со свидетелями (CMP-NAcNeu и CMP). Полученный препарат [^{14}C] CMP-NANA содержал не более 5% CMP и имел удельную радиоактивность 0,3—0,5 мкКи/мкмоль.

CMP-NAcNeu (*немеченую*) получали из ацетонированного порошка биомассы *E. coli* K-235 по модифицированному нами методу Роземана [25]. Культуру *E. coli* K-235 выращивали в ферментере на синтетической среде следующего состава (на 1 л среды): 5 г пептона, 30 мл гидролизата Хоттингера, $NaHPO_4$ — 6 г, KH_2PO_4 — 1 г, глюкоза — 15 г, дрожжевой экстракт — 10 мл. Время выращивания — 3 ч при 37°. Клетки собирали центрифугированием и подвергали замораживанию при —70°. Оттаявшую массу обрабатывали ацетоном, и порошок сушили на воздухе. Выход сухого ацетонового порошка из 100 л среды — 200—350 г. 50 г порошка экстраги-

ровали 750 мл 80%-ного этанола в течение 16 ч. Экстракт упаривали до минимального объема и наносили на бумагу ватман 3 ММ, и CMP-NAcNeu выделяли препаративной БХ и рехроматографировали в тех же условиях. После этого элюат наносили на колонку с 25 мл DEAE-целлюлозы и хроматографировали с помощью градиента триэтиламмонийбикарбонатного буфера pH 7,6 (0,005—0,25 М, объем градиента 1200 мл). При этом элюировался практически лишь один пик, поглощающий при 272 нм. Элюат упаривали, и чистоту препарата определяли по соотношению CMP : NAcNeu и по спектру поглощения в УФ-свете. Чистоту препарата также оценивали с помощью ТСХ на целлюлозе в системе этанол — 1,0 М ацетат аммония, 7 : 3 (pH 7,6) в присутствии свидетеля CMP-NAcNeu. Полученный препарат CMP-NAcNeu содержал не более 10% CMP.

Определение сиалилтрансферазной активности. Для получения сиалилтрансферазы из печени лягушек — самцов *Rana temporaria* животных забивали, печень быстро удаляли, помещали в ледяной раствор 0,1 М К-фосфатного буфера (pH 6,9), содержащего 10^{-4} М меркаптоэтанол и гомогенизировали из расчета 1 г ткани на 1 мл буфера. Гомогенат центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин. Полученную надосадочную жидкость вновь центрифугировали при 40 000 об/мин в течение 20 мин в центрифуге VAC-60. Осадок (митохондрии + микросомы) промывали тем же буфером и суспензию центрифугировали в тех же условиях. Затем суммарную фракцию митохондрий и микросом суспендировали в небольшом объеме 0,1 М К-фосфатного буфера, pH 6,9 (2 мл на 7 г ткани печени) и использовали в качестве препарата фермента. Инкубационная смесь для определения сиалилтрансферазной активности содержала (в конечном объеме 0,06 мл): CMP-NAcNeu — 0,06 мкмоль ($2{,}0 \cdot 10^4$ имп/мин), лактозу, N-ацетиллактозамин или аналоги этих соединений — 1,5—2,0 мкмоль, ферментный препарат — 500—1000 мкг (по белку), К-фосфатный буфер (pH 6,9) — 3,5 мкмоль.

Для определения графическим методом Лайнуивера — Берка величин K_m и V сиалилтрансферазы относительно субстратов-акцепторов лактозу вносили в конечных концентрациях 7,0—70 мкмоль/мл, N-ацетиллактозамин в конечных концентрациях 6,5—65 мкмоль/мл. Время инкубации — 90 мин при 37°. Контрольные пробы не содержали акцептора. Реакцию останавливали замораживанием проб при —7°. После оттаивания 2/3 объема инкубационной смеси наносили на ватман 3 ММ и подвергали электрофоретическому разделению в следующих условиях: градиент напряжения 75—80 В/см, температура — 5°, время — 60 мин, 1%-ный тетраборатный буфер (pH 9,0). В таких условиях лактоза, N-ацетилнейраминозиллактоза и CMP-NAcNeu имели электрофоретическую подвижность соответственно 75, 145 и 270 мм. После высушивания электрофореграмму разрезали на квадраты 30 × 30 мм, радиоактивность которых просчитывали в толуольном сцинтилляторе в счетчике SL-40. О местонахождении продукта реакции судили также по положению пятна стандарта, которым обычно служила N ацетилнейраминозиллактоза. Активность сиалилтрансферазы оценивали по включению [^{14}C] NAcNeu и выражали в имп/мин на 1 мг белка или в процентах, при этом за 100% включения принимали включение [^{14}C] NAcNeu в N-ацетиллактозамин.

ТСХ сиалоолигосахаридов на силикагеле. Суспензию силикагеля готовили, смешивая 1 весовую часть силикагеля с 2 весовыми частями воды. Слой толщиной 0,1 мм наносили автоматическим аппликатором на стеклянные пластинки размером 10 × 10 см. После нанесения слоя пластинки сушили на воздухе и хранили в герметически закрытом шкафу. Пробы наносили на пластинку градуированным капилляром (5 мкл). Хроматографию проводили в системе *н*-пропанол — метанол — вода (5 : 3 : 1). Хроматограммы проявляли дважды; затем пластинки сушили в токе воздуха для удаления остатков растворителей. Для обнаружения пятен использовали резорциновый реактив Свеннерхольма [14].

После опрыскивания пластинку накрывали равным по размерам стеклом и выдерживали при 100—110° 3—5 мин. Денситометрические определения проводили в денситометре «Vitatron» (Голландия) с круглой щелью. Для определения чувствительности метода и ошибки измерения серии опыта повторяли не менее 5—7 раз. Данные обрабатывали статистически. Для определения относительной подвижности олигосахаридов и чувствительности метода применяли модельные смеси объемом 5 мкл следующего состава, мкг: NAcNeu — 10, N-ацетилнейраминозиллактоза — от 2,0 до 20, лактоза — 50, ксилоза — 10.

Авторы приносят глубокую благодарность профессору Р. Шауеру (ФРГ) за предоставленные образцы CMP-NAcNeu и [^{14}C] CMP-NAcNeu и полезную дискуссию. Авторы благодарят также профессора Гобеля (США) за любезно предоставленный штамм *E. coli* К-235.

ЛИТЕРАТУРА

1. Уоррен Л. (1969) Гликопротеины (под редакцией А. Готтшалка), т. 2, стр. 273—293, «Мир», М.
2. Schauer Q. (1973) Angew. Chem. Internat., **12**, 127—138.
3. Roseman S. (1970) Chem. Phys. Lipids, 5, 271—297.
4. Nikaido H., Hassid W. Z. (1971) in Advances Carbohydr. Chem. and Biochem. (Tipson R. S., ed.), 26, 351—483.
5. Kochetkov N. K., Schibaev V. N. (1973) Advances Carbohyd. Chem. and Biochem. (Tipson R. S., Horton D., eds.), 28, 307—399.
6. Габриэлян Н. Д. (1972) в сб. Успехи биологической химии (под ред. Степаненко Б. Н.), **13**, стр. 116—141, «Наука», М.
7. Kean E. L., Roseman S. (1966) J. Biol. Chem., 241, 5643—5650.
8. Schauer R., Wamber M., Ferreire do Amaral C. (1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 6, 883—886.
9. Spiro M. R., Spiro R. G. (1968) J. Biol. Chem., 243, 6520—6528.
10. Eijnolen D. H. van den, Dijk W. van (1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 1817—1820.
11. Hultsch E., Raitter W., Derkai K. (1972) Biochim. et biophys. acta, 273, 133—140.
12. Shoyab M., Pattabiraman T. N., Bacchawat B. K. (1964) J. Neurochem., **11**, 639—646.
13. Roseman S. (1966) in Methods in Enzymology (Neufeld E. F., Ginsburg V., eds.), **8**, 354—372.
14. Svennerholm L. (1957). Biochim. et biophys. acta, 24, 604—611.
15. Bartolomeo B. A., Jourdian G. W., Roseman S. (1973) J. Biol. Chem., 248, 5751—5762.
16. Hudjin R. L., Scharhter H. (1970) Can. J. Biochem., 49, 822—837.
17. Schachter H., Jabbal I., Hudjin R. L., Pinteric L., McGuire E. J., Roseman S. (1970) J. Biol. Chem., 245, 1090—1100.
18. Carlson D. M., Jourdian G. W., Roseman S. (1973) J. Biol. Chem., 248, 5742—5750.
19. Carlson D. M., McGuire E. J., Jourdian G. W., Roseman S. (1973) J. Biol. Chem., 248, 5763—5773.
20. Зурабян С. Э., Лопанцева Е. Н., Хорлин А. Я. (1973) Докл. АН СССР, **210**, 1216—1220.
21. Jacquinet J. C., Zurabyan S. E., Khorlin A. Ya. (1974) Carbohyd. Res., 32, 137—143.
22. Khorlin A. Ya., Nesmeyanov V. A., Zurabyan S. E. (1974) Carbohyd. Res., 33, C_1 — C_3.
23. Warren L. (1959) J. Biol. Chem., 234, 1971—1975.
24. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Tarr A. L. and Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.
25. Comb D. G., Watson D. R., Roseman S. (1966) J. Biol. Chem., 241, 5637—5642.

Поступила в редакцию
30.XII.1974

ACCEPTOR SPECIFICITY OF SIALYLTRANSFERASE FROM FROG LIVER

LAPINA E. B., DROBINSKAJA I. E., KOMALEVA R. L., GABRIELYAN N. D., KHORLIN A. Ya.

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

The acceptor specificity of membrane bound sialyltransferase from frog *Rana temporaria* liver was investigated. Disaccharides with the sequences of monosaccharides Gal → Glc, Gal → Glc, and GalNAc → Glc were shown to be the acceptors of sialic acid. ^{14}C-Labeled substrate, CMP-NAcNeu, used in this work was prepared biosynthetically with the aid of CMP-NAcNeu-synthetase from frog liver. It is the first isolation of this enzyme and sialyltransferase from the above source.