



УДК 577.154.5

СПОСОБНОСТЬ МОРАПРЕНИЛФОСФАТА УЧАСТВОВАТЬ  
В РЕАКЦИЯХ БИОСИНТЕЗА О-АНТИГЕНА  
*SALMONELLA ANATUM*

Шибяев В. Н., Кусов Ю. Ю., Дружинина Т. Н.,  
Калиничук Н. А., Кочетков Н. Б., Гилессо В. А.,  
Рожднова С. Ш.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва;

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии  
Министерства здравоохранения СССР, Москва

Фосфат морапренола (полипренола из листьев шелковицы) способен участвовать в реакциях биосинтеза О-специфического полисахарида *Salmonella anatum* в качестве липида-переносчика углеводов вместо фосфата бактериального полипренола. Зависимость скорости образования полипренилпирофосфатгалактозы от концентрации полипренилфосфата описывается уравнением второго порядка. Эффективность производного морапренола как субстрата этой реакции близка к эффективности фосфатов бактериальных полипренолов из *S. anatum* и *Escherichia coli*. Обнаружено ингибирование реакции под действием примесей, присутствующих в препарате морапренилфосфата до очистки его ионообменной хроматографией. Образующиеся из фосфата морапренола полипренилфосфосахара способны выступать в качестве субстратов на всех стадиях биосинтеза О-специфического полисахарида, хотя и с меньшей эффективностью, чем аналогичные производные бактериального полипренола — природные субстраты процесса.

Биосинтез О-специфической цепи липополисахарида *Salmonella anatum* включает в себя последовательный перенос остатков *D*-галактозилфосфата, *L*-рамнозы и *D*-маннозы соответствующих нуклеотидсахаров (UDPGal, TDP Rha и GDPMan) к бактериальному полипренилфосфату (Ia) с образованием полипренолфосфосахаров (IIa), (IIIa) и (IVa) (см. табл. 1) и последующей полимеризацией, приводящей к соединению (Va). Все эти реакции катализируются ферментами, присутствующими в препарате бактериальных мембран [1]. Трудная доступность бактериального полипренилфосфата делает в настоящее время наиболее реальным подходом к исследованию этих ферментов использование аналогов природного субстрата, в которых остаток бактериального полипренола заменен на остатки более доступных растительных полипренолов.

Для целого ряда биосинтетических систем в бактериях продемонстрирована возможность использования вместо бактериального полипренилфосфата (Ia) фосфата фикапренола (полипренола из листьев фикуса, см. литературу в [2]). Однако данные по специфичности к природе остатка полипренола ферментов биосинтеза О-специфической цепи липополисахарида салмонелл весьма скудны и ограничиваются упоминанием о способности синтетического аналога (IIa), содержащего остаток фикапренола,

Реакции биосинтеза O-специфической цепи полисахарида из *Salmonella anatum*

| № п. п. | Реакции   | Полное название фермента   | Тривиальное название               |
|---------|---|--|------------------------------------|
| 1       | $p\text{-Pre} + D\text{-Gal} \frac{1}{\alpha} ppU \rightleftharpoons D\text{-Gal} \frac{1}{\alpha} pp\text{-Pre} + pU$ <p style="text-align: center;">(IIa, б) (UDPGal) (IIa, б) (UMP)</p>  | Уридиндифосфатгалактоза: полипре-нолфосфатгалактопиранозилфосфаттрансфераза                                  | Галактозилфосфат-трансфераза       |
| 2       | $(IIa, б) + L\text{-Rha} \frac{1}{\beta} ppdT \longrightarrow L\text{-Rha} \frac{1}{\alpha} D\text{-Gal} \frac{1}{\alpha} pp\text{-Pre} + ppdT$ <p style="text-align: center;">(dTDP/Rha) (IIIa, б) (dTDP)</p>  | Глициндифосфатраманноза: полипре-нолпирофосфогалактопираноза-3- $\alpha$ -L-рамнопиранозилтрансфераза        | Рамнозилтрансфераза                |
| 3       | $(IIIa, б) + D\text{-Man} \frac{1}{\alpha} ppC \longrightarrow D\text{-Man} \frac{1}{\beta} L\text{-Rha} \frac{1}{\alpha} D\text{-Gal} \frac{1}{\alpha} pp\text{-Pre} + ppC$ <p style="text-align: center;">(GDPMan) (IVa, б) (GDP)</p>   | Гуанозиндифосфатманноза: полипре-нозил- $\alpha$ -D-галактопираноза)-4- $\beta$ -D-маннопиранозилтрансфераза | Маннозилтрансфераза                |
| 4       | $(nIVa, б) \longrightarrow \frac{6}{\alpha} D\text{-Man} \frac{1}{\beta} L\text{-Rha} \frac{1}{\alpha} D\text{-Gal} \frac{1}{\alpha} \frac{6}{n-1} D\text{-Man} \frac{1}{\beta} L\text{-Rha} \frac{1}{\alpha} D\text{-Gal} \frac{1}{\alpha} pp\text{-Pre} + (n-4) pp\text{-Pre}$ <p style="text-align: center;">(Va, б)</p> |  | Полимераза<br>O-специфической цепи |

Примечание. В ряду «а» Pre означает остаток бактериального полипренола, а в ряду «б» — остаток мориценола. Первый из них содержит два анугеренных изопропеновых звена с  $\psi$ -е-конфигурацией, второй — три таких звена при сходной длине цепи (главный компонент — ундекапренол).

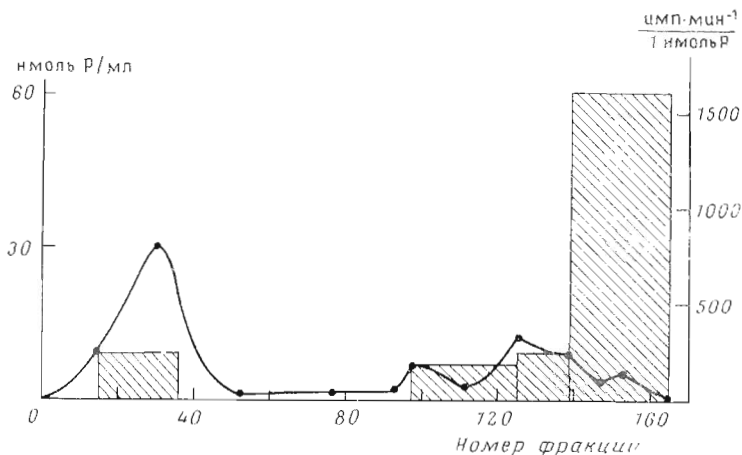


Рис. 1. Очистка фосфата бактериального полипренола на DEAE-целлюлозе. Столбики показывают стимуляцию галактозилфосфаттрансферазной реакции

вступать в реакции, катализируемые рамнозил-, маннозилтрансферазами и полимеразой (неопубликованная работа А. Райта, С. Канегасаки и Х. Д. Уоррена, цит. по [3]).

Цель настоящей работы — исследование способности морапренилфосфата (Iб) заменять фосфат бактериального полипренола в реакциях, показанных в табл. 1. Получение морапренилфосфата (Iб) фосфорилированием полипренолов листьев шелковицы было описано в предыдущем сообщении [2].

Необходимый для сравнения препарат (Iа) был извлечен из клеток как *S. anatum*, так и *E. coli* по методу, предложенному Осборн с сотр. [4]. Модификация условий ионообменной хроматографии (рис. 1) позволила получить препарат, однородный, по данным ТСХ, и по хроматографической подвижности идентичный синтетическому образцу морапренилфосфата.

В качестве источника ферментов, катализирующих реакции 1—3, служил препарат растворимых гликозилтрансфераз, выделенный обработкой бактериальных мембран из *S. anatum* неионным детергентом по методу, описанному Осборн с сотр. [4] для получения гликозилтрансфераз из *S. typhimurium*. Поскольку полимеразы О-специфической цепи (фермент, катализирующий реакцию 4) не переходит при такой обработке в раствор, для изучения этой реакции был применен препарат бактериальных мембран.

Наиболее подробному исследованию была подвергнута реакция, катализируемая галактозилфосфаттрансферазой (реакция 1 в табл. 1). О протекании этой реакции судили по включению радиоактивности в липидную фракцию при инкубации меченной по остатку галактозы UDPGal и липидного акцептора (Iа) или (Iб) с препаратом растворимых трансфераз. Методика проведения этих опытов была близка к описанной в литературе [4], но детергент Альфоник 1012-6 был заменен на Твин-85.

Как видно из рис. 2, включение радиоактивности линейно зависит от времени вплоть до 20 мин инкубации и, следовательно, в этих условиях возможно определение начальной скорости реакции. В то же время в контрольной пробе, где реакция протекает за счет присутствия в препарате трансфераз небольшого количества эндогенного фосфата (Iа), образование полипренилпирофосфатгалактозы (IIа) полностью заканчивается за 5 мин, что соответствует литературным данным [4, 5].

Зависимость скорости реакции синтеза пирофосфата (IIа) от концентрации фосфата полипренола из *S. anatum* плохо описывается уравнением

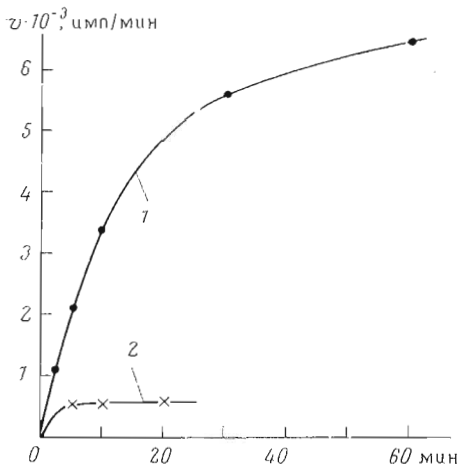


Рис. 2

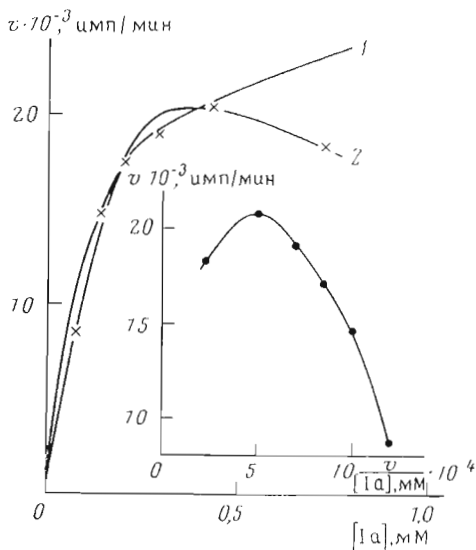


Рис. 3

Рис. 2. Кинетика образования полипренилпирофосфатгалактозы в присутствии 5,6 моль фосфата бактериального полипренола (1) и без него (2)

Рис. 3. Зависимость скорости образования полипренилпирофосфатгалактозы от концентрации фосфата бактериального полипренола (Ia). Приведены экспериментальные точки. Кривая 1 вычислена по уравнению Михаэлиса с параметрами  $K_m = 0,1$  мМ,  $v = 26,4 \cdot 10^3$  имп/мин. Кривая 2 вычислена по уравнению (i) с параметрами  $\alpha_1 = 12,8 \cdot 10^4$  имп/мин,  $\alpha_2 = 0$ ,  $\beta_1 = 1,22$ ,  $\beta_2 = 6,10$ . На врезке — зависимость  $v$  от  $v/s$

Михаэлиса (рис. 3). Это особенно наглядно показывает график в координатах Иди, представленный на врезке. Нелинейность такого рода графиков было предложено считать характерным тестом на несоблюдение уравнения Михаэлиса — Ментен [6]. Лучше описывает полученные экспериментальные данные уравнение второго порядка типа (i) [6, 7]:

$$v = \frac{\alpha_1 s + \alpha_2 s^2}{1 + \beta_1 s + \beta_2 s^2} \quad (i)$$

где  $v$  — скорость ферментативной реакции,  $s$  — концентрация субстрата,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  — постоянные коэффициенты.

Аналогичные опыты были проведены с использованием фосфата (Ia), выделенного из *E. coli*; при этом были получены весьма близкие результаты, свидетельствующие о том, что фосфаты полипренолов из данных видов бактерий взаимозаменяемы как субстраты исследуемой реакции; применение *E. coli* в качестве источника фосфата (Ia) значительно удобнее из-за отсутствия патогенных свойств у этого микроорганизма.

Реакция, катализируемая галактозилфосфаттрансферазой, протекает и при использовании вместо соединения (Ia) фосфата растительного полипренола (Iб). При этом наблюдается аналогичная зависимость скорости реакции от концентрации субстрата (рис. 4). При малых концентрациях морапренилфосфата скорость реакций несколько меньше, чем в случае производного бактериального полипренола (Ia).

Как известно, зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата может описываться уравнением (i) в целом ряде случаев. Это возможно, например, если в системе присутствуют два различных фермента, катализирующих одну и ту же реакцию [7], препарат субстрата содержит примесь ингибитора, действующего по неконкурентному или бесконкурентному типу [8], ферментативная реакция протекает по меха-

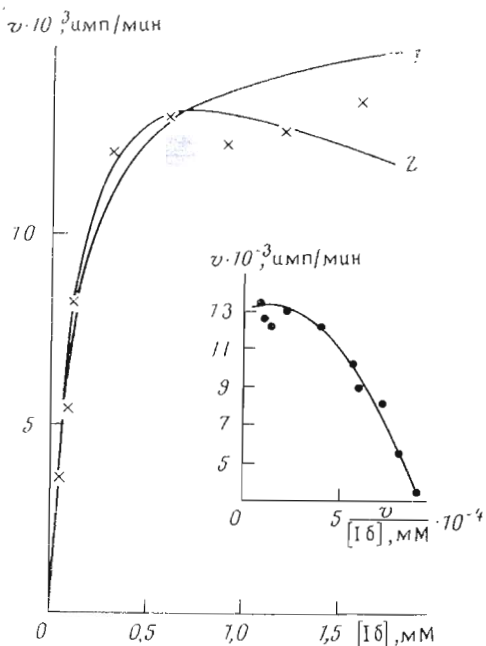


Рис. 4

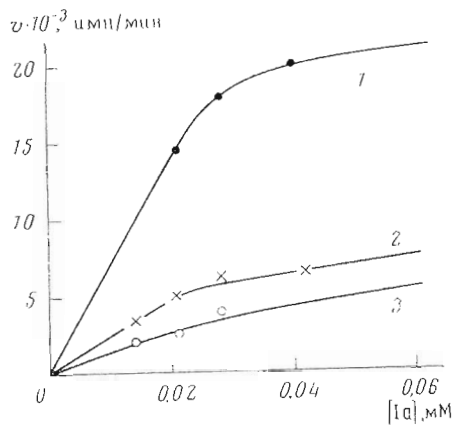


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость скорости образования морапсенилпирофосфатгалактозы от концентрации морапсенилфосфата (16). Приведены экспериментальные точки. Кривая 1 вычислена по уравнению Михаэлиса с параметрами  $K_m = 0,13$  мМ,  $v = 15,7 \cdot 10^3$  имп/мин, кривая 2 — по уравнению (i) с параметрами  $\alpha_1 = 11,9 \cdot 10^4$  имп/мин,  $\alpha_2 = 0$ ,  $\beta_1 = 6,23$ ,  $\beta_2 = 1,89$ . На врезке — зависимость  $v$  от  $v/s$

Рис. 5. Ингибирование образования полипсенилпирофосфатгалактозы в присутствии препарата морапсенилфосфата после хроматографии на силикагеле при его концентрации (мМ): 1 — 0; 2 — 0,14; 3 — 0,28

низу с неупорядоченным присоединением субстратов, которое нельзя описать как быстро устанавливающееся равновесие [6, 7, 9]. Наконец, аналогичное уравнение справедливо в случаях, когда фермент способен связываться с двумя молекулами субстрата, причем каталитические свойства комплексов  $ES$  и  $ES_2$  различны [7]. Мы не имеем в настоящее время данных, позволяющих осуществить однозначный выбор между этими возможностями.

Описанные выше результаты были получены при использовании препаратов морапсенилфосфата, выделенных и очищенных как описано в работе [2], т. е. с использованием ионообменной хроматографии. В то же время на первых этапах исследования мы имели в своем распоряжении ряд препаратов меньшей чистоты и обнаружили, что реакция, катализируемая галактозилфосфаттрансферазой, в значительной степени ингибируется под действием примесей, присутствующих в таких препаратах.

Так, препараты, полученные по прописи, аналогичной описанной в работе [3], и очищенные переосаждением калиевой соли (16) в одинаковых условиях определения, в 10—30 раз менее эффективны, чем препараты этого соединения после очистки ионообменной хроматографией.

По нашим данным, попытки очистить морапсенилфосфат с помощью хроматографии на силикагеле не только не приводят к удалению из препарата ингибирующих галактозилфосфаттрансферазу примесей, но и способствуют накоплению таких примесей. Более того, реакция с фосфатом (1a) заметно ингибируется под действием препарата морапсенилфосфата,

## Участие производных морапренилфосфата в реакциях биосинтеза О-специфической цепи

| Реакции   | Остаток полипренола          |                |
|---|------------------------------|----------------|
|   | бактериальный полипренол (а) | морапренол (б) |
| 1. Образование производного трисахарида (IVа, б) из фосфатов (Iа, б) (реакции 1-3)  |                              |                |
| количество фосфата (I) в смеси, нмоль   | 30                           | 200            |
| количество образовавшегося производного [ <sup>14</sup> C]трисахарида (IV), имп/мин | 9200                         | 3303           |
| 2. Полимеризация производного [ <sup>14</sup> C]трисахарида (IVа, б) (реакция 4)    |                              |                |
| содержание производного (IV) в органической фазе (имп/мин)                          | 3550                         | 5850           |
| контрольная проба   | 1450                         | 5100           |
| опытная проба   | 59                           | 13             |
| Протекание полимеризации, %   |                              |                |

подвергнутого хроматографии на силикагеле (рис. 5). Более детального исследования структуры образующегося при хроматографии на силикагеле ингибитора мы не проводили.

Морапренилширофосфатгалактоза (IIб) — продукт реакции галактозилфосфаттрансферазы с фосфатом (Iб) — способна служить субстратом для рамнозилтрансферазы (реакция 2 в табл. 1), а образующееся дисахаридное производное (IIIб), продукт этой реакции, может далее служить субстратом для маннозилтрансферазы (реакция 3 в табл. 1). Этот вывод был сделан на основании результатов двух вариантов опытов.

В одном из них проводилась инкубация препарата растворимых трансфераз с морапренилфосфатом (Iб) и смесью нуклеотидсахаров — UDPGal, TDPRha и GDP [<sup>14</sup>C] Man. Результаты включения радиоактивной маннозы в липидную фракцию (табл. 2) позволяют предполагать последовательное присоединение остатков галактозилфосфата, рамнозы и маннозы к остатку морапренилфосфата и, следовательно, нормальное функционирование перечисленных ферментов с использованием производных морапренола. Сравнение приведенных данных показывает, что морапренилширофосфатгалактоза функционирует в дальнейших реакциях биосинтеза О-специфического полисахарида несколько менее эффективно, чем соответствующее производное бактериального полипренола.

В другом опыте при аналогичном составе инкубационной смеси в качестве единственного радиоактивного вещества была взята UDP [<sup>14</sup>C] Gal. Радиоактивные полипренолфосфосахара — продукты реакции — были подвергнуты нагреванию с фенолом для расщепления полипренолфосфатной связи [10], а водорастворимые продукты расщепления — дефосфорилированию под действием щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1). При такой обработке из соединений (II) — (IV) должны образовываться соответственно галактоза, α-L-рамнопиранозил-(1 → 3)-D-галактоза (VI) и β-D-маннопиранозил-(1 → 4)-α-L-рамнопиранозил-(1 → 3)-D-галактоза (VII). Анализ радиоактивных продуктов с помощью хроматографии на бумаге (рис. 6) показывает, что главный компонент смеси идентичен по хроматографической подвижности синтетическому образцу (VII) [11]. Таким образом, в условиях инкубации происходит почти полное превращение первоначально образующейся морапренилширофосфатгалактозы (IIб) в производное трисахарида (IVб), т. е. использование рамнозил-

и маннозилтрансферазами субстратов — производных морапренола.

Далее был проведен предварительный опыт по исследованию способности полимеразы О-специфической цепи использовать трисахаридное производное морапренилпирофосфата (IVб). Субстрат для этой реакции получали биосинтетически из морапренилфосфата и соответствующих нуклеотидсахаров. За реакцией полимеризации следили по методу, предложенному Осборн [4]: по превращению растворимого в хлороформе полипренилпирофосфатолигосахарида в нерастворимый полимер. Данные табл. 2 показывают, что реакция полимеризации с трисахаридным производным (IVб) происходит, хотя и менее эффективно, чем с природным субстратом реакции.

Описанные в работе результаты демонстрируют, что морапренилфосфат и морапренилпирофосфатсахара могут заменять производные бактериального полипренола на всех стадиях биосинтеза О-специфического полисахарида *S. anatum*. Эти соединения могут, следовательно, играть роль биологически активных аналогов бактериальных полипренолфосфосахаров при исследовании ферментов биосинтеза.

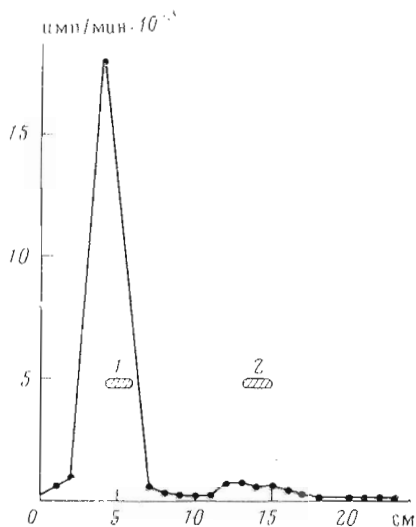


Рис. 6. Хроматография на бумаге продуктов взаимодействия морапренилфосфата с UDP [<sup>14</sup>C] Gal, TDPRha и GDPMan после обработки фенолом и дефосфорилирования. 1 — положение трисахарида (VII), 2 — положение галактозы

### Экспериментальная часть

ТСХ осуществляли на силикагеле КСК и Kieselgel (Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол — вода — конц. аммиак, 60 : 25 : 3,6 : 0,5. Фосфорсодержащие вещества обнаруживали по методу [12]. Хроматографию на бумаге проводили в системах: А — бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3); Б — этанол — 1 М ацетат аммония, pH 3,8 (7 : 3); В — этанол — 1 М ацетат аммония, pH 7,5 (5 : 2). В аналитических опытах использовали бумагу FN-15 (Filtrak, ГДР), для препаративного разделения — Ватман ЗММ. Производные углеводов обнаруживали с помощью анилидфталата. Ионообменную хроматографию проводили на DEAE-целлюлозе DE-32 (Whatman, Англия).

Радиоактивные вещества определяли с помощью жидкостно-сцинтилляционного счетчика Isoscap-300 (Nuclear Chicago, США). Для локализации радиоактивных зон на хроматограммах счет полосок бумаги проводили в толуольном сцинтилляторе (4 г РРО, 0,2 г РОРОР в 1 л толуола), для определения радиоактивности в органических растворителях аликвоты растворов упаривали под лампой (300—500 Вт) в сцинтилляционных флаконах и добавляли 0,5 мл воды и 10 мл диоксанового сцинтиллятора [13].

Количественное определение фосфора проводили по методу Васьяковского [12], определение белка — по Лоури [14].

*Микробиологические методы:* в работе использовали штамм *S. anatum* 255 (ЦНИИЭ Минздрава СССР) и штамм *S. anatum* А<sub>1</sub>, дефектный по UDPGal-4-эпимеразе (КФ 5.1.3.2), любезно предоставленный д-ром А. Райтом [15].

По нашим данным, уровень UDPGal-4-эпимеразы в штамме А<sub>1</sub> в 40 раз ниже (0,5 мЕ), чем в диком (20 мЕ). Штамм *S. anatum* А<sub>1</sub> проверяли

на чувствительность к галактозе путем высева на чашки Петри на ЭМС-плотной среде с 1% галактозой [16], а также на БТБ-плотной среде, содержащей 160 мл гидролизата Хоттингера, 10 г *D*-галактозы, 15 г агара Дифко, 0,05 г бромтимолблау в 1 л дистиллированной воды. Безэпимезный штамм *A*<sub>1</sub> выращивали до среднелогарифмической фазы ( $D_{600} = 0,7-0,8$ ) на минимальной среде [17] с 0,2%-ной глюкозой в ферментере с усиленной аэрацией при 37°. Дикий штамм *S. anatum* 255 выращивали на пептонной воде с 0,5% дрожжевым экстрактом при периодическом встряхивании в течение 24 ч при 37°.

Клетки собирали центрифугированием при 5000 об/мин (15 мин) и промывали 0,9% раствором NaCl.

Препараты мембран получали по методу [4] в следующем варианте: 2 г клеток суспендировали при 0° в 100 мл 0,05 М Трис-ацетата, pH 8,5 (1 мМ по EDTA), обрабатывали 6 раз по 15 с в ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1 при 35 кГц, охлаждая до -4° в промежутках между импульсами. Осадок мембран собирали центрифугированием (150 000g, 60 мин, центрифуга VAC-601, ГДР), суспендировали в том же буфере и центрифугировали при 3000 об/мин до удаления неразрушенных клеток (2-4 раза по 20 мин), затем надосадочную жидкость центрифугировали 60 мин при 150 000g. Осадок суспендировали в 2 мл 0,05 М Трис-ацетата (pH 8,5), хранили при -70°. Препарат содержал 18-20 мг белка/мл.

Препарат растворимых гликозилтрансфераз получали аналогично методике, описанной для *S. typhimurium* [4]: к 1 мл препарата мембран добавляли 0,07 мл 10% раствора Поли-Тергента S305-LF\* в воде, перемешивали 5 мин при 0°, центрифугировали 60 мин при 150 000g. К надосадочной жидкости добавляли равный объем 40% глицерина, хранили при -70°. Препарат содержал 0,9-1,1 мг белка/мл.

*Нерадиоактивные нуклеотидсахара.* В работе использовали препараты UDPGal и GDPMan (Calbiochem, США). TDPRha получена в нашей лаборатории [18].

*Радиоактивные нуклеотидсахара.* Препараты UDP[<sup>14</sup>C]Gal (234 мкКи/мкмоль) и GDP [<sup>14</sup>C]Man (184 мкКи/мкмоль) фирмы Amersham (Англия) разбавляли соответствующими нерадиоактивными нуклеотидсахарами до требуемой удельной активности. Для получения UDP [-6-<sup>3</sup>H] Gal использовали метод [19] в следующем варианте: смесь 10 мг (14 мкмоль) UDPGal, 8 мг галактозооксидазы (КФ 1.1.3.9) (Sigma, США), 3 мг каталазы (КФ 1.11.1.6) (Реахим) в 0,8 мл 0,1 М фосфата (pH 7) инкубировали 72 ч при комнатной температуре, pH доводили до 10 добавлением аммиака и вводили 2,4 мг (100 мКи) NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>. Через 5 ч при 20° добавляли 40 мкл ацетона и упаривали досуха, от остатка отгоняли метанол (5 раз по 2 мл). Продукт выделяли препаративной хроматографией на бумаге в системе Б и рехроматографией в системе В, выход 7,3 мкмоль (52%). Удельная активность 340 мкКи/мкмоль.

*Морапренилфосфат (Iб)* получен и очищен как описано в работе [2], *R<sub>f</sub>* 0,16 (ТСХ). Наряду с препаратом после очистки ионообменной хроматографией в работе использовали препараты, очищенные с помощью пересаживания калиевой соли, а также препараты, подвергнутые хроматографии на силикагеле. Последние препараты содержат примесь фосфорсодержащего вещества с *R<sub>f</sub>* 0,50.

*Бактериальный полипренилфосфат (Iа)* выделен из клеток *S. anatum* и *E. coli* по описанному методу [4]. При ионообменной хроматографии элюцию проводили 5 мМ ацетатом аммония + 5 мМ уксусной кислоты в 99% метаноле (рис. 1). Выход фосфата (Iа) (фракции 135-165) 3,5-4 мкмоль на 100 г влажных клеток. Препарат хроматографически однороден, *R<sub>f</sub>* 0,17 (ТСХ).

*Общая методика проведения ферментативных реакций.* Аликвоту раствора фосфата полипренола упаривали в токе азота, добавляли 10 мкл ме-

\* Дестергент любезно предоставлен проф. Хойнацким (ПНР).



танола и 15 мкл 0,5% раствора Твина-85 в воде, энергично встряхивали до гомогенности. Затем вводили 5 мкмоль Трис-ацетата (рН 8,5), 1 мкмоль  $MgCl_2$ , нуклеотидсахара и фермент в общем объеме смеси 0,1 мл. После окончания инкубации добавляли 2 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1) и перемешивали до гомогенности. Через 10 мин при комнатной температуре добавляли 0,4 мл верхней фазы по Фольчу (смесь 15 мл  $CHCl_3$ , 240 мл метанола, 235 мл воды и 1,83 г  $KCl$ ) [20], отделяли нижний слой и дважды промывали его 0,4 мл верхней фазы. В аликвотах органического слоя определяли радиоактивность, как описано выше.

*Исследование галактозилфосфаттрансферазной реакции.* 1. Зависимость протекания реакции от времени (рис. 2) определяли по общей методике, смесь содержала 5,6 нмоль соединения (Ia), 25 нмоль  $UDP[-6-^3H]Gal$  (50 мкКи/мкмоль) и 10 мкг белка растворимых гликозилтрансфераз из *S. anatum* 255. Время инкубации 3—60 мин, температура 25°.

2. Зависимость скорости реакции от концентрации фосфата бактериального полипренола (рис. 3) определяли по общей методике. Содержание смеси: 7—70 нмоль соединения (Ia), 25 нмоль  $UDP[-6-^3H]Gal$  (60 мкКи/мкмоль) и 9 мкг белка — фермента из *S. anatum* A<sub>1</sub>. Время инкубации 15 мин, температура 25°. В контрольную пробу соединение (Ia) не вносили.

3. Зависимость скорости реакции от концентрации морапренилфосфата (Iб) (рис. 4) определяли по общей методике. Содержание смеси: 3,8—150 нмоль соединения (Iб), 25 нмоль  $UDP[-6-^3H]Gal$  (70 мкКи/мкмоль) и 15 мкг белка — фермента из *S. anatum* A<sub>1</sub>. Время инкубации 15 мин, температура 21°. В контрольную пробу морапренилфосфат не добавляли.

4. Изучение ингибирования реакции под действием препарата морапренилфосфата после хроматографии на силикагеле (рис. 5) проводили по общей методике. Содержание смеси: 1,5—14 нмоль соединения (Ia), 0—28 нмоль препарата (Iб), 25 нмоль  $UDP[-6-^3H]Gal$  (50 мкКи/мкмоль) и 9,2 мкг белка — фермента из штамма 255. Время инкубации 15 мин, температура 25°.

*Исследование рамнозилтрансферазной и маннозилтрансферазной реакции* (табл. 2) проводили по общей методике с количествами полипренилфосфатов, указанными в табл. 2; 25 нмоль  $UDPGal$ ,  $TDPRha$  и  $GDP[^{14}C]Man$  (10 мкКи/мкмоль) и 82 мкг белка — фермента из штамма 255. Время инкубации 15 мин, температура 35°.

В контрольной пробе радиоактивность в органической фазе составила 440 имп/мин. Аналогичные результаты получены с ферментом из штамма A<sub>1</sub>.

В опыте с  $UDP[^{14}C]Gal$  состав инкубационной смеси аналогичен предыдущему, но смесь содержала 80 нмоль соединения (Iб), 25 нмоль  $UDP[^{14}C]Gal$  (50 мкКи/мкмоль), 25 нмоль  $TDPRha$ , 50 нмоль  $GDPMan$  и 38 мкг белка — фермента из штамма A<sub>1</sub>. После инкубации в течение 30 мин при 37° смесь обрабатывали как описано в общей методике, 1 мл полученной органической фазы упаривали, добавляли 0,09 мл воды и 0,13 мл 80% водного фенола, выдерживали 5 мин при 70°. Фазы разделяли после центрифугирования (3000 об/мин, 5 мин), фенольный слой промывали водой (2 раза по 0,1 мл). К объединенным водным слоям добавляли по 0,1 мл раствора щелочной фосфатазы (1 мг в 1 мл 0,1 М Трис- $HCl$ -буфера, рН 8,5), выдерживали 20 ч при комнатной температуре. Пробу наносили на бумагу и хроматографировали 67 ч в системе А (рис. 6).

*Получение трисахаридного производного (IVa).* Инкубационная смесь содержала 138 нмоль фосфата (Ia), 10 мкл метанола, 15 мкл 0,5% раствора Твина-85, 5 мкмоль Трис-ацетата (рН 8,5), 1 мкмоль  $MgCl_2$ , 50 нмоль  $UDPGal$ , 25 нмоль  $TDPRha$  и 25 нмоль  $GDP[^{14}C]Man$  (10 мкКи/мкмоль) и 56 мкг белка — фермента из штамма A<sub>1</sub> в общем объеме 0,125 мл. После инкубации в течение 25 мин при 37° смесь обрабатывали как описано в общей методике, органическую фазу упаривали в токе азота, остаток растворяли в 0,1 мл 0,1% раствора Твина-80 и без очистки использовали для исследования полимеразы.

Трисахаридное производное (IVб) получали в условиях, аналогичных предыдущему опыту, но смесь содержала 150 нмоль (Iб) и 47 мкг белка-фермента.

*Исследование полимеразной реакции.* Инкубационная смесь содержала 30 мкмоль Трис-малеата (рН 6), 1 мкмоль  $MgCl_2$ , производное (IVа) или (IVб) в количествах, указанных в табл. 2, и препарат мембран из штамма 255 (150 мкг белка) в общем объеме 0,1 мл. В контрольную пробу препарат мембран не добавляли. После инкубации в течение 1 ч при 25° смесь обрабатывали по общей методике и определяли радиоактивность в органической фазе (см. табл. 2).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Wright A., Dankert M., Robbins P. W. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54, 235—241.
2. Вергунова Г. И., Глуходей И. С., Данилов Л. Л., Елисеева Г. И., Кочетков Н. К., Троицкий М. Ф., Усов А. И., Шашков А. С., Шибаев В. Н. (1977) Биоорганическая химия, 3, 1484—1492.
3. Warren C. D., Jeanloz R. W. (1972) Biochemistry, 11, 2565—2572.
4. Osborn M. J., Cynkin M. A., Muller G. L., Singh M. (1972) in Methods in Enzymology (Kolowick S. P., Kaplan N. O., eds.), vol. 28 (Complex Carbohydrates, part B), pp. 583—601, Acad. Press, N. Y.—London.
5. Rundell K., Shuster C. W. (1973) J. Biol. Chem., 248, 5436—5442.
6. Walter C. (1974) J. Biol. Chem., 249, 699—703.
7. Botts J. (1958) Trans. Faraday Soc., 54, 593—604.
8. Cleland W. W., Gross M., Folk J. E. (1973) J. Biol. Chem., 248, 6541—6542.
9. Уолтер Ч. (1969) Кинетика ферментативных реакций, с. 60, «Мир», М.
10. Garcia C. R., Recondo E., Dankert M. (1974) Eur. J. Biochem., 43, 93—105.
11. Kochetkov N. K., Dmitriev B. A., Malysheva N. N., Chernyak A. Ya., Klimov E. M., Bayramova N. E., Torgov V. E. (1975) Carbohydr. Res., 45, 283—290.
12. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin E. M. (1975) J. Chromatogr., 114, 129—141.
13. Bray G. A. (1960) Anal. Biochem., 1, 279—285.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.
15. Kanegasaki S., Wright A. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 951—958.
16. Nikaïdo H. (1966) in Methods in Enzymology (Neufeld E. F., Ginsburg V., eds.), vol. 8, pp. 149—152, Acad. Press, N. Y.—London.
17. Мейнелл Д., Мейвелл Э. (1967) Экспериментальная микробиология, с. 47, «Мир», М.
18. Шибаев В. Н., Елисеева Г. И., Кусов Ю. Ю., Петренко В. А., Мищенко С. С., Кочетков Н. К. (1976) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2584—2587.
19. Nelsestuen G. L., Kirkwood S. (1971) J. Biol. Chem., 246, 3828—3834.
20. Folch J., Less M., Sloane-Stanly G. H. (1952) J. Biol. Chem., 226, 497—509.

Поступила в редакцию  
5.V.1977

#### MORAPRENYL PHOSPHATE AS A SUBSTRATE IN THE BIOSYNTHESIS OF THE *SALMONELLA ANATUM* O-ANTIGEN

SHIBAEV V. N., KUSOV Yu. Yu., DRUZHININA T. N.,  
KALINCHUK N. A., KOCHETKOV N. K., KILESSO V. A.,  
ROZHNova S. Sh.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow; Central Research Institute of Epidemiology,  
Ministry of Health of the USSR, Moscow*

Phosphate of moraprenol (polyprenol from mulberry leaves) was found capable of substituting bacterial polyprenyl phosphate as antigen carrier lipid in the biosynthesis of *Salmonella anatum* O-specific polysaccharide. The dependence of polyprenyl pyrophosphate galactose formation rate on polyprenyl phosphate concentration is described by the second-order equation. The substrate efficiency of the moraprenol derivative in the first reaction is similar to that of bacterial polyprenyl phosphates from *S. anatum* and *E. coli*. The reaction is inhibited by impurities which are present in moraprenyl phosphate preparations before ion-exchange purification. Oligosaccharide derivatives formed from moraprenyl phosphate may serve as substrates at all stages of O-specific polysaccharide biosynthesis, although their efficiency is lower than that of bacterial polyprenol derivatives.