



УДК 579.842.11.088.3

В. И. Андриенко, В. А. Кордюм

## ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА ФАГОЛИЗАТА КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI* ОТ ПОЛИСАХАРИДОВ

*На примере очистки фаголизата клеток *E. coli* от полисахаридов показана возможность электрофоретического разделения смеси биополимеров, состоящей из компонентов как несущих электрический заряд, так и электронейтральных.*

*Степень очистки фаголизата от полисахаридов составила более 73 %.*

**Введение.** Метод электрофореза широко используется для разделения и очистки биополимеров, несущих электрический заряд. Его также можно применять для разделения смеси биополимеров, состоящей из компонентов, несущих электрический заряд и электронейтральных [1, 2].

Чтобы проверить возможность и эффективность разделения таких смесей биополимеров, была изготовлена специальная электрофоретическая камера, с помощью которой осуществлена очистка от полисахаридов фаголизата клеток *E. coli*, содержавшего  $\alpha$ -2 рекомбинантный интерферон. Выбор объекта для проверки возможности разделения смеси биополимеров, состоящей из электронейтральных и несущих заряд, был обусловлен разработкой одного из методов очистки рекомбинантного  $\alpha$ -2 интерферона, получаемого из клеток *E. coli*. Это обстоятельство определяло условия проведения электрофореза.

**Материалы и методы.** Исходным материалом для оценки эффективности разделения служили предварительно отцентрифугированный при 5000 об/мин фаголизат клеток *E. coli* и раствор водорастворимого крахмала, использовавшийся для проверки работоспособности электрофоретической камеры.

Электрофорез проводили в 0,5 %-ном растворе уксусной кислоты, рН 3,0, при напряжении на электродах 90 В и токе 110 мА. Время электрофореза 1 ч.

Общее количество белка в исходном и разделенном материалах определяли по методу Бредфорда [3]; количество крахмала в растворе и полисахаридов в разделяемом материале — фенол-серным методом; количество интерферона — иммуноферментным анализом.

**Результаты и обсуждение.** Успешное разделение смеси биополимеров, состоящей из компонентов как электронейтральных, так и несущих заряд, возможно в том случае, когда разделившиеся под воздействием электрического поля компоненты в дальнейшем будут надежно изолированы друг от друга. В нашем приборе это условие осуществляется с помощью установленной между отделениями для разделяемого и разделенного материала специальной перегородки, непроницаемой для электронейтральных биополимеров.

Для проверки герметичности перегородки для электронейтральных биополимеров проводили электрофорез, используя в качестве тест-объекта раствор водорастворимого крахмала. Раствор объемом 18 мл с общим содержанием крахмала 1080 мкг вносили в отделение для разде-

ляемого материала, а отделение для отделяемого — заполняли таким же объемом 0,5 %-ного раствора уксусной кислоты. Замер общего количества крахмала после 3 ч электрофореза показал, что его количество в отделении для разделяемого материала осталось без изменений. В отделении для отделившегося материала крахмал не обнаруживался, что позволило перейти к разделению фаголизата клеток *E. coli*. Характеристика этого материала следующая. Объем исходного материала — 18 мл; концентрации: общего белка — 0,42 мг/мл; интерферона — 0,10 мг/мл; полисахаридов — 30,0 мкг/мл; общее количество: белка — 7,56 мг; интерферона — 1,80 мг; полисахаридов — 540,0 мкг.

Как видно, фаголизат, кроме белков, содержит и полисахариды. Этот материал в полном объеме вносили в отделение для разделяемого материала, а отделение для отделяемого — заполняли 0,5 %-ным раствором уксусной кислоты. После 1 ч электрофореза проводили замер общего количества белка, интерферона и полисахаридов в отделениях исходного и разделенного материалов.

Анализ эффективности очистки фаголизата клеток *E. coli* от полисахаридов представлен такими данными. Общее количество белка в очищенном материале — 6,48 мг; выход белка по отношению к внесенному — 85,71 %; общее количество интерферона в очищенном материале — 1,656 мг; выход интерферона по отношению к внесенному — 92,0 %; общее количество полисахаридов в очищенном материале — 144 мкг; выход полисахаридов по отношению к количеству внесенных — 26,66 %; степень очистки по полисахаридам — 73,34 %. Видно, что за 1 ч электрофореза из отделения для очищаемого материала в отделение очищенного перешло более 85 % общего белка и 92 % интерферона. Это указывает на достаточно высокую скорость переноса биополимеров, несущих электрический заряд.

Однако (см. выше) в этом материале определялись также и вещества, выявляемые фенол-серным методом, т. е. полисахариды или соединения, их содержащие. Общее количество их составило 144 мкг, или более 26 % от их количества в исходном материале. Если учесть, что проверка перегородки, разделяющей отделения для очищаемого и очищенного материалов, показала ее практически полную непроницаемость для электронейтральных биополимеров, то наличие в очищенном материале значительного количества веществ, тестируемых как полисахариды, можно объяснить лишь тем, что в фаголизате клеток *E. coli* присутствуют вещества, тестируемые как полисахариды и несущие электрический заряд.

В настоящее время невозможно оценить точную природу этих веществ. Они могут представлять собой прочные комплексы полисахаридов с белками или пептидами, модифицированные полисахариды, несущие заряды, или какие-либо другие соединения. Однако в любом случае это группа веществ, содержащая сахара и имеющая заряд. Принципиально в самом факте существования таких веществ в клетках *E. coli* нет ничего удивительного. Удивительным оказывается их неожиданно большой процент по отношению ко всем веществам, определяемым в пробе фенол-серным методом. Описанный метод разделения биополимеров позволяет отделить эти вещества в любом требуемом для анализа количестве. Это дает возможность приступить к выяснению природы данной группы веществ.

Подводя итог вышеизложенному, можно сделать вывод о том, что полученные результаты очистки фаголизата клеток *E. coli* от незаряженных молекул указывают на практическую целесообразность применения данного метода и открывают дополнительные возможности фракционирования сложных смесей.

## Резюме

На прикладі очищення фаголізату клітин *E. coli* від полісахаридів показано можливість електрофоретичного розділення суміші біополімерів, яка складається із компонентів як таких, що несуть електричний заряд, так і електронейтральних.

Ступінь очищення фаголізату від полісахаридів становила більше 73 %.

## Summary

The possibility of electrophoretic separation of mixture consisting of electroneutral and charged biopolymers has been shown on the example of purification of phagolysate of *E. coli* cells from polysaccharides.

The degree of purification was more than 73 %.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pat.* EP N 86302310.7. IC<sup>3</sup> G 01 N 27/26. Method and apparatus for separating complex mixtures of bioorganic materials/D. G. Bannerman, W. G. Burton.— Publ. 29.10.86.
2. *Pat.* USA N 4735697. IC<sup>3</sup> G 01 N 27»26. Method and apparatus for separating complex mixtures for bioorganic materials/W. G. Burton.— Publ. 05.04.88.
3. Филиппович Ю. Б., Егоров Т. А., Севастьянов Г. А. Практикум по общей биохимии.— М.: Просвещение, 1982.— 311 с.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 08.02.91

УДК 577.23

А. А. Верхацкая, Е. Л. Прохневская, М. П. Завелевич, Г. Х. Мацука

## ПОВЫШЕНИЕ АКТИВНОСТИ 2'5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТСИНТЕТАЗЫ В КЛЕТКАХ РАКА ПОЧКИ И МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ, СБРАБОТАННЫХ ИНТЕРФЕРОНОМ

*Работа посвящена изучению возможности использования определения активности 2'5'-олигоаденилатсинтеказы как маркера чувствительности клеток к интерферону.*

**Введение.** Интерферон (ИФ) — первый модификатор биологического ответа, который начали применять в онкологической практике. В многочисленных клинических наблюдениях были обнаружены существенные различия в чувствительности опухолей к ИФ [1]. Однако эти закономерности не являются абсолютными и нередко наблюдаются значительные колебания в индивидуальной чувствительности опухолей к разным типам ИФ [2].

Обработка чувствительных к ИФ клеток сопровождается индукцией синтеза в них ряда белков, одним из которых является 2'5'-олигоаденилатсинтеза (2'5'-АС). Индукция последней наиболее закономерно сопутствует антивирусному и антипролиферативному эффектам ИФ. 2'5'-АС в присутствии вирусной или клеточной двуспиральной РНК синтезирует из АТФ серию олигоаденилатов, состоящих из 3—15 адениловых остатков, связанных между собой 2'5'-связью. Олигоаденилат (ОА), образуя комплекс с предсуществующей в клетках неактивной эндонуклеазой, переводит ее в активное состояние. В результате этого эндонуклеаза приобретает способность гидролизовать различные мРНК, что приводит к угнетению белкового синтеза [3]. Это одно из главных звеньев антипролиферативного действия ИФ, но, по-видимому, существуют и другие механизмы [4].

По уровню 2'5'-АС, индуцированной в клетках ИФ, вероятно, можно судить о чувствительности их к ИФ и целесообразности использования определенного типа ИФ в каждом конкретном случае.

© А. А. ВЕРХАЦКАЯ, Е. Л. ПРОХНЕВСКАЯ, М. П. ЗАВЕЛЕВИЧ, Г. Х. МАЦУКА, 1991