

1. Righelli P. G., Drysdale J. W. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: isoelectric focusing. — Amsterdam: North Holland Publ. Co., 1976.—260 p.
2. Бабский В. Г., Жуков М. Ю., Юдович В. И. Математическая теория электрофореза. — Киев: Наук. думка, 1983.—204 с.
3. Kolin A. Evolution of ideas in electrophoretic developments—selected highlights // Electrophoresis'82. — Berlin—New York: Walter de Gruyter and Co., 1983. — P. 3—48.
4. А. с. 802310 СССР, С08 G 73/02. Синтетический амфолит-носитель для разделения биополимеров методами изоэлектрофокусирования и изотахофореза // А. П. Мурель, Ю. Р. Сийгур // Открытия. Изобретения. — 1981. — № 5. — С. 90.
5. Мурель А. П. Синтез улучшенных и недорогих амфолитов-носителей для изоэлектрофокусирования // Известия АН ЭССР. — 1980.—29, № 3. — С. 201—209.
6. Шурхал А. В., Подогаз А. В., Алухов Ю. П. Генетический полиморфизм и редкие варианты α_1 -антитрипсина в населении Москвы. Исследование с помощью изоэлектрофокусирования в сверхтонком геле // Генетика. — 1984.—20, № 12. — С. 2066—2069.
7. Алухов Ю. П., Хильчевская Р. И., Шурхал А. В. Уровни полиморфизма и гетерозиготности русского населения Москвы: данные о 22 генных локусах, кодирующих белки крови // Там же. — 1981.—17, № 3. — С. 548—555.

Ин-т общ. генетики им. Н. И. Вавилова АН СССР,
Москва

Получено 21.10.85

УДК 578.087.9

ИЗОТАХОФОРЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ БИОСИНТЕЗА CoA КУЛЬТУРОЙ *STREPTOMYCES LAVENDOFUSEUS*

А. Х. Жагарс, А. А. Зелтиньш, Д. Я. Павловича,
Ю. А. Земитис, Я. Я. Дрегерис

Введение. Капиллярный аналитический изотахофорез (ИТФ) имеет ряд важных преимуществ перед другими аналитическими электрофоретическими и хроматографическими методами. Изотахофоретическое разделение происходит в капилляре из непроводящего материала с внутренним диаметром 0,4—0,6 мм, на одном конце которого находится неподвижный детектор, в капилляре устранен гидродинамический поток и нет опорной среды. Это дает высокую воспроизводимость анализа, возможность проведения разделения при любых значениях рН от 2 до 12 и анализа белков без денатурации и предварительного обесцвечивания. Применение в качестве электролитов таких популярных веществ, как трис, β -аланин, глицин, HCl, CH_3COOH и др., и малый расход (~ 1 мл) разбавленных (0,01—0,001 М) растворов делают этот метод очень экономичным. По времени анализа (10—20 мин), объему образца ($\sim 0,5$ —50 мкл) и количеству детектируемого вещества (10^{-9} — 10^{-10} моль) капиллярный ИТФ особенно пригоден в биохимии для исследования хода и продуктов ферментативных реакций [1—3].

Проблема получения биологически активных веществ путем микробиологического синтеза связана с несколькими этапами исследования: получение культуры продуцента, подбор наиболее подходящих условий культивирования, выделения необходимого продукта. Очень важно наличие удобной и легко осуществимой методики анализа для контроля биосинтеза.

Культура *Streptomyces lavendofuscus* является продуцентом кофермента А (CoA): при росте стрептомицета на простой минеральной среде без предшественников биосинтеза в культуральной жидкости выделяется CoA [4]. По-видимому, у *Streptomyces lavendofuscus* существует активный CoA-синтезирующий ферментный комплекс, способный осуществить биосинтез CoA из предшественников с высоким выходом, что необходимо было проверить.

В работе с продуцентом CoA неизбежно возникает проблема определения кофермента. В практике обычно используют традиционные ферментативные методы определения [5, 6], вполне пригодные в скрининг-

экспериментах, но часто неудовлетворительные при более подробных исследованиях, особенно в случае необходимости контроля убыли или появления других метаболитов одновременно с приростом CoA в ферментативной среде.

Материалы и методы. Все измерения проведены на аппарате Изотахофор-УФ, созданном на химическом факультете Латвийского госуниверситета им. П. Стучки. Блок-схема прибора приведена на рис. 1. Культуру *Streptomyces lavendofuseus* 3/2001 выращивали на минеральной среде, содержащей 20 г мальтозы, 4 г нитрата калия, 1 г калия гидрогенфосфата, 0,5 г хлорида натрия, 0,5 г сульфата магния в 1 л кипяченой водопроводной воды. В качестве посевного материала использовали гифы, выращенные из

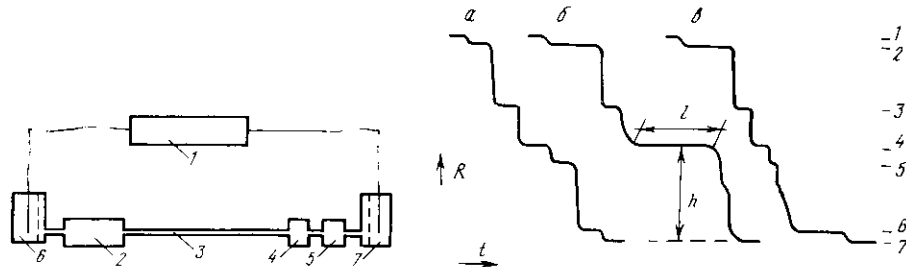


Рис. 1. Блок-схема прибора для изотахофореза: высоковольтный источник (1); ввод образца (2); капилляр разделения (3); детектор поглощения (4); детектор проводимости (5); электродные сосуды для ведущего (6) и замыкающего (7) электролитов.

Fig. 1. Scheme of the isotachopheretic equipment. Stabilized power supply (1), injection system (2), narrow-bore tube (3), absorption detector (4), conductivity detector (5), leading electrolyte compartment (6), terminating electrolyte compartment (7).

Рис. 2. Изотахофореграммы разделения анионов, полученные с помощью кондуктометрического датчика (высота плеча пропорциональна подвижности в зоне, а длина зоны — концентрации вещества в ней): а — смесь стандартов (1 — хлорид; 2 — сульфат; 3 — оксалат; 4 — АТФ; 5 — CoA; 6 — АМФ; 7 — капронат); б — инкубационная смесь при $t=0$ ч; в — инкубационная смесь при $t=24$ ч.

Fig. 2. Isotachophoregrammes of anionic separation obtained with conductivity detector: а — standard mixture (1 — chloride, 2 — sulphate, 3 — oxalate, 4 — ATP, 5 — CoA, 6 — AMP, 7 — caproate); б) incubation mixture at $t=0$ h; в) incubation mixture at $t=24$ h.

спор. Ферментацию проводили в течение 72 ч на качалке (200 об/мин) при 28 °С. Полученную биомассу после центрифугирования гомогенизировали в холодном ацетоне (−20 °С). Полученный «ацетоновый порошок» высушивали в вакуумном эксикаторе при 4 °С. Ацетоновый порошок использовали в качестве ферментного препарата.

Инкубационная смесь содержала 30 мкмоль АТФ, 3,75 мкмоль пантотената кальция, 7,5 мкмоль L-цистеина, 7,5 мкмоль $MgSO_4$, 7,5 мкмоль дитиотрептола, 7,5 мкмоль DS-Na и 80 мг ацетонового порошка в 1,2 мл трис-HCl буфера (0,1 M, pH 8,0). Инкубировали смесь при 37 °С на качалке (100 об/мин) в течение 24 ч.

Подготовку образцов для изотахофореза производили одним из трех методов.

1. К одному объему смеси после инкубации добавляли два объема 6 %-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ). После центрифугирования (15 мин, 18 000 g, 4 °С) образец разбавляли в 100 раз по отношению к исходной смеси и проводили ИТФ-анализ.

2. Смесь после инкубации выдерживали при 95 °С в течение 10 мин, центрифугировали (15 мин, 18 000 g, 4 °С), разбавляли в 100 раз и анализировали изотахофоретически.

3. Смесь после инкубации центрифугировали (15 мин, 18 000 g, 4 °С), разбавляли в 100 раз и проводили ИТФ-анализ.

Использованные системы электролитов для разделения анионов приведены в табл. 1.

Результаты и обсуждение. Используя аппаратуру и методику изотахофоретического анализа, исследовали биосинтез CoA из предшественников (пантотената кальция, АТФ и L-цистеина) высушенным мицелиальным препаратом культуры *Streptomyces lavendofuseus* 3/2001. Для ИТФ использовали образцы инкубационной смеси после обработки ТХУ или прогретые до 95 °С в течение 10 мин. Так же анализировали непосредственно разбавленную и отцент-

Таблица 1
Системы электролитов для разделения анионов
Electrolyte systems for anionic separation

№ системы	Электролит	Ион	Концентрация, моль/л	Противион	pH	Добавка
1	Ведущий Замыкающий	Cl ⁻ Капроновая кислота	5·10 ⁻³ 5·10 ⁻³	Гистидин	5,20	0,1 %-ный тритон X-100 То же
				Гистидин	5,25	
2*	Ведущий Замыкающий	Cl ⁻ Капроновая кислота	3·10 ⁻³ 3·10 ⁻³	β-Аланин	3,90	»
				Трис	8,40	
3	Ведущий Замыкающий	CH ₃ COO ⁻ L-Аспарагин	4·10 ⁻³ 4·10 ⁻³	Трис	8,10	»
				Ва (ОН) ₂	8,50	
4	Ведущий Замыкающий	Cl ⁻ CH ₃ COO ⁻	4·10 ⁻³ 4·10 ⁻³	β-Аланин	3,80	»
				β-Аланин	4,00	

* Среднее время прохождения границы электролитов 20 мин при напряжении 10—12 кВ и токе 100 мкА.

рифугированную жидкость. Денатурация белков избытком ТХУ затрудняет ИТФ-анализ СоА, АТФ и АМФ ввиду того, что образуется большая зона трихлорацетата, формирование которой удлинит время анализа до 35—45 мин и мешает полному отделению стандартного вещества. Термическая обработка исследуемой смеси приводит к существенному снижению содержания АТФ, и продукты ее распада мешают достоверной оценке хода ферментативного процесса. Наиболее ценную информацию о ходе этого процесса дает ИТФ-анализ инкубационной смеси без дополнительной обработки.

Для определения наилучших условий разделения СоА, АТФ и АМФ были проверены четыре системы электролитов для разделения анионов. В системах электролитов № 1 и 4 (табл. 1) АТФ, СоА и АМФ имеют эффективную подвижность, близкую к таковой замыкающего электролита. Наблюдается образование смешанной зоны СоА и АМФ, причем высоты плечей зон АТФ, АМФ и СоА мало отличаются друг от друга и находятся близко к уровню замыкающего электролита. В системе электролитов № 3 АТФ и СоА имеют эффективную подвижность большую, чем ведущий ион ацетата, и не образуют отдельных зон. Наиболее пригодна для одновременного определения АТФ, СоА и АМФ система № 2. На рис. 2 кривая 1 показывает картину разделения стандартной смеси сульфата, оксалата, АТФ, СоА и АМФ с концентрациями

Таблица 2
Биосинтез кофермента А
из предшественников культурой
Streptomyces lavendofuseus
Biosynthesis of coenzyme A from
precursors by culture of
Streptomyces lavendofuseus

Время инкубации, ч	Концентрация, мкмоль/мл		
	АТФ	СоА	АМФ
0	24,8	—	—
2	22,4	следы	1,5
6	19,5	0,33	4,4
12	13,7	0,86	9,1
24	9,3	1,10	13,3

5·10⁻⁵ моль/л в системе электролитов № 2. Оксалат применяли в качестве внутреннего стандарта, так как использование стандартных ионов хлората или хромата недопустимо из-за их окисляющих свойств. В анализе смеси до инкубации не наблюдается зон СоА и АМФ (рис. 2, кривая 2). Ниже зоны АТФ находятся несколько маленьких зон ионогенных компонентов неизвестного состава. В анализе образца после 24 ч инкубации (рис. 2, кривая 3) четко появляются зоны СоА и АМФ, наблюдается сокращение длины зоны АТФ. В табл. 2 приведены примеры биосинтеза СоА препаратом культуры *Streptomyces lavendofuseus*

с одновременным определением содержания АТФ, СоА и АМФ в инкубационной жидкости. Таким образом, данные нашего исследования показали, что метод капиллярного изотахофореза вполне применим для одновременного определения АТФ, СоА и АМФ в разбавленной инкубационной жидкости препарата культуры *Streptomyces lavendofuseus* без денатурации растворенных белков. Это особо важно для оптимизации процесса и контроля за биосинтезом СоА в препаративном масштабе благодаря оперативности и высокой степени автоматизации, позволяющей провести ИТФ-анализ среднему техническому персоналу.

ISOTACHOPHORETIC CONTROL OF CoA BIOSYNTHESIS
BY *STREPTOMYCES LAVENDOFUSEUS*

A. H. Zhagars, A. A. Zeltinsh, D. J. Paolozicha, J. A. Zemitis, J. J. Dregeris

P. Stuchka University, Riga.
A. Kirchenstein Institute of Microbiology,
Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga

Summary

Electrolyte systems for isotachophoretic analysis of anions and simultaneous determination of ATP, AMP and CoA in culture liquid are studied using oxalate as a standard. The method of isotachophoretic determination of CoA, ATP and AMP is shown through the example of synthesis of CoA from precursors by the *Streptomyces lavendofuseus* culture.

1. Vacik J. Theory of isotachopheresis // 4th Int. symp. of isotachopheresis / Ed. P. Bockek. — Hradec Kralove, 1984. — P. 4—28.
2. Everaerts F. M., Becker J. L., Verheggen T. P. Isotachopheresis // J. Chromatogr. — 1976. — 6. — P. 1—418.
3. Table of isotachopheretic indices. I. Simulated qualitative and quantitative indices of 287 anionic substances in the range pH 3—10 / T. Nirokava, M. Nishino, N. Aoki, Y. Kiso // Ibid. — 1983. — 271. — P. D1—D106.
4. А. с. 1117318 СССР. Штамм *Streptomyces lavendofuseus* 3/2000 — продуцент кофермента КоА / Д. Я. Павловича, А. А. Зельтинш, Ю. О. Якобсон и др. // Открытия. Изобретения. — 1984. — № 37. — С. 72.
5. Michal G., Bergmeyer H. U. Coenzyme A // Methods of enzymatic analysis / Ed. H. U. Bergmeyer. — New York: Acad. press, 1962. — P. 512—525.
6. Altred J. B., Guy D. G. Determination of coenzyme A and acetyl CoA in tissue extracts // Anal. Biochem. — 1969. — 29, N 2. — P. 293—299.

Латв. госуниверситет им. П. Стучки, Рига
Ин-т микробиологии им. А. Кирхенштейна
АН ЛатвССР, Рига

Получено 21.10.85