



УДК 547.963.1.05:578.832.1.088.2

**ГЕТЕРОГЕННОСТЬ УГЛЕВОДНЫХ ФРАГМЕНТОВ В ТЯЖЕЛОЙ И ЛЕГКОЙ ЦЕПЯХ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А/ЛЕНИНГРАД/385/80 (H3N2)**

*Арбатский Н. П., Желтова А. О., Лихошерстов Л. М.,  
Сенченкова С. Н., Юртов Д. В., Деревицкая В. А.,  
Кочетков Н. К.*

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

Методом восстановительного расщепления N-гликозидной углевод-пептидной связи проведено отщепление связанных с аспарагином углеводных цепей главного поверхностного антигена вируса гриппа А/Ленинград/385/80 (H3N2) — гемагглютинина и его тяжелой и легкой цепей. С помощью разработанного метода, основанного на использовании гель-хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии, из полученных из каждого гликопротеина смесей олигосахаридов выделено по 21 олигосахариду и установлен их состав. Впервые показано, что, несмотря на различное число точек гликозилирования в тяжелой и легкой цепях гемагглютинина, общее количество и соотношение различных типов углеводных цепей (как олигоманнозидных, так и комплексных) в них примерно одинаково. Из полученных результатов следует, что индивидуальные молекулы гемагглютинина различаются по строению углеводной цепи в одной и той же точке гликозилирования пептидной цепи.

Главный поверхностный антиген вируса гриппа — гемагглютинин (HA) является N-гликозилпротеином, построенным из двух гликозилированных пептидных цепей — тяжелой (HA1) и легкой (HA2), соединенных дисульфидной связью. Он содержит ~20% углеводов, причем основная часть их находится в цепи HA1. Строение углеводных фрагментов гемагглютинина известно лишь в самых общих чертах, а более детально установлено только для одного из штаммов вируса с антигенной формулой H3N2 — A/Aichi/2/68 (X-31) [1]. Имеющиеся литературные данные касаются главным образом соотношения «комплексных» (цепи А-типа) и «олигоманнозидных» (цепи В-типа) цепей гемагглютинина в зависимости от штамма вируса и клетки хозяина [2, 3]; они довольно противоречивы и не позволяют сделать каких-либо определенных заключений о различиях в строении углеводных цепей в HA1 и HA2 и степени однородности цепей в каждой точке гликозилирования («сайте»). По этой причине остаются неясными вопросы, связанные с функцией углеводных цепей гемагглютинина и природой факторов, регулирующих процесс гликозилирования вирусных гликопротеинов.

Ранее нами было описано выделение и первичная характеристика гемагглютинина, его тяжелой и легкой цепей из вируса гриппа А/Ленинград/385/80 (H3N2) [4]. Целью настоящей работы является сравнение и характеристика углеводных цепей, содержащихся в HA1 и HA2 этого вируса, для чего необходимо было отработать методы отщепления углеводных цепей и выделения полученных олигосахаридов в индивидуальном состоянии.

Для отщепления олигосахаридных фрагментов HA, HA1 и HA2 использовался разработанный ранее метод [5] восстановительного расщепления гликозиламидной углевод-пептидной связи в гликопротеине под действием щелочного LiBH<sub>4</sub> в водном трет-бутаноле. Как было установлено на ряде гликопротеинов, в среднем при такой обработке отщепляется ~50% углеводных цепей в виде восстановленных олигосахаридов, причем каких-либо побочных реакций, в том числе N-деацетилирования, не наблюдается.

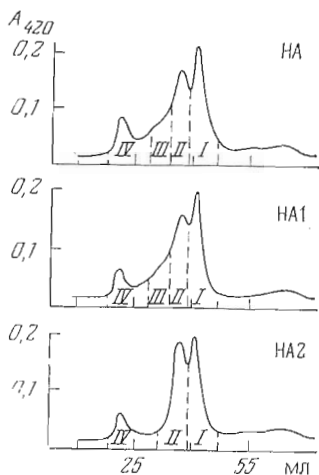


Рис. 1

Рис. 1. Гель-хроматография олигосахаридных фракций из HA, HA1 и HA2 на биогеле Р-6 (-400 меш). Колонка 0,9×140 см; элюент - 0,1 н.  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Поглощение в реакции с орцином и  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

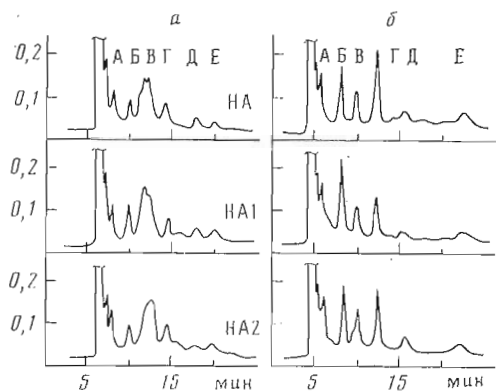


Рис. 2

Рис. 2. Хроматография олигосахаридных фракций I (а) и II (б) из HA, HA1 и HA2 (см. рис. 1) на колонках с обращенной фазой. а - Lichrosorb RP-18 (две спаренные колонки 4,6×250 мм), б - Lichrosorb RP-8 (4,6×250 мм). Элюент - вода

Отщепление углеводных цепей по этому методу сопровождается интенсивным расщеплением полипептидной цепи, поэтому неотщепившиеся олигосахаридные фрагменты могут выделяться и изучаться далее в виде гликопептидов.

Поскольку при разделении цепей HA1 и HA2 необходимым компонентом помимо дитиотреита является детергент (в нашем случае додецилсульфат натрия), а его удаление - трудоемкая процедура, необходимо было убедиться в том, что наличие большого количества детергента в реакционной смеси не мешает реакции восстановительного дегликозилирования гликопротеина. Предварительные опыты по восстановительному расщеплению образцов HA1 и HA2 (содержащих 2-3 мг додецилсульфата натрия на 1 мг гликопротеина) показали, что углеводные цепи и в этом случае отщепляются с хорошим выходом (60-70%). Поэтому в последующих опытах обработку образцов HA проводили в отсутствие, а образцов HA1 и HA2 - в присутствии додецилсульфата натрия. По окончании реакции и отгонки избытка бората упариванием с подкисленным метанолом детергент удаляли из реакционной смеси экстракцией *n*-бутанолом.

Поскольку при восстановительном расщеплении гликозиламидной связи часть отщепившихся углеводных фрагментов имеет на восстанавливаемом конце остаток гликозиламина, который при подкислении гидролизуетсся с образованием восстанавливающего олигосахарида [5], продукты реакции после обессоливания на сефадексе G-15 дополнительно восстанавливали  $\text{NaBH}_4$ . Далее смесь восстановленных олигосахаридов и гликопептидов разделяли ионообменной хроматографией на AG-50 ( $\text{H}^+$ ). При промывке колонки водой получали олигосахаридную фракцию, а при последующей элюции 0,7 М  $\text{NH}_4\text{OH}$  - гликопептидную фракцию. Анализ фракций показал, что независимо от исходного гликопротеина (HA, HA1 или HA2) в среднем ~60% углеводов переходит в олигосахаридную фракцию, в которой на 1 моль глюкозаминита приходится ~4, 4, 2 и 1 моль маннозы, глюкозамина, галактозы и фукозы соответственно, тогда как в гликопептидной фракции глюкозаминит практически отсутствует.

Гель-хроматография олигосахаридных фракций на биогеле Р-6 (рис. 1) показала сходное распределение по молекулярной массе олигосахаридов, выделенных из гликопротеинов HA, HA1 и HA2. Можно отметить лишь,

Относительный выход фракций олигосахаридов из гемагглютинина (см. рис. 1) и молярное соотношение моносахаридов в них

Фракция	Относительный выход по моносахаридам, %				Соотношение моносахаридов, моль/моль Fuc			
	GlcNAc	Man	Gal	Fuc	GlcNAc	Man	Gal	Fuc
I	9,2	56,8	18,6	18,1	4,7	9,6	1,9	1,0
II	40,7	28,7	42,8	39,1	2,6	2,3	1,9	1,0
III	27,4	8,6	22,5	20,5	2,4	1,3	1,8	1,0
IV	21,7	5,9	16,1	22,3	1,8	0,6	1,3	1,0

что в смеси олигосахаридов из HA2 содержится больше олигосахаридов, входящих во фракцию II, и, наоборот, практически отсутствует олигосахаридная фракция III. Относительный выход фракций I—IV (отдельно по каждому моносахариду) показан на примере олигосахаридов из HA (табл. 1). Картина элюции, в частности место выхода главных фракций I и II, и моносахаридный состав полученных фракций (табл. 1) соответствуют хорошо известным данным [2, 6] по гель-хроматографии олигосахаридных фрагментов N-гликозилпротеинов. Основываясь на этих данных, можно заключить, что фракция I является смесью «олигоманнозидных» олигосахаридов (B-типа) и наиболее низкомолекулярных «комплексных» олигосахаридов (A-типа); фракции II и III содержат более высокомолекулярные олигосахариды A-типа, а фракция IV с нехарактерным для углеводных цепей N-гликозилпротеинов моносахаридным составом обусловлена примесями в исходном препарате или, возможно, содержит необычно большие олигосахариды.

Такая интерпретация результатов фракционирования олигосахаридов из HA в целом согласуется с имеющимися данными [7, 8] о наличии в молекуле гемагглютинина различных штаммов вируса (с антигенной формулой H3N2) двух цепей B-типа и пяти-шести цепей A-типа. Вместе с тем очень близкая картина распределения олигосахаридов, выделенных из HA1 и HA2 (рис. 1), никак не соответствует представлению о наличии двух B-цепей и четырех-пяти A-цепей в HA1 и только одной A-цепи в HA2 [7, 8]. Полученные нами результаты показывают, что, несмотря на различное число сайтов в гликопротеинах HA1 и HA2, соотношение A- и B-цепей в них примерно одинаково.

Следующий этап работы состоял в выяснении различий в распределении отдельных индивидуальных углеводных цепей в HA1 и HA2. Хорошо известно, что углеводные фрагменты гликопротеинов как A-, так и B-типа обычно гетерогенны и различаются по молекулярной массе и степени разветвленности: числу и местоположению терминальных остатков маннозы (в цепях B-типа) и остатков глюкозамина, фукозы и нейраминной кислоты [9]. Поэтому выделение индивидуальных олигосахаридов из такой сложной смеси олигосахаридов, которая образуется после отщепления углеводных цепей, состоящих из 7—15 моносахаридных остатков, представляет очень трудную и во многих случаях еще не решенную проблему.

Ранее для разделения олигосахаридов, выделенных из O-гликозилпротеинов, нами с успехом применялась анионообменная хроматография в боратном буфере [10, 11], однако попытки использовать ее для фракционирования смеси олигосахаридов, полученной из N-гликозилпротеина — гемагглютинина, показали недостаточную ее эффективность. В последние годы быстро развивается метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), применявшийся и для разделения олигосахаридных цепей N-гликозилпротеинов [12]. В результате отработки условий хроматографии (тип колонки, элюент, скорость элюции и т. д.) мы разработали следующую схему выделения индивидуальных олигосахаридов из фракций I и II, составляющих основную часть смеси и использовавшихся для дальнейшего изучения. Сначала фракции I и II (рис. 1) разделяли на колонке с обращенной фазой (Lichrosorb RP-18 для фракции I и Lichrosorb

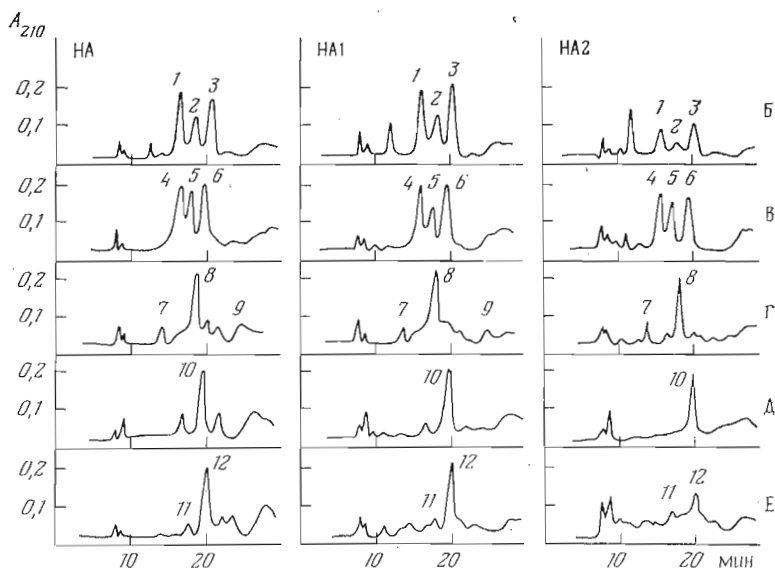


Рис. 3. Хроматография компонентов фракции I (Б-Е; рис. 2а) из НА, НА1 и НА2 на аминоколонке (Alltech NH<sub>2</sub>, две спаренные колонки 4,6×250 мм); элюент — метанол — вода (3:1). Обозначены олигосахариды, выделенные препаративно

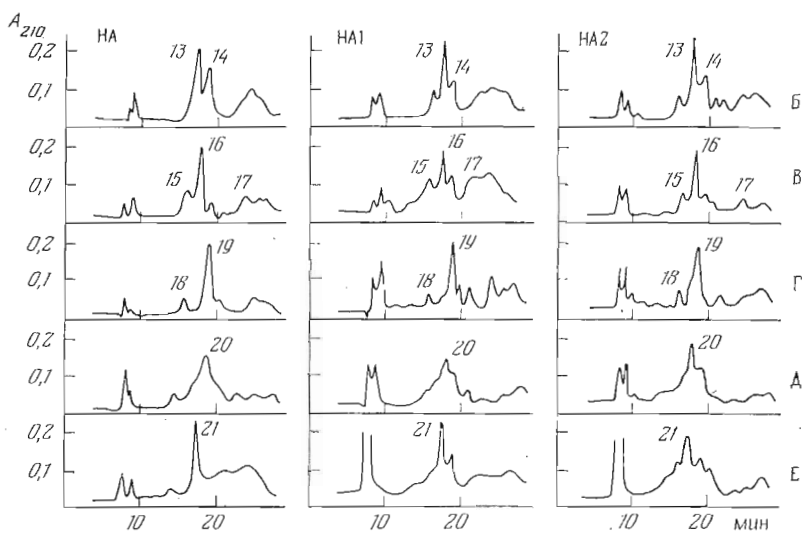
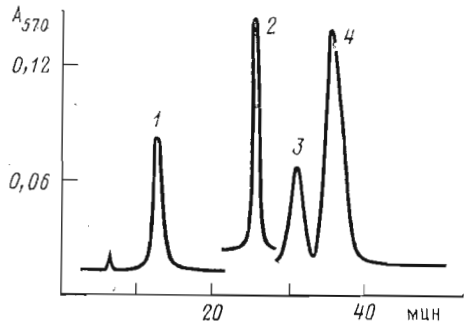


Рис. 4. Хроматография компонентов фракции II (Б-Е; рис. 2б) из НА, НА1 и НА2 на аминоколонке (условия см. рис. 3). Обозначены олигосахариды, выделенные препаративно

RP-8 для фракции II), используя в качестве элюента воду, причем для лучшего разрешения и увеличения количества разделяемой за один прием смеси в некоторых случаях применяли две последовательно соединенные колонки. Далее каждый из полученных компонентов (I.Б — I.Е и II.Б — II.Е, рис. 2а, б) подвергали хроматографии на силикагеле, модифицированном аминопропильными группами (Alltech NH<sub>2</sub>), также используя две последовательно соединенные колонки, а в качестве элюента — 75% водный метанол (рис. 3, 4). Следует отметить, что метанол, который довольно редко используется как компонент элюента при ВЭЖХ олигосахаридов, не требует столь тщательной очистки при УФ-детекции, как, например, обычно применяемый ацетонитрил, и, как показано нами, дает вполне удовлетворительные результаты при разделении сложных смесей олигосахаридов.

Рис. 5. Анионообменная хроматография моносахаридов на колонке (0,4×25 см) с DA×8 в 0,7 М К-боратном буфере, pH 8,0. Стандартная смесь сахаров: 1 — глюкозамин; 2 — манноза; 3 — фукоза; 4 — галактоза (все по 20 нмоль). Площадки в реакции с Си-бицинхонинатом (570 нм). Маннозу регистрировали при растяжке шкалы 0—0,5 ОЕ, прочие сахара — при 0—0,2 ОЕ



Разделение олигосахаридных фракций I и II из НА, НА1 и НА2 проводилось в одинаковых условиях. Во всех случаях получены очень похожие картины распределения отдельных компонентов при небольшом колебании их относительного количества (рис. 2а, б). Равным образом, очень близки картины распределения индивидуальных олигосахаридов, полученные на аминоколонке (рис. 3, 4). Таким образом, гликопротеины НА1 и НА2 содержат одно и то же число различных олигосахаридов с примерно равным их соотношением.

Олигосахариды 1—21 (рис. 3, 4) из всех трех гликопротеинов были выделены препаративно. Анионообменная хроматография в боратном буфере подтвердила хроматографическую однородность полученных образцов олигосахаридов. Идентичные по хроматографическим свойствам олигосахариды из НА, НА1 и НА2 объединялись для последующего их изучения. Необходимо заметить, что некоторые олигосахариды (например, 1—3; 4—6; 13, 14, 16, 18, 20, 19, 21) имеют практически одинаковую хроматографическую подвижность при анионообменной хроматографии, что и объясняет неудачные попытки выделения индивидуальных олигосахаридов этим методом.

Поскольку количество каждого индивидуального олигосахаридов было очень мало, для анализа их моносахаридного состава был отработан метод одновременного определения глюкозамина, маннозы, галактозы и фукозы, основанный на разделении гидролизатов олигосахаридов анионообменной хроматографией в боратном буфере (рис. 5) и детекции моносахаридов с помощью Си-бицинхонината [13]. Несмотря на то что этот реагент известен давно, он почти не применяется при анализе моносахаридного состава гликопротеинов. В то же время его использование позволяет значительно сократить количество требуемого для анализа вещества, что особенно важно при изучении малых количеств гликопротеинов. В разработанных нами условиях этот метод позволяет за 40 мин определить моносахаридный состав на 5—10 нмоль олигосахаридов.

Предварительные данные о составе выделенных олигосахаридов (табл. 2) свидетельствуют, что олигосахариды фракции I (рис. 1) — действительно в основном цепи В-типа, а все олигосахариды, выделенные из фракции II, — цепи А-типа. Некоторые олигосахариды (например, 3, 4; 1, 7, 8; 14, 16; 15, 18, 19) имеют очень близкий моносахаридный состав и, вероятно, являются изомерами; другие олигосахариды (минорные 9—12), по-видимому, не являются индивидуальными. В процессе дальнейшего изучения олигосахаридов эти вопросы будут уточняться.

Как уже отмечалось, на различных штаммах вируса гриппа (А/Мемphis/102/72, А/Aichi/2/68, А/Victoria/3/75, все H3N2) [7, 8], родственных изучавшемуся нами, и некоторых других (например, А/USSR/90/77, H1N1) [14, 15] было установлено, что в молекуле гемагглютинина имеется семь-восемь гликозилированных сайтов, причем шесть-семь из них находятся в субъединице НА1 и только один (несущий цепь А-типа) — в субъединице НА2. Полученные нами результаты показывают, что в гемагглютинине вируса А/Ленинград/385/80 (H3N2) на эти семь-восемь сайтов приходится как минимум 8 различных цепей В-типа и более 13 це-

Моносахаридный состав олигосахаридов

Номер олигосахаридов	Олигосахариды из фракции I *				Номер	Олигосахариды из фракции II *			
	GlcNAc	Man	Gal	Fuc		GlcNAc	Man	Gal	Fuc
1	1	6,3	0,2	Следы	13	4,0	3	2,1	Следы
2	1	8,2	Следы	0	14	4,1	3	2,3	2,2
3	1	6,7	0,1	0	15	4,3	3	2,0	1,0
4 **	1	7,1	Следы	0	16	3,7	3	2,1	1,8
5 **	1	7,8	0	0	17	4,5	3	2,3	2,1
6 **	1	9,3	0	0	18	4,4	3	2,2	0,9
7	1	5,4	0,1	Следы	19	3,6	3	2,1	1,0
8 **	1	5,7	Следы	0	20	4,8	3	2,3	1,2
9	1	3,3	0,5	0,3	21	5,1	3	2,2	1,3
10	1	5,1	0,4	0,1					
11	1	2,0	0,5	0,1					
12	1	1,8	0,5	Следы					

\* Для олигосахаридов из фракции I соотношение моносахаридов рассчитывалось на 1 моль GlcNAc, а для олигосахаридов из фракции II — на 3 моль Man. На восстанавливаемом конце олигосахаридов находится GlcNAc-ol, который в данном анализе не определялся.

\*\* Олигосахариды, выход которых в 5–10 раз больше, чем у остальных олигосахаридов фракции I.

пей А-типа. Хотя данные, указывающие на возможность наличия в одном и том же сайте индивидуальных молекул гемагглютинина различных углеводных цепей, уже имеются в литературе [1, 8, 16], такое большое число различных цепей из гемагглютинина вируса гриппа выделено впервые. Это стало возможным благодаря разработанной методике тщательного фракционирования смеси олигосахаридов с использованием ВЭЖХ на различных фазах. Особый интерес представляет тот факт, что очень высокая гетерогенность углеводных фрагментов характерна не только для гемагглютинина и его тяжелой цепи HA1, но и для легкой цепи HA2, имеющей, исходя из литературных аналогий [7, 8, 14], лишь один гликозилируемый остаток аспарагина. Наличие в субъединице HA2 более 20 различных углеводных цепей как А-, так и В-типа, причем в близких соотношениях, также установлено впервые. Эти факты, свидетельствующие о том, что в одном и том же сайте различные молекулы гемагглютинина имеют различные углеводные цепи, могут привести к коренному пересмотру представлений об особенностях гликозилирования гемагглютинина вируса гриппа, а возможно, и гликопротеинов вообще.

Причины наблюдаемой в гликопротеинах гетерогенности углеводных цепей в настоящее время неясны, а среди возможных рассматриваются в основном два варианта объяснения: 1) различия в активности (эффективности) гликозилирующего аппарата в различных популяциях клеток, синтезирующих гликопротеин; 2) влияние пространственной структуры полипептида на скорость процессинга углеводной цепи. Данные в пользу той или иной гипотезы пока только накапливаются [3, 16–20], и лишь последующее детальное изучение этого важного явления на различных клетках и вирусах может прояснить его смысл в биологических системах.

### Экспериментальная часть

Высокоэффективная жидкостная хроматография олигосахаридов проводилась на хроматографе Altex (США), модель 332, с использованием спектрофотометра Knauer (ФРГ) и колонок Lichrosorb RP-8, Lichrosorb RP-18 и Alltech NH<sub>2</sub> (Alltech, США). Для анионообменной хроматографии олигосахаридов и количественного анализа моносахаридов использовали жидкостный хроматограф Biotronik LC 2000 (ФРГ). Аминокислоты, глюкозамин и глюкозаминит определяли с помощью анализатора аминокислот Biotronik LC 4010 (ФРГ).

*Отщепление углеводных цепей гемагглютинина.* Образцы HA, HA1 и HA2 получены и охарактеризованы с помощью гель-электрофореза по описанному ранее методу [4].

Лиофилизированный образец гликопротеина, содержащий ~40 мг белка (аминокислотный анализ), растворяли в 8 мл воды, приливали 1,6 мл 1 М LiOH и 22,4 мл *трет*-бутанола, раствор охлаждали до 0° С и при охлаждении прибавляли порциями 800 мг LiBH<sub>4</sub>. Реакционную смесь выдерживали с обратным холодильником 10 ч при 50° С, прибавляли конц. CH<sub>3</sub>COOH для разрушения избытка LiBH<sub>4</sub>, упаривали в вакууме при 40° С до небольшого объема, прибавляли 10 мл метанола и несколько капель CH<sub>3</sub>COOH и упаривали (эту операцию повторяли 4—5 раз). Метанол отгоняли упариванием водного раствора, продукт растворяли в 15 мл воды, раствор экстрагировали *n*-бутанолом (5×10 мл), водный раствор упаривали, остаток растворяли в воде и обессоливали на колонке с сефадексом G-15 (1,2×70 см) в 0,1 М CH<sub>3</sub>COOH. Фракции, выходящие при 0,3—0,5 объема колонки и дающие реакцию на углеводы с орцином и H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, объединяли и упаривали. Продукт растворяли в 1 мл 0,05 М NaOH, прибавляли ~15 мг NaBH<sub>4</sub> и смесь выдерживали 16 ч при 20° С. После подкисления CH<sub>3</sub>COOH раствор упаривали несколько раз с метанолом, остаток растворяли в 1 мл воды и наносили на колонку (0,5×7 см) с AG-50 в H<sup>+</sup>-форме (Bio-Rad, США). Колонку промывали 20 мл воды, затем 0,7 М NH<sub>4</sub>OH и в полученных олигосахаридной и гликопептидной фракциях определяли содержание моносахаридов.

*Фракционирование олигосахаридов на биогеле Р-6.* Смесь олигосахаридов (~3—5 мг) растворяли в 0,3 мл 0,1 М CH<sub>3</sub>COOH и наносили на колонку (0,9×110 см) с биогелем Р-6 (—400 меш, Bio-Rad, США). Элюцию проводили 0,1 М CH<sub>3</sub>COOH со скоростью 2 мл/ч; собирали фракции по 0,5 мл, которые анализировали на углеводы реакцией с орцином и H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Фракции объединяли, как показано на рис. 1, и определяли в них содержание моносахаридов. Относительное содержание моносахаридов в каждой фракции рассчитывали, принимая содержание их во всех фракциях за 100% (табл. 1).

*Высокоэффективная жидкостная хроматография олигосахаридов.* Олигосахаридные фракции I из НА, НА1 и НА2 разделяли (50—200 мкг за прием) на двух последовательно соединенных колонках (4,6×250 мм) с Lichrosorb RP-18; скорость элюента (бидистиллят) 0,8 мл/мин, детекция при 210 нм. Компоненты Б—Е (рис. 2а) из НА, НА1 и НА2 выделены препаративно.

*Разделение фракций II* (100—300 мкг за прием) осуществляли на колонке (4,6×250 мм) с Lichrosorb RP-8; градиент скорости элюента (бидистиллят) 0,5→2 мл/мин за 15 мин; детекция при 210 нм. Компоненты Б—Е (рис. 2б) из НА, НА1 и НА2 выделены препаративно.

*Разделение олигосахаридов на аминоколонке.* Фракции олигосахаридов, полученные в результате хроматографии фракций I и II (I.Б—I.Е и II.Б—II.Е), растворяли в 50 мкл 75% метанола и наносили на колонку Alltech NH<sub>2</sub> (две последовательно соединенные колонки 4,6×250 мм); скорость элюции 0,8 мл/мин; детекция при 210 нм. Олигосахариды 1—21 (рис. 3, 4) выделены препаративно.

*Анионообменная хроматография олигосахаридов.* Аликвоту полученных в результате хроматографии на аминоколонке олигосахаридов, содержащую 10—20 нмоль нейтральных сахаров, анализировали на колонке (0,4×25 см) с DA×8 (11 мкм, Durrum, США) при 70° С в 0,4 или 0,2 М Na-боратном буфере, pH 8,0; скорость буфера и реагента (0,1% орцин в конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 35 мл/ч, детекция при 420 нм.

*Определение моносахаридного состава олигосахаридов.* Аликвоту олигосахаридов, содержащую 20—30 нмоль нейтральных сахаров, гидролизировали 3 М CF<sub>3</sub>COOH 6 ч при 100° С, высушивали в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и KOH и анализировали с помощью анионообменной хроматографии на колонке (0,4×25 см) с DA×8 (11 мкм) при 70° С в 0,7 М K-боратном буфере, pH 8,0 (рис. 5); скорость буфера и реагента (2,2'-бидикхонинат меди [13]) — по 27 мл/ч; детекция при 570 нм.

В ряде случаев нейтральные сахара определяли после хроматографии в 0,5 М Na-боратном буфере, pH 8,0, по реакции с орцином и H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Глюкозамин и глюкозаминит определяли после гидролиза 4 н. HCl (6 ч, 100° С) с помощью анализатора аминокислот на колонке (0,9×23 см) с аминексом А-5 в 0,35 М Na-цитратном буфере, рН 5,3.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Matsumoto A., Yoshima H., Kobata A.* Biochemistry, 1983, v. 22, № 1, p. 188–196.
2. *Nakamura K., Compans R. W.* Virology, 1979, v. 95, № 1, p. 8–23.
3. *Hsieh P., Rosner M. R., Robbins P. W.* J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 4, p. 2548–2554.
4. *Арбатский Н. П., Лихошерстов Л. М., Медведев С. А., Новикова О. С., Сенченкова С. Н., Юртов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К.* Докл. АН СССР, 1983, т. 271, № 5, с. 1257–1260.
5. *Лихошерстов Л. М., Новикова О. С., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К.* Докл. АН СССР, 1984, т. 274, № 1, с. 222–225.
6. *Chandrasekaran E. V., Davila M., Nixon D. W., Goldfarb M., Mendicino J. J.* Biol. Chem., 1983, v. 258, № 11, p. 7213–7222.
7. *Ward C. W., Gleeson P. A., Dopheide T. A.* Biochem. J., 1980, v. 189, № 3, p. 649–652.
8. *Ward C. W., Dopheide T. A.* Biochem. J., 1981, v. 193, № 3, p. 953–962.
9. *Sharon N., Lis G.* The Proteins. 3d ed., v. 5/Eds Neurath H., Hill P. L. N. Y.–L.: Acad. Press, 1982, p. 1–144.
10. *Деревицкая В. А., Арбатский Н. П., Кочетков Н. К.* Докл. АН СССР, 1975, т. 223, № 5, с. 1137–1139.
11. *Derevitskaya V. A., Arbatsky N. P., Kochetkov N. K.* Eur. J. Biochem., 1978, v. 86, № 2, p. 423–437.
12. *Honda S.* Analyt. Biochem., 1984, v. 140, № 1, p. 1–47.
13. *Sinner M., Puls J. J.* Chromatogr., 1978, v. 156, № 1, p. 197–204.
14. *Basak S., Pritchard D. G., Bhowan A. S., Compans R. W.* J. Virology, 1981, v. 37, № 2, p. 549–558.
15. *Харитonenков И. Г.* Вопросы вирусологии, 1981, № 3, с. 262.
16. *Klenk H.-D., Kiel W., Niemann H., Geyer R., Schwarz R. T.* New Develop. Diagn. Virol. Berlin e. a., 1983, p. 247–257.
17. *Grey A. A., Narasimhan S., Brisson J.-R., Schachter H., Carver J. P.* Can. J. Biochem., 1982, v. 60, № 12, p. 1123–1131.
18. *Swiedler S. J., Hart G. W., Tarentino A. L., Plummer T. H. Jr., Freed J. H. J.* Biol. Chem., 1983, v. 258, № 19, p. 11515–11523.
19. *Mellis S. J., Baenziger J. U.* J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 19, p. 11546–11556.
20. *Anderson D. R., Grimes W. J. J.* Biol. Chem., 1982, v. 257, № 24, p. 14858–14864.

Поступила в редакцию  
2.1.1985

#### HETEROGENEITY OF CARBOHYDRATE FRAGMENTS IN HEAVY AND LIGHT CHAINS OF INFLUENZA VIRUS A/LENINGRAD/385/80 (H3N2) HEMAGGLUTININ

ARBATSKY N. P., ZHELTOVA A. O., LIKHOSHERSTOV L. M.,  
SENCHENKOVA S. N., IURTOV D. V., DEREVITSKAYA V. A.,  
KOCHETKOV N. K.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

Comparative analysis of carbohydrate chains variations in influenza virus A/Leningrad/385/80 (H3N2) hemagglutinin (HA) and its heavy (HA1) and light (HA2) chains has been carried out. The carbohydrate chains of these three glycoproteins were eliminated by reductive cleavage of N-glucosaminidic linkages under  $\text{LiBH}_4$  – *tert*-BuOH treatment. Fractionation of the oligosaccharides thus obtained by means of gel chromatography and HPLC resulted in isolation of 21 individual oligosaccharides from each glycoprotein. Their monosaccharide composition revealed almost identical pattern of high-mannose as well as complex chains in HA1 and HA2 in spite of different number (6–7 in HA1 and only 1 in HA2) of glycosylated sites. The possibility of a great number of both high-mannose and complex chains attached at the same site of glycoprotein is shown.