



УДК 547.963.1.02

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ
РИБОФЛАВИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО ГЛИКОПРОТЕИНА БЕЛКА
КУРИНОГО ЯЙЦА*Лихшерстов Л. М., Нискарев В. Е., Галенко Е. Л.,
Деревицкая В. А., Кочетков Н. К.**Институт органической химии им. П. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Методом восстановительного расщепления N-гликозиламидной углевод-пептидной связи проведено отщепление углеводных цепей рибофлавинсвязывающего гликопротеина куриного белка. Из полученной смеси олигосахаридов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии выделено 12 олигосахаридов и установлен их состав. Высказано предположение о близости структуры олигосахаридов рибофлавинсвязывающего гликопротеина и овомукунда.

Среди белков куриного яйца важное место занимают транспортные гликопротеины, участвующие в переносе ионов металлов, коферментов, витаминов. Лучше других исследованы овотрансферрин — переносчик ионов железа [1], а также авидин, интенсивно изучающийся в последние годы в связи с широким использованием в биохимии его комплексов с биотином [2]. Однако о структуре углеводных цепей транспортных гликопротеинов яйца известно мало.

Важное место среди транспортных белков яйца принадлежит рибофлавинсвязывающим гликопротеинам белка (РФ-ГП_б) и желтка (РФ-ГП_ж), участвующим в переносе витамина В₂ — рибофлавина. Их полипептидные цепи имеют близкую аминокислотную последовательность, однако состав углеводных цепей этих гликопротеинов различен. В РФ-ГП_ж много сиаловых кислот, причем соотношение галактоза — сиаловые кислоты равно примерно 1, а в РФ-ГП_б сиаловых кислот и галактозы мало, зато он богат N-ацетилглюкозамином [3, 4]. Выделение олигосахаридных цепей обоих гликопротеинов и изучение их структуры представляет интерес с точки зрения выяснения особенностей биосинтеза гликопротеинов птиц и роли их углеводных цепей. Целью настоящей работы является выделение индивидуальных олигосахаридов РФ-ГП_б и их характеристика.

Примененная нами процедура выделения индивидуального гликопротеина с использованием ионообменной хроматографии основывалась на низкой изоэлектрической точке РФ-ГП_б (рI ~ 3,9–4,4), обусловленной присутствием в его молекуле остатков фосфорина [5]. Уже на стадии элюции с DEAE-Servacel чистота РФ-ГП_б составляла, по данным электрофореза, не менее 90–95%. Присутствующий в качестве небольшой примеси белок с молекулярной массой 45 000 Да является, по всей видимости, овальбумином, который также имеет низкую изоэлектрическую точку (рI ~ 4,2) и в таких условиях может задерживаться на анионообменнике. Последующая хроматография на DEAE-Trisacryl в линейном градиенте NaCl позволила выделить полностью очищенный гликопротеин (рис. 1).

Полученный РФ-ГП_б при электрофорезе в ПААГ в присутствии SDS давал единственную полосу, обнаруживаемую реактивами как на белки, так и на углеводы, и имел следующий углеводный состав (в молях на моль белка): манноза — 6,0, галактоза — 1,2, N-ацетилглюкозамин — 11,3,

Сокращения: РФ-ГП_б, РФ-ГП_ж — рибофлавинсвязывающие гликопротеины белка и желтка; ПААГ — полиакриламидный гель; SDS — додецилсульфат натрия.

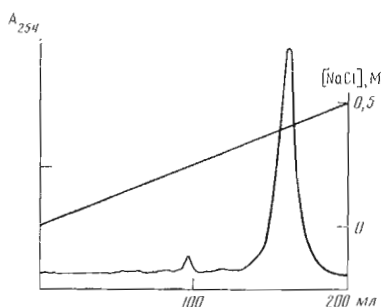


Рис. 1

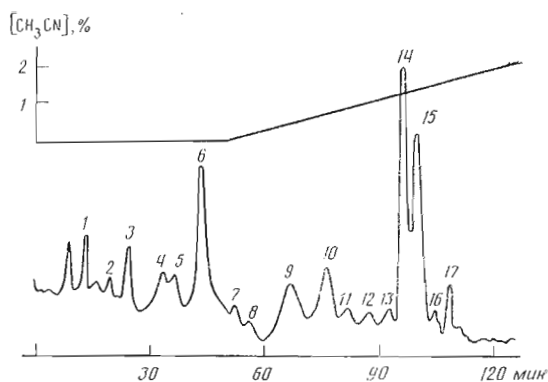


Рис. 2

Рис. 1. Очистка РФ-ГП₆ на колонке с DEAE-Trisacryl. Скорость потока 1 мл/мин

Рис. 2. Разделение смеси восстановленных олигосахаридов РФ-ГП₆ на колонке μBondapak C₁₈. Скорость потока 2 мл/мин, детекция при 205 нм

сиаловые кислоты — 0,5, что очень хорошо согласуется с последними литературными данными [3].

Для отщепления олигосахаридов использовали гликопептиды, полученные проназным гидролизом РФ-ГП₆. В исходную методику расщепления N-гликозиламидной связи* с помощью щелочного LiNH₂ в водном *трет*-бутаноле, разработанную нами ранее [6], были внесены некоторые изменения, позволившие увеличить выход олигосахаридной фракции на 15–20%. Вместо 1 М раствора LiNH₂ использовали 2 М раствор, время расщепления составляло 5–6 ч против 16, а разложение избытка боргидрида после окончания реакции достигалось добавлением ацетона при 5° С. Нерасщепившиеся гликопептиды отделяли ионообменной хроматографией и полученные олигосахариды обрабатывали NaBH₄ для восстановления гликозидных центров. Выход восстановленных олигосахаридов составлял 55–60%. Повторная обработка нерасщепившихся гликопептидов в тех же условиях позволила дополнительно получить олигосахариды с выходом 25%, и, таким образом, общий выход восстановленных олигосахаридов составил 75%.

Анализ углеводного состава олигосахаридной и гликопептидной фракций показал, что преимущественного отщепления каких-либо олигосахаридных структур не происходит. Полное отсутствие глюкозаминита в гликопептидной фракции свидетельствует о том, что расщепление не сопровождается N-деацетилированием. Дегградации или отщепления сиаловых кислот также не наблюдалось.

Полученные олигосахариды фракционировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Сначала смесь олигосахаридов разделяли на колонке с обращенной фазой μBondapak C₁₈, ведя элюцию водой и применяя пологий линейный градиент ацетонитрила в конце деления (рис. 2). Таким образом было получено 17 фракций, однако из-за малых количеств вещества фракции 2, 5, 7, 8, 11, 12 и 16 далее не анализировались. Остальные фракции повторно хроматографировали на той же колонке, и при этом каждая из них выходила в виде единственного пика. Дальнейшую очистку олигосахаридов проводили на колонке с «аминофазой» μBondapak NH₂ — модифицированном аминопропильными группами силикагеле, предложенном ранее для деления сложных олигосахаридных смесей [7, 8]. При этом сиалоолигосахариды, содержащиеся в незначительном количестве в исходной смеси, сорбировались на аминофазе, и дальнейшую работу прово-

* Ранее [3] было показано наличие в РФ-ГП₆ двух углеводных цепей, связанных с остатками Asn³⁶ и Asn¹⁴⁷ полипептидной цепи посредством N-гликозиламидной связи.

Состав олигосахаридов РФ-ГП₆ *

| Номер олигосахариды ** | GlcNAc | GlcNAc _{ol} | Man | Gal | Выход олигосахариды, мкг | GlcNAc+GlcNAc _{ol} | |
|------------------------|--------|----------------------|-----|------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| | | | | | | Man | GlcNAc GlcNAc _{ol} |
| 1-1 | 3,26 | 0,56 | 3 | 0 | 74 | 1,27 | 5,76 |
| 3-1 | 1,24 | 0,45 | 3 | 0 | 62 | 0,56 | 2,73 |
| 3-2 | 2,95 | 0,77 | 3 | 0 | 285 | 1,24 | 3,82 |
| 3-3 | 3,62 | 0,60 | 3 | 0 | 123 | 1,41 | 6,03 |
| 4 | 3,78 | 0,78 | 3 | 0 | 30 | 1,52 | 4,82 |
| 6 | 3,62 | 0,74 | 3 | 0 | 1741 | 1,45 | 4,87 |
| 9 | 4,68 | 0,94 | 3 | 0 | 126 | 1,87 | 4,93 |
| 10-1 | 6,84 | 0,81 | 3 | 0,59 | 267 | 2,55 | 8,46 |
| 10-2 | 5,47 | 0,68 | 3 | 0,91 | 163 | 2,05 | 8,03 |
| 14 | 4,43 | 0,73 | 3 | 0 | 1973 | 1,72 | 6,03 |
| 15 | 6,7 | 1,15 | 3 | 1,23 | 963 | 2,62 | 5,83 |
| 17 | 6,9 | 1,12 | 3 | 1,20 | 50 | 2,67 | 6,16 |

* Соотношение олигосахаридов рассчитывалось на 3 моль Man.
** См. рис. 2, 3.

дли с нейтральными олигосахариды, элюируемымы в градиенте вода — ацетоцитрил (рис. 3). Выяснилось, что фракции 4, 6, 9, 14, 15, 17 однородны и, вероятно, содержали индивидуальные олигосахариды уже после обращенно-фазовой хроматографии, а фракции 1, 3, 10 выходили на «аминофазе» в виде двух и более пиков. Препаративным разделением последних были получены олигосахариды 1-1, 3-1, 3-2, 3-3, 10-1, 10-2. Таким образом было выделено 12 олигосахаридов, из которых явно превалируют олигосахариды 6, 14, 15 (таблица).

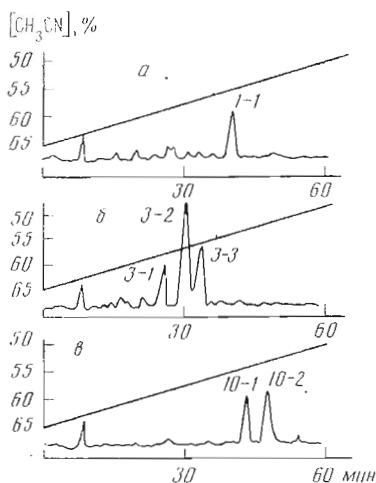
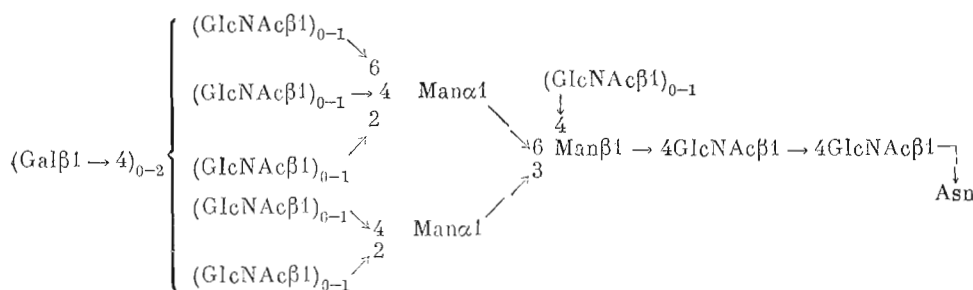


Рис. 3. Разделение фракций 1 (а), 3 (б) и 10 (в) на колонке μBondapak NH₂. Скорость потока 2 мл/мин, детекция при 205 нм

На основании состава олигосахаридов, данные о которых приведены в таблице, можно предположить, что выделенные олигосахариды построены по типу цепей овомукоида — хорошо изученного гликопротеина белка куриного яйца [9]. Для углеводных цепей этого гликопротеина характерно наличие до 6 остатков β-N-ацетилглюкозамина, связанных с пентасахаридным кором, и незначительное содержание галактозы и сиаловых кислот. Общую схему построения олигосахаридов овомукоида можно представить следующим образом [9]:



Очевидно, структуры выделенных нами олигосахаридов РФ-ГП₆ укладываются в эту схему, причем олигосахарид 3-1, вероятно, соответствует минимальной цепи — пентасахаридному кору, а олигосахариды 15 и 17 имеют «предельные» структуры, отвечающие наличию при коре 6 остатков β-N-ацетилглюкозамина и 1–2 остатков галактозы.

В настоящее время ведется работа по установлению структуры этих олигосахаридов, а также выделению и характеристике олигосахаридов РФ-ГП_к.

Экспериментальная часть

Выделение РФ-ГП_б. Белки из 30 куриных яиц отделяли от желтков и добавляли равный объем 0,1 М Na-ацетатного буфера, pH 5,0, содержащего 0,1% 1,1,1-трихлор-2-метилпропанола-2 (Serva, ФРГ). Смесь перемешивали на магнитной мешалке 30 мин и обрабатывали на центрифуге Janetzki K-70 (ГДР) 30 мин при 2500 g. Супернатант наносили на колонку (4×20 см) с DEAE-Servacel 23 SH (Reanal, ВНР), уравновешенную тем же буфером. После посадки белка (яркая желтая зона в верхней части колонки) колонку промывали еще 3–4 л буфера, затем элюировали РФ-ГП_б 200 мл 0,5 М Na-ацетатного буфера, pH 5,0, с 0,1% 1,1,1-трихлор-2-метилпропанола-2, элюат разбавляли в пять раз водой и наносили на колонку (1,6×50 см) с DEAE-Trisacryl (LKB, Швеция). Хроматографию проводили в линейном градиенте NaCl (0→0,5 М) в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH 5,0 (рис. 1). Фракции, содержащие РФ-ГП_б и гомогенные по данным электрофореза в ПААГ, объединяли. Гликопротеин обессоливали в системе для ультрафильтрации в тангенциальном потоке Minitan (Millipore, США) на мембранах с пределом пропускания 10 000 Да и получали 300 мг РФ-ГП_б. Чистоту РФ-ГП_б контролировали с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии 0,2% SDS [10], белок проявляли ку-масси бриллиантовым голубым R-250, углеводы — реактивом Шиффа.

Белок определяли по методу [11].

Получение гликопептидов РФ-ГП_б. 300 мг РФ-ГП_б растворяли в 40 мл буфера 0,1 М трис-HCl, pH 8,0, содержащего 5 мМ CaCl₂. К раствору добавляли 30 мг протеиназы из *Streptomyces griseus* (Pronase, Calbiochem, США), предварительно подвергнутой автолизу (30 мин при 45°С), и 2 мл толуола. Смесь инкубировали при 45°С, добавляя через 24 и 48 ч по 15 мг автолизированного фермента.

По окончании протеолиза смесь упаривали досуха, растворяли в 30 мл 0,1 М CH₃COOH, фильтровали через Millex-NV (Millipore, США) и наносили на колонку (3,5×90 см) с сефадексом G-15 (Pharmacia, Швеция) в 0,1 М CH₃COOH. Фракции, содержавшие углеводы, объединяли и получали 50 мг гликопептидов.

Отщепление углеводных цепей РФ-ГП_б. 50 мг гликопептидов растворяли в 6,25 мл H₂O и добавляли 1,25 мл 1 М LiOH и 17,5 мл *трет*-бутанола. В смесь при охлаждении и перемешивании порциями прибавляли LiBH₄ (Fluka, Швейцария). Концентрация компонентов смеси составляла: *трет*-бутанол — 70%, LiOH — 0,05 М, LiBH₄ — 2 М, гликопептиды — 2 мг/мл. Реакцию проводили в термостате 5–6 ч при 50°С. По окончании реакции реакционную массу разбавляли водой и избыток LiBH₄ разлагали добавлением 15 мл ацетона при ~5°С. После подкисления смеси CH₃COOH и удаления борной кислоты многократной отгонкой с метанолом смесь упаривали досуха, растворяли в 20 мл 0,1 М CH₃COOH и обессоливали на колонке (3,5×90 см) с сефадексом G-15 в 0,1 М CH₃COOH. Углеводсодержащие фракции объединяли и упаривали. Отделение олигосахаридов от нерасщепившихся гликопептидов проводили на колонке (0,5×10 см) с AG 50W-X2 (200–325 меш) в H⁺-форме (Bio-Rad, США). Олигосахаридную фракцию элюировали водой (20 мл), гликопептиды — 1 М NH₄OH (20 мл). Выход олигосахаридов (после упаривания с толуолом досуха) 30 мг.

Олигосахаридную фракцию растворяли в 2 мл 0,05 М NaOH, прибавляли 30 мг NaBH₄ (Merck, ФРГ), оставляли на 24 ч при 20°С. Избыток NaBH₄ разлагали CH₃COOH, борную кислоту удаляли многократной отгонкой с метанолом. Продукт растворяли в 3 мл 0,1 М CH₃COOH, обессоливали на колонке (1×100 см) с сефадексом G-15 в 0,1 М CH₃COOH и лиофилизировали. Выход 25 мг.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Для ВЭЖХ использовали систему и оборудование фирмы Millipore-Waters (США).

Система состояла из двух насосов (модель 510), инжектора (модель У6К), градиент-контролера (модель 721), спектрофотометра (Lambda-Max, модель 481) и интегратора (модель 730). После инжектора стоял фильтр с порами 0,50 мкм и предколонка Guard-ПАК C₁₈ или Guard-ПАК CN соответственно для обращенно-фазовой и нормально-фазовой хроматографии. Для элюции использовали воду, очищенную с помощью системы Milli-Q, и ацетонитрил для спектроскопии (Merck, ФРГ), которые предварительно фильтровали через мембраны с порами 0,20 мкм. Образцы перед хроматографией фильтровали через Millex-NV или Millex-NV₄. Суммарную олигосахаридную фракцию перед обращенно-фазовой хроматографией пропускали через SEP-ПАК C₁₈.

ВЭЖХ проводили на полупрепаративных колонках (7,8×300 мм) фирмы μBondapak C₁₈ и μBondapak NH₂. Количество вещества для анализа составляло 1,5–2 мг, объем пробы — 100–200 мкл.

Углеводный анализ. Нейтральные углеводы и глюкозамин определяли с помощью анионообменной хроматографии на колонке (3,7×75 мм) с Dugum DA x 8-11 (США) при 70°С в 0,4 М боратном буфере, pH 8,0, на жидкостном хроматографе Biotronik LC 2000 (ФРГ). Детекцию проводили с помощью 2,2'-бицинхоината меди [12] при 570 нм. Образцы гидролизовали в 2 М CF₃COOH 3 ч при 100°С.

Глюкозамин и глюкозаминит определяют с помощью аминокислотного анализатора Т 339 (ЧССР) на колонке (3,7×130 мм) с Ostion LG AN В (ЧССР) при 65°С в 0,52 М Na-цитратном буфере, pH 5,3. Детекцию проводили с помощью лингидрина при 520 нм. Образцы гидролизовали в 3 М HCl 4 ч при 100°С.

Сialовые кислоты определяют по тиобарбитуровому методу Уоррена [13], используя в качестве стандарта N-ацетилглицероаминовую кислоту (Koch-Light, Великобритания) и проводя детекцию при 549 нм на спектрофотометре Ultrospec (LKB, Швеция). Образцы гидролизовали в 0,05 М H₂SO₄ 30 мин при 80°С.

Углеводы во фракциях определяли на жидкостном хроматографе Biotronik LC 2000 по реакции с орцином и серной кислотой (детекция при 440 нм).

ЛИТЕРАТУРА

1. Dorland L., Haverkamp J., Vliegenthart J. F. G., Spik G., Fournet B., Montreuil J. Eur. J. Biochem., 1979, v. 100, № 2, p. 569–574.
2. Bruch R. C., White H. B. Biochemistry, 1982, v. 21, № 21, p. 5334–5341.
3. Hamazume Y., Mega T., Ikenaka T. J. Biochem., 1984, v. 95, № 1, p. 1633–1644.
4. Norioka N., Okada T., Hamagume Y., Mega T., Ikenaka T. J. Biochem., 1985, v. 97, № 6, p. 19–28.
5. Rhodes M. B., Azari P. R., Feeney R. E. J. Biol. Chem., 1958, v. 230, № 1, p. 399–408.
6. Лихошерстов Л. М., Новикова О. С., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. Докл. АН СССР, 1984, т. 274, № 1, с. 222–225.
7. Dua V. K., Dube V. E., Bush C. A. Biochim. et biophys. acta, 1984, v. 802, № 1, p. 29–40.
8. Hounsell E. F., Jones N. J., Stoll M. S. Biochem. Soc. Trans., 1985, v. 13, № 6, p. 1061–1065.
9. Yamashita K., Kamerling J. P., Kobata A. In: Glycoconjugates Proc. 7th Int. Symp. Lund: Rabms i Lund, 1983, p. 166–167.
10. Laemmli U. K. Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680–685.
11. Peterson G. L. Meth. Enzymol., 1983, v. 91, p. 95–119.
12. Sinner M., Puls J. J. Chromatogr., 1978, v. 156, № 1, p. 197–204.
13. Warren L. J. Biol. Chem., 1959, v. 234, № 8, p. 1971–1975.

Поступила в редакцию -
28.VII.1986

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE CARBOHYDRATE CHAINS OF HEN WHITE RIBOFLAVIN BINDING GLYCOPROTEIN

LIKHOSHERSTOV L. M., PISKAREV V. E., GALENKO E. L.,
DEREVITSKAYA V. A., KOCHETKOV N. K.

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

Isolation and characterization of oligosaccharides of riboflavin binding glycoprotein from hen white is described. Reductive cleavage of the N-glycosylamide carbohydrate-peptide bond with LiBH₄/tert-BuOH followed by NaBH₄-NaOH treatment gave rise to alditols, which were fractionated by means of HPLC. Twelve alditols were isolated in quantities sufficient for the monosaccharide analysis. Possibility of an ovomucoid-type oligosaccharide structure for all the alditols is discussed.