



УДК 577.112.083

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ГЛИКОПРОТЕИНОВ КУРИНОГО ЯЙЦА И ИХ ОЧИСТКА С ПОМОЩЬЮ ПРЕПАРАТИВНОЙ ВЭЖХ*Пискарев В. Е., Галерко Е. Л., Лихошерстов Л. М.,
Деревицкая В. А., Кочетков Н. К.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Разработан метод фракционирования гликопротеинов куриного яйца, основанный на сочетании ионообменной хроматографии, избирательного осаждения и ультрафильтрации. Из полученных фракций с помощью препаративной ионообменной ВЭЖХ выделены овальбумин, овотрансферрин, овомукоид, авидин и рибофлавинсвязывающие гликопротеины.

Общеизвестно широкое распространение гликопротеинов и их важное значение для жизнедеятельности клетки. Большинство гликопротеинов обладает ярко выраженной биологической активностью. К ним относятся многие ферменты, гормоны, ингибиторы протеиназ, транспортные белки, лектины, токсины, иммуноглобулины, лимфокины. В последнее время обсуждаются возможности использования гликопротеинов и их углеводных фрагментов в биотехнологии [1] и медицине [2].

Несмотря на широкое распространение, доступность большинства гликопротеинов в индивидуальном состоянии ограничена, поскольку их выделение, особенно в препаративных количествах, остается все еще трудной задачей.

Куриное яйцо является, по-видимому, самым дешевым и доступным источником гликопротеинов, содержащих все основные виды N-связанных углеводных цепей — маннозные, гибридные и комплексные, а также уникальные комплексные цепи овомукоидного типа, обнаруженные пока только у птиц. В белке яйца присутствует также овомуцин, содержащий O- и N-связанные углеводные цепи.

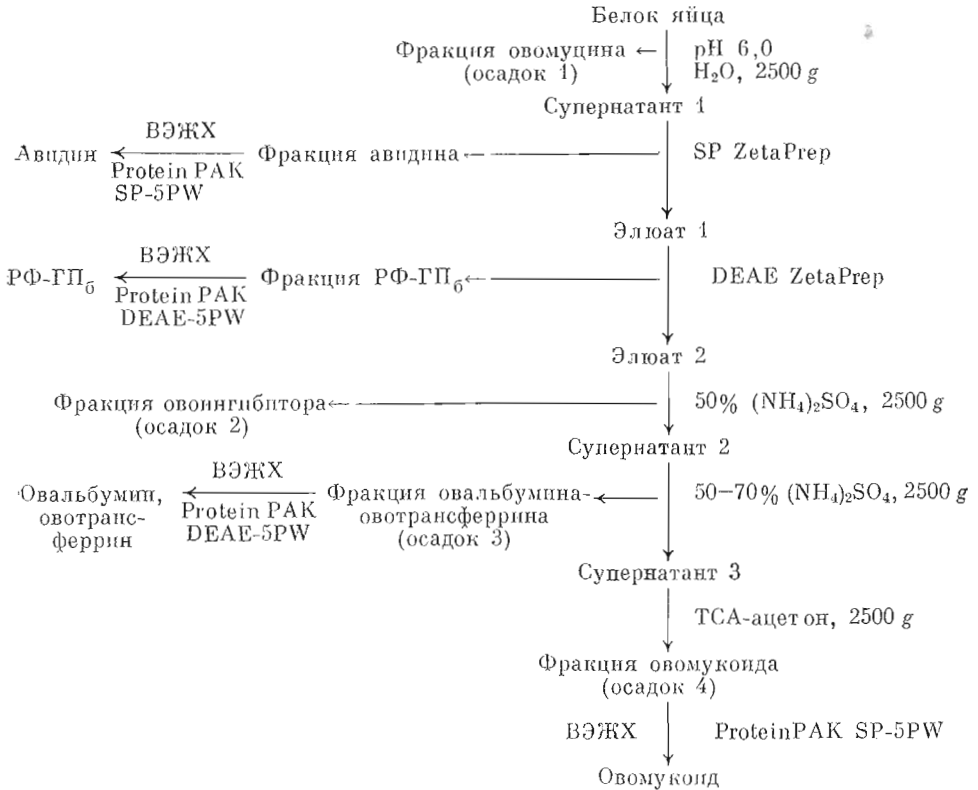
До настоящего времени эффективный метод фракционирования гликопротеинов куриного яйца отсутствует. Классические методы выделения овомукоида [3], овальбумина [4] и авидина [5] позволяют получать, как правило, единственный гликопротеин, тогда как остальные в процессе очистки теряются. При этом чистота препаратов не превышает 90–95%, и их дальнейшая очистка традиционными методами достаточно трудоемка.

Предлагаемый в данной работе метод впервые позволил провести быстрое последовательное выделение наиболее важных гликопротеинов куриного яйца (таблица) с высоким выходом и сохранением их биологической активности. Метод основан на сочетании высокоскоростной ионообменной хроматографии на препаративных патронах ZetaPrep, избирательного осаждения и скоростной ультрафильтрации в потоке, а также использовании на последней стадии очистки препаративной ионообменной ВЭЖХ.

Выделение осуществлялось в два этапа. Сначала проводили фракционирование гликопротеинов — получение соответствующих обогащенных фракций, далее из этих фракций с помощью препаративной ВЭЖХ получали индивидуальные гликопротеины (схема 1).

Принятые сокращения: РФ-ГП_б, РФ-ГП_ж — рибофлавинсвязывающие гликопротеины белка и желтка куриного яйца; ТСА — трихлоруксусная кислота; SP — сульфопропил; ТСМР — 1,1,1-трихлор-2-метилпропан-2-ол; SDS — додецилсульфат натрия.

Фракционирование и очистка гликопротеинов белка куриного яйца



При разбавлении белка водой и слабом подкислении в осадок выпадала фракция овомуцина, которую отделяли центрифугированием. Поскольку содержание различных гликопротеинов в белке значительно варьирует, составляя в расчете на яйцо от 1 мг (авидин) до 1 г (овальбумин), на первом этапе из супернатанта 1 мы выделяли фракции минорных гликопротеинов — авидина и РФ-ГП₆, которые могли теряться в процессе дальнейшей работы. Высокая изоэлектрическая точка авидина (таблица) позволила применить для его выделения сильный катионообменник (SP ZetaPrep 250) в условиях, когда остальные компоненты смеси, кроме лизоцима, на нем не задерживаются. Аналогичный подход мы использовали для выделения с помощью анионообменника (DEAE ZetaPrep 250) РФ-ГП₆, обладающего самой низкой изоэлектрической точкой среди компонентов элюата 1. В подобранных условиях РФ-ГП₆ задерживался на анионообменнике, тогда как остальные гликопротеины оставались в элюате 2. Фракции авидина и РФ-ГП₆ элюировали с ионообменников 0,2 M NaCl и 0,5 M NaCl соответственно.

Для последующего фракционирования гликопротеинов белка мы использовали избирательное осаждение. Сначала из элюата 2 (схема 1) с помощью сульфата аммония осаждали фракцию овонгибитора. При дальнейшем насыщении супернатанта 2 сульфатом аммония количественно осаждали фракцию овальбумина — овотрансферрина, практически свободную от примесей. Попытка избирательного осаждения сульфатом аммония сначала овальбумина, а затем овотрансферрина была малоэффективна и приводила только к обогащенным фракциям.

Далее из супернатанта 3 (схема 1) выделяли фракцию овомукоида осаждением смесью ацетон — TCA [3]. Следует отметить, что осаждение сульфатом аммония, даже при высоком насыщении и подкислении TCA, существенно снижало выход овомукоида.

Желток куриного яйца также богат гликопротеинами, однако они сла-

Свойства гликопротеинов куриного яйца

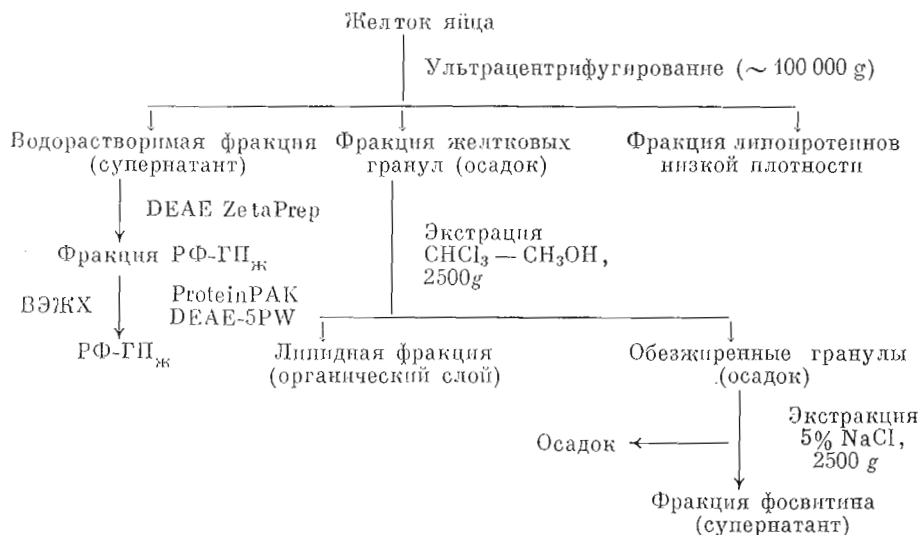
Гликопротеины	Содержание, % от суммарного белка	M_r	pI	Содержание углеводов, %	Тип углеводных цепей *	Биологические функции	Литература
Белок							
Овальбумин	~ 50	45 000	4,2	3-4	Маннозные и гибридные		[6]
Овотрансферрин	10	80 000	5,9	2-3	Комплексные (OM)	Транспорт Fe^{3+}	[7]
Овомукоид	10	28 000	4,3-4,4	20-25	»	Ингибитор протеолитических ферментов	[8]
Овоингибитор (семейство гликопротеинов)	1,5	49 000			»	То же	[9]
РФ-ГП _б	0,2	36 000	3,8-4,1	10	»	Транспорт рибофлавина	[10]
Авидин	0,02	68 000	10,0-10,5	10	Маннозные и гибридные	Транспорт биотина	[11]
Муцин	2	10^6-10^7			O- и N-Связанные	Структурирование белка	[12]
Желток							
РФ-ГП _ж		35 000		12	Комплексные (SA)	Транспорт рибофлавина	[13]
Фосвитин (семейство фосфорилированных гликопротеинов)		13 000-43 000	2-4	3-5	»		[14]

* Комплексные (SA) — спланированные комплексные цепи; комплексные (OM) — GlcNAc-обогащенные комплексные цепи овомукоидного типа.

бо изучены и их выделение затруднено высоким содержанием фосфолипидов и липопротеинов. Поэтому мы ограничились выделением фракций фосвитина и РФ-ГП_ж (схема 2). Следует отметить, что РФ-ГП_б и РФ-ГП_ж имеют практически одинаковые полипептидные цепи, но содержат разные типы N-гликанов (таблица), что обусловлено различием мест их биосинтеза (яйцевод и печень соответственно) [15]. Эти гликопротеины представляют значительный интерес для изучения влияния типа гликозилирования на физико-химические свойства и биологическую активность белка.

Схема 2

Фракционирование и очистка гликопротеинов желтка куриного яйца



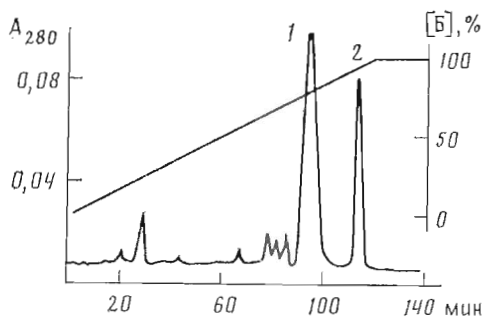


Рис. 1. ВЭЖХ фракции авидина. Колонка Protein PAK SP-5PW (21,5×150 мм). Скорость элюции 5 мл/мин. Детекция 280 нм. Буфер А — 1 М АсОН, буфер Б — 1 М NH₄ОAc в 1 М АсОН. 1 — лизоцим, 2 — авидин

Желток гомогенизировали в буфере, центрифугировали и получали в осадке фракцию желтковых гранул, в супернатанте — фракцию водорастворимых белков, а в желтом слое на поверхности супернатанта — фракцию липопротеинов низкой плотности. Супернатант наносили на анионообменник (DEAE ZetaPrep 250), тщательно промывали и после элюции раствором 0,5 М NaCl получали фракцию РФ-ГП_ж. Из осадка (желтковые гранулы) после экстракции липидов смесью хлороформ — метанол по методу [14] получали фракцию фосвитина.

Таким образом, были получены шесть фракций из белка (овомуцин, авидин, РФ-ГП_б, овоингибитор, овальбумин-овотрансферрин, овомукоид) и две фракции из желтка (РФ-ГП_ж и фосвитин). Для дальнейшего исследования структуры углеводных цепей нас интересовали прежде всего овомукоид, овотрансферрин, овальбумин, РФ-ГП_б, РФ-ГП_ж и авидин, поэтому перечисленные гликопротеины подвергались дальнейшей очистке.

Очистку этих гликопротеинов осуществляли методом препаративной ВЭЖХ на макропористых (1000 Å) полимерных ионообменных колонках типа TSK PW (Protein PAK SP-5PW и Protein PAK DEAE-5PW). Колонки размером 21,5×150 мм позволяли эффективно разделить 100—500 мг, а в отдельных случаях до 1 г белковой смеси.

ВЭЖХ авидина мы проводили на катионообменной колонке (Protein PAK SP-5PW), применив первоначально условия, использовавшиеся ранее [5] при выделении этого гликопротеина на СМ-целлюлозе. Однако пики, соответствующие авидину и лизоциму, в этих условиях частично перекрывались. Полного разделения авидина и лизоцима (рис. 1) удалось достичь, используя для элюции выпуклый градиент рН, генерируемый в системе элюентов 1 М СН₃СООН (буфер А) и 1 М СН₃СООНН₄ в 1 М СН₃СООН (буфер Б) (линейный градиент соли) [16]. Интересно, что более основный лизоцим (pI~11,0) в этих условиях элюировался значительно раньше авидина (pI~10,0—10,5).

В условиях ВЭЖХ на анионообменной колонке (Protein PAK DEAE-5PW) РФ-ГП_б полностью отделялся от небольших примесей (рис. 2). Аналогично выделяли и РФ-ГП_ж (рис. 3). РФ-ГП_ж по сравнению с РФ-ГП_б элюировался чуть позже, поскольку он содержит существенно больше сиаловых кислот [13]. Неправильная форма пиков обоих чистых гликопротеинов (рис. 2, 3) объясняется, по-видимому, значительной гетерогенностью, связанной с наличием остатков фосфосерина (от 5 до 9) [13]. Следует отметить, что для разных выделений форма пиков как РФ-ГП_б, так и РФ-ГП_ж менялась. Вероятно, это отражает изменения в степени фосфорилирования этих гликопротеинов.

Овотрансферрин и овальбумин легко разделялись на анионообменной колонке (Protein PAK DEAE-5PW) (рис. 4), так как их изоэлектрические точки сильно различаются (таблица). При этом овальбумин выходил в виде нескольких пиков — главного и трех минорных (пики 2—5). Ранее [17] овальбумин с помощью металлохелатной хроматографии разделяли на три пика по степени фосфорилирования (от 0 до 2 остатков фосфосерина на 1 моль), причем их относительное содержание было таким же, как пиков 2—4 на рис. 4. Известно [18], что главная форма овальбумина имеет два остатка фосфосерина и ей соответствует пик 4. Появление пика 5,

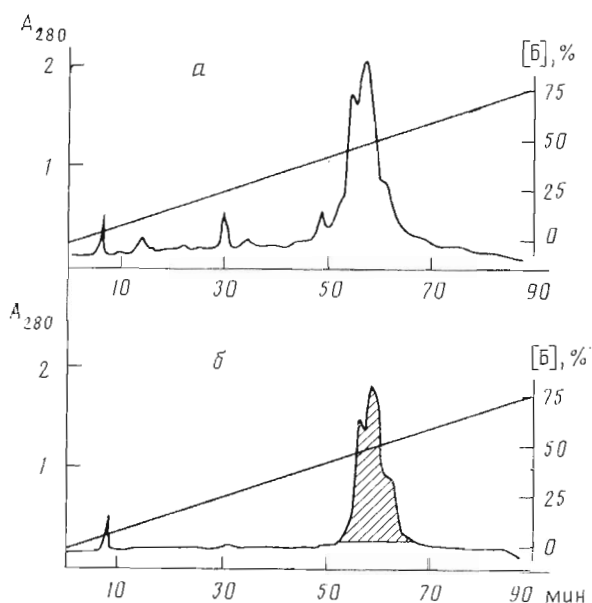


Рис. 2. ВЭЖХ фракции РФ-ГП₅ (а) и чистого РФ-ГП₅ (б). Колонка Protein PAK DEAE-5PW (21,5×150 мм). Скорость элюции 5 мл/мин. Буфер А – 50 мМ NaOAc, рН 5,0, буфер В – 0,3 М NaCl в 50 мМ NaOAc, рН 5,0. Заштрихованный пик – РФ-ГП₅

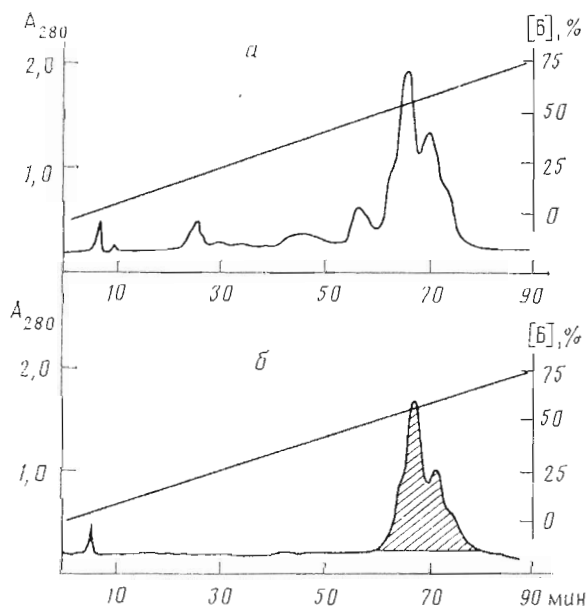


Рис. 3. ВЭЖХ фракции РФ-ГП₆ (а) и чистого РФ-ГП₆ (б). Колонка Protein PAK DEAE-5PW (21,5×150 мм). Условия см. рис. 2

по-видимому, можно объяснить наличием сульфогрупп на части углеродных цепей [10].

Следует отметить, что овальбумин и овотрансферрин высокой чистоты можно быстро выделить в количестве десятков граммов непосредственно из куриного белка после осаждения их сульфатом аммония (50–70% насыщение) и последующим разделением на анионообменном патроне DEAE ZetaPrep 250.

ВЭЖХ овомукоидной фракции первоначально проводилась на анионообменной колонке (Protein PAK DEAE-5PW), однако овомукоид выходил в виде сильно размытого пика. Хорошего отделения овомукоида от

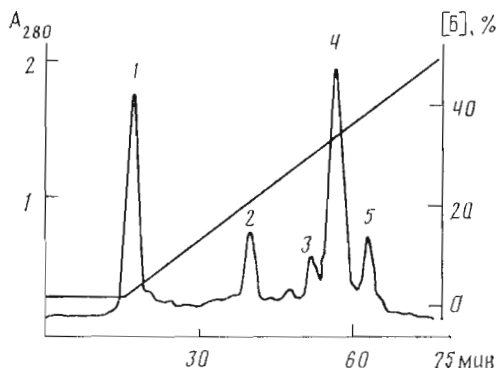


Рис. 4. ВЭЖХ фракция овальбумина - овотрансферрина (см. схему 1). Колонка Protein PAK DE-5PW (21,5×150 мм). Скорость элюции 5 мл/мин. Буфер А - 25 мМ КН₂РO₄, рН 6,8, сульфат В - 0,5 М NaCl в 25 мМ КН₂РO₄. 1 - овотрансферрин, 2-5 - овальбумин

примесей удалось достичь, используя катионообменную колонку (Protein PAK SP-5PW) (рис. 5).

Выделенные гликопротеины были гомогенны по данным электрофореза в ПААГ и эксклюзионной ВЭЖХ. Они совпадали по хроматографической и электрофоретической подвижности с известными гликопротеинами, а также образцами РФ-ГП₆ и РФ-ГП_ж, полученными и охарактеризованными нами ранее [19]. Каждый из выделенных гликопротеинов давал единственную полосу преципитации при иммуноэлектрофорезе. Для авидина и овомукоида определена ожидаемая (таблица) биологическая активность, которая по величине соответствовала гомогенным препаратам. Для фракции овоингибитора показано наличие антихимотрипсиновых и антитрипсиновых свойств.

Таким образом, впервые разработан метод, позволяющий осуществить фракционирование наиболее важных гликопротеинов куриного яйца. С помощью препаративной ВЭЖХ были выделены пять гликопротеинов из белка (овальбумин, овотрансферрин, овомукоид, авидин и РФ-ГП₆) и РФ-ГП_ж из желтка куриного яйца. Для ряда гликопротеинов с помощью ВЭЖХ были также выделены изоформы, различающиеся по *pI*.

Экспериментальная часть

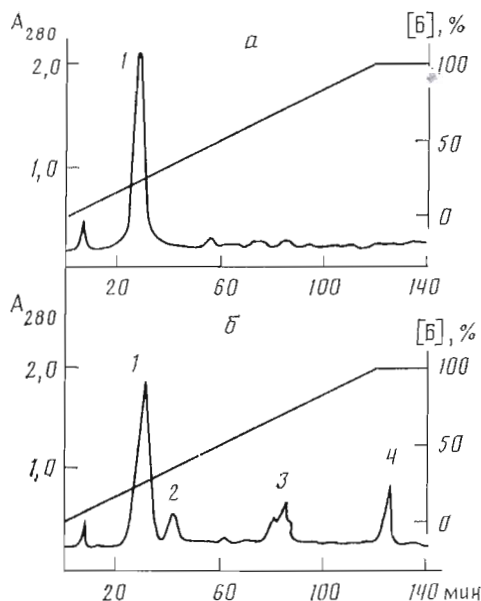
В работе использовали авидин (Fluka, Швейцария), овомукоид и рибофлавин (Reanal, Венгрия), овотрансферрин и овоингибитор (Sigma, США), лизоцим (Союзреактив), овальбумин, метиловый эфир *N*-*n*-тозил-*L*-аргинина, этиловый эфир *N*-бензоил-*L*-тирозина и ТСМР (Serva, ФРГ). Все соли, применявшиеся для ВЭЖХ, перекристаллизовывали. Воду для ВЭЖХ чистили на установке Milli-Q (Millipore, США).

Для ВЭЖХ использовали систему фирмы Millipore-Waters (США), состоящую из двух насосов (Модель 510), инжектора (модель U6K), градиент-контроллера (модель 721), УФ-детектора (модель 481 Lambda Max) и интегратора (модель 730). После инжектора последовательно стояли фильтры с диаметром пор 2 и 0,5 мкм. Для ионообменной хроматографии использовали колонки Protein PAK SP-5PW и Protein PAK DEAE-5PW (Millipore-Waters, США). Во всех случаях перед колонкой ставилась предколонка с соответствующим носителем Guardgel (Beckman, США). Для аналитических целей (0,5–5 мг белка) использовали колонки размерами 7,5×75 мм, для препаративных (100–500 мг белка) – 21,5×150 мм. Образцы перед хроматографией фильтровали через Millex HV или Millex HV₄ (Millipore, США). Буферы для ВЭЖХ дегазировали и фильтровали через мембрану HA 0,45 мкм (Millipore, США).

Для препаративной ионообменной хроматографии белков (10–20 г) использовали систему для ионообмена ZetaPrep 250 с катионообменным (SP) или анионообменным (DEAE) патронами (CUNO, США). Нанесение и элюцию осуществляли с помощью насоса Masterflex (Cole-Parmer, США). Подбор условий предварительно проводили на аналитическом уровне (10–50 мг белка) с помощью соответствующих ионообменных дисков ZetaPrep 15 (CUNO, США).

Для диализа, смены буферов и концентрирования растворов использовали систему для ультрафильтрации в тангенциальном потоке Minitan (Millipore, США), снабженную пакетом мембран с пределом пропускания до 10 000 Да. Растворы белков перед хроматографией на ионообменных патронах ZetaPrep пропускали через стерилизующие патроны Sterivex GV (Millipore, США). Для низкоскоростного центрифугирования использовали центрифугу, модель K-70 (Janetzki, ГДР), для ультрацентрифугирования – центрифугу, модель L5-65 с ротором 45 Ti (Beckman, США). Чистоту белков контролировали с помощью ВЭЖХ на гель-фильтрационных колонках TSK 2000SW (7,5×600 мм) и TSK 3000SW (7,5×300 мм) (Toyo Soda, Япония), а также электрофореза в ПААГ в присутствии 0,2% SDS [20] в ячейке для верти-

Рис. 5. ВЭЖХ фракция овомукоида (а) и овомукоида, полученного по методу Лайнуивера непосредственно из яичных белков (б). Колонка Protein PAKSP-5PW (21,5×150 мм). Скорость элюции 5 мл/мин. Буфер А — 25 мМ NaOAc, pH 4,5, буфер Б — 0,5 М NaCl в 25 мМ NaOAc, pH 4,5. 1 — овомукоид, 2 — овотрансферрин, 3 — овоингибитор, 4 — лизоцим



кального электрофореза в пластинах модель 2001 (LKB, Швеция), используя блок питания, модель 3000/300 (Bio-Rad, США). Белки проявляли кумасси бриллиантовым голубым R-250 (Serva, ФРГ).

Иммуноэлектрофорез проводили по методу [21]. Белок определяли по методу [22].

Ингибиторные свойства овомукоида и овоингибитора определяли по методу [23], используя в качестве субстратов этиловый эфир *N*-бензоил-*L*-тирозина и метиловый эфир *N*-*n*-тозил-*L*-аргинина. Биотинсвязывающую активность авидина определяли по методу [24].

Кроликов (советская шиншилла) иммунизировали 3 раза с интервалом 10 сут (по 1,5 мг гликопротеина на иммунизацию), используя для первой иммунизации полный, для последующих — неполный адъюванты Фрейнда (Difco, США). γ -Глобулиновую фракцию осаждали центрифугированием (1 ч, 2500g) при 45% насыщении сывотки $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. IgG получали из γ -глобулиновой фракции ионообменной хроматографией на ионообменном диске QAE ZetaPrep (CUNO, США) по методу [25].

Фракционирование гликопротеинов белки. Все операции проводили при 4°С. Белки из 20 куриных яиц отделяли от желтков, смешивали с тремя объемами воды, доводили pH 0,5 М HCl до 6,0 и добавляли TCMP до концентрации 0,05%. Смесь перемешивали на магнитной мешалке 1 ч, избегая вспенивания, и оставляли на ночь. Выпавший осадок 1 отделяли центрифугированием (1 ч, 2500g), дважды промывали 2% KCl и получали фракцию овомуцина [26]. В супернатант 1 добавляли 4 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ до 0,02 М концентрации, доводили pH до 9,0 и пропускали со скоростью 2 л/ч через SP ZetaPrep 250, уравновешенный тем же буфером. Ионообменник промывали 1 л 0,1 М NaCl в 0,02 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 9,0, содержащим 0,05% TCMP. Элюаты после посадки и промывки объединяли и получали элюат 1. Фракцию авидина элюировали с SP ZetaPrep 300 мл 0,2 М NaCl в 0,02 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 9,0, диализовали и лиофилизировали.

Элюат 1 с помощью ультрафильтрации переводили в 0,02 М CH_3COONa , pH 5,0, содержащий 0,05% TCMP, концентрировали до 1,2 л, добавляли 25 мг рибофлавина и пропускали со скоростью 2 л/ч через DEAE ZetaPrep 250, предварительно уравновешенный тем же буфером. Элюаты после посадки и промывки 0,15 М CH_3COONa , pH 5,0, объединяли и получали элюат 2. Фракцию РФ-ГП₆ элюировали с DEAE ZetaPrep 300 мл 0,5 М NaCl, диализовали и лиофилизировали.

Элюат 2 с помощью ультрафильтрации обессоливали, концентрировали до 1,2 л и добавляли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 50% насыщения. Смесь перемешивали 1 ч на магнитной мешалке и оставляли на ночь. Осадок 2 отделяли центрифугированием (1 ч, 2500g), диализовали, лиофилизировали и получали фракцию овоингибитора.

Супернатант 2 подкисляли 1 М H_2SO_4 до pH 5,0, добавляли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 70% насыщения, перемешивали 1 ч на магнитной мешалке и оставляли на ночь. Осадок 3 отделяли центрифугированием (1 ч, 2500g), диализовали, лиофилизировали и получали фракцию овальбумина-овотрансферрина.

Супернатант 3 с помощью ультрафильтрации обессоливали, концентрировали до 0,5 л, добавляли 0,5 л смеси ацетон — 0,5 М TCA, pH 3,5 (1 : 2), перемешивали и оставляли на ночь. Осадок удаляли центрифугированием (1 ч, 2500g), а к супернатанту при энергичном перемешивании добавляли 2,5 объема охлажденного до -10°С ацетона и оставляли на ночь. Выпавший осадок 4 отделяли центрифугированием (1 ч, 2500g), диализовали, лиофилизировали и получали фракцию овомукоида [3].

Выделение РФ-ГП₆ и фосвитиновой фракции. Все операции проводили при 4°С. Желтки из 20 яиц аккуратно отделяли от белков, осторожно промывали водой, смешивали с 2 объемами 0,03 М CH_3COONa , pH 5,0, содержащего 0,07% TCMP, и дово-

дили рН до 5,0. Смесь перемешивали на магнитной мешалке 2 ч и центрифугировали (4 ч, 42 000 об/мин). Супернатант пропускали со скоростью 2 л/ч через DEAE ZetaPrep 250, предварительно уравновешенный 0,02 М CH_3COONa , рН 5,0, содержащим 0,05% ТСМР. Фракцию РФ-ГП_w элюировали с DEAE ZetaPrep 300 мл 0,5 М NaCl , диализовали и лиофилизовали. Осадок перемешивали в 10 объемах 0,16 М NaCl в течение 12 ч и центрифугировали (4 ч, 42 000 об/мин). Промывку 0,16 М NaCl и центрифугирование повторяли, после чего осадок дважды экстрагировали 20 объемами смеси хлороформ – метанол, 2:1. Обезжиренные гранулы экстрагировали 5% NaCl , диализовали, лиофилизовали и получали фосвитиновую фракцию [14].

Авторы приносят благодарность А. Г. Габибову (ИМБ АН СССР) за помощь в определении авидина, а также А. В. Волкову (МНИИЭиМ им. Г. Н. Габричевского) за помощь в проведении иммуноэлектрофореза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Berman P. W., Lasky L. A. // Trends Biotechnol. 1985. V. 3. № 2. P. 51–53.
2. Van Boeckel C. A. A. // Rec. trav. chim. 1986. V. 105. № 2. P. 35–53.
3. Lineweaver H., Murray C. W. // J. Biol. Chem. 1947. V. 171. P. 565–581.
4. Kekwick R. A., Cannan R. K. // Biochem. J. 1936. V. 30. № 1. P. 227–232.
5. Melamed M. D., Green N. M. // Biochem. J. 1963. V. 89. № 3. P. 591–599.
6. Tai T., Yamashita K., Ogata-Arakawa M., Koide N., Muramatsu T., Iwashita S., Inone Y., Kobata A. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 2. P. 8569–8575.
7. Dorland L., Haverkamp J., Vliegenthart J. F. G., Spik G., Fournet B., Montreuil J. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 100. № 2. P. 569–574.
8. Yamashita K., Kamerling J. P., Kobata A. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 21. P. 12809–12814.
9. Davis J. G., Zahneley J. C., Donovan J. W. // Biochemistry. 1969. V. 8. № 5. P. 2044–2052.
10. Yamashita K., Ueda I., Kobata A. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 23. P. 14144–14147.
11. Green N. M., Toms E. J. // Biochem. J. 1970. V. 118. № 1. P. 67–70.
12. Kato A., Fujinaga K., Yagishita K. // Agr. Biol. Chem. 1973. V. 37. № 11. P. 2479–2485.
13. Norioka N., Okada T., Hamazume Y., Mega T., Ikenaka T. // J. Biochem. 1985. V. 97. № 1. P. 19–28.
14. Tsutsui T., Obara T. // Agric. Biol. Chem. 1984. V. 48. № 5. P. 1153–1160.
15. Miller M. S., Buss E. G., Clagett C. O. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 677. № 1. P. 225–233.
16. Van den Eijden-van Raaij A. J. M., Koorneef J., van Oostwaard T. M. J., de Laat S. W., van Zoelen E. J. J. // Anal. Biochem. 1987. V. 163. № 1. P. 263–269.
17. Andersson L., Porath J. // Anal. Biochem. 1986. V. 154. № 1. P. 250–254.
18. Perlmann G. E. // Adv. Protein Chem. 1955. V. 10. P. 1–30.
19. Лихошерстов Л. М., Пискарев В. Е., Галенко Е. Л., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 528–532.
20. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
21. Grabar P., Williams C. A. // Biochim. et biophys. acta. 1954. V. 10. P. 193–194.
22. Smith P. K., Krohn R. L., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. // Anal. Biochem. 1985. V. 150. № 1. P. 76–85.
23. Шульгин М. Н., Валучева Т. А., Кастере А. Я., Мосолов В. В. // Биохимия. 1981. Т. 46. № 3. С. 473–480.
24. Green N. M. // Meth. Enzymol. 1970. V. 18. P. 418–424.
25. Hou K. C., Mandara R. M. // Biotechniques. 1986. V. 4. № 4. P. 358–367.
26. Haykawa S., Sato Y. // Agric. Biol. Chem. 1977. V. 41. № 7. P. 1185–1191.

Поступила в редакцию
23.III.1988

FRACTIONATION OF HEN EGG GLYCOPROTEINS AND THEIR PURIFICATION BY MEANS OF PREPARATIVE HPLC

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

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

A new method of fractionation of hen egg glycoproteins has been developed. The procedure involves high-speed mass ion-exchange chromatography on ZetaPrep cartridges, differential precipitation, and ultrafiltration on «Minitan» tangential-flow system. Six fractions were obtained from egg white (ovomucin, avidin, riboflavin-binding glycoprotein RF-GP_w, ovomucoid, ovalbumin-ovotransferrin, and ovomucoid fractions), and two fractions from egg yolk (riboflavin-binding glycoprotein RF-GP_y and phosphovitin fractions). Using ion-exchange HPLC on columns (150×21,5 mm) Protein PAK DEAE-5PW and SP-5PW, six homogenous glycoproteins (avidin, RF-GP_w, ovalbumin, ovotransferrin, ovomucoid, and RF-GP_y) were isolated in preparative quantities (0,1–1 g). Ion-exchange HPLC also resolves some glycoproteins' isoforms with different pI values.