



УДК 577.114.5:522.336

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
N-(4-МЕТИЛКУМАРИН-7-ИЛ)ГЛИКАМИНОВ
В СТРУКТУРНОМ АНАЛИЗЕ N-УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ
ГЛИКОПРОТЕИНОВ

Шиян С. Д., Насонов В. В., Маркин В. А.,
Белянчиков И. М.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

На примере гликопротеинов с известным строением разработан эффективный метод структурного анализа N-углеводных цепей гликопротеинов, который включает в себя отщепление олигосахаридов с помощью гидразиолиза с последующим re-N-ацетилированием, превращение их во флуоресцентномеченные производные (АМК-ОС) по реакции восстановительного аминирования 7-амино-4-метилкумарином, разделение ВЭЖХ и анализ индивидуальных АМК-ОС обращенно-фазовой и эксклюзионной ВЭЖХ. Получено 35 АМК-производных лактозаминного, гибридного и олигоманнозидного типов, определены их хроматографические характеристики при ВЭЖХ на Ultrasphere ODS и TSK G 2000 SW. Показано, что на основании хроматографического поведения и экзогликозидазного секвенирования АМК-ОС можно делать вывод о структуре углеводных цепей исходя из 0,1–1 нмоль гликопротеина или гликопептида.

Найденные к настоящему времени различия в структурах углеводных цепей гликоконъюгатов говорят о важности этих маркеров для биологического узнавания.

Этот факт привлек внимание многих исследователей к проблемам биосинтеза, гетерогенности и строения углеводных цепей гликопротеинов и вызвал бурное развитие методов их анализа [1–4]. Для отщепления аспарагинсвязанных углеводных цепей гликопротеинов (растворимых или мембраносвязанных) могут быть использованы химические (гидразиолиз [5, 6] или обработка LiBH₄ — LiOH [7]) и ферментативные методы (обработка соответствующими амидазами [8, 9]). При этом химические методы не имеют ограничений, связанных со структурой углеводных цепей, и позволяют получать как сиало-, так и асиалоолигосахариды, работать как с гликопептидами, так и с гликопротеинами [5–7].

В ряде работ показана возможность получения информации о структуре углеводных цепей уже в процессе выделения индивидуальных олигосахаридов [5, 8–10]. Один из первых шагов в этом направлении сделан Кобата, получившим хроматографические характеристики почти 100 олигосахаридов [5]. Использование ВЭЖХ повышает эффективность разделения олигосахаридов [9–12], а введение в них флуоресцентной метки в сочетании с ВЭЖХ дает огромные преимущества как в эффективности разделения сложных смесей, так и в чувствительности детекции [3, 4, 9].

Ранее нами описан метод получения флуоресцентно меченных олигосахаридов с использованием 7-амино-4-метилкумарина [13]. В данной работе, исходя из гликопротеинов, строение углеводных цепей которых хорошо изучено, нами выделен и охарактеризован ряд АМК-ОС олигоманнозидного, лактозаминного (в том числе разной антенности, с фукозой и без нее) и гибридного типов. Разделение и идентификация АМК-ОС проведены на основании их различий по молекулярным размерам (эксклюзионная ВЭЖХ) и структуре (обращенно-фазовая ВЭЖХ). Предложена схема высокочувствительного анализа структуры аспарагинсвязанных углеводных цепей гликопротеинов, позволяющая проводить экспресс-анализ сложных

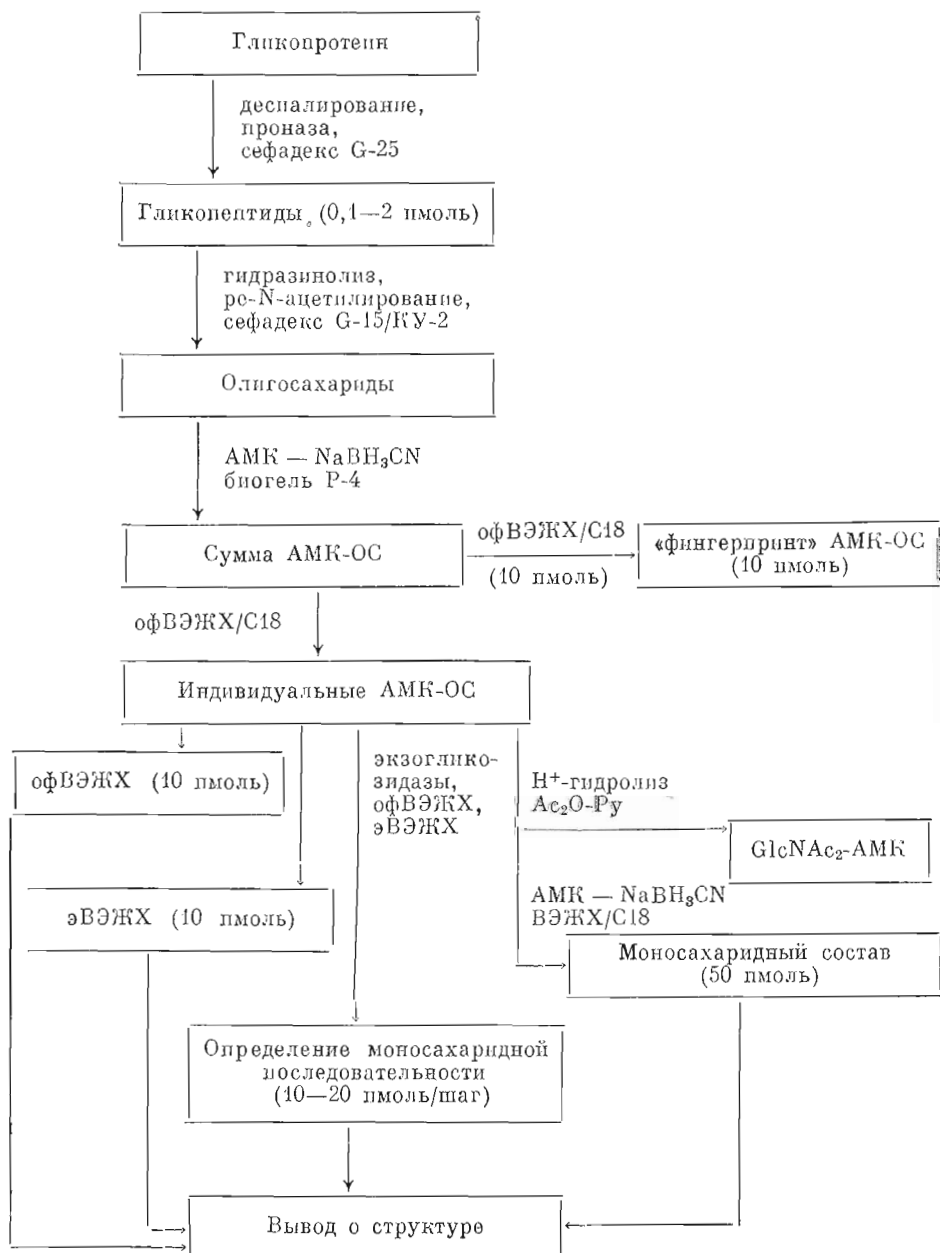
Сокращения: АМК — 7-амино-4-метилкумарин, АМК-ОС — N-(4-метилкумарин-7-ил)гликамин олигосахаридов, оВЭЖХ и эВЭЖХ — обращенно-фазовая и эксклюзионная ВЭЖХ.

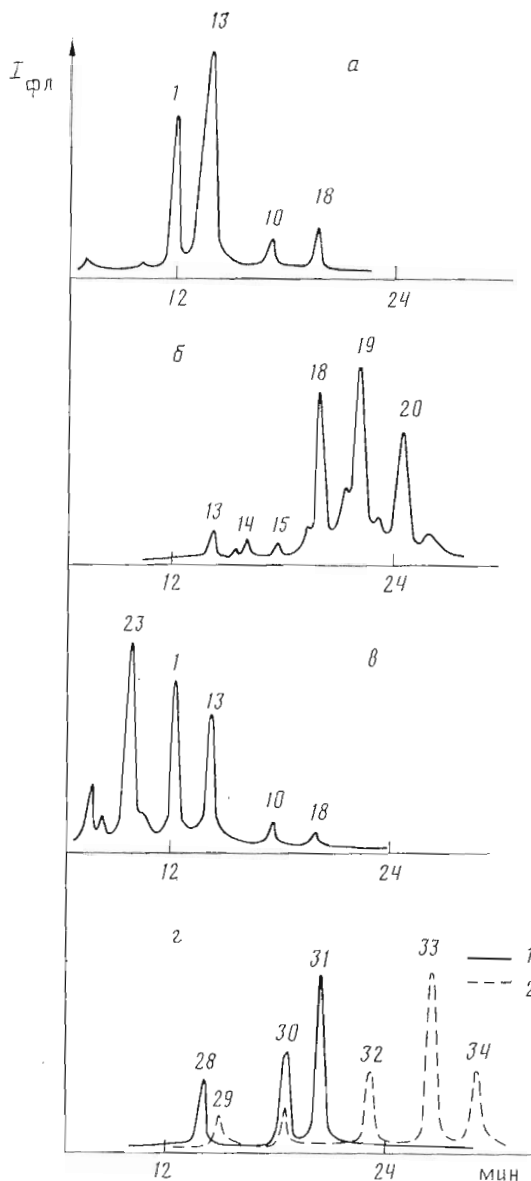
цепей, полученных из асиалогликопептидов или гликопротеинов, по результатам двух видов ВЭЖХ. Эта схема может быть использована для сравнительного анализа гликопротеинов из разных источников, на разных стадиях биосинтеза, в процессе роста и дифференцировки, в норме и при патологии.

Получение стандартных АМК-ОС. Каждый гликопротеин подвергали кислотному деснашиванию, обрабатывали проназой и выделяли гликопептиды с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-25. Гидразиолизом с последующей обработкой бензальдегидным реагентом и ре-N-ацетилированием получали олигосахариды, которые обессоливали на сефадексе G-15 или ионообменнике и превращали во флуоресцентные производные аналогично тому, как описано нами ранее [13]. Смесь АМК-ОС после хроматографии на биоэле разделяли на индивидуальные производные обращенно-фазовой ВЭЖХ и анализировали далее согласно схеме 1. Отсутст-

Схема 1

Структурный анализ N-углеводных цепей гликопротеинов





ВЭЖХ на Ultrasphere ODS в 12% CH_3CN (20°C , 0,9 мл/мин) АМК-ОС, полученных из церуллоплазмина (а), иммуноглобулина G (б), α_1 -кислого гликопротеина (в); г — гидролизат АМК-ОС (28) α -маннозидазой: в течение 30 мин (1) и 5 ч (2). Хроматографировали ~ 10 пмоль смеси АМК-ОС

вие деградации с восстанавливающего конца подтверждали определением АМК-хитобиозы в продуктах кислотного гидролиза олигосахаридов. Моносахаридный состав полученных АМК-ОС приведен в таблице.

Исходя из литературных данных о структуре углеводных цепей использованных гликопротеинов, их моносахаридного состава и относительного содержания, а также результатов обработки олигосахаридов экзогликозидазами различной специфичности, провели идентификацию полученных олигосахаридов. Были выделены следующие АМК-производные: из фетуина — (1) и (5) [13], из фибриногена [14] — (13), из иммуноглобулина G [8, 9] — (18)–(20), из α_1 -кислого гликопротеина [15] — (1), (10), (13), (18) и (23), из церуллоплазмина [16, 17] — (1), (10), (13) и (18), из овальбумина [18, 19] — (28) и (30).

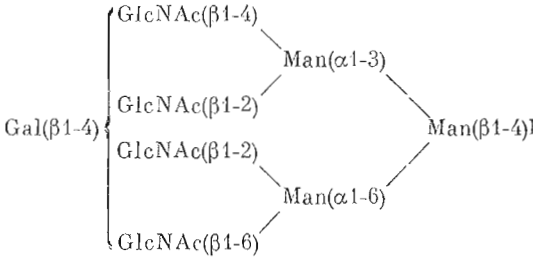
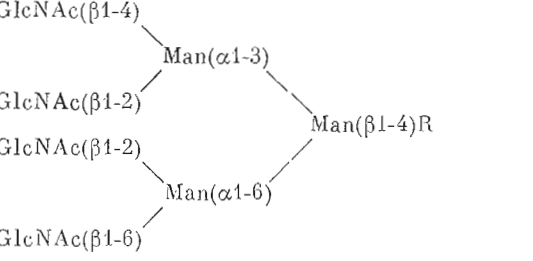
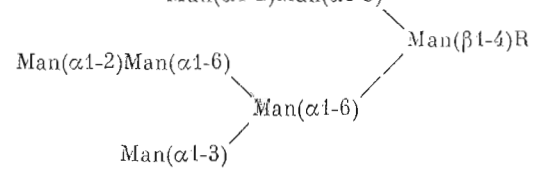
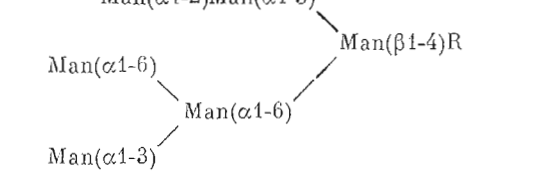
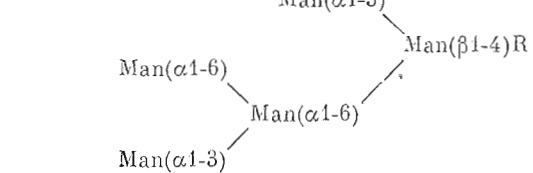
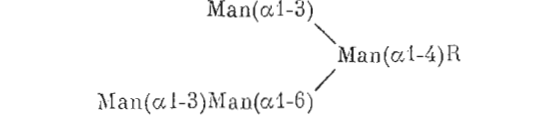
Агалактопроизводные олигосахаридов были выделены из соответствующих гликопротеинов либо получены ферментативным дегалактозилирова-

Состав и хроматографические характеристики АМК-олигосахаридов и продуктов их дегликозилирования

Номер соединения	AMK-OC R=GlcNAc ₂ -AMK R'=GlcNAc(Fuc)GlcNAc-AMK	RRT/ODS *	N _i /TSK ^{2*}	Моносахаридный состав ^{3*} Gal : Man : : GlcNAc : Fuc
1		1,00	19,25	3,1 : 3,0 : 5,1 : 0,0
2		1,13	17,90	2,0 : 3,0 : 4,9 : 0,0
3		1,22	16,00	1,3 : 3,0 : 4,8 : 0,0
4		1,33	14,70	0,1 : 3,0 : 4,8 : 0,0
5		0,91	19,60	2,9 : 3,0 : 4,5 : 0,0
6		1,01	18,00	2,1 : 3,0 : 4,5 : 0,0
7		1,13	16,80	1,1 : 3,0 : 4,9 : 0,0
8		1,20	15,00	0,9 : 3,0 : 4,1 : 0,0

Номер соединения	<p>AMK-OC R=GlcNAc₂-AMK R¹=GlcNAc(Fuc)GlcNAc-AMK</p>	RRT/ODS *	N ₂ /TSK**	Моносахаридный состав *** Gal : Man : : GlcNAc : Fuc
9	<p>Gal(β1-3)GlcNAc(β1-4)Man(α1-3) Man(β1-4)R Man(α1-6)</p>	1,30	13,20	0,8 : 3,0 : 2,8 : 0,0
10	<p>Fuc(α1-3) GlcNAc(β1-4) Gal(β1-4) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6) Man(α1-3) Man(β1-4)R</p>	1,41	22,00	3,1 : 3,0 : 4,6 : 0,0
11	<p>Fuc(α1-3) GlcNAc(β1-4) Gal(β1-4) Gal(β1-4) { GlcNAc(β1-2) GlcNAc(β1-2)Man(α1-6) } Man(α1-3) Man(β1-4)R</p>	1,55	20,00	
12	<p>Fuc(α1-3) GlcNAc(β1-4) Gal(β1-4) GlcNAc(β1-2) GlcNAc(β1-2)Man(α1-6) Man(α1-3) Man(β1-4)R</p>	1,72	18,00	
13	<p>Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) Man(β1-4)R Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)</p>	1,18	16,00	1,8 : 3,0 : 3,9 : 0,0
14	<p>Gal(β1-4) { GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) GlcNAc(β1-2)Man(α1-6) } Man(β1-4)R</p>	1,30	14,20	
15	<p>GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) Man(β1-4)R GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)</p>	1,45	12,80	0,0 : 3,0 : 3,7 : 0,0
16	<p>GlcNAc(β1-2) { Man(α1-3) Man(α1-6) } Man(β1-4)R</p>	1,53	11,50	0,0 : 3,0 : 2,7 : 0,0
17	<p>Man(α1-3) Man(β1-4)R Man(α1-6)</p>	1,63	9,30	0,0 : 3,0 : 2,1 : 0,0

Номер соединения	AMK-OC R=GlcNAc ₂ -AMK R ¹ =GlcNAc(Fuc)GlcNAc-AMK	RRT/ODS *	N ₂ /TSK * ¹	Моносахаридный состав ^{3*} Gal : Man : : GlcNAc : Fuc
18	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) Man(β1-4)R ¹ Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)	1,67	19,00	1,9 : 3,0 : 3,6 : 1,3
19	Gal(β1-4) { GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) Man(β1-4)R ¹ GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)	1,84	17,20	
20	GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) Man(β1-4)R ¹ GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)	2,02	16,30	
21	GlcNAc(β1-2) { Man(α1-3) Man(β1-4)R ¹ Man(α1-6)	2,08	14,60	
22	Man(α1-3) Man(β1-4)R ¹ Man(α1-6)	2,20	12,50	0,0 : 3,0 : 2,1 : 1,1
23	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-4) Man(α1-3) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2) Man(β1-4)R Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2) Man(α1-6) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	0,82	21,25	3,9 : 3,0 : 5,7 : 0,1
24	Gal(β1-4) ₃ { GlcNAc(β1-4) Man(α1-3) GlcNAc(β1-2) Man(β1-4)R GlcNAc(β1-2) Man(α1-6) GlcNAc(β1-6)	0,88	20,00	
25	Gal(β1-4) ₂ { GlcNAc(β1-4) Man(α1-3) GlcNAc(β1-2) Man(β1-4)R GlcNAc(β1-2) Man(α1-6) GlcNAc(β1-6)	0,95	18,50	

Номер соединения	AMK-OC R=GlcNAc ₂ -AMK R'=GlcNAc(Fuc)GlcNAc-AMK	RRT/ODS *	N _i /TSK**	Моносахаридный состав ^{3*} Gal : Man : : GlcNAc : Fuc
26		1,02	17,00	
27		1,10	15,60	0,00 : 3,0 : 5,4 : 0,0
28		1,15	16,00	0,1 : 3,0 : 0,9 : 0,0
29		1,23	13,35	
30		1,40	11,10	
31		1,70	10,70	

Помер соединения	AMK-OC R=GlcNAc ₂ -AMK R ¹ =GlcNAc(Fuc)GlcNAc-AMK	RRT/ODS *	N _i /TSK ^{**}	Моносахаридный состав ^{**} Gal : Man : : GlcNAc : Fuc
32	Man(α1-3)Man(α1-6)Man(β1-4)R	1,90	9,20	
33	Man(α1-3)Man(β1-4)R	2,20	7,80	
34	Man(β1-4)R	2,40	6,40	
35	GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-4)-AMK	2,87	4,90	

^{1*} Аналитическая оФВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS (4,6×250 мм), 12% водн. CH₃CN, 0.9 мл/мин, 27° С; время удерживания относительно AMK-OC (1).

^{2*} Аналитическая эВЭЖХ на колонке TSK G 2000 SW (7,5×300 мм), 7% водн. EtOH, 0.2 мл/мин, 30° С; N_i рассчитано как в работе [13].

^{3*} моль/моль Man; определен как в работе [20].

нием AMK-OC и выделены оФВЭЖХ. Так были получены из AMK-OC (1) его агалактопроизводные (2)–(4), из (5)–(6) и (7), и (10)–(11) и (12), из (13)–(14) и (15), из (18)–(19) и (20), из (23)–(24)–(27). Ферментативным гидролизом гексозаминидазой из AMK-OC (7), (15) и (20) были получены производные (8) и (9), (16) и (17), (21) и (22) соответственно. Обработка AMK-OC (18)–(22) α-L-фукозидазой давала олигосахариды (13)–(17). Из продуктов гидролиза AMK-OC (28) α-маннозидазой были выделены AMK-OC (29)–(34) (рисунок, з).

Следует отметить достаточно строгую стереонаправленность ферментативного дегликозилирования. Так, например, обработка AMK-OC (18) β-галактозидазой из двух возможных моногалактопроизводных (19) давала преимущественно один, в то время как среди AMK-OC, полученных из IgG, можно было увидеть оба изомера (19) (рисунок, б). Контроль за ходом ферментативного гидролиза AMK-OC (28) α-маннозидазой показал, что олигосахарид очень легко превращается в Man₂GlcNAc₂-AMK (31) (мешее чем за 1 ч), в то время как дальнейший его гидролиз до Man(β1-4)GlcNAc₂-AMK (34) требует многочасовой инкубации (20–30 ч), что хорошо коррелирует со специфичностью использованного фермента [19].

ВЭЖХ AMK-OC. Все полученные нами 35 AMK-OC анализировались оФВЭЖХ на Ultrasphere C18 и эВЭЖХ на TSK G 2000 SW. Хроматографическую подвижность соединений характеризовали относительными временами удерживания. При этом в качестве внутреннего стандарта использовали при оФВЭЖХ – AMK-OC (1), при эВЭЖХ – Glc₃-AMK. Относительные молекулярные размеры AMK-OC оценивали в условных единицах (N_i) по результатам ВЭЖХ на колонке TSK G 2000 SW, откалиброванной стандартной смесью олигомеров Glc₁₋₃₀-AMK, полученных из декстрана, как описано нами в работе [13]. Найденные таким образом значения N_i были близки вычисленным по данным моносахаридного состава на основании инкрементов (вкладов отдельных моносахаридов) [13]. Наибольший вклад в величину N_i давал остаток фукозы (ΔFuc=3,0), что, вероятно, связано с конформационными изменениями, вносимыми этим остатком.

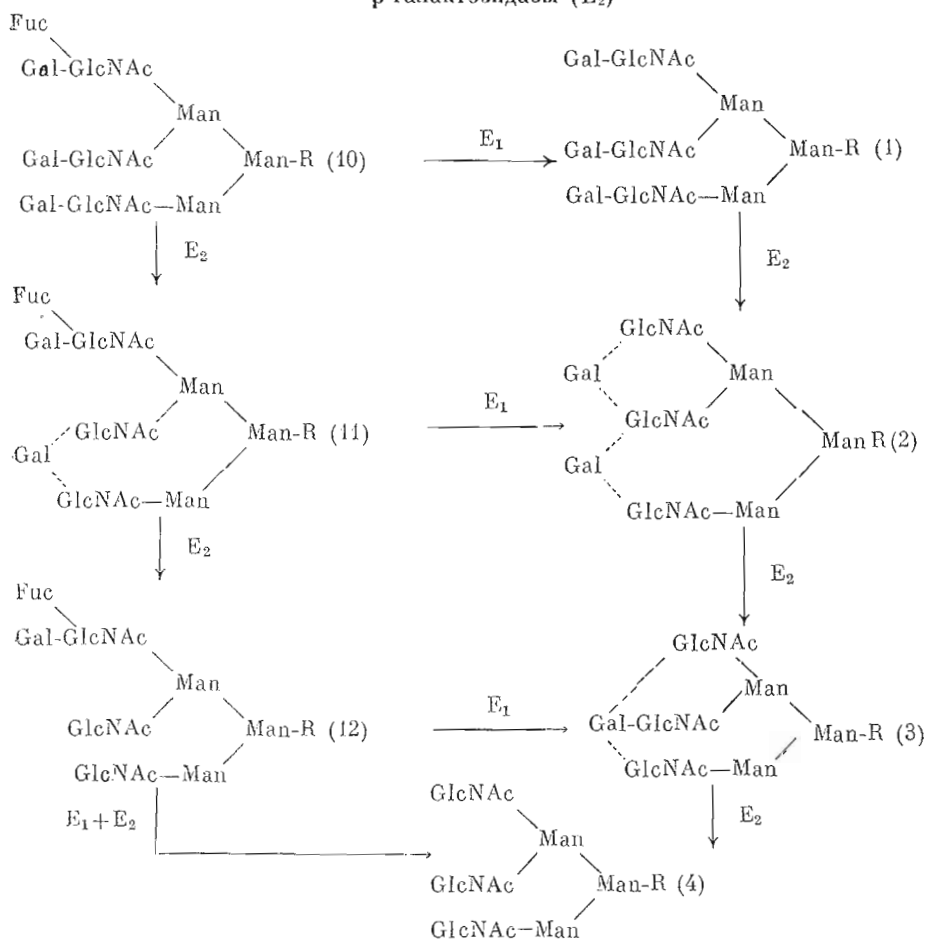
Взаимодействие AMK-OC с октадецильной матрицей Ultrasphere ODS зависело от гидрофобности и структуры олигосахаридов. Наибольший вклад в гидрофобность вносил остаток фукозы, увеличивая время удерживания соответствующих AMK-OC. Это видно из сравнения хроматографических характеристик AMK-OC (1) и (10), (13) и (18) (таблица). Структурные изомеры (например, моногалактопроизводные (19)) можно было разделить, используя градиентную элюцию вместо изократической. Все изученные нами гликопротеины различались как по олигосахаридному профилю (см., например, рисунок), так и по степени гетерогенности, т. е. каждый из гликопротеинов имел свой «фингерпринт». Это может быть использовано при сравнительном анализе гликопротеинов аналогично тому, как это сделано в работах [9, 10].

Анализируя данные, приведенные в таблице, следует подчеркнуть, что все исследованные нами АМК-ОС имеют свою пару хроматографических характеристик (при обращенно-фазовой и эксклюзионной ВЭЖХ), что позволит делать предположение о структуре углеводных цепей новых гликопротеинов на основании хроматографического поведения полученных из них АМК-ОС. Дополняя их данными моносакхаридного состава и экзогликозидного секвенирования индивидуальных АМК-ОС, можно устанавливать строение неизвестных олигосахаридов, исходя из 0,1 нмоль АМК-ОС (схема 1). Такая возможность проиллюстрирована ниже на примере церуллоплазмина.

Анализ углеводных цепей церуллоплазмина. 1 нмоль церуллоплазмина подвергли гидразиолизу, ре-N-ацетилированию и конденсации с АМК согласно схеме 1. ВЭЖХ на октадецильной колонке обнаружила четыре АМК-ОС в соотношении 34 : 48 : 7 : 11 (рисунок, а), которые были выделены в индивидуальном состоянии и охарактеризованы по своему хроматографическому поведению и моносакхаридному составу. АМК-ОС (1) был идентичен описанному нами ранее триантенному Gal₁GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂-АМК [13], а АМК-ОС (13) — диантенному Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂-АМК, выделенному из фибриногена [14]. АМК-ОС (18) по своим хроматографическим характеристикам совпадал с Gal₂GlcNAc₂Man₃·GlcNAc(Fuc)GlcNAc-АМК, выделенным из иммуноглобулина G, а после обработки фукозидазой он превращался в диантенный АМК-ОС (13). Моносакхаридный состав не противоречил их структуре. Четвертый минорный АМК-ОС (10) (его в смеси всего 7%) имел состав, отвечавший триантенному олигосахариду с фукозой.

Схема 2

Превращение АМК-ОС (10) под действием экзогликозидаз: α-фукозидазы (E₁) β-галактозидазы (E₂)



R = GlcNAc-GlcNAc-AMK

Для доказательства строения олигосахарид подвергали гликозидазному анализу согласно схеме 2. Дефукозилирование давало уже известный АМК-ОС (1), а дегалактозилирование приводило к моно- и дидегалактопроизводным (11) и (12). Обработка последних фукозидазой давала АМК-ОС (2) и (3) соответственно. Получение полностью дегалактопроизводного (4) из АМК-ОС (10) затруднено, очевидно, из-за наличия остатка фукозы у GlcNAc одной из антенн. Состав и полученные хроматографические характеристики, в том числе величина N_i , подтверждали их структуру. Наличие в церуллоплазмине минорных ди- и триантенных углеводных цепей с фукозой в хитобиозном и лактозаминном блоке соответственно не противоречит литературным данным [16, 17].

Таким образом, приведенный пример показывает возможность получения информации о структуре углеводных цепей гликопротеинов одновременно с их выделением, причем один ВЭЖХ-анализ требует 1–10 пмоль АМК-ОС (предельная чувствительность детекции в нашем случае [13] — 0,05 пмоль). При отсутствии необходимых свидетелей для идентификации олигосахаридов необходимо привлекать и другие методы. Так, для гликозидазного секвенирования АМК-ОС (10) и (18) было достаточно 50 пмоль. Более сложные структуры, такие, например, как разветвленные полилактозаминные или маннозобогатые углеводные цепи, потребуют использования гораздо большего набора методов (в частности, метилирования и масс-спектрометрии). Тем не менее предварительный хроматографический анализ АМК-ОС позволит резко ограничить число возможных структур, оптимизировать дальнейший структурный анализ и тем самым сократить количество материала, требуемого для его идентификации.

Экспериментальная часть

ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе Du Pont 8800 (США) с точным флуориметром FS 970 (Shoefel, ФРГ) и интегратором Du Pont 4100. АМК-ОС детектировали при λ 365/440 нм. Использовали аналитические колонки TSK G 2000 SW (7,5×300 мм) и Ultrasphere ODS (4,6×250 мм) (Altex) и препаративную — Zorbax C18 (9,4×250 мм; Du Pont). Для разделения использовали 10–12% CH_3CN (3,8 мл/мин, 20°С); условия анализа см. в подписи к таблице. Использовали CH_3CN для ВЭЖХ (Fluka), воду — тридистиллят, остальные растворители и реактивы готовили как в работе [20].

Использовали фетун эмбриональной сыворотки теленка (Serva), фибриноген нормальной человеческой сыворотки отечественного производства, α_1 -кислый гликопротеин нормальной человеческой сыворотки (Sigma), церуллоплазмин нормальной человеческой сыворотки (Serva), иммуноглобулин G нормальной человеческой сыворотки, выделенный как в работе [21], овальбумин белка куриных яиц (Олайне, СССР). Ферменты: проназа (Serva), α -L-фукозидаза почки быка (КФ 3.2.1.51), β -галактозидаза (КФ 3.2.1.23), N-ацетил- β -гексозаминидаза (КФ 3.2.1.30), α -маннозидаза (КФ 3.2.1.24) из *Canavalia ensiformis* (Sigma).

Полученные АМК-ОС [13]. Гликопротеины (100 пмоль) десалировали 0,05 н. трифторуксусной кислотой (80°С, 1 ч), гидролизовали проназой (две порции фермента, Е : S, 1 : 20) в течение 2 сут и выделяли фракцию гликопептидов на колонке (1,5×40 см) с сефадексом G-25 в 5% водной AsOH , анализируя фракции фенол-серниокислотным методом или рефрактометрически. Гликопептиды подвергали гидролизу (0,2 мл безводного N_2H_4 , 100°С, 10 ч), обрабатывали бензальдегидом и re-N-ацетилировали в насыщенном водном растворе NaHCO_3 , как описано в работе [13]. Олигосахариды обессоливали хроматографией на сефадексе G-15 или дауэксе 50×8 (H^+) в воде, превращали в АМК-ОС, инкубируя с 3 мл стандартного раствора АМК, и восстанавливали NaNH_2CN [13]. После подкисления AsOH смесь упаривали 4 раза с MeOH , сухой остаток растворяли в воде, АМК удаляли центрифугированием. Полученные АМК-ОС обессоливали на биогеле Р-4 (200–400 меш, Bio-Rad, США; 1,5×40 см) в 20% водном EtOH и разделяли препаративной ВЭЖХ на Zorbax C18 в 10–12% CH_3CN . Суммарный выход АМК-ОС составлял 70–80% (оценивали по GlcNAc). Так были получены АМК-ОС (1), (5), (10), (13), (18)–(20), (23) и (28). Моносахаридный состав и концевой АМК-меченый сахар определяли после кислотного гидролиза, как описано нами в работе [20].

Ферментативный гидролиз. 1 нмоль АМК-ОС инкубировали при 37°С с ферментом (0,05 ед. акт.) в 100 мкл 0,05 М Na-ацетатного буфера, pH 3,5 (β -галактозидаза), pH 4,5 (α -маннозидаза) или pH 5,0 (N-ацетил- β -гексозаминидаза и α -фукозидаза) в течение 3 ч для выделения промежуточных продуктов ферментации АМК-ОС (2), (3), (6), (8), (11), (16), (21), (24)–(26), (29), (31)–(33) или 30 ч для получения АМК-ОС (4), (7), (9), (12), (15), (17), (20), (27), (34); 20 пмоль АМК-ОС инкубировали с ферментом (0,001 ед. акт.) в 20 мкл буфера. По окончании гидролиза инкубационную смесь прогревали 2–5 мин при 100°С, центрифугировали и подвергали ВЭЖХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Montreul J.* // *Comprehensive Biochemistry*/Eds. Neuberger A., van Deen L. M. 1982. V. 19B. part II. P. 1-179.
2. *Shachter H.* // *Biochem. Cell. Biol.* 1986. V. 64. № 1. P. 163-181.
3. *Honda S.* // *Anal. Biochem.* 1984. V. 140. № 1. P. 1-47.
4. *Takehi K., Honda S.* // *J. Chromatogr.* 1986. V. 379. № 1. P. 27-55.
5. *Yamashita K., Mizuochi T., Kobata A.* // *Meth. Enzymol.* 1982. V. 83. P. 105-126.
6. *Kobata A., Yamashita K.* // *Pure Appl. Chem.* 1984. V. 56. № 7. P. 821-832.
7. *Лихошерстов Л. М., Новикова О. С., Дерезицкая В. А., Кочерков Н. К.* // Докл. АН СССР. 1984. Т. 274. № 1. С. 222-225.
8. *Takahasi N., Ishii I., Ishihara H., Mori M., Tejima S., Jefferis R., Endo S., Arata Y.* // *Biochemistry.* 1987. V. 26. № 4. P. 1137-1144.
9. *Tomiya N., Kurono M., Ishihara H., Tejima S., Endo S., Arata Y., Takahashi N.* // *Anal. Biochem.* 1987. V. 163. № 2. P. 489-499.
10. *Арбатский Н. П., Мартынова М. Д., Дерезицкая В. А., Кочерков Н. К.* // Докл. АН СССР. 1987. Т. 29. № 4. С. 995-999.
11. *Goso-Kato K., Iwase H., Ishihara K., Hotta K.* // *J. Chromatogr.* 1986. V. 380. № 2. P. 374-378.
12. *Blanken W. M., Bergere M. L., Korren P. L., Eijnden D. H.* // *Anal. Biochem.* 1985. V. 145. № 2. P. 322-330.
13. *Хорлин А. Я., Шлян С. Д., Насонов В. В., Маркин В. А.* // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1266-1274.
14. *Nishibe H., Takahasi N.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1981. V. 666. № 2. P. 274-279.
15. *Fournet B., Montreul J., Strecker G., Dorland L., Haverkamp J., Vliegenthart J. F. G., Binett J. P., Shmid K.* // *Biochemistry.* 1978. V. 17. № 24. P. 5206-5214.
16. *Yamashita K., Liang Ch.-J., Funakoshi S., Kobata A.* // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. № 3. P. 1283-1289.
17. *Endo M., Suzuki K., Schmid K., Fournet B., Karamanos Y., Montreul J., Dorland L., van Halbeek H., Vliegenthart J. F. G.* // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. № 15. P. 8755-8760.
18. *Ceccarini C., Lorenzini R., Atkinson P. H.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1983. V. 759. № 3. P. 214-221.
19. *Tai T., Yamashita K., Ogata A. M., Koide N., Muramatsu T., Iwashita S., Inoue Y., Kobata A.* // *J. Biol. Chem.* 1975. V. 250. № 21. P. 8569-8575.
20. *Хорлин А. Я., Шлян С. Д., Маркин В. А., Насонов В. В., Мирзаянова М. Н.* // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1203-1212.
21. *Mizuochi T., Taniguchi T., Shimizu A., Kobata A.* // *J. Immunol.* 1982. V. 129. № 5. P. 2016-2020.

Поступила в редакцию
25.1.1988

HPLC OF N-(4-METHYLCOUMARIN-7-YL)GLYCAMINES IN STRUCTURAL STUDIES OF N-LINKED GLYCOPROTEIN CARBOHYDRATE CHAINS

SHIYAN S. D., NASONOV V. V., MARKIN V. A., BELANCHIKOV I. M.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Using glycoproteins of known structure, an effective method of structural analysis of N-linked carbohydrate chains in glycoproteins is reported. It involves the oligosaccharide (OS) release by hydrazinolysis followed by re-N-acetylation, transformation into fluorescent derivatives (AMC-OS) by reductive amination with 7-amino-4-methylcoumarin separation by reverse-phase HPLC on Ultrasphere ODS and analysis of homogenous AMC-OS by exclusion HPLC on TSK G 2000 SW. Thirty-five AMC-OS of lactosamine, hybrid and oligomannoside types are obtained and chromatographically characterized. It is shown that structure of carbohydrate chains (from 0,1-1 nmole of glycoprotein or glycopeptide) can be determined basing on chromatographic behaviour and exoglycosidase sequencing of AMC-OS.