



УДК 577.112.853.014 : 577.114.5

© 1991 г.

С. Д. Шиян, В. В. Насонов, Н. В. Бовин,
Л. И. Новикова*, В. А. Алешкин*

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ α_1 -КИСЛОГО ГЛИКОПРОТЕИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА. РАЗЛИЧИЯ В СОДЕРЖАНИИ ДИ-, ТРИ- И ТЕТРААНТЕННЫХ N-УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва;
* МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского МЗ РСФСР, Москва

Электрофоретически и иммунохимически чистый α_1 -кислый гликопротеин нормальной сыворотки крови человека (АГП) хроматографией на Соп-А-сепарозе разделен на Соп-А-несвязываемую (АГП-1, 84%) и Соп-А-связываемые (АГП-2 и АГП-3, 14 и 2%) фракции, различающиеся молекулярными массами (соответственно 43,5, 41,2 и 39,5 кДа), pI и моносахаридным составом.

С помощью ВЭЖХ флуоресцентно-меченых олигосахаридов проведен сравнительный анализ N-углеводных цепей АГП и его молекулярных форм, структура олигосахаридов подтверждена экзогликозидазным секвенированием. Найдено, что для каждой из молекулярных форм характерно свое соотношение N-углеводных цепей (ди-, три- и тетраантенных). Обнаружены агалкто-формы олигосахаридов.

α_1 -Кислый гликопротеин (АГП) — один из основных гликопротеинов сыворотки крови человека [1—3]. Молекулярная масса АГП 43 кДа, содержание углеводов более 40%, углеводный компонент представлен пятью Asp-связанными цепями сложного типа (ди-, три- и тетраантенными) [1, 4, 5]. АГП относится к так называемым белкам острой фазы [6], т. е. усиленно синтезируется при различных патологических состояниях. Показано, что количество АГП в крови зависит от физиологического состояния организма и увеличивается в несколько раз при ряде заболеваний [6—8]. АГП связывает и выводит из кровотока ксенобиотики [9], проявляет иммуномодулирующие свойства [10]. В крови АГП присутствует в виде нескольких молекулярных форм, которые различаются по молекулярной массе и величине pI , а также характером взаимодействия с лектинами, в частности с Соп А [7, 11, 12]. Как соотносятся эти формы с соответствующими генами, кодирующими АГП в гепатоцитах, пока не совсем ясно [13].

Структурно-функциональная связь углеводного компонента АГП (и его молекулярных форм) исследована мало [8, 10]. Показано, что макрофаги предпочтительно взаимодействуют с Соп-А-связываемой формой АГП [14]. Предполагают, что изменением доли Соп-А-связываемой и Соп-А-несвязываемой форм АГП, различающихся структурой углеводных цепей, можно объяснить повышение иммуносупрессивных свойств АГП из сыворотки крови онкобольных [8, 15, 16]. До сих пор детальный анализ структурных различий молекулярных форм АГП не проводился.

В данной работе проведен анализ молекулярных форм АГП, различающихся степенью взаимодействия с Соп А, и сравнительный структурный анализ углеводных цепей этих форм.

Для характеристики АГП и его молекулярных форм использовали как коммерческий, так и выделенный нами препараты АГП. Образцы были гомогенны при анализе с помощью градиентного SDS-электрофореза

Сокращения: ОС — олигосахариды; АГП — α_1 -кислый гликопротеин, AMF-ОС — N-(4-метилкумарин-7-ил)гликампин олигосахаридов; офВЭЖХ и эВЭЖХ — обращенно-фазовая и эксклюзионная ВЭЖХ, Соп А — конканавалин А, SDS — додецилсульфат натрия.

Моносахаридный состав АГП и его молекулярных форм
(моль на 3 моль Man)

Сахара	АГП	АГП-1	АГП-2	АГП-3
Man	3,00	3,00	3,00	3,00
Gal	3,95	3,90	2,85	2,50
GlcNAc	5,90	6,00	4,90	4,40
Fuc	0,30	0,40	0,10	0,00
NeuAc	3,00	3,20	2,60	2,20

и имели M 43,5 кДа и pI 2,7—3,4, что соответствовало литературным данным [1, 7, 8]. Иммунохимическую чистоту подтверждали результаты иммуноэлектрофореза с кроличьей антисывороткой к АГП и белкам сыворотки крови.

Разделение АГП на три молекулярные формы проводили хроматографией на *Sep-A-сефарозе*, как описано в работе [11]: АГП-1 получен элюцией буфером с pH 7,2, АГП-2 — элюцией 0,15 М α -метилманнозидом; затем элюцией буфером с pH 3,0 выделена еще одна, ранее не описанная форма, более сильно связываемая с *Sep A*, — АГП-3. Соотношение *Sep-A-несвязываемой* (АГП-1, 82—85%) и *Sep-A-связываемых* форм (АГП-2 и АГП-3, 12—14 и 2%) были близки в обоих препаратах. При этом форма АГП-1 по составу, способу элюции и количеству соответствовала сумме молекулярных форм (АГП-1 + АГП-2), описанных в работе [12] и выделенных в несколько иных условиях. Поскольку нас интересовали в большей степени *Sep-A-связываемые* формы АГП, дальнейшее разделение АГП-1 не проводилось. Форма АГП-3 была выделена впервые, хотя возможность ее существования следует из результатов перекрестного иммуноэлектрофореза в работе [17].

Две основные формы, АГП-1 и АГП-2, различались молекулярными массами (M 43,5 и 41,2 кДа) и изоэлектрическими точками (pI 2,7—3,2 и 3,1—3,4). Содержание *N*-ацетилнейраминовой кислоты (NeuAc) в АГП-1 было несколько выше (10—12%), чем в АГП-2 (8—10%). Однако разница в молекулярных массах была связана не с NeuAc, так как после десалирования эта разница по-прежнему составляла 2 кДа (40,4 и 38,5 кДа).

Химический анализ обнаружил близкий аминокислотный состав, но различное содержание моносахаридов (табл. 1). Суммарное содержание NeuAc, Gal и GlcNAc в АГП-1 было выше, чем в АГП-2 и АГП-3. Масса пептидного кора оценена нами по результатам аминокислотного анализа в 26 кДа. Вычисленное на основании этого процентное содержание белка и углеводов составляло 60 и 40% для АГП-1 и 63 и 37% для АГП-2. Для АГП-3, из-за его малого количества, был проведен анализ только углеводного компонента.

Результаты химического анализа позволяли предположить, что молекулярные формы АГП различаются структурой Asp-связанных углеводных цепей, их соотношением или количеством. Поэтому нами был проведен детальный анализ структуры углеводных цепей.

Анализ осуществляли с помощью ВЭЖХ флуоресцентно-меченых производных (7-амино-4-метилкумариновых, АМК) [18, 19]. Для получения олигосахаридов АГП десалировали, обрабатывали проназой, выделяли гликопептиды и подвергали их гидразинолизу и обработке в условиях работы [18] (способ А) или обрабатывали щелочным $LiBH_4$ в 70% *t*-BuOH, как описано в работе [20] (способ Б). Оба способа давали идентичные смеси олигосахаридов и позволяли работать как с гликопептидами, так и с гликопротеинами. Оба способа были использованы при получении олигосахаридов АГП и АГП-1, выходы смеси олигосахаридов составили 70 (А) и 50% (Б). Для анализа менее доступных АГП-2 и АГП-3, полученных в количестве 1,2 и 0,3 мг, был использован метод А, более удобный для аналитических целей, чем метод Б, который мы считаем предпочтительным для отщепления *N*-цепей в препаративных масштабах (более 5 мг белка).

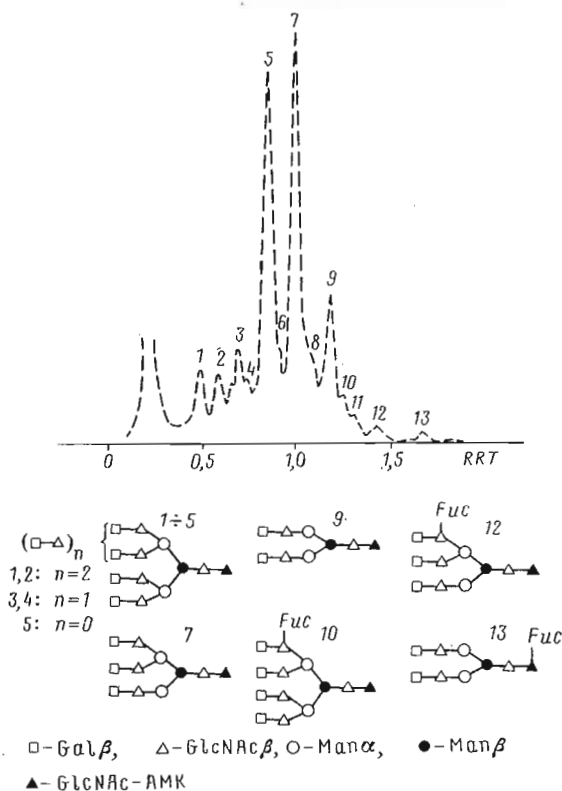


Рис. 1. ВЭЖХ на Ultrasphere ODS в 12% CH_3CN 0,2 нмоль АМК-ОС и схематическая структура АМК-ОС. Номер фракции соответствует номеру идентифицированного в ней АМК-ОС

Полученные свободные олигосахариды по реакции восстановительного аминирования 7-амино-4-метилкумарином превращали во флуоресцентные АМК-ОС, которые разделяли препаративной ВЭЖХ и затем сравнивали с заведомыми стандартами [19]. В качестве хроматографических характеристик использовали RRT (время удерживания при офВЭЖХ относительно олигосахарид (7) (табл. 2), выбранного в качестве внутреннего стандарта), N_i (относительная молекулярная масса АМК-ОС при эВЭЖХ, выраженная в глюкозных единицах; подробнее см. работу [18]).

Хотя АГП имеет только 5 сайтов гликозирования [1], из-за микрогетерогенности N-углеводных цепей число АМК-ОС, разделенных хроматографически, превышало 10 (рис. 1). Наилучшее разделение было достигнуто в системах А и Б (см. «Экспер. часть»). офВЭЖХ в системе Б было выделено 13 АМК-ОС. Нативность каждого из них (отсутствие деградации по восстанавливающему концу при отщеплении от белка) была подтверждена идентификацией АМК-хитобиозы после их гидролиза 4 н. НСІ. Каждую фракцию олигосахаридов анализировали офВЭЖХ в системе А, а также эВЭЖХ и подвергали экзогликозидазному секвенированию — последовательной обработке α -фукозидазой, β -галактозидазой и β -гексозаминидазой с выделением и ВЭЖХ-анализом продуктов после каждого шага.

При анализе в системе А спектр N-углеводных цепей исходного АГП на 85% был представлен тетра-, три- и диантенными цепями (на рис. 1 это АМК-ОС (5)—(9) и (11)) в соотношении 35 : 39 : 10 (табл. 2), что соответствует литературным данным [4, 5]. Хроматографические характеристики, моносахаридный состав и продукты поэтапного превращения этих АМК-ОС при обработке гликозидазами полностью отвечали структурам тетра-, три- и диантенных олигосахаридов сложного типа.

Исчерпывающее дегалактозилирование фракций 5, 7 и 9 приводило к олигосахаридам А (RRT 1,17, N_i 15,40), В (RRT 1,32, N_i 14,7) и С (RRT

Распределение N-углеводных цепей сложного типа в АГП и его молекулярных формах (в %)

АМК-ОС	Хроматографические характеристики *		Содержание АМК-ОС (%) **			
	RRT	N _i	АГП	АГП-1	АГП-2	АГП-3
1	0,49	25,60	4	2	2	0,2
2	0,58	24,90	3	2	2	3
3	0,69	22,71	4	4	2	4
4	0,76	21,86	2	2	<1	<0,2
5	0,83	21,55	32	34	24	13
6	0,86	20,10	3	3	2	1
7	1,00	19,25	36	37	30	16
8	1,09	17,90	3	3	0,1	0,1
9	1,17	16,05	10	6—8	36	60
10	1,25	24,45	0,1	0,1	<0,1	<0,1
11	1,31	14,3	1	1	1	2
12	1,42	22,15	0,1	0,1	<0,1	<0,1
13	1,67	19,05	0,1	0,1	<0,1	<0,1

* RRT — по данным офВЭЖХ в системе А. N_i — по данным эВЭЖХ в системе В.

** Определено флуориметрически в системе Б.

1,42, N_i 12,8), которые отвечали структурам GlcNAc₄Man₃GlcNAc₂-АМК, GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂-АМК и GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂-АМК (рис. 2а), полученным ранее [19]. Обработка АМК-ОС-А, -В и -С β-гексозаминидазой (рис. 2б) давала одно и то же соединение — коровый АМК-ОС-Ф (RRT 9,3, N_i 1,65, Man₃GlcNAc₂-АМК), также полученный ранее [19].

Фракции 6, 8 и 11 (рис. 1) были отделены от основных в системе Б. Они были представлены главным образом агалактопроизводными тетра-, три- и диантенных олигосахаридов и давали при обработке гликозидами те же продукты А, В, С и F, что и АМК-ОС (5), (7) и (9). Их содержание в АГП не превышало 5%.

Результаты экзогликозидазного секвенирования производных (10), (12) и (13) (табл. 2) показали, что они являются фукозосодержащими тетра-, три- и диантенными АМК-ОС: обработка их фукозидазой приводила к АМК-ОС (5), (7) и (9) (рис. 2б). Количество фукозосодержащих фракций в АГП было незначительно (см. табл. 2).

Анализ минорных АМК-ОС (1)–(4), элюировавшихся до АМК-ОС (5) (рис. 1), и продуктов, образующихся при ферментативном отщеплении Gal и GlcNAc (D, E, G, H, K, L и F, рис. 2а и в), указывал на то, что они являются производными тетраантенной цепи с дополнительными пятым и шестым лактозаминными блоками (вероятно, изомерами положения): (GalGlcNAc)₂₋₁(GalGlcNAc)₄Man₃GlcNAc₂-АМК. Дегалактозилирование АМК-ОС (1) и (2) (рис. 2а) приводило главным образом к продуктам D (RRT 0,76, N_i 21,35) и E (RRT 0,88, N_i 20,17); АМК-ОС (3) и (4) давали продукты G (RRT 0,93, N_i 19,25;) и H (RRT 1,03, N_i 18,45). Последующая обработка АМК-ОС-D, -E, -G и -H β-гексозаминидазой приводила (рис. 2б) к АМК-ОС-K (RRT 1,27, N_i 17,15) и -L (RRT 1,47, N_i 13,65), которые отвечали структуре (GalGlcNAc)₂₋₁Man₃GlcNAc₂-АМК. Лишь повторная обработка обеими гликозидазами приводила к коровому АМК-ОС-Ф. Наличие структур с повторяющимися лактозаминными блоками в АГП нормальной человеческой сыворотки было показано А. Кобата [5].

Таким образом, было проведено соотношение полученных АМК-ОС структурами, описанными ранее.

Структуру углеводных цепей молекулярных форм АГП анализировали аналогично описанному выше для самого АГП. Детальный хроматографический анализ смесей АМК-ОС, полученных из АГП-1, АГП-2 и АГП-3, в системах А и Б не обнаружил олигосахаридов, присущих исключительно какой-либо одной молекулярной форме АГП: разница была лишь в соотношении тех или иных фракций. Из рис. 3 видно, что молекулярные формы АГП различались соотношением N-углеводных цепей (главным образом ди-, три- и тетраантенных). Содержание диантенных цепей было

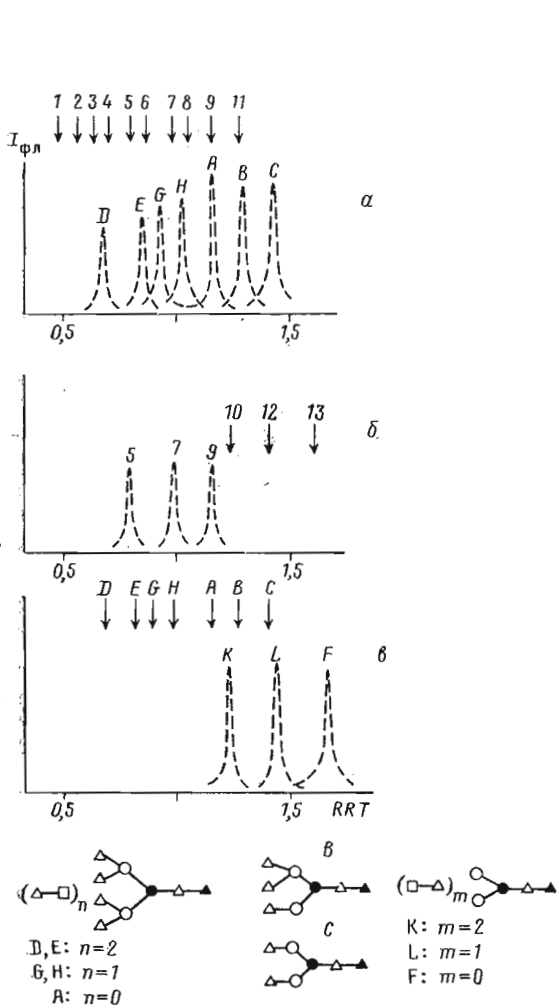


Рис. 2

Рис. 2. ВЭЖХ (условия рис. 1) продуктов дегалактозилирования АМК-ОС 1 (D), 2 (E), 3 (G), 4 (H), 5 и 6 (A), 7 и 8 (B), 9 и 11 (C) (а); продуктов дефукозилирования АМК-ОС 10 (5), 12 (7) и 13 (9) (б) и продуктов обработки гексозаминидазой АМК-ОС D и E (K), G и H (L), A, B и C (F) (в). Под кривой приведены структуры соответствующих продуктов; обозначения как на рис. 1

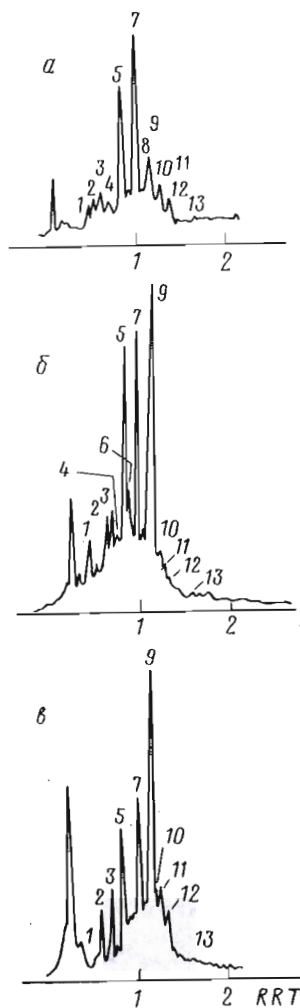


Рис. 3

Рис. 3. ВЭЖХ АМК-ОС (условия рис. 1), полученных из АГП-1 (а), АГП-2 (б), АГП-3 (в)

минимальным в АГП-1 (табл. 2). Эта форма соответствует АГП-А + АГП-В работы [12], согласно которой в форме А диантенная цепь не найдена, а в форме В присутствует только одна диантенная цепь. В АГП-2 (соответствует АГП-С в работе [12]) содержание диантенных N-углеводных цепей было выше (36%) и отвечало двум цепям на пять точек гликозилирования. Самым высоким (60%, или три цепи) содержание диантенных цепей было в АГП-3 (табл. 2). Во всех выделенных фракциях АГП соотношение АМК-ОС (5) и (7) между собой и суммы АМК-ОС (1)–(5) к АМК-ОС (7) было примерно одинаковым и близким 4 : 5 и 4 : 3. Различия по остальным АМК-ОС менее значительны (табл. 2).

Найденные различия в соотношении N-углеводных цепей АГП³ и его молекулярных форм коррелируют с разницей молекулярных масс, которую можно оценить по результатам SDS-электрофореза для АГП-1 и АГП-2 и их десиалированных форм в 2 кДа, а для АГП-1 и АГП-3 — в 4 кДа. Различия в структуре углеводных цепей молекулярных форм АГП, найденные нами, согласуются и с результатами лектинового анализа соответствующих гликопептидов [12].

Таким образом, в данной работе обнаружена новая молекулярная форма АГП, сильно связываемая Con A (названная АГП-3); проведено сравнение структуры N-углеводных цепей молекулярных форм АГП, различающихся отношением к Con A (АГП-1, АГП-2 и АГП-3), и показано, что различия вызваны соотношением ди-, три- и тетраантенных N-углеводных цепей.

Наличие молекулярных форм АГП может быть связано как с существованием нескольких генов, кодирующих АГП в геноме человека [13], так и с посттрансляционной модификацией соответствующих продуктов в гепатоцитах [1]. Являются ли молекулярные формы АГП, выделенные нами, продуктами одного или нескольких генов, пока неясно. Ответ на этот вопрос требует анализа соответствующих пептидов.

Выявленные различия молекулярных форм на уровне углеводных цепей могут быть привлечены для объяснения предпочтительного взаимодействия той или иной формы АГП с макрофагами, лимфоцитами и другими клетками, а также избирательного иммуномодулирующего действия молекулярных форм АГП.

Экспериментальная часть

Использовали АГП (Sigma), а также препарат АГП, выделенный нами по стандартным методикам, как описано в работе [21]; ферменты — проназу Е (Serva): β -галактозидазу и β -N-ацетилгексозаминидазу из *jeak bean*, α -L-фукозидазу почки быка (Sigma); LiBH_4 (Fluka), LiOH (Serva), моноспецифическую антисыворотку к АГП (Behringwerke) и полиспецифическую сыворотку к белкам сыворотки крови человека. *mpm*-Бутиловый спирт дважды кристаллизовали.

Градиентный SDS-электрофорез и изоэлектрофокусирование выполняли на приборе PhastSystem (Pharmacia). Использовали PhastGel Gradient 8—25%, 0,112 М трис-ацетатный буфер, pH 6,4, LMW-standart Kit, PhastGel TM IEF 3—9 Low pl Calibration Kit (pH 2,5—6,5) (Pharmacia). Иммуноэлектрофорез осуществляли по Грабару—Вильямсу, используя моноспецифическую антисыворотку к АГП и полиспецифическую сыворотку к белкам сыворотки крови.

ВЭЖХ выполняли на жидкостном хроматографе Gold System (Beckman) с интегратором Du Pont SP 4100 (США) и проточным флуориметром Gilson 121 (Франция), флуориметрическая детекция при $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 365/440$ нм. Использовали аналитические колонки Ultrasphere ODS (4,6 \times 250 мм, 7 мкм, Beckman) и TSK G 2000 SW (7,5 \times 300 мм, 10 мкм, Altex), ацетонитрил для ВЭЖХ марки ос. ч. (Львов, СССР), остальные реактивы как в работе [18]. Хроматографические системы: 12% CH_3CN в H_2O (А); линейный градиент 7—12% (Б) (0,9 мл/мин, 25° С) и 7% водный этанол (0,2 мл/мин, 30° С) (В).

Колориметрические реакции проводили в 96-луночных планшетах (объем пробы 0,2 мл), измерения — на фотометре Titertek Multiskan MK II, фильтры 620, 490 и 540 нм. Белок во фракциях, полученных при аффинной хроматографии на Con A, определяли реактивом Бредфорда [22], содержание углеводов — фенол-серноокислотным методом [23], сиаловые кислоты — тиобарбитуратным методом [24]; для калибровки использовали бычий сывороточный альбумин, Gal и NeuAc соответственно. Линейность наблюдали в интервале концентраций 0,1—5 мкг.

Моносахаридный состав определяли с помощью офВЭЖХ АМК-производных, как описано в работе [25]. Аминокислотный состав анализировали на приборе системы Pico-Tag (Waters).

Аффинную хроматографию выполняли на колонке (0,6 \times 6 см) с Con-A сефарозой 4В (Pharmacia) в 0,02 М трис- HCl -буфере, pH 7,2, с 0,15 М NaCl , 1 мМ MnCl_2 , 1 мМ CaCl_2 [11]. Элюировали указанным буфером, 0,2 М α -метилманнозидом (Sigma) в этом же буфере, 0,1 М Na -ацетатным буфером, pH 3,0. Фракции, содержащие АГП, собирали, диализовали против воды и лиофилизировали.

Получение олигосахаридов. АГП десиазировали 0,4 н. TFA (80° С, 1 ч), обрабатывали проназой (0,5 мг фермента на 5 мг АГП) и выделяли гликопептиды на сефадексе G-25 (2 \times 30 см) в 0,5% AcOH . Фракции, содержа-

щие углеводы, собирали, лиофилизировали и получали олигосахариды гидролизом, как описано в работе [18] (метод А), или с помощью щелочного LiBH_4 согласно работе [20] (метод Б).

Метод Б. Десалированный АГП (5—10 мг) или 2 мг полученных из него гликопептидов растворяли в 5 мл 0,025 М LiOH — 0,05 М три- Li -цитрат — 70% t - BuOH , охлаждали до 5° С, порциями добавляли LiBH_4 (до конечной концентрации 2 М), перемешивали 5 ч при 50° С, охлаждали до 5—10° С, прибавляли 5 мл воды (5° С), по 3 мл ацетона и AcOH , упаривали досуха, затем упаривали с MeOH (5×10 мл), обессоливали на сефадексе G-15, выдерживали 16 ч в 0,5% AcOH для превращения образовавшихся гликозиламинов в свободные олигосахариды и лиофилизировали.

Полученные по методу А и Б олигосахариды превращали в АМК-ОС по реакции восстановительного аминирования с АМК в присутствии NaBH_2CN в смеси $\text{DMF}-\text{H}_2\text{O}-\text{AcOH}$, согласно работе [18]. АМК-ОС очищали на биогеле Р-4 (200—400 меш) и подвергали аналитической или препаративной ВЭЖХ.

Ферментативный гидролиз АМК-ОС проводили как описано в работах [18, 19].

Авторы благодарят канд. хим. наук Ю. В. Смирнова, В. А. Маркина и Л. С. Жигис (ИБХ АН СССР) за помощь при выполнении ряда анализов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmid K. // The Plasma Proteins. V. 1 / Ed. Putman F. W. N. Y.: Acad. Press, 1975. P. 183—228.
2. Лютов А. Г. Иммунохимические и биологические свойства α_1 -кислого гликопротеина человека: Дис... канд. биол. наук. М., Ин-т эпидемиол. и микробиол. им. Г. Н. Габричевского, 1986.
3. Bayard B., Kerckaert J.-P. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. V. 95. № 2. P. 777—784.
4. Fournet B., Montreuil J., Strecker G., Dorland G., Haverkamp J., Vliegenthart J. F. G., Binette J. P., Schmid K. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 24. P. 5206—5214.
5. Yoshima H., Matsumoto A., Mizuochi T., Kawasaki T., Kobata A. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 16. P. 8476—8484.
6. Алешкин В. А., Новикова Л. И., Лютов А. Г., Алешкина Т. Н. // Клин. мед. 1988. Т. 8. С. 39—48.
7. Wells C., Bog-Hansen T. C., Cooper E. H., Class M. R. // Clin. chim. acta. 1981. V. 109. № 1. P. 59—67.
8. Fujii M., Takahashi N., Hayashi H., Furusho T., Matsunaga K., Yoshikumi Ch. // Anticancer Res. 1988. V. 8. P. 303—306.
9. Kremer J. M. H., Wilting J., Janssen L. H. M. // Pharmacol. Rev. 1988. V. 40. № 1. P. 1—47.
10. Chiu K. M., Mortensen R. F., Osmand A. P., Gewurz H. // Immunology. 1977. V. 32. P. 997—1005.
11. Nicolle I., Libreton J.-P., Fontain M., Hiron M. // Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Berlin — New York: W. de Gruyter & Co., 1982. V. 11. P. 413—421.
12. Bierhuizen M. F. A., De Wit M., Govers C. A. R. L., Ferwerda W., Koeleman C., Pos O., Van Dik W. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 175. № 2. P. 387—394.
13. Dente L., Pizza M. G., Metspalu A., Cortese R. // EMBO J. 1987. V. 6. P. 2289—2296.
14. Pimpanee V., Midoux P. // Glycoconjugate J. 1989. V. 6. № 4. P. 561—574.
15. Fujii M., Takahashi N., Hayashi H., Matsunaga K., Yoshima Ch. // Clin. Biochem. 1987. V. 20. P. 183—189.
16. Bennet M., Schmid K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 10. P. 6109—6113.
17. Friedman M. L., Wermeling J. R., Halsall H. B. // Biochem. J. 1986. V. 236. № 1. P. 149—153.
18. Хорлин А. Я., Шиян С. Д., Насонов В. В., Маркин В. А. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1266—1274.
19. Шиян С. Д., Насонов В. В., Маркин В. А., Беляничков М. М. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1197—1207.
20. Likhocherstov L. M., Novikova O. S., Piskarev V. E., Trusikhina E. E., Derevitskaya V. A., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 178. № 1. P. 155—163.
21. Новикова Л. И. Разработка способов выделения белков острой фазы (БОФ), получение антисывороток к ним и некоторые аспекты их применения: Дис... канд. мед. наук. М.: Ин-т эпидемиол. и микробиол. им. Г. Н. Габричевского, 1990.
22. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 2. P. 248—254.
23. Du Bois M., Gilles K. S., Hamilton J. K., Robors P. A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 2. P. 350—356.

24. Warren L. // J. Biol. Chem. 1959. V. 234. № 4. P. 1971—1975.
25. Хорлин А. Я., Шиян С. Д., Маркин В. А., Насонов В. В., Мирзаянова М. Н. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1203—1212.

Поступила в редакцию
24.IX.1990

После доработки
27.XII.1990

S. D. SHIYAN, V. V. NASONOV, N. V. BOVIN, L. I. NOVIKOVA *, V. A. ALESHKIN *

THE MOLECULAR FORMS OF HUMAN α_1 -ACID GLYCOPROTEIN.
VARIATIONS IN THE OCCURENCE OF BI-, TRI-, AND TETRAANTENNARY
N-LINKED CARBOHYDRATE CHAINS

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

** G. N. Gabrichevski Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow*

α_1 -Acid glycoprotein isolated from healthy individuals blood was separated on Con A-Sepharose into three fractions: non-bound (AGP-1, 84%, 43.5 kDa), Con A-bound (AGP-2, 14%, 41.3 kDa), and Con A-tightly bound (AGP-3, 2%, 39.6 kDa). Amino acid compositions of these fractions were similar but carbohydrate ones differed. HPLC analysis of 7-amino-4-methylcoumarine derivatives of the oligosaccharides in combination with their sequential exoglycosidase digestion showed that AGP-1, AGP-2, and AGP-3 have the same set of oligosaccharides and differ only by their proposition. A minor quantity of agalacto-oligosaccharides (with a terminal GlcNAc residue) was identified.