



УДК 547.963.1.02

СТРУКТУРА УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ
РИБОФЛАВИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО ГЛИКОПРОТЕИНА
БЕЛКА КУРИНОГО ЯЙЦА
II *. СПЕКТРОСКОПИЯ ^1H -ЯМР (500 МГц) ГЛАВНЫХ
НЕЙТРАЛЬНЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ

Пискарев В. Е., Сепетов Н. Ф. *, Лихошерстов Л. М.,
Галенко Е. Л., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К.

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

* Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии
Всесоюзного кардиологического центра Академии медицинских наук СССР,
Москва

Восстановительным расщеплением LiBH_4 в t -BuOH проведено отщепление олигосахаридных цепей рибофлавинсвязывающего гликопротеина белка куриного яйца (РФ-ГП₆). Методом ВЭЖХ выделено семь главных олигосахаридов в виде альдитолов, и с помощью спектроскопии ^1H -ЯМР установлена их структура. Показано, что структура и относительное содержание углеводных цепей РФ-ГП₆ и овомукоида из того же источника совпадают, несмотря на сильные различия их полипептидных цепей и числа сайтов гликозилирования. С помощью ВЭЖХ продемонстрирована высокая гетерогенность олигосахаридов овотрансферрина (другого гликопротеина яичного белка) и их сходство с олигосахаридами РФ-ГП₆ и овомукоида.

Гликозилирование — важнейший вид посттрансляционной модификации белков, и гликопротеины имеют широкое распространение в животном и растительном мире. Белок куриного яйца является важным источником N-гликопротеинов [2]. Биосинтез углеводных цепей этих гликопротеинов имеет ряд особенностей: в них практически отсутствуют комплексные цепи, характерные для многих N-гликопротеинов млекопитающих, зато обнаружены уникальные бисектированные трех—пятиантенные [3, 4], а также бисектированные гибридные олигосахаридные цепи [5]. К настоящему времени хорошо изучено строение углеводных цепей овальбумина [5—14] и овомукоида [3, 4, 15], а также определена структура двух углеводных цепей овотрансферрина [16, 17]. Для других N-гликопротеинов белка куриного яйца (авидина, рибофлавинсвязывающего гликопротеина (РФ-ГП₆), овонингибитора, овомакроглобулина, овомуцина и др.) данные по структуре N-связанных олигосахаридных цепей отсутствуют.

Ранее нами с помощью ВЭЖХ была показана высокая степень гетерогенности углеводных цепей РФ-ГП₆ и определен их моносахаридный состав [1], позволяющий предположить сходство олигосахаридов РФ-ГП₆ и овомукоида, а также овотрансферрина. Цель настоящей работы — выделение главных нейтральных олигосахаридов РФ-ГП₆ и определение их структуры с помощью спектроскопии ^1H -ЯМР (500 МГц).

Овомукоид, овотрансферрин и РФ-ГП₆, гомогенные по данным электрофореза и иммуноэлектрофореза, выделяли с помощью препаративной ионообменной ВЭЖХ [2].

Отщепление олигосахаридов во всех трех гликопротеинах с помощью щелочного LiBH_4 и их довосстановление проводили по методу [18]. Полученную в каждом случае смесь восстановленных олигосахаридов разделяли на кислую и нейтральную фракции на QAE-сефадексе А-25.

Нейтральные восстановленные олигосахариды фракционировали с по-

* Сообщение I см. [1]. Принятые сокращения: РФ-ГП₆ — рибофлавинсвязывающий гликопротеин белка куриного яйца.

Рис. 1. Выделение смеси восстановленных олигосахаридов РФ-ГП₆ (а), овомукоида (б) и овотрансферрина (в) на колонке (19×150 мм) и Bondapak C18. Элюент — вода, скорость потока 6 мл/мин, детекция при 205 нм

Рис. 2. Разделение фракций 1 (а), 3 (б), 6 (в), 8 (г), 9 (д), 13 (е), 14 (ж) на колонке (4,6×250 мм) Zorbax NH₂. Элюция градиентом вода — ацетонитрил (70→55% ацетонитрила за 120 мин), скорость потока 1 мл/мин, детекция при 205 нм

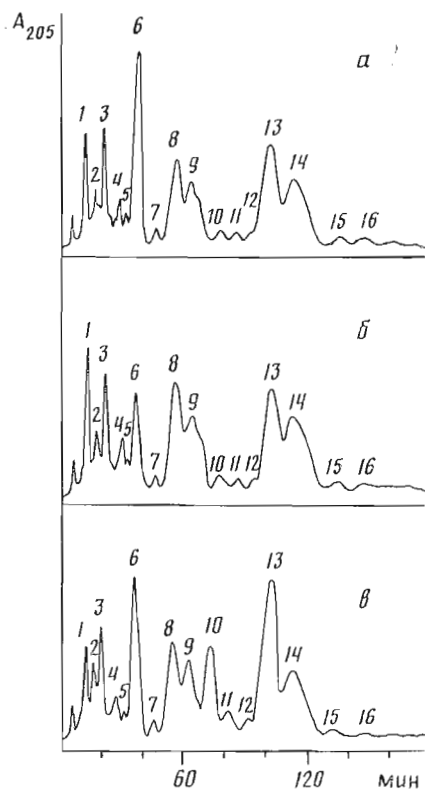


Рис. 1

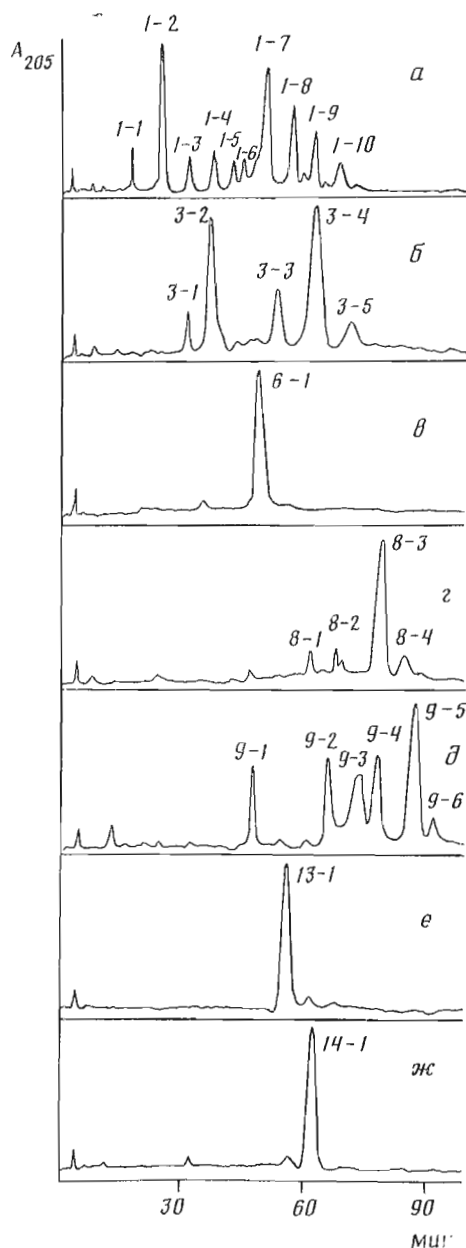
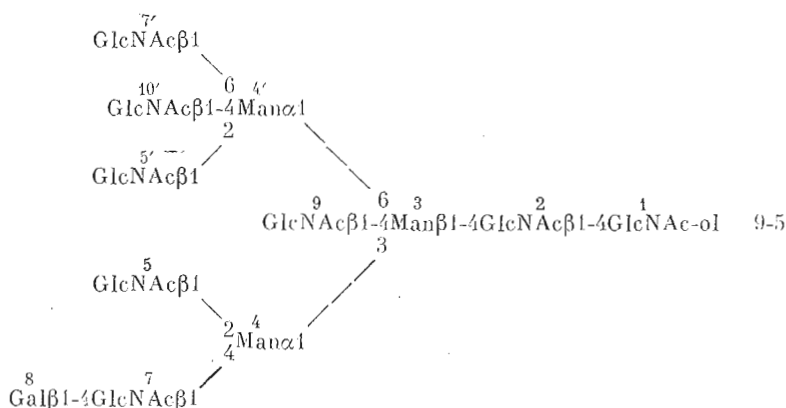


Рис. 2

мощью ВЭЖХ. Сначала использовали обращенно-фазовую хроматографию на препаративной (19×150 мм) колонке и Bondapak C18, проводя элюцию водой; при этом для РФ-ГП₆, овомукоида и овотрансферрина было получено 16 олигосахаридных фракций (рис. 1а–в). Главные фракции 1, 3, 6, 8, 9, 13 и 14 из РФ-ГП₆ и овомукоида повторно хроматографировали на той же колонке. Индивидуальные олигосахариды далее выделяли с помощью нормально-фазовой хроматографии на аналитической колонке (4,6×250 мм) с аминофазой Zorbax NH₂ в градиенте вода — ацетонитрил (рис. 2а–ж).

Структуру выделенных олигосахаридов РФ-ГП₆ и овомукоида определяли с помощью спектроскопии ¹H-ЯМР (500 МГц). В таблице приведены значения химических сдвигов протонов структурно-репортерных групп * моносахаридов семи главных углеводных цепей РФ-ГП₆. На схеме

* По терминологии Влигенхарта [19].



изображены структуры этих олигосахаридов. На рис. 3 и 4 в качестве примера приведены спектры ^1H -ЯМР (500 МГц) олигосахаридов 14-1 и 3-4 соответственно.

Олигосахарид 1-2. Фракция 1 содержала сложную смесь олигосахаридов, элюирующихся на колонке μ Bondapak C18 близко к фронту (рис. 1а); при хроматографии на колонке с аминофазой Zorbax NH_2 она разделялась на большое число олигосахаридных фракций (рис. 2а), главными из которых были 1-2 и 4-7. По данным спектроскопии ^1H -ЯМР, фракция 1-7 была смесью 2–3 олигосахаридов, а фракция 1-2 содержала индивидуальный олигосахарид. Параметры его спектра ^1H -ЯМР (таблица) совпадали с параметрами спектра пентасахаридного кора (см. схему), характерного для N-гликопротеинов и выделенного ранее из куриного [20] и перепелиного [21] овомукоидов в виде альдитола. Сигнал Н-1 на 4,637 м.д. принадлежит GlcNAc-2, сигналы Н-1 на 4,915 и 5,104 м.д. — незамещенным Man-4' и Man-4 соответственно. Сигнал Man-3 на ~4,78 м.д. при 300 К лежит под сигналом воды и проявляется при съемке с температурой 340 К. В спектре присутствуют характеристические сигналы Н-2 Man-3, Man-4' и Man-4, а также сигналы $\text{CH}_3(\text{N-Ac})$ GlcNAc-1-ol и GlcNAc-2 (таблица).

Олигосахарид 6-1. Фракция 6 (рис. 1а) при хроматографии на колонках с обращенной фазой и аминофазой выходила в виде одного пика (рис. 2в), содержащего индивидуальный олигосахарид. Параметры его спектра ^1H -ЯМР (таблица) соответствовали биссектированному октасахариду, выделенному ранее из перепелиного овомукоида в виде альдитола [21], а также в виде невосстановленного олигосахарида и дансильрованного аспарагинилолигосахарида из куриных овомукоида [22] и овотрансферрина [17] соответственно. Близкие дублеты при 4,550 и 4,543 м.д. соответствуют сигналам Н-1 GlcNAc-5 и GlcNAc-5'. По сравнению с олигосахаридом 1-2 происходит сдвиг сигналов протонов Man-3: Н-1 до 4,708 м.д. и Н-2 до 4,176 м.д., что характерно для биссектированных структур [20]; это подтверждается также наличием сигнала 4,465 м.д. (Н-1 GlcNAc-9) и появлением характеристического мультиплета в области 3,3 м.д., обнаруженного в спектрах всех биссектированных структур [9, 17]. В спектре присутствуют характеристические сигналы Н-1 Man-4' и Man-4, Н-2 Man-3, Man-4' и Man-4, а также пять сигналов $\text{CH}_3(\text{N-Ac})$ (таблица).

Олигосахариды 13-1 и 14-1. Фракции 13 и 14 при хроматографии на колонках μ Bondapak C18 (рис. 1а) и Zorbax NH_2 (рис. 2е–ж) выходили в виде одного пика каждая и содержали индивидуальные олигосахариды. Параметры спектра ^1H -ЯМР олигосахарида 13-1 (таблица) полностью соответствовали биссектированному нонасахариду из куриного овомукоида, выделенному в виде альдитола [20] (см. схему); такая же структура в составе гликопептидов была обнаружена в курином овотрансферрине [16, 17]. Главное различие в спектрах олигосахаридов 13-1 и 14-1 (таблица, рис. 3) заключается в сдвиге в низкое поле сигналов Н-1 и Н-2 остатка GlcNAc-7 на 0,022 и 0,047 м.д. соответственно, что свидетельствует о присоединении к нему остатка Gal-8 (Н-1 δ 4,471 м.д.). В пользу

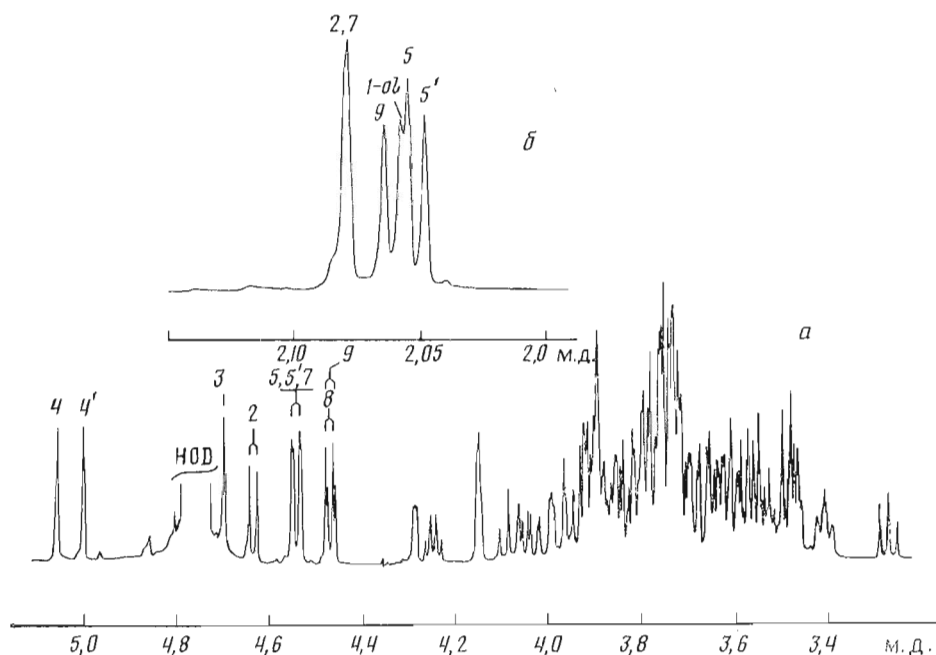


Рис. 3. Спектр ^1H -ЯМР (500 МГц, 300 К) олигосахарида 14-1. Отмечены сигналы протонов Н-1 моносахаридных остатков (а) и группы $\text{CH}_3(\text{N-Ac})$ остатков GlcNAc (б). Цифры соответствуют номеру остатка (см. схему)

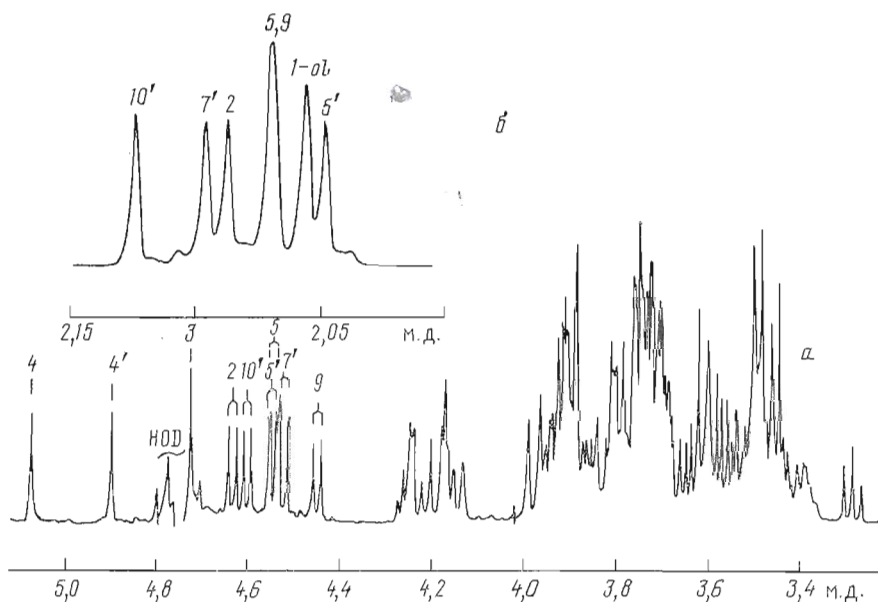


Рис. 4. Спектр ^1H -ЯМР (500 МГц, 300 К) олигосахарида 3-4. Отмечены сигналы протонов Н-1 моносахаридных остатков (а) и группы $\text{CH}_3(\text{N-Ac})$ остатков GlcNAc (б). Цифры соответствуют номеру остатка (см. схему)

этого говорит слабый сдвиг сигнала $\text{CH}_3(\text{N-Ac})$ остатка GlcNAc-7 (на 0,003 м.д.). Gal-8 присоединена к GlcNAc-7 $\beta 1 \rightarrow 4$ -связью [19].

Олигосахарид 3-4. Фракция 3 при хроматографии на μ Bondapak C18 (рис. 1а) выходила в виде симметричного пика, однако на колонке с аминофазой (рис. 2б) она разделялась на 5 основных и 3 минорных олигосахаридных фракций, главными из которых были 3-2 и 3-4. Фракция 3-2, по данным ЯМР, состояла из смеси двух олигосахаридов в соотношении $\sim 2,5:1$. Фракция 3-4 содержала индивидуальный олигосахарид, и пара-

**Химические сдвиги протонов структурно-репортерных групп моносахаридов
главных углеводных цепей РФ-ГП₆ ***

Протон	Номер остатка моно- сахарида	Олигосахарид						
		1-2	6-1	13-1	14-1	3-4	8-3	9-5
Н-1	2	4,637	4,634	4,634	4,634	4,630	4,628	4,628
	3	4,780	4,708	4,698	4,698	4,713	4,712	4,713
	4	5,104	5,059	5,057	5,057	5,069	5,069	5,069
	4'	4,915	5,002	5,000	5,000	4,895	4,891	4,891
	5	—	4,550	4,539	4,540	4,539	4,540	4,537
	5'	—	4,543	4,542	4,540	4,545	4,546	4,538
	7	—	—	4,518	4,540	—	4,518	4,544
	7'	—	—	—	—	4,521	4,518	4,519
	8	—	—	—	4,471	—	—	4,472
	9	—	4,465	4,465	4,466	4,448	4,444	4,444
	10'	—	—	—	—	4,597	4,585	4,586
Н-2	1-ol	4,243	4,244	4,244	4,243	4,244	4,250	4,250
	3	4,259	4,176	4,149	4,149	4,171	4,145	4,145
	4	4,068	4,246	4,285	4,285	2,240	4,275	4,276
	4'	3,974	4,148	4,146	4,144	4,162	4,160	4,160
	7	—	—	3,754	3,801	—	н. о. *	н. о.
CH ₃ (N-Ac)	1-ol	2,054	2,056	2,057	2,054	2,054	2,054	2,054
	2	2,075	2,077	2,077	2,077	2,085	2,085	2,085
	5	—	2,052	2,054	2,054	2,066	2,066	2,065
	5'	—	2,046	2,047	2,048	2,046	2,045	2,046
	7	—	—	2,082	2,079	—	2,084	2,079
	7'	—	—	—	—	2,094	2,094	2,093
	9	—	2,065	2,063	2,064	2,066	2,066	2,065
	10'	—	—	—	—	2,122	2,122	2,122

* н. о. — не определяли.

метры его спектра ¹H-ЯМР (таблица, рис. 4) (кроме сигналов GlcNAc-1 и GlcNAc-2) соответствовали биссектированному декасахариду, выделенному ранее из куриного овомукоида в виде невосстановленного олигосахарида [22]. В нем присутствуют сигналы, характерные для биссектированных структур (см. выше). По сравнению с олигосахаридом 6-1 в декасахариде 3-4 наблюдается сильный сдвиг сигнала Н-1 Man-4' (с 5,002 до 4,895 м.д.) за счет присоединения двух остатков GlcNAc (7' и 10') и появляются соответствующие им характеристические сигналы Н-1 (4,521 и 4,597 м.д.) и CH₃(N-Ac) (2,094 и 2,122 м.д.).

Олигосахариды 8-3 и 9-5. Фракции 8 и 9 при обращенно-фазовой хроматографии выходили в виде перекрывающихся несимметричных пиков (рис. 1а), разделяющихся на колонке с аминофазой на 4 и 6 олигосахаридов соответственно (рис. 2г, д). Главные фракции 8-3 и 9-5 содержали индивидуальные олигосахариды. Параметры их спектров ¹H-ЯМР (таблица) полностью соответствовали биссектированным ундека- и додекасахаридам, полученным из куриного овомукоида также в виде альдитолов [20]. Олигосахарид 8-3 содержал пять остатков GlcNAc, присоединенных к Man-4' и Man-4, т. е. представлял собой пятнантенный биссектированный олигосахарид. Олигосахарид 9-5 содержал дополнительно остаток Gal-8, присоединенный к GlcNAc-7.

Все семь выделенных нами главных нейтральных олигосахаридов были ранее обнаружены в курином овомукоиде [4].

Для оценки относительного содержания различных нейтральных олигосахаридов в РФ-ГП₆ и овомукоиде мы сравнили с помощью ВЭЖХ профили элюции соответствующих олигосахаридных фракций на колонках с обращенной и нормальной фазами, а также сняли спектры ¹H-ЯМР главных олигосахаридов овомукоида.

Сравнение профилей элюции нейтральных восстановленных олигосахаридов из РФ-ГП₆ и овомукоида на колонке μ Bondapak C18 (рис. 1а, б), фракций 1, 3, 6, 8, 9, 13 и 14 на колонке с аминофазой Zorbax NH₂, а также

данные спектроскопии ^1H -ЯМР говорят о том, что оба гликопротеина имеют практически одинаковый набор основных олигосахаридов. Относительное содержание различных углеводных цепей изменяется незначительно; наиболее заметна разница в содержании олигосахарида 6-1 (главного в РФ-ГП₆). Практически одинаковые хроматограммы были получены и при делении на Zorbax NH₂ минорных фракций, например 7 и 10.

Для качественного сравнения набора нейтральных углеводных цепей РФ-ГП₆ и овомукоида с овотрансферрином мы провели обращенно-фазовую хроматографию смеси восстановленных олигосахаридов овотрансферрина с последующей нормально-фазовой хроматографией главных фракций 6, 13 и 14. Очевидно, что главные пики, соответствующие основным олигосахаридам из РФ-ГП₆, овомукоида и овотрансферрина, совпадают (рис. 1а—в). Основное различие связано с более высоким содержанием фракции 10 в овотрансферрине, которая в овомукоиде и РФ-ГП₆ минорна. На основании этих данных можно сделать вывод о том, что олигосахариды овотрансферрина также весьма гетерогенны и относятся к семейству бисектированных GlcNAc-обогащенных олигосахаридов овомукоидного типа. Это подтверждается проведенным ранее [17] выделением из овотрансферрина двух олигосахаридов (в виде дансидаспартилолигосахаридов), совпадающих по структуре с олигосахаридами 6-1 и 13-1 из РФ-ГП₆ и овомукоида.

Интересно, что полипептидные цепи РФ-ГП₆, овомукоида и овотрансферрина сильно различаются [23—25] и процент гомологии их весьма незначителен. В РФ-ГП₆ на 219 аминокислотных остатков приходится 2 сайта гликозилирования, в овомукоиде на 186 аминокислотных остатков — 4—5 сайтов гликозилирования, а в овотрансферрине — всего 1 сайт на 686 аминокислотных остатков. В РФ-ГП₆ гликозилируются весьма сходные участки: -Tyr-Ala-Asn³⁶-Ala-Thr- и -Tyr-Ala-Asn¹⁴⁷-Gly-Thr-. Напротив, в овомукоиде гликозилируются участки, не только отличные от участков РФ-ГП₆, но и различающиеся между собой: Phe-Pro-Asn¹⁰-Ala-Thr, Gly-Thr-Asn⁵³-Ile-Ser, Pro-Met-Asn⁶⁹-Cys-Ser, Tyr-Ala-Asn⁷⁵-Thr-Thr, Glu-Ser-Asn¹⁷³-Gly-Thr. В овотрансферрине гликозилируется сайт Ile-His-Asn⁴⁷³-Arg-Thr, отличающийся от сайтов РФ-ГП₆ и овомукоида. Таким образом, в этих гликопротеинах мы встречаем пример того, что аминокислотные последовательности полипептидных цепей, в том числе ближайшее окружение сайтов гликозилирования, не оказывают существенного влияния на результаты гликозилирования, после которого разные полипептидные цепи содержат практически одинаковый набор олигосахаридных цепей, относительное содержание которых весьма близко. При этом существенного значения не имеют молекулярная масса белка, величина pI и число сайтов гликозилирования.

Известные данные по структуре олигосахаридных цепей N-гликопротеинов белка куриного яйца позволяют отнести эти гликопротеины к двум основным типам. К первому относятся овомукоид, РФ-ГП₆ и овотрансферрин; в их состав входят преимущественно недостроенные бисектированные комплексные цепи (GlcNAc-обогащенные), а также недостроенные двухантенные комплексные и, по нашим предварительным данным, двухантенные фукозилированные комплексные цепи. Ко второму типу принадлежит овальбумин, содержащий олигоманнозидные и гибридные бисектированные цепи [5—14]. В основном к этому же типу, по нашим предварительным данным, относится авидин.

Известно, что биосинтез всех перечисленных гликопротеинов осуществляется в яйцекладе [26, 27]. Различия в гликозилировании обеих групп гликопротеинов могут объясняться тем, что их биосинтез происходит в разных местах яйцеклада с различным набором гликозилтрансфераз или гликозидаз.

Однако более вероятно, что эти различия в гликозилировании определяются полипептидными цепями, как это показано на примере овальбумина [28]. После экспрессии гена овальбумина в гетерологичных клетках (мышинных L-353) оказалось, что синтезируемый белок содержит гибридные цепи, образование которых для животных клеток не характерно.

Такое влияние полипептидной цепи, очевидно, осуществляется на стадии процессинга олигоманнозидных цепей. В отличие от овомукоида в овальбумине часть олигоманнозидных цепей сохраняется (в виде GlcNAc₂ Man₄₋₇ [5–7]), а часть теряет остатки Man на ветви кора Man α 1 $\rightarrow$ 3Man β . После этого дальнейшая трансформация в овальбумине и гликопротеинах типа овомукоида, по-видимому, происходит одинаково: в овальбумине образуются гибридные биссектированные, а в овомукоиде (овотрансферрине, РФ-ГП₆) — GlcNAc-обогащенные углеводные цепи. При этом оба типа углеводных цепей содержат незначительное количество остатков Gal и почти не содержат сиаловых кислот.

Экспериментальная часть

Хроматографическое оборудование, выделение гликопротеинов, отщепление, анализ и ВЭЖХ углеводных цепей описаны в работах [1, 2].

Для спектроскопии ¹H-ЯМР использовали спектрометр WM-500, снабженный компьютером Aspect-2000 (Bruker, ФРГ). Образцы готовили двукратной лиофилизацией из 99,8% ²H₂O (Sigma, США) и растворяли в 0,5 мл 99,96% ²H₂O (Merck, ФРГ). Спектры записывали при 300 К, используя в качестве внутреннего стандарта ацетон (δ 2,225 м.д.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лихошерстов Л. М., Пискарев В. Е., Галенко Е. Л., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 528–532.
2. Пискарев В. Е., Галенко Е. Л., Лихошерстов Л. М., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1171–1178.
3. Yamashita K., Kamerling J. P., Kobata A. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 21. P. 12809–12814.
4. Yamashita K., Kamerling J. P., Kobata A. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 5. P. 3099–3106.
5. Tai T., Yamashita K., Ogata-Arakawa M., Koide N., Muramatsu T., Iwashita S., Inoue Y., Kobata A. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 21. P. 8569–8575.
6. Tai T., Yamashita K., Kobata A. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 19. P. 6687–6694.
7. Yamashita K., Tachibana Y., Kobata A. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 11. P. 3862–3869.
8. Narasimhan S., Harpaz N., Longmore G., Carver J. P., Grey A. A., Schachter H. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 10. P. 4876–4884.
9. Carver J. P., Grey A. A., Winnik F. M., Hakimi J., Ceccarini C., Atkinson P. H. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 23. P. 6600–6606.
10. Nomoto H., Inoue Y. // Eur. J. Biochem. 1983. V. 135. № 2. P. 243–250.
11. Yamashita K., Ueda I., Kobata A. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 23. P. 14144–14147.
12. Ceccarini C., Lorenzoni P., Atkinson P. H. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 759. № 1. P. 214–221.
13. Ceccarini C., Lorenzoni P., Atkinson P. H. // J. Mol. Biol. 1984. V. 176. № 1. P. 161–167.
14. Yamashita K., Tachibana Y., Hitoi A., Kobata A. // Carbohydr. Res. 1984. V. 130. P. 271–288.
15. Conchie J., Hay A. J., Lomax J. A. // Carbohydr. Res. 1983. V. 112. № 2. P. 281–295.
16. Dorland L., Haverkamp J., Vliegthart J. F. G., Spik G., Fournet B., Montreuil J. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 100. № 2. P. 569–574.
17. van Halbeek H., Vliegthart J. F. G., Iwase H., Li S.-C., Li Y.-T. // Glycoconjugate J. 1985. V. 2. № 3–4. P. 235–253.
18. Likhoshesterov L. M., Novikova O. S., Piskarev V. E., Trusikhina E. E., Derovitskaya V. A., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 178. P. 155–163.
19. Vliegthart J. F. G., Dorland L., van Halbeek H. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1983. V. 41. P. 209–374.
20. Paz-Parente J., Strecker G., Leroy Y., Montreuil J., Fournet B., van Halbeek H., Dorland L., Vliegthart J. F. G. // FEBS Lett. 1983. V. 152. № 2. P. 145–152.
21. Alonso J. M., Boulenguer P., Wieruszkeski J.-M., Leroy Y., Montreuil J., Fournet B. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 177. № 1. P. 187–197.
22. Brockhausen I., Grey A. A., Pang H., Schachter H., Carver J. P. // Glycoconjugate J. 1988. V. 5. № 4. P. 419–448.
23. Hanazume Y., Mega T., Ikenaka T. // J. Biochem. 1984. V. 95. № 6. P. 1633–1644.
24. Kato I., Schrode J., Kohr W. J., Laskowski M. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 1. P. 193–201.
25. Williams J., Elleman T. C., Kingston I. B., Wilkins A. G., Kuhn K. A. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 122. № 2. P. 297–303.
26. Mandeles S., Ducay E. D. // J. Biol. Chem. 1962. V. 237. № 10. P. 3196–3199.

27. Fraps R. M., Hertz R., Sebrell W. H. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1943. V. 52. P. 140–142.
 28. Sheares B. T., Robbins P. W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 7. P. 1993–1997.

Поступила в редакцию
3.V.1989

STRUCTURE OF THE OLIGOSACCHARIDE CHAINS OF RIBOFLAVIN-BINDING GLYCOPROTEINS FROM HEN EGG WHITE. II. ^1H NMR 500-MHz SPECTROSCOPY OF THE MAIN NEUTRAL OLIGOSACCHARIDES

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

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

** Institute of Experimental Cardiology, All-Union Cardiology
 Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR,
 Moscow*

Reductive cleavage of riboflavin-binding glycoprotein from hen egg white (RF-GP_w) with $\text{LiBH}_4/\text{tert-BuOH}$ followed by $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$ treatment gave rise to oligosaccharide alditols, fractionated by a successive HPLC on $\mu\text{Bondapak C18}$ and Zorbax NH_2 columns. Seven main individual oligosaccharide alditols were isolated and their structure was investigated by ^1H NMR 500-MHz spectroscopy. The structure and relative content of the main oligosaccharide chains were proved to be identical in RF-GP_w and ovomucoid. Structure of polypeptide chains and their molecular weight, number of glycosylation sites and their structure had little or no effect on the glycosylation pattern in both glycoproteins. HPLC of the oligosaccharide alditols from another egg white glycoprotein, ovotransferrin, also revealed its high microheterogeneity and close resemblance to those of ovomucoid and RF-GP_w.