



УДК 547.963.1.066:577.412.853.088.1

© 1990 г.

Л. М. Лихошерстов, О. С. Новикова, В. А. Дерезицкая,
П. К. Кочетков

МЕТОД ОТЩЕПЛЕНИЯ УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ N-ГЛИКОПРОТЕИНОВ С ПОМОЩЬЮ NaBH_4 — BaCl_2 ИЛИ SrCl_2

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва

Предложена восстановительная система NaBH_4 — BaCl_2 или SrCl_2 для отщепления углеводных цепей от N-гликопротеинов, которая позволяет после гидролиза образующихся гликозиламинов получать интактные олигосахариды с выходом 50—60%. Найдено, что метод пригоден для отщепления щелочелabileльных фукозосодержащих олигосахаридов, которые часто входят в состав N-гликопротеинов растений.

Ранее нами был предложен мягкий метод восстановительного расщепления N-гликозиламидной углевод-пептидной связи гликопротеинов с помощью LiBH_4 [1], в условиях которого отщепление N-аспарагин-связанных олигосахаридных цепей (N-OC) не сопровождается N-деацетилированием остатков гексозаминов (ср. [2—3]). При всей простоте этот метод в то же время имеет некоторые недостатки вследствие огнеопасности и малой доступности LiBH_4 . Поэтому представляется целесообразным поиск более удобных реагентов.

В данной работе предлагается метод отщепления N-OC с помощью восстановительной системы NaBH_4 — BaCl_2 или SrCl_2 .

Известно, что использование восстановительных систем NaBH_4 — безводный галогенид металла в органическом растворителе позволяет более селективно проводить восстановление некоторых функциональных групп органических соединений [4]. В результате изучения влияния солей различных металлов на характер восстановительного расщепления амидных связей в N-гликопротеинах мы нашли, что добавление к NaBH_4 солей щелочноземельных металлов, особенно солей стронция и бария, усиливает расщепление N-гликозиламидной и пептидных связей. Это, по-видимому, вызвано протеканием обменной реакции в системе NaBH_4 — MeX_2 и образованием боргидридов соответствующих металлов $\text{Me}(\text{BH}_4)_2$, близких по восстановительной способности к LiBH_4 .

Для нахождения оптимальных условий восстановительного расщепления глюкозиламидных связей было использовано модельное соединение — 2-ацетамидо-4-О-(2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-N-(L-аспарт-4-ил)-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозиламин (I) [5]. При проведении реакции в водном растворе или с добавлением трет-бутилового спирта при различных концентрациях реагентов NaBH_4 (от 1 до 4 М), NaOH (от 0,025 до 0,1 М), MeCl_2 или $\text{Me}(\text{OAc})_2$ (от 0,2 до 2,3 М), температурах (от 30 до 60° С), временах (от 2,5 ч до 2,5 сут) мы наблюдали, что, как и в случае использования LiBH_4 [1], наряду с главными продуктами — 2-ацетамидо-4-О-(2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозиламином (II) и 2-амино-4-гидроксидбутановой кислотой (III) — в реакционных смесях присутствовали минорные продукты — 2-ацетамидо-4-О-(2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-2-дезоксид-D-глюцитол (IV), 2-ацетамидо-4-О-(2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-1-амино-1,2-дидезоксид-D-глюцитол (V) и продукт его

Сокращения: N-OC—N-аспарагинсвязанные олигосахаридные цепи; O-OC—O-связанные олигосахаридные цепи; THF — тетрагидрофуран.

Выходы 2-амино-4-гидроксибутановой кислоты (III) и гликамина (V) при восстановительном расщеплении гликопептида (I) в различных условиях боргидридной обработки в 0,05 М NaOH при 50° С

| Реагенты | | Время обработки, ч | Присутствие трет-бутилового спирта | Выход, % | |
|-------------------------|---|--------------------|------------------------------------|---------------|---------------|
| [NaBH ₄], М | соль | | | кислоты (III) | гликамина (V) |
| 1 | 1,65 М Ва(СН ₃ СОО) ₂ | 16 | — | 62 | 12 * |
| 2 | » | 16 | — | 90 | 24 * |
| 4 | » | 16 | — | 98 | 34 * |
| 4 | » | 4 | — | 68 | 19 |
| 4 | » | 4 | + | 75 | 21 |
| 4 | 1 М ВаСl ₂ | 4 | + | 70 | 15 |
| 4 | 1 М SrСl ₂ | 4 | + | 82 | 25 |
| 4 | 1 М Са(СН ₃ СОО) ₂ | 4 | + | 54 | н.о. ** |
| 4 | 1 М MgSO ₄ | 4 | + | 17 | » |
| 4 | — | 4 | + | 30 | 10 |
| 1,25 *** | — | 5 | — | 61 | н.о. |

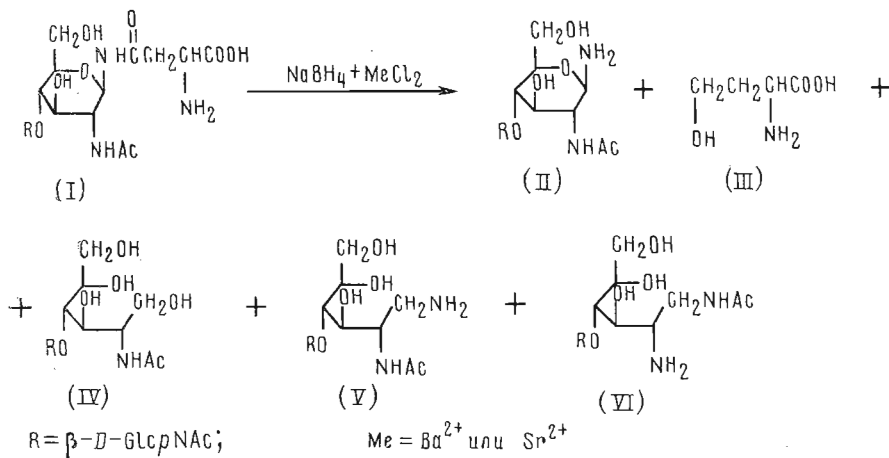
* Сумма гликаминов (V) и (VI).

** Не определяли.

*** Sr(BH₄)₂.

N² → N¹-ацетильной миграции — 1-ацетидамо-4-О-(2-ацетидамо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-2-амино-1,2-дидезокси-D-глюцитол (VI).

Эффективность восстановительного расщепления N-гликозиламиидной связи в гликопептиде (I) определяли по количеству образующейся 2-амино-4-гидроксибутановой кислоты (III), а побочный процесс — восстановление гликозиламина (II) — оценивали по количеству восстановленных гликозиламинов (V) и (VI), причем гликамин (VI) образуется медленно и обнаруживается только при продолжительных обработках (16 ч, 50° С).



В табл. 1 представлены данные расщепления гликопептида (I) боргидридом в различных условиях, из которых видно, что добавление солей Ba²⁺ и Sr²⁺ приводит к более эффективным результатам; применение 2 и 4 М NaBH₄ + Ва(СН₃СОО)₂ позволяет достичь за 16 ч при 50° С 90—98% расщепления гликопептида (I), однако при этом значительная часть (25—35%) гликозиламина (II) превращается в смесь гликаминов (V) и (VI). Присутствие трет-бутилового спирта несколько увеличивало степень расщепления N-гликозиламиидной связи, и выход кислоты (III) при 4-часовой обработке возрастал на 7% (табл. 1). Применение предварительно полученного Sr(BH₄)₂ [6] вместо восстановительной системы NaBH₄ — SrCl₂ не привело к увеличению выхода кислоты (III) (табл. 1).

Исследования, проведенные на модельном гликопептиде (I), позволили далее перейти к расщеплению N-гликопротеинов, для чего были выбраны типичные их представители — овомукоид, асиалофетуин и рибонуклеаза Б.

Выходы олигосахаридов (N-ОС) после обработки N-гликопротеинов боргидридами в 0,05 М NaOH при 50° С

| Гликопротеин | Реагенты | | Время обработки, ч | Присутствие трет-бутилового спирта | Выход N-ОС, % |
|------------------------------|-------------------------|--|--------------------|------------------------------------|---------------|
| | [NaBH ₄], М | соль | | | |
| Овомукоид | 4 | 1,65 М ВаСl ₂ | 2,5 | — | 47 |
| | 4 | » | 4 | — | 52 |
| | 4 | » | 8 | — | 50 |
| | 4 | » | 16 | — | 41 |
| | 4 | 1 М ВаСl ₂ | 4 | + | 57 |
| | 4 | 1 М Ва(СН ₃ СОО) ₂ | 4 | + | 49 |
| | 4 | 1 М SrСl ₂ | 4 | + | 56 |
| | 4 | 4 М LiСl | 4 | + | 42 |
| | 2,5 | 1,65 М ВаСl ₂ | 5 | — | 48 |
| | 2,5 | 1 М ВаСl ₂ | 5 | + | 53 |
| | 1* | — | 4 | + | 50 |
| Асиалофетуин | 4 | 1 М ВаСl ₂ | 4 | + | 59** |
| Рибонуклеаза | 4 | » | 4 | + | 64 |
| Лектин <i>Sambucus nigra</i> | 4 | » | 4 | + | 52 |

* Sr(BH₄)₂.

** Отщепляется также 30% O-связанных углеводных цепей.

При этом было обнаружено, что в условиях (4 М NaBH₄ + ВаСl₂, 16 ч, 50° С), которые приводили к практически полному расщеплению гликопептида (I), выход олигосахаридов из овомукоида составил всего 41% (табл. 2). Возможно, это связано с восстановлением образующегося в процессе расщепления гликозиламина до гликамина, которое мы наблюдали на гликопептиде (I). Подобранные оптимальные условия обработки овомукоида при 50° С в течение 4 ч в 0,05 М водном растворе NaOH, содержащем 1 М ВаСl₂ и 4 М NaBH₄ в присутствии равного объема трет-бутилового спирта, позволили увеличить выход олигосахаридов до 57%. Реакция протекает в гетерогенной среде, так как трет-бутиловый спирт не смешивается с соевым раствором гликопротеина.

В этих же условиях отщепление N-ОС из асиалофетуина и рибонуклеазы составляло 59—64% (табл. 2). Следует отметить, что отщепившиеся от гликопротеина гликозиламины далее гидролизуются уксусной кислотой до олигосахаридов в процессе их выделения. Небольшая часть отщепившихся гликозиламинов гидролизуеться и восстанавливается в условиях восстановительного расщепления, так что соотношение невозстановленных олигосахаридов к восстановленным составляет 8—15 : 1. После дополнительного восстановления NaBH₄ полученных олигосахаридов соотношение GlcN — GlcN-ol в олигосахаридных фракциях резко изменялось. Например, для фракции из рибонуклеазы это соотношение вместо 17 : 1 составило 1,1 : 1, что согласуется с литературными данными о структуре этих олигосахаридов, имеющих только два остатка GlcNAc в виде дисахарида на восстанавливаемом конце [7].

В случае асиалофетуина, являющегося N,O-гликопротеином, наряду с отщеплением N-ОС в этих условиях наблюдалось отщепление приблизительно до 30% O-связанных олигосахаридных цепей (O-ОС). Однако, предлагаемый метод может быть использован для избирательного отщепления N-ОС при условии предварительного отщепления большей части O-ОС от N,O-гликопротеина с помощью щелочного NaBH₄ в присутствии соли Cd²⁺ [8].

Приведенные выше условия оказались пригодными для отщепления без деградации щелочелавильных N-ОС, содержащих остаток Fuc при C-3 остатка GlcNAc, участвующего в образовании углевод-пептидной связи. Олигосахариды такого типа найдены в некоторых N-гликопротеинах из растений [9]. Присутствие аналогичных олигосахаридных цепей можно было ожидать и в лектине из коры *Sambucus nigra*, имеющего

характерный моносахаридный состав (GlcN, Man, Xyl, Fuc) [10]. В связи с этим мы обработали этот гликопротеин NaBH_4 и BaCl_2 в присутствии 0,05 М NaOH и с выходом 52% выделили олигосахариды, соотношение моносахаридов в которых соответствовало соотношению их в исходном гликопротеине. Наличие остатка GlcNAc на восстанавливающем конце полученных олигосахаридов следовало из дополнительного восстановления их NaBH_4 , в результате которого отношение 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозы к 2-амино-2-дезоксид-*D*-глицитолу составило 1,6 : 1 (до восстановления — 24 : 1). О присутствии остатка Fuc в качестве щелочелабильного заместителя при С3 этого остатка GlcNAc свидетельствовал результат мягкой щелочной обработки олигосахаридной фракции, при которой отщеплялось ~90% Fuc (~60% Fuc обнаруживалось в виде моносахарида).

Следует отметить, что при обработке указанного лектина в условиях ранее описанного LiBH_4 -метода [1] остаток Fuc в отщепившихся щелочелабильных олигосахаридов также сохраняется. Этот факт позволяет рекомендовать LiBH_4 -метод, как и восстановительную систему $\text{NaBH}_4 - \text{BaCl}_2 (\text{SrCl}_2)$, для отщепления такого типа N-ОС от гликопротеинов, для которых ранее при использовании химических методов отщепления N-ОС встречались определенные трудности [9].

Использование восстановительной системы $\text{NaBH}_4 - \text{BaCl}_2 (\text{SrCl}_2)$ вместо LiBH_4 представляется целесообразным для препаративных целей (расщепление более 1 г гликопротеина), в связи с чем были определены примерные максимальные концентрации гликопротеина, при которых сохраняются максимальные выходы олигосахаридов. Оказалось, что в рекомендуемых условиях обработки выходы олигосахаридов, например, для овомукоида остаются практически постоянными (55—57%) при концентрации гликопротеина от 3 до 14 мг на 1 мл воды в реакционной смеси. Дальнейшее увеличение концентрации овомукоида до 20 мг/мл уменьшает выход олигосахаридов на 7—10%. Следует заметить также, что гликопротеин не должен содержать аммониевых солей, например сульфата аммония и трис- HCl , так как эти соли способствуют быстрому разложению вводимых в реакцию боргидридов.

Процедура выделения отщепленных N-ОС для всех рассмотренных гликопротеинов включала в себя разложение избытка боргидрида, осаждение Ba^{2+} или Sr^{2+} в виде оксалата, гель-хроматографию и хроматографию на катионите. Так как в предложенных условиях идет восстановительное расщепление пептидной цепи гликопротеинов, все углеводсодержащие продукты при гель-хроматографии выходят близко к холостому объему колонки с сефадексом G-15 и хорошо отделяются от основной массы низкомолекулярных пептидов и аминокислот. При гель-хроматографии в 0,1 М уксусной кислоте одновременно гликозиламин гидролизуются до олигосахаридов. Углеводсодержащая фракция разделялась далее на колонке с катионитом на олигосахаридную и гликопептидную фракции. Наряду с гликопептидами в последней фракции присутствует, по-видимому, небольшое количество олигосахаридов с концевым гликаминем. Следует особо подчеркнуть, что при выделении из лектина олигосахаридов, имеющих кислотно-щелочелабильный остаток Fuc, необходимо контролировать pH среды и температуру. Так, разделение олигосахаридов и гликопептидов на даэксе 50W \times 2 (H^+) нужно проводить на холоду с последующей нейтрализацией полученной олигосахаридной фракции щелочью до pH ~6. Повторная обработка гликопептидной фракции, например из овомукоида, позволяет получить дополнительное количество олигосахаридов, так что суммарный выход достигает 70—75%. Заметим также, что использование $\text{Sr}(\text{BH}_4)_2$ или восстановительной системы $\text{NaBH}_4 - \text{LiCl}$ для расщепления N-гликозиламидной углевод-пептидной связи гликопротеинов оказалось менее эффективным, чем использование $\text{NaBH}_4 - \text{BaCl}_2$ или SrCl_2 (табл. 2).

Таким образом, наряду с LiBH_4 для отщепления N-ОС (включая и щелочелабильные) от гликопротеинов может быть использована легкодоступная восстановительная система $\text{NaBH}_4 - \text{BaCl}_2$ или SrCl_2 .

Экспериментальная часть

В работе применяли NaBH_4 и LiBH_4 (Fluka, Швейцария), $\text{Sr}(\text{BH}_4)_2 \cdot 2 \text{THF}$ [10], перекристаллизованный 3 раза *трет*-бутиловый спирт (ч.д.а., Союзреактив), овомукоид (НПО «Биолар», СССР), рибонуклеазу Б, тип III (Sigma, США), лектин коры *Sambucus nigra* («Диагностикум», СССР) и асиалофетуин, полученный инкубацией фетуина (Sigma, США) в растворе HCOOH с pH 2,1 (1,5 ч, 80° С). Реакции с боргидридами проводили в кварцевых пробирках (7 × 100 мм), закрытых парафильмом. Растворы упаривали в вакууме при температуре бани 30–35° С.

Аналитические методы. 2-Амино-2-дезоксид-*D*-глюкозу, 2-амино-2-дезоксид-*D*-галактозу, 2-амино-2-дезоксид-*D*-глицитол, 2-амино-2-дезоксид-*D*-галактитол и аминокислоты определяли после гидролиза 4 М HCl (16 ч, 100° С) на анализаторе аминокислот Biotronik LC 4010, колонка (0,9 × 23 см) с Aminex А-6. Использовали буферы: 0,2 М Na -цитратно-солянокислый, pH 3,25, при 63° С (А), 0,35 М Na -цитратно-солянокислый, pH 5,28, при 63° С (В) и боратный [11], pH 7,24 при 80° С (С) при скорости 80 мл/ч. Нейтральные сахара (Man, Fuc, Xyl, Gal) определяли после гидролиза 2 М CF_3COOH (3 ч, 100° С) на анализаторе углеводов Biotronik LC 2000 (ФРГ), колонка (4 × 130 мм) с Durrum DАх8-11.

*Обработка 2-ацетамидо-4-О-(2-ацетамидо-2-дезоксид-β-*D*-глюкопиранозил)-*N*-(*L*-аспарт-4-ил)-2-дезоксид-β-*D*-глюкопиранозиламина (I)* NaBH_4 в присутствии соли щелочноземельного металла. К раствору 0,21 мг (0,4 мкмоль) гликопептида (I) и 0,5 ммоль (в некоторых опытах 0,825 ммоль) соли щелочноземельного металла (табл. 1) в 0,45 мл воды прибавляли 0,05 мл 0,5 М NaOH , 76 мг (2,0 ммоль) NaBH_4 и 0,5 мл *трет*-бутилового спирта (некоторые опыты без *трет*-бутилового спирта). Полученную гетерогенную смесь инкубировали 4 или 16 ч при 50° С, разбавляли водой 3 мл и избыток NaBH_4 разлагали при охлаждении 0,2 мл уксусной кислоты. Раствор переносили в мерные пробирки, разбавляли водой до 5 мл и прибавляли 63 мг (0,5 ммоль) или 104 мг (0,825 ммоль) щавелевой кислоты. Осадок оксалата отделяли центрифугированием, аликвоту 3 мл подкисляли конц. HCl до pH 1,5 и с помощью анализатора аминокислот определяли в буфере А 2-амино-4-гидроксидбутановую кислоту (III) и свободную аспарагиновую кислоту, а в буфере В. — 2-ацетамидо-4-О-(2-ацетамидо-2-дезоксид-β-*D*-глюкопиранозил)-1-амино-1,2-дидезоксид-*D*-глицитол (V). К аликвоте 0,5 мл прибавляли 0,5 мл 8 М HCl , гидролизовали (16 ч, 100° С), упаривали досуха и определяли в буфере А связанную аспарагиновую кислоту.

*Определение 2-ацетамидо-4-О-(2-ацетамидо-2-дезоксид-β-*D*-глюкопиранозил)-2-дезоксид-β-*D*-глюкопиранозиламина (II)* проводили после восстановления NaBH_3CN гликозиламина (II) до аминокальдитола (V). К раствору 0,21 мг (0,4 мкмоль) гликопептида (I) в 0,5 мл 0,05 М NaOH последовательно прибавляли 122 мг (0,5 ммоль) $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 76 мг (2 ммоль) NaBH_4 и 0,5 мл *трет*-бутилового спирта. Смесь инкубировали 4 ч при 50° С, разбавляли водой до 15 мл, нейтрализовали 0,2 мл уксусной кислоты, упаривали до 1,5 мл, прибавляли 20 мг NaBH_3CN , 0,8 мл HCOOH и выдерживали 2 ч при 20° С. Раствор в мерной пробирке разбавляли водой до 10 мл, прибавляли 63 мг щавелевой кислоты, осадок оксалата бария удаляли центрифугированием и в буфере В определяли аминокальдитол (V) с выходом 70%.

Отщепление олигосахаридных цепей от гликопротеинов с помощью NaBH_4 — BaCl_2 . а) К раствору 5 мг овомукоида и 122 мг (0,5 ммоль) $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 0,45 мл воды прибавляли 0,05 мл 0,5 М NaOH , 76 мг (2 ммоль) NaBH_4 и 0,5 мл *трет*-бутилового спирта. Гетерогенную смесь инкубировали 4 ч при 50° С и затем разбавляли водой до 10 мл. Избыток NaBH_4 разлагали при охлаждении 2 мл ацетона, прибавляли 0,2 мл уксусной кислоты, раствор упаривали до 7 мл и прибавляли 63 мг (0,5 ммоль) щавелевой кислоты. Осадок оксалата бария удаляли центрифугированием и промывали водой (2 × 5 мл). Раствор и промывные воды объединяли, прибавляли 0,5 мл уксусной кислоты и выдерживали 16 ч при 20° С.

Раствор упаривали с метанолом (5×5 мл) до 3 мл и фракционировали на колонке ($1,84 \times 88$ см) с сефадексом G-15 в 0,1 М уксусной кислоте. Фракцию ($K_{av}^* < 0,3$) выдерживали 16 ч при 20°C , упаривали до 0,5 мл и разделяли на колонке ($0,5 \times 5$ см) с дауэксом 50W \times 2 (H^+). Олигосахаридную фракцию элюировали 10 мл воды, а гликопептидную — 10 мл 0,7 М NH_4OH . Обе фракции упаривали досуха и анализировали в буфере С на содержание 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозы и 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюцитолола. Олигосахаридная фракция содержала 56,5% GlcN (от GlcN в исходном овомукоиде) и 0,5% GlcN-ol, что соответствует содержанию $\sim 3\%$ олигосахаридов в виде альдитолов. Гликопептидная фракция содержала $\sim 40\%$ GlcN и некоторое количество аминокислот.

б) Рибонуклеазу (5 мг) обрабатывали и олигосахариды выделяли аналогичным образом. Выход олигосахаридов 64%, из которых 7% (рассчитано из определения GlcN-ol) были в виде альдитолов.

в) Асиалофетуин (3 мг) обрабатывали и олигосахариды выделяли аналогичным образом с тем отличием, что при фракционировании на сефадексе G-15 собирали две фракции. Из первой фракции ($K_{av} < 0,24$) получали N-ОС с выходом $\sim 60\%$. Из второй фракции ($K_{av} 0,24-0,44$) получали O-ОС в виде альдитолов с выходом $\sim 30\%$.

г) Лектин *Sambucus nigra* (4,8 мг, содержащие 0,67 мкмоль 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозы, 0,83 мкмоль *D*-маннозы, 0,28 мкмоль *L*-фукозы и 0,3 мкмоль *D*-ксилозы) обрабатывали и N-ОС выделяли аналогично описанному для овомукоида с тем отличием, что разделение на колонке с дауэксом проводили при 5°C , водный элюат нейтрализовали 0,5 М NaOH до $\text{pH} \sim 6$, упаривали досуха и определяли 0,36 мкмоль (53,6%) GlcN, 0,012 мкмоль (1,7%) GlcN-ol, 0,43 мкмоль (52%) Man, 0,138 мкмоль (49%) Fuc и 0,15 мкмоль (50,5%) Xyl. Гликопептидную фракцию элюировали 10 мл 0,7 М NH_4OH , упаривали досуха и определяли 0,24 мкмоль (36%) GlcN, 0,3 мкмоль (36%) Man, 0,13 мкмоль (46,5%) Fuc, 0,127 мкмоль (42%) Xyl и аминокислоты.

Отщепление олигосахаридных цепей от лектина Sambucus nigra с помощью LiBH₄. Лектин (7 мг) обрабатывали 90 мг LiBH_4 в 2 мл 70% трет-бутилового спирта как описано ранее [1]. Выделение олигосахаридов проводили как описано выше для этого лектина, но щавелевую кислоту не прибавляли. Выход N-ОС 60%.

Щелочная обработка [13] олигосахаридов из лектина Sambucus nigra. Олигосахариды, содержащие 93 нмоль Fuc, обрабатывали 0,3 мл 0,05 М Na_2CO_3 (25 мин, 70°C). Раствор охлаждали, отбирали аликвоту 0,05 мл, в которой с помощью анализатора углеводов обнаруживали 9,2 нмоль (60%) свободной Fuc. К оставшемуся раствору (0,25 мл) прибавляли 0,02 мл 0,5 М NaOH и 10 мг NaBH_4 . Раствор выдерживали 16 ч при 20°C , разбавляли водой приблизительно до 2 мл, прибавляли 0,5 мл дауэкса 50W \times 8 (H^+), перемешивали 30 мин, смолу отфильтровывали, промывали водой. Фильтрат и промывные воды упаривали с метанолом (3×2 мл), остаток гидролизуют 2 М трифторуксусной кислотой (3 ч, 100°C), кислоту удаляли многократным упариванием с водой и в остатке определяли 9 нмоль (10%) Fuc.

Восстановление олигосахаридов из лектина Sambucus nigra. К 0,2 мл охлажденного ледяной водой водного раствора олигосахаридов, содержащих 142,5 нмоль 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозы и 5,6 нмоль 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюцитолола, прибавляли 0,025 мл 0,5 М NaOH, затем 10 мг NaBH_4 и выдерживали 2 сут при 5°C . Раствор разбавляли водой приблизительно до 1 мл, прибавляли 1 каплю уксусной кислоты, 1 мл дауэкса 50W \times 8 (H^+) и перемешивали 20 мин. Смолу отфильтровывали, промывали водой, фильтрат и промывные воды объединяли, упаривали с метанолом (3×2 мл). Остаток гидролизуют и определяли в буфере С 85 нмоль GlcN и 53 нмоль GlcN-ol.

* Расчет K_{av} см. [12].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Likhosherstov L. M., Novikova O. S., Piskarev V. E., Trusikhina E. E., Derevitskaya V. A., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 178. P. 155—163.
2. Takasaki S., Mizuochi T., Kobata A. // Meth. Enzymol. 1982. V. 83D. P. 263—268.
3. Lee Y. C., Socola J. R. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 18. P. 5753—5758.
4. Хайош А. Комплексные гидриды в органической химии. Л.: Химия, 1971. С. 373.
5. Лихошерстов Л. М., Новикова О. С., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1986. № 7. С. 1663—1669.
6. Михеева В. И., Толмачева Л. И. // Журн. неорганич. химии. 1973. Т. 18. № 6. С. 1703—1705.
7. Liang C.-J., Yamashita K., Kobata A. // J. Biochem. 1980. V. 88. № 1. P. 51—58.
8. Лихошерстов Л. М., Новикова О. С., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 303. № 3. С. 641—645.
9. Ashford D., Dwek R. A., Welby J. K., Amatayakul S., Homans S. W., Lis H., Taylor G. N., Sharon N., Rademacher T. W. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 166. № 2. P. 311—320.
10. Nsimba-Lubaki M., Peumans W. J., Allen A. K. // Planta. 1986. V. 168. № 1. P. 113—118.
11. Yagushi M., Perry N. B. // Can. J. Biochem. 1970. V. 48. № 3. P. 386—388.
12. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. С. 111.
13. Kochetkov N. K., Derevitskaya V. A., Likhosherstov L. M., Martynova M. D., Senchenkova S. N. // Carbohydr. Res. 1970. V. 12. № 3. P. 437—447.

Поступила в редакцию
9.1.1990

L. M. LIKHOSHERSTOV, O. S. NOVIKOVA, V. A. DEREVITSKAYA, N. K. KOCHETKOV

A METHOD FOR THE SPLITTING OF THE CARBOHYDRATE CHAINS
FROM N-GLYCOPROTEINS WITH NaBH_4 — BaCl_2 OR SrCl_2

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

A reductive system NaBH_4 — BaCl_2 or SrCl_2 is proposed to split the carbohydrate chains of N-glycoproteins. The method allows one to obtain intact oligosaccharides (in 50—60% yields) including alkali-labile, fucosylated oligosaccharides from plant N-glycoproteins (lectin from *Sambucus nigra* bark).