



УДК 577.112.853.083:543.422.25

## УДОБНЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ N-ГЛИКОПРОТЕИНОВ ИЗ ФАЗЕОЛИНА – ГЛАВНОГО РЕЗЕРВНОГО БЕЛКА ФАСОЛИ

© 1995 г. Н. П. Арбатский\*, Л. М. Лихошерстов, И. В. Калякина,  
А. О. Желтова, В. Н. Шibaев

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 117913, Москва, Ленинский просп., 47  
Поступила в редакцию 11.01.95 г.

Разработан препаративный метод выделения N-связанных олигосахаридных фрагментов из фазеолина – главного резервного белка фасоли *Phaseolus vulgaris*. В результате расщепления фазеолина действием  $\text{LiBH}_4$  или  $\text{NaBH}_4\text{-BaCl}_2$  в водном  $\text{Bu}^t\text{OH}$ , последующего восстановления  $\text{NaBH}_4$  и ВЭЖХ получены индивидуальные олигосахаридальдитолы  $\text{Man}_5\text{-}_9\text{GlcNAc}_1\text{GlcNAc-ol}$  и  $\text{Man}_3(\text{Xyl})\text{GlcNAc}_1\text{GlcNAc-ol}$ . Главные углеводные цепи фазеолина –  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  и  $\text{Man}_3(\text{Xyl})\text{GlcNAc}_2$  – получены также в невосстановленном виде с помощью последовательной анионообменной хроматографии и ВЭЖХ. Олигосахариды идентифицированы по поведению при хроматографии и данным моносакхаридного состава, их структура подтверждена спектрами  $^1\text{H-ЯМР}$ .

Ключевые слова: фазеолин, фасоль *Phaseolus vulgaris*, олигосахариды, выделение.

В связи с неослабевающим интересом к изучению структуры и функции углеводных цепей гликопротеинов возникает потребность в индивидуальных недеградированных олигосахаридных фрагментах гликопротеинов. Они могут быть использованы в качестве стандартных соединений для хроматографической идентификации углеводных цепей гликопротеинов, а также (после модификации) для получения неогликоконъюгатов путем “пришивки” их к природным белкам или синтетическим полимерам. Для целей идентификации чаще всего используют восстановленные (в том числе  $^3\text{H}$ -меченые) олигосахариды [1] или их флуоресцентные 2-аминопиридиновые производные [2], а для получения неогликоконъюгатов необходимо иметь олигосахариды со свободным восстанавливающим концом.

Наиболее целесообразно получать олигосахариды в препаративном масштабе, выделяя их после избирательной деградации химическими методами относительно доступных природных гликопротеинов. В качестве таковых могут служить гликопротеины семян бобовых, в частности фазеолин – главный резервный белок фасоли. Фазеолин – это семейство гомологичных белков (двух или более) с  $M$  45 - 50 кДа, содержащих одну или две Asp-связанные углеводные цепи [3]. Углеводные фрагменты фазеолина представляют собой обычные для белков растений и животных олиго-

маннозидные цепи, а также характерные только для гликопротеинов растений олигосахариды, содержащие ксилозу [3 - 5]. Таким образом, фазеолин можно рассматривать как очень удобный источник для получения олигосахаридов указанных выше типов.

В настоящей работе описан препаративный метод выделения из фазеолина семян белой фасоли *Phaseolus vulgaris* его недеградированных углеводных фрагментов в виде восстановленных и восстанавливающих олигосахаридов.

Фазеолин выделяли по модифицированному нами методу [6], включающему экстракцию фасолевого муки раствором  $\text{NaCl}$ , центрифугирование и диализ супернатанта против воды. Выбранные оптимальные условия ( $4^\circ\text{C}$ , продолжительность экстракции 40 мин) соответствовали достаточно полному извлечению фазеолина при минимальной экстракции других углеводсодержащих соединений. При диализе экстракта нерастворимый в деионизованной воде фазеолин выпадает в осадок, который отделяли центрифугированием. После повторного растворения в солевом растворе и осаждения при диализе полученный с выходом ~4% фазеолин при электрофорезе в ПААГ в присутствии SDS давал четыре полосы в районе 42 - 50 кДа, что согласуется с литературными данными [3].

Олигосахаридные фрагменты фазеолина отщепляли с помощью разработанных нами ранее методов – обработкой  $\text{LiBH}_4$  или  $\text{NaBH}_4\text{-BaCl}_2$  в

\*Автор для переписки.



Химические сдвиги аномерных протонов в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах олигосахаридальдитолов ( $\delta$ , м. д.)\*

Моносахарид- ный остаток**	D <sub>1</sub> -C-4 D <sub>2</sub> -A D <sub>3</sub> -B 4' 3-2-1 M9-ol		D <sub>1</sub> -C-4 A D <sub>3</sub> -B 4' 3-2-1 M8-ol		D <sub>1</sub> -C-4 A B 4' 3-2-1 M7-ol		C-4 A B 4' 3-2-1 M6-ol		A 4 B 4' 3-2-1 M5-ol		Xyl 4 3-2-1 4' M3X-ol	
	эксп.	лит.	эксп.	лит.	эксп.	лит.	эксп.	лит.	эксп.	лит.	эксп.	лит.***
2	4.665	4.610	4.659	4.621	4.665	4.621	4.669	4.621	4.664	4.606	4.648	4.634
3	4.783	4.77	4.775	4.78	4.781	4.78	4.785	4.78	4.788	4.781	4.853	4.883
4	5.330	5.334	5.331	5.336	5.337	5.336	5.351	5.345	5.124	5.099	5.123	5.122
4'	4.883	4.869	4.877	4.869	4.884	4.869	4.888	4.869	4.880	4.872	4.904	4.913
A	5.384	5.404	5.110	5.090	5.118	5.090	5.121	5.090	5.113	5.093	-	-
B	5.127	5.143	5.125	5.145	4.922	4.908	4.925	4.908	4.918	4.908	-	-
C	5.297	5.308	5.289	5.304	5.292	5.304	5.072	5.052	-	-	-	-
D <sub>1</sub>	5.072	5.049	5.058	5.044	5.062	5.044	-	-	-	-	-	-
D <sub>2</sub>	5.081	5.061	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D <sub>3</sub>	5.063	5.042	5.058	5.044	-	-	-	-	-	-	-	-
Xyl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.462	4.449

\* Для сравнения приведены литературные данные (лит.) для соответствующих восстанавливающих олигосахаридов, полученных в составе гликопептидов [10]; спектры сняты при 27°C.

\*\* См. схему.

\*\*\* Приведены данные работы [4] для аналогичного олигосахаридальдитола; спектр снят при 27°C.

концевых остатков Ман (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> или D<sub>3</sub>) сигнал H1 остатка Ман (A, B или C), к которому он был присоединен, сдвигается на 0.2 - 0.3 м. д. в сильное поле [10]. Руководствуясь этим правилом, легко установить, какому из изомеров соответствует выделенный нами олигосахарид. Так, в области аномерных протонов в спектре олигосахарида M8-ol по сравнению с M9-ol имеются только два сигнала при ~5.06 м. д., характерных для H1 остатков D, отсутствует сигнал замещенного остатка A (~5.4 м. д.) и появляется сигнал при ~5.1 м. д. Из этого однозначно следует, что олигосахарид M8-ol отличается от M9-ol отсутствием остатка маннозы D<sub>2</sub>.

Аналогичным путем установлена структура и других олигосахаридов (см. схему). Таким образом, кроме идентичных выделенным ранее в виде гликопептидов [3] углеводных фрагментов фазеолина (M9, M7 и M3X) нами получены также M8, M6 и M5. Как главные, так и минорные олигосахариды имеют структуру, типичную для многих N-гликопротеинов растений и животных [5, 10 - 12].

С точки зрения практического использования больший интерес представляют восстанавливающие олигосахариды, открытый гликозидный центр которых позволяет проводить различные модификации. Однако выделение индивидуальных восстанавливающих олигосахаридов - гораздо более сложная задача, поскольку олигосахариды каждого типа при описанном методе деградации гликопротеинов получают в трех формах: в ви-

де  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров и частично в виде восстановленных олигосахаридов. По этой причине разделить исходную смесь олигосахаридов с помощью ВЭЖХ, как это описано для восстановленных олигосахаридов [1, 9], оказалось крайне затруднительным.

Ранее для разделения сложных смесей олигосахаридов нами с успехом применялась анионообменная хроматография в боратном буфере [13]. Этот метод оказался весьма эффективным и для фракционирования суммарной олигосахаридной фракции фазеолина (рис. 2). Анализ методом

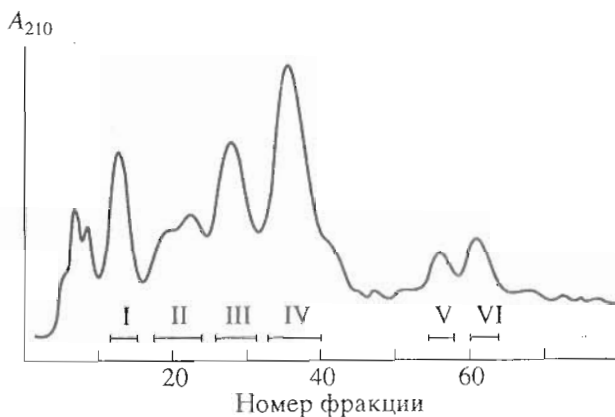


Рис. 2. Анионообменная хроматография суммарной олигосахаридной фракции фазеолина на колонке (0.8 × 53 см) с анионитом DAx4 в 0.5 М боратном буфере, pH 8 (0.6 мл/мин). Объем фракции 3 мл.

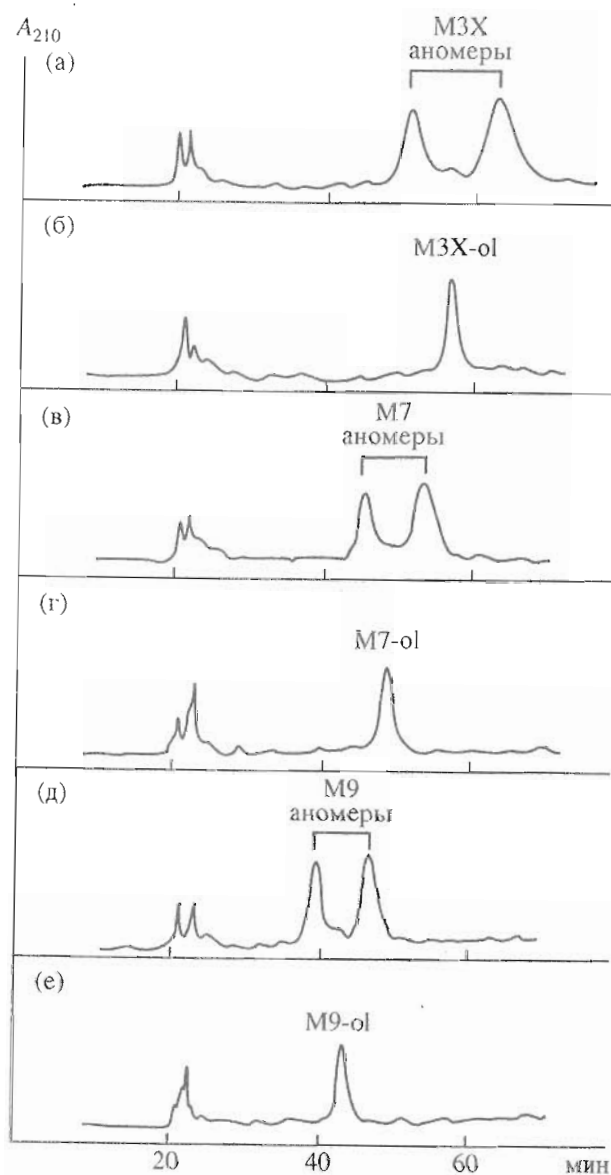


Рис. 3. ВЭЖХ на колонке Ultrasphere C18 фракций I (а, б), III (в, г) и IV (д, е), полученных при анионообменной хроматографии (рис. 2), до восстановления (а, в, д) и после восстановления  $\text{NaBH}_4$  (б, г, е).

ВЭЖХ полученных после анионообменной хроматографии фракций (I - VI) до и после восстановления их  $\text{NaBH}_4$  позволил отнести каждый из пиков к определенному олигосахариду. Так, фракция I содержала в основном восстанавливающий олигосахарид M3X, поскольку до обработки  $\text{NaBH}_4$  она выходит в виде двух пиков, соответствующих двум аномерам олигосахарида (рис. 3а), а после обработки — в виде одного пика (рис. 3б), точно совпадающего по времени элюции с восстановленным олигосахаридом M3X-ol (ср. рис. 1). Аналогичным образом установлено, что основными компонентами фракций III и IV являются восстанавливающие олигосахариды M7 и M9

(рис. 3в, д), а фракция II содержит смесь минорных олигосахаридов M5 и M6. Фракции V и VI, элюируемые после восстанавливающих олигосахаридов, содержали восстановленные олигосахариды M7-ol и M9-ol, так как и без обработки  $\text{NaBH}_4$  каждая из них давала при ВЭЖХ один пик, соответствующий стандартному восстановленному олигосахариду.

Таким образом, применение на первой стадии анионообменной хроматографии позволяет разделить большинство восстанавливающих олигосахаридов и полностью отделить восстановленные олигосахариды. В результате последующей очистки с помощью офВЭЖХ (см. рис. 3а, в, д) получены индивидуальные восстанавливающие олигосахариды M3X, M7 и M9.

Учитывая доступность исходного материала и простоту выделения фазеолина, с помощью описанных методов можно получать в достаточно большом количестве (десятки миллиграммов) олигоманнозидные и Ху1-содержащие олигосахариды как в восстановленном, так и в невосстановленном виде. Полученные олигосахариды могут быть использованы как стандарты при структурном анализе гликопротеинов, лиганды для лектинов, субстраты для соответствующих гликозидаз и гликозилтрансфераз, исходные соединения для синтеза неогликоконъюгатов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Моносахаридный состав олигосахаридов определяли на анализаторе Biotronik LC 2000 (ФРГ) после гидролиза 2 М  $\text{CF}_3\text{COOH}$  ( $121^\circ\text{C}$ , 2 ч). Электрофорез проводили в 7.5% полиакриламидном геле в присутствии 0.2% SDS. Белок проявляли кумасси бриллиантовым голубым Р-250. Спектры  $^1\text{H-NMR}$  сняты в  $\text{D}_2\text{O}$  на приборе Bruker WH-250 при  $70^\circ\text{C}$  в условиях подавления сигнала HDO.

**Выделение фазеолина.** Суспензию 112 г муки белой фасоли *P. vulgaris* в 400 мл 10% раствора  $\text{NaCl}$  перемешивали 40 мин при  $4^\circ\text{C}$  на магнитной мешалке, центрифугировали при  $-4^\circ\text{C}$  и супернатант диализовали ( $-4^\circ\text{C}$ , 4 сут) против дистиллированной воды. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, снова растворяли в 150 мл 10%  $\text{NaCl}$ , центрифугировали и супернатант диализовали как описано выше. Осадок промывали ацетоном, высушивали в вакуумном эксикаторе и получали 4.1 г (3.7%) фазеолина.

**Отщепление углеводных цепей фазеолина** проводили 1 М  $\text{LiBH}_4$  [7] или 1 М  $\text{NaBH}_4$  в присутствии  $\text{BaCl}_2$  [8] в водном  $\text{Bu}^t\text{OH}$ . Выход суммарной олигосахаридной фракции колебался в различных опытах от 1.5 до 2% от количества взятого фазеолина.

**Восстановление олигосахаридов.** 60 мг суммарной олигосахаридной фракции растворяли в

1 мл воды, прибавляли 2 мл 0.1 н. раствора NaOH и ~70 мг NaBH<sub>4</sub>, смесь выдерживали 16 ч при 20°C и оставшийся NaBH<sub>4</sub> разлагали разбавленной AcOH. К раствору прибавляли 15 мл дауэкса 50Wx8 (H<sup>+</sup>), перемешивали 20 мин, смолу отфильтровывали, фильтрат и промывные воды упаривали, остаток упаривали с метанолом (5 × 3 мл) и получали 55 мг смеси олигосахаридальдитолов.

**Хроматография олигосахаридов.** ВЭЖХ олигосахаридов проводили на хроматографе Bio-Rad (США); колонка (1 × 25 см) Ultrasphere C18 (Beckman, США), скорость элюента (вода, бидистиллят) 0.4 мл/мин, УФ-детекция при 210 нм. При выполнении препаративной хроматографии за один прием разделяли до 3 мг смеси олигосахаридов, для аналитической хроматографии требуется 1 - 5 мкг олигосахарида.

Анионообменную хроматографию выполняли на колонке (0.8 × 53 см) с анионитом DAx4 (Dugum, США) в 0.5 М боратном буфере, pH 8 (0.6 мл/мин), УФ-детекция при 210 нм. За один прием разделяли ~10 мг смеси олигосахаридов. Фракции (3 мл) объединяли так, как показано на рис. 2, деионизовали с помощью катионита и упаривали с метанолом.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке фонда Государственной научно-технической программы России "Новейшие методы биоинженерии" (направление "Генная и клеточная инженерия") и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 94-03-08569).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arbatsky N.P., Martynova M.D., Zheltova A.O., Derevitskaya V.A., Kochetkov N.K. // Carbohydr. Res. 1989. V. 187. P. 165 - 171.
2. Tomija N., Kurono M., Ishihara H., Tejima S., Endo S., Arata A., Takahashi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 163. P. 489 - 493.
3. Sturm A., van Kuik J.A., Vliegenthart J.F.G., Chrispeels M.T. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 13392 - 13403.
4. Van Kuik J.A., van Halbeek H., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F.G. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 13984 - 13988.
5. Ashford D.A., Dwek R.A., Rademacher T.W., Lis H., Sharon N. // Carbohydr. Res. 1991. V. 213. P. 215 - 227.
6. Кремович В.Л., Евстигнеева З.Г., Асеева К.Б. // Биохимия. 1960. Т. 25. Вып. 5. С. 878 - 883.
7. Likhoshesterov 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.
8. Лихошерстов Л.М., Новикова О.С., Деревицкая В.А., Кочетков Н.К. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. С. 1386 - 1392.
9. Арбатский Н.П., Шапков А.С., Желтова А.О., Юртов Д.В., Деревицкая В.А., Кочетков Н.К. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. С. 1556 - 1561.
10. Vliegenthart J.F.G., Dorland L., van Halbeek H. // Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. V. 41 / Eds R.S. Tipson, D. Horton. N.Y. - L.: Acad. Press, 1983. P. 209 - 374.
11. Yamaguchi H., Funaoka H., Iwamoto H. // J. Biochem. 1992. V. 111. P. 388 - 395.
12. Kornfeld R., Kornfeld S. // Ann. Rev. Biochem. 1985. V. 54. P. 631 - 664.
13. Derevitskaya V.A., Arbatsky N.P., Kochetkov N.K. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 86. P. 423 - 437.

## A Convenient Method for Preparation of Individual Oligosaccharide Fragments of N-Glycoproteins from Common Beans Major Storage Protein Phaseolin

N. P. Arbatskii\*, L. M. Likhoshesterov, I. V. Kalyakina, A. O. Zheltova, and V. N. Shibaev

Zelinskii Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 117913 Russia

**Abstract** -- A preparative method for isolation of N-linked oligosaccharides, fragments of phaseolin, which is a major storage protein of common beans (*Phaseolus vulgaris*), was developed. Individual oligosaccharide-alditols Man<sub>5-9</sub>GlcNAc<sub>1</sub>GlcNAc-ol and Man<sub>3</sub>(Xyl)GlcNAc<sub>1</sub>GlcNAc-ol were obtained after phaseolin degradation with LiBH<sub>4</sub> or NaBH<sub>4</sub>-BaCl<sub>2</sub> in aqueous *tert*-BuOH, the subsequent reduction with NaBH<sub>4</sub>, and HPLC. The main carbohydrate chain fragments of phaseolin [Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, and Man<sub>3</sub>(Xyl)GlcNAc<sub>2</sub>] were also obtained in an unreduced form by successive use of ion-exchange chromatography and HPLC. The oligosaccharides were identified by means of their chromatographic behavior and monosaccharide composition data, and their structures were confirmed by <sup>1</sup>H NMR.

**Key words:** phaseolin, *Phaseolus vulgaris* common beans, oligosaccharides, isolation.

\* To whom correspondence should be addressed.