

综述与专论

糖类结构研究的若干进展

王 克 夷

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

提 要

近几年糖类的结构测定有一定的进展。本文介绍了高效液相层析 (HPLC) 在糖类结构研究中的若干新的应用, 其中包括: 单糖和寡糖的高效阴离子交换层析和脉冲安培检测器的应用; 寡糖的二维 HPLC 以及 HPLC 和电子计算机联用测定影响 HPLC 的一些参数, 进而利用有关参数和 HPLC 的行为预测寡糖的结构。

关键词 寡糖的高效阴离子交换层析, 寡糖二维高效液相层析

糖类研究进展较蛋白质和核酸缓慢的一个重要原因是, 糖类结构的复杂性, 同时在方法学上也有很多困难。例如糖类没有特征的吸收光谱, 因此在检测时很不方便。如果方法学上有所突破, 糖类结构乃至功能的研究也将出现一个飞跃。目前的生物化学和分子生物学的发展也已对糖类的结构测定提出了新的要求。例如基因工程的目的产物有不少是糖蛋白, 而多数糖蛋白的性质及功能又和糖链的存在以及结构有关。因此, 糖蛋白的糖链结构测定以及和重组产物的糖链结构的比较, 将成为重组产物能否实际应用的关卡之一。本文仅介绍糖类结构研究的若干进展。

糖的高效阴离子交换液相层析 (HPAEC)

糖类的组成分析目前较多的还是使用气相层析。HPLC 虽然在蛋白质和核酸研究中已广泛应用, 但对糖类研究中还受到一些限制, 就是因为糖类没有特征的吸收光谱, 因此直接检测只能用示差检测器, 灵敏度较低。尽管也有用化学测定液相层析流出级分的装置, 但反应

试剂是浓酸, 并没有商品化。近年在这方面有较大的进展。

通常认为糖类是中性的化合物, 但是一些所谓的中性糖也是可以解离的。表 1 中列举了

表 1 一些中性糖的 pK

单糖	果糖	甘露糖	木糖	葡萄糖	半乳糖	山梨醇
pK 值	12.03	12.08	12.1	12.28	12.39	13.60

几种单糖的 pK 值, 它们介乎 12—14。因此在碱性溶液中单糖和寡糖都可以成为阴离子, 进而可以运用阴离子交换树脂, 对它们进行分离, 然后加以检测。由表 1 可知一些单糖的 pK 值是如此的接近, 以至于只有应用高分辨率的阴离子交换树脂才能将它们分开。再者所用的树脂应该在碱性条件下是稳定的, 如由硅胶衍生的树脂就不能使用。常用的聚苯乙烯树脂可以用于碱性条件下的糖类分离, 但是被分析的样品在多孔树脂中有扩散, 使所得的峰形变宽; 换用小孔树脂则会使层析柱的操作压升高。一种新的表层实心树脂 (pellicular resin) 已被应

用于碱性条件下糖类的分离,可得到理想的结果^[1]。

对带电的糖类可用电化学的方法加以检测。脉冲安培检测法 (pulsed amperometric detection, PAD) 可以检测 μg 量的糖类。使用常规的电化学方法时,电极很快就极化,因此而不能继续测量。脉冲安培检测法则利用两个脉冲使电极去极化,处于能再次使用状态。其中第一个脉冲,使在电极表面的糖类氧化成可溶性的酸,从电极表面除去,第二脉冲使电极还原到可工作的状态。这种检测器可以测定 pmol 的糖^[1]。Dionex 公司已经有 HPAEC 和 PAD 联用的可以用于糖类分离和检测的产品。

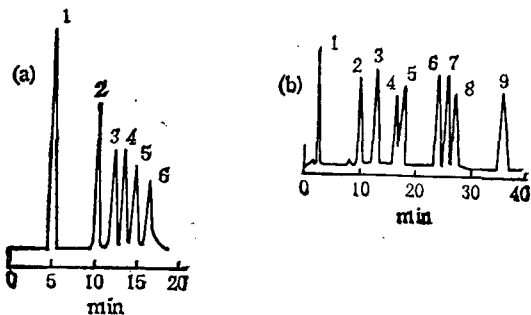


图 1 一些单糖和二糖的阴离子交换脉冲安培检测器所得的 HPLC 图谱

a 为单糖的 HPLC 图谱;1—6 分别为岩藻糖、氨基半乳糖、氨基葡萄糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖;b 为一些二糖的 HPLC 图谱;1—9 分别为海藻糖、蔗糖、乳糖、异麦芽糖、蜜二糖、龙胆二糖、纤维二糖、松二糖和麦芽糖

图 1a 是利用表层树脂分离和脉冲安培检

测法所得到的常见的单糖的分析谱,在多糖或糖蛋白的糖链中的 N-乙酰氨基半乳糖或葡萄糖在水解时都变成了氨基糖,它们彼此可分离,而且和其他常见的单糖也能很好被分辨。图 1b 是 9 种二糖的分离图谱。其中 4, 6, 7 和 9 四个峰分别是异麦芽糖,龙胆二糖,纤维二糖和麦芽糖^[2]。它们都是葡萄糖形成的二糖,但连接方式不同;4 是 α -1-6,6 是 β -1-6,7 是 β -1-4,9 是 α -1-4 连接。由此可见用表层阴离子交换树脂和脉冲安培检测法能较理想地分离和检测糖类的组成单糖,以及不同结构的二糖。就单糖而言,是高 pK 值的单糖先从柱上洗脱下来。

多糖的结构测定是很复杂的,幸运的是很多多糖是有重复结构单元组成的,而这些结构单元又不太大,通常不超过八糖,因此测定它们的结构还不是最复杂的。相比之下,糖蛋白中的 N-糖苷键连接的寡糖链更为复杂,原因是它们的组成相同或是相近,仅是连接方式上的不同,图 2 是从胎球蛋白中分得的两种三支 N-糖苷键连接糖链的分离和测定的结果。这两种寡糖的组成和结构几乎完全一样,所不同的仅是在一个分支中半乳糖和 N-乙酰氨基葡萄糖的连接方式不同,一是 1-4 连接,另一是 1-3 连接。但是它们可用 HPAEC 很好地分开^[3]。其它多种组成相同,结构上差异极小的糖肽的异构体也能用 HPAEC 分离并用 PAD 加以检测^[3]。卵白蛋白中只有一条糖链,但有微观不

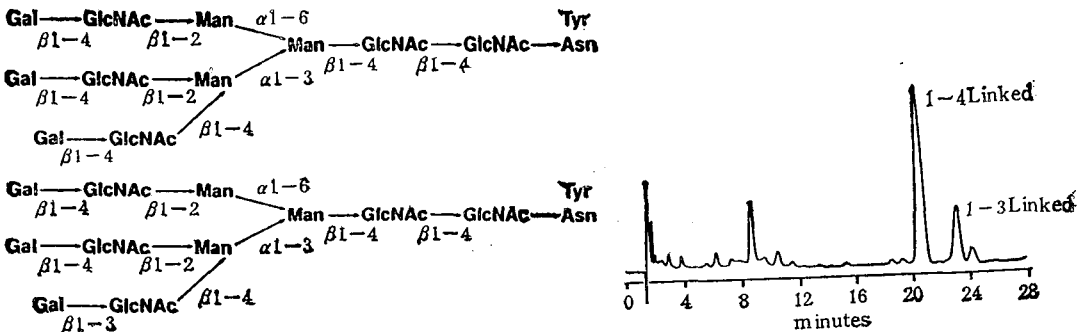


图 2 胎球蛋白中分得的两种结构非常相似的糖链的阴离子交换 HPLC 图谱
两种糖链的结构列于图 2 的左边

均一性，由不同个数的甘露糖组成的高甘露糖链可以用 HPAEC-PAD 联用分离鉴定^[4]。近几年中，有些文献报道了 HPAEC-PAD 技术用于乳汁中一系列寡糖的分离^[5]，含有岩藻糖的寡糖的鉴定^[6]，以及含有唾液酸和磷酸的寡糖的分析^[7,8]。

结构复杂的寡糖从柱上洗脱的顺序，还无法预测；但已能看到一些规律：(1) 小分子寡糖在前，大的寡糖在后；(2) 寡糖接上岩藻糖后，在柱上滞留时间变短；(3) 相反的，寡糖接了唾液酸后，在柱上的滞留时间延长；(4) 寡糖的还原端一旦还原成相应的醇，则明显地容易从柱上洗脱。

寡糖的二维 HPLC^[9]

最近有的实验室运用了寡糖的二维图谱法，有可能简化有关寡糖链的结构测定。寡糖

的二维图谱法的基本原理很简单。目前测定肽链 N-末端，是将肽链的 N-端残基用有色试剂偶联，然后水解，最后进行双相层析，由图谱上有色试剂的位置和一系列已知标准的位置，确定出肽链的 N-末端是何种氨基酸。在蛋白质化学中还有类似的两相的肽谱和蛋白质图谱技术也已广泛地应用。同样的，对任何一个寡糖也能在两根不同性质的层析柱上进行液相分析，目前所用的柱是反相柱和氨基结合柱。然后得到这个寡糖在两根柱上的滞留时间，如果用在两种柱上的滞留时间为坐标，也就能在座标系上定出某一寡糖的位置。不同组成和结构的寡糖在座标系上的定位一般是不同的。如果有一系列的已知结构的样品，然后测定它们在两种不同柱上的滞留时间，就可得到一张标准样品的二维图谱。138 种不同结构的寡糖的参数已被测定。如果某些寡糖的结构和标准图谱

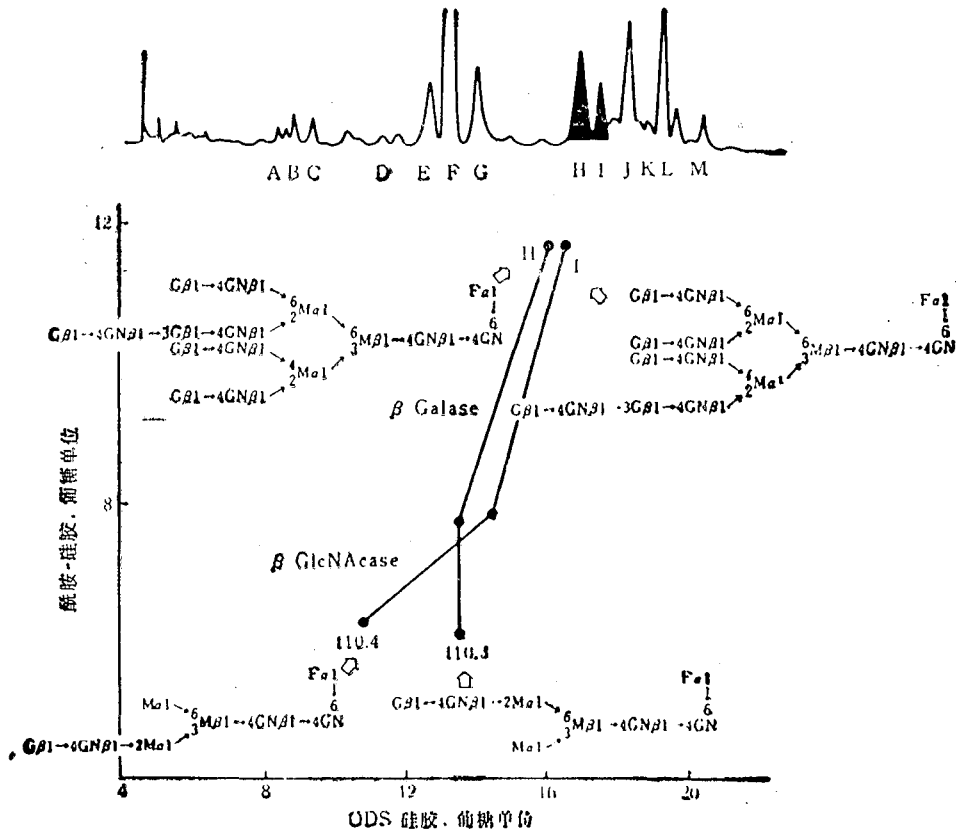


图 3 重组红血球生成素中两个未知结构寡糖的分析鉴定
110.3, 110.4, H 和 I 的结构如图右所示

所列的不同,此时可配合以其它方法,对未知结构的寡糖进行测定。图3为从由婴幼儿田鼠肾细胞所得的重组红血球生成素中分得的两种糖链的测定。重组红血球生成素经酶解可得到一组寡糖,在反相柱上可测得它们的位置,其中H和I两种寡糖是标准中找不到的,也是从天然的尿中分得的红血球生成素中所没有的。经组成分析和分子筛鉴定,已知两者都是四分支的含有多个氨基乳糖的寡糖。它们经半乳糖苷酶和N-乙酰氨基葡萄糖苷酶顺序作用后,分别得到两种已知结构的寡糖。综合上述结果,推断它们的结构为图3中所示的H和I结构^[10]。这方法无疑的可简化N-连接糖苷键连接的糖链的结构测定,但其前提是要求有许多结构已知的相应的寡糖。

对于其它结构未知的寡糖的测定,在很大程度上也可借助两维图谱法,但要同时使用酶降解和NMR等其它技术。

电子计算机和HPLC的联用^[11]

由于电子计算机技术的迅速发展,已经有实验室,借助计算机将许多寡糖在HPLC上所得的数据进行分析,从而得到了一些可循的规律(在上面已提到过),并用一些参数表示出来。然后根据这些参数有可能直接由层析柱上的滞留时间来推测未知结构的寡糖的可能的结构。李远川等测定了寡糖中各个糖残基和寡糖在HPLC时的洗脱体积,也就是在柱上滞留时间的相关性。先是将得到的糖蛋白中N-糖苷键连接的糖链用2-氨基吡啶偶联成为有荧光的衍生物,以便检测。然后在反相柱上进行HPLC

分析。将测得的洗脱体积换算成为相应的葡聚糖单位。经计算机分析处理,求得各个糖残基和寡糖在反相柱上洗脱体积的相关性。将不同结构的糖链分为几个类型,进行分析测定。由高甘露糖型的糖链所得的参数进行计算与直接测定的结果非常吻合,误差为0.050%;而对含有木糖的寡糖链,多数来源于植物糖蛋白,进行比较,误差为0.531%;对含岩藻糖的动物糖蛋白的糖链进行类似的比较,则误差为0.414%。

有了这些参数,对寡糖的结构测定提供了不少方便:不仅有可能对未知结构的糖链可能的结构进行推测;而且在缺少标准样品的情况下,也可能通过计算求得样品的结构。

参 考 文 献

- 1 Olechno J D *et al.* In: Hugli T E ed, *Techniques in Protein Chemistry*, San Diego: Academic Press Inc, 1989: 364—376
- 2 Dionex Circle Reader Service Card, No 72, 1987: 38—50
- 3 Hardy MR, Townsend R R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 3289
- 4 Chen L M *et al.* *FASEBJ*, 1988; 2: 2819
- 5 Wang W T, Zopf D. *Carbohydr Res*, 1989; 189: 1
- 6 Hardy M R, Townsend R R. *Carbohydr Res*, 1989; 188: 1
- 7 Townsend R R *et al.* *Anal Biochem*, 1988; 174: 459
- 8 Townsend R R *et al.* *Anal Biochem*, 1989; 182: 1
- 9 高桥礼子. 糖蛋白糖链研究法. 学会出版ヤンター, 1989: 51—72
- 10 高桥礼子. 糖蛋白糖链研究法. 学会出版ヤンター, 1989: 174—181
- 11 Lee Y C *et al.* *Anal Biochem*, 1990; 188: 259

[本文于1990年8月20日收到,
11月6日修回]