

对氨基苯甲酸乙酯衍生法测定 IgM 中的糖链结构*

蒋 可

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

A. L. BURLINGAME

(University of California, San Francisco, CA 94145)

提 要

糖蛋白中痕量的完整寡糖链结构可用现代质谱方法测定。对寡糖的对氨基苯甲酸乙酯衍生物的液态二次离子质谱进行了研究, 测定了基质效应, 比较了正、负离子谱, 使得麦芽七糖衍生物的最小检测量达到 4p mol。应用氘标记类似物及高分辨质谱数据解释了 IgM 中 N-连接的寡糖链分子结构。

关键词 寡糖结构, 质谱, 免疫球蛋白 M

免疫球蛋白 (Ig) 中的糖链具有重要的生物学功能, 例如细胞的表面识别, 稳定肽链的立体结构等^[1]。酶学方法、分离提纯技术及分析仪器的飞速进展, 使痕量的、完整的寡糖结构测定方法有了一些突破。快原子轰击质谱 (FABMS) 及与其原理相似的液态二次离子质谱 (LSIMS) 是 80 年代刚涉足生物大分子领域的新技术^[2-5]。经过化学衍生的天然寡糖将有利于分离和检测^[6-8], 对氨基苯甲酸乙酯 (ABEE) 衍生物具有紫外吸收而便于用高压液相色谱分离提纯, 衍生物的质谱图中又有解释糖链序列的信息, 是较理想的衍生物之一。通过对探头上液态基质的选择及正、负离子谱图的比较, 麦芽七糖对氨基苯甲酸乙酯衍生物的负离子 LSIMS 测定其最小检测量可达 4p mol。应用氘同位素标记物及高分辨数据测定了免疫球蛋白 M (IgM) 中 N-连接的寡糖链组成、连接及分枝结构。

1 材料与方 法

1.1 试剂 麦芽三糖、六糖和七糖, 氨基硼酸钠及对氨基苯甲酸乙酯均为 Sigma 产品, IgM 样品^[9]系 A. L. Tarentino 教授所赠。

1.2 对氨基苯甲酸乙酯衍生物的制备

165mg ABEE 及 35mg NaBCN 溶于 41 μ l 冰醋酸及 350 μ l 无水甲醇中, 搅拌混合成反应溶液, 少于 1mg 的糖样品放在密封小玻璃反应瓶中, 加 10 μ l H₂O 和 40 μ l 反应溶液, 80℃ 反应 30min, 冷却后加 H₂O 和 CHCl₃ 提取, ABEE 衍生物在水相中。

1.3 [1', 1'', 2', 2'', 2'-³H] 对氨基苯甲酸乙酯 (D₅-ABEE) 的制备 1.37g ABEE 和 5g C₂D₅OH, 以及少量浓硫酸加热回流 1h, 冷却后用 CH₂Cl₂ 和 H₂O 萃取, 取出 CH₂Cl₂ 相, 用高纯氮气吹干, 再重结晶。

1.4 高压液相色谱 (HPLC) 提纯 ABEE 衍生物 Backman 322MP 仪器, 梯度淋洗 (H₂O/乙腈), H₂O 在 40min 内从 20% 增加到 60% (体积比), 流速 1.0ml/min, Alltech 柱, 300mm × 4.1mm I. D., 10 μ m aminopropyl-bonded Silica, UV, 254nm。

1.5 质谱计 Kratos MS50-S 双聚焦质谱计, 装有铯离子轰击的二次离子源^[10]。

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1991-03-11 修回日期: 1991-07-19

2 结果和讨论

探头上添加的液态基质对 LSIMS 谱有重大的影响, 我们选择不同的基质去测定麦芽六糖 ABEE 衍生物的正、负离子 LSIMS 谱, 比较了各谱图中准分子离子的相对强度及能观察

到的重要碎片离子 (从准分子离子分别断裂掉 1 到 5 个葡萄糖 (Glc))——它们提供了糖链的序列结构信息 (表 1)。添加少量甘油作基质 ($< 0.2 \mu\text{l}$) 时, 糖链 ABEE 衍生物的负离子 LSIMS 谱具有较满意的灵敏度和碎片峰。当带冷却的探头上只有 H_2O 作溶剂时, 也可以获

表 1 $2 \mu\text{g}$ 麦芽六糖对氨基苯甲酸乙酯衍生物正负离子 LSIMS 谱的基质效应

基 质	负 离 子					正 离 子						
	[M - H] ⁻ 相对强度 ¹⁾	观测到的碎片峰					MH ⁺ 相对强度 ¹⁾	观测到的碎片峰				
		-Glc	-2Glc	-3Glc	-4Glc	-5Glc		-Glc	-2Glc	-3Glc	-4Glc	-5Glc
甘油	100	+	+	+	+	+	64	+	+	+	+	+
3-氨基-1,2-丙二醇	20	+	+	+	+	+	31	+	+	+	+	+
硫代甘油	20	+	+				23					
二乙醇胺	14	+					2)					
四甘醇	13	+										

1) 相对强度: 以甘油为基质时的 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 离子强度为 100 计算。

2) 用二乙醇胺作基质时, 正离子测定只能得到 $[\text{MH} + \text{基质}]^+$ 离子, 其相对强度为 4。

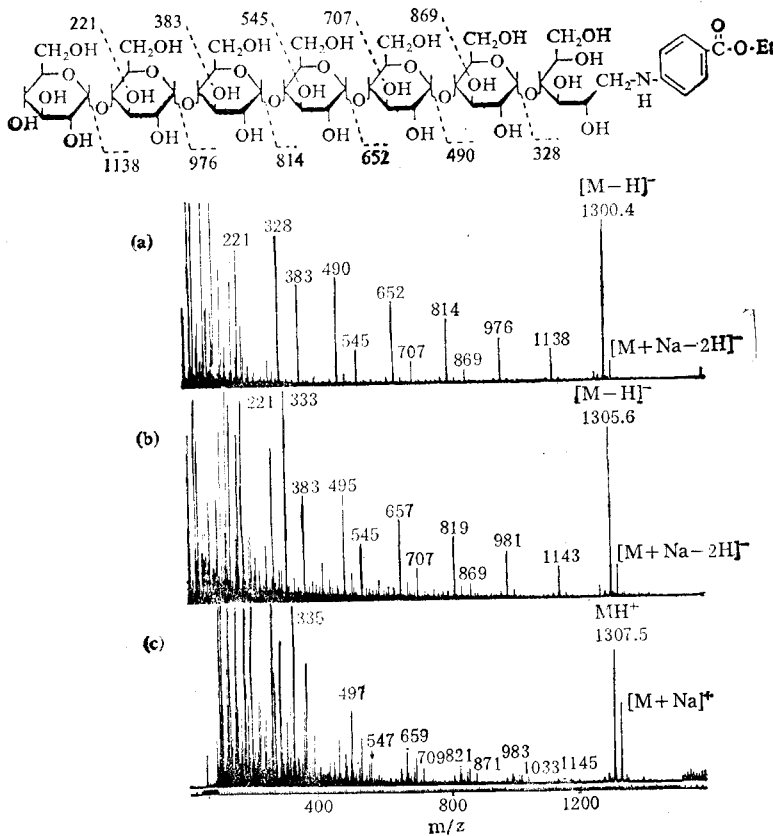


图 1 麦芽七糖的 ABEE 及 D_1 -ABEE 衍生物的 LSIMS 谱

(a) 麦芽七糖 ABEE 衍生物的负离子 LSIMS 谱; (b) 麦芽七糖 D_1 -ABEE 衍生物的负离子 LSIMS 谱; (c) 麦芽七糖 D_1 -ABEE 衍生物的正离子 LSIMS 谱。基质: 甘油

得麦芽三糖 ABEE 衍生物的负离子 LSIMS 谱,测得的准分子离子, $[M - H]^-$ m/z 652 的信噪比 >15 。

麦芽七糖 ABEE 及氘标记的 D_5 -ABEE 衍生物的负、正离子 LSIMS 谱见图 1。比较同位素标记物的谱图,相应于图 1a 中 m/z 1300, 1138, 976, 814, 652, 490 和 328 的峰在图 1b 中

都向右边移动了 5 个单位,说明这些离子的负电荷位于糖链的还原端,它们的间隔为 162 个单位,是由己糖单元组成的糖链。 m/z 221, 383, 545, 707 和 869 峰并不受还原端的 D_5 标记影响,所以离子的电荷一定位于非还原端,其间隔也是 162 个单位。两系列离子的形成机理见图 2。ABEE 衍生的寡糖 LSIMS 灵敏度比

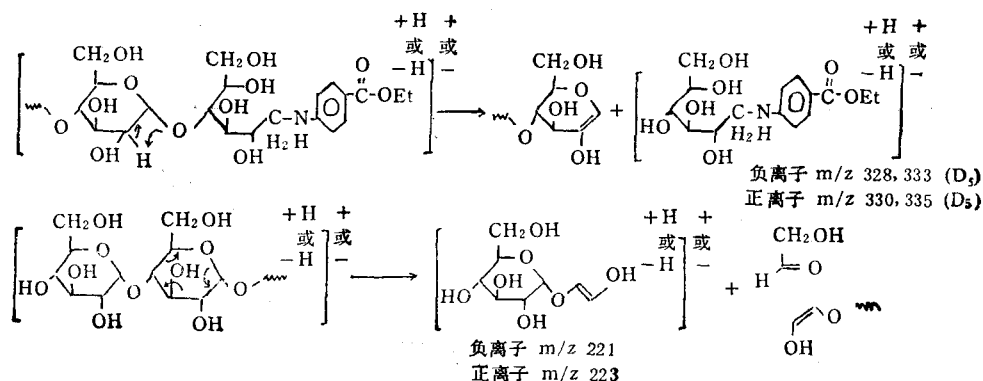


图 2 寡糖链 ABEE 衍生物 LSIMS 谱图中离子的形成机理

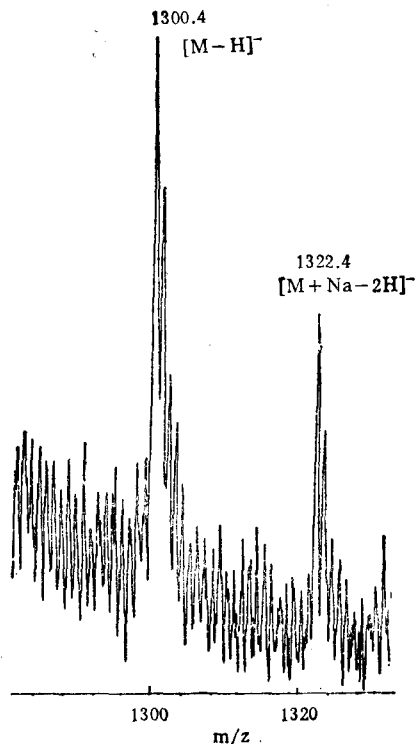


图 3 4p mol 麦芽三糖对氨基苯甲酸乙酯衍生物的负离子 LSIMS 谱
 基质: 0.025 μ l 甘油

未衍生时好得多, 4p mol 麦芽七糖 ABEE 衍生物在负离子 LSIMS 谱中仍然获得信噪比非常好的 $[M - H]^-$ 离子(图 3)。

IgM 样品取自巨球蛋白血症患者的血清,经内切糖苷酶 H 消化后用凝胶柱层析分离得到 5 个含有糖链的成分,将其中的 S2 样品用对氨基苯甲酸乙酯衍生,高压液相色谱分离纯化后,应用负离子 LSIMS 测定了 S2-ABEE 衍生物(图 4)。九糖由 8 个甘露糖 (Man) 及还原端的 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 组成,分子量为 1517 (ABEE 衍生物分子量为 1666.6)。

对照氘同位素标记衍生物质谱图后可以证实,图 4 中的 m/z 1665, 1503, 1341, 1179, 1017, 855, 693, 531 和 369 质谱峰是电荷位于还原端的离子。高分辨 LSIMS 峰匹配测得的精确质量数据进一步证实: m/z 1503, 1341, 1179, 1017, 855 和 693 离子的间隔,以及 m/z 869 和 707 离子的间隔均为 $C_6O_5H_{10}$ (脱水己糖),也证实了 m/z 221, 383, 545, 707 和 869 离子的元素组成中不含有氮原子。

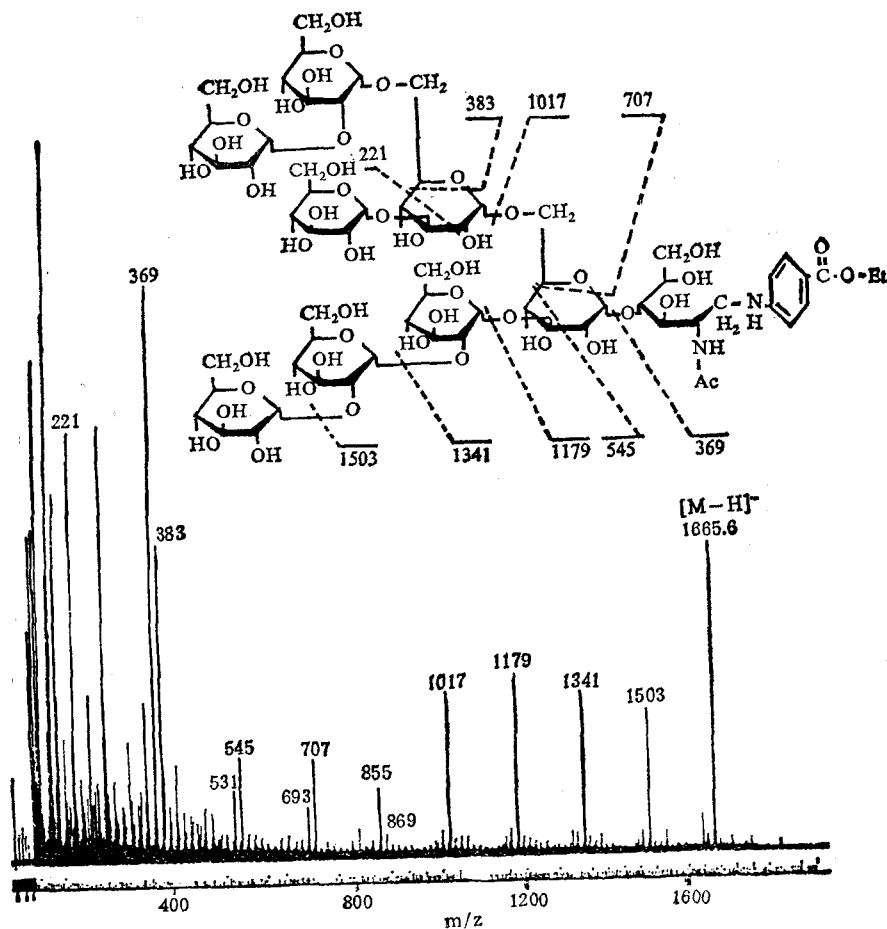


图 4 IgM 中某糖链 (S2) 对氨基苯甲酸乙酯衍生物负离子 LSIMS 谱

基质: 甘油

通过谱图解析推断出 S2 糖链的结构. 分枝构造使得解离一、二、三、四或八个甘露糖较容易, 而简单键断裂无法使五、六或七个甘露糖解离, 所以谱图中的 m/z 1503, 1341, 1179, 1017 和 369 离子峰都较强, 而 m/z 855, 707 和 545 离子峰弱得多, 从分子结构也可判断 m/z 869 离子是较难形成的. 应用 FABMS/MS (B/E) 测定了 m/z 1667 母离子的所有子离子, 得到了和图 4 相似的结果. 上述分子结构也得到了核磁共振数据的证实.

图 5 是 IgM 中另一个糖链 (Man 9 GlcNAc) ABEE 衍生物负离子 LSIMS 谱图中的一部分, 0.7n mol 样品经由衍生和 HPLC 纯化后能获得清晰解释糖链结构的质谱图.

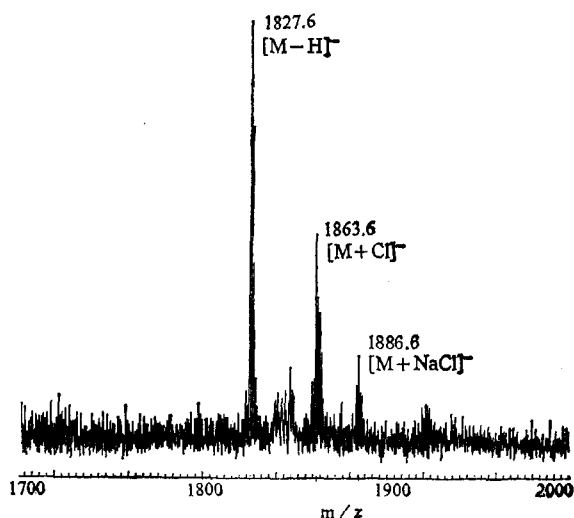


图 5 IgM 糖蛋白中 Man9 GlcNAc 糖链 ABEE 衍生物负离子 LSIMS 谱
0.7n mol 糖链制成的衍生物

结 论

糖的对氨基苯甲酸乙酯衍生物制备简便、快速,其紫外吸收基团有利于 HPLC 分离纯化时的检测,疏水性的增加又使它具有良好的液态二次离子质谱性能,灵敏度可以和 HPLC 相匹配,具有电荷分别位于还原端及非还原端的、能解释糖链序列结构的碎片离子,离子的相对强度又能反映糖链中糖元的联接及分枝状况,是一种较理想的天然寡糖链的痕量测定方法。

参 考 文 献

1 孙册,莫汉庆编. 代谢(二). 北京: 科学出版社, 1988

- 2 蒋可, Burlingame A L. 化学通报, 1990; (6): 30
- 3 Egge H. *Mass Spectrum Rev*, 1987; 6: 331
- 4 Burlingame A L, McCloskey J A eds. *Biological mass spectrometry*. Amsterdam: Elsevier, 1990
- 5 Biermann C J, McGinnis G D eds. *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*. Boca Raton: CRC Press, 1988
- 6 Tomiya N *et al. Anal Biochem*, 1987; 163: 489
- 7 Wang W T *et al. Anal Biochem*, 1984; 141: 366
- 8 Webb J W, Jiang K *et al. Anal Biochem*, 1988; 169: 377
- 9 Byrd J C, Tarentino A L *et al. J Biol Chem*, 1982; 257: 14657
- 10 Abeth W *et al. Anal Chem*, 1982; 54: 2029

蛋白激酶 C 活力的非同位素酶解测定法*

张泽林 刘燕燕 卢波 张慧

(华西医科大学药学院, 成都 610044)

提 要

在磷脂酰丝氨酸和 Ca^{2+} 存在下, 活化的蛋白激酶 C 以 ATP 为磷的供体使组蛋白 H1 磷酸化。用 Dowex-1 柱层析分离反应后的 ADP 与 ATP, 再用酸性磷酸酶水解 ATP 的磷酸酯键, 测定磷的含量, 建立了蛋白激酶 C 活力的非同位素酶解测定法。此法可靠易行。CV = 5.2%。

关键词 蛋白激酶 C, 活力测定

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是一种 Ca^{2+} 和磷脂依赖性蛋白激酶, 它被第二信使二酰基甘油 (diacylglycerol, DG) 激活后, 广泛参与由肌醇脂质信使系统介导的生理生化效应^[1]。研究 PKC 的生物学特性和功能已成为近年来生物化学和分子生物学研究的重要课题^[2]。目前, 国外都采用 ^{32}P - γ -ATP 磷酸化组蛋白 H1 (histone H1) 来测定 PKC 的活力。虽然同位素法灵敏度高, 但仪器试剂昂贵, 条件要求高, 不易进行。我们建立了非同位素酶解定磷法来测定 PKC 的活力, 方法可靠

适用, 介绍如下。

1 材 料 与 方 法

1.1 材料 组蛋白 H1 (histone H1), L-磷脂酰丝氨酸 (PS), ATP, ADP, 甘油二油酸酯 (diolein), DEAE 纤维素 (DEAE-cellulose), 酸性磷酸酶 (type IV-S) 均为 Sigma 产品。二硫苏糖醇 (DTT), Dowex-1 (氯型 X-8, 200-400 目) 为 Serva 产品。苯甲基磺

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1991-01-24 修回日期: 1991-03-28