

- cycle checkpoint pathways. *Science*, 1996, **271** (5247): 357~ 359
- 7 Lydall D, Weinert T. Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest. *Science*, 1995, **270** (5241): 314~ 315
- 8 Carr A M. Checkpoints take the next step. *Science*, 1996, **271** (5247): 314~ 315
- 9 Walworth N C, Bernards R. Rad-dependent response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science*, 1996, **271** (5247): 353~ 356
- 10 Kamb A, Gruis N A, Feldhaws J W *et al.* A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 1994, **264** (5157): 436~ 439
- 11 Nobori T, Milura K, Wu D J *et al.* Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 1994, **368** (6473): 753~ 756
- 12 Skapek S X, Rhee J, Spicer D B *et al.* Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclinD-dependent kinase. *Science*, 1995, **267** (5200): 1022~ 1023
- 13 Haley O, Novitch B G, Spicer D B *et al.* Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science*, 1995, **267** (5200): 1018~ 1020

- 14 Parker S B, Eichele G, Zhang P *et al.* p53-independent expression of p21^{cdi} in muscle and other terminally differentiating cells. *Science*, 1995, **267** (5200): 1024~ 1027

Progress in the Studies of Checkpoint Control Pathways of Cell Cycle. ZHANG Ping-bo, HONG Xi-jun, LIU Yan (*Department of Life science, Southwest Normal University, Chongqing 400715, China*).

Abstract Many checkpoint genes and proteins have been screened from different species and cells until now, such as ATM, RAD53, CHK1 etc. There are a lot of reports about their function in checkpoint control pathways as well as the correspondances with cancers.

Key words cell cycle, checkpoint control pathway, cell carcinogenesis

寡糖分离和结构分析进展

张剑波 田庚元

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032)

摘要 寡糖, 尤其是糖缀合物中的寡糖链, 在生命过程的细胞识别、信号传导和受体调节现象中扮演着重要的角色. 高效液相色谱、毛细管电泳、质谱、核磁共振、荧光标记糖电泳和试剂阵列分析方法等新技术的应用使得寡糖的分离和结构鉴定变得更为快速、简便和准确; 同时多种有力工具的联合运用将更深刻地揭示极微量寡糖的结构-功能关系成为可能.

关键词 寡糖, 分离, 结构分析

学科分类号 Q53

因为糖缀合物上的寡糖链在生命过程的重要作用, 所以开展寡糖的结构与功能关系研究显得非常重要. 在寡糖的分离与分析方面已经有了许多很好的综述, 下面只对近年来这方面的研究进展作一简单评述.

1 寡糖的分离

寡糖链的分离和纯化, 是寡糖结构分析的关键环节. 寡糖自身在组成、连接、衍生化、微观不均一性等方面的高度复杂性及其检测上

的困难, 使得寡糖混合物的分离一直困扰着糖化学家. 因此选择合适的方法对收集到的混合糖链进行分离, 是一项摸索性很强的工作. 下面就最近几年糖的分离手段的主要进展分述如下.

1.1 石墨化碳柱的高压液相色谱

与糖类高压液相色谱分析中常用的正相、反相和阴离子交换柱的分离原理不同的是, 石

收稿日期: 1996-12-13, 修回日期: 1997-06-23

墨化的碳柱的保留机制不仅基于填充剂与样品的疏水相相互作用,而且还包括电子受体供体之间的相互作用.与HPAEC相比,石墨化碳柱(graphitized carbon column, GCC)的容量更大,非常适合于寡糖的制备性操作,而且洗脱时只要用易于除去的水溶性有机溶剂即可.再由于糖类分子的强亲水性,通常用ODS柱分离时寡糖分子需要进行衍生化,操作复杂;而GCC柱对非衍生化的寡糖和带有少量氨基酸残基的糖肽都能获得良好的分离效果^[1].

1.2 高效毛细管电泳

除了少数带有羧基和磺酸基的糖类化合物,绝大多数的糖类化合物不带电荷、极性很大而且没有发色基团或荧光基团,所以用一般的高效毛细管电泳(high performance capillary

electrophoresis, HPCE)系统无法得到分离和检测.为了使糖类化合物能产生电迁移而得以相互分离,可采用的方法有:a.衍生化使之带上发色、荧光基团或电荷;b.与硼酸盐等络合;c.与缓冲液中的添加剂形成包合配合物;d.高pH缓冲条件下使之电离;e.加入表面活性剂使形成胶束.检测则可用:a.直接紫外或荧光法;b.间接紫外或荧光法;c.示差检测法;d.电流检测法;e.质谱法.分离与检测方法的确定则由糖的性质、所存在的介质以及所使用的仪器所决定^[2].如图1是我们利用HPLC和HPCE研究牛膝多糖(Abps)精制品的分离图谱.从两张图谱可以看出在HPLC呈单一对称的主峰(Abps)在HPCE图中可以看出有许多毛刺出现,这就从一个侧面直观地证明了牛膝多糖是一种小分子质量寡糖的同系混合物.

2 寡糖的结构分析

到目前为止,已经建立的寡糖结构分析方法有化学法,如甲基化分析、Smith降解、过碘酸氧化、乙酰解、三氧化铬氧化等;物理方法,包括核磁共振波谱(^1H , ^{13}C -NMR)、快原子轰击质谱(fast atom bombardment-mass spectroscopy, FABMS);和生物学方法,主要是酶解分析.而随着现代分析技术的出现与发展,新技术的引入使得糖链的结构分析工作已不再令人生畏.

2.1 物理方法

2.1.1 质谱:在糖类结构研究的众多分析方法中,质谱被认为是很有前途的手段之一.它灵敏度高、结构信息直观、尤其是80年代出现的FABMS,使得高极性、难挥发而且热不稳定的糖及其缀合物的直接分析成为可能.质谱技术在最近几年来又取得了飞速的发展. a. 电喷雾电离质谱:电喷雾电离质谱(electrospray ionization-mass spectroscopy, ESI-MS)是将溶液中分子转变成气相离子的非常有效的手段.这样产生的分子离子往往带有多个电荷.这些离子是靠吸附或失去若干个氢而形成

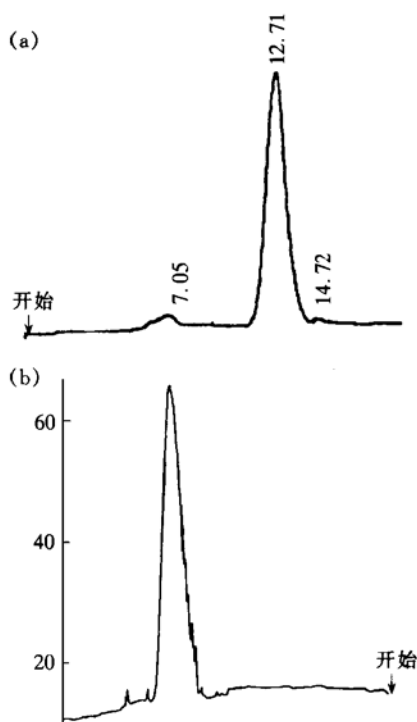


图1 牛膝多糖的色谱图

(a) HPLC, 色谱柱 TSK2000, 洗脱液: 水, 检测器: 示差检测器, 流速 1.0 ml/min; (b) HPCE, 仪器所内自制, 缓冲液 0.09 mol/L NaOH, 电压 18 kV, 检测器: 电流检测器, $E = +0.65\text{V}$ (vs. 饱和甘汞电极), 毛细管长 90 cm.

的, 所以在正离子或负离子谱上会观测到 $(M + nH)^{n+}$ 或 $(M - nH)^{n-}$ 的峰, 因此ESI-MS 可以测定的分子质量范围便大大扩展 (~ 1 亿). 图 2 是我们课题组最近测定牛膝多糖 4 分子质量分布的 ESI-MS 图谱 (徐愿坚, 1996), 从中可以明显看到牛膝多糖 4 中不同分子质量寡糖的分布. 人们发现由 ESI 产生的离子的碎片化反应会因异构体的不同而有所差异, 所以寡糖及其缀合物于过碘酸氧化、还原、甲基化前后用 ESI-CID 联用技术可获得不同的碎片离子, 由此能够获知 pmol 级的寡糖及其缀合物的分子质量、序列、分枝和连接信息^[3]. b. 基质辅助的激光解吸电离质谱: 基质辅助的激光解吸电离质谱 (matrix-assisted

laser desorption ionization mass spectroscopy, MALDI-MS) 技术几乎与 ESI 同时于 80 年代末问世. 由于技术上的特点, 这种离子化方式电离出的离子常用飞行时间 (TOF) 检测器来检测, 所以 MALDI 常与 TOF 连在一起称为基质辅助的激光解吸飞行时间质谱仪. 它也是一种“软电离”方式, 产生的分子离子稳定, 不易裂解, 适用于测定大分子质量的生物样品. 与蛋白质和糖蛋白通常给出强的 $[M + H]^+$ 离子之外还给出较弱的双电荷或多电荷离子不同的是, 中性寡糖分子仅给出单一的 $[M + Na]^+$ 离子峰. 此外, MALDI 方式不受样品中所含添加剂、缓冲液或盐类的影响, 其灵敏度也是各类电离方式中最高^[4].

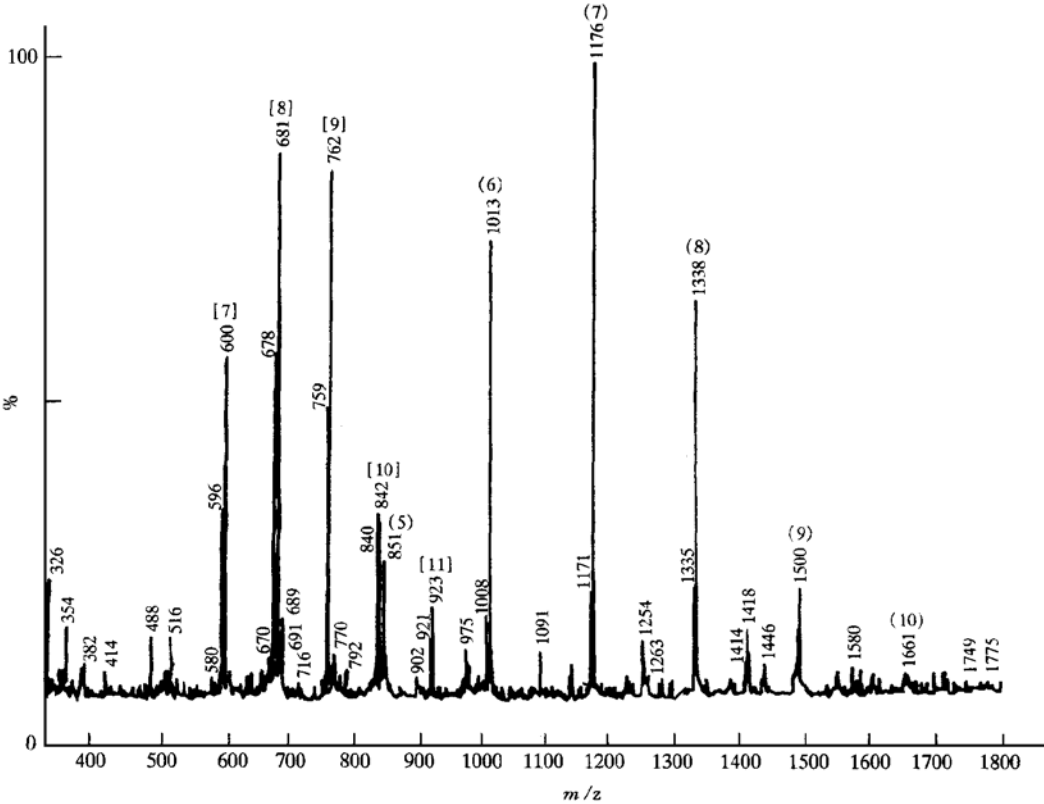


图 2 牛膝多糖-4 的 ESI-MS 图

括号中数字为寡糖的聚合度, () 表示是单电荷分子离子, [] 表示是双电荷分子离子.

2.1.2 电泳: a. 毛细管电泳 (CE): 毛细管电泳不仅仅是一种分离手段, 糖化学家还可以

利用它进行寡糖的组成分析、纯度鉴定和结构归属^[5]. 它既可以对复杂寡糖进行直接分析,

得到寡糖的微观不均一性的信息, 又可以对寡糖的酶解产物进行定性和定量分析, 从而得出寡糖链的完整结构. b. SDS-PAGE-PVDF 技术: 利用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳-聚偏氟乙烯薄膜电迁移技术 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis-polyvinylidene difluoride, SDS-PAGE-PVDF)^[6] 可以把电泳凝胶上的糖蛋白基本上定量地转移到聚偏氟乙烯薄膜上, 在此膜上可以直接进行酸水解, 然后分析其氨基酸和糖基组成; 也可以在此膜上进行溴化氰降解、各种蛋白酶、糖肽酶和糖苷酶水解, 以及把 PVDF 膜直接置于蛋白质气相序列仪或质谱上进行序列分析, 从而获得 pmol 级糖蛋白的肽链和糖链结构以及糖肽连接方式. 其做法是首先将转移到 PVDF 膜上的蛋白质剪下, 溶解后分成数个试样, 再用酸水解确定所研究的蛋白质是否含有糖基和含有什么样的单糖组成, 若是糖蛋白则可用糖苷酶, 如 PNGase、Endo H、Endo F2 等对其进行酶解, 又用 HPAEC-PAD 分析所得的寡糖链, 从而推测出糖蛋白上的糖链结构. c. 荧光基团辅助的糖电泳^[7]: 荧光基团辅助的糖电泳 (fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis, FACE), 又称荧光基团标记的糖的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore-labeled saccharides, PAGEFS), 是一种寡糖结构分析的简便方法. 它可以用来对多个样品平行地进行寡糖样品的简单、快速、灵敏和高分辨率的分离和定量分析. 它是通过对糖类分子的还原端羰基进行荧光基团衍生化标记后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 这既增强了寡糖分子的检测灵敏度 ($< 10^{-12}$ mol), 又使通常呈中性的糖类分子带上电荷在电泳体系中进行分离. 荧光试剂主要有两种: 8-氨基萘基-1, 3, 6-三磺酸和 2-氨基吡啶酮. 分别用于中性与酸性寡糖的分离. 因为凝胶电泳可以很方便地使用通常所用的蛋白质凝胶电泳设备和缓冲液体系 (只要把沉淀剂 SDS 省去即可), 而且在一次电泳时可以平行地进行多个寡糖样品的对照分离, 所以

它与酶解方法结合能非常方便、快捷和灵敏地对寡糖进行结构分析, 这种方法与前面的 CE 方法有着异曲同工之妙, 但所需仪器设备却更为简便.

2.1.3 核磁共振方法: NMR 技术对寡糖及其糖肽结构研究工作具有举足轻重的作用. 尽管糖链中氢谱重叠十分严重, 但 500 或 600 MHz 的高分辨¹H-NMR 能准确测定结构表征基团 (structure reporter groups) 的化学位移和峰宽, 精度可达 0.001. 糖链的各种结构特征, 均可由这些结构表征基团的微小位移变化出来. 此外 2D-NMR、NOE 以及 ¹³C、¹⁵N、³¹P 的 NMR 数据对糖链一级结构及其溶液构象的分析, 也是必不可少的. 对于 N-连接的糖链, 完备的 1D-NMR 数据库已经建立, 并已成功地用于糖肽和糖蛋白上 N-糖链的结构分析. 最近 Wyss 等^[8] 又使用 750 MHz 的核磁共振仪研究了人 CD2 中粘附域 hsCD2₁₀₅ 中肽链和糖链的结构, 从而使人们首次测定了完整糖蛋白的溶液构象, 并由此对其中糖链的作用机理进行了探讨.

2.2 酶学方法

在以前的糖类结构的酶学方法中, 人们通常采用的是一些外切糖苷酶对寡糖进行顺序消化以推测其化学结构. 由于酶解的高度专一性和放射标记方法的引入使得这种方法十分有效并广为采用. 但这种方法最大的缺陷在于酶解结束后需要很多次的进行分离和确定产物的流体动力学体积. 试剂阵列分析方法 (reagent array analysis method, RAAM) 就是针对这种问题应运而生的^[9]. 它将酶解方法的操作简化为只要将纯化的寡糖样品等分成几个试样, 再将每个试样与某种精确设定的外切糖苷酶混合物保温酶解, 这种特定酶混合物就叫作试剂阵列 (reagent array). 其原理是许多外切糖苷酶的混合物与糖链样品保温酶解, 直至所有酶都无法断裂的连接点, 称为终点片段 (“stop point” fragment). 通过省去其中一种或数种不同的外切糖苷酶所得的酶混合物再酶解糖链就会得到不同的终点片段. 又因为放射性标记

在糖链的还原端, 所以检测时只有终点片段具有放射活性, 而反应产物中释放的单糖则没有响应. 合并每次酶水解的产物, 再对产物库 (pool of products) 进行一次凝胶渗透色谱分离, 把分离图谱与计算机数据库中的寡糖链模拟分离图谱进行对照即可确定样品是何种寡糖. 根据这一原理, 商品化的糖序列仪 (glycosequencer) 也已被生产出来. 但由于糖蛋白上 O-连接糖链的高度复杂性和许多连接特异性的糖苷酶无法获得, 因而这一方法目前只适用于结构规律较明确的 N-糖链.

3 展 望

糖生物学的高速发展和新技术的大力推动, 使寡糖的分离和结构测定方法也取得了长足的进步. 作为分离手段的色谱技术与作为分析手段的质谱、酶学方法联用已在糖生物学中得到广泛应用; 而色谱与其他分析手段, 如 NMR 的联用以及结构分析手段相互联用如酶学方法与质谱的联用也已经初露端倪. 各种分离分析手段逐步实现自动化和智能化更使糖生物学家如虎添翼, 寡糖的分离与结构分析变得更为高效、准确、快捷和灵敏, Parekh 等^[10] 已成功地在 10^{-12} mol 水平上确定了 20 μ g 白细胞介素 6 样品上的寡糖序列的事实就充分地表明了这一点. 相信随着糖的分子生物学的不断发展和技术科学的进步, 对细胞水平, 以致分子水平的超微量的寡糖分子也能进行分离和结构的确定. 这无疑将大大推动糖类的分子生物学, 以致整个分子生物学领域的高速发展, 使得科学家可以更为直接和有效地探索生命现象的无穷奥秘.

致谢 衷心感谢徐愿坚同学、向帮平同学、卢保元博士和章广韬博士在本文写作过程中给以的有益建议和讨论.

参 考 文 献

- 1 Fan J Q, Kondo A, Kato I *et al.* High-performance liquid chromatography of glycopeptides and oligosaccharides on

- graphitized carbon column. *Anal Biochem*, 1994, **219** (2): 224~ 229
- 2 Oefner P J, Chiesa C. Capillary electrophoresis of carbohydrates. *Glycobiology*, 1994, **4** (4): 397~ 412
- 3 Reinhold V N, Reinhold B B, Costello C E. Carbohydrate molecular weight profiling: sequence, linkage, and branching data: ES-MS and CID. *Anal Chem*, 1995, **67** (11): 1772 ~ 1784
- 4 Mock K K, Davey M, Cottrell J S. The analysis of underivatized oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Comm*, 1991, **177** (2): 644~ 651
- 5 Honda S, Suzuki S, Nitta A. Application of high-performance capillary electrophoresis to analysis of carbohydrates, especially those in glycoproteins. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 1992, **4** (3): 233~ 243
- 6 Weitzhandler M, Kadlecsek D, Avdanovic N. Monosaccharide and oligosaccharide analysis of proteins transferred to polyvinylidene fluoride membranes after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*, 1993, **268** (7): 5121~ 5130
- 7 Jackson P. The analysis of fluorophore-labelled glycans by high-resolution polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 1994, **216** (2): 243~ 252
- 8 Wyss D F, Choi J S, Li J *et al.* Conformation and function of the N-Linked glycan in the adhesion domain of human CD2. *Science*, 1995, **269** (5228): 1273~ 1278
- 9 Edge C J, Rademacher T W, Wormald M R *et al.* Fast sequencing of oligosaccharides: the reagent-array analysis method. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, **89** (4): 6338~ 6342
- 10 Parekh R B, Dwek R A, Rademacher T W *et al.* Glycosylation of interleukin 6 purified from normal human blood mononuclear cells. *Eur J Biochem*, 1992, **203** (1/2): 135 ~ 141

Progress in Isolation and Structural Analysis of Oligosaccharides. ZHANG Jiar-bo, TIAN Geng-yuan (*Shanghai Institute of Organic Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China*).

Abstract Oligosaccharides, especially the glycans on the glycoconjugates, play important roles in the cell recognition, signal transduction and receptor modulation phenomena in the life processes. The application of new techniques such as HPLC, capillary electrophoresis, MS, NMR, fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis and reagent array analysis method, allows the isolation and structural determination of oligosac-

charide more rapid, convenient and accurate. Also it is now possible to understand more complete the structure-function relationship of the trace oligosaccharide, while a variety of powerful

tools are combined.

Key words oligosaccharide, isolation, structural analysis

脱水蛋白研究进展*

翟大勇 沈黎明

(中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要 植物在干旱胁迫下会产生许多逆境响应蛋白, 其中最常见的是脱水蛋白 (dehydrin). 脱水蛋白具有高度保守的序列. 根据近年研究的进展对脱水蛋白的功能和基因表达调控规律作了简要的综述.

关键词 脱水蛋白, 干旱胁迫, 基因表达

学科分类号 Q51

1 脱水蛋白的存在与结构

人们对比正常和干旱条件下生长的植物, 发现干旱胁迫可以诱导植物产生许多新的 mRNA 及蛋白质, 其中脱水蛋白 (dehydrin) 是目前人们研究得较多的一类与干旱相关的蛋白质. 按 Dure^[1]对逆激蛋白的分类, 脱水蛋白属于 LEA D-11 族. LEA (late embryogenesis abundant) 蛋白最初发现于棉花胚成熟后期, 至 1993 年已发现 18 个不同的种类, 后来发现正常生长的植株在逆境条件下也会诱导类似的蛋白质表达. 多数 LEA 蛋白的性质和功能尚不清楚. 脱水蛋白在特殊生理条件或逆境条件下大量出现 (谷物成熟胚或干旱胁迫下的幼苗中, 脱水蛋白可达可溶性蛋白的 1%), 它的结构和功能已引起了人们的浓厚兴趣, 迄今已对脱水蛋白进行了至少 100 例以上的研究 (根据发表结果统计).

最早发表的对脱水蛋白的研究是 1988 年 Mundy^[2]报道的水稻中的 RAB21 (RAB: responsive to ABA). 脱水蛋白之间的分子质量差别很大, 从 9 ku 到 200 ku 不等, 并且这些蛋白质的氨基酸序列与已知的各种酶均无明显

的同源性. 迄今已鉴定的大多数脱水蛋白均来自被子植物, 免疫抗体杂交技术^[3]表明植物脱水蛋白的抗体可与裸子植物 (如松树、银杏、蕨类等) 蛋白质发生交叉反应. 目前认为在光合生物中广泛存在着诱导脱水蛋白形成的机制. 现在还没有证据表明动物及非光合微生物中存在着与植物中脱水蛋白保守序列同源的逆境蛋白.

免疫定位和亚细胞分级分离的研究表明, 脱水蛋白可在细胞核及细胞质中出现, 而在细胞核中出现的情况随细胞种类的不同而异. 在成熟的玉米籽粒中注入 0.1 mmol/L 脱落酸 (ABA), 通过免疫荧光显微镜技术发现玉米种子脱水蛋白主要定位于糊粉层细胞、盾片薄壁细胞、盾片表皮细胞、微管束原及胚芽的细胞质及细胞核中^[4]; 而在茎干及根中则仅存在于细胞质中. 这些结果与玉米胚中 RAB17^[5]及小麦脱水蛋白 WCS120^[6]的免疫显微定位得出的结果一致. 通过亚细胞定位研究, 在 ABA 处理的水稻叶片及冷处理的菠菜叶片分别鉴定出脱水蛋白 RAB21^[2]及 CAP85^[7], 它

* 国家自然科学基金资助.

收稿日期: 1996-12-17, 修回日期: 1997-05-12