

研究快报

毛细管电泳飞摩尔水平分析糖蛋白中唾液酸*

车发云 邵晓霞 王克夷 夏其昌¹⁾

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 利用毛细管电泳分析唾液酸 2-氨基吡啶酮 (AMAC) 衍生物方法, 可在飞摩尔水平分析糖蛋白中唾液酸. 重组人促红细胞生成素 (rhu-EPO)、人尿胰蛋白酶抑制剂 (hu-UTI) 中唾液酸分析结果与文献值符合较好; 而牛 α_1 -酸性糖蛋白 (α_1 -AGP) 分析结果与早期文献值相比, 存在一定差异, 并发现该糖蛋白中除含有 5-N-乙酰氨基唾液酸 (Neu5Ac) 外, 还含数量与 Neu5Ac 相当的 5-N-乙醇酰氨基唾液酸 (Neu5Gc).

关键词 毛细管电泳, 2-氨基吡啶酮衍生, 唾液酸, 糖蛋白

学科分类号 Q58

自然界有 25 种以上不同修饰的唾液酸. 其中最常见的是 5-N-乙酰氨基唾液酸 (Neu5Ac). 唾液酸对糖蛋白和糖脂在生物体内功能的发挥起着相当重要的作用. 因此, 快速、准确和高灵敏分析糖蛋白中唾液酸具有十分重要的意义. 本文报道毛细管区带电泳分析唾液酸 2-氨基吡啶酮衍生物方法, 在

飞摩尔水平检测糖蛋白中唾液酸.

毛细管电泳将 Neu5Ac-AMAC 与其他中性单糖和酸性单糖的 AMAC 衍生物完全分离 (图 1). 应用 Beckman P/ACE 5500 毛细管电泳和二极管阵列检测器, 波长扫描得 Neu5Ac-AMAC 的吸光光谱, 最大吸收波长为 260 nm.

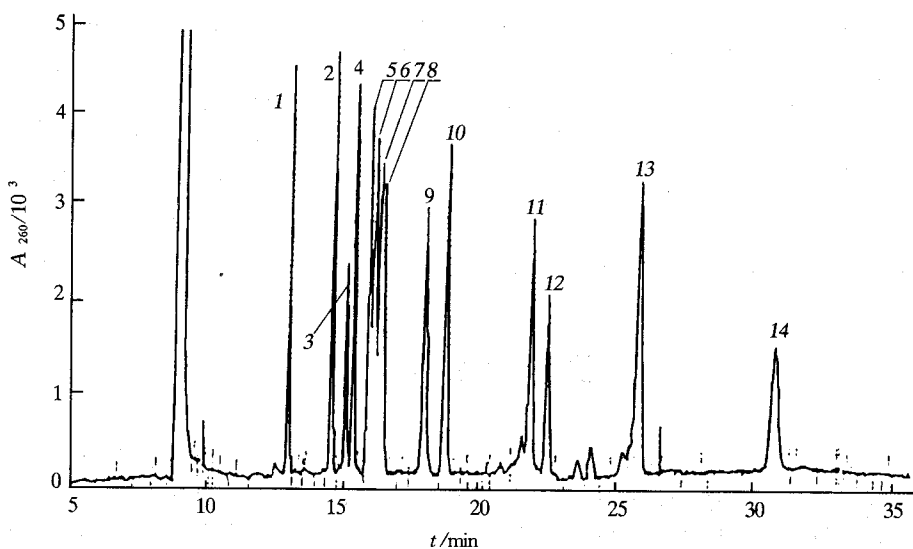


图 1 毛细管电泳分离 12 种单糖 AMAC 衍生物

条件: 熔融石英毛细管, 总长 72 cm, 有效长度 50 cm, 内径 50 μ m; 0.3 mol/L, pH 10.5 硼酸缓冲液; 电压, 20 kV; 100 μ mol/L Neu5Ac-AMAC, 其他单糖衍生物浓度均为 25 μ mol/L; 真空进样 2 s (约 7 nl). 各峰归属: 1: N-乙酰氨基半乳糖; 2: 木糖; 3: N-乙酰氨基唾液酸; 4: 核糖; 5: N-乙酰氨基葡萄糖; 6: 葡萄糖; 7: 甘露糖; 8: 阿拉伯糖; 9: 岩藻糖; 10: 半乳糖; 11: 肉桂酸 (内标); 12: N-乙酰氨基唾液酸; 13: 葡萄糖醛酸; 14: 半乳糖醛酸.

* 国家“863”计划资助项目 (86-102-08-06-02). ¹⁾ 联系人: Fax: 86-21-64338357; e-mail: xiaqc@sunm.shnc.ac.cn.

收稿日期: 1998-06-02, 修回日期: 1998-09-28

寻找到 Neu5Ac 最适衍生反应条件为温度 55℃, 反应时间 4 h. 一个有意义的发现是唾液酸与 AMAC 衍生反应有时会得到两种产物, 一种在酸性单糖衍生物迁移范围内 (图 1, 峰 12), 另一种的电迁移率变小了很多, 在中性单糖衍生物迁移范围 (图 1, 峰 3). 这两种产物有相同的吸光光谱、一阶微分和二阶微分吸光光谱. 峰 12 在室温光照 1.5 h 全部转化为峰 3; 而在室温避光保存 3.5 h, 转化率为 80%; 如衍生物放置于 -20℃ 冰箱保存 12 h, 峰 12 基本无变化. 从迁移率变小和两种物质具有相同的紫外光谱特性提示生色基团的结构在上述转化中没有发生变化等信息来分析, 可以初步推断这种转化可能是由于唾液酸衍生物脱羧酸的缘故, 用电喷雾四极杆离子阱质谱对转化后的物质进行鉴定, 证实它确为唾液酸衍生物脱羧基产物. 以上发现解答了国际上研究者用荧光辅助糖凝胶电泳 (FACE) 分析唾液酸 AMAC 衍生物时, 遇到一不明物质时产生的疑问^[1].

在唾液酸浓度范围 10 ~ 120 $\mu\text{mol/L}$ 及 50 ~ 300 $\mu\text{mol/L}$ 内, 衍生物峰面积与保留时间之商关于唾液酸浓度的线性相关系数分别为 0.9978 ($n=8$) 和 0.9980 ($n=7$). 方法最低检测浓度和最低检测限量分别为 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 35 fmol. 方法的化学衍生极限浓度为 17 $\mu\text{mol/L}$ 唾液酸.

分析了 rhu-EPO (深圳新鹏投资发展公司赠送), hu-UTI (上海医药工业研究院赠送) 和牛 α_1 -AGP (Sigma 产品) 中唾液酸含量. 用氨基酸组成分析法准确定量蛋白质浓度. 三种糖蛋白在 80℃, 0.1 mol/L 三氟乙酸水解条件下, 释放唾液酸的最佳反应时间分别为 30 min, 1 h, 1 h. 分析结果 (图 2a, b) 表明每摩尔 UTI、rhu-EPO 分别含 2.55、17.59 mol 唾液酸, 与文献 [2, 3] 报道值符合较好. 对牛 α_1 -AGP 分析发现, Neu5Ac-AMAC 峰旁另有一峰 (图 2c, 标有问号峰), 该峰的吸光光谱与 Neu5Ac-AMAC 的吸光光谱相同, 并且也发生上述转化反应. 可以推测这是另一种唾液酸衍生物, 用电喷雾四极杆离子阱质谱鉴定它为 5-N-乙醇酰氨基唾液酸 (Neu5Gc). 测得每摩尔牛 α_1 -AGP 含 Neu5Ac 5.50 mol, 含未鉴定唾液酸 4.93 mol (据 Neu5Ac 的校准曲线计算结果). 按文献 [4] 报道数据计算得牛 α_1 -AGP 中总的唾液酸约为 12.7 mol.

运用毛细管电泳分析糖蛋白中的唾液酸尚未见报道. 上述方法, 具有简便、快速、灵敏、经济和定量准确等特点, 可望成为日常分析方法.

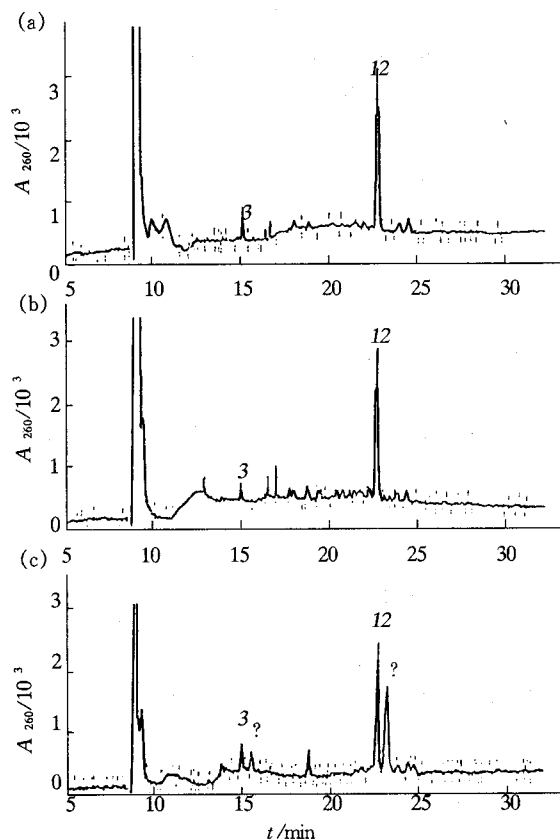


图 2 毛细管电泳分析糖蛋白中唾液酸

从以下糖蛋白中释放出的唾液酸经 AMAC 衍生化, 衍生物稀释至 100 μL . (a) 0.45 nmol rhu-EPO, 进样 2 s; (b) 2.14 nmol hu-UTI, 进样 2 s; (c) 1.42 nmol 牛 α_1 -AGP, 进样 1 s; 其余条件同图 1.

参 考 文 献

- 1 Hu G F. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis technology and applications. *J Chromatogr A*, 1995, **705** (1): 89 ~ 103
- 2 Hochstrasser H, Schonberger O L, Rossmann I, *et al.* Kunitz-type proteinase inhibitors derived by limited proteolysis of the inter- α -trypsin inhibitor, V. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 1981, **362** (10): 1357 ~ 1362
- 3 Hokke C H, Bergwerff A A, Aan Dedem G W K, *et al.* Structural analysis of the sialylated N- and O-linked carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem*, 1995, **228** (3): 981 ~ 1008
- 4 Endersen C, Christensen T B. A comparison of the carbohydrate composition of serumorosomucoid from man, cattle, horse, and sheep. *Acta Chem Scand*, 1972, **26** (4): 1743 ~ 1745

Femtomolar Analysis of Sialic Acids in Glycoproteins by Capillary Electrophoresis Precolumn Derivatization. CHE Fa-Yun, SHAO Xiao-Xia, WANG Ke-Yi, XIA Qi-Chang (Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract A new method was described which allowed the analysis of sialic acids in glycoproteins at femtomole. Sialic acids released from recombinant human erythropoietin (rh-EPO), human urine trypsin inhibitor (h-UTI) and bovine α_1 -acid glycoprotein (α_1 -AGP) by acid hydrolysis, were derivatized with 2-aminoacridone (AMAC), and then separated by capillary electrophoresis, separately. The quantities of sialic acids in the first two glycoproteins were consistent with the previous results while inconsistency was found in the bovine

α_1 -AGP case. It was found that in bovine α_1 -AGP N-glycoloyneuraminic acid (Neu5Gc) was present in addition to Neu5Ac with a quantity comparable to that of Neu5Ac. Based on these data, the AMAC-derivatized sialic acids were unstable and could undergo a decarboxylation reaction at room temperature under light, but they were stable at -20°C in the dark for at least 12 h.

Key words capillary electrophoresis, 2-aminoacridone derivatization, sialic acids, glycoproteins

中国生物化学与分子生物学会 1999 年学术活动计划

1, 第四届医学生物化学与分子生物学学术会议

1999 年 4 月 22 日~ 4 月 24 日, 重庆, 医学生化专业委员会承办

联系人: 缪时英, 中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005, 电话: (010) 65240803

2, 第六届工业生化学术会议

1999 年 11 月初, 福建武夷山市, 工业生化专业委员会承办

联系人: 金新根, 华东理工大学 431 信箱, 上海 200237, 电话: (021) 64253238

3, 第五届全国中医药生化暨养生保健学术研讨会

1999 年 10 月, 北京, 中医药专业组承办

联系人: 张秋菊, 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029, 电话: (010) 64286995

4, 第七次全国基因结构、表达和调控学术讨论会

1999 年 4 月 5 日~ 4 月 8 日, 福建武夷山市, 基因专业组承办

联系人: 杨天恩, 上海岳阳路 320 号《生命的化学》编辑部 200031, 电话: (021) 64372045

5, 第四届全国生物毒学术研讨会

1999 年 10 月, 安徽太平, 毒素专业组承办

联系人: 舒雨雁, 广西医科大学蛇毒研究所, 南宁 530021, 电话: (771) 5313495

6, 第七届全国生物膜学术讨论会

1999 年 11 月 7 日~ 11 月 11 日, 云南昆明, 膜专业组承办

联系人: 杜连芳, 北京市朝阳区大屯路 15 号 中国生物化学与分子生物学会秘书处 100101, 电话: (010) 64889892

7, HDL-C 和 LDL-C 测定技术新进展讲习班

1999 年 7~ 8 月间, 北京, 脂蛋白专业组承办

联系人: 陈保生, 中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005, 电话: (010) 65296413

8, 血浆脂蛋白代谢紊乱研究新进展

1999 年 11 月~ 12 月, 地点待定, 脂蛋白专业组承办

联系人: 陈保生, 中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005, 电话: (010) 65296413

9, '99 生物技术培训班

1999 年暑期, 北京中国农科院植保所, 农业专业委员会承办

联系人: 周顺伍, 中国农业大学生物学院, 北京 100094, 电话: (010) 62892870

10, 二十一世纪农业生物科学展望研讨会

1999 年底, 广东深圳, 农业专业委员会承办

联系人: 周顺伍, 中国农业大学生物学院, 北京 100094, 电话: (010) 62892870