

## 糖芯片制备技术研究进展\*

孙自才 魏 峥\*\* 魏可镁

(福州大学化糖生物化学研究所, 福州 350002)

**摘要** 糖芯片是一种分析糖-蛋白质相互作用最直接有效的方法, 对目前糖芯片的各种制备方法进行了综述, 并分析了影响糖芯片质量的一些关键因素及其对底片材料和固定方法的整体要求, 进而对该领域发展方向和广阔的应用前景进行了展望.

**关键词** 糖芯片, 微阵列技术, 连接臂, 固定化学, 底片材料

**学科分类号** Q53, O629.1

生物芯片或微阵列技术是当前生物学和化学结合的一个尖端研究领域. 在过去的十多年中, DNA 芯片和蛋白质芯片的快速发展和广泛应用, 极大地推动了整个现代生物学和医学的发展<sup>[1]</sup>. 糖芯片制备和分析的基本原理与上述两种芯片一样, 是将多种微量的具有确定结构的糖类化合物以点阵的形式固定于某种无机或有机材料做成的底片之上, 并利用高通量扫描技术分析靶标糖分子与其他生物分子之间的特异性结合, 进而认识其在生物体中所发挥的功能和作用机制<sup>[2]</sup>. 该技术具有使用样品量少、灵敏、快速等独特的优点. 但是, 目前糖芯片制备和检测技术依然处于起步阶段<sup>[3]</sup>, 主要原因有两个方面: a. 由于糖类化合物是一个结构十分复杂的庞大体系, 要分离或合成一系列具有确定结构并且性质类似的多糖或寡糖相对于基因和蛋白质来说比较困难; b. 选择一种合适的方法将靶标糖分子固定在适当的材料之上是制备糖芯片的核心步骤, 这很大程度上依赖于固定化学和材料科学的发展. 近几年来, 研究工作者们从多方面对糖芯片的制备技术进行了研究和探索, 同时制备出的各种糖芯片在分析糖-蛋白质的相互作用中取得了很多引人注目的成果<sup>[4]</sup>.

### 1 糖芯片的制备方法

#### 1.1 物理吸附法

最早的一篇关于糖芯片的研究论文由 Wang 等<sup>[5]</sup>于 2002 年底发表在《自然》杂志上. 该文将 48 种多糖或糖蛋白由物理吸附固定在硝酸纤维酯之上, 结果表明, 这样制备的芯片可以成功检测人体血浆

中细菌多糖的抗体, 但是糖的固定效率取决于糖的分子质量, 分子质量小的容易在检测过程中流失. 同一时期, Willats 等<sup>[6]</sup>和 Bryan 等<sup>[7]</sup>分别研究了用疏水性黑色聚苯乙烯树脂包裹的玻片物理吸附制备糖芯片的方法, 但是该法也只适合于糖蛋白和分子质量大的多糖化合物, 而不能普遍适用于单糖和寡糖. 因此, 增加靶标分子的分子质量或加强物理吸附的作用力是解决该法所存在问题的重要途径. Feizi 等<sup>[8]</sup>通过还原胺化反应将 95 种分离或合成的寡糖与一种氨基磷脂相连接, 然后固定于硝酸纤维酯包裹的玻片上, 大大提高了固定效果, 但是氨基磷脂难于制备得到和推广. Pohl 等<sup>[9]</sup>给糖分子的末端羟基接上一个长长的  $C_8F_{17}$ - 的尾巴后, 然后点样到经氟化物处理过的玻璃片之上, 通过氟化物之间的强作用力而将糖分子有效地固定. 由于物理吸附法制备糖芯片具有简单方便的优点, 该法一直在发展, 并被广泛地应用于多聚糖和糖蛋白的生物功能分析<sup>[10,11]</sup>.

#### 1.2 抗生物素蛋白负载法

第二种糖芯片的制备方法是以前链霉抗生物素蛋白-生物素(streptavidin-biotin)相互作用模式为基础, 广义上仍属于物理吸附法. Galanina 等<sup>[12]</sup>使用 20 多种寡糖通过一个较短的连接臂和生物素形成复合物, 然后直接点样到包裹抗生物素蛋白的底片 XNAonGOLD™(一种早期用于 DNA 微阵列可以商

\* 国家自然科学基金资助项目(20773203), 福建省重点科技平台建设项目(2006F1003).

\*\* 通讯联系人. Tel: 0591-83770818, E-mail: wei@fzu.edu.cn

收稿日期: 2007-09-19, 接受日期: 2007-10-30

业购买的底片)之上, 进而分析糖和各种抗体、凝集素之间的相互作用, 但是结果发现该芯片荧光分析灵敏度比预想的要差很多. Guo 等<sup>[13]</sup>和 Bochner 等<sup>[14]</sup>分别用上述方法制备的芯片分析了 DC-SIGN 和 siglec-8 与糖的作用机制. Karamanska 等<sup>[15]</sup>采用表面胞质共振技术 (surface plasmon resonance, SPR) 实时分析糖-蛋白质作用过程, 提高了检测的效率和灵敏度. 这种方法与传统的免疫学化验相似, 上述文献的实验结果表明是一种十分有效的固定方法, 但是操作精细, 底片对靶标分子的干扰因素较多.

### 1.3 化学共价键固定法

利用化学共价键将糖配体固定在底片材料的表面是目前被广泛研究和普遍使用的方法. 该法可以分为两大类, 一类是将糖分子进行修饰后接上活性基团, 然后和活化的表面快速反应固定, 另一类是材料表面衍生出氨基(—O—NH<sub>2</sub>)、酰肼基(—CO—NH—NH<sub>2</sub>)或光活性基团等, 直接与各种未经修饰的糖分子反应形成化学键.

第一类方法中几种典型形式如下: a. 利用环加成反应键合. Houseman 等<sup>[16]</sup>通过巯基和金箔反应从表面衍生出苯醌基, 然后将 10 种二糖接上环戊二烯基后, 再与表面发生 Diels-Alder 反应快速成键而固定. Wong 等<sup>[17]</sup>则研究了从表面大分子衍生出的乙炔基和与糖分子连接的叠氨基发生 2, 3-环加成反应而将糖固定的方法. b. 利用巯基和马来酰亚胺基键合. Seeberger 等<sup>[18]</sup>和 Mrksich 等<sup>[19]</sup>将巯基活化的单糖或二糖分子与金箔上含马来酰亚胺基的自组装单分子层通过 Micheal 加成反应成键. Park 等<sup>[20]</sup>采用了与此相反的策略, 先从玻片上衍生出巯基, 进而和马来酰亚胺基衍生化的单糖或二糖反应键合. c. 利用氨基和 NHS 活化的羧基键合. 这是由 Blixt 等<sup>[21]</sup>和 Xia 等<sup>[22]</sup>开发的一类方法. 首先将羧基树脂覆盖的玻片用 N-羟基马来酰亚胺活化, 然后经一步反应从糖的还原末端接出一个氨基, 两者通过取代反应成键. 此外, 科研工作者也探索了一些其他类似的固定方法. 例如, Dubois 等<sup>[23]</sup>用电化学的方法将修饰后的二糖固定在聚吡咯电极上, Suda 等<sup>[24]</sup>利用苯胺基和糖还原末端反应, 将多个肝素寡糖连接在束状分子上, 然后大分子束相连接的二硫键可以和金原子快速反应而固定在底片上, Shin 等<sup>[25]</sup>利用酰肼基衍生化的糖与玻片表面环氧基单分子层成键固定, 等等. 第一类方法可以成功避免靶标分子流失的问题, 但是也存在着严重

的缺点. 因为该法需要通过一步或多步化学反应对糖分子进行修饰, 这就或多或少地对糖分子结构有所破坏, 从而对那些高度硫酸化、磷酸化等取代型的功能性糖类化合物不一定适用.

第二类方法为直接化学固定法, 该法最大的优点是不需要经过繁琐的修饰过程, 从而很大程度上地避免了对糖结构的破坏. Koberstein 等通过甲基硅烷化试剂在玻片上衍生出长链氨基, 进一步经取代反应接上邻苯酰亚胺发色基团<sup>[26]</sup>. 该基团在 300 nm 左右的紫外光照射下, 可以夺取糖分子碳链上的氢原子, 进一步经自由基重排成键. 实验结果表明, 该法不会破坏糖上的取代基团, 而且固定效率与糖的分子质量无关. Shin 等<sup>[27]</sup>首次报道了氨基(—O—NH<sub>2</sub>)、酰肼基(—CO—NH—NH<sub>2</sub>)直接和糖类化合物的还原末端反应键合的制备糖芯片的方法, 该法反应温和、简单而快速. 并且通过比较得出, 两者参加反应的氨基都以 β- 构象存在, 但是氨基固定的糖末端主要以开环的形式存在, 而酰肼基固定的糖末端仍然以环合的状态为主. 从而酰肼基固定法更大程度地保持了糖分子的原有结构, 在与蛋白质作用检测时显示出更强的荧光信号. 随后, Zhi 等<sup>[28]</sup>对氨基固定法进行了发展和完善, 而 Zhou 等<sup>[29]</sup>对酰肼基固定法进行了简化和发展. 然而, 直接化学固定法是近两年来才兴起的一类方法, 其广泛使用还有待于接下来的系统研究与探索.

## 2 影响糖芯片质量的关键因素

糖芯片的制备是一项十分具有挑战性的工作, 到目前为止, 上述各种方法都有一定的针对性和缺陷. 通过对这些方法的比较可以看出, 影响糖芯片质量的主要有以下几个关键因素: a. 固定效率, 即被固定的糖分子数与点样时样品中糖分子总数的比例, 它决定了分析所需要的最少样品量. 简单物理吸附的效率一般在 20% 左右<sup>[2, 5]</sup>, streptavidin/biotin 法最佳时可以达到定量吸附的效果<sup>[4]</sup>, 化学固定的效率也可以达到 90% 以上<sup>[20, 29]</sup>. b. 靶标分子的密度, 即同样面积的单点上所分布的糖分子的数量. 提高靶标分子的密度是增强芯片检测灵敏度的重要方法, 但是分布密度太大, 糖分子簇拥在一起, 空间位阻较大, 反而会影响其与蛋白质之间的作用<sup>[14, 29]</sup>. c. 表面和靶标分子分布的均匀性. 要使荧光扫描、SPR 等能够准确分析结果, 则底片的表面必须要均匀, 同时各点上糖分子也要分布均匀. 如果各点上

靶标分子的密度不一致, 则很有可能导致错误的分析结果<sup>[9]</sup>. d. 连接臂的长度. 物理吸附没有连接臂的问题, 但是对于后两种方法, 尤其是化学共价键固定法, 连接臂的长度十分重要<sup>[20,24]</sup>. 首先, 需要一个较长的连接臂把靶标分子和底片本体隔开, 以防止非特异性吸附, 其次是连接臂可以增大靶标分子的灵活性及周围空间, 有利于糖-蛋白质高特异性结合. e. 点阵的密度. 生物芯片技术需要向微型化方向发展, 因为只有样品点足够小, 单位面积上点阵密度足够大, 而且各点响应灵敏, 才能实现真正意义上的高通量扫描. 已报道的文献中, 糖类分子的样品点都只有十余个或几十个, 最多的也就两百个左右<sup>[6,21]</sup>. 所以, 目前的糖芯片都还只能称做是“多阵列”(multiarray), 离“微阵列”(microarray)还有相当大的距离.

### 3 对底片的要求和三维糖芯片简介

糖类化合物包括糖蛋白、多聚糖和寡糖等等, 它们的性质各不相同, 尤其是寡糖, 随着分子质量的不同, 空间结构、溶解性、反应位点和反应活性都差别很大. 但是理想的糖芯片制备方法应该具有普适性, 且操作简单, 从而其对底片材料有着特殊的要求. 具体如下: a. 具有相对平整和结构均一的表面以便于实现高密度点样; b. 表面具有足够数量的活性基团, 而且这些活性基团和较长的连接臂相连以防止检测过程中发生非特异性吸附; c. 具有足够的化学和热稳定性, 自身和固定的生物分子都不会在高通量扫描过程中溶解或流失; d. 具有低的光学背景以适合于分析检测. 以上报道的各种方法都很难达到这些要求, 综合比较, 直接化学固定法具有明显的优势和发展潜力. 同时, 随着3D芯片技术在DNA和蛋白质领域的广泛应用, 3D-糖芯片最近也开始出现<sup>[30]</sup>. 三维糖芯片可以使用凝胶, 无机或有机纳米颗粒为基体材料, 具有操作方便、负载量大、灵敏度高等诸多优点<sup>[2]</sup>, 开发潜力巨大.

### 4 展 望

糖类化合物或糖组学的研究是当前生物学和化学所面对的一个新兴领域. 只有全面剖析糖类所承担的各种生物功能, 才能为解释整个生命现象的复杂性提供可能. 糖芯片作为研究糖类化合物生物功能的最有效工具之一, 其重要性不言而喻. 但是, 糖芯片制备技术是一个系统工程, 从整体上看目前

还不成熟, 从而很大程度地限制了其应用和推广. 在将来的研究中, 深入分析和比较各种制备方法的优缺点, 取长补短, 进一步开发出一些简单而广泛适用于各种糖类化合物制备方法是该领域的首要任务. 与DNA芯片和蛋白质芯片的发展过程一样, 可以预料, 糖芯片分析检测技术在未来生物学上会扮演越来越重要的角色.

### 参 考 文 献

- 1 Stears R L, Martinsky T, Schena M. Trends in microarray analysis. *Nat Med*, 2003, **9**(1): 140~145
- 2 Dyukova V I, Shilova N V, Galanina O E, *et al.* Design of carbohydrate multiarrays. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1760**(4): 603~609
- 3 Feizi T, Fazio W F, Chai C H. Carbohydrate microarrays—A new set of technologies at the frontiers of glycomics. *Curr Opin Struct Biol*, 2003, **13**(5): 637~645
- 4 Shin I, Park S, Lee M R. Carbohydrate microarrays: an advanced technology for functional studies of glycans. *Chem Eur J*, 2005, **11**(10): 2894~2901
- 5 Wang D, Liu S, Trummer B J, *et al.* Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(3): 275~281
- 6 Willats W G, Rasmussen S E, Kristensen T, *et al.* Sugar-coated microarrays: a novel slide surface for the high-throughput analysis of glycans. *Proteomics*, 2002, **2**(12): 1666~1671
- 7 Bryan M C, Plettenburg O, Sears P, *et al.* Saccharide display on microtiter plates. *Chem Biol*, 2002, **9**(6): 713~720
- 8 Fukui S, Feizi T, Galustian C, *et al.* Oligosaccharide microarrays for high-throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(10): 1011~1017
- 9 Mamidyalala S K, Ko K S, Pohl N L, *et al.* Noncovalent fluoros interactions for the synthesis of carbohydrate microarrays. *J Fluor Chem*, 2006, **127**(415): 571~579
- 10 Patwa T H, Zhao J, Anderson M A, *et al.* Screening of glycosylation patterns in serum using natural glycoprotein microarrays and multi-Lectin fluorescence detection. *Anal Chem*, 2006, **78**: 6411~6421
- 11 Rhodes M A C, Childs R A, Kiso M, *et al.* Carbohydrate microarrays reveal sulphation as a modulator of siglec binding. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **344**(4): 1141~1146
- 12 Galanina O E, Mecklenburg M, Nifantiev N E, *et al.* Glycochip: multiarray for the study of carbohydrate-binding proteins. *Lab Chip*, 2003, **3**(4): 267~272
- 13 Guo Y, Feinberg H, Conroy E, *et al.* Structural basis for distinct ligand binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DCSIGNR. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, **11**: 591~598
- 14 Bochner B S, Alvares R A, Nehta P, *et al.* Glycan array screening reveals a candidate ligand for siglec-8. *J Biol Chem*, 2005, **280**(6): 4307~4312



- 15 Karamanska R, Clarke J, Blixt O, *et al.* Surface plasmon resonance imaging for real-time, label-free analysis of protein interactions with carbohydrate microarrays. *Glycoconj J*, 2007, **16**, published online, 2008, **25**(1): 59~64
- 16 Houseman B T, Mrksich M. Carbohydrate arrays for the evaluation of protein binding and enzymatic modification. *Chem Biol*, 2002, **9** (4): 443~454
- 17 Bryan M C, Lee L V, Wong C H. High-throughput identification of fucosyltransferase inhibitors using carbohydrate microarrays. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, **14**(12): 3185~3188
- 18 Ratner D M, Adams E W, Disney M D, *et al.* Tools for glycomics: mapping interactions of carbohydrates in biological systems. *Chem Bio Chem*, 2004, **5**(10): 1375~1383
- 19 Houseman B T, Gawalt E S, Mrksich M. Maleimide-functionalized self-assembled monolayers for the preparation of peptide and carbohydrate biochips. *Langmuir*, 2003, **19**(5): 1522~1531
- 20 Park S, Lee M R, Pyo S J, *et al.* Carbohydrate chips for studying high-throughput carbohydrate-protein interactions. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(15): 4812~4819
- 21 Blixt O, Hoffmann J, Svenson S, *et al.* Pathogen specific carbohydrate antigen microarrays: a chip for detection of Salmonella O-antigen specific antibodies. *Glycoconj J*, 2008, **25**(11): 27~36
- 22 Xia B, Kwar Z S, Ju T, *et al.* Versatile fluorescent derivatization of glycans for glycomic analysis. *Nat Methods*, 2005, **2**(11): 845~850
- 23 Dubois M P, Gondran C, Renaudet O, *et al.* Electrochemical detection of *Arachis hypogaea* (peanut) agglutinin binding to monovalent and clustered lactosyl motifs immobilized on a polypyrrole film. *Chem Commun*, 2005. 4318~4320
- 24 Suda Y, Arano A, Fukui Y, *et al.* Immobilization and clustering of structurally defined oligosaccharides for sugar chips: an improved method for surface plasmon resonance analysis of protein-carbohydrate interactions. *Bioconjugate Chem*, 2006, **17**(5): 1125~1135
- 25 Park S, Shin I. Carbohydrate microarrays for assaying galactosyltransferase activity. *Org Lett*, 2007, **9**(9): 1675~1678
- 26 Wang D N, Carroll G T, Turro N J, *et al.* Photogenerated glycan arrays identify immunogenic sugar moieties of *Bacillus anthracis* exosporium. *Proteomics*, 2007, **7**(2): 180~184
- 27 Lee M R, Shin I. Facile preparation of carbohydrate microarrays by site-specific covalent immobilization of unmodified carbohydrates on hydrazide-coated glass slides. *Org Lett*, 2005, **7**(19): 4267~4272
- 28 Zhi Z L, Powell A K, Turnbull J E. Fabrication of carbohydrate microarrays on gold surfaces: direct attachment of nonderivatized oligosaccharides to hydrazide-modified self-assembled monolayers. *Anal Chem*, 2006, **78**(14): 4786~4793
- 29 Zhou X C, Zhou J Z. Oligosaccharide microarrays fabricated on aminoxyacetyl functionalized glass surface for characterization of carbohydrate-protein interaction. *Biosens Bioelectron*, 2006, **21** (8): 1451~1458
- 30 Dyukova V I, Dementieva E I, Zubitsov D A, *et al.* Hydrogel glycan microarrays. *Anal Biochem*, 2005, **347**(1): 94~105

## Advances in Fabrication of Carbohydrate Chips\*

SUN Zi-Cai, WEI Zheng\*\*, WEI Ke-Mei

(Research Center of Glycan Biochemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract** Carbohydrate chip, a wonderful tool for studying the carbohydrate-protein interactions, is developing very fast in recent years and shows a bright future. The methods of fabrication of carbohydrate multi-arrays are systematically introduced, factors that influence the obtained chip's quality are analyzed in detail, and the general requirement of plate materials and immobilization methods for design of carbohydrate chip are discussed.

**Key words** carbohydrate chip, microarray, spacer, immobilization chemistry, plate materials

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (20773203) and Foundation of High Technology Construction Project of Fujian Province (2006F1003).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-591-83770818, E-mail: wei@fzu.edu.cn

Received: September 19, 2007 Accepted: October 30, 2007