

生物化学丛书

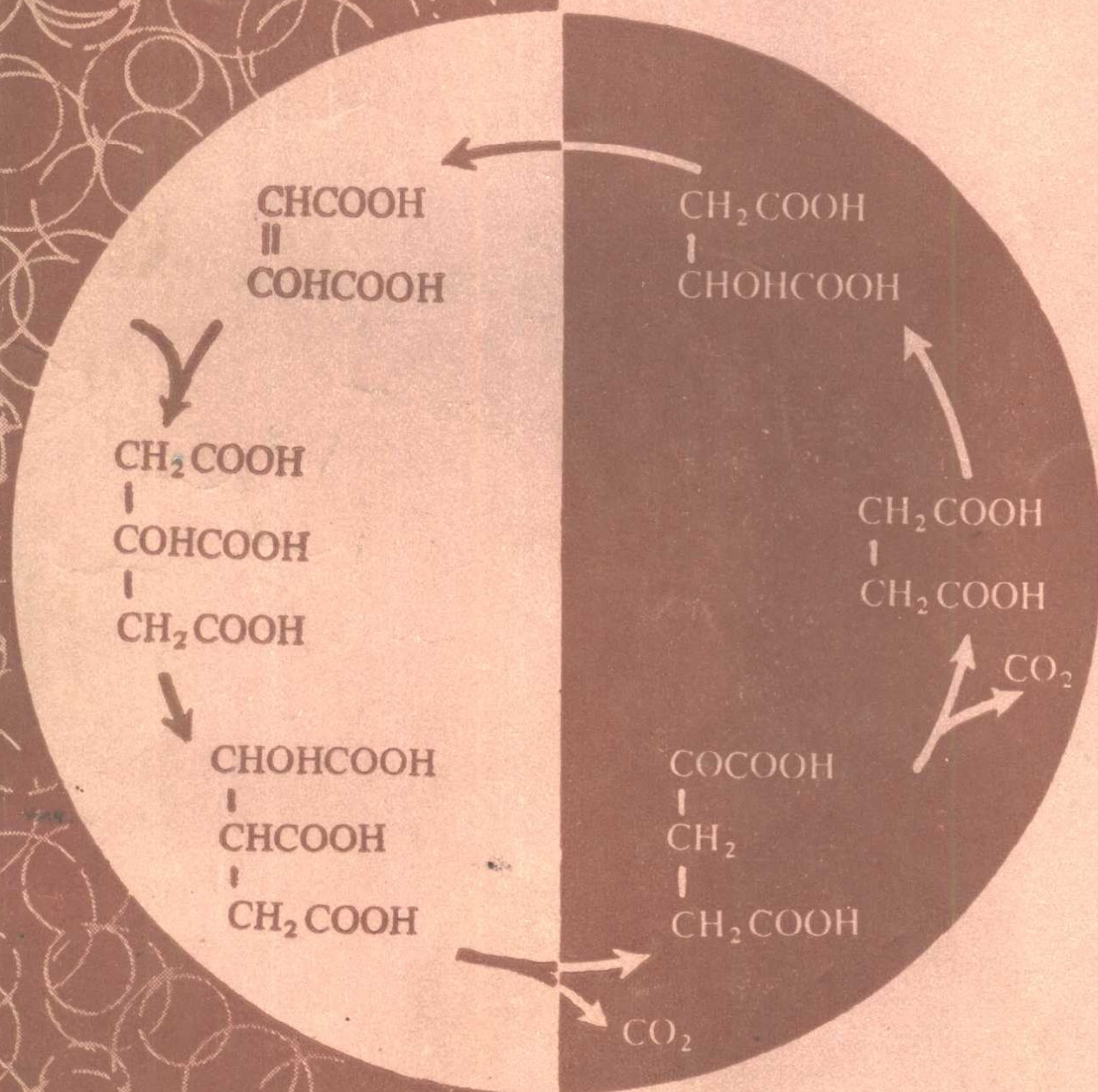
5-5
36
9.1

代谢

(二)

糖蛋白与蛋白聚糖
结构、功能和代谢

孙 册 莫汉庆 编著



科学出版社

生物化学丛书

代 谢 (二)

糖蛋白与蛋白聚糖 结构、功能和代谢

孙 册 莫汉庆 编著

科 学 出 版 社

1 9 8 8

内 容 简 介

糖复合物(包括糖蛋白、蛋白聚糖、糖结合蛋白和糖脂)是近十几年来发展很快的一个领域,这类化合物在生物体中起着重要作用,受到生物科学和医学研究工作者的重视。

本书共分六章,第一至第五章介绍糖蛋白,包括糖蛋白研究概况;研究糖蛋白结构的方法,主要是寡糖的结构分析;糖蛋白的结构、生物合成和降解代谢;糖蛋白的功能以及结构和功能的关系,着重介绍糖类在生物的生命现象和各种生理、病理作用中作为识别的标记,以及它们的重要性。第六章介绍蛋白聚糖(包括糖胺聚糖)的结构、生物合成、降解代谢和功能。

本书可供生物学科的研究工作者,以及有关大专院校教师、研究生和高年级学生阅读参考。

生物化学丛书

代 谢 (二)

糖蛋白与蛋白聚糖
结构、功能和代谢

孙 册 莫汉庆 编著

责任编辑 赵甘泉

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1988年4月第 一 版 开本:787×1092 1/16
1988年4月第一次印刷 印张:10 1/4
印数:0001—7,000 字数:234,000

ISBN 7-03-000306-3/Q·59

定价: 2.70 元

序 言

生物化学研究所举办的生化训练班始自 1950 年,开始时着重实验室训练,我们的目的是为了使青年生化工作者掌握这门学科研究的一些新方法、新技术。以后随着我所高研人员的增多,又添加了讲课内容,围绕当时的生化生长点,系统地讲述国际生化的新进展。课文内容逐渐发展充实,并结合在上海科技大学讲授高级生化课的需要,编写成高级生化训练班讲义。1960 年中国科学院在上海召开第一次全国生化学术会议,会议期间各地代表纷纷要求生化所举办一次大型高级生化训练班,为全国各有关单位培训生化人才。因此,生化所于 1961 年举办了一次有四百多学员参加的高级生化训练班,以系统介绍生化学科新知识为主,部分学员并参加了实验训练。十几年来,我们发现通过该次训练班学习的学员,大部分已成为各有关单位的生化科研或教学骨干。这个发现给予生化所同志以极大鼓舞。“文化大革命”中,高级生化训练班横遭批判,但 1972 年以后,各方面仍不断有呼声,要求生化所再次举办高级生化训练班。1976 年我们在所内作一次小型尝试,着重发挥部分中级科研人员在教学中的作用,从编写讲义到讲课。1979 年在中国科学院一局的催促和支持下,为克服住宿的困难,我们再次在沪杭两地同时举行一次大型高级生化训练班,人数近五百人,课程内容大为扩充,包括十余年来进展最迅速的生化或分子生物学领域,如分子遗传、DNA 重组、生物膜、免疫生化等等。为适应国内广大生化工作者的需要,特将上述讲课内容整理成书,分册付印,定名为“生物化学丛书”。尚望国内同行对本书内容不吝批评指正,供今后再版时修改参考。

王应睐

前 言

新陈代谢,简称代谢,是古老的科学,又是极为新颖的科学。它的大要早已为人们掌握,但是它的很多细节则有待逐步认识。

为学习上的方便起见,我们仍按习惯上使用的框架,将代谢归纳为糖代谢、蛋白质代谢、核酸代谢、脂质代谢等大标题。其中核酸和蛋白质的合成代谢(生物合成),则按已经形成的习惯列入本丛书之一《核酸,结构与合成》。留下的糖代谢、核酸降解代谢和核酸的生物合成,合并成为一册,作为代谢(一)。蛋白质的降解代谢和氨基酸的代谢,将成为另一册,作为代谢(四),目前在着手撰写。糖结合物的研究,近十余年来才引人注目,进展较快,现将此部分另列一册,作为代谢(二),内容包括糖蛋白、蛋白聚糖和结合糖的蛋白质(最后部分尚未成稿,待再版时补入)。代谢(三)主要讨论脂质及其代谢,除甘油酯、磷脂、鞘脂外,也列入了糖脂和脂蛋白,并将类固醇、类胡萝卜素、类萜纳入脂质范畴。关于代谢的一般问题,则以代谢总论为题作简短的叙述,放在糖代谢的前面,作为整个代谢的引子。

以上这些,虽经各作者下了功夫,较满意地完成了编写工作,全部稿件、亦已由我审阅,但由于我们的知识有限,不足和错误在所难免,尚希读者勿吝指教,予以更正。

沈昭文

1986年9月

目 录

第一章 糖蛋白研究概况.....	1
第二章 研究糖蛋白结构的方法.....	7
一、糖蛋白的分离和纯化	7
二、物理化学性质的研究	10
三、糖链结构分析	11
第三章 糖蛋白的结构.....	28
一、糖链和肽链的连接方式	28
二、糖链结构	30
三、糖蛋白的全结构	51
四、立体构象	53
五、细胞膜糖蛋白的构造	57
第四章 生物合成与降解代谢.....	61
一、N-糖苷键型寡糖的生物合成	62
二、O-糖苷键型寡糖的生物合成	76
三、降解代谢	90
第五章 糖蛋白的功能以及结构和功能的关系.....	94
一、糖蛋白中糖链的功能	94
二、糖链结构与其功能的关系	115
第六章 蛋白聚糖.....	133
一、概论	133
二、糖胺聚糖	135
三、蛋白聚糖	147

0376242-88/7/29-21702

第一章 糖蛋白研究概况

长期以来,认为糖类主要是作为生物的能量来源和结构物质。对它的研究主要集中于单糖以及它们的代谢转化,和少数种类大分子物质如肝糖原、淀粉和纤维素。直到约二十年前,生物化学家和化学家才对长期忽视的糖复合物、特别是糖蛋白和糖脂发生了兴趣,开展了多方面的研究。认识到细胞表面的相互作用、分泌和摄取现象、变异和转化、以及细胞调节和识别的许多其它重要作用,都直接依赖糖复合物。

虽然现在知道,在有机体中许多具有生物活力的成分如酶、激素、毒素、载体蛋白等都是糖蛋白,这些糖蛋白的寡糖部分的功能,过去人们很少考虑。这是因为含糖和不含糖的同一物质在某些性质上相同或相似,如不含糖的核糖核酸酶 A 和糖基化的核糖核酸酶 B 显示完全相同的动力学性质。许多含糖基的酶,去除糖的部分后不影响它们的催化活性。然而在许多这些试验中,人们发现去糖基的酶的热稳定性较差,表明糖蛋白的糖基具有稳定作用。糖蛋白中糖基的理化效应在许多例子中是明显的。如动物粘膜表面覆盖的糖蛋白(粘蛋白),一般富含唾液酸或硫酸化的糖,整个分子形成粘弹性凝胶。去除唾液酸,导致粘蛋白溶液粘度的降低。从南极鱼分离到的一种糖蛋白,能使溶液的冰点下降,具有抗冻作用。这一糖蛋白含有许多 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}$ 基,与由丙-丙-苏重复单位组成的肽链的苏氨酸基连接。经半乳糖苷酶水解,或半乳糖氧化酶氧化半乳糖基,抗冻性质即被破坏。以上例子表明糖蛋白的糖基在糖蛋白的物理性质中起重要作用。除在理化性质中的作用外,糖基还显示明显的生物学功能,如人的血型物质具有糖结构的决定簇,肿瘤细胞特有的抗原决定簇主要也是糖,高等动物血液循环中糖蛋白的存活时间受其糖链结构的控制,淋巴细胞和血细胞从循环中清除的时间与其细胞表面的糖密切相关。这些研究结果说明了糖蛋白中糖基的生物学功能。

糖蛋白研究的迅速发展,使长期被忽视的糖蛋白突然成为生化学科研究的中心。人们不再把它解释为松散的“蛋白质-糖复合物”,而是糖和蛋白质的共价结合物。并且相信糖蛋白是一类具有许多功能的重要的化合物。为此,它吸引着各学科,包括化学、生物学、生物化学、免疫学、细胞生物学、植物生理学等乃至医学及农学的工作者从事这一领域的研究。

糖蛋白在自然界广泛存在于动物、植物和某些微生物中。在生物体内它们以各种形式存在。在细胞中的糖蛋白既有可溶性的、又有膜结合的形式。糖蛋白也分别以可溶性和水不溶性的形式存在于细胞外液和细胞间质。几乎所有合成蛋白质的细胞都合成糖蛋白,它们中的一部分成为细胞膜的构成成分,从细胞质膜到细胞器膜,一切膜结构都含有糖蛋白。存在于质膜上的糖蛋白,其亲水的糖链总是位于细胞外侧。但对细胞器膜上糖蛋白糖链的分布是有不少争论的。根据用同位素标记的凝集素的研究,认为核膜向细胞质的表面,线粒体外膜和肾上腺细胞嗜铬颗粒膜(chromaffin granule membrane)向细胞质的表面,具有结合凝集素的部位。另一方面,用伴刀豆凝集素(简称 ConA)-过氧化物酶的实验,表明核膜向细胞质的和向腔的表面均有丰富的 ConA 受体,嗜铬颗粒膜仅在向腔

表1 若干典型糖蛋白的分布及功能

糖 蛋 白	来 源	分 子 量	糖含量(%)
酶			
碱性磷酸酯酶	小鼠肝	130 000	18
菠萝蛋白酶	菠萝杆	33 000	3.6
羧肽酶 Y	酵母	51 000	17
多巴胺 β -羟化酶	牛肾上腺	290 000	3.9
半乳糖苷转移酶	牛初乳	54 000	6.8
葡萄糖氧化酶	黑曲霉素	186 000	16
蔗糖酶	酵母	223 000	46
过氧化物酶 C	辣根	40 000	15—18
核糖核酸酶 B	牛胰	14 700	8
核糖核酸酶 C	牛胰	~15 000	18
核糖核酸酶 D	牛胰	~15 000	22
硫酸化酶	牛肝	107 000	9.4
激素			
绒毛膜促性腺激素	人	38 000	31
促红细胞生成素	人	34 000	29.4
促黄体生成素	人	28 000	17.3
促黄体生成素	猪	30 000	14.4
男性激素	<i>Volvox carteri</i>	27 500—30 000	45
凝集素			
利马豆		124 000	6
马铃薯		50 000	50
大豆		120 000	6
膜成分			
血型糖蛋白	人红细胞	31 000	60
E 糖蛋白	西门利启森林病毒	52 000	11.5
G 蛋白	疱疹口炎病毒	70 000	9—10
血凝素	流感病毒	210 000	25
视紫红质	牛视网膜	40 000	7
血清糖蛋白			
铜蓝蛋白	人	132 000	8
胎球蛋白	小牛(胎牛)	48 400	22.9
免疫球蛋白			
IgA	人	160 000	7
IgG	人	150 000	3
IgM	人	950 000	10
甲状腺球蛋白	小牛	670 000	7.9
凝血酶原	人	72 000	8.2
结构糖蛋白			
胶原	大鼠皮肤	~300 000	0.4
	鸡软骨	~300 000	4
毒素			
相思豆毒素	相思豆	65 000	3.2
蓖麻毒素	蓖麻豆	60 000	5.2
其它			
干扰素	人白细胞	26 000	~20
纤维粘连蛋白	人成纤维细胞	250 000	4.5

摘自 N. Sharon & H. Lis, Glycoproteins, in The Proteins, vol. V, 1982, Academic Press, New York.

的表面具有结合 ConA 的部位。高尔基体膜结合蓖麻凝集素(简称 RCA₁)的部位,仅存在于向腔的表面。

现在看来,大多数蛋白质是糖蛋白,它们包括酶、免疫球蛋白、载体蛋白、激素、毒素、凝集素和结构蛋白(表 1)。迄今从人血清分离到的 60 多种蛋白质,除白蛋白和前白蛋白外,都是糖蛋白,如血浆铜蓝蛋白、 α_1 -酸性糖蛋白、触珠蛋白、乳铁蛋白、铁传递蛋白、各种免疫球蛋白等。鸡蛋清中仅约占蛋清总蛋白质量 3% 的溶菌酶不是糖蛋白。占人体总蛋白质的 1/4 到 1/3 的胶原蛋白,也都是糖蛋白。多肽激素中的绒毛膜促性腺激素(HCG)、促卵泡激素(FSH)、促黄体生成激素(LH)等也都是糖蛋白。原来一直认为是“纯”的多糖,如糖原和纤维素,亦含有极少量的共价结合的蛋白质。

在自然界中,已发现的单糖虽有 200 种左右,但通常在糖蛋白中出现的糖只有 11 种(表 2)。糖蛋白中的糖,有时可和其它基团结合,例如硫酸基团(在小肠粘蛋白和病毒的糖蛋白中)和磷酸基团(在溶酶体水解酶和酵母甘露聚糖中)。

表 2 生物体中糖蛋白的单糖成分

单 糖	真 核 生 物		原核生物 ^a
	动 物	植 物	细 菌
己糖			
半乳糖	+	+	+
葡萄糖	+	+	+
甘露糖	+	+	+
脱羟己糖			
L-岩藻糖	+	+	
己糖胺 ^b			
半乳糖胺	+	+	+
葡萄糖胺	+	+	+
戊糖			
木糖	+	+	+
L-阿拉伯糖	?	+	
唾液酸 ^c	+	-	
醛酸			
葡萄糖醛酸 ^d	+	-	+
L-艾杜糖醛酸	+	-	

^a 糖蛋白在原核细胞是罕见的。

^b 通常是 N-乙酰化的,在蛋白聚糖中肝素和乙酰肝素硫酸酯,葡萄糖胺可能是 N-硫酸化的。

^c 这类化合物中最通常存在的是 N-乙酰神经氨酸,在糖蛋白中已有 20 余种神经氨酸衍生物被发现。

^d 蛋白聚糖特有的。

出处见表 1。

绝大部分糖蛋白中的糖与多肽链通过 N-乙酰半乳糖胺 $\alpha 1$ -丝氨酸(或苏氨酸)(GalNAc $\alpha 1$ -Ser/Thr)键,或 N-乙酰葡萄糖胺 $\beta 1$ -天冬酰胺(GlcNAc $\beta 1$ -Asn)连接,连接方式属于前者的称粘蛋白型,因为它们在粘蛋白中非常广泛地存在。

各种糖蛋白中糖链的长短和结构可以相差很大,有的糖链由一个或二个单糖组成,例如胶原蛋白的糖链;有的是由数十个单糖组成的、没有支链的、长的寡糖链,如结缔组织中的蛋白聚糖的糖链;或有分支的寡糖链,如血清糖蛋白中的寡糖链。各种糖蛋白所含的糖

表3 糖蛋白中糖链数和间距的变动

糖 蛋 白	每一分子的糖链数	糖链间距 (氨基酸/糖链)
血清糖蛋白		
α_1 -酸性糖蛋白	4	51
胎球蛋白	6	60
人触珠蛋白	13	113
人 α_2 -巨球蛋白	31	209
牛甲状腺球蛋白	19	296
人转铁蛋白	2	375
人 IgG	2	776
胰糖蛋白		
牛核糖核酸酶 B	1	124
脱氧核糖核酸酶	1	270
粘蛋白		
羊颌下腺粘蛋白	800	6
猪颌下腺粘蛋白	~500	8
胶原		
牛肾小球基底膜	—	58
兔角膜胶原	19	173
牛皮肤胶原	8	435
大鼠皮肤胶原	4	770
兔巩膜胶原	3	1 000

摘自 N. Sharon, in Complex Carbohydrates. their Chemistry, Biosynthesis and Functions, 1975, Addison-Wesley Publishing Company.

链数也十分不同, 可以从每个分子中仅有一条糖链到多达几百条糖链。例如卵白蛋白和核糖核酸酶 B, 每个分子中均只有一条糖链, 而羊的颌下腺粘蛋白, 每个分子中有 800 条寡糖链 (表 3)。

由于在不同的糖蛋白中, 寡糖链的长度和数目相差很大, 糖蛋白的含糖量也有很大的差别, 如胶原蛋白的含糖量不到 1%, 而可溶性血型物质的含糖量高达 85% (图 1)。若以某些证据所表明的, 原先以为是“纯”的多糖, 如糖原也共价结合少量蛋白质, 那末是一个含糖量高达 99% 以上的糖蛋白。

单糖是多功能团分子, 通常具有 3 个或 4 个游离羟基。两个单糖通过糖苷键形成双糖时, 糖苷键可以连接在第二个糖的不同位置的羟基上 (例如 1→2, 1→3, 1→4 或 1→6), 糖苷键的连接还可以有不同的异头构型, α -或 β -构型。三个以上的单糖形成寡糖时, 情况更复杂。糖不仅有直链形式, 还可以有分支结构。因此, 糖链结构比蛋白质和核酸的结构复杂得多。相同单体数形成的寡糖比多肽具有更多的异构体 (表 4)。

由于糖链结构的复杂性, 使阐明一个寡糖结构比阐明同样大的肽的结构所需的数据多得多。阐明一个蛋白质的一级结构, 只要弄清它的氨基酸组成和顺序就可以了。而阐明一个寡糖结构, 不仅要弄清它的组成成分、糖的顺序, 还必须弄清连接每个糖基的糖苷键的性质 (是 1→2, 1→3, 1→4 或 1→6 糖苷键), α -或 β -构型, 以及糖链和肽链的连接方式。因此, 直到 70 年代初期, 寡糖的全结构分析还几乎是不可能的, 远远落后于蛋白质和核酸结构的研究。各种专一性的内切和外切糖苷酶的相继纯化和应用, 新技术的发展,

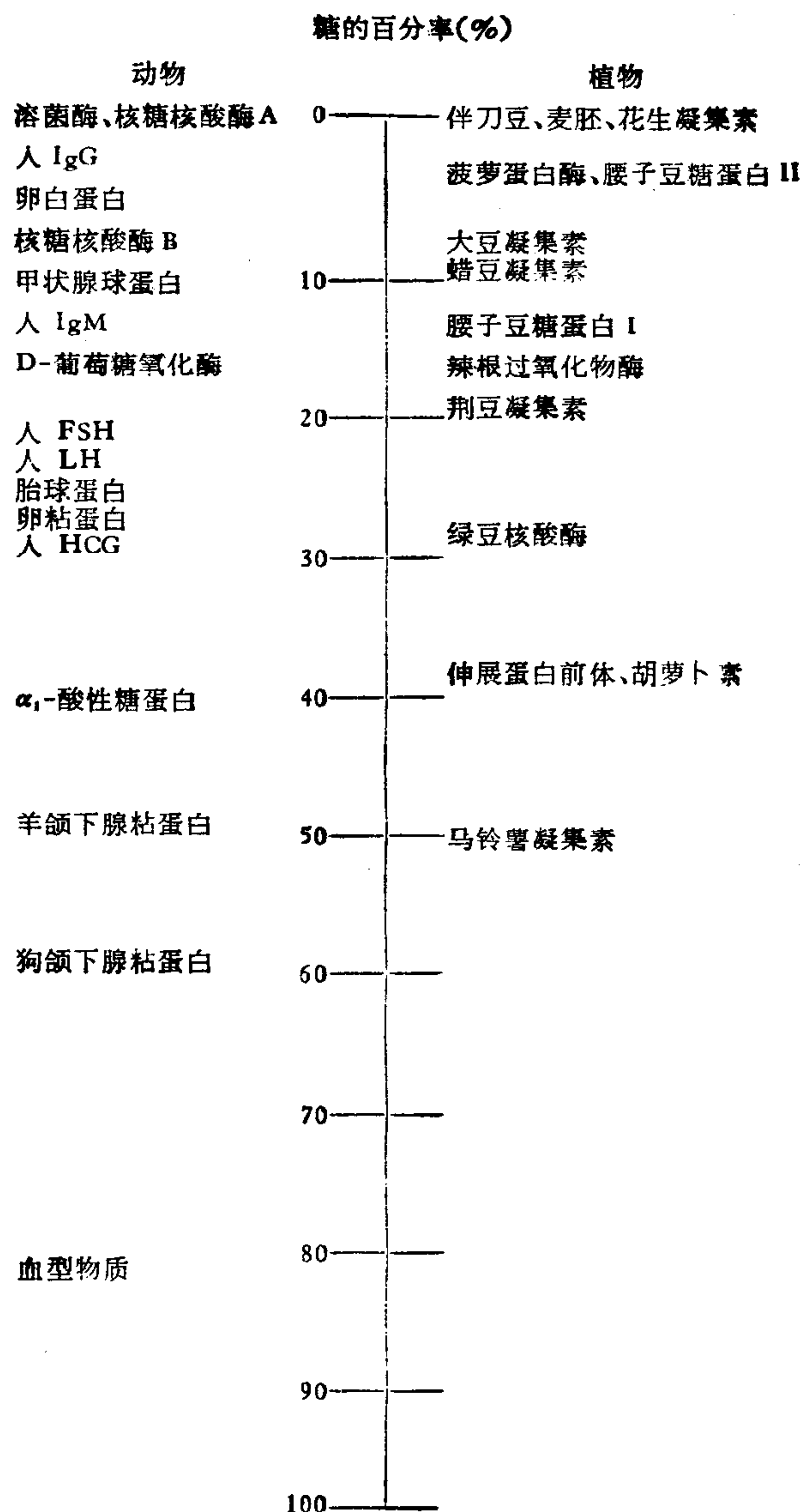


图 1 若干动物和植物糖蛋白的含糖量。

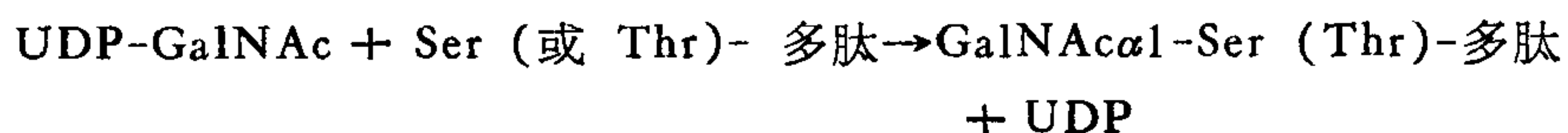
如质谱分析、核磁共振技术引入到糖的结构分析,以及改进解离糖蛋白中糖肽连接键的方法,和分离已释放的糖链的技术,特别是固定化凝集素的应用,使糖结构的确定,有显著进展。现在已可能用毫克量的糖蛋白,在较短时间内,完成其糖链结构的全分析,这样,糖链的结构分析不再是使人们棘手的难题了。

在阐明糖蛋白的生物合成方面,近十数年来也有很大进展。从 40 年代末,核苷酸糖类化合物以及它们在寡糖和聚糖形成中的供体作用的发现开始,随后是对糖基转移酶的研究,它们催化核苷酸糖分子中的糖基转移到糖蛋白和蛋白聚糖的反应。糖蛋白生物合成的主要进展是近十几年来事, Leloir 等发现连接单糖和寡糖的脂质载体,多萜醇磷酸脂,是装配糖蛋白中天冬酰胺连接的寡糖的中间体。蛋白质糖基化的专一性抑制剂,特

表 4 寡糖和寡肽异构体数的比较

单体组成	产 物	异 构 体 数 目	
		寡 肽	寡 糖
X_2	二聚体	1	11
X_3	三聚体	1	176
XY	二聚体	2	36
XYZ	三聚体	6	1 056

别是衣霉素 (tunicamycin) 的发现, 也大大促进这一领域的进展。糖蛋白中 O-糖苷键连接的糖链的形成, 在 Kornfeld、Robbins 和 Summers 几个实验室中首先阐明, 它们的起始阶段与天冬酰胺连接的寡糖的合成不同, 不需要中间体, 都是通过单一的途径, 即糖基转移酶的作用, 将单糖从核苷酸糖一个一个的转移到多肽链上去。因此, 所有粘蛋白型糖链生物合成的第一步是 GalNAc-Ser 或 GalNAc-Thr 基在多肽链上通过下列反应形成。



它们的糖基化作用不被衣霉素抑制。

随着人们对糖蛋白的分布、结构和生物合成的知识日渐增加, 更多的注意力集中到糖蛋白分子中糖基的功能。从某些情况看来, 它们的功能是已经清楚的, 如唾液粘蛋白的润滑功能与唾液酸的存在相关。其它一些糖蛋白中共价结合的糖起到稳定蛋白质、对抗变性剂和蛋白酶的作用。特别重要的功能是糖蛋白中特定的糖基可作为识别的标志, 它就非常有力地阐明了糖蛋白中的寡糖具有作为专一信息载体的能力。糖蛋白(和糖脂)的糖总是位于细胞的外表面, 这些糖作为某些病毒、细菌、激素、毒素和凝集素的受体起作用。此外, 膜糖蛋白(和糖脂)可能参与细胞的社交行为, 膜糖蛋白(和糖脂)的糖链可能影响细胞与细胞的相互作用。因此, 对生长、分化和恶变可能是重要的。细胞表面的糖蛋白(和糖脂)看来也和多种其它的生物现象有关, 例如细胞粘附和受精, 这些功能也都应归功于细胞表面糖蛋白(和糖脂)的寡糖部分。影响淋巴细胞的许多功能, 包括有机体中细胞有丝分裂原的激活作用, 细胞对毒素的反应和淋巴细胞归巢到靶器官, 也依赖某些细胞表面糖的存在。

现在人们认识到, 蛋白质非酶催化的糖基化作用在有机体内也存在, 这种糖基化的最有表征性的产物是血红蛋白 Alc, 它是在血红蛋白 A 的 β -链氨基末端缬氨酸上加上葡萄糖形成的。糖尿病患者的血红蛋白 Alc 和糖基化的血清白蛋白的水平有所升高, 提示对这些糖蛋白的定量测定, 可用来监视正常人和糖尿病患者的糖代谢。

第二章 研究糖蛋白结构的方法

一、糖蛋白的分离和纯化

总的说来,糖蛋白可用蛋白质化学中常用的一些技术来分离纯化,如盐析、离子交换层析、凝胶过滤、超离心等。然而,由于糖链是高度亲水的,糖蛋白(除组成膜的糖蛋白外)在水溶液中倾向于更易溶解,其结果是,用经典的蛋白质沉淀剂如硫酸铵等,并不总可以将含糖量丰富的糖蛋白沉淀。另一方面,糖蛋白的高度溶解性,在某些情况,对分离糖蛋白是有帮助的。例如 α_1 -酸性糖蛋白,它是血清糖蛋白中含糖量最丰富的(约45%),在三氯乙酸和高氯酸中是可溶解的。因此,很容易与其它大多数血清蛋白质和糖蛋白分开。某些糖蛋白中存在许多唾液酸、糖醛酸或硫酸基团,使它们带上高负电荷。这一特点,也被利用于分离糖蛋白,包括使用阴离子交换层析、电泳或用季铵盐与糖蛋白形成络合物,使其沉淀等方法。

除改变蛋白质的溶解度和电荷外,糖亦影响蛋白质的密度。因为糖分子比氨基酸重约15%,用氯化铯密度梯度离心,可使富含糖的糖蛋白与一般蛋白质分开。

(一) 用固定化凝集素为亲和吸附剂

近年来,根据凝集素能专一地、可逆地与游离的和复合糖类中的单糖或寡糖结合的性质,利用固定化凝集素亲和层析作为分离纯化糖蛋白的手段。这一方法,简单易行,在温和条件下进行,不破坏糖蛋白的活性,通常得率也高。

一个生物聚合物,能专一地与一个凝集素作用,可作为该聚合物含糖的证据。酵母转化酶是糖蛋白的证据,最初是用 ConA 获得的,人淋巴细胞 HL-A 抗原与固定化扁豆凝集素(简称 LCA) 柱的结合,证明 HL-A 是糖基化的,用同样方法,也获得了脯氨酰羟化酶是糖蛋白的最初证据。

凝集素亲和层析既可用于水溶性糖蛋白的分离纯化,也可用于细胞膜糖蛋白的分离纯化。ConA 与甘露糖核心专一作用,所有与天冬酰胺连接的寡糖都含有甘露糖基。因此,固定化的 ConA 是最普遍地应用的固定化凝集素。各种含糖的酶如 α -和 β -半乳糖苷酶等,含糖的多肽激素如 HCG、FSH 等,多种抗原如甲种胎儿蛋白(AFP)、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的多肽片段等,凝集素如大豆凝集素(简称 SBA)等,干扰素、血清蛋白等等,都可用固定化 ConA 分离纯化(表5)。

由于膜糖蛋白的穿膜部分的疏水性,使膜糖蛋白不溶于水,所以它们的纯化需要在去垢剂存在的情况下进行。去垢剂的选择必须考虑两个方面的因素。一方面,所使用的去垢剂,要尽可能将膜上的糖蛋白完全增溶下来;另一方面,又要不破坏糖蛋白的构象和生物活性,也要不降低或破坏凝集素的结合活性。十二烷基硫酸钠(简称 SDS)是一种强极性的去垢剂,增溶效率很好,但并不适用于凝集素亲和层析,因为它能使凝集素分子解离

表 5 固定化伴刀豆凝集素纯化的水溶性糖蛋白

糖 蛋 白	来 源
α -N-乙酰氨基半乳糖苷酶	猪肝
β -N-乙酰氨基己糖苷酶	人尿
α -抗胰蛋白酶	人血清
绒毛膜促性腺激素	人尿
多巴胺 β -羟化酶	牛肾上腺
α -胎儿蛋白	人脐带血
α -半乳糖苷酶	人胎盘
β -半乳糖苷酶	人肝
α -甘露糖苷酶	人肝
过氧化物酶	辣根
核糖核酸酶 B	牛胰
大豆凝集素	大豆种子
HBsAg 表面抗原多肽	人血清
干扰素	人血清

表 6 去垢剂对固定化凝集素结合糖蛋白的影响

去垢剂(%)	相对结合效应(%)				
	RCA	PNA	SBA	ConA	WGA
Nonidet P-40					
0.1	100	103	100	88	95
1.0	98	87	100	78	90
2.5	100	92	102	80	92
Triton X-100					
0.1	105	92	100	85	90
1.0	105	90	100	76	76
2.5	100	90	99	74	79
二甲基十二烷基甘氨酸					
0.1	100	103	84	54	108
1.0	98	110	48	53	104
2.5	100	107	37	50	100
去氧胆酸盐					
0.1	100	90	53	60	85
1.0	102	85	34	46	39
2.5	105	37	10	20	10
十二烷基三甲基溴化铵					
0.1	100	107	78	53	104
1.0	100	105	57	59	107
2.5	100	93	36	45	98
十二烷基硫酸钠(SDS)					
0.05	100	82	22	70	89
0.1	70	64	11	26	13

摘自 Lotan, R. & Nicolson, G. L., 1979, *Biochim. Biophys. Acta*, 559, pp.329—376。

成亚基,或使之变性,或两者兼有之,从而降低或者完全破坏固定化凝集素的活性。非离子去垢剂,例如 Triton X-100、Nonidet P-40 (简称 NP-40)、Lubrol 等等,抽提膜

表 7 固定化凝集素纯化的膜糖蛋白

纯化的物质	膜的来源	固定化凝集素
血型糖蛋白	人红细胞	WGA
去唾液酸血型糖蛋白	唾液酸酶处理的人红细胞	PNA
去唾液酸 glycolalicin	唾液酸酶处理的人血小板	PNA
多肽 3	人红细胞	ConA
多肽 3+ 血型糖蛋白	人红细胞	LCA
血型糖蛋白	人红细胞	WGA
癌胚抗原	人结肠腺癌	ConA, RCA
		WGA
主要表面糖蛋白	人血小板	ConA
人淋巴细胞抗原	人淋巴细胞株	LCA
人组织相容抗原	淋巴母细胞	LCA
5'-核苷酸酶	猪淋巴细胞	LCA
层粘连蛋白 (Laminin)	小鼠肉瘤	BSLI
视紫红质	牛视网膜	ConA
Thy-1	小鼠胸腺	ConA
	人和猫脑	LCA
蓖麻毒素受体	小鼠 BW5147 淋巴瘤	RCA
乙酰胆碱受体	大鼠脑	LCA, RCA, WGA, 欧洲百脉根
病毒糖蛋白	有荚膜的病毒(流感病毒, 仙台病毒)	LCA

糖蛋白的效率虽然稍差,但它们对固定化凝集素结合糖的活性没有显著影响。因此,绝大多数情况,都采用非极性去垢剂增溶膜糖蛋白。由于各种去垢剂对各种凝集素的影响不同(表 6),在选择去垢剂时,考虑增溶效率的同时,也应注意到采用哪一种固定化凝集素作亲和吸附剂。固定化凝集素纯化膜糖蛋白的例子见表 7。

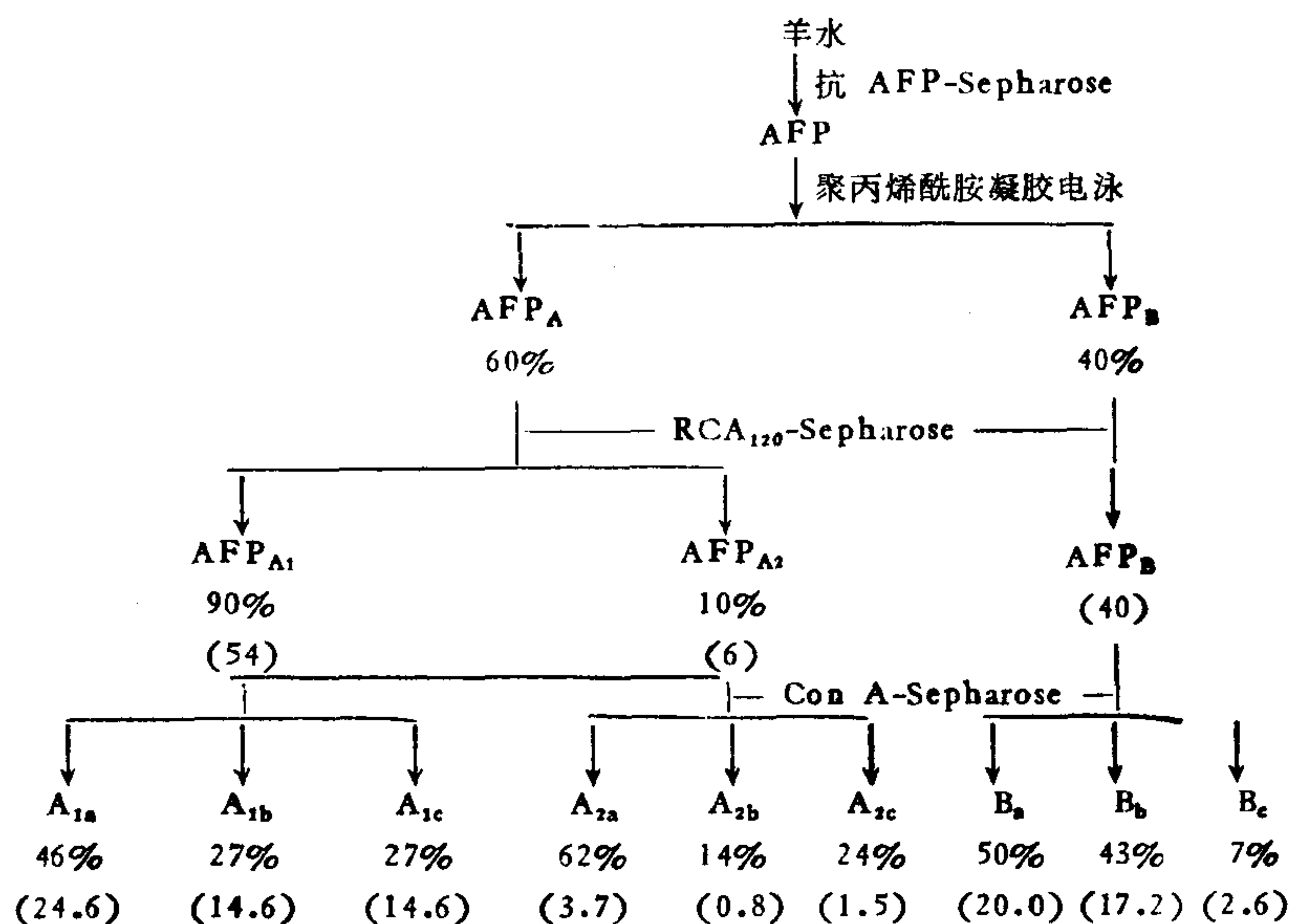


图 2 大鼠羊水 9 种 AFP 变种的分离及每一分离步骤各变种之间量的关系的图解。

(摘自 Bayard, B. & Kerchaert, J. P., 1977, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77, 489)

凝集素亲和层析作为一种从非糖基化的生物大分子中分离糖蛋白(和糖脂)的手段,是很成功的,也是能普遍应用的。用于分离二种或几种仅在糖组成,或糖链结构有微小差别的糖蛋白或糖肽,虽也很有成效,但应用范围有限,不可能很普遍。以下几个例子,是用固定化凝集素亲和层析分离糖链结构有微小差别的糖蛋白。胎牛血清和大鼠羊水的 AFP 的分子变种,已经用 ConA-Sepharose 层析分开,亦可用蓖麻凝集素(简称 RCA₁ 或 RCA₁₂₀)-Sepharose 分离大鼠羊水的 AFP 变种(图 2)。用 ConA-Sepharose 层析,可将双花扁豆凝集素(简称 DBA)的两种同工凝集素分开。它们的糖专一性相同。固定化 ConA 亦用于分离西门利启森林病毒(Semliki forest virus)的穿膜糖蛋白 E₁ 和 E₂。胎球蛋白和铜蓝蛋白在固定化 RCA₁ 柱上层析,揭示这种制剂中存在小量的、但值得重视的失去唾液酸的部分糖蛋白。

(二) 应用预标记技术

分离纯化膜糖蛋白,采用的另一种技术,是选择性地标记细胞膜上的糖蛋白,称之为预标记。预标记技术是很有用的,能够对一个糖蛋白在细胞膜上的位置提供直接的证据,并能在分离纯化过程中,作为检测该糖蛋白的跟踪标记。一种预标记的方法,是用半乳糖氧化酶氧化糖链非还原末端的半乳糖基(和 N-乙酰氨基半乳糖基)上第 6 位碳(C-6)的游离羟基,使它变为醛基。然后用氚标记的硼氢化钠(NaB³H₄)还原,这一醛基,又立即还原为羟基。这时,第 6 位碳上就参入了氚。而且因为半乳糖氧化酶的分子量约为 75,000,它不能透过细胞质膜。因此,只有位于细胞质膜外表面的糖蛋白上的半乳糖基才能为氚标记。这就可以与细胞内的可溶性糖蛋白、细胞器膜上及细胞器内的糖蛋白区分开来。用这一方法标记的人红细胞膜,在聚丙烯酰胺凝胶电泳上显示 20 条放射性带,而同样的凝胶用常规的过碘酸-Schiff 试剂(PAS)染色,只显示 5 条糖蛋白带(细胞上其它组分与 NaB³H₄ 作用导致的假象,先用非标记的 NaBH₄ 处理细胞可以避免)。

另一种方法是标记唾液酸,用过碘酸钠温和处理,使唾液酸 C-7, C-8, C-9 之间的键断裂,导致产生一个 C-7 位的醛,然后用氚标记的 NaB³H₄ 还原,这时 C-7 位参入放射性氚。也可先用唾液酸酶处理细胞,除去末端的唾液酸基,暴露出半乳糖,然后再用半乳糖氧化酶氧化。

另外,也有在细胞培养液里加入 [¹⁴C]L-岩藻糖来标记细胞,但是这种方法不是专一标记细胞表面糖蛋白的。

二、物理化学性质的研究

在对纯化的糖蛋白进行物理化学性质的研究中,分子的均一性问题的最先是和首要的。虽然蛋白质本身通常是单分散的(monodisperse),但是对糖蛋白来说,情况不总是这样。糖蛋白经常显示分子不均一性,典型的例子是富含糖的血型物质,它的分子量在 3×10^5 到 10×10^5 之间变化。天然的酵母转化酶,约含 50% 的糖,在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上形成一条扩散的宽带,表观分子量在 90000—160000 之间,不可能确切地估计该酶的大小或亚基结构。人红细胞膜上的第三带蛋白是又一个例子,它在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳上显示一条宽的带。有日益增多的证据表明,糖蛋白在电泳上显示扩散的带

是由于它所含寡糖的不均一性引起的。用蛋白水解酶将第三带蛋白上的糖基化肽段切去后,剩下的一个大的蛋白质片段,在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳上显示一条边缘清晰的紧密的蛋白质带,而切下的那段糖基化的肽段在 SDS 凝胶电泳上的蛋白质带,比完整的第三带蛋白更扩散。用内切- β -半乳糖苷酶处理红细胞也能使第三带蛋白在凝胶电泳上显示一条紧密的染色带。由羊水细胞合成的纤维粘连蛋白在 SDS 凝胶电泳上也显示宽松的蛋白质带。用不同的方法分别标记多肽主链和糖链,结果清楚地表明不均一性存在于分子的糖链部分。

测定糖蛋白分子量经常遇到很大的困难,即使在不发生多分散性 (polydispersity) 的情况下也如此。含糖量高的糖蛋白在凝胶过滤和凝胶电泳时的行为都是反常的。对于绝大多数球状蛋白来说,它们在葡聚糖凝胶 (Sephadex) 柱上的洗脱体积和它们的分子量对数之间存在线性关系。而糖蛋白,例如胎球蛋白、卵粘蛋白和甲状腺球蛋白等,并不遵循这一关系。这是由于糖链的存在而引起的,由于糖的亲水性,在溶液中更大程度的水合作用,导致糖蛋白比相同分子量的一般蛋白质有更大膨胀的结构。

在 SDS 凝胶电泳时,含糖量高的糖蛋白的迁移率比根据它们的分子量所预算的要低,换言之,当用 SDS 凝胶测定未知糖蛋白的分子量时,其结果往往偏高。人红细胞质膜的主要唾液酸糖蛋白——血型糖蛋白,含 60% 的糖,包括 23% 唾液酸,它的表观分子量是 39000 (在 7.5% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳),除去唾液酸后的血型糖蛋白的表观分子量更大,为 41000。而实际分子量分别为 31000 和 24000。糖蛋白电泳迁移率低是由于它们结合的 SDS 的量比不含糖的同类蛋白质少。例如含糖 84% 的可溶性血型糖蛋白结合 SDS 的量是 1.0 克/1 克多肽,而不含糖的蛋白质结合 SDS 的量为 1.4 克/1 克多肽。再则,用凝胶电泳测得的糖蛋白的分子量,受凝胶浓度和交联度的影响。例如人红细胞质膜的一个主要糖蛋白的表观分子量,用 5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳测定时为 92000,而用 12.5% 的凝胶测定时为 55000。有人认为采用高浓度 (至少 10%) 和高交联度的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,可获得较为正确的糖蛋白的表观分子量。在这种条件下测得的 α_1 -酸性糖蛋白 (含糖量 41%) 的表观分子量为 45,000,比较接近它的实际分子量 40000。

在测定含糖量高的糖蛋白的分子量时,另一个困难是往往发生非共价的相互作用。这种相互作用导致分子间复合物的形成。正如羊颌下腺粘蛋白所表现的那样,会形成大的凝聚体,分子量从 0.5×10^6 到 1.0×10^6 ,羊颌下腺蛋白含糖约 63%。

用超离心测定的糖蛋白分子量值,通常也是不正确的,这不仅是因为这种分子间的结合,而且还因为计算分子量所根据的微分比容 (partial specific volume) 没有实验测定数据。由于测定微分比容需要相当大量的样品,因此,常按氨基酸和糖组成估计糖蛋白的微分比容。但这种估计数值与实验测得的微分比容值有较大差异。

三、糖链结构分析

为在分子基础上阐明细胞表面的识别现象,糖蛋白 (和糖脂) 特别是糖链部分结构的信息是不可少的 (表 8)。由于在这一领域技术上的不完备,1975 年以前,获得的糖蛋白的糖链结构信息是零散的和不完全的。