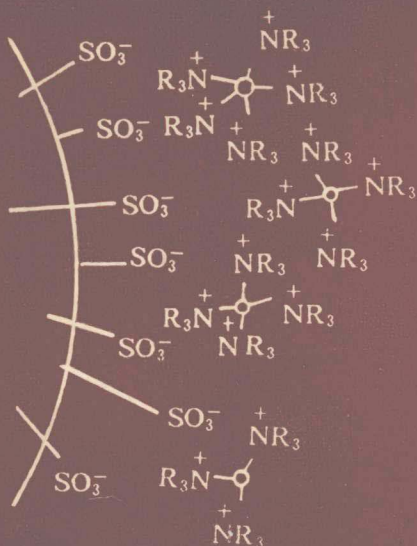
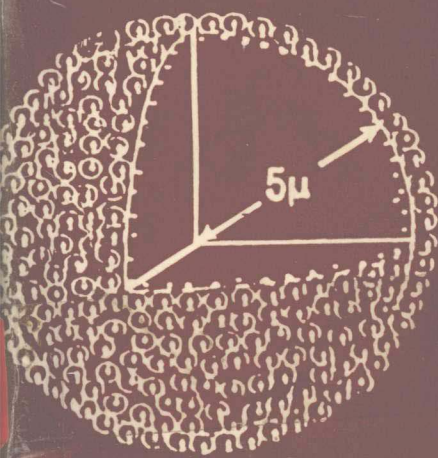


糖复合物生化研究技术

主编 张惟杰

浙江大学出版社



糖复合物生化研究技术

主编

张杰

书



浙江大学出版社

(浙)新登字 10 号

糖复合物生化研究技术

主编 张惟杰

责任编辑 李玲如

* * *

浙江大学出版社出版

浙江大学出版社计算机中心电脑排版

德清第二印刷厂印刷

浙江省新华书店发行

* * *

850×1168 32开 24印张 646千字

1994年10月第1版 1994年10月第1次印刷

印数: 0001—1000

ISBN 7-308-01272-7/Q · 005

价: 13.50元

本书作者名录

中国科学院化学研究所

于海妮 何慧珠 郑 革 杨其民 竺 安 贺玉珍
余兆楼 常理文 腰锐锋 陈 义

中国科学院微生物研究所

戈苏国 王俊英 那 安 张树政 钱世钧
曾宇成 韩文珍

中国科学院生态环境中心

王相明 孙思恩 陆德培 吴昌贤 李荣春 黄克武
蒋挺大 裴雅群

中国科学院青岛海洋研究所

史升跃 纪明侯 张燕霞

中国科学院上海生物化学研究所

王克夷 孙 册

中国科学院上海有机化学研究所

王来曦 田庚元 冯宇澄

中国科学院上海药物研究所

方积年

中国医学科学院心血管病研究所

张英珊

中国医学科学院血液学研究所

林大锡

中国预防医学中心卫生研究所

刘秉慈 李玉瑞 陈宁蒙 余 兰

中医研究院中药研究所

李铁林

天津市医药科学研究所

樊绘曾

中国人民解放军军事医学科学院

马立人 刘耀清 孙仲诏 陈戟兰 骆传环

耿俊贤 王秉伋 董俊兴

中国人民解放军第二军医大学

张世民

上海医科大学

徐大顺 顾天爵

大连医学院

朱正美

东北师范大学

李润秋 张翼仲

安徽大学

王 靖 张郢昌 张林维 吴东儒

武汉大学

赵永芳

山东大学

毛存贵 张玉臻 陈冠军 曲音波 高培基

中国科学院图书馆

张树庸

编者的话

在全国第一次糖的生化学术会议(1982,青岛)后,我受命集合大家的力量编一本糖生化研究方法的书。经过几年努力,《复合多糖生化研究技术》于1987年问世。第一次印刷印2400册。1990年前后,各位作者收到索书的函件逐渐多起来,作者们手头的一、二本也被要去,有的地方甚至不得不复印一批,以满足本单位教学与科研的需要。这些情况反映出,在世界范围内对糖生物学(Glycobiology)的热度不断上升的影响下,我国糖的研究在不断发展。以糖为研究重点的实验室和课题在不断增加,参与或涉及糖研究的研究人员和研究生人数大为扩展,高等院校中也增设了糖方面的讲授与实验课程。因此,有必要把编写糖生化研究方法的书的工作继续下去。

现在放在大家面前的《糖复合物生化研究技术》一书,由于内容和作者队伍都有较大的扩充,也由于书名和出版社的变更,可以把它看做是第一本书的增扩再版,也可以把它看做是一本新书。一本书和任何一事物一样,都应有自身的历史。因此,除了请惠永正教授写前言外,仍保留了在第一本书中,张龙翔教授所写的前言和沈昭文教授所写的后记。

有一点是两本书相同的和未变的,那就是编辑的宗旨。糖的研究方法进展很快,在目前这本书里,仍不是求全,而是力求其可靠性与可行性。仍是请国内从事某一技术方法较多的作者或实验室,把自己

亲手做过的,可以得到相应结果的方法写出来,构成本书的主体内容。适当扩充的一些方法内容,其作者也许并未亲自做过,但肯定对这个方面比较熟悉,有一定的权威或把握。

同样,作为一本方法书,正确无误是理所当然的,但仍可能出错,对我很有临渊履冰之忧,只有恳请同行和读者不吝指出,以便在以后可能的机会中改正。

本书的出版,承袁士龙同志给予大力支持,于昕、许正平两同志在校对中给予帮助,谨向他们致以谢意。

张惟杰

于 1994 年 9 月 1 日

前 言

糖类的研究经过一个相对寂静时期以后,近二十多年来又活跃起来了。过去认为糖类在生物体内的作用主要是作为能量资源,例如动物体内储存的糖元和植物体内储存的淀粉;或者是作为结构材料,例如植物细胞的纤维素等。近来由于多糖以及糖结合物的分离、纯化、组分测定和结构分析有了长足的进步,同时由于对糖类的生物学功能有了新的认识,例如糖结合物在细胞识别、细胞间物质运输和对免疫功能的调节等方面的作用,因此关于糖类研究又引起人们的重视。

糖类的研究工作和蛋白质、核酸的研究工作相比,在我国还是一个薄弱的环节。1982年中国生物化学会在青岛召开了第一次糖的生化学术会议。在会议上,五十多篇论文的报告和讨论反映了我国目前糖的生化研究方面的成就,也说明我国这方面的研究工作已经有了一个较好的开端。这次学术会议对于糖类研究工作的开展,无疑将会起推动作用。本书是这次学术会议建议编写的一本关于糖化学和生化研究的工具书。生物化学研究工作的开展,在很大程度上取决于实验方法和研究技术的掌握。参加本书编写工作的作者都是在糖类领域里从事研究的生化工作者,具有第一手的经验。列入本书的实验研究方法,大多数是作者在自己实验室做过的。这本工具书的出版,将会起到交流各自经验和心得的作用;对于准备参加糖类生化研究的

新手来说,也可以收到事半功倍的效果。

本书在总论中介绍糖类的分离、测定、结构分析的常用方法,也包括近年发展起来的气相色谱、高效液相色谱、质谱、红外光谱、核磁共振等新方法。一些糖苷酶类和结构分析用的工具酶的分离纯化方法也在总论中作了介绍。在各论中,介绍真菌、酵母等微生物多糖,植物多糖,褐藻、红藻、海带等海藻多糖,以及蛋白聚糖、神经鞘糖脂、凝集素等的分离、纯化、鉴定等研究方法。各论中列举的材料,大都是我国产的多糖和糖结合物。为了读者方便,本书最后还对糖类生化的文献作了简单介绍。

我国地大物博,糖类资源也很丰富,而且有些真菌多糖还对生物体具有独特的生理作用,可以作为药用资源。随着社会主义现代化建设的开创,各个地区和海洋资源的开发,糖类研究必将越来越受到人们的重视。希望这本工具书的问世,能加速我国糖类基础和应用研究的发展,为社会主义现代化建设服务。

张龙翔

于 1987 年

序 言

蛋白质、核酸和多(寡)糖是最重要的三种生物大分子。蛋白质和核酸在生命现象中的重要性为世人所知,以基因重组为代表的生物工程已经并将大大地造福于人类社会。在迎接生命科学作为领头科学的新世纪来临之际,我们不能不再次重申:正是由于蛋白质和核酸化学,包括分析、测序、合成和结构诸方面研究的成熟带动了在分子水平上研究生命现象的时代的出现。在这些领域中涌现出多个诺贝尔化学奖获得者即是一个强有力的佐证。

碳水化合物在结构上不同寻常的复杂性再次引起了人们对它的兴趣。与只能以一种途径相互联结的核苷酸和氨基酸不同,单糖可在多个羟基上以二种可能的构型相连成寡糖和多糖,这样,四种不同的核苷酸或氨基酸连结只能够构成 24 种不同的四核苷酸和四肽,但四种不同的单糖,理论上即能形成 35560 种四糖。结构多样性引起的复杂性虽然给糖化学家的工作带来了巨大困难,但也使寡糖成为最有魅力的信息载体。生物进化的无数事实使我们感觉到自然界似乎不会浪费如此巨大的信息资源,问题是迄今我们还未对其功能认识清楚而已。可肯定的是在生命体系中,糖不会仅仅作为一种结构材料或能量贮源,一定会具有可与核酸或蛋白质比拟的信息功能。确实,近 10 年来涉及糖的生物学研究已使这一重大前景初露端倪。例如,不断积累的证据表明糖及其缀合物是细胞识别的主要标记物,对特定

的糖类参与细胞识别的基础研究,在预防和治疗包括癌症在内的多种疾病将有巨大的应用潜力。无可置疑,如同蛋白质和核酸一样,糖的重要生物功能的全貌必将随着糖化学的成熟而逐步明朗,从而带动分子生物学的另一场突破。

目前,在糖化学中包括顺序测定的分析技术、合成方法学和空间结构技术等研究方法,从总体上讲还只相当于六七十年代核酸和蛋白质研究的水平。在核酸和蛋白质研究中起重要作用的高效的序列分析,固相自动合成和依靠 X 衍射方法的空间结构分析等,对糖化学来讲,还是一个在远处呼唤的期待。蛋白质和核酸的科学史证明了理论上的突破(如双螺旋概念)离不开方法和手段上的创新(如固相合成法),两者汇合在一起才能造成一个新的时代。

“工欲善其事,必先利其器”。建立系统完善的糖化学研究方法已成为有志于攀登糖研究高峰的科学家,特别是青年科学家追求的目标。本书从几个方面介绍糖的生化分析的目前进展和各种已建立的方法和技术,不失为一本有价值的参考书。我衷心希望在我国有更多的同行,特别是青年人勇敢进入这个具有高度挑战性领域,为科学的发展和人类进步作出贡献。

国家科委副主任 惠永正 教授

1993 年 8 月 12 日于北京

目 录

第一章 绪论	1
第二章 糖的分离和分析	8
一、糖的定量测定	8
(一) 中性糖的测定	12
1. 还原糖的次亚碘酸盐定量法	12
2. 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法	13
3. Somogyi-Nelson 法	14
4. 苯酚-硫酸法	16
5. 蒽酮-硫酸法	17
6. 地衣酚-硫酸法	18
7. 戊糖的测定(地衣酚法)	19
8. 己糖和 6-脱氧己糖的比色测定	20
9. 葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖	21
(二) 氨基己糖的测定	23
1. 氨基己糖的比色测定	23
2. N-乙酰氨基己糖的比色测定	25
3. 用 Ehrlich 试剂测定氨基糖	26
(三) 己糖醛酸的测定	30
1. 己糖醛酸的比色测定	30

二. 糖的色谱法	31
(一) 糖的纸色谱	31
1. 单糖和双糖的纸色谱	31
2. 寡糖和多糖的纸色谱	39
3. 多羟基醇的纸色谱	40
4. 糖酸的纸色谱	41
5. 氨基糖的纸色谱	42
6. 糖内酯的纸色谱	42
7. 糖磷酸酯的纸色谱	43
(二) 糖的柱色谱	46
1. 糖的活性炭柱分离	46
2. 蜂蜜中寡糖的炭柱分级法	48
3. 糖的离子色谱法分析	49
(三) 糖的气相色谱	57
1. 糖的三甲基硅醚衍生物	58
2. 糖腈乙酸酯衍生物	60
3. 糖醇乙酸酯衍生物	63
4. 糖的三氟乙酸酯衍生物	65
5. 果糖和葡萄糖或甘露糖共存时的气相色谱定量法	67
6. 气相色谱同时测定醛糖与糖醛酸	69
7. 气相色谱用于微量多糖与寡糖成分分析	71
(四) 糖的高效液相色谱	74
1. 单糖和双糖的分析	76
2. 寡糖的分离和测定	83
3. 糖脂全苯甲酸酯紫外标记法分离 和测定微量单糖和双糖	89
4. 脉冲安培检测法(HPAEC-PAD)用于单糖和寡糖的分析	90
5. 神经节苷脂的高效液相色谱分析(HPLC)	100
(五) 糖的薄层色谱	102
三. 糖的电泳法	105

1. 红细胞膜上唾液酸的等速电泳	106
2. 多糖的滤纸电泳	108
3. 多糖的玻璃纤维纸电泳	110
4. 多糖的醋酸纤维薄膜电泳	111
5. 多糖的凝胶电泳	112
6. 单糖的高效毛细管电泳	113
7. 糖蛋白的高效毛细管电泳	116
8. 酸性多糖与寡糖的等电聚焦和聚丙烯酰胺凝胶电泳	120
四、糖复合物中其它成分的测定	122
1. 糖复合物中乙酰基的测定	122
2. 糖复合物中硫酸基的测定	124
第三章 复合糖化物的物化性质	126
一、多糖的纯度鉴定	128
1. 比旋度法	128
2. 超离心法	129
3. 高压电泳法	129
4. 凝胶过滤法	131
二、复合糖化物分子量的测定	133
1. 测定多糖分子量的方法原则	133
2. 渗透压法测定多糖分子量	138
3. 蒸气压法测定多糖分子量	141
4. 端基法测定多糖分子量	143
5. 光散射法测定多糖分子量	148
6. 粘度法测定多糖分子量	155
7. 高效液相色谱法测定多糖分子量(1)	158
8. 高效液相色谱法测定多糖分子量(2)	166
9. 超过滤法及其在多糖化学研究中的应用	170
10. 凝胶过滤法测定糖蛋白与糖肽的分子量	180
第四章 糖链结构分析方法	183

一、从糖蛋白分离糖链或糖肽	184
1. O-糖苷键的稀碱水解(β -消除反应)	184
2. N-糖苷键的胍解法	186
3. N-糖苷键的三氟乙酸水解法	189
4. 多糖的部分酸水解	191
5. 糖蛋白与糖肽的部分酸水解	194
6. 从卵清蛋白制备糖肽	196
7. 酶解法从糖蛋白释放糖链	199
二、用于结构研究的化学方法	202
1. 高碘酸氧化	202
2. Smith 降解	204
3. 甲基化反应(改良 Hakomori 法)	206
4. 甲基化反应(硫酸二甲酯法)	209
5. 多糖中乙酰基的定位	211
三、糖苷酶在结构分析中的应用和其它	213
1. 胍解法释放牛凝血酶原寡糖的顺序测定	224
2. β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶-H(Endo-H)的分离纯化	225
3. β -甘露糖苷酶的分离纯化	229
4. 一种能分解琥珀酸型聚糖的内切酶的分离纯化	231
5. 从土壤细菌中初步分离 α -甘露糖苷酶和 $\alpha(1\rightarrow6)$ 甘露聚糖内切酶	233
6. 枯草杆菌 α -淀粉酶的分离纯化	237
7. 红色红曲霉 α -葡萄糖苷酶的分离纯化	240
8. 茁霉多糖酶的分离纯化	244
9. 多聚半乳糖醛酸内切酶的分离纯化	247
10. 几丁质酶的分离纯化	249
11. 菊糖酶的分离纯化	252
12. 真菌纤维素酶系的分离纯化	255
13. 木聚糖酶系的分离纯化	259

14. 糖苷酶的固定化	261
15. 硝基苯酚糖苷化合物的有机合成	262
四、用于糖链结构分析的仪器分析方法	271
1. 糖的红外光谱法	271
2. 糖的拉曼光谱法	279
3. 糖的质谱法	284
4. 全乙酰化低聚木糖的质谱研究	287
5. 全苄基化缩水内醚糖的质谱研究	292
6. 色质联用进行低聚糖的结构序列分析	303
7. 质谱法测定痕量的完整寡糖	307
8. 神经节苷脂的快原子质谱结构分析	318
9. ^1H 和 ^{13}C 核磁共振光谱在多糖上的应用	324
五、糖链结构研究中的免疫学方法	340
1. 抗原的制备	340
2. 抗血清的制备	346
3. 抗血清的处理和纯化	347
4. 效价的测定和糖结构分析	348
第五章 糖复合物的其它研究方法	355
一、同位素标记在糖复合物微量分析中的应用	355
二、拟糖蛋白 (Neoglycoproteins) 的合成和应用	358
(一) 糖与蛋白质形成共价联接的方法	361
1. 重氮盐偶合法	361
2. 重氮偶联法	363
3. 异硫腈酸酯法	364
4. 异硫氰酸苯基- α -L-岩藻糖苷和 BSA 的偶联	366
5. 还原胺化法合成拟糖蛋白	368
6. 寡糖天冬酰胺经茚三酮激活后用还原胺化法和蛋白质偶联	370
7. 还原胺化法偶联糖蛋白和蛋白质	372
8. 还原氨基化方法	374

9. 活化酰基化方法	375
10. 糖肽与蛋白质的偶联	376
11. 双功能试剂交联法合成拟糖蛋白(1)	379
12. 双功能试剂交联法合成拟糖蛋白(2)	380
13. 脲化法合成拟糖蛋白	380
(二) 水不溶性糖类载体和蛋白质的偶联	
——以糖类成分为基质的蛋白质和酶的固定化	386
1. 溴化氰活化法	387
2. 重氮法	388
3. 用双环氧试剂的交联法	390
(三) 拟糖蛋白的应用	391
1. 用于糖结合蛋白的分离和鉴定	391
2. 作为组织化学的标记物	393
三、多糖的化学修饰	394
(一) 非选择性化学修饰	395
1. 酯化	395
2. 甲基化	400
3. O-羧甲基化, O-羧甲基纤维素钠的制备	402
(二) 选择性化学修饰	403
1. 伯羟基的酯化	403
2. 伯羟基的醚化	405
3. 伯羟基的氧化	407
4. 仲羟基的氧化	409
5. 羧基的还原	410
6. 羧基的酰化	411
7. N-酰化	412
(三) 末端基团的修饰	413
第六章 多 糖	416
一、植物多糖	416