

糖蛋白

作者：有故事的人 来源：范文网 www.wtabcd.cn/fanwen/

本文原地址：<https://www.wtabcd.cn/zhishi/a/16785235138217.html>

范文网，为你加油喝彩！

京剧常识-车辆租赁协议模板



学问靠点滴积累，聪明靠思考练就；
博学靠学习成就，创造靠实践成功。

2023年3月11日发(作者：目标程序)

糖蛋白的结构、功能及分析方法

武金霞 赵晓瑜

(河北大学生命科学学院,保定071002)

摘要:综述了糖蛋白研究的重要意义、糖肽键的主要类型、糖链的主要类型、糖蛋白结构研究的一般策略

及结构分析的最新进展。

关键词: 糖蛋白 糖链 结构分析

StructureFunctionandAnalysisMethodsofGlycoprotein

WuJinxia ZhaoXiaoyu

(CollegeofLifeScienceHebeiUniversity,Baoding071002)

Abstract: In this paper, the importance of glycoprotein research, the types of glyco-peptide bonds, the types of oligosaccharides chain, the general methods of glycoprotein structure research, and the progress of analysis methods in this field were summarized.

Keywords: Glycoprotein Oligosaccharide Structureanalysis

1 糖蛋白的重要作用

糖蛋白(glycoprotein)是指由比较短,往往带分

支的寡糖与多肽链某些特殊部位的羟基或酰氨基共

价连接而成的一类结合蛋白质。细胞中的糖蛋白有

可溶性的,也有与膜结合的不溶形式,生物体内大多

数蛋白质是糖蛋白[1]。糖蛋白中蛋白质是生理功能的主要承担者,糖链对蛋白质的功能起修饰作用,即糖链影响蛋白质的整体构象,影响蛋白质的折叠、溶解度、半衰期、抗原性及生物活性等,糖链与蛋白质的相互作用介导细胞的专一性识别和调控各种生命过程如:受精、发生、发育、分化、神经系统、免疫系统恒态的维持等,在炎症及自身免疫疾病、老化、癌细胞异常增殖及转移、病原体感染等过程中起重要作用

[2,3]。

糖链的合成并不是依据模板的复制过程,而是包含了糖基的供体、糖基的受体、糖基转移酶及糖苷酶等因素在内的复杂过程,除受酶基因表达的调控外,还受酶活性的影响,即便在同种分子的同一糖基化位点上,糖链的结构也有差异,即糖链有微不均一

性,这种不均一性反映了组织、细胞类型、发育和分

化阶段的不同,因此对糖链的结构及生物学作用只

能逐个的分别研究(casebycase)。糖链结构测定

和化学合成也远比核酸和蛋白质要困难,各国科学

家都在致力于糖链结构分析和合成方法学上的突

破,为糖链的功能分析提供技术支持。继功能基因

组学(functionalgenomics)和蛋白质组学(pro-

teomics)研究之后,糖组学(glycomics)正在成为全面

揭示生命本质所不可缺少的内容。

2 糖肽键类型

在糖蛋白的高级结构中,肽链折叠卷曲成特定

的空间结构,肽链上只有某些特殊的氨基酸序列位

点才能与糖链结合,糖链作为侧链和亲水基团暴露

在空间结构外面。

糖肽键是糖链和肽链的连接键,是指糖基异头

碳原子上的羟基与肽链氨基酸残基上的酰胺基或羟

基脱水形成的糖苷键。可分为N-糖苷键和O-糖苷键两大类。参与糖肽键的氨基酸残基主要有:天冬酰胺(Asn)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、羟赖氨酸(Hyl)和羟脯氨酸(Hyp)。它们可以与N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、木糖、半乳糖及阿拉伯糖形

基金项目:河北大学自然科学基金及河北省生物工程重点学科

作者简介:武金霞,女(1966-),河北大学副教授,主要从事生物化学及分子生物学方向研究

生物技术通报

· 技术与方法 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2004年第1期

成5种主要的糖肽键,分别是: -N-乙酰葡萄糖胺-天

冬酰胺(GlcNAc-Asn)、 -N-乙酰半乳糖胺-丝氨酸/

苏氨酸(GalNAc-Ser/Thr)、 -木糖-丝氨酸(Xyl-Ser)、

-半乳糖-羟赖氨酸(Gal-Hyl)、 -L-阿拉伯糖-羟脯氨

酸(Ara-Hyp)。此外,还发现罕见的以N-末端氨基

酸残基为连接点的糖肽键,存在于小鼠血红蛋白

A1c中。

2.1 N-糖苷键[4]

2.1.1 组成

N-糖苷键以 -N-乙酰葡萄糖胺-天冬酰胺为连

接点。在糖蛋白中仅有N-乙酰- -D-葡萄糖胺残基

与天冬酰胺相连,生成的键是4-N-(2-乙酰氨基-2-脱

氧- -D-吡喃葡萄糖基)-L-天冬酰胺。

2.1.2 糖苷键附近的氨基酸顺序

N-糖苷键不仅与氨基酸种类有关,而且与氨基

酸顺序有关。带糖链的天冬酰胺残基附近往往含有

一个苏氨酸或丝氨酸残基,即它具有顺序子结构,称

为天冬酰胺顺序子:天冬酰胺-X-苏氨酸(Asn-X-

Thr)或天冬酰胺-X-丝氨酸(Asn-X-Ser),其中X可

代表除脯氨酸以外的任何一种氨基酸残基。表明糖

蛋白中能与天冬酰胺残基相连的寡糖链数目是有限

的,并非所有天冬酰胺顺序中的天冬酰胺都发生糖

基化,如鸡卵清蛋白。天冬酰胺顺序子不仅与糖基

化有关,可能对糖链的组成与长短也有控制作用,如

顺序子中的X为极性氨基酸时,常生成复杂型寡糖

链;X为非极性氨基酸时常形成单纯型寡糖链。

2.2 O-糖苷键[5]

主要有4种类型:

(1)以 -N-乙酰半乳糖胺-丝氨酸/苏氨酸残基

为起点,此糖肽键是3-O-(2-乙酰胺-2-脱氧- -D-吡喃

半乳糖基)-L-丝氨酸或(苏氨酸)。是粘液糖蛋白的

特征键,在某些非粘液型糖蛋白中也有发现。

(2)以木糖-丝氨酸残基为连接点,大多数以木

糖残基与肽链上丝氨酸残基结合,形成O-糖苷键而

连接起来。

(3)以半乳糖-羟赖氨酸残基为连接点,此糖肽

键称为5-O- -吡喃半乳糖基-5羟基-L-赖氨酸。是胶

原和一些胶原样多聚物的特征结构。在发生糖基化

的羟赖氨酸(Hyl)之后,紧接着往往是一个甘氨酸

(Gly)。

(4)以阿拉伯糖-羟脯氨酸残基为连接点,此糖

肽键称为4-O- -D-吡喃阿拉伯糖基-4-羟-反式-L-脯

氨酸,目前仅在高等植物中发现,主要存在于绿色植

物和绿藻细胞壁的糖蛋白中。

3 糖链结构

糖蛋白的糖链可以是直链或支链,糖基数一般1

~ 15个左右。不同的糖蛋白分子中,其糖链数目不

等,多肽链上糖链的分布亦不均匀,如膜糖蛋白的糖

链全部分布在暴露于膜外侧的肽链上,而不存在于

膜的内部。理论上讲,糖蛋白上的糖链有无数种结

构模式,但生物体内可能有某种限制因素,使实际存

在的糖链类型大减。迄今发现,许多不同种类的糖

蛋白含有共同的核心结构。

3.1 N-连接的糖链[4]

N-糖链通常包含一个五糖核心结构,称为三甘

露五糖核心结构,该核心由内侧的两个GlcNAc和外

侧的三个甘露糖(Man)构成,其中两个 α -Man,分别

以 1 3和 1 6与内侧的 α -Man相连,各种生物

体内N-连接的糖蛋白糖链中均含有此结构。根据

五糖核心结构连接其它糖的情况,N-糖链分为以下

几类:

(1)高甘露糖型 穗糖链只含有甘露糖和N-乙

酰氨基葡萄糖,而且只有甘露糖连接在五糖核心区

上,如卵白蛋白。

(2)复杂型 穗糖链除含有甘露糖和N-乙酰氨基

基葡萄糖外,在甘露糖上还连接有半乳糖、岩藻糖和

唾液酸等。 α -1 3Man的C

和C

4

位,以及 1 6Man

的C

2

和C

6

位上连接外侧糖连,即天线,可分为二天

线型(C2C2)、三天线型(C2,4C6)和四天线型

(C

2

,

4

C

2

,

6

)。只有极少数是单天线型的,五天线型仅

发现于鸟类卵清中。

(3)杂合型 又称混合型,既有高甘露糖链,又

有N-乙酰氨基半乳糖链,连接于五糖核心的两个 -

Man上,如卵清蛋白。

(4)核心岩藻糖型 五糖核心的最内侧GlcNAc

上以 1 6连接岩藻糖(Fuc)。

(5)平分型 -Man上连接一个GlcNAc。

3.2 O-连接的糖链[4]

O-连接的糖链存在多种形式,如GalNAc-Ser/

Thr,GlcNAc-Ser/Thr,Gal-Ser,Ara-Ser/Thr,Man-

32

生物技术通报 Biotechnology Bulletin 2004年第1期

Ser/Thr等。这类糖类结构共同点,是由一种或少数

几种单糖与某些含羟基氨基酸连接,不存在共有的

核心结构,但在O-GalNAc连接的糖链中已发现有4

类核心结构。其中研究得最多的是粘蛋白、血浆蛋

白和膜蛋白。

4 糖链分析策略

4.1 糖蛋白及糖链结构的定性鉴定

样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳后用Shiff试剂、甲

苯胺蓝、硫酸-百里苯酚等染色可以定性鉴定糖蛋

白[6 ~ 8],也可以电泳后进行Western印迹,将蛋白条

带转移至硝酸纤维素膜上,再以糖蛋白测定试剂盒,

进行糖蛋白定性试验[9]。

凝集素是一类能识别、结合特异单糖或糖链结

构的糖蛋白,糖结合专一性不同的凝集素,可以区别

糖残基的连接方式、分支和修饰情况,因此凝集素不

仅能用于寡糖和糖复合物的分离纯化,还能用于糖

链结构分析。常用凝集素亲和层析、亲和沉淀、亲和

电泳、酶联免疫(ELISA)、印迹等方法鉴定分离糖

链、糖肽及鉴定糖链结构[10]。

4.2 糖蛋白及糖肽的制备

糖蛋白的分离制备常采用离子交换层析、凝胶

过滤、凝集素亲和层析等方法;糖肽的制备首先要用

蛋白酶切断蛋白主链,糖蛋白的酶解,酶的用量比纯

蛋白的酶解要多几倍,时间也更长。糖肽片段的分

离一般采用各种层析方法。

4.3 从糖肽片段上切下糖链

4.3.1 酶法[11]

常用的酶有glycopeptidaseA、N-peptidoglycosi-

daseF、内切-N-乙酰半乳糖胺酶、内切-N-乙酰葡

萄糖胺酶、内切-N-乙酰半乳糖胺酶、内切-半乳糖

苷酶。酶切法具有高效、专一、条件温和等特点,但

酶价格昂贵,如果所用的酶是糖蛋白,那么酶本身造

成的糖链污染也是必须考虑的问题。

4.3.2 化学法[5]

-消除反应广泛应用于含N-乙酰半乳糖-丝氨

酸/苏氨酸(Gal-NAcSer/Thr)连接的糖蛋白或糖肽;

肼解法用于含N-乙酰氨基葡萄糖(Glc-NAcAsn)连

接的糖蛋白或糖肽。为了避免肼对糖链的水解及脱

乙酰作用,肼解后需对糖链进行还原及乙酰化;三氟

乙酸酸解法主要用于Glc-NAcAsn连接的糖肽或糖

蛋白。较温和的三氟乙酸水解条件可避免还原端与

次末端的己糖胺残基受到破坏。

4.4 穗糖链的分离纯化

常采用纸层析、薄板层析、SephadexG-25、

SephadexG-50层析分离蛋白与穗糖链,但葡聚糖凝

胶上脱落的可溶性葡聚糖片段会造成污染,因此用

聚丙烯酰胺凝胶Bio-Gel分离。所有未知糖链的纯

化,均需要HPLC来完成,固定化凝集素可以用来纯

化具有特异结构的寡糖。

4.5 糖链的结构分析

要阐明一种寡糖链结构,必须了解以下内容:分

子量、单糖残基组成、单糖残基间的顺序、环状结构

的类型、糖苷键的构型、 α -、 β -异头异构体、羟基被取

代情况等。

糖的组分复杂,结构相似,没有显色基团,如果

不经衍生难以进行光谱、色谱分析,因此糖链结构分

析难度较大。传统的方法有凝胶过滤法、蒸气压法

(测定分子量);部分酸水解、完全酸水解、纸色谱、气

相色谱法(测定单糖残基组成);选择性酸水解、糖苷

酶顺序水解、凝集素亲和层析(单糖残基间的顺序);

红外光谱(环状结构的类型);单糖与氨基酸组成分

析、稀碱水解、肼解反应(糖苷键的构型);糖苷酶水

解、核磁共振、红外光谱(α -、 β -异头异构体);甲基化

反应-气相色谱、过碘酸氧化(羟基被取代情况)。

前几十年质谱就应用于糖类化合物的分

析[12,13],应用GC-MS可了解单糖组成及大致的分

析情况[14]。快原子轰击电离质谱(FAB-MS)和液态

二次离子质谱(LSI-MS)[15,16]可以测定nmol样品/

μ l基质的寡糖,并可获到分子量信息和结构信息。

将分离技术与质谱法相结合是分离科学方法中的一

项突破性进展,LC-MS可以同时检测糖肽的位置并

且提供结构信息。毛细管电泳(CE)与质谱的联用技

术[17],在一次分析中可同时得到迁移时间、分子量

和碎片信息,是LC-MS的补充。大气压电喷雾

(ESI)质谱系统的建立,即使只有pmol量级且未经

衍生的大分子寡糖样品,也可以使用ESI分

析[18,19]。基体辅助激光解吸-电离质谱(MALDI-

MS)[20 ~ 22]

可以精确地测定ng量级的葡聚糖(糊

精),相对分子质量达7000u.,能快速(数分钟1个

样品)、准确(可达几千分之几)、高灵敏度(nmol量

332004年第1期 武金霞等:糖蛋白的结构、功能及分析方法

级)测定大分子多糖相对分子质量,该技术的灵敏度

由于引进Q-TOF(QuadTimeFlight)而大幅度提高,

可分析飞摩尔($10 \sim 15\text{mole}$)级的样品以提供糖蛋白

糖基化位点和糖链序列信息,这些技术与外切糖昔

酶、荧光标记衍生物、HPLC/CE和NMR技术的联

合使用,可测定出糖链的组成和连接方式。

5 糖链在糖蛋白中的作用

获得糖链的精确结构信息是研究糖基化对蛋白

质功能影响的基础。克隆蛋白质基因,采用定点突

变技术使蛋白质的糖基化位点发生改变,再将突变

基因转化具有糖基化修饰的受体菌,或者将完整的

蛋白质基因转化糖基化修饰缺陷型的受体菌,比较

分析表达产物与天然产物的生化性质和生物学活性

的变化;选择不同酶切位点的糖苷酶水解糖链,也可

以分析失去糖链的蛋白部分的性质变化。

6 糖生物学研究的限制因素及趋势

目前糖生物学研究中要解决的关键技术问题是

糖链结构分析和合成方法的建立。在糖链的分析上

需要建立高分辨率、快速的序列测定方法和构象研

究的方法、模型;在合成上需要建立高效的合成方

法。但糖链的结构分析和合成很难象核酸和蛋白质

那样完全靠化学方法解决,因此化学法和酶法相结

合是发展趋势。在功能研究方面,主要是研究糖链

合成代谢途径和糖链在细胞内、细胞间的功能,其前

沿领域为糖基化、细胞粘附分子(即识别糖链信息分

子的蛋白质)与糖链的相互作用及糖在微生物感染

中的作用3个领域。

参考文献

1 iology,1993,3(20):97 ~ 130.

2 PerezS,MouhousR,NifantE,iology,1996,6:537 ~

542.

3 WangX,SunP,AlqamariA,em,2001,276:8436 ~

8444.

4 吴东儒,糖类的生物化学.北京:高教出版社,1987,747.

5 张维杰,复合多糖生化研究技术.上海:上海科技出版社,1987,

160.

6 HartmutG,em,1971,246(20):6339 ~ 6340.

7 DevenyiT,GergelyJ.实用蛋白质化学技术.上海:上海科技出版

社,1982,52.

8 ochem,1979,99:474 ~ 476.

9 孙秀琴,中村健,伊藤洋一,石原和彦,等.中国寄生虫病防治杂

志,2001,14(4):285 ~ 287.

10 孙建中,王克夷.生物化学与生物物理进展,1994,21(2):104 ~

109.

11 FukudaM,I,1989,197(19):

12 MechrefY,v,2002,102:321 ~ 37.

13 DellA,e,2001,291:2351 ~ 2356.

14 ydrRes,1985,140 ~ 141.

15 ,1981,293:270.

16 AberthW,StrubKM,BurlingameAL,em,

1982,54:20 ~ 29.

17 OlivaresJA,NhungT,Nguyen,em,1987,59:12

~ 30.

18 DuffinKL,WelplyJK,HuangE,em,1993,65:

2791.

19 LiT,OhashiY,MatsuzakiY,ectrom,1993,28:

211.

20 MechrefY,em,1998,70:455 ~ 463.

21 ColangeloJ,em,1999,71:1479 ~ 1482.

22 GeyerH,SchmittS,WuhrerM,em,1999,71:

476 ~ 482.

(上接第38页)

8 StillI H,VinceP,cs,1999,58(2):165 ~

170.

9 HerC,Doggett,cs,1998,52(1):50 ~ 61.

10 刘春宇,张春玲,夏家辉.生物化学与生物物理进展,1998,25

(5):434 ~ 439.

11 彭永德,宋怀东,等.上海第二医科大学学报,2001(4):292 ~

295.

12 ModrekB,ReschA,GrassoC,cAcidsRes,2001,

29(13):2850 ~ 2859.

13 Picoult-NewbergL,Res,1999,9:167 ~ 174.

14 H,1996,14(8):261 ~ 272.

15 VelculescuVE,e,1995,270:484 ~ 487.

16 HwangDM,DempseyAA,WangRX,ation,1997,

96(12):4146 ~ 4203.

17 LanfranchiG,MuraroT,CaldaraF,Res,1996,6

(1):35 ~ 42.

18 MaoM,FuG,WuJS,tlAcadSciUSA,1998,95

(14):8175 ~ 8180.

19 胡仁明,彭永德,等.中华内分泌代谢杂志,2000,16(1):10

~ 14.

20 宋怀东,胡仁明,等.中华内分泌代谢杂志,2000,16(5):292

~ 296.

21 GreenP,LipmanD,HittierL,e,1996,259

(5102):1711 ~ 1716.

22 e,1996,286:453 ~ 456.

34

生物技术通报Biotechnology Bulletin 2004年第1期

更多 在线阅览 请访问 https://www.wtabcd.cn/zhishi/list/91_0.html

文章生成doc功能，由[范文网](http://www.wtabcd.cn/fanwen/)开发