

• 研究论文 •

## 荧光辅助糖电泳用于果胶水解产物中寡糖的分析研究

孙 静<sup>a</sup> 李健军<sup>a,b</sup> 黄琳娟<sup>a</sup> 王仲孚<sup>\*,a</sup>

(<sup>a</sup> 西北大学生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术省部共建教育部重点实验室

西北大学糖生物学与糖工程研究中心 西安 710069)

(<sup>b</sup> 西安交通大学理学院化学系 西安 710049)

**摘要** 荧光辅助糖电泳(FACE)是首先用荧光衍生试剂对糖类分子的还原端进行衍生化标记,然后在一定浓度的聚丙烯酰胺凝胶上进行分离的分析方法,可同时分析中性糖与酸性糖.将该方法用于果胶寡糖的分离分析,对影响 FACE 的诸多因素如荧光试剂的种类、用量,荧光衍生化时间、温度,分离胶浓度及盐、酸等进行了考察,对果胶寡糖的 FACE 条件进行了优化,结果显示:每 1.2 mg 无酸且不含盐的果胶寡糖中,加入 0.2 mol/L 的 ANTS 溶液 3.75  $\mu$ L, 1.0 mol/L 的 NaBH<sub>3</sub>CN 溶液 5  $\mu$ L, 40  $^{\circ}$ C 衍生化反应 16 h 后,在浓度为 38% 的分离胶上电泳分离,取得良好的分离效果.在该实验条件下,果胶多糖酸水解后得到聚合度为 2~16 的果胶寡糖混合物,与质谱分析结果基本一致.该方法快速、简捷、灵敏、分辨率高,费用低,为果胶多糖可控性降解的监测和果胶寡糖的分离分析提供了技术手段.

**关键词** 果胶;寡糖衍生物;荧光辅助糖电泳;8-氨基萘-1,3,6-三磺酸;2-氨基吡啶酮

## Pectic Oligosaccharide Analysis by Fluorophore-assisted Carbohydrate Electrophoresis

Sun, Jing<sup>a</sup> Li, Jianjun<sup>a,b</sup> Huang, Linjuan<sup>a</sup> Wang, Zhongfu<sup>\*,a</sup>

(<sup>a</sup> Educational Ministry Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China & Glycobiology and Glycotechnology Research Center, Northwest University, Xi'an 710069)

(<sup>b</sup> Department of Chemistry, College of Science, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049)

**Abstract** Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) was used to analyse pectic oligosaccharides. The influence of different factors on the separation of oligosaccharides by FACE was investigated. The condition including the type and the content of fluorescent reagent, labelling time and temperature, salt, acid and the concentration of resolving gel was optimized as follows: 1.2 mg of salty-free and acid-free pectic oligosaccharides were labeled by 3.75  $\mu$ L of 0.2 mol/L ANTS solution and 5  $\mu$ L of 1.0 mol/L NaBH<sub>3</sub>CN solution. The derivative reaction was accomplished at 40  $^{\circ}$ C after 16 h, and the concentration of resolving gel was 38%. In this condition, a pectic oligosaccharide mixture was obtained with the range of DP 2~16. The FACE result was accordant with that of MS analysis. So the FACE procedure described is useful for the rapid monitoring of pectic polysaccharide depolymerization and acidic oligosaccharide analysis.

**Keywords** pectin; oligosaccharide derivative; fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis; 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonate; 2-aminoacridone

果胶多糖是一种酸性杂多糖,是植物细胞壁重要的结构成分,多存在于高等植物细胞初生壁和细胞间层,

在初生壁中与不同含量的纤维素、半纤维素、木质素的微纤丝以及某些伸展蛋白相互交联,对细胞组织起着软

\* E-mail: wangzhf@nwu.edu.cn; Tel.: 029-88302184.

Received June 27, 2008; revised December 8, 2008; accepted January 4, 2009.

国家高技术研究发展计划(863 计划, Nos. 2006AA02Z146, 2007AA10Z338)资助项目.

化和粘合作用<sup>[1]</sup>. 其降解产物果胶寡糖具有多种生物活性, 如促进双歧杆菌增殖、抑菌、诱抗等, 在食品、医药、农业等领域具有广阔的开发应用前景<sup>[2]</sup>.

虽然高灵敏度的气相色谱、液相色谱、质谱和核磁共振谱在糖类分析中已显示出优越性, 但是上述分析方法需要昂贵的仪器和操作熟练的技术人员, 而且对酸性寡糖的分析具有一定的局限性. 荧光辅助糖电泳<sup>[3]</sup> (fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis, FACE), 也称为荧光标记的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore-labeled saccharides, PAGEFS) 是近年来发展起来的一种简单、快捷的糖类物质的分离分析方法, 可以同时多个中性和酸性寡糖样品进行简单、快速、灵敏和高分辨率的分离分析. 它首先用荧光衍生化试剂对糖类分子的还原端衍生化标记, 然后在一定浓度的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离分析. 衍生化反应既为糖类分子提供了生色(荧光)基团, 又使通常呈中性的糖类分子带上电荷, 可以在电场力作用下进行电泳分离. 常用的荧光衍生化试剂主要有<sup>[4,5]</sup>: 8-氨基萘-1,3,6-三磺酸(ANTS)和 2-氨基吡啶酮(AMAC).

本研究将FACE用于果胶水解产物中寡糖的分离分析, 考察了不同条件对果胶寡糖电泳效果的影响, 对电泳条件进行了优化, 为发展果胶多糖可控性降解技术及果胶寡糖的分离分析提供了实验手段.

## 1 实验部分

### 1.1 主要试剂和仪器

果胶(From Citrus Fruits)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、甘氨酸(glycine)、丙烯酰胺(acrylamide)、甲叉双丙烯酰胺(bisacrylamide)、四甲基乙二胺(*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine, TEMED)、过硫酸铵(ammonium persulfate)、硼氢化钠( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ )、2-氨基吡啶酮(AMAC)和 8-氨基萘-1,3,6-三磺酸(ANTS), 以上试剂均购于 Sigma 公司. 其它试剂均为分析纯, 所用水为超纯水.

DYC-28C 型电泳槽为北京六一电泳仪厂生产 AXIMA CFR 型基质辅助激光解析电离质谱仪为岛津公司生产.

### 1.2 果胶寡糖的制备

称取 0.6 g 果胶多糖, 加 0.5 mol/L 的 TFA 水溶液 60 mL, 于 80 °C 油浴中搅拌反应 5 h. 反应完成后把反应溶液平均分成三份, 其中一份加氨水中和, 浓缩至 10 mL, 记为样品 1; 第二份加水旋转蒸发, 反复多次以除去多余的 TFA, 浓缩至 10 mL, 记为样品 2; 第三份直接

浓缩至 10 mL, 记为样品 3. 以上三个样品置于 4 °C 冰箱中保存备用.

### 1.3 荧光衍生化反应

ANTS 衍生化反应<sup>[5,6]</sup>: 取果胶寡糖 60  $\mu\text{L}$ , 加入 0.2 mol/L ANTS 的 HAc-H<sub>2</sub>O (3 : 17, *V/V*) 溶液 3.75  $\mu\text{L}$ , 1.0 mol/L  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  的 DMSO 溶液 5  $\mu\text{L}$ , 混匀, 封管, 40 °C 水浴反应 16 h, 置于 -20 °C 冰箱中备用.

AMAC 衍生化反应<sup>[5,7]</sup>: 取果胶寡糖 60  $\mu\text{L}$ , 加入 0.2 mol/L AMAC 的 HAc-DMSO (3 : 37, *V/V*) 溶液 3.75  $\mu\text{L}$ , 1.0 mol/L 的  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  水溶液 5  $\mu\text{L}$ , 混匀, 封管, 40 °C 水浴反应 16 h, 置于 -20 °C 冰箱中保存备用.

### 1.4 电泳<sup>[6,7]</sup>

分离胶由丙烯酰胺(0.32 g/mL)、甲叉双丙烯酰胺(0.024 g/mL)和 Tris (0.0509 g/mL) 组成. 每 10 mL 分离胶中加入 10% 的过硫酸铵水溶液 214  $\mu\text{L}$ , TEMED 21.4  $\mu\text{L}$ . 浓缩胶由丙烯酰胺(0.08 g/mL)、甲叉双丙烯酰胺(0.006 g/mL)和 Tris (0.0076 g/mL) 组成. 每 3 mL 分离胶中加入 10% 的过硫酸铵水溶液 25  $\mu\text{L}$ , TEMED 2.5  $\mu\text{L}$ . 电极缓冲液由 Tris (0.6057 g/L) 和甘氨酸(2.8827 g/L) 组成, pH = 8.4. 15 mA 恒定电流下电泳 5~8 h.

### 1.5 成像

将电泳后的凝胶用凝胶图像分析仪拍照, 保存.

### 1.6 MALDI-TOF MS 测定

正离子检测方式,  $\text{N}_2$  激光波长为 337 nm, 加速电压为 80 keV, 基质为 2,5-二羟基苯甲酸水溶液(DHB, 10 mg/mL), 用标准混合肽作质量校正.

## 2 结果与讨论

### 2.1 FACE 分析

#### 2.1.1 糖类物质的 ANTS/AMAC 衍生化反应

ANTS/AMAC 的结构如图 1 所示. ANTS 的衍生化反应不仅为糖分子提供了荧光基团, 还提供了 3 个负电荷, 使原来呈电中性的糖分子可以在一定 pH 值的缓冲液中, 在电场力作用下能够产生电迁移.

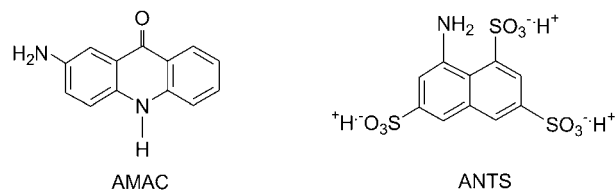


图 1 AMAC 和 ANTS 结构

Figure 1 Structural formulas of AMAC and ANTS

ANTS/AMAC 衍生化反应原理如图 2 所示. 和其它

胺化还原反应相同, ANTS/AMAC 的氨基首先与糖的还原端(醛基)发生亲核反应, 消去一分子水, 形成席夫碱; 席夫碱不稳定, 还原剂  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  迅速将其还原成稳定的二级胺。由于第一步反应是可逆反应, 为使反应向右进行, 可通过加入过量的衍生化试剂, 或改变反应的条件如反应的时间、温度、pH 和溶剂使其反应完全。

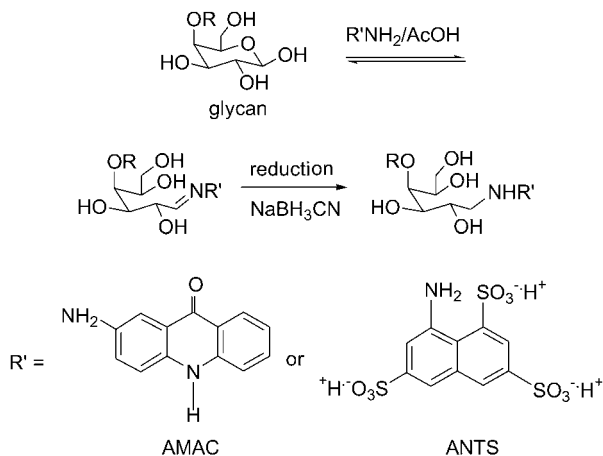


图 2 ANTS/AMAC 对糖链进行标记的原理

Figure 2 Principle of ANTS/AMAC-label to saccharide-chain

### 2.1.2 荧光衍生化试剂的选择

本实验考察了 AMAC 与 ANTS 对果胶寡糖(样品 1)的衍生效果, 结果见图 3。

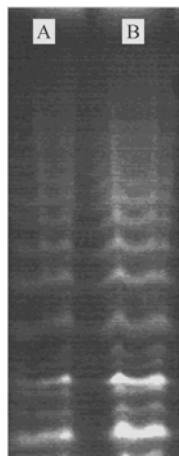


图 3 不同荧光试剂对果胶寡糖的衍生化分析

Figure 3 Analysis of different fluorescent reagents-labeled pectic oligosaccharides

A—AMAC-label; B—ANTS-label

结果显示, B 组条带明显比 A 组条带清晰, 说明 ANTS 对果胶寡糖的衍生效果比 AMAC 的衍生效果好, 故本实验中选取 ANTS 作为果胶寡糖的衍生化试剂。

### 2.1.3 ANTS 用量的优化

在 FACE 中, 荧光试剂的用量对衍生效果有较大影

响。用量不足, 对糖的衍生不完全; 用量太多, 会影响电泳分离效果, 而且浪费试剂。本实验考察了不同用量的 ANTS 对果胶寡糖(样品 1)的衍生效果, 结果见图 4。

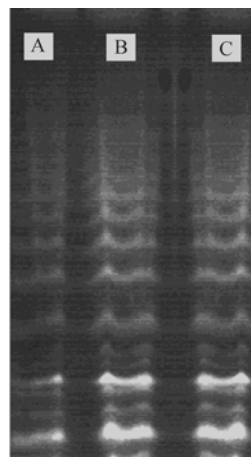


图 4 不同用量的 ANTS 对果胶寡糖的衍生化分析

Figure 4 Analysis of different content of ANTS-labeled pectic oligosaccharides

A—1.88  $\mu\text{L}$  of ANTS solution, 2.5  $\mu\text{L}$  of  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  solution; B—3.75  $\mu\text{L}$  of ANTS solution, 5  $\mu\text{L}$  of  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  solution; C—7.5  $\mu\text{L}$  of ANTS solution, 10  $\mu\text{L}$  of  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  solution

结果显示, 随着 ANTS 用量的增加, 衍生产物的荧光强度逐渐增强。1.2 mg 果胶寡糖中, 加入 0.2 mol/L 的 ANTS 溶液 3.75  $\mu\text{L}$ , 1.0 mol/L 的  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  溶液 5  $\mu\text{L}$  (B 组条带) 进行标记时荧光强度达到最强, 继续增加 ANTS 用量, 荧光强度未见有明显增强。故本实验中, 1.2 mg 果胶寡糖中, 加入 0.2 mol/L 的 ANTS 溶液 3.75  $\mu\text{L}$ , 1.0 mol/L 的  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  溶液 5  $\mu\text{L}$  对其进行衍生。

### 2.1.4 衍生化反应温度的优化

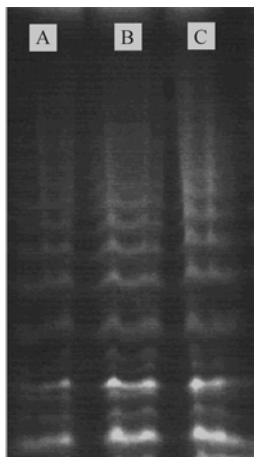
分别在 30, 40, 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴中对果胶寡糖(样品 1)进行衍生化反应, 然后进行电泳分析, 结果见图 5。

结果显示, 随着衍生化温度的升高, 衍生产物的荧光强度逐渐增强。40  $^{\circ}\text{C}$  下反应的条带荧光达到最强, 50  $^{\circ}\text{C}$  时未见有明显增强。故选择衍生化反应温度为 40  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 2.1.5 盐对 FACE 的影响

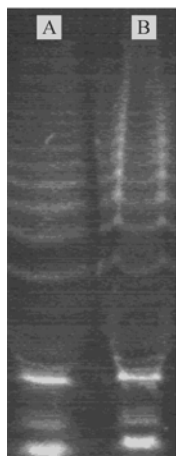
据文献报道<sup>[8]</sup>, 电泳样品中含盐会直接影响电泳效果。本实验考察了盐对果胶寡糖的衍生反应及电泳效果的影响, 用 ANTS 分别对样品 1 和样品 2 衍生后进行电泳分析, 结果见图 6。

结果显示, 当样品中不含盐时, 电泳条带平滑整齐, 相邻条带界线清晰; 而含盐样品电泳条带呈波浪状, 影响电泳对糖的分离分析效果。引起这种现象的原因可能是, 盐增加了溶液的离子强度, 降低了分子的泳动速度, 所以影响电泳的分离效果, 故在 FACE 前, 对样品进行脱盐处理是非常必要的。



**图 5** ANTS 在不同温度下对果胶寡糖的衍生化分析  
**Figure 5** Analysis of ANTS-labeled (at different temperatures) pectic oligosaccharides

A—30 °C; B—40 °C; C—50 °C



**图 6** ANTS 对含盐和不含盐的果胶寡糖的衍生化分析  
**Figure 6** Analysis of ANTS-labeled salty and salty-free pectic oligosaccharides

A—salty-free pectic oligosaccharides; B—salty pectic oligosaccharides

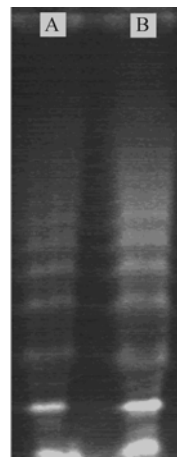
#### 2.1.6 酸对 FACE 的影响

在 FACE 中, 弱酸环境有利于衍生化反应中  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  对中间产物席夫碱的还原, 但较强的酸性环境可能不利于衍生化反应的进行. 本实验考察了酸对果胶寡糖的衍生化反应及电泳效果的影响, 用 ANTS 分别对样品 2 和样品 3 衍生后进行电泳分析, 结果见图 7.

结果显示, ANTS 对不含酸的样品衍生后的荧光比对含酸的样品衍生后的荧光强. 引起这种现象的原因可能是, 过强的酸性环境会降低  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  的还原力, 从而降低 ANTS 对糖的衍生效果, 所以, 在 FACE 中, 应尽量避免待衍生样品中酸的存在.

#### 2.1.7 衍生化反应时间的优化

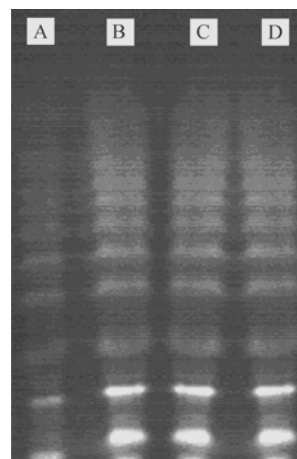
衍生化反应时间是影响 FACE 效果的因素之一. 若反应时间太短, 反应不完全; 时间太长, 则会大大减慢



**图 7** ANTS 对含酸和不含酸的果胶寡糖的衍生化分析  
**Figure 7** Analysis of ANTS-labeled acidiferous and acidiferous-free pectic oligosaccharides

A—acidiferous pectic oligosaccharides; B—acidiferous-free pectic oligosaccharides

实验进程. 本实验对果胶寡糖(样品 2)分别衍生 12, 16, 20, 24 h 后进行电泳分析, 结果见图 8.



**图 8** ANTS 对果胶寡糖衍生不同时间后的电泳分析  
**Figure 8** Analysis of ANTS-labeled (for different times) pectic oligosaccharides

A—12 h; B—16 h; C—20 h; D—24 h

结果显示, 随着衍生化时间的增长, 衍生产物的荧光强度逐渐增强. 衍生 16 h 时的条带荧光达到最强, 继续延长衍生化时间, 荧光未见有明显增强. 故选择衍生反应时间为 16 h.

#### 2.1.8 分离胶浓度的优化

相对于蛋白质和 DNA 这些大分子而言, 寡糖是较小的分子, 浓度较大的聚丙烯酰胺凝胶的交联孔隙较小, 可以有效地分离寡糖. 本实验考察了果胶寡糖(样品 2)衍生物在不同浓度分离胶上的分离效果, 结果见图 9.

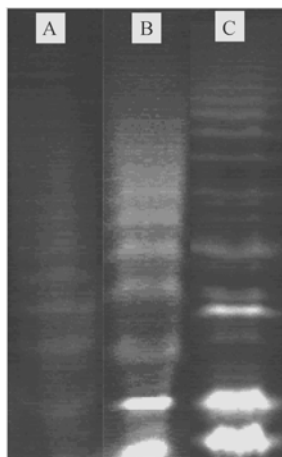


图9 ANTS对果胶寡糖衍生后在不同浓度分离胶上的分离  
Figure 9 Separation of ANTS-labeled pectic oligosaccharides on polyacrylamide gel of different concentration

The concentration of resolving gel: A—28%; B—32%; C—38%

结果显示, 随着分离胶浓度的增大, 分离效果明显改善, 用浓度为 38% 的分离胶可以使果胶寡糖得到很好的分离. 故采用浓度为 38% 的分离胶对果胶寡糖衍生物进行分析.

综合以上实验结果, 我们得到优化的 FACE 条件为: 每 1.2 mg 无酸且不含盐的果胶寡糖中, 加入 0.2 mol/L ANTS 的 HAc-H<sub>2</sub>O (3 : 17, V : V) 溶液 3.75 μL, 1.0 mol/L NaBH<sub>3</sub>CN 的 DMSO 溶液 5 μL, 40 °C 水浴反应 16 h 后, 在浓度为 38% 的分离胶上进行电泳分析, 如图 10.

可以看出有 16 个条带, 代表不同聚合度的果胶寡糖.

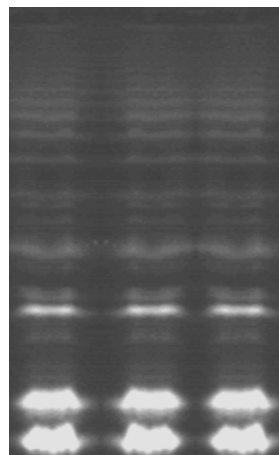


图10 优化条件下果胶寡糖的 FACE 分析  
Figure 10 FACE analysis on pectic oligosaccharides at optimum condition

## 2.2 MALDI-TOF MS 分析

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是近年发展起来的一种对多组分混合物进行快速、便捷分析的新方法, 已被广泛用于糖类物质的结构分析. 对以上果胶寡糖(样品 2)进行 MALDI-TOF MS 分析, 结果见图 11.

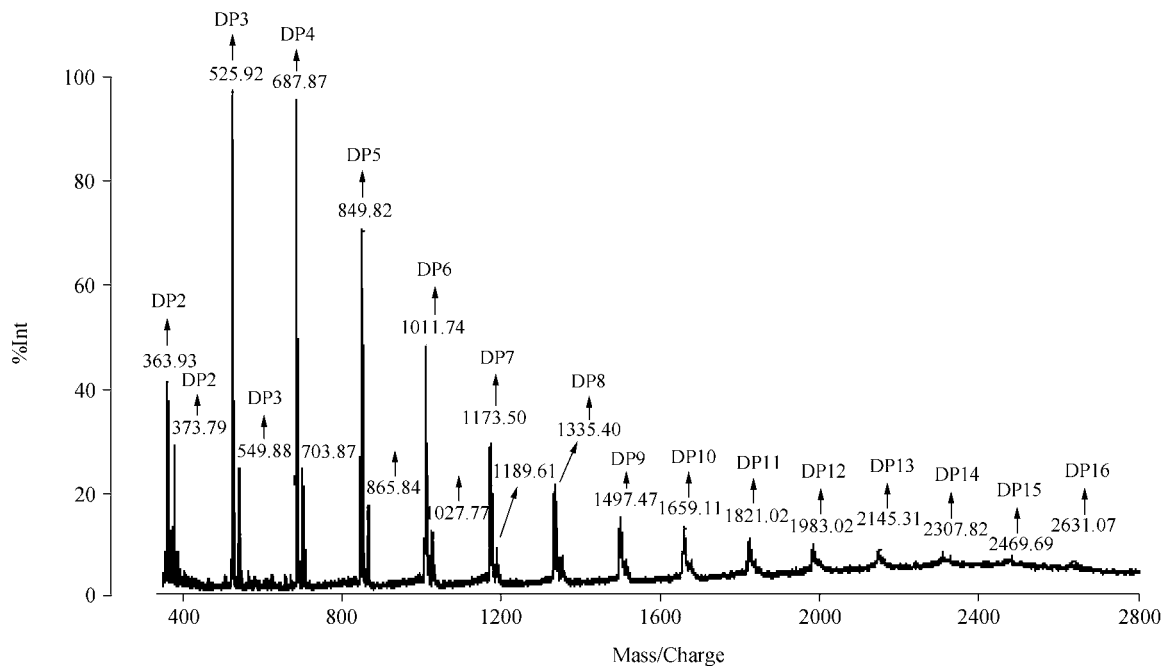


图11 果胶寡糖的 MALDI-TOF MS 分析  
Figure 11 MALDI-TOF MS analysis of pectic oligosaccharides

从 MALDI-TOF MS 图中可以看出, 果胶寡糖混合物中含有 2~16 个聚合度的寡糖. 优化后 FACE 的分析结果(如图 10)与 MALDI-TOF MS 分析结果基本一致, 说明 FACE 可以准确地对寡糖进行分析检测.

使用优化后的 FACE 条件对果胶寡糖多次重复测定, 结果重现性良好, 表明该方法稳定、可靠, 可以对果胶多糖的降解过程进行有效的监控, 为果胶寡糖的分离和分析提供了实验依据. 虽然气相色谱、液相色谱、质谱和核磁共振谱等也能灵敏地分析糖类物质, 但需要昂贵的仪器和操作熟练的技术人员, 而且对酸性寡糖的分析具有一定的局限性. FACE 可以同时多个中性和酸性寡糖样品进行简单、快速、灵敏和高分辨率的分离分析, 而且操作简单, 电泳可以使用常用的蛋白质凝胶电泳设备和缓冲液体系(只要把沉淀剂 SDS 省去即可). 因此, FACE 可以作为实验室研究果胶寡糖的常规方法.

## References

- 1 Perez, S.; Mazeau, K.; Penhoat, C. H. *Plant Physiol. Biochem.* **2000**, *38*, 37.
- 2 Ni, H.; Yang, Y.-Y.; Yan, D.-Z. *J. Hubei Univ. (Nat. Sci. Ed.)* **2003**, *25*, 148 (in Chinese). (倪红, 杨艳燕, 阎达中, 湖北大学学报(自然科学版), **2003**, *25*, 148.)
- 3 Jackson, P. *Biochem. J.* **1990**, *270*, 705.
- 4 Kbeckow, A.; Amado, R.; Widmer, H. M.; Paulus, A. *J. Chromatogr.* **1995**, *716*, 241.
- 5 Yoji, O.; Yuko, Y.; Yasuo, U.; Akira, A. *Anal. Biochem.* **2005**, *343*, 212.
- 6 Huang, G.-L.; Mei, X.-Y.; Zhang, H.-C.; Wang, P. *Fine Chemicals* **2006**, *23*, 636 (in Chinese). (黄刚良, 梅新娅, 张厚程, 王鹏, 精细化工, **2006**, *23*, 636.)
- 7 Goubet, F.; Morriswood, B.; Dupree, P. *Anal. Biochem.* **2003**, *321*, 174.
- 8 Shu, Q.-F.; Zhao, L.; Li, W.-B.; Zhang, L.-M.; Sun, Y.-R. *Chin. Bull. Botany* **1998**, *15*, 73 (in Chinese). (舒群芳, 赵路, 李文彬, 张利明, 孙勇如, 植物学通报, **1998**, *15*, 73.)

(A0806271 Lu, Y.; Lu, Z.)