

K-卡拉胶寡糖为配体的亲和探针制备方法的研究*

甘小平, 詹中伟, 陈海敏, 严小军**

(宁波大学海洋生物工程重点实验室, 宁波 315211)

摘要 目的: 建立一种以 K-卡拉胶寡糖为配体, Affi-gel 15 为载体的亲和探针, 用于分离纯化 K-卡拉胶寡糖在细胞信号通路中的特异性受体。方法: 将标准寡糖和 K-卡拉胶寡糖进行己二胺衍生化后与 Affi-gel 15 结合, 并利用 MS NMR、PAGE 电泳等方法对各步的产物进行分析。结果: MS NMR 结果表明, 标准寡糖和 K-卡拉胶寡糖均能与己二胺进行完全稳定的衍生化反应, 其衍生物与 Affi-gel 15 的结合率都能达到 50% 以上, 其中 K-卡拉胶寡糖-己二胺与 Affi-gel 15 的结合率达到了 68%。结论: 制备得到的以 K-卡拉胶寡糖为配体的亲和探针能够与 K-卡拉胶寡糖的受体结合, 如碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)。这表明这种制备方法是可行的。

关键词: K-卡拉胶寡糖; 肝素; 己二胺; Affi-gel 15; LC-MS NMR; 碱性成纤维细胞生长因子

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0591-08

Preparation of affinity probe with K- carrageenan oligosaccharides as the ligand*

GAN Xiao-ping ZHAN Zhong-wei CHEN Hai-min, YAN Xiao-jun**

(Ningbo University, Key Laboratory of Marine Biotechnology, Ningbo 315211, China)

Abstract Objectives To establish a method to prepare an affinity probe by using the K- carrageenan oligosaccharide as the ligand and Affi-gel 15 as the solid phase support to isolate and purify the specific receptors in cell signaling pathways **Methods** Authentic oligosaccharides and K- carrageenan oligosaccharides were derivatized with 1, 6- diamino hexane, and the structure were analyzed by means of MS NMR. Then, the affinity probe were prepared by linking to Affi-gel 15 support and its activity was assayed by PAGE **Results** The results of LC-MS and NMR showed that authentic oligosaccharides and K- carrageenan oligosaccharides could react with 1, 6- diamino hexane completely. The binding ratios of the oligosaccharide derivatives and Affi-gel 15 were higher than 50% in a specific reaction condition. Preliminary assay indicated that the affinity probe of K- carrageenan oligosaccharide ligand could bind to the receptor of bFGF. **Conclusions** The preparation of affinity probe of K- carrageenan oligosaccharide is feasible through derivatization of 1, 6- diamino hexane and linking with Affi-gel

Key words K- carrageenan oligosaccharide; 1, 6- diamino hexane; Affi-gel 15; LC-MS NMR; basic fibroblast growth factor (bFGF)

作为生物体信号传递过程中的重要组成部分, 很多寡糖在抗病毒、病原菌抑制、增强免疫力、改善胃肠功能等方面都发挥了重要作用^[1-6]。研究发现, 很多多糖降解后得到的寡糖比原来的多糖具有更明显的生理活性和更少的副作用。例如, 由甲壳素脱乙酰化、降解后得到的壳寡糖具有许多甲壳素所不具备的优异的生理功能, 如提高机体的免疫能力和抗癌能力, 改善肠道微生物的区系分布, 刺激有

益菌的生长^[7,8]; 经化学降解后的肝素寡糖与肝素相比, 其药理学分布曲线得到了改善, 表现出更好的抗血栓活性和其他生物药效, 并且减少了副作用^[9]。基于寡糖类物质在生物活性研究中得到越来越多的实例验证, 阐明寡糖物质的作用机理已经成为当前糖生物学的核心问题。

研究表明, 寡糖的生物活性是通过与细胞中多种蛋白质因子的相互作用来实现的, 因此, 通过制备

* 教育部长江学者与创新团队项目 (IRT0734), 教育部“高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目” (0705028)

** 通讯作者 Tel: (0574) 87600458 E-mail: xiaojunyan@hotmail.com

亲和探针来寻找寡糖在细胞中的蛋白质靶点已逐渐成为有效的研究寡糖生理功能的分子机制的方法。在以糖为配体的亲和探针的制备及其应用方面,国内外对肝素/肝素寡糖的报道较多,较常见的制备方法是利用肝素/肝素寡糖分子链上丰富的可反应基团,如羟基、羧基、磺酸基、氨基等与亲和色谱基质上可反应基团进行反应,以共价键的方式将之固定于基质上或人为的再在基质与肝素/肝素寡糖之间接上一“空间臂”(如六碳以上的二胺)以提高肝素/肝素寡糖分子的自由性^[10~12]。利用这种亲和色谱的方法,人们证实并且提纯了多种能与肝素/肝素寡糖相互作用的蛋白质。例如, Nascimento 等人利用肝素-琼脂糖亲和色谱证实了组织蛋白酶 X (cathepsin X)与肝素的相互作用^[13];穆成华等人将环氧氯丙烷活化的琼脂糖凝胶胺化后与肝素反应制备得到肝素亲和层析介质,并用所制介质从人血浆中分离出抗凝血酶 III^[14]。

K-卡拉胶是由 β -D-4-硫酸-半乳糖 (Galp4S)和 α -D-3,6-内醚半乳糖 ($A_{3,6}$ Galp)形成的交替共聚物,经过降解得到的 K-卡拉胶寡糖作为一种海洋硫酸寡糖,来源丰富,结构独特而且与内源性寡糖有很多相似点,有着巨大的开发潜力,其结构和功能都与肝素寡糖或硫酸肝素寡糖相似。本实验室的前期研究发现,卡拉胶寡糖能够抑制血管的生成从而阻止肿瘤的生长^[15]。因此,在上述研究的基础上,本实验建立了一种制备以 K-卡拉胶寡糖为配体的亲和探针的方法,以期用于筛选细胞中 K-卡拉胶寡糖的靶标蛋白,为研究卡拉胶生物活性的分子机理提供更加明确的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 K-卡拉胶(青岛友利德国贸易有限公司,食品级,二次纯化后使用);新卡拉二硫酸基四糖 (Neocarratetraose-4',4'-disulfate, 以下简称 NCD-4)、麦芽糖,均为标准糖,分析纯,Human FGF-basic 蛋白,美国 Sigma 公司;Affi-Gel 15 supports 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 阳离子交换树脂/HCL 体系降解 K-卡拉胶
降解 K-卡拉胶采用与琼胶寡糖制备类似的方法^[16]:取 K-卡拉胶 1 g 溶解于 100 mL 水中,搅拌均匀,再加入盐酸 ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理过的阳离子交换树脂,在 80°C 条件下水浴降解 6 h。反应完后,滤去阳离子交换树脂,降解液用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠中和,旋转蒸发,冻干得 K-卡拉胶寡糖。

1.2.2 寡糖-己二胺的合成 取上述制得的 K-卡拉胶寡糖 (NCD-4 纯度 95% 以上)和麦芽糖 (纯度 95% 以上)各 $12 \text{ } \mu\text{mol}$ 溶于 $4 \text{ mL } 1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 己二胺的 10% 冰醋酸溶液,再加入新配的 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氰基硼氢化钠水溶液 1 mL,摇匀后,于 37°C 反应 8 h 间或震荡,反应结束后,利用 sephadex G₁₀ 柱去除多余的己二胺。收集洗脱液,旋转蒸发,冻干得到 3 种寡糖-己二胺。

1.2.3 寡糖、寡糖-己二胺的质谱分析 质谱仪为 Q-TOF Premier 高分辨四极杆与飞行时间串联质谱仪 (Q-TOF-MS),配有电喷雾离子源 (ESI)及 MassLynx 4.1 数据处理系统 (Waters 公司,美国)。质谱条件:电喷雾电离 (ESI)源;负离子电离模式,毛细管电离电压 2.5 kV ,取样锥孔电压 65 V ,离子源温度 100°C ,脱溶剂温度 250°C ,脱溶剂剂氮气流速 $400 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$,锥孔反吹氮气 Q_0 。四极杆质量扫描范围 $100 \sim 3000 \text{ m/z}$,碰撞室能量 5 V ,TOF 离子飞行方式采用 V 模式。

1.2.4 NMR 分析 将己二胺、寡糖和寡糖-己二胺溶解于重水 (D_2O) 中,采用 400 MHz NMR 仪 (Bruker 公司,德国)进行测定。 ^1H -NMR 的观测频率是 400.13 MHz , ^{13}C -NMR 的观测频率是 100.61 MHz , ^1H 90° 脉冲宽度为 $11.0 \text{ } \mu\text{s}$, ^{13}C 90° 脉冲宽度为 $7.8 \text{ } \mu\text{s}$ 。

1.2.5 寡糖-Affi-Gel 15 亲和探针的制备 Affi-Gel 15 用预冷的去离子水冲洗 3 遍,再用预冷的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液 [4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, HEPES] 冲洗平衡。寡糖衍生样品溶于 HEPES 缓冲液中,预冷至 4°C ,将寡糖与 Affi-Gel 15 混合,总体积 3 mL 左右, 4°C 振荡 4 h,然后每 1 mL Affi-Gel 15 加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘氨酸乙酯盐酸盐 ($\text{pH } 8.0$) 1 mL , 4°C 放置 1 h 来封阻未结合的位点。反应结束后用 HEPES 缓冲液冲洗介质至无糖出现,再用 $10 \sim 20 \text{ mL}$ Tris 缓冲液 ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $\text{pH } 8.0$, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠, $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镁)冲洗 Affi-Gel 15 并将其保存在 Tris 缓冲液中。

1.2.6 寡糖结合率的测定 采用苯酚-硫酸法检测上述洗脱液中的糖含量,用于测定寡糖结合率。

1.2.7 亲和探针与 bFGF 的结合 结合方法参考肝素/HIS 与 bFGF 的方法^[17,18]。方法如下:用 Tris 缓冲液 ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $\text{pH } 8.0$, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠, $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镁)配制 $0.1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 bFGF 溶液, $25 \text{ } \mu\text{L}$ 加入亲和材料, $250 \text{ } \mu\text{L}$ 混合均

匀, 4 ℃, 振摇 1~2 h 后, 将亲和材料转移至亲和小柱, 用 Tris 缓冲液充分冲洗, 再用 $0 \sim 2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液梯度洗脱, 收集氯化钠的洗脱液, 超滤至 20 μL , PAGE 电泳。

2 结果

2.1 标准寡糖-己二胺的合成

寡糖还原性末端的半缩醛在弱酸溶液中易与己二胺的氨基反应形成席夫碱。这一反应是可逆反

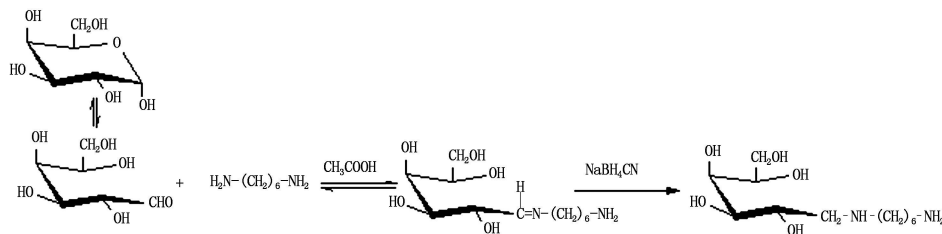


图 1 糖与己二胺的还原胺化

Fig 1 Reductive amination of carbohydrate by 1, 6- hexanediamine

理论上说, 己二胺的 2 个自由氨基都可以与寡糖还原性末端的半缩醛反应, 从而可能生成寡糖-己二胺和寡糖-己二胺-寡糖 2 种产物。实验结果(图 2)可以看到: 麦芽糖与己二胺反应之后, 其分子离子峰在负离子模式下从 340.89 变为 441.14 其中 340.89 为麦芽糖的分子离子峰(麦芽糖相对分子质量为 342), 反应后分子离子峰的增加值为 100。从上图的反应原理中可知, 寡糖-己二胺的相对分子质量比相应的寡糖多 100 而寡糖-己二胺-寡糖的相对分子质量比相应的寡糖多 200。因此, 在大过量己二胺的反应条件下, 绝大多数的标准糖都被己二胺还原胺化, 表现在质谱图中已经看不到麦芽糖的分子离子峰; 而且产物是寡糖-己二胺, 其己二胺残基末端保留 1 个自由氨基。

对于新卡拉二硫酸基四糖(NCD-4)的己二胺衍生化实验结果同样表明, NCD-4 的相对分子质量为 834 在负离子模式下, 其分子离子峰为 $[\text{M}-\text{Na}]$ 峰, m/z 为 810.79 而其产物的分子离子峰为 911.23 相对于底物的分子离子峰增加值为 100 说明该反应产物为 NCD-4-己二胺衍生物。

因此, 对于未知寡糖来说, 可以通过寻找反应底物与产物中分子离子峰差值为 100 的相互关系, 来确定底物与产物之间一一对应的关系。

应, 大过量的己二胺不仅能促使反应向右进行, 而且可以保证反应的己二胺只有一个氨基参与反应(本实验中寡糖和己二胺的物质的量的比是 1:500)。氰基硼氢化钠可专一地还原席夫碱中的双键, 而对糖中的碱基没有作用, 而且这一步还原反应是不可逆的, 因此最后得到稳定的寡糖-己二胺衍生物(图 1)。

2.2 K-卡拉胶寡糖及其己二胺衍生物的 LC-MS 分析

对于降解制备的卡拉胶寡糖进行 LCM S 分子, 从其总离子流色谱图(图 3)可以看到: 主要出现了 5 个色谱峰, 保留时间分别 0.70 1.85 5.56 6.80 8.08 min。

对于每个色谱峰进行质谱观察发现(图 4): 保留时间为 0.70 min 的色谱峰的质谱图没有明显可以归类的物质, 初步定为杂质干扰, 保留时间为 1.85 min 的色谱峰的质谱图中的主要质量峰为 403 和 422, 为卡拉胶二糖($M_r = 404$), 另外还有 1 个较小的质量峰为 259 与 G4S 的相对分子质量相吻合。保留时间为 5.56 min 的色谱峰的主要质谱峰为 709 和 727, 为卡拉胶四糖, 另外 1 个较小的质谱峰 565 对应于卡拉胶三糖。保留时间为 6.80 min 的色谱峰的主要质谱峰为 403 和 598, 判断该物质为卡拉胶六糖的二价分子离子峰。保留时间为 8.08 min 的色谱峰的主要质谱峰为 471, 判断为卡拉胶七糖的三价分子离子峰。负离子模式下 ESI-MS 质谱学的判断依据见表 1。结合总离子流色谱图, 我们认为: 采用本实验方法降解获得的 K-卡拉胶寡糖混合物中以卡拉胶二糖($M_r = 404$)为主, 同时还包括其他几个低聚度的卡拉胶寡糖。

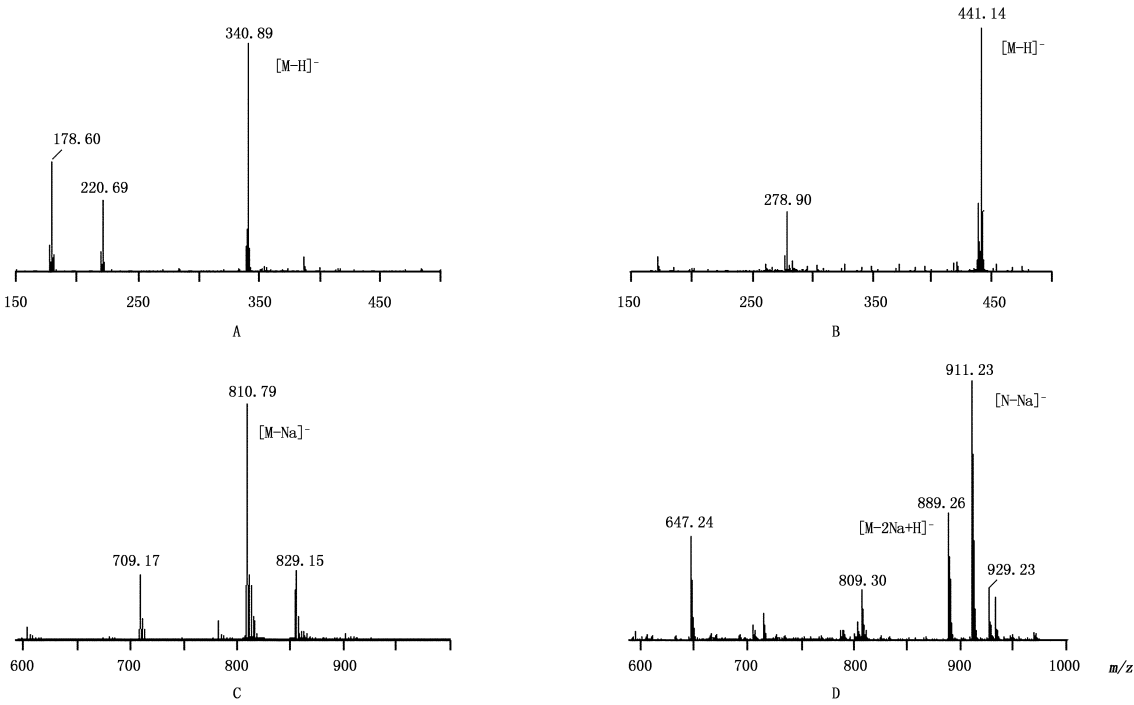


图 2 标准糖及其己二胺衍生物的 ESI-MS 谱图

Fig 2 ESIMS analysis of Standard oligosaccharides and derivatives with 1, 6- diaminohexane

A. 麦芽糖 (maltose) B 麦芽糖-己二胺 (maltose- 1, 6- diaminohexane) C. NCD- 4 D. NCD- 4- 己二胺 (NCD- 4- 1, 6- diaminohexane)

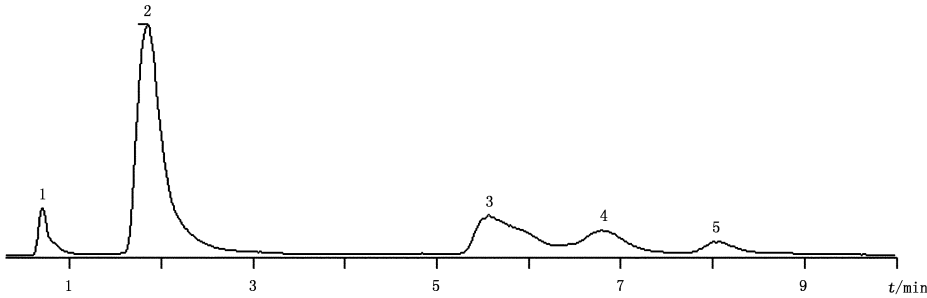


图 3 κ-卡拉胶寡糖的总离子流色谱图

Fig 3 Total ion current chromatogram (TIC) ofκ- carrageenan oligosaccharide

1 杂质 (impurity) 2 二糖 (disaccharide) 3 四糖 (tetrasaccharide) 4 六糖 (hexasaccharide) 5 七糖 (heptasaccharide)

表 1 κ-卡拉胶寡糖的 ESI-MS 分析结果*
Tab1 ESIMS analysis ofκ- carrageenan oligosaccharides

寡糖 (oligosaccharide)	质谱峰 (MS peak)	结构简式 (unit)	相对分子质量 (Mr)	分子离子或碎片离子 (ion)
杂质 (impurity)	4a	-	249	-
单糖 (monosaccharide)	4b	G4S	260	259(M-H) ⁻
二糖 (disaccharide)	4c	G4S-A	404	403(M-H) ⁻
	4d			421(M+H ₂ O-H) ⁻
三糖 (trisaccharide)	4e	G4S-A-G4S	646	565(M-SO ₃ -H) ⁻
四糖 (tetrasaccharide)	4f	G4S-A-G4S-A	790	709(M-SO ₃ -H) ⁻
	4g			727(M-SO ₃ -H+H ₂ O) ⁻
六糖 (hexasaccharide)	4h	G4S-A-G4S-A-G4S-A	11765	98(M-2Na) ²⁻
七糖 (heptasaccharide)	4i	G4S-A-G4S-A-G4S-A-G4S	1418	471(M-3H) ³⁻

* 质谱峰标注同图 4(MS peak identities as in Fig. 4)

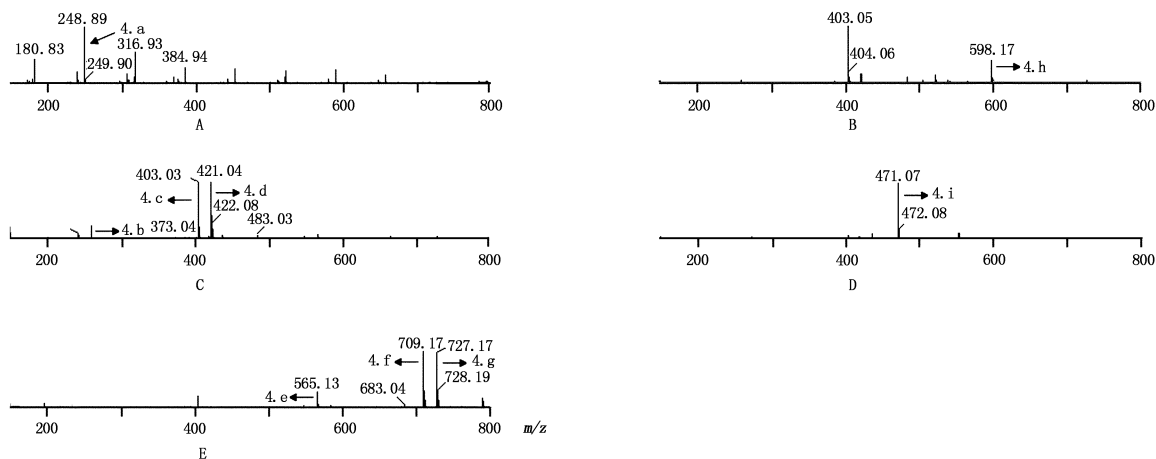


图 4 κ -卡拉胶寡糖的 ESI-MS 谱图

Fig 4 ESI/MS analysis of κ -carrageenan oligosaccharide

A. 杂质 (impurity) B. 二糖 (disaccharide) C. 四糖 (tetrasaccharide) D. 六糖 (hexasaccharide) E. 七糖 (heptasaccharide)

对于 κ -卡拉胶寡糖-己二胺产物进行 ESI-MS 分析, 得到的卡拉胶寡糖与己二胺反应物质谱图见图 5 质谱峰 m/z 248.90 怀疑是非糖杂质, 因为它在胶化反应前后没有发生变化; 359.14 和 503.19 应该分别是卡拉胶单糖-己二胺和卡拉胶二糖-己二胺的分子离子峰。因此, 可以说明, 经过己二胺的还原胺化, κ -卡拉胶寡糖已经转变成相应的 κ -卡拉胶寡糖-己二胺。其主要产物为卡拉胶二糖-己二胺衍生物。

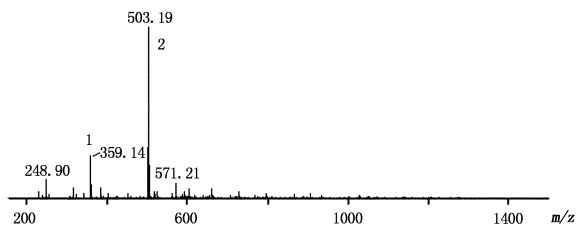


图 5 κ -卡拉胶寡糖-己二胺的 ESI-MS 谱图

Fig 5 ESI/MS analysis of κ -carrageenan oligosaccharide derivatives

1 单糖-己二胺 (disaccharide-1, 6-diaminohexane) 2 二糖-己二胺 (monosaccharide-1, 6-diaminohexane)

2.3 κ -卡拉胶寡糖及其己二胺衍生物的 NMR 结果分析

κ -卡拉胶寡糖的 ^{13}C -NMR 图谱 (图 6-A) 中, 可以看到 κ -卡拉胶寡糖特有的 12 个碳原子的化学位移值 (表 2 的实验值与文献值对照基本一致)。己二胺的 ^{13}C -NMR 图谱 (图 6-B) 则较为简单, 6 个碳在 3 个位置出现了明显的吸收峰: 41.38, 32.47, 26.78 ppm, 这和己二胺对称的结构是相符的。经过化学合成后的 κ -卡拉胶寡糖-己二胺的 ^{13}C -NMR 图谱 (图 6-C) 与上述两张 ^{13}C -NMR 图谱相比出现了 2 种较为明显的改变: (1) A1 96.4 的化学位移消失, 这说明寡糖中的还原端羟基已被反应掉了; (2) 己二胺中碳的化学位移的数量和位置都发生了明显的改变, 6 个碳原子的信号归属为: C1, 49.71; C2, 39.39; C3, 26.51; C4, 25.23; C5, 25.12; C6, 23.32, 这是由于己二胺与寡糖合成后改变了原来对称的结构。

表 2 κ -卡拉胶寡糖各碳原子的 ^{13}C -NMR 化学位移 (ppm)
Tab 2 ^{13}C -NMR chemical shifts of carbons of κ -carrageenan (ppm)

寡糖 (oligosaccharide)	糖单位 (unit)	1	2	3	4	5	6
文献值 [19] (literature values)	G	102.5	69.6	78.9	74.1	74.8	61.3
	A	95.3	69.9	79.2	78.3	76.8	69.5
实测值 (measured value)	G	102.3	69.9	77.3	74.1	74.7	61.1
	A	96.4	70.6	77.7	76.7	76.6	68.9

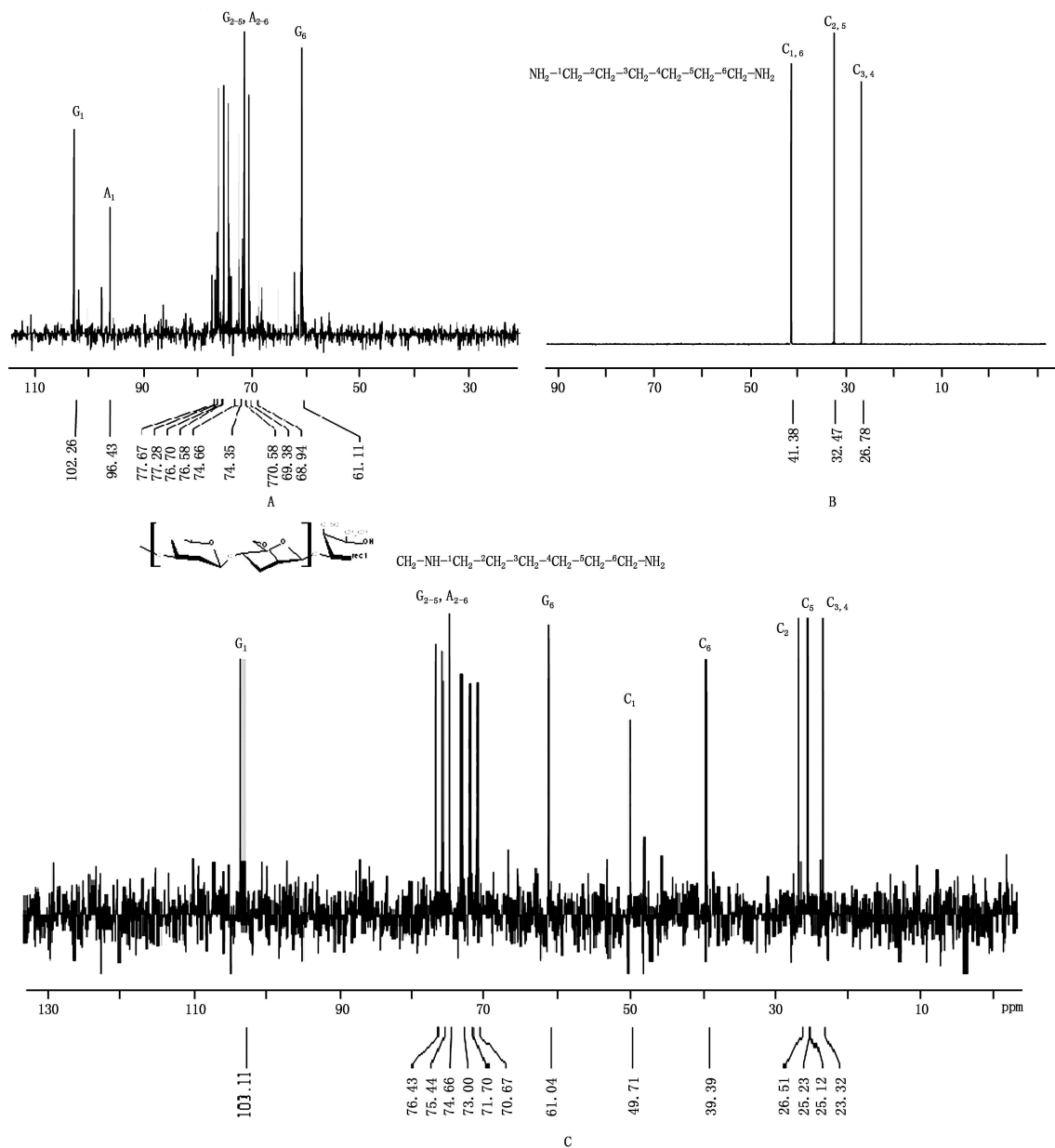


图 6 K-卡拉胶寡糖、己二胺和寡糖-己二胺的 ^{13}C -NMR图谱

Fig 6 ^{13}C -NMR analysis of K-carrageenan oligosaccharide, 1,6-diaminohexane and derivatives

A. K-卡拉胶寡糖 (K-carrageenan oligosaccharide) B. 己二胺 (1,6-diaminohexane) C. 寡糖-己二胺 (K-carrageenan oligosaccharide-1,6-diaminohexane)

2.4 寡糖-Affi-Gel15亲和探针的制备 寡糖-己二胺的己二胺残基末端具有自由的氨基, 因此可以与 Affi-G15结合, 其反应原理是 Affi-G15固相载体本身带有丁二酸内胺, 可以与有机胺发生置换反应(图 7)。因为在不同的离子条件下, Affi-Gel15与配体的结合率有差异, 因此本文探讨了离子条件对本实验的影响。实验结果显示, 这 3 种寡糖-己二胺与 Affi-G15的结合率在相同的反应条件下无明显的差异, 而且含有一定量 Ca^{2+} 的缓冲液可以提高 Affi-Gel15与寡糖的结合率(表 3)。

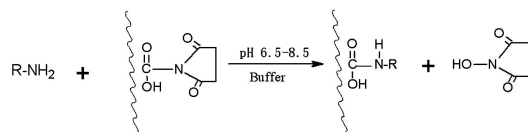


图 7 Affi-Gel15载体与配体反应

Fig 7 Coupling reaction of Affi-Gel15 supports with ligand containing free amino groups

表 3 寡糖-己二胺与 A ff- Gel 5 结合率 (%)

Tab 3 The binding ratios of the oligosaccharide derivatives and A ff- gel 15

反应条件 (reactin condition)	κ- 卡拉胶寡糖 (κ- carrageenan oligosaccharide)	NCD- 4	麦芽糖 (maltose)
0.1 mol/L HEPES pH 8.0	43	45	32
0.1 mol/L HEPES pH 8.0+ 80 mmol/L $CaCl_2$	68	73	64
0.1 mol/L HEPES pH 8.0+ 0.3 mol/L NaCl	46	39	42

3 讨论

A ff- gel 上的丁二酸内胺可以快速高效的与各种带有自由氨基的化合物共价结合, 包括各种胺、蛋白质以及多肽等。它已经广泛用于蛋白质的分离纯化中, 包括纯化酶、抗原、细胞信号通路中的特异性受体^[20~23]。为了寻找卡拉胶寡糖在信号通路中的特异性受体, 我们首次尝试将卡拉胶寡糖作为配基与 A ff- gel 结合制备特异性的亲和层析柱, 又考虑到卡拉胶寡糖不能直接与 A ff- gel 结合, 因此我们想到在寡糖与 A ff- gel 之间引入一“空间臂”, 这样不仅可以解决两者不能直接结合的问题还可以增加连接在 A ff- gel 上的寡糖的空间自由性。因为寡糖还原性末端的半缩醛能与胺反应形成稳定的化合物, 这已被大量的实验证明^[24,25], 又考虑到 A ff- gel 能与自由氨基反应, 因此我们选择了己二胺作为“空间臂”。实验结果表明, 在一定的反应条件下, 己二胺能与 κ- 卡拉胶寡糖发生完全稳定的反应而且己二胺- κ- 卡拉胶寡糖与 A ff- gel 也有较高的结合率。

已有实验证明卡拉胶寡糖可与碱性纤维生长因子 (bFGF)、转化生长因子-β₁ (TGF-β₁)、血小板衍生生长因子 (PDGF) 结合并竞争性的抑制肝素诱导的生长因子与其受体的结合^[26,27], 因此, 可以通过观察这种亲和探针与 bFGF 的结合来验证这种制备方法的可靠性。

bFGF 的结合能力极弱或不结合, 而 κ- 卡拉胶寡糖为配体的亲和探针具有一定的结合 bFGF 的能力。因此, 这一实验结果可以在一定程度上证明, 我们这种以 κ- 卡拉胶寡糖为配体的亲和探针的制备方法是成功的, 具有一定的结合 bFGF 的能力, 并且可以用于筛选其他混合蛋白质。

麦芽糖是以葡萄糖为单元的二糖, 而且不含硫酸基; 四糖的结构与 κ- 卡拉胶四糖结构相似, 每个分子含有两个硫酸基; 本实验中制取的 κ- 卡拉胶寡糖是一种以 κ- 卡拉胶二糖为主的混合寡糖。因此, 通过本实验结果, 我们推测, κ- 卡拉胶寡糖与 bFGF 的结合能力与其硫酸化相关, 而且较低的聚合度可能更有利于两者的结合。

参考文献

- 1 Tomas P. Synovial proliferation induced by polysaccharides. *Nature* 1960; 166: 251
- 2 Anderson W. Degraded carrageenan and duodenal ulceration in the guinea-pig. *Nature*, 1965, 206: 101
- 3 Anderson W. Intravenous degraded carrageenan and histamine gastric ulceration in the guinea-pig. *Nature*, 1965, 214: 823
- 4 WANG Chang-yun (王长云), GUAN Hua-shi (管华诗). Advances of researches on antiviral activities of polysaccharides I. Antiviral activities of polysaccharides (多糖抗病毒作用研究进展 I 多糖抗病毒作用). *Prog Biotechnol* (生物工程进展), 2000, 20(1): 3
- 5 WANG Chang-yun (王长云), GUAN Hua-shi (管华诗). Advances of researches on antiviral activities of polysaccharides II. Antiviral activities of sulfated polysaccharides (多糖抗病毒作用研究进展 II 硫酸多糖抗病毒作用). *Prog Biotechnol* (生物工程进展), 2000, 20(2): 17
- 6 WANG Chang-yun (王长云), GUAN Hua-shi (管华诗). Advances of researches on antiviral activities of polysaccharides III. Carrageenan and its antiviral activities (多糖抗病毒作用研究进展 III 卡拉胶抗病毒作用). *Prog Biotechnol* (生物工程进展), 2000, 20(3): 10
- 7 HU Zhi-peng (胡志鹏). Research advances in chitin oligosaccharides (壳寡糖的研究进展). *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 1999, 20(2): 99
- 8 ZHU Guo-fang (竺国芳), ZHAO Lu-hang (赵鲁杭). The progress about study of N-acetyl-chitin oligosaccharides and chito-

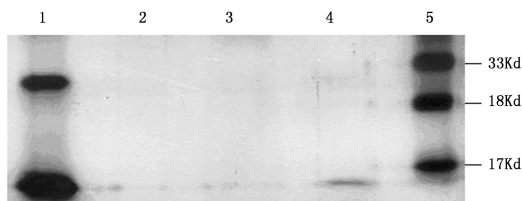


图 8 探针与 bFGF 结合后的 PAGE 结果

Fig 8 PAGE analysis after the reaction of probe and bFGF

1 bFGF 2 麦芽糖 (maltose) 3 NCD- 4 4 κ- 卡拉胶寡糖 (κ- carrageenan oligosaccharide) 5 Mark

bFGF 蛋白的分子质量为 17.2 kD, 电泳结果 (图 8) 显示 NCD- 4 和麦芽糖为配体的亲和探针与

- oligosaccharides(几丁寡糖和壳寡糖的研究进展). *Chin J Marine Drugs*(中国海洋药物), 2000(1): 43
- 9 LIANG Ai-ye(梁爱叶), DU Yu-guang(杜昱光), WANG Ke-yi(王克夷), *et al* Analysis of heparin and their oligosaccharide by capillary electrophoresis(肝素及其寡糖的毛细管电泳分析). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2004, 24(4): 448
- 10 Marconi W, Benvenuti F, Pozzi A. Covalent bonding of heparin to a vinyl copolymer for biomedical applications *Biomaterials* 1997, 18(12): 885
- 11 Michanetzis GPA, Kasala N, Misisirli YF. Comparison of haemocompatibility in provent of four polymeric biomaterials by two heparinization techniques *Biomaterials*, 2003, 24(4): 677
- 12 Luo Xianglin, Duan Yourong, Lin Hong. Study of covalently immobilizing heparin to polyethurethane surface. *J Biomed Eng*, 2000, 17(1): 16
- 13 Nascimento FD, Rizzi CC, Nantes IL, *et al* Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans *Arch Biochem Biophys*, 2005, 436(2): 323
- 14 MU Cheng-hua(穆成华), YAO Hong-juan(姚红娟), MA Hong-hui(马光辉), *et al* Preparation of heparin-agarose Gel 6FF and its application in the purification of antithrombin III(肝素-琼脂糖凝胶 6FF 的制备及其在抗凝血酶 III 分离纯化中的应用). *Chin J Process Eng*(过程工程学报), 2005(5): 545
- 15 CHEN Hai-min(陈海敏), YAN Xiao-jun(严小军), WANG Feng(王峰), *et al* In vitro anti-angiogenic action of λ -carrageenan oligosaccharides(λ -卡拉胶寡糖体外对血管生成的抑制作用). *Acta Pharm Sin*(药学报), 2007, 42(6): 595
- 16 Chen HM, Zheng L, Yan XJ. The preparation and bioactivity research of agar-oligosaccharides *Food Technol Biotechnol*, 2005, 43(1): 29
- 17 Eui Kyung Rgu, Ki Toon Cho, Jin Kwang Kim, *et al* Expression and purification of recombinant human fibroblast growth factor receptor in *Escherichia coli* *Protein Expr Puri*, 2006, 49: 15
- 18 Wu XP, Liu XJ, Xiao YC, *et al* Purification and modification by polyethylene glycol of a new human basic fibroblast growth factor mutant-hbFGFser^{25,87,92}. *J Chromatogr A*, 2007, 1161: 51
- 19 Usov AI, Shashkov AS. Polysaccharides of algae XXXIV: Detection of iota-carrageenan in *Phyllophora brodiaei* (Turn.) J Ag (Rhodophyta) using ¹³C-NMR spectroscopy. *Bot Mar*, 1985, 28: 367
- 20 William HP, Luyi G, Tanya M J. Preparation of immobilized swainsonine analogs on solid support *Tetrahedron Lett*, 2002, 43(12): 2175
- 21 Jinsen X, Hiroki T, Yukihiko S. One-step immunochromatographic separation and ELISA quantification of glycyrrhizin from traditional *Chin Medicines* *J Chromatogr B*, 2007, 850: 53
- 22 Caroline G, Marie-Pascale M. Immunolocalization of serotonin 5-HT₆ receptor-like material in the rat central nervous system. *Brain Res*, 1997, 746: 207
- 23 Miguel A J, Carolina GR, Factor J *et al* an inhibitor of the complement classical pathway: The quantitation by an ELISA inhibition assay in normal human serum. *Clin Biochem*, 1994, 27(3): 169
- 24 CHEN Hai-min(陈海敏), YAN Xiao-jun(严小军), ZHENG Li(郑立), *et al* HPLC analysis of agar-oligosaccharides profiles under different hydrolysis modes(不同水解模式下琼二糖多聚体的 HPLC 定量分析). *Chin J Marine Drugs*(中国海洋药物杂志), 2004, 23: 30
- 25 LI Fu-duan(李福川), QIN(戚欣), GENG Mei-yu(耿美玉). A novel method of immobilization of 911 for surface plasmon resonance biosensor(一种糖生物传感芯片制备的新方法). *Chin J Anal Chem*(分析化学研究报告), 2003, 3: 266
- 26 Akio S, Hiroshi M. Analysis of plasma proteins that bind to glycosaminoglycans *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1770: 241
- 27 Maradeas M, Samine K. Exploiting heparin-binding properties of MoMLV-based retroviral vectors for affinity chromatography. *J Chromatogr B*, 2007, 846: 124

(本文于 2008 年 4 月 17 日收到)