DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.10.015
第22卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 10
958 2000年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)10-0958-03

O-乙酰氨基半乳糖基化氨基酸的化学合成

周吉军,王祥智,吴玉章,贾正才,周 伟,边 疆 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 为获得精确定位糖基化糖肽,合成O-乙酰氨基半乳糖基化氨基酸,作为糖肽固相合成的原料。方法 利用环状糖结构的半缩醛羟基可与含侧链羟基氨基酸的羟基形成糖苷键,用化学方法,使过乙酰化GalNAc与氨基被9-Fluorenylmethoxycarbonyl(N-α-Fmoc)保护的丝氨酸或苏氨酸连接。结果 反应产物通过反相制备HPLC纯化后,可作为O-连接糖肽合成构建单位(Building blocks)在固相多肽合成仪上合成所需的病毒或肿瘤相关糖肽,并可进一步研究其生物学活性。结论 本法相对易操作,重复性好,收益率也较高,更重要的是糖基化的均一性好,对推动糖肽研究具有重要意义。

关键词:O-糖基化;糖肽合成;糖肽合成构建单位;高压液相色谱(HPLC)
中图法分类号:Q5;R392.1 文献标识码:A

Chemical synthesis of building blocks for O-linked synthetic glycopeptide

ZHOU Ji-jun, WANG Xiang-zhi, WU Yu-zhang, JIA Zheng-cai, ZHOU Wei, BIAN Jiang (Institute of Immunology PLA, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To obtain the exactly glycosylated peptide by glycosylated N-α-Fmoc serine and threonine were synthesized as the raw material for solid-phase glycopeptide synthesis. Methods The glycosylation of N-α-Fmoc serine or threonine with 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose (GalNAc) pentaacetate was carried out with BF_3 Et_2O and $SnCl_4$ as promoters in CH_2Cl_2 or CH_3CN. Results After purification with reversed-phase HPLC, the glycosylated N-α-Fmoc serine or threonine can be further used as the building blocks to synthesize viral or tumorous glycopeptide with solid-phase polypeptide synthesizor. Conclusion This method is easy to perform and with high repeatability and better yield, especially the glycosylation is well distributed.

Key words: glycosylation; glycopeptide synthesis; O-linked glycopeptide; building blocks for O-linked glycopeptide synthesis; RP-HPLC

糖基化修饰可对蛋白(肽)生物学活性产生重要影响。其中丝氨酸(Ser)和苏氨酸(Thr)残基的羟基糖基化,导致O-连接寡糖链成束地伸出肽链,可为免疫识别提供功能性决定簇[1,2]。但因精确定位糖基化糖肽的获得比较困难限制了糖肽生物学研究的发展,通过化学合成或酶促方法直接把寡糖连接到肽形成糖肽不能保证糖基化的精确性。而用糖基化氨基酸逐步合成糖肽则可靠性较高,精确性好,并易控制,可根据需要合成病毒或肿瘤相关糖肽,为糖肽药物化学及疫苗设计研究提供了新的研究手段,具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

分析纯乙酰氨基半乳糖(GalNAc)、BF_3 Et_2O、$SnCl_4$、乙酸酐购自Sigma公司;肽合成级N-α-Fmoc-Ser-OH和N-α-Fmoc-Thr-OH购自Advanced Chemtech公司;HPLC级CH_2Cl_2和CH_3CN购自PE公司。

1.2 实验方法

1.2.1 乙酰氨基半乳糖过乙酰化(A) 三角烧瓶中分别加入1.0 g GalNAc、10 ml CH_2Cl_2、10 ml 乙酸酐[$(CH_3CO)_2O$]及100 mg $SnCl_4$。室温,反应48 h(磁性搅拌),移入分液漏斗,加入

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39789010)

作者简介:周吉军(1967—),男,重庆市人,博士,讲师,主要从事表位糖基化与HBV特异性CTV应答方面的研究,发表论文6篇,现在附属西南医院全军感染病研究所。电话:(023)68754479

收稿日期:2000-09-04;修回日期:2000-09-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

20 ml CH_2Cl_2, 用超纯水中和乙酸酐至 pH 值为中性。分离 $CHCl_2$ 相, 旋转蒸发仪抽干。加入乙醚, 搅拌至结晶析出, 抽干, 电子天平称量后, －20 ℃保存, 备用。

1.2.2　N-α-Fmoc 保护氨基酸糖基化(B)　　三角烧瓶中加入过乙酰化 GalNAc(130 μmol)和 N-α-Fmoc 保护氨基酸(Ser 或 Thr, 155 μmol分别溶于 2 ml 无水 CH_2Cl_2 和 1.5 ml 无水 CH_3CN 中)。加入 BF3 Et2O 390 μmol 或 $SnCl_4$ 170 μmol, 磁性搅拌。反应过程中, 硅胶板薄层色谱(TLC)监测反应(隔 10 min 监测 1 次), 扩展剂为石油醚∶乙酸乙酯∶甲醇(ψ_B= 6∶3∶1), 显色剂为 8%的磷钼酸。反应约 60～90 min, 当游离过乙酰化 GalNAc 被消耗完后, 20 ml CH_2Cl_2 稀释, 移入分液漏斗, 用 1 mol/ L HCl 50 ml 洗涤3 次。分离 CH_2Cl_2 相, 无水硫酸钠干燥 4 h, 过滤后抽干至约10 ml。

1.2.3　反相 HPLC 纯化　　使用 Waters 600 HPLC 仪, 使用 C_{18} 柱(C_{18} column, 20×250 mm), 流动相为 0.1%TFA(三氟乙酸)水溶液/ 0.1%TFA 的 CH_3CN 溶液(ψ_B= 55∶45)。旋转蒸发仪真空抽干, 收集结晶物, 电子天平称量, －20 ℃保存, 备用。

2　结果

2.1　GalNAc 过乙酰化反应

1 g(4.52 mmol) GalNAc 过乙酰化后, 获得 0.78 g(2.0 mmol)过乙酰化乙酰氨基半乳糖, 收益率为 44.2%。

2.2　硅胶板薄层色谱(TLC)结果

见图 1, 其中 0 为点样点, 1 为过乙酰化 GalNAc 点, 反应约 60 min 后, 随逐渐消耗, TLC 上该点逐渐消失。2 为 N-α-Fmoc 氨基酸点, 3 为糖基化 N-α-Fmoc 氨基酸点。经计算比移(Rf)值(样品扩展距离/溶剂扩展距离), 过乙酰化 GalNAc、N-Fmoc-ser、糖基化 N-Fmoc-Ser、N-Fmoc-Thr、糖基化 N-Fmoc-Thr 分别为 0.41、0.68、0.78、0.60、0.70。

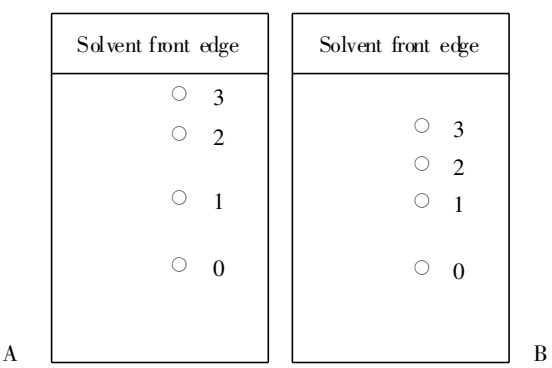


图 1　糖基化反应 TLC 图

Fig 1　The TLC map of the glycosylation reaction

A: N-α-Fmoc-Ser; B: N-α-Fmoc-Thr

2.3　糖基化产物的收益率

不同溶剂和催化剂, 过乙酰化 GalNAc 糖基化 N-α-Fmoc-Ser 和糖基化 N-α-Fmoc-Thr 的收益率, 见表 1。

2.4　反相 HPLC 色谱图

N-α-Fmoc-Ser 过乙酰化 GalNAc 糖基化反应反相 HPLC 色谱图, 纯化前保留时间为 3.577 min 的峰为糖基化氨基酸, 保留时间为 2.786 min 的峰为未糖基化氨基酸, 此时流动相流速为 2 ml/ min, 见图 2。纯化后保留时间为 6.744 min 峰为糖基化 N-α-Fmoc-Ser, 峰形显示比较均一。此时流动相流速 1 ml/ min, 少数杂峰为溶剂峰, 见图 3, N-α-Fmoc-Thr糖基化的 HPLC 色谱图与 N-α-Fmoc-Ser 类似, 在此省略。

表 1　溶剂和催化剂对 N-α-Fmoc 保护 Ser 或 Thr 过乙酰化 GalNAc 糖基化反应的影响

Tab 1　The influence of solvent and promoter to yield of glycosylation reaction

Promoter	Solvent	Yield(%)	
		Glycosylated N-α-Fmoc-Ser	Glycosylated N-α-Fmoc-Thr
BF3α Et2O	CH_2Cl_2	57	54
BF3α Et2O	CH_3CN	53	51
$SnCl_4$	CH_2Cl_2	38	36
$SnCl_4$	CH_3CN	35	30

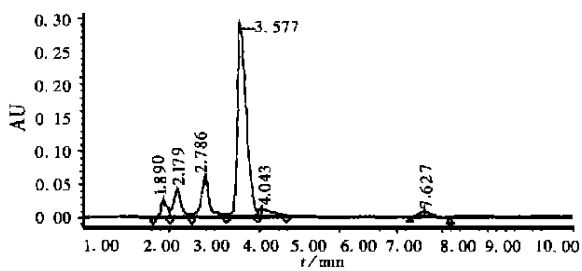


图 2　N-α-Fmoc-Ser 过乙酰化 GalNAc 糖基化反应制备 RP-HPLC 色谱图

Fig 2　The RP-HPLC chromatogram of pentaacetated GalNAc glycosylation reaction to N-α-Fmoc-Ser (flow-phase speed is 2 ml/ min)

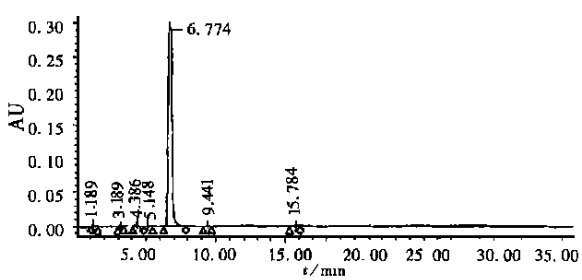


图 3　经制备 RP-HPLC 纯化后的 N-α-Fmoc-Ser 色谱图

Fig 3　The RP-HPLC chromatogram of purified pentaacetate GalNAc glycosylated N-α-Fmoc-Ser (flow-phase speed is 1 ml/ min)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

糖的种类和数目的变化(形成寡糖或多糖)、糖的异构性以及糖苷键所处位置不同,决定了糖蛋白上糖的多样性,也导致了糖蛋白的结构多样性和生物学活性的变化。其中丝氨酸和苏氨酸残基的羟基糖基化,导致O-连接寡糖链成束地伸出肽链,可为免疫识别提供多价糖抗原,也可形成病毒功能性决定簇及病毒或肿瘤免疫逃避的结构基础。

蛋白糖基化与多种疾病相关,病毒表面蛋白均为糖蛋白,由宿主细胞内质网经翻译后修饰糖基化,因此不易与宿主糖蛋白区别,如HIV、HBV、流感病毒等,它们所具有的免疫逃避特性,很可能与其表面蛋白糖基化有关。肿瘤细胞也可能利用其异常糖基化结构逃避机体免疫监视和免疫识别。因此研究糖基化对抗原表位活性影响具重要意义。

天然提取糖肽因糖基精确鉴定比较困难限制了上述相关研究的发展,肽的直接糖基化目前不能令人满意,因为通过化学或酶促方法糖基化不能保证糖所连接位置的准确性和连接数量的均一性,重复性也较差。利用环状糖结构的半缩醛羟基可与含侧链羟基氨基酸的羟基形成糖苷键,用化学方法,使过乙酰化GalNAc C1上羟基与N-α-Fmoc保护的丝氨酸或苏氨酸羟基连接,通过反相制备HPLC纯化后,作为O-连接糖肽合成构建单位,用于固相肽合成,可合成各种O-糖基化糖肽。本研究所选用目标糖GalNAc在病毒和肿瘤糖蛋白抗原中广泛存在[3]。

用于固相糖肽合成的糖基化氨基酸的保护基团必须精心选择,因为糖苷键具酸不稳定性,笔者采用的比较简便的糖过乙酰化不仅保护糖的羟基,而且在固相合成的酸性条件下,起加固糖苷键作用。

反相HPLC色谱图(图2)显示糖基化的N-Fmoc氨基酸(保留时间为3.577 min)与未糖基化的N-Fmoc氨基酸(保留时间为2.786 min)明显区别开来,且从峰形看,糖基化的均一性较好,这不仅有助于分离纯化,更重要的是经纯化制备后,能达到固相多肽合成仪所要求的纯度。

该合成路线重复性好,与国外同类研究比,相对易操作,收益率也较高(国外在30%~40%),更重要的是糖基化的均一性好,这就能保证所合成糖肽的质量。另外,发现BF3 Et2O具较高催化效率。

参考文献:

[1] Haurum J S, Tan L, Arsequell G, *et al*. Peptide anchor residue glycosylation: effect on class I major histocompatibility complex binding and cytotoxic T lymphocyte recognition[J]. Eur J Immunol, 1995, 25(12): 3 270—3 276.

[2] Jensen T, Galli Stampino L, Mouritsen S, *et al*. T cell recognition of Tn-glycosylated peptide antigens[J]. Eur J Immunol, 1996, 26(6): 1 342—1 349.

[3] Apostolopoulos V, Pietersz G A, Xing P X, *et al*. The immunogenicity of MUC1 peptides and fusion protein[J]. Cancer Lett, 1995, 90(1): 21—26.

(编辑 汪勤俭)

(上接953页)

诱发酮症酸中毒[2]。因此,必须严密监测血糖,我们采用袖珍血糖仪,监测患者三餐前后及睡前血糖,以便及时调整胰岛素的用量,使血糖控制在正常范围内。

2.4 作好健康宣传教育

患者是1名农民,既往曾有"磺胺"、"去痛片"等药物过敏史。由于文化水平低,医学知识了解少,病急乱投医,以至造成病情加重。该患者属过敏体质,应告诉其致敏药物的名称并写在门诊病历上,今后用药时应谨慎。并让患者了解糖尿病的基本知识,平时多加强运动,注意控制饮食,遵医嘱服药。

通过对患者进行皮肤护理,实行保护性隔离,严密监测血糖及健康宣教,该患者入院16 d后康复出院。

关键词:糖尿病/并发症;表皮坏死性药疹/护理
中图法分类号:R587.2 文献标识码:B

参考文献:

[1] 于学红.别嘌呤醇致大疱性表皮坏死松解型药疹1例[J].临床皮肤科杂志,1999,28(2):139.

[2] 荣 文.糖尿病与感染[A].见:董砚虎,钱荣立 主编.糖尿病及其并发症当代治疗[M].济南:山东科学技术出版社,1994.92—98.

(编辑 汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net