

CGE-LIF进行支链淀粉分支结构中葡萄糖平均聚合度的分析

The degree of glucose polymerization in branch structure of amylopectin was analyzed by CGE-LIF

高铁, 兰朝辉, 陈泓序, 郭立海

Gao Tie, Lan Zhaohui, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX, 中国

SCIEX, China

Key word: CGE-LIF, 支链淀粉, 葡聚糖, 平均聚合度

1. 前言

淀粉是由葡萄糖分子聚合而成的多糖链, 基本构成单位为 α -D-吡喃葡萄糖, 由支链淀粉和直链淀粉组成, 其中直链淀粉是长直链, 通过 α -1,4-糖苷键连接, 分子量在3-16万范围内, 相当于200-980个葡萄糖单元连结而成, 如图1; 支链淀粉结构复杂, 分量也更大, 在10-100万范围内, 相当于600-6000个葡萄糖单元连结而成, 支链淀粉具有多个分支, 分支通过 α -1,6-糖苷键连接, 分支的数量在50以上, 整个支链淀粉形如树枝状, 如图2 (其中红色标注位置为异淀粉酶的切割位点)。支链淀粉分支结构中葡萄糖的平均聚合度一直是淀粉结构研究的热点, 其中聚合度 (Degree of Polymerization, DP) 代表了糖链中糖的数量 (及糖链长度), 而平均聚合度代表的是在不同长度的糖链混合样品中聚合度的平均值 (计算公式可参考结果部分)。分支结构链长分布的传统方法通常依靠分子排阻方式进行分离^[1], 依靠折射率和光散射进行检测。然而这些方法对于不同长度分支结构的分辨率略差, 并且以分子量为基础的检测手段灵敏度较差。同样有报道利用阴离子交换高效液相色谱系统匹配安培检测器和成像电泳匹配荧光检测器进行分支结构链长分析^[2], 但这两种方法都不能很好地解决淀粉中糖链长度范围分析中遇到的分辨率和定量问题。

使用异淀粉酶将淀粉中的分支结构切割下来。分支结构的还原末端通过还原胺化反应标记上荧光染料 (8-amino-1,3,6-pyrenesulfonic acid, APTS), 通过PA800 Plus药物分析系统 (图3) 结合激光诱导荧光检测器 (LIF) 进行支链淀粉分支结构链长的检测, 并计算平均聚合度。该方法在1-100多葡萄糖链的长度范围内均可提供良好的分离度, 可实现一个单元葡萄糖的分离, 考察分支结构的平均聚合度, 并且超高灵敏度的LIF检测器为后续的定位工作提供了更优质的支持。

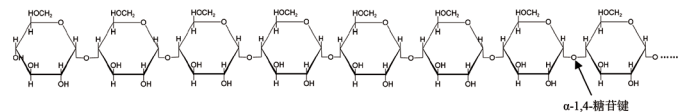


图1. 直链淀粉的结构示意图

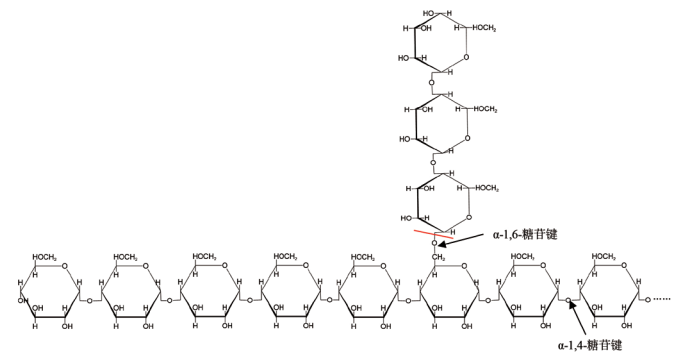


图2. 支链淀粉的结构示意图 (红色为异淀粉酶切割位点, 可将支链淀粉的分支切割下来)



图3. PA800 Plus药物分析系统和糖标记及分析试剂盒

2.1. 试剂、方法和样品

试剂耗材：糖标记及分析试剂盒（SCIEX, PN477600），包含APTS（SCIEX, PN 501309, 5 mg）、分离凝胶（SCIEX, PN 477623, 56 mL）、N-CHO涂层毛细管（SCIEX, PN 477601, 50 μm I.D.）和葡萄糖梯度标准品（G20, 50 mg），醋酸（Sigma-Aldrich, PN 695092），1 M溶于THF的氰基硼氢化钠（Sigma-Aldrich, PN296813），二次去离子水（Millipore）。

样品：葡萄糖梯度标准品（G20），异淀粉酶处理后的蜡质玉米淀粉粉末（异淀粉酶的作用是：水解支链淀粉分支的α-1,6-糖苷键，切下整个分支）。

2.2. 样品前处理方法

取100 μL 15% (v/v) 的醋酸溶解5 mg APTS，涡旋充分溶解后标记为APTS工作溶液。

G20标准品制备：取5 mg G20标准品溶于80 μL二次去离子水中，取溶解好的G20标准品2 μL，添加2 μL 1M溶于THF的氰基硼氢化钠，再添加2 μL APTS工作溶液，进行充分混合，60 °C孵育4 h，添加96 μL二次去离子水终止标记反应，样品可于-80 °C冻存3个月。

样品制备：取100 μg异淀粉酶处理后的蜡质玉米淀粉粉末，加5 μL APTS工作溶液与10 μL 15% 冰醋酸和5 μL 1M溶于THF的氰基硼氢化钠，充分涡旋混合，60 °C孵育4 h，添加500 μL二次去离子水终止标记反应，样品可于-80 °C冻存3个月。

标记反应流程如图4。

2.3. 仪器及方法

PA800 Plus药物分析系统匹配LIF检测器（SCIEX）。N-CHO涂层毛细管：40/50 cm(有效/总长度)，50 μm 内径；分离条件：-30 kV，20 min；进样条件：0.5 psi，5 s；毛细管温度：20 °C；样品室温度：10 °C；LIF检测器：488 nm（激发波长），520 nm（发射波长）。毛细管电泳分离步骤及详细参数设置如图5。

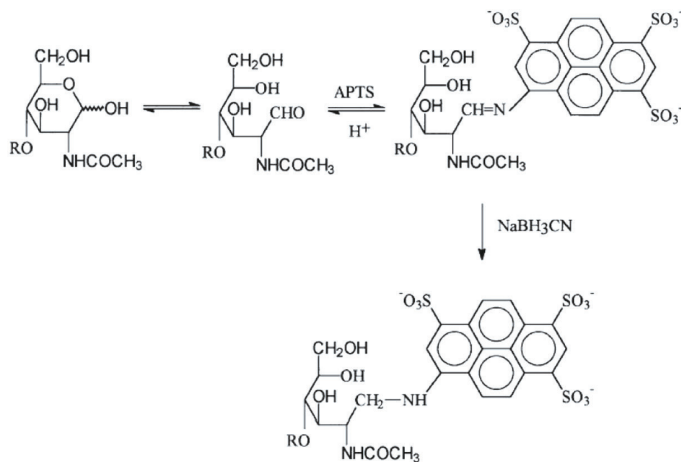


图4. APTS的标记反应

2. 结果

G20标准品与异淀粉酶处理后的脱支淀粉样品分别进行CGE-LIF分析，结果如图4。G20标准品为不同葡萄糖聚合物，最小的聚合度为一个葡萄糖，葡萄糖的数量以聚合度表示（DP）；通过与G20标准品的对比，发现异淀粉酶处理后的蜡质玉米淀粉样品的第一个峰聚合度为6，后面的聚合度逐步增加，每个峰之间的差异即为一个葡萄糖单元。

根据样品中每个峰的迁移时间、峰面积、聚合度等参数，可以计算平均聚合度，公式为

$$\text{校正峰面积 } A_i = \frac{\text{峰面积} \times \text{毛细管有效长度(cm)}}{\text{迁移时间}} \dots\dots(1)$$

$$\text{校正峰面积百分比 } A_i \% = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^n A_i} \times 100 \dots\dots(2)$$

$$\text{平均聚合度} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{各峰的聚合度} \times A_i \%}{100} \dots\dots(3)$$

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	Rinse - Pressure	30.0 psi	3.00 min	BI:B1	BO:B1	forward, In / Out vial inc 20	Gel Buffer-N rinse to clean capillary surface - Automatic increment every 20 cycles
2	Inject - Pressure	0.5 psi	5.0 sec	SI:A1	BI:C1	Override, forward	Sample introduction
3	Wait		0.20 min	BI:A4	BO:A4	In / Out vial inc 20	ddH2O dip to clean capillary tips - Automatic increment every 20 cycles
4	Separate - Voltage	30.0 kV	20.00 min	BI:C1	BO:C1	0.17 Min ramp, reverse polarity, In / Out vial inc 20	Separation - Automatic increment every 20 cycles
5	Autozero						
6	20.00	Stop data					

图5. 毛细管电泳分离的时间程序

经过计算，可以确认该样品的聚合度分布在6-32，且峰之间的分离度均大于3，计算得到该样品的平均聚合度为15.24。

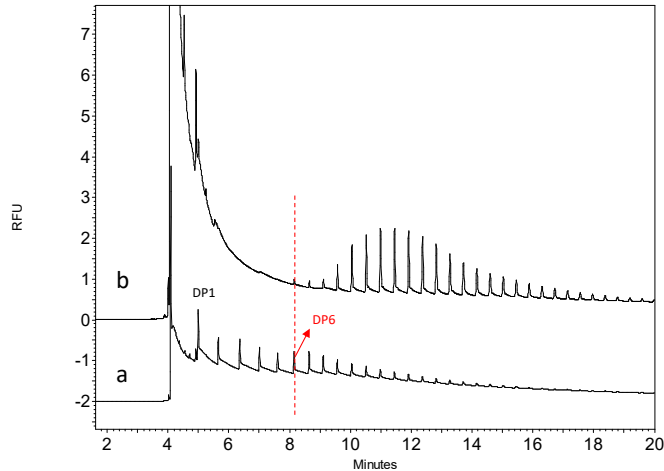


图4. G20标准品与脱支淀粉样品的CGE-LIF结果（DP1表示一个葡萄糖，DP6表示6个葡萄糖聚合）；a. G20标准品，b. 异淀粉酶处理后的蜡质玉米淀粉样品。

表1. 样品中各峰的迁移时间、峰面积、分离度等信息及平均聚合度结果

名称	时间	峰面积	分离度	聚合度	校正峰面积	校正峰面积百分比	含量
DP6	8.15	37222.00	0.00	6.00	228355.83	0.89	5.33
DP7	8.65	37857.00	9.42	7.00	218826.59	0.85	5.96
DP8	9.11	105901.00	5.88	8.00	581234.91	2.26	18.08
DP9	9.57	192931.00	5.73	9.00	1007998.96	3.92	35.28
DP10	10.05	363036.00	8.12	10.00	1806149.25	7.02	70.24
DP11	10.52	465512.00	7.81	11.00	2212509.51	8.60	94.64
DP12	10.99	529761.00	7.58	12.00	2410195.63	9.37	112.47
DP13	11.45	549123.00	7.19	13.00	2397917.03	9.32	121.22
DP14	11.92	547579.00	6.95	14.00	2296891.78	8.93	125.05
DP15	12.38	520788.00	6.63	15.00	2103344.10	8.18	122.69
DP16	12.82	476931.00	6.22	16.00	1860105.30	7.23	115.74
DP17	13.28	405840.00	5.87	17.00	1528012.05	5.94	101.02

名称	时间	峰面积	分离度	聚合度	校正峰面积	校正峰面积百分比	含量
DP18	13.72	341079.00	5.35	18.00	1242999.27	4.83	87.01
DP19	14.16	301107.00	5.07	19.00	1063230.93	4.13	78.56
DP20	14.60	272586.00	4.86	20.00	933513.70	3.63	72.60
DP21	15.03	244594.00	4.54	21.00	813685.96	3.16	66.45
DP22	15.45	208114.00	4.46	22.00	673508.09	2.62	57.62
DP23	15.88	168655.00	4.48	23.00	531029.60	2.07	47.50
DP24	16.30	137551.00	4.43	24.00	421935.58	1.64	39.38
DP25	16.73	111213.00	4.39	25.00	332375.97	1.29	32.31
DP26	17.14	89860.00	4.40	26.00	262135.36	1.02	26.50
DP27	17.55	74367.00	4.35	27.00	211871.79	0.82	22.25
DP28	17.97	60693.00	4.28	28.00	168873.12	0.66	18.39
DP29	18.38	50318.00	4.23	29.00	136882.48	0.53	15.44
DP30	18.79	41824.00	4.10	30.00	111293.24	0.43	12.98
DP31	19.19	35065.00	3.97	31.00	91362.69	0.36	11.01
DP32	19.60	26971.00	3.91	32.00	68803.57	0.27	8.56
平均聚合度							15.24

3. 结论

该毛细管凝胶电泳（CGE-LIF）方法具有如下特点：

- **高效分离：**可实现单个葡萄糖差异的分离。
- **操作方便：**具有商品化的毛细管、染料和分离凝胶。
- **实用性强：**可有效评估支链淀粉分支结构的葡聚糖链分子大小和分布情况，考察平均聚合度。

参考文献

- [1] Hizukuri, S., Carbohydr. Res. 1985, 141, 295-306.
- [2] Koizumi, K., Kubota, Y., Tanimoto, T., Okada, Y., J. Chromatogr. 1989, 464, 305-373.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-32207-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：SCIEX-China