

文章编号:1673-1689(2005)05-0038-04

大肠杆菌产生的聚唾液酸的结构

郑志永, 詹晓北*, 吴剑荣, 朱莉

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 研究了大肠杆菌产生的聚唾液酸的分子结构, 对聚唾液酸的分子基团特征进行了红外光谱分析, 研究了聚唾液酸糖苷键的连接方式和构型. 发酵液中的聚唾液酸经超滤浓缩、有机沉淀和离子交换层析处理, 得到高纯度的聚唾液酸. 经¹³C-NMR 分析和比较, 表明所得到的聚唾液酸是一种 α -2,8 糖苷键连接的同聚物.

关键词: 聚唾液酸; ¹³C-NMR; 红外光谱; 大肠杆菌

中图分类号: Q 959.216.106

文献标识码: A

Structure Analysis of Polysialic Acid in *Escherichia coli*

ZHENG Zhi-yong, ZHAN Xiao-bei*, WU Jian-rong, ZHU Li

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The structure of polysialic acid was investigated with infrared spectra and ¹³C-NMR methods. The polysialic acid was purified from *Escherichia coli* broth with ultrafiltration, organic solvent precipitation and ion-exchange chromatography. The group characteristics of the polysialic acid were confirmed with infrared spectra and identified with that of standard sample. The polysialic acid in *E. coli* K-235 was identified as α -2,8 glycosidic linkage homopolymer of N-acetyl-neuraminic acid.

Key words: polysialic acid; ¹³C-NMR; infrared spectra; *Escherichia coli*

聚唾液酸(Polysialic acid)是 N-乙酰神经氨酸以 α -2,8 和(或) α -2,9 键连接的同聚物^[1], 1959 年 Barry 和 Goebel^[2] 首先在大肠杆菌 K235 发酵液中发现, 之后又发现在其他一些菌株如脑脊髓膜炎双球菌和沙门氏菌^[3] 中也存在. 聚唾液酸可以作为药物的缓释剂^[4], 可以用作酶固定化的介质并应用于临床诊断, 还可以用作治疗一些疾病的疫苗. 聚唾液酸水解后得到的唾液酸是合成抗流感药物 Zanamivir(N-乙酰基-2,3-二去氧-4-胍基唾液酸)和 Tamiflu(GS4071)的前体物质^[5].

Apurba^[6] 研究了脑脊髓膜炎双球菌 B 和 C 血清型菌株产生的聚唾液酸结构, 用核磁共振¹³C 谱进行分析, 证明 B 型血清型菌株产生的聚唾液酸的连接方式为 α -2,8 糖苷键, 而 C 型血清型菌株产生的是 α -2,9 糖苷键连接的聚唾液酸. 之后, Egan^[7] 等对大肠杆菌 Bos-12 所产的聚唾液酸的结构进行研究, 发现一种含有 α -2,8 和 α -2,9 间隔的连接方式. 作者所在实验室选育了一株高产聚唾液酸的大肠杆菌菌株^[8], 为确认所合成的聚唾液酸的糖苷键连接方式, 对其分子结构进行了研究.

收稿日期: 2004-12-23; 修回日期: 2005-01-24.

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK99190)资助课题.

作者简介: 郑志永(1973-), 男, 浙江临海人, 工学博士. * 责任作者.

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

菌种:大肠杆菌 *Escherichia coli* K235-WXJ4 (作者所在实验室保藏号)。

种子培养基(组分 g/L):牛肉膏 3,胰蛋白胨 10,NaCl 5,pH 值 7.1~7.2(灭菌后)。若用于固体培养基,加入 15~20 g/L 琼脂。

发酵培养基(组分 g/L):山梨醇 30,NH₄Cl 5,MgSO₄ 0.6,胰蛋白胨 0.4,K₂HPO₄ · 3H₂O 20,pH 值 7.1~7.2(灭菌后)。

培养方法:在 15 L 的全自动发酵罐 Biostat C10-3(德国 Braun 公司)中培养,装液量为 9 L,温度 37 ℃,搅拌转速 400 r/min,通气量 1.5 L/(L · min),培养 48 h。

超导核磁共振仪 DPX-400(瑞士 Bruker 公司制造)由中科院上海有机化学研究所提供;AKTA-Explorer 快速纯化系统(瑞典 Pharmacia 公司制造);红外光谱仪 IR-440(日本岛津公司制造);争光 TD013 树脂(杭州争光树脂厂提供)。

1.2 实验方法

1.2.1 聚唾液酸的纯化 发酵液中加入一定量的饱和氯化钙溶液,离心去除沉淀,上清液用超滤装置(截留相对分子质量为 10 000)进行浓缩,在浓缩液中慢慢流加入 5 倍体积 95%的乙醇,搅拌后静置 6 h,离心得到沉淀物,再用体积分数 75%的乙醇洗涤、离心 3 次;将得到的聚唾液酸沉淀溶解于去离子水中,加入硫酸铵使之达到 50%的饱和度,静置后离心去除蛋白质沉淀,取上清液再用 Sevag 试剂去除蛋白质,之后用透析膜透析 48 h,透析液再经过阳离子交换柱(争光 TD013,10 mm × 800 mm)进行脱色和去除阳离子,泵入 63 mL 去离子水淋洗,收集洗脱液后再经冷冻真空干燥,得到纯度较高的聚唾液酸粉末。

1.2.2 聚唾液酸的精制 以 25 mmol/L pH 7.2 的磷酸缓冲液平衡 DEAE-Sephadex A-75 填充柱(10 mm × 150 mm)。将所得到的聚唾液酸粉末溶解于 15 mmol/L pH 8.0 的磷酸缓冲液中,上样后以 5 个柱体积平衡缓冲液洗涤填充柱,以 0~0.5 mol/L 的 NaCl 磷酸缓冲液线性梯度洗脱,分部收集洗脱液,测定聚唾液酸含量。收集含有聚唾液酸的洗脱液,透析(截留相对分子质量为 10 000)24 h,冷冻干燥后得到高纯度的聚唾液酸粉末。

1.2.3 聚唾液酸定量测定 间苯二酚显色法^[9]。

1.2.4 聚唾液酸的结构鉴定

1) 红外光谱鉴定:测试范围为 4 000~400 cm⁻¹,KBr 压片。

2) 核磁共振鉴定:聚唾液酸溶解于 35 ℃ D₂O 中(pH 值 7.0),质量浓度 80 mg/mL,¹³C-NMR Bruker DXP-400,在 400 MHz 下操作。

2 结果与amp;讨论

2.1 聚唾液酸纯化

由于发酵液中含有较高浓度的磷酸盐,与加入的氯化钙形成沉淀,离心去除磷酸钙沉淀。超滤不仅可以浓缩所得到的上清液,而且可以脱除上清液中的盐分和小分子色素物质,能有效减轻后续分离过程的负担。加入乙醇使聚唾液酸、蛋白质等大分子物质沉淀下来,而去除一些小分子杂质。分别以硫酸铵沉淀法和 Sevag 试剂法去除大部分蛋白。再经过阳离子柱脱色和吸附除去阳离子类的杂质后,冷冻干燥得到聚唾液酸,经测定其纯度为 95.7%,蛋白质几乎完全去除。

2.2 唾液酸的精制

用 NMR 分析聚唾液酸结构,需要得到高纯度的聚唾液酸粉末。为进一步去除杂质和精制聚唾液酸,用 DEAE-Sephadex A-75 对聚唾液酸样品进行分离。DEAE-Sephadex A-75 兼有离子交换和分子筛的作用,能够得到相对分子质量分布比较集中的聚唾液酸。透析去掉磷酸盐和氯化钠,冷冻干燥得到聚唾液酸,经测定其纯度达到 98%以上。

2.3 聚唾液酸的红外光谱鉴定

对分离得到的聚唾液酸进行红外光谱分析,所得的红外光谱(见图 1)与文献^[10]报道一致。聚唾液酸红外光谱在 3 744 cm⁻¹处有宽而强的吸收,示有—OH 的 O—H 键和—NH—的 N—H 键伸缩振动;在 1 684 cm⁻¹处有中强吸收,示有—COO⁻和—NHCOCH₃的 C—O 键的伸缩振动和非对称伸缩振动,以及 N—H 键的弯曲振动;在 1 402 cm⁻¹处有中等吸收,示有—COO⁻的 C—O 键伸缩振动和 C=O 的对称伸缩振动;在 1 112 cm⁻¹处有强吸收,示有 C—O—C(糖环)的伸缩振动。这些基团均为乙酰氨基多糖的特征基团。

2.4 聚唾液酸的¹³C-NMR 鉴定

聚唾液酸是 N-乙酰神经氨酸的线性聚合物,其单体之间连接的糖苷键主要有 3 种不同方式,即 α-2,8、α-2,9 或 α-2,8/α-2,9 混合连接。对精制的聚唾液酸进行¹³C 核磁共振分析,所得谱图见图 2。经比较,大肠杆菌 K235-WXJ4 所产的聚唾液酸的¹³C-NMR 谱与文献^[6,7]报道的 α-2,8 糖苷键连接的

聚唾液酸¹³C-NMR谱相一致。

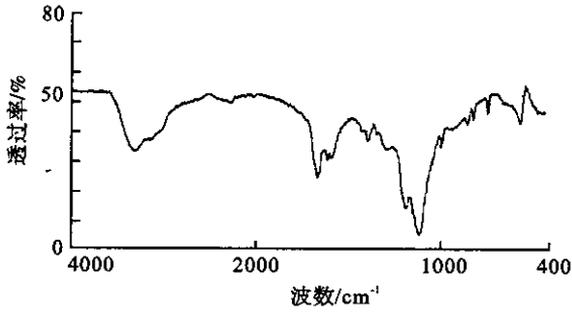


图1 聚唾液酸的红外光谱

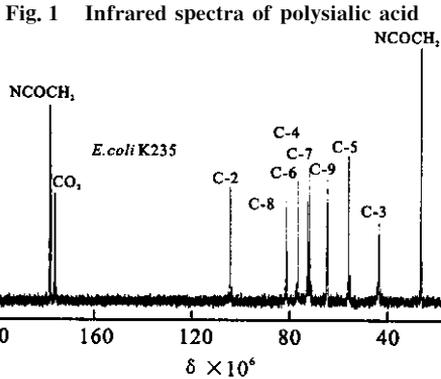


图2 *Escherichia* K235-WXJ4的聚唾液酸的¹³C-NMR谱图

Fig. 2 ¹³C-NMR spectra of polysialic acid in *Escherichia coli* K235-WXJ4

图3是文献报道的 α -2,8和/或 α -2,9糖苷键连接方式下聚唾液酸的核磁共振图谱。

从图3可以看到,单纯以 α -2,8或 α -2,9糖苷键连接的聚唾液酸的¹³C-NMR谱的化学位移 δ 在60~80附近区别比较明显,这个区域是醇基的化学位移区。通过表1中化学位移的比较,可以看到,*E. coli* K235-WXJ4产生的聚唾液酸显然不是以 α -2,8/ α -2,9糖苷键混合连接的;比较脑脊髓膜炎双球菌B型血清型菌株产生的聚唾液酸(α -2,8糖苷键连接)和C型血清型菌株产生的聚唾液酸(α -2,9糖苷键连接)的C-4和C-7的化学位移^[6],可以发现,以 α -2,8糖苷键连接的聚唾液酸的C-4和C-7化学

位移分得比较开。而*E. coli* Bos-12和C型血清型菌株的C-4和C-7的化学位移完全一样;这是因为以 α -2,9连接的聚唾液酸有3个仲醇基(C-4、C-7、C-8),C-7和C-4所处环境几乎一样,其化学位移相差不大;而 α -2,8聚唾液酸的C-7的边上C-8上羟基形成共价键,C-7和C-4所处的环境差别就比较大,因此可以判断*E. coli* K235-WXJ4所得到的聚唾液酸,其糖苷键连接为 α -2,8型。

用ChemOffice软件对 α -2,8和 α -2,9两种连接方式进行¹³C-NMR模拟,见图4,发现所得到的化学位移和实际实验结果相差很小,模拟的 α -2,9的C-2的化学位移 δ 为106.0,而 α -2,8的C-2的化学位移 δ 为103.8,和用仪器测出的103.67一致,这进一步说明了大肠杆菌K235-WXJ4所产生的聚唾液酸的糖苷键连接方式为 α -2,8型。

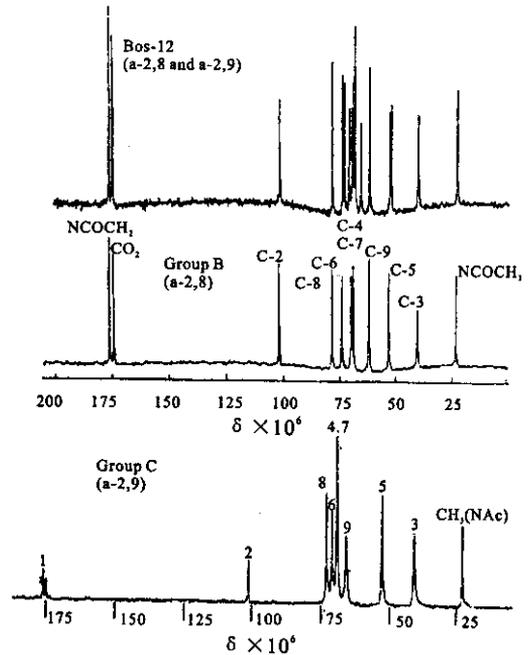


图3 脑脊髓膜炎双球菌C型、B型血清型菌株和*E. coli* Bos-12产生聚唾液酸的¹³C-NMR谱

Fig. 3 ¹³C-NMR spectra of polysialic acid in *Neisseria meningitidis* Serogroups B and C, *E. coli* Bos-12

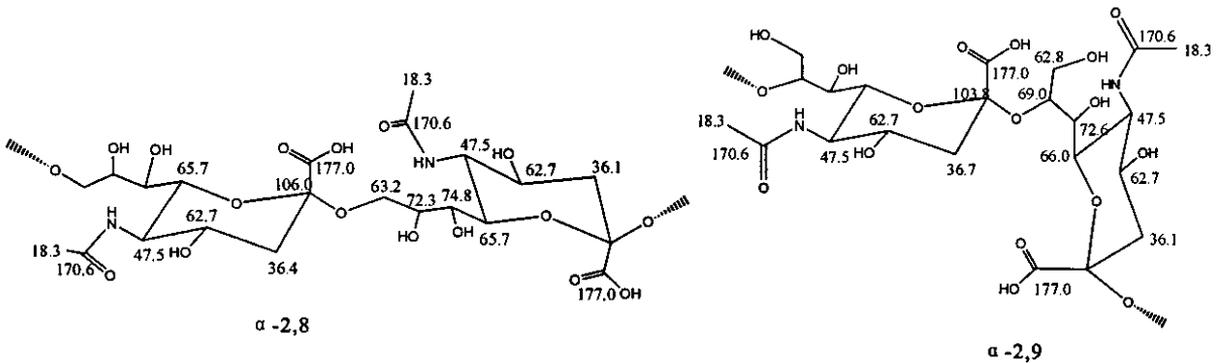
表1 不同菌株生产聚唾液酸的¹³C-NMR化学位移

Tab. 1 ¹³C-NMR Chemical shifts (δ) of polysialic acid in different bacteria strain

C原子的位置	$\delta \times 10^6$				
	B型血清型大肠杆菌	C型血清型大肠杆菌	大肠杆菌 Bos-12	大肠杆菌 K235-WXJ4	共价结合的氢原子数
C-1	174.3	174.9	174.5 101.9	175.869	0
C-2	102.1	101.4	102.0 40.9	103.67	0
C-3	40.9	41.2	41.1	42.546	2
C-4	69.4	69.5	69.8 52.8	71.782	1

续表 1

C 原子的位置	$\delta \times 10^6$				共价结合的氢原子数
	B 型血清型大肠杆菌	C 型血清型大肠杆菌	大肠杆菌 Bos-12	大肠杆菌 K235-WXJ4	
C-5	53.6	53.0	53.5 73.5	55.118	
C-6	74.3	73.6	74.5 69.0	75.884	
C-7	70.4	69.5	70.4 71.5	71.252	
C-8	78.8	71.4	78.8 62.4	80.543	1
C-9	62.4	66.3	66.2 175.9	64.187	2
NCOCH ₃	176.1	176.1	176.0 23.3	177.683	0
CH ₃ CO	23.6	23.3	23.5	24.942	3

图 4 ChemOffice 模拟 α -2,8 和 α -2,9 聚唾液酸的¹³C-NMR 谱Fig. 4 ¹³C-NMR spectra of polysialic acid with ChemOffice simulations

参考文献:

- [1] Rodriguez-Aparicio L B, Reglero A. Effect of physical and chemical conditions on the production of colominic acid by *Escherichia coli* in a defined medium[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1988, 27: 474-483.
- [2] Barr G T, Goebel W F. Colominic acid, a substance of bacterial organic related to sialic acid[J]. **Nature**, 1959, 179: 206-208.
- [3] Schauer R. Sialic acid; Chemistry, Metabolism and Function[M]. New York: Wien New York Springer-Verlag, 1982.
- [4] Gregoriadis G, McCormack B, Wang Z. Polysialic acids: potential in drug delivery[J]. **FEBS Letters**, 1993, 315(3):271-276.
- [5] 李连生, 刘克刚, 姚祝军, 等. 唾液酸类化合物的合成研究进展[J]. **有机化学**, 2002, 22(10): 718-734.
- [6] Apurba K, Bhattacharjee H J, Jennings C. Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* Serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1975, 250(5): 1926-1932.
- [7] Egan W, Liu T Y. Structural studies on the sialic acid polysaccharide antigen of *E. coli* strain Bos-12[J]. **Biochemistry**, 1977, 16(16): 3687-3692.
- [8] 詹晓北, 于军华, 吴剑荣, 等. NTG 对 *E. coli* 突变株聚唾液酸产量的影响. **无锡轻工大学学报**, 2002, 9(5):456-459.
- [9] Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1957, 24: 604-611.
- [10] Uchida Y, Tsukada Y, Sugimori T. Improved microbial production of colominic acid, a homopolymer of N-acetylneuraminic acid[J]. **Agricultural Biological Chemistry**, 1973, 37(9):2105-2110.