

寡糖的分离和结构分析方法*

韩丽君 袁兆慧 范 晓 王 剑

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

核酸、蛋白质、糖类是生命系统中的主要大分子物质。随着生物化学和分子生物学的发展, 科学家们对核酸和蛋白质的研究逐渐深入, 对其在决定生命规律方面的作用已有了初步的了解。但相比之下对生物多糖的研究较滞后, 尽管糖类的生理意义同样至关重要。在生物体中生物多糖(polysaccharide)多是以糖缀合物(glycoconjugates, 即多糖与非糖物质如脂类或蛋白质共价结合而成的糖复合物)的形式存在, 如糖蛋白(glycoproteins), 糖脂(glycolipids)和蛋白聚糖(proteoglycan, 即由蛋白质和糖胺聚糖通过共价键相连的化合物)。许多糖缀合物中由比较少数分子的单糖(2~14 个)缩合形成的寡糖(oligosaccharide)部分具有惊人的多样性、复杂性和微不均一性, 而使它与许多重要生理过程紧密相关并具有许多重要的生理功能。目前已知的一些重要功能有: 糖蛋白的寡糖组分影响多肽链的正确折叠, 防止蛋白水解, 提高蛋白的稳定性和溶解性, 决定它们在血液中的清除速率, 在细胞中作为信息分子调节它们的分泌。糖缀合物中的糖链作为信息分子涉及多细胞生物生命的许多识别过程, 如细胞-细胞间的相互作用, 细胞的生长、分化、荷尔蒙-受体和抗原-抗体的相互作用等(Schachter, 1992; Paulson, 1989)。糖缀合物已成为生命科学研究领域的科学前沿。糖的生物学正在受到越来越广泛的重视。糖链结构的阐明对深入理解糖缀合物的功能和结构的相关性具有重要意义。

一、寡糖的分离和检测

寡糖混合物的性质和分离研究是糖类研究中的难点之一, 其主要原因是: ①寡糖具有相似的化学组成, 有多种可能的异构体, 存在多种连接方式和分支形式, 结构异常复杂, 分离难度很大; ②糖分子缺乏生色团或荧光团, 直接且高灵敏度地检测比较困难, 而偏偏参与调节许多重要生理过程的糖缀合物中的寡糖组分结构复杂且可得量又小, 这些因素造成寡糖的分离分析相当困难。虽然未衍生的糖分子可以用灵敏度和选择性都较差

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 4554 号。国家高新技术“863”研究发展计划资助项目(2001 AA620503, AA620403); 中国科学院方向性创新项目(KZCX3-SW-215)

通信作者: 韩丽君, 女, 研究员, E-mail: Lijunh@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2003 年 4 月 15 日

的示差法检测,但不能满足糖缀合物中的微量至痕量的寡糖组分的分析和分离的要求,就需要高灵敏度和高选择性的分离和分析方法。

1. 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)

HPLC 是 20 世纪 70 年代初开始迅速发展起来的液相色谱技术。HPLC 和柱色谱的原理相同,因其采用了高压泵、高效固定相和高灵敏度的检测器,故使其分析速度、分离效率、自动化程度都大大提高。高效液相色谱法分析糖类有很大潜力,已有多种形式的 HPLC 法应用于复杂糖的分析,其中包括正相、反相和离子交换高效液相色谱均已用于已标记和未标记的糖的分析。由于糖一般无可见光吸收,紫外区仅在 190~210nm 处有微弱吸收,所以未经衍生的糖分子只能用灵敏度很差,非选择性的示差法检测,这样达不到一些极少的糖缀合物分析灵敏度的要求。

近来已有许多关于柱前衍生化的报道(Matthew, 1996),结果都能获得高产率的带荧光或紫外吸收基团的衍生物,经过标记后使得分析灵敏度大为提高,并且亦便于通过紫外或荧光检测器进行在线检测,如苯甲酰化法(Feizi, 1987)是通过糖分子中的羟基与衍生化试剂反应而引入生色基团,但是此法对于还原性糖常有差向异构体产生:丹酰脲(Dansylhydrazoone)(Wang, 1984)衍生物标记法则存在顺反异构体的问题;与以上这两种方法相比还原化标记法则反应完全,且没有异构体产生的问题。该方法是通过糖的还原末端的醛基与带有伯胺基和荧光或紫外生色团的试剂反应生成席夫碱,由于此反应是可逆的,加入 NaCNBH_3 进一步还原,使反应向正向进行得到高产率的还原胺化衍生物。由于这种方法仅涉及糖链的还原端,因而对糖链的专一性影响较小,检测灵敏度提高,是目前应用广泛且比较成功的一类衍生化标记方法。已经使用的紫外可见标记试剂有:对胺基苯甲酸已酯(ABEE)(Wang, 1984)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑酮(PMP)(Kazuaki, 1991)、4-N 二甲基氨基-4-胺基偶氮苯(DAAB)。荧光标记试剂有: α -萘胺、2-胺基吡啶(Jun, 1992)7-胺基-4-甲基香豆素(AMC)1-二甲基(Prakash, 1983)胺基萘-5-磺酰氯等。经过标记的寡糖通过适当的高效液相色谱法可以使分析灵敏度达到 pmol/L 水平。其中,对胺基苯甲酸乙酯(ABEE)衍生物通过西佛碱反应很容易制备,另外 ABEE 是一个憎水的生色基团,它可以改善糖在极性基质中较差的表面活度,正是由于表面活度差而限制离子喷雾技术如 FAB-MS 在糖分析中应用,因此还原端上具有此紫外吸收的(ABEE)基团不仅极大地提高了紫外检测灵敏度,而且还使该衍生物在质谱分析中可以给出更好的碎片峰。虽然没有放射性标记法灵敏度高,但却避免了放射性处理及测量的麻烦,是一种切实可行的方法。王维通等(1984)采用廉价易得、量子产率较高的 Q-萘胺为荧光标记物将其标记在异麦芽糖寡糖的还原端。用高效液相色谱法,使含有 2~9 个糖残基的寡糖链得到完全地分离,并用快原子轰击质谱等方法鉴定了它们的链的结构。

2. 高效阴离子交换色谱法(high-performance anion-exchange chromatography, HPAEC)

HPAEC 的分离原理,在 HPAEC 中通常以强碱性溶液(NaOH)作洗脱液,在这种条件下糖分子的羟基转变成氧负离子从而使糖在未经硼酸的络和下,以阴离子的形式用于

色谱。不同糖分子中的羟基的 pK_a (电离常数)有细微的差别,这种差别使得氧负离子与阴离子交换树脂的相互作用产生的差异并表现在 HPAEC 中的不同洗脱位置,而达到分离的目的。HPAEC 是一种有效且灵敏的糖分析技术,但是由于技术上的原因,对洗脱液泵送系统和分离柱有特殊的要求,要求分离柱可以长期耐受 NaOH 的腐蚀性。高效阴离子交换色谱主要包括两方面,其一是分离系统,二是检测系统。1959 年 Frahn 曾经指出糖分子的羟基在强碱性条件下可阴离子化。利用强阴离子交换树脂以氢氧化物的形式进行色谱分离还原性单糖和寡糖的方法,因为需要大量的洗脱体积而受到限制,树脂的强碱性也可使糖发生异构化和降解。由于一种有效的薄膜型阴离子交换树脂的出现使糖阴离子交换色谱技术发生了巨大的变化,还原性的单糖和寡糖可以在足够短的时间内被分离,从而使糖的异构化和降解可以忽略不计。随着实用的 HPAEC 仪器的商品化,HPAEC 成为糖研究的有力工具。以往在糖分析检测方法中,地灰酚-硫酸用作糖的显色剂可达到灵敏度 10nmol/L 。用精氨酸-硼酸盐作荧光试剂则可使灵敏度提高 10 倍,因为 HPAEC 是在碱性条件下进行的,所以检测的方法要与此条件相适应。脉冲安培检测(PAD)的出现,目前已广泛地应用于 HPAEC 中,检测限大幅度地降低,甚至适用于那些没有还原基的糖。其检测灵敏度达到 10pmol/L ,而不需要进行柱前或柱后衍生化。其他的检测方法,如柱后荧光标记法,虽然此方法的灵敏度较 PAD 低,但与 PAD 法相比具有较好的选择性(如一个还原性基团)。当寡糖经荧光或紫外吸收试剂标记后,荧光检测或紫外吸收检测都可用于 HPAEC 中。当然放射性标记的化合物也不需要用 PAD 检测。Matthew 等(1996)利用 HPAEC 分离并测定了由组织型血纤维蛋白溶酶原活化因子突变体得到的各寡糖的浓度;并通过 MALDI / TOF / MS(激光解析电离/发光时间质谱)确定了中性寡糖的结构。

3. 电泳法(electrophoresis, 简称 EP)

前两种传统的色谱法,存在分离效力有限或非专一响应等问题。对于大分子化合物因其分子大,扩散系数小,故在两相之间的传质慢,从而使分离效率降低。而电泳技术不含有传质过程,扩散系数越小,反而可使分辨率提高。在色谱学发展的基础上,色谱学家们于 20 世纪 60 年代后期将毛细管引入电泳,形成毛细管电泳技术。因此,电泳法是糖分离中应用最广泛的方法。毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)或高效毛细管电泳(high performance capillary electrophoresis, HPCE)是以毛细管为分离室、以高压电场为驱动力的一类新型现代电泳技术。在色谱法中采用毛细管柱是为了消除涡流扩散和缩短在流动相中传质的路程,而电泳采用毛细管是为了有效地散热,并且使径向温度梯度更小。毛细管电泳具有很多优点:①高效($10^5\sim 10^7$ 理论塔板数/m);②快速(数十秒至数十分钟);③分离模式多,选择自由度大;④分析对象广,从无机离子到整个细胞;⑤高度自动化;⑥样品需量小,运行成本低,无环境污染等。

(1) 毛细管电泳法

具有高分离能力、高灵敏度、快速和简便等特点。在糖类分析中已显示出优越性。以下几种 CE 分离后的柱上检测方法,寡糖的硼酸复合物(Hofstetter, 1991)可使 195nm 的紫外吸收信号增大 2~20 倍,使检测达 mmol/L 水平;用唾液酸间接光检测(Klockow, 1984),

可以达到微摩尔(10^{-4} ~ 10^{-5} mol/L),报道的安培电流检测法(Colon, 1993)可以选择性地检测还原性的或非还原性的糖且检测最低浓度限达到 10^{-6} mol/L。这与毛细管电泳分析糖中示差法检测(Alfredo, 1991)的灵敏度相近。柱前衍生化是目前最有希望的高灵敏度地检测糖的方法。因为糖通常是中性的,不带有电荷和发色基团,所以 CE 分析不能直接应用,在使用紫外光或荧光在线检测的毛细管电泳分析糖类时,需要将糖预衍生。目前,已有数种适于 UV 和荧光检测的衍生方法和若干种相应衍生试剂被应用于毛细管电泳柱前衍生。对于还原性糖,最常用的方法是一个含有伯胺基的发色团或荧光团将糖还原胺化,如 2-氨基吡啶(Honda,1989),对氨基苯甲酸和 4-氨基苯基氰。Honda 等(1989)在碱催化下使还原性的糖与 3-甲基-1-苯基-5-氧代-2-吡唑啉酮(MPP)的活泼氢进行缩合反应。用 UV 检测 2-氨基吡啶,对氨基苯甲酸或 MPP 标记的糖,检测限浓度是 $(4\sim 8)\times 10^{-6}$ mol/L (Honda,1989)即使纯化,降解和标记等分析过程都按理论水平计算,以上几种 UV 检测方法的最低检测浓度也不能满足糖蛋白的寡糖的检测要求。采用激光诱导荧光(LIF)检测 3-(4-羧基苯甲酰基)2-醛基喹啉羧酸(CBQCA)标记的糖检测最低浓度限是 10^{-9} mol/L。此方法经过两步标记,首先是糖与氨气进行还原氨化形成氨基糖,然后 CBOCA 与氨基糖反应。这样在标记物稍过量的条件下就可以得到最高产率的糖标记。但是 LIF 检测只有在适当的标记物和最佳的标记条件下,才有可能达到微摩尔的检测限(即分析糖蛋白的寡糖组分的要求)。电泳分离是依赖于电荷和尺寸的差异。大多数糖缺乏易于离子化的官能团,故而电泳法分离糖是困难的。一个常用的可以克服此困难的方法是糖在高 pH 条件下使糖与硼酸形成其带负电的酯化合物。Honda(1989)等将还原性单糖衍生为 N-2-吡啶基糖胺,然后用 CZE 分离它们的带负电荷的硼酸盐复合物,用 UV 进行在线检测并达到 10pmol/L 水平。因为正离子倾向于被吸附于未被修饰的带负电荷的灌注的硅胶毛细管壁上,使电渗流较小,因此,形成带负电荷的标记物较好。一些芳香的磺酸衍生物如 1,3-二磺酸基-7-氨基萘(ANDS)和 1,3,6-三磺酸基-8-氨基萘(ANTS)可以作为负电荷标记物,它们的相应衍生物即使在较低的 pH 下就可以形成高电荷阴离子,即糖的 ANTS 衍生物在较广的 pH 范围内,均使糖增加 3 个负电荷,电迁移率的差异主要决定于分子的有效表面的差异,这一点对决定最优化分离条件方面很重要。也因此可以根据电迁移率比较糖链的长短。其中 8-氨基萘基-1,3,6-三磺酸(8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonate, ANTS)应用较多,并首先被 Jackson(1990)用在荧光辅助糖电泳(fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis, FACE)中分析寡糖。ANTS 衍生糖分子不仅为其提供了生色(荧光)基团,还提供了 3 个负电荷,使原来为中性的糖分子能在各种 pH 的缓冲液中,在电场力作用下产生电迁移,比较适合于寡糖的分离。Klockow 等分别将数个中性寡糖标准、数个唾液酸化寡糖标准、鸡卵清蛋白寡糖库和牛胎球蛋白寡糖库用 ANTS 胺化还原衍生,各衍生物在毛细管电泳中得到很好分离,并采用 325nm 的 He-Cd 激光器进行了激光诱导的荧光检测。车发云等将葡萄糖(dextran)部分水解成寡糖混合物,然后用 ANTS 胺化还原衍生,经毛细管电泳分离在线检测,得到 DP1-21 的葡聚糖 ANTS 衍生物电泳剃度图。并发现同类寡糖衍生物相对迁移时间(TM),与聚合度 N 均呈线性关系。

(2) 非水毛细管电泳法(nonaqueous capillary electrophoresis, NACE)

NACE 是一种较新的分析技术。由于采用的是非水介质, 具有较低的传导性, 可以减小由于焦耳热引起的谱带展宽, 从而使分离效率得到提高, 另外还可提高检测灵敏度。Lee (1992) 等通过在优化的条件下(即适当的电压和缓冲溶液浓度), 以减少由于焦耳热和电渗流引起的谱带展宽, 分别在水介质和非水介质中, 对麦芽糖寡糖 ANTS 标记衍生物进行 CE 分析, 来对比非水毛细管电泳和水介质毛细管电泳的分离效率, 并得出结论: 在优化的实验条件下, 采用非水介质可使分离效率提高 1.5 倍。

(3) 聚丙烯酰胺凝胶电泳法(polyacrylamide gel electrophoresis)

1) 荧光标记糖的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Jackson, 1990)(polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore-labeled saccharides)PAGEFS 或(fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis)FACE, 此方法是利用适当的试剂如 ANTS 和 2-氨基吡啶酮(AMAC) 通过还原胺化反应在糖的还原端引一个荧光基团, 所得糖荧光标记产物用高密度 PAGE 凝胶可达到高分辨率的分离, 在适当的波长下经荧光检测器检测, 用灵敏的摄像系统如数码相机成像, 灵敏度可达到亚 pmol/L 水平的糖分析方法, 具有快速、灵敏且较价廉, 可以对多个样品平行地进行定量分析, 技术上易操作等优点。

2) 一种高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳方法, 此方法是利用一种有色的染料, 4-氨基-1, 1-偶氮苯-3, 4-二磺酸(AABA)通过还原胺化反应标记寡糖得到有色的产物, 其最大吸收波长为 489nm, 摩尔消光系数是 37.615。然后再在碱性条件下用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 用光密度仪扫描凝胶来定量, 电迁移率用于定性。这种方法的优点是价廉且易于操作, 对仪器的要求也不高。

4. 凝集素亲和电泳法(lectin affinity electrophoresis)

LAEC 是根据凝集素与糖可产生生物特异性相互作用这一特点与电泳的驱动力结合起来的一种新方法。凝集素是一类动物或植物中所含有的蛋白质或糖蛋白, 它们以特定的顺序和低分子量的糖或寡糖结合。因此, 凝集素作为一种细胞生物学的生化工具被广泛地应用于含糖分子如糖蛋白、蛋白聚糖、糖脂的定位和纯化。该方法主要用于分析糖蛋白来进行有关的癌症和炎症情况的诊断以及它在骨骼和肝胆管疾病诊断中的应用。因为对于大多数寡糖而言, 由于缺少运用电泳进行分离所需的固定电荷和灵敏的检测方法, 凝集素亲和电泳一直未被用于寡糖的分析, 直到 Lee(1992)等将降凝集素刀豆球蛋白 A 并入凝胶基质中, 利用电泳来分离带荧光标记的具有相同分子量的寡糖的衍生物。将梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳和毛细管区带电泳用于中性糖带电荷和荧光基团的衍生物的分析 and 测序已有文献报道。梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳分离这些糖衍生物的原理和用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质一样, 是基于寡糖链的分子大小进行分离的。尽管梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳具有高分辨率, 荧光标记寡糖后使得检测灵敏度进一步提高, 但这种方法受到一定的限制, 不能清楚地分辨具有相同分子大小的荧光寡糖衍生物, 故如用糖外切酶和梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(Gradient PAGE)对含荧光基团的糖衍生物进行序列测定, 则须在确保没有其他的分子大小相似结构不同的糖的衍生物存在的条件下。而凝集素亲和电泳这种新方法可以弥补这一局限性, 对于从糖蛋白中水解出的具有相似结

构的寡糖的纯化和分离这一方法值得注意,并且也可能代表用电泳技术分析复杂寡糖的又一方向。

二、结构分析方法

寡糖结构的确定通常需要以下几个步骤:①纯度鉴定,常用的经典鉴定方法有:功能团分析的摩尔比恒定;比旋光度不再改变;水解后分析糖组成恒定;示差折射法检测不变;柱层上呈现一个峰等。②分子量的测定,目前多采用质谱法。常通过化学电离(CI)、场解吸(FD)、快原子轰击(FAB)等方法获得分子离子峰。③单糖的鉴定,首先要了解链全甲基化,然后水解甙键,鉴定所有获得的甲基化单糖,其中游离 OH 的部位就是连接位置。从不同类型甲基化单糖的相对比例,可以推测出糖链重复单位中各种单糖的数目,末端糖的性质及分支点的位置。目前常使用 ^{13}C NMR 方法来确定糖连接位置主要是通过归属各碳信号,以确定产生甙化位移的碳。④连接顺序的确定,早期主要是通过缓和水解法,即用稀酸水解、酶解、乙酰解、碱水解等方法,将糖链水解成较小的片段,然后分析这些小片段的连接顺序。从而推测整个糖链的结构。质谱分析也已用于低聚糖的结构研究,是根据质谱的裂片规律推测低聚糖和甙的糖链的连接顺序。⑤甙键构型的确定,通过质谱、甲基化分析、酶降解和核磁共振等方法。至今,已经建立的寡糖结构分析方法可概括为化学法、物理方法和生物学法。其中化学法中比较经典的如甲基化法,需要经过全甲基化、水解、还原和全乙酰化等步骤,然后再用 GC 或 GC/MS 分析来确定糖基间的连接方式,这种方法通常较耗时且需要样品量较大;物理方法主要是质谱和核磁共振分析;生物学法主要是酶解分析法。这里主要介绍物理方法。

1. 质谱(mass spectroscopy, MS)

在糖类结构分析的众多方法中,质谱被认为是很有前途的手段之一。它灵敏度高、结构信息直观、需要的样品量较少,尤其是将其与一些软离子化的方法如快原子轰击(fast atom bombardment, FAB)等结合起来,使得高极性、难挥发且热不稳定的糖及其缀和物的直接分析成为可能。①FAB 法广泛应用于寡糖的分析,样品用量少且可以回收而不影响原来的生物活性,灵敏度高,能实现高分辨率测试,操作方便,对样品没有气化的要求,并能提供 $(\text{M}+\text{H})^+$ 准分子离子信息,但是在低质量区域的峰会受底物峰的干扰。②电喷雾电离质谱(electrospray ionization-mass spectroscopy, ESI-MS)是将溶液中的分子转变成气相离子的分场有效的手段。这样产生的分子离子往往带有多个电荷,这些离子是靠吸附或失去若干个氢而形成的,所以在正离子或负离子上会看到 $(\text{M}+\text{nH})^{n+}$ 或 $(\text{M}-\text{nH})^{n-}$ 的峰,因此它可以测定的分子质量范围便大大扩展。③基质辅助的激光解吸电离质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectroscopy, MALDI-MS)也是一种软电离方式,产生的分子离子稳定不易裂解,由于技术上的特点,这种离子化方式电离出的离子常用飞行时间(TOF)检测器来检测,所以 MALDI 常与 TOF 连在一起称为基质辅助的激光解吸飞行时间质谱仪, MALDI 不受样品中缓冲溶液或盐类的影响,且其灵敏度

也是各类电离方式中最高的。

2. 核磁共振法(nuclear magnetic resonance spectroscopy,NMR)

NMR 与 MS 相比需要的样品量较多,灵敏度较差,但其提供的结构信息较多。这种方法对仪器设备的精密度和谱图的解析要求相当高,高分辨率的 ^1H NMR 能准确测定结构表征基团的化学位移和峰宽,糖链的各种结构特征,均可由这些结构表征基团的微小位移变化表现出来。此外,2D-NMR、NOE 和 ^{13}C NMR 数据对糖链的一级结构及其溶液构象的分析,也是必不可少的。

三、展 望

由于糖几乎参与了生命的全部过程,因此对生命过程中糖功能的研究,揭示了糖类药物对治疗各种疾病的巨大前景。同时,糖化学的研究也是当今一个重要的研究领域。随着糖生物学的高速发展和新技术的大力推动,使寡糖的分离与结构分析变得更为高效、准确、快速和灵敏,可以更为直接和有效地探索生命现象的无穷奥秘。

参 考 文 献

- Alfredo E B, Krattiger B, Maystre F *et al.*, 1991. On-column laser-based refractive index detector for capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, **63**(23): 2689~2697
- Feizi T, 1987. Carbohydrates as antigenic determinants of Glycoproteins. *Biochem. J.*, **245**:1~11
- Hoffstetter K S , Paulus A, Gassmann E *et al.*, 1991. Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, **63**(15): 1541~1547
- Honda S, 1989. Simultaneous determination of reducing monosaccharides by capillary zone electrophoresis as the borate complexes of N-2-pyridylglycamines. *Anai. Biochem.*, **176**(1): 72~77
- Jackson P, 1990. The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid. Detection of picomolar quantities by an imaging system based on a cooled charge-coupled device. *Biochem. J.*, **270**:705~713
- Jun S S , 1992. Analysis of oligosaccharides by on-line high-performance liquid chromatography and ion-spray mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **207**(2): 203~207
- Kazuaki K , 1991. Precolumn labeling of reducing carbohydrates with 1-(p-methoxy)phenyl-3-methyl-5-pyrazolone: analysis of neutral and sialic acid-containing oligosaccharides found in glycoproteins. *Anal. Biochem.*, **199**(2): 256~268
- Lee K B, 1992. Lectin affinity electrophoresis for the separation of fluorescently labeled sugar derivatives. *Anal. Biochem.*, **203**(2): 206~210
- Luis A C, Dadoo R, Zare R N, 1993. Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a copper microelectrode. *Anal. Chem.*, **65**(4): 476~481
- Matthew F, 1996. The use of high-performance anion-exchange chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to monitor and identify oligosaccharide degradation. *Anal. Biochem.*, **239**(1):92~98
- Peter J, 1994. The analysis of fluorophore-labeled glycans by high-resolution polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **216**(2):243~52
- Prakash C, 1983. A new fluorescent tag for labeling of saccharides. *Anal. Biochem.*, **128**(1):41~46
- Wang W T, 1984. Structural characterization of oligosaccharides by high-performance liquid chromatography, fast-atom bombardment-mass spectrometry, and exoglycosidase digestion. *Anal. Biochem.*, **141**(2): 366~381

A Review of Separation and Structure Determination Methods for Oligosaccharides *

HAN Lijun YUAN Zhaohui FAN Xiao WANG Jian

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract

Carbohydrates are important structural and functional moieties of glycoproteins and glycolipids . Many important biological processes, such as development, immunology, cancer metastasis, etc. are mediated by the carbohydrates moieties of glycoconjugates. Oligosaccharides from most biological sources are of considerable complexity and variety. Understanding the precise roles they play in biological processes often required their isolation, detailed structural analyses and usage in functional assays. Generally oligosaccharides lack chromophore groups, which increase the difficulty of oligosaccharides structure analysis. Now a complete analysis of a carbohydrate oligomer is one of the foremost and compelling challenges in structural biology. We reviewed 28 references on the methods for isolation and structure determination for oligosaccharides.

* Contribution No.4554 from the Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences