

细菌脂多糖及其寡糖链结构分析技术研究进展*

周巾煜^{1,2)} 李倩倩¹⁾ 黄纯翠¹⁾ 武红梅^{1,3)} 李 岩^{1,2)**}

(¹⁾ 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; (²⁾ 中国科学院大学, 北京 100049; (³⁾ 广东中科康仪生物技术有限公司, 佛山 528000)

摘要 脂多糖是大多数革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分, 能诱发宿主细胞固有免疫反应, 在细菌的识别、黏附、转移、致病等过程中发挥非常重要的作用. 其结构组成与细菌的血清型和致病能力息息相关, 因而对其结构进行精准分析, 有助于研究其结构与生物效应间的关系, 便于鉴别菌种和研发相关的抗生素及疫苗. 由于脂多糖具有两亲性、多电荷且结构复杂等特点, 为研究分析带来很多难题. 本文全面归纳了细菌脂多糖分析技术的相关研究成果, 阐述脂多糖及其寡糖链的提取、分离纯化及鉴定方法.

关键词 脂多糖, 寡糖链, 提取, 分离纯化, 鉴定

学科分类号 Q53, O65

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0306

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)又名内毒素, 是大多数革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分, 也存在于梳状菌属(*Pectinatus*)等少数革兰氏阳性细菌中^[1]. LPS 的分子质量为 2~20 ku, 能够提高细菌质膜负电性, 增加质膜稳定性, 保护质膜免受外界攻击, 在细菌的生存及其与外界环境及宿主细胞的相互作用, 如细菌的识别、黏附、转移、致病等过程中发挥重要作用. 据细菌糖结构数据库(<http://csdb.glycoscience.ru/bacterial/>)记载, 已有 4 000 余刊物报道了 6 000 多微生物中的 10 000 余个糖化合物的结构, 其中多数为脂多糖寡糖结构片段.

构成脂多糖的结构单元如图 1 所示, 主要有 3 部分: 类脂 A (lipid A)、核心寡糖 (core oligosaccharide) 以及 O- 抗原 (O-antigen 或 O-specific polysaccharide). 类脂 A 是脂多糖中最保守的部分, 同一菌种的类脂 A 结构基本保持一致, 它是一种磷酸糖脂(phosphoglycolipid), 其骨架结构是被磷酸基团修饰、脂肪酸链取代的 β -1, 6 连接的 D- 氨基葡萄糖(GlcN)二糖. 核心寡糖是由 9~10 个糖基组成的分枝寡糖链, 又可被进一步划分为内核心寡糖与外核心寡糖. 内核心寡糖主要含 2 种不常见的糖——七碳糖(L- 甘油 -D- 甘露型庚糖, Hep)

和八碳糖酸(3- 脱氧 -D- 甘露型 - 辛酮糖酸, KDO). 外核心寡糖主要由葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、N- 乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、N- 乙酰半乳糖胺(GalNAc)等己糖组成. O- 抗原是抗原决定因子, 一般含有多个重复单元, 是脂多糖中最善变的部分, 其糖基组成和结构在不同菌种之间以及在同一菌种不同血清型间都会有所差别, 是细菌免疫学分类的基础. 根据脂多糖中是否含有 O- 抗原, 可将脂多糖分为 S- 型脂多糖(S-LPS)和 R- 型脂多糖(R-LPS, LOS), 当脂多糖 O- 抗原重复单元数 n 为 1 时, 也被称作半 R- 型脂多糖(semi-rough LPS, SR-LPS).

脂多糖可介导固有免疫反应, 是生物医学研究领域中的关键分子. 高剂量时, 可引起发热、微循环障碍、内毒素休克及播散性血管内凝血等疾病; 低剂量时, 能够导致肿瘤坏死因子 TNF- α 及

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2013CB910100), 国家自然科学基金(31270909), 国家高技术研究发展计划(863) (2014AA021101) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-64887212, E-mail: yanli001@gmail.com

收稿日期: 2016-09-29, 接受日期: 2016-12-20

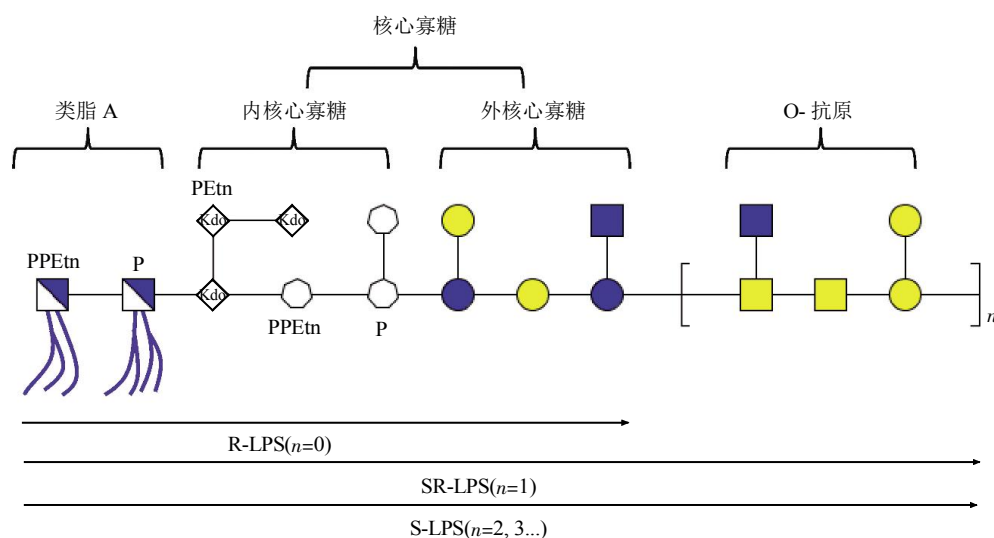


Fig. 1 General architecture of an intact LPS

图 1 脂多糖结构示意图

■: GlcN; ■: GlcNAc; ■: GlcNAc; ●: Gal; ●: Glc; 脂肪酸链; ◆: KDO; ○: Hep; P: 磷酸修饰; PEtn: 磷酸乙醇胺修饰; PPEtn: 焦磷酸乙醇胺修饰。

白介素 IL-6 等细胞因子生成、激发 Toll- 样受体 TLR4(少量 R- 型 LPS 可拮抗 TLR4, 如五日热巴氏菌 *Bartonella quintana* 的脂多糖^[2]), 帮助宿主抵御感染(如肠道菌群), 可作为疫苗及佐剂的有效成分^[3]。已有研究表明, 其结构组成变化与细菌的血清型及致病能力息息相关, 因而对细菌脂多糖结构的快速准确解析有利于迅速判断细菌种属及血清型^[4-6]、了解其结构与生物学功能之间的关系^[7-8], 从而有助于细菌种属的快速甄别及研发针对特异性菌种的抗生素及疫苗等药物^[9-11]。

脂多糖既含有亲脂的低极性类脂 A, 又含有亲水的高极性寡糖链, 这导致两亲性的脂多糖分子在检测过程中易处于聚集状态, 为完整脂多糖的直接解析带来了不便。因此, 研究者也会采用将类脂 A 与寡糖链分开分析的方法对脂多糖的结构进行鉴定。类脂 A 结构相对简单, 对其研究较为成熟^[12-14], 但寡糖链变化多端, 单糖组成及连接方式各不相同, 这就为脂多糖寡糖链的快速准确分析设置了障碍, 也成为当前细菌糖生物学研究的热点。本文将对脂多糖及其寡糖链的提取、分离纯化及鉴定方法进行综述。

1 完整脂多糖的分析方法

1.1 完整脂多糖的提取与纯化方法

脂多糖中含有较多的磷酸及乙醇胺等易丢失修饰基团, 因而在提取过程中要注意保证脂多糖结构的完整性, 最为经典的脂多糖提取方法是酚-水提取法 (phenol-water extraction) 和醚提取法 (ether extraction), 为提高提取率及提取纯度, 可联合使用几种方法或连续使用同种方法进行提取^[15]。在此基础上, 人们对传统的提取方法进行改良、简化, 并开发出了适用于少量细菌的脂多糖微提取试剂盒。

酚-水提取法主要适用于 S- 型脂多糖, 当温度高于 65℃ 时, 酚-水溶液混为一相; 冷却后, 两相分开, 蛋白溶于酚相, 脂多糖和核酸溶于水相, 利用核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶及蛋白酶 K 降解核酸及残余蛋白质即可从水相获取脂多糖^[16]。最近, Ahamad 等^[17]在酚-水提取法的基础上构建了高产量、高纯度、安全、低成本的两步提取的方法: 首先利用乙二胺四乙酸(EDTA)释放混有氯化钙(CaCl₂)的细菌培养物中的脂多糖, 再利用改良的

酚-水提取法对脂多糖进行提取。

醚提取法则更适用于 R-型脂多糖的提取, 主要是因为 R-型脂多糖缺乏亲水的 O-抗原, 其极性较 S-型脂多糖小。利用酚-水提取法提取容易被萃取到酚相, 而利用液态酚、氯仿及石油醚混合单相溶液(PCP)则可将 R-型脂多糖全溶于提取液, 而 S-型脂多糖、蛋白质、核酸及多糖则不溶于提取液, 从而实现 R-型脂多糖的提取^[18]。

提取得到的脂多糖中可能混有磷脂、核酸、蛋白质等杂质, 因而在进行后续分析之前需要确定样品中是否含有杂质并予以去除: 可通过薄层层析(TLC)检测是否含有磷脂, 利用氯仿-甲醇溶液去除磷脂; 通过检测 260 nm 及 280 nm 紫外吸收强度确定是否含有核酸与蛋白质, 利用相应的核酸酶与蛋白酶予以去除。此外, 凝胶过滤色谱法也是一种常用的脂多糖纯化方法, 可依据分子质量的差异实现不同脂多糖的分离(详见 2.2.1)。

1.2 完整脂多糖的鉴定方法

对完整脂多糖直接进行结构鉴定, 不仅可以节省耗材、节约时间, 也可以避免脂多糖在处理过程中的结构变化。但是, 具有两亲性的脂多糖在溶液中容易聚集, 其上带负电荷的基团也会通过二价阳离子交联, 为脂多糖结构鉴定设下了羁绊。目前, 常用的完整脂多糖鉴定方法有质谱法、凝胶电泳法、凝集素检测法、酶联免疫吸附实验(ELISA)法、免疫印迹法等。

1.2.1 质谱法

利用质谱法对完整脂多糖进行鉴定, 主要适用于 R-型脂多糖。早在 20 世纪 90 年代初, Caroff 等^[19]利用 ^{252}Cf 等离子体解吸质谱(^{252}Cf -PDMS)对寡糖链所含单糖数不超过 5 个的 R-型脂多糖进行鉴定; 随后, 电喷雾电离傅立叶变换离子回旋共振质谱(ESI FT-ICR MS)也被用于鉴定 R-型脂多糖^[20-21]; 随着质谱技术的发展, 在克服脂多糖的两亲性、低溶解度及高电荷等特性的样品制备方法建立的基础上, 基质辅助激光解吸质谱^[22-23](MALDI-MS)也可实现微量完整脂多糖的高效、快速的分子质量及组成检测。

Sturiale 等^[22]利用反射基质辅助激光解吸-飞行时间质谱(reflectron MALDI-TOF MS)在负离子模式下对完整 R-型脂多糖进行鉴定。在样品制备过程中利用乙二胺四乙酸(EDTA)增加脂多糖的溶解能力, 通过阳离子交换树脂去除溶液中的金属离子, 选用三羟基苯乙酮和硝化纤维素做基质捕获盐离子

等杂质、为 R-型脂多糖的解离提供非导电界面。通过 MALDI-TOF-MS 解析, 在高质量区, 由于脂肪链数量及长度的不同, 可获取分子质量相差 14(亚甲基)的多个 R-型脂多糖分子的[M-H]⁺离子峰簇^[24], 在低分子质量区, 由于源内裂解(ISD), 类脂 A 末端与 KDO 残基间不稳定糖苷键断裂, 依次呈现 B 型核心寡糖离子和 Y 型类脂 A 离子。

1.2.2 凝胶电泳法

凝胶电泳法所需设备简单、操作简便、易于观察, 是一种在电场作用下按带电物质在凝胶中泳动的速度不同将物质分离的鉴定方法, 聚丙烯酰胺凝胶^[25-27]和琼脂糖凝胶^[28]是常用的凝胶介质。S-型脂多糖电泳图呈阶梯状, 由此可通过凝胶电泳区分脂多糖是 R 型还是 S 型^[29-30]; 再者, 不同菌种、不同血清型来源的脂多糖所得电泳图条带分布不同, 从而可以粗略鉴定脂多糖的种属来源^[31]。

脂多糖凝胶电泳有多种显色方法, 最常用的是银染法, 脂多糖的邻二羟基被高碘酸氧化为醛基, 与银离子结合后在凝胶上显现棕色或黑色的条带。咪唑锌负染色法^[27]灵敏度高于银染法, 其染液中重金属锌盐在凝胶表面作用后形成不溶性复合沉淀物, 但在含脂多糖的部位形成与脂多糖结合的较高浓度的可溶性复合物, 且抑制了不溶性复合沉淀物的形成, 从而在半透明背景上反衬出透明的脂多糖带。Zhu 等^[26]利用伊红 B(eosin B)为染料对脂多糖进行负染色, 可在电泳后 30 min 内完成显色, 且该方法灵敏度高出银染法 4 倍, 能检测出 20~40 ng 的脂多糖。Wang 等^[31]选用荧光染料酰肼衍生物 UGF202 为染料, 可在 45 min 内完成显色, 其灵敏度大大提高, 能检测出 0.5~1 ng 的脂多糖。

1.2.3 凝集素检测法

凝集素是一类非免疫来源的天然蛋白或糖蛋白, 能与细胞表面特定糖蛋白或糖脂的寡糖链结合, 具备使细胞凝集或糖复合物沉淀的能力。凝集素能专一地识别某一特定单糖或寡糖片段, 如伴刀豆凝集素(Con A)可识别甘露糖、麦胚凝集素(WGA)识别 N-乙酰葡萄糖胺、雪莲花凝集素(GNA)能识别高甘露糖型糖链等。凝集素不仅可分离纯化糖蛋白, 也可通过识别糖链的类型、单糖及寡糖组成来分析糖链大致结构^[32]。

单一的凝集素反应难以定量且耗时长, 往往不作为检测精细糖结构变化的工具, 但同时含有几十种凝集素的凝集素芯片技术能够高通量地获取数据信息, 识别菌株上脂多糖等糖缀合物的糖型差异,

从而实现菌种的鉴别. Kilcoyne 等^[33]利用凝集素芯片对在 37℃ 和 42℃ 培养的空肠弯曲杆菌 *Campylobacter jejuni* 81116 和 81-176 菌株进行鉴定, 同时发现温度升高会导致 81116 菌株中脂多糖样的寡糖含量减少, 81-176 菌株中 R- 型脂多糖与荚膜多糖的分布发生变化.

1.2.4 酶联免疫吸附实验法和免疫印迹法

酶联免疫吸附实验法和免疫印迹法是两种典型的依托抗原与抗体特异性反应的血清型研究方法. 含有 O- 抗原的脂多糖具备特异性结合抗体的能力, 不同脂多糖的共同抗原表位也可能出现交叉反应, 因而酶联免疫吸附实验法和免疫印迹法是判断脂多糖免疫化学特性、通过已知抗原表位推测未知抗原表位所对应的寡糖片段的有效手段. 通常选用经特定菌种免疫兔或鼠所得的抗血清为一抗, 过氧化氢酶或碱性磷酸酶标记的抗兔或鼠免疫球蛋白 G (IgG) 为二抗. Siwinska 等^[34]利用酶联免疫吸附实验法、免疫印迹法与核磁共振法相结合的手段, 证明了羽状变形菌 *Proteus penneri* Br 114 的脂多糖隶属于与 *Proteus* O1~O79 均不同的新血清型 O80, 其重复五糖单元中含有部分 O- 乙酰化、被丝氨酸修饰的葡萄糖醛酸.

2 脂多糖寡糖链的分析方法

2.1 脂多糖寡糖链的释放方法

由于脂多糖同时具备亲脂的类脂 A 和亲水的寡糖链, 最常见的分析策略是将类脂 A 与寡糖链分开鉴定. KDO 是一种辛酮糖酸, 它与类脂 A 的氨基葡萄糖间形成的酮糖苷键较醛糖苷键更不稳定, 易于在弱酸(1%~2%乙酸或 0.01 mol/L 柠檬酸)条件下于 100℃ 作用 1 h 左右断裂, 将类脂 A 与寡糖链分离开, 类脂 A 可通过离心去除, 寡糖链溶于水相. 酸解过程中加入十二烷基磺酸钠(SDS)和构建缓冲体系能促进脂多糖解聚、提高酸解效率、避免脂多糖上磷酸等取代基的丢失^[35-36]. 此外, 也可对无水肼或液氨 37℃ 温和水解获取的脱 O- 酰基的脂多糖, 或在 4 mol/L 氢氧化钾(KOH)中于 120℃ 反应获取的脱 N- 酰基的脂多糖寡糖链进行结构鉴定.

2.2 脂多糖寡糖链的纯化方法

脂多糖的寡糖链(去乙酰化或脱类脂 A 的寡糖链)的分离纯化可以由凝胶过滤色谱法、高效液相色谱法及毛细管电泳法等完成.

2.2.1 凝胶过滤色谱法

最常用的脂多糖纯化方法是凝胶过滤色谱法. 该方法简单常见, 能分离不同的脂多糖, 尤其适用于大量(至少几十毫克, 通常为几百毫克)脂多糖寡糖链的分离. 样品经过色谱柱与洗脱液淋洗, 利用示差检测器检测, 根据分子大小及形状的不同分离物质.

葡聚糖与环氧氯丙烷偶联的 Sephadex^[37-39]、聚丙烯酰胺凝胶 Bio-Gel^[40-43]、乙烯醇和甲基丙烯酸酯共聚而成的 TSK HW^[44-46]等是常用的分子筛材质. 其洗脱液一般选用水或低浓度的缓冲盐溶液, 为避免脂多糖的聚集效应, 在洗脱液中可加入十二烷基磺酸钠(SDS)、脱氧胆酸(DOC)、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)等解聚试剂.

2.2.2 高效液相色谱法

相比常压及低中压柱层析, 高效液相色谱(HPLC)上样量少、高效、快速且样品处理简单, 是常用的样品分离纯化方法. 脂多糖的亲水糖链在含 C₁₈、氨基、氰基及苯基的反相硅胶柱上都难以保留, 因而可利用脂多糖核心寡糖骨架上, 存在能影响脂多糖分子静电平衡的非化学计量数目的磷酸、乙醇胺、KDO 取代基, 通过离子交换色谱法、反相离子对色谱法、亲水相互作用色谱法将脂多糖寡糖链分离.

Kojima 等^[47]发现, 含季胺基的强碱性阴离子交换色谱柱 HiTrap Q HP, 以磷酸钠 - 氯化钠为流动相, 利用牛磺酸 - 高碘酸钠柱后衍生、荧光检测器检测的方法, 可将含带电基团数目不同的脂多糖寡糖链有效分开; 为实现液质联用, Kojima 等^[48]又利用反相离子对色谱法, 以三乙胺为离子对试剂、乙酸铵为流动相、乙腈为有机调节剂, 通过梯度洗脱的方法, 将脂多糖寡糖链分离, 实现了色谱分离与质谱鉴定的兼容, 构建了准确鉴定含不同带电基团的脂多糖寡糖链的方法.

此外, 亲水相互作用色谱(HILIC)作为一种对中性聚糖、酸性聚糖、糖肽等分离的有效手段, 也被用于脂多糖的分离. Man-Kupisinska 等^[49]用两性离子型 HILIC 柱, 实现了对大肠杆菌 *Escherichia coli* R1 R- 型脂多糖的不同核心寡糖链及来源于蜂房哈夫尼菌 *Hafnia alvei* PCM 1200 脂多糖核心寡糖链, 其含特征序列的不同寡糖片段的分离.

2.2.3 毛细管电泳法

毛细管电泳(CE)是以毛细管作为分离管、以电

渗作为分离的主要动力, 利用样品在导电介质中通过电场的迁移率不同分离的一种技术, 依靠脂多糖分子所带电荷、大小、形状的不同将其分离, 其最大优势是能与质谱联用, 实现脂多糖的高灵敏分析^[50-51].

Kojima 等^[48]尝试用毛细管区域电泳法(CZE)对取代基不同的脂多糖寡糖链进行分离, 但由于骨架结构相同的脂多糖寡糖链拥有相似的水合半径, 导致该方法分辨率较 HPLC 低. 不过, 通过优化鞘液组成, CZE 与 MS 联用能实现微量样品的高灵敏度分析.

随后, Wang 等^[52]报道, 毛细管电泳法能够分离含 KDO 和磷酸基团数目不同的去酰基化脂多糖, 分离条件的选择主要取决于脂多糖去酰基化的程度, 以 50% 甲醇为鞘液、10 mmol/L 乙酸铵(pH 9.0)为电解质溶液、电势 30 kV 是最佳的分离条件.

2.3 脂多糖寡糖链的鉴定方法

脂多糖寡糖链化学结构的确定需要考虑很多因素, 包括糖残基的排列顺序、连接方式、异头碳的构型、糖链分支情况及糖残基上磷酸等取代基的取代情况等, 通常的鉴定方法有化学分析法、质谱法和核磁共振法, 在实际应用中通常联合使用几种方法.

2.3.1 化学分析法

随着质谱、核磁等尖端仪器的开发, 寡糖结构鉴定愈发快速、高效、灵敏. 传统化学分析法并没有淡出历史舞台, 常与质谱、核磁共振法联用, 在解析寡糖单糖组成、构象及连接方式中依旧发挥着重要作用. 完全酸解法、甲基化分析、Smith 降解法等是常用的脂多糖寡糖链结构化学分析法.

完全酸解法主要用于获取脂多糖糖链中糖基的组成及比例, 将脂多糖寡糖链置于酸中(如 2 mol/L 三氟乙酸), 加热(120℃ 左右)彻底水解^[53], 或在 2 mol/L 盐酸 - 无水甲醇(85℃ 左右)进行甲醇解^[54], 生成的糖基混合物或糖基甲基糖苷混合物用气液色谱(GLC)等方法进行定性定量分析.

甲基化分析主要用于确定寡糖中糖基间的连接位点. 通常利用二甲基亚砜(DMSO)和氢氧化钠(NaOH)制备二甲基亚砷酰阴离子, 碘甲烷(CH₃I)为甲基化试剂, 将糖链中的游离羟基转变为甲氧基. 接着通过酸解释放甲基化单糖或衍生物, 经硼氢化钠(NaBH₄)还原为糖醇、乙酸化水解生成羟基, 用气质联用(GC-MS)方法分析获得的甲基化糖醇 - 乙酰衍生混合物, 获取糖基类型及糖苷键连接位点^[55].

Smith 降解主要用于确定糖苷键的连接方式, 将糖链经高碘酸氧化、硼氢化钠还原, 再用乙酸等弱酸部分水解, 获取特征性的糖连接重复单元, 经凝胶过滤色谱纯化后, 利用核磁共振法进行分析, 获取糖基的构象及连接方式^[38, 45].

2.3.2 质谱法

生物质谱因具有软电离、相对分子质量检测范围大、高灵敏度、高通量、高分辨率等优点, 可很好地解决寡糖等生物大分子难挥发、高极性、热不稳定等难题, 是糖链研究的重要手段, 同样适用于脂多糖寡糖链的研究. 现阶段, 质谱主要用于判断构成寡糖的单糖及取代基的种类和数量, 也可利用二级质谱判断部分典型的连接方式. 快原子轰击质谱(FAB-MS)^[56]、电喷雾电离质谱(ESI-MS)和基质辅助激光解吸质谱(MALDI-MS)都曾报道用于脂多糖寡糖链结构的鉴定. 其中 ESI-MS 和 MALDI-MS 是最为常用的质谱分析方法.

ESI-MS 适用于脂多糖寡糖链分析的主要优势有两点: 一是能与 HPLC^[49, 57]或 CE^[58]联用, 实现分离与鉴定的一体化; 二是能产生多电荷的分子离子峰, 从而使高分子质量的化合物出现在低质荷比(m/z)区, 大大增加了化合物的检测范围. Turska-Szewczuk 等^[43]利用负离子模式下的电喷雾电离四级离子阱质谱(ESI-QTRAP-MS)对豆科植物根瘤菌 *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* 外核心四糖进行鉴定, 通过两高丰度[M-H]⁻峰对应的 m/z 值及差值, 确定其寡糖链中同时含有被 O- 乙酰化修饰和不被 O- 乙酰化修饰的化合物, 并确定其单糖组成, 又通过碰撞诱导解析串联质谱(CID MS/MS)获得相应的 A 型、B 型、C 型及 X 型、Y 型、Z 型碎片离子, 根据其分子质量及相对丰度判断糖的连接方式. Knirel 等^[59]利用正离子模式下的电喷雾电离高分辨质谱(ESI-HR-MS)对酸解后的大肠杆菌 *Escherichia coli* O84a O- 抗原进行一级及二级质谱鉴定, 证明了其 O- 抗原重复单元中存在磷酸吡喃岩藻糖和二-O- 乙酰基 -6- 脱氧 - 塔罗糖. 此外, ESI FT-ICR MS^[60]也常用于鉴定脂多糖寡糖链的分子质量及单糖组成.

MALDI-MS 鉴定脂多糖寡糖链较 ESI-MS 的主要优势: 一方面, 质谱鉴定受样品中缓冲盐等添加剂的干扰小, 因而样品处理相对简单; 另一方面, 产生的碎片离子少且图谱中无多电荷离子, 因而易于解析. Pieretti 等^[40]利用反射 MALDI-TOF MS 对变形菌 *Halomonas alkaliantarctica* 的核心多糖进行

鉴定, 确定了两种糖型的存在, 并比较两种糖型的源后裂解(PSD)图谱, 证明了分支的庚糖上的取代基为非化学计量取代基. Kaszowska 等^[41]利用正离子模式 MALDI-TOF MS 确定了类志贺毗邻单胞菌 *Plesiomonas shigelloides* CNCTC 80/89 核心九糖的单糖组成, 并利用二级质谱 MALDI-TOF MS/MS 确定了甘氨酸的连接位点.

2.3.3 核磁共振法

核磁共振法(NMR)是脂多糖糖链解析应用最广泛的方法, 它不损坏样品, 利用化学位移、耦合常数、积分面积、空间偶极耦合(NOE)及弛豫时间等的不同, 实现糖链构型和连接方式的精确解析. 通常利用一维及二维核磁共振法联用的手段对糖链进行解析^[44-45, 61-62].

一维核磁共振法(^1H NMR 和 ^{13}C NMR)通过碳谱及氢谱中化学位移特征判断异头质子或异头碳的构型、单糖组成、分支位点及化合物中的重要官能团. 二维核磁共振法(^1H , ^1H -TOCSY、 ^1H , ^1H -COSY、 ^1H , ^1H -ROESY、 ^1H , ^{13}C -HSQC、 ^1H , ^{13}C -HMBC、 ^1H , ^{13}C -HSQC-TOCSY 等)将一维的参数展开于二维的平面上, 减少了谱线的拥挤与重叠, 更加清晰地展现了 C-C、C-H、H-H 原子间的空间作用及耦合作用, 更适用于判断单糖之间的连接位点与连接方式. 当核磁共振信号归属遇到困难、无法解析时, 可通过查阅细菌糖数据库(<http://csdb.glycoscience.ru/bacterial/>), 获取相似菌种的结构及核磁共振信息作为对照与参考, 同时也可结合相应的化学分析及质谱数据, 以便准确解析脂多糖寡糖链的结构.

3 总结与展望

脂多糖作为大多数革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分, 能诱发宿主细胞固有免疫反应, 其结构组成与细菌致病能力息息相关, 是生物医学研究领域中的关键靶标分子, 其结构鉴定在传染病的预防与治疗中起到重要作用, 有助于研发针对特异性菌种的抗生素及疫苗等医药产品. 脂多糖是由类脂 A 和寡糖链组成的两亲性分子, 其复杂的理化性质使得脂多糖结构分析并非简单易行, 目前已经使用的色谱、电泳、质谱、核磁等多种技术可以进行脂多糖的结构鉴定, 但也面临着同样的挑战, 例如: 脂多糖的鉴定往往需要多种分析技术共同完成, 样品消耗大、实验步骤繁琐、分析通量低等. 因此, 科研人员一直致力于发展新型分析技术与思路, 包括: 研发适用于细菌脂多糖微量提取的试剂盒, 或

直接针对细胞及其裂解产物中脂多糖进行检测; 选用与液相色谱填料相对应的固相萃取小柱、离子交换树脂或芯片技术等提高检测灵敏度; 在鉴定方面, 重点从优化样品前处理过程、合理选用与开发不同种质谱或者核磁等仪器、科学自动化地解析数据谱图等环节不断探索, 寻求鉴定细菌脂多糖及其寡糖链的规律与方法.

其中, 在脂多糖结构研究的众多分析方法中, 质谱技术由于灵敏度高、特异性强, 是脂多糖分析发展潜力极大的一种技术. 质谱技术的进一步发展主要包括以下两个方面: 首先可以通过细菌脂多糖的质谱图快速识别细菌种类与亚型, 该方法类似微生物质谱鉴定方法; 其次, 质谱特征谱图的分析可以实现脂多糖的结构鉴定. 由于脂多糖寡糖链分支结构的复杂性, 一级与二级质谱谱图往往不能给出寡糖链精细结构分析需要的全部信息, 例如, 寡糖链连接位点信息通常需要单糖残基发生环内碎裂时才能获得, 然而, 二级质谱提供的多是单糖之间碎裂的片段, 缺乏进一步碎裂的有效片段, 仅仅使用一级与二级质谱谱图, 往往无法提供寡糖链分支与连接位点的结构信息. 因此, 多级质谱作为可以深入研究分子结构的新型技术, 可以将二级质谱离子进一步碎裂成为三级甚至多级离子碎片, 直到离子碎片足够提供具体的结构信息为止. 离子碎片越小, 其可能的结构越少, 有利于获得唯一碎片结构, 这些碎片结构与多级碎裂关系为寡糖链提供了更多精细结构信息. 结合生物信息学技术, 多级质谱技术通过解析多级质谱谱图可获得寡糖链结构信息. 随着技术的不断发展, 建立适用于微量脂多糖高通量鉴定的新型技术方法, 将为细菌菌种的快速鉴别、脂多糖的结构及生物效力、毒理间关系的研究, 以及抗生素及疫苗的研发开辟新的道路.

参 考 文 献

- [1] Helander I M, Haikara A, Sadovskaya I, *et al.* Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *Pectinatus*—lipopolysaccharides of a Gram-positive genus. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, **28**(5): 543–552
- [2] Malgorzata-Miller G, Heinbockel L, Brandenburg K, *et al.* Bartonella quintana lipopolysaccharide (LPS): structure and characteristics of a potent TLR4 antagonist for *in-vitro* and *in-vivo* applications. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 34221
- [3] Aldapa-Vega G, Pastelin-Palacios R, Isibasi A, *et al.* Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharides. *Revista Alergia Mexico*, 2016, **63**(3): 293–302
- [4] Ma F, Rehman A, Liu H, *et al.* Glycosylation of quinone-fused

- polythiophene for reagentless and label-free detection of *E. coli*. Analytical Chemistry, 2015, **87**(3): 1560–1568
- [5] Palusiak A. Classification of *Proteus penneri* lipopolysaccharides into core region serotypes. Medical Microbiology and Immunology, 2016, **205**: 615–624
- [6] Chen M, Shpirt A M, Guo X, *et al.* Identification serologically, chemically and genetically of two *Escherichia coli* strains as candidates for new O serogroups. Microbiology, 2015, **161** (9): 1790–1796
- [7] Liu Q, Li Y, Zhao X, *et al.* Construction of *Escherichia coli* mutant with decreased endotoxic activity by modifying lipid A structure. Marine Drugs, 2015, **13**(6): 3388–3406
- [8] Speciale I, Paciello I, Fazio L L, *et al.* Determination of the structure of the O-antigen and the lipid A from the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* lipopolysaccharide along with its immunological properties. Carbohydrate Research, 2015, **412**: 20–27
- [9] Lin J, Smith M A, Benjamin W H, Jr., *et al.* Monoclonal antibodies to shigella lipopolysaccharide are useful for vaccine production. Clinical and Vaccine Immunology, 2016, **23**(8): 681–688
- [10] Martin L B, Simon R, MacLennan C A, *et al.* Status of paratyphoid fever vaccine research and development. Vaccine, 2016, **34** (26): 2900–2902
- [11] Vanithamani S, Shanmughapriya S, Narayanan R, *et al.* Lipopolysaccharide specific immunochromatography based lateral flow assay for serogroup specific diagnosis of leptospirosis in india. Plos One, 2015, **10**(9): e0137130
- [12] Kilar A, Dornyei A, Kocsis B. Structural characterization of bacterial lipopolysaccharides with mass spectrometry and on- and off-line separation techniques. Mass Spectrometry Reviews, 2013, **32**(2): 90–117
- [13] Li Y, Yoon S H, Wang X, *et al.* Structural derivation of lipid A from *Cronobacter sakazakii* using tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2016, **30**(20): 2265–2270
- [14] Molinaro A, Holst O, Di Lorenzo F, *et al.* Chemistry of lipid A: at the heart of innate immunity. Chemistry-A European Journal, 2015, **21**(2): 477–477
- [15] De Castro C, Parrilli M, Holst O, *et al.* Microbe-associated molecular patterns in innate immunity: extraction and chemical analysis of gram-negative bacterial lipopolysaccharides. Methods in Enzymology, 2010, **480**(10): 89–115
- [16] Westphal O. Bacterial lipopolysaccharide-extraction with phenol water and further application of procedure. Methods in Carbohydrate Chemistry, 1965, **5**: 83–91
- [17] Ahamad N, Katti D S. A two-step method for extraction of lipopolysaccharide from *Shigella dysenteriae* serotype 1 and *Salmonella typhimurium*: an improved method for enhanced yield and purity. Journal of Microbiological Methods, 2016, **127**: 41–50
- [18] Galanos C, Luderitz O, Westphal O. A new method for the extraction of R-LPS. European Journal of Biochemistry, 1969, **9**(2): 245–249
- [19] Caroff M, Deprun C, Karibian D, *et al.* Analysis of unmodified endotoxin preparations by ^{252}Cf plasma desorption mass spectrometry. Determination of molecular masses of the constituent native lipopolysaccharides. Journal of Biological Chemistry, 1991, **266**(28): 18543–18549
- [20] Corsaro M M, Pieretti G, Lindner B, *et al.* Highly phosphorylated core oligosaccharide structures from cold-adapted *Psychromonas arctica*. Chemistry, 2008, **14**(30): 9368–9376
- [21] Knirel Y A, Lindner B, Vinogradov E V, *et al.* Temperature-dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*. Biochemistry, 2005, **44**(5): 1731–1743
- [22] Sturiale L, Palmigiano A, Silipo A, *et al.* Reflectron MALDI TOF and MALDI TOF/TOF mass spectrometry reveal novel structural details of native lipooligosaccharides. Journal of Mass Spectrometry, 2011, **46**(11): 1135–1142
- [23] Kilar A, Dornyei A, Bui A, *et al.* Structural variability of endotoxins from R-type isogenic mutants of *Shigella sonnei*. Journal of Mass Spectrometry, 2011, **46**(1): 61–70
- [24] Sturiale L, Garozzo D, Silipo A, *et al.* New conditions for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of native bacterial R-type lipopolysaccharides. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005, **19**(13): 1829–1834
- [25] Kido N, Ohta M, Kato N. Detection of lipopolysaccharides by ethidium bromide staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Journal of Bacteriology, 1990, **172**(2): 1145–1147
- [26] Zhu Z X, Cong W T, Zhou X, *et al.* Negative staining of lipopolysaccharides on polyacrylamide gels by using eosin B. Analytical Biochemistry, 2012, **426**(1): 1–3
- [27] Hardy E, Pupo E, Castellanos-Serra L, *et al.* Sensitive reverse staining of bacterial lipopolysaccharides on polyacrylamide gels by using zinc and imidazole salts. Analytical Biochemistry, 1997, **244**(1): 28–32
- [28] Rodriguez C, Hardy E. Lipopolysaccharide aggregates in native agarose gels detected by reversible negative staining with imidazole and zinc salts. Analytical Biochemistry, 2015, **485**: 72–80
- [29] Patra K P, Choudhury B, Matthias M M, *et al.* Comparative analysis of lipopolysaccharides of pathogenic and intermediately pathogenic *Leptospira* species. BMC Microbiology, 2015, **15**: 244
- [30] Kianmehr Z, Kaboudanian Ardestani S, Soleimanjahi H, *et al.* Comparison of biological and immunological characterization of lipopolysaccharides from brucella abortus RB51 and S19. Jundishapur Journal of Microbiology, 2015, **8**(11): e24853
- [31] Wang X, Zhou A, Cai W, *et al.* Highly sensitive fluorescent stain for detecting lipopolysaccharides in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis, 2015, **36**(15): 1795–1800
- [32] Kasperkiewicz K, Swierko A S, Bartłomiejczyk M A, *et al.* Interaction of human mannose-binding lectin (MBL) with *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide. International Journal of Medical Microbiology, 2015, **305**(6): 544–552
- [33] Kilcoyne M, Twomey M E, Gerlach J Q, *et al.* Campylobacter

- jejuni strain discrimination and temperature-dependent glycome expression profiling by lectin microarray. *Carbohydrate Research*, 2014, **389**: 123–133
- [34] Siwinska M, Levina E A, Ovchinnikova O G, *et al.* Classification of a *Proteus penneri* clinical isolate with a unique O-antigen structure to a new *Proteus* serogroup, O80. *Carbohydrate Research*, 2015, **407**: 131–136
- [35] Caroff M T A, Szabó L. Detergent-accelerated hydrolysis of bacterial endotoxins and determination of the anomeric configuration of the glycosyl phosphate present in the “Isolated lipid A” fragment of the *Bordetella pertussis*, endotoxin. *Carbohydrate Research*, 1988, **175**(2): 273–282
- [36] Chafchaoui-Moussaoui I, Novikov A, Bhrada F, *et al.* A new rapid and micro-scale hydrolysis, using triethylamine citrate, for lipopolysaccharide characterization by mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011, **25**(14): 2043–2048
- [37] Carillo S, Pieretti G, Parrilli E, *et al.* Structural investigation and biological activity of the lipooligosaccharide from the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAB 23. *Chemistry*, 2011, **17**(25): 7053–7060
- [38] Sigida E N, Fedonenko Y P, Shashkov A S, *et al.* Structure of the polysaccharides from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Jm125A2. *Carbohydrate Research*, 2015, **416**: 37–40
- [39] Silipo A, Sturiale L, De Castro C, *et al.* Structure of the lipopolysaccharide isolated from the novel species *Uruburuella suis*. *Carbohydrate Research*, 2012, **357**: 75–82
- [40] Pieretti G, Carillo S, Nicolaus B, *et al.* Structural characterization of the core region from the lipopolysaccharide of the haloalkaliphilic bacterium *Halomonas alkaliantarctica* strain CRSS. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2010, **8**(23): 5404–5410
- [41] Kaszowska M, Jachymek W, Niedziela T, *et al.* The novel structure of the core oligosaccharide backbone of the lipopolysaccharide from the *Plesiomonas shigelloides* strain CNCTC 80/89 (serotype O13). *Carbohydrate Research*, 2013, **380**: 45–50
- [42] Bobko E, Tyras M, Jachymek W. Reprint of "new complete structure of *Hafnia alvei* clinical isolate strain PCM 2670 semi-rough lipopolysaccharide". *Carbohydrate Research*, 2013, **378**: 71–78
- [43] Turska-Szewczuk A, Russa R, Karas M A, *et al.* Structural elucidation of the outer core tetrasaccharide isolated from the LPS of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain 24. *Carbohydrate Research*, 2015, **409**: 1–8
- [44] Tomshich S V, Kokoulin M S, Kalinovskiy A I, *et al.* Structure of the O-specific polysaccharide from a marine bacterium *Cellulophaga tyrosinolydans*. *Carbohydrate Research*, 2015, **413**: 1–4
- [45] Kokoulin M S, Komandrova N A, Kalinovskiy A I, *et al.* Structure of the O-specific polysaccharide from the deep-sea marine bacterium *Idiomarina abyssalis* capital KA, Cyrilliccapital EM, Cyrilliccapital EM, Cyrillic 227(T) containing a 2-O-sulfate-3-N-(4-hydroxybutanoyl)-3, 6-dideoxy-d-glucose. *Carbohydrate Research*, 2015, **413**: 100–106
- [46] Komandrova N A, Kokoulin M S, Kalinovskiy A I, *et al.* The O-specific polysaccharide from the marine bacterium *Pseudoalteromonas agarivorans* KMM 255 (T). *Carbohydrate Research*, 2015, **414**: 60–64
- [47] Kojima H, Inagaki M, Tomita T, *et al.* Separation and characterization of lipopolysaccharide related compounds by HPLC/post-column fluorescence derivatization (HPLC/FLD) and capillary zone electrophoresis/mass spectrometry (CZE/MS). *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2009, **877**(14–15): 1537–1542
- [48] Kojima H, Inagaki M, Tomita T, *et al.* Improved separation and characterization of lipopolysaccharide related compounds by reverse phase ion pairing-HPLC/electrospray ionization-quadrupole-mass spectrometry (RPIP-HPLC/ESI-Q-MS). *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2010, **878**(3–4): 442–448
- [49] Man-Kupisinska A, Bobko E, Gozdiewicz T K, *et al.* Fractionation and analysis of lipopolysaccharide-derived oligosaccharides by zwitterionic-type hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with electrospray ionisation mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, 2016, **427**: 29–37
- [50] J.Li, P.Thibault, Martin A, *et al.* Development of an on-line preconcentration method for the analysis of pathogenic lipopolysaccharides using capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. Application to small colony isolates. *Journal of Chromatography A*, 1998, **817**(1–2): 325–336
- [51] Wang Z, Vinogradov E, Larocque S, *et al.* Structural and serological characterization of the O-chain polysaccharide of *Aeromonas salmonicida* strains A449, 80204 and 80204-1. *Carbohydrate Research*, 2005, **340**(4): 693–700
- [52] Zaia J. Capillary electrophoresis-mass spectrometry of carbohydrates. *Methods in Molecular Biology*, 2013, **984**: 13–25
- [53] Sigida E N, Fedonenko Y P, Shashkov A S, *et al.* Structural studies of the O-specific polysaccharide(s) from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* type strain Sp7. *Carbohydrate Research*, 2013, **380**: 76–80
- [54] Molinaro A, Silipo A, Lanzetta R, *et al.* Structural elucidation of the O-chain of the lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris*, strain 8004. *Carbohydrate Research*, 2003, **338**(3): 277–281
- [55] Sigida E N, Fedonenko Y P, Zdorovenko E L, *et al.* Structure of repeating units of a polysaccharide(s) from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* SR80. *Carbohydrate Research*, 2013, **371**: 40–44
- [56] Jachymek W, Czaja J, Niedziela T, *et al.* Structural studies of the O-specific polysaccharide of *Hafnia alvei*, strain PCM1207 lipopolysaccharide. *European Journal of Biochemistry*, 1999, **237**(3): 635–641
- [57] Kenyon J J, Duda K A, De Felice A, *et al.* Serotype O:8 isolates in the *Yersinia pseudotuberculosis* complex have different O-antigen gene clusters and produce various forms of rough LPS. *Innate Immunity*, 2016, **22**(3): 205–217
- [58] Vitiazeva V, Li J, Hood D W, *et al.* The structural diversity of

- lipopolysaccharide expressed by non-typeable *Haemophilus influenzae* strains 1158 and 1159. Carbohydrate Research, 2012, **357**: 98–110
- [59] Knirel Y A, Qian C, Senchenkova S N, *et al.* Structure of the beta-l-fucopyranosyl phosphate-containing O-specific polysaccharide of *Escherichia coli* O84. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, **88**: 578–585
- [60] Casillo A, Parrilli E, Filomena S, *et al.* Structural investigation of the oligosaccharide portion isolated from the lipooligosaccharide of the permafrost psychrophile *Psychrobacter arcticus* 273-4. Marine Drugs, 2015, **13**(7): 4539–4555
- [61] Shashkov A S, Zhang W, Perepelov A V, *et al.* Structure of the O-polysaccharide of *Escherichia coli* O132. Carbohydrate Research, 2016, **427**: 44–47
- [62] Shashkov A S, Yang B, Senchenkova S N, *et al.* Structures and genetics of biosynthesis of glycerol 1-phosphate-containing O-polysaccharides of *Escherichia coli* O28ab, O37, and O100. Carbohydrate Research, 2016, **426**: 26–32

Recent Advances in The Structural Analysis of Bacterial Lipopolysaccharide and Its Oligosaccharide Chains*

ZHOU Jin-Yu^{1,2)}, LI Qian-Qian¹⁾, HUANG Chun-Cui¹⁾, WU Hong-Mei^{1,3)}, LI Yan^{1,2)**}

¹⁾ Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾ University of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³⁾ GuangDong Bio-healtech Advanced Co.,Ltd., Foshan 528000, China)

Abstract Lipopolysaccharide (LPS), the main component of the cell wall of most gram-negative bacteria, can activate the innate immune response of host cells, and play important roles during the process of recognition, adhesion, metastasis and pathopoiesis of bacteria. Importantly, the structure of LPS determines both the serotype and the pathogenicity of a bacterial infection. Therefore, accurate analysis of its structure is essential for a better understanding of the relationship between LPS structure and its biological effects. Furthermore, reliable determination of its structure might assist in identification of hitherto unknown strains, as well as in the development of novel antibiotic compounds and vaccines. However, the amphiphilic, multi-charged and structural complicated nature of LPS presents a major challenge for its structural analysis. In this review, we summarize recently developed tools for the analysis of bacterial LPS, covering the latest approaches to extracting, separating, purifying and identifying LPS & its oligosaccharide chains.

Key words LPS, oligosaccharide chains, extraction, separation, purification, identification

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0306

* This work was supported by grants from The National Basic Research Program of China (2013CB910100), The National Natural Science Foundation of China (31270909), and The National Hi-Tech Research and Development Program(2014AA021101).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64887212, E-mail: yanli001@gmail.com

Received: September 29, 2016 Accepted: December 20, 2016