

从大肠杆菌 C-8 制备和纯化唾液酸*

钱世钧 李 剑¹ 高建梅² 郭良栋 叶 军

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 大肠杆菌, 唾液酸, 纯化

分类号 Q936 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)02-0178-80

大肠杆菌产生的多聚唾液酸是一类线性的同聚体, 这由 200 个左右的唾液酸通过 α -2, 8-酮苷键连接。我们在前文^[1]中已就产多聚唾液酸的菌种筛选及产酸条件作了叙述。本文将对多聚唾液酸的水解、唾液酸的纯化及鉴别进行研究, 为今后应用打下基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、培养基、培养方法及唾液酸测定

大肠杆菌 C-8 由本实验室筛选而得, 培养基、培养方法和唾液酸分析参照前文所述^[1]。

1.2 多聚唾液酸的制备

发酵液于 5000r/min 离心 15min, 将上清液减压蒸馏浓缩 8~10 倍, 加硫酸铵至饱和度 50%, 静置 4~5 h, 于 10 000 r/min 离心 15min, 上清液对水透析, 至透析液变为无色, 将所得透析液浓缩即为多聚唾液酸粗制品。

1.3 多聚唾液酸的水解

用 6mol/L 盐酸将多聚唾液酸液调 pH 至 2.5, 然后在 70℃ 水浴水解 4 h, 即得单体唾液酸。

1.4 唾液酸的纯化

将水解后的产物, 用氨水调 pH 至 4.0, 随即上阴离子交换树脂(Dowex1-x8)柱, 在用 3~5 倍的床体积蒸馏水洗脱后, 用 0~2 mol/L 甲酸进行梯度洗脱, 收集含唾液酸的洗脱液。

1.5 唾液酸的纯度鉴定

1.5.1 薄层层析法:展开剂:正丙醇:饱和氨水:水=6:1:2.5。显色剂:间苯二酚-盐酸试剂(与唾液酸分析试剂相同)。

将点好样品的层析板置于盛有展开剂的层析缸, 密闭式展开, 溶剂前沿距层析板上端 1cm 时取出, 在室温下挥发干, 用喷雾器喷洒显色剂, 再在 110℃ 烘箱显色, 待层析板呈现蓝紫色斑点取出。

1.5.2 光谱法:参照 Reuter 和 Schauer 的方法^[2], 将纯化的唾液酸样品分别用 5-甲基苯二酚/ Fe^{3+} /HCl 和高碘酸/硫代巴比妥酸方法处理, 再分别在 400~700 和 400~800nm 吸收光谱扫描。

1.6 试剂

Dowex1-x8 阴离子树脂和 5-甲基苯二酚为 Fluka 产品, 高碘酸钠、硫代巴比妥酸和唾液酸标准样品均为 Sigma 产品, 其余试剂为国产分析纯试剂。

2 结果和讨论

2.1 唾液酸的纯化

*“九五”国家科技攻关项目(No. 96-C02-03-08), 微生物资源前期开发国家重点实验室资助项目

¹ 北京大学生物系 1997 届毕业生, ² 北京师范大学生物系 1996 届毕业生

收稿日期: 1997-08-11, 修回日期: 1998-01-16

大肠杆菌 C-8 在合适的培养基里, 37°C 培养 65 h 所得发酵液 975 mL, 按“材料和方法”所述, 离心去菌体, 减压蒸馏浓缩, 硫酸铵沉淀, 上清液对水透析除去盐及小分子杂质, 得到多聚唾液酸粗制品 412mg。再经酸水解。水解液上 Dowex1-X8 柱(1cm×40cm), 经过水洗脱及 0~2mol/L 甲酸梯度洗脱后, 含唾液酸的洗脱液集中在 10 个管(图 1), 得到纯的唾液酸样品 183mg, 纯化收率为 22.5%。整个纯化步骤及数据见表 1。

表 1 唾液酸的纯化

步骤	体积/mL	唾液酸量/g	收率/%
发酵液	975.0	0.813	100
浓缩(1)	105.0	0.672	82.7
硫酸铵沉淀	117.0	0.531	65.3
透析	185.0	0.472	58.0
浓缩(2)	36.0	0.412	50.7
水解	34.5	0.373	45.9
Dowex1-x8 柱层析	45.0	0.183	22.5

2.2 唾液酸纯度的鉴定

对所得的唾液酸纯化样品, 按“材料和方法”所述, 进行纯度鉴定。

薄层层析结果见图 2。纯化的唾液酸与标准样品都为一点, 它们的迁移距离相同。

用光谱法分析的结果见图 3 和图 4。用 5-甲基苯二酚/ Fe^{3+} /HCl 处理样品与标准品, 它们在 400~700nm 之间的扫描曲线是平行的(图 3), 最大的吸收光谱完全一致。而用高碘酸/硫代巴妥酸处理的样品在 400~800nm 的最大吸收光谱(A550)及整个图形与文献报道基本一致^[2]。

以上结果表明, 所制得的唾液酸样品已达到相当高的纯度。

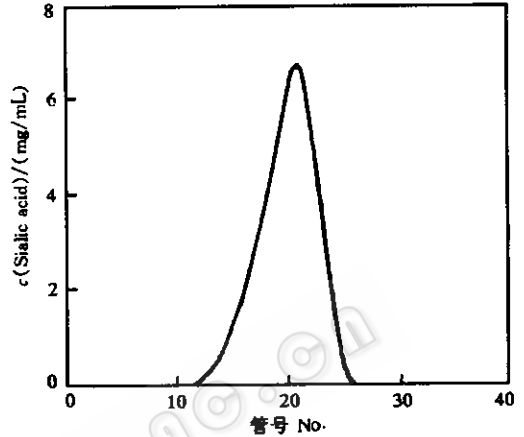


图 1 唾液酸的 Dowex1-x8 柱层析图

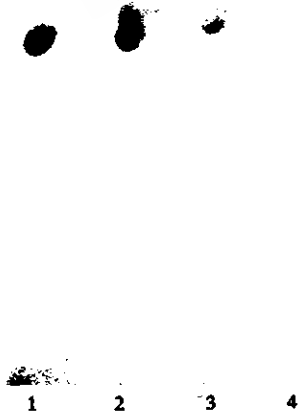
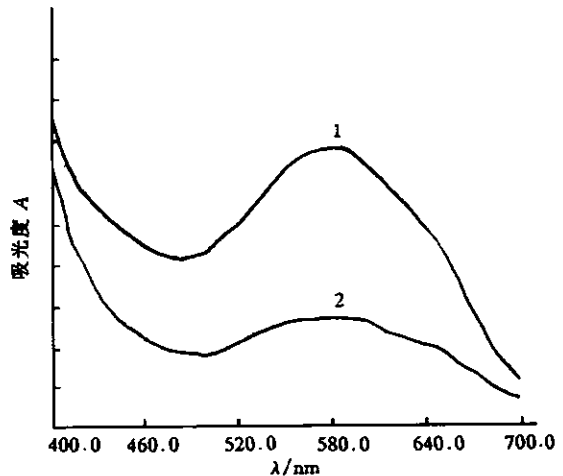


图 2 唾液酸的薄层层析分析

1. 唾液酸标准品;
2. 多聚唾液酸水解后的样品;
3. 层析后的样品;
4. 多聚唾液酸。

图 3 唾液酸在 5-甲基苯二酚/ Fe^{3+} /HCl 中的吸收光谱

1. 唾液酸标准品;
2. 纯化后的唾液酸样品。

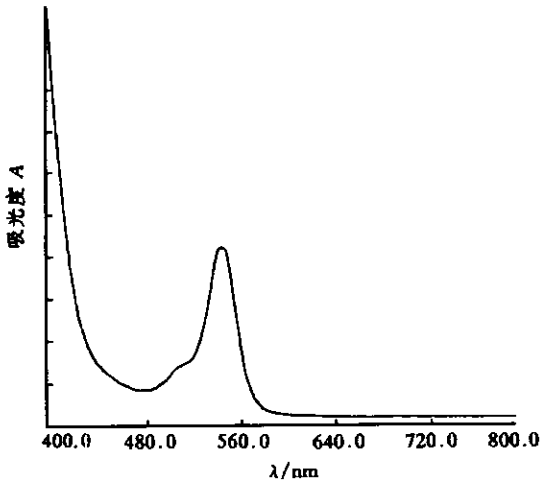


图4 唾液酸在高碘酸/硫代巴比妥酸中的吸收光谱

2.3 讨论

唾液酸的测定方法很多,我们采用的是间苯二酚法^[3],这个方法可以测定通过糖苷键结合的及游离的唾液酸,这对于在纯化过程中确定唾液酸的总量(包括多聚和寡聚唾液酸)是有利的。但其他一些糖类(如己糖、戊糖等)在分析反应中所产生的色素,在 580nm 处也有吸收,影响方法的精确度,纯度越高的唾液酸受这方法的干扰越小。纯化收率的下降实际上受到此因素的影响。

参 考 文 献

- [1] 郭良栋,钱世钧,叶 军等. 微生物学报, 1998, 38(1): 103~107.
- [2] Reuter G, schauer R. Methods in enzymology, Vol. 230, Lennarz WJ San Diego: Academic Press, 1994. 168~199.
- [3] Svennerholm L. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1957, 24(3): 604.
- [4] Itzstei M V, Wu W Y, Kok G B *et al.* *Nature*, 1993, 363: 418~423.

PREPARATION, PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF SIALIC ACID FROM *ESCHERICHIA COLI* C-8*

Qian Shijun Li Jian Gao Jianmei Guo Liangdong Ye Jun
(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

Abstract Colominic acid produced from *Escherichia coli* C-8 was purified by ammonia sulfate precipitation, dialysis and concentration. After hydrolysis of colominic acid at a pH of 2.5, at 70°C for 4h, sialic acid was obtained, then purified by chromatography on Dowex1-x8. Analysis of thin-layer chromatography and absorption spectrum of sialic acid in the orcinol/Fe³⁺/HCl and the periodic acid/thiobarbituric acid confirmed that its purity was identical with that of standard sample.

Key words *Escherichia coli*, Sialic acid, Purification

* Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development (No. 96-C02-03-08)