

研究报告

基于棉花亲水色谱从鸡蛋黄中分离纯化唾液酸化糖肽研究

韩健利¹ 陈庆辉² 邹美义² 路宇² 魏明² 李成²
王承健¹ 黄琳娟¹ 王仲孚^{*1,2}

¹(西北大学食品科学与工程学院, 陕西省天然多糖资源利用工程研究中心, 西安 710069)

²(西北大学生命科学学院, 西安 710069)

摘 要 鸡蛋黄中的唾液酸化糖肽(Sialylglycopeptide, SGP)的肽段部分由 6 个氨基酸(KVANKT)组成,其中天冬酰胺(N)被唾液酸化的复杂型 *N*-糖链修饰。SGP 主要从鸡蛋黄中分离获得,现有的 SGP 分离纯化方法操作繁琐,成本较高,难以规模化制备。本研究基于亲水相互作用色谱技术,用医用脱脂棉作为亲水色谱柱的固定相,建立了一种从鸡蛋黄中分离纯化唾液酸化糖肽的方法。首先将鸡蛋黄经苯酚处理得到唾液酸化糖肽的粗品,然后将糖肽粗品用水配成 150 mg/mL 的溶液,加入制备好的棉花亲水色谱柱中,依次用 100%、95%、85%、75% (V/V) 的乙腈-水溶液进行除杂,最后用去离子水洗脱唾液酸化糖肽。本方法操作简单,成本低廉。利用本方法从 50 个鸡蛋黄中制备得到了 300 mg SGP,经高效液相色谱(HPLC)鉴定,其纯度高达 95%,同时采用电喷雾电离质谱(ESI-MS)和串联质谱(MS/MS)对 SGP 及其糖链组成和糖基化位点进行了表征。

关键词 唾液酸化糖肽; 亲水色谱柱; 脱脂棉; 鸡蛋黄

1 引言

糖基化(Glycosylation)修饰是蛋白质最普遍、最复杂的翻译后修饰之一,目前已知的蛋白质中约有一半以上发生了糖基化修饰^[1]。与蛋白共价连接的寡糖链在细胞通讯、细胞粘附、病原体感染、个体发育及免疫应答等生物过程中发挥了关键作用^[2~6]。由于糖链的生物合成具有结构的微观不均一性,导致了糖蛋白和糖肽功能上的显著差异。带有均一糖链的糖蛋白和糖肽是糖链结构和功能研究必不可少的材料。开发制备带有均一糖链的糖蛋白和糖肽的方法成为糖生物学的研究热点。

鸡蛋黄中唾液酸化糖肽(Sialylglycopeptide, SGP)的肽段部分由 6 个氨基酸(KVANKT)组成,其中天冬酰胺(N)被唾液酸化的复杂型 *N*-糖链修饰^[7~9]。该糖肽是一种人源化的糖肽,研究表明,这种唾液酸化糖肽在许多生物过程中具有重要作用。SGP 在肠道疾病的治疗过程中具有一定作用,唾液酸化糖肽不仅可抑制沙门氏菌等细菌感染人类肠道表面细胞^[10],也可抑制轮状病毒感染小肠上皮细胞,对于婴幼儿腹泻有较好的治疗效果^[11]。同时,SGP 中唾液酸化的 α -(2 $\rightarrow$ 6) *N*-乙酰氨基乳糖残基在抗流感病毒方面也有重要作用,可作为与 A 型人流感病毒血凝素结合的配体,进而阻止病毒感染人体^[12]。SGP 也可作为糖基供体,用于合成带有 *N*-糖链的亲脂类化合物,对药物的发现和开发具有重要意义^[13]。由于唾液酸化糖肽具有重要的生物学活性和临床药用价值,该糖肽的制备和生产显得尤为必要。

唾液酸化糖肽结构复杂,很难用化学方法或生物工程方法进行合成获取。SGP 是鸡蛋黄中的主要成分之一,从鸡蛋黄中提取是获取唾液酸化糖肽的主要途径。目前主要有两种纯化方法:其一是 1997 年 Seko 等^[7]首次报道的从鸡蛋黄中分离纯化唾液酸化糖肽的方法。该方法对鸡蛋黄进行苯酚处理后,经过两次 Sephadex G-50 分离、Sephadex G-25 除盐、DEAE-Toyopeael 650M 离子交换柱纯化、Sephadex G-25 除盐后,冻干得到样品,但上述方法具有步骤多、成本高、周期长、样品损失较大、上样量少等缺点;其二是 Zou 等^[14]报道的方法,先用苯酚处理新鲜的鸡蛋黄得到唾液酸化糖肽粗提物,再用 Sephadex

G-50进行分离,最后用活性炭柱进行纯化。该方法虽然简化了一些步骤,但纯化周期仍然较长,柱填料成本较高,且由于 Sephadex G-50 柱层析色谱上样量的限制,不适合大规模制备唾液酸化糖肽。

亲水相互作用色谱 (Hydrophilic interaction chromatography, HILIC) 由于能很好地纯化分离糖肽^[15~17],在糖组学和糖蛋白组学中得到了广泛应用^[18~20]。HILIC 固定相的一个重要特征是它们是非离子的,可与糖肽上的糖链之间形成氢键,从而吸附糖肽,由于低保留率,未被糖基化修饰的肽段、脂质、盐被洗涤剂洗脱^[21~23]。Wada 等^[24]报道了微晶纤维素柱可用于胰蛋白酶糖肽的纯化;Sha 等^[18]将溶胶-凝胶转化法制备的纤维素微球用于人免疫球蛋白(IgG)糖肽的纯化。虽然这些方法都实现了糖肽的纯化,但是微晶纤维素柱和合成的纤维素微球填料粒径小,装柱时易渗漏;微晶纤维素柱需使用有强烈的刺激性气味的正丁醇,而纤维素微球合成产率低且未商品化生产。相比之下,棉花亲水色谱柱具有操作简单、不会渗漏、成本低廉等优点。目前尚未有将棉花亲水色谱柱用于鸡蛋黄中唾液酸化糖肽的规模化制备的研究报道。

唾液酸化糖肽的肽段部分较短,具有较好的亲水性,使得利用棉花亲水色谱对其进行分离纯化成为可能。本研究以医用脱脂棉为 HILIC 固定相,从鸡蛋黄中分离纯化 SGP,对其结构和纯度进行鉴定,纯化效果良好。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

LC-2010A 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司);LTQ-XL 型电喷雾电离质谱(美国 Thermo Scientific 公司)。

N-糖苷酶 F(PNGase F, Sigma-Aldrich 公司);十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)、二巯苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)、NP-40(上海阿拉丁试剂公司);乙腈(Acetonitrile, ACN)等试剂均为国产分析纯;WondaSep C₁₈和多孔石墨化碳固相萃取小柱(日本 Shimadzu-GL Sciences 公司)。医用脱脂棉购于西北大学附属医院。实验用水为 Milli-Q 系统(美国 Millipore 公司)制备的超纯水。新鲜未受精鸡蛋购于本地农贸市场。

2.2 实验方法

2.2.1 鸡蛋黄的苯酚预处理 参考文献[7]的方法,用苯酚处理新鲜蛋黄,得到唾液酸化糖肽粗品。首先取 50 个新鲜未受精的鸡蛋黄(约 1 L),加入等体积的去离子水稀释,并搅拌均匀。向上述蛋黄溶液中加入 10 倍体积的苯酚-水(1:9, V/V)溶液,持续搅拌 2 h,然后加入 2 L 去离子水,混匀后,以 8000 r/min 离心 30 min,将上清液用旋转蒸发仪减压浓缩至 50 mL,再经冷冻干燥,即得到唾液酸化糖肽粗品,于-20℃保存,备用。

2.2.2 棉花亲水色谱柱的准备 取医用脱脂棉 150 mg 均匀塞进 1 mL 的移液枪枪头中,并轻微压实,分别用 10 mL 水和乙腈清洗棉花柱。

2.2.3 唾液酸化糖肽的富集 将冻干的唾液酸化糖肽粗品配制成 150 mg/mL 的溶液,12000 r/min 离心 3 min。取上清液加入清洗好的棉花柱中,用乙腈、乙腈-水(19:1, V/V)、乙腈-水(17:3, V/V)和乙腈-水(3:1, V/V)各 15 mL 除杂质,用 6 mL 去离子水洗脱唾液酸化糖肽,冷冻干燥,得到唾液酸化糖肽纯品,采用 ESI-MS 进行分析。

2.2.4 唾液酸化糖肽的 PNGase F 酶解 5 mg 样品溶于 50 μL 去离子水中,加入等体积的蛋白质变性液(0.17 mol/L SDS 和 0.4 mol/L DTT),100℃加热变性 10 min。冷却到室温,向体系中加入 60 μL 酶解缓冲液(0.5 mol/L Na₃PO₄,用 H₃PO₄ 调节至 pH 7.5)、60 μL NP-40 溶液(1:9, V/V)和 1.5 μL PNGase F 酶(500 units/μL),37℃反应 24 h^[25,26]。反应结束后,反应液在 13000 r/min 离心 3 min,上清液经 C₁₈ 柱和多孔石墨化碳固相萃取小柱纯化,用 ESI-MS 分析。

2.2.5 ESI-MS 和 MS/MS 分析条件 ESI-MS 参数设置如下:质谱进样口的定量环为 2 μL;流动相为甲醇-水(1:1, V/V);清洗时流速为 200 μL/min;毛细管温度 300℃;进样检测时流速为 20 μL/min;离子源电喷雾工作电压为 4 kV;毛细管透镜电压 250 V;辅助气(氮气)流速:鞘气(氮气)流速=1:2(辅

助气体流速一般选择 10 arb); 毛细管电压 37 V; 用 LTQ Tune 软件对数据进行采集。

多级质谱(MS^n)检测参数设置为:在 ESI-MS 参数设置的基础上增加了碰撞气体为氦气; 狭缝宽度为 m/z 3; 碰撞时的能量选择 30% ~ 45%。

2.2.6 利用 HPLC 对唾液酸化糖肽进行纯度鉴定 对棉花亲水色谱柱纯化后的唾液酸化糖肽进行高效液相色谱分析,使用酰胺柱 HILIC (250 mm×4.6 mm, TSK-GEL Amide-80)。流动相 A 为乙腈,流动相 B 为水。将样品瓶放置在相应位置,自动进样器进样 10 μ L。其中分离条件设置:流速 0.8 mL/min; 线性梯度洗脱:0 ~ 60 min, 80% ~ 20% A。柱温为 25 $^{\circ}$ C, 检测波长 214 nm。

3 结果与讨论

3.1 唾液酸化糖肽的纯化策略

鸡蛋黄经过苯酚处理后得到的唾液酸化糖肽粗提取物中含有大量的杂蛋白、脂质和盐等杂质,要得到较纯的唾液酸化糖肽,首先须除去上述杂质。Seko 等^[7]报道的纯化唾液酸糖肽的方法,主要采用连续两次 Sephadex G-50 纯化除去杂蛋白,然后用 Sephadex G-25 除盐处理 3 次,该方法操作繁琐,由于连续过柱纯化造成了样品损失严重。Zou 等^[14]报道的纯化唾液酸糖肽的方法,同样采取 Sephadex G-50 除去杂蛋白,然后利用活性炭对唾液酸化糖肽表面糖链的吸附作用,将样品过活性炭柱进行水洗除盐,该方法相比文献^[7]方法省略了很多步骤,但由于 Sephadex G-50 柱层析色谱存在上样量的限制,而且柱填料成本较高,不利于规模化制备。本研究将除杂质过程简化为一步,利用棉花亲水色谱柱与糖肽表面糖链上的羟基形成次级化学键,体系中的杂蛋白和盐等杂质由于在色谱柱上不能保留而被洗脱除去。分离纯化唾液酸化糖肽的策略见图 1,此纯化策略具有便捷、高效、柱填料成本低等优点,还可对柱体积进行放大处理,实现大规模纯化制备唾液酸化糖肽。

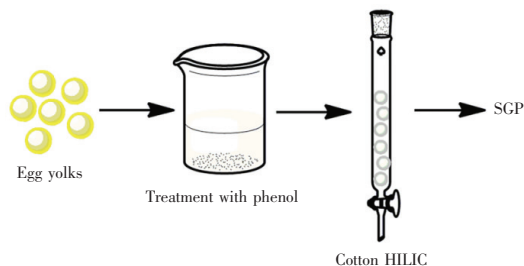


图 1 唾液酸化糖肽的分离纯化策略

Fig. 1 Strategy for separation and purification of sialylglycopeptide (SGP)
HILIC, hydrophilic interaction chromatography

3.2 棉花亲水色谱柱纯化糖肽过程中洗脱液的 ESI-MS 图谱分析

洗脱剂中水的百分比对于亲水色谱柱的洗脱效果影响很大,含水量过高将会造成样品损失。依次用乙腈、乙腈-水(19:1, V/V)、乙腈-水(17:3, V/V)和乙腈-水(3:1, V/V)对棉花亲水柱进行洗脱,除去体系中的盐和蛋白等杂质。对洗脱下来的液体进行 ESI-MS(负离子模式下)实时检测。与图 2A 相比,图 2B 和图 2C 信噪比较差,基线较高,并且未检测到唾液酸化糖肽的质谱信号峰,表明大量杂质在乙腈-水(19:1, V/V)或乙腈-水(17:3, V/V)的洗脱条件下被洗脱下来。图 2D 的基线开始趋于平稳,同时有几条主峰出现,表明在乙腈-水(3:1, V/V)的洗脱条件基本接近临界值。以水对棉花色谱柱进行洗脱,目标产物的理论分子量为 m/z 2866,由于所用质谱仪的检测分子量上限为 2000 Da,在质谱检测中发现目标产物的双电荷峰 m/z 1431.3 $[M-2H]^{-2}$ 和三电荷峰 m/z 953.9 $[M-3H]^{-3}$,而且信噪比较好(图 2E)。因此,上述结果表明,利用棉花亲水色谱柱可以很好地纯化并得到唾液酸化糖肽。

3.3 PNGase F 酶处理唾液酸化糖肽后 N-糖基化位点的鉴定与糖链结构分析

唾液酸化糖肽经 PNGase F 酶解,再通过 C_{18} 和多孔石墨化碳固相萃取小柱纯化后,得到了肽段和糖链部分,分别进行 ESI-MS 分析。图 3 为肽段部分的质谱图,唾液酸化糖肽的氨基酸序列为(Lys-Val-Ala-Asn-Lys-Thr),理论分子量为 659 Da,经 PNGase F 酶解作用后,天冬酰胺(N)变成天冬氨酸(D),分子量增加 0.98 Da,理论分子量变成 660 Da。图 3 中的 m/z 661 质谱峰为正离子模式下目标肽段的单电荷 $[M+H]^+$ 峰,与理论分子量相吻合。

为进一步确认目标峰的氨基酸序列,进行了串联质谱(MS/MS)分析,结果如图 4 所示,对图中的 b、y 离子碎片进行归属,发现 m/z 643.25 与肽段的分子量 661 Da 相差一个水分子,确定其为肽段失去一

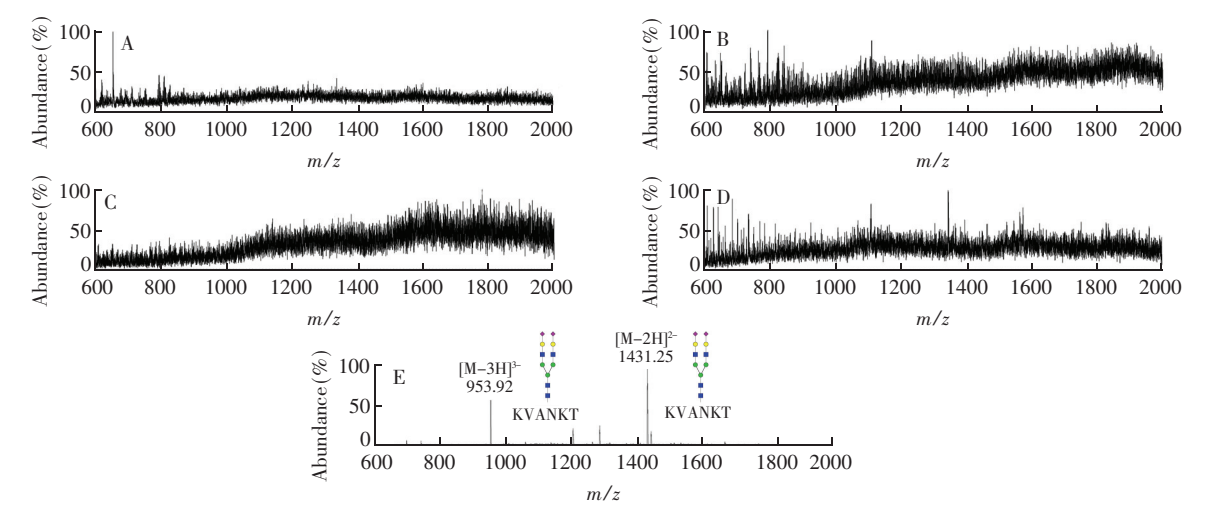


图 2 不同洗脱条件下洗脱液的 ESI-MS 图谱：A：乙腈；B：乙腈-水（19：1，V/V）；C：乙腈-水（17：3，V/V）；D：乙腈-水（3：1，V/V）；E：水。■：N-乙酰氨基葡萄糖；●：甘露糖；●：半乳糖；◆：唾液酸；K：赖氨酸；V：缬氨酸；A：丙氨酸；N：天冬酰胺；T：苏氨酸

Fig. 2 Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) analyses of eluent under different elution conditions: A: 100% ACN; B: CAN-H₂O (19:1, V/V); C: CAN-H₂O (17:3, V/V); D: CAN-H₂O (3:1, V/V); E: H₂O. ■: N-acetylglucosamine; ●: Mannose; ●: Galactose; ◆: Sialic Acid; K: lysine; V: valine; A: alanine; N: asparagine; T: threonine

分子水的碎片峰 ($M-H_2O$)； m/z 560.17 (b_5) 为肽段失去一个苏氨酸残基质量 101 Da 所形成的碎片峰； m/z 414.17 (b_4-H_2O) 为 b_5 失去一个赖氨酸残基质量 128 Da 和一分子水所形成的碎片峰； m/z 317.25 (b_3) 为 b_4 失去一个天冬氨酸残基质量 115 Da 所形成的碎片峰，这也符合在 PNGase F 酶解的过程中，天冬酰胺变成了天冬氨酸； m/z 246.72 (b_2) 为 b_3 失去一个丙氨酸残基质量 71 Da 而形成的碎片峰； m/z 533.17 (y_5) 为肽段失去一个赖氨酸残基质量 128 Da 所形成的碎片峰； m/z 434.17 (y_4) 为 y_5 失去一个缬氨酸残基质量 99 Da 所形成的碎片峰； m/z 363.17 (y_3) 为 y_4 失去一个丙氨酸残基质量 71 Da 所形成的碎片峰； m/z 248.25 (y_2) 为 y_3 失去一个天冬氨酸残基质量 115 Da 所形成的碎片峰。结合上述分析结果，可以得出肽段的氨基酸序列为 KVAN[#]KT (#表示糖基化位点)，与理论序列一致，并确定了序列中的 Asn 是一个糖基化位点。

在质谱的负离子模式下对糖链结构进行解析，结果如图 5 所示，唾液酸糖链的理论分子质量为 m/z 2223，图 5 中的 m/z 1111.09 为目标糖链的双电荷 $[M-2H]^{2-}$ 峰， m/z 2222.64 为其单电荷 $[M-H]^{-}$ 峰， m/z 2244.73 为单电荷 $[M+Na-2H]^{-}$ 峰。为进一步确定糖链结构，对图 5 中的 m/z 2244.73 进行 ESI-MS/MS 分析，结果如图 6 所示。对图 6 中的离子碎片峰进行解析，归属如下： m/z 2041.36 是 m/z 2244.73 失去一个 N-乙酰氨基葡萄糖残基 (203 Da) 形成的碎片峰； m/z 2023.55 为 m/z 2041.36 失去一分子水形成的碎片峰； m/z 1940.18 ($^{0,2}A_6$) 为糖链发生穿环裂解形成的碎片峰； m/z 1838.55 为 m/z 2041.36 失去一个 N-乙酰氨基葡萄糖残基形成的

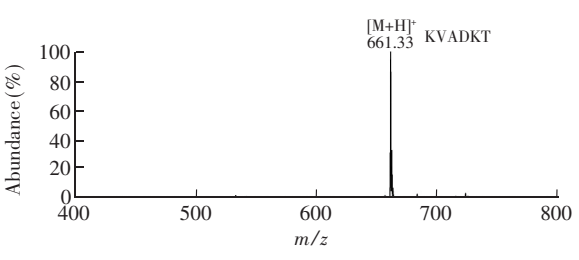


图 3 唾液酸化糖肽肽段部分的 ESI-MS 图谱

Fig. 3 ESI-MS spectrum of peptide of SGP

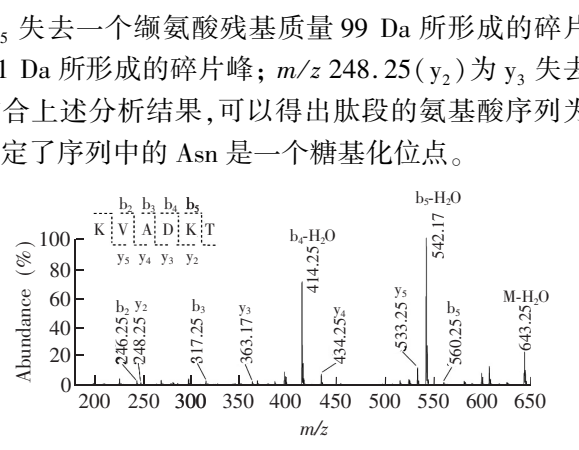


图 4 唾液酸化糖肽肽段部分的 MS/MS 图谱

Fig. 4 MS/MS spectrum of peptide of SGP

碎片峰; m/z 1732.55 为 m/z 2023.55 失去一个唾液酸形成的碎片峰; m/z 1589.27 为 m/z 2041.36 失去一个唾液酸和半乳糖残基形成的碎片峰; m/z 1529.45 为 m/z 1732.55 失去一个 N -乙酰氨基葡萄糖残基形成的碎片峰。综上,解析出糖链结构为 H5N4A2(H:己糖;N: N -乙酰氨基葡萄糖;A:唾液酸),与文献[14]报道的一致,证明纯化得到的产物为唾液酸化糖肽。

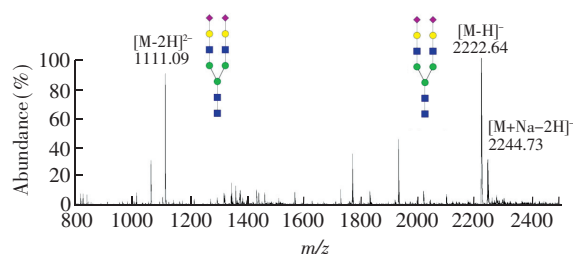


图5 唾液酸化糖肽经糖苷酶 F 处理后 N -糖链的 ESI-MS 图谱

Fig.5 ESI-MS spectrum of the N -glycans of SGP after PNGase F hydrolysis

3.4 唾液酸化糖肽纯度的鉴定

通过高效液相色谱(HPLC)对棉花色谱柱纯化得到的唾液酸化糖肽进行纯度鉴定,色谱图如图7所示,在34 min处出现目标峰,对峰面积进行积分,鉴定其纯度达到95%以上。

4 结论

采用苯酚对鸡蛋黄进行预处理,获取唾液酸糖肽粗品,以脱脂棉制作的亲水色谱柱进行除杂,建立了一种操作简单、快速高效、可大量制备唾液酸化糖肽的方法。用此方法从50个鸡蛋黄中提取到300 mg 唾液酸化糖肽,对其进行结构解析和纯度鉴定。结果表明,糖链结构、氨基酸序列、糖基化位点均与理论值相吻合,通过 HPLC 鉴定其纯度>95%。本方法纯化唾液酸化糖肽分离步骤少,用时短,固定相的成本低,为规模化制备唾液酸化糖肽提供了解决方案,有良好的应用前景。

References

- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1473(1): 4-8
- Agrawal P, Fontanals-Cirera B, Sokolova E, Jacob S, Vaiana C A, Argibay D, Castillo M. *Cancer Cell*, **2017**, 31(6): 804-819
- Dube D H, Bertozzi C R. *Nat. Rev. Drug Disc.*, **2005**, 4(6): 477-488
- Haltiwanger R S, Lowe J B. *Seminars Cell Develop. Biol.*, **2010**, 21(6): 638-645
- Arnold J N, Wormald M R, Sim R B, Rudd P R, Dwek R A. *Annu. Rev. Immunol.*, **2007**, 25(1): 21-50
- Dwek R A, Butters T D, Platt F M, Zitzmann N. *Nat. Rev. Drug Disc.*, **2002**, 1(1): 65-75
- Seko A, Koketsu M, Nishizono M, Enoki Y, Ibrahim H R, Juneja L R, Kim M, Yamamoto T. *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, 1335(1-2): 23-32
- Liu L, Prudden A R, Bosman G P, Boons G J. *Carbohydr. Res.*, **2017**, 452: 122-128
- Peng W, de Vries R P, Grant O C, Thompson A J, McBride R, Tsogtbaatar B, Paulson J C. *Cell Host Microbe*, **2017**, 21(1): 23-34
- Sugita-Konishi Y, Sakanaka S, Sasaki K, Juneja L R, Noda T, Amano F. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50(12): 3607-3613
- Koketsu M, Nitoda T, Juneja L R, Kim M, Kashimura N, Yamamoto T. *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43(4): 858-861
- Makimura Y, Watanabe S, Suzuki T, Suzuki Y, Ishida H, Kiso M, Katayama T, Kumagai H, Yamamoto K. *Carbohydr. Res.*, **2006**, 341(11): 1803-1808

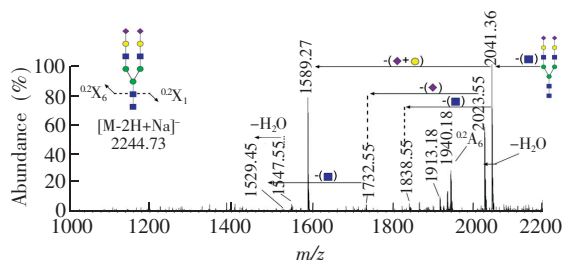


图6 m/z 2244.73 的 MS/MS 图谱

Fig.6 MS/MS spectrum of m/z 2244.73

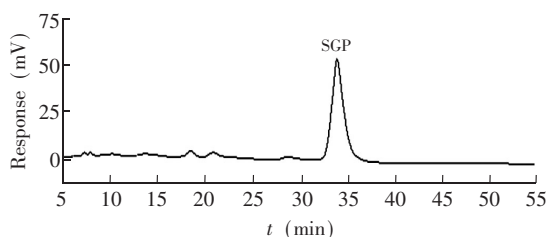


图7 唾液酸化糖肽的高效液相色谱图

Fig.7 High performace liquid chromatogram of SGP

- 13 Huang W, Ochiai H, Zhang X, Wang L X. *Carbohydr. Res.*, **2008**, 343(17): 2903–2913
- 14 Zou Y, Wu Z G, Chen L L, Liu X W, Gu G F, Xue M Y, Wang P G, Chen M. *J. Carbohydr. Chem.*, **2012**, 31(4-6): 436–446
- 15 Takegawa Y, Deguchi K, Keira T, Ito H, Nakagawa H, Nishimura S. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1113(1-2): 177–181
- 16 Wohlgemuth J, Karas M, Jiang W, Hendriks R, Andrecht S. *J. Sep. Sci.*, **2010**, 33(6-7): 880–890
- 17 Selman M H J, Hemayatkar M, Deelder A M, Wuhner M. *Anal. Chem.*, **2011**, 83(7): 2492–2499
- 18 Sha Q, Wu Y, Wang C, Sun B, Zhang Z, Zhang L, Liu X, Sun B, Lin Y. *J. Chromatogr. A*, **2018**, 1569: 8–16
- 19 Zhang Q, Li H, Feng X, Liu B F, Liu X. *PloS One*, **2014**, 9(4): e94232
- 20 Selman M H, McDonnell L A, Palmblad M, Ruhaak L R, Deelder A M, Wuhner M. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(3): 1073–1081
- 21 Ruhaak L R, Huhn C, Waterreus W J, de Boer A R, Neuss C, Hokke C H, Deelder A M, Wuhner M. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(15): 6119–6126
- 22 Wuhner M, de Boer A R, Deelder A M. *Mass Spectrom. Rev.*, **2009**, 28(2): 192–206
- 23 Mysling S, Palmisano G, Hojrup P, Thaysen-Andersen M. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(13): 5598–5609
- 24 Wada Y, Tajiri M, Yoshida S, Shumi Y. *Anal. Chem.*, **2004**, 76(22): 6560–6565
- 25 Packer N H, Lawson M A, Jardine D R, Redmond J W. *Glycoconjugate J.*, **1998**, 15(8): 737–747
- 26 LI Ling-Mei, WANG Cheng-Jian, HAN Jian-Li, LIU Ren-Dan, WEN Ya-Nan, WEI Ming, JIN Wan-Jun, HUANG Lin-Juan, WANG Zhong-Fu. *Chem. J. Chinese Universities*, **2018**, 39(3): 427–434
- 李玲梅, 王承健, 韩健利, 柳人丹, 温娅楠, 魏明, 晋万军, 黄琳娟, 王仲孚. 高等学校化学学报, **2018**, 39(3): 427–434

Separation and Purification of Sialylglycopeptide from Egg Yolk Based on Cotton Hydrophilic Chromatography

HAN Jian-Li¹, CHEN Qing-Hui², ZOU Mei-Yi², LU Yu², WEI Ming², LI Cheng²,
WANG Cheng-Jian¹, HUANG Lin-Juan¹, WANG Zhong-Fu^{*1,2}

¹(Shaanxi Natural Carbohydrate Resource Engineering Research Center,
College of Food Science and Technology, Northwest University, Xi'an 710069)

²(College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract The peptide portion of the sialylglycopeptide (SGP) in egg yolk is composed of six amino acids residues (KVANKT), in which asparagine (N) is modified by sialylated complex N-glycan. SGP is mainly obtained from egg yolk, and currently, the methods for separation and purification of SGP are cumbersome, expensive, and difficult to scale production. In this study, a simple and low-cost method for separation and purification of sialylated glycopeptide from egg yolk was developed based on the hydrophilic interaction chromatography by using medical absorbent cotton as stationary phase. Firstly, 50 egg yolks were treated with phenol to obtain crude sialylated glycopeptide. The obtained glycopeptide was then formulated into a 150 mg/mL solution and loaded onto the prepared cotton hydrophilic chromatographic column, followed by the treatment with 100%, 95%, 85% and 75% acetonitrile aqueous solution to remove the impurity. Finally, the sialylglycopeptide was obtained by eluting with deionized water. By this way, 300 mg SGP was obtained and its purity was identified by high-performance liquid chromatography (HPLC) to be 95%. The glycan composition and glycosylation site of SGP were further validated by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and tandem mass spectrometry (MS/MS).

Keywords Sialylated glycopeptide; Hydrophilic column; Absorbent cotton; Egg yolk

(Received 4 June 2019; accepted 10 October 2019)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31670808, 31870798).