

蛋白质糖基化工程

张旭 综述 黄秉仁 审校

(中国医学科学院基础医学研究所生化室)

引言

生物体内大多数蛋白质为糖蛋白。^[14]特别是随着基因工程产品的开发,蛋白上糖链的结构与功能愈来愈受到关注,以每年测定六百个新寡糖链顺序的速度增长。从美国国家生物技术信息中心(CCSDB)得知,目前已获得 9200 个独特的寡糖链。预计到 1994 年底将增加到 12000 个。^[6]

由于原核细胞表达体系表达的无糖化蛋白往往无体内活性,^[33]酵母与昆虫表达体系产生的糖蛋白,其糖链与天然糖蛋白往往不相同,^{[28][6]}就是哺乳动物细胞的表达体系也有成本高等不利因素,因此,分子生物学家在努力寻找控制糖链顺序的方法。糖生物学(Glycobiology)将成为研究热点。^[35]

目前,基因工程与蛋白质工程的方法日趋成熟,糖基化工程(Glycosylation engineering)也应运而生,^[40]其目的是生产有应用价值的糖蛋白。本文的目的主要讨论有关糖链的结构与功能,糖基化工程手段及其应用前景。

一、蛋白上糖链的结构

糖蛋白上的糖链从连接方式上可分两类:一类是与天冬氨酰连接,即 N-连接糖蛋白,另一类与丝氨酸或苏氨酸连接,称为 O-连接糖蛋白。一般来说,O-糖链不含甘露糖,而 N-糖链总含有大量的甘露糖,因此,通过分析单糖的组分,便可知两者的分布组成情况。^[12]

N-糖链通常都有一个五糖核心 | Man α 1 \rightarrow 6 (Man α 1 \rightarrow 3) Man β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc |,根据它们的外层链(Outer Chain)结构的不同,可分为:高甘露糖型(High man-

nose),杂合型(Hybrid type)与复合型(Complex type),如图 1 所示。

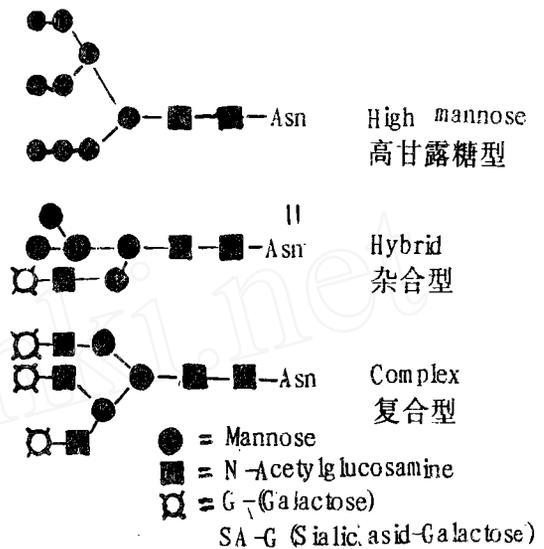


图 1 N-连接型糖蛋白的三种类型

O-糖链根据其核心结构的不同可分为四个亚型^[24]如图 2 所示

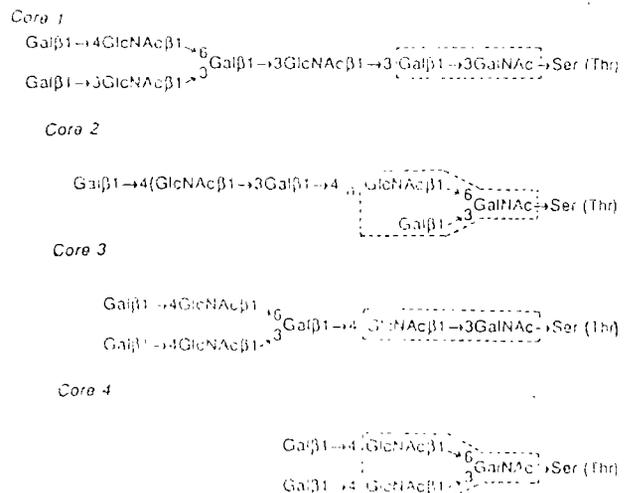


图 2 O-连接糖链的四种亚型虚线框内是核心结构

二、糖链的功能

糖链的功能广泛,遍及生物体的各个功能领域。^{[9][37]}同一蛋白上的糖可有多种功能,如红细胞生成素(EPO)这一高度糖化的蛋白,其寡糖对生物合成、分泌及生理学效应等方面,都起很重要的作用。^[5]有些蛋白的糖链,依据其蛋白的特性担任如下功能之一。

1. 寡糖的结构功能(structure function),保护(protection)功能和稳定(stability)功能蛋白聚糖和粘多糖对维持组织结构及其完整性无疑起很重要的作用。^[19]同样,覆盖在糖蛋白上的糖链,在维持蛋白质结构的同时,也起到保护多肽链不被蛋白酶水解,防止与抗体识别等作用。另外,糖链参与多肽在内质网中折叠的起始,并参与之后的溶解度与构象的维系。

通常,有已上功能的蛋白其外层糖链的微小改变并不影响其功能。^[41]

2. 寡糖的毒素受体功能

某些特定的寡糖是许多细菌毒素,植物毒素的受体^[12],如流感病毒血凝集素,能特异性识别唾液酸及其相关类型,而霍乱毒素能极特异地与细胞表面上特殊的糖链顺序:GM1神经节苷脂结合。这种结合特异性已为研究糖链的表达,提供了极大的方便。^[39]同样,一些特定的糖链参与了共生动物肠道病毒和植物根瘤病毒与宿主的结合。^[41]

3. 寡糖的开关与调节功能^[41]

一些细胞表面的生长因子受体需糖基化后才有结合功能,这样可避免不必要的配体-受体结合,^[1]配体的糖化同样具开关功能。例如,人 β 绒毛膜促性腺激素(β -HCG)去糖化后,与受体结合的亲合力没有改变^[20],但失去激活腺苷酸环化酶而引发的传递信号的能力。^[2]

但在大多数情况下,糖化所表现的不是开关(switch)功能,而是部分的或相对的调节,即相当于调频(Tuning)功能,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(CM-CSF),常有一系列糖型(Glycoforms),它们对亲合力及信号传递就有所不同。^{[1][32]}

4. 寡糖的库存功能^[41]

寡糖的另一个新被发现的功能是做为重要生物活性分子的保护性储存仓库,许多生长因子是通过葡糖胺糖链固相化亲合层析纯化的,看来,特异性生长因子可紧密地结合体内的葡糖胺糖链上,这样,可使生长因子定位于待激活细胞的胞外基质(extracellular matrix)上,在分泌颗粒中,已发现葡萄糖胺链的存在,它们在分泌之后与蛋白结合并起保护作用^[41]因此可以设想其作为仓库,是为避免生长因子扩散,已有证据表明,这样的库(sink)能保护生长因子不受非特异的水解,从而延长其寿命。其他可作仓库的还有水,Ca²⁺离子,蛋白质分子等。^[41]

5. 细胞内运输功能

最典型的例子当属甘露糖-6-磷酸残基将所有溶酶体酶导向溶酶体。^[26]因为存在碳水化合物结合蛋白(Carbohydrate binding protein)^[40],它们是能识别特殊顺序寡糖链的蛋白,如Man-6-P受体,它能与溶酶体酶上所有携带N-连接甘露糖的磷酸甘露糖残基结合,使之进入溶酶体。

6. 寡糖的激素功能

现在已发现,游离寡糖本身在许多系统中都有生物学效应,与激素相似。其最好的例子是植物的寡糖(Oligosaccharin)^[5],它们依赖于糖链结构的不同,调控着植物的生长、发育与防御等重要生理过程。同样,糖链所具特殊结构,使得游离的高甘露糖链对体外培养的哺乳动物细胞产生强烈的免疫抑制效应。^[22]又如,某种细胞类型释放的寡糖肝素对其他种类的细胞也起作用,也许是通过结合与信息传递起作用。但它们通过什么受体作用仍不清楚。

7. 寡糖介导的细胞间识别功能^[41]

尽管该功能在理论上已被承认,但明显的证据还不多,如Selectin家族的受体蛋白,它们介导白细胞与内皮细胞结合(L-Selectin),白细胞与被激活或损伤的内皮的识别(E-Selectin),和白细胞与激活的血小板或内皮的相互作用(P-Selectin),识别时有唾液酸果糖糖链参与。综上所述,寡糖链的功能可简化为两点:(1)介导特异识别(2)调节生命进程。功能的

多样性与结构的多样性是分不开的。三个单糖分子能组成一千多种叁糖结构,而三个氨基酸只能形成三种多肽,这在进化上有特殊意义,糖提供了有限的基因转译所不具有的多样性。

三、糖链的特点及影响糖链的因素

1. 糖链的特点

寡糖链的结构功能及二者的关系上看有以下几个特点:

(1)很难仅从糖链的一级结构上推测出其功能。^[46]

(2)一个糖蛋白上可有多个不同类型的糖链,存在于不同的糖基化位点。

(3)同一蛋白上的糖链有微不均一性(Microheterogeneity)^[11],即特定定位点有不同的糖基。

(4)糖链有组织特异性(tissue specific)。如,同一哺乳动物的 γ -GTP酶在肝脏和肾脏中有不同的糖链修饰。^[11]

(5)糖链有种间特异性(species specific),例如,在牛和大鼠的糖蛋白中,复杂型N-连接糖链存在如下外部糖链:Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc和Gal β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc,而在人的糖蛋白

中不存在这样的结构。^[24]

(6)糖链的发育特异性(developmental specific),糖链在不同发育时期表现不同。如,出生后人红细胞的血红蛋白含量和红细胞表面抗原发生显著变化。出生一年后,成人血红蛋白取代胎儿血红蛋白。胎儿抗原(i)变为成人抗原(I),细胞表面复合糖类的寡糖结构,从直链的聚乳糖胺变成有分枝的聚乳糖胺。

(7)某些糖蛋白上的糖基是部分存在的^[41],即相同的蛋白,在特定定位点上,有些有糖基,有些则无。

(8)细胞表面存在废物(junk)寡糖^[41],与junk DNA相似,可能是细胞对外来病原体长期进化适应,而在其原有的框架上改变外层寡糖的结果。

2. 糖链的生物合成

纵观糖链的生物合成途径,便知影响因素甚多。

O-链的生物合成,是逐渐的将单糖从核苷酸糖,加在多肽的Ser或Thr上,主要在高尔基体内进行。^[19]

N-糖链的合成是较为复杂的,藉助磷酸

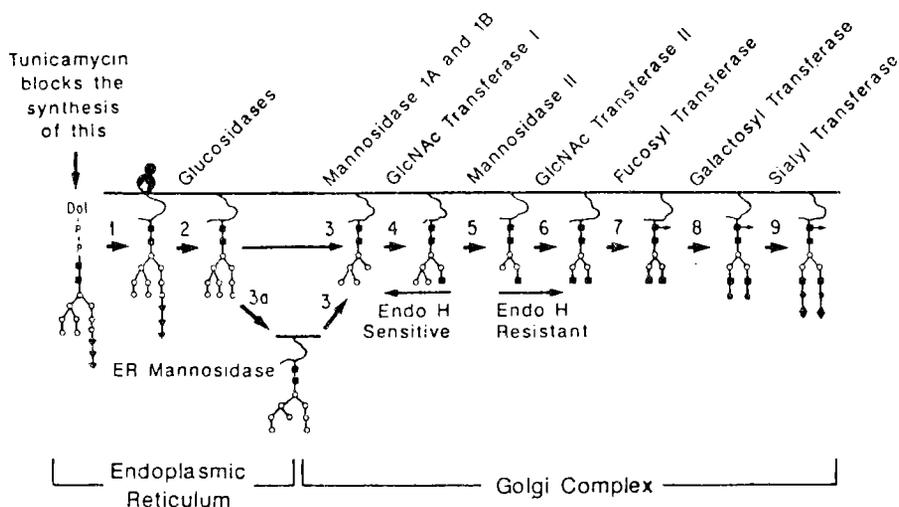


图3 N-糖链生物合成途径

▼葡萄糖 ○甘露糖 ■N-乙酰葡萄糖胺
●半乳糖 ►岩藻糖 ◆唾液酸

多帖醇形成一个共同的脂多糖前体: $(\text{Glc})_3(\text{Man})_9(\text{GlcNAc})_2-\text{Dol}-\text{P}-\text{P}$ 并将其加于新生多肽糖基化位点 $\text{Asn}-\text{Xaa}-\text{Ser}/\text{Thr}$ 中的 Asn 上(Xaa 为非脯氨酸的任何其他氨基酸), 在经过二步糖苷酶作用, 形成 $(\text{Man})_5(\text{GlcNAc})_2-\text{Dol}-\text{P}-\text{P}-\text{Asn}$ 。以上过程是在内质网中, 之后再运至高尔基体中, 经一系列糖苷酶与糖基转移酶的进一步加工, 成为最后的糖蛋白^[25]。如图 3

3. 影响糖链的因素

目前, 已清楚知道, 影响一个多肽糖基化的因素有以下三种:

(1) 多肽链的自身的结构

一般来说, N -糖链都有一个特定的糖化位点: $\text{Asn}-\text{X}-\text{Ser}/\text{Thr}$, 其原因很可能是寡糖转移酶能识别多肽形成的环形结构, 如图 3^[28]。如 $t-\text{PA}$, 在 $\text{Asn}117$ 位点有高甘露糖, 而在 $\text{Asn}184$ 位点, 则为复合型糖。这两位点分别位于二个 Kringle Domain 中, 二个区域高度同源, 且构象上相似。可为什么二位点上的糖相差如此之大呢? 作 cDNA 的缺失与重复实验, 发现, 当第 55-62 位氨基酸存在时, $\text{Asn}117$ 上才是甘露糖型, 而缺失这一段, 则表达出复合型糖。另外, 重复这一氨基酸序列, 则不能产生所需的甘露糖型。很可能是通过糖蛋白在合成过程中所处的折叠方式来影响糖链的结构。因此, 氨基酸的一级结构及至空间结构, 对糖链的形成起至关重要的作用^[11]。

(2) 细胞的内在特征因素(如糖基转移酶与糖苷酶的完整表达)

这是糖基化的决定因素, 因为, 虽然糖化不同于蛋白质翻译有特定的基因模板, 但糖链是糖基转移酶遵循严格的底物专一性而完成的一系列催化反应, 因此也遵循一定规则^[34] 实际上, 糖链的种间特异性(species specific), 组织特异性(tissue specific), 以及发育特异性(Developmental specific), 都源于糖基化酶不同时间及不同空间的表达。

(3) 环境因子的影响

近来发现, 糖基化对细胞生理状况及胞外

环境因子的压力与水平^[34] 如培养细胞的密度及年龄, 培养基的糖分及养分, PH 等因素十分敏感。实际上, 它们通过影响蛋白的空间结构, 糖基化酶及跨膜运输等来影响糖基化。

以上因素都是糖基化工程所必须考虑的。

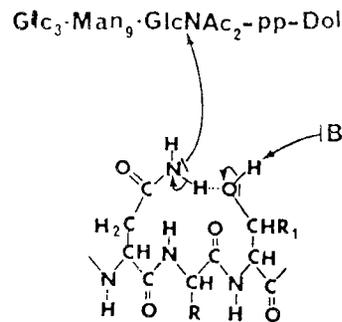


图 4 糖基转移酶识别糖基化位点的环状结构

$R_1 = \text{CH}_3$

B 为寡糖转移酶上的残基。

四、糖基化工程

1989 年 Knight^[23] 探讨碳水化合物是否能被人工操作, 1992 年 Stanley^[40] 便发表了名为糖基化工程(Glycolysation Engineering)的综述性文章, 糖基化工程成为继基因工程蛋白质工程之后生物化学及分子生物学领域很有前景的学科, 其目的是能操作蛋白质上的寡糖链, 使之能有正常的生物学功能。

其优点如下: 增加合成及分泌的效率, 增加溶解度, 延长生物学半生期, 增强生物学活性, 增强稳定性, 降低异源性及抗原性, 导向进入或离开某一组织, 帮助蛋白的纯化和结晶化等^[40]。

其方法有选择特异性的宿主细胞, 如选择合适的细胞株或不同的真核细胞表达体系。此外糖基化工程还有如下方法:

对重组糖蛋白来说有两种: (1) 抑制糖链的增加①改变糖基化位点②利用细菌生产③加入衣霉素(2) 改变糖链的表达①利用糖基化抑制剂②利用糖基化突变型。

对纯化的天然蛋白, 可用糖苷酶除去糖链, 或糖基转移酶加上糖链。

1. 改变糖基化位点

研究糖链的结构与功能相互关系的直接方法,是做缺失实验,即逐一删去表达多肽的基因的有关部分。最明显的是,删除或突变N-糖基化位点 Asn-X-Ser/Thr 中间的 Asn, Ser, Thr 任何密码子,就能阻断糖基化。

删去O-糖基化位点并不常用,因为没有特定的氨基酸顺序的糖基化位点。但也可以通过突变与糖连接的 Ser, Thr 来删除糖基,这在EPC已成为成功的实例。^[1]通常O-连接糖常常成簇出现,所以需删除一连串的氨基酸。

2. 利用糖基化突变型

到目前为止,已有为数众多的糖基化突变型已从CHO细胞中分离出来。它们遍布N-糖化,O-糖化及聚糖,糖脂等生物合成过程,这为产生许多不同糖链提供可能。

例如 Lec 3. 2. 81 CHO 细胞系能表达出N-糖位点有 Man₅GlcNac₂-Asn, O-一位点上有不可替代的 GalNAc;ldID. Lec 细胞系,只在N-一位点上有相同的糖链结构,O-糖化位点上无糖化;PIR. Lec 1 突变株在N-一位点上有 Man₃GlcNac₂Asn, O-一位点上有不变的O-糖链。^[41]所以只要认真选择一个宿主细胞突变系便可产生一个拥有特殊糖化的糖蛋白。

糖基化工程的另一个目标是,在某一重组蛋白上,加特定的糖残基。例如,完全唾液酸化的蛋白不易被肝结合蛋白从循环系统中清除。因此,为了增加宿主细胞唾液酸化的能力,可通过选择一个能永久表达 $\alpha(2,6)$ 唾液酸转移酶的缺陷型,或筛选一个高效表达唾液酸转移酶基因的稳定转染细胞株^[29]。

3. 使用糖基化抑制剂

如果没有合适的糖基化突变型,可用糖基化抑制剂生产修饰的糖链^[4]。许多N-糖化抑制剂来自于植物碱,一些来自于细菌。最常用的阻断N-糖化的抑制剂是衣霉素,它能阻断N-糖化的起始步骤:将GlcNAc从UDP-GlcNAc转移到磷酸多萜醇(Dol)上,从而产生没有糖化的蛋白^[40]。

有几种抑制能使N-糖链得到修饰,如用 amphomycin 处理后得糖链结构并没有显著变

化,末端寡甘露糖却有所改变^[40]另外,还有其他抑制剂如: α -glucosidases 抑制剂(Bromocunduritol, Deoxynojirimycin)和 α -mannosidases 抑制剂(Swainsonine, 1-deoxymannojirimycin)等,它们能改变寡糖链的成分,防止体外修剪糖链或阻断高甘露糖型转变为复合型。^[8]

4. 用纯化的糖基转移酶与糖苷酶

这一方案主要针对纯化好的糖蛋白。用糖苷酶除去不要的糖链,或用糖基转移酶加上合适的糖链。尽管这样产生的有疗效的糖蛋白十分昂贵,但对修饰作为靶信号的有限糖残基,用糖基转移酶无疑是种极好的尝试,并为细胞表面碳水化合物的修饰开辟一条新途径^[45]。

一般来说,除去N-连接位点上的糖可用 endo H 糖苷酶或N-多肽糖苷酶F,但这两种酶均需要将糖蛋白在去污剂与盐溶液中伸展开,才能接近糖化位点,所以,尽管糖苷酶对糖蛋白的结构分析有极其重要作用,对于功能分析或产生有治疗价值的分子还是十分困难的^[46]。

5. 体外糖化法

尽管糖化极易受许多因素的影响,但其有严格的底物专一性,故遵守一定的程序,这为体外糖化提供了理论依据。

①固相化酶法^{[45][36]}

许多寡糖链已用酶法合成。利用固相化糖基转移酶是毫无疑问的,但糖苷酶也可用于反向合成糖链也是近来受欢迎的方法。

②加外源细胞器高尔基体与内质网法

在体外将待糖化蛋白加入适当的细胞器提取物来实现体外糖化。

五、糖基化工程常用的表达体系

1. 原核生物 E. coli 系统

虽然原核细胞中也能有糖基化反应^[36],但其表达的重组哺乳动物蛋白没有糖化,因此可做为糖基化工程中除掉糖基的一种方法^[40]。

有些基因工程产品,如许多生长因子,在该系统表达有很好的生物学活性^[43],但大多数重组糖蛋白,在体外虽然有活性,在体内则无活

性,并且,往往伴随着溶解性降低,半生期下降,抗原性增加等因素,而无应用价值^[4],因此,必须考虑真核细胞表达系统。

2. 酵母表达体系

酵母细胞除具真核细胞的特点外,还具易生长等优点,其最为诱人之处在于它拥有哺乳动物—糖化合成途径的早期过程^[28]。

但酵母细胞表达的 N—连接, O—连接糖蛋白有长长的寡甘露糖外链,^[3]因此具有极高的抗原性,必需借助于酵母糖化突变型^[13]或用内源糖苷酶 H 处理,再用糖基转移酶加上所需要的寡糖,来获得与哺乳动物相似的糖链^[40]许多糖基转移酶都已被克隆生产^[45],所以易于获得,便于操作。

近来发现,甲基醇营养酵母 *Pichia. pastoris* 的糖化不具甘露糖外链(Outer Chain),如图—4 所示,与哺乳动物细胞接近,它平均甘露糖链长为 8—14 个单位,而在 *S. cerevisises* 中多于 40 单位,并具培养成本低,且能识别啤酒酵母的起动机等优点,因此具更高的应用价值^{[3][27]}如图 5 所示,最近德国 Heinrich—Heine 大学的研究者们开发另一个甲基醇营养酵母: *Hansenula polymorph* 能适用于产生多亚基复合体蛋白,他们认为表达优于啤酒酵母十倍^[18]

3. 用昆虫细胞/杆状病毒表达体系

用杆状病毒做载体转染昆虫培养细胞 *Spodoptera frugiperala*, 能产生毫克—克/升的重组蛋白。MicroGeneSys 公司目前已有三个基因工程产品疫苗问世,它们是 gp160HIV 预防疫苗, p24HIV 疫苗,及一种虐疾疫苗(均过二期实验)^[18]。

另外发现,该系统极适用于复合蛋白即异源多聚体蛋白的表达,对 130 种蛋白调查发现,其表达高于 CHO 细胞 100 至 200 倍。

因此,用昆虫细胞生产大量的重组蛋白比酵母,甚至 CHO 细胞更有吸引力,但它也有一定的不足,如: Sf9 细胞既能产生 N—连接寡聚糖,又能生成内源糖苷酶 H 抗性的 N 连接寡糖,而后者是哺乳动物细胞所不具有的,所以,仍须发现一个含表达哺乳动物糖化的昆虫细胞

系,才能有所突破^[40]

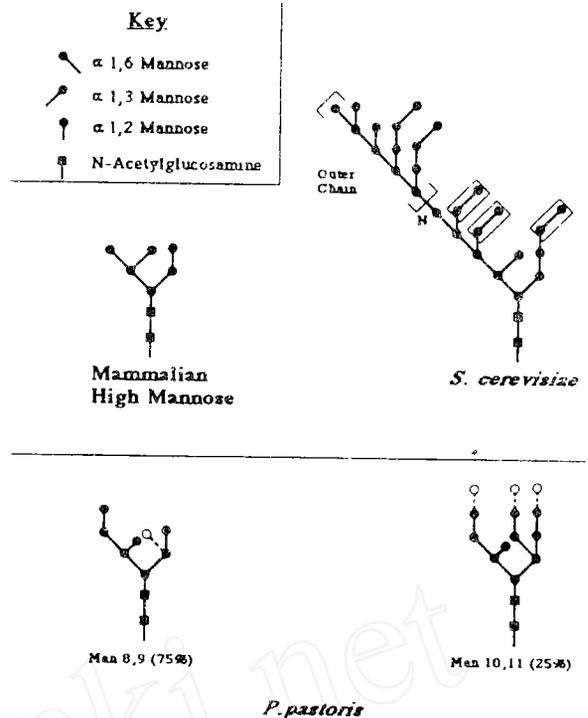


图 5 甲基醇酵母的 N—糖化

O. 代表甲基醇酵母

P. pastoris 上末端甘露糖最经常出现位置。啤酒酵母有长长的外层链。

4. 哺乳动物细胞

目前,能合成生物相关活性的哺乳动物糖蛋白的最佳途径,仍是哺乳动物细胞表达体系^[40]因为,许多不同的哺乳动物细胞系产生不同的糖基转移酶,所以需选择一个能产生某特殊糖链的正确细胞系,或对该细胞转染使之含某糖基转移酶基因,^[29]从而能产生正确的糖链。例如,研究表明,CHO 细胞系不具有 $\alpha(2,6)$ 唾液酸转移酶,转染该基因的细胞株,已成功的具有唾液酸转移酶的活力。

六. 糖基化工程的前景

目前糖基化的重要性已被更多的注意到^{[43][4]},并已上升到工程的高度。但是,仍须大量的基础性与开创性工作,特别是糖链的分析方面有待突破。另外,有些有功能活性的寡糖,是先蛋白质骨架上合成,之后,蛋白降解。是否寡糖能代替糖蛋白,而单独作为药物等,都正在研究之中。^[9]

(下转第 28 页)

by, St. Louis.

22. Ganai, M. W. et al. 1991. *Mol. Gen. Genet.* 225:501—509.
23. Devos, K. M. et al. 1992. *Theor. Appl. Genet.* 83: 931—939.
24. Brown, J. et al. *Theor. Appl. Genet.* 81:185—188.

25. Devos, K. M. et al. 1993. *Theor. Appl. Genet.* 85: 784—791.
26. Devos, K. M. et al. 1993. *Theor. Appl. Genet.* 85: 673—680.

(上接第 35 页)

糖生物学家 Hart. G. W. (1992)^[16]说“糖生物学终于在通往生物化学的最后一个广阔领域的门上开了个小孔”。因此,糖基化工程将发挥巨大的作用,并对二十一世纪的生命科学做出贡献。

参考文献

1. Cebon, J. et al (1990). *J. Biol. Chem.* ,265,4483—4491
2. Chen, H. C. et al (1982) *J. Biol. Chem.* ,257,14446—14452
3. Cregg, J. M. et al. *Biotechnology* 1993,11,905—910
4. Cumming, D. A. *Glycobiology*, 1991,1,115—130
5. Darvill, A. , et al *Glycobiology*, 1992,2,181—198
6. Dell, A, et. al *Curr. Opin. in Biotech.* 1993,4,52—56
7. Dube, S. , et al (1988) *J. Biol. Chem.* , 1988, 263, 17516—17521
8. Elbein, A. D. , (1987) *Annu. Rev. Biochem.* ,56,497—534.
9. Elbin, A. D. . (1991) *Trends. Biotechnol.* ,9,346—352
10. Edgington S. M. , (1992) *Biotechnology*, 10,383—389.
11. Furukawa, K. , & Kobata, A. , (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3,554—559
12. Ginsburg, V. and Robbins, P. (1981) *Biology of Carbohydrates*. J. Wiley, New York, Vol. 1
13. Gopal, P. K. & Ballou, C. E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1987, 84,8824—8828
14. Gordon, M. Y. . et al (1987) *Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM — CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment*
15. Gottschalk, A. (1972) *Glycoproteins: Their Composition, structure and function*, Elsevier, New York.
16. Hart, G. W. (1992) *Glycosylation, Curr, Opin. Cell. Biol.* ,4, 1017—1023
17. Hirschberg, C. B. & Snider, M. D. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56,63—87
18. Hodgson, J., *Biotechnology*, 1993,11,887—893
19. Horowitz, M. et, al, (1982) *The Glycoconjugates*. Academic Press, New York.
20. Kalyan, N. K. , & Bahl, O, P. (1983) *J. Biol. Chem.* .258,67—74
21. Karlsson, K—A. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* ,58,309—350
22. Klagsbrun, M. , & D'Amore, P. A. (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53,217—239
23. Knight, P. , (1989) *Biotechnology*, 7,35—40
24. Kobata, A. , (1992) *Eur. J. Biochem.* 209,483—501
25. Kornfeld, R. & Kornfeld, S. , 1985. *Annu. Rev. Biochem.* 54,631—664
26. Kornfeld, S. , (1986) *J. Clin. Invest.* 77,1—6
27. Kumagai, M. H. , (1993) *Biotechnology*, 11,606—610
28. Kukuruzinska, M. H. et al (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56, 915—944
29. Lee, E. U. et al (1989) *J. Biol. Chem.* ,264,13848—13855
30. Lechner, J. & Wieland, F. , (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 1989,58,173—94
31. Momen, P. , et al (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 4428—4431
32. Okamoto, M. , et al (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* ,286, 562—568
33. Paulson, J. C. (1989) *Trends Biochem. Sci.* ,14,272—276
34. Parckh, R. B. (1991) *Curr. Opin. Biotech.* 2,730—734
35. Rademacher, T. W. (1988) *Glycobiology, Annu. Rev. Biochem.* 57,785—838.
36. Rastall, R, A. & Bucke, C. (1992) *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 10,253—278
37. Rasmussen, J. R. (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* ,2,682—686
38. Sairam, M. R. (1989) *FASEB. J.* ,3,1915—1926
39. Sharon, N. & Lis, H. (1989) *Science*, 246,227—234
40. Stanley, P. , (1992). *Glycobiology* 3,97—107
41. Varki, A. (1993), *Glycobiology*, 3,97—130
42. Wasley, L. C. et al (1991) *Blood*, 77,2624—2632
43. West, C. M. (1986) *Mol. Cell. Biochem.* ,72,3—20
44. Wilhelm, J. & Hung. P. , (1992) *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 2(2),111—135.
45. Whitehart, S. W. . et al (1989). *Methods. Enzymol.* 179,82—95