

文章编号: 1004-0374(2011)06-0569-08

糖链的生物质谱分析

王承健, 王仲孚*

(西北大学生命科学学院, 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西安 710069)

摘要: 糖链是重要的生物信息分子, 在许多生理和病理过程中都发挥着独特作用。糖链结构非常复杂, 具有微观不均一性, 其分析和结构解析一直是糖生物学研究的瓶颈。质谱具有灵敏度高、可获得多种结构信息和适于分析混合物等优点, 是糖链定性定量分析的一种理想手段。电喷雾电离质谱和基质辅助激光解析电离质谱两大生物质谱技术已被广泛应用于糖链的相对分子质量指纹谱分析、序列和连接方式测定及相对定量分析。对近年来以质谱为主要分析手段的糖链分析方法研究进展做一综述。

关键词: 糖链; 结构; 质谱

中图分类号: Q53; O657.63 **文献标志码:** A

Glycan analysis by biological mass spectrometry

WANG Cheng-Jian, WANG Zhong-Fu*

(Educational Ministry Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Life Sciences College, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: As a group of bioinformation molecules, glycans play significant roles in many physiological and pathological processes. Due to their structural complexity and microheterogeneity, analysis and structural characterization of glycans are the bottleneck of glycobiology research. Mass spectrometry, which has advantages in the ability to minimize sample consumption, obtain diverse structural information, and analyse mixtures, is an ideal device for qualification and quantitation of glycans. The two biological mass spectrometry technologies, electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS), have been widely used in the analysis of glycan molecular mass fingerprint, sequence, linkage, and relative quantitation. This article summarizes the recent progress in the methodology investigation of glycan analysis using mass spectrometry as a fundamental analysing instrument.

Key words: glycan; structure; mass spectrometry

糖类物质作为信息分子在免疫^[1]、受精^[2]、发育分化^[3]等许多生命活动中发挥着重要作用。与核酸和蛋白质相比, 糖类物质结构更为复杂, 糖链不仅具有单糖组成和序列信息, 而且包括单糖残基环的大小、手性、连接方式和异头物构型等立体化学结构。此外, 糖链还具有微观不均一性, 并且常以糖蛋白、蛋白聚糖和糖脂等糖复合物的形式存在于生物体中, 要分离得到结构完全一致的生物糖链样品十分困难。因此, 传统的色谱、电泳、核磁共振等分析技术在糖链分析和结构研究上有局限性, 分析手段成为制约整个糖类研究领域发展的瓶颈。随

着 20 世纪 80 年代生物质谱技术的出现, 糖类研究进入了快速发展的时期。生物质谱以其软电离、高灵敏度、高分辨率、宽相对分子质量检测范围和高通量等特点, 很好地解决了高极性、难挥发、热不稳定的生物大分子的分析难题, 已成为蛋白质和糖

收稿日期: 2011-01-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870548); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-08-0893); 国家高新技术研究发展计划(“863”计划)(2006AA02Z146)

*通信作者: E-mail: wangzhf@nwu.edu.cn

链研究中最重要分析手段之一,有力促进了生物组学的发展。

近年来,糖链的分析研究取得了不少进展。以质谱为分析平台,糖链的释放和衍生化等样品制备方法不断得到丰富和改进,糖链的各种分析策略相继建立起来,大量生物糖链结构得到解析。本文主要对糖链的定性定量分析方法及质谱技术在糖链分析中的应用进展做一分析和总结。

1 质谱技术的发展及其在糖链分析中的应用

质谱 (mass spectrometry, MS) 的基本原理是使分子或原子等粒子在离子源中发生电离,然后在加速电场的作用下让所产生的离子进入质量分析器,利用电场和磁场使各种离子按质荷比的差异发生色散和聚焦,从而确定其质量。1912年,英国物理学家约瑟夫·约翰·汤姆逊 (Joseph John Thomson) 建成了一种能够分离同位素并测定其质量的阳射线气体放电装置,这一装置可以认为是最原始的质谱仪。早期的质谱主要用于元素及同位素质量的测定,英国物理学家弗朗西斯·威廉·阿斯顿 (Francis Willian Aston) 因制成世界上第一台高效能质谱仪并用质谱法精确测定多种同位素质量而获得1922年诺贝尔化学奖。二战期间,质谱技术在美国原子弹制造计划中用于研究²³⁵U。由于离子源和质量检测器的不断改进,从20世纪40年代开始,质谱广泛用于有机物质分析,特别是气相色谱-质谱联用 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 技术实现了对复杂混合物的分析和鉴定。60年代到80年代初,出现了场解析 (field desorption, FD)、等离子体解析 (plasm desorption, PD)、快速原子轰击 (fast atom bombardment, FAB) 和热喷雾 (thermospray, TS) 等离子化技术,使得质谱分析的相对分子质量范围达到了几千道尔顿 (Da),分析对象也扩展到了极性较大的生物分子。但是,这些技术仍然难以同时在准分子离子百分比、离子流稳定性、质量范围及准确性等方面达到核酸、蛋白质和糖类等生物大分子分析的要求。80年代中期以后,电喷雾电离^[4] (electrospray ionization, ESI) 和基质辅助激光解析电离^[5] (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 两大软电离技术相继出现,它们可以使蛋白质、核酸和聚糖这样高极性、难挥发、热不稳定、质量可高达几十万的生物大分子高效、持续、稳定地生成准分子离子,因此与离子阱 (ion trap, IT)、三重串联四极杆 (triple quadrupole, QQQ)、飞行时间 (time

of flight, TOF) 和傅里叶变换离子回旋共振 (Fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR) 等高性能质量分析器串联后,可以实现生物大分子的级联质谱分析、定量分析和相对分子质量测定,并且检出限可达到皮摩尔级甚至更低。而且,电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 还可与高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 串联组成液质联用仪 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS), 用于复杂生物样品混合物的分析。ESI-MS 和 MALDI-MS 这类适于分析生物大分子的质谱系统统称为生物质谱 (biological mass spectrometry)。

快原子轰击质谱 (FAB-MS) 是最早被引入到糖链分析领域的质谱技术,它使用氩或氙等高能粒子照射液态基质中的样品分子而使之蒸发和电离,操作简便,信号稳定。但是,其缺点是离子源会导致部分糖链解离成分子碎片,准分子离子产率比较低,样品性质对信号强度影响显著。与 FAB-MS 相比,ESI-MS 和 MALDI-MS 在离子化时能量更低,可以使样品中各种分子更高效地产生完整的准分子离子,灵敏度更高,分子质量范围更宽,适合各种微量糖链或其衍生物样品的分析。因此,ESI-MS 和 MALDI-MS 已经取代 FAB-MS 成为糖链分析的主要工具。值得一提的是,MALDI-TOF 具有无与伦比的灵敏度和分子质量检测范围,而且 TOF/TOF 还可进行二级裂解,因而它是进行生物糖链相对分子质量指纹谱及序列分析的有力工具。ESI-MS 常用 IT 作为质量分析器,具有全扫描和选择离子扫描功能,而且还可以利用其离子储存技术对任一质量离子进行碰撞解离,以实现二级质谱 (MS/MS) 与多级质谱 (MSⁿ) 分析,适用于糖链序列及连接方式的研究。IT 分析的质荷比上限一般不超过 6 000,但因为 ESI 中产生的准分子离子具有多电荷现象,使得质量检测范围成倍增加,所以 ESI-MS 也同样可以对相对分子质量上万的高分子糖链进行分析鉴定。此外,HPLC-ESI-MS 还可对组分更为复杂的糖链样品进行在线分离分析。对于糖链的连接方式等复杂结构,还可以结合甲基化等衍生化方法及 GC-MS 进行分析。

2 质谱分析糖链的策略

糖链的定性定量分析与结构解析是糖链构效关系研究的基础,因而在糖生物学中占有重要地位。生物糖链包括糖蛋白糖链、糖脂糖链和游离糖链等,而单一生物体中的一整套糖链或特定生物样品中的

某一套糖链又称为一个糖组, 对生物糖组的产生、变化及作用机理的研究则称为糖组学^[6]。只有首先在结构和数量上将各种糖链明确地区分开来, 才能进一步确定它们的产生、变化及生物学功能, 因此这里以糖蛋白糖链为例进行探讨, 要进行糖链分析, 就必然要求在研究策略和方法上不断创新和完善。近年来, 各种以质谱为分析手段的糖生物学方法学的发展为糖链研究奠定了基础。从目前的研究来看, 质谱分析糖蛋白糖链一般有两种策略, 一种是糖蛋白组学分析策略, 另一种是糖组学分析策略, 其过程如图 1 所示。

糖蛋白组学分析策略, 是利用蛋白酶或化学方法将糖蛋白样品降解成相对分子质量较小的糖肽, 然后对糖肽进行在线 LC-ESI-MS/MS 分析或离线 HPLC 分离及 ESI-MSⁿ 或 MALDI-TOF/TOF 分析, 或者直接对糖蛋白进行质谱分析。这一策略主要用于确定糖蛋白的糖基化位点和糖基化程度, 但也可以用来分析和鉴定糖链。我们用这种策略建立了一种以非特异性酶链蛋白酶 (Pronase E) 从糖蛋白上释放 *N*-糖链的方法, 得到了只带一个天冬氨酸 (Asn) 的 *N*-糖链, 称之为糖氨酸, 然后用 9-氯甲酸芴甲酯 (Fmoc-Cl) 对糖氨酸进行衍生化, 并对衍生产物进行了 HPLC-ESI-MS 分析, 取得了很好的效果^[7]。

糖组学分析策略, 则是以游离糖链为分析对象,

从而实现质谱对生物糖链的相对分子质量指纹谱扫描及序列结构分析。这种策略需要首先用解离方法将糖链从细胞系、免疫沉淀物、组织提取物或者体液等生物样品中糖蛋白的肽链上解离下来, 然后对解离后的游离糖链群体进行富集纯化, 并根据分析的需要, 选择特定的衍生化方法对其进行衍生化, 最终在不同结构水平上对这些糖链衍生物进行质谱分析。如果只是为了确定样品中各种糖链的相对分子质量, 以获得样品中糖链群体的总体分布特征, 那么, 既可以直接以 ESI-MS 或 MALDI-MS 对富集纯化获得的糖链样品进行相对分子质量检测而得到糖链混合物的相对分子质量指纹谱, 又可以将糖链经过常规的衍生化之后进行相对分子质量指纹谱扫描。其中, 衍生化可以提高质谱对糖链检测的灵敏度。如果要确定各种糖链的序列, 则需要对糖链样品进行甲基化并进行 MS/MS 和 MSⁿ 分析。如果要对糖链进行相对定量, 以确定不同来源的同种糖链之间的丰度比, 就需要用同位素试剂对不同糖链样品进行标记, 然后将它们按一定比例混合并进行 QQQ-MS 或 FTICR-MS 分析。这类定量方法可以用来比较不同糖组在糖链种类及相对丰度方面的异同, 对寻找疾病的糖链生物标志物及研究糖链功能具有重要意义。如果要确定样品中各种糖链的绝对含量, 则可以用带发色基团的衍生化试剂对糖链样

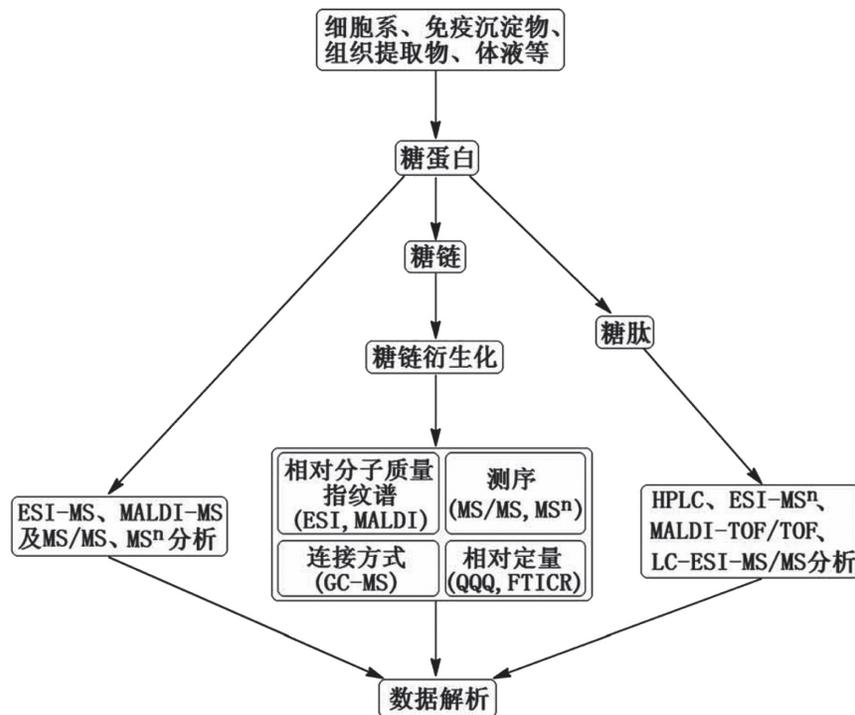


图1 质谱分析糖链的策略

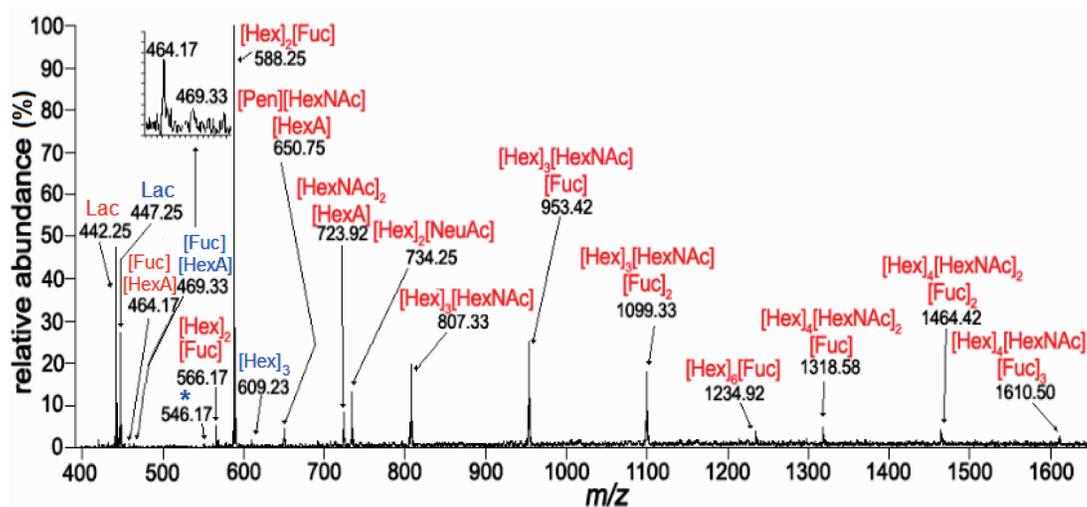
品进行衍生化, 然后以 HPLC-ESI-MS/MS 进行分析。如果要确定糖链内部单糖间的连接方式, 则需要进行 MSⁿ 分析, 或者将糖链全甲基化之后进行 GC-MS 分析。GC-MS 配置的电子轰击 (electron impact, EI) 或化学离子化 (chemical ionization, CI) 等离子源可以使 GC 分离后的各种糖链衍生物分别得到高效裂解, 依据糖链分子裂解规律对碎片离子产生的质谱信号进行分析, 就可以确定糖苷键的类型。运用糖组学策略分析糖链的典型例子就是最近对人血浆 N-糖组的研究, 首先采用酶法将所有 N-糖链从人全血浆糖蛋白上解离下来, 然后以 C18 小柱和石墨碳固相萃取小柱对糖链进行纯化和富集, 得到的糖链经过常规的还原和甲基化, 最终用于 ESI-MS 及 MSⁿ 分析, 从而确定了人血浆 106 种 N-连接糖链的单糖组成及其序列结构^[8]。我们也建立了一种用五氘代苯胺标记糖链进行相对定量的方法, 并以 ESI-MS 实现了对人乳和牛奶还原性游离糖链的比较分析^[9](图 2)。

无论是糖蛋白组学分析策略还是糖组学分析策略, 都为生物糖链研究提供了一般的模式和思路。如果说糖蛋白组学分析策略是对蛋白质糖基化现象进行初步探索的话, 那么糖组学分析策略则是对糖蛋白糖链部分进行专门、深入的研究。由此可见, 蛋白质组学与糖生物学之间具有密切联系。不过, 这两种策略对糖生物学研究都不可或缺, 它们互为补充, 各有侧重, 糖蛋白组学分析策略常用来确定蛋白质糖基化位点及糖基化程度, 而糖链结构和数量方面的问题则需要糖组学分析策略来解答。

3 糖链的释放

哺乳动物中 50% 以上的蛋白质都是糖基化蛋白。在这些糖蛋白中, 糖链的还原端以 N-糖肽键连接到肽链的天冬酰胺 (Asn) 残基上, 或以 O-糖肽键连接到肽链的丝氨酸 (Ser) 或苏氨酸 (Thr) 残基上。要对这些 N-连接或 O-连接糖链进行分析, 一般首先需要将它们从高相对分子质量的糖蛋白肽链上释放出来。在糖链的定性定量分析和结构解析中, 糖链释放的质量好坏和效率高低都至关重要。因此, 糖链释放方法就成为糖生物学方法学中一项很重要的研究内容。释放糖链主要有酶法和化学法两大类。

糖肽酶或内切糖苷酶可以相应实现糖肽键或糖苷键的选择性切割, 因此被用来释放糖蛋白糖链。对于 N-糖链, 最常使用的酶是肽 N-糖苷酶 F (PNGase F), 它特异性切割连在天冬酰胺残基上的 N-糖肽键, 可以得到完整并且带有还原端醛基的高甘露糖型、复杂型和杂合型的 N-连接糖链, 但核心 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 被 α 3-岩藻糖基化的 N-糖链除外。肽 N-糖苷酶 A (PNGase A) 也是一种非常有用的酶, 它除了具有 PNGase F 的所有水解活性外, 还可以切除核心 GlcNAc 被 α 3-岩藻糖基化的复杂型 N-糖链。常见的内切糖苷酶如 Endo H、Endo F1、Endo F2 和 Endo F3 因只切割某些特定类型的 N-糖链而常被配合使用, 以研究 N-糖链的某些结构。此外, 非特异性的蛋白水解酶如胰蛋白酶和链酶蛋白酶 (Pronase E) 等也可以用来释放 N-糖链, 通过控制酶量和反应时间, 可以将糖蛋白水解



注: 人乳糖链以常规苯胺进行标记(红色); 牛奶以五氘代苯胺进行标记(蓝色)

图2 人乳和牛奶中还原性游离寡糖链群体的相对定量分析^[9]

为低相对分子质量的糖肽乃至只带一个氨基酸的糖氨酸^[10]。对于 *O*-糖链, 由于缺乏广谱的 *O*-糖肽酶和内切糖苷酶, 所以目前普遍采用化学方法进行解离。

β -消除法是解离 *O*-糖链的常规方法, 它利用氢氧化钠 (NaOH)、氨水、有机碱等提供的碱性环境使糖蛋白发生 β -消去反应而使 *O*-糖链从肽链上解离下来。由于还原性糖链在碱性介质中会发生降解, 因此常在反应体系中加入硼氢化钠 (NaBH₄) 等还原剂, 使解离下来的糖链还原端醛基转化为对碱稳定的醇羟基, 这类方法称为还原性 β -消除^[11]。但是, 这一还原过程也使得糖链由于失去活性羰基而难以进行常规的还原端衍生化。为此, 许多研究者对传统的还原性解离方法进行改进, 建立了一系列非还原性解离方法, 如胍解法^[12]、水合胍解离^[13]、有机碱解离^[14]、碳酸铵/氨水解离^[15]和在线流动系统解离^[16]等。这些方法虽然都可以获得还原性糖链, 但也都存在着一个共同的缺点, 即由于解离效率低下或发生副反应等原因使得具有研究价值的糖链产率较低。最近, 本实验室建立了一种 *O*-糖链的非还原性解离与 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 标记同时进行的新方法, 此方法在同一个反应体系中同时完成了 *O*-糖链的 β -消除解离和发色试剂衍生化两个重要步骤, 既可以避免糖链在碱性环境中发生降解, 又为后续的检测分析提供了便利, 因此在 *O*-糖链分析中具有较大的应用价值。

4 糖链的衍生化

糖链分子中有多个羟基, 极性很大, 很难直接用反相高效液相色谱 (reverse phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC) 和气相色谱 (GC) 等方法进行分析, 也不利于 MS 分析。而且, 糖链自身不带发色基团, 无法直接用常规的紫外检测器进行检测。因此, 在进行糖链分析之前, 有必要用衍生化的方法对其结构进行一定程度的修饰和改造, 以降低其极性或者引入发色基团。依据糖链参加反应化学基团的不同, 糖链的衍生化方法可以分为两类, 一类是羟基上的衍生化, 另一类是还原端羰基上的衍生化。

为了降低糖链分子的极性, 需要用疏水基团将其所有亲水性的羟基封闭起来, 最常用的方法是全甲基化和全乙酰化。全甲基化是在碱性条件下利用碘甲烷等试剂提供的甲基对糖链上的所有羟基氢进行取代, 使羟基转化为甲醚基。全乙酰化是用乙酸

酐或乙酰氯等试剂提供的乙酰基取代糖链上所有的羟基氢, 最终生成酯类结构。它们的衍生产物都易于气化和裂解, 便于 GC、GC-MS 和 MSⁿ 的分析。其中, 全甲基化对糖链结构分析十分重要, 不仅可以提高糖链在 MS 检测中的灵敏度, 还可以简化糖链分子在 MS/MS 和 MSⁿ 中的裂解过程^[17-18]。而全乙酰化则常用于糖链的 GC 分析。通常情况下, 全甲基化和全乙酰化反应体系中都应保持无水, 否则会导致反应不完全而影响分析结果。为了使反应更加快速并且容易操作, 一些学者还发展了水相甲基化^[19]和固相甲基化方法^[20]。

为了使糖链带上发色基团或疏水基团, 增强其电离特性, 便于紫外检测器检测及 RP-HPLC、毛细管电泳 (CE)、MS 分析, 一般都需要利用糖链还原端活性羰基进行衍生化。最常使用的衍生化方法是还原氨化法, 所用的衍生化试剂都带有一个活性伯氨基或胍基, 可在酸催化的条件下与糖链还原端自由醛基缩合生成希夫碱 (Schiff base), 而希夫碱的双键最终被硼氢氰化钠 (NaBH₃CN) 还原为稳定的单键。此类衍生化试剂最多, 包括常见的 2-氨基吡啶 (2-AP)、对氨基苯甲酸乙酯 (ABEE)、1-氨基苄基-3,6,8-三磺酸 (APTS)、8-氨基萘-1,3,6-三磺酸 (ANTS) 和 2-氨基苯甲酸 (2-AA) 等等^[21]。将一种新的衍生化试剂 3-氨基-9-乙基吡唑 (AEC) 运用到单糖及寡糖的分析中, 取得了很好的效果^[22-23]。如果衍生化试剂带有苯环等发色基团, 那么衍生产物可用光电二极管阵列 (photodiode array, PDA) 等常规检测器进行检测。若用荧光试剂对糖链进行衍生, 则产物可用于凝集素芯片分析。如果除了参加衍生化反应的氨基或胍基外衍生试剂还带有其它质子受体或供体基团, 则其糖链衍生产物将更易带上电荷, MS 分析的灵敏度将会提高, CE 分离的效果也将得到增强。而且, 衍生化试剂大多都具有一定的疏水性, 其糖链衍生产物在 RP-HPLC 反相柱中也更容易得到分离。此外, 米歇尔加成 (Michael addition) 也是一类重要的衍生化方法, 衍生试剂独特的活性亚甲基可以在稀碱溶液中失去一个质子而形成碳负离子, 进而与糖链还原端醛基发生亲核反应而生成糖链衍生产物, 反应条件比较温和, 可以避免糖链在酸性条件下丢失唾液酸。典型的衍生化试剂是 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮^[24] (PMP) 和 1-(对-甲氧基)苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮^[25] (PMPMP), 尤其是 PMP 被广泛用于单糖及寡糖的分析。Zhang 等^[26]也合成了一种结构类似的试剂 1-(对-异丙基)苯

基-3-甲基-5-吡啶啉酮 (PPMP), 成功建立了其对单糖的衍生化及 HPLC-ESI-MS/MS 分析方法, 并在螺旋藻多糖 SPPB-1 的单糖组成分析中取得了很好的应用效果。可以预料, PPMP 在寡糖的分析中也应具有一定的应用潜力。在糖链分析中, 还有一些其它类型的衍生化方法, 由于在以前的文章^[27]中作过总结, 所以此处不再赘述。

5 糖链序列结构分析

解析糖链结构, 以阐明其单糖组成、序列及连接方式等信息, 是糖链分析的关键环节, 也是难点所在。目前普遍采用 MS/MS、MSⁿ 和 GC-MS 等手段来分析糖链结构, 其原理是用一定方法使糖链分子或其准分子离子发生裂解, 利用所产生的碎片离子在质谱中的质荷比信号来推断糖链的各种结构特征。糖链裂解可采用碰撞诱导解离 (collision induced dissociation, CID)、源后衰变 (post-source decay, PSD) 和电子分离解离 (electron detachment dissociation, EDD) 等多种不同的方式, 但它们对同一种糖链所产生的碎片离子图谱却十分相似, 主要区别仅限于离子类型 ([M+H]⁺、[M+Na]⁺、等等)、离子化过程中所施加的能量大小以及碎片离子信号持续的时间长短等方面^[17]。可见, 糖链的裂解可能有着某些内在的规律性。

在质谱分析糖链结构方面, Domon 和 Costello^[28]提出的糖链穿环裂解碎片命名方法被广泛使用, 它比较系统地总结了糖链在 MS/MS、MSⁿ 和 GC-MS 中碎片化的一般方式。糖链的断裂方式可以分为两类: 一类是两个糖环之间糖苷键的断裂, 另一类是糖链中糖环的裂解。如图 3 所示, 糖链中糖苷键的 O 左边的键断裂后非还原端部分的糖链用 B 表示, 还原端部分用 Y 表示; 糖苷键的 O 右边的键断裂后非还原端部分的糖链用 C 表示, 还原端部分用 Z 表示。这些字母右下角标注的阿拉伯数字表示发生断裂的糖苷键在糖链中所处的位置, 如 B₁、B₂、B₃……B_i、Y₁、Y₂、Y₃……Y_i。糖环上任意两个键断裂叫做穿环裂解。糖链发生穿环裂解后, 非还原端部分用 A 表示, 还原端部分用 X 表示, 其右下角的阿拉伯数字表示发生穿环裂解的糖环在糖链中的位置。每个糖环中 O 原子和异头碳之间的键记为 0 号键, 从异头碳开始, 顺时针方向上各键依次记为 1、2、3、4、5。穿环裂解中发生断裂的两个键的序号标注在 A 和 X 的左上角, 序号之间用“,”号隔开。例如, ^{2,4}X₁ 表示从还原端开始第二个糖环

上的 2 号键和 4 号键断裂后糖链的还原端部分; 而 ^{2,5}A₃ 表示从非还原端开始第三个糖环上的 2 号键和 5 号键断裂后糖链的非还原端部分。糖链的分枝用 α、β、γ 等希腊字母加以区别, 其中 α 代表最大的支链, 例如 C_{2α} 表示糖链中最大的支链从非还原端开始第二个糖苷键上的 O 原子与第三个糖环之间的连键发生断裂后的非还原端部分。有学者认为, 糖苷键断裂是由电荷诱导的, 而穿环裂解则是与电荷无关的过程^[17]。从能量上看, 穿环裂解比糖苷键断裂更难发生。但是, 在一定程度上, 糖链发生穿环裂解越多, 得到的糖链结构信息就越丰富。因此, 在糖链分析中应根据不同的结构研究层次 (相对分子质量指纹谱、序列、连接方式等) 有针对性地选择糖链分子的裂解程度及裂解类型。在生物质谱的 MS/MS 分析中, 只能以准分子离子为母离子进行二级裂解, 得到的结构信息较为有限, 所以 MS/MS 常用于糖链的序列分析。而在 MSⁿ 分析中, 可以进一步选择准分子离子裂解的碎片作为母离子进行逐级裂解, 从而可以得到更为详细的分子碎片结构信息, 所以 MSⁿ 是一种糖链结构完全解析的手段。GC-MS 也可以使糖链甲基化产物得到较为充分的裂解, 一般用于分析糖链的连接方式。

对糖链的质谱数据进行解释和归属, 是一个重要而复杂的过程。将 MS、MS/MS 及 MSⁿ 分析得到的质荷比数据转化为糖链结构信息, 不仅要考虑到糖链归属结果与质谱检测数据的匹配程度, 而且还涉及生物合成糖链的过程和规律。为了利用计算机技术实现对糖链质谱数据的自动化注解, 研究者开发了许多专用软件工具, 如 GlycosidIQ^[29]、Cartoonist^[30]、Oscar^[31]、GLYCH^[32] 等。这些工具大体上可以分为三类, 即与数据库糖链数据进行比对的注解软件、依据相对分子质量推断糖链单糖组成的注解软件和针对糖链级联质谱数据的注解软件, 它们都可以快速完成对糖链质谱数据的自动化归属。但是, 每种注解工具都有各自的局限性和适用范围, 所以在使用这些软件之前应充分了解其算法特点, 并且应对其归属结果进行最终的人工筛选和确认。近几年也出现了一些较新的软件, 其中 Glyco-Workbench^[33] 是一种对糖链结构分析很有用的半自动化注解工具, 它不但可以完成对糖链结构的图形化定义, 模拟生成理论上可能产生的所有糖链碎片类型, 还可以通过所定义糖链的理论碎片与实际获得的糖链 MSⁿ 数据之间的比对实现对糖链结构的归属。如果分析的是糖肽, 则可以使用 GlycoPep DB^[34]。

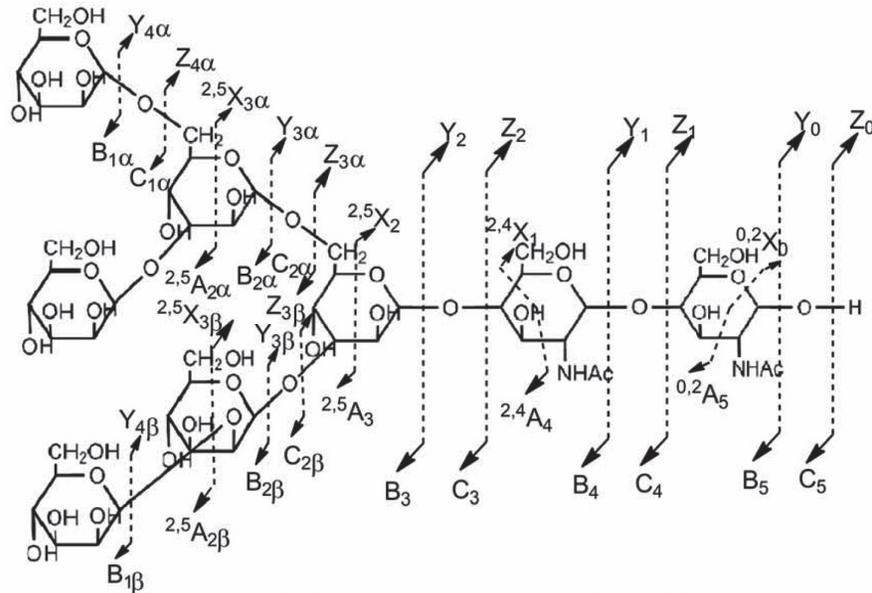


图3 糖链的裂解类型及分子碎片的命名规则

6 质谱在糖链分析中的应用现状及趋势

过去二十多年里, 质谱技术的革新和应用为糖链分析和结构解析取得突破带来了希望, 有力推动了糖生物学方法学的进步。在糖链分析中, 质谱既可以获得糖链样品的相对分子质量指纹谱, 又可以结合稳定同位素标记进行糖链的相对定量分析, 还可以与色谱联用进行糖链样品的定性定量分析。在糖链结构解析中, 质谱既可以用来测定糖链的序列, 也可以分析糖链的连接方式。随着质谱的普及和应用, 糖链的释放和衍生化方法得到不断改进, 多种生物糖链得到分析^[35-39]。而且, 目前质谱在糖链分析中的应用还表现出几个发展趋势: 糖链的释放、衍生化及质谱分析向自动化、一体化、高通量化发展, 日本学者特别重视这方面的研究^[40]; 糖链结构分析具有朝 MSⁿ 完全解析糖链结构方向发展的趋势^[8]; 生物质谱越来越多地用于疾病糖类标志物的发现及糖链相关疾病机理的研究, 从而为疾病诊断和治疗提供帮助^[41-44]。但同时也应看到, 目前糖类研究仍然落后于核酸和蛋白质研究, 糖链的定性、定量及构效关系等方面还有很多关键技术尚待突破。

[参 考 文 献]

[1] Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, et al. Glycosylation and the immune system. *Science*, 2001, 291: 2370-6
 [2] North SJ, Hitchen PG, Haslam SM, et al. Mass spectrometry in the analysis of *N*-linked and *O*-linked glycans. *Curr Opin Struc Biol*, 2009, 19: 498-506

[3] Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, et al. Complex *N*-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell*, 2007, 129: 123-34
 [4] Yamashita M, Fenn JB. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem*, 1984, 88(20): 4451-9
 [5] Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 Daltons. *Anal Chem*, 1988, 60(20): 2299-301
 [6] 王克夷, 杜昱光. 糖组和糖组学. *医学分子生物学杂志*, 2004, 1(5): 261-4
 [7] 徐莎, 张萍, 黄琳娟, 等. Pronase E酶解释放糖蛋白 N -糖链的方法及荧光标记衍生生物的LC-MS分析. *高等学校化学学报*, 2010, 31(10): 1992-8
 [8] Stumpo KA, and Reinhold VN. The *N*-glycome of Human plasma. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9, 4823-30
 [9] 薛向东, 张萍, 王仲孚, 等. 基于电喷雾电离质谱(ESI-MS)的苯胺稳定同位素标记对还原性寡糖(链)的定性定量分析方法. *高等学校化学学报*, 2010, 31(11): 2173-80
 [10] Song X, Lasanajak Y, Rivera-Marrero C, et al. Generation of a natural glycan microarray using 9-fluorenylmethyl chloroformate (FmocCl) as a cleavable fluorescent tag. *Anal Biochem*, 2009, 395: 151-60
 [11] Carlson DM. Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *J Biol Chem*, 1968, 243(3): 616-26
 [12] Patel TP, Parekh RB. Release of oligosaccharides from glycoproteins by hydrazinolysis. *Method Enzymol*, 1994, 230(2): 57-66
 [13] Cooper CA, Packer NH, Redmond JW. The elimination of *O*-linked glycans from glycoproteins under non-reducing conditions. *Glycoconjugate J*, 1994, 11: 163-7
 [14] Chai W, Feizi T, Yuen CT, et al. Nonreductive release of

- O*-linked oligosaccharides from mucin glycoproteins for structure/function assignments as neoglycolipids: application in the detection of novel ligands for E-selectin. *Glycobiology*, 1997, 7(6): 861-72
- [15] Huang Y, Mechref Y, Novotny MV. Microscale nonreductive release of *O*-linked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 2001, 73(24): 6063-9
- [16] Karlsson NG, Packer NH. Analysis of *O*-linked reducing oligosaccharides released by an in-line flow system. *Anal Biochem*, 2002, 305: 173-85
- [17] Harvey D. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates and glycoconjugates. *Int J Mass Spectrom*, 2003, 226: 1-35
- [18] Huang L, Hollingsworth RI, Haslam SM, et al. The Lan3-2 glycopeptide of *Hirudo medicinalis* consists of β -(1,4)-linked mannopyranose: cell type-specific glycans of *H. medicinalis*. *J Neurochem*, 2008, 107: 1448-56
- [19] Singh V, Tiwari A. Microwave-accelerated methylation of starch. *Carbohydr Res*, 2008, 343: 151-4
- [20] Kang P, Mechref Y, Novotny MV. High-throughput solid-phase permethylation of glycans prior to mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22: 721-34
- [21] Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, et al. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397: 3457-81
- [22] Zhang Y, Huang L, Wang Z. A sensitive derivatization method for the determination of the sugar composition after pre-column reductive amination with 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) by high-performance liquid chromatography. *Chinese J Chem*, 2007, 25(10): 1522-8
- [23] 牟青, 张英, 黄琳娟, 等. 3-氨基-9-乙基咪唑衍生寡糖混合物的高效液相色谱分离及激光解吸电离飞行时间质谱分析. *色谱*, 2009, 27(1): 24-8
- [24] Honda S, Akao E, Suzuki S, et al. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Anal Biochem*, 1989, 180: 351-7
- [25] Kakehi K, Suzuki S, Honda S, et al. 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*, 1991, 199(2): 256-68
- [26] Zhang P, Wang Z, Xie M, et al. Detection of carbohydrates using a pre-column derivatization reagent 1-(4-isopropyl)phenyl-3-methyl-5-pyrazolone by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2010, 878: 1135-44
- [27] 王仲孚, 贺建宇, 魏亚辉, 等. 用于寡糖链分析的HPLC柱前衍生化方法研究进展. *有机化学*, 2006, 26(5): 592-8
- [28] Domon B, Costello C. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J*, 1998, 5: 397-409
- [29] Joshi HJ, Harrison MJ, Schulz BL, et al. Development of a mass fingerprinting tool for automated interpretation of oligosaccharide fragmentation data. *Proteomics*, 2004, 4(6): 1650-64
- [30] Goldberg D, Sutton-Smith M, Paulson J, et al. Automatic annotation of matrix-assisted laser desorption/ionization *N*-glycan spectra. *Proteomics*, 2005, 5(4): 865-75
- [31] Lapadula AJ, Hatcher PJ, Hanneman AJ, et al. Congruent strategies for carbohydrate sequencing. 3. OSCAR: An algorithm for assigning oligosaccharide topology from MSⁿ data. *Anal Chem*, 2005, 77(19): 6271-9
- [32] Tang H, Mechref Y, Novotny MV. Automated interpretation of MS/MS spectra of oligosaccharides. *Bioinformatics*, 2005, 21(suppl. 1): i431-9
- [33] Ceroni A, Maass K, Geyer H, et al. GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J Proteome Res*, 2008, 7(4): 1650-9
- [34] Go EP, Rebecchi KR, Dalpathado DS, et al. GlycoPep DB: a tool for glycopeptide analysis using a "smart search". *Anal Chem*, 2007, 79(4): 1708-13
- [35] Pang P, Tissot B, Drobnis EZ, et al. Analysis of the human seminal plasma glycome reveals the presence of immunomodulatory carbohydrate functional groups. *J Proteome Res*, 2009, 8(11): 4906-15
- [36] Heiskanen A, Hirvonen T, Salo H, et al. Glycomics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells can be used to evaluate their cellular differentiation stage. *Glycoconj J*, 2009, 26: 367-84
- [37] Bleckmann C, Geyer H, Reinhold V, et al. Glycomic analysis of *N*-linked carbohydrate epitopes from CD24 of mouse brain. *J Proteome Res*, 2009, 8(2): 567-82
- [38] Montesino R, Toledo JR, Sánchez O, et al. *N*-glycosylation pattern of E2 glycoprotein from classical swine fever virus. *J Proteome Res*, 2009, 8(2): 546-55
- [39] Tao N, Ochonicky KL, German JB, et al. Structural determination and daily variation of porcine milk oligosaccharides. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(8): 4653-9
- [40] Yamada K, Hyodo S, Kinoshita M, et al. Hyphenated technique for releasing and MALDI MS analysis of *O*-glycans in mucin-type glycoprotein samples. *Anal Chem*, 2010, 82(17): 7436-43
- [41] Comunale MA, Wang M, Hafner J, et al. Identification and development of fucosylated glycoproteins as biomarkers of primary hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res*, 2009, 8(2): 595-602
- [42] Vakhrushev SY, Snel MF, Langridge J, et al. MALDI-QTOFMS/MS identification of glycoforms from the urine of a CDG patient. *Carbohydr Res*, 2008, 343: 2172-83
- [43] Chen C, Schmilovitz-Weiss H, Liu X, et al. Serum protein *N*-glycans profiling for the discovery of potential biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis. *J Proteome Res*, 2009, 8(2): 463-70
- [44] Arnold JN, Saldova R, Hamid UMA, et al. Evaluation of the serum *N*-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation. *Proteomics*, 2008, 8: 3284-93