

文章编号: 1004-0374(2011)06-0612-07

· 技术与应用 ·

糖蛋白质组定量技术进展

张莹, 刘丽婷, 陆豪杰*, 杨芃原

(复旦大学化学系和生物医学研究院, 上海 200032)

摘要: 蛋白质的糖基化是最重要和最普遍的蛋白质翻译后修饰之一, 在生物体内起着极为重要的作用。糖蛋白质的量和(或)糖基化程度的改变以及糖链结构的改变等与许多疾病密切相关, 因此定量糖蛋白质组研究已经成为一个新的热点。然而由于糖基化蛋白质所具有的独特特征, 其定量面临严峻的挑战。糖蛋白质组学定量方法和技术的发展将为更好地研究糖基化蛋白质生物学功能起到重要作用。综述了基于生物质谱的糖蛋白质组定量研究的技术和方法, 及其优缺点和未来的发展趋势。

关键词: 糖蛋白质组学; 定量; 质谱

中图分类号: Q513.3; O655; O657.63 **文献标志码:** A

Progress of technology and methodology in quantitative glycoproteomics

ZHANG Ying, LIU Li-Ting, LU Hao-Jie*, YANG Peng-Yuan

(Department of Chemistry and Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: As one of the most important and common post-translational modifications, protein glycosylation plays an essential role in biological function. The changes of glycoprotein content and/or glycosylation degree as well as alterations of glycan structure are associated with a variety of diseases. Therefore, increasing attention has been directed to the quantitative and comparative aspects of glycoproteome. However, the quantitative glycoproteomics faces more severe challenges because of the intrinsic characteristics of glycoproteins. The development of technologies and methods of quantitative glycoproteomics will increasingly become an important tool for the biological function study of glycoprotein. Advantages and disadvantages of several newly developed technologies and methods were discussed, and the progress in quantitative glycoproteome research was summarized.

Key words: glycoproteomics; quantitation; mass spectrometry

蛋白质的糖基化修饰是细胞中最重要、最常见和最复杂的蛋白质翻译后修饰之一, 目前已知哺乳动物蛋白质中约有一半以上的蛋白质发生了糖基化^[1]。糖蛋白质是蛋白质与糖类以共价键相连形成的复合物, 根据蛋白质被糖修饰形式的不同可以把蛋白质糖基化分成以下四类: (1)N-糖蛋白, 糖链通过N-乙酰葡萄糖胺与处于特征序列N-X-S/T(X是除了P之外的氨基酸)中的N相连; (2)O-糖蛋白, 糖链与丝氨酸或苏氨酸相连; (3)GPI(糖基磷脂酰肌醇)-锚定糖蛋白; (4)C-糖蛋白, 糖链以C-C键与肽链上的色氨酸残基相连。蛋白质糖基化以前两种最为常见且研究得最多。

蛋白质的糖基化修饰极大地增加了蛋白质的多样性和复杂性, 也赋予了糖蛋白更多的生物学功能和更重要的生物学意义。蛋白质糖基化修饰在各种生命现象中起着重要的作用, 如参与细胞黏附及信号转导, 影响蛋白质的分泌和稳定性, 参与血浆中

收稿日期: 2011-02-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070732, 21005020); 上海高校特聘教授(东方学者)岗位计划; 上海市教育委员会和上海市教育发展基金会“曙光计划”; 上海市重点学科发展基金项目(B109)

*通信作者: E-mail: luhaojie@fudan.edu.cn

衰老蛋白的清除、免疫及炎症反应、精卵识别以及影响蛋白质在细胞内的转送方向等^[2]。糖基化修饰在疾病中,特别是肿瘤的发生、发展和转移过程中都有着重要意义,许多疾病诊断标志物及治疗的靶标,如前列腺癌中的前列腺特异性抗原 PSA^[3]、卵巢癌中的肿瘤抗原 CA125^[4]、乳腺癌中的 Her2/neu^[5],以及肝癌中的 AFP^[6]等都是糖蛋白。早期的糖蛋白质组研究主要集中于糖蛋白质/糖肽的分离富集、糖蛋白质的鉴定、糖基化位点的确定及糖链结构的解析等方面,以物质组学为核心的相关技术已广泛用于蛋白质组学水平的糖基化研究^[7]。

研究发现,在特定的状态下蛋白质是否发生糖基化修饰、糖蛋白质的量和(或)其糖基化程度的变化以及糖链结构的改变与特定的生理或病理状态改变直接相关,因而近年来糖蛋白质组的定量研究尽管开展得较晚但正受到研究者更多的关注。糖蛋白质组的定量从组学水平上大规模地研究糖蛋白质的含量高低和蛋白质糖基化修饰的程度改变以及它们二者之间的联系,其研究将对于找到疾病相关的重要分子有重要意义^[8]。尽管定量蛋白质组分析的方法和技术原则上都适用于糖蛋白质定量分析,但由于糖基化蛋白质自身的一些特点,使得糖蛋白质组定量分析遇到新的困难,也正是这些难点从很大程度上导致糖蛋白质定量研究开展相对较晚。首先,某些情况下糖蛋白质的表达量相对于非糖蛋白质而言处于极低的量,在定量之前如何能有效地将糖蛋白质/糖肽从大量的非糖蛋白/非糖肽中分离富集出来并加以鉴定,是对其进行准确定量的前提。第二,糖蛋白质/糖肽在质谱中的离子化效率远低于非修饰蛋白/肽,这样的信号抑制降低了糖蛋白质被鉴定的可能性;第三,糖蛋白质上糖链的高度微观不均一性及多样性使得质谱中质量数的分散,造成糖蛋白质鉴定的困难;第四,糖基化位点的改变、糖基化程度的变化等往往并不伴随蛋白质本身量的改变,适合糖蛋白质组定量的技术需要能同时反映糖蛋白质的蛋白质水平变化和糖基化程度变化。因此,定量蛋白质组的方法学发展对于糖蛋白质的定量研究和发现新的疾病诊断标志物及治疗靶标都有非常重要的意义。糖蛋白质组的定量技术大致可以分为同位素标记相对定量、非标记相对定量和目标糖蛋白质的绝对定量。本文主要就糖蛋白质组(主要针对 N-糖蛋白质和 O-糖蛋白质)的定量分析技术的现状及发展趋势作一综述。

1 糖蛋白质相对定量

1.1 同位素标记相对定量

同位素标记是最常用的蛋白质定量技术之一,通过引入化学结构相同、物理化学性质相似但质量数不同的稳定同位素标签用于标记两个(或多个)样品中的蛋白质,再将被标记的样品混合之后进行质谱分析,这样不同样品中的相同蛋白质的同一条肽将因由于标记产生的质量数差异在质谱图中表现为一对峰,通过比较质谱峰的强弱,即可以定量出不同样品中蛋白质表达量的相对变化。对于糖基化蛋白质而言,除了蛋白质水平的定量之外,还需要考虑糖基化程度的定量,而很多时候糖基化程度的变化和糖蛋白质量的变化并不一致。在糖蛋白质定量中,糖蛋白质的糖基化肽之间的比例变化可以反映出糖基化程度的变化;非修饰肽之间的比例变化则可以从蛋白质水平上反映出糖蛋白质的量的变化。

1.1.1 化学标记同位素定量

Zhang 等^[9]先利用胍脲反应富集糖蛋白质,再将富集到的蛋白质酶解并用 PNGase F 酶去除糖链,然后在去除糖链后的糖肽的 N 末端引入轻(H_4)/重(D_4)同位素标记的琥珀酸酐,再通过比较被标记肽的同位素峰的强度差异则可得到糖肽的相对量的变化。他们用标准糖蛋白质及人血清样品对该方法进行了评价,该方法用于人血清样本糖蛋白质组定量的结果和理论值平均偏差为 8%,表明了该方法可以适合于糖蛋白质的选择性捕获及糖基化程度的定量分析。该方法的优点包括,一方面对糖蛋白质进行特异性富集减少了样品的复杂程度,有利于提高糖蛋白质的鉴定成功率并保证定量的准确性;另一方面标记容易实现且 4 Da 的相对分子质量差异可以较好地避免同位素峰的重叠。但是该方法在定量方面也有着一定的缺陷,首先它主要是利用糖肽去除糖链后得到的肽来进行定量,这样仅能得到糖基化程度的变化,由于并未对非糖肽进行定量因而不能得到对糖蛋白质在蛋白质水平上含量变化的评价;第二,糖基化位点的确认仅通过糖肽经 PNGase F 脱去糖链时天冬酰胺残基转变为天冬氨酸时增加 0.98 Da 的差异来判断,并不够准确。Zhou 等^[10]利用类似的胍脲反应富集糖蛋白质,并用 iTRAQ 试剂(117/116)分别标记气候性滴状角膜病变患者的眼泪和正常人眼泪样品,通过比较 iTRAQ 试剂在 MS/MS 中的报告离子同位素峰来定量糖基化程

度。另外，他们还对未经胍脲反应富集的一对样品进行了同样的 iTRAQ 试剂标记，通过对糖蛋白质的非糖肽的定量可以得到该糖蛋白质在蛋白质水平上量的变化。结果表明，在气候性滴状角膜病变患者的眼泪样品中共有 5 个糖蛋白质的糖基化程度发生显著变化，但是这 5 个糖蛋白质在蛋白质水平上均未表现出明显的量的变化。

除了上述的胍脲反应选择性富集糖蛋白质，还可利用凝集素能够专一识别某一特殊结构的单糖或聚糖中特定的糖基序列的特点使用凝集素柱对糖蛋白质进行富集。如 Qiu 和 Regnier^[11-12] 利用接骨木凝集素 (*Sambucus nigra* agglutinin, SNA) 选择性富集含唾液酸的糖肽，然后用同位素标记的轻 (H_3)/重 (D_3) 乙酸-N-琥珀酰亚胺酯对肽段的 N 末端进行乙酰化标记，再用 PNGase F 脱去糖链，最后通过比较两组样品中同位素标记的去糖链后的糖肽的信号强度可以获得其含唾液酸的糖肽定量变化信息。他们还在富集时联用接骨木凝集素和伴刀豆球蛋白凝集素 (Concanavalin A, ConA)，通过比较只用 SNA 富集和 SAN-ConA 联用富集得到的糖肽量的变化，还可以定量分析糖肽中唾液酸化程度的变化，结果表明不同糖基化位点上的唾液酸化修饰程度不尽相同^[11]。但是该方法的主要缺点在于并未对糖蛋白质在蛋白质水平上量的变化进行比较。Ueda 等^[13] 将对照组血清和肺癌患者血清去除 6 种高丰度蛋白质后，一部分样品用扁豆凝集素 (*Lens culinaris*, LCA) 凝集素柱富集含 α -1,6-岩藻糖的糖蛋白质，将得到的糖蛋白质分别用轻 ($^{12}C_6$)/重 ($^{13}C_6$)-2-硝基苯磺酰氯 (2-nitrobenzenesulfonyl, NBS) 标记后再酶解进行质谱分析。根据同位素峰强度的比例得到 $^{13}C/^{12}C_{LCA}$ ，另一部分样品不经通过凝集素富集直接进行 NBS 同位素标记得得到 $^{13}C/^{12}C_{Pre}$ ，($^{13}C/^{12}C_{LCA}$)/($^{13}C/^{12}C_{Pre}$) 的比例即反映了 α -1,6-岩藻糖的水平变化，研究发现有 34 个糖蛋白质的 α -1,6-岩藻糖发生显著变化。该方法中引入了不经凝集素富集同位素标记样品的信号作为参照，真实反映了岩藻糖修饰程度的变化，也同时反映了含岩藻糖的糖蛋白质在蛋白质水平量上的变化。在最近的工作中，Ueda 等^[14] 对上述方法进行了改进，引入了 8 标的 iTRAQ 试剂并将其和凝集素富集以及 $H_2^{18}O$ 中进行 PNGase F 去糖链处理结合 (isotopic glycosidase elution and labeling on lectin column chromatography, IGEL)，用于肺癌病人血清糖蛋白质组的定量研

究。共鉴定到 107 条糖肽，并发现 A2GL_Asn151、A2GL_Asn290 等位点的糖基化程度发生显著变化。该方法的优势在于：第一，利用 iTRAQ 试剂可以同时标记 8 个样品，是现有糖蛋白质组定量中同时标记样品数最多的；第二，iTRAQ 定量是通过二级质谱低端报告离子强度进行定量，相比之前的 NBS 标记方法而言减少了同位素标记对一级质谱复杂度的影响；第三，在去糖链时引入 ^{18}O 标记有利于糖基化位点的确认；第四，一方面用不经凝集素富集的非糖肽对糖蛋白的蛋白质水平进行定量，另一方面用经凝集素富集得到的糖肽对糖基化水平进行定量。Shetty 等^[15] 用 SNA 凝集素富集和串联标记方法 (lectin and tandem labeling, LTL) 来定量前列腺癌病人血清中的含唾液酸的糖蛋白质及其唾液酸化程度变化。对照样品和疾病血清样品分别经胰酶酶解后再用 SNA 富集唾液酸化糖肽，富集得到的糖肽再分别用轻 (H_3)/重 (D_3) 同位素进行乙酰化标记，再将标记后的样品进行混合并在 $H_2^{18}O$ 中进行 PNGase F 去糖链处理，对唾液酸化程度进行定量，同时收集未被 SNA 凝集素富集的非糖肽经过同样的标记进行蛋白质水平的定量。通过这样的乙酰化和 ^{18}O 串联标记共鉴定到 45 个唾液酸化糖肽，并发现前列腺癌病人血清中大多数糖蛋白质的唾液酸化程度增加，而这些蛋白质本身的量并没有明显改变。该方法具有诸多优点：首先，利用凝集素富集可以特异性地研究某一类糖型的糖蛋白如唾液酸化糖蛋白质；第二，在 $H_2^{18}O$ 中进行 PNGase F 去糖链酶切可以在糖基化位点处多引入一个 ^{18}O 原子，有利于糖基化位点的确认。但该方法中，轻重标记的同位素峰之间仅有 3 Da 的差异，在定量时可能会有因同位素峰交盖引起的误差，因此作者在定量时将重/轻同位素比例大于 2 的才认为有明显差异以减少误差。

Lee 等^[16] 发展了一种不经过选择性富集，直接用 iTRAQ 标记定量肝癌患者 (hepatocellular carcinoma, HCC) 血浆糖蛋白质组的方法。他们先对血浆样品进行高丰度蛋白去除和胰酶酶切，将酶解肽段分别进行 iTRAQ 试剂 (114/116) 标记、混合和一维反相色谱分离和 MS/MS 质谱鉴定，根据鉴定到的肽段的 m/z 值和色谱保留时间建立“排除峰列表 (exclude peak list, EPL)”；然后再将另一份血浆样品进行胰酶酶切，iTRAQ(114/116) 标记和 PNGase F 去糖链酶切，将上述的 EPL 导入到该样品的一维

反相色谱分离和 MS/MS 分析过程中作为质谱选择鉴定肽的参数, 这样第一次鉴定到的非糖肽将不会被送入本次的质谱 MS/MS 鉴定, 而本次的质谱鉴定将只针对于被 PNGase F 去糖链的糖肽进行 MS/MS 分析, 最后同样是根据 iTRAQ 报告离子的峰强来确定糖肽的变化, 结果发现 14 个 N-糖基化肽在肝癌患者血浆中高表达。该方法最突出的优势在于和胍胍反应富集、凝集素富集等相比省去了富集步骤, 可以避免因富集导致的样品丢失。

由于缺乏有效去除 O-糖蛋白质的糖链的糖苷酶, 以上的定量方法均针对于 N-糖蛋白质定量。对于 O-糖蛋白质定量, Vosseller 等^[17]利用 β -消除-Michael 加成 (β -elimination followed by Michael addition with dithiothreitol, BEMAD) 结合 cICAT 同位素标记进行定量。首先对糖蛋白质的酶解肽段进行 β 消除, 再对两组样品分别用轻 (H_0) / 重 (D_0) 同位素标记的二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT) 进行 Michael 加成反应, 这样, 丝氨酸或者苏氨酸上的 O-糖修饰位点处将分别引入轻 / 重同位素标记的 DTT, 通过比较轻重同位素不同的 DTT 的标记肽段即可对 O-糖蛋白质的糖基化程度进行定量, 通过 cICAT 标记的非糖肽则可以对糖蛋白质进行定量。Khidekel 等^[18]发展的化学酶促标记和同位素标记定量方法 (quantitative isotopic and chemoenzymatic tagging, QUIC-Tag) 则是先将 O-GlcNAc 糖基化蛋白质通过化学酶促标记上半乳糖酮-生物素 (Ketogalactose-Biotin) 标签, 利用 avidin 柱对含生物素标签的糖蛋白质进行富集, 然后再将富集到的糖蛋白质进行酶解和对酶解肽段用轻 (H_3) / 重 (D_3) 同位素进行双甲基化标记, 最后通过比较轻重同位素的比例即可对两组样品的糖基化程度进行定量。引入的半乳糖酮-生物素标签一方面可以有效地对糖蛋白质进行富集, 另一方面, 该标签将在串联质谱中产生特征离子 515.3 Da 和 718.4 Da, 可以用于糖肽的确认。他们采用该方法首次证实了 O-GlcNAc 糖基化在活体大脑中由兴奋性刺激进行动态调节。

1.1.2 酶促同位素标记定量

除了上述的化学标记之外, 还可以通过酶促标记在肽段 C 末端引入同位素标签。2002 年, Reynolds 等^[19]首次提出了两步酶解双标记的方法用于糖蛋白质的定量。他们首先将两组样品分别在 $H_2^{16}O$ 和 $H_2^{18}O$ 中采用 Glu-C 对蛋白质进行酶解, 酶解得到的肽段 C 末端将引入两个同位素差异的 O

原子 (产生 4 Da 的相对分子质量差异), 接下来再用 PNGase F 对两组样品分别在 $H_2^{16}O$ 和 $H_2^{18}O$ 中进行去糖链酶切又引入一个同位素差异 O 原子 (再产生 2 Da 的质量差异)。两步酶切后对于具有一个糖基化位点的糖肽而言, 采用在 $H_2^{18}O$ 和在 $H_2^{16}O$ 中酶切得到的肽之间将产生 6 Da 的相对分子质量差异, 这样一对同位素峰的强度的变化即反应了糖基化程度的变化。该方法的主要优点在于一方面 6 Da 的相对分子质量差异可以避免同位素峰的重叠效应, 定量更为准确; 另一方面在去糖链时引入 ^{18}O 标记使得糖基化位点的确认更为可靠。但这一方法并不适合于大规模的糖蛋白质组学研究。首先, 糖蛋白通常处于极低的丰度, 需要经过富集才能得到更高灵敏度的鉴定和更可靠的定量结果, 上述方法没有和富集方法结合难以达到实际样品分析所需要的灵敏度要求; 第二, 所采用的酶 Glu C 相对于 Trypsin 而言, 酶切效率相对较低且价格较昂贵, 不适合于常规的蛋白质组分析。我们课题组最近发展了亲水富集糖肽结合串联 ^{18}O 同位素标记用于 N-糖蛋白组定量的方法 (TOSIL), 并将其成功应用于人卵巢癌病人血清的糖蛋白质组定量研究, 找到了 86 个具有定量信息的 N-糖基化位点, 其中, 56 个糖肽的糖基化程度发生了显著改变^[20]。如图 1 所示, 在该方法中, 我们首先分别在 $H_2^{16}O$ 和 $H_2^{18}O$ 中采用胰蛋白酶对蛋白质进行酶解; 接下来, 对酶解得到的肽段采用亲水法进行富集, 选择性的富集到糖肽; 然后, 再用 PNGase F 在 $H_2^{16}O$ 和 $H_2^{18}O$ 中对得到的糖肽进行去糖链酶切。两步酶切后, 对于具有一个糖基化位点的糖肽而言, 采用在 $H_2^{18}O$ 和在 $H_2^{16}O$ 中酶切得到的肽之间将产生 6 Da 的相对分子质量差异; 最后, 根据是否产生 6 Da 的差异即可确认糖基化位点, 根据糖肽同位素峰强度的差异即可对其糖基化程度进行定量分析, 根据非糖肽同位素峰强度的差异对糖蛋白进行定量分析。这样的糖蛋白定量方法, 具有诸多的优点: (1) 高达 6 Da 的相对分子质量差异可以避免同位素峰的交盖, 使得定量更准确; (2) 对糖肽采取选择性的富集, 有效地提高了鉴定的灵敏度; (3) 对于糖蛋白而言, 既可以根据其糖肽进行糖基化程度的定量, 又可以根据非糖肽进行蛋白质水平的定量, 并且可以对两者定量的数据进行整合, 对于寻找疾病相关的生物标志物及疾病的发生发展机制的阐述具有重要意义。Shakey 等^[21]采用了类似的标记方法并结合了用末

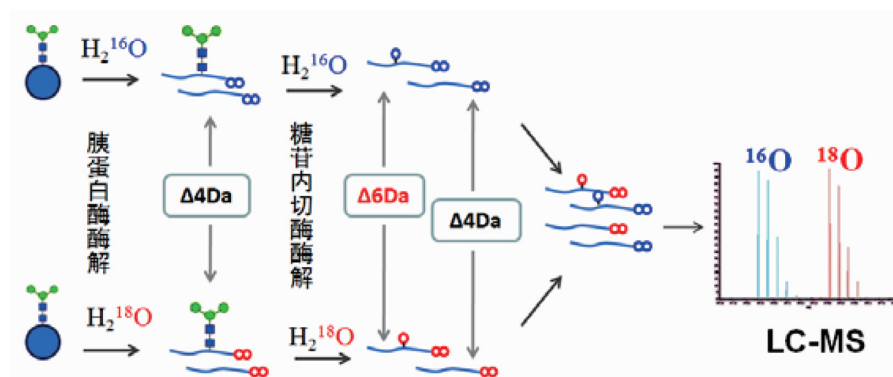


图1 TOSIL法糖流程示意图

端为酰肼基团的磁珠通过肼腙反应富集糖肽，对糖蛋白质组进行定量。针对其中的关键技术如糖的氧化、肼腙反应条件以及酶解条件等进行了优化，并用 15 个标准糖蛋白质以不同浓度掺入小鼠血清中对该方法的准确度、重现性和定量的线性范围进行了评价，最终用建立的方法从 20 μL 未经高丰度蛋白去除的小鼠血清样品中定量到 224 条 N-糖肽对应于 130 个糖蛋白质。酶促同位素标记的共同优点在于：首先， ^{18}O 酶促标记过程具有高度专一性，无标记副产物产生；第二，标记反应条件温和，标记前后肽段的理化性质不发生改变；第三，蛋白质的胰蛋白酶切位点丰度适中，在现有质谱的质量分析范围对所有蛋白都有合适的酶解肽段，因此 ^{18}O 标记对蛋白质是全域的。但需要注意的是，胰酶酶促 ^{18}O 标记方法是一个快速的动态可逆反应，常常会发生标记不完全和标记肽段发生回标的情况，有效地促进标记效率和回标抑制这两个环节是实验成功的关键^[22]。另外由于没有适合 O-糖蛋白质去糖链的酶，这种酶促同位素标记尚未被用于 O-糖蛋白质定量。

1.2 非标记相对定量

非标记定量方法同样可以用于糖蛋白质组的定量。如 Mann 等^[23] 发展了一种串联凝集素富集结合非标记的方法用于糖蛋白质的定量。先将血清中的蛋白质经过网孢盘菌凝集素 (*Aleuria aurantia* lectin, AAL) 和莲花豆凝集 (*Lotus tetragonolobus* agglutinin, LTA) 选择性富集其中含岩藻糖的糖蛋白质，将富集到的糖蛋白质进行胰蛋白酶酶解和 Bottom-up LC-MS/MS 质谱鉴定，最后再根据鉴定到的肽段所对应的提取离子色谱图中的峰面积对食道腺癌患者、高度不良增生患者和对照组人血清样

品中的糖蛋白质进行定量。共鉴定到 136 个可能含岩藻糖的糖蛋白质，并发现 Fetuin-B、EMILIN-2 等糖蛋白质在食道腺癌患者血清样本中高表达。该方法具有非标记定量方法的共同优点，如：对样本的操作步骤最少，从而使其最接近原始状态；不需要昂贵的同位素标签，实验耗费低。但同时也存在非标记定量方法的固有缺点，如肽段离子化的效率会影响肽段的检测丰度，这一缺点在糖蛋白质的定量分析中显得更为突出，特别是对较低丰度的糖肽难以检测分析。此外，在这种非标记定量方法中被检测到的大多是非糖基化肽，即糖蛋白质的定量是通过非糖肽来实现的，因此只从蛋白质水平上反映了糖蛋白质量的变化，未能反应糖基化程度的变化，也未对鉴定到的糖蛋白的糖基化位点进行更进一步的确认和分析。Goo 等^[24] 用类似的非标记定量方法比较了人正常前列腺细胞和人膀胱基质细胞的糖蛋白质组，先对细胞中的糖蛋白质用肼腙反应富集，PNGase F 酶处理脱去糖链后进行 LC-MS/MS 分析，根据肽离子流峰面积 (peptide ion current area, PICA) 对蛋白质进行定量。结果分别从正常前列腺细胞和膀胱基质细胞中鉴定到 116 和 84 个糖基化蛋白质，其中组织蛋白酶 Cathepsin L 等在膀胱基质细胞中上调。这类现有的非标记定量方法的主要缺点均在于难以对糖基化程度进行定量以及没有对糖基化位点进行更准确的确认。

2 目标糖蛋白质绝对定量

近年来，目标蛋白质的绝对定量成为定量蛋白质组学新的热点之一，而糖蛋白质绝对定量方面的研究报道还不多见。Ahn 等^[25] 最近发展了糖蛋白质特异性富集结合 MRM 技术对肠癌病人血清

中的糖蛋白质金属蛋白酶组织抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP 1) 进行了绝对定量。他们首先去除血清中的高丰度蛋白质, 然后用植物血球凝集素 (phytohemagglutinin-L4, L-PHA) 对糖蛋白质进行富集, 随后进行胰酶酶解, 得到混合肽段。同时, 在 TIMP 1 中选取两条胰酶酶切肽段, 将这两条肽作为抗原设计其抗体, 用以对它们进行富集, 由于根据其中一条肽设计的抗肽段抗体 (anti-peptide antibody) 并未对这条肽表现出很好的识别, 因此, 后续的 MRM 实验只选取了另一条肽进行。即首先按照所选的肽序列合成一对轻重同位素标记的肽作为 MRM 的目标离子, 通过标准样品实验分别得到以这两条肽为母离子的 3 对母子离子对用于 MRM 定量。最后通过将重同位素标记的这条肽掺入到肠癌患者血清中并结合上述的 L-PHA 凝集素富集和抗体肽富集技术, 定量到其中的 TIMP 1 的含量为 0.8 ng/mL。利用凝集素富集和抗肽段抗体富集技术, 一方面大大简化了样品的复杂度, 提高了目标糖蛋白质的鉴定效率和定量准确度; 另一方面, 这样的定量是基于该糖蛋白质的能够被高选择性、高效率富集的前提, 而事实上可能会由于富集效率低而导致糖蛋白质没有被有效富集从而影响定量结果的真实性。并且, 这样绝对的定量技术仅是对糖蛋白质本身的量进行了分析, 并未对其糖基化程度等进行考察。

3 糖链定量

糖蛋白质定量研究中, 还需要对糖链进行定量分析, 但一般而言糖链的定量大多作为糖组学的研究范畴进行研究, 因此在本文中不作过多阐述。基于质谱的糖链定量分析可以通过体外途径也可以通过体内途径对糖链进行稳定同位素标记来实现。体外标记的方法主要有 H/D 甲基化标记^[26-27]、¹²C/¹³C 还原胺化标记^[28]、H/D β-消除还原标记^[29], 以及通过糖的还原端与胺氧基反应引入含 H/D 同位素的基团作为标签标记^[30]等。最近的报道中 Orlando 等^[31]发展了一种体内同位素代谢标记方法即谷氨酸盐同位素标记糖氨基 (isotopic detection of aminosugars with glutamine, IDAWG) 对糖链进行定量。由于谷氨酰胺 (Gln) 侧链氨基部分是 GlcNAc、GalNAc 和唾液酸生物合成过程的唯一氮源, 培养基中加入重同位素标记的 amide-¹⁵N-Gln 即可在代谢过程中将细胞内的氨基糖用 ¹⁵N 进行标记。通过比较分别来

自轻重谷氨酰胺培养的两株细胞糖蛋白质的糖链的一对质谱同位素峰信号强度即可对糖链进行定量。

4 结语和展望

糖蛋白质组的定量研究已经受到强烈的关注, 各种技术也相应地迅速发展起来, 但由于糖蛋白质组学自身的一些特点, 现有的技术还不能很好地满足研究的需要。首先, 要发展高效率、高选择性、高回收率的糖蛋白质/糖肽分离富集方法, 这是糖蛋白质得以准确鉴定和定量的前提; 第二, 对于稳定同位素标记定量技术而言, 要发展高效率的同位素标记方法、通过固定化酶技术等减少酶促同位素标记中可能产生的回标, 提高同位素标记的稳定性和标记效率; 第三, 对于非标记定量技术而言, 需要发展高重现性、高稳定性的色谱-质谱联用技术, 以确保定量的准确性; 第四, 所发展定量方法要能与大规模的糖蛋白质组分析兼容, 构建自动化高通量技术平台也将是未来发展的一个方向; 最后, 还需要研究更有效的计算机软件和生物信息学方法进行辅助定量。相信随着蛋白质组学研究和生物质谱技术的不断深入和发展, 糖蛋白质组定量技术必将得到突飞猛进的发展, 为进一步探索糖蛋白质用于发现新的疾病诊断标志物及治疗靶标提供有力支持。

[参 考 文 献]

- [1] Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1473(1): 4-8
- [2] Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 2006, 126(5): 855-67
- [3] Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening-test for prostate-cancer. *New Eng J Med*, 1991, 324(17): 1156-61
- [4] Zhang Z, Bast RC, Yu YH, et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res*, 2004, 64(16): 5882-90
- [5] Clark GM, Mcguire WL. Follow-up-study of her2/neu amplification in primary breast-cancer. *Cancer Res*, 1991, 51(3): 944-8
- [6] Sato Y, Nakata K, Kato Y, et al. Early recognition of hepatocellular-carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein. *N Engl J Med*, 1993, 328(25): 1802-6
- [7] Pan S, Chen R, Aebersold R, et al. Mass spectrometry based glycoproteomics—from a proteomics perspective.

- Mol Cell Proteomics, 2011, 10(1): R110.003251
- [8] Wei X, Li L. Comparative glycoproteomics: approaches and applications. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2009, 8(2): 104-13
- [9] Zhang H, Li XJ, Martin DB, et al. Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nat Biotech*, 2003, 21(6): 660-6
- [10] Zhou L, Beuerman RW, Chew AP, et al. Quantitative analysis of N-linked glycoproteins in tear fluid of climatic droplet keratopathy by glycopeptide capture and iTRAQ. *J Proteome Res*, 2009, 8(4): 1992-2003
- [11] Qiu RQ, Regnier FE. Use of multidimensional lectin affinity chromatography in differential glycoproteomics. *Anal Chem*, 2005, 77(9): 2802-9
- [12] Qiu RQ, Regnier FE. Comparative glycoproteomics of N-linked complex-type glycoforms containing sialic acid in human serum. *Anal Chem*, 2005, 77(22): 7225-31
- [13] Ueda K, Katagiri T, Shimada T, et al. Comparative profiling of serum glycoproteome by sequential purification of glycoproteins and 2-nitrobenzensulfonyl (NBS) stable isotope labeling: A new approach for the novel biomarker discovery for cancer. *J Proteome Res*, 2007, 6(9): 3475-83
- [14] Ueda K, Takami S, Saichi N, et al. Development of serum glycoproteomic profiling technique; simultaneous identification of glycosylation sites and site-specific quantification of glycan structure changes. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(9): 1819-28
- [15] Shetty V, Nickens Z, Shah P, et al. Investigation of sialylation aberration in N-linked glycopeptides by lectin and tandem labeling (LTL) quantitative proteomics. *Anal Chem*, 2010, 82(22): 9201-10
- [16] Lee HJ, Na K, Choi EY, et al. Simple method for quantitative analysis of N-linked glycoproteins in hepatocellular carcinoma specimens. *J Proteome Res*, 2010, 9(1): 308-18
- [17] Vosseller K, Hansen KC, Chalkley RJ, et al. Quantitative analysis of both protein expression and serine/threonine post-translational modifications through stable isotope labeling with dithiothreitol. *Proteomics*, 2005, 5(2): 388-98
- [18] Khideke N, Ficarro SB, Clark PM, et al. Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(6): 339-48
- [19] Reynolds KJ, Yao XD, Fenselau C. Proteolytic ^{18}O labeling for comparative proteomics: Evaluation of endoprotease Glu-C as the catalytic agent. *J Proteome Res*, 2002, 1(1): 27-33
- [20] Liu Z, Cao J, He YF, et al. Tandem ^{18}O stable isotope labeling for quantification of N-glycoproteome. *J Proteome Res*, 2010, 9(1): 227-36
- [21] Shakey Q, Bates B, Wu J. An approach to quantifying N-linked glycoproteins by enzyme-catalyzed $^{18}\text{O}_3$ -labeling of solid-phase enriched glycopeptides. *Anal Chem*, 2010, 82(18): 7722-8
- [22] Angel PM, Lim JM, Wells L, et al. A potential pitfall in ^{18}O -based N-linked glycosylation site mapping. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(5): 674-82
- [23] Mann B, Madera M, Klouckova I, et al. A quantitative investigation of fucosylated serum glycoproteins with application to esophageal adenocarcinoma. *Electrophoresis*, 2010, 31(11): 1833-41
- [24] Goo YA, Liu AY, Ryu S, et al. Identification of secreted glycoproteins of human prostate and bladder stromal cells by comparative quantitative proteomics. *Prostate*, 2009, 69(1): 49-61
- [25] Ahn YH, Lee JY, Lee JY, et al. Quantitative analysis of an aberrant glycoform of TIMP1 from colon cancer serum by L-PHA-enrichment and siscapa with MRM mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2009, 8(9): 4216-24
- [26] Alvarez-Manilla G, Warren NL, Abney T, et al. Tools for glycomics: relative quantitation of glycans by isotopic permethylation using $^{13}\text{CH}_3\text{I}$. *Glycobiology*, 2007, 17 (7): 677-87
- [27] Kang P, Mechref Y, Kyselova Z et al. Comparative glycomic mapping through quantitative permethylation and stable-isotope labeling. *Anal Chem*, 2007, 79 (16): 6064-73
- [28] Bowman MJ, Zaia J. Tags for the stable isotopic labeling of carbohydrates and quantitative analysis by mass spectrometry. *Anal Chem*, 2007, 79(15): 5777-84
- [29] Xie Y, Liu J, Zhang J, et al. Method for the comparative glycomic analyses of O-linked, mucin-type oligosaccharides. *Anal Chem*, 2004, 76(17): 5186-97
- [30] Uematsu R, Furukawa J, Nakagawa H, et al. High throughput quantitative glycomics and glycoform-focused proteomics of murine dermis and epidermis. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4(12): 1977-89
- [31] Orlando R, Lim JM, Atwood JA, et al. IDAWG: Metabolic incorporation of stable isotope labels for quantitative glycomics of cultured cells. *J Proteome Res*, 2009, 8(8): 3816-23