

化学酶法标记整合质谱技术在蛋白质糖基化分析中的研究进展

赵晨阳¹, 李中华², 陆豪杰^{1,2}

(1. 复旦大学生物医学研究院和化学系, 上海 200032;

2. 复旦大学基础医学院, 卫健委糖复合物重点实验室, 上海 200032)

摘要: 蛋白质糖基化是最丰富、最复杂的翻译后修饰(PTMs)之一, 在蛋白质折叠、稳定、信号传导、细胞黏附和免疫调控等多种生物学过程中发挥着关键作用。糖基化异常与多种疾病的发生发展密切相关, 包括癌症、神经退行性疾病和代谢性疾病等。由于糖基化具有高度的动态性和异质性, 其结构解析和功能研究仍面临挑战。近年来, 质谱(MS)技术在糖蛋白质组学研究中发挥着重要作用, 能够实现糖基化修饰位点、糖链结构及丰度的解析。然而, 由于传统富集糖链的策略存在特异性不足或覆盖率有限等局限, 糖蛋白质组学鉴定仍任重道远。近年来, 化学酶法通过利用重组酶对底物的高选择性以及化学标记的高灵敏性, 为部分糖基化的特异性标记、成像、富集与质谱鉴定提供了强有力的工具。本文综述了化学酶法辅助的质谱技术在糖蛋白质组学中的发展与应用, 重点介绍了其在 *N*-糖基化、*O*-乙酰氨基葡萄糖(*O*-GlcNAc)及黏蛋白型 *O*-乙酰氨基半乳糖(*O*-GalNAc)等糖基化类型研究中的最新进展, 并探讨其在疾病机制研究和精准医学中的潜在应用价值。

关键词: 蛋白质糖基化; 质谱; 化学酶法; 糖蛋白质组学; 富集分析

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2026)03-0261-13

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0154

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0154

Application Progress of Chemoenzymatic Labeling-Assisted Mass Spectrometry in Protein Glycosylation Analysis

ZHAO Chen-yang¹, LI Zhong-hua², LU Hao-jie^{1,2}

(1. Institutes of Biomedical Science and Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200032, China;

2. NHC Key Laboratory of Glycoconjugates Research, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Protein glycosylation is one of the most abundant and structurally diverse post-translational modifications (PTMs) in eukaryotic systems. Unlike template-driven biosynthesis, glycosylation is synergistically regulated by multiple glycosyltransferases, glycosidases, and glycan transporters, resulting in extensive structural heterogeneity at both macroscopic and microscopic levels. This inherent complexity enables glycosylation to play an important role in protein folding, stability, quality control, intercellular communication, signal transduction, and immune regulation. The dysregulation of glycosylation is associated with a wide range of pathological conditions, including

cancer, metabolic disorders, inflammatory diseases, and neurodegenerative diseases, highlighting the importance of comprehensive and site-specific glycoproteomic analysis. Recently, glycoproteomics based on liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) has become a pivotal analytical platform for characterizing intact glycopeptides, which is capable of simultaneously identifying peptide backbones, glycosylation sites, and glycan structures. However, the low abundance of glycoproteins in complex biological samples, coupled with the low ionization efficiency and significant structural heterogeneity of glycopeptides, poses significant challenges for comprehensive and unbiased glycosylation analysis. Chemoenzymatic labeling strategies have emerged as powerful and versatile tools in MS-based glycoproteomics, offering unique advantages for the selective enrichment, identification, and quantitative analysis of protein glycosylation. By combining the strict substrate specificity of enzymes (e.g., glycosyltransferases and glycosidases) with the flexibility of chemical tagging reactions, these approaches enable precise characterization of glycosylation while maintaining compatibility with complex biological samples. Compared with conventional physicochemical or affinity-based enrichment methods, chemoenzymatic strategies provide improved structural specificity and enhanced adaptability to different glycosylation types. This review focused on recent methodological advances in chemoenzymatic labeling-assisted MS workflows for glycoproteomic analysis. Representative labeling strategies were systematically summarized according to glycosylation types, including *N*-glycosylation, *O*-GlcNAcylation, mucin-type *O*-GalNAcylation, and others. Among these chemoenzymatic labeling strategies, researchers have introduced innovations in probe design and synthesis, the selection of enzymatic tools, enrichment approaches, and tag-cleavage strategies, enabling these labeling methods to be more effectively integrated into glycoproteomic workflows. In addition to enrichment strategies, recent advances in tandem MS fragmentation modes and glycopeptide-centric data analysis software have significantly improved the scope and depth of glycosylation identification. The integration of chemoenzymatic labeling with advanced MS technology establishes a robust framework for high-throughput and quantitative glycoproteomics. In summary, the chemoenzymatic strategy connects chemical biology and MS, providing high selectivity, sensitivity in glycosylation analysis. Continuous innovation in enzyme engineering, labeled probe design, enrichment materials, and computational analysis is expected to further expand the scope of glycoproteomics, enabling a deeper understanding of the biological processes involved in glycosylation regulation and promoting translational applications in disease mechanism research and precision medicine.

Key words: protein glycosylation; mass spectrometry; chemoenzymatic method; glycoproteomics; enrichment analysis

糖基化(glycosylation)是真核生物中最常见、最复杂的蛋白质翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)之一,作为一种非模板驱动的修饰过程,蛋白质糖基化由多种糖基转移酶、糖苷酶及聚糖转运蛋白协同调控,共同决定糖链结构与糖蛋白的功能特征。糖链结构的复杂性和多样性在很大程度上源于这些酶类在空间和时间上的精细调控^[1-3]。越来越多的研究表明^[3-4],糖基化在调节蛋白质折叠与稳定

性、介导细胞黏附与信号转导、调控免疫识别与逃逸等生理过程中发挥关键作用。相应地,糖基化异常与多种疾病的发生发展密切相关,包括肿瘤、炎症反应、糖尿病、神经退行性疾病及自身免疫性疾病等。鉴于糖基化过程的复杂性和糖链结构的异质性,如何在分子水平上全面、准确地解析糖蛋白的糖基化修饰,已成为糖生物学研究的重要挑战。近年来,得益于液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-

MS)技术的高灵敏度和高通量特性,糖蛋白质组学(glycoproteomics)得以在完整糖肽水平上同时解析糖链组成、肽段序列及糖基化位点信息,已成为糖基化研究的主导分析手段^[5]。然而,由于糖蛋白在生物样本中的低丰度和异质性,糖蛋白样品的特异性富集面临巨大挑战。近年来发展起来的化学酶法标记策略(chemoenzymatic labeling),通过结合糖基转移酶的底物特异性与化学标记的高灵敏性,能够靶向地标记、成像、富集并分析特定糖蛋白,结合质谱检测可实现特定糖基化修饰的精准鉴定,是解析糖蛋白质组的重要工具^[6-7]。

本综述将聚焦化学酶法在糖蛋白质组学中的发展与应用,系统梳理其技术演进过程,并重点介绍近年来在糖蛋白富集与定量分析中展现应用潜力的化学酶法标记策略。

1 糖基化研究的意义和挑战

1.1 糖基化研究的复杂性及其挑战

蛋白质糖基化作为生物体中一种重要的翻译后修饰,主要通过其在蛋白质上的修饰位点与修饰类型来影响蛋白质的结构、性质与功能,进而调控多种生物学过程^[4]。糖基化的形成由酶促反应驱动,该过程不同于基因转录和蛋白质翻译,不依赖模板,且受糖基转移酶和糖苷酶表达、底物可得性、细胞环境等多种因素影响,糖链修饰常表现出高度多样性。在宏观上,同一条蛋白质链上,一个特定位点可能被糖基化,也可能不被糖基化,即具有宏观异质性(macroheterogeneity)^[8]。在微观上,蛋白质同一位点上由于糖链的类型、组成、连接方式、分支、修饰(如硫酸化、磷酸化)等造成的结构也不同,即具有微观不均一性(microheterogeneity)。这些异质性会改变蛋白质的理化性质^[9]、免疫识别^[10]、半衰期^[11]等,具有重要的生物学意义。二者共同构成了糖蛋白复杂多样的结构基础,是蛋白质糖基化系统性研究的核心挑战之一。

1.2 糖基化研究的手段与化学酶法标记的优势

随着研究的深入,糖基化鉴定经历了从低通量到高通量的技术革新。早期研究多依赖免疫荧光检测(immunofluorescence detection)、凝集素(lectin)染色及核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)等手段,用于揭示糖链的总体特

征或特定位点的存在,但这些方法的灵敏度较低、通量有限,难以全面解析复杂样本中糖蛋白的修饰情况。随后,糖组学(glycomics)的发展能够系统分析游离糖链的组成与结构,但其局限性在于无法保留糖链与肽段之间的对应关系。相比之下,液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术赋能的糖蛋白质组学能够同时鉴定完整糖肽的糖链结构、肽段序列及糖基化位点,从而提供更完整、更具生物学意义的定量与定位信息^[6]。这一优势使糖蛋白质组学成为当前糖基化研究的主流方向之一。然而,通常糖蛋白在复杂生物样本中的含量较低,且糖肽在质谱中的离子化效率较低、信号强度较弱,因此,在质谱分析前需要进行糖肽富集与修饰。

近年来,研究者们致力于开发和改进用于糖肽分析的富集和分离方法,主要包括3种方式:1)基于非共价亲和相互作用的富集方法,包括基于物理化学性质的亲水相互作用液相色谱(hydrophilic-interaction chromatography, HILIC)^[12-13]、多孔石墨碳(porous graphitized carbon, PGC)、固定金属亲和层析(immobilized metal-chelated affinity chromatography, IMAC)、TiO₂/ZrO₂富集等;2)基于化学反应的富集方法,包括硼酸化(boronic acid chemistry)、酰肼化(hydrazide chemistry)、还原氨化(reductive amination chemistry)、肟点击化学(oxime click chemistry)等^[14];3)基于生物识别的方法,如利用抗体/凝集素修饰的磁珠进行富集^[15]。然而,上述方法均存在一些缺陷,如,基于非共价亲和和相互作用的手段,由于复杂糖链本身的物化性质不同会导致富集具有偏向性;基于化学反应的富集方法,其化学反应富集步骤复杂,且可能影响糖链结构;生物识别法主要包括基于抗体或凝集素的糖蛋白识别与富集策略,抗体通常针对特定蛋白表位或特定糖表位,具有较高的识别特异性,但受限于可获得抗体种类及其表位覆盖范围,难以实现对复杂糖蛋白体系的全面分析^[16],相比之下,凝集素通过识别特定糖基结构或糖基基序能够实现广谱富集,适用于整体糖基化特征的研究,但其对糖链结构的分辨率有限,通常难以区分高度相似的聚糖结构^[6]。因此,单一的生物识别策略在系统性糖蛋白质组学分析中存在局限。

代谢标记策略(metabolic labeling)是一种强

大的糖基化分析工具,它依赖于代谢过程,用修饰的单糖类似物插入糖蛋白的构建模块。但由于与天然底物的竞争,难以准确反映内源性糖基化的水平;此外,代谢标记不适用于分析无法进行代谢培养处理的组织、体液等样本^[17]。

化学酶法(chemoenzymatic approach)是一种整合化学合成与酶催化技术的策略,其利用重组合成酶(例如糖基转移酶)选择性地标记供体(如引入叠氮基团的非天然糖核苷酸供体)转移到蛋白质的特定聚糖结构(受体)上。其中使用的重组酶对糖供体具有较宽的识别范围,而对受体则具有严格的底物选择性,被标记的特定聚糖结构可以通过生物正交反应被检测报告分子或探针捕获,从而实现对目标聚糖结构的系统性标记、成像、富集分析。化学酶法相对于基于物化性质的无偏向性方法,具有能够特异性标记靶向糖链的特点;相较于基于抗体或凝集素的亲和性富集方法,具有灵敏、高效、不受糖肽序列影响的优势;由于无需依赖代谢过程,该方法可直接标记生物体的内源性糖基化水平,且适用于细胞、组织、体液等多种复杂样本。总体而言,化学酶法为特定糖基化类型的系统性富集提供了强大的工具,有望成为糖蛋白质组学研究中的关键一环^[17]。

2 化学酶法在糖链标记与富集中的进展

化学酶法旨在解决糖类分子(如糖蛋白、糖链)的合成、标记及功能研究等难题。2003年, Hsieh-Wilson 等^[18]最早将化学酶法用于蛋白糖基化标记,利用突变 GalT 引入羰基糖类似物,在温和条件下与氨基生物素衍生物反应,并结合荧光基团实现了 *O*-GlcNAc 的标记。随后,该团队结合抗生物素亲和层析法实现了糖蛋白富集,并应用于质谱糖蛋白质组学研究^[19],通过结合基于重汞甲醛/NaCNBD₃ 同位素标记法实现了定量分

析^[20]。诺贝尔化学奖得主 Bertozzi 团队^[21]开发的生物正交反应凭借良好的生物相容性、快速高效和高特异性等优势,已成为生物体靶向标记的强大工具,也是化学酶法标记和富集糖基化策略的重要技术基础,示于图 1。本文将分别从 *N*-糖基化、*O*-GlcNAc 糖基化和黏蛋白型 *O*-GalNAc 糖基化以及其他类型糖基化 4 个方面,介绍化学酶法标记整合质谱技术在糖蛋白质组学分析中的研究进展。

2.1 *N*-糖基化分析

N-糖基化是目前研究较多的糖基化类型,指糖链通过 *N*-糖苷键(*N*-glycosidic bond)共价连接到蛋白质天冬酰胺(asparagine, Asn, N)残基上,这是一个多步骤的复杂生化过程,涉及内质网(endoplasmic reticulum)和高尔基体(golgi apparatus)的协同作用,其主要步骤包括糖链前体的合成、糖链的转移、剪切及成熟。初始糖链的合成和转移主要在内质网内进行,进一步的加工和成熟修饰则在高尔基体内完成,包括剪切、延伸及分支化^[1]。此外,*N*-糖基化还通过参与内质网内的蛋白质质量控制机制,调节新生蛋白质的折叠过程^[22]。在功能层面,*N*-糖基化在多种重要的生理与病理过程中发挥关键作用。例如,人体内 *N*-糖基化可作用于 PD1/PD-L1 通路,通过增强 PD-L1 与 PD1 的结合亲和力,放大免疫抑制信号^[23]; *N*-糖链分支增加可以增强整合素和生长因子受体活性,提高肿瘤黏附、迁移及上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关侵袭能力^[24]。

在糖蛋白质组学研究中,传统的 *N*-糖肽富集通常依赖于亲水相互作用色谱(HILIC),然而,该方法存在共富集非糖肽、富集偏倚、覆盖度有限以及脱盐困难等局限。为克服这些不足,逐渐发展出化学酶法富集策略,以期在糖链结构特异性和无偏向性富集方面取得平衡。近年来,Boons

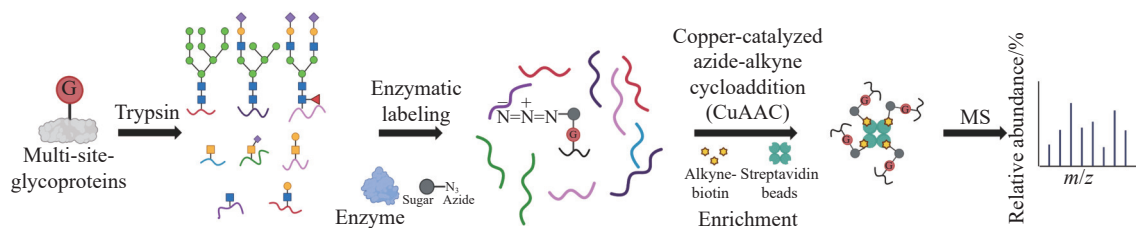


图 1 化学酶法标记富集策略用于质谱糖蛋白质组学

Fig. 1 Chemoenzymatic labeling and enrichment strategy for mass spectrometry-based glycoproteomics

等^[25]基于 ST6Gal1 和生物素化 CMP-Neu5Ac 类似物作为底物, 标记 *N*-糖基化的末端半乳糖, 开发了一步法标记策略, 与之前先引入叠氮化糖再利用点击反应 (click reaction) 标记生物素的两步法^[26]相比, 该方法显著提高了标记效率。Wu 等^[27]利用半乳糖氧化酶 (GAO) 将半乳糖 (Gal)/*N*-乙酰氨基半乳糖 (GalNAc) C6 位点的羟基转化为醛基, 并通过酰肼化学法进行富集, 随后在 $H_2^{18}O$ 环境中使用肽 *N*-糖苷酶 F (peptide *N*-glycosidase F, PNGase F) 酶解糖链, 以分析 *N*-糖基化位点, 并将该策略应用于活细胞表面的糖蛋白研究中。Figeys 等^[28]利用多种糖苷内切酶 (Endo-H/-S/-F3) 水解高甘露糖-混合型/双天线型/三-二天线型聚糖, 并分别通过轻重同位素二甲基标记使被 3 种内切酶作用的肽段得以区分, 随后利用突变型 β 1,4-半乳糖转移酶 (GalT-1 Y289L) 将叠氮化 *N*-乙酰半乳糖胺 (GalNAz) 转移到酶切后的 *N*-GlcNAc 上, 再通过 click 反应与生物素-链霉亲和素体系链接, 实现糖肽的选择性富集与质谱分析。该研究首次系统整合了酶法切割、代谢标记与化学点击反应技术, 但仍存在对双天线糖链重复识别等局限。

核心岩藻糖基化 (core fucosylation) 是由岩藻糖转移酶 8 (FUT8) 催化的特异性 *N*-糖基化修饰形式, 其特征是岩藻糖通过 α -1,6 键连接 *N*-糖链最内层的 *N*-乙酰-*D*-葡萄糖胺 (GlcNAc) 残基^[29]。这种修饰在细胞信号传导、细胞黏附、长时程增强、抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 和肿瘤发生等生理过程中发挥重要作用, 是人类多种疾病的生物标志物^[30]。Huang 等^[31]利用野生型 Endo-F3/Endo-M 分别切割核心/非核心岩藻糖化复杂 *N*-聚糖, 随后利用 Endo-F3 的 D165A 突变体, 将合成的叠氮标记唾液酸复合型 *N*-聚糖恶唑啉底物组装到 $Fuc\alpha 1,6GlcNAc/non$ -fucosylated GlcNAc 上, 再利用 click 反应进行成像等研究, 实现了活细胞表面糖型的均一化编辑。在此基础上, Wen 等^[32]直接合成了带有生物素 (biotin) 的一步探针。对于酶解后的多肽, 先利用野生型 Endo-F3 切除核心岩藻糖化的复杂 *N*-聚糖, 再使用糖苷合成酶 M-Endo-F3 将带有生物素的一步探针标记到 $Fuc\alpha 1,6GlcNAc$ 上, 实现了一步富集; 同时, 在 LC-MS/MS 检测前使用野生型 Endo-F3 原位切除探针, 仅释放 $Fuc\alpha 1,6GlcNAc$ 二糖肽, 减少

了传统链霉亲和素 beads 非特异性吸附导致的糖基化肽段质谱鉴定偏差。但对于细胞裂解液的标记, 由于恶唑啉探针的非特异性标记较强, 且生物素化探针与糖肽的极性相似, 难以分离, 因此, Wen 团队和 Zhou 团队^[33]将富集试剂换为温度敏感的聚 *N*-异丙基丙烯酰胺 (PNIPAM), 利用其在低于 40 °C 时溶于水, 高于 40 °C 时形成沉淀的特性, 通过 EndoF3 的 D165A 突变体将带有 PNIPAM 基团的 *N*-聚糖探针直接标记至 Endo-F3 切除后的核心岩藻糖基化肽段, 实现了一步法富集, 显著提高了富集效率。此外, Hsieh-Wilson 团队和 Wen 团队^[34]利用秀丽隐杆线虫的半乳糖转移酶 (ceGALT-1) 作为工具酶, 将 N_3 标记的 Gal 特异性转移到核心岩藻糖上, 并进一步通过 click 反应实现对这些蛋白的精准标记。这些化学酶法为核心岩藻糖基化的功能研究提供了工具与思路。

2.2 O-GlcNAc 糖基化分析

蛋白质 *O*-GlcNAc 糖基化修饰 (*O*-GlcNAcylation) 是指将单个 *N*-乙酰葡萄糖胺 (*N*-acetylglucosamine, GlcNAc) 共价连接到丝氨酸 (Serine, Ser, S)、苏氨酸 (Threonine, Thr, T) 以及酪氨酸 (Tyrosine, Tyr, Y) 侧链羟基上的过程^[35]。这一修饰广泛发生在细胞质、细胞核及线粒体内, 并由 1 对拮抗作用的酶来控制其在蛋白质上的“写入”和“擦除”: *O*-GlcNAc 转移酶 (*O*-GlcNAc transferase, OGT) 负责催化该修饰的发生, *O*-GlcNAc 水解酶 (*O*-GlcNAcase, OGA) 则介导修饰的去除。由于 *O*-GlcNAc 修饰对细胞代谢状态高度敏感, 因此被认为是人类细胞和组织中营养通量与应激途径的动态传感器, 广泛参与转录、翻译、信号转导和代谢等多个生物学过程^[36], 其修饰异常与多种疾病密切相关^[37]。然而, *O*-GlcNAc 修饰的低丰度、高动态性以及其在质谱分析中的不稳定性, 使其检测与鉴定面临较大挑战; 此外, *O*-GlcNAc 结构的亲水性较弱, 限制了传统 HILIC 在富集分析中的应用, 因此基于质谱的 *O*-GlcNAc 组学分析需要更具特异性的策略。

Hsieh-Wilson 等^[18]于 2003 年开始利用 GalT-1 Y289L 进行 *O*-GlcNAc 的靶向化学酶法标记, 是目前常见的 *O*-GlcNAc 标记策略。然而, 在糖肽富集过程中通常会引入生物素标签, 其在质谱中的离子化效率较低, 进而影响糖基化位点的准确

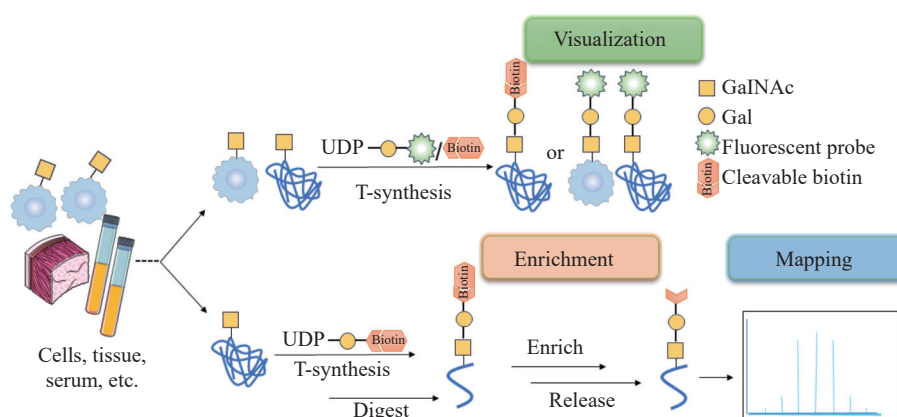
鉴定与定量。针对这一问题, Chen 等和 Yi 等在使用 GalT-1 Y289L 的基础上分别开发了包括酸裂解标记、光裂解标记等多种同位素标签的 *O*-GlcNAc 鉴定方法, 排除了生物素的影响与干扰, 提高了质谱富集鉴定效率^[38-41]。Wu 等^[42]结合酶促反应和酰肼化学法, 利用来自牛奶的半乳糖基转移酶(GalT)将 UDP 半乳糖(UDP-Gal)链接到带有 *O*-GlcNAc 位点的糖肽上, 再使用半乳糖氧化酶(GAO)将半乳糖的 C6 羟基氧化为醛基, 实现后续的化学标记与富集, 但此方法无法区分 *O*-GlcNAc 和 TF 抗原。为提高标记效率并简化标记流程, Wen 等^[43]将糖基转移酶 GalT 的 K279A 进行突变, 为糖供体底物的 C-2 位创造了更大的容纳空间, 从而使带有生物素基团的一步法探针得以有效利用, 实现了更高效的 *O*-GlcNAc 标记与富集。Qin 等^[44]使用突变体 Endo-M N175Q 将 *N*-聚糖恶唑啉标记在 *O*-GlcNAc 聚糖上, 使位点糖链得以延长, 然后利用 HILIC 法富集、WT Endo-M/S 切除延长的糖链, 显著提升了富集效率。

2.3 截短型 *O*-GalNAc 糖基化分析

蛋白质 *O*-GalNAc 糖基化(*O*-GalNAcylation) 也被称为黏蛋白型(Mucin-type)*O*-糖基化, 是哺乳动物中最常见的 *O*-糖基化形式。该修饰广泛存在于分泌蛋白和跨膜蛋白中, 通常修饰在富含丝氨酸/苏氨酸的重复肽序列上, 被 20 多种 GalNAc 转移酶(GalNAc-transferases, GalNAc-Ts) 催化^[45]。*O*-GalNAc 糖链可被多种糖基转移酶延长, 形成具有复杂结构的长链 *O*-GalNAc 聚糖, 其中部分结构决定血型抗原等生理特征。相反, 截短的 *O*-GalNAc 糖链(如 Tn、STn 和 T 抗原)常作为肿瘤发生与转移的相关标志物, 被视为典型的肿瘤相关抗原^[46]。

目前, 凝集素亲和纯化是分析 *O*-GalNAc 糖基化的常用方法, 但存在特异性不足、亲和力较弱以及识别范围有限等局限^[47-48]。相比之下, 化学酶法能够对 *O*-GalNAc 糖基化结构进行选择性的标记与富集, 显著提升检测的选择性与灵敏度。Yi 等^[49]利用细菌岩藻糖基转移酶 WbwK 和 *N*-乙酰半乳糖胺转移酶 BgtA 开发了一种串联酶法, 依靠 WbwK 对 T 抗原二糖结构的严格底物特异性, 首先将 T 抗原二糖转化为 Fucal,2-Galβ1,3-GalNAc-α 三糖结构, 随后利用 BgtA 对 Fucal,

2-Galβ 结构的强烈底物偏好性, 将叠氮化的 GalNAc 连接到该结构, 实现了 T 抗原的标记、成像与富集。Wang 等^[50]利用 ST6GalNAc-IV 对唾液酸化 T 抗原的受体特异性, 将生物素化 CMP-Neu5Ac 探针分子连接到唾液酸化 T 抗原, 实现了对唾液酸化 T 抗原的可视化、定量和富集分析。Zhang 等^[51]引入一种新的化学酶法(EXoO)提取 *O*-连接糖肽, 酶解肽段通过还原胺化与固相材料偶联后, 利用 *O*-聚糖依赖性内切蛋白酶(OpeRATOR)选择性释放 *O*-连接糖肽, 实现对 *O*-糖基化位点及其糖链特异性的精准鉴定。随后, 该团队^[52]在固相结合前引入胍基化和 HILIC 富集, 并在使用 OpeRATOR 处理前加入唾液酸酶混合物(SialEXO)去除唾液酸, 以提高 OpeRATOR 识别切割位点的效率。该团队^[53]的另一项研究则聚焦于 Tn 糖基化肽的富集, 首先利用长柔毛野豌豆外源凝集素(vicia villosa agglutinin, VVA)富集 *O*-糖肽, 并通过肽 N 端的氨基与醛基化固相载体偶联捕获, 随后采用糖基转移酶 C1GalT1 将同位素标记的半乳糖连接到 Tn 抗原, 再通过 OpeRATOR 特异性切割 *O*-糖肽进行释放, 该策略通过轻/重标同位素标记区分原始 T 抗原和 Tn 抗原。Ye 等^[54]采用 PNGase F 对胰酶处理后的多肽进行处理, 以去除 *N*-聚糖, 并通过 HILIC 富集 *O*-糖肽, 再经 OpeRATOR/Glu-C 联用截短 *O*-糖肽, 随后结合 LC-MS/MS 与阶段碰撞诱导解离(steped collision energy higher-energy collisional dissociation, sceHCD)碎裂模式及 MS-decipher 软件的 O-search 算法, 实现了大规模 *O*-糖肽的精准鉴定。Yang 等^[55]开发了 Tn 抗原及复杂 *O*-糖基化鉴定方法(MOTAI), 将酶解后的肽段先通过还原胺化偶联到固相载体, 经 PNGase F 去除 *N*-聚糖, 随后使用 OpeRATOR 切除复杂 *O*-糖肽, 再用另一种识别其他类型 *O*-聚糖的内切蛋白酶 IMPa 切掉 Tn 和 sTn, 从而实现对多种 *O*-糖肽的鉴定。本课题组^[56]发展了酶法标记策略, 使用人源糖基转移酶 T-synthase 作为工具酶, 利用其对供体底物(UDP-Gal)识别的宽松特性, 设计了多功能探针 UDP-Gal-Cy3 和 UDP-Gal-S-S-biotin, 通过一步酶法靶向标记肿瘤相关的 Tn 抗原, 实现了对 Tn 抗原的高选择性和高灵敏度荧光成像、富集和位点特异性质谱鉴定等多功能检测, 示于图 2。

图2 Tn 抗原的一步酶法标记策略^[56]Fig. 2 One-step enzymatic strategy for imaging and mapping of Tn antigen^[56]

2.4 多种糖基化类型同时分析及其他糖基化类型分析

研究者还开发出可针对多种糖基化类型进行同步、全面表征的策略。Wang 等提出一种两步化学酶法,利用来自空肠弯曲杆菌的 β -(1,4)-*N*-乙酰半乳糖胺转移酶(CgtA)将底物 UDP-GalNAz 同时偶联在 *N*-糖基化和 *O*-糖基化末端的 Neu5Ac α 2,3-Gal 上,随后通过点击化学反应和生物素-链霉亲和素作用实现富集,再利用 LC-MS 进行检测^[57],该策略被应用于标记革兰氏阳性和阴性病原体^[58]。Wen 等^[59]使用 2 种突变内切糖苷酶 EndoF3-D165A 和 EndoCC-N180H 分别识别 *N*-聚糖的核心岩藻糖化与 *O*-GlcNAc 修饰,将带有温敏 PNIPAM 基团的 *N*-聚糖探针标记到相应位点,并通过温敏材料沉淀进行富集,实现了 2 种糖型的同步富集与质谱检测。在此基础上,该团队^[60]于 2025 年开发了以多种唾液酸转移酶为工具酶的富集平台,首先使用唾液酸酶对原有糖肽的末端唾液酸进行切除,随后用重组表达的 2 种唾液酸转移酶 PS2, 6ST 和 ST6GalNAc1 将带有 PNIPAM 基团和光裂解标签的探针标记到目标位点,通过温度诱导的相变富集及紫外光(UV)照射裂解释放,实现了多类型糖肽的高效分离与鉴定,为多维糖蛋白质组学研究提供了新思路。

此外,非典型蛋白质糖基化的标记研究取得了进展。Chen 等和 Shao 等在军团菌中筛选出 2 种 *O*-葡萄糖转移酶 SetA 和 Ltpm,可将叠氮化葡萄糖标记于潜在 *O*-糖基化位点上,并使用生物素富集方法结合酸裂解标签开展糖蛋白质组

学分析,通过对其位点分布与底物偏好性进行系统性研究,扩展了糖基化研究的方向^[61-62]。

综上,化学酶法富集策略在糖蛋白质组学研究中展现出显著优势,具有结构特异性、操作灵活性及标记高效性的优势,为高通量和定量解析复杂糖基化网络提供了有力工具。用于糖蛋白质组学分析的代表性化学酶法标记策略列于表 1。

3 质谱技术在化学酶法标记糖蛋白质组分析中的应用

质谱技术的持续革新极大地推动了糖蛋白质组学在糖链结构解析与糖肽位点分析中的应用,从碎裂模式的优化到数据处理算法的升级,助力化学酶法辅助的糖蛋白质组学研究获得更高的分辨率与准确度。串联质谱(tandem MS, MS/MS)通过碎裂糖肽来解析其肽序列和糖基化信息。不同的碎裂模式会产生不同类型的碎片离子,这对糖肽结构解析十分关键^[63]。目前,糖蛋白质组中常用的碎裂模式包括碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID)、高能碰撞解离(higher-energy collisional dissociation, HCD)、电子转移解离(electron transfer dissociation, ETD)等。

CID 通常应用于离子阱中,其存在显著的检测局限,即当产生的碎片离子质荷比(m/z)低于母离子的 1/3 时,无法被有效输送到质量分析器中进行检测^[64]。因此, CID 模式下易丢失低 m/z 碎片离子(如氧鎓离子),且由于糖苷键会优先于肽键断裂,糖肽在该模式下往往产生糖链片段。

表1 用于糖蛋白质组学分析的代表性化学酶法标记策略

Table 1 Representative chemoenzymatic labeling methods for glycoproteomics

糖受体 Glycan receptor	生物酶工具 Enzymatic tool	化学标记/探针策略 Chemoenzymatic labeling strategy and probe design	富集手段 Enrichment method	分析层面 Analytical level	糖基化类型 Glycosylation type	参考文献 Reference
末端半乳糖	ST6Gal1	一步酶法/生物素	生物素-链霉亲和素	蛋白质	N-糖基化	[25]
半乳糖/N-乙酰氨基半乳糖	GAO & PNGase F	氧化末端Gal/GalNAc	酰肼固相富集	糖基化位点		[27]
高甘露糖-混合型/双天线型/三-二天线型聚糖 & N-GlcNAc	Endo-H/-S/-F3 & GalT-1 Y289L	Click反应/光解生物素	生物素-链霉亲和素	糖基化位点		[28]
核心岩藻糖基化N-聚糖	Endo-F3/Endo-M & Endo-F3 D165A /Endo-M	一步酶法/PNIPAM热敏糖探针	热敏PNIPAM	糖基化位点		[33]
核心岩藻糖	C.e. GALT-1	Click反应/生物素	生物素-链霉亲和素	蛋白质		[34]
O-GlcNAc	GalT & GAO	一步酶法/氧化末端Gal	酰肼固相富集	糖基化位点	O-糖基化	[42]
O-GlcNAc	GalT K279A	一步酶法/生物素	生物素-链霉亲和素	蛋白质		[43]
O-GlcNAc	Endo-M的N175Q突变体 & PNGase F	一步酶法/长链聚糖	HILIC富集	糖基化位点		[44]
O-GlcNAc	GalT-1 Y289L	Click反应/光/酸解生物素	生物素-链霉亲和素	糖基化位点		[38-41]
T抗原	WbwK & BgtA	串联酶法/Click反应	生物素-链霉亲和素	蛋白质		[49]
T抗原	ST6GalNAc-IV	一步酶法/生物素	生物素-链霉亲和素	蛋白质		[50]
T抗原-Tn抗原	OpeRATOR & C1GalT1	一步酶法-OpeRATOR酶切	还原氨化捕集-酶切释放	糖基化位点		[53]
多种O-聚糖	PNGase F & OpeRATOR/Glu-C	HILIC富集-OpeRATOR/Glu-C酶切	HILIC富集	糖基化位点		[54]
Tn & sTn抗原	OpeRATOR & IMPa	OpeRATOR切除复杂O-糖肽-IMPa酶切Tn & sTn糖肽	还原氨化捕集-酶切释放	糖基化位点		[55]
Tn抗原	C1GalT1	一步酶法/还原裂解生物素	生物素-链霉亲和素	糖基化位点		[56]
唾液酸 α 2,3半乳糖	CgtA	Click反应/生物素	生物素-链霉亲和素	蛋白质	其他	[57]
N-聚糖的核心岩藻糖化与O-GlcNAc	EndoF3 D165A & EndoCC N180H	一步酶法/PNIPAM热敏糖探针	热敏PNIPAM	糖基化位点		[59]
末端唾液酸	PS2, 6ST & ST6GalNAc1	一步酶法/PNIPAM热敏糖探针	热敏PNIPAM	糖基化位点		[60]
O-葡萄糖基化位点	SetA	Click反应/酸解生物素	生物素-链霉亲和素	糖基化位点		[61]
O-葡萄糖基化位点	Ltpm	Click反应/酸解生物素	生物素-链霉亲和素	糖基化位点		[62]

HCD突破了此限制,其母离子与碎片离子的检测并非同时进行,且工作能量更高,在该模式下,糖肽同时发生糖苷键断裂和肽主链断裂。糖苷键断裂可产生具有诊断意义的糖氧鎓离子以及来源于糖链的片段离子(B/Y型离子);而肽主链断裂则生成b/y型离子,用于提供肽段序列信息。在部分情况下,肽段碎片离子可能保留部分糖链残基,有助于糖基化位点的解析^[65]。但该

技术存在糖链断裂优先于肽骨架,易产生复杂的MS/MS谱峰,影响数据质量并干扰下游数据解析的缺陷。

ETD主要产生c/z型肽段离子,且保留完整糖链,适用于糖基化位点的精准定位。但该方法存在碎裂不完全、数据采集时间长的缺陷,导致大量母离子残留,且糖链大小及其在肽段上的连接方式均会影响碎裂效果。

由于单一碎裂模式难以兼顾所有糖肽的特性,复合碎裂方法应运而生,电子转移/高能碰撞解离(electron-transfer/higher energy collision dissociation, EThcD)^[66]便是典型代表。传统 EThcD 技术在糖基化分析中存在占空比过高的问题,可能会遗漏重要成分。2022年, Li 等^[67]提出了基于修饰特异性片段离子肽触发的 EThcD 分析策略(HCD pd EThcD), 该技术的优势是减少非必要碎裂,对未检测到氧鎓离子样品不进行“串联碎裂-谱图产生-数据匹配”这一流程,从而显著提高了检测效率与准确度。

除碎裂模式的进步外,基于质谱的糖肽分析技术和数据注释软件也在不断迭代,以适应快速、准确、完整的糖肽分析。近年来,商品化软件 Byonic 通过计算糖肽谱图与理论谱图之间的匹配度对糖基化多肽进行综合打分,有助于提高鉴定准确性和位点定位精度^[68]。Nesvizhskii 团队^[69]开发的 MSFragger 中引入了专门的 glyco search 模块(Glyco-FragPipe),实现了对完整糖肽的快速、系统化鉴定。Zeng 等^[70]和 Cao 等^[71]开发的 pGlyco3 软件能够实现在位点特异性水平上快速、准确鉴定完整糖肽和修饰糖单元,并通过内置的 pGlycoQuant 模块实现对位点特异性糖基化的定量分析。此外,他们还开发了 pGlycoNovo 软件,实现了对稀有聚糖结构的完整糖肽的从头识别^[72]。Sun 等^[73]开发了模块化策略 StrucGP,可通过串联质谱解释完整糖肽上 *N*-聚糖结构,为 *N*-糖蛋白质组学的自动化大规模分析提供支撑。Ye 等^[74]开发的 MS-Decipher 软件通过加入 O-Search-Pattern 检索,为 *O*-糖基化研究提供了高效辅助。

总体而言,质谱碎裂机制与算法的持续优化,显著提升了糖链结构解析与糖肽鉴定的准确性,为基于化学酶法的靶向糖蛋白质组学研究奠定了坚实的技术基础。

4 总结与展望

本文系统梳理了化学酶法标记策略在基于质谱的糖蛋白质组学研究中的应用进展。化学酶法标记策略利用酶对供体糖探针的识别宽容性以及糖基受体的严格底物特异性,高选择性地标记目标聚糖。鉴于糖基化蛋白质在复杂生物样品中含量低的特点,该策略通过特异性标记

与富集显著提升了靶向糖肽分析的灵敏度与准确性。随着化学生物学技术的发展,定向进化和高通量筛选平台将在未来酶标分析的工具酶开发方面发挥关键作用^[17];同时,新型糖基化富集材料的不断创新将进一步简化质谱分析前的化学酶法富集流程^[75],而对于生物正交反应在糖基化分子中反应的进一步探索,也有助于提高糖基化多肽的富集效率。

未来的糖蛋白质组学研究需结合多维度分析技术以实现更全面、更精准的解析。例如,冷冻电子显微镜(cryo electron microscopy, Cryo-EM)可以提供蛋白-糖复合物的空间结构信息^[76];基于机器学习(machine learning, ML)的计算生物学方法可用于构建更加系统化的糖基化研究数据库^[77]。未来的糖基化研究有望向着质谱等多种技术与计算建模深度融合的方向发展,形成更完整的多维度研究体系,为深入揭示糖基化的生物学功能及其在疾病发生发展中的作用提供更加有力的技术支撑与理论基础。

参考文献:

- [1] SCHJOLDAGER K T, NARIMATSU Y, JOSHI H J, CLAUSEN H. Global view of human protein glycosylation pathways and functions[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020, 21(12): 729-749.
- [2] OHTSUBO K, MARTH J D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease[J]. *Cell*, 2006, 126(5): 855-867.
- [3] PINHO S S, REIS C A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2015, 15(9): 540-555.
- [4] HE M, ZHOU X, WANG X. Glycosylation: mechanisms, biological functions and clinical implications[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, 9: 194.
- [5] LU H, ZHANG Y, YANG P. Advancements in mass spectrometry-based glycoproteomics and glycomics[J]. *National Science Review*, 2016, 3(3): 345-364.
- [6] BAGDONAITIS I, MALAKER S A, POLASKY D A, RILEY N M, SCHJOLDAGER K, VAKHRUSHEV S Y, HALIM A, AOKI-KINOSHITA K F, NESVIZHSHKII A I, BERTOZZI C R, WANDALL H H, PARKER B L, THAYSEN-ANDERSEN M, SCOTT N E. Glycoproteomics[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2022, 2: 48.
- [7] THAYSEN-ANDERSEN M, PACKER N H, SCHULZ B L. Maturing glycoproteomics technologies provide

- unique structural insights into the *N*-glycoproteome and its regulation in health and disease[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2016, 15(6): 1 773-1 790.
- [8] ČAVAL T, HECK A J R, REIDING K R. Meta-heterogeneity: evaluating and describing the diversity in glycosylation between sites on the same glycoprotein[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2021, 20: 100 010.
- [9] SHENTAL-BECHOR D, LEVY Y. Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(24): 8 256-8 261.
- [10] JEFFERIS R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2009, 8(3): 226-234.
- [11] BAS M, TERRIER A, JACQUE E, DEHENNE A, POCHET-BÉGHIN V, BEGHIN C, DEZETTER A S, DUPONT G, ENGRAND A, BEAUFILS B, MONDON P, FOURNIER N, de ROMEUF C, JORIEUX S, FONTAYNE A, MARS L T, MONNET C. Fc sialylation prolongs serum half-life of therapeutic antibodies[J]. *Journal of Immunology*, 2019, 202(5): 1 582-1 594.
- [12] MYSLING S, PALMISANO G, HØJRUP P, THAYSEN-ANDERSEN M. Utilizing ion-pairing hydrophilic interaction chromatography solid phase extraction for efficient glycopeptide enrichment in glycoproteomics[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(13): 5 598-5 609.
- [13] PENG Y, WANG L, ZHANG Y, BAO H, LU H. Stable isotope sequential derivatization for linkage-specific analysis of sialylated *N*-glycan isomers by MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(24): 15 993-16 001.
- [14] ZHANG Y, ZHANG C, JIANG H, YANG P, LU H. Fishing the PTM proteome with chemical approaches using functional solid phases[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(22): 8 260-8 287.
- [15] LIU Q, LU X, DENG Y, ZHANG H, WEI R, LI H, FENG Y, WEI J, MA F, ZHANG Y, ZOU X. Global characterization of mouse testis *O*-glycoproteome landscape during spermatogenesis[J]. *Nature Communications*, 2025, 16: 2 676.
- [16] TOMMASONE S, ALLABUSH F, TAGGER Y K, NORMAN J, KÖPF M, TUCKER J H R, MENDES P M. The challenges of glycan recognition with natural and artificial receptors[J]. *Chemical Society Reviews*, 2019, 48(22): 5 488-5 505.
- [17] TIAN Y, MA S, WEN L. Towards chemoenzymatic labeling strategies for profiling protein glycosylation[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2024, 80: 102 460.
- [18] KHIDEKEL N, ARNDT S, LAMARRE-VINCENT N, LIPPERT A, POULIN-KERSTIEN K G, RAMAKRISHNAN B, QASBA P K, HSIEH-WILSON L C. A chemoenzymatic approach toward the rapid and sensitive detection of *O*-GlcNAc posttranslational modifications[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(52): 16 162-16 163.
- [19] KHIDEKEL N, FICARRO S B, PETERS E C, HSIEH-WILSON L C. Exploring the *O*-GlcNAc proteome: direct identification of *O*-GlcNAc-modified proteins from the brain[J]. *PNAS*, 2004, 101(36): 13 132-13 137.
- [20] CLARK P M, DWECK J F, MASON D E, HART C R, BUCK S B, PETERS E C, AGNEW B J, HSIEH-WILSON L C. Direct in-gel fluorescence detection and cellular imaging of *O*-GlcNAc-modified proteins[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(35): 11 576-11 577.
- [21] LAUGHLIN S T, BERTOZZI C R. Metabolic labeling of glycans with azido sugars and subsequent glycan-profiling and visualization *via* Staudinger ligation[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(11): 2 930-2 944.
- [22] HELENIUS A, AEBI M. Roles of *N*-linked glycans in the endoplasmic reticulum[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2004, 73: 1 019-1 049.
- [23] KAUFMAN B, ABU-AHMAD M, RADINSKY O, GHARRA E, MANKO T, BHATTACHARYA B, GOLOGAN D, ERLICHMAN N, MESHEL T, NUTA Y, COOKS T, ELKABETS M, BEN-BARUCH A, POR-GADOR A. *N*-Glycosylation of PD-L1 modulates the efficacy of immune checkpoint blockades targeting PD-L1 and PD-1[J]. *Molecular Cancer*, 2025, 24(1): 140.
- [24] LIN Y, LUBMAN D M. The role of *N*-glycosylation in cancer[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2024, 14(3): 1 098-1 110.
- [25] SUN T, YU S H, ZHAO P, MENG L, MOREMEN K W, WELLS L, STEET R, BOONS G J. One-step selective exoenzymatic labeling (SEEL) strategy for the biotinylation and identification of glycoproteins of living cells[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(36): 11 575-11 582.
- [26] MBUA N E, LI X, FLANAGAN-STEET H R, MENG L, AOKI K, MOREMEN K W, WOLFERT M A, STEET R, BOONS G J. Selective exo-enzymatic labeling of *N*-glycans on the surface of living cells by recombinant ST6Gal I[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2013, 52(49): 13 012-13 015.

- [27] SUN F, SUTTAPITUGSAKUL S, WU R. Enzymatic tagging of glycoproteins on the cell surface for their global and site-specific analysis with mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(6): 4 195-4 203.
- [28] LI H, LI L, CHENG K, NING Z, MAYNE J, ZHANG X, WALKER K, CHEN R, TWINE S, LI J, FIGEYS D. Chemoenzymatic method for glycoproteomic *N*-glycan type quantitation[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(1): 1 618-1 627.
- [29] CALDERON A D, LIU Y, LI X, WANG X, CHEN X, LI L, WANG P. Substrate specificity of FUT8 and chemoenzymatic synthesis of core-fucosylated asymmetric *N*-glycans[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2016, 14(17): 4 027-4 031.
- [30] WANG X, GU J, IHARA H, MIYOSHI E, HONKE K, TANIGUCHI N. Core fucosylation regulates epidermal growth factor receptor-mediated intracellular signaling[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(5): 2 572-2 577.
- [31] TANG F, ZHOU M, QIN K, SHI W, YASHINOV A, YANG Y, YANG L, GUAN D, ZHAO L, TANG Y, CHANG Y, ZHAO L, YANG H, ZHOU H, HUANG R, HUANG W. Selective *N*-glycan editing on living cell surfaces to probe glycoconjugate function[J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(7): 766-775.
- [32] TIAN Y, WANG Y, YIN H, LUO Y, WEI F, ZHOU H, WEN L. A sensitive and reversible labeling strategy enables global mapping of the core-fucosylated glycoproteome on cell surfaces[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2022, 61(49): e202206802.
- [33] WANG Y, YUAN R, LIANG B, ZHANG J, WEN Q, CHEN H, TIAN Y, WEN L, ZHOU H. A “one-step” strategy for the global characterization of core-fucosylated glycoproteome[J]. *JACS Au*, 2024, 4(5): 2 005-2 018.
- [34] ZHU Q, CHAUBARD J L, GENG D, SHEN J, BAN L, CHEUNG S T, WEI F, LIU Y, SUN H, CALDERON A, DONG W, QIN W, LI T, WEN L, WANG P G, SUN S, YI W, HSIEH-WILSON L C. Chemoenzymatic labeling, detection and profiling of core fucosylation in live cells[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2024, 146(38): 26 408-26 415.
- [35] YANG X, QIAN K. Protein *O*-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 18(7): 452-465.
- [36] HART G W, HOUSLEY M P, SLAWSON C. Cycling of *O*-linked beta-*N*-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins[J]. *Nature*, 2007, 446(7 139): 1 017-1 022.
- [37] HART G W, SLAWSON C, RAMIREZ-CORREA G, LAGERLOF O. Cross talk between *O*-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2011, 80: 825-858.
- [38] QIN K, ZHU Y, QIN W, GAO J, SHAO X, WANG Y, ZHOU W, WANG C, CHEN X. Quantitative profiling of protein *O*-GlcNAcylation sites by an isotope-tagged cleavable linker[J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(8): 1 983-1 989.
- [39] LI J, LI Z, DUAN X, QIN K, DANG L, SUN S, CAI L, HSIEH-WILSON L C, WU L, YI W. An isotope-coded photocleavable probe for quantitative profiling of protein *O*-GlcNAcylation[J]. *ACS Chemical Biology*, 2019, 14(1): 4-10.
- [40] LIU J, HAO Y, HE Y, LI X, SUN D E, ZHANG Y, YANG P Y, CHEN X. Quantitative and site-specific chemoproteomic profiling of protein *O*-GlcNAcylation in the cell cycle[J]. *ACS Chemical Biology*, 2021, 16(10): 1 917-1 923.
- [41] LIU J, HAO Y, WANG C, JIN Y, YANG Y, GU J, CHEN X. An optimized isotopic photocleavable tagging strategy for site-specific and quantitative profiling of protein *O*-GlcNAcylation in colorectal cancer metastasis[J]. *ACS Chemical Biology*, 2022, 17(3): 513-520.
- [42] XU S, SUN F, WU R. A chemoenzymatic method based on easily accessible enzymes for profiling protein *O*-GlcNAcylation[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(14): 9 807-9 814.
- [43] TIAN Y, ZHU Q, SUN Z, GENG D, LIN B, SU X, HE J, GUO M, XU H, ZHAO Y, QIN W, WANG P, WEN L, YI W. One-step enzymatic labeling reveals a critical role of *O*-GlcNAcylation in cell-cycle progression and DNA damage response[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2021, 60(50): 26 128-26 135.
- [44] CHEN Y, TANG F, QIN H, YUE X, NIE Y, HUANG W, YE M. Endo-M mediated chemoenzymatic approach enables reversible glycopeptide labeling for *O*-GlcNAcylation analysis[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2022, 61(23): e202117849.
- [45] SCHUMANN B, MALAKER S A, WISNOVSKY S P, DEBETS M F, AGBAY A J, FERNANDEZ D, WAGNER L J S, LIN L, LI Z, CHOI J, FOX D M, PEH J, GRAY M A, PEDRAM K, KOHLER J J, MRKSICH M, BERTOZZI C R. Bump-and-hole engineering identifies

- specific substrates of glycosyltransferases in living cells[J]. *Molecular Cell*, 2020, 78(5): 824-834. e15.
- [46] KUDELKA M R, JU T, HEIMBURG-MOLINARO J, CUMMINGS R D. Simple sugars to complex disease—mucin-type *O*-glycans in cancer[J]. *Advances in Cancer Research*, 2015, 126: 53-135.
- [47] GOUMENOU A, DELAUNAY N, PICHON V. Recent advances in lectin-based affinity sorbents for protein glycosylation studies[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8: 746 822.
- [48] XIE Y, SHENG Y, LI Q, JU S, REYES J, LEBRILLA C B. Determination of the glycoprotein specificity of lectins on cell membranes through oxidative proteomics [J]. *Chemical Science*, 2020, 11(35): 9 501-9 512.
- [49] LI Q, LI Z, DUAN X, YI W. A tandem enzymatic approach for detecting and imaging tumor-associated Thomsen-Friedenreich antigen disaccharide[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(36): 12 536-12 539.
- [50] WEN L, LIU D, ZHENG Y, HUANG K, CAO X, SONG J, WANG P. A one-step chemoenzymatic labeling strategy for probing sialylated thomsen-friedenreich antigen[J]. *ACS Central Science*, 2018, 4(4): 451-457.
- [51] YANG W, AO M, HU Y, LI Q, ZHANG H. Mapping the *O*-glycoproteome using site-specific extraction of *O*-linked glycopeptides (EXoO)[J]. *Molecular Systems Biology*, 2018, 14(11): MSB188486.
- [52] YANG W, AO M, SONG A, XU Y, SOKOLL L, ZHANG H. Mass spectrometric mapping of glycoproteins modified by Tn-antigen using solid-phase capture and enzymatic release[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(13): 9 230-9 238.
- [53] YANG W, SONG A, AO M, XU Y, ZHANG H. Large-scale site-specific mapping of the *O*-GalNAc glycoproteome[J]. *Nature Protocols*, 2020, 15(8): 2 589-2 610.
- [54] LIU L, ZHU H, LIU L, YOU X, MAO J, WANG Y, LIU X, QIN H, DONG M, YE M. *O*-Glycopeptide truncation strategy for heterogeneous *O*-GalNAc glycoproteomics characterization[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(26): 10 017-10 024.
- [55] YUE S, WANG X, WANG L, LI J, ZHOU Y, CHEN Y, ZHOU Z, YANG X, SHI X, GAO S, WEN Z, ZHU X, WANG Y, YANG S. MOTAI: a novel method for the study of *O*-GalNAcylation and complex *O*-glycosylation in cancer[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96(28): 11 137-11 145.
- [56] LI Z, DU Q, FENG X, SONG X, REN Z, LU H. A versatile one-step enzymatic strategy for efficient imaging and mapping of tumor-associated tn antigen[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2024, 146(30): 20 539-20 543.
- [57] WEN L, ZHENG Y, JIANG K, ZHANG M, KONDEN-GADEN S M, LI S, HUANG K, LI J, SONG J, WANG P G. Two-step chemoenzymatic detection of *N*-acetylneuraminic acid- α (2-3)-galactose glycans[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(36): 11 473-11 476.
- [58] WU Q, YE J, CHAO Y, DONG S, NIU M, WANG Y, LIU Z, CHEN W, GE N, LU S, WANG P, CHEN M. Chemoenzymatic labeling pathogens containing terminal *N*-acetylneuraminic acid- α (2-3)-galactose glycans[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2022, 8(3): 657-664.
- [59] LUO Y, WANG Y, TIAN Y, ZHOU H, WEN L. “Two Birds One Stone” strategy for the site-specific analysis of core fucosylation and *O*-GlcNAcylation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(29): 15 879-15 887.
- [60] TIAN Y, WANG Y, ZHANG Y, GUO J, ZHANG P, LI X, ZHOU H, WEN L. One-step labeling strategy for the profiling of multiple types of protein glycosylation[J]. *Analytical Chemistry*, 2025, 97(14): 7 833-7 841.
- [61] GAO L, SONG Q, LIANG H, ZHU Y, WEI T, DONG N, XIAO J, SHAO F, LAI L, CHEN X. Legionella effector SetA as a general *O*-glucosyltransferase for eukaryotic proteins[J]. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(3): 213-216.
- [62] LI W, GAO L, CUI S, WEI T, SUN J, ZHOU X, LIANG S, PAN X, PAN X, GAO C, WANG Y, CHANG J, WANG C, LV P, XIAO J, DAI P, CHEN X. Protein β -*O*-glucosylation by Legionella LtpM through short consensus sequons G-T/S and S-G[J]. *Nature Chemical Biology*, 2025, 21(11): 1 806-1 817.
- [63] REIDING K R, BONDT A, FRANC V, HECK A J R. The benefits of hybrid fragmentation methods for glycoproteomics[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 108: 260-268.
- [64] WELLS J M, McLUCKEY S A. Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins[J]. *Methods in Enzymology*, 2005, 402: 148-185.
- [65] CAO L, TOLIĆ N, QU Y, MENG D, ZHAO R, ZHANG Q, MOORE R J, ZINK E M, LIPTON M S, PAŠA-TOLIĆ L, WU S. Characterization of intact *N*- and *O*-linked glycopeptides using higher energy collisional dissociation[J]. *Analytical Biochemistry*, 2014, 452: 96-102.

- [66] WANG L, NWOSU C, GAO Y, ZHU M. Signature ions triggered electron-transfer/higher-energy collisional dissociation (EThcD) for specific and confident glycation site mapping in therapeutic proteins[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2020, 31(3): 473-478.
- [67] LI M, ZHU W, ZHENG H, ZHANG J. Efficient HCD-pd-EThcD approach for *N*-glycan mapping of therapeutic antibodies at intact glycopeptide level[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1189: 339-352.
- [68] BERN M, KIL Y J, BECKER C. Byonic: advanced peptide and protein identification software[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2012, 40(1): 13.20.1-13.20.14.
- [69] POLASKY D A, YU F, TEO G C, NESVIZHSHKII A I. Fast and comprehensive *N*- and *O*-glycoproteomics analysis with MSFragger-glyco[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(11): 1125-1132.
- [70] ZENG W, CAO W, LIU M, HE S, YANG P. Precise, fast and comprehensive analysis of intact glycopeptides and modified glycans with pGlyco3[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(12): 1515-1523.
- [71] KONG S, GONG P, ZENG W, JIANG B, HOU X, ZHANG Y, ZHAO H, LIU M, YAN G, ZHOU X, QIAO X, WU M, YANG P, LIU C, CAO W. pGlycoQuant with a deep residual network for quantitative glycoproteomics at intact glycopeptide level[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 7539.
- [72] ZENG W, YAN G, ZHAO H, LIU C, CAO W. Uncovering missing glycans and unexpected fragments with pGlycoNovo for site-specific glycosylation analysis across species[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 8055.
- [73] SHEN J, JIA L, DANG L, SU Y, ZHANG J, XU Y, ZHU B, CHEN Z, WU J, LAN R, HAO Z, MA C, ZHAO T, GAO N, BAI J, ZHI Y, LI J, ZHANG J, SUN S. StrucGP: *de novo* structural sequencing of site-specific *N*-glycan on glycoproteins using a modularization strategy[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(8): 921-929.
- [74] ZHU H, LIU L, FANG Z, QIN H, DONG M, YE M. O-Search-pattern: a searching tool utilizing the Y-ion pattern to enhance *O*-glycopeptide identification for the analysis of *O*-GalNAc glycoproteome[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(26): 9761-9768.
- [75] XIONG Y, LU Z, SHAO Y, MENG P, WANG G, ZHOU X, YAO J, BAO H, LU H. Rapid and large-scale glycopeptide enrichment strategy based on chemical ligation[J]. *National Science Review*, 2024, 11(11): nwae341.
- [76] WAN L, GE X, XU Q, HUANG G, YANG T, CAMPBELL K P, YAN Z, WU J. Structure and assembly of the dystrophin glycoprotein complex[J]. *Nature*, 2025, 637(8048): 1252-1260.
- [77] REEL P S, REEL S, PEARSON E, TRUCCO E, JEFFERSON E. Using machine learning approaches for multi-omics data analysis: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 49: 107739.

(收稿日期: 2025-11-21; 修回日期: 2025-12-19)