

人尿液蛋白质 N-糖肽富集和 质谱鉴定的新方法研究

黄俊杰^{1,2}, 焦丰龙², 王和平², 朱丽华^{1,3}, 秦伟捷², 钱小红²

(1. 华北理工大学基础医学院, 河北 唐山 063200;

2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 国家蛋白质科学中心(北京), 蛋白质组学国家重点实验室, 北京蛋白质组研究中心, 北京 102206; 3. 河北省慢性疾病重点实验室, 河北 唐山 063000)

摘要:蛋白质的 N-糖基化修饰参与了许多重要的生理过程, 是研究多种重大疾病诊断标志物的热点。与其他体液活检样本相比, 尿液可以无创、大量获取, 并且不受稳态调节的影响, 能够在一定程度上反映整个机体的生理和病理状态。因此, 人尿液蛋白质 N-糖基化的规模化研究对疾病诊断标记物的筛选和治疗靶点的发现均具有重大意义。由于人尿液中的 N-糖蛋白含量有限, 修饰比例较低, 在质谱分析时 N-糖肽易被高丰度的非糖肽所掩盖, 难以鉴定。因此, 发展高效、高选择性的富集材料是实现尿蛋白 N-糖基化深度覆盖的必要前提。本研究利用巯基-烯点击化学反应, 使用[3-(甲基丙烯酰氨基)丙基]二甲甲基(3-硫代丙基)氢氧化铵内盐(SPP)制备了两性离子修饰亲水硅胶材料(SPP-SiO₂)。该材料成功地应用于标准糖蛋白和健康人尿蛋白 N-糖肽的富集和质谱检测, 共鉴定了包含 1 065 个位点的 633 个尿液糖蛋白, 比文献报道的鉴定规模提高了 12.2%, 证明了该亲水材料在尿液糖蛋白质组研究中的应用潜力。

关键词: 巯基-烯点击化学法; 尿蛋白; N-糖肽; 富集; 质谱鉴定

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2018)02-0149-09

doi: 10.7538/zpzb.2017.0009

New Method for Human Urinary N-glycopeptide Enrichment and Identification by Mass Spectrometry

HUANG Jun-jie^{1,2}, JIAO Feng-long², WANG He-ping², ZHU Li-hua^{1,3},
QIN Wei-jie², QIAN Xiao-hong²

(1. School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China;
2. Beijing Institute of Radiation Medicine, National Center for Protein Sciences (Beijing),
State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing 102206, China;
3. Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases, Tangshan 063000, China)

Abstract: Glycosylation plays important role in cell-cell interaction, signal transduction

收稿日期: 2017-01-10; 修回日期: 2017-03-31

基金项目: 国家自然科学基金(21235001, 21275005, 21405175); 国家重点研发计划(2013CB911204, 2016YFA0501403)资助

作者简介: 黄俊杰(1992—), 男(汉族), 浙江人, 硕士研究生, 蛋白质组学专业。E-mail: h3721562@163.com

通信作者: 朱丽华(1972—), 女(汉族), 河北人, 教授, 从事病毒相关肿瘤分子生物学研究。E-mail: zhulihua1972@163.com

秦伟捷(1977—), 男(汉族), 北京人, 研究员, 从事蛋白质组学研究。E-mail: aunp_dna@126.com

网络出版时间: 2018-01-20; 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20180119.1045.002.html>

and cancer immunology, which is currently a hotspot in biomarkers screening for many major human diseases. Though commonly used in biomarker studies, plasma proteome/glycoproteome is under strict homeostatic control, which makes it difficult for biomarker discovery. As the partial filtrate of blood, urine serves not only as an ideal source of biomarker for diseases diagnosis of the urogenital system, but also as a potential source of information on physiological conditions. Therefore, in-depth analysis of human urine glycoproteome is of great significance. However, due to the low abundance of *N*-glycoprotein in human urine, limited modification stoichiometry and microheterogeneity of *N*-glycosylation, it is a highly challenging task for *N*-glycoprotein/glycopeptide identification by mass spectrometry. Therefore, the development of efficient and selective enrichment method is a prerequisite for large-scale identification of urinary protein *N*-glycosylation. In this study, we synthesized a novel zwitterionic stationary phase with high hydrophilicity based on the “thiol-ene” click reaction between [3-(methacryloylamino) propyl] dimethyl (3-thiopropyl) ammonium hydroxide (SPP) and mercapto silica. SPP-silica exhibited great potential in the enrichment of *N*-glycopeptides, while keeping the merit of a facile and time-saving synthesis protocol. To evaluate the practicability of SPP-silica in the selective enrichment of *N*-glycopeptides, a tryptic digest of standard glycoprotein (human IgG) was employed as the testing sample. 36 glycopeptides were captured and identified. SPP-silica showed remarkable selectivity for *N*-linked glycopeptides even in the presence of 10-fold excess tryptic digests of non-glycoprotein (BSA). SPP-silica was successfully applied to the HILIC enrichment and mass spectrometry identification of urinary protein *N*-glycopeptide from healthy adults. The same sample was enriched by three batches of SPP-silica and analyzed by mass spectrometry. 959, 837 and 877 of *N*-glycosylation sites were identified, respectively with >70% selectively. A total of 1 065 *N*-glycosylation sites in 633 urinary glycoproteins was identified, which is 12.2% larger than that reported in the literature. 81.2% and 73.9% of the obtained *N*-glycoproteins and sites were identified in at least two experiments. The above results demonstrate the application potential of this hydrophilic material in urinary glycoproteomics research and biomarker screening.

Key words: thiol-ene click chemistry; urine-protein; *N*-glycopeptide; enrichment; mass spectrometry

N-糖基化修饰作为一种重要的蛋白质翻译后修饰,在细胞粘附、信号转导、细胞凋亡、免疫应答等生物学过程及生理机能的调节中发挥着关键的作用^[1-4]。异常的糖基化修饰与人类多种重大疾病,如肿瘤、炎症以及神经退行性疾病等密切相关^[5]。因此,*N*-糖蛋白作为重要的生物标志物,目前已被广泛应用于疾病的诊断、预警和药效评价^[6]。为了更好地了解这些生物学过程,发现疾病的生物标记物,需要规模化、深入地鉴定生物体内的 *N*-糖蛋白,并且确定糖基化位点。目前,生物质谱技术是分析和鉴定

蛋白质糖基化最重要、最有效的工具。但是,由于 *N*-糖蛋白本身的丰度有限,糖基化修饰比例较低,并具有高度微不均一性,在质谱分析中易受高丰度非糖基化蛋白质、肽段的干扰^[7]。因此,对 *N*-糖肽进行高效、高选择性地富集是实现高灵敏质谱鉴定的必要前提。

目前,常用的 *N*-糖肽富集方法主要有凝集素法^[8-9]、硼酸富集法^[10-13]、酰肼富集法^[14-15]及亲水相互作用色谱法^[16-19]等。凝集素作为一类糖亲和蛋白质,能够识别糖蛋白或者糖肽连接的特定聚糖结构或者末端某些特定单糖,并与

之非共价结合,对不同糖型的专一性较好,但分析成本高,难以实现各类糖型的全面富集。酰肼富集法对糖链不存在歧视效应,以共价结合的方式富集效率高,在高通量的糖基化位点鉴定中得到了广泛的应用,但步骤繁琐、易造成样品损失且破坏糖链结构,不利于完整糖肽的分析。硼酸富集法可以实现对糖蛋白和糖肽的非破坏性富集,但对糖蛋白和糖肽的亲水性较低,且易与非糖蛋白、肽段发生非特异性吸附,容易导致富集效率低、特异性差。亲水相互作用色谱(HILIC)利用糖肽与色谱固定相的亲水、极性等一系列相互作用,可实现糖肽的有效保留、分离和富集,且富集效果不受糖型的影响,具有较好的广谱性,可保持糖链结构完整、操作简单,与质谱兼容性好、易实现在线分析。

人的尿液是研究疾病标记物的理想来源,部分尿液蛋白质来源于血液的肾脏滤过物,因此尿液蛋白质组不仅能够反映泌尿系统的功能状态,还能在一定程度上反映血液和整个机体的状态^[20-21]。

本工作拟利用巯基-烯点击化学法^[22-24]将[3-(甲基丙烯酰氨基)丙基]二甲基(3-硫代丙基)氢氧化铵内盐亲水化合物键合于硅胶填料表面,制备兼具离子功能化修饰的 HILIC 富集材料(SPP-SiO₂)。对所合成的 HILIC 富集材料进行扫描电镜、红外光谱和元素分析表征,并使用人免疫球蛋白 G(IgG)酶解肽段作为标准品,对 HILIC 富集材料的 N-糖肽富集效率和选择性进行评价。为进一步考察所制备 HILIC 填料的富集效果,将该富集材料应用于健康成人尿液蛋白质 N-糖肽的富集和质谱鉴定。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Nicolet 5700 傅里叶红外光谱仪:美国 Thermo 公司产品;TGA Q500 热重分析仪:美国 TA 公司产品;UltrafleXtreme 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS):德国 Bruker 公司产品,用于 IgG 酶解产物 N-糖肽检测时,采用正离子反射模式,加速电压 20 kV,质量扫描范围 m/z 1 000~5 000,并使用 FlexAnalysis 软件(版本 3.3)进行分

析;Orbitrap Fusion Lumos 轨道离子阱质谱仪:美国 Thermo 公司产品;分析柱(120 mm×150 μm×1.9 μm):日本 Dr. Maisch 公司产品,用于复杂生物蛋白酶解产物肽段的检测;预柱(2 cm×100 μm×3 μm):日本 DR. Maisch 公司产品;数据采集模式为正离子模式,电压 2 000 V,一级检测使用 Orbitrap,分辨率 120 000,质量扫描范围 m/z 300~1 400,二级检测使用离子阱,扫描范围模式为 Normal,扫描速率模式为 Rapid;使用 PD2.0 软件进行数据分析。

胰蛋白酶(Trypsin),肽 N-糖苷酶 F(PN-Gase F):英国 New England Biolabs 公司产品;IgG(免疫球蛋白 G)、2,5-二羟基苯甲酸(DHB)、三氟乙酸(TFA)、甲酸(FA)、甲醇、3-巯基丙基三甲基硅烷:美国 Sigma 公司产品;[3-(甲基丙烯酰氨基)丙基]二甲基(3-硫代丙基)氢氧化铵内盐:深圳瑞吉特生物技术有限公司产品;偶氮二异丁腈(AIBN)、甲苯、二氯甲烷、4A 型分子筛:国药集团化学试剂有限公司产品;球形硅胶(粒径 3 μm,孔径 100 Å):日本 Osaka soda 公司产品;去离子水:由 Millipore 纯水系统制备;¹⁸O 水:由上海化工研究院提供;健康人中段晨尿:由志愿者提供。

1.2 实验方法

1.2.1 SPP-SiO₂ 的制备 向粒径 3 μm 的硅胶颗粒中加入 1 mol/L 盐酸(1 g 硅胶颗粒中加入 10 mL 盐酸),超声处理 30 min,浸泡 12 h 后,用去离子水洗涤若干次,直至 pH 为中性。离心去除液体,并将所得的硅胶颗粒置于 80 °C 真空干燥箱,过夜。

称取 5 g 硅胶颗粒于三颈圆底烧瓶中,120 °C 干燥过夜。然后加入 40 mL 无水甲苯,在氮气氛围中搅拌均匀后,加入 3 mL 3-巯基丙基三甲基硅烷,于 110 °C 回流 24 h。反应完毕后,用玻璃砂芯漏斗抽滤,依次用 20 mL 甲苯、二氯甲烷、甲醇、水、甲醇洗涤,于 80 °C 干燥过夜,得到巯基丙基硅胶。

量取 20 mL 甲醇水溶液于 50 mL 三颈圆底烧瓶,依次加入 500 mg [3-(甲基丙烯酰氨基)丙基]二甲基(3-硫代丙基)氢氧化铵内盐(SPP)、500 mg 巯基丙基硅胶以及 4 mg 偶氮二异丁腈,升温至 60 °C,在氮气氛围中回流搅拌过夜。反应完毕后,用玻璃砂芯漏斗抽滤,依

次用 30 mL 水和甲醇洗涤,于 80 °C 干燥过夜,得到 SPP-SiO₂ 亲水填料。

1.2.2 肽段制备 标准蛋白:将 1 mg IgG 进行超滤辅助样品制备法(FASP)酶解。将蛋白转移至 30 kD 超滤管中,以 12 100 r/min 离心 10 min,然后加入 200 μL UA(含 8 mol/L 尿素,0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.5),以 12 100 r/min 离心 10 min,重复 3 次。然后加入 10 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT),于 37 °C 烘箱中变性 4 h;以 12 100 r/min 离心 10 min 除去 DTT,再加入 UA 重复离心清洗 2 次。接着加入 200 μL 50 mmol/L 碘乙酰胺(IAA),室温避光放置 40 min,还原烷基化,然后以 12 100 r/min 离心 10 min 除去 IAA。加入 200 μL 50 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液,并以 12 100 r/min 离心 10 min,重复清洗 5 次后,更换新的套管,加入 200 μL 50 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液和 Trypsin (1 : 50),于 37 °C 培养箱酶切 16 h,收集肽段,干燥待用。

人尿蛋白:将人尿液于 4 °C 以 11 600 r/min 离心 20 min,取 10 mL 上清液于离心管中,并加入 3 倍体积的预冷丙酮,于 -20 °C 放置沉淀 4 h。将沉淀蛋白转移至 EP 管中,加入 UA 溶解,涡旋、超声后,以 12 100 r/min 离心 10 min,取上清液进行 FASP 酶解。

1.2.3 SPP-SiO₂ HILIC 富集 N-糖肽 标准蛋白:取 1 mg 填料,溶于 1 mL binding buffer (88% ACN+0.1% TFA+11.9% H₂O),活化 10 min。取 20 μL 该溶液,分别与 1 μg IgG

肽段、IgG 肽段与 BSA 肽段混合液(1 : 100, W/W)孵育 30 min,离心,弃去上清液,加入 100 μL binding buffer,清洗 3 次。使用洗脱液(30% ACN+0.1% TFA+69.9% H₂O)洗脱 2 次。蒸干收集的洗脱液,复溶后加入 100 U PNGase F 酶,37 °C 水浴 16 h,进行质谱分析。

人尿蛋白:各取 1 mg 3 个批次的填料,分别溶于 60 μL binding buffer (88% ACN+0.1% TFA+11.9% H₂O),各加入 40 μg 人尿蛋白酶解肽段孵育 1 h。用 binding buffer 清洗 3 次,洗脱液(30% ACN+0.1% TFA+69.9% H₂O)洗脱 2 次,蒸干洗脱液,用 25 mmol/L NH₄HCO₃ 的¹⁸O 重水溶液复溶后,加入 100 U PNGase F 酶,进行质谱分析。

2 结果与讨论

2.1 SPP-SiO₂ 的表征

分别采用扫描电镜、傅里叶转换红外光谱分析法以及有机元素分析对合成的 SPP-SiO₂ 亲水材料进行表征。

扫描电镜图示于图 1, SPP 修饰前、后的形貌和分散程度无明显变化。SPP 修饰的硅胶填料形状完整,粒径均匀,未见颗粒交联,保持了良好的分散性。

SPP 修饰前、后的红外谱图示于图 2。图中,463、796、1 090 cm⁻¹ 分别是 Si—O—Si 摇摆振动、对称伸缩振动和反对称伸缩振动对应的吸收峰;950 cm⁻¹ 是 Si—OH 伸缩振动的吸

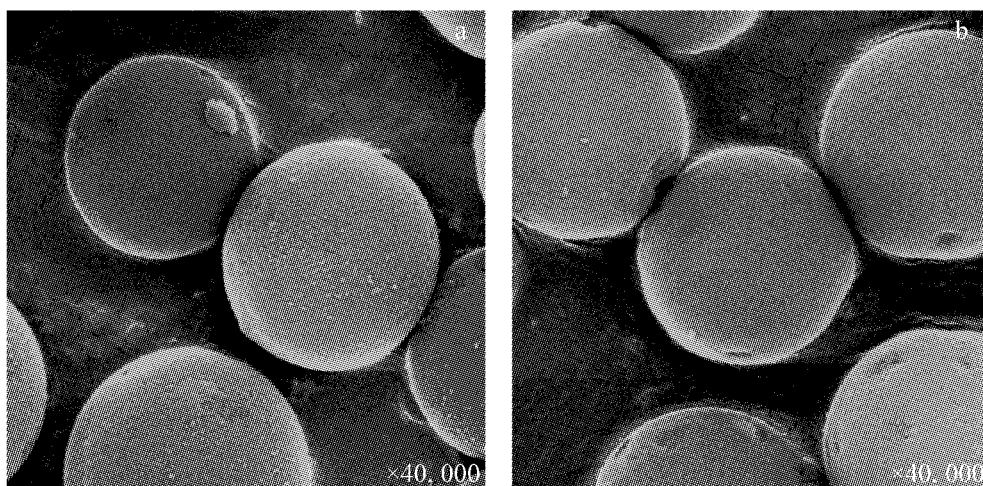


图 1 未经修饰的硅胶颗粒(a)和 SPP-SiO₂ 颗粒(b)的扫描电镜图

Fig. 1 SEM images of bare silica microparticles (a) and SPP-SiO₂ microparticles (b)

收峰; 1 640、3 450 cm^{-1} 分别是 O—H 弯曲振动和伸缩振动的吸收峰。SPP 修饰后, 在 1 550 cm^{-1} 处出现了一个新的特征峰, 是 SPP 中 N—H 弯曲振动, 表明 SPP 两性离子亲水单体成功地键合到硅胶颗粒表面。

元素分析表征结果列于表 1。结果表明, 巯基丙基硅胶(SH-SiO₂)的硫含量为 2.45%, 高于裸硅球的硫含量(0.52%), 说明巯基丙基硅胶制备成功。两性亲水材料 SPP-SiO₂ 的碳含量为 15%, 氮含量为 2.58%, 均明显高于巯基丙基硅胶, 证明了 SPP 亲水单体成功地键合到硅胶表面, 而且基于巯基-烯的键合方法具有较高的修饰效率。

表 1 元素分析结果

Table 1 Results of element analysis

材料 Material	氮含量 N content/%	碳含量 C content/%	氢含量 H content/%	硫含量 S content/%
SiO ₂	0	0	1.179	0.521
SH-SiO ₂	0	3.72	1.423	2.471
SPP-SiO ₂	2.58	15.04	3.293	4.274

2.2 SPP-SiO₂ 对糖肽的富集效果考察

使用标准糖蛋白 IgG 酶解后的肽段, 评价 SPP-SiO₂ 亲水材料在 N-糖肽 HILIC 富集和质谱鉴定中应用的可能性, 结果示于图 3a~3c。在未经富集的 IgG 肽段谱图中, 可观察到大量的非糖肽, 而且信号强度较高, 仅鉴定到 6 条信号强度较低的完整 N-糖肽。经 SPP-SiO₂ 富集后, 绝大部分非糖肽被有效除去, 可鉴定到 36 条不同糖型高信噪比的完整 N-糖肽^[25-26], 数量和信号强度均得到明显提高, 且鉴定的 N-糖肽数目高于文献报道^[20]。

为进一步确认 SPP-SiO₂ 对 N-糖肽的富集效果, 使用 PNGase F 酶对富集的 N-糖肽进行去糖基化处理, 通过 MALDI-TOF MS 检测到 2 个去糖基化肽段(m/z 1 159, 1 191), 结果示于图 3d。完整 N-糖肽的质谱信号峰全部消失, 表明图 3b 和 3c 中的信号峰属于 N-糖肽。

为进一步提高富集难度并更加真实地模拟实际生物样本的复杂程度, 将 IgG 和 BSA 混合(1:100, W/W), 再使用 SPP-SiO₂ 对混合肽段进行富集, 质谱分析结果示于图 4。未富集前, 谱图中全部是高丰度的非糖肽信号, 检测不到任何 N-糖肽信号。富集后, 绝大部分非糖肽被

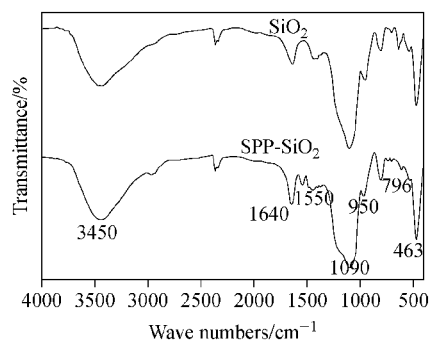


图 2 未经修饰的硅胶填料和 SPP-SiO₂ 两性离子修饰亲水填料的红外光谱图

Fig. 2 FT-IR spectra of bare silica microparticles and SPP-SiO₂ microparticles

有效除去, 能够检测到 8 条完整的 N-糖肽。证明了 SPP-SiO₂ 材料对糖肽富集的高效性。

2.3 SPP-SiO₂ 在正常人尿蛋白 N-糖肽的富集和质谱鉴定中的应用

对于某些疾病, 特定的标记物在尿液中比在血液中具有更好的诊断意义。如尿液中的 Angiostatin 浓度与肾病相关^[27], ADAM12 浓度与乳腺癌相关^[28], Desmosine 浓度与慢性阻塞性肺疾病相关^[29]等。因此, 对人尿液蛋白质和糖基化蛋白质进行深入鉴定和研究, 有利于发现多种疾病的诊断生物标记物, 这为疾病的临床研究及药物研发提供了有价值的信息。本研究使用 3 个不同批次的 SPP-SiO₂ 材料对正常人尿蛋白酶解产物中的 N-糖肽进行 HILIC 富集和质谱分析, 分别鉴定到 959、837 和 877 个 N-糖基化位点, 选择性分别为 75%、76% 和 73%, 合计鉴定 1 065 个 N-糖基化位点, 对应 633 个 N-糖蛋白。与文献^[30]报道的 949 个 N-糖基化位点相比, 鉴定规模提高了 12.2%。实验重现性示于图 5, 73.9% N-糖基化位点和 75.5% N-糖蛋白至少在 2 次实验中重复富集鉴定到。说明该材料具有较好的制备稳定性和富集重现性。

为进一步研究这些 *N*-糖基化蛋白功能,使用生物信息学工具 DAVID 对鉴定到的 *N*-糖基化蛋白进行 GO 注释分析。这些 *N*-糖基化修饰的尿蛋白的分子功能(molecular function, MF)主要包括结合功能(binding)、蛋白质同二聚化活性(protein homodimerization activity)、受体(receptor activity)和内肽酶活性(endopeptidase activity)等。*N*-糖基化修饰的尿蛋

白主要参与的生物过程(biological process, BP)按反应程度依次为细胞粘附(cell adhesion)、信号转导(signal transduction)、蛋白水解(proteolysis)、细胞外基质的组成(extracellular matrix organization)及免疫反应(immune response)等。上述结果与已知的 *N*-糖蛋白主要功能相符,证明了此富集、鉴定方法的可靠性。

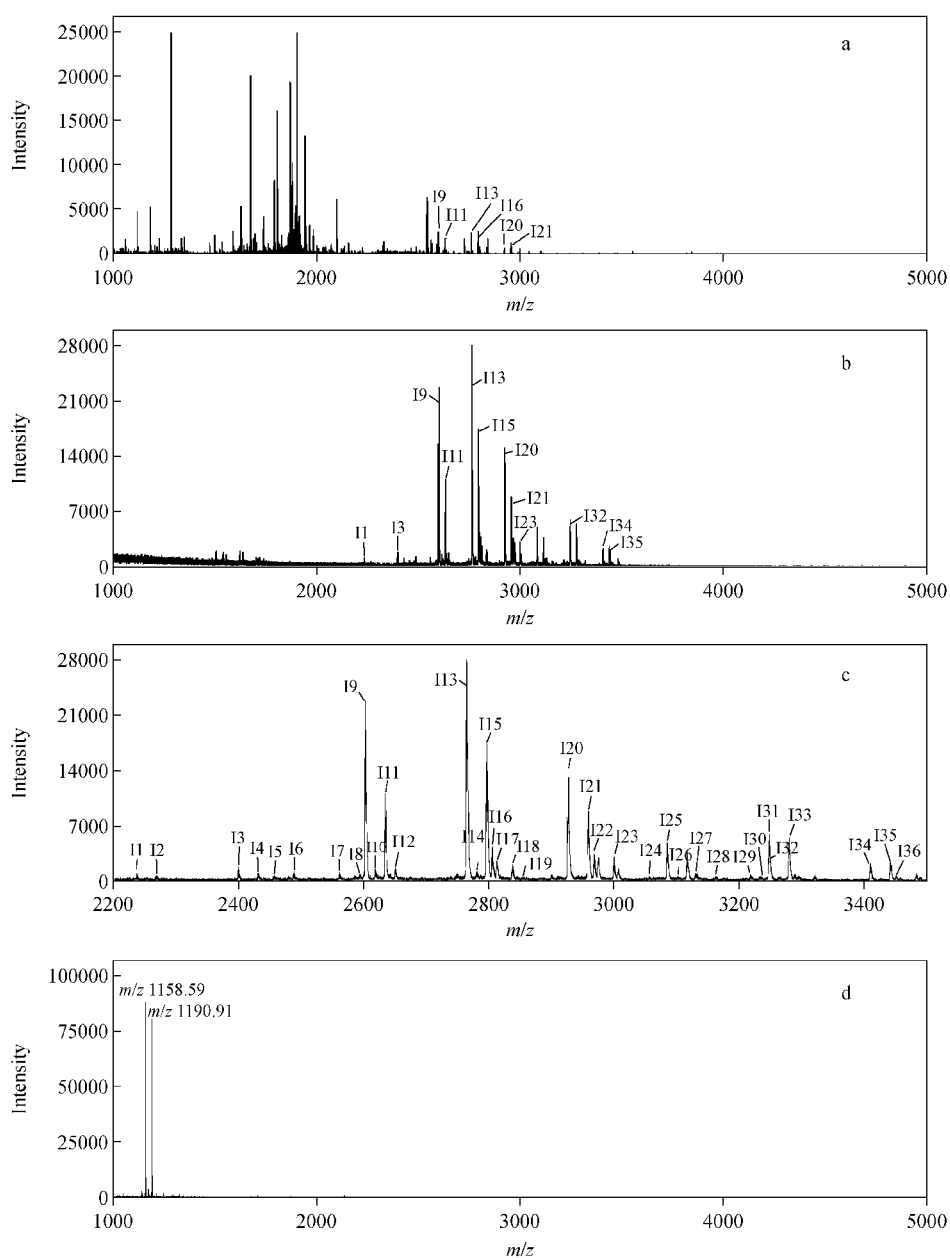


图3 富集前的IgG酶解肽段(a), SPP-SiO₂富集后的IgG酶解肽段(b), 富集后 m/z 2 200~3 500 的局部放大图(c), 使用 PNGase F 酶切糖后(d)的 MALDI-TOF MS 谱图
Fig. 3 MALDI-TOF MS spectra of tryptic digest of human IgG in direct analysis before (a) and after enrichment by SPP-SiO₂ (b), enlarged region of m/z 2 200-3 500 (c) and after deglycosylation by PNGase F (d)

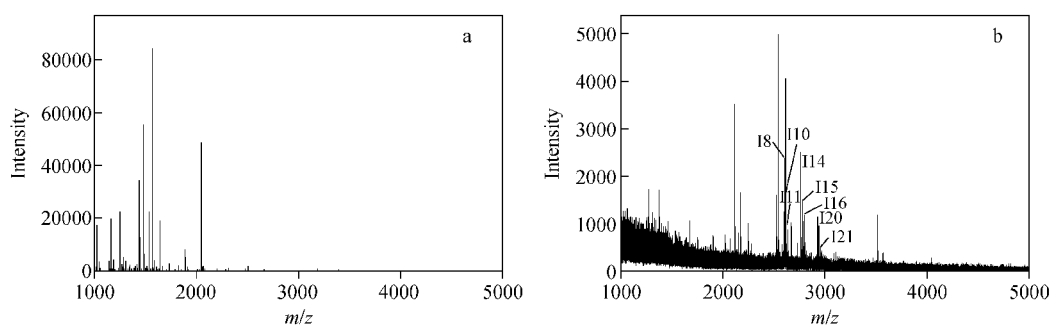


图 4 IgG 和 BSA 混合肽段富集前(a)和富集后(b)的 MALDI-TOF MS 谱图

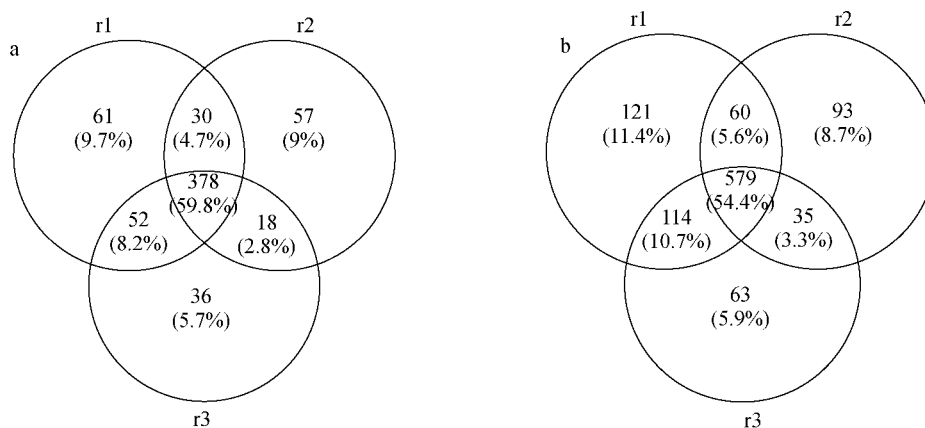
Fig. 4 MALDI-TOF MS spectra of tryptic digest of human IgG and BSA in direct analysis before (a) and after enrichment (b)

表 2 人免疫球蛋白酶切肽段富集后 N-糖肽鉴定信息表

Table 2 Informations of the enriched N-glycopeptides after digested by human IgG

序号 No.	质荷比 <i>m/z</i>	多糖成分 Glycan composition	肽序列 Peptide sequence
1	2237.4	[Hex]3[HexNAc]2[Fuc]1	EEQFN#STFR
2	2268.8	[Hex]3[HexNAc]2[Fuc]1	EEQYN#STYR
3	2398.8	[Hex]3[HexNAc]3[Fuc]1	EEQFN#STFR
4	2431.5	[Hex]3[HexNAc]3[Fuc]1	EEQYN#STYR
5	2456.4	[Hex]3[HexNAc]4	EEQFN#STFR
6	2488.4	[Hex]3[HexNAc]4	EEQYN#STYR
7	2561.8	[Hex]4[HexNAc]3[Fuc]1	EEQFN#STFR
8	2593.2	[Hex]4[HexNAc]3[Fuc]1	EEQYN#STYR
9	2602.5	[Hex]3[HexNAc]4[Fuc]1	EEQFN#STFR
10	2618.7	[Hex]4[HexNAc]4	EEQFN#STFR
11	2634.8	[[Hex]3[HexNAc]4[Fuc]1	EEQYN#STYR
12	2650.9	[HexNAc]4[HexNAc]4	EEQYN#STYR
13	2765	[Hex]4[HexNAc]4[Fuc]1	EEQFN#STFR
14	2780.6	[Hex]5[HexNAc]4 EEQFN#STFR	EEQFN#STFR
15	2796.4	[Hex]4[HexNAc]4[Fuc]1	EEQYN#STYR
16	2806.8	[Hex]3[HexNAc]5[Fuc]1	EEQFN#STFR
17	2812	[Hex]5[HexNAc]4	EEQYN#STYR
18	2838.3	[Hex]3[HexNAc]5[Fuc]1	EEQYN#STYR
19	2853.9	[Hex]4[HexNAc]5	EEQYN#STYR
20	2927.5	[Hex]5[HexNAc]4[Fuc]1	EEQFN#STFR
21	2959.6	[Hex]5[HexNAc]4[Fuc]1	EEQYN#STYR
22	2969	[Hex]4[HexNAc]5[Fuc]1	EEQFN#STFR
23	2999.8	[Hex]4[HexNAc]5[Fuc]1	EEQYN#STYR
24	3057.4	[Hex]4[HexNAc]4[Fuc]1[NeuAc]1	EEQFN#STFR
25	3085.3	[Hex]4[HexNAc]4[Fuc]1[NeuAc]1	EEQYN#STYR
26	3105.7	[Hex]5[HexNAc]4[NeuAc]1	EEQYN#STYR
27	3130.9	[Hex]5[HexNAc]5[Fuc]1	EEQFN#STFR
28	3162.9	[Hex]5[HexNAc]5[Fuc]1	EEQYN#STYR
29	3219.1	[Hex]5[HexNAc]4[Fuc]1[NeuAc]1	EEQFN#STFR
30	3235.9	[Hex]5[HexNAc]4[Fuc]1[NeuAc]1	EEQFN#STYR
31	3247.5	[Hex]4[HexNAc]4[Fuc]1	TKPREEQFN#STFR
32	3251.7	[Hex]5[HexNAc]4[Fuc]1[NeuAc]1	EEQYN#STYR
33	3279.6	[Hex]4[HexNAc]4[Fuc]1	TKPYEEQYN#STYR
34	3409.6	[Hex]5[HexNAc]4[Fuc]1	TKPREEQFN#STFR
35	3441.8	[Hex]5[HexNAc]4[Fuc]1	TKPYEEQYN#STYR
36	3452	[Hex]5[HexNAc]5[Fuc]1[NeuAc]1	EEQYN#STYR

注: N# 表示 N-连接的糖基化位点



注:r1、r2、r3 分别代表 3 个不同批次样品

图 5 三个不同批次 SPP-SiO₂ 材料富集鉴定 *N*-糖蛋白(a)和 *N*-糖基化位点(b)的重现性

Fig. 5 Repeatability of enrichment and identification of *N*-glycopeptide (a) and *N*-glycosylation site (b) by three batches of SPP-SiO₂

3 结论

利用巯基-烯点击化学法将 SPP 两性离子亲水单体键合于硅胶表面,成功地制备了具有高亲水性的 HILIC 富集材料。该材料具备两性离子的强亲水性和硅胶的高机械强度,制备重现性高、操作简便。并将该亲水材料成功地应用于富集标准糖蛋白和复杂生物样本蛋白质酶解产物的 *N*-糖肽,从正常人尿蛋白中共鉴定出 1 065 个 *N*-糖基化位点,比文献报道的鉴定规模提高了 12.2%,这说明 SPP-SiO₂ 材料在糖蛋白质组学研究中具有很大潜力。

参考文献:

- [1] SONG X, LASANAJAK Y, XIA B, et al. Shotgun glycomics: a microarray strategy for functional glycomics[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(1): 85-90.
- [2] WELLS L, VOSELLER K, HART G W. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and *O*-GlcNAc[J]. *Science*, 2001, 291(5 512): 2 376-2 378.
- [3] HART G W, COPELAND R J. Glycomics hits the big time[J]. *Cell*, 2010, 143(5): 672-676.
- [4] RUDD P M, ELLIOTT T, CRESSWELL P, et al. Glycosylation and the immune system[J]. *Science*, 2001, 291(5 512): 2 370-2 376.
- [5] PAN S, CHEN R, AEBERSOLD R, et al. Mass spectrometry based glycoproteomics—from a proteomics perspective[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, 10(1): 1-14.
- [6] CHEN R, TAN Y, WANG M, et al. Development of glycoprotein capture-based label-free method for the high-throughput screening of differential glycoproteins in hepatocellular carcinoma[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, 10(7): 1-13.
- [7] ANDERSON N L, ANDERSON N G. The human plasma proteome history, character, and diagnostic prospects[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2002, 1(11): 845-867.
- [8] RUIZ-MAY E, HUCKO S, HOWE K J, et al. A comparative study of lectin affinity based plant *N*-glycoproteome profiling using tomato fruit as a model[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2014, 13(2): 566-579.
- [9] RUIZMAY E, CATALÁ C, ROSE J K. *N*-glycoprotein enrichment by lectin affinity chromatography[J]. *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, 2014, (1 072): 633-643.
- [10] WANG M, ZHANG X, DENG C. Facile synthesis of magnetic poly(styrene-co-4-vinylbenzene-boronic acid) microspheres for selective enrichment of glycopeptides[J]. *Proteomics*, 2015, 15(13): 2 158-2 165.
- [11] LIU J, YANG K, SHAO W, et al. Boronic acid-functionalized particles with flexible three-dimensional polymer branch for highly specific recognition of glycoproteins[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(15): 9 552-9 556.

- [12] LI Q, TU X, YE J, et al. Nanoconfining affinity materials for pH-mediated protein capture-release [J]. *Chemical Science*, 2014, 5 (10): 4 065-4 069.
- [13] WANG Y, LIU M, XIE L, et al. Highly efficient enrichment method for glycopeptide analyses: using specific and nonspecific nanoparticles synergistically[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(4): 2 057-2 064.
- [14] HUANG G, SUN Z, QIN H, et al. Preparation of hydrazine functionalized polymer brushes hybrid magnetic nanoparticles for highly specific enrichment of glycopeptides[J]. *Analyst*, 2014, 139(9): 2 199-2 206.
- [15] LIU L, YU M, ZHANG Y, et al. Hydrazide functionalized core-shell magnetic nanocomposites for highly specific enrichment of N-glycopeptides [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(10): 7 823-7 832.
- [16] LIU J, YANG K, SHAO W, et al. Synthesis of zwitterionic polymer particles via combined distillation precipitation polymerization and click chemistry for highly efficient enrichment of glycopeptide[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(34): 22 018-22 024.
- [17] WU R, XIE Y, DENG C. Thiol-ene click synthesis of L-cysteine-bonded zwitterionic hydrophilic magnetic nanoparticles for selective and efficient enrichment of glycopeptides[J]. *Talanta*, 2016, (160): 461-469.
- [18] CHEN Y, XIONG Z, ZHANG L, et al. Facile synthesis of zwitterionic polymer-coated core-shell magnetic nanoparticles for highly specific capture of N-linked glycopeptides[J]. *Nanoscale*, 2015, 7(7): 3 100-3 108.
- [19] LIANG Y, WU C, ZHAO Q, et al. Gold nanoparticles immobilized hydrophilic monoliths with variable functional modification for highly selective enrichment and on-line deglycosylation of glycopeptides[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 900(4): 83-89.
- [20] SHAO C, WANG Y, GAO Y. Applications of urinary proteomics in biomarker discovery [J]. *Science China Life Sciences*, 2011, 54(5): 409-417.
- [21] SUN W, CHEN Y, LI F, et al. Dynamic urinary proteomic analysis reveals stable proteins to be potential biomarkers[J]. *Proteomics-Clinical Applications*, 2009, 3(3): 370-382.
- [22] HOYLE C E, BOWMAN C N. Thiol-ene click chemistry[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(9): 1 540-1 573.
- [23] CHEN Y, WU M, WANG K, et al. Vinyl functionalized silica hybrid monolith-based trypsin microreactor for on line digestion and separation via thiol-ene "click" strategy[J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1 218 (44): 7 982-7 988.
- [24] WANG K, CHEN Y, YANG H, et al. Modification of VTMS hybrid monolith *via* thiol-ene click chemistry for capillary electrochromatography[J]. *Talanta*, 2012, 91(6): 52-59.
- [25] MA W, XU L, LI Z, et al. Post-synthetic modification of an amino-functionalized metal-organic framework for highly efficient enrichment of N-linked glycopeptides[J]. *Nanoscale*, 2016, 8 (21): 10 908-10 912.
- [26] ZOU X, JIE J, YANG B. A facile and cheap synthesis of zwitterion coatings of the CS@ PGMA@ IDA nanomaterial for highly specific enrichment of glycopeptides[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(15): 3 251-3 253.
- [27] WU T, DU Y, HAN J, et al. Urinary angiostatin-a novel putative marker of renal pathology chronicity in lupus nephritis[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(5): 1 170-1 179.
- [28] PORIES S E, ZURAKOWSKI D, ROY R, et al. Urinary metalloproteinases: noninvasive biomarkers for breast cancer risk assessment[J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2008, 17(5): 1 034-1 042.
- [29] HUANG J T, CHAUDHURI R, ALBARBARAWI O, et al. Clinical validity of plasma and urinary desmosine as biomarkers for chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Thorax*, 2012, 67(6): 502-508.
- [30] PAN L, AGUILAR H A, WANG L, et al. Three-dimensionally functionalized reverse phase glycoprotein array for cancer biomarker discovery and validation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(47): 15 311-15 314.