

离子迁移谱-质谱技术 及其在蛋白质糖基化研究中的应用

付彬¹, 梁宇颖¹, 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. 复旦大学卫健委糖复合物重点实验室, 上海 200032)

摘要:糖基化是生物体内重要的蛋白质翻译后修饰(PTM)。基于质谱的检测技术,特别是液相色谱-质谱(LC-MS)联用技术是糖基化研究的常规手段。然而,由于糖基化存在复杂的异构现象,大多数基于质谱的分析技术在区分其异构体时存在困难。离子迁移谱(IM)是一种基于离子在气相中的形状和电荷进行分离的技术,能够为质谱分析提供新的分离维度。离子迁移谱-质谱(IM-MS)技术具有较强的区分异构体的能力,在蛋白质糖基化研究中的潜力越来越受到重视。本文总结了IM-MS技术的类型和基本原理,及其在蛋白质糖基化研究中的进展,如对完整糖蛋白、完整糖肽和聚糖的研究,并展望了其应用前景。

关键词:糖基化;离子迁移谱-质谱(IM-MS);翻译后修饰(PTM);糖组学;糖蛋白质组学

中图分类号:O657.63 文献标志码:A 文章编号:1004-2997(2022)05-0564-16

doi:10.7538/zpxb.2022.0083

Ion Mobility-Mass Spectrometry and its Applications in Protein Glycosylation Research

FU Bin¹, LIANG Yu-ying¹, LU Hao-jie^{1,2}

(1. *Institutes of Biomedical Sciences and Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200032, China;*
2. *NHC Key Laboratory of Glycoconjugates Research, Fudan University, Shanghai 200032, China*)

Abstract: Glycosylation is one of the most important post-translational modifications (PTM), mediating physiological processes like cell adhesion, cell proliferation, cell signaling, and immune responses. The special functionality of glycosylation for cancer progression and metastasis were reported in recent researches. Analytical methods based on mass spectrometry (MS), especially liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS), are the routine practices for protein glycosylation research. However, due to the high complexity and multiformity of glycan structures, as well as the existence of numerous isomers, in-depth analysis of glycosylation ends up as a major challenge for conventional LC-MS-based method. Ion mobility separation is a promising approach to fill the gap as it provides an additional separation dimension for mass spectrometry analysis based on structures and charges of the gas-phase ions. As a technology with an entirely different separation mechanism from that of liquid chromatography, ion mobili-

ty spectrometry (IM) has several properties superior to other separation facilities. First of all, unlike liquid chromatography or capillary electrophoresis which demand minutes of separation time, IM only requires a few milliseconds to finish the separation, and it is well compatible with fast mass spectrometry analysis. Besides, as a separation technique for gas phase ions, IM can be modularized and readily integrated into full-fledged LC-MS system. Most importantly, IM is proved to have great potential in glycan isomer discriminations. Given the aforementioned merits, ion mobility mass spectrometry (IM-MS) is gaining attention from glycomics community. This review summarized the basic principles of IM-MS and its applications in protein glycosylation research for the past five years. The means of enhancing isomeric separation performance of glycans were comprehensively discussed, including derivatization, forming metal and other non-covalent adducts, and utilizing high-resolution ion mobility spectrometry implementation. The various approaches of leveraging collision cross section (CCS) values to assist glycan identification and isomer discrimination were also summarized. Furthermore, as two monosaccharides with great biological and pathological significance, the IM-MS applications on fucoses and sialic acids were given special attention. As for glycopeptides, innovative spectra matching algorithms, novel ion activation techniques to facilitate glycan and peptide elucidations, and brand new quantification strategies for isomers were included, along with various glycoproteomic applications of IM-MS on biological samples. Finally, in terms of IM-MS applications in glycoprotein research, investigations of conformational properties, 3D structures, stabilities, and protein-protein interactions were covered. It was concluded that IM-MS is a promising method for protein glycosylation research with great potential.

Key words: glycosylation; ion mobility-mass spectrometry (IM-MS); post-translational modifications (PTM); glycomics; glycoproteomics

糖基化是一种重要的蛋白质翻译后修饰。蛋白质糖基化是指在酶的催化下,蛋白质与多糖共价结合的过程,在生物体内有着重要的生理意义,在细胞黏附、细胞增殖、细胞信号传输和免疫应答中起着重要的作用^[1]。例如,免疫细胞能够识别微生物表面的“糖衣”,启动免疫应答^[2]。细胞表面的受体大多数是糖蛋白,这些糖蛋白是胞间交流和病原体入侵的主要参与者^[3]。根据糖苷键的类型,蛋白质糖基化可分为 *N*-糖基化、*O*-糖基化、*P*-糖基化、*C*-糖基化、*S*-糖基化和糖基磷脂酰肌醇化等类型,其中前两者最为常见。*N*-糖基化是指聚糖连接在满足特定氨基酸序列的天冬酰胺上(Asn-*X*-Ser/Thr,其中 *X* 不能为 Pro),是细胞壁和胞外基质的重要组成部分,影响稳定性^[4-6]和溶解性^[7]等蛋白质理化性质,并且在免疫细胞表面辅助免疫细胞的转移^[7]。*O*-糖基化是指聚糖连接在 Ser 或 Thr 的氧原子

上,在识别异物、控制细胞代谢以及提供软骨和肌腱的灵活性方面发挥着重要的作用^[8]。

按照研究对象,可将蛋白质糖基化分为 3 个层面:对完整糖蛋白的研究、对蛋白酶解产生糖肽的研究、对从糖蛋白上释放得到糖链的研究。得益于液相色谱高效的分离能力和质谱极高的灵敏度,液相色谱-质谱(LC-MS)已成为蛋白质糖基化研究最常用的分析方法^[9]。然而,不同于磷酸化、泛素化等其他蛋白质翻译后修饰,糖基化复杂的异质性及大量同分异构体的存在使得包括液相色谱在内的传统分离方法很难实现对聚糖或糖肽异构体的完全分离。此外,虽然串联质谱(MS/MS)技术可以辅助糖结构的解析,但对于聚糖异构体来说,仅凭碎裂离子的质量仍然难以对同分异构体进行区分。

离子迁移谱-质谱(ion mobility-mass spectrometry, IM-MS)是一种能够根据离子在气

相中的淌度进行分离,并分析分离后离子质荷比的技术。近年来,研究者们开始逐渐重视IM-MS在区分聚糖异构体方面的潜力^[10]。本文将总结IM-MS在蛋白质糖基化研究中的应用进展,并对未来的研究方向及挑战进行展望。

1 糖基化研究的意义和挑战

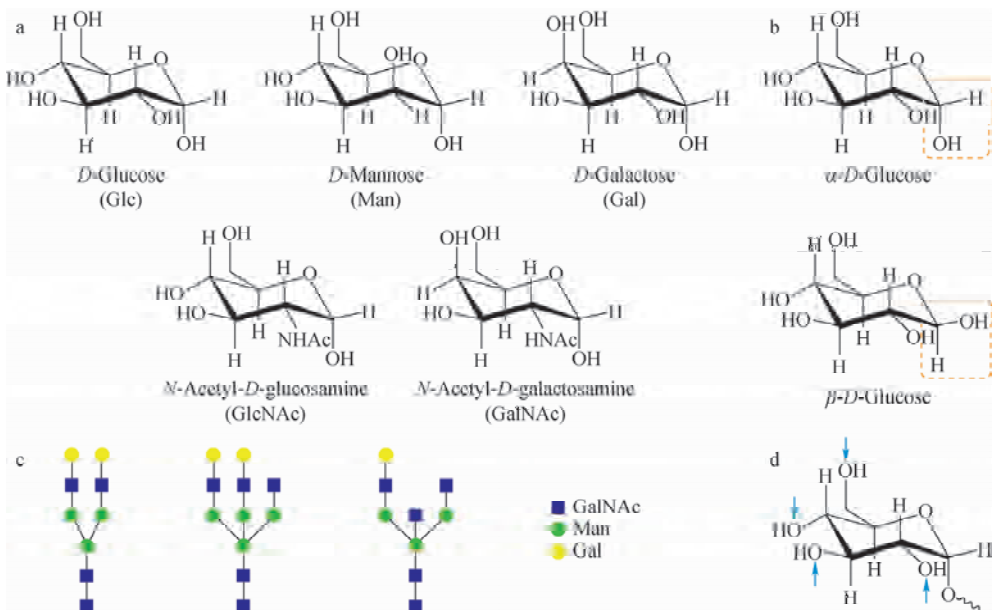
1.1 糖基化的复杂性及其挑战

因为聚糖结构的高度复杂性,糖组学常被称为“最具挑战性”的组学研究^[11]。聚糖的结构示于图1,其复杂性来源于:1)单糖的多样性。在脊椎动物中常见的单糖有9种,包括半乳糖(Gal)、葡萄糖(Glc)、甘露糖(Man)、*N*-乙酰半乳糖胺(GalNAc)和 *N*-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)等。其中很多单糖的相对分子质量完全相同,仅某个羟基的连接方式不同。在组成聚糖后,这些单糖还可能发生不同的修饰,进一步生成更多的聚糖结构。2)单糖异头碳(环状葡萄糖的C-1)上的羟基存在 α 、 β 型2种不同的立体异构。当C-1和C-5具有相同的构型(R或S)时,称为 α 型,反之称为 β 型。 α 型和 β 型异头碳上的羟基在形成糖苷键时会形成不同的立体异构体。3)单糖除异头碳羟基外,所有羟基都有可能与其他单糖的异头碳羟基形成糖苷键,从而形成

丰富的连接异构体。4)与线形结构的肽段不同,1个单糖可以与多个其他单糖形成糖苷键,从而形成复杂的分支结构。除聚糖的复杂结构外,糖基化有着复杂的微观异质性和宏观异质性。其中,微观异质性是指在同一个蛋白糖基化位点上可能存在不同的糖型,而宏观异质性是指同一蛋白质存在不同的糖基化位点^[11]。以上因素给糖基化研究带来了挑战。

1.2 糖基化的主要研究方法

早期的糖基化蛋白检测通常采用基于抗原抗体结合的免疫测定法,以及联合抗体和凝集素的荧光基团连接的免疫吸附测定法。这些方法依赖于昂贵的抗体,并且在没有相应抗体时无法开展实验。现代糖基化研究最常用的检测手段是基于质谱的检测技术,包括LC-MS和毛细管电泳-质谱(capillary electrophoresis mass spectrometry, CE-MS)。在糖基化研究中,常用的液相色谱分离模式包括多孔石墨化碳(porous graphitic carbon, PGC)吸附色谱、反向色谱(reversed phase liquid chromatography, RPLC)以及亲水作用色谱(hydrophilic-interaction chromatography, HILIC)。现也有研究将液相色谱替换成毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE),将CE的高分辨率和MS



注:a. 常见的单糖;b. 异头碳羟基的 α 、 β 异构;c. 聚糖会形成分支结构;d. 单糖的多个羟基都可能与其他单糖形成糖苷键

图1 聚糖的复杂结构

Fig. 1 Complex structure of glycans

的高灵敏度相结合,在糖基化研究中取得了良好的结果^[12-13]。此外,核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术也被很多研究者用来辅助聚糖结构的解析^[14-15]。

然而,上述方法都存在一些缺陷^[9]。即使在抗体很容易获得的情况下,由于基质效应和交叉反应的存在,免疫测定无法精准分析非常复杂的生物样本。虽然液相色谱高效,但在区分异构体方面能力不足;NMR 能够提供详细的信息,但由于对样品纯度要求苛刻,不适合分析复杂的生物样品。

2 离子迁移谱-质谱技术

2.1 质谱技术基本介绍

自1912年 Thomson^[16]发明质谱以来,质谱技术逐渐成为最常用的检测分析手段之一。得益于灵敏度高、检出限低、检测速度快等优点,质谱被广泛应用于有机化学、无机化学等领域。在离子化时,电子轰击源和化学电离源离子化技术会将离子碎裂成碎片,不适合研究生物大分子。基质辅助激光解吸离子化(matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)^[17]和电喷雾离子化(electron spray ionization, ESI)^[18]等软电离技术的出现,使质谱分析生物大分子成为可能。MALDI和ESI的离子化条件相对温和,在离子化过程中主要形成准分子离子,往往不会碎裂分子,近年来被广泛应用于蛋白质组学^[19]、糖组学^[20]和代谢组学^[21]的研究。

虽然质谱能够提供精确的质荷比,但复杂的生物样品不加预分离往往会产生难以解析的复杂谱图。因此,通常将质谱与气相色谱或液相色谱联用,通过对复杂样品进行预分离以减少谱图的复杂度。LC-MS作为组学研究最常用的分析技术,虽然能够对复杂的生物样本进行质谱预分离,但在分析具有复杂异构现象的糖组样品时仍存在困难。

2.2 离子迁移谱基本原理

离子迁移谱(IM)是一种利用离子在气相中淌度的不同实现分离的技术。淌度是衡量气相中离子在电场力和中性分子阻力作用下的移动能力。气相中的离子在电场作用下与中性气体相对位移时发生碰撞,由于离子所带电荷和自身立体结构,其受碰撞产生的阻力大小不同。

当电场强度足够低,以至于离子的漂移速度 v_d 远小于离子的热运动速度 v_T 时,离子淌度常数 K 与离子碰撞截面(collision cross section, CCS) Ω 的关系满足 Mason-Schamp 公式^[22]:

$$K = \left(\frac{3q}{16N}\right) \left(\frac{2\pi}{kT}\right)^{1/2} \left(\frac{m+M}{mM}\right)^{1/2} \left(\frac{1}{\Omega}\right) \quad (1)$$

式中, q 是离子所带电荷, N 是中性缓冲气体的粒子数密度, k 是玻尔兹曼常数, T 是开尔文温度, m 是中性缓冲气体的分子质量, M 是离子质量, Ω 是离子的碰撞截面。 Ω 的本质是“动量转移碰撞积分”,即离子和中性分子之间的动量转移对所有离子-分子相对热速度的积分。 Ω 的大小同时与离子的性质和缓冲气体的性质有关^[23]。

常用的离子迁移谱包括漂移管离子迁移谱(drift tube ion mobility spectrometry, DTIMS)^[24]、高场不对称离子迁移谱(high-field asymmetric ion mobility spectrometry, FAIMS)^[25]、行波离子迁移谱(travelling wave ion mobility spectrometry, TWIMS)^[26]和捕集离子迁移谱(trapped ion mobility spectrometry, TIMS)^[27]。DTIMS作为最早出现的,也是最常用的离子迁移谱,常被简称为IMS。

目前为止,DTIMS是唯一能够通过漂移时间计算离子淌度常数 K 的技术^[23]。

$$K = \frac{v_d}{E} = \frac{l}{t_d E} \quad (2)$$

式中, l 是漂移管长度, t_d 是离子从漂移管一端运动到另一端所需的时间, E 是电场强度。对于TWIMS和TIMS来说,CCS可以由DTIMS获取的CCS值经校准得到^[28-30]。与DTIMS不同,FAIMS在高电场强度下对离子进行了无法确定的能量转移,以至于离子的温度无法确定,故无法通过Mason-Schamp公式计算淌度常数。因此,FAIMS通常只作为一种高效的分离手段。

3 离子迁移谱-质谱技术在糖基化研究中的应用

根据研究对象的不同,基于IM-MS技术的糖基化研究可分为对聚糖、糖肽和完整糖蛋白的研究三类。

3.1 聚糖研究

3.1.1 IM-MS对聚糖离子检测的优化 质谱的发展已步入超高分辨时代,包括飞行时间质

谱(time of flight, TOF)和 Orbitrap 在内的高分辨质量分析器已经被普遍应用于主流的商用质谱仪器中。然而,对具有较长发展历史的质谱而言,离子迁移谱的分辨能力有时并不能满足聚糖研究的要求(平均~1%误差^[31])。为了克服这一困难,研究者们分别从糖链衍生化、改变和优化加合离子、发展离子迁移谱仪器等方面尝试提高 IM-MS 对聚糖离子的分辨能力。

在分析聚糖时,通常需要进行衍生化处理。通过同位素标签可以在不同样本的聚糖上引入1个固定的质量差,从而辅助定量。Butler等^[32]研究了“同位素聚糖酰肼标签标记的个体归一化”(individuality normalization when labeling with the isotopic glycan hydrazide tags, INLIGHT)技术对N-糖 IM-MS 分析的影响,发现该技术中的 NAT(nature,天然状态)和 SIL(stable isotope label,稳定同位素标签)不仅不会影响聚糖的漂移时间,还能够提高 IM 分辨率。全甲基化修饰是另一种常用的聚糖衍生化,是指将所有与O原子和N原子相连的H原子用甲基取代。全甲基化可以抑制聚糖的中性丢失,提高离子化效率,并在串联质谱中产生利于结构解析的诊断碎片离子^[33]。Dumontier等^[34]发现,在对N-糖进行全甲基化修饰后,其在IM中的半峰宽变窄,说明全甲基化能够减弱N-糖的构象变化。在IM中通常无法区分构象异构体和同分异构体,构象异构体常干扰同分异构体的判断,而该研究证明全甲基化能够为IM-MS提供更好的异构体分辨能力。荧光标签可以为本身没有荧光发射的聚糖引入荧光基团,便于色谱检测。虽然在LC-MS中作为检测器的质谱不需要荧光基团辅助检测,但荧光标签能够改善聚糖在液相色谱上的分离能力,并且提高质谱的离子化效率^[33]。Manz等^[35]将常用的荧光标签2-AA、2-AB和ProA(procaïnamide)用于聚糖的IM-MS检测,发现荧光标签会增大聚糖的CCS值,增大的程度与携带荧光标签的大小呈正相关,并且可以提高聚糖在IM中的分辨率。

使用特殊的金属离子或阴离子与聚糖形成特殊的加合物,从而可提高IM对聚糖的分辨能力。例如, Ca^{2+} 、 Co^{2+} 等二价金属离子能够明显提高聚糖离子在IM中的分辨率^[36-38],与

卤素离子的共加合(如 $[\text{M} + \text{Ca} + \text{I}]^+$ 或 $[\text{M} + \text{Ca} + \text{Cl}]^+$)可以进一步提高分辨率^[36-37]。然而,聚糖与二价金属离子形成的加合离子可能存在不同的形式:1个聚糖和1个金属离子、1个聚糖和2个金属离子、2个聚糖和1个金属离子、2个聚糖和2个金属离子等。包含2个聚糖的二聚体可能由2个不同的聚糖组成,在 MS^1 中可能会形成与其他单体重叠的峰,从而导致 MS/MS 谱图质量下降,难以准确分析^[39-40]。Morrison等^[41]证明,由于相同 m/z 的二聚体和单体在IMS中的到达时间分布差距较大,IMS能够排除质谱分析中二聚体的干扰。

用低分辨离子迁移谱很难实现聚糖异构体的直接分离。Quaranta等^[42]发现,TWIMS无法区分相同单糖数的聚糖。因此,除了使用不同的衍生化或加合离子来改善分辨率外,直接使用高分辨离子迁移谱也是一种选择。含有无损离子操作结构的离子淌度谱(structures for lossless ion manipulations ion mobility spectrometry, SLIM-IM)是一种新型的离子淌度技术,能够在较小的空间范围内极大地提高离子的有效路径长度,从而提高离子迁移谱的分辨率^[43]。有报道^[44]成功地将具有拓展蛇形超长路径(serpentine ultra-long path with extended routing, SUPER)的SLIM-IM-MS用于区分聚糖阳离子,实现了 α 、 β 端基异构体的分离。TIMS采用较为巧妙的方法延长了离子运动的有效路径。在TIMS中,与常规离子在静止缓冲气体中的运动形式不同,缓冲气体有一定的流速,而离子相对于漂移管静止。这种设计使TIMS能够在很小的空间内实现超高的分辨能力。Wei等^[45]利用TIMS-MS/MS分析了22对N-糖异构体,其中有14对能够被区分,证明了TIMS的优势。环状离子迁移谱(cyclic ion mobility mass spectrometer, cIMS)是一种高分辨离子迁移谱,通过重复利用环状的离子轨道,延长离子的有效路径长度,从而提高分辨率。Ujma等^[46]用Q-cIM-MS实现了对3种五聚糖混合物的分离,并识别出 α 、 β 端基异构体。

有研究^[32,47-48]尝试将IM-MS与现有的分离技术联用,利用不同分离技术的正交性克服IM分辨率不足的问题。由于离子迁移谱是对

气相中的离子进行分离,需要放在离子源后,因此可以作为一种模块化组件方便地加入常用的 LC-MS 中,而不影响液相色谱的分离。此外,IM 的分离发生在 ms 尺度,而液相色谱的分离发生在 min 尺度,两者可以形成很好的嵌套关系。最后,由于液相色谱和离子迁移谱的分离存在一定的正交性,离子迁移谱能够将液相色谱共流出的组分进一步分离,以简化质谱图^[32]。有研究^[47]尝试将毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis, CZE)与 IM-MS 相结合,发现 CZE-DTIMS-MS 能够实现单独使用 DTIMS-MS 和 CZE-MS 时无法实现的 *N*-糖异构体的完全分离,并在区分唾液酸连接异构体上有着出色的表现。Zheng 等^[48]将 IM-MS 与固相萃取(solid-phase extraction, SPE)相结合用于分离分析 *O*-糖异构体,证明了其区分 α 、 β 端基异构体和不同分支结构的能力^[48]。

除与其他分离技术联用外,IM-MS 还可以与常用的质谱碎裂模式结合。Harvey 等^[49-50]开展了一系列研究探究碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)与 IM-MS 相结合的能力,离子通过 IM 分离后被碎裂,并进行 MS/MS 分析。他们利用不同电荷的离子在漂移时间(drift time, DT)对 m/z 所作图上会形成不同趋势线这一性质,实现了对 m/z 相近但电荷不同的母离子的区分,简化了 MS/MS 谱图。在另一些研究中,IM 被用于分离分析不同类型的 *N*-糖(包括多甘露糖型 *N*-糖^[51]、岩藻糖基化 *N*-糖^[52]、复杂型 *N*-糖^[53])的 CID 碎裂离子,通过不同的母离子形成的子离子会有指纹特性的到达时间分布(arrival time distributions, ATDs)或 CCS 值分布(CCS distributions, CCSDs),以实现对外异构体的分离。同样,Torano 等^[54]采用 IM-MS/MS 得出了类似的结论,证明了岩藻糖的结构信息可以通过 CID 子离子特殊的 ATDs 来获取。Hoftmann 等^[55]发现 CID 碎裂离子的 ATDs 可以用来区分 Lewis 结构和血型聚糖异构体。相比于 CID,紫外光解离(ultraviolet photodissociation, UVPD)在碎裂聚糖时能够诱导更利于结构解析的跨环碎裂。然而,由于未衍生的聚糖只有很弱的紫外吸收,UVPD 对聚糖的碎裂效率较弱。Morrison 等^[38]发现,使用 Co^{2+} 离子加合物可以提高聚糖 UVPD 的

子化效率和聚糖在 DTIMS 中的分辨率。

3.1.2 IM-MS CCS 值用于区分聚糖异构体

目前,在 IM-MS 中通常使用 CCS 作为区分不同结构聚糖的依据。CCS 值的理论计算大多使用分子动力学模拟的方式。Re 等^[56]采用分子动力学与 IM-MS 结合研究 *N*-糖在气相中 CCS 值的决定因素,发现 *N*-糖携带质子的状态及其构象组合对 CCS 值的影响较大,大部分质子化聚糖以球状或棍状的构象存在,其 CCS 值分布为较窄的单峰,且其 CCS 值的差异足以用于区分异构体。由于理论计算仍存在较大偏差,目前通常使用在 DTIMS 上测得的 CCS 值(^{DT}CCS)作为标准值。近年来,已有研究者尝试构建聚糖 CCS 值数据库,其中以 GlycoMob 最为典型。GlycoMob^[57]是聚糖、寡糖及其碎片 CCS 值的数据库,截止 2022 年,共收录了 1 008 个离子。GlycoMob 为校准 TWIMS 提供了极大的便利,同时为基于 CCS 值的聚糖结构解析提供了支持。如 Dumontier 等^[34]用 TWIMS-MS 和 ESI-MS/MS 研究了三角苜蓿(*P. tricornutum*)蛋白的 *N*-糖,发现与其他微藻类硅藻不同的是,三角苜蓿能够产生一种在哺乳动物中常见的 Man-5 异构体(二者具有相同的 CCS 值),表明三角苜蓿有合成复杂 *N*-糖的潜力,可以用于生物制药。Lucas 等^[58]结合多种分析手段,包括 Western blot、TWIMS-MS、nanoLC-ESI-MS 和 ESI-MSⁿ,分析了莱茵衣藻(*C. reinhardtii*)的木糖基化 *N*-聚糖。Barroso 等^[59]通过 CCS 值的差异实现了阴离子模式下 α 2-3、 α 2-6 唾液酸连接异构体的区分。Vanier 等^[60]通过 CCS 值发现莱茵衣藻体内复杂型 *N*-糖和哺乳动物 *N*-糖存在结构差异,不同于哺乳动物中的支链结构,莱茵衣藻中的 Man5 GlcNAc2 具有线性结构,揭示了莱茵衣藻不同的复杂型 *N*-糖合成路线。

对于 DTIMS 来说,虽然可以直接通过到达时间计算 CCS 值,但在实际操作中,由于 Mason-Schamp 公式中的许多参数存在误差,直接计算所得的 CCS 误差较大。Stow 等^[22]提出 DTIMS 的多场矫正和单场矫正方法,提高了 DTIMS 的到达时间转化为 CCS 值的准确性。多场矫正是指用同一标准物质在漂移管长度、漂移管内气压或电场强度梯度变化时得到

的 AT-CCS 校准曲线,其中变化电场强度的做法最常见、最准确;而单场矫正是指测定多个标准物质在同一实验条件(包括电场条件)下的到达时间,从而得到 AT-CCS 校准曲线。有报道^[32,39]使用单场校准方法取得理想效果。TWIMS 无法直接从到达时间计算 CCS 值,需要用已知 CCS 值的标准物质进行校准。目前,最常用的 TWIMS CCS 值计算方法是由 Smith 等^[28]提出的校准方法,Hofmann 等^[30]和 Pagel 等^[29]将这一方法扩展到聚糖上。

CCS 值分布也能作为分析指标。糖肽或聚糖可能出现多种同分异构体,而每种同分异构体在气相中可能会出现多种构象异构体。因此,糖肽或聚糖的异构体离子会出现不同的 ATDs,其可转化成 CCS 分布,从而得以区分异构体^[47,51,54]。Torano 等^[10]提出了从多糖 DTIMS-MS 的 ATDs 推算多糖的构象分布(conformation distributions, CDs),从而辅助多糖鉴定的方法。他们用 DTIMS-MS/MS 测定了 15 种常见的免疫相关 *N*-糖的 ATDs,证实了 m/z 相近的多糖,甚至是 m/z 相同的连接异构体(包括唾液酸 α 2-3 和 α 2-6 连接异构体),可以通过阴离子模式下特异性的 ATD 指纹图谱得以区分。此外,作者还用从牛胎球蛋白酶解产生的多糖验证了通过 ATDs 辅助多糖结构鉴定的可行性,证明在拥有完整多糖 ATDs 指纹图谱数据库的情况下,仅通过 IMS-MS 一级质谱进行结构鉴定是可行的。质子化的聚糖在 IM 中通常只以中心对称的单峰形式存在,而在阴离子模式下,聚糖通常会在 IM 中出现复杂且具有指纹特性的 ATDs^[10]。因此,基于 IM-MS 的糖基化异构体研究通常是在阴离子模式下进行^[42,49-50,59]。Zheng 等^[48]发现,虽然聚糖在阴、阳离子模式下的 IM 谱图有较大差别,但不同的聚糖在不同模式下可能会有更好的分离效果,不应一概而论。

3.1.3 IM-MS 用于分析岩藻糖和唾液酸聚糖

值得注意的是,在聚糖中往往要关注一些具有重要生理意义的单糖异构体或连接位置。岩藻糖和唾液酸是 2 种重要的单糖。岩藻糖在聚糖中存在着不同的连接方式,可能起到不同的生理作用。岩藻糖基化的 *N*-糖介导包括白细胞黏附^[61]、受精^[62]、组织发育^[63]和肿瘤转

移^[64]在内的各种生理过程。Harvey 等^[52]在对含 Lewis x 和 Lewis y 结构的岩藻糖基化 *N*-糖分别进行 CID 前后的 IM 表征发现,该技术能够很好地识别岩藻糖在哪个天线上,以及每个天线上各有多少岩藻糖。Hoftmann 等^[55]用 IM-MS/MS 实现了对 Lewis 结构和血型聚糖异构体的区分。他们首先通过 IM-MS 测得一些血型和 Lewis 三聚糖、四聚糖完整离子以及 CID 碎裂离子的 CCS 值和 m/z ,以此构建聚糖碎片指纹数据库;随后,在人类腮腺组织 *N*-糖和乳牛寡糖样品中验证了 CCS 指纹谱数据库,用于鉴定 Lewis 结构和血型结构的可行性。此外,岩藻糖基 *N*-糖在碎裂时会发生岩藻糖的转移重排^[65],给 *N*-糖的结构解析带来很多困难。Torano 等^[54]利用 IM-MS/MS 研究了岩藻糖的转移规律,发现岩藻糖重排时会生成各种不同位置异构的子离子,在 DTIMS 中形成不同的 ATDs,从而得以表征岩藻糖的重排行为。研究还发现,岩藻糖基残基会迁移到 *N*-乙酰神经氨酸的乙酰氨基部分、乙酰氨基残基和异头标签的亲核位点,产生特定的异构片段离子。与之前研究结论不同的是,该研究没有发现岩藻糖向羟基重排的现象。此外,Manz 等^[55]发现 2-AA 或 2-AB 等荧光标签会阻止岩藻糖的重排。

唾液酸通常以 α 2-3 或 α 2-6 的连接方式与半乳糖(Gal)相连,与包括免疫细胞追踪^[66]、微生物附着^[67]、凝血^[68]和炎症稳态^[69]在内的多种生理过程有关。 α 2-3 或 α 2-6 异构体在不同的细胞事件(例如病毒感染)中具有选择识别性^[70]。此外,在一些癌症的发展过程中,两者的变化水平也会呈现不同的趋势^[71]。由于 LC 往往难以充分分离唾液酸连接异构体,因此,基于 LC-MS 研究唾液酸连接异构体通常采用连接异构体特异性衍生的方法,如将 α 2-3 和 α 2-6 异构体间引入 1 个质量差^[71-72]。而一些研究者利用 IM-MS 区分同分异构体的能力,在不衍生的情况下实现了对唾液酸连接异构体的分离分析。Torano 等^[10]通过 DTIMS-MS/MS 测定了 15 种免疫相关 *N*-糖(包括唾液酸连接异构体)的 ATDs,发现 m/z 相近的多糖,包括唾液酸 α 2-3 和 α 2-6 连接异构体,都可以通过阴离子模式下的 ATD 指纹图谱进行区分。Lane 等^[73]发现,在向 FAIMS 的缓冲气体中加入适

量的甲醇蒸汽,可以实现对唾液酸连接异构体的完全区分。理论计算表明, α 2-3 连接异构体有更负的补偿电压,表明 α 2-6 连接异构体和甲醇有更强的结合能量,即 α 2-3 连接异构体与甲醇分子的结合能力更强。此外,Jooss 等^[47]在 α 2-3 唾液酸苷酶的辅助下,利用 CZE-DTIMS-MS 实现了 α 2-3、 α 2-6 唾液酸连接异构体的区分。

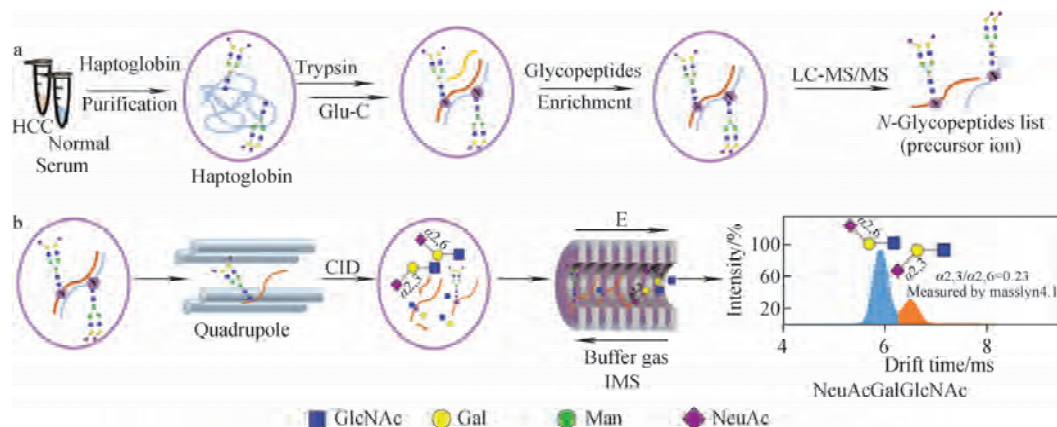
3.2 糖肽研究

以聚糖作为研究对象时,其位点信息会随着糖链从糖蛋白或糖肽上的释放而丢失。因此,位点特异的糖基化研究具有重要意义。完整糖肽通常是指糖蛋白经过蛋白酶酶解后产生的带有糖基化修饰的肽段,同时保留聚糖和聚糖连接位点的信息。研究表明^[74-75],IM-MS/MS 策略可以更好地进行糖肽的结构解析。Pallister 等^[76]将液相色谱-荧光-离子迁移谱-质谱(LC-FLR-IM-MS)用于分析 *N*-糖肽的异构体,采用 TWIMS 分离分析完整离子和碎片离子。对于完整离子的分析,获取 IM-MS 数据后,将数据与数据库中的谱图进行比对以实现结构鉴定;对于碎片离子的分析,母离子碎裂为子离子产生 MS/MS 谱图和子离子 IM 数据,通过比对数据库进行结构鉴定。上述 2 种策略均可有效区分糖肽异构体,该研究首次实现了在阳离子模式下对糖肽异构体的 IM 分析。Campbell 等^[77]采用 FAIMS-MS/MS 实现了糖肽异构体 MUC5AC-3 和 MUC5AC-13 的分离,并提出结合碰撞诱导解离(collision-

induced dissociation, CID)或电子捕获解离(electron capture dissociation, ECD)可以在无需标准物质的情况下利用 MS/MS 谱图对 IM 谱图中的峰进行归属。

在基于串联质谱的糖肽解析中,通常会同时使用包括 CID、电子转移解离(electron transfer dissociation, ETD)在内的多种碎裂模式,或使用电子转移/高能碰撞解离(ETHcD)、电子转移/碰撞诱导解离(ETciD)等混合碎裂模式,实现对肽段和糖链部分的碎裂。Kolli 等^[78]提出了一种基于 IM 的新型碎裂模式,可以对同一批母离子同时进行 CID 和 ETD 碎裂。在此流程中,带 n 个正电荷的母离子被四极杆选择后,短暂地与负电自由基反应离子反应,此时部分母离子发生电子转移反应(ET),另一部分离子不反应(NR)。随后,ET 离子和 NR 离子由于淌度的较大差异经由 IM 分离。经淌度分离的 2 组离子在离开淌度分离室后经过振动激活,导致 NR 离子发生 CID 碎裂,而 ET 离子发生 ETD 碎裂。因为 NR 和 ET 离子的漂移时间差异很大,所以这 2 个解离过程在时间上是分离的,所有子离子随后经由 TOF MS 分析。此流程利用传统 ETD 过程中未反应的离子获取 CID 谱图,极大地提高了离子利用率。

本课题组^[79]提出了一种用 IM-MS 对 α 2-3 和 α 2-6 唾液酸连接异构的 *N*-糖肽进行定性和定量分析的方法,示于图 2。该方法中的每个样本需要 2 次进样:第 1 次进样中,糖肽在富集



注:a. 通过 LC-MS/MS 鉴定 *N*-糖肽;b. 通过 LC-CID-IM-MS 得到 α 2-3 和 α 2-6 唾液酸连接异构体的比例

图 2 通过 IM-MS 对 α 2-3 和 α 2-6 唾液酸连接异构的 *N*-糖肽进行定性和定量分析的方法^[79]

Fig. 2 A new strategy for qualitative and quantitative analysis of *N*-glycopeptide α 2-3 and α 2-6 linkage isomers by IM-MS^[79]

后通过 LC-MS/MS 分析和鉴定,此时各个糖肽母离子的 m/z 和保留时间被记录下来,得到 1 个样本中所含糖肽母离子数据库;第 2 次进样采用 LC-CID-IM-MS 的分析模式,满足特定 m/z 和保留时间的母离子被四极杆分离出来并进行 CID 碎裂,产生的离子经由 IM-MS 分析。在 CID 碎裂后, m/z 657.24 的 B_3 离子在 IM 上出现 2 个峰,分别对应 2 种唾液酸连接异构体。 B_3 离子在 IM 中的曲线下面积可以用于该唾液酸连接异构体的定量。这种方法不需要额外的衍生化处理,减少了在衍生化步骤中可能引入的误差。本课题组将该方法成功用于肝细胞癌和健康对照血清触珠蛋白 N -糖肽的分析,共鉴定到 42 对唾液酸连接异构的糖肽,其中 9 对具有显著差异,有望作为肝细胞癌的潜在标志物。

目前,基于质谱的完整糖肽研究在极大程度上依赖于以糖为中心的糖肽富集^[80]。糖肽富集可以减小色谱中共流出的非糖基化肽段的离子信号抑制^[81]。两性离子亲水作用液相色谱(ZIC-HILIC)是糖肽富集最常用的技术之一,HILIC 表面的“水层”能够与糖肽亲水的糖链发生亲水相互作用,从而富集糖肽。然而,HILIC 对较大的糖结构有偏向性^[82],且在 O -糖肽的富集上表现较差^[83]。Ahmad 等^[84]对比了传统 HILIC+LC-MS/MS 和无需 HILIC 富集的 FAIMS-MS/MS 2 种分析细菌糖蛋白质组的方法,证明了 FAIMS 在糖蛋白质组分析中的优势。实验以 3 种伯克霍尔德氏菌的糖蛋白质组为研究对象,发现较短的 O -糖肽在 HILIC 富集过程中会丢失,而 FAIMS-MS/MS 却可以检测到这些糖肽,且 HILIC 和 FAIMS 鉴定到的糖肽具有一定的互补性,通过 FAIMS-MS/MS 鉴定到的糖肽数量增加了 25%。Fang 等^[85]发现使用 FAIMS 可将 LC-MS/MS 分析中含有糖鎗离子的谱图数提高 76%,且在人类 DG75 细胞中鉴定到的 N -糖肽数是未使用 FAIMS 时的 3.6 倍。

除单个蛋白的精准分析,也有研究将 IM-MS 技术用于糖蛋白质组学研究。Veith 等^[75]通过 LC-FAIMS-MS/MS 研究连翘坦纳氏菌(*T. forsythia*)细胞膜的糖基化蛋白质组,鉴定到 13 种糖链,以及在 145 个糖蛋白上的 312 个糖基化位点。Cain 等^[86]用平行多蛋白酶酶

解,ESI-MS/MS 和 FAIMS-MS/MS 分析空肠弯曲菌的糖蛋白质组,发现了 142 个糖基化位点,其中 32 个是首次发现的新位点。Sanda 等^[74]用 LC-MS/MS 研究 SARS-CoV-2 刺突蛋白表面的 N -糖基化和 O -糖基化,并确定了 9 个 N -糖肽和 17 个 O -糖肽及其异构体。实验中使用高分辨的环状离子迁移谱(cIMS)对碎裂后的离子进行分离,以排除肽段骨架的干扰并辅助糖结构的鉴定。

Gelb 等^[87]结合理论计算与实验,系统地分析了不同聚糖结构和氨基酸序列的 N -糖肽形成不同电荷的质子化离子在 TWIMS-MS 中 CCS 值的规律。研究发现,糖肽的 CCS 值与减少分子内的库仑排斥(使得肽段更舒展)和增大电荷的溶剂化作用(使得肽段更紧凑)这 2 种稳定过程有关。体积较大的聚糖有助于溶剂化作用,使得肽段更紧凑,从而有较小的 CCS 值。

3.3 糖蛋白研究

在传统的质谱组学研究中,将完整糖蛋白作为研究对象的“自上而下”的研究较少,主要是由于质谱在高质量区的分辨率较低,且完整糖蛋白的四级结构较复杂等原因。IM-MS 以其能够识别离子在气相中结构的优势,在完整糖蛋白研究中发挥着不可替代的作用。IM-MS 应用于完整糖蛋白的研究主要可以分为糖基化对蛋白质稳定性的影响、蛋白-糖蛋白或糖蛋白-糖蛋白的相互作用、以及完整糖蛋白的结构分析三类。

碰撞诱导展开(collision induced unfolding, CIU)是一种表征蛋白稳定性的常用手段。在 CIU 中,被分离出来的离子(例如蛋白质离子)在中性气体(例如氩气)碰撞下内能升高,使得其在气相中发生构象变化,但内能升高的程度不足以断裂共价键。CIU 过程通常使用 IM-MS 进行分析,通过离子 CCS 的变化得到构象变化信息,并通过 MS 或 MS/MS 进行定性和定量分析^[88]。Li 等^[4]用非变性离子淌度质谱(native IM-MS)通过 CIU 测定唾液酸修饰对转铁蛋白化学稳定性、构象稳定性和拓扑学稳定性的影响,证明了唾液酸对转铁蛋白有着稳定作用,但会阻止其发生二聚。Yen 等^[5]用 IM-MS 结合 CIU 研究糖基化微观异质性和宏观异质性对 SARS-CoV-2 病毒受体蛋

白 DC-SIGN 稳定性的影响,发现糖的类别对蛋白稳定性的影响不大,而糖的数量却对其有着很大影响。

有报道将 IM-MS 用于研究糖蛋白-蛋白之间的相互作用。Zhao 等^[89]用 Q-TWIMS-TOF 研究糖蛋白细胞环形受体 1 (Robo1) 和硫酸肝素 (HS) 的相互作用,重点研究了 Robo1-HS 相互作用时的构象变化,以及 N-糖基化对 Robo1 构象和结合能力的影响。Wang 等^[90]开发了一种多步 ESI-MS 流程用来研究糖蛋白和聚糖结合蛋白之间的相互作用。流程如下:1) CaR-IMS-ESI-MS:在捕获和释放分析中,通过调节条件使糖蛋白和聚糖结合蛋白结合,然后通过 IM 分离出相互作用的蛋白复合物,再改变条件破坏其相互作用使糖蛋白被释放,最后通过 MS 分析糖蛋白与聚糖结合蛋白的结合。2) 亲和力 K_a 由竞争配体和 ESI-MS 分析获得。3) 从糖蛋白上释放的 N-糖通过 ESI-MS 进行定性分析,以确定聚糖结合蛋白识别的聚糖类型。

有报道利用 IM-MS 在结构分析方面的优势研究气相中完整糖蛋白离子的结构。Upton 等^[91]使用 IM-MS 系统地评估了从不同厂家购买的 3 批 Herceptin、2 个单克隆抗体标准品和 1 个完整的 Fc 铰链片段。数据显示,在气相中,N-糖将每个单抗的构象扩散降低了 10.5%~25%。Tian 等^[6]用 Q-TWIMS-TOF MS 结合 CIU 技术研究单克隆抗体的糖基化修饰,通过与 CIU 指纹图谱对比,可以区分单克隆抗体糖基化的细微差异,证明了在没有高分辨质谱的情况下,快速的 CIU 分析也可以用来对单克隆抗体上 Fc 区域的 N-糖进行准确的定性和定量分析。Roberts 等^[92]用 TIMS-MS/MS 和 FTICR-MS/MS 研究 SARS-CoV-2 刺突蛋白受体结合域 (S-RBD) 上的蛋白质糖基化修饰。非变性的 TIMS-MS/MS 能够分离不同的 S-RBD 构象异构体,揭示其在气相中的结构异质性;而 FTICR-MS/MS 用于分析糖基化结构和位点。该研究首次报道了 8 个 S-RBD O 糖的完整结构信息,包括 1 个此前未被报道的核心岩藻糖基化修饰多糖结构,以及这些 O 糖的相对分子含量。

Liu 等^[93]研发了新型的 TIMS/TIMS,实现了类似于串联质谱的串联离子迁移谱分析,并用 TIMS/TIMS-MS 分析抗生物素蛋白

的结构和序列信息。研究发现,串联 TIMS 能够保持完整的、非变性的抗生物素蛋白四聚体结构,并且能够保留包裹在结构内的溶剂分子。此外,在 TIMS/TIMS 界面引入的低能量 CID 可以产生完整的三聚体离子,且该三聚体离子与折叠起来的四聚体中的三聚体结构相同。在高能量 CID 下,四聚体解离成单体或二聚体有助于结构分析。该研究证明,带有 CID 碎裂的 TIMS/TIMS-MS 是一种很好的分析完整糖蛋白的方法,可以高效地解析糖蛋白组成。

4 总结与展望

近年来,IM-MS 在蛋白质糖基化研究中表现出巨大的潜力。IM-MS 可以利用离子淌度分离降低质谱图的复杂度,也可以利用聚糖或糖肽结构中的诊断离子特征信息进行快速的糖结构识别,对区域异构体和立体异构体具有出色的分辨能力。此外,IM-MS 还具有分析时间短、消耗样品量少等优点。随着更多成熟的 IM-MS 商用仪器的出现,相信 IM-MS 会逐渐成为糖基化研究的重要分析工具之一。

然而,IM-MS 在分析蛋白质糖基化方面仍存在问题。首先,由于 IM 只基于气相离子形状进行分离,一些形状特别相近的异构体无法得到很好的区分。有研究尝试将 IM-MS 和其他分离分析技术进一步结合,包括红外光谱 (IR)^[94]、毛细管区带电泳 (CZE)^[47] 等,均取得了良好效果。随着组学实验数据规模的增大(例如高通量筛选标志物的实验),数据处理难度急剧增加。研究者需要能够将 CCS 和 MS 数据进行整合并发展自动化的软件用于聚糖或糖蛋白的鉴定,来代替繁杂的手动解谱工作。此外,规范化的 CCS 值数据发表和收集流程对未来的 IM-MS 研究有很大的帮助。“糖组学实验所需的最少信息”(minimum information required for a glycomics experiment, MIR-ATE) 计划已经针对常用的糖组学研究手段提供了指导方针,包括质谱^[95]、液相色谱^[96]和毛细管电泳^[97]等。如果基于 IM 的糖组学分析也能够有类似的标准,将会为未来的研究带来极大的便利。例如,一些文献在发表时已经在使用“仪器 CCS_{载气}”的格式来表示 CCS 值(例如,

$^{DT}CCS_{He}$ 代表在 DTIMS 上以氦气为载气时的 CCS 值)^[98], 标注了测量 CCS 值时的条件, 使数据更具参考意义。最后, 为了更好地进行分离分析, 仍需要开发分辨率更高的离子迁移谱仪器。一些研究已经在此方面做出了尝试, 包括用具有拓展蛇形超长路径的 IM-MS (SLIM SUPER IM-MS)^[44]、循环离子迁移率质谱 (cIMS) 等技术实现了超高分辨的 IM-MS 糖基化研究^[74]。将来, 随着分析仪器硬件和相应软件的进步, 相信离子迁移谱-质谱技术将会在蛋白质糖基化研究中发挥越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] VARKI A. Biological roles of oligosaccharides; all of the theories are correct[J]. *Glycobiology*, 1993, 3: 97-130.
- [2] HU M, LAN Y, LU A, MA X, ZHANG L. Glycan-based biomarkers for diagnosis of cancers and other diseases; past, present, and future [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2019, 162: 1-24.
- [3] OHTSUBO K, MARTH J D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease[J]. *Cell*, 2006, 126(5): 855-867.
- [4] LI G, PHETSANTHAD A, MA M, YU Q, NAIR A, ZHENG Z, MA F, DELANEY K, HONG S, LI L. Native ion mobility-mass spectrometry-enabled fast structural interrogation of labile protein surface modifications at the intact protein level[J]. *Anal Chem*, 2022, 94: 2 142-2 153.
- [5] YEN H Y, LIKO I, GAULT J, WU D, STRUWE W B, ROBINSON C V. Correlating glycoforms of DC-SIGN with stability using a combination of enzymatic digestion and ion mobility mass spectrometry[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2020, 132(36): 15 560-15 564.
- [6] TIAN Y, RUOTOLO B T. Collision induced unfolding detects subtle differences in intact antibody glycoforms and associated fragments[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2018, 425: 1-9.
- [7] SINCLAIR A M, ELLIOTT S. Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 94: 1 626-1 635.
- [8] HOUNSELL E F, DAVIES M J, Renouf D V. O-Linked protein glycosylation structure and function[J]. *Glycoconjugate Journal*, 1996, 13: 19-26.
- [9] MU Y, SCHULZ B L, FERRO V. Applications of ion mobility-mass spectrometry in carbohydrate chemistry and glycobiology[J]. *Molecules*, 2018, 23(10): 2 557.
- [10] TORANO J S, AIZPURUA-OLAIZOLA O, WEI N, LI T, UNIONE L, JIMENEZ-OSES G, CORZANA F, SOMOVILLA V J, FALCON-PEREZ J M, BOONS G J. Identification of isomeric N-glycans by conformer distribution fingerprinting using ion mobility mass spectrometry [J]. *Chemistry-a European Journal*, 2021, 27 (6): 2 149-2 154.
- [11] VARKI A, CUMMINGS R D, ESKO J D, STANLEY P, HART G W, AEBI M, DAVILL A G, KINOSHITA T, PACKER N H, PRESTEGARD J H. *Essentials of glycobiology* [M]. Cold Spring Harbor (New York): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- [12] CHENG M, SHU H, YANG M, YAN G, ZHANG L, WANG L, WANG W, LU H. Fast discrimination of sialylated N-glycan linkage isomers with one-step derivatization by microfluidic capillary electrophoresis-mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(11): 4 666-4 676.
- [13] SZABO Z, GUTTMAN A, REJTAR T, KARGER B L. Improved sample preparation method for glycan analysis of glycoproteins by CE-LIF and CE-MS[J]. *Electrophoresis*, 2010, 31(8): 1 389-1 395.
- [14] LUNDBORG M, WIDMALM G. Structural analysis of glycans by NMR chemical shift prediction[J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(5): 1 514-1 517.
- [15] BARB A W, PRESTEGARD J H. NMR Analysis demonstrates immunoglobulin G N-glycans are accessible and dynamic[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7: 147-153.
- [16] THOMSON J J. Further experiments on positive rays[J]. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 1912, 24: 209-253.
- [17] TANAKA K, WAKI H, IDO Y, AKITA S, YOSHIDA Y, YOSHIDA T, MATSUO T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry

- [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1988, 2; 151-153.
- [18] FENN J B, MANN M, MENG C K, WONG S F, WHITEHOUSE C M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules[J]. *Science*, 1989, 246(4 926); 64-71.
- [19] CALDERON-CELIS F, ENCINAR J R, SANZ-MEDEL A. Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2018, 37(6): 715-737.
- [20] RUHAAK L R, XU G, LI Q, GOONATILLEKE E, LEBRILLA C B. Mass spectrometry approaches to glycomic and glycoproteomic analyses[J]. *Chem Rev*, 2018, 118(17); 7 886-7 930.
- [21] KIND T, TSUGAWA H, CAJKA T, MA Y, LAI Z, MEHTA S S, WOHLGEMUTH G, BARUPAL D K, SHOWALTER M R, ARITA M, FIEHN O. Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2018, 37(4): 513-532.
- [22] STOW S M, CAUSON T J, ZHENG X, KURULUGAMA R T, MAIRINGER T, MAY J C, RENNIE E E, BAKER E S, SMITH R D, MCLEAN J A, HANN S, FJELDSTED J C. An interlaboratory evaluation of drift tube ion mobility-mass spectrometry collision cross section measurements[J]. *Anal Chem*, 2017, 89(17): 9 048-9 055.
- [23] GABELICA V, MARKLUND E. Fundamentals of ion mobility spectrometry[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2018, 42; 51-59.
- [24] COHEN M J, KARASEK F. Plasma chromatographyTM-a new dimension for gas chromatography and mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatographic Science*, 1970, 8(6): 330-337.
- [25] BORSDFORF H, EICEMAN G A. Ion mobility spectrometry: principles and applications[J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2006, 41; 323-375.
- [26] GILES K, PRINGLE S D, WORTHINGTON K R, LITTLE D, WILDGOOSE J L, BATEMAN R H. Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004, 18(20); 2 401-2 414.
- [27] FERNANDEZ-LIMA F, KAPLAN D A, SUE-TERING J, PARK M A. Gas-phase separation using a trapped ion mobility spectrometer[J]. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry*, 2011, 14; 93-98.
- [28] SMITH D P, KNAPMAN T W, CAMPUZANO I, MALHAM R W, BERRYMAN J T, RADFORD S E, ASHCROFT A E. Deciphering drift time measurements from travelling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry studies [J]. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*, 2009, 15: 113-130.
- [29] PAGEL K, HARVEY D J. Ion mobility-mass spectrometry of complex carbohydrates: collision cross sections of sodiated *N*-linked glycans[J]. *Anal Chem*, 2013, 85; 5 138-5 145.
- [30] HOFMANN J, STRUWE W B, SCARFF C A, SCRIVENS J H, HARVEY D J, PAGEL K. Estimating collision cross sections of negatively charged *N*-glycans using traveling wave ion mobility-mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(21); 10 789-10 795.
- [31] GELB A S, JARRATT R E, HUANG Y, DODDS E D. A study of calibrant selection in measurement of carbohydrate and peptide ion-neutral collision cross sections by traveling wave ion mobility spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2014, 86; 11 396-11 402.
- [32] BUTLER K E, KALMAR J G, MUDDIMAN D C, BAKER E S. Utilizing liquid chromatography, ion mobility spectrometry, and mass spectrometry to assess INLIGHT (TM) derivatized *N*-linked glycans in biological samples[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2022, 414; 623-637.
- [33] RUHAAK L R, ZAUNER G, HUH N C, BRUGGINK C, DEELDER A M, WUHRER M. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397; 3 457-3 481.
- [34] DUMONTIER R, LOUTELIER-BOURHIS C, WALET-BALIEU M L, BUREL C, MARECK A, AFONSO C, LEROUGE P, BARDOR M. Identification of *N*-glycan oligomannoside isomers in the diatom *phaeodactylum tricornutum*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 259; 117 660.
- [35] MANZ C, GRABARICS M, HOBERG F, PUGINI M, STUCKMANN A, STRUWE W B, PAGEL K. Separation of isomeric glycans by ion mobility spectrometry-the impact of fluorescent

- labelling[J]. *Analyst*, 2019, 144: 5 292-5 298.
- [36] XIE C, LI L, WU Q, GUAN P, WANG C, YU J, TANG K. Effective separation of carbohydrate isomers using metal cation and halogen anion complexes in trapped ion mobility spectrometry[J]. *Talanta*, 2021, 225: 121 903.
- [37] XIE C, WU Q, ZHANG S, WANG C, GAO W, YU J, TANG K. Improving glycan isomeric separation via metal ion incorporation for drift tube ion mobility-mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2020, 211: 120 719.
- [38] MORRISON K A, CLOWERS B H. Differential fragmentation of mobility-selected glycans via ultraviolet photodissociation and ion mobility-mass spectrometry[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2017, 28: 1 236-1 241.
- [39] WU Q, XIE C, YU J, TANG K. Analysis of oligosaccharides isomers using ion mobility-quadrupole-time of flight mass spectrometry[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2020, 41: 351-358.
- [40] MORRISON K A, BENDIAK B K, CLOWERS B H. Enhanced mixture separations of metal adducted tetrasaccharides using frequency encoded ion mobility separations and tandem mass spectrometry[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2017, 28(4): 664-677.
- [41] MORRISON K A, BENDIAK B K, CLOWERS B H. Assessment of dimeric metal-glycan adducts via isotopic labeling and ion mobility-mass spectrometry[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2018, 29: 1 638-1 649.
- [42] QUARANTA A, SPASOVA M, PASSARINI E, KARLSSON I, NDREU L, THORSEN G, ILAG L L. *N*-Glycosylation profiling of intact target proteins by high-resolution mass spectrometry (MS) and glycan analysis using ion mobility-MS/MS[J]. *Analyst*, 2020, 145(5): 1 737-1 748.
- [43] HAMID A M, IBRAHIM Y M, GARIMELLA S V, WEBB I K, DENG L, CHEN T C, ANDERSON G A, PROST S A, NORHEIM R V, TOLMACHEV A V, SMITH R D. Characterization of traveling wave ion mobility separations in structures for lossless ion manipulations [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(22): 11 301-11 308.
- [44] NAGY G, ATTAH I K, GARIMELLA S V B, TANG K, IBRAHIM Y M, BAKER E S, SMITH R D. Unraveling the isomeric heterogeneity of glycans: ion mobility separations in structures for lossless ion manipulations[J]. *Chemical Communications*, 2018, 54: 11 701-11 704.
- [45] WEI J, TANG Y, RIDGEWAY M E, PARK M A, COSTELLO C E, LIN C. Accurate identification of isomeric glycans by trapped ion mobility spectrometry-electronic excitation dissociation tandem mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(19): 13 211-13 220.
- [46] UJMA J, ROPARTZ D, GILES K, RICHARDSON K, LANGRIDGE D, WILDGOOSE J, GREEN M, PRINGLE S. Cyclic ion mobility mass spectrometry distinguishes anomers and open-ring forms of pentasaccharides[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2019, 30: 1 028-1 037.
- [47] JOOSS K, MECKELMANN S W, KLEIN J, SCHMITZ O J, NEUSUESS C. Capillary zone electrophoresis coupled to drift tube ion mobility-mass spectrometry for the analysis of native and APTS-labeled *N*-glycans[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411: 6 255-6 264.
- [48] ZHENG X, ZHANG X, SCHOCKER N S, RENSLOW R S, ORTON D J, KHAMSI J, ASHMUS R A, ALMEIDA I C, TANG K, COSTELLO C E, SMITH R D, MICHAEL K, BAKER E S. Enhancing glycan isomer separations with metal ions and positive and negative polarity ion mobility spectrometry-mass spectrometry analyses[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409: 467-476.
- [49] HARVEY D J, BEHRENS A J, CRISPIN M, STRUWE W B. Identification of *N*-glycans with GalNAc-containing antennae from recombinant HIV trimers by ion mobility and negative ion fragmentation[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, 413: 7 229-7 240.
- [50] HARVEY D J, STRUWE W B, BEHRENS A J, VASILJEVIC S, CRISPIN M. Formation and fragmentation of doubly and triply charged ions in the negative ion spectra of neutral *N*-glycans from viral and other glycoproteins[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, 413: 7 277-7 294.
- [51] HARVEY D J, SEABRIGHT G E, VASILJEVIC S, CRISPIN M, STRUWE W B. Iso-

- mer information from ion mobility separation of high-mannose glycan fragments[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2018, 29: 972-988.
- [52] HARVEY D J, STRUWE W B. Structural studies of fucosylated *N*-glycans by ion mobility mass spectrometry and collision-induced fragmentation of negative ions[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2018, 29: 1 179-1 193.
- [53] HARVEY D J, WATANABE Y, ALLEN J D, RUDD P, PAGEL K, CRISPIN M, STRUWE W B. Collision cross sections and ion mobility separation of fragment ions from complex *N*-glycans[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2018, 29: 1 250-1 261.
- [54] TORANO J S, GAGARINOV I A, VOS G M, BROSZEIT F, SRIVASTAVA A D, PALMER M, LANGRIDGE J I, AIZPURUA-OLAIZOLA O, SOMOVILLA V J, BOONS G J. Ion-mobility spectrometry can assign exact fucosyl positions in glycans and prevent misinterpretation of mass-spectrometry data after gas-phase rearrangement [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2019, 58(49): 17 616-17 620.
- [55] HOFTMANN J, STUCKMANN A, CRISPIN M, HARVEY D J, PAGE K, STRUWE W B. Identification of lewis and blood group carbohydrate epitopes by ion mobility-tandem-mass spectrometry fingerprinting[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(4): 2 318-2 325.
- [56] RE S, WATABE S, NISHIMA W, MUNEYUKI E, YAMAGUCHI Y, MacKERELL A D, SUGITA Y. Characterization of conformational ensembles of protonated *N*-glycans in the gas-phase[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 1 644.
- [57] STRUWE W B, PAGEL K, BENESCH J L P, HARVEY D, CAMPBELL M P. GlycoMob: an ion mobility-mass spectrometry collision cross section database for glycomics[J]. *Glycoconjugate Journal*, 2016, 33: 399-404.
- [58] LUCAS P L, MATHIEU-RIVET E, SONG P C T, OLTMANN S A, LOUTELIER-BOURHIS C, PLASSON C, AFONSO C, HIPPLER M, LEROUGE P, MATI-BAOUCHE N, BARDOR M. Multiple xylosyltransferases heterogeneously xylosylate protein *N*-linked glycans in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *The Plant Journal*, 2020, 102: 230-245.
- [59] BARROSO A, GIMENEZ E, KONIJNENBERG A, SANCHO J, SANZ-NEBOT V, SOBOTT F. Evaluation of ion mobility for the separation of glycoconjugate isomers due to different types of sialic acid linkage, at the intact glycoprotein, glycopeptide and glycan level[J]. *Journal of Proteomics*, 2018, 173: 22-31.
- [60] VANIER G, LUCAS P L, LOUTELIER-BOURHIS C, VANIER J, PLASSON C, WALET-BALIEU M L, TCHI-SONG P C, REMY-JOUET I, RICHARD V, BERNARD S, DRIOUICH A, AFONSO C, LEROUGE P, MATHIEU-RIVET E, BARDOR M. Heterologous expression of the *N*-acetylglucosaminyl-transferase I dictates a reinvestigation of the *N*-glycosylation pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 10 156.
- [61] LI J, HSU H C, MOUNTZ J D, ALLEN J G. Unmasking fucosylation: from cell adhesion to immune system regulation and diseases[J]. *Cell Chemical Biology*, 2018, 25(5): 499-512.
- [62] PANG P C, CHIU P C, LEE C L, CHANG L Y, PANICO M, MORRIS H R, HASLAM S M, KHOO K H, CLARK G F, YEUNG W S. Human sperm binding is mediated by the sialyl-lewisx oligosaccharide on the zona pellucida[J]. *Science*, 2011, 333: 1 761-1 764.
- [63] MURAMATSU T, MURAMATSU H. Carbohydrate antigens expressed on stem cells and early embryonic cells[J]. *Glycoconjugate Journal*, 2004, 21: 41-45.
- [64] STAUDACHER E, ALTMANN F, WILSON I B, MÄRZ L. Fucose in *N*-glycans: from plant to man[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1999, 1 473: 216-236.
- [65] WUHRER M, KOELEMAN C A M, HOKKE C H, DEELDER A M. Mass spectrometry of proton adducts of fucosylated *N*-glycans: fucose transfer between antennae gives rise to misleading fragments[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, 20(11): 1 747-1 754.
- [66] PINHO S S, REIS C A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2015, 15: 540-555.
- [67] VARKI A. Sialic acids in human health and

- disease[J]. Trends in Molecular Medicine, 2008, 14: 351-360.
- [68] SCHAUER R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2009, 19: 507-514.
- [69] OSWALD D M, JONES M B, COBB B A. Modulation of hepatocyte sialylation drives spontaneous fatty liver disease and inflammation[J]. Glycobiology, 2020, 30: 346-359.
- [70] SHINYA K, EBINA M, YAMADA S, ONO M, KASAI N, KAWAOKA Y. Influenza virus receptors in the human airway[J]. Nature, 2006, 440: 435-436.
- [71] 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]. Anal Chem, 2019, 91(24): 15 993-16 001.
- [72] WHEELER S F, DOMANN P, HARVEY D J. Derivatization of sialic acids for stabilization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and concomitant differentiation of $\alpha(2\rightarrow3)$ - and $\alpha(2\rightarrow6)$ -isomers[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009, 23: 303-312.
- [73] LANE C S, McMANUS K, WIDDOWSON P, FLOWERS S A, POWELL G, ANDERSON I, CAMPBELL J L. Separation of sialylated glycan isomers by differential mobility spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(15): 9 916-9 924.
- [74] SANDA M, MORRISON L, GOLDMAN R. *N*- and *O*-glycosylation of the SARS-CoV-2 spike protein[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93: 2 003-2 009.
- [75] VEITH P D, SCOTT N E, REYNOLDS E C. Characterization of the *O*-glycoproteome of *tannerella forsythia*[J]. Msphere, 2021, 6(5): e0064921.
- [76] PALLISTER E G, CHOO M S F, WALSH I, TAI J N, TAY S J, YANG Y S, NG S K, RUDD P M, FLITSCH S L, TERRY N K. Utility of ion-mobility spectrometry for deducing branching of multiply charged glycans and glycopeptides in a high-throughput positive ion LC-FLR-IMS-MS workflow[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(23): 15 323-15 335.
- [77] CAMPBELL J L, BABA T, LIU C, LANE C S, Le BLANC J C Y, HAGER J W. Analyzing glycopeptide isomers by combining differential mobility spectrometry with electron- and collision-based tandem mass spectrometry[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2017, 28: 1 374-1 381.
- [78] KOLLI V, SCHUMACHER K N, DODDS E D. Ion mobility-resolved collision-induced dissociation and electron transfer dissociation of *N*-glycopeptides: gathering orthogonal connectivity information from a single mass-selected precursor ion population[J]. Analyst, 2017, 142: 4 691-4 702.
- [79] FENG X, SHU H, ZHANG S, PENG Y, ZHANG L, CAO X, WEI L, LU H. Relative quantification of *N*-glycopeptide sialic acid linkage isomers by ion mobility mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(47): 15 617-15 625.
- [80] YU A, ZHAO J, PENG W, BANAZADEH A, WILLIAMSON S D, GOLI M, HUANG Y, MECHREF Y. Advances in mass spectrometry-based glycoproteomics[J]. Electrophoresis, 2018, 39(24): 3 104-3 122.
- [81] WOHLGEMUTH J, KARAS M, EICHHORN T, HENDRIKS R, ANDRECHT S. Quantitative site-specific analysis of protein glycosylation by LC-MS using different glycopeptide-enrichment strategies[J]. Analytical Biochemistry, 2009, 395: 178-188.
- [82] 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.
- [83] NEUE K, MORMANN M, PETER-KATALINIĆ J, POHLENTZ G. Elucidation of glycoprotein structures by unspecific proteolysis and direct nanoESI mass spectrometric analysis of ZIC-HILIC-enriched glycopeptides[J]. Journal of Proteome Research, 2011, 10(5): 2 248-2 260.
- [84] AHMAD IZAHAM A R, ANG C S, NIE S, BIRD L E, WILLIAMSON N A, SCOTT N E. What are we missing by using hydrophilic enrichment? Improving bacterial glycoproteome coverage using total proteome and FAIMS analyses

- [J]. *Journal of Proteome Research*, 2021, 20: 599-612.
- [85] FANG P, JI Y, SILBERN I, VINER R, OEL-
LERICH T, PAN K T, URLAUB H. Evaluation
and optimization of high-field asymmetric
waveform ion-mobility spectrometry for multi-
plexed quantitative site-specific *N*-glycoprote-
omics[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93:
8 846-8 855.
- [86] CAIN J A, DALE A L, CORDWELL S J.
Exploiting pglB oligosaccharyltransferase-positive
and-negative campylobacter jejuni and a multipro-
tease digestion strategy to identify novel sites
modified by *N*-linked protein glycosylation[J].
Journal of Proteome Research, 2021, 20: 4 995-
5 009.
- [87] GELB A S, LAI R, LI H, DODDS E D. Com-
position and charge state influence on the ion-
neutral collision cross sections of protonated
N-linked glycopeptides: an experimental and theo-
retical deconstruction of coulombic repulsion vs.
charge solvation effects[J]. *Analyst*, 2019, 144
(19): 5 738-5 747.
- [88] DIXIT S M, POLASKY D A, RUOTOLO B T.
Collision induced unfolding of isolated proteins in
the gas phase: past, present, and future[J].
Current Opinion in Chemical Biology, 2018, 42:
93-100.
- [89] ZHAO Y, YANG J Y, THIEKER D F, XU Y,
ZONG C, BOONS G J, LIU J, WOODS R J,
MOREMEN K W, AMSTER I J. A traveling
wave ion mobility spectrometry (TWIMS) study
of the robo1-heparan sulfate interaction[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2018, 29: 1 153-1 165.
- [90] WANG Y, PARK H, LIN H, KITOVA E N,
KLASSEN J S. Multipronged ESI-MS approach
for studying glycan-binding protein interactions
with glycoproteins[J]. *Analytical Chemistry*,
2019, 91(3): 2 140-2 147.
- [91] UPTON R, MIGAS L G, PACHOLARZ K J,
BENISTON R G, ESTDALE S, FIRTH D,
BARRAN P E. Hybrid mass spectrometry meth-
ods reveal lot-to-lot differences and delineate the
effects of glycosylation on the tertiary structure
of Herceptin (R)[J]. *Chemical Science*, 2019,
10(9): 2 811-2 820.
- [92] ROBERTS D S, MANN M, MELBY J A, LAR-
SON E J, ZHU Y, BRASIER A R, JIN S, GE
Y. Structural *O*-glycoform heterogeneity of the
SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding
domain revealed by top-down mass spectrometry
[J]. *Journal of the American Chemical Society*,
2021, 143: 12 014-12 024.
- [93] LIU F C, CROPLEY T C, RIDGEWAY M E,
PARK M A, BLEIHOLDER C. Structural analysis
of the glycoprotein complex avidin by tandem-
trapped ion mobility spectrometry-mass spec-
trometry (tandem-TIMS/MS)[J]. *Analytical
Chemistry*, 2020, 92(6): 4 459-4 467.
- [94] MASELLIS C, KHANAL N, KAMRATH M
Z, CLEMMER D E, RIZZO T R. Cryogenic
vibrational spectroscopy provides unique finger-
prints for glycan identification[J]. *Journal of the
American Society for Mass Spectrometry*, 2017,
28: 2 217-2 222.
- [95] KOLARICH D, RAPP E, STRUWE W B,
HASLAM S M, ZAIA J, McBRIDE R, AGRA-
VAT S, CAMPBELL M P, KATO M, RANZ-
INGER R, KETTNER C, YORK W S. The
minimum information required for a glycomics
experiment (MIRAGE) project: improving the
standards for reporting mass-spectrometry-based
glycoanalytic data[J]. *Mol Cell Proteomics*,
2013, 12: 991-995.
- [96] CAMPBELL M P, ABRAHAMS J L, RAPP E,
STRUWE W B, COSTELLO C E, NOVOTNY
M, RANZINGER R, YORK W S, KOLARICH
D, RUDD P M, KETTNER C. The minimum
information required for a glycomics experiment
(MIRAGE) project: LC guidelines[J]. *Glycobi-
ology*, 2019, 29: 349-354.
- [97] LAGEVEEN-KAMMEIJER G S M, RAPP E,
CHANG D, RUDD P M, KETTNER C, ZAIA
J. The minimum information required for a gly-
comics experiment (MIRAGE): reporting guide-
lines for capillary electrophoresis[J]. *Glycobiol-
ogy*, 2022, 32(7):580-587.
- [98] HOFMANN J, PAGEL K. Glycan analysis by
ion mobility-mass spectrometry[J]. *Angewandte
Chemie-International Edition*, 2017, 56: 8 342-
8 349.