基于电喷雾电离质谱(ESI-MS)的丙酮稳定同位素标记对 N-糖链的相对定量分析方法的研究

薛向东^a 孙玉姣^a 刘洋^a 张萍^{a,b} 王仲孚^a 黄琳娟^{*,a}

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

(^b 咸阳师范学院化学与化工学院 咸阳 712000)

摘要 建立了一种基于电喷雾电离质谱的丙酮稳定同位素标记对 N-糖链进行相对定量的研究方法. 与传统的 PNGase F 酶水解 N-糖链的方法不同, 采用非特异性蛋白酶 Pronase E 对 N-糖蛋白进行处理, 使 N-糖蛋白被酶解为带有一个氨基酸的糖氨酸(Glycan-Asn), 为 N-糖链引入了一个氨基活性基团, 然后用丙酮对氨基进行标记. 用 d_0/d_6 丙酮对 Ribo B 标准糖蛋白的 Pronase E 酶解产物进行标记, 考察了 4 对 d_0/d_6 丙酮标记的 Glycan-Asn ($\text{Man}_5\sim\text{Man}_8\text{-Asn}$) 在电喷雾电离质谱中的线性、动态范围以及重现性. 结果表明, 在 10 倍动态范围内, 相对定量方法有良好的线性关系($R=0.9981$)和重现性($\text{CV}<8.7\%$). 并将建立的方法应用于不同含量的鸡卵清白蛋白中, 进一步验证了该方法的可行性. 研究结果表明, 该方法能准确分析样品中 N-糖链的含量, 对不同样品中 N-糖链进行相对定量. 该方法成本低廉, 后处理方法简单方便, 适于微量样品通量化分析, 对差异糖组的研究有一定的意义.

关键词 丙酮稳定同位素标记; 电喷雾电离质谱; 还原烷化; N-糖链的定量

A Novel Method for Relative Quantitation of N-Glycans via Acetone Stable Isotopic Labeling and ESI-MS Analysis

Xue, Xiangdong^a Sun, Yujiao^a Liu, Yang^a Zhang, Ping^{a,b}
Wang, Zhongfu^a Huang, Linjuan^{*,a}

(^a Key Laboratory of Ministry of Education for Western China Resource Biology and Biotechnology, The College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069)

(^b Chemistry and Chemical Engineering School, Xianyang Normal University, Xianyang 712000)

Abstract A new method for relative quantitation of N-glycans based on acetone stable isotopic labeling and ESI-MS analysis is reported. Unlike the traditional PNGase F enzymolysis method, a non-specific protease, pronase E, is employed to digest N-glycoproteins into free N-glycans bearing a single asparagine residue (N-glycan-Asns) in this study. Consequently, the Asn moiety of the obtained N-glycan-Asns exposes an active amino group for further derivatization, enabling introduction of several relative quantitation methods of proteins/peptides into glycan analysis. On this basis, the N-glycan-Asns were derivatized with acetone (d_0 -acetone) and its stable isotope form (d_6 -acetone) by reductive alkylation, which has been extensively employed for derivatization of proteins/peptides. As a result, the isotopically labeled N-glycan-Asns have the same ionization efficiency as their isotopic forms, and each N-glycan-Asn exhibits a pair of ion peaks with a stable mass difference ($\Delta m=6$ Da) in the mass spectrum. Hence, comparing the intensities of the two peaks of each glycan, the relative contents of N-glycans obtained from different glycoprotein samples can be quantified. In this work, ribonuclease B from bovine pancreas (Ribo B) was digested by pronase E and applied to ESI-MS analysis, and four peaks corresponding to high-mannose N-glycans were observed in the mass spectra. The molecular weights of these glycans were 114 Da bigger than those released by PNGase F from Ribo B, due to the persistence of the Asn residue on the pronase-obtained glycans, indicating that pronase E could stably hydrolyze the N-glycoprotein to N-glycan-Asn. Next, two same-quantity aliquots of the obtained N-glycan-Asn sample were labeled with d_0 - and d_6 -acetone, respectively, and mixed together for ESI-MS analysis. As a result, some doublet ion peaks with a 6-Da mass difference were observed in mass spectra, and the light and heavy forms of each glycan appeared almost with the same peak intensity, indicating the acetone stable isotopic labeling procedure could be steadily employed for the relatively quantitative analysis of N-glycans. Furthermore, the linearity and dynamic range of this N-glycan relative quantitation method were evaluated using mixtures of the d_0 - and d_6 -acetone labeled Ribo B N-glycan-Asn samples ($\text{Man}_5\sim\text{Man}_8\text{-Asn}$) in different molar ratios. The MS profiling results demonstrated that the relative quantitative method could provide the relative quantitation data with a dynamic range of 10-fold, adequate linearity ($R>0.995$) and reliable reproducibility with a coefficient of variation that was less than 8.7%. Moreover, the reliable relative quantitative

* E-mail: huanglj@nwnu.edu.cn; Tel.: 029-88305853; Fax: 029-88303572

Received November 6, 2013; published January 5, 2014.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31170773, 21375103, 31370804).

项目受国家自然科学基金(Nos. 31170773, 21375103, 31370804)资助.

method was successfully employed to compare the quantitative difference between different chicken egg albumin samples with different purities by MS analysis. The results showed that the relative quantitative method could accurately perform relative quantitative analysis of *N*-glycans.

Keywords acetone stable isotopic labeling; ESI-MS; reductive alkylation; quantitation of *N*-linked glycans

1 引言

蛋白质糖基化是真核细胞中最常见的翻译后修饰过程,人类大约有 70%以上的蛋白被糖基化^[1].糖蛋白糖链是重要的生物信息分子,参与细胞信号转导,细胞识别或分子识别的过程^[2];作为血型物质与红细胞膜蛋白结合^[3];与未成熟肽段结合,参与肽链的正确缔合和折叠等.目前研究表明,糖链的异常表达和恶性肿瘤的发生有着密切的关系,在胃癌^[4]、卵巢癌^[4a,5]、胰腺癌^[6]等患者中,细胞的癌变均伴随着细胞表面糖蛋白糖链结构和含量的异常表达,如糖链的岩藻糖基化和唾液酸化水平的改变等,这些糖链的异常表达,会影响到细胞间的识别和信号转导.因此,细胞上的糖链是否异常表达可作为诊断细胞癌变的潜在生物标志分子.糖链的定量研究对糖链标志物的筛选及用于临床有着重要的意义.

现代生物质谱技术是糖类物质定性分析的强大工具^[7],但基于生物质谱对糖链进行绝对定量会因为不同糖链的离子化效率、质子亲合性、表面活性等因素的影响而产生很大的差别,还会不同程度的受到杂质的干扰,使定量结果不准确.为了弥补这一不足,目前的方法主要是相对定量法^[8],即用一对同位素物质对两组糖链分别进行标记,然后按已知比例混合样品,相同的糖链会因质量上的差异在质谱图中出现一对同位素特征峰.由于它们的离子化效率相同,可以通过比较对峰的相对丰度,对两组糖链进行相对含量的比较.以稳定同位素标记作为内标物定量的方法对蛋白质组学的研究较成熟^[9],目前已经建立起很多的标准方法,如 SILAC^[10], ICAT^[11], ICPL^[12]和 iTRAQ^[13]等,这些定量方法是通过标记蛋白质的氨基或巯基实现的.若使糖链带上一个类似于氨基酸的氨基或巯基的活性基团,便可将蛋白质的相对定量方法应用于糖类物质的研究.可以通过化学衍生化的方法,使糖链带上氨基酸类似基团,如用对氨基苯(*p*-Phenylenediamine)使糖链带上一个游离的氨基.但这种方法为定量过程增加了衍生化步骤,会不同程度的损失样品糖链,影响分析结果.生物样品中糖蛋白上糖链是天然的与不同的氨基酸以糖苷键的形式相连的,其中 *N*-糖链与天冬酰胺(Asn)连接, *O*-糖链大多与丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)连接,如果有一种方法可使糖链在解离时与其相连的氨基酸一起分离,这样便可产生天然的带有氨基酸活性基团的糖链. Li 等^[14]已成功用非特异性蛋白酶 Pronase E 将糖蛋白上 *N*-糖链酶解为带有一个天冬酰胺的糖氨酸(*N*-Glycan-Asn),并对天冬酰胺末端氨基进行甲基化修饰,使氨基被修饰为季铵

盐基团,更利于质谱分析^[15].我们实验室也成功地将糖蛋白 *N*-糖链的 Pronase E 酶解产物用 Fmoc-cl 衍生化后,进行了 LC-MS 分析^[16]. Pronase E 酶解糖蛋白会使糖链带上一个氨基活性基团,获得的糖氨酸只带有一个氨基基团,相对于蛋白质定量中遇到的多氨基情况,定量结果更易分析.

丙酮作为广泛使用的烷化试剂已被成功应用于蛋白质的定量研究中^[17].丙酮可与氨基酸 *N*-端氨基和赖氨酸的 ϵ -氨基发生烷化反应,向蛋白中引入多个异丙基,且反应效率高,反应产物稳定.本研究用丙酮稳定同位素试剂 d_0 丙酮(不含“氘”同位素的丙酮)和 d_6 丙酮(含 6 个“氘”同位素的丙酮)对 Pronase E 酶解糖蛋白产物进行标记,建立了一种基于电喷雾质谱分析对 *N*-糖链进行相对定量的方法,这种方法被称为 RABA (Reductive Alkylation by d_0/d_6 -Acetone)相对定量法.首先,用非特异性蛋白酶 Pronase E 对糖蛋白进行酶解,将 *N*-糖蛋白酶解为 *N*-Glycan-Asn,使糖链带有一个天然的氨基活性基团,然后与 d_0/d_6 丙酮的酮基进行反应,引入一个 d_0/d_6 异丙基($\Delta m=6$ Da).用 d_0/d_6 丙酮标记 4 条 Ribo B 标准糖蛋白的 Pronase E 酶解产物(Man₅~Man₈-Asn),考察了定量方法的线性关系、动态范围、重现性和准确性,建立了准确的相对定量方法;并将这种定量方法应用于不同纯度的鸡卵清白蛋白中,验证了此方法的可行性,这对差异糖组学的研究以及生物样品中 *N*-糖链的分析具有重要意义.

2 结果与讨论

2.1 丙酮标记 Glycan-Asn 的反应原理

丙酮衍生 Glycan-Asn 的原理如图 1 所示: d_0/d_6 丙酮的酮基与 Asn 的氨基反应,然后脱去一分子水;经硼氢氰酸钠还原后引入一个异丙基基团,使 Glycan-Asn 增加 42 Da (d_0 丙酮)或 48 Da (d_6 丙酮),同时,文献表明,异丙基的引入可以增加样品的离子化效率^[18].这种还原烷化法是对氨基酸进行修饰的经典方法之一^[19].

2.2 基于生物质谱的 RABA 相对定量方法的原理

如图 2 所示,本文建立的相对定量方法可以分为三个步骤:首先用非特异性蛋白酶 Pronase E 从两组不同来源的生物样品(Sample 1 和 Sample 2)中释放出糖链;经进一步纯化后将两组糖链按相同条件分别进行轻量同位素(d_0 丙酮)和重量同位素(d_6 丙酮)标记,其中 Sample 1 中的糖链被 d_0 丙酮标记, Sample 2 中的糖链被 d_6 丙酮标记;最后按等比例混合两组样品的丙酮标记

图1 丙酮衍生化 Glycan-Asn 的过程

Figure 1 Derivatization scheme of Glycan-Asn with acetone

产物, 进行 ESI-MS 分析. 由 MS 图中可知, 混合物中相同的糖链标记物会以相差 6 Da 的对峰被检测出来, 如 a 和 A*, 通过对两组糖链在质谱中被检测出的相对丰度差异, 就可以对不同来源样品中的糖链进行定量; 任何

一条糖链若只在一种样品中存在, 如 B 和 C*, 则会以单峰的形式被检测出来, 不会出现相差 6 Da 的对峰, 可以作为对糖链进行定性的依据.

2.3 RABA 对 N-糖链的相对定量

按 4.2 节方法对 Ribo B 进行酶解纯化, 纯化后进行 ESI-MS 分析, 结果谱图如图 S1 和图 3 所示. 由图 S1 和图 3A 可知, Ribo B 的 Pronase E 酶解产物为 m/z 1371.58, 1533.67, 1695.67, 1857.75 和 1905.33, 均比 PNGase F 酶解的糖链 Man_5 (m/z 1257.25), Man_6 (m/z 1419.25), Man_7 (m/z 1581.25) 和 Man_8 (m/z 1743.33) 多 114 Da, 说明 Pronase E 可将 N-糖链酶解为 Glycan-Asn (实验所用质谱为 ESI-MS, Man_9 -Asn m/z 为 2019, 不做检测). 将纯化好的 $\text{Man}_5 \sim \text{Man}_8$ -Asn 进行 d_0/d_6 丙酮标记, 将标记产物等等物质的量的比混合后进行 ESI-MS 分析, 结果如图 3B 所示, 4 条糖链均以相差 6 Da 的对峰的形式出现. 4 条峰

图2 RABA 相对定量法的策略图

Figure 2 General description of RABA relative quantitation strategy

The strategy consists of three major steps: (a) Releasing glycopeptide from the biological samples separately; (b) Generation of stable isotopic labeled corresponding glycopeptide pairs; (c) Identification and quantitation of candidate glycopeptide by ESI-MS

平均峰高比 $R=0.97$ ($CV=4.6\%$), 与理论混合比值 1:1 非常接近, 且 CV 值非常小, 说明了 RABA 定量法对 N -糖链的定量是精确的. 图 3A 和图 3B 中均存在一条 m/z 1275.58 Da 的质谱峰, 在样品被 d_0/d_6 丙酮标记后, 分子量仍保持不变, 经推测, 其为 Ribo B 标准糖蛋白中游离的寡糖链 Man_5 , 因为丙酮是对 Glycan-Asn 的天冬酰胺氨基进行标记的, 不会与游离寡糖的醛基反应. 因此, RABA 定量方法可以排除实际样品中游离寡糖链对糖蛋白糖链定量结果的影响, 提供了更加精确的定量方法, 这对糖蛋白上糖链的研究是很有意义的.

为了考察 RABA 定量法的线性范围, 将线性范围提高到 10:1 到 1:10, 通过对 4 对 d_0/d_6 丙酮标记的 Ribo B 糖链的电喷雾质谱信号强度分析, 计算了各个比例下相关系数 R 、变异系数 CV (%) 和标准误差 SE (%), 每组混合比例的实验都重复 3 次 ($n=3$), 线性关系图见图 S2. d_0/d_6 丙酮标记后的 4 条 Ribo B 糖链 ($Man_5 \sim Man_8$ -Asn) 在 10 倍动态范围内的相关系数均大于 0.9955. 如表 1 所示, 平均变异系数小于 8.70%, 平均标准误差小于 13.90%. 说明 RABA 定量法在 10 倍动态范围内具有良

好的稳定性和准确性. 将动态范围提高到 15:1 到 1:15 后, 低丰度糖链 Man_7 -Asn 的低混合比例的质谱峰不能检测出, 故 RABA 相对定量方法的动态范围确定为两个数量级(10 倍)以内.

2.4 RABA 相对定量方法线性关系、动态范围和准确度的考察

RABA 定量方法是根据 d_0/d_6 丙酮标记后的 Glycan-Asn 相对丰度比来确定糖链的相对含量的, 因此, 确定该方法的线性关系、动态范围和准确度是很重要的. 为了确定 RABA 定量法的线性关系, 以 Ribo B 的 Pronase E 酶解产物 ($Man_5 \sim Man_8$ -Asn) 为研究对象, 用 d_0 丙酮和 d_6 丙酮分别对其进行标记, 然后以 5 组不同等物质的量的比混合, 分别是 7:1, 3:1, 1:1, 1:3 和 1:7 ($d_0:d_6$). 用 ESI-MS 对 RABA 相对定量方法进行线性、重现性等指标的分析. 表 S1 为 Ribo B 4 条糖链按 5 种不同等物质的量的比混合后测得的数据. 以 d_0 丙酮标记糖氨酸和 d_6 丙酮标记糖氨酸理论混合比值做为横坐标,

图 3 RABA 相对定量法对 N -Glycan-Asn 的应用

Figure 3 RABA relative quantitation method for N -Glycan-Asn. (A) Mixtures of high mannose-type N -Glycan-Asn Man_5 -Asn, Man_6 -Asn, Man_7 -Asn and Man_8 -Asn released by Pronase E digestion of Ribo B and subjected to ESI-MS analysis. (B) N -Glycan-Asn released by Pronase E were labeled with d_0/d_6 acetone separately, mixed exactly in 1:1 molar ratio, and subjected to ESI-MS analysis. The masses of the individual glycans are shown associated with the most plausible structures represented with the symbols as shown in every figure, and the ratio of the peak areas of d_0 -acetone-glycan/ d_6 -acetone-glycans was shown (R)

表1 10倍动态范围内的定量统计数据
Table 1 Statistic data of 10-fold dynamic range

Glycan-Asn	Related coefficient	CV ^a /%	Standard error ^a /%
Man ₅ -Asn	0.9987	6.00	13.00
Man ₆ -Asn	0.9995	5.80	10.00
Man ₇ -Asn	0.9984	8.00	13.90
Man ₈ -Asn	0.9955	8.70	8.68

^aAverage from different ratio of d_0/d_6 -Glycan-Asn.

实测丰度比值为纵坐标, 作线性关系图. 图 4A 为 Man₅-Asn 反应结果的线性关系图, 其线性关系非常好, $R=0.9981$. 其他 3 条糖链的相关系数也非常好, 分别为 Man₆-Asn(图 4B, $R=0.9996$), Man₇-Asn(图 4C, $R=0.9989$)和 Man₈-Asn(图 4D, $R=0.9987$). 为了更好的验证 RABA 相对定量法的稳定性和准确性, 继续对 Ribo B 的 4 条糖链在各个比例下的标准差, 变异系数和定量误差进行了分析, 为保证此定量方法的重现性, 每组实验都重复 3 次($n=3$). 结果如表 S1 所示, Ribo B 糖链各个比例的标准差平均值为 $SD=0.08$, 变异系数平均值为 $CV=6.2\%$ 和标准误差平均值为 $SE=9.5\%$, 结果表明, RABA 定量法具有很好的可行性.

2.5 RABA 方法对不同纯度的鸡卵清白蛋白中 *N*-糖链的相对定量

为了验证 RABA 相对定量方法的可行性, 用该法对 Pronase E 酶解的不同纯度鸡卵清白蛋白(purity 62%~88%和 $\geq 98\%$, Albumin from chicken egg white)中 *N*-糖链进行相对定量分析. 将鸡卵清白蛋白按照 4.2 节方法处理后, 得到纯化的 *N*-Glycan-Asn. 然后将纯化好的 *N*-Glycan-Asn 分别按照 4.2 节方法进行 d_0/d_6 丙酮(d_0/d_6 -Acetone)标记. 将标记后产物 d_0/d_6 -Glycan-Asn 按等比例混合, 进行 ESI-MS(正离子检测)分析. 结果见图 5. 由图 5 可见, 共有 14 条糖链被检测出, 其中 2 条糖链没有以对峰形式出现, 分别为 m/z 1136.33, $[\text{Hex}]_3[\text{HexNAc}]_3$ 和 m/z 1339.42, $[\text{Hex}]_3[\text{HexNAc}]_4$. 同时, 这两条糖链在分子量上也没有增加(与丙酮反应会增加 42 Da 的分子量), 说明它们的分子结构上没有可与丙酮反应的氨基酸存在, 且没有被丙酮标记, 因此推断它们可能为两种鸡卵清白蛋白中含有的游离 *N*-糖链; 12 条糖链为同位素对峰, 说明这些糖链为鸡卵清白蛋白的 *N*-糖链, 均为 Glycan-Asn 形式, 其糖链的组成与文献报道一致^[20]. 通过比较同位素对峰的丰度, 可以计算出两种鸡卵清白蛋白中 *N*-糖链含量的差异, 如表 S2 所示, 分别为 $[\text{Hex}]_3[\text{HexNAc}]_2$ -Asn (0.65 ± 0.095), $[\text{Hex}]_3[\text{HexNAc}]_3$ -Asn (0.64 ± 0.095), $[\text{Hex}]_5[\text{HexNAc}]_2$ -Asn (0.72 ± 0.095), $[\text{Hex}]_3[\text{HexNAc}]_3$ -Asn (0.64 ± 0.095), $[\text{Hex}]_3[\text{HexNAc}]_4$ -Asn (0.62 ± 0.095), $[\text{Hex}]_7[\text{HexNAc}]_2$ -Asn (0.70 ± 0.095), $[\text{Hex}]_5[\text{HexNAc}]_3$ -Asn (0.74 ± 0.095), $[\text{Hex}]_4[\text{HexNAc}]_4$ -Asn (0.62 ± 0.095), $[\text{Hex}]_3[\text{HexNAc}]_5$ -

图4 理论值与实测值之间的线性关系图

Figure 4 The linear relationship between theoretical values and measured values. Error bar stands for standard deviation

Asn (0.72 ± 0.095), $[\text{Hex}]_5[\text{HexNAc}]_4$ -Asn (0.74 ± 0.095), $[\text{Hex}]_5[\text{HexNAc}]_4$ -Asn (0.68 ± 0.095)和 $[\text{Hex}]_3[\text{HexNAc}]_6$ -Asn (0.62 ± 0.095). 其丰度之比在 0.62~0.74 之间, 与实际的加入量相符(实际加入量比为 0.62~0.98), 变异系数 $CV < 3.0\%$ ($n=3$). 进一步验证了 RABA 相对定量法的可行性和准确性.

3 结论

建立了基于电喷雾质谱的丙酮稳定同位素标记对

图5 RABA 相对定量法的应用

Figure 5 Validation of the RABA quantitation method. Glycans are obtained from different purity chicken egg albumin separately, labeled with d_0/d_6 -acetone and mixed in equal molar prior to ESI-MS analysis

N-糖链进行相对定量的分析方法, 与其他定量的方法相比, RABA 相对定量法有以下优点: (1)丙酮稳定同位素仅与糖氨酸的氨基端发生反应, 同位素对峰的质量差异不会随糖链的大小而改变, 始终为 6 Da, 更易于定量分析; (2)成本低廉, Pronase E 相比于 PNGase F 酶是非常廉价的, 因此 RABA 相对定量法可广泛应用; (3) RABA 相对定量法用丙酮同位素对糖氨酸的氨基进行标记, 而不与糖链的醛基反应, 可以只对糖蛋白糖链进行分析, 排除了样品中游离糖链的对定量结果的影响, 提供了更加精确的定量方法; (4) RABA 定量法中酶解糖链的所用的 Pronase E 为非特异性蛋白酶, 本研究仅用于 *N*-糖链, 理论上, Pronase E 同样可将 *O*-糖链酶解为末端带有 Ser/Thr 的糖链, 仍可用 RABA 定量法对其进行研究, 为 *O*-糖链的研究提供新的思路. 因此, RABA 定量方法成本低廉, 后处理方法简单方便, 适于微量样品通量化分析, 对差异糖组的研究有一定的意义.

4 实验部分

4.1 质谱条件

质谱离子源为 ESI 源, 质量分析器为离子阱. 本研究用 2 μ L 定量环(Rheodyne loop)进样, 流动相为甲醇/水(1:1, *V/V*), 流速为 200 μ L/min. 电喷雾电压为 4.5 kV, 毛细管温度为 350 $^{\circ}$ C, 鞘气(Sheath gas, N_2)压力为 451.48 psi, 辅助气(Aux gas, N_2)压力为 75.30 psi, 离子吹扫气(Ion sweep gas, N_2)压力为 0 psi; 扫描所有谱图均在正离子模式下采集, 扫描范围: m/z 为 1000~2000.

4.2 Glycan-Asn 的制备及纯化

5 mg 糖蛋白与 5 mg Pronase E 酶溶于 1 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH=8.0, 含 1 mmol/L $CaCl_2$)中, 于 37 $^{\circ}$ C 酶解 48 h. 酶解完成后, 100 $^{\circ}$ C 变性 5 min 使酶失活, 然后将酶解反应液氮气吹干^[14-16]. 将吹干后的样品溶于 1 mL 去离子水中, 然后用石墨碳柱纯化^[21], 用 2

mL 25%乙腈洗脱目标糖链, 洗脱速度为 1.5 mL/min, 将目标糖链氮气吹干后, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用.

4.3 Glycan-Asn 的丙酮标记

按文献[17]方法, 将 4.2 节中糖链溶于 50 μ L 90%乙腈溶液(含 0.1%甲酸), 与新鲜配制的 100 μ L 0.1 mol/L $NaCNBH_3$ 的丙酮溶液(100 μ g $NaCNBH_3$ 溶于 100 μ L d_0/d_6 丙酮)混合于 2 mL 离心管中, 室温震荡反应 1 h. 然后将反应产物用氮气吹干, 溶于 1 mL 去离子水中, 然后加载到石墨碳柱中, 用 2 mL 去离子水除盐, 被丙酮标记上的 Glycan-Asn 用 2 mL 的 25%的乙腈洗脱, 洗脱速度为 1.5 mL/min, 将洗脱物用氮气吹干后溶解于 200 μ L 去离子水中进行 ESI-MS 分析.

References

- [1] Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **1999**, 1473, 4.
- [2] (a) Powlesland, A. S.; Quintero-Martinez, A.; Lim, P. G.; Pipirou, Z.; Taylor, M. E.; Drickamer, K. *Methods Enzymol.* **2010**, 480, 165; (b) Wu, A. M.; Liu, J.-H.; Gong, Y.-P.; Li, C.-C.; Chang, E.-T. *FEBS Lett.* **2010**, 584, 3561.
- [3] (a) Katsuhira, O.; Tetsuya, K.; Takashi, N.; Seiichi, O. *Int. J. Biochem.* **1987**, 23, 569; (b) Wu, A. M.; Wu, J. H.; Singh, T.; Liu, J. H.; Tsai, M. S.; Gilboa-Garber, N. *Biochimie* **2006**, 88, 1479.
- [4] (a) Brockhausen, I. *BBA-Gen. Subjects* **1999**, 1473, 67; (b) Pinho, S.; Marcos, N. T.; Ferreira, B.; Carvalho, A. S.; Oliveira, M. J.; Santos-Silva, F.; Harduin-Lepers, A.; Reis, C. A. *Cancer Lett.* **2007**, 249, 157; (c) Wang, F.-L.; Cui, S.-X.; Sun, L.-P.; Qu, X.-J.; Xie, Y.-Y.; Zhou, L.; Mu, Y.-L.; Tang, W.; Wang, Y.-S. *Cancer Detect. Prev.* **2009**, 32, 437.
- [5] (a) Kim, Y.-G.; Jeong, H.-J.; Jang, K.-S.; Yang, Y.-H.; Song, Y.-S.; Chung, J.; Kim, B.-G. *Anal. Biochem.* **2009**, 391, 151; (b) Di Michele, M.; Marcone, S.; Cicchillitti, L.; Della Corte, A.; Ferlini, C.; Scambia, G.; Donati, M. B.; Rotilio, D. *J. Proteomics* **2010**, 73, 879.
- [6] (a) Miyoshi, E.; Shinzaki, S.; Moriwaki, K.; Matsumoto, H. *Methods. Enzymol.* **2010**, 478, 153; (b) Hirota, M.; Mogaki, M.; Pour, P. M.; Chaney, W. G. *Exp. Mol. Pathol.* **1993**, 58, 169.
- [7] (a) Wang, Z. F.; Zhang, Y.; Lin, X.; Huang, L. J. *Acta Chim. Sinica* **2007**, 65, 2761. (王仲孚, 张英, 林雪, 黄琳娟, 化学学报, **2007**, 65, 2761.); (b) Qiu, J.; Zhang, Y.; Lu, H. J.; Yang, P. Y. *Acta Chim. Sinica* **2011**, 69, 2123. (仇娟, 张莹, 陆豪杰, 杨凡原, 化学学报, **2011**, 69, 2123.); (c) Kuang, M.; Zhang, Y.; Yang, P. Y.; Lu, H. J. *Acta Chim. Sinica* **2013**, 71, 1007. (匡敏, 张莹, 杨凡原, 陆豪杰, 化学学报, **2013**, 71, 1007.)

- [8] (a) Bowman, M. J.; Zaia, J. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3023; (b) Xia, B.; Feasley, C. L.; Sachdev, G. P.; Smith, D. F.; Cummings, R. D. *Anal. Biochem.* **2009**, *387*, 162; (c) Yuan, J.; Hashii, N.; Kawasaki, N.; Itoh, S.; Kawanishi, T.; Hayakawa, T. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1067*, 145; (d) Prien, J. M.; Prater, B. D.; Qin, Q.; Cockrill, S. L. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1498; (e) Botelho, J. C.; Atwood Iii, J. A.; Cheng, L.; Alvarez-Manilla, G.; York, W. S.; Orlando, R. *Int. J. Mass Spectrom.* **2008**, *278*, 137; (f) Zhang, P.; Zhang, Y.; Xue, X.; Wang, C.; Wang, Z.; Huang, L. *Anal. Biochem.* **2011**, *418*, 1; (g) Bowman, M. J.; Zaia, J. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 5777; (h) Alvarez-Manilla, G.; Warren, N. L.; Abney, T.; Atwood, J.; Azadi, P.; York, W. S.; Pierce, M.; Orlando, R. *Glycobiology* **2007**, *17*, 677.
- [9] (a) Flory, M. R.; Griffin, T. J.; Martin, D.; Aebersold, R. *Trends Biotech.* **2002**, *20*, S23; (b) Goshe, M. B.; Smith, R. D. *Curr. Opin. Biotech.* **2003**, *14*, 101; (c) Gouw, J. W.; Krijgsveld, J.; Heck, A. J. R. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 11; (d) Julka, S.; Regnier, F. *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 350.
- [10] (a) Ong, S.-E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristensen, D. B.; Steen, H.; Pandey, A.; Mann, M. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 376; (b) Krüger, M.; Moser, M.; Ussar, S.; Thievensen, I.; Luber, C. A.; Forner, F.; Schmidt, S.; Zanivan, S.; Fässler, R.; Mann, M. *Cell* **2008**, *134*, 353.
- [11] Gygi, S. P.; Rist, B.; Gerber, S. A.; Turecek, F.; Gelb, M. H.; Aebersold, R. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 994.
- [12] Schmidt, A.; Kellermann, J.; Lottspeich, F. *Proteomics* **2005**, *5*, 4.
- [13] Ross, P. L.; Huang, Y. N.; Marchese, J. N.; Williamson, B.; Parker, K.; Hattan, S.; Khainovski, N.; Pillai, S.; Dey, S.; Daniels, S.; Purkayastha, S.; Juhasz, P.; Martin, S.; Bartlett-Jones, M.; He, F.; Jacobson, A.; Pappin, D. J. *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 1154.
- [14] Liu, X.; McNally, D. J.; Nothhaft, H.; Szymanski, C. M.; Brisson, J.-R.; Li, J. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6081.
- [15] Liu, X.; Li, X.; Chan, K.; Zou, W.; Pribil, P.; Li, X.-F.; Sawyer, M. B.; Li, J. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3894.
- [16] Xu, S.; Zhang, P.; Huang, L.; Wang, Z. *Chem. J. Chin. Univ.* **2010**, *31*, 1992. (徐莎, 张萍, 黄琳娟, 王仲孚, 高等学校化学学报, **2010**, *31*, 1992.)
- [17] Zhai, J.; Liu, X.; Huang, Z.; Zhu, H. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **2009**, *20*, 1366.
- [18] (a) Beardsley, R. L.; Karty, J. A.; Reilly, J. P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 2147; (b) Brancia, F. L.; Oliver, S. G.; Gaskell, S. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 2070.
- [19] Fretheim, K.; Iwai, S.; Feeney, R. E. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1979**, *14*, 451.
- [20] (a) Huntington, J. A.; Stein, P. E. *J. Chromatogr. B* **2001**, *756*, 189; (b) Charlwood, J.; Langridge, J.; Camilleri, P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 1522; (c) Saba, J. A.; Shen, X.; Jamieson, J. C.; Perreault, H. *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 563.
- [21] Packer, N. H.; Lawson, M. A.; Jardine, D. R.; Redmond, J. W. *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 737.

(Qin, X.)