

基于可断裂双功能探针的糖蛋白分析*

李畅 郑振东 郑江南* 田瑞军*

(南方科技大学理学院化学系 深圳 518055)

摘要 糖蛋白在细胞活动和疾病发生发展过程中发挥着重要作用。然而,在复杂的生物样本中,糖蛋白的丰度往往较低,因而在质谱分析前必须对其进行富集以实现高灵敏质谱分析。目前,已经发展出诸多糖蛋白富集方法,其中肼化学法与肼点击化学法因对糖蛋白标记的普适性与无偏性受到了越来越多的关注。然而,由于这些方法以共价连接或者超高亲和力和生物素结合的方式在固相载体上捕获糖蛋白,因此无法选择性地洗脱被富集的糖蛋白。传统的方法是在固相载体上直接进行酶解,因此无法排除非特异性吸附蛋白、内源性生物素化蛋白、固相载体上的链霉亲和素等无关蛋白对糖蛋白质谱分析产生的背景干扰。本工作设计并合成了三种可断裂的双功能探针[生物素-偶氮苯-氧胺(BAA)、生物素-*N*-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧环己基)乙基-氧胺(BDA)、生物素-邻硝基苄基-氧胺(BNA)],通过温和的方式从固相载体上释放糖蛋白,从而排除非糖蛋白的干扰,提高糖蛋白富集的选择性。对三种探针的标记与富集效果、切割效率、蛋白回收率等性能进行了评估。结果显示,探针 BDA 与 BNA 的性能较为优越。最后,探针 BNA 被应用于细胞表面糖蛋白的分离富集与质谱鉴定中。与传统的在固相载体上直接进行酶解的方法相比,该方法中非糖蛋白数目从 3564 降到了 2139,降幅达到了 40.0%,糖蛋白的无标定量(LFQ)分析强度提升了 104.2%。此外,切割方法极大降低了内源性生物素化蛋白的干扰。上述结果表明,可断裂双功能探针显著地提高了糖蛋白质谱鉴定的灵敏度与选择性,为生物与医学等领域中糖蛋白的深度解析提供了新的工具。

关键词 糖蛋白; 质谱; 富集; 肼点击化学; 可断裂探针

Glycoprotein Identification using Cleavable Bifunctional Probes*

Li, Chang Zheng, Zhendong Zheng, Jiangnan* Tian, Ruijun*

(Department of Chemistry, School of Science, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055)

Abstract Glycoproteins play important roles in cellular activities and disease development. However, the abundance of glycoproteins is often low in complex biological samples. Thus, it is critical to enrich glycoproteins to achieve highly sensitive mass spectrometry (MS) analysis result. Many methods have been developed to enrich glycoproteins, among which hydrazide chemistry and oxime click chemistry have received increasing attention because of their universality and unbiasedness for labelling glycoproteins. Glycoproteins are captured by covalent binding or high affinity biotin binding on beads in these methods. Therefore, it is difficult to release glycoproteins from beads. Conventional way such as on-bead digestion is too harsh that can co-elute non-specifically bound proteins, endogenously biotinylated proteins and streptavidin on beads. These contaminant proteins would cause background interference in the subsequent glycoprotein identification by MS. In this study, three kinds of cleavable bifunctional probes named Biotin-Azo-Aminooxy (BAA), Biotin-Dde-Aminooxy (BDA) and Biotin-Nbz-Aminooxy (BNA) have been designed and synthesized. The cleavable bifunctional probes allow the release of glycoproteins from beads under mild condition. The mild condition can separate labelled glycoproteins from contaminant proteins to exclude the interference of non-glycoproteins. We evaluated the labelling and enrichment conditions, cleavage efficiency, glycoprotein recovery of these probes. The result showed that the properties of BDA and BNA are excellent. Lastly, BNA was selected to analyze cell surface glycoproteins by MS. Compared with the traditional method of on-bead digestion, the number of non-glycoproteins in this method decreased from 3564 to 2139 by 40.0% and the total Label-free quantitative (LFQ) intensity of glycoproteins increased by 104.2%. Furthermore, the endogenously biotinylated proteins were greatly reduced in cleavage method. The result shows that cleavable bifunctional probes can significantly improve the sensitivity and selectivity of the cell surface glycoprotein identification by MS, which provide tools for deep profiling of glycoproteins in the field of biology and medicine.

* Dedicated to the 90th anniversary of *Acta Chimica Sinica*.

* E-mail: zhengjn@sustech.edu.cn; tianrj@sustech.edu.cn

Received June 1, 2023; published August 14, 2023.

Project supported by the National Key R&D Program of China (Nos. 2021YFA1302603, 2020YFE0202200), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22125403, 92253304, 32201218), the Shenzhen Innovation of Science and Technology Commission (Nos. JCYJ20200109141212325, JCYJ20210324120210029, JCYJ20200109140814408), and Guangdong Provincial Fund for Distinguished Young Scholars (No. 2019B151502050).

* 庆祝《化学学报》创刊 90 周年。

项目受国家重点研发计划(Nos. 2021YFA1302603, 2020YFE0202200)、国家自然科学基金(Nos. 22125403, 92253304, 32201218)、深圳市科技创新委员会(Nos. JCYJ20200109141212325, JCYJ20210324120210029, JCYJ20200109140814408)、广东省杰出青年基金(No. 2019B151502050)资助。

Keywords glycoprotein; mass spectrometry; enrichment; oxime click chemistry; cleavable probes

1 引言

作为最常见、最重要的蛋白质翻译后修饰之一,糖基化广泛参与到人体的各项生理活动中.糖蛋白在免疫响应、细胞间信号转导、宿主识别等方面发挥着重要作用^[1-3].糖蛋白的异常表达与肿瘤等疾病的发生发展息息相关^[4].目前,糖蛋白作为标志物及靶标在肿瘤的诊断与治疗中受到越来越多的关注^[5-6].因此,对于糖蛋白的分析有助于我们更好地理解生理与病理过程,为肿瘤等疾病的诊断与治疗提供帮助.

目前,质谱(Mass spectrometry, MS)已成为糖蛋白质组学研究的重要工具^[7].然而,在复杂的生物样品中糖蛋白的丰度通常较低,高丰度的非糖基化蛋白会对糖蛋白的质谱鉴定产生严重的干扰^[8].因此,糖蛋白的富集对于其定性定量分析至关重要.利用糖蛋白中糖链的物理和化学性质,已经发展出了诸多糖蛋白富集策略,例如凝集素亲和富集法、亲水色谱法、硼酸法、胍化学法与胍点击化学法^[9-13].其中,凝集素亲和富集法依赖于凝集素与糖蛋白的相互作用^[14].因此,一种凝集素只能富集一类或少数几类糖蛋白,该方法的通用性较差;亲水色谱法利用糖基化肽段具有比常规肽段更高的亲水性对糖基化肽段进行富集^[15],但是该方法也会同时富集样品中的亲水性的非糖基化多肽,并且难以在蛋白质水平对糖蛋白进行富集;硼酸法利用硼酸与糖链中的邻二醇发生可逆的共价结合,通过溶液酸碱度的改变实现糖蛋白的富集与洗脱.然而,硼酸配体与糖蛋白的相互作用一般较弱,对低丰度糖蛋白的富集效果较差^[16].胍化学法^[17]与胍点击化学法^[18]是利用高碘酸钠等氧化剂,选择性地将糖链结构中的顺式邻二醇氧化成醛,再

利用胍基或羟胺固相载体或生物素化探针与醛反应,实现糖蛋白的标记与富集,因此具有无偏性与普适性.与基于固相载体的富集方法相比,生物素化探针可以实现活细胞表面糖蛋白的原位标记,并通过链霉亲和素和琼脂糖微球(Streptavidin beads)对标记的糖蛋白进行富集.

然而,由于生物素与链霉亲和素之间的作用力强($K_d \approx 10^{-15} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),这使得被富集的糖蛋白难以从链霉亲和素和琼脂糖微球上释放.常见的释放方式分为两类:(1)在变性缓冲液中煮沸微球以破坏链霉亲和素结构从而释放糖蛋白.(2)在链霉亲和素和素微球上直接进行酶解(On-bead digestion),使酶解后的肽段释放到溶液中.然而,这类剧烈的条件也会释放微球上的非特异性结合蛋白与内源性的生物素化蛋白.此外,微球上的链霉亲和素也会被酶解或高温释放,这对糖蛋白后续的质谱鉴定造成了背景干扰^[19-20].

含有可断裂基团的可断裂探针(Cleavable probe)的开发与应用为这一问题提供了解决方案^[21].通过在温和的条件下切割可断裂基团,可以实现被探针标记蛋白质的选择性回收.本文在双功能探针生物素-羟胺(Biotin-Aminooxy, BA)的结构基础上,合成了含有化学切割可断裂基团偶氮苯(Azo)^[22]、*N*-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧环己基)乙基(Dde)^[23]与光切割可断裂基团邻硝基苄基(Nbz)^[24]的双功能探针[生物素-偶氮苯-氧胺(BAA)、生物素-*N*-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧环己基)乙基-氧胺(BDA)、生物素-邻硝基苄基-氧胺(BNA)](图1).本文对可断裂双功能探针的标记与富集效率、切割效率、蛋白回收率等性能进行了评估.最后将其应用于活细胞表面糖蛋白的标记富集流程中:将细胞表面的糖蛋白

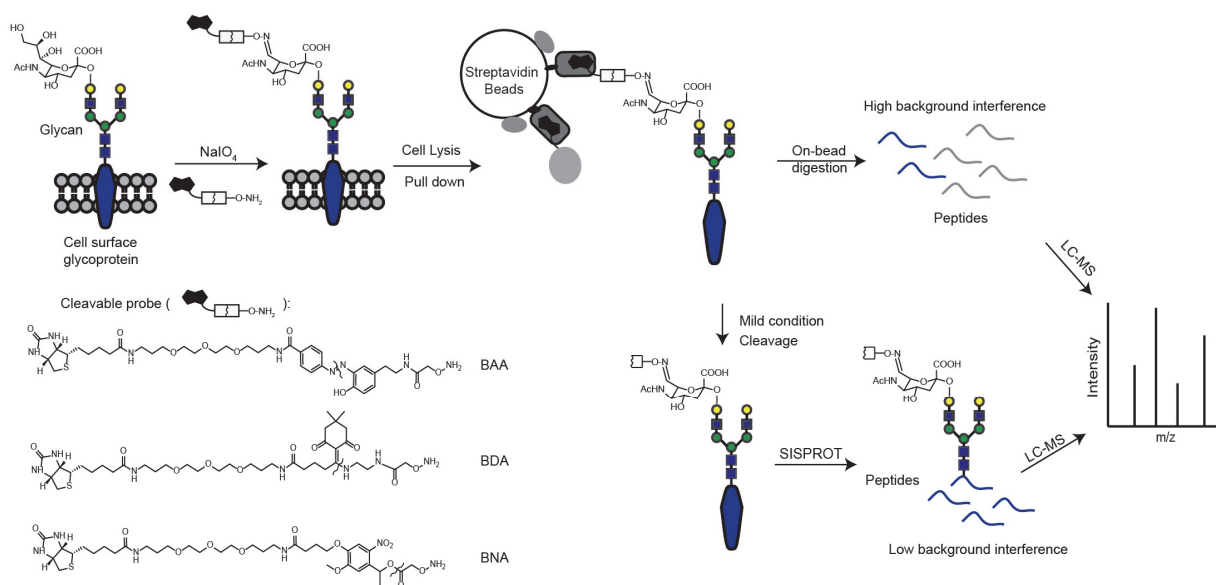


图1 基于可断裂双功能探针的细胞表面糖蛋白分析流程图

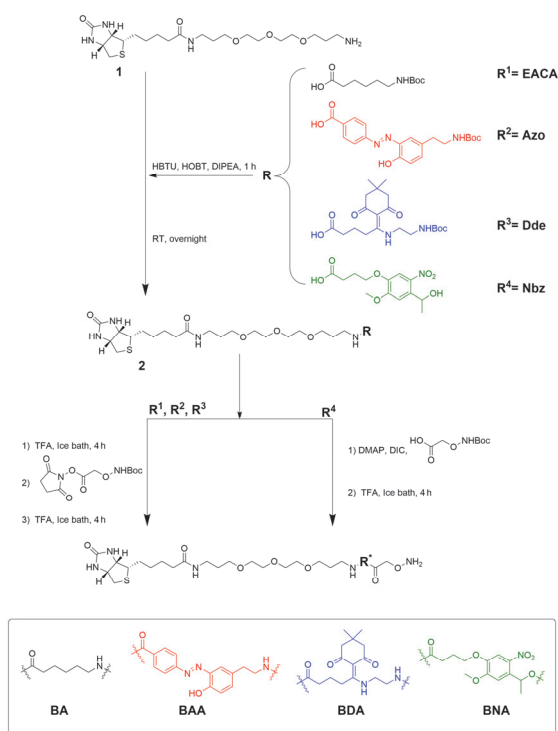
Figure 1 Workflow of cell surface glycoprotein identification using cleavable bifunctional probes

白氧化标记后,以链霉亲和素琼脂糖微球对其进行富集.对富集后的微球进行切割与洗脱条件处理,收集切割及洗脱液,并结合本课题组基于离心力的集成化蛋白质组学样品前处理技术(Simple and integrated spintip-based proteomics technology, SISPROT)^[25-26]对其进行酶解与除盐,随后进行质谱鉴定.其操作流程如图1所示.质谱结果显示可断裂双功能探针能显著提高细胞表面糖蛋白鉴定的灵敏度与选择性.本实验为可断裂基团的选择与使用提供了依据,并为高灵敏度、高选择性的糖蛋白质谱分析提供了新的工具.

2 结果与讨论

2.1 探针的合成

本文所使用的探针结构及合成路径如 Scheme 1 所示,探针的一端以生物素(Biotin)官能团作为富集基团,另一端以羟胺(Aminooxy)作为标记基团.为了增加探针的亲水性和生物相容性在探针结构中引入了聚乙二醇(PEG)链.其详细的合成过程及表征结果见实验部分.



图式 1 双功能探针 BA 及可断裂双功能探针 BAA、BDA、BNA 的合成

Scheme 1 The synthesis of the bifunctional probe BA and cleavable bifunctional probes BAA, BDA, BNA

2.2 探针标记与蛋白富集效果考察

本文将胎球蛋白(Fetuin)作为实验的样品蛋白测定了可断裂双功能探针的标记效果.胎球蛋白分子量约为 64 kDa,为高度糖基化的蛋白,是糖蛋白分析方法考察中常见的模型蛋白^[27].如图 2A 所示,以不加探针的情况为阴性对照,以双功能探针 BA 为阳性对照,可断裂

双功能探针组均可在蛋白免疫印迹法(WB)中检测到糖蛋白上的生物素信号,表明可断裂双功能探针 BAA、BDA、BNA 均能对糖蛋白的标记.

标记后的糖蛋白与链霉亲和素琼脂糖微球孵育,以考马斯亮蓝染色法考察孵育后上清溶液与微球上富集的蛋白的量.如图 2B 所示,不加探针时, Fetuin 均保留在上清中.而双功能探针 BA 与可断裂双功能探针 BAA、BDA、BNA 标记后的 Fetuin 均被微球富集,表明了可断裂双功能探针较高的标记效率与优越的蛋白富集效果.

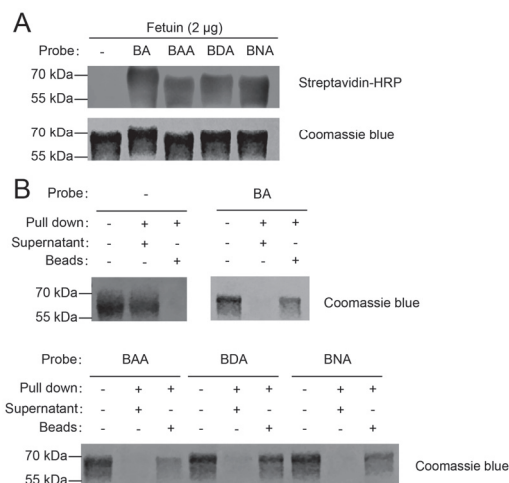


图 2 (A)探针的标记效果.以蛋白免疫印迹法(WB)检测标记后 Fetuin 上生物素的信号. (B)标记蛋白的富集效果.以链霉亲和素琼脂糖微球富集标记探针后的 Fetuin.以考马斯亮蓝染色法检测富集后上清与微球中蛋白的总量.左侧泳道:标记探针后的 Fetuin;中间泳道:与链霉亲和素琼脂糖微球孵育后的上清;右侧泳道:孵育后煮样的微球

Figure 2 (A) Labelling efficiency of the probes. Detection of the signal of biotin in labelled Fetuin by western blot (WB). (B) Enrichment effect of labelled protein. Enrich labelled Fetuin by Streptavidin beads and detect the Fetuin in supernatant and beads by Coomassie blue. Left lane: Labelled Fetuin. Middle lane: supernatant after capture with Streptavidin beads. Right lane: boiled beads after capture

2.3 探针最佳切割时间与蛋白回收率考察

根据文献的报道^[16-18],可断裂基团 Azo、Dde、Nbz 的切割条件分别为 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、2% N_2H_4 、365 nm 紫外光照.如图 3A 所示,三种可断裂探针标记的 Fetuin 溶液分别以上述条件处理 10、30 和 60 min,以 WB 法检测蛋白上生物素的残留量,从而确定探针的最佳切割时间.结果显示,三种可断裂基团均在 60 min 达到了最佳切割效果.

此外,三种可断裂探针在切割条件下切割 60 min 后,以糖蛋白上生物素的残留量比较三者的切割效率.结果显示, BAA 探针在切割后存在微量的生物素残留,其切割效率略低于其余两者, BDA、BNA 探针在切割后蛋白上无生物素残留,均能实现完全断裂.

为了考察三种探针富集糖蛋白的回收率, Fetuin 在被探针标记后通过链霉亲和素琼脂糖微球富集.使用上述的切割条件处理微球,并检测回收至上清中的糖蛋白

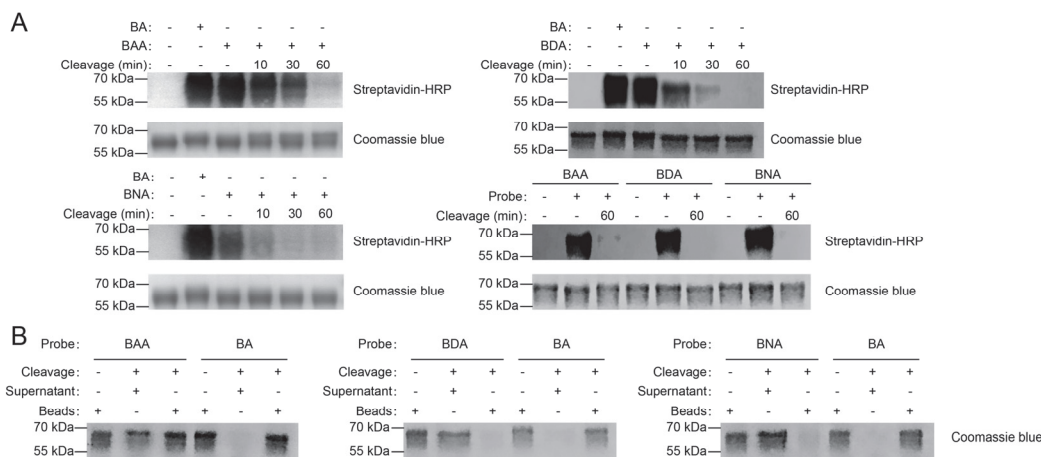


图 3 (A) 探针的最佳切割时间与探针的切割效率. 以切割条件 BAA-50 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$; BDA-2% N_2H_4 ; BNA-365 nm UV 分别对标记了探针的 Fetuin 处理 10 min、30 min、60 min, 然后检测胎球蛋白上剩余的生物素含量. (B) 标记蛋白的回收率. 对微球进行切割及洗脱条件处理后, 检测上清与微球中蛋白的量. 左侧泳道: 孵育后直接煮样的微球; 中间泳道: 对孵育后的微球进行切割与洗脱处理后收集合并的上清; 右侧泳道: 孵育后进行切割与洗脱处理后煮样的微球

Figure 3 (A) The best cleavage time and cleavage efficiency of different probes. Treat Fetuin labelled by different cleavable probes with different condition (BAA-50 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$; BDA-2% N_2H_4 ; BNA-365 nm UV) for 10 min, 30 min and 60 min. Detection of the remaining biotin in fetuin. (B) The recovery of labelled protein. Evaluation of the elution of Fetuin from Streptavidin beads. Left lane: boiled beads after capture. Middle lane: supernatant after cleavage and elution. Right lane: boiled beads after cleavage and elution

(middle lane)与残留在微球上的糖蛋白的量(Right lane). 回收率为切割洗脱后上清中糖蛋白的量(Middle lane)与富集的糖蛋白总量(Left lane)的比值. 如图 3B 所示, BAA 探针的蛋白回收率约为 50%, BDA、BNA 探针的蛋白回收率均高于 95%. 因此, 后续实验以 BDA 及 BNA 探针为主要的研究对象.

2.4 切割条件的温和性与细胞裂解液中蛋白的回收率测试

链霉亲和素琼脂糖微球与细胞裂解液共同孵育, 以切割及洗脱条件对微球进行处理, 从而考察切割洗脱条件对非特异性吸附蛋白的影响. 如图 4A 所示, 无论是 2% N_2H_4 还是 365 nm 紫外光照的切割条件, 对非特异性吸附的蛋白影响都较小. 切割及洗脱后, 链霉亲和素与绝大部分非特异性吸附的蛋白保留在微球上. 这证明切割及洗脱条件较为温和, 不会洗脱非特异性吸附蛋白.

受此鼓舞, 细胞裂解液中蛋白的回收率测试. 如图 4B 所示, 考马斯亮蓝染色结果显示, 在 100 倍细胞裂解液蛋白的高背景干扰下, 标记了可断裂探针 BDA、BNA 的 Fetuin, 均能被高效回收, 其回收率(Lane 4 与 Lane 3 的比值)均大于 95%, 且非特异性吸附蛋白与链霉亲和素均保留在微球(Lane 5)上, 实现了标记的糖蛋白与链霉亲和素、非特异性吸附蛋白分离的效果. 此结果证明可断裂双功能探针 BDA、BNA 与细胞裂解液的兼容性. 并且, 标记的糖蛋白可实现温和条件下的选择性回收, 为后续的应用奠定了基础.

2.5 细胞表面糖蛋白鉴定

探针 BNA 的切割过程不需要引入额外的化学试剂, 对后续酶解及质谱分析影响较小. 因此, BNA 探针被用

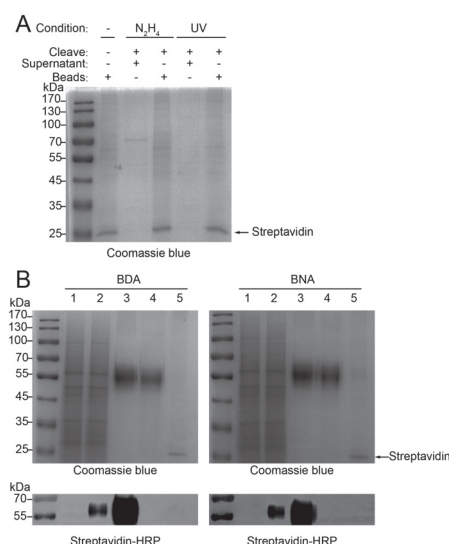


图 4 (A) 切割条件的温和性考察. 将链霉亲和素琼脂糖微球与细胞裂解液孵育. (B) 细胞裂解液中蛋白的回收率测试. 在 400 μg 的细胞裂解液中加入 4 μg 标记探针的 Fetuin, 加入链霉亲和素琼脂糖微球孵育. 第 1 泳道: 细胞裂解液(4 μg); 第 2 泳道: 加入 0.04 μg 标记的 Fetuin 的 4 μg 细胞裂解液; 第 3 泳道: 标记探针的 Fetuin (4 μg); 第 4 泳道: 对微球进行切割洗脱后的上清; 第 5 泳道: 进行切割与洗脱处理后煮样的微球

Figure 4 (A) Investigation of the gentleness of cutting conditions. Incubate Streptavidin beads with cell lysate. (B) Determination of protein recovery in cell lysate. Determination of protein recovery in cell lysate. Lane 1: 4 μg cell lysate. Lane 2: 4 μg cell lysate with 0.04 μg labelled Fetuin. Lane 3: 4 μg labelled Fetuin. Lane 4: Supernatant after cleavage and elution. Lane 5: boiled beads after cleavage and elution

于细胞表面糖蛋白的质谱鉴定实验中. 传统的在微球上直接进行酶解(On-bead digestion)为本次实验的对照组. 富集后进行切割洗脱为本次实验的实验组. 其结果如图 5 所示. 首先, 我们将鉴定到的蛋白以 Uniprot 数据库进

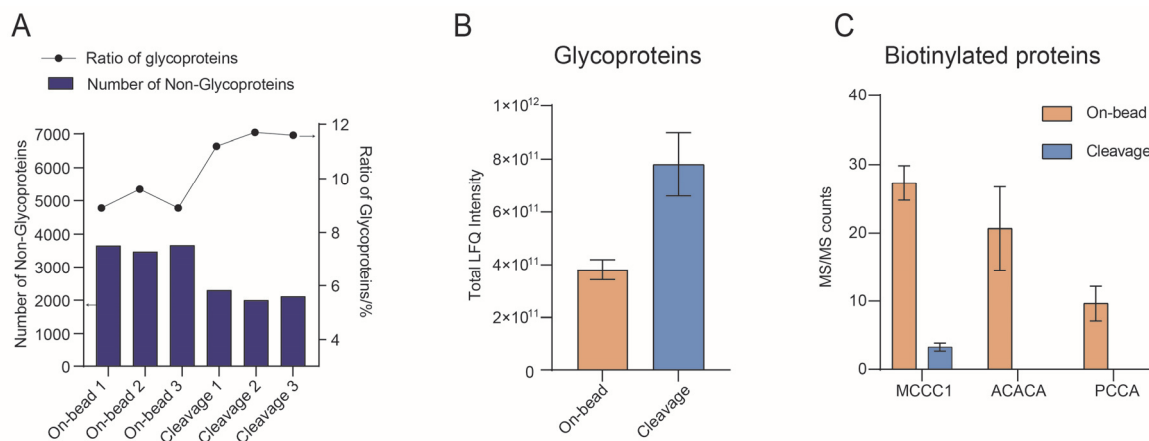


图 5 将细胞表面糖蛋白用可断裂双功能探针进行标记,并用链霉亲和素琼脂糖微球富集进行富集.以传统的 On-bead digestion 方法为对照组,以切割洗脱的方法为实验组.在两组实验组鉴定到的(A)非糖蛋白的数目以及糖蛋白的占比;(B)糖蛋白总的无标定量分析强度对比;(C)内源性生物素化蛋白(如 MCCC1、ACACA、PCCA)的 MS/MS 数目对比

Figure 5 Label the cell surface glycoproteins by cleavable bifunctional probe and pull down it by Streptavidin beads. Take On-bead digestion as control group and take cleavage as experimental group. (A) The number of non-glycoproteins and the ratio of glycoproteins in different groups; (B) the total LFQ intensity of glycoproteins in different groups; (C) the MS/MS counts of endogenously biotinylated proteins (such as MCCC1, ACACA, PCCA) in different groups

行注释,其中对照组鉴定到的非糖蛋白平均数目为 3564,实验组鉴定到非糖蛋白平均数目为 2139.实验组中非糖蛋白数目较对照组降低了 40%.对照组中糖蛋白的占比为 9.1%,实验组中糖蛋白的占比提升到了 11.5% (图 5A).无标定量(label-free quantification, LFQ)分析结果显示,切割洗脱方法得到的总糖蛋白的 LFQ 强度比传统的 on-bead 酶解方法提升了 104.2% (图 5B).

在哺乳动物细胞中存在内源性的生物素化蛋白,在基于链霉亲和素富集的方法中被同时富集,从而对目标蛋白的分析造成干扰^[28].在传统的 On-bead digestion 方法中,本实验鉴定到了 Raji 细胞中三种主要的内源性生物素化蛋白 MCCC1、ACACA 和 PCCA (图 5C).定量分析结果表明,与 on-bead digestion 方法相比,切割洗脱方法鉴定的内源性生物素化蛋白的 MS/MS 数目降低了 94.3%.

综上所述,可断裂双功能探针能有效地降低糖蛋白富集过程中非特异性吸附蛋白、内源性生物素化蛋白和链霉亲和素等背景蛋白的干扰,提高糖蛋白质谱定性定量分析的灵敏度与选择性.

3 结论

本文设计并合成了基于点击化学的可断裂双功能探针,对其性能进行了系统的考察,并将其应用于细胞表面糖蛋白的富集与质谱鉴定中.实验结果证明可断裂双功能探针切割条件温和,对标记蛋白的回收率高,可以有效地降低糖蛋白富集过程中背景蛋白的干扰,提高糖蛋白质谱鉴定的灵敏度与选择性.该探针为糖蛋白的深度鉴定提供了新的工具.

4 实验部分

4.1 仪器与试剂

Orbitrap Exploris 480 质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司)、紫外交联仪(美国 UVP 公司)、3 kD 截留超滤管(美国 Millipore 公司)、Fetuin、64% N₂H₄(美国 Sigma-Aldrich 公司)、Na₂S₂O₄(北京百灵威公司)、[(叔丁氧羰基)氨基氧]乙酸 *N*-琥珀酰亚胺酯、叔丁氧羰基氨基氧基乙酸、三氟乙酸(TFA)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、*N,N'*-二异丙基碳二亚胺(DIC)、*N,N'*-二异丙基乙胺(DIPEA) (上海毕得医药)、*O*-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)、1-羟基苯并三唑(HOBT)(上海强耀公司)、高效链霉亲和素琼脂糖微球(Streptavidin beads) (美国 GE HealthCare 公司)、SISPROT(深圳贝普奥生物科技有限公司).

4.2 探针的合成

化合物 **1**^[29],可断裂基团 Azo^[22]、Dde^[23]、Nbz^[24]按文献报道的方法合成.

4.2.1 化合物 **2** 的合成

将 0.4 mmol 可断裂基团 Azo、Dde、Nbz 或叔丁氧羰基-6-氨基己酸(EACA)溶于 15 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中,依次加入 190 mg *O*-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU), 70 mg 1-羟基苯并三唑(HOBT), 65 mg *N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA),室温反应 1 h.将 0.4 mmol 化合物 **1** 溶解于 10 mL DMF 中加入 DIPEA 使其 pH=8,将其逐滴加入至活化的可断裂基团或叔丁氧羰基-6-氨基己酸的溶液中,室温反应过夜.待反应完全后,旋蒸除去 DMF,柱层析纯化[V(二氯甲烷):V(甲醇)=5:1],得到化合物 **2** (R¹=EACA,产率 95%; R²=Azo,产率 31%; R³=Dde,产率 32%; R⁴=Nbz,产率 47%).取 100 mg 的化合物 **2** 进行下一步反应.

4.2.2 探针的合成

当化合物 **2** 中 **R** 为 EACA、Azo、Dde 时. 将化合物 **2** 溶于 20 mL 二氯甲烷(DCM)中, 加入 1 mL 三氟乙酸(TFA), 冰浴下反应 4 h, 去除溶剂, 加入 DCM 旋蒸 3 次. 以 10 mL DMF 复溶, 并加入适量 DIPEA, 使 pH=8, 加入 50 mg [(叔丁氧羰基)氨基氧]乙酸 *N*-琥珀酰亚胺酯, 室温过夜反应. 待反应完全后, 旋蒸除去 DMF, 柱层析纯化 [*V*(二氯甲烷): *V*(甲醇)=5:1]. 纯化后的产物溶于 10 mL DCM 中, 加入 0.5 mL TFA, 冰浴下反应 4 h, 反应后旋蒸去除溶剂, 加入 DCM 旋蒸 3 次, 经制备液相色谱分离得到探针 BA. 色谱条件: 流动性 A 相为水-三氟乙酸溶液(*V*:*V*=100:0.1), 流动相 B 相为乙腈-三氟乙酸溶液(*V*:*V*=100:0.1), 流速为 10 mL/min, 分离梯度: 0 min, 20% B; 1 min, 20% B; 15 min, 80% B; 17 min, 80% B; 18 min, 20% B. 得到探针 BA 24 mg, 产率为 26%. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.16 (s, 1H), 7.76 (q, *J*=5.2 Hz, 2H), 6.41 (d, *J*=37.2 Hz, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.30 (dd, *J*=7.7, 5.1 Hz, 1H), 4.12 (dd, *J*=7.9, 4.4 Hz, 1H), 3.54~3.31 (m, 11H), 3.14~2.99 (m, 6H), 2.81 (dd, *J*=12.5, 5.1 Hz, 1H), 2.57 (d, *J*=12.4 Hz, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.04 (q, *J*=6.9 Hz, 3H), 1.60 (p, *J*=6.8 Hz, 4H), 1.53~1.37 (m, 6H), 1.35~1.16 (m, 4H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ : 172.41, 167.47, 163.21, 158.66, 72.12, 70.23, 70.00, 68.56, 61.53, 59.67, 55.90, 38.68, 36.19, 35.77, 35.67, 29.87, 29.17, 28.69, 28.51, 26.52, 25.77, 25.44; HRMS calcd for C₂₈H₅₃N₆O₈S [M+H]⁺ 633.3567, found 633.3637.

探针 BAA 18.3 mg, 产率为 19%. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.62 (t, *J*=5.6 Hz, 1H), 8.32 (t, *J*=5.7 Hz, 1H), 8.04 (s, 3H), 7.74 (t, *J*=5.6 Hz, 1H), 7.62 (d, *J*=2.2 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J*=8.4, 2.3 Hz, 1H), 7.03 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 4.44 (s, 2H), 4.30 (dd, *J*=7.7, 5.0 Hz, 1H), 4.13 (dd, *J*=7.7, 4.4 Hz, 1H), 3.53 (dq, *J*=9.4, 4.6 Hz, 6H), 3.52~3.46 (m, 3H), 3.47 (d, *J*=4.1 Hz, 1H), 3.38 (tt, *J*=9.8, 6.2 Hz, 5H), 3.34 (d, *J*=6.6 Hz, 1H), 3.12~3.05 (m, 3H), 2.81 (dd, *J*=12.5, 5.1 Hz, 1H), 2.76 (t, *J*=7.2 Hz, 2H), 2.58 (d, *J*=12.4 Hz, 1H), 2.05 (dd, *J*=15.5, 8.0 Hz, 2H), 1.79 (p, *J*=6.6 Hz, 2H), 1.65~1.56 (m, 3H), 1.56~1.47 (m, 2H), 1.47~1.41 (m, 1H), 1.36~1.22 (m, 2H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ : 172.41, 167.26, 165.86, 163.20, 159.19, 158.94, 158.69, 158.44, 153.39, 138.78, 136.87, 135.10, 130.98, 128.84, 122.88, 122.21, 118.77, 116.82, 114.90, 71.70, 70.27, 70.24, 70.05, 70.01, 68.73, 68.57, 61.51, 59.66, 55.88, 37.28, 36.19, 36.06, 35.67, 34.36, 29.86, 29.80, 28.68, 28.49, 25.77; HRMS calcd for C₃₇H₅₅N₈O₉S [M+H]⁺ 787.3734, found 787.3796.

探针 BDA 13 mg, 产率为 13%. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 13.29 (t, *J*=5.8 Hz, 1H), 8.49 (t, *J*=5.7 Hz,

1H), 7.87 (t, *J*=5.6 Hz, 1H), 7.76 (t, *J*=5.6 Hz, 1H), 4.30 (dd, *J*=7.7, 5.1 Hz, 1H), 4.13 (dd, *J*=7.8, 4.4 Hz, 1H), 3.60 (q, *J*=5.7, 5.2 Hz, 2H), 3.48 (dd, *J*=22.7, 4.7 Hz, 8H), 3.38 (t, *J*=6.1 Hz, 6H), 3.07 (dq, *J*=12.5, 6.6 Hz, 5H), 2.90 (s, 2H), 2.82 (dd, *J*=12.4, 5.1 Hz, 1H), 2.59 (t, *J*=14.4 Hz, 2H), 2.28 (s, 4H), 2.18 (t, *J*=7.3 Hz, 2H), 2.04 (t, *J*=7.4 Hz, 2H), 1.69~1.55 (m, 7H), 1.55~1.41 (m, 3H), 1.38~1.22 (m, 2H), 0.94 (s, 6H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ : 186.94, 176.07, 172.41, 167.84, 163.19, 158.91, 158.66, 115.06, 107.69, 71.83, 70.23, 70.00, 68.57, 59.66, 55.89, 52.90, 37.86, 36.30, 36.18, 35.67, 30.12, 29.87, 29.82, 28.68, 28.50, 28.28, 27.53, 25.77, 23.72; HRMS calcd for C₃₇H₆₄N₇O₁₀S [M+H]⁺ 798.4357, found 798.4414.

当化合物 **2** 中 **R** 为 Nbz 时. 向圆底烧瓶中加入 170 mg 叔丁氧羰基氨基氧基乙酸并以 10 mL DCM 溶解, 依次加入 10 mg 4-二甲氨基吡啶(DMAP)和 500 mg *N,N'*-二异丙基碳二亚胺(DIC), 搅拌均匀后加入化合物 **2**, 室温过夜反应. 待反应完全后, 旋蒸除去 DCM, 柱层析纯化 [*V*(二氯甲烷): *V*(甲醇)=5:1]. 纯化后的产物溶于 10 mL DCM 中, 加入 0.5 mL TFA, 冰浴下反应 4 h, 反应后旋蒸去除溶剂, 加入 DCM 旋蒸 3 次, 经制备液相色谱分离(色谱条件与上文相同)得到探针 BNA 12.7 mg, 产率为 12%. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.86 (t, 1H), 7.76 (t, *J*=5.6 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.34 (q, *J*=6.4 Hz, 1H), 4.76~4.66 (m, 2H), 4.31 (dd, *J*=7.7, 5.1 Hz, 1H), 4.13 (dd, *J*=7.8, 4.4 Hz, 1H), 4.06 (t, *J*=6.5 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.51 (t, *J*=4.7 Hz, 4H), 3.46 (dd, *J*=5.7, 3.3 Hz, 4H), 3.38 (t, *J*=6.4 Hz, 4H), 3.08 (dq, *J*=12.6, 6.4 Hz, 5H), 2.82 (dd, *J*=12.5, 5.1 Hz, 1H), 2.58 (d, *J*=12.4 Hz, 1H), 2.23 (t, *J*=7.4 Hz, 2H), 2.05 (t, *J*=7.4 Hz, 2H), 1.99~1.91 (m, 2H), 1.62 (dt, *J*=13.4, 6.7 Hz, 8H), 1.56~1.50 (m, 1H), 1.50~1.47 (m, 1H), 1.47~1.41 (m, 1H), 1.36~1.23 (m, 2H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ : 172.39, 171.75, 167.82, 163.18, 158.91, 158.66, 154.11, 147.62, 140.07, 131.51, 116.79, 114.87, 109.40, 108.84, 70.94, 70.23, 70.00, 69.14, 68.86, 68.56, 61.50, 59.65, 56.78, 55.88, 36.29, 36.18, 36.05, 35.67, 31.99, 29.87, 29.81, 28.68, 28.50, 25.76, 25.09, 21.79; HRMS calcd for C₃₅H₅₇N₆O₁₃S [M+H]⁺ 801.3626, found 801.3691.

4.3 探针标记与蛋白富集效果考察

4.3.1 探针标记

取 35 μ L Fetuin 溶液(100 mmol/L 醋酸钠, 200 mmol/L NaCl, pH=5.5, 1 μ g/ μ L), 加入 0.7 μ L 0.1 mol/L NaIO₄水溶液, 摇匀, 置于 4 $^{\circ}$ C, 避光反应 30 min. 随后加入 0.7 μ L 0.2 mol/L Na₂S₂O₃水溶液, 摇匀, 室温震荡 5 min. 最后加入 1 μ L 10 mmol/L 探针和 0.4 μ L 苯胺

(aniline) 催化剂, 摇匀, 室温震荡 2 h. 使用 10% SDS-PAGE, 在 120 V 恒定电压下分离样品. 以 200 mA 恒定电流湿法转膜 2 h 后, 采用牛血清白蛋白封闭, 在室温下孵育 Streptavidin-HRP 抗体 20 min (1:5000 稀释抗体).

4.3.2 蛋白富集效果考察

如上进行探针标记后, 超滤三次除去多余探针. 在体系中加入 10 μ L 链霉亲和素琼脂糖微球在 4 $^{\circ}$ C 过夜以富集标记蛋白. 富集后, 上清和微球分别置于 98 $^{\circ}$ C 中加热 10 min, 在凝胶电泳分离后, 使用考马斯亮蓝染色.

4.4 探针切割条件优化与回收率考察

4.4.1 探针切割条件优化与切割效率考察

使用 BAA、BDA、BNA 分别标记 Fetuin, 再使用相应的切割条件(50 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、2% N_2H_4 、365 nm UV)分别处理 10 min、30 min、60 min. 使用凝胶电泳分离产物后进行转膜、封闭和 Streptavidin-HRP 抗体孵育, 以考察三者的切割效率.

4.4.2 回收率考察

对 Fetuin 进行探针标记和富集后, 用 RIPA 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl (pH=7.4), 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.25% 脱氧胆酸钠)和磷酸盐缓冲液(PBS)分别洗涤链霉亲和素琼脂糖微球两次. 离心, 除去上清. 对微球使用不同的条件进行切割处理. 在 BAA 组中向微球中加入 20 μ L 75 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的 PBS 溶液, 室温震荡 30 min, 重复一次; 在 BDA 组中向微球中加入 20 μ L 3% N_2H_4 的 PBS 溶液, 室温震荡 30 min, 重复一次; 在 BNA 组中向微球中加入 20 μ L 的 PBS 溶液, 以 365 nm 波长的紫外光照射 20 min 后重新摇匀, 重复两次. 切割完成后使用 20 μ L 150 mmol/L Tris-HCl (pH=7.6) 对微球洗脱三次, 每次 3 min. 合并切割及洗脱的上清.

4.5 非特异性吸附与细胞裂解液中蛋白的回收率测试

4.5.1 非特异性吸附及切割条件影响

向 400 μ L 293T 细胞裂解液中(1 μ g/ μ L)加入 10 μ L 链霉亲和素琼脂糖微球在 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, 洗涤后, 加入不同的切割洗脱条件, 合并上清.

4.5.2 细胞裂解液中蛋白的回收率测试

取 4 μ g 标记探针的 Fetuin, 加入到 400 μ L 293T 细胞裂解液中(1 μ g/ μ L), 再加入 10 μ L 链霉亲和素琼脂糖微球在 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, 洗涤后, 加入不同的切割洗脱条件, 合并上清, 冻干. 对切割洗脱后的 Beads 进行 98 $^{\circ}$ C 高温煮样 10 min, 以释放非特异性吸附蛋白.

4.6 细胞表面糖蛋白鉴定

以冰浴的 1 mL PBS 清洗 Raji 细胞两次, 离心(400 rcf, 4 $^{\circ}$ C, 5 min), 除去上清. 加入 1 mL PBS 吹打使细胞悬浮, 将其分装为六管. 加入 0.1 mol/L NaIO_4 使其浓度为 1.6 mmol/L, 在 4 $^{\circ}$ C 下反应 20 min. 随后以 1 mL

PBS 洗涤三次以除去 NaIO_4 , 离心除上清后, 加入 1 mL PBS 使其重新悬浮, 并加入 3 μ L 33 mmol/L BNA 探针与 1 μ L 苯胺(aniline)催化剂, 4 $^{\circ}$ C 下反应 2 h, 标记完成后以 1 mL PBS 洗涤三次以除去探针, 离心除上清. 加入 400 μ L 的 RIPA(强)裂解液, 置于冰上超声 30 s 裂解细胞, 离心(17000 rcf, 4 $^{\circ}$ C, 5 min)取上清, 加入 10 μ L 链霉亲和素琼脂糖微球在 4 $^{\circ}$ C 过夜以富集标记蛋白.

富集后, 对微球进行洗涤. 实验组进行切割, 切割及洗脱后的上清以 SISPROT 进行酶解及除盐处理. 对照组加入 40 μ L 50 mmol/L 碳酸氢铵后, 在微球上进行酶解. 将酶解后的多肽样品进行液相色谱串联质谱(LC-MS)分析. 色谱条件: 流动性 A 相为水-甲酸溶液($V:V=100:0.1$), 流动相 B 相为水-乙腈-甲酸溶液($V:V:V=20:80:0.1$), 流速为 0.3 μ L/min, 分离梯度: 0 min, 3% B; 1 min, 8% B; 52 min, 28% B; 60 min, 45% B; 62 min, 95% B. 质谱条件: Orbitrap Exploris 480 质谱仪, 纳流喷雾(Nanospray ionization, NSI)离子源, 电压为 2100 V, 毛细管温度为 320 $^{\circ}$ C; 一级谱参数: Orbitrap 分析器, 扫描范围 m/z 400~12000, 分辨率 60000, 最大注入时间 45 ms; 二级谱参数: Orbitrap 分析器, 分辨率 15000. 质谱数据以 Proteome Discoverer1.4 和 MaxQuant 1.6.14 进行搜库. 参数设置为: 酶的特异性设置为 Trypsin/P, 最多允许两个酶切遗漏点; 固定修饰设置为半胱氨酸烷基化, 可变修饰设置为甲硫氨酸氧化和天冬酰胺脱酰胺化. 以 Uniprot 数据库对搜库结果中的糖蛋白进行定位与注释.

References

- [1] Pirro, M.; Schoof, E.; van Vliet, S. J.; Rombouts, Y.; Stella, A.; de Ru, A.; Mohammed, Y.; Wührer, M.; van Veelen, P. A.; Hensbergen, P. J. *J. Proteome Res.* **2019**, *18*, 1125.
- [2] Kailemia, M. J.; Xu, G.; Wong, M.; Li, Q.; Goonatilake, E.; Leon, F.; Lebrilla, C. B. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 208.
- [3] Venkatakrishnan, V.; Packer, N. H.; Thaysen-Andersen, M. *Expert Rev. Respir. Med.* **2013**, *7*, 553.
- [4] Shi, Y.; Gao, W.; Lytle, N. K.; Huang, P.; Yuan, X.; Dann, A. M.; Ridinger-Saison, M.; DelGiorno, K. E.; Antal, C. E.; Liang, G.; Atkins, A. R.; Erikson, G.; Sun, H.; Meisenhelder, J.; Terenziani, E.; Woo, G.; Fang, L.; Santisakultarm, T. P.; Manor, U.; Xu, R.; Becerra, C. R.; Borazanci, E.; Von Hoff, D. D.; Grandgenett, P. M.; Hollingsworth, M. A.; Leblanc, M.; Umetsu, S. E.; Collisson, E. A.; Scadeng, M.; Lowy, A. M.; Donahue, T. R.; Reya, T.; Downes, M.; Evans, R. M.; Wahl, G. M.; Pawson, T.; Tian, R.; Hunter, T. *Nature* **2019**, *569*, 131.
- [5] Campos-da-Paz, M.; Dorea, J. G.; Galdino, A. S.; Lacava, Z. G. M.; de Fatima Menezes Almeida Santos, M. *Recent Pat. Biotechnol.* **2018**, *12*, 269.
- [6] Saavedra, D.; Crombet, T. *Front Immunol.* **2017**, *8*, 269.
- [7] Riley, N. M.; Bertozzi, C. R.; Pitteri, S. J. *Mol. Cell Proteomics* **2021**, *20*, 100029.
- [8] Suttapitugsakul, S.; Sun, F.; Wu, R. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 267.
- [9] Zhang, L.; Du, X.; Zeng, Y. *Acta Chim. Sinica* **2016**, *74*, 149 (in Chinese). (张丽霞, 杜秀芳, 曾盈, 化学学报, **2016**, *74*, 149.)
- [10] Li, Y.; Peng, Y.; Lu, H. *Acta Chim. Sinica* **2021**, *79*, 705 (in Chinese). (李月悦, 彭叶, 陆豪杰, 化学学报, **2021**, *79*, 705.)
- [11] Bao, H.; Xie, L.; Lu, H. *Se Pu* **2016**, *34*, 1145 (in Chinese). (包慧敏, 谢力琦, 陆豪杰, 色谱, **2016**, *34*, 1145.)
- [12] Liu, L.; Qin, H.; Ye, M. *Se Pu* **2021**, *39*, 1045 (in Chinese). (刘璐瑶, 秦洪强, 叶明亮, 色谱, **2021**, *39*, 1045.)
- [13] Xiong, Y.; Cheng, M.; Lu, H. *Fenxi Huaxue* **2021**, *49*, 1597 (in Chi-

- nese). (熊莹莹, 程孟霞, 陆豪杰, 分析化学, **2021**, 49, 1597.)
- [14] Duan, L.; Zangiabadi, M.; Zhao, Y. *Chem. Commun.* **2020**, 56, 10199.
- [15] Shu, Q.; Li, M.; Shu, L.; An, Z.; Wang, J.; Lv, H.; Yang, M.; Cai, T.; Hu, T.; Fu, Y.; Yang, F. *Mol. Cell Proteomics*. **2020**, 19, 672.
- [16] Xiao, H.; Chen, W.; Smeekens, J. M.; Wu, R. *Nat. Commun.* **2018**, 9, 1692.
- [17] Zeng, Y.; Ramya, T. N.; Dirksen, A.; Dawson, P. E.; Paulson, J. C. *Nat. Methods*. **2009**, 6, 207.
- [18] Zhang, Y.; Yu, M.; Zhang, C.; Ma, W.; Zhang, Y.; Wang, C.; Lu, H. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 7920.
- [19] Szychowski, J.; Mahdavi, A.; Hodas, J. J.; Bagert, J. D.; Ngo, J. T.; Landgraf, P.; Dieterich, D. C.; Schuman, E. M.; Tirrell, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 18351.
- [20] Yang, Y.; Hahne, H.; Kuster, B.; Verhelst, S. H. *Mol. Cell Proteomics* **2013**, 12, 237.
- [21] Beard, H. A.; Korovesis, D.; Chen, S.; Verhelst, S. H. L. *Mol. Omics* **2021**, 17, 197.
- [22] Eom, T.; Khan, A. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, 18, 420.
- [23] Mnatsakanyan, R.; Markoutsas, S.; Walbrunn, K.; Roos, A.; Verhelst, S. H. L.; Zahedi, R. P. *Nat. Commun.* **2019**, 10, 2195.
- [24] Chang, T. C.; Adak, A. K.; Lin, T. W.; Li, P. J.; Chen, Y. J.; Lai, C. H.; Liang, C. F.; Chen, Y. J.; Lin, C. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 1216.
- [25] Chen, W.; Wang, S.; Adhikari, S.; Deng, Z.; Wang, L.; Chen, L.; Ke, M.; Yang, P.; Tian, R. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 4864.
- [26] Gao, W.; Zhang, Q.; Su, Y.; Huang, P.; Lu, X.; Gong, Q.; Chen, W.; Xu, R.; Tian, R. *Analyst* **2020**, 145, 6441.
- [27] Pace, C. L.; Muddiman, D. C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2020**, 10, 1021.
- [28] Frankenfield, A. M.; Fernandopulle, M. S.; Hasan, S.; Ward, M. E.; Hao, L. *Anal. Chem.* **2020**, 92, 15437.
- [29] Chu, B.; He, A.; Tian, Y.; He, W.; Chen, P.; Hu, J.; Xu, R.; Zhou, W.; Zhang, M.; Yang, P.; Li, S. S. C.; Sun, Y.; Li, P.; Hunter, T.; Tian, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115, E8863.

(Cheng, F.)