

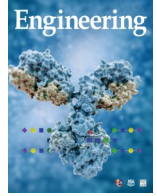


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



Research  
Glycomedicine—Article

## 可去除染料——N-聚糖多方法深入分析中的缺失环节

Samanta Cajic<sup>a,b</sup>, René Hennig<sup>a,b</sup>, Valerian Grote<sup>a</sup>, Udo Reichl<sup>a,c</sup>, Erdmann Rapp<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Max Planck Institute for Dynamics of Complex Technical Systems, Magdeburg 39106, Germany

<sup>b</sup> glyXera GmbH, Magdeburg 39120, Germany

<sup>c</sup> Otto-von-Guericke University, Chair of Bioprocess Engineering, Magdeburg 39106, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 September 2022

Revised 21 December 2022

Accepted 15 February 2023

Available online 1 June 2023

#### 关键词

糖蛋白

N-聚糖

可逆标记

亲水相互作用液相色谱法

毛细管凝胶电泳

质谱分析

### 摘要

随着聚糖在健康和疾病中的作用不断被阐明,很明显,聚糖的巨大复杂性也不可被忽视。为了充分描述聚糖结构,本文开发了一种综合方法,结合了一套成本效益好、应用广泛和易于操作的分析方法。本文工作流程的关键特点是利用可移动荧光标记——以氯甲酸-9-苄基甲酯(Fmoc)为例——来弥补不同糖组学分析方法之间的差距,特别是毛细管电泳-激光诱导荧光检测(xCGE-LIF)和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)。通过对从鸡卵白蛋白、马血清和牛转铁蛋白中选择的复杂N-聚糖的详细结构进行分析,说明了本文所提方法的分析能力。此外,这种方法“可视化”了迄今为止难以识别的N-聚糖——如人类免疫球蛋白A上的硫酸化聚糖——包括聚糖结构的微小变化,期望为生物标志物的发现提供有用的新靶点。

© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

当Karl Landsteiner在1900年将他的6个同事的血清和红细胞混合时[1],他观察到一种凝集效应,这在多年后被归因于糖缀合物的一个基本特征:聚糖结构的微小变化可以产生巨大的影响。在Landsteiner的发现中,红细胞糖缀合物链的倒数第二个单糖上只有一个N-乙酰基(一个小的变化)在A细胞和B细胞之间产生了重要的差异,导致血型不相容(一个巨大的影响)[2]。随着对聚糖结构和功能的认识不断增加,研究人员发现了更多的例子,证实了聚糖的细微差异会转化为重要的(病理)生理效应[3]。虽然癌细胞上的聚糖通常与正常细胞上的聚糖在结

构上只有微小的差异[如岩藻糖(Fuc)、半乳糖(Gal)、唾液酸(SA)的位置和连接,或触角的位置],但它们在癌症的形成和进展中起着重要作用。例如,三种N-聚糖的 $\beta$ 1-6-N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)分支(而不是 $\beta$ 1-4)的增加是在癌症中发现的最常见的N-聚糖结构变化之一,并与增加的转移潜能相关[4–6]。因此,成分分析之外的详细的N-聚糖结构表征对于更深入地理解聚糖在生物过程中的作用,以及寻找特定的糖基生物标记物是至关重要的。

许多基于毛细管电泳(CE)、液相色谱(LC)和质谱(MS)的方法已经被开发用于N-聚糖的分析。这些方法不仅在它们所需的专业知识、运行和维护成本方面有所

\* Corresponding author.

E-mail address: [rapp@mpi-magdeburg.mpg.de](mailto:rapp@mpi-magdeburg.mpg.de) (E. Rapp).

2095-8099/© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

英文原文:Engineering 2023, 26(7): 132–150

引用本文:Samanta Cajic, René Hennig, Valerian Grote, Udo Reichl, Erdmann Rapp. Removable Dyes—The Missing Link for In-Depth N-Glycan Analysis via Multi-Method Approaches. Engineering, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.02.016>

不同, 而且在它们提供的结构信息的类型和数量上也有所不同。质谱检测提供了直接的质量信息(聚糖组成), 但如果没有广泛的碎片分析实验, 该方法通常不能分解聚糖结构异构体, 这有时被认为是过于复杂的[7-8]。相比之下, 基于分离的方法与光学检测相结合, 在简便性以及连接和位置异构体的分辨率方面具有优势; 然而, 这类方法在结构鉴定, 特别是在紧密联系、可能重叠的N-聚糖中的使用, 仅限于使用聚糖标准和酶降解[9-10]。因此, 现有的方法都不能全面提供所有结构信息。因此, 详细的N-聚糖结构表征仍然面临苛刻的分析挑战。

虽然目前的研究工作主要集中在寻找一种单一的“获胜”糖组学方法, 但本文研究团队认为, 只有将各种糖组学分析方法的优点结合起来, 才能解开聚糖结构的全部复杂性。其中一个主要的障碍是广泛的不可逆荧光标记聚糖的还原胺化。虽然某些N-聚糖标记可以提高一种方法的检测能力, 但它们可能对其他方法有害[11-12]。因此, 本研究试图通过利用可裂解的荧光染料来结合“不可组合”的方法。作为概念证明, 本文重新利用了氯甲酸-9-芴基甲酯(Fmoc)标签, 该标签被广泛用作肽合成[13]和制备聚糖库[14]和阵列[15]中的氨基保护基团。本文概述了这种新的分析方法的原理, 并讨论了潜在的瓶颈及其解决方案。此外, 这种可去除染料策略的好处被证明适用于具有挑战性结构(杂合和多重唾液酸化复合型N-聚糖)和修饰(O-乙酰化和硫酸化)的N-聚糖。最后, 即使难以表征, 但具有生物学和临床意义的相关N-聚糖, 也可以通过将用于降低聚糖样品复杂性的分馏方法[由亲水相互作用液相色谱-高效液相色谱-荧光检测(HILIC-HPLC-FLD)提供]与高通量分离和高分辨率分离方法[由毛细管电泳-激光诱导荧光检测(xCGE-LIF)提供]以及聚糖组成的快速测定[由基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)提供]来阐明。

## 2. 方法

### 2.1. 材料

使用的所有材料都列在附录A中。水溶液用下标“aq”表示。

### 2.2. 一般方法

通过光谱分析法很难检测到聚糖。为了使聚糖能够被荧光检测器检测到, 首先用Fmoc对聚糖进行衍生化。通过HILIC-HPLC-FLD对Fmoc标记的聚糖混合物进行分离, 降低了通过xCGE-LIF、MALDI-TOF-MS或任何其他

方法进行进一步分析的复杂性。由于使用了可裂解染料Fmoc, 因此可以使用适当的方法进行分析, 无论它们是Fmoc标记、未标记或标记特异性方法的染料, 如xCGE-LIF分析的8-氨基苾-1,3,6-三磷酸三钠盐(APTS)、HILIC-HPLC-FLD分析的2-氨基苯甲酰胺(2-AB), 或任何其他标记(更多标记概述, 包括还原胺化标记和糖基胺标记, 在最近的综述[16]中提供)。因此, 可以用互补的方法并行分析等碎片, 以获得全谱的结构信息。所有步骤都经过仔细优化, 以增加释放的糖基胺、标记的聚糖和回收的碎片的数量。最后的最优条件如下文所述。实验工作流程如图1所示(请参考[17-19]绘制多聚糖结构)。

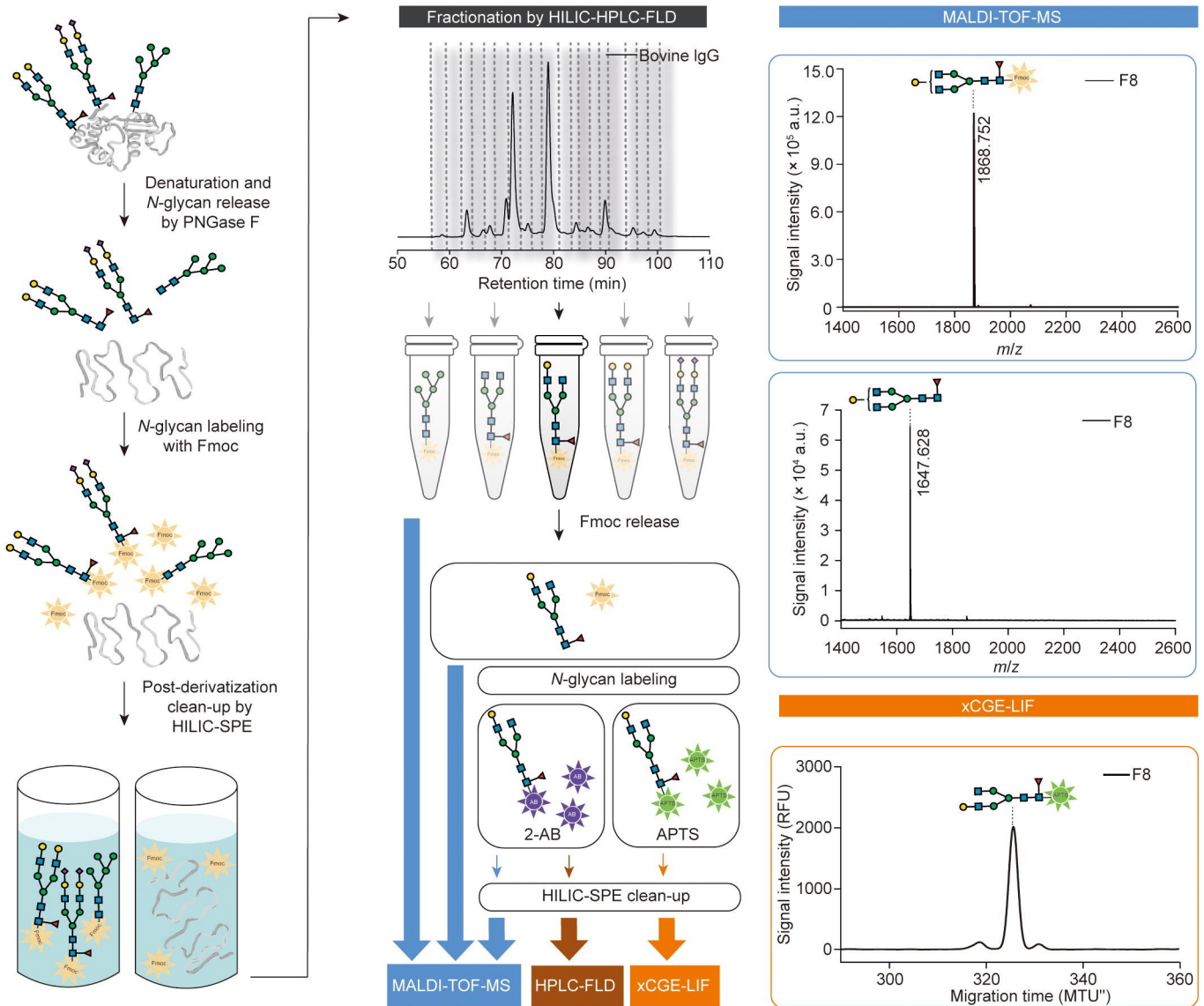
### 2.3. 从糖蛋白中释放的N-聚糖

用肽N-糖苷酶F(PNGase F)从糖蛋白中酶解释放N-聚糖。由于Fmoc标记需要糖基胺, 而基于还原胺化的标记(如APTS和2-AB)需要具有自由还原端的聚糖, 因此遵循了两种N-聚糖释放策略。PNGase F释放通过还原胺化和连续的xCGE-LIF分析进行聚糖标记, 如之前参考文献[20-21]报道。

为了允许Fmoc标记, 对反应条件进行了优化, 以获得最高的糖基胺产率, 同时限制水解以尽可能少地还原低聚糖。在含糖蛋白的样品中, 有10  $\mu\text{L}$  样品重组在50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸钠缓冲溶液(溶液pH值为8.5)中, 然后与20  $\mu\text{L}$  的2%十二烷基硫酸钠(SDS)混合在50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液[溶液pH值为8.5(浓度)]中, 60  $^{\circ}\text{C}$  孵育10 min。随后, 通过添加IGEPAL CA-630(IGEPAL)中和剩余的SDS, 通过添加PNGase F从变性和线性化的糖蛋白中释放N-聚糖。为此, 将制备10  $\mu\text{L}$ 、8% IGEPAL的50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液[pH值为8.5(V/V)], 9.5  $\mu\text{L}$ 、50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液(pH值为8.5)和0.5  $\mu\text{L}$  PNGase F [50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸钠缓冲液(pH值为8.5)中为1 unit (U)  $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ]的混合物, 并将该混合物加入每个样品中。样品在37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育5 min, 释放N-聚糖作为糖基胺。

### 2.4. 释放的N-聚糖的Fmoc标记

为了使荧光检测器可以检测到随后的分离, 酶释放的糖基胺用荧光染料Fmoc进行化学修饰。将50  $\mu\text{L}$  N-聚糖溶液与150  $\mu\text{L}$  水和100  $\mu\text{L}$ 、20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Fmoc混合在乙腈(ACN)中, 在37  $^{\circ}\text{C}$  下对释放的N-聚糖进行1 h的标记。每个由Fmoc标记的N-聚糖组成的样品用离心蒸发器蒸发至干燥状态。接下来, 将100  $\mu\text{L}$ 、80%的ACN<sub>aq</sub>(80% ACN: 20% 水; V/V)加入干燥样品中, 然后通过



**图1.** N-聚糖的完整结构表征的分析方法。工作流程包括从糖蛋白中酶促释放N-聚糖，Fmoc衍生化和随后的纯化（左图），通过使用HILIC-HPLC-FLD来分离N-聚糖以降低样品的复杂性，然后使用多种方法对收集的组分进行并行分析（例如，利用xCGE-LIF进行结构分析，利用MALDI-TOF-MS进行成分分析）。可以释放Fmoc基团，未标记或用其他荧光染料标记后进行聚糖分析（例如，APTS用于xCGE-LIF或2-AB用于HILIC-HPLC-FLD和MALDI-TOF-MS）（中间图）。用MALDI-TOF-MS和xCGE-LIF对牛免疫球蛋白G（IgG）N-聚糖组分进行分析的例子（右图）。N-聚糖结构是使用GlycanBuilder [17–18]绘制的，遵循聚糖符号命名法则（SNFG）指南[19]。PNGase F：多肽N-糖苷酶F；HILIC-SPE：亲水相互作用液相色谱-固相萃取法。a.u.：任意单位； $m/z$ ：质量与电荷比；MTU<sup>''</sup>：校准的迁移时间单位；RFU：相对荧光单位；F8：组分8。

生物凝胶P10（BioGel）亲水相互作用液相色谱-固相萃取法（HILIC-SPE）进一步纯化。

### 2.5. Fmoc 标记的 N-聚糖的纯化

衍生后的样品使用BioGel HILIC-SPE进行清理，去除游离的Fmoc、去糖基化的蛋白质、盐和其他杂质。体积为200  $\mu\text{L}$  的100  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  BioGel悬浮液溶于水/乙醇/ACN（70%：20%：10%； $V/V/V$ ）中，然后加入96孔亲水性膜过滤板的每孔中。使用多头抽真空装置（Merck Millipore，德国）通过抽真空去除溶剂。所有孔均用200  $\mu\text{L}$  的水预洗三次，然后用200  $\mu\text{L}$ 、80%的ACN<sub>aq</sub>（ $V/V$ ）平

衡三次。经过Fmoc标记程序后，样品（在80%的ACN<sub>aq</sub>中）被装入含有BioGel悬浮液的孔中，以每分钟450转（rpm）的速度摇动5 min，以改善与聚糖的结合。为了洗脱，随后用200  $\mu\text{L}$ 、80%的ACN<sub>aq</sub>洗涤5次。所有的洗涤步骤都是通过加入溶液、孵育2 min和通过抽真空去除溶剂来完成的。洗脱时，每孔分别应用一次和两次100  $\mu\text{L}$ 和200  $\mu\text{L}$ 水，然后在450  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下孵育5 min（每次加水后）。洗脱液在96孔存储板中通过真空收集。含有Fmoc标记的N-聚糖的混合洗脱液要么通过HILIC-HPLC-FLD立即进行分馏和（或）分析，要么在-20  $^{\circ}\text{C}$ 下保存直到用



于分馏/分析。对用该方法制备的Fmoc标记的N-聚糖样品也进行了直接的MALDI-TOF-MS分析。如有必要,样品通过真空离心进行浓缩,并在分离/分析前在水中进行重组。

## 2.6. 通过HILIC-HPLC-FLD分离Fmoc标记的N-聚糖

通过HILIC-HPLC分离Fmoc标记和纯化的聚糖,并根据观察到的单个峰收集组分。将体积为90  $\mu\text{L}$ 的Fmoc标记和纯的样品(稀释至80%:20%的ACN/水样品;  $V/V$ )在TSKgel Amide-80柱[5.0  $\mu\text{m}$ , 250.0 mm(长)  $\times$  4.6 mm(内径)柱; Tosoh Bioscience, 德国]上于30  $^{\circ}\text{C}$ 下分离。该装置配备了一个保护柱(10.0 mm  $\times$  4.6 mm),包含与分离柱相同的固定相和颗粒尺寸。流速设置为0.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,采用二元梯度(线性梯度; 曲线5),采用50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH值为4.4的甲酸铵作为水溶剂A, ACN作为有机溶剂B。采用以下梯度条件: 80%溶剂B下0 min; 42%溶剂B下152 min; 0%溶剂B下155 min; 0%溶剂B下162 min; 80%溶剂B下163 min; 80%溶剂B下200 min。注射前将样品保持在10  $^{\circ}\text{C}$ 下。在Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation Binary系统(Dionex/Thermo Fisher Scientific, 德国)上进行色谱分离和分馏,该检测系统与FP-2020 Plus荧光探测器(Jasco, 德国)相结合,激发和发射波长分别为266 nm和310 nm。采用Chromleon 6.8(Thermo Fisher Scientific)色谱分析数据软件进行仪器控制。组分收集由荧光信号阈值和峰值斜率[阈值为-40相对荧光单位(RFU),上升率为0.5  $\text{RFU}\cdot\text{s}^{-1}$ ,下降率为-0.5  $\text{RFU}\cdot\text{s}^{-1}$ ]触发。为了减少甲酸铵盐的数量,将组分水稀释,并通过真空离心干燥。然后,对这些组分立即进行分析[通过xCGE-LIF、MALDI-TOF-MS和(或)HILIC-超高效液相色谱(UPLC)-FLD],或存储在-20  $^{\circ}\text{C}$ 下直到用于分析。

## 2.7. Fmoc标记的N-聚糖的HILIC-UPLC-FLD分析

通过HILIC-UPLC-FLD对Fmoc标记和纯化的聚糖进行定量分析(相对定量)。Fmoc标记的N-聚糖在Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation Binary系统(Dionex/Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation Binary)上通过HILIC分离,该荧光探测器的激发和发射波长分别为266 nm和310 nm。该仪器由Chromleon 7.2软件SR4(Thermo Fisher Scientific)控制。对Fmoc标记的N-聚糖在ACQUITY UPLC BEH聚糖柱[1.7  $\mu\text{m}$ , 150.0 mm(长)  $\times$  2.1 mm(内径)柱; Waters, 德国]上进行分离,温度为40  $^{\circ}\text{C}$ ,以50.0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH值为4.4的甲酸铵为水溶剂A,以ACN为有机溶剂B。在一个运行时间为

38.5 min的分析运行过程中,采用78.0%~55.9%的溶剂B的线性梯度(曲线5),流速为0.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。ACQUITY BEH Glycan VanGuard前置柱(1.7  $\mu\text{m}$ , 5.0 mm  $\times$  2.1 mm; Waters)直接连接到ACQUITY UPLC柱的入口。样品的注射体积为10~20  $\mu\text{L}$ ,在80%的 $\text{ACN}_{\text{aq}}$ ( $V/V$ )中制备。样品在注射前保持在10  $^{\circ}\text{C}$ 环境下。随后,使用基于java的聚糖分析软件glyXtoolLC(未公开的测试版本; glyXera, 德国)对数据进行处理(即峰值提取、积分、相对量化和保留时间校准)。

## 2.8. Fmoc标记的N-聚糖释放Fmoc基团

为了允许用其他染料标记(例如, xCGE-LIF分析的APTS标记或HILIC-UPLC-FLD分析的2-AB),以及进行游离聚糖分析(如利用MALDI-TOF-MS),有必要首先从聚糖中释放Fmoc基团。通过将20  $\mu\text{L}$ 含Fmoc标记的N-聚糖溶液(或HILIC-HPLC组分)与30  $\mu\text{L}$ 二甲基甲酰胺和20  $\mu\text{L}$ 吗啉混合来回收游离N-聚糖,然后在37  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30 min。在用其他荧光染料(如APTS或2-AB)对N-聚糖进行还原胺化标记之前,样品用离心蒸发器进行干燥。对于MALDI-TOF-MS分析,使用棉花HILIC-SPE纯化未标记的聚糖,并直接或在连接特异性SA酯化后进行分析(实验细节见2.13~2.15节)。

## 2.9. 游离N-聚糖的APTS标记(Fmoc基团释放后)

为了实现电泳迁移和随后的检测,无Fmoc的聚糖通过带负电荷的APTS荧光衍生。在荧光标记之前,有必要将释放的N-聚糖的糖基胺形式转化为还原性聚糖形式。为此,将2  $\mu\text{L}$ 、2  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸水溶液( $\text{CA}_{\text{aq}}$ )加入干燥的材料中,短暂离心后,在室温下放置5 min,然后进行下一步操作。在37  $^{\circ}\text{C}$ 下,加入2  $\mu\text{L}$  APTS溶液和2  $\mu\text{L}$  ReduX溶液(一种还原剂),对无Fmoc的N-聚糖标记3 h,这两种溶液都来自glyXprep试剂盒(glyXera)。或者,2  $\mu\text{L}$ 的5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CA}_{\text{aq}}$ 与2  $\mu\text{L}$  APTS溶液和2  $\mu\text{L}$  ReduX溶液预混合,并将混合物直接加入到干燥的材料中。为停止标记反应,本研究加入了100  $\mu\text{L}$ 的终止液(从试剂盒中提取),并仔细混合样品。

## 2.10. APTS-标记的N-聚糖的纯化

为了去除多余的APTS标记、还原剂等杂质,并降低盐的浓度,本研究采用了glyXbeads HILIC-SPE。根据制造商的说明,使用glyXprep样品制备试剂盒(glyXera)进行样品清理。简而言之,将样品(在终止液中)放于含有200  $\mu\text{L}$  glyXbeads浆液的过滤板孔中,室温孵育5 min后让它们结合在一起,然后进行清洗和洗脱步骤。如有必

要，用真空浓缩器对含有纯化的APTS标记的N-聚糖的洗脱物进行干燥，并溶解在适当体积的水中。样品在 $-20^{\circ}\text{C}$ 下保存，直到用于分析。

### 2.11. APTS-标记的N-聚糖的xCGE-LIF分析

为了对聚糖进行详细的结构表征，使用xCGE-LIF分析了APTS标记的聚糖和HILIC-SpE纯化的聚糖。纯化荧光标记寡糖的xCGE-LIF测定细节如之前所报道[20]。使用glyXtoolCE软件(glyXera)处理xCGE-LIF生成的数据(即自动峰值提取、积分和相对量化)和将迁移时间( $t_{\text{mig}}$ )校准到一个内部标准(glyXalign GA2, 除非另有说明; glyXera)。一般来说，从电泳图中创建一个N-聚糖“指纹”(即对齐电泳图): 将y轴上RFU的信号强度绘制在x轴上校准的 $t_{\text{mig}}$ 上[以迁移时间单位(MTU $''$ )]。在校准 $t_{\text{mig}}$ 的高重复性支持下，比较不同样品的N-聚糖指纹图谱，并通过 $t_{\text{mig}}$ 与glyXtoolCE-聚糖数据库的匹配，对N-聚糖峰进行注释。

### 2.12. 外切糖苷酶处理APTS-标记的N-聚糖

除数据库匹配外，还通过外切糖苷酶酶切以及后续xCGE-LIF对N-聚糖指纹进行的重新评价对N-聚糖的注释(即序列、单糖类型和连接)进行确认。进行如下外切糖苷酶酶切:  $\alpha$ 2-3-唾液酸酶[SiaS; 重组肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*), 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达];  $\alpha$ 2-3,6-唾液酸酶[SiaC; 重组产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*), 在大肠杆菌中表达];  $\alpha$ 2-3,6,8-唾液酸酶[SiaA; 重组节杆菌(*Arthrobacter ureafaciens*), 在大肠杆菌中表达];  $\beta$ 1-3-半乳糖苷酶[3GALase; 重组木薯萎蔫病黄单胞菌(*Xanthomonas manihotis*), 在大肠杆菌中表达];  $\beta$ 1-4-半乳糖苷酶(4GALase; 重组肺炎链球菌, 在大肠杆菌中表达);  $\beta$ 1-4,6-半乳糖苷酶(46GALase; 来自洋刀豆);  $\beta$ 1-2,3,4,6-N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶(GlcNAcase<sup>xm</sup>; 重组木薯萎蔫病黄单胞菌, 在大肠杆菌中表达);  $\beta$ 1-2,3,4,6-N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶(GlcNAcase或GlcNAcase<sup>sp</sup>; 重组肺炎链球菌, 在大肠杆菌中表达);  $\alpha$ 1-2,3,6-甘露糖苷酶(MANase; 来自洋刀豆)。在缓冲液中于 $37^{\circ}\text{C}$ 下和在酶供应商推荐的条件下进行外切糖苷酶酶切实验。在xCGE-LIF分析之前，使用glyXbeads HILIC-SPE纯化样品(详见第2.10节)。对所使用的每种外切糖苷酶的比活力和可能的副作用进行了仔细的测试。

### 2.13. 乙酯化用于Fmoc标记的N-聚糖的MALDI-TOF-MS分析

为了稳定SA用于后续的MALDI-TOF-MS分析，采

用连接特异性SA酯化程序[22-23]: 将 $1\ \mu\text{L}$  N-聚糖溶液加入 $20\ \mu\text{L}$ 、 $0.25\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide]中和 $0.25\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  1-羟基苯并三唑(1-hydroxybenzotriazole),  $37^{\circ}\text{C}$  孵育1 h。随后，加入 $20\ \mu\text{L}$  ACN，通过棉花HILIC-SPE纯化，然后进行MALDI-TOF-MS分析，如下所述。

### 2.14. 在MALDI-TOF-MS分析前纯化Fmoc标记的N-聚糖

在MALDI-TOF-MS分析之前，Fmoc标记的聚糖的纯化采用棉花HILIC-SPE，如Reidide等[22]报道，略有修改。在含Fmoc标记的N-聚糖的样品中，其中 $6\ \mu\text{L}$ 在纯化前用 $34\ \mu\text{L}$  ACN进行稀释，有机含量为85%的 $\text{ACN}_{\text{aq}}$ ( $V/V$ )。在一个体积为 $2\sim 200\ \mu\text{L}$ 的移液管尖端填充棉絮，通过移液 $40\ \mu\text{L}$ 水三次，然后移液 $40\ \mu\text{L}$ 、85%  $\text{ACN}_{\text{aq}}$ ( $V/V$ )三次进行调节和平衡。通过上下移液反应混合物20次，将样品装在棉絮上。用含1%的三氟乙酸的 $40\ \mu\text{L}$ 、85%的 $\text{ACN}_{\text{aq}}$ ( $V/V$ )清洗移液管尖端三次，用 $40\ \mu\text{L}$ 、85%的 $\text{ACN}_{\text{aq}}$ ( $V/V$ )清洗三次。随后在 $20\ \mu\text{L}$ 的水中进行洗脱。

### 2.15. Fmoc标记的N-聚糖的MALDI-TOF-MS分析

这些聚糖的组成信息来源于MALDI-TOF-MS的测量。为了获得更具体的结构信息，使用MALDI-TOF/TOF-MS/MS对选定的聚糖进行碎片分析。对于MALDI-TOF-MS分析，在一个MTP AnchorChip 800/384 TF MALDI靶标(Bruker Daltonics, 德国)上发现了 $0.5\ \mu\text{L}$ 的 $10\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 超二羟基苯甲酸基质[在ACN/含 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的0.1%三氟乙酸水溶液(30%:70%;  $V/V$ )中]。随后，将 $1\ \mu\text{L}$ 的样品(加入Fmoc标记的N-聚糖)应用于干燥的基质层上。另外，将 $1\ \mu\text{L}$ 的样品与 $1\ \mu\text{L}$ 、 $5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  2,5-二羟基苯甲酸[在含 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠的50%的 $\text{ACN}_{\text{aq}}$ ( $V/V$ )中]一起应用于AnchorChip靶板上，然后在冷空气下干燥。除非另有说明，N-聚糖样品在仪器MALDI-TOF(RP)MS上以正离子反射模式进行检测，该仪器配备了Smartbeam-II激光器和flexControl 3.3软件 Build 108(Bruker Daltonics)。该仪器使用肽校准标准品和右旋糖酐标准品( $2\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。对于正离子模式，在120 ns的提取延迟后施加25 kV的加速电压；对于负离子模式，在100 ns的提取延迟后施加20 kV的加速电压。记录了质量-电荷比( $m/z$ )1000和5000之间的离子，每个光谱积累了15 000次激光发射。调整激光功率以获得高信号强度，同时为所有可检测到的寡糖质量保持一个明确定义的单单位

素峰。MALDI-TOF/TOF-MS/MS分析采用“LIFT”细胞；在正离子模式下通过激光诱导解离产生碎片离子，脉冲离子提取为80 ns，先驱体离子选择范围为0.45%。数据处理采用top-hat滤波器和相邻平均算法，使用flexAnalysis版本3.3 Build 80 (Bruker Daltonics)。

### 2.16. N-聚糖对SA的温和酸水解

将10  $\mu\text{L}$ 的N-聚糖水溶液与10  $\mu\text{L}$ 的4  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸在80  $^{\circ}\text{C}$ 下共孵育2.5 h，对APTS标记的N-聚糖进行化学去唾液酸化，如其他研究[24–25]所描述。用真空浓缩器通过蒸发去除乙酸。该样品被重新溶解在水中，并进行进一步的分析。使用标准聚糖样品（APTS标记的人柠檬酸血浆N-聚糖）控制温和酸水解的完整性。

### 2.17. 唾液酸O-乙酰改性的碱性水解

通过将1  $\mu\text{L}$ 、1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠加入至10  $\mu\text{L}$ 的N-聚糖水溶液，对APTS-标记的N-聚糖上的SA进行化学O-去乙酰化，然后在37  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30 min，如其他研究[26]所述。加入1  $\mu\text{L}$ 、1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸后，反应停止，然后进行glyXbeads HILIC-SPE样品清理（详情见第2.10节）。使用标准聚糖样品仔细控制碱性水解的完整性，该标准聚糖样品为来自促红细胞生成素的APTS-标记的N-聚糖（在中国仓鼠卵巢细胞中产生）。

## 3. 结果和讨论

### 3.1. 基于可去除染料的工作流程的设计

通过用一种可去除的染料标记一个聚糖，并结合CE、LC和MS的优点，能够解开甚至是最具分析挑战性的（和新颖的）聚糖结构。在之前的工作中，本文研究团队发现xCGE-LIF提供了前所未有的分离能力，能够区分密切相关的位置和连接聚糖异构体[21,27–28]。然而，即使是这种方法——尽管能够解决最小的结构差异——也有一个有限的峰值容量。通过xCGE-LIF进行聚糖分析的一些主要障碍是识别迁移时间同时重叠的聚糖，以及高度复杂的聚糖集合体（包含未知结构）的完整结构表征。因此，仍然有必要将xCGE-LIF与其他分析方法相结合。

将xCGE-LIF（最有效的结构鉴定和异构体分离工具之一）与一种快速和简单的基于成分的方法结合，即MALDI-TOF-MS，可以形成一种有利的分析工具，用于详细的聚糖分析。APTS已被证明是一个理想的标记，用于xCGE-LIF分析，因为它满足成功的聚糖分析的所有要求：高荧光产额、足够的负电荷注入和快速分离、仪器要

求的激发和发射波长，以及一个大型数据库[10]。因此，首先尝试简单地通过APTS-聚糖将xCGE-LIF与MALDI-TOF-MS结合。虽然之前的一些研究报道了用APTS或类似染料[29–30]标记的N-聚糖的MALDI-TOF-MS检测，但无法观察到任何在反向或正向模式下APTS标记的N-聚糖[见附录A中的图S1 (a)和(b)]。另外，尽管标记效率大于95% [31]，但仍然能够检测到剩余的少量未标记的N-聚糖[见附录A中的图S1 (b)]。本文的结果与其他一些报道的观察结果[11,32]很一致。相反，使用xCGE-LIF能够检测到APTS标记的N-聚糖，即使相同样品（之前用MALDI-TOF-MS无法测量到）被大量稀释[见附录A中的图S1 (c)和(d)]。不能排除这样一种可能性，即更高浓度的APTS-聚糖可以通过MALDI-TOF-MS进行检测；然而，在现实情景中，该方法更可能用于处理有限的样本数量而不是大量的样本，这使得这种方法适用性不高。因此，APTS对聚糖的不可逆标记阻碍了两种方法的结合。

为了将xCGE-LIF和MALDI-TOF-MS这两种高通量和易于使用的方法结合，有必要通过引入一个可逆的（即可去除的）标记（即Fmoc）来重新设想聚糖分析的工作流程。这种基于可去除染料的集成工作流程的概念如图1所示，其原理已在第2.1节中进行详细说明。简而言之，首先使用HILIC-HPLC制备分离Fmoc衍生的聚糖，以降低样品的复杂性，然后进行聚糖的可选择Fmoc去除和重新标记。通过进一步将MALDI-TOF-MS与xCGE-LIF结合，从而将聚糖组成与序列和连接信息连接起来，可以得到更完整的结构图。此外，Fmoc衍生物在MALDI-MS和HILIC-HPLC中的敏感性显著提高（与传统标记相比，见附录A中的图S2）。当样品数量有限时，这是一个重要的方面。

### 3.2. 反应条件的调查

Fmoc标记的适用性已经在通过CE/LC-电喷雾电离(ESI)-MS方法[33–34]的N-聚糖分析中得到了证实。然而，这些方法并没有充分利用Fmoc，即其可逆性。Kamoda等[35]在2005年探索了在N-聚糖分析中可以去除Fmoc标记的想法。然而，从那时起，可去除的标记并没有广泛用于聚糖分析。毫无疑问，通过一个可去除的标记来组合多种方法并不简单。因此，需要仔细评估各种工作流程模块在可去除染料方法中的兼容性。与之前的报道[35]相比，本研究进一步优化了工作流程的所有步骤，并研究了这种可逆标记反应的长期稳定性。用固相萃取(SPE)纯化取代了液-液萃取步骤，以获得更高的信号强度。在接下来的章节（第3.2.1~3.2.3节）中，将讨论这种



标记方法的潜在缺陷，并概述了避免可能的错误来源的策略；然后，特别注意，首次如此详细地展示了可去除染料方法在广泛的N-聚糖分析中的适用性（第3.3节）。

### 3.2.1. 利用PNGase F从糖蛋白中释放N-聚糖

天冬酰胺连接聚糖的寡糖部分的酶释放和Fmoc衍生化的总体方案见图2（a）。N-聚糖通过酶PNGase F的作用作为不稳定的N-糖基胺（即1-氨基-寡糖）从蛋白质中释放出来。释放的N-糖基胺逐渐水解为自由的还原端聚糖（即还原聚糖）[36]。

在这种方法的开发过程中，最重要的是保存PNGase F释放的聚糖为N-糖基胺，然后将它们进一步“降解”为还原聚糖。只有N-糖基胺-聚糖可以用Fmoc标记，而还原性聚糖仍是未标记的[图2（a）]。糖基胺-聚糖浓度的增加导致Fmoc标记聚糖产量的增加，使低样本量可用于分析。然而，在之前（本文研究团队和其他研究人员）[21,35,37]进行PNGase F释放时，Fmoc标记和未标记的聚糖在HILIC-HPLC分离过程中共洗脱，并通过MALDI-TOF-MS对同一部分进行检测。虽然本研究的目标是通过分馏来减少聚糖结构的数量，但共洗脱实际上增加了样品的复杂性，使进一步的分析极大地复杂化。为了克服这些问题，本研究尽力去找到N-糖基胺水解量最小的酶释放条件，同时保持较高的PNGase F活性。为此，本文研究了孵育条件（即缓冲液pH值、类型和浓度）、PNGase F类型和浓度，以及孵育时间的影响。PNGase F活性（即释放的N-聚糖量）通过评估Fmoc标记的牛免疫球蛋白（IgG）FA2G2聚糖的绝对峰面积，利用HILIC-UPLC间接测定[图2（a），左图]，如图2（b）~（d）中橙色和绿松石条所示（缩写的说明见附录A）。此外，通过MALDI-TOF-MS追踪N-糖基胺的水解情况[图2（a），右图]，因为可以检测到两种形式，即Fmoc标记和未标记的聚糖（即自由还原的FA2G2）。将这两个峰面积汇总为总峰面积，并显示自由还原FA2G2聚糖的百分比[图2（b）~（d）中的灰点]。

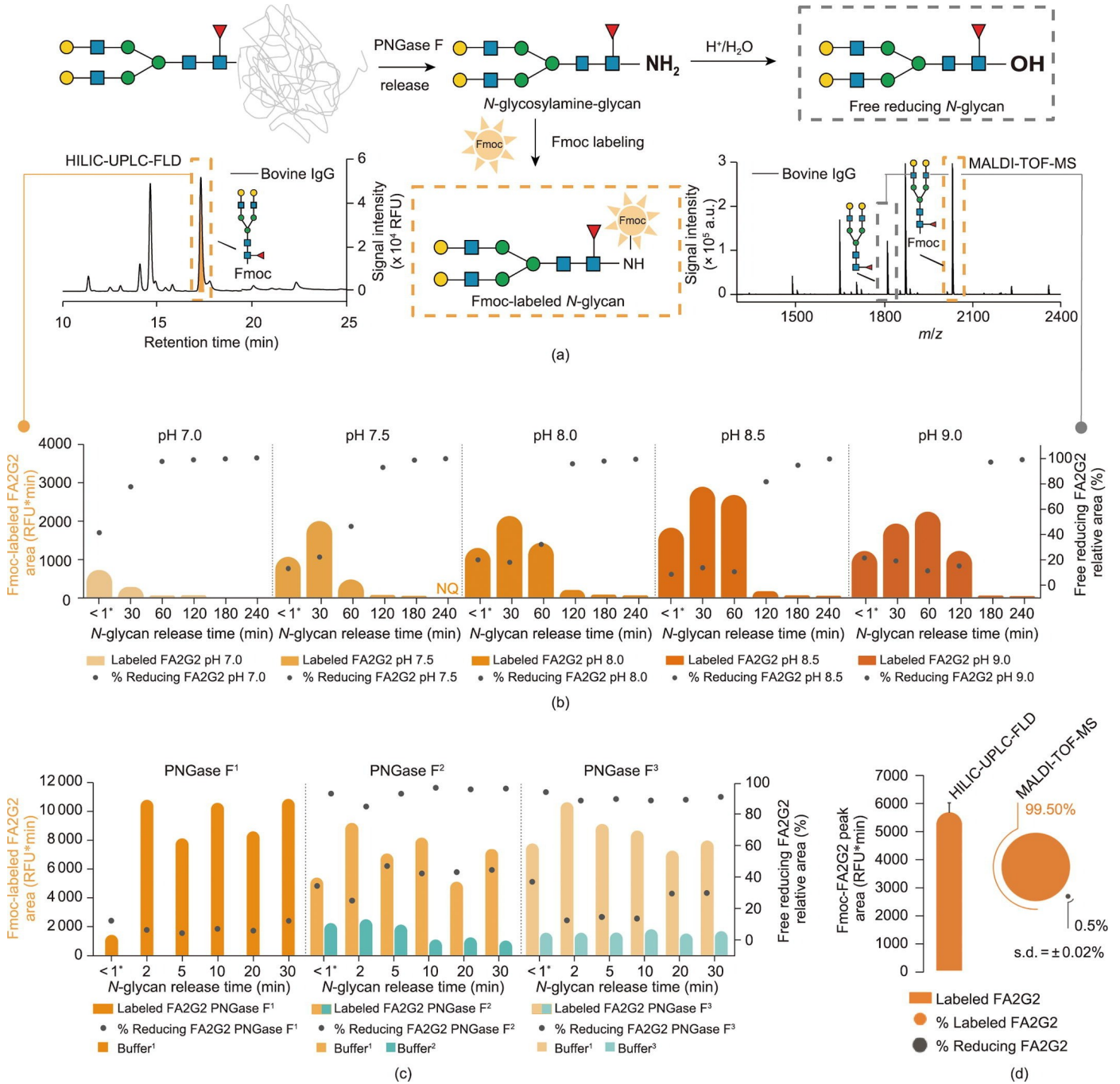
研究发现，反应pH值是影响PNGase F活性和糖基胺稳定性的关键参数。在pH值为7.0时，约40%的N-聚糖在一分钟内就已经被水解；因此，它们对Fmoc标记不再可用[图2（b）]。然而， $\text{pH} \geq 8.5$ 稳定了N-糖基胺，导致大量的还原聚糖延迟出现（ $>180$  min时超过95%），以及较短的反应时间（ $< 60$  min）内还原聚糖（低于10%）的稳定水平[见图2（b）和附录A中的图S3（a）]。为了优化N-糖基胺的形成，降低非反应性水解产物（即还原聚糖）的水平，本研究还利用脉冲安培检测法，使用高性能

阴离子交换色谱检测技术，监测了不同pH值下PNGase F消化产物的时间过程（见附录A中的图S4）。该检测显示了类似的结果。这些结果与报道的PNGase F和N-糖基胺的行为一致；也就是说，PNGase F在pH值为7.5和9.5 [36]之间（最大pH值为8.5 [38]）活性最高——N-糖基胺在该pH值范围内是相对稳定的。

由于较长的酶反应时间导致糖基胺水解[图2（b）]，因此短时间反应更好。由于快速的PNGase F可以保证在几分钟内脱糖基化，这似乎为糖基胺开始显著降解之前进行更有效的标记提供了机会。因此，测试了一种快速PNGase F与两种常规PNGase F [图2（c）]。然而，由于在pH值为8.5的酶切缓冲液下，所有酶在几分钟内达到最大产量，因此使用快速PNGase F对糖基胺标记方法不利[图2（c）]。此外，在较高的酶浓度下，没有检测到产物的增加[见附录A中的图S3（b）]。对于缓冲液2和缓冲液3，获得的Fmoc-FA2G2的较小的峰面积可能是由于酶促反应中pH值不理想[图2（c），绿松石条]——这一结果证实了pH值在N-糖基胺稳定性方面的重要性。

因为N-糖基胺也可以在含铵的缓冲液中产生[39]，接下来研究了4种不同缓冲液类型及其浓度，以及PNGase F释放期间的孵育时间[见附录A中的图S3（c）~（e）]的影响。尽管不同的缓冲液类型对聚糖总量影响很小[见附录A中的图S3（c）]，但在含铵缓冲液中，N-糖基胺降解为还原聚糖的速度较慢[即使在240 min后也未达到100%；见附录A中的图S3（d）]。这一结果与N-糖基胺在碳酸氢铵存在下的水解速度更慢的观察结果一致[40]。此外，有报道称，还原性糖可以在过量的碳酸氢铵（饱和溶液）中转化为糖基胺[41]，这应该会增加Fmoc标记的聚糖的产量。然而，本文研究团队看到Fmoc标记的聚糖的峰面积显著减少[见附录A中的图S3（e）]，表明较高的缓冲液浓度降低了标记效率，甚至导致Fmoc衍生物的分解。

最后，在优化条件下（ $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液，pH值为8.5， $0.01 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  PNGase F；在 $37^\circ\text{C}$ 下孵育5 min），最大程度地将Fmoc标记的N-聚糖的回收率提高到99.5%，同时保持未标记的聚糖数量，将聚糖减少到最小值[图2（d）]。进一步的方案开发包括检查在Fmoc标记过程中N-糖基胺的水解程度（见附录A中的补充结果1）。由于生物学上相关的聚糖（潜在的糖生物标记物）往往以低丰度存在，因此仔细地重新审视Fmoc释放后APTS标记条件并进行调整，以进一步提高xCGE-LIF分析的标记效率和敏感性（见附录A补充结果2）。



**图2.** 使用 PNGase F 优化聚糖蛋白中 N-聚糖的释放。(a) 反应方案, 阐明了通过 PNGase F 释放 N-糖基胺及其随后的 Fmoc 标记 (虚线框中 Fmoc 标记的聚糖)。后者缓慢地水解为一个未还原聚糖 (灰色虚线框); 在酸性条件下更快。HILIC-UPLC-FLD 色谱图: (左) Fmoc 标记的 N-聚糖的数量通过由 HILIC-UPLC-FLD 分析获得的牛 IgG 中的 FA2G2 聚糖的峰面积进行评估 (如下图橙色和绿松石条形图所示)。MALDI-TOF-MS 图谱 (右): 标记后, 用 MALDI-TOF-MS 评估反应混合物中剩余未标记的 FA2G2 聚糖的残留量; 可用未还原的与总 FA2G2 的比率 [即标记的和未还原聚糖的总和 (如下图中的灰点图所示)]。(b) pH 值对可用于 Fmoc 衍生化的 N-糖基胺数量的影响与 PNGase F 去糖基化时间的关系。(c) 酶的类型 (标准和快速 PNGase F) 对可用于 Fmoc 衍生化的 N-糖基胺数量的影响与 PNGase F 去糖基化时间的关系。Sigma-Aldrich P7367 PNGase F 被标记为 PNGase F<sup>1</sup>, NEB P0704 被标记为 PNGase F<sup>2</sup>, NEB P0710 Rapid PNGase F 被标记为 PNGase F<sup>3</sup>。以下缓冲液用于 N-聚糖的释放: 50 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸钠的 pH 值为 8.5, 作为 buffer<sup>1</sup>; 由 PNGase F<sup>2</sup> 提供的缓冲液作为 buffer<sup>2</sup>, 由 PNGase F<sup>3</sup> 提供的缓冲液作为 buffer<sup>3</sup>。(d) 在 N-聚糖释放的优化条件下, Fmoc 标记和未还原聚糖的各自的绝对产率和相对产率。数据反映了三个独立实验的平均值和标准差 (s.d.)\*代表 (b) 和 (c) 中的第一个采样时间点, 在 PNGase F 释放开始后 (反应时间小于 1 min), 立即取等分的样品进行 Fmoc 衍生化。对于 (b) ~ (d), PNGase F 释放牛 IgG 中的 N-聚糖, 用 Fmoc 对 PNGase F 进行标记, 并用 HILIC-UPLC-FLD 和 MALDI-TOF-MS 进行分析。利用 HILIC-UPLC-FLD 评估可用于 Fmoc 衍生化的 N-糖基胺的数量——作为 Fmoc-FA2G2 峰的相对面积 (RFU\*min), 并且通过 MALDI-TOF-MS 进行分析——作为未标记的 FA2G2 峰的相对面积 (未还原的与总 FA2G2 的比率; %)。N-聚糖按照 SN-FG 命名法表示[19]。



### 3.2.2. Fmoc 标记的 N-聚糖的稳定性

除了在 Fmoc 标记之前 N-糖基胺的水解外，还原聚糖的另一个来源（可能使进一步分析复杂化）可能是 Fmoc 标记的 N-聚糖的分解。为了研究 Fmoc 标记的 N-聚糖在不同处理条件下的稳定性，将从人血浆中提取的 Fmoc 标记的 N-聚糖储存在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ （比较多次冻融循环）、 $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  和室温（ $+21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）以及各种溶剂中，最长时间为两年。使用 HILIC-UPLC-FLD 评估 Fmoc 标记的聚糖的绝对丰度和相对丰度。Fmoc 聚糖衍生物被发现在不同温度（ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $+21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）和不同的溶剂（水、有机溶剂，低 pH 值 HILIC-HPLC 缓冲液）中非常稳定，这可以从 Fmoc 标记的 A2G2S2、A2G2S1 和 A2G2 的恒定的绝对和相对峰面积从随着时间的变化[见附录 A 中的图 S5 (a) ~ (e)]中看出来。例如，在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  的水中，即使在 40 次冻融循环后，聚糖丰度在保存两年后也没有变化[见附录 A 中的图 S5 (a)]。此外，样品可以在  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ （分馏前自动采样器的条件下）在有机溶剂中保存至少 40 h，而不影响聚糖丰度[见附录 A 中的图 S5 (b)]。唯一的例外是，当样品在室温保存超过 10 天后，唾液酸化聚糖减少，中性聚糖同时增加[见附录 A 中的图 S5 (c)]。然而，观察到的唾液化物种的减少完全不是由于 Fmoc 标记的聚糖的分解，而是由于敏感末端 SA 的丢失，这是聚糖分析中已知的问题

[42]。基于这些发现，可去除的 Fmoc 标记在广泛的存储和处理条件下稳定地与聚糖相连。

### 3.2.3. 从 N-聚糖中释放 Fmoc 基团, 用于连续的重新标记

一些现代的聚糖分析方法也依赖于 N-糖基胺的存在来进行荧光标记[43–46]。然而，目前的方法的最大的优点之一——使用 Fmoc 标记的 N-糖基胺——来自于可逆标记的应用。更具体地说，在温和和非选择性条件下，弱碱吗啉可以快速而容易地定量去除 Fmoc 基团[见附录 A 中的图 S6 (a) ~ (c)] [47]。在降低聚糖聚合物的复杂性和去除 Fmoc 后，聚糖可以直接用具有最有利性质的任何其他染料重新标记，用于后续分析。为了利用 xCGE-LIF 方法获得聚糖结构的信息，通过还原胺化，用 APTS 荧光染料进行标记。然而，在整个分析工作流程，即 N-聚糖释放、Fmoc 标记和清理、Fmoc 释放、APTS 标记和第二次清理之后，通过 xCGE-LIF 测量时，观察到许多额外、非聚糖相关的峰[图 3(a)]。非聚糖相关峰出现在 N-聚糖  $t_{\text{mig}}$  范围内[图 3(a) 中的区域 2]，但也在外部，在内标品的区域内[图 3(a) 中的区域 1 和区域 3]，进行聚糖分析和  $t_{\text{mig}}$  校准几乎不可能。使用一种系统的消除方法，确定了杂质吗啉的来源（数据未显示）。

进一步研究了几种不同品牌和等级的吗啉是否会导致

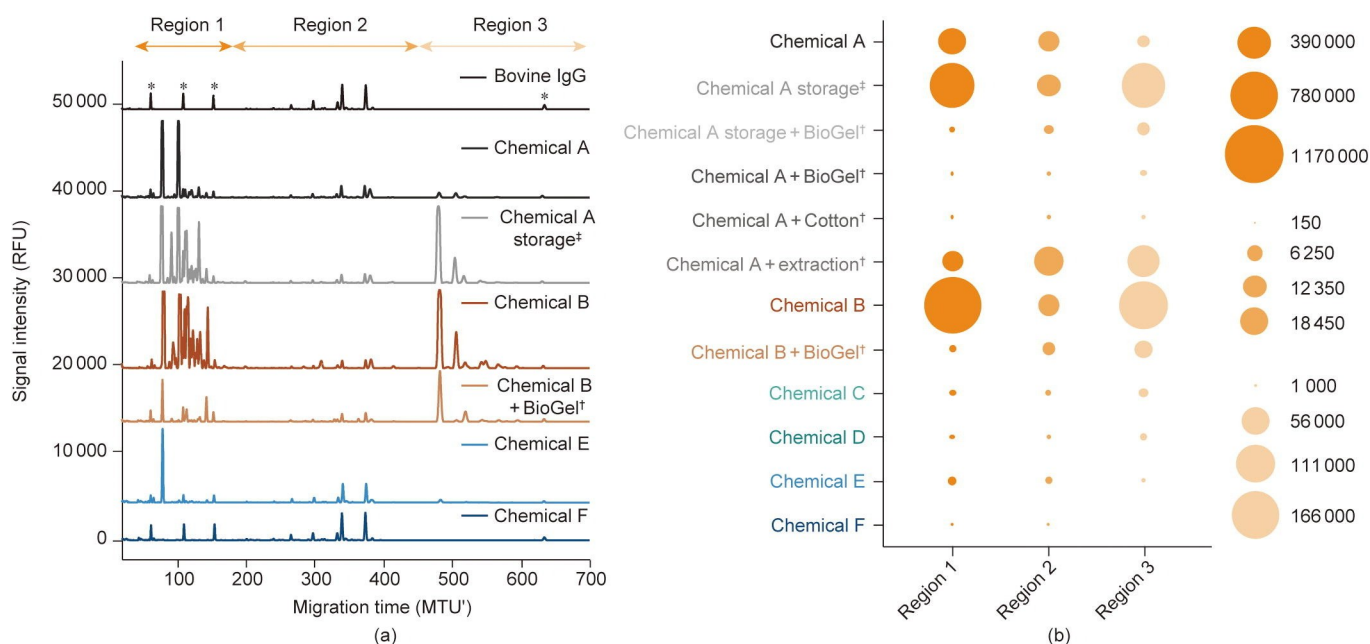


图 3. N-聚糖释放 Fmoc 的连续重新标记优化。(a) 利用不同来源和等级的吗啉获得的牛 IgG APTS 衍生的 N-聚糖的 xCGE-LIF 指纹图谱（即校准的电泳图）。xCGE-LIF 中与迁移时间校准标准对应的峰用星号 (\*) 表示。(b) 使用不同来源和等级的吗啉获得的非聚糖相关的峰（即杂质）的数量。圆的面积与在 xCGE-LIF（三次实验的平均值）中观察到的杂质信号的总峰面积（用 RFU\*min 表示）成正比。Sigma-Aldrich ReagentPlus<sup>®</sup> 吗啉用作化学品 A，Supelco analytical standard 吗啉用作化学品 B，Millipore 吗啉用作化学品 C，Acros Organics 吗啉用作化学品 D，Sigma-Aldrich ACS 试剂用作化学品 E，经再蒸馏纯化的 Sigma-Aldrich 吗啉用作化学品 F。对于 (a) 和 (b)，首先从 Fmoc 标记的 N-聚糖中释放 Fmoc 基团，随后通过还原胺化反应利用 APTS 衍生、纯化，并用 xCGE-LIF 分析聚糖。按照之前发表的 BioGel HILIC-SPE [20]、棉花 HILIC-SPE [22] 和液-液提取 [35] 方法，在 Fmoc 释放后进行额外的纯化。<sup>‡</sup>在室温下储存两年的化学品。MTU<sup>†</sup>：符合 glyXalign GA1 的 MTU。

杂质峰的减少甚至完全丢失。基于电泳图覆盖[图3 (a)]和使用 xCGE-LIF 对每个商业吗啉获得的峰面积[图3 (b)]的比较,发现一个具有极小污染峰贡献的吗啉品牌[图3 (a)和(b)中的化学品F]。另一种方法是在Fmoc释放后但在APTS标记之前纯化聚糖(与标准程序相反,在APTS标记后只有一个纯化步骤)。液-液萃取(含乙醚)[35]或SPE(BioGel和棉花HILIC-SPE)[20,22]显著减少了杂质质量[图3 (b)]。然而,一个额外的纯化步骤(在Fmoc释放之后,但在APTS标记之前)是不实际的,因为该步骤增加了实际操作的时间。由于所有被检测化学品的杂质质量随储存时间的增加而增加,如图3 (a)所示的储存两年的化学品,建议在将化学品应用于样品之前,尽量检查一下化学品的纯度。

### 3.3. 应用程序

通过对从鸡卵清白蛋白、马血清、牛转铁蛋白和人免疫球蛋白A(IgA)中选择的N-聚糖的结构进行分析,证明了基于可去除染料的方法的全部潜力和广泛的适用性。

#### 3.3.1. 杂合型N-聚糖

即使是对N-聚糖的微小修饰也可以对生物学功能和临床相关性产生令人印象深刻的影响。例如,仅在从癌症患者(如绒毛膜癌和肝细胞癌)[6,48-49]体内分离的糖蛋白上发现异常双触角N-聚糖[在核心 $\alpha$ 1-3-甘露糖(Man)上带有两个GlcNAc分支(在 $\alpha$ 1-6-Man上没有GlcNAc,杂合型N-聚糖的一个特征)]。同样,杂合型N-聚糖的增加和 $\beta$ 1-6-glcnae分支结构的同步减少对肿瘤的生长和转移也有影响[50-51]。因此,开发一种强大的N-聚糖分析工具是非常重要的,该工具可以超越简单的组成指纹图谱,可以提供完整、详细的聚糖结构图片。

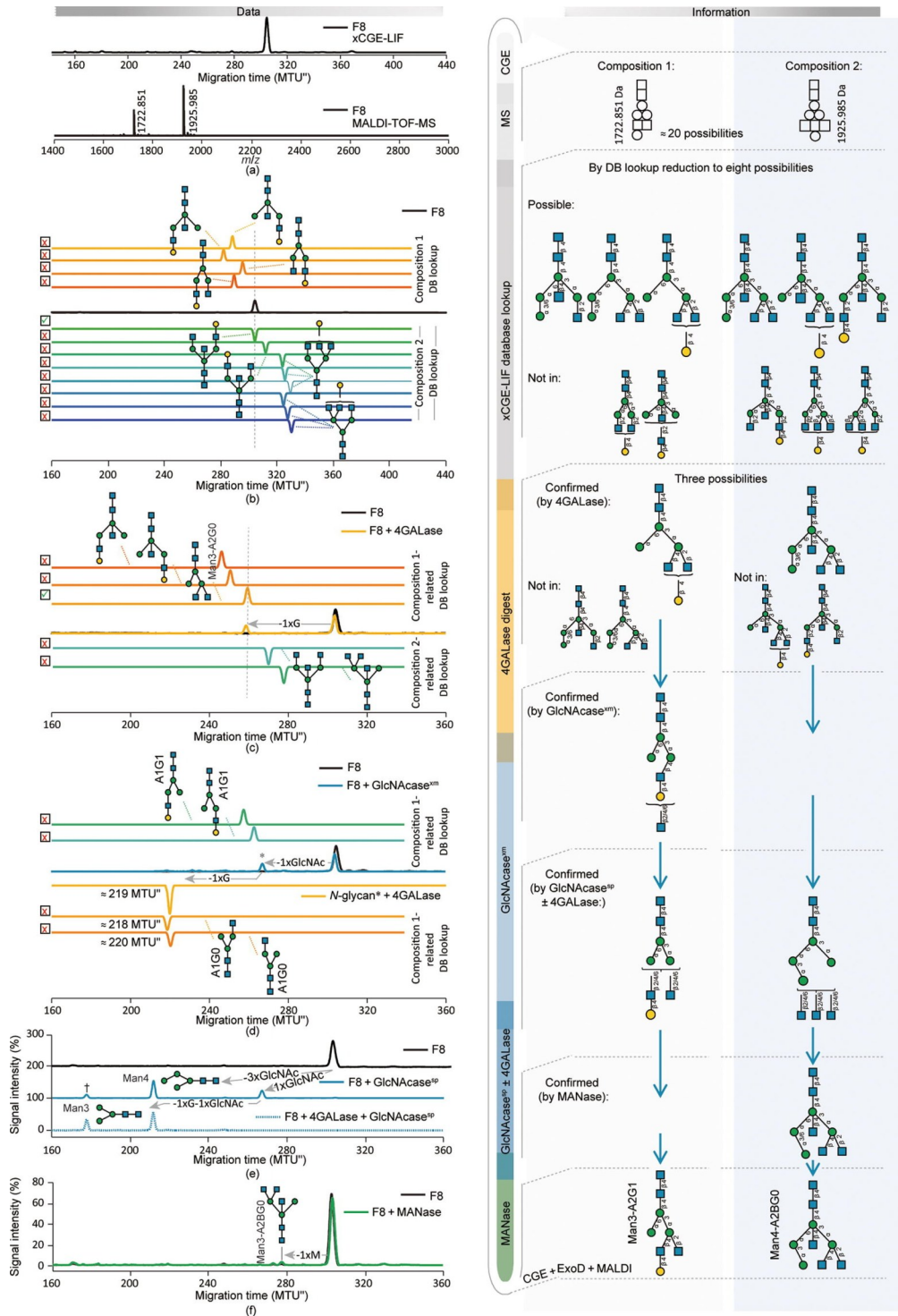
为了检验基于Fmoc的策略是否能够应对上述分析挑战,利用该方法对鸡卵清白蛋白的N-聚糖结构进行了详细的探索。虽然卵清白蛋白只有一个单一的N-糖基化位点,但其聚糖混合物具有极高的异质性,主要包含仅终止在Man残基中的N-聚糖(寡聚甘露糖型)和终止在Man和GlcNAc中的N-聚糖(杂合型)[52]。由从卵清白蛋白获得的Fmoc标记的N-聚糖混合物的HILIC-HPLC色谱中得到了15个碎片[见附录A中的图S7 (a)],随后均通过MALDI-TOF-MS和xCGE-LIF(外切糖苷酶切)进行分析。选择碎片8(F8)去进一步证明这种方法揭示详细的位置和异构体信息的能力。

而xCGE-LIF在F8中引起一个单峰[见附录A中的图S7 (b)],MALDI-TOF-MS暴露了至少两种含有聚糖

成分的化合物,分别是hexose(Hex)<sub>4</sub>N-acetylhexosamine(HexNAc)<sub>4</sub>和Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>3</sub>[图4 (a)]。考虑Man和Gal具有相同的质量,以及糖残基的连接和位置不能仅通过精确的质量来确定,因此这两种成分表明可能存在大约20种不同的结构。然而,在xCGE-LIF聚糖数据库的帮助下,能够排除其中一些 $t_{\text{mig}}$ 不匹配引起的结构上的可能性[图4 (b)]。其他具有(几乎)与目标峰相同的 $t_{\text{mig}}$ 、但成分不同于MALDI-TOF-MS所揭示的成分的潜在共迁移聚糖结构被排除(数据未显示)。因此,MALDI-TOF-MS结果为进一步的xCGE-LIF分析和外切糖苷酶酶切奠定了方向。

为了更详细地了解聚糖的结构,进行了结合xCGE-LIF的外切糖苷酶酶切。在与4GALase孵育后,F8峰的高度下降了约25%[图4 (c)]。这种迁移率的变化表明,经过4GALase处理,一个 $\beta$ 1-4连接的Gal从聚糖中被去除。脱乳糖化聚糖与杂合型聚糖Man3-A2G0表现出相同的 $t_{\text{mig}}$ ,这消除了一些其他结构的可能性。用GlcNAcase<sup>sm</sup>测定了Gal残基的位置[图4 (d)]。GlcNAcase<sup>sm</sup>酶切后,F8峰的高度再次下降了约25%,表明GlcNAc从与Gal残基相同的聚糖中裂解。基于GlcNAcase<sup>sm</sup>产品的 $t_{\text{mig}}$ ,能够消除传统的结构,其中Gal残基位于 $\beta$ 1-2连接的GlcNAc上,GlcNAc连接到两个 $\alpha$ 连接的Man臂之一[图4 (d),绿色痕迹]。此外,当进行4GALase酶切时,GlcNAcase<sup>sm</sup>处理F8峰[在图4 (d)中用星号标记,蓝色痕迹]得到一个产物,该产物的 $t_{\text{mig}}$ 与A1G0(具有与 $\beta$ 1-2连接的GlcNAc)的不匹配[图4 (d),黄色痕迹]。这些发现强烈表明,所研究的化合物具有一个含 $\beta$ 1-4-Gal的三甘露糖基核心,其中 $\beta$ 1-4-Gal位于与 $\alpha$ 1-3-Man臂连接的GlcNAc- $\beta$ 1-4和同样与 $\alpha$ 1-3-Man臂连接的一个未取代的GlcNAc  $\beta$ 1-2(Man3-A2G1;图4,右图)上。

在4GALase处理后,F8峰的第二个化合物的迁移率没有发生变化,表明该聚糖中没有Gal[图4 (c)]。虽然该化合物应该包含一个含有三个GlcNAc残基的三甘露糖基核心(基于MALDI-TOF-MS),但GlcNAcase<sup>sm</sup>酶切没有发生变化[图4 (d)]。然而,GlcNAcase<sup>sp</sup>水解所有三种GlcNAc,最终向Man4转化[图4 (e),蓝色痕量]。用4GALase和GlcNAcase<sup>sp</sup>的混合物酶切时,这两种化合物分别被完全转化为Man3和Man4的Man核心[图4 (e),蓝色虚线痕迹]。MANase酶切图谱显示,第二种被研究的化合物的Man残基的水解非常缓慢:孵育16 h后,酶切产物Man3-A2BG0对应的峰值高度仅增加了7%[图4 (f)]。结果表明,部分酶切化合物为Man4-A2BG0,该化合物含有一个连接到三甘露糖基核心 $\alpha$ 1-6-Man臂的



**图 4.** 鸡卵清白蛋白杂合型 N-聚糖的详细结构表征。(a) 含卵清白蛋白 N-聚糖的 HILIC-HPLC F8 的 xCGE-LIF 指纹图谱 (即校准的电泳图谱) 和 MALDI-TOF-MS 图谱。(b) 将 F8 峰的校准迁移时间 (用 MTU<sup>+</sup> 表示) 与具有相同单糖组成 (假设的候选结构) 的 APTS 标记的 N-聚糖标准物进行比较。这些标准以前已经被很好地描述过, 并将它们的迁移时间合并到 glyXtoolCE 数据库。(c) F8 中包含的 APTS 标记的 N-聚糖 4GALase 酶切前后的 xCGE-LIF 指纹图谱, 并与假设的候选结构的迁移时间进行比较。(d) F8 中包含的 APTS 标记的 N-聚糖 GlcNAcase<sup>pm</sup> 酶切前后的 xCGE-LIF 指纹图谱, 并与假设的候选结构的迁移时间进行比较。对 \*GlcNAcase<sup>pm</sup> 产物 (用蓝色痕迹的星号标记) 进行进一步的 4GALase 酶切, 产生一个以黄色痕迹描绘的峰值。(e) GlcNAcase<sup>pm</sup> 酶切前后的 xCGE-LIF 指纹图谱, 以及 F8 中含有的 APTS 标记的 N-聚糖的 4GALase + GlcNAcase<sup>pm</sup> 酶切。† 需要注意的是, GlcNAcase<sup>pm</sup> 在 Man4 上显示副作用, 孵育时间较长, 将 Man4 分解为标记的 (蓝色痕迹) Man3 [经 MANase 酶切证实; 见附录 A 中的图 S7 (c)]。(f) F8 中含有的 APTS 标记的 N-聚糖在 MANase 酶切前后的 xCGE-LIF 指纹图谱。在 (b) ~ (d) 中, 复选框  显示数据库迁移时间匹配 [复选中 (✓) 标记] 和排除的结构 [交叉 (X) 标记]。在 (c) ~ (f) 中, 箭头表示相应的外切糖苷酶酶切后选定峰的迁移时间的变化: -G 表示半乳糖水解; -GlcNAc 表示 N-乙酰氨基葡萄糖水解; -M 表示甘露糖残基水解; 数字 (1x、2x 或 3x) 表示水解糖的数量。右图显示了利用每个分析步骤 (从 MALDI-TOF-MS 组成校准到 xCGE-LIF 数据库匹配和外切糖苷酶测序) 获得的信息水平。关于聚糖名称缩写的解释可以在附录中找到。N-聚糖按照 SNFG 命名法表示 [19]。DB: 数据库。



Man 残基  $\alpha$ 1-3, 这根据先前报道的洋刀豆 MANase 对  $\alpha$ 1-3 连接的 Man 的缓慢水解进行判断[53–54]。相比之下, Man3-A2G1 完全抵抗 MANase 酶切, 这与过去的研究一致, 表明当 GlcNAc 延伸  $\alpha$ 1-3 臂 (R-GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ ) 时, MANase 在三甘露糖核心的 Man $\alpha$ 1-6Man $\alpha$  连接上不活跃[55–56]。

在过去的 40 年里, 卵清白蛋白 N-聚糖的组成结构一直得到研究人员的关注[52,57–58]。虽然早期主要利用核磁共振、甲基化-气相色谱-质谱, 以及详细的酶法分析和化学方法揭示具体的聚糖结构[53–54,59], 但这些方法比较繁琐, 需要高度的专业知识 (只有在专业的实验室才能获得)。本文展示了通过结合常见的色谱、电泳和质谱方法来分离许多连接和位置异构体的能力。当对总卵清白蛋白 N-聚糖进行 4GALase 酶切时, 由于峰高度和聚糖共迁移的微小变化, 监测峰的变化很困难 (如果可能的话) [见附录 A 中的图 S7 (d)]。这一结果说明了如何抛开总 N-聚糖从而对糖基化有更深刻的认识, 并表明实际需要结合几种分析方法。所提出的方法可以揭示在总 N-聚糖中通常未被识别的聚糖结构, 但这些聚糖结构在生物学上是相关的, 因此是潜在的生物标志物。此外, 对于卵清白蛋白杂合型聚糖的结果无疑说明了所提出的方法在分析各种聚糖结构方面的有效性, 无论聚糖结构的复杂性如何。卵清白蛋白 N-聚糖的完整结构注释如附录 A 中的图 S7 (e) 所示。

### 3.3.2. O-乙酰化 N-聚糖

SA 被认为是一种极其多样化的糖类[60]。这种多样性主要来自于 SA 的 4-、7-、8-和 9-羟基位置 (即甲基、乙酰基、乳酸基、硫酸基和磷酸基) 的不同类型的 O-取代。在癌细胞中已经观察到 SA 的 O-乙酰化的变化[61–63], 这使得 SA 的这种精细修饰成为一种潜在的诊断和预后生物标志物。不幸的是, 目前的方法 (部分或完全) 破坏或错过了这种不稳定的修饰[64–66], 阻碍了对 O-乙酰化 SA 的生物学作用的更深入的理解。

因此, 本文将评估基于 Fmoc 的方法与一个小的结构修饰 (如 SA-O-乙酰化) 的分析的相容性。为此, 选择了含有 SA N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 和 N-乙酰-4-O-乙酰神经氨酸 (Neu4,5Ac<sub>2</sub>) 的马血清糖蛋白质组作为其 N-聚糖链的组成部分。对从马血清中提取 Fmoc 标记的 N-聚糖进行 HILIC-HPLC 柱层析, 并收集 15 个碎片[见附录 A 中的图 S8 (a)]。碎片 6 (F6) 和碎片 9 (F9) 均含有具有  $t_{\text{mig}}$  [在 xCGE-LIF 中非常接近 A2G2S2(6,6)] 和具有  $t_{\text{mig}}$  位移 [分别仅为 1.95 MTU'' 和 0.95 MTU''] 的 N-聚糖结构[见图 5

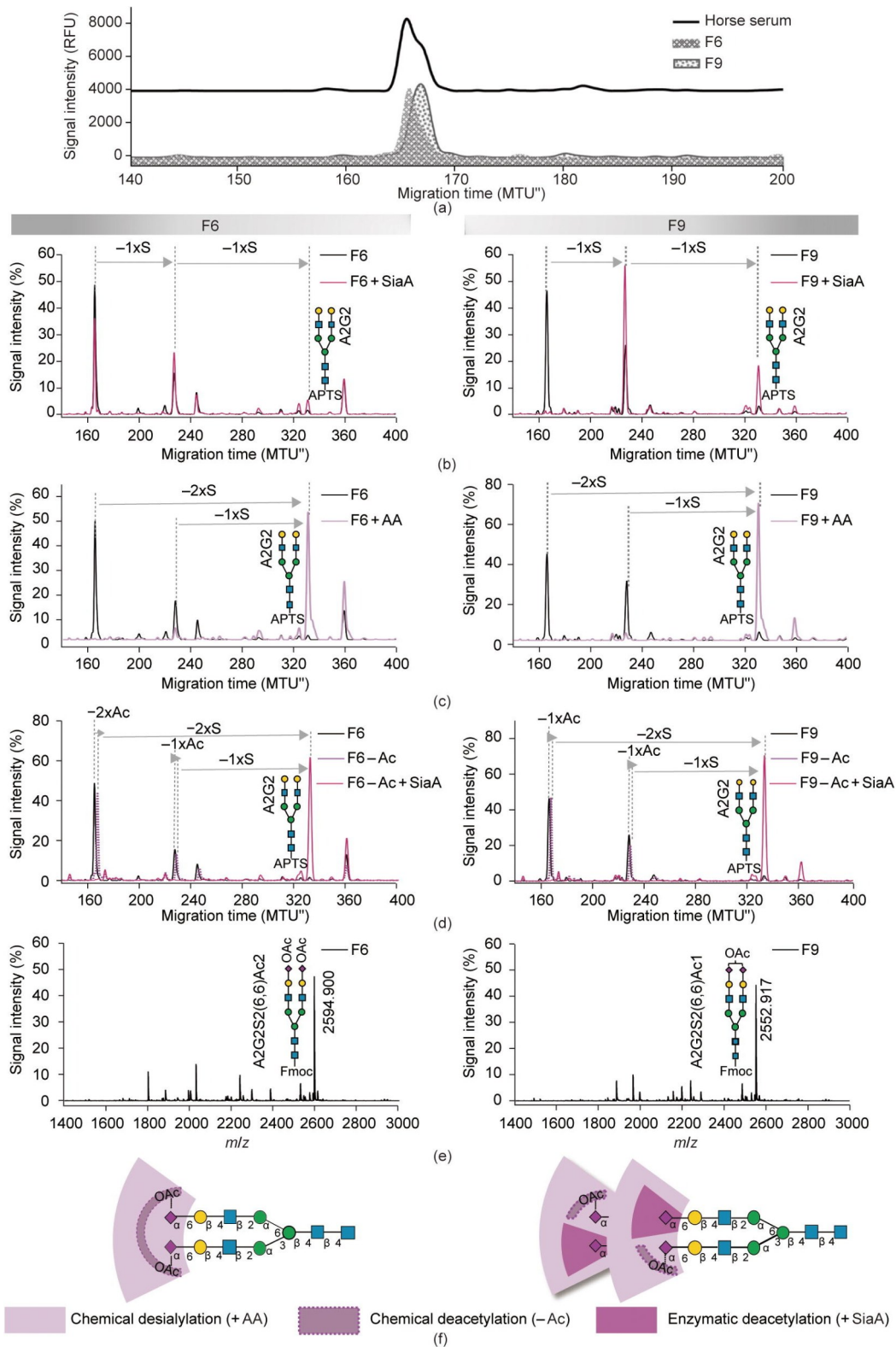
(a) 和附录 A 中的图 S8 (b)]。一个小的  $t_{\text{mig}}$  变化表明这两个碎片不含 A2G2S2(6,6), 但很可能包含密切相关的结构。有趣的是, 在 SiaA 处理后, 这两个碎片中的聚糖表现出不同的行为 (在酶切效率方面) [图 5 (b)]。这些观察结果有助于确定 F6 和 F9 的聚糖结构。

F6 首先被 SiaA 水解, 裂解末端 Neu5Ac, 分别为  $\alpha$ 2-3-、 $\alpha$ 2-6-或  $\alpha$ 2-8 连接。在 SiaA 酶切后, 仅观察到单唾液酸化的 A2G2S1(6) 和中性的 A2G2 (由于去唾液酸化) 略有增加[图 5 (b), 左]。这种可忽略不计的信号强度变化与早期的发现相一致, 即 O-乙酰化的神经氨酸对唾液酸酶具有抗性[67–68]。然而, 在 SA 的非酶的温和酸水解 (释放所有 SA 类型, 独立于它们在聚糖中的连接和位置) 后, 研究的结构完全转化为中性成分 A2G2, 表明两个 Neu5Ac 残基的丢失[图 5 (c), 左]。由于酶的抗性可能是由 SA 的乙酰化作用引起的, 所以 O-乙酰基碱性水解后是 F6 的 SiaA 酶切。经过碱性水解后, SiaA 裂解了两个末端的 Neu5Ac, 从而生成了中性的 A2G2 [图 5 (d), 左]。通过 MALDI-TOF-MS 在  $m/z$  2594.9 处也检测到含有两个 O-乙酰基的去唾液酸化的双触角聚糖为 [M-2H+3Na]<sup>+</sup> [图 5 (e)]。

将同样的分析方法也用于 F9。值得注意的是, SiaA 处理主要导致一个 SA 从去唾液化聚糖中水解, 显著增加了单唾液酸化对应物的信号强度[图 5 (b), 右]。这种部分水解表明, 只有一个 Neu5Ac 被 O-乙酰化, 并且 SiaA 酶切产生了单乙酰化的 A2G2S1(6)。同样, 温和的酸水解释放了所有的 Neu5Ac, 通过 xCGE-LIF 可以明显看到 A2G2 峰的增加[图 5 (c), 右]。经过去乙酰化和 SiaA 酶切后, 所研究的峰完全转化为 A2G2 峰, 表明发生了单乙酰化 [图 5 (d), 右]。此外, 通过 MALDI-TOF-MS 在  $m/z$  2552.9 处观察到一个含有一个 O-乙酰基的去唾液酸化的双触角聚糖为 [M-2H+3Na]<sup>+</sup> [图 5 (e)]。

为了确定 Neu5Ac 和 Neu4,5Ac<sub>2</sub> 残基在两个触角上的位置, 将 F9 用 SiaA 进行水解, SiaA 可以裂解 Neu5Ac, 但不能裂解 Neu4,5Ac<sub>2</sub> [见附录 A 中的图 S8 (c)]。然后, 进行 4GALase 酶切, 释放末端 Gal 残基, 并通过碱性水解从另一支臂上的末端 Neu4,5Ac<sub>2</sub> 释放 O-乙酰基。在 A2G2S1(6) [6] 和 A2G2S1(6) [3] 对应的电泳图中出现了两个峰, 反映了 Neu4,5Ac<sub>2</sub> 出现在聚糖结构的  $\alpha$ 1-6-Man 和  $\alpha$ 1-3-Man 臂上[见附录 A 中的图 S8 (c)]。

根据目前的数据可知, 在马血清 F6 和 F9 中, 异质性与 SA 残基的修饰有关[图 5 (f)]。早期对马血清蛋白糖基化的研究主要关注 SA 的不同修饰[69–72]。一些已报道的用于分析 O-乙酰化 SA 的新方法依赖于碎片分析技术进



**图5.** 马血清中O-乙酰化N-聚糖的详细结构表征。(a) 含有APTS标记的马血清N-聚糖与全马血清的HILIC-HPLC F6和F9的xCGE-LIF指纹图谱(即对齐电泳图)(放大)。(b) F6(左)和F9(右)中含有的APTS标记的N-聚糖的SiaA酶切前后的xCGE-LIF指纹图谱。(c) F6(左)和F9(右)中APTS标记的N-聚糖中唾液酸温和和乙酸水解(AA)前后的xCGE-LIF指纹图谱。(d) F6(左)和F9(右)中APTS标记的N-聚糖唾液酸弱碱性去O-乙酰化(-Ac)和随后的SiaA酶切前后的xCGE-LIF指纹图谱。(e) 通过MALDI-TOF-MS获得的F6(左)和F9(右)中鉴定出的Fmoc标记的马血清N-聚糖的组成信息。(f) 在F6(左)和F9(右)中鉴定出的马血清N-聚糖的示意图,包括对唾液酸的酶促作用和化学作用的概述。在(b)~(d)中,由于水解(酶促或化学作用)而失去的糖残基或官能团(即一个N-聚糖结构转化为另一个)用箭头表示:-S表示唾液酸残基的水解;-Ac表示O-乙酰基的水解;数字(1x或2x)表示水解糖或基团的数量。聚糖结构的缩写见附录A。N-聚糖按照SNFG命名法表示[19]。聚糖底图上的OAc: O-乙酰基。

行更深层次的表征[64–65]。然而，所有这些研究（类似于关于卵清白蛋白的研究）所采用的技术在专业知识/设备方面都相当昂贵和（或）要求很高。为了克服这些挑战，本文建立了一种基于Fmoc的方法，结合了分子诊断实验室中广泛使用的两种设备：基于毛细管凝胶电泳（CGE）的DNA分析仪和MALDI-TOF-MS。重要的是，本研究表明，在本文提出的工作流程的所有步骤之后——去N-糖基化、Fmoc标记、清理和分馏、Fmoc去除、APTS标记、二次清理和分析——脆弱的修饰如SA O-乙酰化没有丢失。此外，乙酰化的聚糖很容易被识别出来，即使使用了微小（即微升）体积的复杂样品混合物（马血清）（不像上述的一些方法，需要100~1000倍以上的纯糖蛋白）。虽然O-乙酰化只是一个很小的修饰，但本文对相关的糖基化的最小的细节进行了分析[见图S8（c）中O-乙酰化SA的异构体特异性分析]。

所提出的基于可去除染料的方法为人血浆（这是临床糖组学中被研究最多的生物液体之一）N-聚糖的研究提供了新的机会。血浆中N-聚糖图谱的改变已被发现与生理学事件（如衰老或妊娠）[73–74]和病理生理学事件（如II型糖尿病、肝硬化/纤维化和癌症）[75–77]相关。由于样品的复杂性、糖基化水平的广泛动态范围，以及聚糖的结构异质性，N-糖组总体分析仍然是一个巨大的挑战。值得注意的是，血浆中低丰度的聚糖可能是潜在的有价值的疾病标志物，该标志物可能被忽视。通过将所提出的方法应用于马血清，表明该方法适用于从复杂的样品中制备的N-聚糖的表征；因此，该方法有潜力去识别疾病发生和进展的生物标志物。

### 3.3.3. 多重唾液酸化N-聚糖

要完整地研究唾液化结构的复杂性，就需要表征微小的结构变化，如SA与潜在在聚糖链连接的差异。此外，还需要识别不同的SA类型，这些类型通常只需要一个细微的修饰，如单个氧原子[如Neu5Ac vs N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)]。SA的水平[78]、类型[79]或连接[80]的显著变化与癌症的侵袭性和转移有关，突出了SA阐明的重要性，而不仅仅是触及SA多样性的表面。

为了更深入地了解唾液酸化的N-糖组，将基于Fmoc的方法与MALDI-TOF-MS方法相结合，利用SA羧基的选择性修饰来区分 $\alpha$ 2-3和 $\alpha$ 2-6连接的SA [22–23]。来自不同动物物种的血清转铁蛋白的聚糖在SA的类型、数量和连接方面具有前所未有的多样性[70,81–82]。因此，选择牛血清转铁蛋白（迄今为止对其糖基化作用分析较少）来展示唾液酸化N-聚糖的多样性和所有的分析可能性。

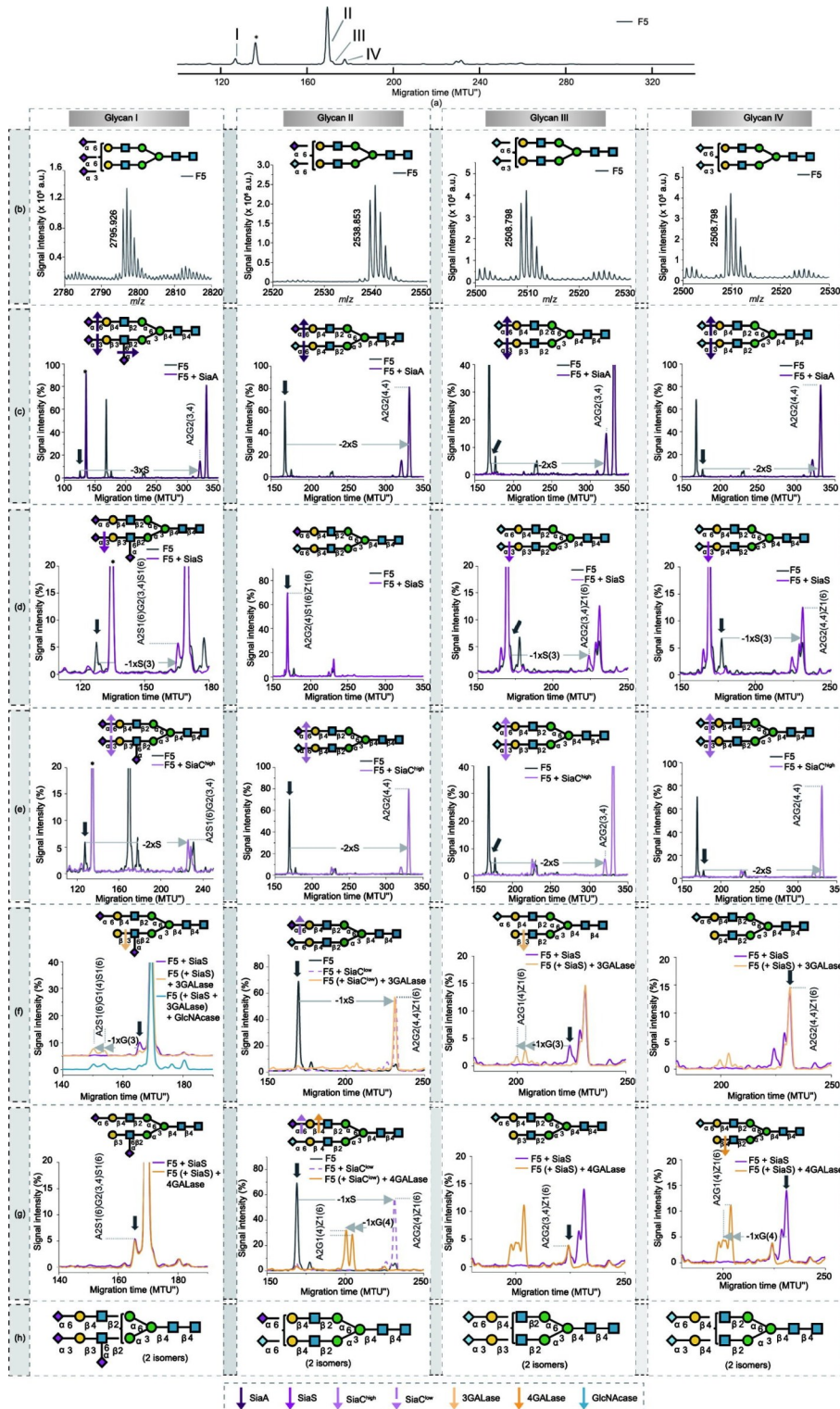
为此，用HILIC色谱法将牛血清转铁蛋白中Fmoc标记的N-聚糖分离成8个碎片[见附录A中的图S9（a）]，并通过MALDI-TOF-MS和xCGE-LIF，利用外切糖苷酶酶切进行进一步分析。本文报道了碎片5（F5）的结果[见附录A中的图S9（b）]，其中包含各种多重唾液酸化N-聚糖。作为一个例子，4种N-聚糖（称为聚糖I–IV）解释了结构测定的方法，这些聚糖是唯一存在于这个组分中的[图6（a）]。

为了在MALDI-TOF-MS中区分相同质量的唾液连接异构体，对Fmoc-聚糖组分进行了连接特异性乙酰化反应。利用SA衍生法引起的质量差异，可以直接从质谱中分辨出 $\alpha$ 2-3连接的SA [与未修饰的SA相比， $-18.011$ 道尔顿(Da)]和 $\alpha$ 2-6连接的SA ( $+28.031$  Da) [22]。因此，不仅获得了有关SA类型（即Neu5Ac或Neu5Gc，质量差异为15.999 Da）的信息，而且还获得了聚糖I–IV的连接类型（ $\alpha$ 2-3或 $\alpha$ 2-6）和SA的数量（2个或3个）的信息[图6（b）]。在用 $\beta$ 1-3特异性3GALase和 $\beta$ 1-4特异性4GALase处理F5后，没有观察到xCGE-LIF中聚糖 $t_{\text{mig}}$ 的变化[见附录A中的图S9（c）和（d）]，表明所有的Gal都被末端SA占据。SiaA酶切（修饰所有SA）显示，所有4种聚糖都包含双触角结构A2G2(4,4)或A2G2(3,4)作为潜在的主链[图6（c）]。

为了完全揭示聚糖的结构，进行了额外的特异性外切糖苷酶酶切[图6（d）和（e）]。 $\alpha$ 2-3特异性SiaS酶切证实，聚糖I有一个末端 $\alpha$ 2-3连接的Neu5Ac，而聚糖III和聚糖II有一个末端 $\alpha$ 2-3连接的Neu5Gc [图6（d）]。通过高浓度（完整的）SiaC酶切（SiaC<sup>high</sup>）可知，存在一个额外的Neu5Ac  $\alpha$ 2-6-连接到聚糖I的触角GlcNAc，该酶切割了所有的末端 $\alpha$ 2-3-SA和 $\alpha$ 2-6-SA，但没有切割分支SA（与内部连接，触角GlcNAc），如图6（e）所示。

为了确定唾液连接的位置和潜在的聚糖链的排列，对这些聚糖进行了顺序外切糖苷酶酶切。在从聚糖I中去除末端 $\alpha$ 2-3连接的Neu5Ac后，只有3GALase（而不是4GALase）对暴露的臂起作用[图6（f）和（g），聚糖I]。因此研究发现，聚糖I上的 $\alpha$ 2-3-Neu5Ac只与 $\beta$ 1-3-Gal相连。 $\alpha$ 2-6-Neu5Ac在Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-R触角（由与GlcNAcase最终孵育支撑）上与GlcNAc相连，由于分支Necu5Ac的存在，不能去除GlcNAc [图6（f），聚糖I]。通过SiaC<sup>high</sup>的连续降解，进一步证实了聚糖I的身份，即GALase（3GALase或4GALase）和GlcNAcase [见附录A中的图S9（e）和（f）]。同样，聚糖III和聚糖IV分别含有与3GALase或4GALase连接的 $\alpha$ 2-3-Neu5Gc，这一结论通过与SiaS和GALase（3GALase或4GALase）





**图 6.** 牛血清转铁蛋中唾液酸化N-聚糖的详细结构表征。将基于Fmoc的方法与连接特异性唾液酸酯化和MALDI-TOF-MS分析相结合。(a) 含有APTS标记的牛转铁蛋白N-聚糖的HILIC-HPLC F5的xCGE-LIF指纹图谱(即对齐电泳图)[见附录A中的图S9(a)、(b)]。(b) Fmoc标记和乙酰基化聚糖I、II、III、IV(来自MALDI-TOF-MS所研究的F5)的唾液酸类型和连接信息。(c)~(e)由xCGE-LIF分析前和分析后的APTS标记的聚糖I-IV的外切糖苷酶单酶切:(c) SiaA;(d) SiaS;(e) 高浓度(完整) SiaC (SiaC<sup>high</sup>) 酶切。(f)、(g) 使用以下酶对APTS标记的聚糖I-IV进行顺序外切糖苷酶酶切的xCGE-LIF指纹图谱: 低浓度(部分) SiaC (SiaC<sup>low</sup>)、4GALase、3GALase和GlcNAcase。(h) F5中鉴定出的牛转铁蛋白聚糖I-IV。(c)~(g) 垂直箭头(灰色)表示正在研究的外切糖苷酶酶切时行为的峰。水平箭头表示每次酶切后峰的运动: -S表示唾液酸残基的水解; -S(3)表示 $\alpha$ -2-3连接的唾液酸的水解; -G(4)表示 $\beta$ -1-4连接的半乳糖的水解; -G(3)表示 $\beta$ -1-3连接的半乳糖的水解。彩色箭头表示外切糖苷酶对特定末端单糖的特异性。用星号(\*)标记的峰表示xCGE-LIF中添加到样本的一个内部标准,用于迁移时间校准。关于结构缩写的详细说明见附录A。以下结构特征不能用缩写来描述: $\beta$ -1-3-半乳糖只能用 $\alpha$ -2-3-唾液酸取代; $\alpha$ -2-6-Neu5Ac只与Gal $\beta$ -1-3GlcNAc $\beta$ -1-R触角上的GlcNAc相连。N-聚糖按照SNFG命名法表示[19]。

的逐步酶切得到证实[图 6 (f) 和 (g)], 聚糖 III 和聚糖 IV]。GlcNAcase 处理的最后一步证实了在聚糖 III 上没有分支 SA [见附录 A 中的图 S9 (g)]。低浓度 (部分) SiaC 酶切 (SiaC<sup>low</sup>) 从糖聚糖 II 中去除末端  $\alpha$ 2-6-Neu5Ac, 而 Neu5Gc $\alpha$ 2-6Gal 连接保持完整 [图 6 (f), 聚糖 II]。用 4GALase 孵育 SiaC<sup>low</sup> 处理的聚糖 II, 产生两个同分异构聚糖 [图 6 (g), 聚糖 II]。聚糖 I ~ IV 的准确结构如图 6 (h) 所示。

由于可逆标记, 大量的分析方法可以潜在地相互结合在一起, 最终的选择取决于研究问题和仪器的可用性 (在附录 A 中: 补充结果 3 显示了与生物制药行业的“金标准”方法, 即 HILIC-HPLC 的结合)。本文将具有连接特异性 SA 衍生化的 MALDI-TOF-MS 和具有大量的外切糖苷酶酶切的 xCGE-LIF 组合在一起, 以研究牛血清转铁蛋白上唾液酸化聚糖结构的完整复杂性 [完整的结构注释见附录 A 中的图 S9 (h)]。MALDI 技术具有相对简单的光谱解释和简单的 SA 连接分析, 以快速和有效的方式提供了有关 SA 核心结构和 SA 与潜在糖连接的信息。此外, 具有靶向外切糖苷酶酶切的 xCGE-LIF 方法解读了 SA 的位置以及潜在糖的确切排列。因此, 所提出的基于可去除染料的方法为探索唾液酸化聚糖物种的复杂结构开辟了新的和令人兴奋的可能性。

### 3.3.4. 硫酸化 N-聚糖

抗体糖基化已被证明在许多疾病中发生变化, 包括自身免疫性疾病、感染性疾病和癌症, 与疾病进展和严重程度相关 [83–84]。这些研究主要涉及 IgG 糖基化; 然而, 人血免疫球蛋白 A (hIgA) 糖基化最近也得到了一些关注, 并被发现与类风湿性关节炎和 IgA 肾病有关 [85]。因此, IgA 糖基化在未来可能被用于诊断和治疗方法。除了 IgG 之外, 人们对抗体的糖基化在健康或疾病中的作用仍然知之甚少, 这可能是由于其糖基化复杂程度更高。本文应用了基于可去除染料的方法来扩展对 IgA N-糖基化的理解。xCGE-LIF 分析结合外切糖苷酶酶切证实了先前的报道 [86], 表明 hIgA N-聚糖是复杂的双触角型, 具有高水平的唾液酸化和半乳糖化, 以及可能的岩藻糖基化和平分型 [图 7 (a)]。有趣的是, 有一个峰含有一个不能被明确识别出来的 N-聚糖。这种结构 [在图 7 (a) 中用箭头标记] 比完全唾液酸化的双触角型聚糖迁移得更快 (因此在电泳图中出现得更早), 表明这种聚糖结构可能包含额外的负电荷基团 (因为更多的负电荷使聚糖的迁移速度更快)。通过对 Fmoc 标记的 hIgA 衍生的 N-聚糖聚合物的 HILIC-HPLC 分馏, 分离出了未知的结构 [见附录 A 中的图 S10

(a), 组分 16; 图 7 (b), 图 I], 并对该结构进行详细的 xCGE-LIF 和 MALDI-TOF-MS 分析 [图 7 (b) ~ (d)]。

序列外切糖苷酶酶切结合 xCGE-LIF 分析显示, 除了 SA 羧基外, 在所研究的聚糖上还存在一个带负电荷的修饰及其位置 [图 7 (b)]。同时引入两种不同特异性的唾液酸酶以及酸水解, 以区分聚糖的  $\alpha$ 2-3 和  $\alpha$ 2-6 连接 SA。目标 N-聚糖上的 SA 对 SiaA 酶切 [图 7 (b), 图 II] 和酸处理 (数据未显示) 敏感, 同时释放  $\alpha$ 2-6 和  $\alpha$ 2-3 连接的 SA, 但对 SiaS 具有抗性 [见附录 A 中的图 S10 (b)], 仅释放  $\alpha$ 2-3 连接的 SA。因此, 本研究发现目标 N-聚糖上的 SA 完全是  $\alpha$ 2-6 连接的。此外, 去唾液酸化后,  $t_{\text{mig}}$  的变化对应于两个 SA 的丢失。有趣的是, 与两种不同的半乳糖苷酶的酶切给出了不同的结果。首先, 用 4GALase 的酶切释放一个 Gal 残基 [图 7 (b), 图 II]。其次, 用 46GALase 的酶切可去除两个 Gal 残基 [图 7 (b), 图 III]。而迁移变化的幅度大小分别与一个和两个 Gal 残基的损失相关,  $t_{\text{mig}}$  结果表明, 在聚糖上仍保留着负电荷。随后的 GlcNAc 酶切去除了一个 [在 4GALase 的情况下; 图 7 (b), 图 II] 或两个潜在的 GlcNAc 残基 [在 46GALase 的情况下; 图 7 (b), 图 III]。更重要的是, 46GALase 产物的 GlcNAcase 处理 (完全去唾液酸化和去半乳糖基化) 将聚糖切割为具有核心岩藻糖基化 (FMan3) 的常见的三甘露糖基核心结构, 表明 N-聚糖不仅失去了两个 GlcNAc 残基, 而且失去了负电荷 [即由于带电荷的 GlcNAc 水解而向电泳图更高的  $t_{\text{mig}}$  区域转移; 图 7 (b), 图 III, 蓝色痕迹]。因此, 该修饰的位置位于附着在三甘露糖基核心上的两个 GlcNAc 残基之一上。

MALDI-TOF-MS 揭示了这种酸性聚糖修饰的身份。首先, 在  $m/z$  2086.7 处的 [M-H]<sup>-</sup> 离子 [在反射负离子 (RN) 模式下为去唾液酸化组分记录], 表明双触角去半乳糖岩藻糖基化聚糖上存在硫酸化修饰 [FA2G2; 图 7 (c)]。串联质谱 (MS/MS) 提供了最终的证据, 证实了 FA2G2 聚糖上的硫酸基团的存在和位置 [图 7 (d)]。在 MS/MS 中观察到含有硫酸基团的碎片离子, 进一步证明了 N-聚糖的硫酸化。此外, 某些碎片还提供了关于硫酸基团位置的关键信息。例如,  $m/z$  1809.7 处的一个碎片离子 [由于两个末端己糖残基的丢失; 图 7 (d) 中的阴影结构] 在  $m/z$  2132.0 处的 [M-H+2Na]<sup>+</sup> 的 MS/MS 图谱 (盒状结构) 中被清晰地观察到, 表明硫酸基团位于 GlcNAc 上。如上所述, 这一结果得到了外切糖苷酶实验 (与 xCGE-LIF 结合) 的支持。因此, 由于使用了基于 Fmoc 的方法, 本文详细描述了 hIgA 上的硫酸化聚糖, 以前其他聚糖分析技术没有检测到该结构 [图 7 (e)]。



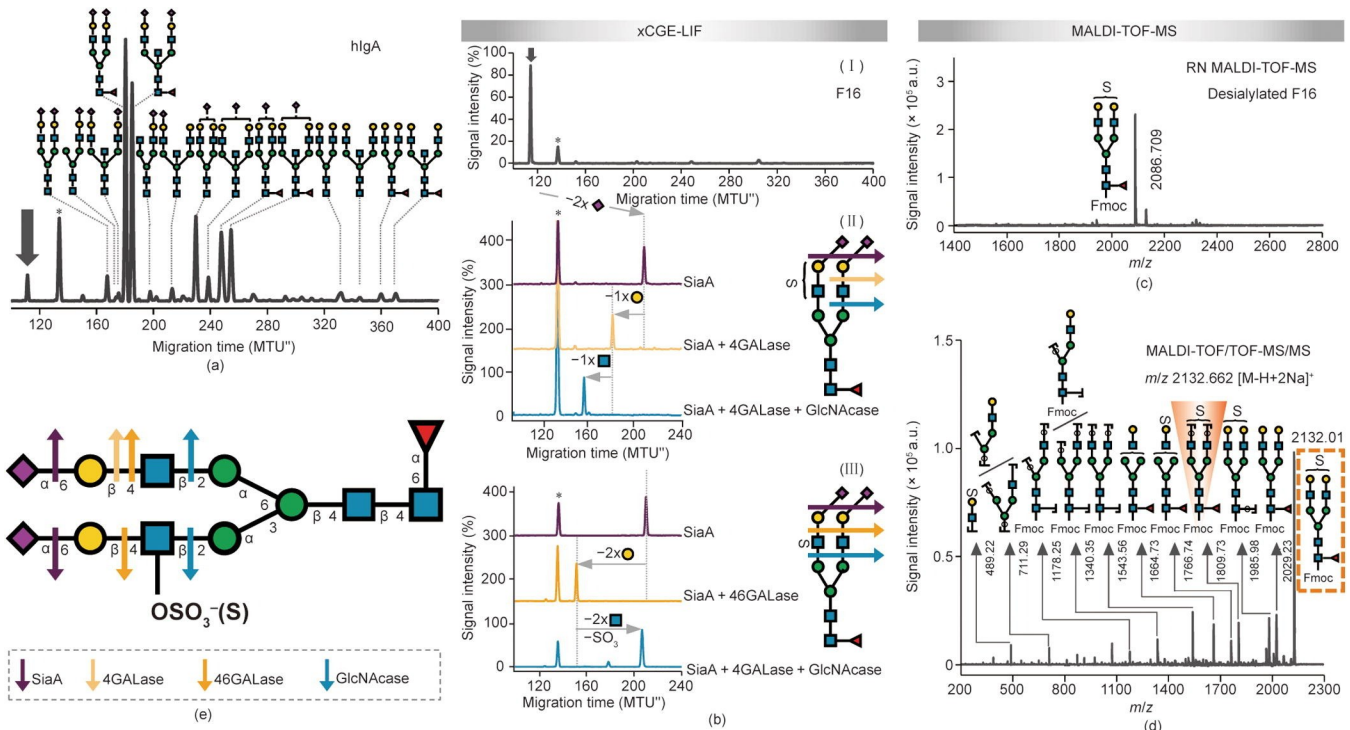


图7. hIgA中硫酸化N-聚糖的详细结构表征。(a) APTS标记的hIgA N-聚糖的xCGE-LIF指纹图谱(即校准的电泳图)。N-聚糖结构通过数据库匹配进行校准,并通过外切糖苷酶测序进行确认(均与xCGE-LIF结合)。(b)图(I)显示了含有APTS标记的hIgA N-聚糖的HILIC-HPLC碎片16(F16)的xCGE-LIF指纹图谱。图(II)和图(III)显示了如xCGE-LIF分析的F16中含有APTS标记的N-聚糖的顺序外切糖苷酶酶切。使用如下酶进行酶切:SiaA、4GALase、46GALase和GlcNAcase。在左边的N-聚糖指纹图谱中,酶的活性用箭头显示,指出了相应的N-聚糖的迁移时间变化。在这两个图中,酶的活性如图中右侧所示。(c)Fmoc标记下的去唾液酸化F16的反射负离子(RN)MALDI-TOF-MS图谱。(d)Fmoc标记的F16中主要的N-聚糖的MALDI-TOF/TOF-MS-MS光谱图(所研究的分析物;在橙色虚线框中突出显示)。显示硫酸基团位置的关键诊断碎片为橙色阴影部分。(e)F16中鉴定的hIgA N-聚糖示意图。对于(b)和(e)中的聚糖插图,箭头表示末端聚糖残基上的外切糖苷酶的活性[(e)中提供酶颜色图例]。Neu5Ac-Gal结合的角度[如(b)图所示]表明了 $\alpha$ 2-6连接。(b)~(e)中聚糖底图上的字母S表示硫酸基团。(a)、(b)中用星号(\*)标记的峰值对应于xCGE-LIF中用于迁移时间校准的一个内部标准。N-聚糖按照SNFG命名法表示[19]。

为了进一步揭示聚糖结构的细节,寻找了严格水解硫酸盐或硫酸化聚糖的酶。在之前的合作工作中,确定了硫酸盐依赖的己糖胺酶从N-聚糖的末端位置去除完整的GlcNAc-6-so4(而不是硫酸化的GlcNAc)[87]。当将这种高度特异性的酶应用于所研究的聚糖[之前被SiaA和46GAL酶(即完全脱烷和脱乳糖结构)酶切],它对硫酸化GlcNAc起作用,导致聚糖的一个非硫酸化GlcNAc保留在 $\alpha$ 1-6-Man臂(FA1G0[6])上[87]。因此,利用这种新的聚糖分析工具,发现仅在 $\alpha$ 1-3-Man臂的GlcNAc上附着了一个硫酸基团,从而为更深入地表征硫酸化聚糖开辟了一条途径。尽管检测和表征硫酸化聚糖对所有的分析方法来说都是一项艰巨的任务[88],但本文的方法确定了硫酸盐在IgA衍生的N-聚糖上的确切位置。

本研究认为,这一新发现将有助于未来研究IgA糖基化与疾病之间的关系,因为N-聚糖的硫酸化可以显著影响生物识别和从体内清除蛋白质等过程[89-90]。然而,硫酸化N-聚糖对IgA的影响尚不清楚。事实上,尽管各种各样的方案和方法(如放射性同位素标记、凝集素结合阵

列、与色谱法相结合的释放聚糖或糖肽的质谱分析,以及与FLD结合的LC)已经用于大型队列研究中健康组和疾病组中IgA糖基化的研究[83,91],但本文是关于hIgA N-聚糖硫酸化的第一个详细报道。IgA N-聚糖的结构已经用不同的分析方法进行了探索,而这种硫酸化作用还没有被发现,因此需要一种新的聚糖分析工具。本研究认为,基于Fmoc的方法——特别是与新发现的硫酸化特异性酶结合[87]——可以提供非常深入的结构信息,并可以帮助回答一些关于其他免疫球蛋白硫酸化的迫切问题[92-94]。

#### 4. 结论

在过去的几十年里,已经看到了用于N-聚糖结构分析的技术在不断进步。然而,这些分析工作流程的重点主要是提高速度、总处理能力和灵敏度,通常以糖组分析的深度和广度为代价。为了解糖基化过程中所包含的生物学信息,首先有必要充分解剖聚糖结构。本研究的基本目的



是展示通过可逆标记将高分辨率基于CE的方法 (xCGE-LIF) 与快速和易于使用的基于MS的方法 (MALDI-TOF-MS) 相结合来揭示聚糖复杂性的能力。随着可去除标记技术的应用, 现有的聚糖分析技术具有操作简单、成本低、处理能力高、结构分辨率高和灵敏度高的优点, 而且易于整合以阐明结构细节 (如位置和连接异构体)。以鸡卵清白蛋白、马血清、牛转铁蛋白和hIgA为例, 本研究不仅证实了已知的结构信息 (这些信息以前仅通过费时费力的分析方法获得), 而且还揭示了以前未见过的结构细节。虽然本文关注的是xCGE-LIF和MALDI-TOF-MS这两种高通量方法的结合, 但可去除染料的应用为许多新的分析途径打开了大门。因此, 本文提出的方法将鼓励聚糖研究者将可逆标记作为一种方法, 然后结合以前“不可组合”技术进行深入的聚糖分析。此外, 希望所提出的方法有助于更多的研究人员能更容易地进行聚糖分析, 从而对聚糖在生理学和疾病中的作用获得更深入的理解。

## Nomenclature

<b>2-AB</b>	2-aminobenzamide
<b>3GALase</b>	$\beta$ 1-3-galactosidase
<b>4GALase</b>	$\beta$ 1-4-galactosidase
<b>46GALase</b>	$\beta$ 1-4,6-galactosidase
<b>APTS</b>	8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid
<b>BioGel</b>	Bio-Gel P10
<b>CE</b>	capillary electrophoresis
<b>Fmoc</b>	9-fluorenylmethyl chloroformate
<b>Fuc</b>	fucose
<b>Gal</b>	galactose
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> -acetylglucosamine
<b>GlcNAcase</b> or <b>GlcNAcase<sup>sp</sup></b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> $\beta$ 1-2, 3, 4, 6- <i>N</i> -acetylglucosaminidase
<b>GlcNAcase<sup>xm</sup></b>	<i>Xanthomonas manihotis</i> $\beta$ 1-2, 3, 4, 6- <i>N</i> -acetylglucosaminidase
<b>(h)IgA</b>	(human) immunoglobulin A
<b>HILIC-</b>	
<b>HPLC-FLD</b>	hydrophilic interaction high-performance liquid chromatography with fluorescence detection
<b>LC</b>	liquid chromatography
<b>Man</b>	mannose
<b>MANase</b>	$\alpha$ 1-2,3,6 mannosidase

<b>MALDI-TOF-MS</b>	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
<b>MS</b>	mass spectrometry
<b>MTU"</b>	aligned migration time units
<b><i>m/z</i></b>	mass-to-charge ratio
<b>Neu5Ac</b>	<i>N</i> -acetylneuraminic acid
<b>Neu4,5Ac<sub>2</sub></b>	<i>N</i> -acetyl-4- <i>O</i> -acetylneuraminic acid
<b>Neu5Gc</b>	<i>N</i> -glycolylneuraminic acid
<b>PNGase F</b>	peptide <i>N</i> -glycosidase F
<b>RFU</b>	relative fluorescence units
<b>RN</b>	reflectron negative-ion mode
<b>RP</b>	reflectron positive-ion mode
<b>SA</b>	sialic acid
<b>SiaA</b>	$\alpha$ 2-3,6,8-sialidase
<b>SiaC</b>	$\alpha$ 2-3,6-sialidase
<b>SiaS</b>	$\alpha$ 2-3-sialidase
<b>SPE</b>	solid-phase extraction
<b><i>t</i><sub>mig</sub></b>	migration time
<b>UPLC</b>	ultra-high-performance liquid chromatography
<b>xCGE-LIF</b>	multiplexed capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence detection fluorescence detection

## Acknowledgements

We would like to thank Silvana Fischer and Lisa Fichtmüller for technical support with the optimization experiments and Alex Behne for support with the glyXtoolCE (commercially available) and glyXtoolLC (closed beta version) software. We also thank Léa Chuzel and Marcus Hoffmann for helpful discussions and critical reading of the manuscript. We acknowledge support from the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) under the project “Die Golgi Glykan Fabrik 2.0” (031A557C for Samanta Cajic and Erdmann Rapp), the European Commission (EC) under the project “HighGlycan” (278535 for René Hennig and Erdmann Rapp), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under the project “The concert of dolichol-based glycosylation: from molecules to disease models” (FOR2509 for Valerian Grote and Erdmann Rapp). We are grateful to the glyXera GmbH

for providing the software tools glyXtoolCE (commercial software) and glyXtoolLC (closed beta version) for data analysis.

## Authors' contributions

Samanta Cajic designed, planned, and performed most of the experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. Samanta Cajic and René Hennig prepared figures. Valerian Grote performed the experiments on horse serum and hIgA N-glycans, as well as their data analysis and interpretation. René Hennig, Valerian Grote, and Erdmann Rapp contributed to data interpretation. René Hennig proposed the project and provided expertise and feedback. Erdmann Rapp supervised the project. All authors critically revised and edited the manuscript, and confirmed the final version of the manuscript.

## Compliance with ethics guidelines

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Erdmann Rapp is co-affiliated and Samanta Cajic and René Hennig are employees of glyXera GmbH. glyXera provides high-performance glycoanalytical products and services and holds several patents for xCGE-LIF and MALDI-based glycoanalysis.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.02.016>.

## References

- [1] Watkins WM. The ABO blood group system: historical background. *Transfus Med* 2001;11(4):243–65.
- [2] Olsson ML, Clausen H. Modifying the red cell surface: towards an ABO-universal blood supply. *Br J Haematol* 2008;140(1):3–12.
- [3] Walt D, Aoki-Kinoshita KF, Bertozzi CR, Boons GJ, Darvill A, et al. Transforming glycoscience: a roadmap for the future. Washington DC: National Academies Press; 2012.
- [4] Dennis JW, Laferté S, Waghorne C, Breitman ML, Kerbel RS. Beta 1–6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* 1987;236(4801):582–5.
- [5] Przybyło M, Pocheć E, Link-Lenczowski P, Lityń ska A. Beta1–6 branching of cell surface glycoproteins may contribute to uveal melanoma progression by up-regulating cell motility. *Mol Vis* 2008;14:625–66.
- [6] Taniguchi N, Kizuka Y. Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. *Adv Cancer Res* 2015; 126:11–51.
- [7] Mechref Y, Muzikar J, Novotny MV. Comprehensive assessment of N-glycans derived from a murine monoclonal antibody: a case for multimethodological approach. *Electrophoresis* 2005;26(10):2034–46.
- [8] Mitra I, Zhuang Z, Zhang Y, Yu CY, Hammoud ZT, Tang H, et al. N-glycan profiling by microchip electrophoresis to differentiate disease states related to esophageal adenocarcinoma. *Anal Chem* 2012;84(8):3621–7.
- [9] Gennaro LA, Salas-Solano O. On-line CE-LIF-MS technology for the direct characterization of N-linked glycans from therapeutic antibodies. *Anal Chem* 2008;80(10):3838–45.
- [10] Cajic S, Hennig R, Burock R, Rapp E. Capillary (gel) electrophoresis-based methods for immunoglobulin (G) glycosylation analysis. In: Pezer M, editor. *Antibody glycosylation. Experientia supplementum*, vol. 112. Cham: Springer; 2021. p. 137–72.
- [11] Pabst M, Kolarich D, Pörtl G, Dalik T, Lubec G, Hofinger A, et al. Comparison of fluorescent labels for oligosaccharides and introduction of a new postlabeling purification method. *Anal Biochem* 2009;384(2):263–73.
- [12] Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, Wuhrer M. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem* 2010;397(8):3457–81.
- [13] Carpino LA. The 9-fluorenylmethyloxycarbonyl family of base-sensitive amino-protecting groups. *Acc Chem Res* 1987;20(11):401–7.
- [14] Kajihara Y, Suzuki Y, Sasaki K, Juneja LR. Chemoenzymatic synthesis of diverse asparagine-linked oligosaccharides. *Methods Enzymol* 2003;362:44–64.
- [15] Song X, Lasanajak Y, Rivera-Marrero C, Luyai A, Willard M, Smith DF, et al. Generation of a natural glycan microarray using 9-fluorenylmethyl chloroformate (FmocCl) as a cleavable fluorescent tag. *Anal Biochem* 2009; 395(2):151–60.
- [16] Trbojević-Akmačić I, Lageveen-Kammeijer GSM, Heijs B, Petrović T, Deriš H, Wuhrer M, et al. High-throughput glycomic methods. *Chem Rev* 2022;122(20): 15865–913.
- [17] Ceroni A, Dell A, Haslam SM. The GlycanBuilder: a fast, intuitive and flexible software tool for building and displaying glycan structures. *Source Code Biol Med* 2007;2:3.
- [18] Damerell D, Ceroni A, Maass K, Ranzinger R, Dell A, Haslam SM. The GlycanBuilder and GlycoWorkbench glycoinformatics tools: updates and new developments. *Biol Chem* 2012;393:1357–62.
- [19] Varki A, Cummings RD, Aebi M, Packer NH, Seeberger PH, Esko JD, et al. Symbol nomenclature for graphical representations of glycans. *Glycobiology* 2015;25:1323–4.
- [20] Hennig R, Rapp E, Kottler R, Cajic S, Borowiak M, Reichl U. N-glycosylation fingerprinting of viral glycoproteins by xCGE-LIF. In: Lepenies B, editor. *Carbohydrate-based vaccines. Methods in molecular biology*. New York City: Humana Press; 2015. p. 123–43.
- [21] Hennig R, Cajic S, Borowiak M, Hoffmann M, Kottler R, Reichl U, et al. Towards personalized diagnostics via longitudinal study of the human plasma N-glycome. *Biochim Biophys Acta* 2016;1860(8):1728–38.
- [22] Reiding KR, Blank D, Kuijper DM, Deelder AM, Wuhrer M. High-throughput profiling of protein N-glycosylation by MALDI-TOF-MS employing linkage-specific sialic acid esterification. *Anal Chem* 2014;86(12):5784–93.
- [23] Reiding KR, Lonardi E, Hipgrave Ederveen AL, Wuhrer M. Ethyl esterification for MALDI-MS analysis of protein glycosylation. In: Reinders J, editor. *Proteomics in systems biology. Methods in molecular biology*. New York City: Humana Press; 2016. p. 151–62.
- [24] Dionex. Direct determination of sialic acids in glycoprotein hydrolyzates by HPAAE-PAD. Application update 180 2011:LPN 2831 [Internet]. Thermo Fisher Scientific Inc., c2016 [cited 2021 Sep 22]. Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AU-180-IC-Sialic-Acids-Glycoprotein-Hydrolyzates-AU71730-EN.pdf>.
- [25] Varki A, Diaz S. The release and purification of sialic acids from glycoconjugates: methods to minimize the loss and migration of O-acetyl groups. *Anal Biochem* 1984;137(1):236–47.
- [26] Martin LT, Verhagen A, Varki A. Recombinant influenza C hemagglutinin-esterase as a probe for sialic acid 9-O-acetylation. *Methods Enzymol* 2003;363: 489–98.
- [27] Thiesler CT, Cajic S, Hoffmann D, Thiel C, van Diepen L, Hennig R, et al. Glycomic characterization of induced pluripotent stem cells derived from a patient suffering from phosphomannomutase 2 congenital disorder of

- glycosylation (PMM2-CDG). *Mol Cell Proteomics* 2016;15(4):1435–52.
- [28] Konze SA, Cajic S, Oberbeck A, Hennig R, Pich A, Rapp E, et al. Quantitative assessment of sialo-glycoproteins and *N*-glycans during cardiomyogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Chembiochem* 2017; 18(13):1317–31.
- [29] Suzuki H, Müller O, Guttman A, Karger BL. Analysis of 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate-derivatized oligosaccharides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 1997;69(22):4554–9.
- [30] Lemoine J, Cabanes-Macheteau M, Bardor M, Michalski JC, Faye L, Lerouge P. Analysis of 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid labelled *N*-glycans by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000;14(2):100–4.
- [31] Guttman A, Chen FTA, Evangelista RA. Separation of 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate-labeled asparagine-linked glycans by capillary gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1996;17(2):412–7.
- [32] Laroy W, Contreras R, Callewaert N. Glycome mapping on DNA sequencing equipment. *Nat Protoc* 2006;1(1):397–405.
- [33] Nakano M, Higo D, Arai E, Nakagawa T, Kakehi K, Taniguchi N, et al. Capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry for rapid and sensitive *N*-glycan analysis of glycoproteins as 9-fluorenylmethyl derivatives. *Glycobiology* 2009;19(2):135–43.
- [34] Wang C, Qiang S, Jin W, Song X, Zhang Y, Huang L, et al. Reductive chemical release of *N*-glycans as 1-amino-alditols and subsequent 9-fluorenylmethylloxycarbonyl labeling for MS and LC/MS analysis. *J Proteomics* 2018;187:47–58.
- [35] Kamoda S, Nakano M, Ishikawa R, Suzuki S, Kakehi K. Rapid and sensitive screening of *N*-glycans as 9-fluorenylmethyl derivatives by high-performance liquid chromatography: a method which can recover free oligosaccharides after analysis. *J Proteome Res* 2005;4(1):146–52.
- [36] Tarentino AL, Plummer Jr TH. Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from flavobacterium meningosepticum. *Methods Enzymol* 1994;230: 44–57.
- [37] Ruhaak LR, Hennig R, Huhn C, Borowiak M, Dolhain RJEM, Deelder AM, et al. Optimized workflow for preparation of APTS-labeled *N*-glycans allowing high-throughput analysis of human plasma glycomes using 48-channel multiplexed CGE-LIF. *J Proteome Res* 2010;9(12):6655–64.
- [38] Rasmussen JR, Davis J, Risley JM, Van Etten RL. Identification and derivatization of (oligosaccharyl)amines obtained by treatment of asparagine-linked glycopeptides with *N*-glycanase enzyme. *J Am Chem Soc* 1992;114(3): 1124–6.
- [39] Likhoshervostov LM, Novikova OS, Derevitskaja VA, Kochetkov NK. A new simple synthesis of amino sugar  $\beta$ -*D*-glycosylamines. *Carbohydr Res* 1986; 146(1):C1–5.
- [40] Küster B, Harvey DJ. Ammonium containing buffers should be avoided during enzymatic release of glycans from glycoproteins when followed by reducing terminal derivatization. *Glycobiology* 1997;7(2):7–9.
- [41] Kallin E, Lönn H, Norberg T, Elofsson M. Derivatization procedures for reducing oligosaccharides, part 3: preparation of oligosaccharide glycosylamines, and their conversion into glycosaccharide—acrylamide copolymers. *J Carbohydr Chem* 1989;8(4):597–611.
- [42] Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, Goulding PN, Charles SM, Parekh RB. Nonspecific and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal Biochem* 1995;230(2):229–38.
- [43] Lauber MA, Yu YQ, Brousmiche DW, Hua Z, Koza SM, Magnelli P, et al. Rapid preparation of released *N*-glycans for HILIC analysis using a labeling reagent that facilitates sensitive fluorescence and ESI-MS detection. *Anal Chem* 2015;87(10):5401–9.
- [44] Stöckmann H, Duke RM, Millán Martín S, Rudd PM. Ultrahigh throughput, ultrafiltration-based *N*-glycomics platform for ultraperformance liquid chromatography (ULTRA(3)). *Anal Chem* 2015;87(16):8316–22.
- [45] Kimzey M, Szabo Z, Sharma V, Gyenes A, Tep S, Taylor A, et al. Development of an instant glycan labeling dye for high throughput analysis by mass spectrometry. *Prozyme* 2015;25:1295.
- [46] Cook KS, Bullock K, Sullivan T. Development and qualification of an antibody rapid deglycosylation method. *Biologicals* 2012;40(2):109–17.
- [47] Fields GB. *Methods for removing the Fmoc group. Peptide synthesis protocols.* New Jersey: Humana Press; 1994.
- [48] Endo T, Nishimura R, Kawano T, Mochizuki M, Kobata A. Structural differences found in the asparagine-linked sugar chains of human chorionic gonadotropins purified from the urine of patients with invasive mole and with choriocarcinoma. *Cancer Res* 1987;47(19):5242–5.
- [49] Yamashita K, Totani K, Iwaki Y, Takamisawa I, Tateishi N, Higashi T, et al. Comparative study of the sugar chains of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidases purified from human hepatocellular carcinoma and from human liver. *J Biochem* 1989; 105(5):728–35.
- [50] Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 1999;1473(1):21–34.
- [51] Goss PE, Baker MA, Carver JP, Dennis JW. Inhibitors of carbohydrate processing: a new class of anticancer agents. *Clin Cancer Res* 1995;1(9): 935–44.
- [52] Harvey DJ, Wing DR, Küster B, Wilson IBH. Composition of N-linked carbohydrates from ovalbumin and co-purified glycoproteins. *J Am Soc Mass Spectrom* 2000;11(6):564–71.
- [53] Tai T, Yamashita K, Ogata-Arakawa M, Koide N, Muramatsu T, Iwashita S, et al. Structural studies of two ovalbumin glycopeptides in relation to the endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase specificity. *J Biol Chem* 1975;250(21):8569–75.
- [54] Yamashita K, Tachibana Y, Kobata A. The structures of the galactose-containing sugar chains of ovalbumin. *J Biol Chem* 1978;253(11):3862–9.
- [55] Yoshima H, Takasaki S, Kobata A. The asparagine-linked sugar chains of the glycoproteins in calf thymocyte plasma membrane. *J Biol Chem* 1980;255(22): 10793–804.
- [56] Kajihara Y, Suzuki Y, Yamamoto N, Sasaki K, Sakakibara T, Juneja LR. Prompt chemoenzymatic synthesis of diverse complex-type oligosaccharides and its application to the solid-phase synthesis of a glycopeptide with Asn-linked sialyl-undeca- and asialo-nonasaccharides. *Chemistry* 2004;10(4):971–85.
- [57] Duffin KL, Welply JK, Huang E, Henion JD, Huang E, Henion JD. Characterization of N-linked oligosaccharides by electrospray and tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 1992;64(13):1440–8.
- [58] Mechref Y, Novotny MV. Mass spectrometric mapping and sequencing of N-linked oligosaccharides derived from submicrogram amounts of glycoproteins. *Anal Chem* 1998;70(3):455–63.
- [59] Nomoto H, Inoue Y. A novel glycoasparagine isolated from an ovalbumin glycopeptide fraction (GP-IV). *Eur J Biochem* 1983;135(2):243–50.
- [60] ChemistrySchauer R., metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1982;40:131–234.
- [61] Klein A, Roussel P. O-acetylation of sialic acids. *Biochimie* 1998;80(1):49–57.
- [62] Varki A. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 1992;2(1):25–40.
- [63] Mandal C, Schwartz-Albiez R, Vlasak R. Functions and biosynthesis of O-acetylated sialic acids. *Top Curr Chem* 2015;366:1–30.
- [64] Liu X, Afonso L. Is permethylation strategy always applicable to protein *N*-glycosylation study? A case study on the O-acetylation of sialic acid in fish serum glycans. In: Li J, editor. *Functional glycomics. Methods in molecular biology.* New Jersey: Humana Press; 2010. p. 259–68.
- [65] Liu X, Qiu H, Lee RK, Chen W, Li J. Methylamidation for sialoglycomics by MALDI-MS: a facile derivatization strategy for both  $\alpha$ 2,3- and  $\alpha$ 2,6-linked sialic acids. *Anal Chem* 2010;82(19):8300–6.
- [66] Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology* 2017;27(1):3–49.
- [67] Neuberger A, Ratcliffe WA. The acid and enzymic hydrolysis of O-acetylated sialic acid residues from rabbit Tamm-Horsfall glycoprotein. *Biochem J* 1972; 129(3):683–93.
- [68] Schauer R, Veh RW, Sander M, Corfield AP, Wiegandt H. “Neuraminidase-resistant” sialic acid residues of gangliosides. In: Svennerholm L, Mandel P, Dreyfus H, Urban PF, editors. *Structure and function of gangliosides. Advances in experimental medicine and biology.* Boston: Springer; 1980. p. 283–94.
- [69] Pepper DS. The sialic acids of horse serum with special reference to their virus inhibitory properties. *Biochim Biophys Acta* 1968;156(2):317–26.
- [70] Spik G, Coddeville B, Montreuil J. Comparative study of the primary structures of sero-, lacto- and ovotransferrin glycans from different species. *Biochimie* 1988;70(11):1459–69.
- [71] Coddeville B, Stratil A, Wieruszkeski JM, Strecker G, Montreuil J, Spik G. Primary structure of horse serotransferrin glycans. *Eur J Biochem* 1989;186(3): 583–90.
- [72] Damm JBL, Voshol H, Hård K, Kamerling JP, Vliegenthart JFG. Analysis of *N*-acetyl-4-O-acetylneuraminic-acid-containing N-linked carbohydrate chains released by peptide-N4-(*N*-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase F. *Eur J Biochem* 1989;180(1):101–10.
- [73] Miura Y, Endo T. Glycomics and glycoproteomics focused on aging and age-related diseases—glycans as a potential biomarker for physiological alterations. *Biochim Biophys Acta* 2016;1860(8):1608–14.
- [74] Reiding KR, Bondt A, Hennig R, Gardner RA, O’Flaherty R, Trbojević-Akmačić I, et al. High-throughput serum *N*-glycomics: method comparison and application to study rheumatoid arthritis and pregnancy-associated changes. *Mol Cell*



- Proteomics 2019;18(1):3–15.
- [75] Keser T, Gornik I, Vučković F, Selak N, Pavić T, Lukić E, et al. Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2017;60(12):2352–60.
- [76] Liu XE, Desmyter L, Gao CF, Laroy W, Dewaele S, Vanhooren V, et al. N-glycomic changes in hepatocellular carcinoma patients with liver cirrhosis induced by hepatitis B virus. *Hepatology* 2007;46(5):1426–35.
- [77] Wang M, Zhu J, Lubman DM, Gao C. Aberrant glycosylation and cancer biomarker discovery: a promising and thorny journey. *Clin Chem Lab Med* 2019;57(4):407–16.
- [78] Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 2015;15(9):540–55.
- [79] Zhang Z, Wuhrer M, Holst S. Serum sialylation changes in cancer. *Glycoconj J* 2018;35(2):139–60.
- [80] Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2019;15(6):346–66.
- [81] Spik G, Coddeville B, Strecker G, Montreuil J, Regoeczi E, Chindemi PA, et al. Carbohydrate microheterogeneity of rat serotransferrin. *Eur J Biochem* 1991; 195(2):397–405.
- [82] Coddeville B, Regoeczi E, Strecker G, Plancke Y, Spik G. Structural analysis of trisialylated biantennary glycans isolated from mouse serum transferrin. *Biochim Biophys Acta* 2000;1475(3):321–8.
- [83] De Haan N, Falck D, Wuhrer M. Monitoring of immunoglobulin N- and O-glycosylation in health and disease. *Glycobiology* 2020;30(4):226–40.
- [84] Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol* 2018;333:65–79.
- [85] Bondt A, Nicolardi S, Jansen BC, Kuijper TM, Hazes JMW, van der Burgt YEM, et al. IgA N- and O-glycosylation profiling reveals no association with the pregnancy-related improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2017;19(1):160.
- [86] Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GSM, Bondt A, Wuhrer M. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J* 2016;33(3):309–43.
- [87] Chuzel L, Fossa SL, Boisvert ML, Cajic S, Hennig R, Ganatra MB, et al. Combining functional metagenomics and glycoanalytics to identify enzymes that facilitate structural characterization of sulfated N-glycans. *Microb Cell Fact* 2021;20(1):162.
- [88] Jiang H, Irungu J, Desaire H. Enhanced detection of sulfated glycosylation sites in glycoproteins. *J Am Soc Mass Spectrom* 2005;16(3):340–8.
- [89] Kawashima H. Roles of sulfated glycans in lymphocyte homing. *Biol Pharm Bull* 2006;29(12):2343–9.
- [90] Muthana SM, Campbell CT, Gildersleeve JC. Modifications of glycans: biological significance and therapeutic opportunities. *ACS Chem Biol* 2012; 7(1):31–43.
- [91] Zauner G, Selman MHJ, Bondt A, Rombouts Y, Blank D, Deelder AM, et al. Glycoproteomic analysis of antibodies. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12(4): 856–65.
- [92] Wang JR, Gao WN, Grimm R, Jiang S, Liang Y, Ye H, et al. A method to identify trace sulfated IgG N-glycans as biomarkers for rheumatoid arthritis. *Nat Commun* 2017;8(1):631.
- [93] Lauc G, Vučković F, Bondt A, Pezer M, Wuhrer M. Trace N-glycans including sulphated species may originate from various plasma glycoproteins and not necessarily IgG. *Nat Commun* 2018;9(1):2916.
- [94] Wang JR, Gao WN, Grimm R, Jiang S, Liang Y, Ye H, et al. Reply to “trace N-glycans including sulphated species may originate from various plasma glycoproteins and not necessarily IgG”. *Nat Commun* 2018;9(1):2915.