



人血清 Alpha-1-酸性糖蛋白的糖基化分析

于龙, 李秀玲, 侯美倩, 张秀莉, 梁鑫淼*

中国科学院分离分析化学重点实验室; 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023

*通讯作者, E-mail: liangxm@dicp.ac.cn

收稿日期: 2010-04-01; 接受日期: 2010-06-17; 网络版发布日期: 2010-09-14

doi: 10.1360/032010-252

摘要 获取真实准确的蛋白质糖基化信息是全面了解糖基化修饰生物学功能的前提。针对简单蛋白质的糖基化分析通常采用反相高效液相色谱-串联质谱技术在肽的水平上对糖基化信息进行采集和解析。本文以人血清 Alpha-1-酸性糖蛋白(AGP)酶解液为对象, 发展了一套简单有效的蛋白质糖基化分析方法。本方法分为三个步骤, 第一步是建立糖肽的理论 m/z 值表; 第二步是获取糖蛋白酶解液的 LC-MS 谱图, 并将每一个色谱峰中所包含糖肽的实际 m/z 值与理论 m/z 值进行人工匹配; 第三步是对每个色谱峰的糖肽结构归属进行 LC-MS/MS 验证。采用本方法, 我们从 AGP 酶解液中共鉴定出 172 条糖肽。与单独采用 Survey 模式的方法相比, 本方法能够显著提高糖肽的覆盖率。

关键词

糖基化分析
Alpha-1-酸性糖蛋白
糖肽
质谱

1 引言

糖基化修饰是一种常见而重要的蛋白质翻译后修饰, 不仅影响蛋白质的理化性质, 而且在细胞识别、信号转导、肿瘤浸润和转移以及免疫应答等多种细胞过程中发挥重要的生物学作用^[1-6]。蛋白质糖基化信息的获取是全面了解糖基化修饰生物学功能的前提, 糖基化信息主要包括糖基化位点信息和位点上所连接聚糖结构的信息^[7]。与磷酸化蛋白质的磷酸化位点上只连接有磷酸根不同的是, 糖蛋白的糖基化位点上连接的聚糖具有更为复杂的微不均一性(microheterogeneity), 即同一糖基化位点上存在多种不同结构聚糖的现象^[8]。为了获取每个位点上的聚糖微不均一性信息, 针对简单糖蛋白的位点特异性分析(site-specific analysis)通常是把糖蛋白酶解成肽段, 然后采用反相色谱-串联质谱联用技术(RPLC-MS and MS/MS)对酶解液中含有聚糖的肽段(即糖肽)进行结构鉴定^[9-12]。糖肽在反相色谱上的保留主要取决于肽段的序列, 因此, 具有相同肽段序

列不同聚糖结构的糖肽的出峰时间非常接近, 在质谱的总离子流图(TIC)上往往包含在一个色谱峰中。而为了区分 TIC 谱图中的糖肽信息和非糖肽信息, 质谱检测通常在 Survey 模式下进行, 通过提取糖肽特征碎片的质核比(m/z)如 204(乙酰葡萄糖胺)即可得到糖肽的专属信息^[13]。由于 Survey 模式是对同一样品交替扫描一级谱和二级谱, 导致一级谱中的糖肽信号会由于部分糖肽做二级谱而损失, 因此, 通常还需对相同样品做一次一级扫描以获取糖肽的真实一级谱图^[12]。本文以人血清 Alpha-1-酸性糖蛋白(AGP)酶解液为对象, 以糖肽理论 m/z 值表和独立进行的 LC-MS 和 LC-MS/MS 分析为基础, 发展了一套简单有效的蛋白质糖基化分析方法。本方法分为三个步骤, 第一步是建立糖肽的理论 m/z 值表; 第二步是获取糖蛋白酶解液的 LC-MS 谱图, 并对 LC-MS 谱图中糖肽的色谱峰进行人工归属, 方法是将每一个色谱峰中所包含肽段的 m/z 值与理论 m/z 值进行匹配; 最后一步是对每个色谱峰的糖肽归属进行 LC-MS/MS 验证。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

AGP、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT), 碘代乙酸(iodoacetic acid, IAA)购自 Sigma 公司, 测序级修饰胰蛋白酶购自 Promega 公司, 脱盐用 GELoader 枪头购自 Eppendorf 公司, 脱盐用 C18 材料购自 Sunchrom 公司, 甲酸(FA)购自 Acros 公司, 乙腈(ACN)购自 Merck 公司. 液相色谱为美国 Micro-Tech Scientific 公司的 X'TremeSimple 纳升液相色谱, 质谱为 Waters 公司四极杆飞行时间质谱.

2.2 实验方法

2.2.1 糖蛋白酶解

取 0.5 mg 的 AGP 溶于 100 μ L 的 8 M 尿素 50 mM 碳酸氢铵缓冲溶液中, 温育 3 h. 变性后的 AGP 用 4 μ L 的 50 mM DTT 溶液在 37 $^{\circ}$ C 下还原 2 h, 然后向样品中加入 5 μ L 的 50 mM IAA 溶液, 避光在室温下温育 30 min. 所得溶液用 50 mM 碳酸氢铵缓冲溶液稀释十倍后, 按酶/底物质量比 1/30 加入胰蛋白酶后, 在 37 $^{\circ}$ C 下温育 16 h.

2.2.2 酶解液脱盐

取 1 mg 的 C18 材料放入 45 μ L 乙腈中制成匀浆液, 装入 GELoader 枪头中(枪头中部用惰性材料塞紧以防填料流失). 装好的微柱先用 45 μ L 50% ACN/0.1% FA 冲洗, 再用 90 μ L H₂O/0.1% FA 平衡. 取 30 μ L AGP 酶解液上样, 用 H₂O/0.1% FA 淋洗 45 μ L 脱盐后, 将肽用 45 μ L 50% ACN/0.1% FA 洗脱

出来并旋干.

2.2.3 酶解液的 LC-MS 和 LC-MS/MS 分析

取上述脱盐后的酶解液重溶于 H₂O/0.1% FA 中以进行 RPLC-MS 或 MS/MS 分析. RPLC 分离采用美国 Micro-Tech Scientific 公司的 C18 柱(150 mm \times 150 μ m i.d.), 流动相 A 相为 100% H₂O/0.1% FA, 流动相 B 相为 100% ACN/0.1% FA. 流速设为 1 μ L/min, 采用如下梯度: 0~5 min, 5% B; 5~50 min, 5%~35% B; 50~60 min, 35% B. MS 和 MS/MS 分析均在正离子模式下进行, 毛细管电压为 2.0 kV. MS 谱图的 m/z 范围为 500~2000, MS/MS 谱图的 m/z 范围为 100~2000. 根据糖肽质量数和电荷数的差别, MS/MS 采用 20~40 eV 的碰撞电压.

3 结果与讨论

3.1 AGP 糖肽理论 m/z 值表的建立

Sigma 公司的 AGP 含有两种变体蛋白, 分别为 AGP-1 和 AGP-2, 二者都含有五个糖基化位点, 酶解之后分别包含在 13 个糖肽肽段当中(见表 1). 其中, 这两个变体的位点 II 肽段和位点 III 肽段是两两相同的, 而位点 I、IV 和 V 的肽段则是两两不同的.

为了分析每个位点上的糖肽微不均一性信息, 我们首先需要建立各位点糖肽的理论 m/z 值表. 由于 AGP 所连接聚糖的糖型为有规律的唾液酸化的单天线、双天线、三天线和四天线的复杂型结构^[14], 因此, 所有可能出现的聚糖结构可以比较容易的通过推测得到(见表 2). 据此, 可按下式计算各位点上具有不

表 1 AGP 糖肽肽段序列

变体位点	氨基酸位置序号	肽段序列	$M_{\text{肽段}}(\text{Da})$	糖肽 RPLC 保留时间(min)
AGP-1/Site I	[1~24]	^{pyro} QIPLCANLVPVPITN ¹⁵ ATLDQITGK	2559.3618	50.4
	[5~24]	CANLVPVPITN ¹⁵ ATLDQITGK	2125.1089	43.3
	[8~24]	LVPVPITN ¹⁵ ATLDQITGK	1779.0142	41.4
AGP-2/Site I	[1~20]	^{pyro} QIPLCANLVPVPITN ¹⁵ ATLDR	2188.1562	48.0
	[5~20]	CANLVPVPITN ¹⁵ ATLDR	1753.9032	38.4
	[8~20]	LVPVPITN ¹⁵ ATLDR	1407.8085	35.6
AGP-1, 2/Site II	[34~39]	NEEYN ³⁸ K	795.3399	12.0
	[40~55]	SVQEIQATFFYFTPN ⁵⁴ K	1918.9465	45.3
AGP-1, 2/Site III	[40~63]	SVQEIQATFFYFTPN ⁵⁴ KTEDTIIFLR	2895.4563	49.8
	[69~83]	QDQCIYN ⁷⁵ TYLNVQR	1915.8734	33.9
AGP-2/Site IV	[69~83]	QNQCFYN ⁷⁵ SSYLNVQR	1920.8425	33.9
AGP-1/Site V	[84~90]	EN ⁸⁵ GTISR	775.3824	12.0
AGP-2/Site V	[84~90]	EN ⁸⁵ GTVSR	761.3668	12.0

表 2 肽段序列为 QIPLCANLVPVPITN¹⁵ATLDQITGK 的糖肽理论 *m/z* 值

推测聚糖结构	<i>M</i> _{肽段} (Da)	<i>M</i> _{糖肽} (Da)	糖肽理论 <i>m/z</i> 值		
			2+	3+	4+
[Hex] ^a 4[HexNAc] ^b 3[NeuAc] ^c 1	1566.5551	4107.9301	2054.9651	1370.3100	1027.9825
[Hex]4[HexNAc]3[NeuAc]1[Fuc] ^d 1	1712.6130	4253.9880	2127.9940	1418.9960	1064.4970
[Hex]5[HexNAc]4[NeuAc]1	1931.6872	4473.0622	2237.5311	1492.0207	1119.2656
[Hex]5[HexNAc]4[NeuAc]1[Fuc]1	2077.7451	4619.1201	2310.5601	1540.7067	1155.7800
[Hex]5[HexNAc]4[NeuAc]2	2222.7826	4764.1576	2383.0788	1589.0525	1192.0394
[Hex]5[HexNAc]4[NeuAc]2[Fuc]1	2368.8405	4910.2155	2456.1078	1637.7385	1228.5539
[Hex]6[HexNAc]5[NeuAc]1	2296.8193	4838.1943	2420.0972	1613.7314	1210.5486
[Hex]6[HexNAc]5[NeuAc]1[Fuc]1	2442.8772	4984.2522	2493.1261	1662.4174	1247.0631
[Hex]6[HexNAc]5[NeuAc]2	2587.9147	5129.2897	2565.6449	1710.7632	1283.3224
[Hex]6[HexNAc]5[NeuAc]2[Fuc]1	2733.9726	5275.3476	2638.6738	1759.4492	1319.8369
[Hex]6[HexNAc]5[NeuAc]3	2879.0101	5420.3851	2711.1926	1807.7950	1356.0963
[Hex]6[HexNAc]5[NeuAc]3[Fuc]1	3025.0680	5566.4430	2784.2215	1856.4810	1392.6108
[Hex]7[HexNAc]6[NeuAc]1	2661.9514	5203.3264	2602.6632	1735.4421	1301.8316
[Hex]7[HexNAc]6[NeuAc]1[Fuc]1	2808.0093	5349.3843	2675.6922	1784.1281	1338.3461
[Hex]7[HexNAc]6[NeuAc]2	2953.0468	5494.4218	2748.2109	1832.4739	1374.6055
[Hex]7[HexNAc]6[NeuAc]2[Fuc]1	3099.1047	5640.4797	2821.2399	1881.1599	1411.1199
[Hex]7[HexNAc]6[NeuAc]3	3244.1422	5785.5172	2893.7586	1929.5057	1447.3793
[Hex]7[HexNAc]6[NeuAc]3[Fuc]1	3390.2001	5931.5751	2966.7876	1978.1917	1483.8938
[Hex]7[HexNAc]6[NeuAc]4	3535.2376	6076.6126	3039.3063	2026.5375	1520.1532
[Hex]7[HexNAc]6[NeuAc]4[Fuc]1	3681.2955	6222.6705	3112.3353	2075.2235	1556.6676

a) Hex, 甘露糖或半乳糖; b) HexNAc, *N*-乙酰葡萄糖胺; c) NeuAc, 唾液酸; d) Fuc, 岩藻糖

同聚糖结构的糖肽的理论质量数:

$$M_{\text{糖肽}} = M_{\text{肽段}} + M_{\text{聚糖}} - M_{\text{H}_2\text{O}}$$

其中, $M_{\text{糖肽}}$ 为糖肽的理论质量数, $M_{\text{肽段}}$ 为酶解后形成的糖肽肽段理论质量数, $M_{\text{聚糖}}$ 为聚糖的理论质量数. 表 2 即为以 AGP-1 的糖肽肽段 ^{PYRQ}QIPLCANLVPVPITN¹⁵ATLDQITGK 为例建立的糖肽理论 *m/z* 值表. 以此类推, 可得其他 12 个糖肽肽段的糖肽理论 *m/z* 表.

3.2 AGP 酶解液 LC-MS 谱图分析和糖肽归属

对脱盐后的 AGP 酶解液进行 LC-MS 分析, 可得包括糖肽和非糖肽在内的各肽段 MS 谱图. 由于糖肽在 RPLC 上的保留主要取决于肽段序列, 因此含有相同肽段不同聚糖结构(微不均一性)的糖肽通常在比较接近的保留时间范围内出峰, 导致其表现出与普通肽段不同的且比较特征的 MS 谱图(如图 1). 在得到含有上述 13 个糖肽肽段的糖肽理论 *m/z* 值表后, 即可将 AGP 酶解液 LC-MS 谱图所包含的糖肽实际 *m/z* 值与理论 *m/z* 值进行比对, 以初步确定糖肽的归属. 比对采用人工方法, 如果某一色谱峰中的大部分糖肽实际 *m/z* 值与理论值表中含有某一肽段的糖肽

理论 *m/z* 值都能匹配, 则可初步确定该色谱峰的糖肽肽段和聚糖结构归属. 以 AGP-1 变体的肽段结构为 QIPLCANLVPVPITN¹⁵ATLDQITGK 的糖肽为例的比对结果见图 2, 共匹配出 13 条糖肽. 从图 1 中可以看到, 大部分的糖肽带有三到四个电荷, 其主要的聚糖结构为唾液酸化的二天线、三天线和四天线结构, 而且部分聚糖还伴随岩藻糖修饰. 图中未标记的质谱峰部分为钠加合物, 部分为肽段为 SVQEIQATFF-YFTPN⁵⁴KTEDTIFLR 的糖肽.

将 AGP 酶解液 LC-MS 全部色谱峰所包含的糖肽实际 *m/z* 值与糖肽理论 *m/z* 值表进行比对, 共找到 172 条糖肽. 与只采用 Survey 模式的对比^[15], 除了较为罕见的五天线和六天线的聚糖结构外, 文献[15]中所发现的其余 60 条糖肽几乎全部包括在本方法所发现的糖肽中. 除了大大丰富了每个糖基化位点上聚糖的微不均一性信息外, 本方法还发现了四个文献[15]未发现的含有糖基化位点的肽段, 即 ^{PYRQ}QIPLCANLVPVPITN¹⁵ATLDQITGK, ^{PYRQ}QIPLCANLVPVPITN¹⁵ATLDR, SVQEIQATFFYFTPN⁵⁴K 和 EN⁸⁵GTVSR. 可见, 相对于只采用 Survey 模式的糖基化分析方法, 本方法显著提高了 AGP 糖肽的覆盖率.

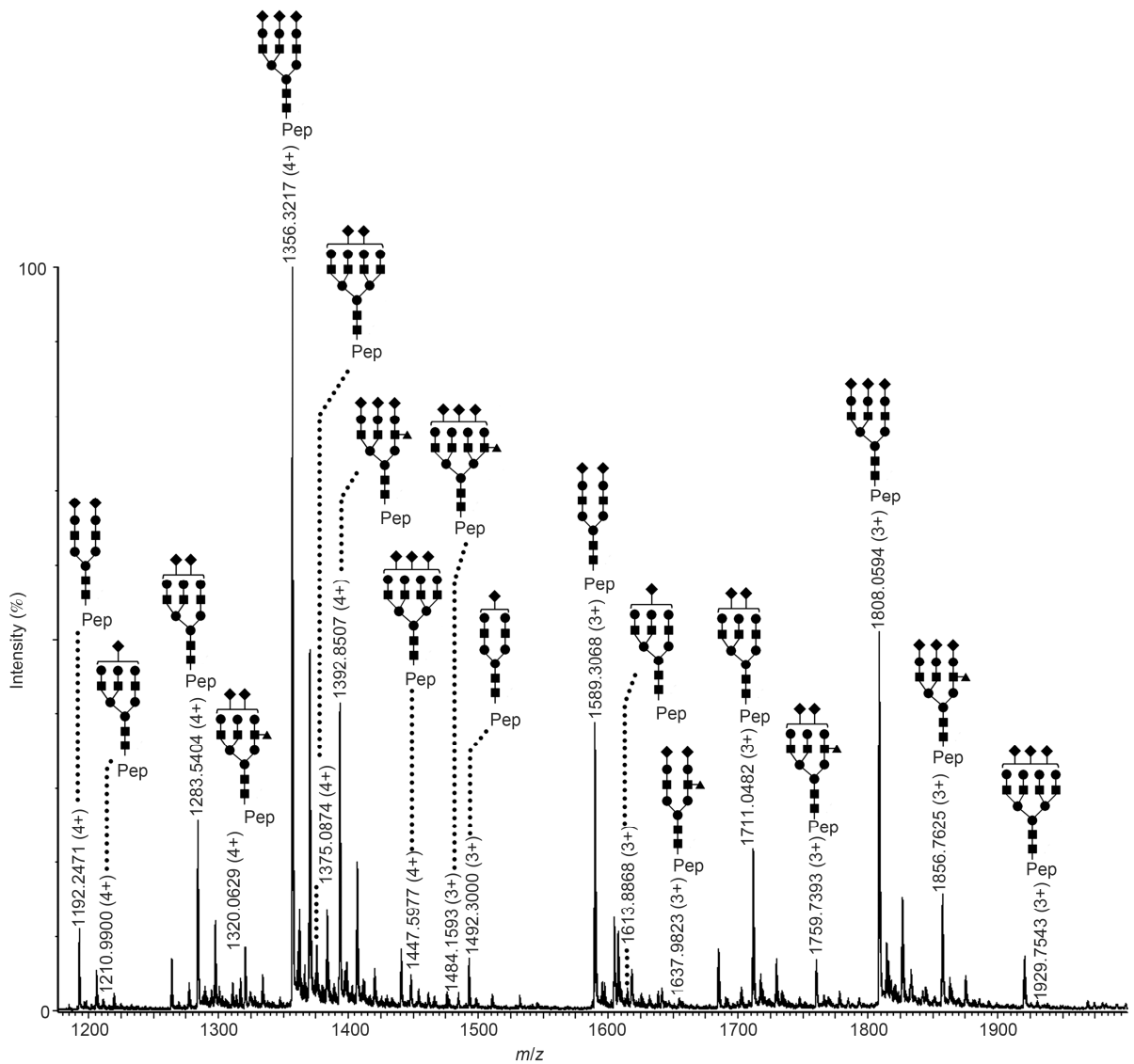


图1 肽段序列为 QIPLCANLVPVPIITN¹⁵ATLDQITGK 的糖肽 MS 谱图与结构归属. ■, N-乙酰葡萄糖胺; ●, 甘露糖或半乳糖; ◆, 唾液酸; ▲, 岩藻糖

3.3 AGP 酶解液中糖肽的 LC-MS/MS 验证

为了进一步验证上述糖肽结构归属正确与否, 需要对每个位点上的高丰度糖肽进行二级质谱的分析. 图 2 是肽段序列为 QIPLCANLVPVPIITN¹⁵ATLDQITGK、*m/z* 为 1808.0 的糖肽的 MS/MS 谱图, 碰撞电压为 23 eV. 理论 *m/z* 值表中糖肽 1808.0 的聚糖结构为含三个唾液酸的三天线复杂型聚糖, MS/MS 谱图的解析清晰验证了糖肽的聚糖结构. 在较低的碰撞电压下, 糖肽的裂解大部分都发生在糖苷键上, 而肽段并未发生断裂, 但糖肽的肽段序列仍可由碎

片 1382.4 (2+)证实. 谱图解析将该碎片归属为带有一个乙酰葡萄糖胺的肽段, 其质量数在扣除乙酰葡萄糖胺的质量数后与肽段 QIPLCANLVPVPIITN¹⁵ATLDQITGK 的质量数吻合. 因此, 在无法对肽段序列进行三级质谱分析的前提下, 该糖肽的肽段序列可基本确定.

4 结论

本文以 AGP 酶解液为对象, 发展了一套有效的蛋白质糖基化分析方法. 本方法分为三个步骤, 第一

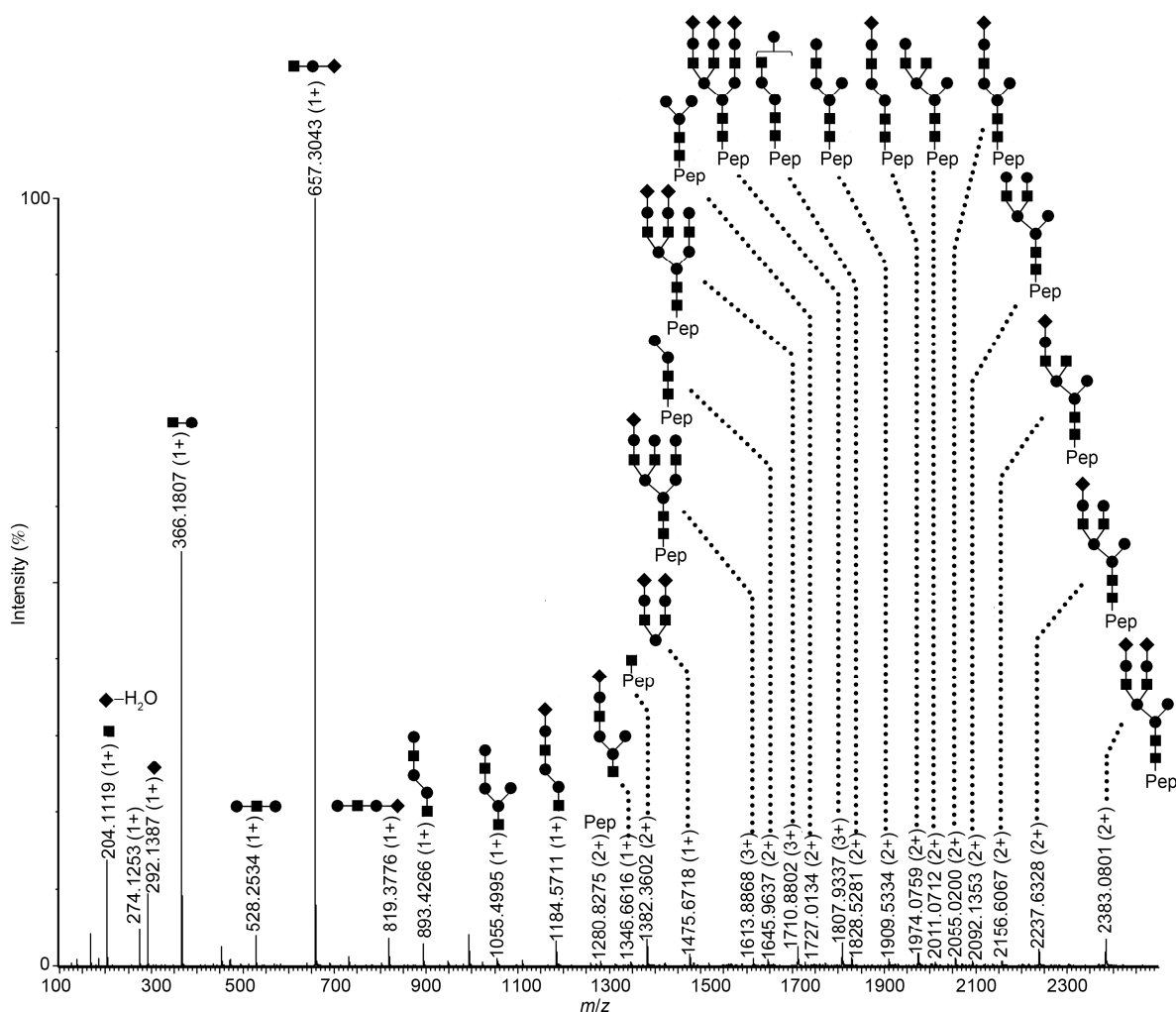


图 2 肽段序列为 QIPLCANLVPVITN¹⁵ATLDQITGK、*m/z* 为 1808.0 的糖肽 MS/MS 谱图与碎片归属。■, *N*-乙酰葡萄糖胺; ●, 甘露糖或半乳糖; ◆, 唾液酸

步是建立糖肽的理论 *m/z* 值表; 第二步是获取糖蛋白酶解液的 LC-MS 谱图, 并将每一个色谱峰中所包含肽段的 *m/z* 值与理论 *m/z* 值进行人工匹配; 第三步是

对第二步得到的每个色谱峰的糖肽归属结构进行 LC-MS/MS 验证. 本方法具有简便和糖肽覆盖率高的特点.

致谢 本工作得到中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-YW-R-170)和国家自然科学基金面上项目 (20805046)资助, 特此致谢.

参考文献

- 1 Zhao YY, Takahashi M, Gu JG, Miyoshi E, Matsumoto A, Kitazume S, Taniguchi N. Functional roles of *N*-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. *Cancer Sci*, 2008, 99: 1304–1310
- 2 Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1999, 1473: 21–34
- 3 Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA. Glycosylation and the immune system. *Science*, 2001, 291: 2370–2376

- 4 Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 2006, 126: 855–867
- 5 Lowe JB. Glycosylation, immunity, and autoimmunity. *Cell*, 2001, 104: 809–812
- 6 Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Protein glycosylation in development and disease. *Bioassays*, 1999, 21: 412–421
- 7 Wuhler M, Catalina MI, Deelder AM, Hokke CH. Glycoproteomics based on tandem mass spectrometry of glycopeptides. *J Chromatogr B*, 2007, 849: 115–128
- 8 An HJ, Froehlich JW, Lebrilla CB. Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins. *Curr Opin Chem Biol*, 2009, 13(4): 421–426
- 9 Wang F, Nakouzi A, Angeletti RH, Casadevall A. Site-specific characterization of the N-linked oligosaccharides of a murine immunoglobulin M by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2003, 314: 266–280
- 10 Faid V, Evjen G, Tollersrud OK, Michalski JC, Morelle W. Site-specific glycosylation analysis of the bovine lysosomal alpha-mannosidase. *Glycobiology*, 2006, 16: 440–461
- 11 Fenaille F, Le Mignon M, Groseil C, Ramon C, Riande S, Siret L, Bihoreau N. Site-specific N-glycan characterization of human complement factor H. *Glycobiology*, 2007, 17: 932–944
- 12 Harazono A, Kawasaki N, Itoh S, Hashii N, Ishii-Watabe A, Kawanishi T, Hayakawa T. Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2006, 348: 259–268
- 13 Geyer H, Geyer R. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics*, 2006, 1764: 1853–1869
- 14 Fournier T, Medjoubi NN, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol*, 2000, 1482: 157–171
- 15 Imre T, Schlosser G, Pocsfalvi G, Siciliano R, Molnar-Szollosi E, Kremmer T, Malomi A, Vekey K. Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2005, 40: 1472–1483

Glycosylation analysis of human serum alpha-1-acid glycoprotein

YU Long, LI XiuLing, HOU MeiQian, ZHANG XiuLi & LIANG XinMiao

Key Lab of Separation Science for Analytical Chemistry; Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

Abstract: Protein glycosylation information is of great importance for elucidating the biofunctions of glycosylation modification. For the glycosylation analysis of simple glycoproteins, tandem mass spectrometry coupled with reversed-phase liquid chromatography (RPLC-MS and MS/MS) is a common technique for acquiring the glycosylation information in the glycoprotein digests. We have developed a simple and effective glycosylation analysis method by using human serum alpha-1-acid glycoprotein digest as a model glycoprotein. The method consists of three major steps, that is, (1) the establishment of theoretical m/z value tables of glycopeptides, (2) the acquisition of LC-MS spectrum of protein digest, followed by the artificial matching of the experimental m/z values of glycopeptides with the theoretical ones, and (3) the validation of glycopeptide structure assignment with LC-MS/MS analysis. We have identified 172 glycopeptides in AGP digest by using this method. Compared with the survey-mode-only strategy, this method could significantly increase the glycopeptides detected in the digest.

Keywords: glycosylation analysis, AGP, glycopeptides, mass spectrometry