



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111077256 A

(43)申请公布日 2020.04.28

(21)申请号 202010055249.8

(22)申请日 2020.01.17

(71)申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

(72)发明人 肖华 刘莎 张岩

(74)专利代理机构 上海段和段律师事务所

31334

代理人 陈少凌 郭国中

(51)Int.Cl.

G01N 30/08(2006.01)

G01N 30/72(2006.01)

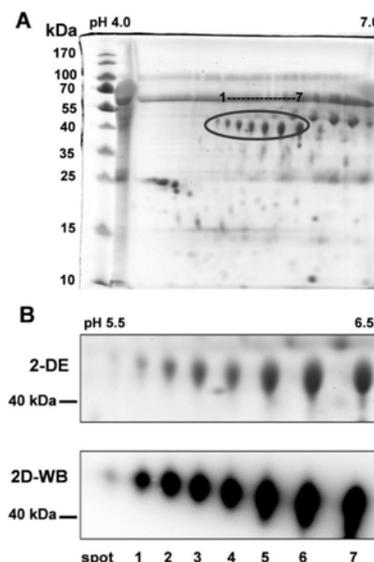
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种结合双向凝胶电泳和质谱鉴定糖蛋白糖链结构的方法

(57)摘要

本发明公开了一种结合双向凝胶电泳和质谱鉴定糖蛋白糖链结构的方法。所述方法包括以下步骤：S1、对生物样本中的糖蛋白进行特异性富集并通过双向凝胶电泳进行分离，根据目标糖蛋白的分子量和等电点选定目标糖蛋白异构体凝胶斑点；S2、使用双向凝胶电泳蛋白印迹和质谱对选定的目标糖蛋白异构体凝胶斑点进行确认；S3、对步骤S2中确认了的目标糖蛋白异构体凝胶斑点进行胶内酶解和质谱分析，鉴定其肽段序列和糖链结构。本发明适用于各种蛋白翻译后修饰(糖基化,泛素化和乙酰化等)生物标志物异构体和修饰体的分离以及结构鉴定,可以显著提高翻译后修饰蛋白作为诊断标志物的灵敏度和特异性。



1. 一种结合双向凝胶电泳和质谱鉴定糖蛋白糖链结构的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

S1、对生物样本中的糖蛋白进行特异性富集并通过双向凝胶电泳进行分离,根据目标糖蛋白的分子量和等电点选定目标糖蛋白异构体凝胶斑点;

S2、使用双向凝胶电泳蛋白印迹和质谱对选定的目标糖蛋白异构体凝胶斑点进行确认;

S3、对步骤S2中确认了的的目标糖蛋白异构体凝胶斑点进行胶内酶解和质谱分析,鉴定其肽段序列和糖链结构。

2. 根据权利要求1所述的结合双向凝胶电泳和质谱鉴定糖蛋白糖链结构的方法,其特征在于,步骤S1中,所述生物样本选自动植物组织、细胞、微生物、体液样本。

3. 根据权利要求1所述的结合双向凝胶电泳和质谱鉴定糖蛋白糖链结构的方法,其特征在于,步骤S1中,对糖蛋白进行特异性富集包括采用凝集素亲和色谱或亲水性材料方法。

4. 根据权利要求1所述的结合双向凝胶电泳和质谱鉴定糖蛋白糖链结构的方法,其特征在于,步骤S2包括用步骤S1中选择的目标糖蛋白的抗体进行双向凝胶电泳蛋白印迹,确定选择的目标糖蛋白异构体凝胶斑点是否为目标糖蛋白。

5. 根据权利要求1所述的结合双向凝胶电泳和质谱鉴定糖蛋白糖链结构的方法,其特征在于,步骤S2包括对步骤S1中选择的目标糖蛋白异构体凝胶斑点进行胶内酶解,酶解好的肽段经质谱鉴定其是否为选定的目标糖蛋白。

6. 根据权利要求1所述的结合双向凝胶电泳和质谱鉴定糖蛋白糖链结构的方法,其特征在于,步骤S3是对对步骤S2确认的目标糖蛋白异构体凝胶斑点进行胶内酶解,获得的肽段经质谱和生物信息学工具分析鉴定目标糖蛋白的糖链结构。

7. 一种如权利要求1所述的方法鉴定的目标糖蛋白的糖链结构在生物标志物检测中的用途。

## 一种结合双向凝胶电泳和质谱鉴定糖蛋白糖链结构的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及糖蛋白质组学领域,具体涉及一种结合双向凝胶电泳和质谱鉴定糖蛋白糖链结构的方法;更具体是涉及一种分离鉴定目标糖蛋白异构体并鉴定其糖链结构的新方法。

### 背景技术

[0002] 糖基化是蛋白质最重要的翻译后修饰之一,其涉及许多关键的细胞过程,包括细胞识别和粘附,免疫细胞运输和致癌作用等。糖基化修饰主要发生在内质网和高尔基体,主要过程是在糖基转移酶作用下将糖链转移至蛋白质,和蛋白质上的氨基酸残基形成糖苷键,经过一系列转运、糖链末端的剪切、修饰和岩藻糖化或者唾液酸化等,完成糖基化蛋白质的组装。目前,研究较多的为N-糖蛋白和O-糖蛋白,其中N-糖蛋白尤为受关注。N-糖苷键型主要有高甘露糖型、复合型和杂合型三类寡糖链。

[0003] 组织和体液(血液、尿液和唾液等)中含有数千种蛋白质,其中蕴含的糖蛋白往往是潜在的疾病诊断生物标志物。美国食品和药品管理局(FDA)批准的大多数癌症生物标志物都是糖蛋白(J.A.Ludwig,J.N.Weinstein,Biomarkers in cancer staging,prognosis and treatment selection,Nature Reviews Cancer 5(11)(2005)845-56.)。由于糖链结构的异质性,特定糖蛋白生物标志物的一种或几种糖型以及聚糖结构的临床诊断特异性显著高于糖蛋白自身。但是,目前关于糖蛋白生物标志物的研究主要集中于糖蛋白的差异表达水平上,同时,绝大多数糖蛋白生物标志物的糖链结构都是未知的,导致其用于癌症诊断和预后评价的灵敏度和特异性较低。

[0004] 目前,对聚糖结构进行全面分析仍然是一个挑战,因为存在诸多复杂因素影响,包括糖蛋白异构体的分离、糖链的富集、糖肽在质谱中的低离子化效率和糖链的异质性等。质谱法是鉴定聚糖结构的首选方法,此外,研究人员也开发出了完整糖肽搜索引擎,例如GPSeeker(K.Xiao,Z.Tian,GPSeeker Enables Quantitative Structural N-Glycoproteomics for Site-and Structure-Specific Characterization of Differentially Expressed N-Glycosylation in Hepatocellular Carcinoma,Journal of Proteome Research 18(7)(2019)2885-2895.)和pGlyco2.0(M.Q.Liu,W.F.Zeng,P.Fang,W.Q.Cao,C.Liu,G.Q.Yan,Y.Zhang,C.Peng,J.Q.Wu,X.J.Zhang,H.J.Tu,H.Chi,R.X.Sun,Y.Cao,M.Q.Dong,B.Y.Jiang,J.M.Huang,H.L.Shen,C.C.L.Wong,S.M.He,P.Y.Yang,pGlyco2.0enables precision N-glycoproteomics with comprehensive quality control and one-step mass spectrometry for intact glycopeptide identification,Nature Communications 8(1)(2017)438.),都可以用于N-完整糖肽结构的大规模鉴定。目前,有公开发表的研究建立了分离鉴定糖蛋白N-糖链结构的方法,但是其都局限于检测某种类型的聚糖结构或者是混合蛋白的聚糖结构,不能将聚糖结构和肽段以及蛋白一一对应起来。因此,就临床诊断而言,急迫需要鉴定特定糖蛋白生物标志物的聚糖结构,对其位点特异性和结构特异性聚糖的结构进行表征,找到癌症组特征的聚糖结构,从

而提高其特异性。对于特定的糖蛋白生物标志物研究,我们首先要对其异构体进行分离。本发明基于双向凝胶电泳分离,实现了对特定目标糖蛋白异构体进行分离,目标糖蛋白异构体的凝胶斑点经质谱分析,全面鉴定了其糖链结构。同时,通过本发明可以鉴定其癌症组特征的位点特异性和结构特异性聚糖的结构,为临床生物标志物诊断提供了新的线索,可以显著提高特定糖蛋白生物标志物临床诊断的特异性。

[0005] 本发明是一种分离鉴定特定目标糖蛋白生物标志物糖链结构的方法,经检索国内同行业未见相同。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种结合双向凝胶电泳和质谱鉴定糖蛋白糖链结构的方法。更具体来说,本发明提供了一种分离目标糖蛋白生物标志物异构体并鉴定其糖链结构的技术,提高其用于癌症检测的灵敏度和特异性。

[0007] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0008] 本发明提供了一种结合双向凝胶电泳和质谱鉴定糖蛋白糖链结构的方法,包括以下步骤:

[0009] S1、对生物样本中的糖蛋白进行特异性富集并通过双向凝胶电泳进行分离,根据目标糖蛋白的分子量和等电点选定目标糖蛋白异构体凝胶斑点;

[0010] S2、使用双向凝胶电泳蛋白印迹和质谱对选定的目标糖蛋白异构体凝胶斑点进行确认;

[0011] S3、对步骤S2中确认了的的目标糖蛋白异构体凝胶斑点进行胶内酶解和质谱分析,鉴定其肽段序列和糖链结构。

[0012] 作为本发明的一个实施方案,步骤S1具体为:收集正常组与癌症组的组织或者体液样本,提取总蛋白并富集其中的糖蛋白。可采用凝集素亲和色谱或亲水性材料等方法富集糖蛋白。对得到的糖蛋白进行双向凝胶电泳分离,根据目标糖蛋白的分子量和等电点选定目标糖蛋白异构体的凝胶斑点。

[0013] 进一步的,步骤S1中,所述生物样本选自动植物组织、细胞、微生物、体液样本。

[0014] 进一步的,步骤S1中,对糖蛋白进行特异性富集包括采用凝集素亲和色谱或亲水性材料方法。

[0015] 进一步的,步骤S2包括用步骤S1中选择的目标糖蛋白的抗体进行双向凝胶电泳蛋白印迹,确定选择的目标糖蛋白异构体凝胶斑点是否为目标糖蛋白。

[0016] 进一步的,步骤S2包括对步骤S1中选择的目标糖蛋白异构体凝胶斑点进行胶内酶解,酶解好的肽段经质谱鉴定其是否为选定的目标糖蛋白。

[0017] 进一步的,步骤S3是对对步骤S2确认的目标糖蛋白异构体凝胶斑点进行胶内酶解,获得的肽段经质谱和生物信息学工具分析鉴定目标糖蛋白的糖链结构。

[0018] 步骤S2具体为:取一定量的步骤S1得到的糖蛋白进行双向凝胶电泳分离,选用目标糖蛋白的抗体进行双向凝胶电泳蛋白印迹检测。同时,对步骤S1得到的目标糖蛋白斑点进行胶内酶解,酶解好的肽段经质谱分析,确认其是选定的目标糖蛋白。

[0019] 步骤S3具体为:所选择的目标糖蛋白异构体的凝胶斑点,经双向凝胶电泳蛋白印迹和质谱确认后,对其每个凝胶斑点进行胶内酶解,获得的肽段经质谱分析,将得到的质谱

数据经生物信息学软件解析目标糖蛋白的糖链结构。

[0020] 本发明还涉及一种上述方法鉴定的目标糖蛋白的糖链结构在生物标志物检测中的用途。

[0021] 本发明采用双向凝胶电泳对目标糖蛋白的异构体进行分离,并使用双向凝胶电泳蛋白印迹和质谱对选定的目标糖蛋白凝胶斑点进行确认,最后,通过质谱分析鉴定这些凝胶斑点中目标糖蛋白的糖链结构。与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0022] 1) 本发明可以全面分离鉴定目标糖蛋白生物标志物的异构体和糖链结构,可以显著提高其用于临床诊断的灵敏度和特异性;

[0023] 2) 本发明可用于所有翻译后修饰蛋白的异构体分离以及修饰结构鉴定,具有普适性。

### 附图说明

[0024] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:

[0025] 图1为本发明实验流程示意图;

[0026] 图2为唾液糖蛋白的异构体分离以及鉴定;其中,A为唾液糖蛋白双向凝胶电泳胶图(圈出的七个凝胶斑点为目标糖蛋白AZGP1的异构体);B为AZGP1的双向凝胶电泳蛋白印迹结果。

### 具体实施方式

[0027] 下面结合实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干调整和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0028] 在以下实施例中未指出具体技术或条件,都遵循本领域文献中描述的技术或条件,或根据产品的说明书进行操作。所使用的试剂或仪器若没有注明制造商,均可以通过常规渠道购买。

[0029] 以下实施例虽然仅列举了以唾液糖蛋白生物标志物:锌- $\alpha$ -2-糖蛋白(Zinc- $\alpha$ -2-glycoprotein,AZGP1)为模式蛋白进行其异构体分离及糖链结构解析,但该方法同样适用于其它糖蛋白生物标志物异构体分离及糖链结构解析。同时,该方法同样适用于其它翻译后修饰蛋白异构体的分离及翻译后修饰结构检测。

[0030] 实施例

[0031] 如图1所示,本实施例由以下步骤组成:

[0032] S1、对唾液样本中的糖蛋白进行特异性富集并进行双向凝胶电泳分离,选定目标糖蛋白异构体的凝胶斑点。

[0033] 收集健康人的唾液,经4℃、离心力2600g、20min的冷冻离心,取上清为唾液全蛋白。糖蛋白富集采用伴刀豆凝集素(Concanavalin A,Con A)亲和色谱。将琼脂糖结合的凝集素Con A装入色谱柱中,用结合缓冲液(20mM Tris-HCl,150mM NaCl,1mM CaCl<sub>2</sub>,1mM MnCl<sub>2</sub>,1mM MgCl<sub>2</sub>,pH 7.4)进行富集。然后,通过用结合缓冲液洗涤色谱柱,除去非特异性结

合蛋白。最后,使用洗脱缓冲液(在结合缓冲液中加入0.2M $\alpha$ -methyl mannoside和0.2M $\alpha$ -methyl glucoside)释放富集到的糖蛋白。得到的糖蛋白经浓缩后,在-80℃下储存。

[0034] 然后,对得到的糖蛋白进行双向凝胶电泳分离。取400 $\mu$ g唾液糖蛋白,用丙酮沉淀后,重新溶解于水化液(8M urea,75mM Tris (pH 8.8),2% (w/v) CHAPS,36mM dithiothreitol,2% (v/v) ampholyte)中。第一向,等电聚焦电泳。将7cm IPG胶条(pH 4-7, Bio-Rad,Hercule,CA)置于水化液上方室温水化16h后,将IPG胶条置于等电聚焦电泳仪中,按照表1的程序进行等电聚焦电泳分离。接着,将IPG胶条置于平衡缓冲液(6M urea,2% (w/v) CHAPS,36mM dithiothreitol,2% (v/v) ampholyte)中平衡两次。其中,在平衡液里加2% Dithiothreitol (w/v)平衡IPG胶条15min,在平衡液里加5% Iodoacetamide (w/v)平衡IPG胶条15min。第二向,聚丙烯酰胺凝胶电泳。将平衡好的IPG胶条转移至第二向凝胶(13.5% Bis-Tris)上,用低熔点琼脂糖凝胶液(0.5g低熔点琼脂糖,60 $\mu$ L 1%溴酚蓝,加超纯水定容至100mL)封好,设置电泳程序(80V:30min,120V:90min)进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。待电泳结束,凝胶经固定液(50%乙醇,10%乙酸,40%超纯水)固定1h后,考马斯亮蓝染色。最后,使用扫描仪进行图像采集,凝胶保存待用。根据文献和目标糖蛋白的等电点和分子量,在凝胶上选定7个凝胶斑点(图2A圈出的七个点)可能是AZGP1异构体的凝胶斑点。

[0035] 表1.等电聚焦电泳程序

[0036]

No	Voltage (V)	Speed	Time (h)
1	100	Rapid	1
2	200	Rapid	1
3	300	Rapid	1
4	1000	Gradual	1
5	5000	Gradual	1
6	5000	Rapid	2
7	500	Hold	

[0037] S2、对选择的目標糖蛋白的凝胶斑点进行双向凝胶电泳蛋白印迹和质谱分析。

[0038] 对选择的凝胶斑点进行双向凝胶电泳蛋白印迹检测。取50 $\mu$ g唾液糖蛋白,按步骤S1进行双向凝胶电泳分离后,将双向电泳凝胶中的蛋白质转移到PVDF膜上(200mA,1h)。经印迹和洗膜后,将PVDF膜分别与AZGP1抗体(Abcam,Cambridge,MA,1:10000)和辣根过氧化物酶偶联的二抗(Teyebio,Shanghai,China,1:5000)孵育。经化学发光ECL显色后进行扫描。结果如图2B所示,我们选定的7个凝胶斑点确实是AZGP1的异构体。

[0039] 对选择的凝胶斑点进行质谱检测。将凝胶斑点切成小块,用超纯水洗两次。加200 $\mu$ L脱色液(50%乙腈,25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )进行脱色。加200 $\mu$ L 10mM Dithiothreitol 60℃水浴40min,加200 $\mu$ L 25mM Iodoacetamide室温避光放置20min。加100 $\mu$ L 12ng/ $\mu$ L trypsin (Promega,Madison,WI)和0.2 $\mu$ L PNGase F (New England Biolabs,Ipswich,MA),待凝胶充分吸胀后,37℃酶解20h。酶解后进行肽段的提取,200 $\mu$ L乙腈:水:甲酸:(60:35:5),超声粉碎5min,37℃放置60min,重复一遍,将得到的肽段溶液50℃离心浓缩干燥。经C18柱除盐后,上样进行质谱(Q-Exactive Plus,Thermo Fisher Scientific,Waltham,Massachusetts)检测。

[0040] 表2.AZGP1凝胶斑点质谱鉴定信息

No	Unique peptides	Sequence coverage (%)	Protein score	N-glycosylation sites
1	19	61	244.58	Asn109,112
2	19	58	147.93	Asn109,112 and 128
3	21	67	280.41	Asn109,112 and 128
4	21	65	202.97	Asn109,112 and 128
5	24	69	343.19	Asn109,112 and 128
6	22	65	442.17	Asn109,112 and 128
7	24	70	553.74	Asn109,112 and 128

[0042] 结果如表2所示,选定的凝胶斑点经鉴定确实为AZGP1。同时,七个凝胶斑点总共鉴定到25条特征肽段,序列覆盖度为58%-70%,检测到AZGP1 109位,112位和128位三个糖基化位点。

[0043] S3、对步骤S1中得到的AZGP1的凝胶斑点进行胶内酶解和质谱检测,鉴定其糖链结构。

[0044] 根据AZGP1凝胶斑点的相对强度,我们选择5、6和7三个凝胶斑点进行AZGP1糖链结构的检测。按照步骤S2的方法进行胶内酶解和质谱检测(采用阶梯式能量20%-30%-40%)。得到的质谱数据导入完整糖肽搜索引擎pGlyco2.0进行分析,结果如表3所示。根据三次技术重复的分析结果显示,在三个凝胶斑点5、6和7中分别鉴定到7、3和5种单糖组成,分别对应11、7和8种聚糖结构。我们总共鉴定到AZGP1三个糖基化位点(109位,112位和128位)10种单糖组成,对应15种聚糖结构。其中,每个凝胶斑点的聚糖结构不同;每个凝胶斑点中AZGP1相同糖基化位点的聚糖结构也不同。我们可以分别从三个凝胶斑点5、6和7中检测到4、10和9个聚糖结构。因此,在128位,109位和112位分别鉴定到10、2和4个聚糖结构。以位点特异性来分析AZGP1的聚糖结构,在糖基化位点128位被部分核心岩藻糖基化的N-聚糖修饰。共鉴定到10个聚糖结构,9个是核心岩藻糖基化,其中它们大多数是杂合型。109位和112位鉴定到部分唾液酸化的聚糖结构,它们都是复合型。

[0045] 表3.AZGP1糖链结构鉴定信息

[0046]

Glycan	Glycan composition	Glycan ID	Spot 5 Asn128	Spot 6 Asn128	Spot 7 Asn128	Spot 5 Asn112	Spot 6 Asn112	Spot 6 Asn109	Spot 7 Asn109
	64000	294		✓					
	32001	14			✓				
	43001	72			✓				
	43001	78		✓	✓				
	43002	132			✓				
	54001	284		✓	✓				
	54001	285	✓	✓	✓				
	54001	286	✓	✓	✓				
	54001	288		✓					
	45001	320		✓	✓				
	54102	932				✓		✓	
	54004	934					✓		
	54103	1279				✓			
	54103	1282					✓		
	54005	1289							✓

[0047] Identified glycan structures are ticked by the mark in the table. Glycan composition (H,N,A,G,F) :H=Hex,N=HexNAc,A=NeuAc,G=NeuGc,F=Fuc. Blue square, GlcNAc; green circle, Man; purple diamond, sialic acid; red triangle, Fuc.

[0048] S4、对健康对照组和非小细胞肺癌组AZGP1的糖链结构进行比较,找到非小细胞肺癌组AZGP1特征的聚糖结构,从而提高AZGP1作为肺癌诊断生物标志物的特异性。

[0049] 按照S1,S2和S3所述结合双向凝胶电泳和质谱的方法,将非小细胞肺癌患者与正常人的AZGP1的糖链结构进行比较(如表4)。如表3和表4所示,我们一共鉴定到AZGP1 15种单糖组成,对应22种聚糖结构。其中肺癌特征的有5种(gly ID:37,134,164,264和265),正常组特征的有2种(gly ID:138和207)。同时,我们可以鉴定到AZGP1 128位主要是核心岩藻糖基化的聚糖结构,109位和112位除了核心岩藻糖基化的聚糖结构外,还有部分唾液酸化的聚糖结构。

[0050] 表4. 健康对照组和非小细胞肺癌组AZGP1糖链结构鉴定信息

[0051]

Glycan	Glycan composition	Glycan ID	Spot 5 Asn128	Spot 6 Asn128	Spot 7 Asn128	Spot 6 Asn112	Spot 7 Asn112	Spot 6 Asn109
	32001	14						
	33001	37						
	43001	78						
	43002	132						
	53001	134						
	53001	138						
	44001	161						
	44001	164						
	43003	207						
	44002	264						
	44002	265						
	54001	285						
	54001	286						
	45001	320						
	54102	932						
	54103	1282						

[0052] The identified site-specific glycan structures for healthy control group and lung cancer group are illustrated as a shaped (round:normal group, triangular:cancer group) figure in the table. Glycan composition (H,N,A,G,F): H=Hex, N=HexNAc, A=NeuAc, G=NeuGc, F=Fuc. Blue square, GlcNAc; green circle, Man; purple diamond, sialic acid; red triangle, Fuc.

[0053] 本发明具体应用领域很广,以上所述仅为本发明具体实施个例,但本发明的保护范围并不局限于此,对于本领域技术人员而言,在不脱离本发明的构思情况下,可以进行多种变形和改进。这些也应视为本发明的保护范围。

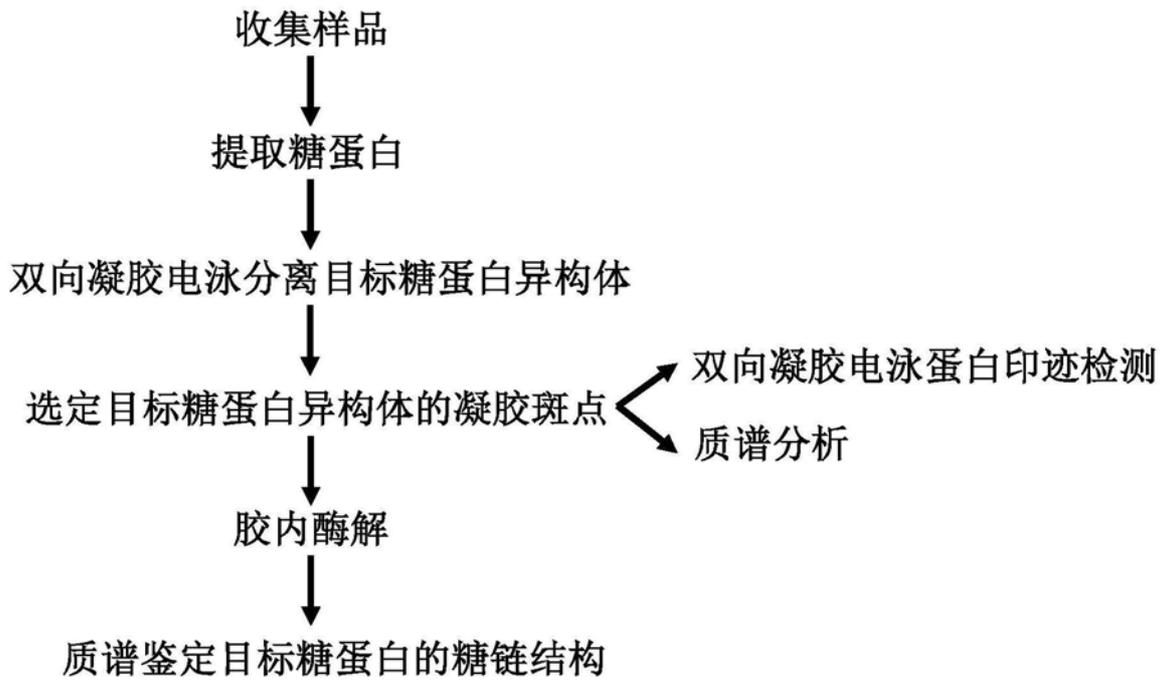


图1

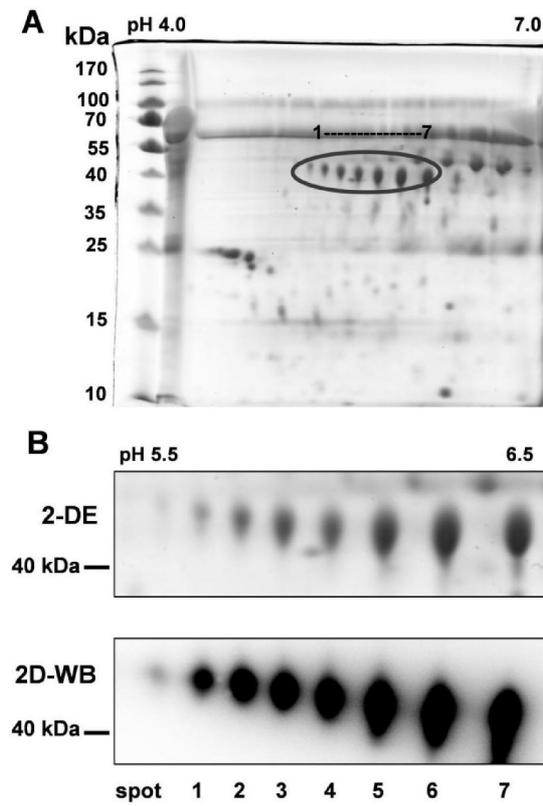


图2