

基于超滤膜辅助的糖蛋白全 O-连接糖链的富集 和 MALDI-TOF/TOF 质谱结构解析*

武艳丽¹⁾ 杨刚龙¹⁾ 缪明永²⁾ 关 锋^{1)**}

(¹⁾ 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122; (²⁾ 第二军医大学生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

摘要 哺乳动物中约有 50% 以上的蛋白质都发生了糖基化修饰. 连接在丝氨酸或苏氨酸上的 O-连接糖链是常见的蛋白质糖基化修饰方式之一, 其主要功能是维持与其连接的蛋白质部分的空间构象, 保护其免受蛋白酶水解及覆盖某些抗原决定簇. 糖链结构的解析有助于更清楚地认识糖蛋白及其功能. 本研究建立了一种基于超滤膜辅助(FASP)富集细胞、血清和尿液中糖蛋白全 O-连接糖链的方法, 根据糖蛋白与其糖链结构之间的分子质量差异, 利用 10 KD 超滤膜富集蛋白质样品中由 β 消除反应释放的全 O-连接糖链, 将糖链甲基化修饰后再使用 MALDI-TOF/TOF-MS 进行解析, 同时利用二级质谱进行结构确认. 通过上述方法可从标准糖蛋白 mucin、细胞、血清和尿液样本中分别鉴定到 83、29、33 和 85 种 O-连接糖链结构, 利用该方法可以从复杂样品中富集和解析糖蛋白全 O-连接糖链, 实现快速、高效、高通量地解析糖蛋白 O-连接糖链的目的.

关键词 O-连接糖链, 糖组学, 超滤膜辅助(FASP), MALDI-TOF/TOF-MS

学科分类号 Q81

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0312

蛋白质的糖基化是动物细胞中最常见的蛋白质翻译后修饰之一^[1], 目前已知哺乳动物蛋白质中约有 50% 以上的蛋白质发生了糖基化^[2]. 蛋白质糖基化修饰在各种生命现象中起着重要的作用, 如参与细胞黏附及信号转导, 影响蛋白质的分泌和稳定性, 参与血浆中衰老蛋白的清除、免疫及炎症反应、精卵识别以及影响蛋白质在细胞内的转运方向等^[3]. 糖基化修饰在疾病中, 特别是肿瘤的发生、发展和转移过程中都有着重要意义, 许多疾病诊断标志物及治疗的靶标, 如前列腺癌中的前列腺特异性抗原 PSA^[3]、卵巢癌中的肿瘤抗原 CA 125^[4]、乳腺癌中的 Her2/neu^[5]以及肝癌中的 AFP^[6]等都是糖蛋白. 蛋白质是否发生糖基化修饰、糖蛋白的量和(或)其糖基化程度的变化以及糖链结构的改变与特定的生理或病理状态改变直接相关, 糖蛋白上糖链结构的解析可以帮助我们进一步了解糖链和糖蛋白的生物学功能. 此外, 比较不同病理状态和正常状态下糖链的变化可以为疾病的早期诊断、治疗及预后提供参考依据, 达到尽早防治的目的.

蛋白质的糖基化修饰主要有 N-糖基化和 O-

糖基化两种主要形式. 一般所说的蛋白质 O-糖基化是指在蛋白质的 Ser/Thr 上通过 N-乙酰氨基半乳糖转移酶的催化作用, 加 N-acetylgalactosamine (GalNAc)起始的黏蛋白(mucin)型 O-糖基化. 另外, 还有 O-GlcNAc、O-mannose、O-fucose、O-glucose、O-xylose 等 O-糖基化形式^[7]. 目前, 我们已经知道了 O-连接糖链的 8 个核心结构^[8], 而且许多研究发现 O-连接糖链的异常表达具有很重要的生物学意义. 例如, 癌症细胞中 Core 2 O-连接糖链的上调能够使肿瘤细胞逃避免疫系统 NK 细胞的杀伤, 促进肿瘤细胞的增殖和转移^[9]. 在神经系统中, O-连接糖链的 core 1 结构(T 抗原)在发育的神经元轴突表面有大量分布^[10], 并且在果蝇的神经系统发育过程中起重要的作用^[11]. 癌症细胞中

* 国家自然科学基金青年科学基金(81402115), 国家高技术研究发展计划(863)(2014AA093513)和江苏省自然科学基金(BK20140172)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0510-85918126, E-mail: fengguan@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-10-07, 接受日期: 2016-12-21

Core 3、Core 4 或 O-mannose 能够调节整合素蛋白的信号通路, 抑制肿瘤的形成和转移^[12].

对于 N-连接糖链的释放, 可以使用 PNGase F 酶(N-糖苷酶 F), 它可以切断 GlcNAc-Asn 连接的酰胺键, 活性高, 适用于高甘露糖型、杂合型和复杂型糖链等多种类型的 N-连接糖链, 能对大多数的 N-连接糖链进行有效的释放. 但对于 O-连接糖链, 首先, O-糖基化没有保守的特征修饰序列用来预测糖基化位点, 其次, 已知 O-连接糖链有 8 个核心结构, 其结构变化较 N-连接糖链更为复杂, 最后, 尚未发现可以将 O-连接糖链整体从肽链上游离的通用内切酶, 因此目前大多数研究人员均采用化学手段使 O-连接糖链从多肽上游离. 目前常用的传统化学法是 β 消除法和肼解法. Royle 等^[13]利用温和型肼解法在中性粒细胞粒明胶酶 B 和分泌型 IgA 中分别鉴定到 18 和 25 种特异的 O-连接糖链. Huang 等^[14]利用改良过的 β 消除法在人乳中分离的胆盐刺激脂酶中鉴定到 12 种特异的 O-连接糖链. 肼解法, 可同时释放 N-连接糖链和 O-连接糖链, 通过控制肼解温度可以选择性地断裂 N-连接糖链和 O-连接糖链, 目前该方法已经实现仪器自动化. 但因该法反应条件剧烈, 肼解后需对糖链进行乙酰化复原处理, 而且蛋白部分已经破坏, 无法进行有关糖基化位点的研究^[14]. 因此, 肼解法没有得到广泛应用. 而 β 消除反应^[15]采用 0.1 mol/L 的 NaOH 提供碱性环境将 O-连接糖链从相应的糖蛋白上解离下来, 采用 1 mol/L 的 NaBH₄(过量)作为还原剂将糖链的半缩醛结构还原为在碱性条件下比较稳定的糖醇以阻止其发生剥皮反应(peeling reaction), 保护糖链的还原性末端. 因此, 大多数已发表的文献中均采用 β 消除的方法进行 O-连接糖链的释放, 而且随着研究的不断发展其方法也在不断地改进和完善. Rasilo 等^[16]用硼烷氨络合物(NH₃·BH₃)代替经典 β 消除法中的 NaOH 和 NaBH₄, 此方法优势在于 NH₃·BH₃ 的还原性比 NaBH₄ 强, 避免了传统 β 消除中用醋酸终止反应时过量 NaBH₄ 产生大量的盐, 降低了因除盐带来的显著样品损失^[17]. Goetz 等^[18]用 28% 的氨水溶解的硼烷氨络合物代替了 NaOH 和 NaBH₄, 并对释放的糖链进行了甲基化修饰, 虽然大大地提高了糖链的收率, 但由于实验过程时间过长以及未能将糖链与肽段进行分离, 还是造成了糖链的大量损失. 除了上述两种经典的化学法外, 最近发表的文献中也报道

了一些较新颖的方法. 例如, Kudelka 等^[19]在细胞培养的过程中向培养基中添加可被细胞摄取的化学前体物质 Ac₃GalNAc- α -Bn, 这种化学前体物质进入细胞后经细胞内酯酶的作用重新生成去乙酰化的 Bn- α -GalNAc, 可被细胞内的糖基转移酶利用生成 O-连接糖链, 然后释放到培养基中, 通过对培养基中 O-连接糖链量的鉴定即可得到细胞内 O-连接糖链的量. Song 等^[20]利用 NaClO 对各种生物样本进行控制处理, 从而快速地进行 O-连接糖链的释放, 这种方法虽然大大减少了实验成本和时间, 但其所需样本量为 g 级, 对于组织、尿液和血清等临床样本的适用性相对较弱.

鉴于本实验室所发明的一种利用超滤膜辅助(FASP)富集细胞和血清中糖蛋白全 N-连接糖链的方法^[21], 根据糖蛋白与其糖链结构之间的分子质量差异, 利用 10 KD 超滤膜通过离心使蛋白样品中经 PNGase F 酶切释放的全 N-连接糖链与肽段快速分离, 从而减少糖链的损失. 综上所述, 本文建立了一种基于超滤膜富集细胞、血清和尿液中糖蛋白全 O-连接糖链的方法, 并利用质谱技术对糖链结构进行分析. 根据糖蛋白及其糖链结构之间的分子质量差异, 通过 10 KD 超滤膜富集细胞、血清和尿液糖蛋白上经 β 消除反应释放的全 O-连接糖链, 使用 MALDI-TOF/TOF-MS 解析糖链结构, 并且利用二级质谱进行了结构确认. 该方法可以被用于从大量生物样本中富集糖蛋白全 O-连接糖链, 可以达到快速、高通量地解析糖蛋白 O-连接糖链的目的.

1 材料与方 法

1.1 细胞培养

人源乳腺非浸润性肿瘤细胞 MCF-7 购买于 ATCC, 培养基为含有 10% 胎牛血清(Gibco BRL, USA)和 1% 双抗(Gibco BRL)的 MEM(Gibco BRL)完全培养基, 于 37°C CO₂ 浓度 5% 的细胞培养箱中培养.

1.2 蛋白质的提取

1.2.1 尿液蛋白的提取

收集第 1 次晨尿中段尿 50 ml, 5 000 g 4°C 离心 30 min, 去除细胞碎片, 加入 3 倍体积 -20°C 预冷丙酮, 4°C 放置 12 h, 14 000 g 4°C 离心 30 min, 去除上清, 保留沉淀. 碳酸氢铵复溶蛋白沉淀, 10 000 g 4°C 离心 10 min 去除沉淀, 保留上清, 用

BCA 蛋白质浓度测定试剂盒 (Beyotime Biotechnology, China) 测定蛋白质浓度后 -80°C 保存备用。

1.2.2 细胞蛋白质的提取

当细胞密度达到 90% 时提取细胞全蛋白: 用 $1\times\text{PBS}$ 多次冲洗细胞, 加入适量含 1% PMSF 和 0.1% 抑肽酶的组织蛋白抽提试剂 (Thermo Scientific, USA); 将样品置于冰浴中, 超声 3 min 左右, 超声功率为 400 W, 超声 3 s, 停 9 s, 超声至样品澄清、透明, $14\,000\text{ g}$ 离心 15 min, 除去沉淀取上清并测定蛋白质浓度, -80°C 保存备用。

1.2.3 血清蛋白的提取

采集患者或者志愿者静脉全血于收集管中, 于室温静置 30 min 待血液凝集后, $2\,000\text{ g}$ 冷冻离心 15 min, 使其分层。将收集管小心地从离心机中取出, 防止打乱分层效果, 尽快吸取上层的液体部分, -80°C 保存备用。

1.3 O-连接糖链的解离

分别将 $500\text{ }\mu\text{g}$ 标准糖蛋白 mucin、2 mg 细胞蛋白、血清蛋白和尿液蛋白溶液加入 10 KD 超滤膜中 $14\,000\text{ g}$ 离心 15 min, 弃去流出液; 加入 $300\text{ }\mu\text{l}$ 8 mol/L 尿素溶液, 充分混匀, $14\,000\text{ g}$ 离心 15 min, 弃去流出液; 再加入 $200\text{ }\mu\text{l}$ 8 mol/L 尿素溶液, 充分混匀, $14\,000\text{ g}$ 离心 15 min, 弃去流出液; 加入 $400\text{ }\mu\text{l}$ 8 mol/L 尿素和 50 mmol/L 碳酸氢铵的混合液, 同时加入 $8\text{ }\mu\text{l}$ 10 mmol/L DTT, 充分混匀, 于 56°C 孵育 45 min, 孵育完成后, $14\,000\text{ g}$ 离心 15 min, 弃去流出液。加入 $400\text{ }\mu\text{l}$ 尿素和碳酸氢铵的混合液, 加入 $16\text{ }\mu\text{l}$ 20 mmol/L IAM, 充分混匀(避光操作), 暗处静置 45 min。 $14\,000\text{ g}$ 离心 15 min, 弃去流出液。加入 $200\text{ }\mu\text{l}$ NH_4OH 至超滤管, $14\,000\text{ g}$ 离心 15 min, 重复 2 次。加入 $300\text{ }\mu\text{l}$ 28% 的 NH_4OH 溶解的硼烷氨络合物, 混匀, 37°C 反应 24 h, $14\,000\text{ g}$ 离心 15 min, 用新的收集管收集流出液, 待温度降至室温后加入 1 mol/L 的 HCl 中和硼烷氨络合物和氨水(冰浴中)。冷冻干燥, 加入 $300\text{ }\mu\text{l}$ 甲醇, 清洗, 再冻干, 重复 3 次, 去掉残留的硼酸残基。

1.4 糖链的除盐

用 80% 乙腈 (ACN) 2 ml 清洗 carbon SPE 柱 (Grace Davison Discovery Sciences, USA) 1 次, 再用 2 ml 超纯水清洗柱子 1 次。将冻干的样品用 $500\text{ }\mu\text{l}$ 超纯水溶解并上样至 carbon SPE 柱(重复 3

次上样)。加入 2 ml 超纯水清洗柱子, 重复 3 次。再用 1 ml 0.1% TFA/80% ACN 洗脱产物, 收集洗脱液, 冷冻干燥。

1.5 糖链的泛甲基化修饰

取大约 0.5 g NaOH, 研磨成粗粉, 快速转移至玻璃研磨器中并加入 1 ml DMSO, 进行研磨, 大约 10~15 min, 成均一糊状即可。向样品中加入 $150\text{ }\mu\text{l}$ DMSO 超声 15 min 之后加入 $200\text{ }\mu\text{l}$ 糊状 NaOH 和 $50\text{ }\mu\text{l}$ 碘甲烷(注意避光操作), 振荡 20 min。加入 1 ml 氯仿和 2 ml 超纯水进行抽提, 振荡 10 min, $2\,000\text{ g}$ 离心 3 min, 去除上层水相, 再加入 2 ml 超纯水进行重复振荡(重复 4 次), 除去水相后将氯仿层用氮气吹干。

1.6 MALDI-TOF/TOF-MS 解析糖链

应用 Bruker Daltonics 公司的 UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF 质谱仪解析上述样品中 O-连接糖链, 将冻干的 O-连接糖链用 $30\text{ }\mu\text{l}$ 50% 的甲醇水溶液溶解, 取 $2\text{ }\mu\text{l}$ N-糖溶液点样于 MTP Anchorchip 384 点的靶板上, 真空抽干。再加 $1\text{ }\mu\text{l}$ $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DHB 溶液至样品点上, 真空抽干。以反射阳离子模式鉴定 O-连接糖链, 一级质谱方法参数如下。离子源 1: 7.5 kV; 离子源 2: 6.75 kV; 反射电压 1: 29.5 kV; 反射电压 2: 13.95 kV。激发光源为 N_2 激光(337 nm), 分子质量检测范围为 500~3 500。每张谱图扫描 500 次并多点采集谱图, 最后将所有谱图叠加为各样品全 O-连接糖链谱图。从一级谱图中挑选质谱峰进行二级质谱的解析, 二级质谱方法参数如下。离子源 1: 25 kV; 离子源 2: 22.4 kV; 反射电压 1: 26.45 kV; 反射电压 2: 13.35 kV; LIFT1: 19 kV; LIFT2: 3.7 kV。质谱数据由 Glycoworkbench 软件分析。用 flexAnalysis 软件开打 O-连接糖链原始数据, 设置信噪比(signal-to-noise, S/N)>4, 在 3 次生物学重复中至少鉴定到 2 次的 O-连接糖链做后续分析。将鉴定 O-连接糖链的 m/z 及强度导出为 txt 格式, 导入 Glycoworkbench 中, 设置参数如下: 选择 GlycomeDB 数据库, 离子选择 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 和 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 前体离子容忍度为 2, 碎片离子容忍度为 0.5。

2 结果与分析

2.1 基于超滤膜辅助的全 O-连接糖链富集方法解析标准糖蛋白 mucin 中 O-连接糖链

本研究对于生物体系中的 O-糖基化进行分

析. 首先, 是从生物体系中分离或富集得到 O-糖基化的糖链; 其次, 是将 O-连接糖链与蛋白分离、除盐并进行衍生化处理; 最后, 进行质谱和串联质谱分析, 得到定性的结构信息. 在没有专一性切割酶的条件下很难保证糖链的释放效率, 而且目前所用的所有化学方法都不可避免地产生一些不良的副产物和反应. 实验时间过长和糖链与肽段不能及时分离都会造成糖链的损失. 为了减少糖链的损失, 本文借助超滤膜截留大分子物质, 而使小分子糖链通过的性质, 将 β 消除释放 O-连接糖链的反应在滤膜上进行, 然后通过简单的离心对 O-糖链进行分离和富集. 此外, 选择合适大小的超滤膜才能达到预期的分离效果, 目前已知哺乳动物细胞表达的蛋白质的平均分子质量大于 10 KD, 而已知分子质量最大的 O-连接糖链也远远小于 10 KD^[22], 因此 10 KD 的超滤膜可以很好地分离蛋白质与糖链. 本研究选择改良后的 β 消除的方法释放糖蛋白质上

的 O-连接糖链^[23], 该方法用 28% NH_4OH 溶解的硼烷氨络合物代替 NaOH, 使释放的糖链马上发生还原反应变为糖醇, 从而阻止剥皮反应的进行. 之后将释放的糖链进行甲基化修饰, 不仅可以对糖链的唾液酸进行保护, 而且能提高糖链的离子化效率, 从而提高样品检测的灵敏度.

本研究首先对标准糖蛋白 mucin 中的 O-连接糖链进行了鉴定分析, 并对不同的除盐方法进行了对照实验. 通过对比发现, 利用 carbon SPE 柱和 sepharose 4B 均可对 O-连接糖链进行除盐处理, 分别鉴定到 83 和 63 种特异的 O-连接糖链(附录表 S1), 其中 45 种 O-连接糖链运用两种方法均能鉴定到, 因 carbon SPE 柱除盐所得到的 O-连接糖链包含了 sepharose 4B 除盐方法的大部分结果, 因此本文选择了利用 carbon SPE 柱除盐的方法. 从图 1 中也可以看出用 carbon SPE 比 sepharose 4B 可以在 mucin 中鉴定到更多的 O-连接糖链. 并最终

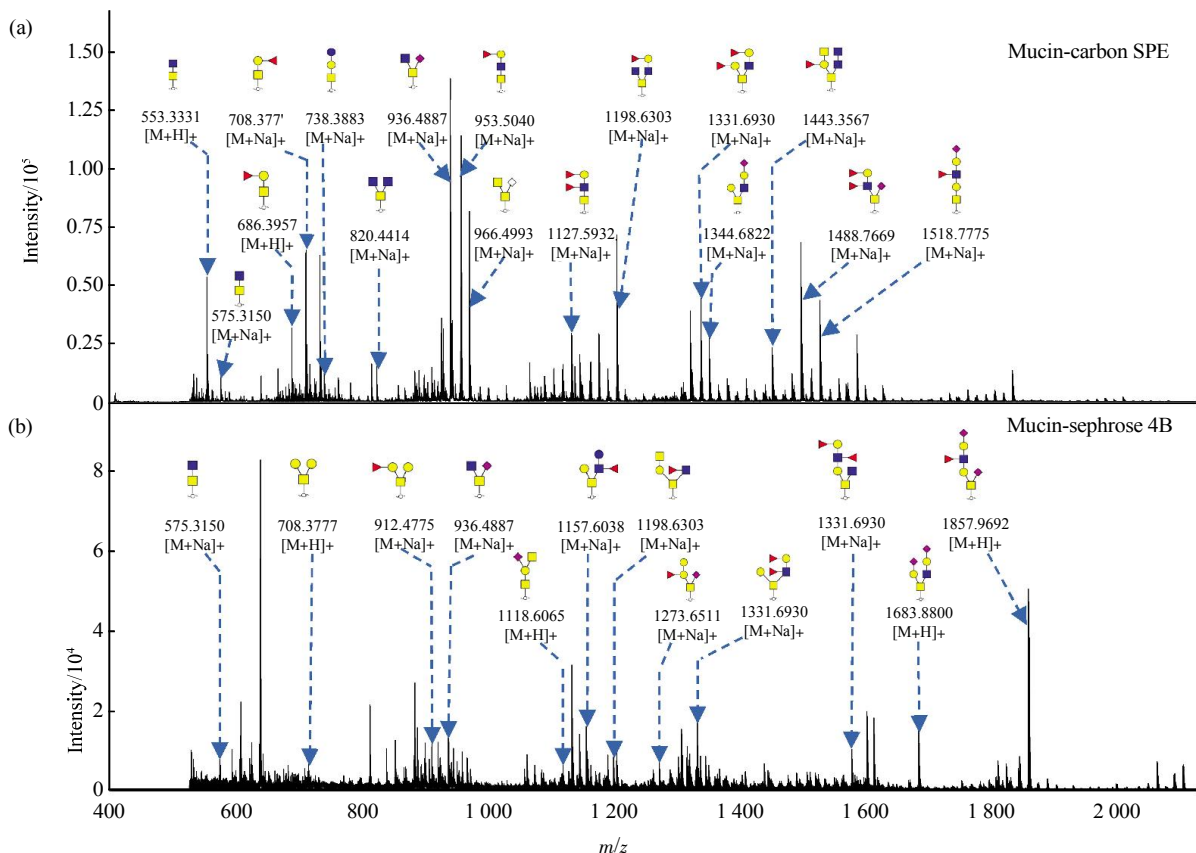


Fig. 1 MALDI-TOF-MS spectra of total O-linked glycans from the glycoprotein mucin:

(a) Carbon SPE and (b) Sepharose 4B were used in purification procedure

■: GlcNAc; ●: Galactose; ◻: GalNAc; ◆: Neu5Ac; ▲: Fucose.

确定了基于超滤膜辅助的全 O- 连接糖链富集新方法的实验流程图(图 2)。如图 1a 所示, 运用本文所述方法在标准糖蛋白 mucin 中所检测到的主要离子峰 m/z 936.488、966.499 和 1488.766 均为甲基化修饰后带唾液酸的 core 3 结构, 其具体结构分别为 $(\text{NeuAc})_1 (\text{GlcNAc})_1 (\text{GalNAc-OH})_1$ 、 $(\text{NeuGc})_1 (\text{GalNAc})_1 (\text{GalNAc-OH})_1$ 和 $(\text{Fuc})_2 (\text{NeuAc})_1 (\text{Gal})_2 (\text{GalNAc-OH})_1$, 其他被鉴定到的主要离子峰 m/z 953.504 和 1198.603 为甲基化修饰后带岩藻糖的 core 3 和 core 4 结构。另外, 根据之前文献中的报道本文所鉴定到的离子峰 m/z 669.3804、699.3910、936.4887 和 966.4993 是标准糖蛋白 mucin 中的 4 个主要特征 O- 连接糖链。与已发表的文章在标准糖蛋白 mucin 中所鉴定到的 O- 连接糖链数目相比, 本文所述方法鉴定到的 O- 连接糖链在数量和覆盖率方面均有较大的优势。例如, Zauner 等^[24]利用 DMA 将 O- 连接糖链从标准糖蛋白上释放出来, 然后利用 PMP 对 O- 连接糖链进行衍生化修饰从而

阻止 Peeling 反应的发生, 运用此方法在标准糖蛋白 mucin 中总共鉴定到 7 种特异的 O- 连接糖链。Yamada 等^[23]利用 NH_4OH 进行糖链的释放, 然后用苄甲氧羰酰氯对其释放的 O- 连接糖链修饰之后进行质谱分析, 在标准糖蛋白 mucin 中共鉴定到 10 种特异的 O- 连接糖链。范万翠^[25]利用氨水非还原性解离 O- 连接糖链, 并同时利用 PMP 衍生化新标记的方法对标准糖蛋白 mucin 中 O- 连接糖链进行解离与分析, 共鉴定到 47 种特异的 O- 连接糖链, 其中 44 种特异的 O- 连接糖链运用本文所述的实验方法均能鉴定到。此方法标准糖蛋白的上样量为 5 mg, 而本文所述方法上样量仅为 500 μg , 由于上样量的差异和实验方法的不同可能导致鉴定结果存在差异, 但本文所用实验方法鉴定到更多的 O- 连接糖链。故本文建立的基于超滤膜辅助解析全 O- 连接糖链的方法更能快速、高通量地解析糖蛋白质的 O- 连接糖链。

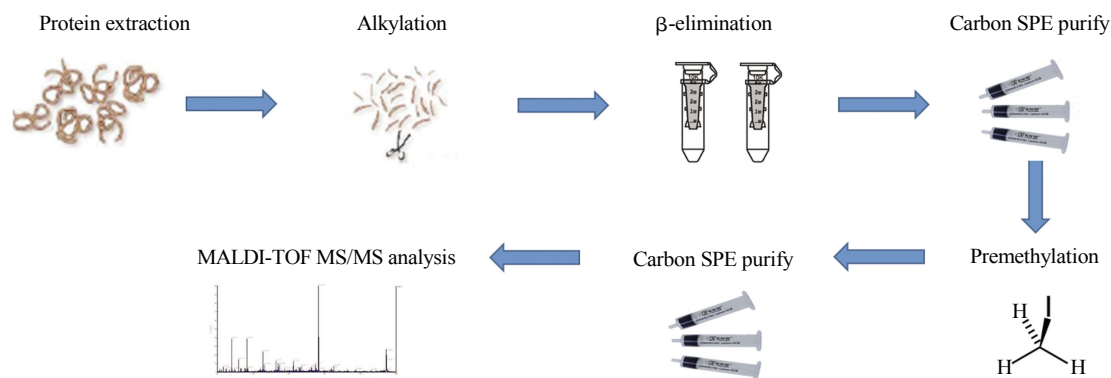


Fig. 2 Flow diagram for isolation and enrichment of total O-linked glycans from the glycoprotein

2.2 基于超滤膜辅助的全 O-连接糖链富集方法在解析复杂生物样品中的应用

2.2.1 基于超滤膜辅助的全 O- 连接糖链富集方法解析细胞中的糖蛋白 O- 连接糖链

肿瘤的发生、发展以及迁移与糖链的表达密切相关, 肿瘤细胞糖基化修饰的改变能够影响细胞的周期和细胞的增殖能力, 促进肿瘤的恶化。对细胞中的 O- 糖链进行鉴定与分析, 有利于阐明细胞蛋白质糖基化改变与癌症的关系。本研究选取乳腺癌

细胞 MCF-7 作为实验对象, 对其糖蛋白质 O-连接糖链进行解析, 一级质谱图如图 3a 所示, 共鉴定到 29 种特异的 O- 连接糖链(附录表 S2)。运用本文所述方法在乳腺癌细胞 MCF-7 中所鉴定到的主要离子峰为无唾液酸带岩藻糖结构的 core 1、core 2 和 Core 3 型 O- 连接糖链(m/z 1086.566, 1584.847, 1821.945, 1996.034 等 13 种糖链)。另外, 其他被鉴定到的离子峰多数为无唾液酸也无岩藻糖结构的 core 1、core 2 和 core 3 型 O- 连接糖链 (m/z

512.306, 716.604, 779.414, 955.467 等 8 种糖链)。对比之前文献报道, 本文所讲述的方法具有很大的优势。例如, Miura 等^[20]用氨基甲酸铵替代 NH_4OH 和碳酸铵来释放 O-连接糖链, 在乳腺癌细胞 MCF-7 中仅鉴定到 4 种特异的 O-连接糖链, 与

之前文献报道的方法相比, 本文所用的方法可在细胞中鉴定更多糖蛋白质 O-连接糖链, 存在一定的优势, 因此可以简单、快速、全面地从细胞中鉴定 O-连接糖链。

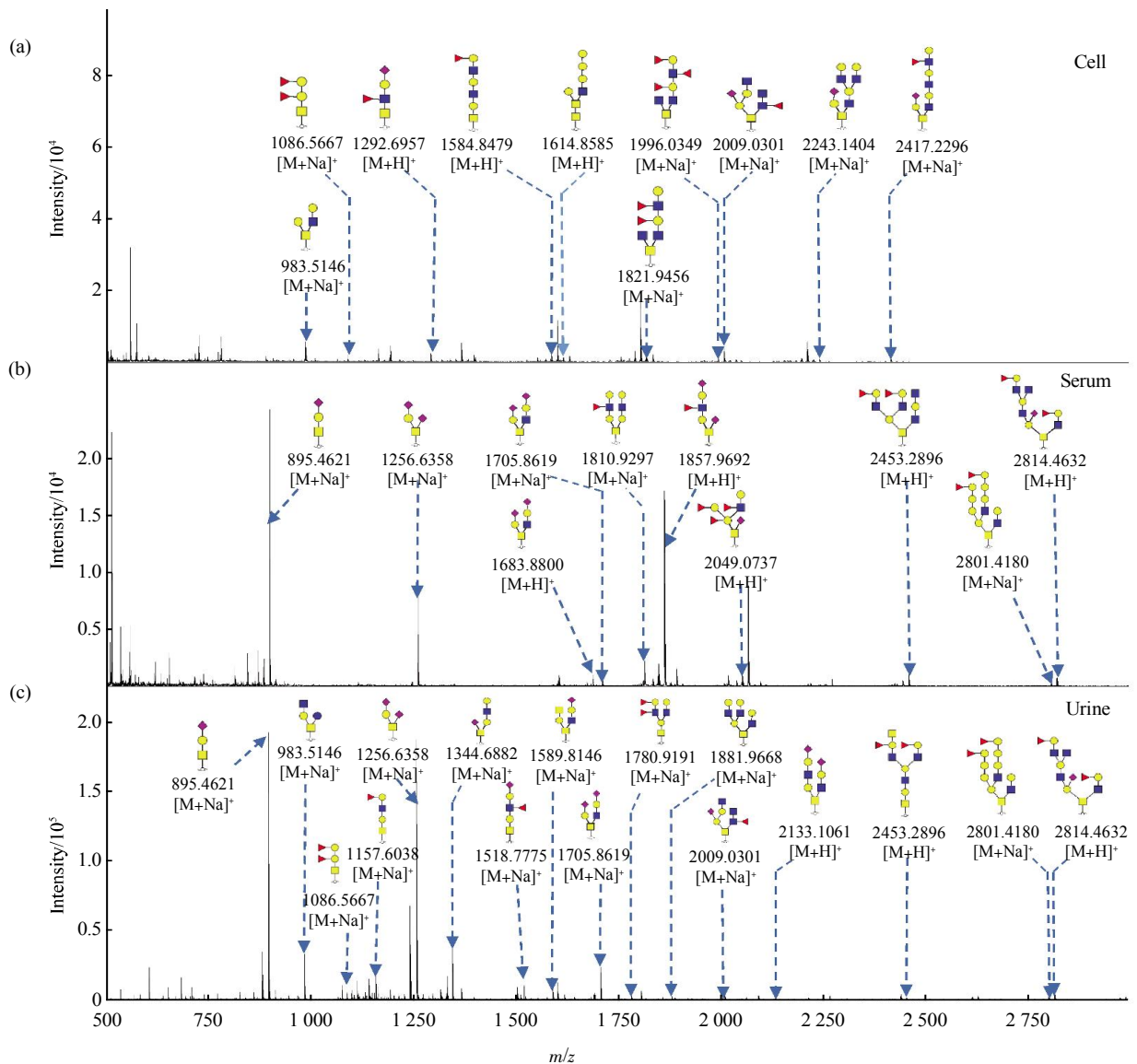


Fig. 3 MALDI-TOF-MS spectra of the total O-linked glycans from the (a) cell.

(b) serum and (c) urine glycoproteins

■ : GlcNAc; ● : Galactose; ◻ : GalNAc; ◆ : Neu5Ac; ▲ : Fucose.

2.2.2 基于超滤膜辅助的全 O-连接糖链富集方法解析血清中糖蛋白 O-连接糖链

目前, 在临床上对恶性肿瘤的体外诊断中, 血

清学检查已非常普遍, 但是血清中已发现并使用的大多数肿瘤标志物特异性较差, 可以作为辅助诊断, 对疗效判断和随访具有一定价值。如消化系统

肿瘤中 CA 19-9、肿瘤相关性抗原(CEA、CA 15-3、CA 72-4)等的检测^[27]。已有研究表明,在肿瘤血清中的异常糖基化修饰可为肿瘤的诊断和预后等提供基础^[28-31]。本研究采集人的正常血清作为实验对象,运用本文所讲述的方法,对其糖蛋白质 O-连接糖链进行解析,一级质谱图如图 3b 所示,共鉴定到 33 种特异的 O-连接糖链(附录表 S2)。在血清中鉴定到的主要离子峰为无唾液酸带岩藻糖的 core 1、core 2 和 core 3 型 O-糖链(m/z 727.422, 912.477, 931.522, 1829.97489 等 13 种糖链)。其他被鉴定到的主要离子峰为带唾液酸和岩藻糖的 core 1 和 core 2 型 O-连接糖链(m/z 1670.884, 1857.969, 2009.030, 2049.073, 2417.229, 2814.463)。与已发表的文章在血清中所鉴定到的糖链相比,本文所述实验方法在糖链数量和覆盖率方面均有较大的优势。例如, Miura 等^[26]用氨基甲酸铵替代 NH_4OH 和碳酸铵来释放 O-连接糖链,避免氢氧根离子的产生从而防止糖链发生剥皮反应,通过此方法在血清中仅鉴定到 2 种特异的 O-连接糖链,分别为图 3b 中的 2 个峰 m/z 895.462 和 1256.635 其具体结构 $(\text{Neu5Ac})_1(\text{Gal})_1(\text{GalNAc-OH})_1$ 、 $(\text{Neu5Ac})_2(\text{Gal})_1(\text{GalNAc-OH})_1$ 。Yamada 等^[32]利用与 MALDI-TOF 联用的自动装置在血清中鉴定到 3 种特异的 O-连接糖链,运用本文所讲述的方法均能鉴定到,分别为图 3b m/z 873.507、895.462 和 1256.635,其具体结构为 $(\text{Neu5Ac})_1(\text{Gal})_1(\text{GalNAc-OH})_1$ 、 $(\text{Neu5Ac})_1(\text{Gal})_1(\text{GalNAc-OH})_1$ 、 $(\text{Neu5Ac})_2(\text{Gal})_1(\text{GalNAc-OH})_1$ 。与前期研究相比,本研究建立的方法可以高通量地从血清样本中提取 O-连接糖链为肿瘤的诊断和预后手段提供了一定理论基础。

2.2.3 基于超滤膜辅助的全 O-连接糖链富集方法解析尿液中糖蛋白 O-连接糖链

尿液作为血液经肾脏过滤后的排泄物,在临床检测中具有很重要的作用。其最显著的特点就是尿液的采集是完全无创的,并可以连续收集的体液。尿液作为重要的生物标志物来源,近年来也受到了人们越来越多的关注。运用本文所讲述的方法,从健康人的尿液里共鉴定到 85 种特异的 O-连接糖链(附录表 S2)。相比细胞和血清在尿液中鉴定到的主要离子峰为带唾液酸无岩藻糖的 core 1、core 2 和 core 3 型 O-连接糖链(m/z 873.480, 895.462, 936.488, 1118.606 等 16 种糖链)。上文提到的

Miura 等^[26]的方法可以从尿液中鉴定到 8 种特异的 O-连接糖链。分别为图 3c 中看到的 m/z 534.288、895.462、983.514、1140.588、1256.635、1344.688、1589.814 和 1705.862,其具体结构为 $(\text{Gal})_1$ 、 $(\text{GalNAc-OH})_1$ 、 $(\text{Neu5Ac})_1$ 、 $(\text{Gal})_1$ 、 $(\text{GalNAc-OH})_1$ 、 $(\text{GlcNAc})_1$ 、 $(\text{Gal})_2$ 、 $(\text{GalNAc-OH})_1$ 、 $(\text{Neu5Ac})_1$ 、 $(\text{Gal})_1$ 、 $(\text{GalNAc})_1$ 、 $(\text{GalNAc-OH})_1$ 、 $(\text{Neu5Ac})_2$ 、 $(\text{Gal})_1$ 、 $(\text{GalNAc-OH})_1$ 、 $(\text{Neu5Ac})_1$ 、 $(\text{Gal})_2$ 、 $(\text{GlcNAc})_1$ 、 $(\text{GalNAc-OH})_1$ 、 $(\text{Neu5Ac})_1$ 、 $(\text{GlcNAc})_1$ 、 $(\text{Gal})_2$ 、 $(\text{GalNAc})_1$ 、 $(\text{GalNAc-OH})_1$ 、 $(\text{Neu5Ac})_2$ 、 $(\text{Gal})_2$ 、 $(\text{GlcNAc})_1$ 、 $(\text{GalNAc-OH})_1$ 。与之相比,本文建立的方法更能快速、高通量的在尿液中鉴定 O-连接糖链。

2.3 O-糖链结构分析

将一级质谱中所检测到的离子峰进行 MS_2 级质谱裂解,通过特定糖苷键的断裂信息结合 Glycoworkbench 软件进行糖链结构序列的推测。图 4 所示为其中 3 个离子峰的二级质谱图。一级质谱检测到的 m/z 895.462、1242.620、1256.635 的离子峰,经过计算,确定是 m/z 697.227、988.322 和 988.322 被还原后经泛甲基化修饰后出现的峰,为了进一步分析 O-连接糖链 m/z 895.462、1242.620 和 1256.635 的序列结构,对 m/z 895.462、1242.620 和 1256.635 的离子峰进行了 MS_2 级质谱裂解。大部分的高峰度碎片离子峰均来自于糖苷键断裂产生的 B 离子和 Y 离子,例如,来自 m/z 895.462 的 $Y_{1\alpha}$ (520.272)、 $X_{1\beta}Y_{1\alpha}$ (374.178) 和 $B_{1\alpha}$ (398.178),来自 1242.620 的 $B_{2\beta}X_{2\beta}$ (343.136)、 $X_{2\beta}Y_{1\alpha}$ (374.178) 和 $Y_{2\beta}X_{2\alpha}$ (864.431)。另外,一些穿环断裂产生的低峰度的碎片离子峰也出现在二级质谱图中,例如,来自 m/z 895.462 的 $X_{1\beta}Y_{1\alpha}$ (374.178) 和 $X_{1\alpha}$ (620.288),来自 m/z 1256.635 的 $X_{1\beta}Y_{1\alpha}$ (374.178) 和 $Z_{1\beta}X_{1\alpha}$ (601.294)。

3 结 论

综上所述,本文建立了一种基于超滤膜辅助富集和质谱分析 O-连接糖链的方法,可以简单、快速、高通量地对标准糖蛋白、细胞、血清和尿液中糖蛋白质全 O-连接糖链进行鉴定与分析。

附件 表 S1, S2 见本文网络版附录(<http://www.pibb.ac.cn>)

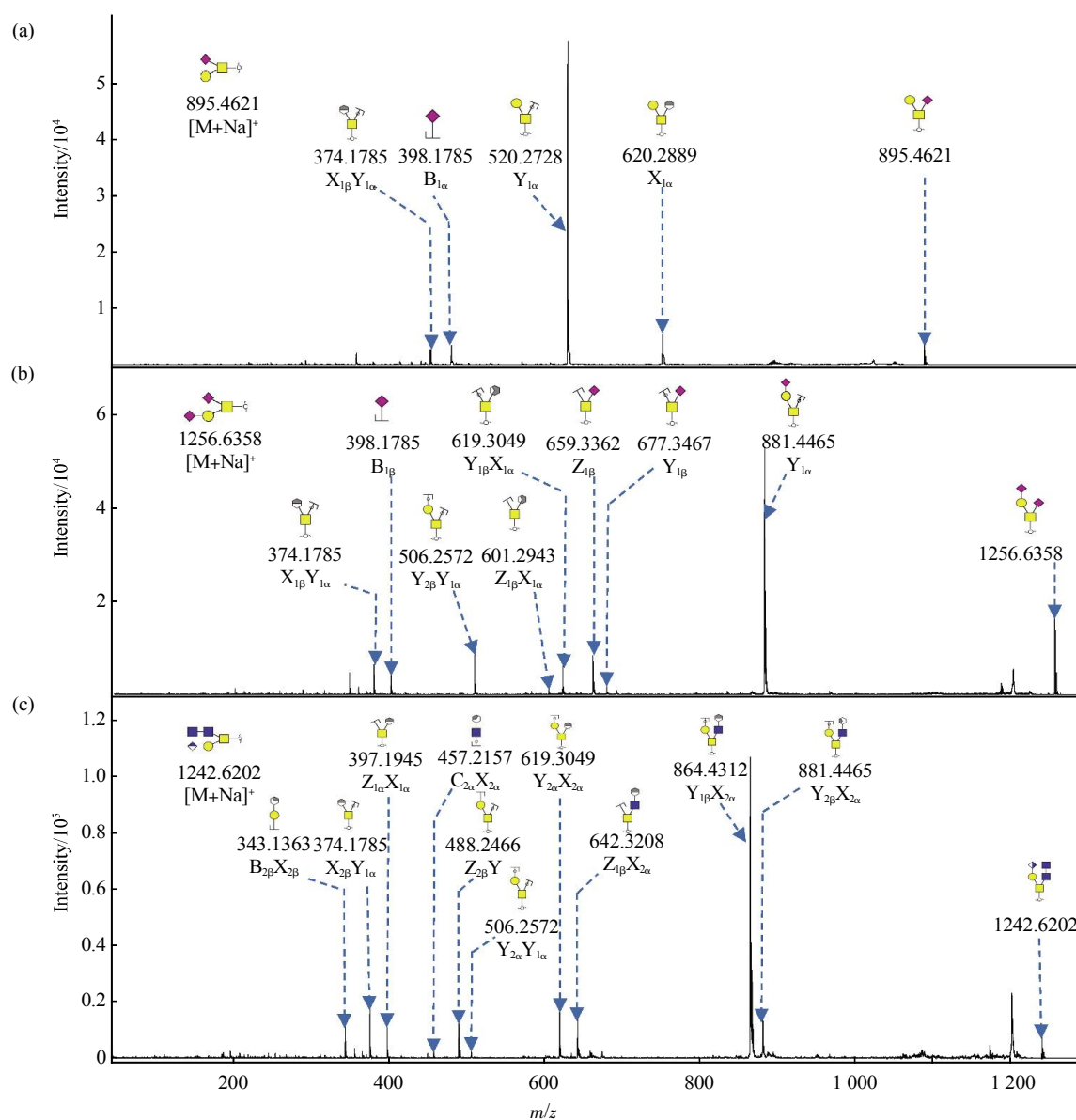


Fig. 4 Tandem mass spectrometry analyzing the O-linked glycan precursor ion from MS spectra

The three major O-glycan peaks (a) m/z 895.462, (b) m/z 1256.635, (c) m/z 1242.620 subjected to MS/MS analysis were indicated. ■ : GlcNAc; ● : Galactose; □ : GalNAc; ◆ : Neu5Ac; ▲ : Fucose.

参 考 文 献

- [1] Ohtsubo K, Marth J D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 2006, **126**(5): 855–867
- [2] Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1999, **1473**(1): 4–8
- [3] Catalona W J, Smith D S. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 1991, **324**(17): 1156–1161
- [4] Zhang Z, Bast R C, Yu Y H, *et al.* Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Research*, 2004, **64**(16): 5882–5890
- [5] Clark G M, McGuire W L. Follow-up-study of Her2/neu amplification in primary breast-cancer. *Cancer Research*, 1991, **51**(3): 944–948
- [6] Sato Y, Nakata K, Kato Y, *et al.* Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein. *New England Journal of Medicine*, 1993, **328**(25): 1802–1806

- [7] 王 胜, 邹 霞, 张 延. 基于质谱的蛋白质 O-糖基化分析. 化学进展, 2010, **22**(12): 2428–2435
Wang S, Zou X, Zhang Y. Prog Chem, 2010, **22**(12): 2428–2435
- [8] Jensen P H, Kolarich D, Packer N H. Mucin-type O-glycosylation-putting the pieces together. The FEBS Journal, 2010, **277**(1): 81–94
- [9] Okamoto T, Yoneyama M S, Hatakeyama S, *et al.* Core2 O-glycan-expressing prostate cancer cells are resistant to NK cell immunity. Molecular Medicine Reports 2013, **7**(2): 359–364
- [10] Wu A M, Song S C, Chang S C, *et al.* Further characterization of the binding properties of a GalNAc specific lectin from Codium fragile subspecies tomentosoides. Glycobiology, 1997, **7**(8): 1061–1066
- [11] Lin Y R, Reddy B V, Irvine K D. Requirement for a core1 galactosyltransferase in the drosophila nervous system. Developmental Dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, 2008, **237**(12): 3703–3714
- [12] Iwai T, Kudo T, Kawamoto R, *et al.* Core3 synthase is down-regulated in colon carcinoma and profoundly suppresses the metastatic potential of carcinoma cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, **102**(12): 4572–4577
- [13] Royle L, Mattu T S, Hart E, *et al.* An analytical and structural database provides a strategy for sequencing O-glycans from microgram quantities of glycoproteins. Analytical Biochemistry, 2002, **304**(1): 70–90
- [14] Huang Y, Konse T, Mechref Y, *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry compatible β -elimination of O-linked oligosaccharides. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2002, **16**(12): 1199–1204
- [15] Yamada K, Hyodo S, Matsuno Y K, *et al.* Rapid and sensitive analysis of mucin-type glycans using an in-line flow glycan-releasing apparatus. Analytical Biochemistry, 2007, **371**(1): 52–61.
- [16] Rasilo M L, Renkonen O. Mild alkaline borohydride treatment liberates N-acetylglucosamine-linked oligosaccharide chains of glycoproteins. FEBS Letters, 1981, **135**(1): 38–42
- [17] Hokke C H, Damm J B, Penninkhof B, *et al.* Structure of the O-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins. European Journal of Biochemistry, 1994, **221**(1): 491–512
- [18] Goetz J A, Novotny M V, Mechref Y. Enzymatic chemical release of O-glycans allowing MS analysis at high sensitivity. Analytical Chemistry, 2009, **81**(23): 9546–9552
- [19] Kudelka M R, Antonopoulos A, Wang Y, *et al.* Cellular O-glycome reporter/amplification to explore O-glycans of living cells. Nature Methods, 2016, **13**(1): 81–86
- [20] Song X, Ju H, Lasanajak Y, *et al.* Oxidative release of natural glycans for functional glycomics. Nature Methods, 2016, **13**(6): 528–534
- [21] Yang G L, Ma T R, Li Z. Enrichment and characterization of total N-linked glycans from glycoproteins by ultrafiltration units and mass spectrometry. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2014, **41**(4): 403–408
- [22] Wisniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, *et al.* Universal sample preparation method for proteome analysis. Nature Methods, 2009, **6**(5): 359–362
- [23] Yamada K, Hirabayashi J, Takechi K. Analysis of O-glycans as 9-fluorenylmethyl derivatives and its application to the studies on glycan array. Analytical Chemistry, 2013, **85**(6): 3325–3333
- [24] Zauner G, Koeleman C A M, Deelder A M, *et al.* Mass spectrometric O-glycan analysis after combined O-glycan release by beta-elimination and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone labeling. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2012, **1820**(9): 1420–1428
- [25] 范万翠. O-糖链的非还原性解离及同时 PMP 衍生化的方法研究 [D]. 西安: 西北大学, 2010
Fan W C. A Non-reductive O-linked Glycan Release and Simultaneously Derivatization with PMP Coupled with ESI-MS Analysis[D]. Xi'an: Northwest University, 2010
- [26] Miura Y, Kato K, Takegawa Y, *et al.* Glycoblotting-assisted O-glycomics : ammonium carbamate allows for highly efficient O-glycan release from glycoproteins. Analytical Chemistry, 2010, **82**(24): 10021–11029
- [27] Sun Z, Zhang N. Clinical evaluation of CEA, CA19-9, CA72-4 and CA125 in gastric cancer patients with neoadjuvant chemotherapy. World Journal of Surgical Oncology, 2014, **12**(1): 397–409
- [28] Yabu M, Korekane H, Miyamoto Y. Precise structural analysis of O-linked oligosaccharides in human serum. Glycobiology, 2014, **24**(6): 542–553
- [29] Storr S J, Royle L, Chapman C J, *et al.* The O-linked glycosylation of secretory/shed MUC1 from an advanced breast cancer patient's serum. Glycobiology, 2008, **18**(6): 456–462
- [30] Ozcan S, Barkauskas D A, Renee Ruhaak L, *et al.* Serum glycan signatures of gastric cancer. Cancer Prevention Research, 2014, **7**(2): 226–235
- [31] Iwatsuka K, Watanabe S, Kinoshita M, *et al.* Free glycans derived from glycoproteins present in human sera. Journal of Chromatography B, 2013, **928**(1): 16–21
- [32] Yamada K, Hyodo S, Kinoshita M, *et al.* Hyphenated technique for releasing and MALDI MS analysis of O-glycans in mucin-type glycoprotein samples. Analytical Chemistry, 2010, **82**(17): 7436–7443

Enrichment and Characterization of Total O-linked Glycans From Glycoproteins by Ultrafiltration Units and Mass Spectrometry*

WU Yan-Li¹⁾, YANG Gang-Long¹⁾, MIAO Ming-Yong²⁾, GUAN Feng^{1)**}

¹⁾ Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry & Biotechnology Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

²⁾ Department of Biochemistry, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Approximately more than half of mammalian proteins are glycosylated. O-linked glycan, attached to protein *via* serine or threonine residue, is one of common post-translation modifications on proteins. Its main functions include maintaining the conformation of the protein connected, protecting it from proteolysis, and covering some antigenic determinant. Analysis of O-linked glycan structure of glycoproteins can contribute to a clearer understanding of glycoproteins and their functions. This study describes a new strategy, involving enrichment and separation of total O-glycan from the glycoproteins based on a filter assisted sample preparation method (O-glycan-FASP), which was developed using ultrafiltration units according to the molecular mass differences among the glycans and proteins. The glycans were characterized and confirmed by MALDI-TOF/TOF-MS. A total of 105, 29, 33 and 85 distinctive O-glycan were characterized from bovine submaxillary mucin (BSM), human cell, serum and urine respectively.

Key words O-glycan, glycomics, ultrafiltration unit, MALDI-TOF/TOF-MS

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0312

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation for Young Scientists of China (81402115), Hi-Tech Research and Development Program of China (2014AA093513) and The Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20140172).

















**Corresponding author.

Tel: 86-510-85918126, E-mail: fengguan@jiangnan.edu.cn



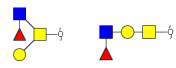


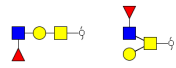
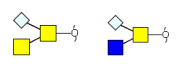

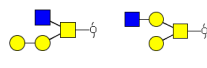
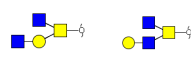

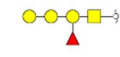
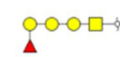


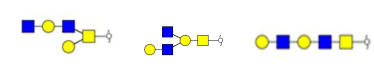
Received: October 7, 2016 Accepted: December 21, 2016

附 录

Table S1 Proposed structures and their molecular ions in MALDI spectra of O-glycans from mucin in two different ways

No.	Calculated <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	Charges	Glycan structure	Way ¹⁾	Type
1	534.2885	534.259	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1
2	553.3331	553.940	[M+H] ⁺		C	Core 3
3	575.3150	575.921	[M+Na] ⁺		S, C	Core 3
4	669.3804	667.405	[M+H] ⁺		S, C	Core 1
5	686.3957	687.033	[M+H] ⁺		S, C	Core 1
6	699.3910	699.421	[M+H] ⁺		S, C	Core 1
7	708.3777	708.373	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1
8	716.6043	717.938	[M+H] ⁺		S, C	Core 1
9	727.4223	726.438	[M+H] ⁺		C	Core 6
10	738.3883	738.428	[M+Na] ⁺		C	Core 1
11	749.4042	750.992	[M+Na] ⁺		C	Core 6
12	779.4148	779.418	[M+Na] ⁺		C	Core 1, 2
13	820.4140	820.462	[M+Na] ⁺		C	Core 4, 5
14	890.4955	889.484	[M+H] ⁺		C	Core 1
15	895.4621	895.464	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1
16	912.4775	912.497	[M+Na] ⁺		S	Core 1

Continued to Table S1

No.	Calculated <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	Charges	Glycan structure	Way ¹⁾	Type
17	914.5068	914.546	[M+H] ⁺		S, C	Core 3, 5
18	920.5061	920.540	[M+H] ⁺		S	Core 1
19	931.5221	930.547	[M+H] ⁺		C	Core 1, 2
20	936.4887	936.501	[M+Na] ⁺		S, C	Core 3
21	942.4880	941.638	[M+Na] ⁺		S	Core 1
22	953.5040	953.520	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1, 2
23	966.4993	966.588	[M+Na] ⁺		S, C	Core 3, 5
24	972.5486	971.651	[M+H] ⁺		S	Core 3
25	983.5146	983.521	[M+Na] ⁺		C	Core 1, 2
26	1024.5411	1024.578	[M+Na] ⁺		C	Core 1, 2
27	1086.5667	1086.582	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1
28	1094.5953	1094.971	[M+H] ⁺		C	Core 1
29	1116.5772	1115.859	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1
30	1118.6065	1116.628	[M+H] ⁺		S, C	Core 1, 2, 3
31	1127.5932	1126.585	[M+Na] ⁺		S, C	Core 2, 3
32	1128.6409	1128.634	[M+Na] ⁺		C	Core 1, 2, 3






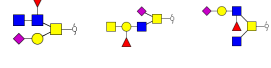

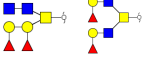
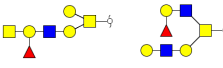


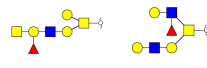
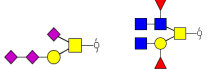
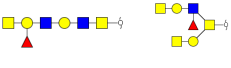

Continued to Table S1

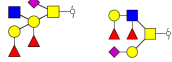


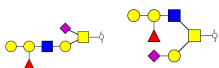
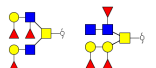



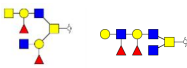
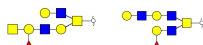


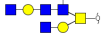
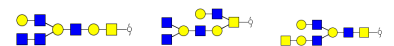

No.	Calculated <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	Charges	Glycan structure	Way ¹⁾	Type
33	1135.6218	1134.650	[M+H] ⁺		C	Core 1, 2
34	1140.5885	1140.599	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1,2
35	1146.5878	1144.673	[M+Na] ⁺		S,C	Core 1
36	1157.6038	1157.614	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1, 2
37	1176.6484	1175.7620	[M+H] ⁺		S	Core 2,3, 4
38	1187.6144	1187.630	[M+Na] ⁺		C	Core 1
39	1198.6303	1200.621	[M+Na] ⁺		S, C	Core 2, 3
40	1228.6409	1228.621	[M+Na] ⁺		C	Core 1, 2, 4
41	1269.6675	1269.696	[M+Na] ⁺		C	Core 2
42	1273.6511	1275.640	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1
43	1288.7121	1288.734	[M+H] ⁺		S	Core 4
44	1292.6957	1290.700	[M+H] ⁺		S, C	Core 3
45	1314.6777	1315.677	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1, 3
46	1322.7063	1320.845	[M+H] ⁺		S, C	Core 1, 2
47	1331.6930	1331.707	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1, 2
48	1339.7216	1338.750	[M+H] ⁺		C	Core 1, 2

Continued to Table S1


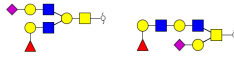
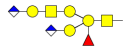
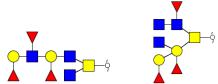
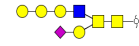
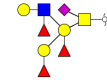
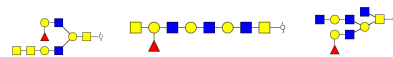
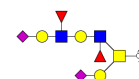
No.	Calculated m/z	Experimental m/z	Charges	Glycan structure	Way ¹⁾	Type
49	1344.6882	1344.705	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1, 2
50	1350.7376	1349.763	[M+Na] ⁺		S	Core 2, 3
51	1361.7036	1360.699	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1, 2
52	1364.6668	1363.8650	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1, 3, 4
53	1372.7195	1372.767	[M+Na] ⁺		C	Core 2, 4
54	1385.7148	1385.731	[M+Na] ⁺		C	Core 3
55	1402.7301	1402.777	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1, 2, 3
56	1416.7094	1415.705	[M+Na] ⁺		C	Core 2
57	1425.7584	1427.709	[M+H] ⁺		C	Core 1
58	1442.7737	1443.804	[M+H] ⁺		S, C	Core 1, 2, 4
59	1447.7403	1449.732	[M+Na] ⁺		C	Core 1
60	1451.7853	1449.796	[M+H] ⁺		C	Core 2, 3
61	1479.7802	1477.812	[M+H] ⁺		C	Core 1, 2, 3
62	1488.7669	1487.761	[M+Na] ⁺		S, C	Core 3
63	1494.7662	1493.925	[M+Na] ⁺		S	Core 1

Continued to Table S1

No.	Calculated m/z	Experimental m/z	Charges	Glycan structure	Way ¹⁾	Type
64	1505.7822	1504.784	[M+Na] ⁺		S, C	Core 2
65	1513.8103	1512.831	[M+H] ⁺		C	Core 2
66	1518.7775	1518.796	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1, 2
67	1535.7928	1535.820	[M+Na] ⁺		S, C	Core 2
68	1548.7880	1548.845	[M+Na] ⁺		S, C	Core 2
69	1559.8040	1559.858	[M+Na] ⁺		C	Core 2, 3, 4
70	1565.8033	1563.847	[M+Na] ⁺		S	Core 1
71	1576.8193	1576.873	[M+Na] ⁺		S, C	Core 2, 4
72	1584.8479	1584.970	[M+H] ⁺		S, C	Core 1, 2
73	1589.8146	1589.844	[M+Na] ⁺		C	Core 1, 2, 3
74	1595.8639	1595.833	[M+H] ⁺		S	Core 2
75	1606.8299	1606.797	[M+Na] ⁺		C	Core 1, 2
76	1617.8095	1617.833	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1, 2
77	1647.8564	1647.919	[M+Na] ⁺		C	Core 2, 3
78	1683.8800	1682.949	[M+H] ⁺		S	Core 2

No.	Calculated <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	Charges	Glycan structure	Way ¹⁾	Type
79	1692.8667	1694.836	[M+Na] ⁺		C	Core 1, 2
80	1696.9116	1694.916	[M+H] ⁺		C	Core 2, 3
81	1709.8220	1708.923	[M+Na] ⁺		C	Core 2
82	1722.8772	1721.873	[M+Na] ⁺		C	Core 1, 2
83	1750.9085	1750.966	[M+Na] ⁺		S, C	Core 2, 4
84	1752.8878	1751.019	[M+Na] ⁺		S	Core 2
85	1780.9191	1780.939	[M+Na] ⁺		C	Core 1, 2
86	1793.9143	1793.977	[M+Na] ⁺		S, C	Core 1, 2, 5
87	1821.9456	1822.006	[M+Na] ⁺		S, C	Core 2, 4
88	1829.9743	1829.052	[M+H] ⁺		S	Core 2, 3
89	1834.9409	1835.884	[M+Na] ⁺		C	Core 2
90	1857.9692	1857.966	[M+H] ⁺		S, C	Core 1, 2
91	1871.0008	1872.078	[M+H] ⁺		S	Core 3
92	1901.0114	1901.076	[M+H] ⁺		S	Core 1, 2, 3
93	1903.0158	1901.076	[M+H] ⁺		S	Core 3

Continued from Table S1




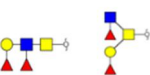


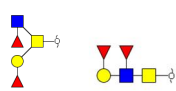




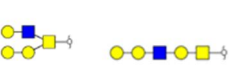

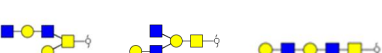



No.	Calculated <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	Charges	Glycan structure	Way ¹⁾	Type
94	1937.9930	1939.936	[M+Na] ⁺		C	Core 4
95	1968.0036	1968.025	[M+Na] ⁺		C	Core 1, 2
96	1979.9795	1979.940	[M+H] ⁺		C	Core 1
97	1996.0349	1996.163	[M+Na] ⁺		S, C	Core 2, 4
98	1998.0141	1996.163	[M+Na] ⁺		S, C	Core 5
99	2049.0737	2047.246	[M+H] ⁺		S, C	Core 1
100	2075.1006	2074.252	[M+H] ⁺		S	Core 1, 2, 3
101	2481.2845	2480.487	[M+H] ⁺		S	Core 2

¹⁾ C=Carbon SPE; S=Sepharose 4B

Table S2 Proposed structures and their molecular ions in MALDI spectra of O-glycans from cell, serum and urine

No.	Calculated <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	Charges	Glycan structure	Material ¹⁾	Type
1	512.3065	513.430	[M+H] ⁺		C	Core 1
2	534.2885	534.259	[M+Na] ⁺		S	Core 1
3	553.3331	553.940	[M+H] ⁺		S	Core 3
4	575.3150	575.921	[M+Na] ⁺		S, U	Core 3
5	716.6043	717.938	[M+H] ⁺		C, U	Core 1
6	727.4223	726.438	[M+H] ⁺		S, U	Core 6
7	738.3883	738.428	[M+Na] ⁺		S, U	Core 1
8	757.4329	755.891	[M+H] ⁺		S	Core 1, 2
9	779.4148	779.418	[M+Na] ⁺		C, U	Core 1, 2
10	873.4802	873.491	[M+H] ⁺		S, U	Core 1
11	895.4621	895.464	[M+Na] ⁺		S, U	Core 1
12	912.4775	911.448	[M+Na] ⁺		C, S, U	Core 1
13	931.5221	930.547	[M+H] ⁺		S, U	Core 1, 2
14	936.4887	936.501	[M+Na] ⁺		U	Core 3
15	953.5040	953.520	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2
16	955.4673	955.600	[M+Na] ⁺		C	Core 1
17	983.5146	983.521	[M+Na] ⁺		C, U	Core 1, 2






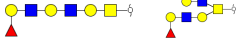
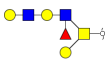
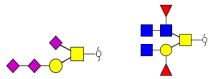
Continued to Table S2

No.	Calculated m/z	Experimental m/z	Charges	Glycan structure	Material ¹⁾	Type
18	1065.5677	1065.477	[M+Na] ⁺		U	Core 1
19	1069.5514	1069.555	[M+Na] ⁺		U	Core 1
20	1086.5667	1086.582	[M+Na] ⁺		C, U	Core 1
21	1105.6113	1104.644	[M+H] ⁺		U	Core 2, 3
22	1118.6065	1116.628	[M+H] ⁺		U	Core 1, 2, 3
23	1124.6059	1126.585	[M+H] ⁺		U	Core 1
24	1127.5932	1126.585	[M+Na] ⁺		C, U	Core 2, 3
25	1130.5565	1131.630	[M+Na] ⁺		C	Core 1
26	1135.6218	1134.650	[M+H] ⁺		U	Core 1, 2
27	1140.5885	1140.599	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2
28	1157.6038	1157.614	[M+Na] ⁺		C, U	Core 1, 2
29	1187.614	1186.612	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2
30	1198.630	1200.621	[M+Na] ⁺		U	Core 2, 3
31	1128.6409	1128.634	[M+Na] ⁺		C, U	Core 1, 2, 3
32	1242.6202	1242.639	[M+Na] ⁺		U	Core 2
33	1247.6855	1248.715	[M+H] ⁺		U	Core 2
34	1256.6358	1256.646	[M+Na] ⁺		S, U	Core 1

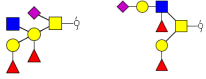
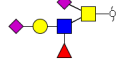
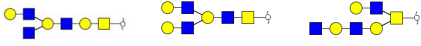
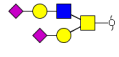

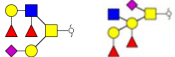
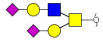

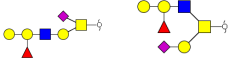
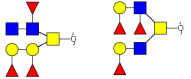
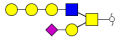

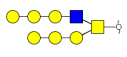

Continued to Table S2

No.	Calculated <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	Charges	Glycan structure	Material ¹⁾	Type
35	1273.6511	1272.639	[M+Na] ⁺		U	Core 1
36	1292.6957	1290.700	[M+H] ⁺		C, U	Core 3
37	1309.7111	1308.740	[M+H] ⁺		U	Core 1, 2
38	1314.6777	1315.677	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 3
39	1322.7063	1322.760	[M+H] ⁺		U	Core 1, 2
40	1331.6930	1331.707	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2
41	1344.6882	1344.705	[M+Na] ⁺		S, U	Core 1, 2
42	1350.7376	1349.763	[M+Na] ⁺		U	Core 2, 3
43	1353.7009	1352.872	[M+H] ⁺		C	Core 2
44	1361.7036	1360.699	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2
45	1380.7482	1380.889	[M+H] ⁺		C	Core 1, 2, 3
46	1385.7148	1385.731	[M+Na] ⁺		U	Core 3
47	1425.7584	1426.650	[M+H] ⁺		U	Core 1
48	1473.7672	1472.755	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2, 3

Continued to Table S2

No.	Calculated <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	Charges	Glycan structure	Material ¹⁾	Type
49	1488.7669	1487.761	[M+Na] ⁺		U	Core 3
50	1501.7621	1501.776	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2, 3
51	1505.7822	1504.784	[M+Na] ⁺		U	Core 2
52	1518.7775	1518.796	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2
53	1526.8601	1525.913	[M+H] ⁺		C	Core 1, 2
54	1535.7928	1535.820	[M+Na] ⁺		U	Core 2
55	1567.8326	1567.882	[M+H] ⁺		U	Core 1, 3
56	1584.8479	1584.976	[M+H] ⁺		C	Core 1, 2
57	1589.8146	1589.844	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2, 3
58	1595.8275	1595.799	[M+H] ⁺		U	Core 1
59	1595.8639	1595.833	[M+H] ⁺		U	Core 2
60	1606.8299	1606.850	[M+Na] ⁺		U	Core 2
61	1614.8585	1615.008	[M+H] ⁺		C	Core 1, 5
62	1617.8095	1617.833	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2

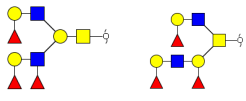
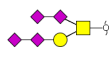
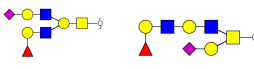
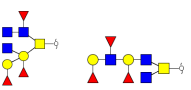
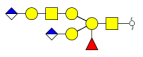
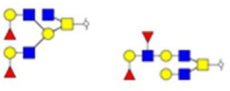



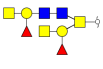
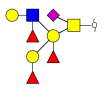
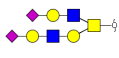
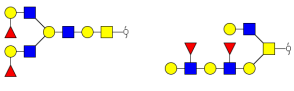
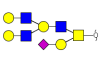
Continued to Table S2

No.	Calculated <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	Charges	Glycan structure	Material ¹⁾	Type
63	1670.8847	1668.958	[M+H] ⁺		S	Core 1, 2
64	1675.8513	1676.860	[M+Na] ⁺		U	Core 3
65	1677.8670	1676.860	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2, 3
66	1683.8800	1682.949	[M+H] ⁺		S, U	Core 2
67	1687.9000	1689.856	[M+H] ⁺		U	Core 2
68	1692.8667	1691.875	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2
69	1705.8619	1705.882	[M+Na] ⁺		S, U	Core 2
70	1720.8980	1721.873	[M+Na] ⁺		U	Core 1
71	1722.8772	1721.873	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2
72	1728.9266	1729.816	[M+H] ⁺		C	Core 2, 3
73	1730.9058	1729.816	[M+H] ⁺		C	Core 2
74	1763.9038	1764.920	[M+Na] ⁺		U	Core 2, 3
75	1777.9317	1776.635	[M+H] ⁺		C	Core 2
76	1780.9191	1780.939	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2

Continued to Table S2

No.	Calculated <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	Charges	Glycan structure	Material ¹⁾	Type
77	1788.9477	1790.942	[M+H] ⁺		C	Core 1
78	1799.9137	1799.000	[M+Na] ⁺		S	Core 2
79	1799.9637	1799.000	[M+H] ⁺		S	Core 2, 4
80	1818.9583	1819.121	[M+H] ⁺		C	Core 1
81	1821.9456	1821.118	[M+Na] ⁺		C	Core 2, 4
82	1829.9743	1829.052	[M+H] ⁺		S	Core 2, 3
83	1857.9692	1857.966	[M+H] ⁺		S, U	Core 1, 2
84	1871.0008	1872.078	[M+H] ⁺		S	Core 3
85	1879.9511	1879.971	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2
86	1881.9668	1879.971	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2
87	1901.0114	1901.076	[M+H] ⁺		S	Core 1, 2, 3
88	1903.0158	1901.076	[M+H] ⁺		S	Core 3
89	1929.0063	1928.074	[M+H] ⁺		U	Core 1, 3
90	1950.9882	1951.008	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 3, 4

Continued to Table S2

No.	Calculated <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	Charges	Glycan structure	Material ¹⁾	Type
91	1955.0083	1955.013	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2
92	1957.0012	1955.013	[M+H] ⁺		U	Core 1
93	1968.0036	1968.025	[M+Na] ⁺		U	Core 1, 2
94	1996.0349	1995.045	[M+Na] ⁺		C	Core 2, 4
95	2001.9614	2003.112	[M+H] ⁺		S	Core 1
96	2004.0635	2003.086	[M+H] ⁺		S, U	Core 2, 4
97	2009.0301	2009.109	[M+Na] ⁺		C, S, U	Core 2
98	2034.0740	2033.151	[M+H] ⁺		S	Core 2
99	2039.0407	2039.246	[M+Na] ⁺		C	Core 2
100	2045.0900	2045.150	[M+H] ⁺		S	Core 2
101	2049.0737	2050.124	[M+H] ⁺		S, U	Core 1
102	2133.1061	2132.180	[M+H] ⁺		U	Core 2
103	2208.1632	2207.185	[M+H] ⁺		S, U	Core 1, 2
104	2243.1404	2243.370	[M+Na] ⁺		C	Core 2

Continued to Table S2

No.	Calculated <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	Charges	Glycan structure	Material ¹⁾	Type
105	2245.1449	2243.370	[M+Na] ⁺		C	Core 1
106	2249.1898	2249.228	[M+H] ⁺		U	Core 2
107	2307.1953	2306.271	[M+H] ⁺		U	Core 2
108	2349.2045	2347.286	[M+H] ⁺		U	Core 3
109	2370.2038	2368.286	[M+Na] ⁺		U	Core 3
110	2417.2296	2417.303	[M+Na] ⁺		C, S, U	Core 2
111	2453.2896	2452.335	[M+H] ⁺		S, U	Core 1, 2
112	2481.2845	2493.362	[M+H] ⁺		U	Core 2
113	2494.2797	2493.362	[M+H] ⁺		U	Core 2
114	2765.7081	2764.847	[M+Na] ⁺		U	Core 2
115	2799.4636	2799.500	[M+H] ⁺		U	Core 2
116	2801.4180	2799.560	[M+Na] ⁺		S	Core 2
117	2814.4632	2813.512	[M+H] ⁺		S, U	Core 2

¹⁾ C=Cell; S=Serum; U=Urine