论文

植物凝集素串联法富集纯化血清多个亚糖蛋白质组

齐义军^①, 王攀^①, 牛保华^{①②}, 侯艳芳^①, 晁玮霞^①, WARD Douglas^③,
JOHNSON Philip J^③, 马远方^{①*}

① 河南大学医学院细胞与分子免疫学重点实验室, 开封 475000;

② 河南大学环境医学研究所, 开封 475000;

③ CRUK-Institute for Cancer Studies, Birmingham University, Birmingham B15 2TT, UK

* 联系人, E-mail: mayf@henu.edu.cn

收稿日期: 2010-12-21 接受日期: 2011-04-27

国家自然科学基金(批准号: 30700366 和 81072039)资助项目

doi: 10.1360/052011-774

摘要 蛋白质糖基化修饰是哺乳动物中最为常见的一种翻译后修饰, 蛋白质的寡糖侧链具有重要的生物学意义, 如蛋白质分子间及细胞间相互作用、识别、肿瘤侵袭与转移等. 本实验应用寡甘露糖型亲和层析柱、唾液酸型层析柱和 O-连接糖蛋白亲和层析柱从血清中序列性提取寡甘露糖型、唾液酸型的 N-连接糖蛋白及 O-连接的糖蛋白, 一维和二维电泳图谱显示血清各亚糖蛋白质组图谱差异, 并对富集的唾液酸型糖蛋白质组的二维电泳图谱中 12 个显著的差异蛋白质点进行质谱检测, 鉴定出的 14 个蛋白均为 N-连接糖蛋白. 植物凝集素序列性提取血清各亚糖蛋白质组, 显著减小了血清蛋白质组的复杂性和血清蛋白浓度波动范围, 提高了质谱鉴定血清中对疾病诊断和疗效监测具有重要意义生物标志物的灵敏性.

关键词

糖蛋白质组

血清蛋白质组学

植物凝集素

高效液相色谱-电喷雾串联质谱

蛋白质糖基化修饰是哺乳动物中最为常见的一种翻译后修饰, 糖蛋白约占所有蛋白的 50%^[1,2]. 糖蛋白的寡糖侧链不但具有重要的生理功能, 如蛋白质分子细胞内定位、稳定性、酶活性、黏附性、蛋白质分子间及细胞间相互作用、识别等功能^[3-5], 而且参与许多病理过程, 如蛋白质的异常糖基化是肿瘤形成与进展过程中的一个基本特性, 与癌细胞的侵袭、转移过程密切相关^[6-9]. 糖蛋白质组学已成为目前研究热点之一, 阐明糖蛋白质组组分及功能有助于增进理解认识生理、病理过程. 植物凝集素是一类具有高度特异

性糖结合活性的蛋白, 使用植物凝集素亲和层析法纯化富集不同种类的糖蛋白是目前许多研究者的首选技术之一, 目前多数研究者仅研究了单一的糖蛋白质组, 而从同一原始标本序列性纯化多亚糖蛋白质组, 尚未有报道. 本实验应用寡甘露糖型层析柱、唾液酸型层析柱和 O-连接糖蛋白层析柱从血清中序列性提取寡甘露糖型、唾液酸型 N-连接及 O-连接的糖蛋白, 一维和二维电泳检测不同种类的糖蛋白图谱差异, 并对富集的唾液酸型糖蛋白中差异显著的蛋白质斑点进行质谱鉴定, 验证序列性提取糖蛋白的可行性.

英文引用格式: Qi Y J, Wang P, Niu B H, et al. Purification and enrichment of serum multiple sub-glycoproteome by lectins in tandem. SCIENTIA SINICA Vitae, 2011, 41: 377-383, doi: 10.1360/052011-774

1 材料与方法

1.1 血清标本

人血清标本来自 Institute for Cancer Studies, Birmingham University. 采集早晨空腹静脉血 5 mL, 室温静置 1 h, 3000 r/min 离心后吸取血清并保存于 -80℃ 条件下备用.

1.2 植物凝集素亲和层析柱的制备

寡甘露糖型亲和层析柱: 分别加入 500 μ L 的琼脂糖偶联的刀豆蛋白(concanavalin A, ConA)、晶状体凝集素(lentil lectin, LCH)、雪花凝集素(sonwdrop lectin, GNA)于 Poly-Prep 层析柱内; 唾液酸型亲和层析柱: 分别加入等量的琼脂糖偶联的麦胚凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)、接骨木凝集素(elderberry lectin, SNA)、马鞍树凝集素(maackia amurensis lectin, MAL)于 Poly-Prep 层析柱内; O-连接糖蛋白亲和层析柱: 分别加入花生凝集素(peanut agglutinin, PNA)和木菠萝凝集素(Jacalin)于 Poly-Prep 层析柱内. 然后分别用含有 0.1% Triton X-100 的 N-连接糖蛋白缓冲液(10 mmol/L BIS-TRIS, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L CaCl_2 , 1 mmol/L MnCl_2 , pH 7.2)和不含去污剂的缓冲液各洗涤 1 次以备用.

1.3 糖蛋白的序列性提取

将 25 μ L 的血清用 N-连接糖蛋白稀释至 1 mL, 13000 r/min 离心弃沉淀, 上清液加入寡甘露糖层析柱后于旋转摇床上室温孵育 1 h, 500 r/min 收集流出液, 缓冲液洗涤 2 次, 200 mmol/L 的甲基- α -D 甘露糖苷洗脱富含寡甘露糖的 N-连接糖蛋白; 混合上述流出液及洗涤液, 加入唾液酸蛋白层析柱, 洗涤后用 200 mmol/L 的 N-乙酰葡萄糖胺洗脱富含唾液酸的 N-连接糖蛋白, 收集并混合上述未结合的流出液, 超滤(3 kD)后置换为 O-连接糖蛋白缓冲液(10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L CaCl_2 , pH 7.2), 加入 O-连接糖蛋白层析柱, 洗涤后用 500 mmol/L 的乳糖洗脱 O-连接糖蛋白. 分别将上述洗脱液约 2 mL, 加入 8 mL -20℃ 的丙酮后于 -20℃ 冰箱过夜, 12000 $\times$ g 离心 20 min, 弃上清, 室温静置 15 min 使多余的丙酮挥发, 然后加入适量的二维电泳水化液溶解沉淀的蛋白.

1.4 一维及二维电泳 SDS-PAGE

一维电泳时取上述蛋白 20 μ g, 加入适量的上样

缓冲液, 95℃ 加热 5 min 后加入 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 考马斯亮蓝染色. 二维电泳等电聚焦采用 GE 的 Non-linear IPG 3-10 (pH 3-10) 胶条, 聚焦条件如下: S1, 30 V 10 h; S2, 500 V 1 h; S3, 1000 V 1 h; S4, 8000 V 7 h; 等电聚焦完成后胶条分别经 IAA 和 DTT 平衡后进行 SDS-PAGE 电泳, 待电泳完成后采用银染染色, 银染后的蛋白 2-D 图谱用 PDQuest 分析.

1.5 高效液相色谱-电喷雾串联质谱(ESI)鉴定

切取唾液酸型植物凝集素处理后与原始血清明显差异的蛋白质点, 按文献[10]报道方法制备质谱分析样品, 进行 ESI 质谱分析和检索 IPI 人类蛋白质数据库, 结合肽段精确质量评分确认候选蛋白 ID.

1.6 表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI)验证

切取唾液酸型糖蛋白质组的二维电泳图谱的蛋白质点 3204, 按文献[11]报道方法从二维电泳胶上被动洗脱出蛋白质分子, 将 2 μ L 的洗脱液加于 IMAC30 蛋白芯片, 应用 Ciphergen 的蛋白芯片仪进行 SELDI 分析测定.

2 结果

2.1 各亚糖蛋白质组一维电泳图谱

图 1 为原始未处理血清、高甘露糖型及唾液酸型 N-连接糖蛋白及 O-连接糖蛋白的一维电泳图谱. 与原始血清的图谱相比较, 不同类型的糖蛋白表现出独特的图谱模式. 原始血清一维电泳图谱中所见的蛋白条带最丰富, 方框所突出的是 66 kD 的白蛋白所处的区域. 经不同的植物凝集素富集后, 唾液酸型糖蛋白所含的蛋白条带最多, 高甘露糖型糖蛋白所含的蛋白条带次之, 蛋白条带最少的是 O-连接的糖蛋白. 由于白蛋白不属于糖蛋白, 不能与凝集素层析柱结合, 因而纯化富集的 3 种类型的糖蛋白条带中, 白蛋白相应的区域中条带明显减少, 尤其见于甘露糖型糖蛋白.

2.2 各亚糖蛋白质组二维电泳图谱

图 2 是原始血清和凝集素纯化后的 3 种不同类型糖蛋白质组的二维电泳图谱. 原始血清表现出与 3 种亚糖蛋白不同的二维图谱模式, 尤其是方框所显示

图 1 原始血清和序列性提取血清各亚糖蛋白质组的一维电泳结果

1: 原始血清; 2: 高甘露糖型糖蛋白; 3: 唾液酸型糖蛋白; 4: O 连接糖蛋白

的白蛋白区域, 掩盖了处于同一区域的其他蛋白质. 经 3 种不同的植物凝集素富集后, 3 种不同类型糖蛋白表现出各自独特的二维电泳图谱, 经 PDQuest 分析后, 分别在原始血清、高甘露糖型糖蛋白、唾液酸型糖蛋白、O-连接糖蛋白图谱中检测到了 165, 166, 281

和 121 个蛋白质斑点.

2.3 唾液酸型糖蛋白的质谱鉴定

由于唾液酸型糖蛋白的二维电泳图谱检测到的蛋白质斑点最多, 选取了 12 个与原始血清二维电泳图谱具有显著差异的蛋白质斑点, 进行 ESI 质谱分析, 鉴定出 14 个糖蛋白质分子(表 1).

2.4 运甲状腺素蛋白(Transferrin)的 SELDI 质谱图

为验证从血清中序列性提取的糖蛋白及质谱鉴定蛋白质分子, 本研究切取了该蛋白斑点后, 洗脱出胶内的蛋白质分子, 然后采用 IMAC30 蛋白芯片对洗脱出的蛋白质分子进行了测定, 结果显示了 2 个蛋白质分子峰, 质荷比分别为 6917 和 13907, 与理论上运甲状腺素蛋白(质荷比 13880)的 SELDI 质谱峰相符合(图 3).

3 讨论

大规模的蛋白质鉴定很少涉及到蛋白质的翻译后修饰, 蛋白的翻译后修饰种类繁多, 至少有 150 种, 其中蛋白质糖基化修饰是最为常见的一种翻译后修饰, 约占所有蛋白 50%. 根据寡糖侧链共价结合的氨基酸残基的不同, 可将糖蛋白分为 N-连接糖蛋白和 O-连接糖蛋白. N-寡聚糖侧链的变异发生于多种肿瘤, 包括寡聚糖核心结构及末端残基结构的变化^[12];

图 2 原始血清和序列性提取血清各亚糖蛋白质组的二维电泳图谱
(A) 原始血清; (B) 高甘露糖型糖蛋白; (C) 唾液酸型糖蛋白; (D) O 连接糖蛋白

表 1 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法鉴定的唾液酸性糖蛋白

蛋白斑点	蛋白质名称(分子量/等电点)	糖蛋白类型	与数据库匹配的肽段	匹配肽段百分率(%)
5616	补体因子 B[前体] (85533.3/6.67)	N-linked(GlcNAc)	VQALEEANNDLENK, TLLDIDNTR, IKFEMEQLNR, TLNDMRQEYEQLIQK, HGVQLELEIELQSQLSK, HGVQLELEIELQSQLSKK, EIETYHNLLEGGQEDFESSGAGK	14.13
	补体成分 C7[前体] (93518.8/6.09)	N-linked(GlcNAc)	LSGNVLSYTFQVK, VLFYVDSEK, YSAWAESVTNLPQVIK, SCVGETTESTQCEDEEHLR,	7.00
1511	激肽原-1[前体] (71957.9/6.34)	N-linked(GlcNAc), O-linked(GalNAc)	YNSQNQSNNQFVLYR, TVGSDTFYSFK, QVVAGLNFR, IASFSQNCDIYPGK, IASFSQNCDIYPGKDFVQPPTK, KYFIDFVAR, YFIDFVAR, KLGSQSLDCNAEVYVVPWEK LYGSEAFATDFQDSAAAK, AKWEMFPDPQDTHQSR,	13.20
	Alpha-1-抗胰凝乳蛋白酶[前体] (50598.9/5.42)	N-linked(GlcNAc)	EIGELYLPK, AVLDVFEEGTEASAATAVK, ITLLSALVETR	16.29
	玻连蛋白[前体] (54306.2/5.55)	N-linked(GlcNAc)	DVWGIEGPIDAAFTR, FEDGVLDPDYPR, DWHGVPGQVDAAMAGR	9.00
1412	Alpha-1-抗胰蛋白酶[前体] (46737.2/5.37)	N-linked(GlcNAc)	ITPNLAEFASFSLYR, TLNQPSQLQLTTGNGLFLSEGLK, KLYHSEAFVTNFGDTEEAKK, LYHSEAFVTNFGDTEEAKK, DTEEDFHVDQVTTVK, LGMFNIQHCK, KLSSWVLLMK, LSSWVLLMK, LQHLENELTHDIITK,	26.08
	激肽原-1[前体] (71957.9/6.34)	N-linked(GlcNAc)	YNSQNQSNNQFVLYR, ENFLFLTPDCK, IASFSQNCDIYPGK, YFIDFVAR	7.45
1414	Alpha-1-抗胰蛋白酶[前体] (46737.2/5.37)	N-linked(GlcNAc)	TLNQPSQLQLTTGNGLFLSEGLK, KLYHSEAFVTNFGDTEEAKK, LYHSEAFVTNFGDTEEAKK, PFEVKDTEEDFHVDQVTTVK, DTEEDFHVDQVTTVK, LGMFNIQHCK, KLSSWVLLMK, LSSWVLLMK, LQHLENELTHDIITK	23.92
	激肽原-1[前体] (71957.9/6.34)	N-linked(GlcNAc)	YNSQNQSNNQFVLYR, ENFLFLTPDCK, IASFSQNCDIYPGK, YFIDFVAR	7.45
	Alpha-1-抗胰凝乳蛋白酶[前体] (50598.9/5.42)	N-linked(GlcNAc)	AVLDVFEEGTEASAATAVK	4.24
	抗凝血酶-III[前体] (52692.2/6.11)	N-linked(GlcNAc)	FATTFYQHLADSK, TSDQIHFFFAK	5.16
1319	维生素 D-结合蛋白[前体] (52964.9/5.4)	N-linked(GlcNAc), O-linked(GalNAc)	KFPSGTFEQVSQVLVK, FPSGTFEQVSQVLVK, SCESNSPFPVHPGTAECCCK, HQPQEFTPYVEPTNDEICEAFR, HLSLLTTLNLR, RTHLPEVFLSK	16.67
	血液结合素[前体] (51677.0/6.55)	N-linked(GlcNAc)	GECQAEGVLFFQGDR, LYLQGTQVYVFLTK, SGAQATWTELPWPHEK	9.96
3502	血液结合素[前体] (51677.0/6.55)	N-linked(GlcNAc)	NFPSPVDAAFR, VWVYPPEK, GECQAEGVLFFQGDR, EWFWDLATGTMK, SWPAVGNCSALR, YYCFQGNQFLR, DYFMPCPGR, LYLQGTQVYVFLTK, GGYTLVSGYPK, EVGTPHGIILDSVDAAFICPGSSR, RLWWLDLK, LWWDLDK, SGAQATWTELPWPHEK, SLGPNSCSANGPGLYLIHGPNLYCYSDVEK	39.61
	补体成分 3 前体(片段) (187305.9/6.02)	N-linked(GlcNAc)	IPIEDGSGEVVLRS, SGIPVTSPIYQIHFTK	1.80
2323	补体因子 B[前体] (85533.3/6.67)	N-linked(GlcNAc)	PQGSCSLEGVEIK, LLQEGQALEYVCPSGFYPPVQTR, AIHCPRPDHFENGEYWPR, PHDFENGEYWPR, WSGQTAICDNGAGYCSNPGIPGTR	10.47
1305	富亮氨酸-alpha-2-糖蛋白[前体] (38178.6/6.45)	N-linked(GlcNAc), O-linked(GalNAc)	ENQLEVLEVSWLHGLK, LHLEGNKLQVLGK, YLFLNGNK	13.54
	锌-alpha-2-糖蛋白[前体] (34259.5/5.71)	N-linked(GlcNAc)	YSLTYIYTGLSK, AREDFMETLK, YYVDGKDYIEFNK, AYLEEECPATLR	16.11
	血液结合素[前体] (51677.0/6.55)	N-linked(GlcNAc)	GECQAEGVLFFQGDR, YYCFQGNQFLR	5.63
6315	血液结合素[前体] (51677.0/6.55)	N-linked(GlcNAc)	LLQDEFPGIPSLDAAVECHR, GECQAEGVLFFQGDR, YYCFQGNQFLR, LYLQGTQVYVFLTK, GGYTLVSGYPK, EVGTPHGIILDSVDAAFICPGSSR, RLWWLDLK, SGAQATWTELPWPHEK	26.19

(接下页)

续表 1

蛋白斑点	蛋白质名称(分子量/等电点)	糖蛋白类型	与数据库匹配的肽段	匹配肽段百分率(%)
6316	血液结合素[前体] (51677.0/6.55)	N-linked(GlcNAc)	LLQDEFPGIPSPLDAAVECHR, GECQAEGVLFFQGDR, YYCFQGNQFLR, DYFMPCPGR, LYL VQGTQVYVFLTK, GGYTLVSGYPK, RLWWLDLK, SGAQATWTELPWPHEK	22.94
6411	Beta-2-糖蛋白-1[前体] (38299.0/8.34)	N-linked(GlcNAc), O-linked(GalNAc)	TCPKPDDLPLFSTVVPLK, TFYEPGEEITYSCK, FICPLTGLWPINTLK, VCPFAGILENGAVR, YTTFEYPNTISFSCNTGFYLNAGDSAK, WSPPELPVCAPIICPPPSIPTFATLR, CPFPSRPDNGFVNYPYPAK, CPFPSRPDNGFVNYPYPAKPTLYYK, DKATFGCHDGYSLDGPPEIECTK, ATFGCHDGYSLDGPPEIECTK	45.80
	血液结合素[前体] (51677.0/6.55)	N-linked(GlcNAc)	LLQDEFPGIPSPLDAAVECHR, GECQAEGVLFFQGDR, GGYTLVSGYPK, RLWWLDLK, SGAQATWTELPWPHEK	15.37
3204	运甲状腺素蛋白[前体] (15887.9/5.52)	N-linked(GlcNAc)	GSPAINVAVHVFR, GSPAINVAVHVFRK, KAADDTWEPFASGK, AADDTWEPFASGK, TSESGELHGLTTEEEFVEGIYK, ALGISPFHEHAEVVFTANDSGPR, RYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK, RYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK	65.31

图 3 SELDI 蛋白芯片检测唾液酸性糖蛋白组二维电泳图谱中 3204 蛋白斑点洗脱出的蛋白的 SELDI 质谱

该变异同时也导致同一蛋白形成不同糖蛋白异构体, 在二维凝胶电泳图上表现为多个不同等电点或分子量相近的蛋白质点。寡聚糖作为蛋白质分子翻译后修饰的主要成分之一, 大大增加了蛋白质分子的功能多样性。在细胞外的微环境中, N-连接糖蛋白存在相当普遍, 如胞膜蛋白的胞外区域、分泌蛋白及血清、唾液、脑脊液等体液中均存在^[13]。细胞表面 Notch 受体的岩藻糖基化也证明 O-连接糖蛋白在信号传导中具有重要作用^[14]。上述证据表明糖蛋白变化反映了许多疾病的病理过程, 具有重要的临床应用价值, 因而许多临床应用的诊断标志物或治疗靶点多多为糖蛋白, 如 CA125(卵巢癌)^[15], PSA(前列腺癌)^[16], c-erbB-2(乳腺癌)^[17], AFP-L3^[18]和 GP73(肝癌)^[19]等。可见, 系统、定量分析糖蛋白的变化, 不但有利于新的疾病诊断标志物、治疗靶点及治疗效果的评价与监测手段的探寻, 还有助于进一步理解疾病发生发展的规律及治疗的分子机制。

由于糖蛋白中寡糖侧链的不均一性, 胰酶裂解后的含糖肽段丰度极低、浓度动态范围大, 应用质谱技术分析未经分离富集的原始样品中的糖蛋白相当困难。因此, 成功分离富集糖蛋白或其肽段是全面分析糖蛋白质组的必要条件之一。目前常用的分离富集糖蛋白或糖基化肽段的技术包括抗体或植物凝集素亲和色谱法、生物正交糖同系物标签法、糖同系物标签法、固定硼酸介质分离法、氧化固相分离富集等方法^[20]。上述方法分离富集得到的糖蛋白或肽段, 应用质谱分析得到糖蛋白的 ID 及糖基化发生的位点。

本研究采用 3 组不同的植物凝集素从血清中序列性提取寡甘露糖型、唾液酸型的 N-连接糖蛋白及 O-连接的糖蛋白。一维和二维电泳图谱显示了不同亚型的糖蛋白具有各自特征性的电泳图谱, 唾液酸型的 N-连接糖蛋白在血液中含量较高, 因而可见到较多的蛋白条带或蛋白斑点。由于血清白蛋白不属于糖蛋白, 故白蛋白所处的相应区域蛋白含量大大

减少, 是有效的去除血清中高丰度的非糖蛋白组分方法之一。

本研究结果表明, 应用不同的植物凝集素可特异性地结合相应的糖蛋白寡糖链, 因而应用与相似结构糖链结合的植物凝集素组合, 可提高富集纯化的亚糖蛋白质组的效率; 同时采用序列性的提取各亚糖蛋白质组, 能大幅度减少全蛋白质组的复杂性, 尤其是血清蛋白质组。血清蛋白质组的构成极其复杂, 前 22 种高丰度蛋白约含血清蛋白总量的 99%, 低丰度蛋白仅占全部血清蛋白的 1%, 高低丰度蛋白浓度波动范围极大, 二者可相差 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$ 个数量级以上。通过串联的植物凝集素亲和层析法, 序列性提取各亚糖蛋白质组, 有助于去除血清中的高丰度非糖蛋白而富集低丰度糖蛋白, 有效降低血清蛋白浓度的波动范围, 减小高丰度蛋白对低丰度蛋白的掩盖, 提高质谱检测的敏感性。选取唾液酸型糖蛋白

质组的二维电泳图谱中明显差异的蛋白点进行质谱鉴定, 结果表明鉴定的 14 个蛋白质全为糖蛋白; 同时对鉴定的运甲状腺素蛋白, 又进行了 SELDI 质谱分析, 比对了其来源的 3204 蛋白点与运甲状腺素蛋白的理论质谱, 确认质谱鉴定的准确性。

糖蛋白质组学是后基因组时代一个重要的研究方向, 并且蛋白质糖基化与细胞的生物信息交流关系密切。应用串联植物凝集素序列性的提取血清来源的多个亚糖蛋白质组, 不仅有效降低了血清中的高丰度非糖蛋白成分, 还富集了低丰度的糖蛋白, 有效的减小血清蛋白浓度波动范围, 达到目前质谱检测的浓度范围。此外, 该糖蛋白纯化富集技术还可应用于细胞、组织、分泌液、体腔积液等来源的标本, 减小了全蛋白质组的复杂性, 提高了质谱鉴定对疾病诊断和疗效监测具有重要意义的生物标志物的灵敏性。

参考文献

- 1 Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1473: 4-8
- 2 Yang Z, Hancock W S, Chew T R, et al. A study of glycoproteins in human serum and plasma reference standards (HUPO) using multilectin affinity chromatography coupled with RPLC-MS/MS. *Proteomics*, 2005, 5: 3353-3366
- 3 Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 1993, 3: 97-130
- 4 Isaji T, Gu J, Nishiuchi R, et al. Introduction of bisecting GlcNAc into integrin $\alpha 5 \beta 1$ reduces ligand binding and down-regulates cell adhesion and cell migration. *J Biol Chem*, 2004, 279: 19747-19754
- 5 Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 2001, 291: 2364-2369
- 6 Durand G, Seta N. Protein glycosylation and diseases: blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clin Chem*, 2000, 46: 795-805
- 7 Alper J. Glycobiology. Turning sweet on cancer. *Science*, 2003, 301: 159-160
- 8 Phan U T, Waldron T T, Springer T A. Remodeling of the lectin-EGF-like domain interface in P- and L-selectin increases adhesiveness and shear resistance under hydrodynamic force. *Nat Immunol*, 2006, 7: 883-889
- 9 Patridge E A, Le Roy C, Di Guglielmo G M, et al. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science*, 2004, 306: 120-124
- 10 Mohri Y, Mohri T, Wei W, et al. Identification of macrophage migration inhibitory factor and human neutrophil peptides 1-3 as potential biomarkers for gastric cancer. *Br J Cancer*, 2009, 101: 295-302
- 11 Jorgensen C S, Jagd M, Sorensen B K, et al. Efficacy and compatibility with mass spectrometry of methods for elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and polyvinylidene difluoride membranes. *Anal Biochem*, 2004, 330: 87-97
- 12 Ihara S, Miyoshi E, Ko J H, et al. Prometastatic effect of N-acetylglucosaminyltransferase V is due to modification and stabilization of active matriptase by adding beta 1-6 GlcNAc branching. *J Biol Chem*, 2002, 277: 16960-16967
- 13 Roth J. Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. *Chem Rev*, 2002, 102: 285-303
- 14 Haltiwanger R S. Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. *Curr Opin Struct Biol*, 2002, 12: 593-598
- 15 Seelenmeyer C, Wegehingel S, Lechner J, et al. The cancer antigen CA125 represents a novel counter receptor for galectin-1. *J Cell Sci*, 2003, 116: 1305-1318
- 16 Drake R R, Schwegler E E, Malik G, et al. Lectin capture strategies combined with mass spectrometry for the discovery of serum glycoprotein biomarkers. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5: 1957-1967

- 17 Kraus M H, Fedi P, Starks V, et al. Demonstration of ligand-dependent signaling by the erbB-3 tyrosine kinase and its constitutive activation in human breast tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 2900–2904
- 18 Aoyagi Y, Isemura M, Suzuki Y, et al. Fucosylated alpha-fetoprotein as marker of early hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 1985, 2: 1353–1354
- 19 Ozkan H, Erdal H, Tutkak H, et al. Diagnostic and prognostic validity of golgi protein 73 in hepatocellular carcinoma. *Digestion*, 2011, 83: 83–88
- 20 Bond M R, Kohler J J. Chemical methods for glycoprotein discovery. *Curr Opin Chem Biol*, 2007, 11: 52–58

Purification and Enrichment of Serum Multiple Sub-Glycoproteome by Lectins in Tandem

QI YiJun¹, WANG Pan¹, NIU BaoHua^{1,2}, HOU YanFang¹, CHAO WeiXia¹,
WARD Douglas³, JOHNSON Philip J³ & MA YuanFang¹

1 Key Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, College of Medicine, Henan University, Kaifeng 475000, China;

2 Institute of Environmental Medicine, Henan University, Kaifeng 475000, China;

3 CRUK-Institute for Cancer Studies, Birmingham University, Birmingham B15 2TT, UK

Glycosylation is the most common protein modification post translation and sugar chains play important roles in a variety of physiological functions, e.g., recognition of proteins and cells, tumor invasion and metastasis, etc. The current study used multiple lectin chromatography in tandem to sequentially extract serum sub-glycoproteome of N-linked high-mannose and sialic acid type, and O-linked type, respectively. One-dimensional and two-dimensional SDS-PAGE showed distinct maps of each serum sub-glycoproteome. For N-linked sialic acid glycoproteome, we identified a total of 14 glycoproteins from 12 differential protein spots by ESI-MS/MS. In conclusion, sequential extraction of multiple serum glycoproteome by lectins in tandem can effectively decrease complexity and dynamic range of serum proteome, which leads to improvement of biomarker discovery for disease diagnosis and monitoring with clinical relevance.

glycoproteome, serum proteome, lectin, ESI-MS/MS

doi: 10.1360/052010-774