



分泌体系 *O*-GalNAc 修饰研究方法与应用进展

张勇, 赵洋, 应万涛, 钱小红*

军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 蛋白质组学国家重点实验室, 北京蛋白质组学研究中心, 国家蛋白质科学中心(北京), 北京 102206

* 联系人, E-mail: 13911734119@163.com

收稿日期: 2017-07-21; 接受日期: 2017-08-21; 网络发表日期: 2017-11-20

国家重点研发计划(批准号: 2017YFF0205400, 2016YFA0501300)和国家自然科学基金(批准号: 81530021)资助

摘要 蛋白质 *O*-GalNAc 糖基化作为蛋白质翻译后修饰的一种重要形式, 参与重要的生理和病理过程. 在血浆及其他分泌体系中, *O*-GalNAc 修饰的异常改变可能作为疾病预警的标志分子. 鉴于 *O*-GalNAc 结构的多样性, 系统性分析 *O*-GalNAc 修饰具有极大的挑战. 随着富集方法、质谱分析技术以及数据解析工具的发展, 近年来 *O*-GalNAc 修饰的研究取得了一系列进展, 促进了对蛋白 *O*-GalNAc 糖基化在人类健康中所起作用的深入理解. 本文主要介绍近年来分泌体系中的 *O*-糖基化蛋白、*O*-糖链以及 *O*-糖基化位点的富集与鉴定方法和最新进展.

关键词 生物质谱, 血浆, *O*-糖基化蛋白, *O*-糖基化位点, *O*-糖链

蛋白质糖基化修饰及其动态变化, 对于机体免疫反应、蛋白识别与定位、蛋白质折叠、血清清除率以及信号调控等至关重要^[1,2], 与糖基化紊乱性疾病^[3]、自身免疫性疾病^[4]、糖尿病并发症以及代谢综合征等密切相关^[5], 并在肿瘤细胞的侵袭和转移中发挥不可忽视的作用^[6]. 鉴于糖修饰蛋白质在疾病发生和蛋白质功能调控中的重要作用, 近年来, 规模化富集、鉴定与定量分析糖修饰蛋白质, 解析血浆、尿液等分泌体系中的重要蛋白质糖链结构及其在生理病理条件下的表达与变化信息, 受到了生物科学界和医学界越来越广泛的关注.

1 血浆 *O*-糖基化蛋白质概述

常见的蛋白糖基化修饰包括 *N*-糖基化和 *O*-糖基化两种类型, 而蛋白质 *O*-糖基化又包括 *O*-连接的

高甘露糖基化(*O*-Man), *O*-连接的 *N*-乙酰葡萄糖胺糖基化(*O*-GlcNAc)以及 *O*-连接的 *N*-乙酰半乳糖胺糖基化(*O*-GalNAc)等, 连接的氨基酸残基又包括丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸以及羟赖氨酸残基. 本文重点关注的 *O*-糖基化是指 *O*-GalNAc 单糖以 α -键与蛋白质上的丝氨酸或苏氨酸残基的羟基相连接, 是蛋白质糖基化中调控最复杂的类型, 由超过 20 种独特的多肽 GalNAc 转移酶同工酶(GalNAc-Ts)催化. 脊椎动物中的 *O*-糖基化具有多样性, 有 8 种常见的核心结构, 并在此基础上进一步分枝和延伸^[7]. 早期研究认为 *O*-GalNAc 是聚集地发生在黏蛋白上以及蛋白质的黏蛋白样结构域中, 如今越来越多的证据表明, *O*-GalNAc 也广泛地存在于那些不含黏蛋白样结构域的蛋白质中^[8]. 同时研究也表明, 大量 *O*-糖基化修饰在肿瘤发展进程中异常表达, 可能作为疾病标志物和治疗靶点, 其中与肿瘤发生相关的

引用格式: 张勇, 赵洋, 应万涛, 等. 分泌体系 *O*-GalNAc 修饰研究方法与应用进展. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 124–133

Zhang Y, Zhao Y, Ying W T, et al. Progress of *O*-glycoprotein and *O*-glycoproteome analysis in secretion systems (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 124–133, doi: [10.1360/N052017-00170](https://doi.org/10.1360/N052017-00170)

O-糖基化异常包括唾液酸化(Lewis抗原)程度增加以及截短型*O*-糖(Tn抗原)的增加^[6].

血浆作为最常用于研究的分泌体系,除了最高丰度的白蛋白外,大部分蛋白质携带糖修饰.在美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的血清肿瘤标志物中,绝大部分都是糖蛋白,如CA125(卵巢癌),HE4(卵巢癌),CA19-9(胰腺癌),AFP(肝癌),PSA(前列腺癌),CEA(大肠癌、乳腺癌、肺癌),CA15-3(乳腺癌),Tg(甲状腺癌)等^[9-11],提示血浆糖蛋白质组学研究具有巨大的应用潜力.但血浆蛋白之间丰度差异高达12个数量级,分析难度大^[12].随着高丰度蛋白去除和选择性富集等样本制备策略的应用以及质谱检测技术的发展,血浆蛋白质鉴定数量从几百个提高到5000多个^[13].针对血浆的*O*-糖蛋白质组研究,同样也面临着降低高丰度蛋白质影响,富集中低丰度糖蛋白的双重挑战.

目前*O*-糖蛋白质组学研究进展远远滞后于蛋白质组学研究,究其原因,主要是源于以下挑战:(i)*O*-糖蛋白上糖基化位点占用的不均一性(宏观不均一性)以及每个位点上糖链的不均一性(微观不均一性)^[14].(ii)相比较*N*-糖基化蛋白具备固定的模体序列N-X-S/T(X≠P),*O*-糖基化修饰目前还没有保守的模体序列.(iii)*O*-糖链修饰的链接方式异构,存在大量含有相同质量但糖苷键不同的异构体.(iv)缺乏释放所有类型*O*-糖链的糖苷酶.(v)糖修饰肽段在蛋白中剂量水平较低,且在质谱检测中信号强度弱,易被非糖肽信号掩盖.(vi)*O*-糖链和肽段在质谱中的碎裂行为不同,需要发展针对性的质谱碎裂技术.(vii)*O*-糖基化肽段在质谱中产生的谱图十分复杂,传统的分析软件如Mascot, MaxQuant难以对其进行准确分析.尽管存在上述诸多挑战,仍有各种不同的方法被开发出来,用于复杂样本或单个蛋白质中*O*-糖修饰结构鉴定与定量分析.下面对分泌体系,尤其是血浆中的*O*-糖基化蛋白、位点、糖链分析的方法以及应用进展进行总结.

2 *O*-糖基化蛋白的分析方法

2.1 *O*-糖链释放与分析的方法研究

糖蛋白糖链修饰的研究,可以将糖链从蛋白质上释放下来分析,或者分析携带糖链的糖肽,后者也称为

完整糖肽分析.基于生物质谱技术的发展,可以实现对蛋白质上释放下来的糖链类型的分析.血浆糖蛋白*O*-糖链的释放可以采用酶法和化学法.由于*O*-糖链核心结构的多样性,目前还没有特异性的酶能够释放完整的*O*-糖链,*O*-糖苷酶(endo- α -*N*-acetylgalactosaminidase)^[15]只能水解丝氨酸或苏氨酸连接的未被取代的*O*-糖核心1结构(Gal- β (1 $\rightarrow$ 3)-GalNAc),该核心结构上有任何其他修饰都会使*O*-糖苷酶作用失效,因而常需要与去唾液酸酶、半乳糖苷水解酶、*N*-乙酰葡萄糖苷水解酶等联合使用来分析蛋白质上的*O*-糖链结构.该方法时间长,分析难度较大,成本较高,不利于开展大规模的*O*-糖蛋白质组研究,但是对于纯化的单个*O*-糖蛋白糖链精细结构解析可以考虑使用.

化学法包括胍解作用、氧化作用以及 β 消除反应等.胍解作用对于蛋白链上成簇聚集的*O*-糖链的释放可能会不完全,且会降解肽段.最近, Song等人^[16]发展了廉价、快速的糖链释放方法,利用次氯酸钠的氧化作用释放*N*-糖、*O*-糖以及鞘糖脂上的糖,能从千克级别的生物样品中制备大量的糖链,可用于糖组表征和功能糖组学等相关研究,但是该方法由于引入了强氧化剂次氯酸钠,糖链的功能基团如伯胺、巯基或碳碳双键可能会被其破坏.目前,碱性条件下的 β 消除反应还是最常用的*O*-糖链释放方法,该反应是使用亲核试剂(如氢氧化钠、氨水、氨硼烷、乙胺、烷基胺、二甲胺等)进攻丝氨酸和苏氨酸,从而将*O*-糖链从蛋白上释放出来.经典的方法是在氢氧化钠^[17]条件下进行 β 消除反应,在此基础上, Maniatis等人^[18]探索了温和释放条件如在微波辅助的二甲胺环境下能快速有效地释放*O*-糖链.使用化学法释放*O*-糖链实验比较复杂,而且可能会存在一些副反应,如单糖的脱落,多肽链的切割以及氨酰化^[19-21].此外,一些组合策略也被人提出,如Goetz等人^[22]提出了酶法与化学法组合释放*O*-糖链的策略,该方法首先利用非特异性的链霉菌蛋白酶对糖蛋白进行充分酶切,然后进行固相全甲基化^[23],最后进行 β 消除反应释放全甲基化的*O*-糖链.该方法利于碱性基团对*O*-糖基化位点的进攻以及提高 β -消除反应的效率和检测灵敏度,不过依然可能存在化学副反应的干扰.

O-糖链被释放后需进行衍生化(如全甲基化)或化学标记(如2-氨基苯甲酰胺荧光标记),以便*O*-糖链在质谱中能够保持稳定并且能够实现一致的电

离^[24]。衍生化或标记之后使用Sep-Pak柱、PGC柱或亲水性液相色谱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)柱对O-糖链进行富集以便能与生物质谱兼容。基质辅助激光解析飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight, MALDI-TOF)分析法^[17]以及高效液相色谱-串联质谱(liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)分析法^[25]是检测O-糖链种类常用的方法, 与传统的方法如核磁共振法相比, 具有样品需求量低, 灵敏度高, 应用范围广等优势。MALDI-TOF分析质荷比高于2000的O-糖链的灵敏度高于LC-MS/MS分析法, 但是MALDI-TOF分析法的定量能力有限, 尤其是对于低分子量端($m/z < 600$)的O-糖链。Xia等人^[26]将两种质谱技术进行整合对人血清中的N-糖链和O-糖链进行了定量分析, 证明了该方法可作为糖基化先天失常II型疾病的诊断工具。O-糖链序列解析常采用串联质谱技术, 常见的碎裂方式包括碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)、高能碰撞解离(high energy collision dissociation, HCD)、电子转移解离(electron transfer dissociation, ETD)和电子捕获解离(electron capture dissociation, ECD)等。此外, 红外多光子断裂(infrared multiphoton dissociation, IRMPD)串联质谱^[27]也是不错的选择, 但是受仪器的限制, 目前相关的报道还很少。近年来也有一些新兴技术出现, 如Kudelka等人^[28]提出的CORA (cellular O-glycome reporter/amplification)技术可以用于研究活细胞的O-糖组, 该方法类似于PCR技术, 是活细胞吸收转化外源性乙酰化的Bn- α -GalNAc, 并将扩增的Bn-O-糖组分泌到胞外, 利用高效液相色谱与质谱能够鉴定到更多和更复杂的O-糖组。但是该方法只能鉴定事先甲基化的非硫酸化和非磷酸化的黏蛋白型O-糖组, 并且不能反映自然条件下各个O-糖型的相对丰度, 也不能用于研究活细胞之外的其他O-糖组。

2.2 O-糖基化肽段的富集与分析

O-糖链从蛋白上释放之后, 关于其修饰位点的信息也将一并丢失。而糖基化修饰的功能作用机制, 很可能是位点特异性的, 例如, 同一种糖在IgG的Fc端发生修饰和在Fab端发生修饰会产生不同的影响^[29]。要获得O-糖基化蛋白、位点和糖链等信息, 需进行O-糖基化

肽段或O-糖蛋白质组的分析。由于O-糖基化肽段在血浆蛋白中含量很低(肽段混合物中糖肽约占2%~5%), 为了提高目标肽段的相对浓度, 需要对O-糖蛋白/O-糖肽进行富集以去除非糖蛋白或非糖肽段。常用的富集方法包括以下生物、化学、物理的方法^[30,31]。

生物富集方法主要包括凝集素亲和法和抗体亲和法等, 其中凝集素亲和法是目前最常用的糖蛋白/糖肽富集手段之一。凝集素亲和法原理是凝集素的糖识别结构域能与糖蛋白上特定聚糖结构进行特异性可逆结合, 然后洗涤除去非结合组分, 再用特定的单糖与凝集素竞争性结合, 从而把糖蛋白/糖肽置换下来。富集血浆中O-糖蛋白或O-糖肽可使用的凝集素包括选择性结合Gal- β 1,3-GalNAc结构(T抗原)的木菠萝素(jacalin)、花生凝集素(peanut agglutinin, PNA)、双孢蘑菇凝集素(agaricus bisporus leefm, ABL)以及结合末端GalNAc结构(Tn抗原)的蚕豆凝集素(viola villosa agglutinin, VVA)^[32,33]等。凝集素富集优点是实验技术相对成熟, 操作简单, 重复性好, 缺点是单一凝集素无法实现所有糖肽的无偏性富集。而抗体亲和法能够针对性地研究含特定糖链结构的蛋白或肽段, 专一性比凝集素亲合法更高, 但是针对糖链的抗体种类有限。

化学富集方法主要包括胍化学反应法和硼酸化学反应法等。胍化学法是利用糖链中单糖残基上的顺式邻二醇结构与胍基团进行共价结合。操作流程通常是用高碘酸盐将糖链上的顺式邻位羟基氧化为醛基, 随后与固定在支持物材料上的胍基团形成腙键, 通过清洗去除非糖基蛋白/糖肽, 利用胰蛋白酶酶切后只有糖肽留在支持物上, 从而实现糖蛋白/糖肽的分离与富集。采用该方法的优点是非特异性吸附少, 缺点是反应步骤繁琐, 条件不易控制, 并且糖链结构信息由于化学反应而全部丢失, 因而限制了该方法在糖链解析和糖组学研究中的应用。硼酸化学反应法是基于硼酸与糖链上的顺式邻位羟基的共价键作用, 苯硼酸衍生物在碱性条件下可与具有1,2-或1,3-二醇基团的多羟基化合物形成可逆的五元或六元环酯, 在酸性条件下可逆解离。国内的刘震、杨芄原等研究组^[34-40]开发了许多基于硼酸亲和富集或标记糖蛋白的新材料和新方法, 但是基于硼酸化材料的富集方法用于高通量鉴定复杂生物样本中O-糖蛋白或糖肽还未见报道。该方法理论上无明显偏性, 可以富集O-型糖蛋白/糖肽, 但是影响富集的因素较多, 如疏水作用和离子作

用等二级相互作用。

糖肽富集物理方法主要包括分子筛法和亲水性介质富集法等。分子筛法原理是胰酶酶切后的糖肽分子质量明显大于非糖基化肽,因而可以利用分子筛的方法非选择性地对糖肽与非糖肽进行预分离。亲水性介质富集法原理是糖基化修饰的肽段亲水性显著增强,与非糖基化修饰肽段产生明显的亲疏水性差异,从而使得HILIC成为分离富集糖肽的理想工具之一。这些方法的优点是不需要复杂的衍生化过程,简单快速并且可同时分析各种糖型的糖蛋白,缺点是对酶切效率要求高,不能有效区分不同类型的糖肽。此外,这些富集技术可以组合使用,如Calvano等人^[41]建立了多种凝集素(WGA, ConA, SNA)结合ZIC-HILIC的方法从人血浆中富集糖蛋白或糖肽。

完整O-糖基化肽段的序列分析、O-糖链组成以及O-糖基化位点确认,需要利用高分辨率质谱来完成。经典的串联质谱碎裂方式CID往往会使糖链解离,造成修饰位点信息的缺失。HCD会获得较完整的O-糖肽碎裂信息,但是同样难以确定O-糖基化位点。ECD和ETD通常会优先断裂多肽骨架,同时保留完整的糖链结构,根据较完整的c离子和z离子序列即可推断O-糖基化位点。ETD和HCD联合使用(EThcD)是近年来新发展的一种碎裂方式,糖肽首先经过ETD碎裂,然后母离子和碎片离子进一步使用HCD碎裂。研究已经表明,使用该碎裂方式能得到更好的序列覆盖率,并清楚指认磷酸化以及N-糖基化位点信息^[42],但是在大规模的O-糖基化蛋白质组中的应用还很少被报道。此外,各种碎裂方式的组合,如CID-ETD, HCD-ETD, CID-EThcD, HCD-EThcD, HCD-PD-ETD^[43], HCD-PD-EThcD^[44],对糖蛋白质组的研究也起着推动作用。Darula和Medzihradsky人^[45]采用CID和HCD碎裂模式对凝集素Jacalin富集的牛血浆核心1型O-糖蛋白组进行了位点特异性O-糖基化分析。Yin等人^[43]利用ZIC-HILIC富集糖肽,采用HCD-ETD以及HCD-PD-ETD碎裂模式对人内皮细胞分泌的糖蛋白质组进行了综合分析。质谱分析O-糖肽得到的原始谱图需要借助解析糖类的软件来进行分析,如Hua等人^[46]、Strum等人^[47]和Bern等人^[48]等。刘杭等人^[49]对目前文献报道的糖蛋白质组学信息学资源和方法进行了综述, Walsh等人^[50]对糖链和糖肽定量分析的生物信息学工具也进行了总结,本文将不再赘述。

3 O-糖基化蛋白研究进展

3.1 O-糖基化蛋白质组研究进展

以质谱鉴定技术的发展为核心,促进了近年来O-糖蛋白质组学的快速发展,尤其是从血浆等分泌体系大规模发现O-糖基化蛋白质,并发掘其调控变化的研究。Darula等人^[51]采用凝集素Jacalin富集牛血浆中核心1型O-糖蛋白和O-糖肽,鉴定到124个O-糖基化位点和51个O-糖基化蛋白,该研究存在的问题是没有获得糖链结构信息。Halim等人^[52]采用酰肼化学法富集了人尿液中含唾液酸的糖蛋白,通过胰酶酶切后使用CID和ECD碎裂方式对糖肽进行质谱表征,共鉴定到58条N-糖基化肽段和63条O-糖基化肽段。该研究的特点是特异性富集含有唾液酸化修饰的糖蛋白,但是无唾液酸修饰的糖肽将无法获得有效富集。2013年, Halim等人^[53]用PNGase F去除N-糖链后,采用酰肼富集方法研究人脑脊髓液中的O-糖基化蛋白、位点和糖型,并用CID, ETD和ECD碎裂方式对糖肽进行质谱表征,共鉴定到106个O-糖基化位点和49个O-糖基化蛋白。2015年, Bai等人^[54]使用凝集素Jacalin富集经过胰酶、PNGase F和内切酶联合处理过的人血浆中的O-糖肽,并用CID碎裂方式对糖肽进行质谱表征,共鉴定到49条O-糖基化肽段和36个O-糖基化蛋白,但其缺点是没有提供完整的糖链和准确的位点信息。2016年, Hoffmann等人^[55]使用非特异的蛋白酶K酶切人血浆全蛋白并使用HILIC富集完整O-糖肽,并用CID和ETD碎裂方式对糖肽进行质谱表征,共鉴定到31个O-糖基化位点和22个O-糖基化蛋白,提供了丰富的糖链和位点信息。尽管蛋白酶K产生的糖肽更适合于质谱检测,但是其泛酶切特异性大大增加了搜索空间和时间。2016年, Qin等人^[56]采用一个整合的策略研究了人血浆中O-GalNAc修饰的糖蛋白质组,具体来讲是采用PNGase F切除N-糖链、胰酶酶切,然后使用HILIC富集完整的O-糖基化肽段,使用Beam-CID碎裂模式对糖肽进行表征,共鉴定到407条完整O-糖基化肽段和93个O-糖基化蛋白,提供了较大规模的O-糖蛋白质组数据,但是其缺点是不能提供准确的O-糖基化位点信息。2017年, King等人^[57]采用凝集素(PNA和VVA)富集完整的O-糖肽, HCD和ETD碎裂方式对糖肽进行质谱表征,从人血浆、血小板和内皮细胞中共鉴定到649个糖蛋白和1123个O-糖基化位点,表明O-糖基化是一

种普遍修饰,但是由于蛋白经过去唾液酸化处理,导致了完整O-糖链信息的缺失.上述不断提升的研究水平提示,O-糖蛋白组的研究,仍有很大的提升空间.尤其是在大部分研究中,仍然缺少完整的O-糖基化修饰位点和糖链相关信息.因此,也期待一些新技术和方法的出现.

需要特别提出的是2010年,Steentoft等人^[58]使用锌指核酸酶基因打靶技术敲除了人细胞中核心O-糖链合成步骤中的关键基因COSMC,导致细胞合成的O-糖基化蛋白仅含有Tn或STn结构,这个技术被命名为SimpleCell技术.2013年,该研究组利用该技术构建了12个人类细胞系,鉴定到超过600种O-糖蛋白和超过3000个O-糖基化位点,是已知最大规模的GalNAc修饰的O-糖基化蛋白质组,并且发现这些O-糖蛋白质在每个人类细胞系中都是差异表达和动态变化的^[8].尽管该方法可以大规模地鉴定O-糖基化蛋白和位点,为O-糖基化蛋白质组研究提供了重要参考,但是它尚不适用研究分泌体系样本,并且由于简化了O-糖结构,导致复杂结构O-糖型信息缺失.

3.2 重要血浆蛋白质O-糖基化修饰精细结构解析

人血浆中含有大量的免疫球蛋白,包括IgA, IgD, IgE, IgG以及IgM五类抗体分子,起着识别抗原、激活补体、结合Fc受体、穿过胎盘和黏膜、调节免疫应答等作用,其中IgA1, IgD和IgG3被报道是O-糖基化蛋白.研究表明IgA1的O-糖基化异常与许多疾病相关,如原发性肾小球疾病IgA肾病(IgAN)患者典型免疫病理特征之一是肾小球系膜区IgA1沉积,且循环系统中存在高水平的半乳糖缺失型IgA1,而N-糖链则与对照组无明显差别^[59-61],因而O-糖基化修饰的IgA1具有作为标志物的潜力.一般情况下, IgA1是由成熟的B细胞产生,约占血清中总IgA含量的90%左右,结构上存在一个富含丝氨酸、苏氨酸和脯氨酸的铰链区,具有9个潜在的O-糖基化位点,其中3~6个位点会同时发生O-糖基化, O-糖链的多样性以及O-糖基化位点占用不均一性导致该蛋白具有很大的异质性,因而导致其O-糖基化位点和O-糖链的分析挑战极大^[62].2011年, Takahashi等人^[63]利用抗体亲和富集的方法纯化正常人及骨髓瘤患者血浆中IgA1,用胰酶和重组蛋白AK183, TIGR4以及HK50消解糖肽,联合质谱ECD碎裂解析糖肽序列.该方法生成大小适合质谱分析的IgA1完整O-

糖肽,实现IgA1位点特异性O-糖基化分析,最后发现骨髓瘤患者血浆IgA1的Ser²³⁰, Thr²³³和Thr²³⁶这3个位点和正常人血浆IgA1的Ser²³³和Thr²³⁶这两个位点最容易发生半乳糖缺失,该结果反映出进行O-糖基化位点特异性研究的必要性.

IgD是B细胞发育早期产生的,属于正常人血清中浓度较低的抗体类型(约30 μg/mL),分为作为抗原受体的膜结合型IgD和生物学功能尚不明确的血清型IgD,其铰链区含有高达5个O-糖基化位点. Smith等人^[64]发现在IgAN患者中, IgD比IgA1半乳糖基化修饰程度更高,但是唾液酸化程度更低. IgG是人血浆中高丰度蛋白之一,其中IgG3含量约占总IgG含量的8%,具有一个三重重复序列的延伸铰链区.2015年, Plomp等人^[65]报道了人血浆IgG3的糖基化位点占用以及O-糖链结构.不同来源的IgG3经胰酶或蛋白酶K消化之后,利用ETD和CID两种碎裂模式以及毛细管电泳偶联的质谱技术对其O-糖基化肽段进行了分析,发现铰链区的苏氨酸位点上存在唾液酸化或非唾液酸化的核心I型结构,而丝氨酸位点上并未发生O-糖基化,并利用重组的突变型IgG3进行了确证.但是目前对于IgG3铰链区的O-糖基化的功能研究还较少,一般认为其可能具有阻止蛋白质降解^[66]和维持延伸构象的作用,也可能参与致病过程^[67].

补体蛋白是固有免疫防御体系的重要组成部分,在人血浆中含量约占5%~6%,这些蛋白质均为糖蛋白,也是抗体发挥免疫效应的重要机制之一.研究表明,其中一些蛋白含有O-糖基化修饰.2016年, Yang等人^[68]发展了一种整合策略,即结合高分辨率非变性质谱(即选用温和的溶液体系及质谱条件,使蛋白保持在非变性状态下被分析)和middle-down蛋白质组学对人红细胞生成素和血浆备解素进行了分析,提供这两种蛋白最完整的糖基化修饰信息,包括备解素的17个C-高甘露糖型修饰位点,4个O-糖基化位点和1个N-糖基化位点.备解素是旁路途径中的重要成分,与C3b, Bb结合行使稳定C3转化酶的功能,但是糖基化修饰与其功能之间的关系还不清楚.2017年, Franc等人^[69]使用EMR高分辨率质谱分析了从人血浆中纯化的非变性状态下的补体C9蛋白,首次提供了该蛋白N端存在O-糖基化修饰的直接实验证据.

人绒毛膜促性腺激素(hCG)是人胎盘滋养层分泌的一种糖蛋白激素,是在怀孕妇女的血和尿中发现

的,其异常糖基化(又名高糖基化)与恶性肿瘤如睾丸癌、卵巢癌、肝癌、胃癌、肺癌等相关^[70],对其异常糖型进行测定可能对于唐氏综合症怀孕和滋养层疾病等的诊断也是有用的^[71-73].该蛋白由 α 和 β 两个亚基组成,其中 β 亚基上的S121, S127, S132和S138位被报道是O-糖基化位点. Valmu等人^[74]发现,不同患者尿液中hCG的 β 亚基的O-糖型具有显著的位点特异性差异, S121主要是核心2糖型, S138主要是核心1糖型,并且癌症患者在S127或S132上的核心2糖型十分丰富. Bai等人^[54]还发现 α 亚基上T54位存在一个O-糖基化位点,但其发生机制以及与疾病相关性还不清楚.

红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是由肾脏和肝脏分泌的一种可以增加人体血液中红细胞数量、提高血液含氧量的糖蛋白激素,中国仓鼠卵巢细胞表达的重组红细胞生成素已经作为贫血治疗的药物广泛使用^[75].该蛋白含有3个N-糖基化位点和一个O-糖基化位点,附着的糖链结构具有很高的微不均一性^[76].在入血浆中,该蛋白的糖含量和糖链结构对其生物活性、可溶性以及寿命十分重要^[77].由于细胞类型以及培养条件的差异会导致表达的重组蛋白糖基化修饰发生变化,因而需要进行糖基化分析进行质量控制.目前人们针对该蛋白已经发展了许多分析方法对释放的糖链、酶切的肽段以及完整的糖蛋白进行质谱分析和糖基化表征^[77,78].

血管性血友病因子(von Willebrand factor, VWF)主要是内皮细胞表达并分泌到血浆中的一种多聚体糖蛋白,帮助血小板黏附于血管损伤处以及作为促凝血因子VIII的载体分子,从而参与止血功能^[79,80]. Canis等人^[81]从该蛋白中鉴定到18种O-糖链结构,包括8种核心1和核心2糖型,以及少见的四重唾液酸核心1糖型以及ABH抗原核心2糖型.研究表明,N-糖基化会影响

该蛋白的多聚化、分泌、半衰期、ADAMTS-13的切割、与血小板的亲合力等特性^[82-84].O-糖基化的功能研究相对较少,一些研究表明O-糖基化影响该蛋白与血小板GP1b之间的相互作用^[85,86], van Schooten等人^[87]还发现VWF血浆水平与T抗原含量之间具有相关性, Badirou等人^[88]发现,每个位点的O-糖基化对于正常的VWF多聚化和生物合成是可有可无的,而一些O-糖基化位点,尤其是T1255和T1256,对于VWF血浆水平的维持以及正常止血十分重要,而S1486对于血小板结合很关键.

除了上述蛋白质外,人血浆中胎球蛋白(fetuin-A)、激肽原(kininogen-1)等^[55]也发现具有O-糖基化位点,但是其中许多蛋白发生O-糖基化修饰的生物学功能尚不明确,还需要进一步研究. SWISSPROT数据库的注释显示,人体内有166个蛋白质具备703个潜在的O-GalNAc修饰位点,而这些O-糖修饰如何影响蛋白质的功能,以及如何参与调控发生过程,则有待于更多的技术进步和更深入的功能研究.

4 总结与展望

尽管O-GalNAc糖基化的研究存在很多困难和挑战,但是这些研究为发现疾病标志物和发展生物治疗药物提供了新思路.对于复杂的生物样本,例如,分泌体系中的血浆,多种分离和富集O-糖蛋白或O-糖基化肽段方法组合以及多种质谱碎裂模式组合能够部分解决目前研究中的困难.随着质谱碎裂技术以及分析软件的发展,最终将有望像蛋白质组学研究一样,实现规模化获取和解析O-糖基化肽段的谱图,实现生物样本中O-糖蛋白、O-糖链以及O-糖基化位点的高通量鉴定与定量分析,推动O-糖修饰研究的新发现与新应用.

参考文献

- 1 Arnold J N, Wormald M R, Sim R B, et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 21-50
- 2 Hounsell E F, Davies M J, Renouf D V. O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconjugate J*, 1996, 13: 19-26
- 3 Freeze H H. Understanding human glycosylation disorders: biochemistry leads the charge. *J Biol Chem*, 2013, 288: 6936-6945
- 4 Horynová M S, Raška M, Clausen H, et al. Aberrant O-glycosylation and anti-glycan antibodies in an autoimmune disease IgA nephropathy and breast adenocarcinoma. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70: 829-839
- 5 Testa R, Vanhooren V, Bonfigli A R, et al. N-glycomic changes in serum proteins in type 2 diabetes mellitus correlate with complications and with metabolic syndrome parameters. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0119983

- 6 Pinho S S, Reis C A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15: 540–555
- 7 Lavery S B, Steentoft C, Halim A, et al. Advances in mass spectrometry driven O-glycoproteomics. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850: 33–42
- 8 Steentoft C, Vakhrushev S Y, Joshi H J, et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J*, 2013, 32: 1478–1488
- 9 Perkins G L, Slater E D, Sanders G K, et al. Serum tumor markers. *Am Family Phys*, 2003, 68: 1075–1088
- 10 Duffy M J. Tumor markers in clinical practice: a review focusing on common solid cancers. *Med Princ Pract*, 2013, 22: 4–11
- 11 Kailemia M J, Park D, Lebrilla C B. Glycans and glycoproteins as specific biomarkers for cancer. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409: 395–410
- 12 Surinova S, Schiess R, Hüttenhain R, et al. On the development of plasma protein biomarkers. *J Proteome Res*, 2010, 10: 5–16
- 13 Keshishian H, Burgess M W, Gillette M A, et al. Multiplexed, quantitative workflow for sensitive biomarker discovery in plasma yields novel candidates for early myocardial injury. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14: 2375–2393
- 14 Stavenhagen K, Hinneburg H, Thaysen-Andersen M, et al. Quantitative mapping of glycoprotein micro-heterogeneity and macro-heterogeneity: an evaluation of mass spectrometry signal strengths using synthetic peptides and glycopeptides. *J Mass Spectrom*, 2013, 48: 627–639
- 15 Iwase H, Hotta K. Release of O-linked glycoprotein glycans by endo- α -N-acetylgalactosaminidase. *Methods Mol Biol*, 1993, 14: 151–159
- 16 Song X, Ju H, Lasanajak Y, et al. Oxidative release of natural glycans for functional glycomics. *Nat Meth*, 2016, 13: 528–534
- 17 Morelle W, Faïd V, Chirat F, et al. Analysis of N- and O-linked glycans from glycoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol*, 2009, 534: 5–21
- 18 Maniatis S, Zhou H, Reinhold V. Rapid de-O-glycosylation concomitant with peptide labeling using microwave radiation and an alkyl amine base. *Anal Chem*, 2010, 82: 2421–2425
- 19 Zheng Y, Guo Z, Cai Z. Combination of β -elimination and liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the determination of O-glycosylation sites. *Talanta*, 2009, 78: 358–363
- 20 Mirgorodskaya E, Hassan H, Clausen H, et al. Mass spectrometric determination of O-glycosylation sites using β -elimination and partial acid hydrolysis. *Anal Chem*, 2001, 73: 1263–1269
- 21 Whitaker J R, Feeney R E. Behavior of O-glycosyl and O-phosphoryl proteins in alkaline solution. In: *Protein Crosslinking*. Berlin: Springer, 1977. 155–175
- 22 Goetz J A, Novotny M V, Mechref Y. Enzymatic/chemical release of O-glycans allowing MS analysis at high sensitivity. *Anal Chem*, 2009, 81: 9546–9552
- 23 Kang P, Mechref Y, Klouckova I, et al. Solid-phase permethylation of glycans for mass spectrometric analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19: 3421–3428
- 24 An H J, Lebrilla C B. A glycomics approach to the discovery of potential cancer biomarkers. *Methods Mol Biol*, 2010, 600: 199–213
- 25 Karlsson H, Larsson J M H, Thomsson K A, et al. High-throughput and high-sensitivity nano-LC/MS and MS/MS for O-glycan profiling. *Methods Mol Biol*, 2009, 534: 117–131
- 26 Xia B, Zhang W, Li X, et al. Serum N-glycan and O-glycan analysis by mass spectrometry for diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Anal Biochem*, 2013, 442: 178–185
- 27 Goldberg D, Bern M, Li B, et al. Automatic determination of O-glycan structure from fragmentation spectra. *J Proteome Res*, 2006, 5: 1429–1434
- 28 Kudelka M R, Antonopoulos A, Wang Y, et al. Cellular O-glycome reporter/amplification to explore O-glycans of living cells. *Nat Methods*, 2016, 13: 81–86
- 29 Krapp S, Mimura Y, Jefferis R, et al. Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J Mol Biol*, 2003, 325: 979–989
- 30 Thaysen-Andersen M, Packer N H. Advances in LC-MS/MS-based glycoproteomics: getting closer to system-wide site-specific mapping of the N- and O-glycoproteome. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1844: 1437–1452
- 31 王胜, 邹霞, 张延. 基于质谱的蛋白质O-糖基化分析研究进展. *化学进展*, 2010, 22: 2428–2435
- 32 Kato K, Takeuchi H, Ohki T, et al. A lectin recognizes differential arrangements of O-glycans on mucin repeats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371: 698–701
- 33 Wu A M, Wu J H, Lin L H, et al. Binding profile of *Artocarpus integrifolia* agglutinin (Jacalin). *Life Sci*, 2003, 72: 2285–2302
- 34 Ye J, Chen Y, Liu Z. A boronate affinity sandwich assay: an appealing alternative to immunoassays for the determination of glycoproteins. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 10386–10389
- 35 Bie Z, Chen Y, Ye J, et al. Boronate-affinity glycan-oriented surface imprinting: a new strategy to mimic lectins for the recognition of an intact glycoprotein and its characteristic fragments. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 10211–10215

- 36 Pan X, Chen Y, Zhao P, et al. Highly efficient solid-phase labeling of saccharides within boronic acid functionalized mesoporous silica nanoparticles. *Angew Chem*, 2015, 127: 6271–6274
- 37 Xu Y, Wu Z, Zhang L, et al. Highly specific enrichment of glycopeptides using boronic acid-functionalized mesoporous silica. *Anal Chem*, 2008, 81: 503–508
- 38 Zhang L, Xu Y, Yao H, et al. Boronic acid functionalized core-satellite composite nanoparticles for advanced enrichment of glycopeptides and glycoproteins. *Chem Eur J*, 2009, 15: 10158–10166
- 39 Zhang J, He T, Tang L, et al. Boronic acid functionalized Fe₃O₄ magnetic microspheres for the specific enrichment of glycoproteins. *J Sep Sci*, 2016, 39: 1691–1699
- 40 Tang J, Liu Y, Qi D, et al. On-plate-selective enrichment of glycopeptides using boronic acid-modified gold nanoparticles for direct MALDI-QIT-TOF MS analysis. *Proteomics*, 2009, 9: 5046–5055
- 41 Calvano C D, Zamboni C G, Jensen O N. Assessment of lectin and HILIC based enrichment protocols for characterization of serum glycoproteins by mass spectrometry. *J Proteomics*, 2008, 71: 304–317
- 42 Frese C K, Zhou H, Taus T, et al. Unambiguous phosphosite localization using electron-transfer/higher-energy collision dissociation (ET_hCD). *J Proteome Res*, 2013, 12: 1520–1525
- 43 Yin X, Bern M, Xing Q, et al. Glycoproteomic analysis of the secretome of human endothelial cells. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12: 956–978
- 44 Bilan V, Leutert M, Nanni P, et al. Combining higher-energy collision dissociation and electron-transfer/higher-energy collision dissociation fragmentation in a product-dependent manner confidently assigns proteomewide ADP-ribose acceptor sites. *Anal Chem*, 2017, 89: 1523–1530
- 45 Darula Z, Medzihradszky K F. Affinity enrichment and characterization of mucin core-1 type glycopeptides from bovine serum. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8: 2515–2526
- 46 Hua S, Nwosu C C, Strum J S, et al. Site-specific protein glycosylation analysis with glycan isomer differentiation. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 403: 1291–1302
- 47 Strum J S, Nwosu C C, Hua S, et al. Automated assignments of *N*- and *O*-site specific glycosylation with extensive glycan heterogeneity of glycoprotein mixtures. *Anal Chem*, 2013, 85: 5666–5675
- 48 Bern M, Kil Y J, Becker C. Byonic: advanced peptide and protein identification software. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2012, in press, doi: 10.1002/0471250953.bi1320s40
- 49 刘杭, 姚鋆, 杨其原, 等. 糖蛋白质组学的信息学资源和方法. *生物化学与生物物理进展*, 2016, 43: 910–918
- 50 Walsh I, Zhao S, Campbell M, et al. Quantitative profiling of glycans and glycopeptides: an informatics' perspective. *Curr Opin Struct Biol*, 2016, 40: 70–80
- 51 Darula Z, Sherman J, Medzihradszky K F. How to dig deeper? Improved enrichment methods for mucin core-1 type glycopeptides. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11: O111.016774
- 52 Halim A, Nilsson J, Ruetschi U, et al. Human urinary glycoproteomics attachment site specific analysis of *N*- and *O*-linked glycosylations by CID and ECD. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11: M111 013649
- 53 Halim A, Rütschi U, Larson G, et al. LC-MS/MS characterization of *O*-glycosylation sites and glycan structures of human cerebrospinal fluid glycoproteins. *J Proteome Res*, 2013, 12: 573–584
- 54 Bai X, Li D, Zhu J, et al. From individual proteins to proteomic samples: characterization of *O*-glycosylation sites in human chorionic gonadotropin and human-plasma proteins. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 1857–1869
- 55 Hoffmann M, Marx K, Reichl U, et al. Site-specific *O*-glycosylation analysis of human blood plasma proteins. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15: 624–641
- 56 Qin H, Cheng K, Zhu J, et al. Proteomics analysis of *O*-GalNAc glycosylation in human serum by an integrated strategy. *Anal Chem*, 2017, 89: 1469–1476
- 57 King S L, Joshi H J, Schjoldager K T, et al. Characterizing the *O*-glycosylation landscape of human plasma, platelets, and endothelial cells. *Blood Adv*, 2017, 1: 429–442
- 58 Steentoft C, Vakhrushev S Y, Vester-Christensen M B, et al. Mining the *O*-glycoproteome using zinc-finger nuclease-glycoengineered SimpleCell lines. *Nat Meth*, 2011, 8: 977–982
- 59 Allen A, Harper S, Feehally J. Galactosylation of *N*- and *O*-linked carbohydrate moieties of IgA1 and IgG in IgA nephropathy. *Clin Exp Immunol*, 1995, 100: 470–474
- 60 Tomana M, Matousov K, Julian B A, et al. Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney Int*, 1997, 52: 509–516
- 61 Sun Q, Zhang Z, Zhang H, et al. Aberrant IgA1 glycosylation in IgA nephropathy: a systematic review. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0166700

- 62 Tarelli E, Smith A C, Hendry B M, et al. Human serum IgA1 is substituted with up to six *O*-glycans as shown by matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Carbohydr Res*, 2004, 339: 2329–2335
- 63 Takahashi K, Smith Iv A D, Poulsen K, et al. Naturally occurring structural isomers in serum IgA1 *O*-glycosylation. *J Proteome Res*, 2011, 11: 692–702
- 64 Smith A C, de Wolff J F, Molyneux K, et al. *O*-glycosylation of serum IgD in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17: 1192–1199
- 65 Plomp R, Dekkers G, Rombouts Y, et al. Hinge-region *O*-glycosylation of human immunoglobulin G3 (IgG3). *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14: 1373–1384
- 66 Brezski R J, Jordan R E. Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases: an evasion tactic against host immunity? In: *Cleavage of IgGs by Proteases Associated with Invasive Diseases: an Evasion Tactic Against Host Immunity?* MAbs. Abingdon: Taylor & Francis, 2010, 2: 212–220
- 67 Homma H, Tozawa K, Yasui T, et al. Abnormal glycosylation of serum IgG in patients with IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol*, 2006, 10: 180–185
- 68 Yang Y, Liu F, Franc V, et al. Hybrid mass spectrometry approaches in glycoprotein analysis and their usage in scoring biosimilarity. *Nat Commun*, 2016, 7: 13397
- 69 Franc V, Yang Y, Heck A J R. Proteoform profile mapping of the human serum complement component C9 revealing unexpected new features of *N*-, *O*-, and *C*-glycosylation. *Anal Chem*, 2017, 89: 3483–3491
- 70 Cole L A. Hyperglycosylated hCG, a review. *Placenta*, 2010, 31: 653–664
- 71 Birken S, Yershova O, Myers R V, et al. Analysis of human choriogonadotropin core 2 *O*-glycan isoforms. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 204: 21–30
- 72 Kovalevskaya G, Birken S, Kakuma T, et al. Differential expression of human chorionic gonadotropin (hCG) glycosylation isoforms in failing and continuing pregnancies: preliminary characterization of the hyperglycosylated hCG epitope. *J Endocrinol*, 2002, 172: 497–506
- 73 Birken S. Specific measurement of *O*-linked core 2 sugar-containing isoforms of hyperglycosylated human chorionic gonadotropin by antibody B152. *Tumor Biol*, 2005, 26: 131–141
- 74 Valmu L, Alfthan H, Hotakainen K, et al. Site-specific glycan analysis of human chorionic gonadotropin β -subunit from malignancies and pregnancy by liquid chromatography—electrospray mass spectrometry. *Glycobiology*, 2006, 16: 1207–1218
- 75 Fisher J W. Erythropoietin: physiology and pharmacology update 2. *Exp Biol Med*, 2003, 228: 1–14
- 76 Rush R S, Derby P L, Smith D M, et al. Microheterogeneity of erythropoietin carbohydrate structure. *Anal Chem*, 1995, 67: 1442–1452
- 77 Balaguer E, Demelbauer U, Pelzing M, et al. Glycoform characterization of erythropoietin combining glycan and intact protein analysis by capillary electrophoresis-electrospray-time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2006, 27: 2638–2650
- 78 Takegawa Y, Ito H, Keira T, et al. Profiling of *N*- and *O*-glycopeptides of erythropoietin by capillary zwitterionic type of hydrophilic interaction chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J Sep Sci*, 2008, 31: 1585–1593
- 79 Sakariassen K S, Bolhuis P A, Sixma J J. Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-Von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature*, 1979, 279: 636–638
- 80 Weiss H J, Sussman I I, Hoyer L W. Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. *J Clin Invest*, 1977, 60: 390–404
- 81 Canis K, McKinnon T A J, Nowak A, et al. The plasma von Willebrand factor *O*-glycome comprises a surprising variety of structures including ABH antigens and disialosyl motifs. *J Thrombosis Haemostasis*, 2010, 8: 137–145
- 82 Wagner D D, Mayadas T, Marder V J. Initial glycosylation and acidic pH in the Golgi apparatus are required for multimerization of von Willebrand factor. *J Cell Biol*, 1986, 102: 1320–1324
- 83 McKinnon T A J, Chion A C K, Millington A J, et al. *N*-linked glycosylation of VWF modulates its interaction with ADAMTS13. *Blood*, 2008, 111: 3042–3049
- 84 Lawrence J B, Gralnick H R. Asialo-von Willebrand factor inhibits platelet adherence to human arterial subendothelium: discrepancy between ristocetin cofactor activity and primary hemostatic function. *Blood*, 1987, 70: 1084–1089
- 85 Carew J A, Quinn S M, Stoddart J H, et al. *O*-linked carbohydrate of recombinant von Willebrand factor influences ristocetin-induced binding to platelet glycoprotein Ib. *J Clin Invest*, 1992, 90: 2258–2267
- 86 Schulte Am Esch J, Robson S C, Knoefel W T, et al. *O*-linked glycosylation and functional incompatibility of porcine von Willebrand factor for human platelet GPIb receptors. *Xenotransplantation*, 2005, 12: 30–37
- 87 van Schooten C J M, Denis C V, Lisman T, et al. Variations in glycosylation of von Willebrand factor with *O*-linked sialylated T antigen are associated with its plasma levels. *Blood*, 2007, 109: 2430–2437
- 88 Badirou I, Kurdi M, Legendre P, et al. *In vivo* analysis of the role of *O*-glycosylations of von Willebrand factor. *PLoS ONE*, 2012, 7: e37508

Progress of *O*-glycoprotein and *O*-glycoproteome analysis in secretion systems

ZHANG Yong, ZHAO Yang, YING WanTao & QIAN XiaoHong

*National Center for Protein Science (Beijing), Beijing Proteome Research Center, State Key Laboratory of Proteomics,
Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China*

O-GalNAc is one of the most important post-translational modifications of protein, which regulates key physiological and pathological processes. In plasma and other secretion system, aberrant *O*-glycosylation may serve as early warning sign for diseases. Because of the diversity of *O*-linked glycan structures, systemic analysis of *O*-GalNAc poses a great challenge. With the development of enrichment methods, mass spectrometry technologies and data analysis tools, a series of progress has been reported in the field of *O*-glycosylation research, which extends our understanding of the function of the *O*-glycoprotein and *O*-glycoproteome in human health. In this paper, we try to review main progress of the techniques and their applications in *O*-glycoprotein and *O*-glycoproteome studies in secretory systems.

mass spectrometry, plasma, *O*-glycosylation, *O*-glycosylation site, *O*-glycan

doi: [10.1360/N052017-00170](https://doi.org/10.1360/N052017-00170)