

基于糖基识别的糖蛋白传感器研究及应用

梁峻瑜 童沛洪 李建平*

(桂林理工大学化学与生物工程学院, 广西电磁化学功能物质重点实验室, 桂林 541004)

摘 要 糖蛋白是一种结合蛋白质,其结构主要由糖和蛋白质的含量及其结合的肽键决定。糖蛋白种类繁多,根据其在医学领域的临床作用,可分为凝集素、激素、酶和免疫球蛋白。糖蛋白具有多种生物学功能,在医学和生物学领域具有重要意义。为了研究与糖蛋白相关的生物信息,有必要建立高灵敏度和高效识别的糖蛋白分析检测方法。糖蛋白的检测涉及分离纯化、结构分析和含量测定。常用的糖蛋白测定方法有质谱法、色谱-质谱联用法、表面等离子体共振法、酶联免疫吸附法等。近年来,糖蛋白传感器的研究和应用逐渐引起研究者的关注。本文简要总结了糖蛋白的分析方法,重点对基于糖基识别的糖蛋白生物传感器的研究和应用进行了综述,详细介绍了糖蛋白生物传感器,包括电化学传感器、光学传感器和质量传感器的原理和应用,并对糖蛋白传感器的未来发展方向进行了展望。

关键词 糖蛋白;糖基;传感器;评述

1 引言

随着社会经济发展,人类生活环境不断受到破坏,人们的健康面临许多挑战。大部分疾病是由于人体细胞发生病变引起的,如肿瘤、癌症等。因此,能够在早期及时准确地发现疾病,对临床方面的针对性治疗和后期康复具有非常重要的意义^[1]。在细胞发生病变的过程中,正常细胞由于受到致癌因子的作用,转变为恶性增殖细胞,产生诸如癌细胞表面糖蛋白等物质。糖蛋白与各种疾病的发生密切相关,已被用作临床诊断的生物标志物和治疗靶标分子。因此,糖蛋白的分析检测研究十分重要,快速、准确的糖蛋白检测方法的开发受到了研究者的广泛关注^[2,3]。糖蛋白是一种组合蛋白质,糖蛋白中糖的组成成分含有大量的结构信息,可作为主要的特异性识别位点。在糖蛋白检测中,可利用特征糖基与凝集素、抗体或其它具有糖基亲和作用的分子进行特异性识别。糖蛋白生物传感器具有灵敏度高、选择性好、使用简单方便等优势。本文对糖蛋白的分析和基于糖基识别的糖蛋白生物传感器的研究进展进行了综述。

2 糖蛋白

糖蛋白广泛存在于动植物体内,是细胞信息功能的承载者。糖蛋白是糖类分子与蛋白质分子共价结合形成的大分子,是分支的寡糖链与多肽链共价相连所构成的复合糖。因此,糖蛋白既是一种复合糖,也是一种蛋白质。糖蛋白的结构主要由糖和蛋白的含量以及所结合的肽键决定。糖蛋白在自然界中分布非常广泛,包括已研究过的六十余种血浆蛋白质、部分酶、激素及从植物或动物中分离出来的凝集素。有关糖和蛋白质相互作用的许多早期工作都是围绕酶对糖类的识别展开的,如细菌细胞壁分解的内切糖苷酶溶菌酶及参与中间代谢的酶。Fleming、Chain 和 Corey 因为发现溶菌酶和青霉素的抗菌作用,于 1945 年获得了诺贝尔奖。20 世纪 60 年代末,Phillips 等^[4]从溶菌酶与四糖形成的复合物中获得了溶菌酶的三维结构。此外,伴刀豆蛋白 A(ConA)^[5]和流感病毒血凝素^[6]的晶体结构的确定均具有重要的理论和实际应用价值。

2.1 糖蛋白种类

糖蛋白种类繁多,根据其所结合的肽键类型可分为 O-连接糖蛋白和 N-连接糖蛋白^[7];根据糖蛋白中糖和蛋白质含量的不同可分为蛋白聚糖^[8]和糖蛋白^[9],两者的主要区别是蛋白聚糖以聚糖为主,蛋白质为辅助,其中糖类的含量可达到 98%;而在多数情况下,糖蛋白中糖的含量小于蛋白质。糖蛋白根据存在方式分类,可分为可溶性糖蛋白、膜结合糖蛋白和结构糖蛋白。可溶性糖蛋白包括酶(如核酸酶类、蛋白酶类、糖苷酶类)、肽类激素(如绒毛膜促性腺激素、促黄体激素、促甲状腺素、促红细胞生成素)、抗体、补体,以及某些生长因子、干扰素、抑素、凝集素及毒素等。膜结合糖蛋白包括酶、受体、凝集素及运载蛋白等。结构糖蛋白包括胶原及各种非胶原糖蛋白(纤粘连蛋白、层粘连蛋白等)。糖蛋白种类很多,广泛存在于生物体内,与生命的成长息息相关,在医学领域具有重要的研究意义和临床作用(表 1)。

表 1 糖蛋白的分类及作用
Table 1 Classification and role of glycoprotein

分类 Classification	名称 Name	作用 Effect	参考文献 Ref.
凝集素 Lectin	动物凝集素 Animal lectin	细胞、分子之间的识别和粘附,如肿瘤转移等。 Identification and adhesion between cells, molecules, such as tumor metastasis, etc.	[10]
	植物凝集素 Plant lectin		[11]
激素 Hormone	绒毛膜促性腺激素 Chorionic gonadotropin (CG)	作用于特定的组织和器官,与相应的蛋白偶联受体结合,激活第二信使通路,促进腺体的释放,在生长发育中起着重要的调节作用。 It acts on specific tissues and organs, binds to the corresponding protein-coupled receptors, activates the secondary messenger pathway, promotes the release of glands, and plays an important regulatory role in growth and development.	[12]
	促卵泡激素 Follicle stimulating hormone (FSH)		[13]
	促黄体激素 Luteinizing hormone (LH)		[14]
	促甲状腺激素 Thyroid stimulating hormone (TSH)		[15]
	脂蛋白脂肪酶 Lipoprotein lipase		[16]
酶 Enzyme	组织纤维蛋白溶酶 Tissue plasminogen activator	参与人体的代谢系统,有能力提高组织液的通透性,酶活性作为临床疾病如白血病、前列腺肿瘤的指标。 Participation in the body's metabolic system, has the ability to improve the permeability of tissue fluid, enzyme activity as an indicator of clinical diseases such as leukemia, prostate tumors.	[17]
	透明质酸酶 Hyaluronidase		[18]
	肝酯酶 Hepatic lipase		[19]
免疫球蛋白 Immunoglobulin	IgG/IgM/IgA/IgD/IgE	补体激活,受体结合,分子识别,分子聚合等 Complement activation, receptor binding, molecular recognition, molecular polymerization, etc.	[20]
			[21]

2.2 糖蛋白的临床作用

糖蛋白具有重要的临床意义,很多种临床诊断或者疾病监测的指标物为糖蛋白,既可作为异常的标志,为临床诊断提供信息,也有助于愈后的判断和介入治疗。糖蛋白与肿瘤和癌症等疾病密切相关。Zhou 等^[22]建立了一种基于糖基和凝集素亲和作用的糖蛋白富集策略,应用于糖蛋白岩藻糖基质谱分析中,结果表明,蛋白质岩藻糖基化的分析有助于更深入了解前列腺癌的发生和发展,为临床判断前列腺癌是否具有侵袭性提供了有效的参考依据。除此之外,糖蛋白还可应用于妊娠的临床诊断。如高糖基化 hCG 是人绒毛促性腺激素 hCG 的一个相关分子,由未分化或低分化的细胞滋养层细胞分泌,hCG 的蛋白质骨架结构基本相同,不同之处是高糖基化 hCG 在表达分泌过程中,亚基上修饰的糖基比例显著增多,且修饰的糖基分子量更大,结构更为复杂。高糖基化 hCG 水平与早期妊娠的发展、滋养细胞疾病的发生发展密切相联。在动物妊娠的临床诊断中也有类似研究,De Rensis 等^[23]提出利用马齿绒毛膜促性腺激素(eCG)治疗和控制奶牛生殖活动,从而改善了奶牛的怀孕率。糖蛋白还可用于临床中的介入治疗,Zhang 等^[24]首次从红菇中分离提取出具有抗肿瘤活性的新型凝集素,并对其进行了表征,该研究为临床治疗肿瘤提供了一种有效思路。此外,MDR 的潜在机制之一是多药耐药细胞过度表达 p-糖蛋白(p-gp),使得抗癌药物外排增加。Li 等^[25]利用 p562 型人类白血病细胞的 MDR 合成了一种具有可溶性的水溶性单壁碳纳米碳管(抗 p-gp)的抗体,有效克服了人白血病细胞的多药耐药性。因此,发展简单、高效的糖蛋白检测方法非常必要。

3 糖蛋白分析方法

糖蛋白的分析包括糖蛋白分离、结构分析与鉴定、含量测定等。糖蛋白分析主要是依据糖蛋白分子的分子尺寸、形状、极性、荷质比和分子间作用力展开。通常在进行糖蛋白分析前,需将单一组分糖蛋白从糖蛋白粗提物中分离出来。

3.1 分离纯化方法

糖蛋白的分离纯化是指从糖蛋白粗品中去除杂质而分离得到单一糖蛋白的过程^[26]。由于凝集素能识别和结合特定的单糖或者糖链结构,因此固定化凝集素亲和层析法^[27]是最常用的糖蛋白分离纯化方法。色谱分离技术通常会将几种方法混合,利用糖蛋白的分子形状与大小各异、蛋白质在不同 pH 值溶液中所带电荷不同等特点进行分离,包括高效液相色谱、离子交换色谱、凝胶柱色谱和亲和色谱等。电泳分离则是利用糖蛋白所负载的电荷不同,在电场下的迁移率也不同的特点进行分离^[28]。膜分离是将不同分子量的糖蛋白进行粗略分级,还需要结合色谱或者电泳方法进一步分离。分级沉淀法是利用糖蛋白分子大小和溶解度的不同进行分离^[29]。硼酸盐亲和材料(BAMs)对含有顺式二醇生物分子的具有独特亲和作用,可用于选择性分离富集糖类、糖基和糖蛋白等,近年来备受关注^[30,31]。如 Liu 等^[32]提出了基于硼酸盐亲和作用的硼亲和光刻印迹方法和硼亲和可控定向印迹法,有效提高了 BAMs 的亲合力和选择性。

3.2 结构分析方法

目前,糖蛋白的结构分析方法有甲基化分析^[33]、高碘酸氧化^[34]、核磁共振^[35]、色谱-质谱联用^[36]和 X-射线衍射^[37]等,主要涉及分子量、多糖和蛋白质含量、氨基酸组成和序列、糖链结构等方面的分子信息分析^[38]。糖链的结构信息包括单糖组成、连接方式和分支结构等,一般通过释放糖链的方法获得。目前,N-糖链释放采用酶水解法^[39],如内切糖苷酶、胰蛋白酶等;O-糖链释放采用化学法,如 β -消除法^[40]等。多糖的一级结构鉴定方法有高效液相色谱法、核磁共振法和质谱分析法等,其中单糖和寡糖多采用质谱和核磁共振技术。高分辨核磁共振技术可研究糖链的立体结构,通过化学位移、积分面积、偶合常数等信息表达结构特征^[41]。质谱法则主要用于糖链结构分析,如电喷雾离子化质谱、基质辅助激光解吸飞行时间质谱和快原子轰击质谱等,可分析糖肽键的连接方式和糖基化位点。

3.3 糖和蛋白质含量的测定方法

通常,利用糖的还原性测定多糖含量,如苯酚-硫酸法^[42]等;蛋白质含量的测定通常是将蛋白质与染色剂形成化合物,根据颜色的深浅判断蛋白质含量,如福林酚法^[43]等。采用凝胶过滤色谱或聚丙烯酰胺凝胶电泳法可快速鉴定糖蛋白样品中的蛋白质分子量和等电点。其次,可通过离子交换色谱、高效液相色谱、毛细管电泳等方法确定蛋白质中的氨基酸种类、数目及含量等方面的结构信息。

糖蛋白中特征糖基或糖链的专一性是分析检测的重点,糖蛋白的常用检测方法是质谱法^[44],近年来液相色谱-质谱联用方法也备受关注^[45]。但是这些方法存在仪器成本高、需要专业技术人员以及样品前处理复杂的缺点。因此,开发简单、高效的分离和检测糖蛋白的方法具有重要意义。芯片法无需将糖链从糖蛋白上释放下来,可直接对糖蛋白的糖链进行检测^[46]。芯片法采用的检测方法包括表面激元共振、酶联免疫吸附测定^[47]和生物传感器^[48]等方法。该方法的检测原理是将单糖、凝集素^[49]和抗体等固定在基质上,使其与糖蛋白特异性结合而产生检测信号。其中,生物传感器的方法应用最为广泛,结合传感器技术制备糖蛋白生物传感器,可快速、高效和高灵敏地对糖蛋白分子进行定性与定量检测^[50]。

4 糖基识别糖蛋白传感器的分类及应用

生物传感器研究是现阶段非常活跃的领域,其研究重点在于研发可作为敏感元件的生物活性材料,如生物大分子等^[51]。20 世纪 80 年代以来,包括糖蛋白生物传感器在内的生物传感器研究备受关注,发展了多种利用抗体、激素、受体、分子印迹膜等作为识别元件的糖蛋白生物传感器。

目前,检测糖蛋白的生物传感器研究仍处于聚糖和凝集素检测的初期阶段。迄今为止,糖类生物传感器中最常用的方法是根据凝集素对单糖和聚糖的识别检测糖类化合物^[52]。凝集素阵列已被有效地

用于分析糖蛋白,以及细菌和哺乳动物细胞表面的蛋白聚糖。糖蛋白的特征糖基或糖链是传感器选择性识别糖蛋白的关键,多数糖蛋白传感器主要是利用对糖基具有特异性或亲和力的分子作为敏感元件。此外,还可进一步在敏感膜中掺杂纳米材料^[53],研制具有高灵敏度的糖蛋白传感器,利用纳米材料独特的表面效应和催化效应,降低糖蛋白的检测下限。基于糖基识别的糖蛋白传感器的种类很多,根据信号转换类型,可分为电化学、光学和质量型传感器。

4.1 电化学传感器

基于糖基识别的糖蛋白电化学传感器将电化学检测法的高灵敏度与糖蛋白分子固有的生物选择性结合,通过特异性识别糖蛋白所具有的糖基或者糖链选择性识别待测物,产生电信号,从而实现对待测物定性或定量检测。目前,电化学传感器是应用较广的一类糖蛋白生物传感器^[54,55],可分为电流型、阻抗型和电位型^[56],其中报道较多的是电流型和阻抗型,表 2 中列出了基于凝集素特异性识别糖基的糖蛋白传感器,其中电流型是通过修饰有凝集素或者糖基印迹膜等识别元件的电极,在电极表面特异性结合糖蛋白分子后,电话性探针在电极表面发生电子转移;随着吸附不同浓度的目标糖蛋白分子,电极表面的电子转移率发生变化,从而引起电流变化^[57]。基于糖基识别构建的糖蛋白阻抗型传感器是利用凝集素与糖基糖链的特异性结合,由于重吸附糖蛋白分子阻碍了传感器表面电话性探针的电子转移,传感器的阻抗值与糖蛋白分子浓度呈一定的线性关系,从而实现糖蛋白的定性定量检测^[58,59]。

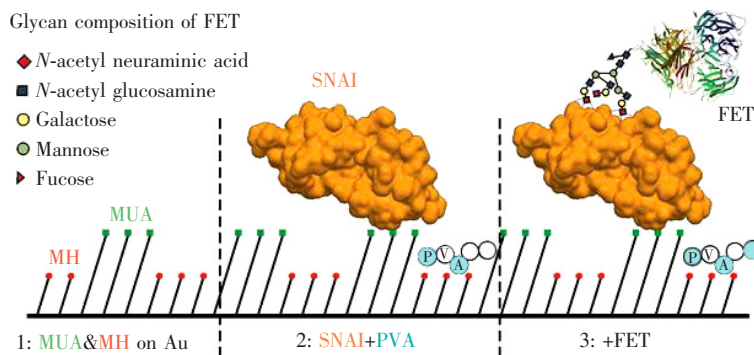
表 2 基于凝集素特异性识别糖基的糖蛋白电化学传感器
Table 2 Glycoprotein electrochemical sensors based on lectin-specific glycosylation recognition

糖蛋白目标物 Glycoprotein target	输出信号类型 Output signal type	凝集素类型 Lectin type	检出范围 Detection range	检出限 Limit of detection	参考文献 Reference
癌胚抗原 Carcinoembryonic antigen (CEA)	电流型 Amperometric	伴刀豆蛋白 A Concanavalin A (ConA)	1 ~ 10 ng/mL	0.03 ng/mL	[60]
甲胎蛋白 Alpha fetoprotein (AFP)	阻抗型 Electrochemical impedance spectroscopy (EIS)	麦胚素 Wheat germ agglutinin (WGA)	1 ~ 100 ng/mL	0.1 ng/mL	[61]
前列腺特异抗原 Prostate specific antigen (PSA)	阻抗型 EIS	黑接骨木凝集素 Sambucusnigra lection (SNA)	100 ag/mL ~ 1 μg/mL	100 ag/mL	[62]
胎球蛋白 Fetuin (FET)	阻抗型 EIS	蚕豆凝集素 Vicia villosa lectin (VVA)	>2.25 g/mL	0.68 g/mL	[63]
胎球蛋白 FET	阻抗型 EIS	花生凝集素 Peanut agglutinin (PNA)	>1 g/mL	1 pg/mL	[64]
抗原(普罗帕利凝集素) Antigens (ProBL)	电流型 Amperometric	麦胚素 WGA	1 ~ 10 ⁵ ng/mL	1 ng/mL	[65]

阻抗型传感器可通过加入增敏材料提高传感器的检测灵敏度。常用的增敏材料包括具有高导电性和生物亲和性的金纳米粒子(AuNPs)、具有高电子转移率的石墨烯和碳纳米管,以及具有较高的比表面积和框架稳定性的金属有机框架材料。Klukova 等^[66]基于凝集素 ConA 对甘露糖专一性识别作用制备了阻抗型糖基识别传感器。为进一步提高传感器的灵敏度,他们利用氧化石墨烯高导电率的优点,将石墨烯修饰于电极表面,以增加电子转移率。部分凝集素对糖基具有较强的亲和作用,Bertok 等^[67]基于黑接骨木凝集素(SNA I)对含有唾液酸糖基的糖蛋白-胎球蛋白具有较强的特异性,制备了一种超灵敏的无标记凝集素阻抗生物传感器,检出范围达到 7 个数量级,且检出限低于 0.54 fmol/L(图 1)。

Hu 等^[68]基于碳水化合物与凝集素的相互作用,将可特异性识别甘露糖的凝集素 ConA 修饰于金电极表面,研制了一种新型电化学阻抗型物传感器,利用凝集素直接识别检测癌细胞表面具有甘露糖基的糖蛋白或糖肽,成功应用于人肝癌细胞的检测(图 2)。

分子印迹技术^[69]具有构效预定性、环境耐受性和高选择性的特点,将分子印迹技术应用于糖蛋白的检测是一个良好的发展方向。生物大分子的印迹是难度较大,特别蛋白质尺寸大,很难将其从高度交

图1 超灵敏的无标记凝集素阻抗生物传感器原理图^[67]Fig. 1 Schematic of an ultrasensitive label-free lectin impedance biosensor^[67]

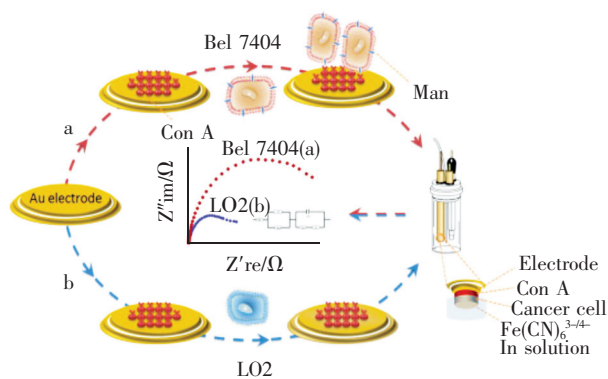
联的聚合物网络中洗脱去除,妨碍了糖蛋白印迹传感器的研究和应用。Li等^[70]提出了一种结合了硼酸盐亲和性和分子印迹传感器(MIPs)的优势的印迹策略,即光刻硼酸盐亲和分子印迹法。该方法通过硼酸盐亲和作用将糖蛋白模板和单体形成共价复合物,以紫外光引发交联剂和硼酸复合物发生聚合,通过简单调节溶液pH值即可得到印迹孔穴,适用的pH值范围宽,硼酸与糖蛋白的亲合性强、特异性高、抗干扰能力好。但是,该方法也有一定的局限性,其要求印迹膜在紫外光辐射发生聚合得到,聚合膜的种类少。研究组开发了

了另一种简便、通用性更好的方法,即基于硼酸盐亲和作用的可控定向表面印迹法^[71]。此外,受抗原决定基印迹法启发,结合肿瘤的糖基化变更行为^[72],本课题组^[73]提出了一种新的基于糖基化的大分子印迹策略,以肿瘤标志物的特征糖基为模板进行印迹,可达到识别整个糖蛋白大分子的目的。如图3所示,利用糖抗原CA19-9末端过度表达的特征糖基Sle^a结构为模板分子,以邻苯二胺为功能单体,成功制备多糖印迹传感器,通过间接法定量检测CA19-9,检测范围为0.1~5.0 U/mL,检出限0.028 U/mL,同样有效解决了糖蛋白大分子印迹困难的难题。与传统的免疫分析对比,该传感器具有成本低、制备步骤简便快速的优点,为糖蛋白检测提供了一种灵敏度高、选择性好、简便高效和适用性好的非免疫方法。

4.2 光学糖蛋白传感器

利用识别糖基检测糖蛋白的光学传感器通常采用表面等离子共振(SPR)^[74]、荧光^[75]等技术,直接或间接地得到光信号的变化,从而实现检测。其中,SPR传感器不需要进行标记,直接在传感器芯片表面发生生物特异性相互作用。Geuijen等^[76]基于SPR技术,利用凝集素ConA和SNA等对甘露糖、岩藻糖等糖基的特异性亲和作用,构建了一个多重SPR成像平台,对凝集素特异性识别糖蛋白特征糖基进行研究(图4)。此外,Angeloni等^[77]利用凝集素与糖链成分的特异性识别作用,将凝集素功能化修饰在载玻片表面,通过荧光标记等制备了荧光传感器,并将其应用于活细胞表面糖蛋白的糖链结构的高效分析中。近年来,基于硼酸与糖之间的共价作用,结合MIPs的高特异性和表面增强拉曼散射技术等,提出了硼亲和和三明治法(BASA)^[78]和等离子体免疫三明治法(PISA)^[79~81]两种新型光学传感器检测方法,用于测定复杂样品中微量的糖蛋白,检测速度快、灵敏度高。

在糖蛋白分子检测的光学传感器研究中,荧光探针是关键的部分。因与抗原抗体结合且不影响其

图2 基于糖基与凝集素相互作用制备电化学阻抗型糖蛋白生物传感器原理图^[68]Fig. 2 Electrochemical impedance glycoprotein biosensor based on interaction of carbohydrates and lectins^[68]

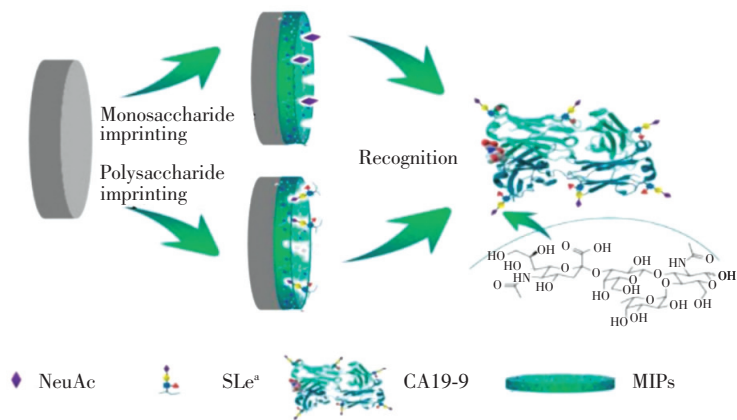


图 3 基于糖基化变更的 CA19-9 电化学传感器的构建^[73]

Fig.3 Construction of CA19-9 electrochemical sensor based on glycosylation change^[73]

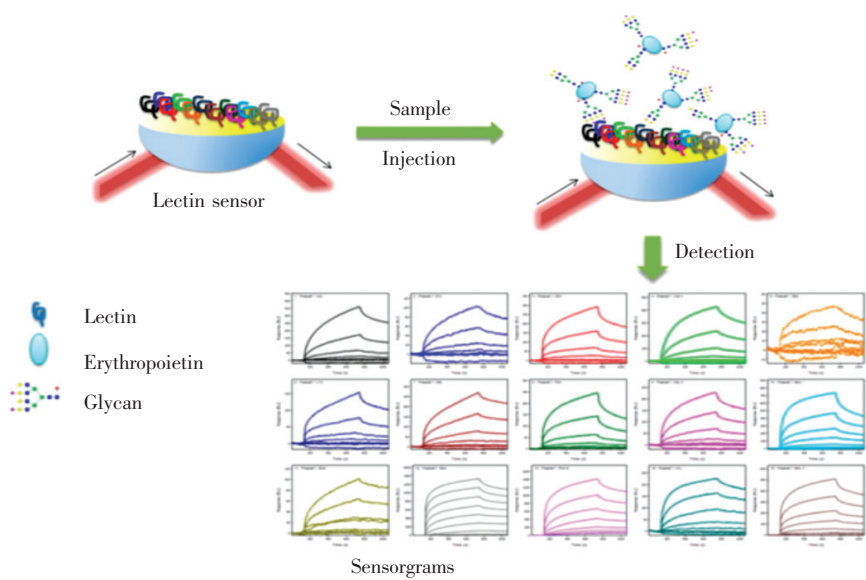


图 4 基于表面等离子体共振技术免标记检测凝集素-糖基的传感器^[76]

Fig.4 Construction of label-free lectin-glycosyl sensor based on surface plasmon resonance^[76]

活性的特点,荧光探针通常被用于糖蛋白传感器荧光免疫法中抗原抗体的标记^[82],但是特异性抗体一般难以获得且价格较昂贵。Jiang 等^[83]提出利用糖基与凝集素之间的相互作用合成了两种新型糖基荧光探针 PT-Man 和 PT-Gal,并利用氧化石墨烯作为糖基平台,进一步提高了传感器的灵敏度,检出限达到 10^{-9} mol/L,为细胞间已知或未知的受体反应研究提供了可参考的依据(图 5)。

4.3 质量型传感器

质量型传感器包括石英晶体微天平(QCM)传感器^[84]、表面声波传感器^[85]等,是指通过压电或压力等参数变化直接获得传感器表面物质的质量信号变化,将质量信号转化为电信号或直接计算质量信号变化值,进行定量分析。目前,基于糖基识别构建的质量型传感器^[86,87]主要结合 QCM,将特异性识别糖基的凝集素固定于功能化后的传感平台表面,传感平台的质量信号变化与谐振频率变化具有一定的线性关系,从而定量检测糖蛋白。基于抗原决定基印迹技术,Lu 等^[88]开发了一种新型质量型传感器,以多巴胺为功能单体,人免疫缺陷病毒(HIV)-1 糖蛋白片段的合成肽为模板分子,在 QCM 传感片表面进行印迹膜聚合,该传感器不仅对模板肽具有很强的亲和力,同时还能特异性地检测 HIV 表面糖蛋白 GP41,检出限达到 2 ng/mL(图 6)。此外,还可应用于细胞^[89]、抗原^[90]等的灵敏检测。

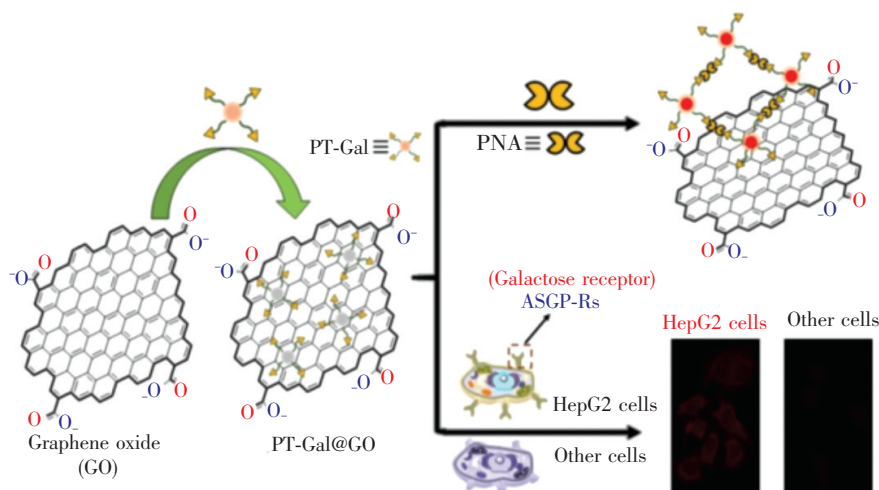


图 5 基于新型糖基荧光探针构建的糖蛋白荧光传感器原理图^[83]

Fig. 5 Fluorescent glycoprotein sensor based on novel glycosyl fluorescent probe^[83]

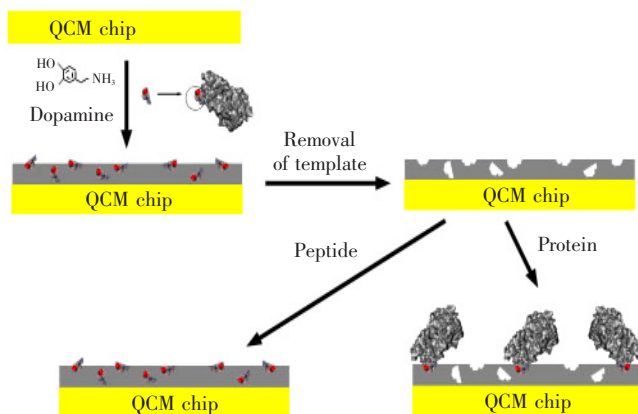


图 6 表面印迹石英晶体微天平检测 HIV 相关糖蛋白^[88]

Fig. 6 Schematic diagram of detection of human immunodeficiency virus (HIV)-associated glycoprotein by surface-imprinted quartz crystal microbalance (QCM)^[88]

5 结论和展望

糖蛋白的糖基具有复杂的生物结构信息,能直接或间接地参与生物识别,其生物学作用一直是研究的热点。与传统的质谱法相比,糖蛋白印迹传感器检测技术具有检测快速、灵敏度高等特点,是糖蛋白研究的一个理想的发展方向。特别是基于糖基印迹和硼酸亲和印迹技术构建的糖蛋白传感器具有高特异性、简便高效的特点,有效解决了免疫型传感器部分抗体难以获得、成本高的问题,弥补了糖蛋白印迹中模板分子难以洗脱的不足。此外,利用凝集素与糖基的特异性结合,拓展了糖基传感器的研究领域。

目前,部分糖蛋白生物传感器已经实现了商业化,如验孕棒等。此传感器在肿瘤标志物的检测分析方面的应用也为及早发现和及时治疗相关疾病提供了可靠的参考。结合新型纳米材料、成像技术等应用于细胞、病毒的研究,将会是未来该领域研究的发展方向。

References

- 1 Kreicbergs U, Valdimarsdóttir U, Steineck G, Henter J I. *Lancet*, **2004**, 364(9436): 787–789
- 2 Beck W T, Grogan T M, Willman C L, Cordoncardo C, Parham D M, Kuttesch J F, Andreeff M, Bates S E, Berard C W, Boyett J M, Brophy N A, Broxterman H J, Chan H S, Dalton W S, Dietel M, Fojo A T, Gascoyne R D, Head D, Houghton P J, Srivastava D K, Lehnert M, Leith C P, Paietta E, Pavelic Z P, Weinstein R. *Cancer Res.*, **1996**, 56(13): 3010–3020

- 3 ZHAO Yang, ZHANG Yong, WANG Ming-Chao, MENG Bo, YING Wan-Tao, QIAN Xiao-Hong. *Chinese Journal of Chromatography*, **2018**, 36(12): 1197–1205
赵洋, 张勇, 王明超, 孟波, 应万涛, 钱小红. 色谱, **2018**, 36(12): 1197–1205
- 4 Phillips D C. *Sci. Am.*, **1966**, 215(5): 78–93
- 5 Hardman K D, Ainsworth C F. *Biochemistry*, **1972**, 11(26): 4910–4919
- 6 Wilson I A, Skehel J J, Wiley D C. *Nature*, **1981**, 289(5796): 366–373
- 7 Jensen P H, Karlsson N G, Kolarich D, Packer N H. *Nat. Protoc.*, **2012**, 7(7): 1299–1310
- 8 Merkle R K, Poppe I. *Methods Enzymol.*, **1994**, 230(4): 1–15
- 9 Alexander S P, Benson H E, Faccenda E, Pawson A J, Sharman J L, Speding M, Peter J A, Harmar A J. *Brit. J. Pharmacol.*, **2014**, 170(8): 1459–1581
- 10 Stern D, Pauly D, Zydek M, Müller C, Avondet M A, Worbs S, Lisdat F, Dorner M B, Dorner B G. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, 78: 111–117
- 11 Toshima T, Shirabe K, Ikegami T, Yoshizumi T, Kuno A, Togayachi A, Gotoh M, Narimatsu H, Korenaga M, Mizokami M. *J. Gastroenterol.*, **2015**, 50(1): 76–84
- 12 Diana T, Krause J, Olivo P D, König J, Kanitz M, Decallonne B, Kahaly G J. *Clin. Exp. Immunol.*, **2017**, 189(3): 304–309
- 13 Pocius K D, Maurer R, Fortin J, Goldberg A B, Bartz D. *Contraception*, **2015**, 91(6): 503–506
- 14 Santi D, Casarini L, Alviggi C, Simoni M. *Front. Endocrinol.*, **2017**, 8: 114
- 15 Vestergaard E T, Schjørring M E, Kamperis K, Petersen K K, Rittig S, Juul A, Kritstensen K, Birkebæk N H. *Eur. J. Endocrinol.*, **2017**, 176(6): 747–753
- 16 Calderon R M, Diaz S, Szeto A, Llinas J A, Hughes T A, Mendez A J, Goldberg R B. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **2015**, 100(7): 2581–2588
- 17 Gong H, Chao Y, Xiang J, Han X, Song G, Feng L, Liu J, Yang G, Chen Q, Liu Z. *Nano Lett.*, **2016**, 16(4): 2512–2521
- 18 Moore H B, Moore E E, Gonzalez E, Hansen K C, Dzieciatkowska M, Chapman M P, Sauaia A, West B, Banerjee A, Silliman C C. *Shock*, **2015**, 43(1): 39–46
- 19 Reiner Ž, Guardamagna O, Nair D, Soran H, Hovingh K, Bertolini S, Jones S, Coric M, Calandra S, Hamilton J, Eagleton T, Ros E. *Atherosclerosis*, **2014**, 235(1): 21–30
- 20 Liang L, Willis-Owen S A, Laprise C, Wong K C, Davies G A, Hudson T J, Binia A, Hopkin J M, Yang I V, Grundberg E, Busche S, Hudson M, Rnnblom L, Pastinen T, Schwartz D A, Lathrop G M, Moffatt M F, Cookson W O. *Nature*, **2015**, 520(7549): 670–674
- 21 Walker B A, Wardell C P, Brioli A, Boyle E, Kaiser M F, Begum D B, Dahir N B, Johnson D C, Ross F M, Davies F E. *Blood Cancer J.*, **2014**, 4(3): e191
- 22 Zhou J, Yang W, Hu Y, Höti N, Liu Y, Shah P, Sun S, Clark D, Thomas S, Zhang H. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(14): 7623–7630
- 23 De Rensis F, López-Gatius F. *Reprod. Dom. Anim.*, **2014**, 49(2): 177–182
- 24 Zhang G, Sun J, Wang H, Ng T B. *Phytomedicine*, **2010**, 17(10): 775–781
- 25 Li R, Wu R, Zhao L, Wu M, Yang L, Zou H. *ACS Nano*, **2010**, 4(3): 1399–1408
- 26 Ugozzoli M, Chiu A. *Biotechniques*, **1992**, 12(2): 187–190
- 27 Meiniger M, Stepath M, Henning R, Cajic S, Rapp E, Rotering H, Wolff M W, Reichl U. *J. Chromatogr. B*, **2016**, 1012–1013: 193–203
- 28 Cong W, Zhou A, Liu Z, Shen J, Zhou X, Ye W, Zhu Z, Zhu X, Lin J, Jin L. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(3): 1462–1465
- 29 Arnold L, Chen R. *Biotechnol. Bioeng.*, **2014**, 111(2): 413–417
- 30 Nishiyabu R, Kubo Y, James T D, Fossey J S. *Chem. Commun.*, **2011**, 47(4): 1106–1123
- 31 Li D J, Chen Y, Liu Z. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44(22): 8097–8123
- 32 Liu Z, He H. *Acc. Chem. Res.*, **2017**, 50(9): 2185–2193
- 33 Shajahan A, Supekar N T, Heiss C, Ishihara M, Azadi P. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(20): 10734–10743
- 34 Giannini G, Alekseeva A, Naggi A, Salvini L, Tei L, de Santis R. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2018**, 410(2): 553–564

- 35 Gallo M, Matteucci S, Alaimo N, Pitti E, Orsale M V, Summa V, Cicero D O, Monteaquado E. *J. Pharm. Anal.*, **2019**, 167: 21–29
- 36 Huang Y L, Jhou B Y, Chen S F, Khoo K H. *Anal. Sci.*, **2018**, 34(9): 1049–1054
- 37 Kent S B H. *Protein Sci.*, **2019**, 28(2): 313–328
- 38 Hofbauerová K, Jr K V, Sykora J, Karpenko V. *Biophys. Chem.*, **2003**, 103(1): 25–33
- 39 Yan J P, Liu Y R, Wang K X, Li D Y, Hu Q Q, Zhang W J. *Plant Sci.*, **2018**, 276: 143–151
- 40 Eckmair B, Jin C S, Abed-Navandi D, Paschinger K. *Mol. Cell. Proteomics*, **2016**, 15(2): 573–597
- 41 Schubert M, Walczak M J, Aebi M, Wider G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54(24): 7096–7100
- 42 Wang Y G, Jing Y J, Leng F F, Wang S W, Wang F, Zhuang Y, Liu X F, Wang X L, Ma X Q. *Sugar Tech*, **2017**, 19(4): 424–431
- 43 Kandemir F M, Yukselel M, Ozdemir N, Deveci H. *Vet. Arhiv*, **2013**, 83(6): 603–610
- 44 Yang Y, Liu F, Franc V, Halim L A, Schellekens H, Heck A J. *Nat. Commun.*, **2016**, 7: 13397
- 45 Souza B W S, Coimbra M A, Bourbon A I, Pinheiro A C, Martins J T, Teixeira J A, Coimbra M A, Vicente A A. *Food Hydrocolloids*, **2012**, 27(2): 287–292
- 46 Bie Z, Chen Y, Ye J, Wang S, Liu Z. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54(35): 10211–10215
- 47 Liu J, Chen C, Zhu R, Ye X, Jia J, Yang L, Wang Y, Wang W, Ye J, Li Y. *Appl. Microbiol. Biot.*, **2015**, 99(11): 4845–4853
- 48 Huber W, Hurst J, Schlatter D, Barner R, Hübscher J, Kouns W C, Steiner B. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 227(3): 647–656
- 49 Okazaki I, Hasegawa Y, Shinohara Y, Kamasaki T, Bhikhabhai R. *J. Mol. Recognit.*, **1995**, 8(1-2): 95–99
- 50 Stephenson-Brown A, Acton A L, Preece J A, Fossey J S, Mendes P M. *Chem. Sci.*, **2015**, 6(9): 5114–5119
- 51 MA Xiong-Hui, LI Jian-Ping, WANG Chao, XU Guo-Bao. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2016**, 44(1): 152–159
马雄辉, 李建平, 王超, 徐国宝. *分析化学*, **2016**, 44(1): 152–159
- 52 Reuel N F, Mu B, Zhang J, Hinckley A, Strano M S. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41(17): 5744–5779
- 53 Svarovsky S A, Joshi L. *Anal. Methods*, **2014**, 6(12): 3918–3936
- 54 Wei Q, Zhao Y, Xu C, Wu D, Cai Y, He J, Li H, Du B, Yang M. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, 26(8): 3714–3718
- 55 Bertok T, Sediva A, Katrlík J, Gemeiner P, Mikula M, Nosko M, Tkac J. *Talanta*, **2013**, 108(8): 11–18
- 56 Belický S, Cernocká H, Bertok T, Holazova A, Réblová K, Palecek E, Tkac J, Ostatná V. *Bioelectrochemistry*, **2017**, 117: 89–94
- 57 Luna D M, Oliveira M D, Nogueira M L, Andrade C A. *Chem. Phys. Lipids*, **2014**, 180(5): 7–14
- 58 Avelino K Y P S, Andrade C A S, de Melo C P, Nogueira M L, Correia M T S, Coelho L C B B, Oliveira M D L. *Synthetic Met.*, **2014**, 194: 102–108
- 59 Dai Z, Kawde A, Xiang Y, La Belle J T, Gerlach J, Bhavanandan V P, Joshi L, Wang J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128(31): 10018–10019
- 60 Zhao L, Li C, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Sens. Actuators B*, **2016**, 235: 575–582
- 61 Yang H, Li Z, Wei X, Huang R, Qi H, Gao Q, Li C, Zhang C. *Talanta*, **2013**, 111(13): 62–68
- 62 Pihikova D, Kasak P, Kubanikova P, Sokol R, Tkac J. *Anal. Chim. Acta*, **2016**, 934: 72–79
- 63 Silva M L S, Rangel M G H. *Sens. Actuators B*, **2017**, 252: 777–784
- 64 La Belle J T, Gerlach J Q, Svarovsky S, Joshi L. *Anal. Chem.*, **2007**, 79(18): 6959–6964
- 65 Sadik O A, Yan F. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 588(2): 292–296
- 66 Klukova L, Filip J, Belický S, Vikartovska A, Tkac J. *Analyst*, **2016**, 141(14): 4278–4282
- 67 Bertok T, Gemeiner P, Mikula M, Gemeiner P, Tkac J. *Microchim. Acta*, **2013**, 180(1-2): 151–159
- 68 Hu Y, Zuo P, Ye B. *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, 43(1): 79–83
- 69 Vasapollop G, Del Sole R, Mergola L, Lazzoi M R, Scardino A, Scorrano S, Mele G. *Int. J. Mol. Sci.*, **2011**, 12(9): 5908–5945
- 70 Li L, Lu Y, Bie Z J, Chen H Y, Liu Z. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 129(11): 2871
- 71 Xing R R, Wang S S, Bie Z J, He H, Liu Z. *Nat. Protoc.*, **2017**, 12(5): 964–987
- 72 Pinho S S, Reis C A. *Nat. Rev. Cancer*, **2015**, 15(9): 540–555

- 73 Li J, Ma X, Li M, Zhang Y. *Biosens. Bioelectron.*, **2018**, 99: 438–442
- 74 Zhang Y, Wang F, Qian S, Liu Z, Wang Q, Gu Y, Wu Z, Jing Z, Sun C, Peng W. *Sensors*, **2017**, 17(10): E2259
- 75 Chen Y L, Liu H P, Ding L, Ju H X. *Anal. Chem.*, **2018**, 90(5): 3073–3078
- 76 Geuijen K P M, Halim L A, Schellekens H, Schasfoort R B, Wijffels R H, Eppink M H. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(16): 8115–8122
- 77 Angeloni S, Ridet J L, Kusy N, Gao H, Crevoisier F, Guinchard S, Kochhar S, Sigrist H, Sprenger N. *Glycobiology*, **2005**, 15(1): 31–41
- 78 Ye J, Chen Y, Liu Z. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53(39): 10386–10389
- 79 Tu X Y, Muhammad P, Liu J, Ma Y Y, Wang S S, Yin D Y, Liu Z. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(24): 12363–12370
- 80 Muhammad P, Tu X Y, Liu J, Wang Y J, Liu Z. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, 9(13): 12082–12091
- 81 Liu J, Yin D Y, Wang S S, Chen H Y, Liu Z. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55(42): 13215–13218
- 82 Bleher O, Schindler A, Yin M, Holmes A B, Lupp P B, Gauglitz G, Proll G. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, 406(14): 3305–3314
- 83 Jiang T, Tan H, Sun Y, Wang J, Hang Y, Lu N, Yang J, Qu X, Hua J. *Sens. Actuators B*, **2018**, 261: 115–126
- 84 Pei Z C, Larsson R, Aastrup T, Anderson H, Lehn J M, Ramstrom O. *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, 22(1): 42–48
- 85 Zhang X, Zou Y, An C, Ying K, Chen X, Wang P. *Sens. Actuators B*, **2015**, 217(10): 100–106
- 86 Coulibaly F S, Youan B B C. *Biosens. Bioelectron.*, **2014**, 59: 404–411
- 87 Yakovleva M E, Safina G R, Danielsson B. *Anal. Chim. Acta*, **2010**, 668(1): 80–85
- 88 Lu C, Zhang Y, Tang S, Fang Z, Yang H, Chen X, Chen G. *Biosens. Bioelectron.*, **2012**, 31(1): 439–444
- 89 Zhou B, Hao Y, Long D, Yang P. *Biosens. Bioelectron.*, **2018**, 111: 90–96
- 90 Chen J C, Sadhasivam S, Lin F H. *Process. Biochem.*, **2011**, 46(2): 543–550

Research and Application of Glycoprotein Sensors Based on Glycosyl Recognition

LIANG Jun-Yu, TONG Pei-Hong, LI Jian-Ping*

(College of Chemical and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guangxi Key Laboratory of Electrochemical and Magnetochemical Function Materials, Guilin 541004, China)

Abstract Glycoprotein is a binding protein whose structure is mainly determined by the content of sugars and proteins and the peptide bonds to which it binds. The glycoproteins can be mainly classified into lectin, hormone, enzyme and immunoglobulin according to the clinical role in the medical field. Glycoproteins have a variety of biological functions and are of great significance in the medical and biological fields. To study the biological information related to glycoproteins, it is necessary to establish a highly sensitive and efficient analytical detection method for glycoproteins. The assay of glycoproteins includes separation and purification method, structural analysis, and content determination. The commonly used methods for determination of glycoproteins are mass spectrometry, chromatography-mass spectrometry, surface excimer resonance, enzyme-linked immunosorbent assay, etc. In recent years, in the detection of glycoproteins, the research and application of sensors have gradually increased. This paper briefly summarized the analysis methods of glycoproteins and reviewed the research and application of glycoprotein biosensors based on glycosyl recognition. The glycoprotein biosensors including electrochemical sensors, optical sensors and mass sensors were introduced in detail. The future development direction of glycoprotein sensors was prospected.

Keywords Glycoprotein; Glycosyl; Sensors; Review

(Received 8 May 2019; accepted 18 June 2019)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21765006) and the Natural Science Foundation of Guangxi, China (No. 2015GXNSFFA139005).