

基于质谱的N-糖蛋白分析进展

田志新^{*}

(同济大学化学科学与工程学院,上海 200092)

摘要 N-连接糖基化是蛋白质上常见的翻译后修饰,在修饰位点上具有跟其他小分子修饰(如甲基化、乙酰化、磷酸化)同样的宏观不均一性,也就是蛋白质氨基酸序列上具有多个潜在的修饰位点。但相对于小分子修饰单一的结构,N-糖基化修饰具有来自不同单糖组成,序列结构、链接结构、异头异构,立体构象等多个结构维度的数以万计的结构。这使得N-糖基化在修饰位点上具有额外的微观不均一性,也就是说同一个N-糖基化位点可以以一定的化学计量比修饰不同的糖链。N-糖基化修饰以位点和结构特异的方式调控N-糖蛋白的结构和功能,疾病条件下差异表达的N-糖基化需通过位点和结构特异的定量分析来表征。本文主要介绍最新发展水平的基于质谱的位点和结构特异定量N-糖蛋白组学及在生物医学中的应用。

关键词 N-糖蛋白;糖基化位点;糖链结构;定性;定量

中图分类号 R593 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2023)06-0662-12

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.2023062701

引用本文 田志新. 基于质谱的N-糖蛋白分析进展[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(6): 662–673.

Cite this article as: TIAN Zhixin. Progresses of mass spectrometry-based analysis of N-glycoproteins [J]. J China Pharm Univ, 2023, 54(6): 662–673.

Progresses of mass spectrometry-based analysis of N-glycoproteins

TIAN Zhixin^{*}

School of Chemical Science and Engineering, TongJi University, Shanghai 200092, China

Abstract N-linked glycosylation is a common post-translational modification on proteins, which exhibits the same macro-heterogeneity of modification site as other small molecule modifications (such as methylation, acetylation, phosphorylation), i. e., the amino acid sequence of a protein has multiple putative modification sites. However, compared to small molecule modifications with single structures, N-glycosylation modification have tens of thousands of structures from multiple structural dimensions such as different monosaccharide compositions, sequence structures, linking structures, isomerism, and three-dimensional conformation. This results in additional micro-heterogeneity of modification site of N-glycosylation, i. e., the same N-glycosylation site can be modified with different glycans with a certain stoichiometric ratio. N-glycosylation modification regulates the structure and function of N-glycoproteins in a site- and structure-specific manner, and differential expression of N-glycosylation under disease conditions needs to be characterized through site- and structure-specific quantitative analysis. This article mainly introduces the latest development of mass spectrometry-based site- and structure-specific quantitative N-glycoproteomics and its applications in biomedical fields.

Key words N-glycoprotein; glycosylation sites; glycan structure; qualitative; quantitative

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 22074105, No. 21775110, No. 21575104).

N-连接糖基化(简称N-糖基化)是蛋白质上常见的翻译后修饰。在修饰位点方面,N-糖基化修饰在N-X-S/T/C(X ≠ P)序列子上,人体蛋白质组中具有至少一个序列子,也就是说潜在的N-糖蛋白

收稿日期 2023-10-31 *通信作者 E-mail:zhixintian@tongji.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 22074105, No. 21775110, No. 21575104)

占 78.8%;一个蛋白质的氨基酸序列上,一般具有多个序列子,这些序列子可以修饰一个或多个 N-糖基化的组合;这是 N-糖基化修饰位点的宏观不均一性,跟其他小分子(如甲基化、乙酰化、磷酸化)相同。在修饰结构方面,与小分子修饰仅仅具有单一结构不同,糖基化修饰具有数以万计的结构,包含单糖组成,序列结构、链接结构、异头异构,立体构象等多个结构维度;N-糖基化修饰也因此具有独特的微观不均一性,同一个 N-糖基化位点通常按一定的化学计量比修饰不同的糖链。N-糖基化修饰以位点和结构特异的方式调控 N-糖蛋白的结构和功能。突变 PD-1 第 71 号 N-糖基化位点(N71)可以减少其对 CAR-T 细胞的抑制,从而提高 CAR-T 的细胞毒性和免疫治疗的疗效^[1]。PD-1 上第 58 号 N-糖基化位点(N58)上的 N-糖基化是 PD-1 和 PD-L1 结合所必需的^[2]。带特定糖链结构和核心岩藻糖(YY(F)M(MYLS)MYLS, Y 为 N-乙酰葡萄糖胺, M 为甘露糖, L 为半乳糖, F 为岩藻糖, S 为唾液酸)的甲胎蛋白(AFP)糖基化变体(AFP-L3)较全部 AFP 蛋白在肝癌早期诊断中具有更高的敏感度^[3]。N-连接糖外侧的岩藻糖与病毒感染^[4]、肠道微生物^[5]、肠道共生菌^[6]等密切相关;N-连接糖外侧的唾液酸则与抗炎^[7]、过敏^[8]及肠道微生物^[9]密切相关。Fc 段带 α2,6 唾液酸的 IgG 在关节炎治疗中具有抗炎活性,而对应的 α2,3 变体则没有。疾病条件下的 N-糖基化需通过位点和结构特异的定量分析来表征。

随着材料制备、高效液相色谱分离、高效串级质谱分析、智能化生物信息学等技术的快速发展和广泛应用,基于质谱的组学技术已被深入用于正常生理和异常病理条件下蛋白质 N-糖基化的位点和结构特异定性定量分析。在分子水平上,借助仅使用外切糖苷酶(如 PNGase F),仅使用蛋白质水解酶(如胰蛋白酶),同时使用上述两种酶和不使用任何酶,N-糖基化可以在 N-连接糖^[10-15]、完整 N-糖肽^[16-33]、含 N-糖基化位点多肽^[12]、完整 N-糖蛋白^[34]等 4 个层次上进行分析(图 1-A)。

在 N-连接糖分子水平上的 N-糖基化分析,Xiao 等^[14], Human Glycome Project^[35], 以及 Mechref 等^[36]先后进行了一般性全面综述报道。在完整 N-糖肽分子水平上的 N-糖基化分析,Luo 等^[37]在富集,Reiding 等^[38]在串级质谱解离,DelaField 等^[39]在

定量,Polasky 等^[40]在生物信息学等方面进行了具体的综述;Kolarich 等^[41]、Scott 等^[42]、Thaysen-Andersen 等^[43]则进行了一般性的全面综述。

本文主要介绍本课题组基于选择性化学衍生的唾液酸链接结构鉴定^[26]、基于亲水分离的唾液酸链接异构和岩藻糖位置异构的鉴定、基于同位素质荷比及轮廓指纹比对原位质谱解析算法^[44-46]、基于位点决定性碎片离子的 N-糖基化位点定位^[47]、基于结构诊断离子的 N-连接糖序列结构的鉴定、基于特征碎片离子的特定序列和链接结构(如核心岩藻糖、平分型结构、唾液酸链接异构)的验证、基于两重同位素^[25]和多重等重^[26]标记的定量等技术所发展的位点和结构特异定量 N-糖蛋白质组学;同时介绍在癌症细胞模型(癌细胞^[20, 29]、癌症干细胞^[27]、耐药癌细胞^[18, 21, 23-24, 31])、癌症临床成对癌和癌旁组织、癌症血清^[48]、人体体液(尿液^[28])、大分子药物(新冠重组疫苗^[33]、单克隆抗体^[32])等体系中(差异表达)N-糖基化的分析。

1 基于质谱的 N-糖蛋白分析新技术新方法进展

1.1 基于选择性化学衍生的唾液酸链接结构鉴定

烷基酰胺化是唾液酸 α2,3 和 α2,6 链接特异衍生的常见化学反应(图 1-B)。α2,3 链接选择性与甲胺反应,质量上增加 13 D;而 α2,6 链接选择性与异丙胺反应,质量上增加 41 D。在结合多重 TMT 标记的临床肺癌组织(相对于癌旁组织)差异表达唾液酸化的比较 N-糖蛋白质组学研究中,田等^[26]鉴定出 307 个具有链接特异性的唾液酸化完整 N-糖肽,对应于 84 个 N-连接糖、232 个 N-糖基化位点、229 个多肽骨架和 221 个完整 N-糖蛋白;以倍数变化 ≥ 1.5 和 $P < 0.05$ 为标准,共定量到 84 个链接特异唾液酸化完整 N-糖肽,其中 29 个含有 α2,6 链接,55 个含有 α2,3 链接。例如,来自葡萄糖-6-磷酸异构酶(P06744, G6PI_HUMAN)N-糖基化位点 N105 的双 α2,6-链接唾液酸化,变化倍数为 1.92;来自酪氨酸蛋白激酶(Q9H792, PEAK1_HUMAN)N-糖基化位点 N677 的双 α2,3-链接唾液酸化,其倍数变化为 0.83(图 2)。

1.2 基于亲水分离的唾液酸链接异构和岩藻糖位置异构的鉴定

亲水作用色谱对唾液酸链接异构和岩藻糖位

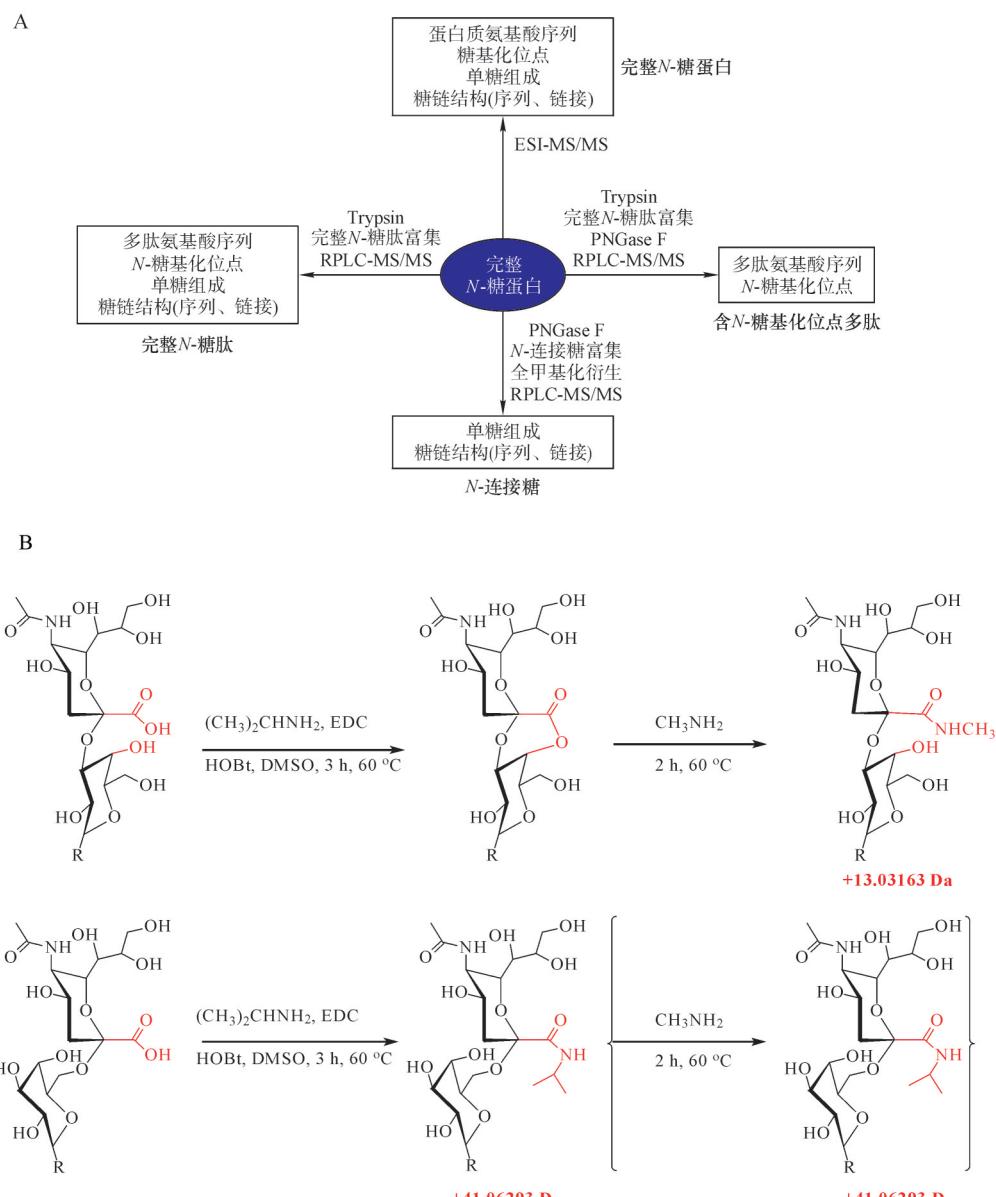


图1 蛋白质N-糖基化质谱分析的分子水平及唾液酸链接特异化学衍生反应策略

A:基于质谱的N-糖蛋白的分析的3个分子层次;B:基于烷基酰胺化的唾液酸链接特异衍生

置(序列)异构体具有非常高的分离分辨,在完整N-糖肽分子水平上可以达到基线分离。在基于penta-HILIC-MS/MS在线分离分析的HepG2中差异表达N-糖基化的研究中,来自三肽基肽酶I(O14773,TPP1_HUMAN)的完整N-糖肽FLSSPHLPSSYF-NASGR_N3H4F0S1的 α 2,3链接异构体O1Y41Y41M(31M)61M61Y41L32S在HepG2细胞(相对于LO2细胞)中上调(6.2 ± 1.2);而具有相同单糖组成和序列结构的 α 2,6链接异构体O1Y41Y41M(31 M)61M61Y41L62S下调(0.3 ± 0.1)(图3)^[20]。来自整

合素a3(P26006, ITA3_HUMAN)的完整N-糖肽MNITVK_N4H5F1S2的岩藻糖支链异构体O1Y41Y41M(31M21Y(31F) 41L32S)61M61Y41L32S在HepG2中下调(0.4 ± 0.1),而对应的核心异构体O1Y(61F)41Y41M(31M41Y41L2S)61M41Y41L32S上调(1.5 ± 0.1)(图4)。

1.3 基于同位素质荷比及轮廓指纹比对原位质谱解析算法

基于电子轰击和化学电离的无机及有机质谱中,分子离子峰一般是1价(由电离方式决定,无论

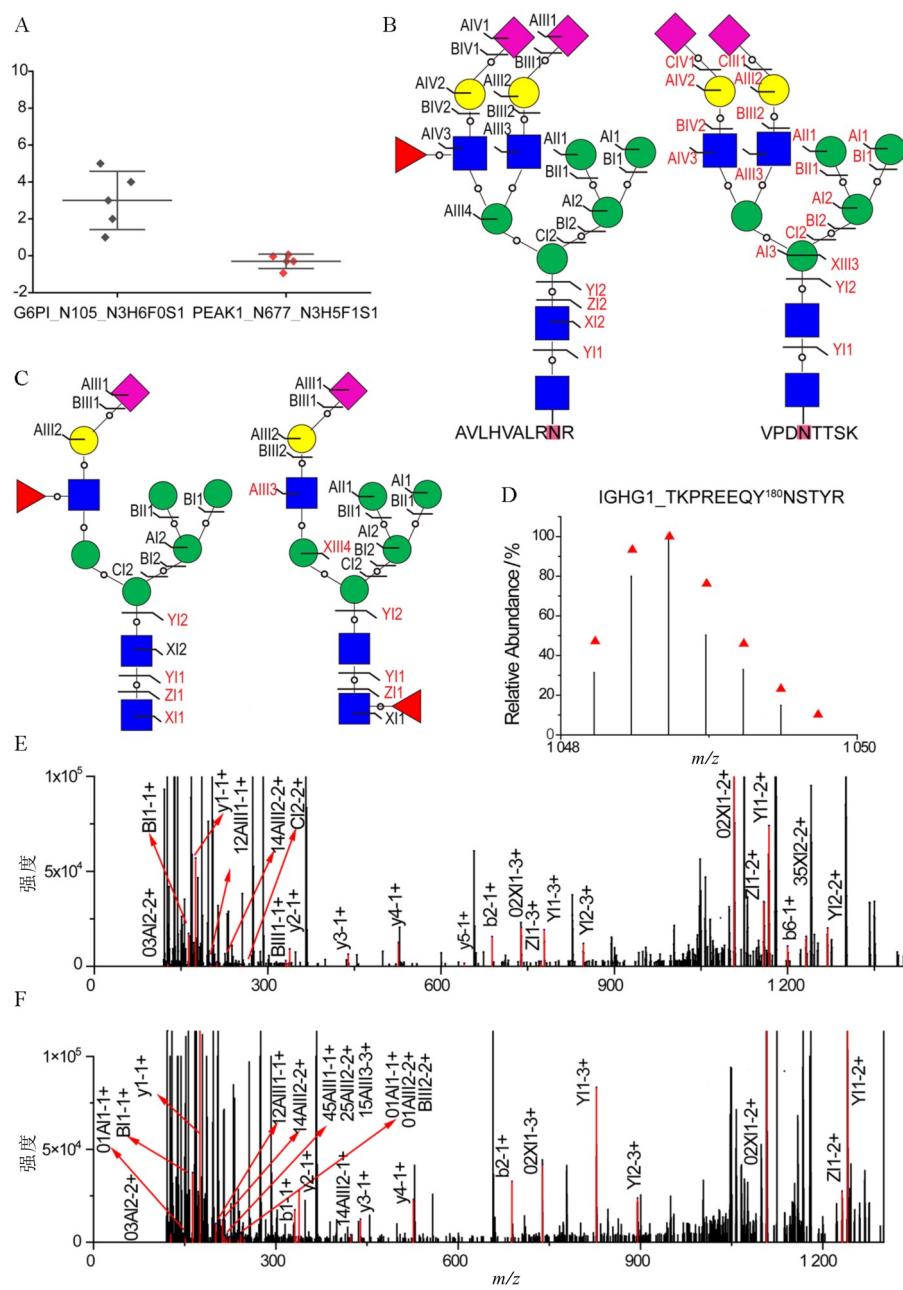


图2 通过唾液酸链接特异衍生鉴定的完整N-糖肽^[26]

A、B:条形图和具有N4H7F1S2单糖组成的上调的完整N-糖肽AVLHVALRNR的N-连接糖部分的图形解离图,其包含来自葡萄糖-6-磷酸异构酶(N105,P06744,G6PI_HUMAN)的双 α 2,6-链接唾液酸化,其倍数变化为1.92,并且完整N-糖肽VPDNTTSK_N4H7F0S2包含来自非活性的双 α 2,3-链接唾液酸化酪氨酸蛋白激酶(N677,Q9H792,PEAK1_HUMAN),其倍数变化为0.83;C:N-连接糖部分的图形解离图;D:前体离子的同位素包络指纹图谱;E、F:完整N-糖肽TKPREEQYNSTYR_N3H6F1S1的匹配碎片离子注释MS/MS谱图,其连接糖链接为01Y41Y41M(31M21Y(31F)41L31S)61M(31M)61M

正、负离子)且其同位素轮廓最左侧单同位素峰理论强度往往是最高的(由分子大小决定,随着分子增大,强度逐渐降低;直至8 000 D左右完全消失,此时整个轮廓呈高斯对称状)。此时单同位素峰的质荷比实验值可以准确用于分子的定性鉴定。基于电喷雾电离的生物质谱中,分子离子峰一般

是多价且其同位素轮廓最左侧的同位素峰因强度较低，在实验上往往观察不到，也就是不能被直接测量到。传统解析算法通常使用模型分子（如平均氨基酸）对实验轮廓进行拟合来获得实验上没有被观察到的单同位素峰及其质荷比，但很难处理重叠数据、非理想数据以及相对分子质量超过

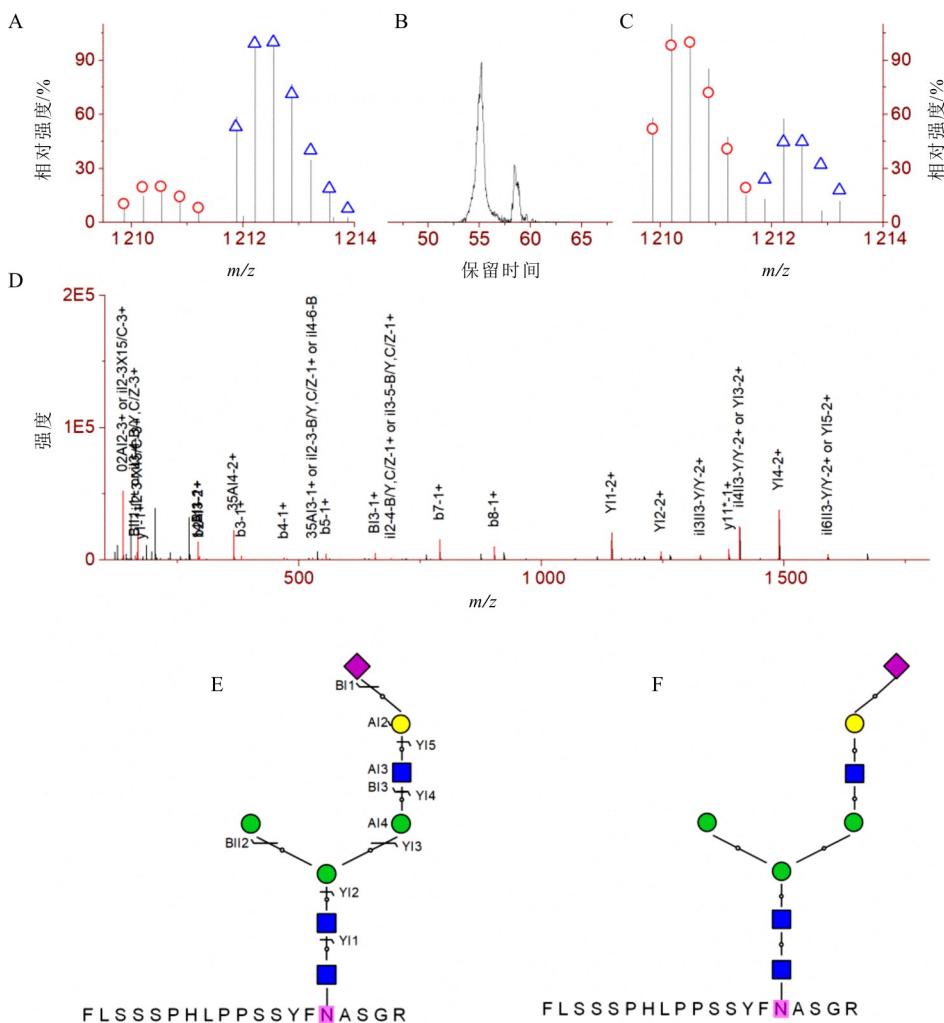


图3 具有相同单糖组成N3H4F0S1和序列结构的完整N-糖肽FLSSPHLPSSYFNASGR(O14773,TPP1_HUMAN)的唾液酸链接特异的差异表达;在HepG2与LO2中,01Y41Y41M(31M)61M61Y41L32S(A,B中的左LC峰)的上调(6.2 ± 1.2)与01Y41Y41M(31 M)61M61Y41L62S(C,B中的下调(0.3 ± 0.1)^[20]

A、C:来自轻标记L02(左,圆圈)和重标记HepG2的前体离子的成对同位素包络;B:重标记前体离子的提取离子色谱图(m/z 1 212.55);D、E:(A)中重标记异构体的HCD的注释的MS/MS光谱和图形碎片图;F:绘制以作为比较视觉指南

10 kD的分子。Li等^[44]发明了同位素质荷比及轮廓指纹比对(isotopic mass-to-charge ratio and envelope fingerprinting, iMEF)原位解析算法,通过整个实验和理论轮廓的比对来解析质谱图中离子(图5-A),包括一级质谱中的前体离子和多级质谱中的碎片离子。通过要求同位素峰强度阈值(IPA-CO, isotopic peak abundance cutoff)以上的每个理论同位素峰在实验同位素轮廓中被观察到,且同位素峰质荷比偏差(IPMD, isotopic peak m/z deviation)和同位素峰强度偏差(IPAD, isotopic peak abundance deviation)须满足设定的阈值,全面严格控制实验同位素轮廓的质量,从而从源头上控制

相应分子鉴定的准确度。同位素轮廓指纹比对算法的另外一个优势是重叠同位素轮廓数据的有效解析(图 5-B),从而将质谱图信号利用得最大化,解析出最多的离子,在二级质谱中将鉴定、修饰位点定位和修饰结构的鉴定最大化。

1.4 基于位点决定性碎片离子的N-糖基化位点定位

同一个多肽或蛋白质氨基酸序列上往往具有多个潜在的N-糖基化位点。考虑到脆弱修饰(如磷酸化、糖基化等)在串级质谱中存在较大比率中性丢失的情况,Shen等^[28]发展了基于包含修饰(残基或完整分子)的位点决定性碎片离子对的定位

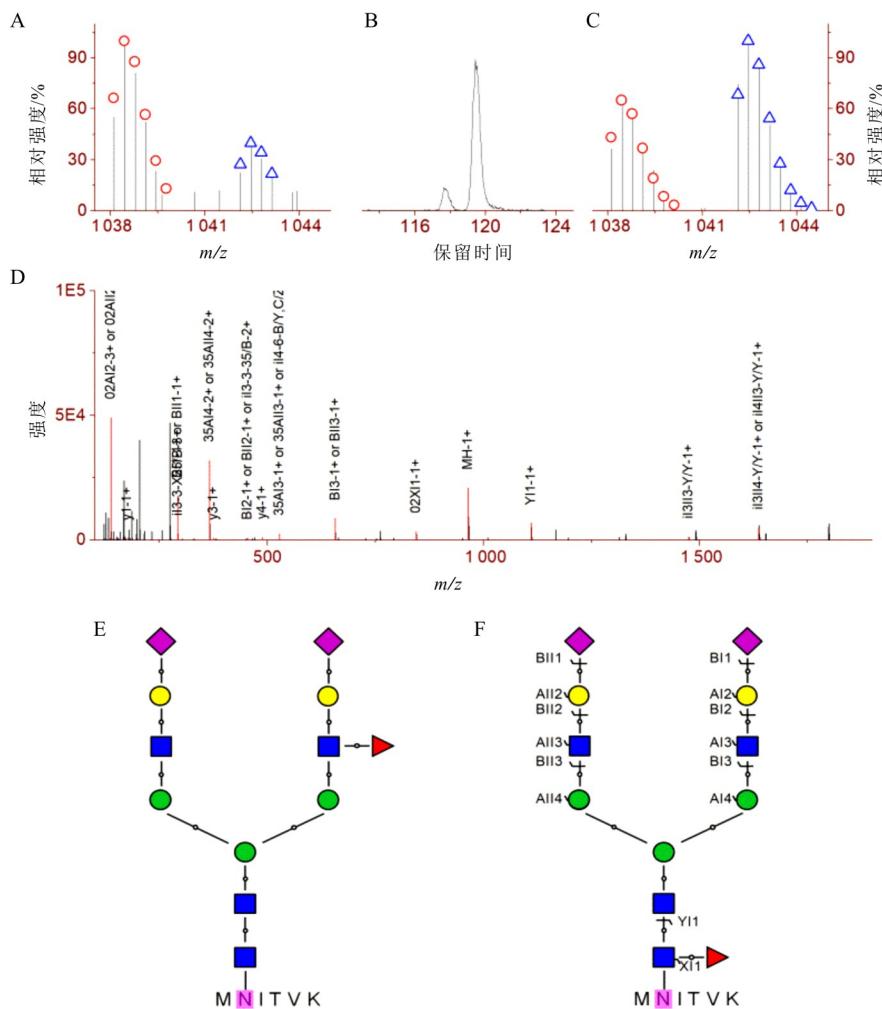


图 4 来自整合素 $\alpha 3$ (P26006, ITA3_HUMAN) 的完整 *N*-糖肽 MNITVK_N4H5F1S2 的岩藻糖序列/位置异构体特异差异表达。在 HepG2 与 LO2 中, 支链异构体 01Y41Y41M(31M21Y(31F)41L32S)61M61Y41L32S(a, 左侧 LC 峰值在 B 中)的下调 (0.4 ± 0.1) 与核心异构体 01Y(61F)41Y41M(31M41Y41L2S)61M61g41L32S 的上调 (1.5 ± 0.1) (C, 右侧 LC 峰值在 B 中)^[20]

A、C: 来自轻标记 LO2 (左, 圆圈) 和重标记 HepG2 的前体离子的成对同位素包络; B: 轻标前体离子的提取离子色谱图 (m/z 1 038.44); D、F: (C) 中来自轻标异构体的 HCD 的注释的 MS/MS 色谱和图形碎片图; E: 绘制以作为比较视觉指南

方法, 利用直接的实验证据对修饰进行准确定位 (图 6-A)。利用该定位策略的磷酸化定位工具 P-bracket 在对包含 101 520 个合成磷酸肽 (位点已知) 的 96 个 LC-MS/MS 数据组中, 错误定位率为 0.9%^[45]。在 *N*-糖基化的定位中, 基于包含 *N*-乙酰葡萄糖胺残基的位点决定性 b/y 离子对 (由高能碰撞诱导解离产生) 和或包含完整 *N*-连接糖分子的位点决定性 c/z 离子对 (由基于电子的解离方式产生, 图 6-B) 对 *N*-糖基化修饰位点进行准确定位。

1.5 基于结构诊断离子的 *N*-连接糖序列结构的鉴定

同一个单糖组成一般对应数 10 个序列结构, 除了谱图水平上常规基于靶向-诱饵数据库搜索的

假阳性控制, 不同序列结构可以由特征序列结构诊断碎片离子进行区分和确认。Xiao 等^[20]定义了 Glycoform score (简称为 G Score), 其定义为能独立区分相同分子组成 (分子式, 包括相同单糖组成) 的不同序列结构的结构诊断碎片离子的数量^[11, 20]。单糖组成为 N4H5F1S2 的 *N*-连接糖的岩藻糖支链位置异构体和核心位置异构体在高能碰撞诱导解离中分别得到了 4 个 ($^{3,5}\text{AI}4\text{-}1+$ 、 $\text{YI}3\text{-}2+$ 、 $\text{YI}2\text{-}2+$ 、 $\text{YI}1\text{-}2+$) 和 3 个 ($\text{YI}1\text{-}1+$ 、 $\text{ZI}4\text{-}2+$ 、 $\text{YI}3\text{-}2+$) 结构诊断碎片离子的相互区分和鉴定 (图 7-A ~ 7-D)。

1.6 基于特征碎片离子的特定序列和链接结构的验证

半分型结构、核心岩藻糖等特征序列结构可

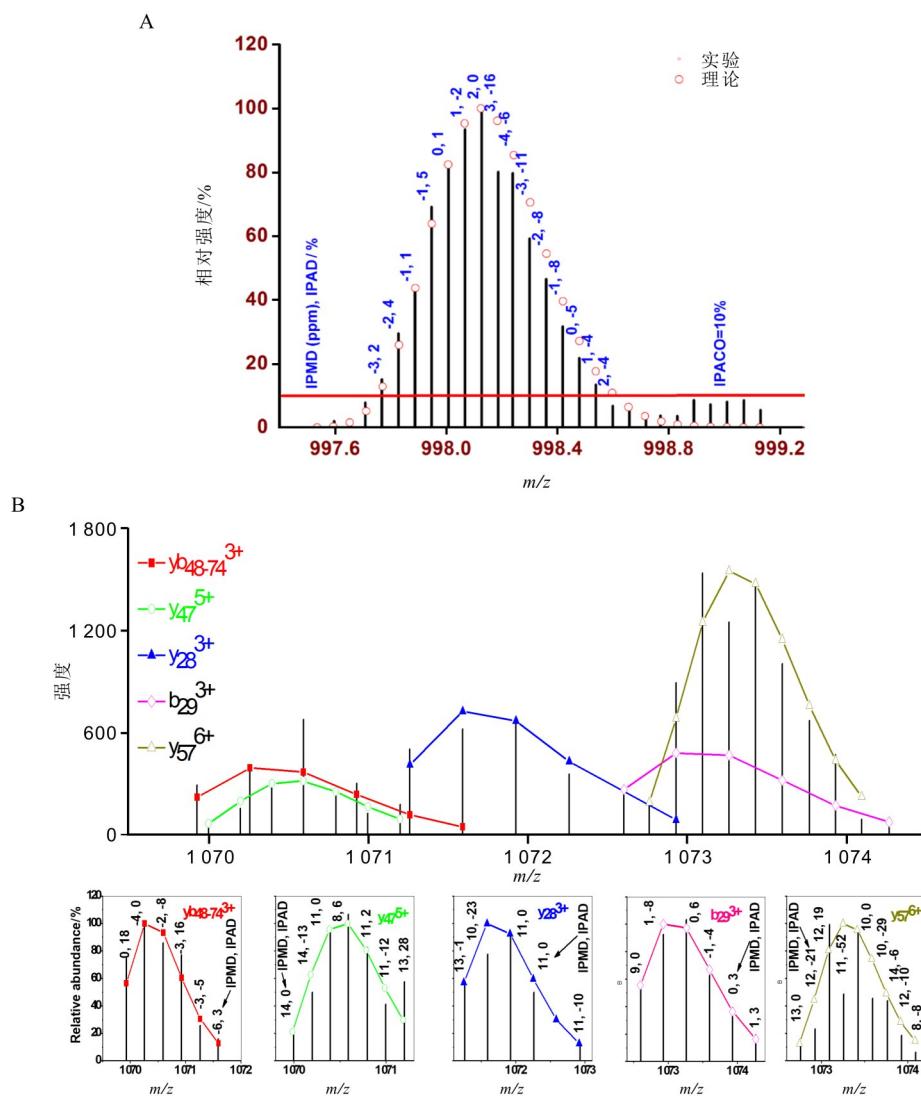


图5 基于同位素轮廓指纹比对的原始质谱图及重叠数据的解析

A: 同位素轮廓指纹比对(圆圈:理论轮廓;竖线:实验轮廓);B:基于同位素轮廓指纹比对的重叠数据的解析

以通过对应的特征单糖序列进行靶向验证。平分型结构特征单糖序列为N-N-H-N或N(F)-N-H-N(如果含有核心岩藻糖)。如在单糖组成为N5H9F3S1的完整N-糖肽(图7-E)的N-连接糖部分结构的鉴定中,观察到了N-N-H-N对应的+2价碎片离子;从而实现了该平分型结构的验证。

1.7 基于同位素两重标记的相对定量

完整N-糖肽分子水平上的N-糖基化的定量可以采用鸟枪法蛋白质组学常用的N端及赖氨酸残基上氨基的还原烷基化来实现,包括适用于成对样本的同位素标记(如二甲基化、二乙基化)和大队列样本的等重标记(如iTRAQ、TMT)。Wang等^[25]发展的稳定同位素二乙基标记获得了高达50

倍的动态范围(图8-A),随后在癌症、癌症干细胞、耐药癌细胞等体系中差异表达N-糖基化分析中得到了广泛应用。

2 基于质谱的N-糖蛋白分析应用进展

2.1 在潜在N-糖蛋白质标志物位点和结构特异发现中的应用

上述位点和结构特异定量N-糖蛋白质组学方法已被应用于基于细胞模型和临床样本(血清、成对癌和癌旁组织、尿液)的癌症、癌症干细胞、癌症耐药等体系中差异表达N-糖基化的分析,观察到了疾病条件下位点和结构特异的异常N-糖基化变化。另外,还观察到了N-连接糖尺寸依赖的差异

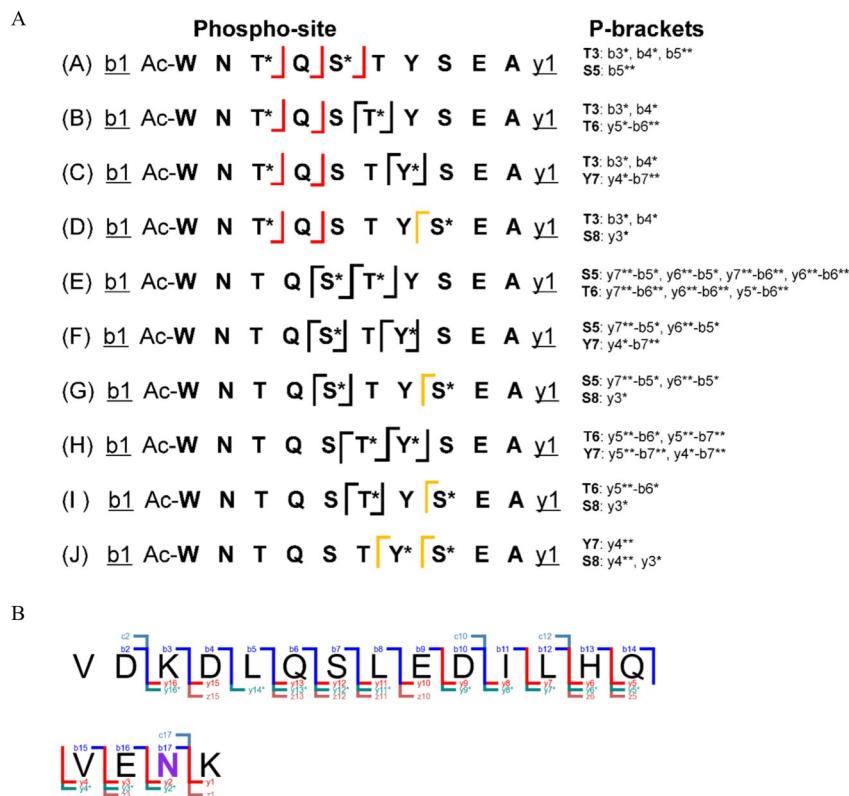


图6 基于位点决定性碎片离子的翻译后修饰的定位

A: 基于包含磷酸基团的位点决定性碎片离子对的磷酸化修饰定位^[45]; B: 在完整N-糖肽分子水平上, 基于包含N-乙酰葡萄糖胺残基的位点决定性b/y离子对(由高能碰撞诱导解离产生)和或包含完整N-连接糖分子的位点决定性c/z离子对(由基于电子的解离方式产生)的N-糖基化修饰定位

表达, 如在 MCF7/ADR CSCs(相对于 MCF7/ADR)中观察到了甘露糖尺寸依赖的由上调, 到趋于平缓, 到下调的联系变化(图8-B)^[24]。

2.2 在N-糖蛋白生物药位点和结构特异表征中的应用

除了临床复杂样本, 上述位点和结构特异N-糖蛋白质组学方法也被广泛应用于单个N-糖蛋白N-糖基化宏观和微观不均一性的鉴定; 同一个糖链可以修饰在不同的糖基化位点, 且同一个单糖组成往往对应多个序列结构。如新冠病毒重组S蛋白受体结合区域共有3个N-糖基化位点, N331, N334和N343^[33]; 分别鉴定到了12个、17个和19个糖链结构(图8-C); 其中包含3组序列异构体(图中虚线框中的结构)。

3 结论与展望

基于质谱的最新发展水平的位点和结构特异定量N-糖蛋白质组学目前已经成为蛋白质N-糖基化修饰定性定量分析的首选方法。相对于N-连接糖和完整N-糖蛋白分子, 在完整N-糖肽分子水平上, 当前高效液相色谱对完整N-糖肽复杂混合物具有较高的分离分辨和峰容量, 保证了整体定性定量分析的深度。借助多肽骨架的同位素标记和等重多重标记, 可以实现少量样本(如成对样本)和大队列样本的相对定量, 实现疾病条件下差异表达的N-糖基化在完整N-糖肽水平上的位点和结构特异的准确定量。在生物信息学数据解析方面, 相对于基于质量比对的传统方法, 同位素轮廓指纹比对搜索算法能够准确识别一级质谱的前体离子和二级质谱中的碎片离子; 同时能对重叠数据进行高效解析, 匹配实验碎片离子解析的最大化直接提高氨基酸和单糖序列结构和N-糖基化位点鉴定的准确度。基于包含部分(如完整N-糖肽上N-糖基化部分在高能碰撞诱导解离下留在多肽骨架上的单个N-乙酰葡萄糖胺单糖)和或完整(如基于电子的解离中N-连接糖部分保持完整)糖基化

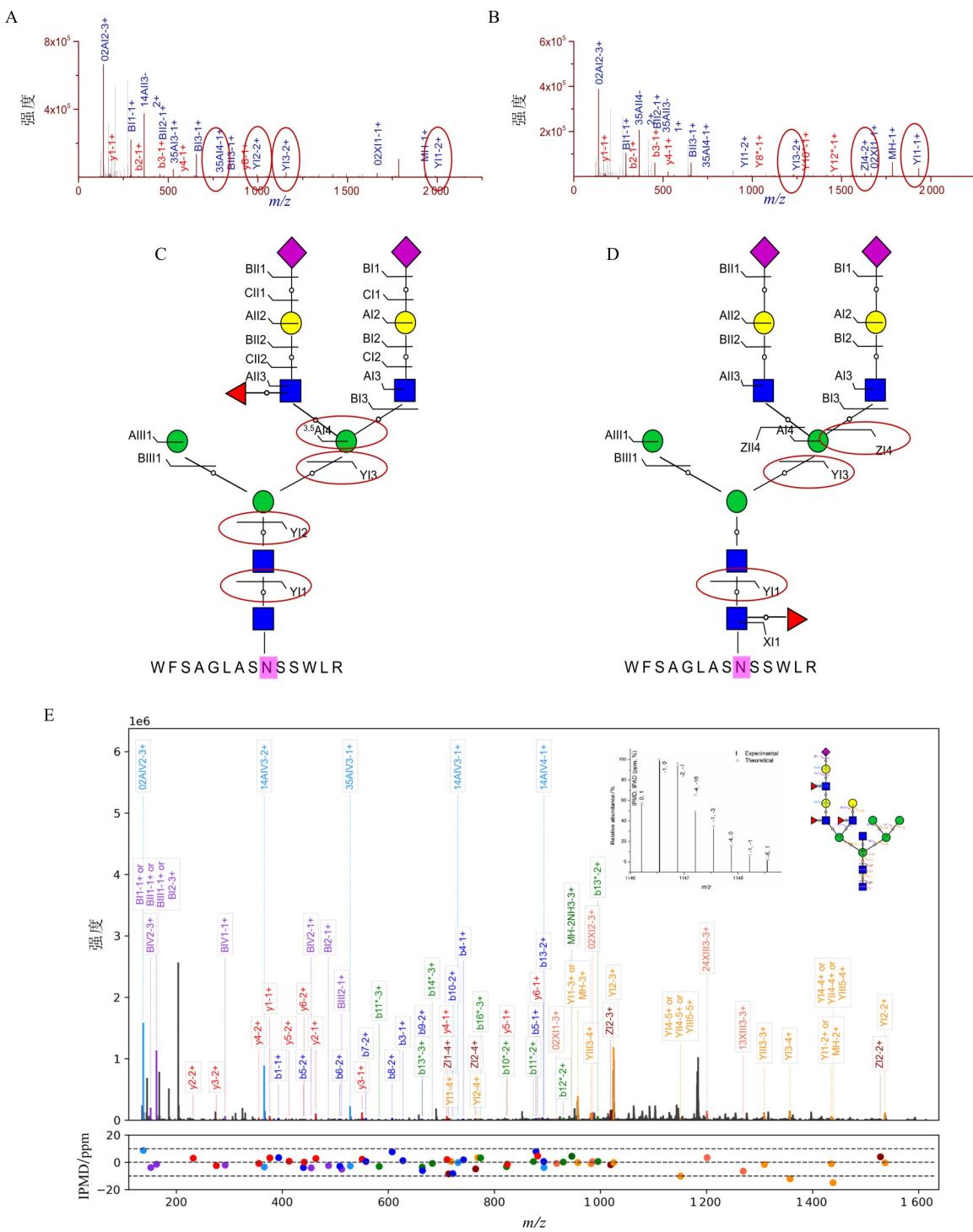


图7 基于结构诊断碎片离子的岩藻糖支链和核心序列异构体的区分

A、C:注释二级质谱图;B、D:图形解离图,本图改编自文献[28];E:含多肽骨架及N-连接糖部分匹配碎片离子的注释二级质谱图,左内插图为实验观察到的特征单糖序列N-N-H-N对应的+2价碎片离子,右内插图为N-连接糖部分的图形解离图

修饰的位点决定性碎片离子，也就是利用直接实验中观察到的直接证据，实现N-糖基化位点的准确定位；对于单糖序列结构，一个分子组成（包括同单糖组成）对应的多个潜在序列结构可以由序

列结构诊断和特征碎片离子进行明确区分和确认；对于唾液酸链接结构，链接特异化学衍生反应（如烷基酰胺化）、亲水色谱分离以及串级质谱特征都能进行有效区分和确认。位点和结构特异定

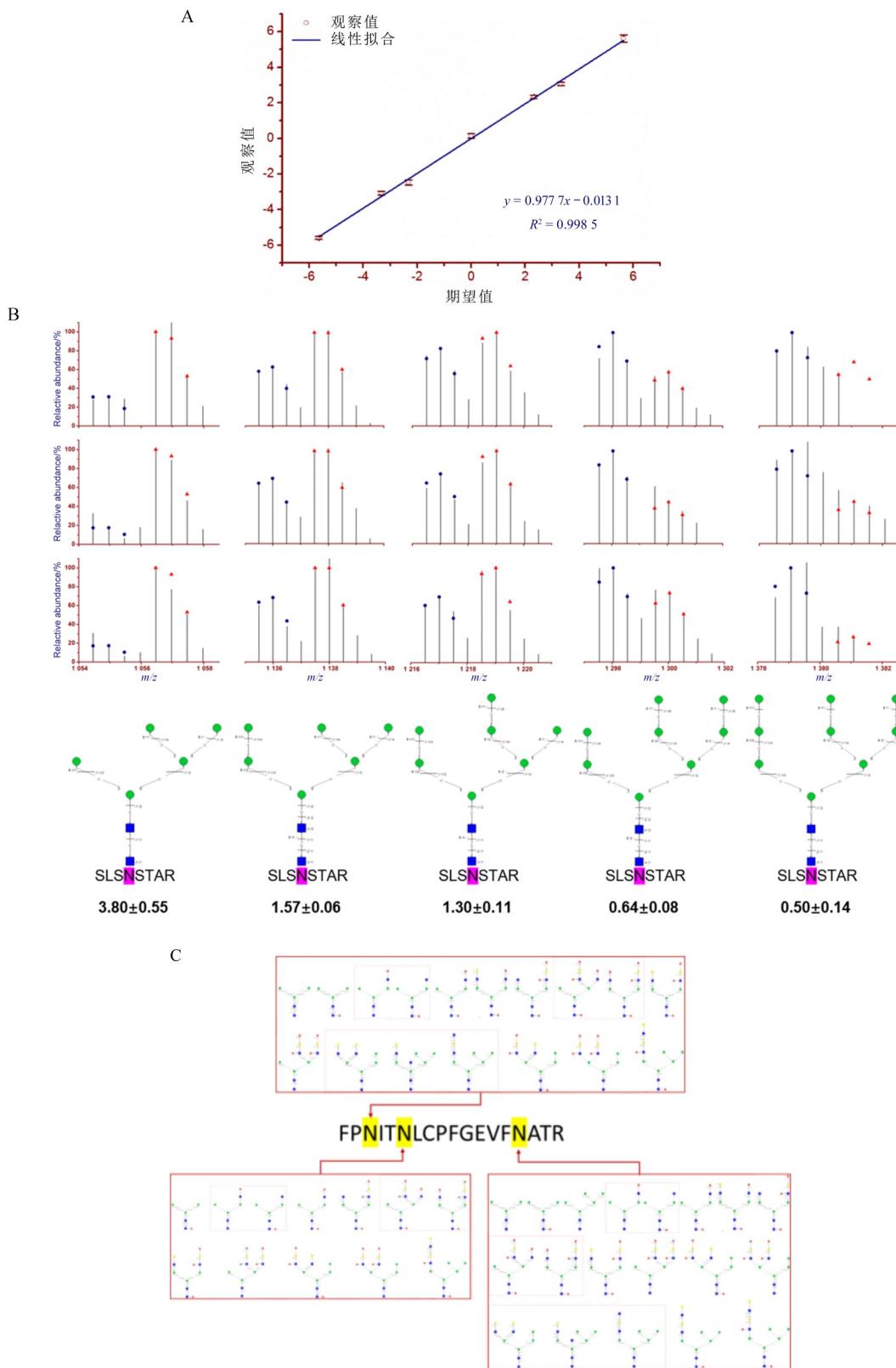


图 8 N-糖基化的位点和结构特异定量分析

A: 稳定同位素二乙基标记相对定量线性动态范围; B: 完整 N-糖肽系列 SLSNSTAR_N2HxF0S0 ($x = 5, 6, 7, 8, 9$; 从左到右) 的差异表达与高甘露糖 N-聚糖大小的连续变化, 从完整 N-糖蛋白 Serpin H1(P50454) 的 N-糖基 N120 鉴定出 3 个技术复制(从上到下), 本图取自文献[24]; C: 新冠病毒重组 S 蛋白受体结合区域位点和结构特异 N-糖基化

量N-糖蛋白质组学方法的推广正助力更高效N-糖蛋白相关早诊标志物、药物靶点及药物的研发及精准医学的发展。

References

- [1] Shi XJ, Zhang DQ, Li F, et al. Targeting glycosylation of PD-1 to enhance CAR-T cell cytotoxicity[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, **12**(1): 127.
- [2] Wang YN, Lee HH, Hsu JL, et al. The impact of PD-L1 N-linked glycosylation on cancer therapy and clinical diagnosis [J]. *J Biomed Sci*, 2020, **27**(1): 77.
- [3] Sato Y, Nakata K, Kato Y, et al. Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein [J]. *N Engl J Med*, 1993, **328**(25): 1802-1806.
- [4] Bournezos S, Vo HTM, Duong V, et al. Antibody fucosylation predicts disease severity in secondary dengue infection[J]. *Science*, 2021, **372**(6546): 1102-1105.
- [5] Pickard JM, Maurice CF, Kinnebrew MA, et al. Rapid fucosylation of intestinal epithelium sustains host-commensal symbiosis in sickness[J]. *Nature*, 2014, **514**(7524): 638-641.
- [6] Coyne MJ, Reinap B, Lee MM, et al. Human symbionts use a host-like pathway for surface fucosylation[J]. *Science*, 2005, **307**(5716): 1778-1781.
- [7] Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation[J]. *Science*, 2006, **313**(5787): 670-673.
- [8] Shade KT C, Conroy ME, Washburn N, et al. Sialylation of immunoglobulin E is a determinant of allergic pathogenicity[J]. *Nature*, 2020, **582**(7811): 265-270.
- [9] Yao YK, Kim G, Shafer S, et al. Mucus sialylation determines intestinal host-commensal homeostasis[J]. *Cell*, 2022, **185**(7): 1172-1188.e28.
- [10] Xiao KJ, Han YY, Tian ZX. Large-scale identification and visualization of human liver N-glycome enriched from LO2 cells[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, **410**(17): 4195-4202.
- [11] Xiao KJ, Wang Y, Shen Y, et al. Large-scale identification and visualization of N-glycans with primary structures using GlySeeker[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2018, **32**(2): 142-148.
- [12] Mun DG, Bhin J, Kim S, et al. Proteogenomic characterization of human early-onset gastric cancer[J]. *Cancer Cell*, 2019, **35**(1): 111-124.e10.
- [13] Shen Y, You YW, Xiao KJ, et al. Large-scale identification and fragmentation pathways analysis of N-glycans from mouse brain [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2019, **30**(7): 1254-1261.
- [14] Xiao KJ, Han YY, Yang HL, et al. Mass spectrometry-based qualitative and quantitative N-glycomics: an update of 2017-2018[J]. *Anal Chim Acta*, 2019, **1091**: 1-22.
- [15] Qin SS, Qin SD, Tian ZX. Progresses in mass spectrometry-based plant N-glycomics and N-glycoproteomics[J]. *Int J Mass Spectrom*, 2022, **481**: 116917.
- [16] Lu HR, Xiao KJ, Tian ZX. Benchmark of site- and structure-specific quantitative tissue N-glycoproteomics for discovery of potential N-glycoprotein markers: a case study of pancreatic cancer[J]. *Glycoconj J*, 2021, **38**(2): 213-231.
- [17] Qin SS, Qin SD, Tian ZX. Comprehensive site- and structure-specific characterization of N-glycosylation in model plant *Arabidopsis* using mass-spectrometry-based N-glycoproteomics[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2022, **1198**: 123234.
- [18] Qin SD, Tian ZX. Gain-of-glycosylation in breast multi-drug-resistant MCF-7 adenocarcinoma cells and cancer stem cells characterized by site- and structure-specific N-glycoproteomics [J]. *Anal Chim Acta*, 2023, **1252**: 341029.
- [19] Gong YQ, Qin SD, Dai LZ, et al. The glycosylation in SARS-CoV-2 and its receptor ACE2[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, **6**(1): 396.
- [20] Xiao KJ, Tian ZX. GPSeeker enables quantitative structural N-glycoproteomics for site- and structure-specific characterization of differentially expressed N-glycosylation in hepatocellular carcinoma[J]. *J Proteome Res*, 2019, **18**(7): 2885-2895.
- [21] Yang HL, Xu FF, Xiao KJ, et al. N-glycoproteomics study of putative N-glycoprotein biomarkers of drug resistance in MCF-7/ADR cells[J]. *Phenomics*, 2021, **1**(6): 269-284.
- [22] Wang Y, Tian ZX. New energy setup strategy for intact N-glycopeptides characterization using higher-energy collisional dissociation[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2020, **31**(3): 651-657.
- [23] Yang HL, Xu FF, Chen Y, et al. Putative N-glycoprotein markers of MCF-7/ADR cancer stem cells from N-glycoproteomics characterization of the whole cell lysate[J]. *Talanta*, 2021, **232**: 122437.
- [24] Wang Y, Xu FF, Chen Y, et al. A quantitative N-glycoproteomics study of cell-surface N-glycoprotein markers of MCF-7/ADR cancer stem cells[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, **412**(11): 2423-2432.
- [25] Wang Y, Xiao KJ, Tian ZX. Quantitative N-glycoproteomics using stable isotopic diethyl labeling[J]. *Talanta*, 2020, **219**: 121359.
- [26] Yang HL, Tian ZX. Sialic acid linkage-specific quantitative N-glycoproteomics using selective alkylamidation and multiplex TMT-labeling[J]. *Anal Chim Acta*, 2022, **1230**: 340391.
- [27] Wang Y, Xu FF, Xiao KJ, et al. Site- and structure-specific characterization of N-glycoprotein markers of MCF-7 cancer stem cells using isotopic-labelling quantitative N-glycoproteomics[J]. *Chem Commun*, 2019, **55**(55): 7934-7937.
- [28] Shen Y, Xiao KJ, Tian ZX. Site- and structure-specific characterization of the human urinary N-glycoproteome with site-determining and structure-diagnostic product ions[J]. *Rapid*

- Commun Mass Spectrom*, 2021, **35**(1): e8952.
- [29] Xue BB, Xiao KJ, Wang Y, et al. Site- and structure-specific quantitative *N*-glycoproteomics study of differential *N*-glycosylation in MCF-7 cancer cells[J]. *J Proteomics*, 2020, **212**: 103594.
- [30] Xiao KJ, Tian ZX. Site- and structure-specific quantitative *N*-glycoproteomics using RPLC-pentaHILIC separation and the intact *N*-glycopeptide search engine GPSeeker[J]. *Curr Protoc Protein Sci*, 2019, **97**(1): e94.
- [31] Yang HL, Xu FF, Chen Y, et al. Structural *N*-glycoproteomics characterization of cell-surface *N*-glycosylation of MCF-7/ADR cancer stem cells[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2023, **1219**: 123647.
- [32] Bi M, Bai B, Tian ZX. Structure-specific *N*-glycoproteomics characterization of NIST monoclonal antibody reference material 8671[J]. *J Proteome Res*, 2022, **21**(5): 1276-1284.
- [33] Yang JY, Wang W, Chen ZM, et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity[J]. *Nature*, 2020, **586**(7830): 572-577.
- [34] Li SS, Zhou Y, Xiao KJ, et al. Selective fragmentation of the *N*-glycan moiety and protein backbone of ribonuclease B on an Orbitrap Fusion Lumos Tribrid mass spectrometer[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2018, **32**(23): 2031-2039.
- [35] de Haan N, Pučić-Baković M, Novokmet M, et al. Developments and perspectives in high-throughput protein glycomics: enabling the analysis of thousands of samples[J]. *Glycobiology*, 2022, **32**(8): 651-663.
- [36] Donohoo KB, Wang JY, Goli M, et al. Advances in mass spectrometry-based glycomics-An update covering the period 2017-2021[J]. *Electrophoresis*, 2022, **43**(1/2): 119-142.
- [37] Luo YT, Wang BC, Yi LH, et al. Mesoporous materials for glycopeptide separation [J]. *Trends Anal Chem*, 2023, **167**: 117234.
- [38] Reiding KR, Bondt A, Franc V, et al. The benefits of hybrid fragmentation methods for glycoproteomics[J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2018, **108**: 260-268.
- [39] DelaField DG, Li LJ. Recent advances in analytical approaches for glycan and glycopeptide quantitation[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2021, **20**: 100054.
- [40] Polasky DA and Nesvizhskii AI. Recent advances in computational algorithms and software for large-scale glycoproteomics [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2023, **72**: 102238. doi:10.1016/j.cbpa.2022.102238.
- [41] Oliveira T, Thayesen-Andersen M, Packer NH, et al. The hitch-hiker's guide to glycoproteomics[J]. *Biochem Soc Trans*, 2021, **49**(4): 1643-1662.
- [42] Bagdonaitė I, Malaker SA, Polasky DA, et al. Glycoproteomics [J]. *Nat Rev Method Prime*, 2022, **2**(1): 1-29.
- [43] Chau TH, Chernykh A, Kawahara R, et al. Critical considerations in *N*-glycoproteomics[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2023, **73**: 102272.
- [44] Li L, Tian ZX. Interpreting raw biological mass spectra using isotopic mass-to-charge ratio and envelope fingerprinting[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2013, **27**(11): 1267-1277.
- [45] Xiao KJ, Yu F, Fang HQ, et al. Accurate and efficient resolution of overlapping isotopic envelopes in protein tandem mass spectra[J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 14755.
- [46] Xiao KJ, Yu F, Tian ZX. Top-down protein identification using isotopic envelope fingerprinting[J]. *J Proteomics*, 2017, **152**: 41-47.
- [47] Xiao KJ, Shen Y, Li SS, et al. Accurate phosphorylation site localization using phospho-brackets[J]. *Anal Chim Acta*, 2017, **996**: 38-47.
- [48] Du YY, Wang Y, Lai ZZ, et al. Study on the differences in *N*-glycosylation of disease-specific immune and inflammatory proteins between lung cancer and lung benign disease[J]. *Basic Clin Med* (基础医学与临床), 2020, **40**(8): 1096-1102.



[专家介绍] 田志新, 同济大学教授, 入选国家高层次青年人才计划。2003 年于中国科学院化学研究所获得化学博士学位。2004—2011 年先后在美国明尼苏达大学和太平洋西北国家实验室从事合作研究。2011—2013 年被聘为中国科学院大连化学物理研究所研究员, 高分辨质谱技术研究组组长。2013 年至今被聘为同济大学化学科学与工程学院教授、博士生导师。目前主要研究领域是基于生物质谱的蛋白质组学与糖基化修饰组学。现任中国质谱学会理事, 中国生物化学与分子生物学会糖复合物专业委员会委员、蛋白质组学专业委员会委员, 中国生物物理学会糖生物学分会委员。