

文章编号: 1674 - 7054(2016)03 - 0402 - 07

植物糖基化蛋白质组研究技术 策略及研究进展

孙勇, 王丹, 仝征, 常丽丽, 王力敏, 王旭初

(中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海口 571101)

摘要: 综述了植物糖基化研究的主要策略以及植物糖蛋白质组学研究的最新进展, 旨在为更好地开展植物糖蛋白质组研究提供技术线索及研究思路。

关键词: 糖蛋白; 蛋白质糖基化; N-糖链; 糖蛋白质组学; 生物质谱

中图分类号: Q 946.1 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.03.022

蛋白质翻译后修饰(Post-translational modification, PTM) 是对蛋白质侧链和末端进行化学修饰, 或者是蛋白水解酶改变蛋白质性质的共价加工过程^[1]。蛋白质翻译后修饰在信号传导、免疫应答和细胞周期调控等生理学过程中发挥着重要作用, 是生物体在有限基因数目的条件下调控复杂生命过程的重要原因。正是由于蛋白质在内质网和高尔基体中的不同加工和折叠, 才使得蛋白质结构更加多样, 功能更为完善, 调控更为精细^[1-3]。蛋白质翻译后修饰种类繁多, 过程复杂, 主要包括蛋白糖基化、磷酸化、泛素化、烷基化、甲基化和乙酰化等^[3]。蛋白糖基化修饰是细胞内质网中糖链添加到蛋白质上形成寡糖链的过程。诸多研究表明, 细胞中约一半以上的蛋白质发生了糖基化, 糖基化作为一种主要的翻译后修饰对蛋白质功能的正常发挥起着重要作用。在真核生物细胞中, 寡糖链与蛋白质多肽链中的氨基酸以多种形式共价连接, 构成糖蛋白的糖肽连接链, 简称糖肽链^[4]。在哺乳动物中, 根据糖肽链的不同, 可以将蛋白糖基化分为4种不同的类型: 1) N-糖苷键型。寡糖中的N-乙酰葡萄糖与多肽链中天冬酰胺残基的酰胺氮连接, 形成N-连接糖蛋白^[5]; 2) O-糖苷键型。寡糖中的N-乙酰半乳糖与多肽链的丝氨酸或苏氨酸残基的羟基相连而形成O-连接糖蛋白^[5]; 3) C-甘露糖糖基化。半胱氨酸为其糖肽键的连接点^[6]; 4) 酯糖苷键型。以天冬氨酸或谷氨酸的游离羧基为连接点, 形成酯糖苷键型^[7]。植物蛋白糖基化形式主要是N-糖苷键型和O-糖苷键型, 其中N-糖基化更为常见和重要。植物N-糖基化过程起始于细胞质侧内质网膜上多萜醇脂连接糖链合成, 随后糖链翻转到内质网的腔内形成Glc₃Man₉GlcNAc₂结构, Man是甘露糖的缩写, GlcNAc是acetylglucosamine(乙酰葡萄糖胺)的缩写^[8]。组装完成的糖链通过位于Asn-X-Ser/Thr(NxS/T)结构上天冬酰胺残基的酰胺键与蛋白主链相连, 其中X是除了脯氨酸外的任何氨基酸^[9]。植物N-糖苷键型根据结合的多糖类型分为3种: 寡甘露糖型N-多糖, 高甘露糖型N-多糖和复杂型N-多糖。当蛋白正确折叠后, 3种葡萄糖残基从肽段上释放出来, 而糖蛋白运输到高尔基体中继续进行深层次的糖链加工, 进而成为成熟的能行使正常功能的蛋白^[10]。O-糖蛋白主要有2种, 分泌蛋白或细胞质/核蛋白, O-连接的糖链性质取决于蛋白质的定位^[11]。在哺乳动物细胞中, 糖蛋白上的糖链参与许多生物学功能, 包括受体结合、细胞信号、蛋白折叠、亚细胞分布与定位、蛋白稳定、内吞作用、免疫识别、引起炎症及致病性等^[12]。在植物中, N-糖基化蛋白的重要功能不是很清楚, 只是在研究单一蛋白的时候, 发

收稿日期: 2015 - 10 - 29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31400523)

作者简介: 孙勇(1987 -), 男, 研究实习员, 硕士, 研究方向: 植物蛋白质组学. E-mail: sunyong_03119308@126.com

通信作者: 王旭初(1977 -), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 植物抗逆整合生物学. E-mail: xchwanghainan@163.com

现植物糖蛋白的 N-糖链能影响糖蛋白的催化活性、热稳定性和折叠^[13] 或者亚细胞定位及分泌^[14]。最近的研究发现, N-糖链可能在植物与病原物相互作用^[15] 及受体识别^[16] 过程起作用。鉴定植物糖蛋白, 分析其糖基化位点和糖链结构以及糖蛋白在特定生理学过程中的作用越来越重要。因此, 笔者综述了研究植物糖蛋白的方法、策略和仪器, 旨在为更好地开展植物糖蛋白质研究提供一定的参考线索及思路。

1 植物 N-糖基化研究的策略

糖组学(Glycomics) 和糖蛋白质组学(Glycoproteomics) 是 2 种用来分析特殊细胞、组织和器官的某个特定状态下的蛋白质复合物的策略。糖组学是研究全套蛋白与糖类结合的策略, 它主要聚焦于糖链结构的研究, 该研究需要先将糖链从糖蛋白中释放出来, 然后经质谱单独分析或者与色谱技术进行联合分析, 色谱技术不仅能提供额外的糖链识别, 还能确定每个鉴定糖组分的保留时间^[17]。另外, 在不释放糖链的情况下, 还能通过质谱技术鉴定包涵糖基化位点和结合糖链的糖肽^[18]。糖蛋白质组学是一种分析特定细胞或组织全部糖结合蛋白质的研究技术, 它主要聚焦于糖基化蛋白和糖基化位点的质谱鉴定, 研究过程中糖基化的蛋白首先经适当的方法富集, 然后用 LC-MS/MS 鉴定具体蛋白质, 并解析其糖基化位点。糖蛋白的简要研究策略如图 1 所示。路线 1 表示通过 PNGase 酶处理总蛋白来释放 N-糖链, PNGase 酶通过破坏糖链与蛋白肽主链之间的链接键来释放糖链, 但是在分析有复杂型糖链的蛋白时, PNGase F 的效率不理想; 路线 2 表示通过 MALDI-TOF/TOF MS, LC-MS/MS 或 CE(毛细管电泳) 来分析 N-糖链, 测定糖链的结构; 路线 3 表示从总蛋白或总糖蛋白中分离出 N-糖蛋白, 主要是根据糖蛋白的特性, 利用凝集素或者亲和层析的方法富集糖蛋白; 路线 4 表示利用 SDS-PAGE 分离得到的糖蛋白组分; 路线 5 表示用胰酶消化 N-糖蛋白组分; 路线 6 表示用 SDS-PAGE 分离总蛋白或总糖蛋白; 路线 7 表示利用 Western 杂交检测特异的 N-糖蛋白; 路线 8 表示选择 SDS-PAGE 分离后的糖蛋白, 经胰酶消化后用 LC-MS/MS, MALDI-TOF MS 或 CE-MS/MS 鉴定分析; 路线 9 表示用 LC-MS/MS, MALDI-TOF MS 或 CE-MS/MS 分析不经电泳分离, 而直接酶解通过富集得到的糖蛋白; 路线 10 表示用亲和捕获的方法选择性的富集经胰酶酶解后的 N-糖肽; 路线 11 表示用 LC-MS/MS 或 CE-MS/MS 分析纯化的糖肽的 N-糖链; 路线 12 表示用 PNGase 酶处理 N-糖肽来释放肽段; 路线 13 表示用 LC-MS/MS 测定路线 12 中释放出来的肽的 N-糖基化位点占有率。路线 1-2 和 10-11 描述的是通过裂解得到 N-糖链结构或糖肽段来获得 N-糖链结构的信息, 属于糖组学范畴, 而其他路线属于糖蛋白质组学的范畴。

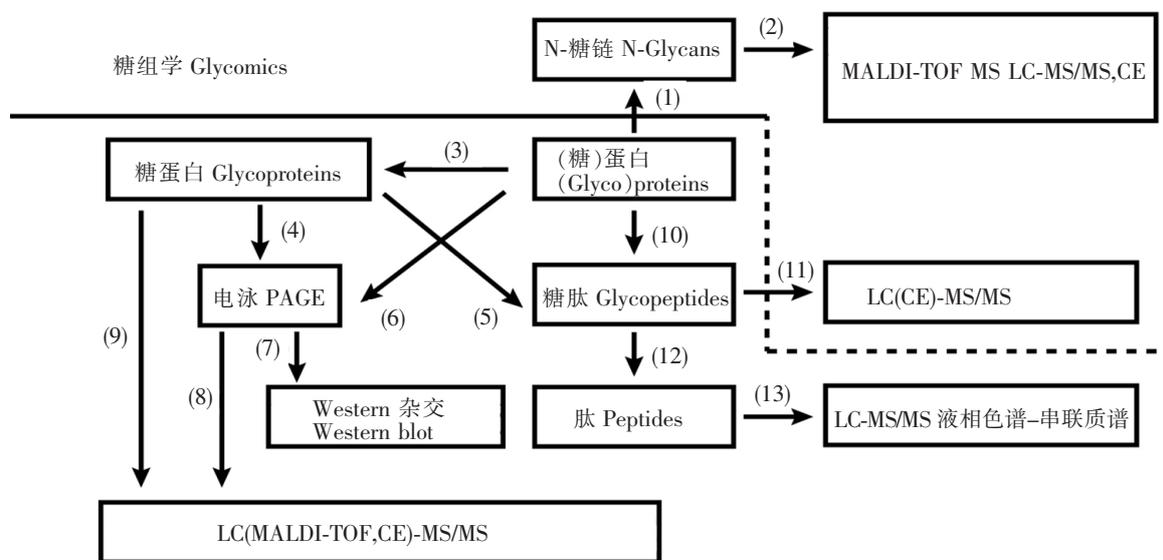


图 1 N-糖基化蛋白的研究策略

Fig.1 Strategies in N-glycoprotein analysis

2 植物 N-糖基化蛋白的研究进展

2.1 基于凝胶的糖蛋白分析 凝胶的糖蛋白的分析原理是利用 SDS-PAGE 来达到分离蛋白的目的,在凝胶上挖取目标蛋白点或条带进行酶解,然后利用质谱鉴定糖蛋白及其糖基化位点和糖链结构,主要包括单个糖蛋白和混合蛋白的分析。单个植物糖蛋白的更多信息都基于凝胶的糖蛋白分析(图1,路线4-7-8),这样可以提高待测物的浓度和纯度,减少其他蛋白或肽段的干扰,提高鉴定效率,可以明确得到待测蛋白的 N-糖基化位点及其位点占有率。Franc 等用路线4-8的策略发现酵母中表达的玉米细胞分裂素氧化酶/脱氢酶(CKO)的天冬酰胺(Asn) 52, 63, 134, 294, 323 及 338 位点上有 N-糖基化修饰,且属于高甘露糖型 N-糖链,结合的多糖链包含 3~14 个甘露糖残基,其中 Asn323 只有部分被糖基化,而 Asn338 承载了超过 25 个甘露糖残基的超长糖链^[19]。Picariello 等用路线4-8和1-2的策略研究了大豆 β -伴大豆球蛋白亚基 [α (~67 kDa), α' (~71 kDa) 和 β (~50 kDa)] 的糖基化位点及糖种类,发现 β -伴大豆球蛋白有 5 个位点被糖基化,其中 α' 亚基的 N215 和 N489 位点被糖基化修饰, α 亚基的 N199 和 N455 位点被糖基化修饰, β 亚基的 N326 位点被糖基化修饰,且所有修饰位点的糖链都是高甘露糖型 N-糖链,说明这 3 个亚基处在一个共同的共转化糖基化过程[20]。Schiarea 等利用 4-8, 1-2 和 9 这三种路线结合的研究策略分析了纯化后的羽扇豆 γ -蓝豆蛋白(γ -Conglutin) N-糖链的结构、微观不均一性和结合位点,最终发现 N-糖链结合在羽扇豆 γ -蓝豆蛋白的 Asn131 位点上,而且有 4 种微观不均一性变体,分别是 $\text{Man}_2(\text{Xyl})(\text{Fuc})\text{-GlcNAc}_2$, $\text{Man}_3(\text{Xyl})(\text{Fuc})\text{-GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAcMan}_3(\text{Xyl})(\text{Fuc})\text{-GlcNAc}_2$ 和 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3(\text{Xyl})(\text{Fuc})\text{-GlcNAc}_2$, 且每个变体都承载了 β -1,2-木糖和 α -1,3-海藻糖^[21]。Franc 等用基于凝胶(路线4-8)和伴刀豆球蛋白凝集素富集糖肽(路线5-11)的方法分析了豌豆幼苗铜铵氧化酶(PSAO)和小扁豆幼苗铜铵氧化酶(LSAO)的糖基化情况,发现 PSAO 有 5 个糖肽,其中 4 个结合在糖基化位点 Asn558 上,另一个在糖基化位点 Asn334 上,并且有从 $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ 到 $\text{Man}_{11}\text{GlcNAc}$ 寡聚糖结构存在,包括 GlcNAc 、己糖和戊糖等 6 种结构变体,但是没有其他糖型。LSAO 有 7 个糖肽结合在糖基化位点 Asn558 上,并且镶嵌了 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_3\text{XylGlcNAc}_2$ 和 $\text{Man}_4\text{XylGlcNAc}_2$ 这 4 种寡聚糖结构^[22]。Halim 等分析了猫尾草花粉过敏原蛋白 Phl p 1 和 Phl p 5 的糖基化情况(路线4-8),最终发现 Phl p 1 有 85% 的序列覆盖率,有 2 个糖肽,分别是 (V27PPGPNTAT YGDK40) 和 (I24PKVPPGPNTATYGDK40) 这 2 种肽有 1~2 个羟脯氨酸修饰和 1~4 个戊糖残基,其中一个是一木糖连接的 N-糖链。Phl p 5 有 86% 的序列覆盖率,但是 Phl p 5 并没有被 N-或 O-连接的 HexNAc 残基修饰,只是在肽段 A26DLGYGPATP AAPAAGYTPA TPAAPAGAEP AGK58 上发现了 0~7 个羟脯氨酸残基修饰^[23]。Balén 等发现,仙人掌幼苗和愈合组织的一种 42 kDa 糖蛋白具有相同的糖链结构(路线4-8),这种 N-糖链在仙人掌组织中属于寡甘露糖型 N-糖链。外植体再生组织和 TW 瘤组织的糖链属于复杂型 N-糖链,它们有 7 种相同的寡糖结构,而且 TW 瘤组织还有 2 种高分子量的特异复杂型 N-糖链,上述结果表明,仙人掌不同组织的同一蛋白的 N-糖链是多样的,也暗示着组织的不同发育时期会影响植物蛋白的糖基化^[24]。

基于凝胶的糖蛋白分析策略除了用来分析单个糖蛋白的糖基化情况之外,也用来分析复杂的某类蛋白或者总蛋白的糖基化情况。也可以在凝胶中通过荧光分子与高碘酸氧化碳化合物之间的共价键连接来检测糖蛋白并利用质谱鉴定。Mathieu-Rivet 等分析了 3 个不同品系的衣藻细胞的可溶性蛋白和膜蛋白的糖基化情况(路线4-8),最终鉴定了 86 个糖蛋白,135 个糖肽和 137 个糖基化位点,还发现不同品系衣藻细胞可溶性蛋白和膜蛋白中的糖蛋白结合的多糖结构基本一致,表明 N-糖链的结构不依赖于品系,且与分泌蛋白的目的地也没有关系。衣藻细胞的可溶性蛋白和膜蛋白中糖蛋白的糖链大部分是多聚甘露糖,从 $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$ 到 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, 小部分是复杂型的 N-糖链,主要是承载 1 到 2 个被 6-O-甲基化的木糖 $\text{Man}-3$ 到 $\text{Man}-5$ 糖链^[25]。Silva-Sanchez 等用荧光染色的方法分析了玉米己糖缺失突变体和 WT 胚乳的总蛋白的糖基化情况(路线4-8),经抗体杂交实验发现突变体胚乳的糖基化水平比 WT 要低。最后选择了 45 个糖基化水平变化 20% 以上的糖蛋白进行 LC-MS/MS 分析,发现这些蛋白质主要参与翻译后修饰,蛋白翻转,伴侣蛋白活性,糖及氨基酸合成和转运,细胞壁合成等生理过程,同时发现这些

蛋白主要与内质网胁迫和响应未折叠蛋白相关,并且是造成突变体糖基化水平低的主要原因^[26]。Barba-Espín 等用荧光染色的方法分析了衣霉素和高温分别处理的大麦籽粒糊粉层胞外蛋白和胞内蛋白(路线4-8),最终鉴定了22个胞外糖蛋白,主要包括 α -淀粉酶和肽酶;鉴定了178个胞内糖蛋白,这些蛋白包括初级代谢相关蛋白(98个)、伴侣蛋白(29个)和多糖水解酶(11个)^[27]。

2.2 基于凝集素亲和层析的糖蛋白、糖肽分析 抗体和凝集素不仅可以用来检测糖蛋白,也可以用来分离糖蛋白。分离的糖蛋白组分随后可以通过1-DE、2-DE或者色谱按分子量大小分级,继而将感兴趣的蛋白条带通过LC-MS/MS, MALDI-TOF MS 或 CE-MS/MS 来分析(图1,路线3-4-8),或者将收集的糖蛋白不经电泳分离而直接用这些液质联用方法来鉴定(图1,路线9)。用来分离糖蛋白的凝集素主要有伴刀豆球蛋白(ConA)、麦胚凝集素(WGA)、菠萝蜜凝集素(AIL)和花生凝集素(PNA)。其中ConA用途最广泛,经常用来捕获有甘露糖型的糖链,但对复杂型的N-糖链不起作用。麦胚凝集素(WGA)能够用来分离N-糖链末端具有GlcNAc的糖蛋白,而且还能用来分离O-糖基化的糖蛋白。凝集素AIL和花生凝集素(PNA)能用来捕获有半乳糖Gal的N-和O-糖蛋白,AIL能识别大多数的 α -Gal,而PNA识别 α -Gal和 β -Gal^[28]。

Catala 等利用ConA富集结合质谱分析了番茄果皮总蛋白中的糖蛋白(路线3-5-11),最终鉴定了133个糖蛋白,其中89%的蛋白具有预测的信号肽,分析发现,这些蛋白可能参与分泌途径^[29]。Ligatz 等用ConA富集甘蓝木质部汁液总蛋白中的糖蛋白后直接进行LC-MS/MS分析(路线3-9),最后鉴定到189个蛋白,其中164个蛋白具有信号肽,还包括81个N-糖蛋白,说明大部分木质部汁液蛋白属于分泌蛋白^[30]。Zhang 等用ConA亲和层析、多维凝集素亲和层析(ConA, WGA, AIL和PNA)和硼酸层析法来鉴定拟南芥黄化胚轴细胞壁的糖基化蛋白(路线3-4-8),最终鉴定了127个糖基化蛋白,并经过ProTerNyc生物信息学软件预测,大部分糖蛋白都是N-连接的糖蛋白^[31]。Ruiz-May 等用伴刀豆球蛋白A、雪花莲凝集素和小扁豆凝集素分别富集了成熟绿番茄果皮总蛋白中的糖蛋白(路线3-5-11),并用多孔石墨盒富集了酶解后的糖肽进行nanoLC-MS/MS鉴定,其中用伴刀豆球蛋白A富集的有240个,雪花莲凝集素富集的有251个,小扁豆凝集素的有210个。3种凝集素富集法都鉴定到的只有68个,有110个蛋白只在伴刀豆球蛋白A富集的样品中鉴定到,95个蛋白只在雪花莲凝集素富集的样品中鉴定到,59个蛋白只在小扁豆凝集素富集的样品中鉴定到。最终共鉴定了448个N-糖基化蛋白^[32]。Mustafa 等提取生长2d的对照组和涝害2d的大豆根蛋白,利用伴刀豆球蛋白富集糖蛋白,胰酶和内源赖氨酸胺酶消化后进行nano-LC MS/MS鉴定糖蛋白(路线3-4-8)。利用伴刀豆球蛋白杂交定量分析对照组和处理组中表达变化的糖蛋白,发现涝害降低了大豆根中糖蛋白的积累。比较对照组中4d的大豆和2d的大豆蛋白,有149个蛋白发生了显著变化,其中有111个糖蛋白,51个上调表达,60个下调表达,涝害处理2d后,有87个蛋白发生了现在变化,其中有69个糖蛋白,34个上调表达,35个下调表达。有23个糖蛋白在对照组和处理组都鉴定到^[33]。Kumar 等用ConA富集了棉花纤维细胞中的糖蛋白,一部分胰酶酶解后再用ConA富集糖肽,其中的一些用PNGase F/A去糖基化后进行nano-LC MALDI TOF-TOF鉴定(路线3-5-12-13),另一部分直接进行nano-LC MALDI TOF-TOF分析(路线3-5-11)。最终鉴定了334个蛋白质,并从中67个单一蛋白中鉴定到92个N-连接糖基化肽段,106个糖基化位点^[34]。

由于糖链具有较强的亲水性,所以很多亲水性层析介质都可应用来富集糖肽。Melo-Braga 等提取了被Lobesia botrana侵染的葡萄外果皮和中果皮总蛋白,胰酶酶解后肽段用iTRAQ染料标记,再利用两性离子-亲水性相互作用液相色谱(Zwitterionic-hydrophilic interaction liquid chromatography, ZIC-HILIC)富集糖基化肽段,用PNGase A去糖基化后用于LC-MS/MS(线路5-12-13)。最终鉴定到323个N-糖基化位点,外果皮中鉴定到62个N-糖蛋白,中果皮中鉴定到53个N-糖蛋白,在这些糖蛋白中,抗病反应蛋白206在植物防御真菌入侵中起重要作用^[35]。Barba-Espín 在用荧光染色技术分析衣霉素和高温处理的大麦籽粒糊粉层胞外蛋白和胞内蛋白糖基化的同时,还利用HILIC富集糖蛋白,经PNGase A去糖基化后用LC-MS/MS鉴定糖基化位点(路线3-9),得到了与荧光染色技术不一样的结果,最后在65个糖蛋白上鉴定出73个糖肽,其中胞外糖蛋白57个,胞内糖蛋白36个,有28个糖蛋白是两者共有^[27]。Dedvisitsakul 等用ZIC-HILIC和cotton wool微柱富集经胰酶酶解的小麦白蛋白糖肽,富集的糖肽经18O标记后用PN-

Gase A 消化去糖基化,最后用 LC-MS/MS 鉴定(线路 5-12-13)。共鉴定出 67 个白蛋白糖蛋白,78 个不同的糖基化位点,在所有的糖基化位点中,位于 NXS/T/C 上的天门冬酰胺残基占大多数,并且被 18O 标记^[36]。Zhang 等利用路线 10-12-13 和路线 6-8 相结合的策略分析了短柄草幼苗叶片的糖基化情况,最终鉴定了 46 个糖蛋白,包括 47 个糖肽和 47 个糖基化位点。这 46 个糖蛋白中有 36 个酶,主要包括蛋白酶/肽酶、糖基水解酶/转移酶、酯酶/脂肪酶等。Motif-X 分析表明这 47 个糖肽中有 30 个属于 NxT 修饰,17 个属于 NxS。二级结构分析结果显示,环/转 β 转角, α 螺旋结构分别占 47 个糖基化位点的 63%、26%、11%^[37]。

2.3 基于胍类的糖蛋白和糖肽分析 糖蛋白还能通过糖链与胍酯之间的链接被捕获(图 1,路线 10-12-13)。在这个过程中,蛋白样品经胰酶酶解后的糖链首先被氧化形成功能醛基,随后通过共价键与胍酯链接^[38]。在清洗掉未链接的肽段后,经 N-糖链与胍酯链接的糖肽能在 PNGase 酶作用下被释放出来,造成 N-糖链与肽键之间断裂。当对 N-连接的糖肽进行定量分析或者样品之间进行比较时,用基于胍酯的方法来分离糖肽,然后进行无标记定量 LC-MS/MS,或者用不同的稳定同位素标记。尽管经过大量清洗,依然会有非糖肽在 PNGase F 处理后从胍酯上释放出来。但是存在一个 NxS/T 糖基化共识位点并且存在 1 Da 的质量漂移,这个特征可以区分真正的糖肽和污染的非糖肽。这种方法在植物糖蛋白质组学研究中应用较少,Palmsano 等在分析白葡萄酒中葡萄来源的糖蛋白时,用胍化学富集法,结合 HILIC 和二氧化钛富集法,用 MALDI TOF MS 和 LC-MS/MS 鉴定了 28 个糖蛋白和 44 个糖基化位点,来源于葡萄的糖蛋白包括转化酶和病程相关蛋白^[39]。Song 等提取拟南芥叶片总蛋白,经还原烷基化后进行胰酶酶解,用 C18 spe 柱子富集糖肽后经 PNGase F 去糖基化,最后用二维 LC-MS 鉴定糖蛋白(路线 10-12-13),共鉴定了 170 个糖蛋白,330 个糖肽,其中有 28 个糖蛋白在以前的拟南芥 TAIR 数据库中并不认为是分泌蛋白。同时对野生型和缺失复杂型多糖突变体拟南芥进行了肽信号比较,发现在这两种株系中,膜蛋白 SKU5 表现出不同的糖肽信号强度,这也暗示这在不同株系中同一种蛋白的糖链有不同的修饰^[40]。

3 蛋白糖基化研究中的主要难题

3.1 糖蛋白的复杂性 植物糖蛋白的相对低表达丰度以及糖肽和糖链复杂的化学结构及不同的化学特性,给有效解析糖蛋白或糖肽带来了巨大挑战。糖肽的丰度相对较低,离子化效率比非糖肽低很多,非糖肽总是在质谱检测的时候抑制糖肽的信号。糖基化过程的动力学特性导致同一糖蛋白具有不同的糖链结构,这也导致了糖蛋白分析方法变得更加复杂。具有不同的糖链变体的低信号的单一糖肽在液相色谱分析时,会在不同的保留时间内检测到多个峰,这会阻碍复杂的混合样品的检测及有效鉴定。

3.2 肽段的鉴定 PNGase 处理导致的 1 Da(普通水)或者 2 Da(18O 标记的水)质量移除可以用来检测糖基化位点。但是这有可能来源于天冬酰胺的脱氨作用,这需要检测对照样品来确定(例如检测脱氨酰的正常水平)。此外,很多糖蛋白只有 1 个或少数的糖基化位点,与分离得到的糖肽连接去鉴定特异蛋白是不被承认的,而鉴定蛋白的普通标准是需要有多个肽段,但是在很多情况下,对亲和选定的单肽段来说鉴定结果是不太可信的。

3.3 PNGase A 的缺陷 用于植物糖蛋白研究的 N-糖蛋白组学策略通常会受益于 PNGase A 基因的分离和多功能的 PNGase 的生产,在没有糖基化位点突变的情况下能更有效地释放糖肽。然而采用胍捕获法分析结合有复杂型糖链的蛋白时,需要先用 PNGase F 移除甘露糖型-N 糖肽,然后用 PNGase A 来释放其他糖链,不过这一过程还不够有效。

4 小结

虽然在植物糖蛋白组研究中遇到了相当多的困难和挑战,但是也改进和迸发了新的技术来解决问题,针对糖蛋白的特性,主要在以下 3 个方面进行了改进:1) 针对糖蛋白、糖肽和游离的糖链选择合适的富集技术,改进分离技术包括色谱分离、毛细管电泳和离子迁移技术的小型化;2) 提高质谱技术,发展更有效的分析流程;3) 为解析质谱图谱发展新的软件和运算法则,并且不再局限于单一方法,而是结合多种研究策略以达到最佳的结果。糖蛋白质组,特别是质膜糖蛋白质组,在植物发育和病原体入侵过程中,在

与细胞外信号有相互作用的生理过程中高度积累,并且其糖基化修饰类型主要是复杂型的N-糖链。虽然糖蛋白只是这些生理学过程中的部分蛋白,但基于糖蛋白而发展起来的技术手段能够增强我们对这些重要生理过程的了解。

参考文献:

- [1] Mann M, Jensen O N. Proteomic analysis of post-translational modifications [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(3): 255–261.
- [2] Seo J, Lee K J. Post-translational modifications and their biological functions: Proteomic analysis and systematic approaches [J]. *J. Biochem Mol. Biol.*, 2004, 37(1): 35–44.
- [3] 胡筋, 郭燕婷, 李艳梅. 蛋白质翻译后修饰研究进展 [J]. *科学通报*, 2005, 50(11): 1061–1072.
- [4] 张倩, 杨振, 张艳贞, 等. 蛋白质糖基化修饰的研究方法及其应用 [J]. *生物技术通报*, 2006(1): 46–49.
- [5] Zhang Y, Yin H R, Lu H J. Recent progress in quantitative glycoproteomics [J]. *Glycoconj J.*, 2012, 29(5/6): 249–258.
- [6] Hofsteenge J, Muller D R, Beer T, et al. New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase [J]. *Biochemistry*, 1994, 33(46): 13524–13530.
- [7] Floyd N, Vijayakrishnan B, Koeppe J R, et al. Thiol glycosylation of olefinic proteins: S-linked glycoconjugate synthesis [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48(42): 7798–7802.
- [8] Trombetta E S. The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis [J]. *Glycobiology*, 2003, 13(9): 77R–91R.
- [9] Bause E. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes [J]. *Biochem J.*, 1983, 209(2): 331–336.
- [10] Zielinska D F, Gnad F, Schropp K, et al. Mapping N-glycosylation sites across seven evolutionarily distant species reveals a divergent substrate proteome despite a common core machinery [J]. *Mol. Cell*, 2012, 46(4): 542–548.
- [11] Fitchette A C, Dinh O T, Faye L, et al. Plant proteomics and glycosylation [J]. *Methods Mol. Biol.*, 2007, 335: 317–342.
- [12] Song W, Henquet M G, Mentink R A, et al. N-glycoproteomics in plants: Perspectives and challenges [J]. *J. Proteomics*, 2011, 74(8): 1463–1474.
- [13] Lige B, Ma S, Van-huystee R B. The effects of the site-directed removal of N-glycosylation from cationic peanut peroxidase on its function [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 386(1): 17–24.
- [14] Cerioti A, Duranti M, Bollini R. Effects of N-glycosylation on the folding and structure of plant proteins [J]. *J. Exp. Bot.*, 1998, 49: 1091–1103.
- [15] Pattison R J, Amtmann A. N-glycan production in the endoplasmic reticulum of plants [J]. *Trends Plant Sci.*, 2009, 14(2): 92–99.
- [16] Haweker H, Rips S, Koiwa H, et al. Pattern recognition receptors require N-glycosylation to mediate plant immunity [J]. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285(7): 4629–4636.
- [17] Baycinhal D, Wolozny D, Colao J, et al. Glycoproteomic and glycomic databases [J]. *Clinical Proteomics* 2014, 11(1): 15–24.
- [18] Nilsson J, Rurtschi U, Halim A, et al. Enrichment of glycopeptides for glycan structure and attachment site identification [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(11): 809–811.
- [19] Franc V, Sebela M, Rehulka P, et al. Analysis of N-glycosylation in maize cytokinin oxidase/dehydrogenase 1 using a manual microgradient chromatographic separation coupled offline to MALDI-TOF/TOF mass spectrometry [J]. *J. Proteomics*, 2012, 75(13): 4027–4037.
- [20] Picariello G, Amigo-benavent M, Delcastillo M D, et al. Structural characterization of the N-glycosylation of individual soybean β -conglycinin subunits [J]. *J. Chromatogr A*, 2013, 1313: 96–102.
- [21] Schiarea S, Amoldi L, Fanelli R, et al. In-depth glycoproteomic characterization of γ -conglutin by high-resolution accurate mass spectrometry [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73906.
- [22] Franc V, Rehulka P, Medda R, et al. Analysis of the glycosylation pattern of plant copper amine oxidases by MALDI-TOF/TOF MS coupled to a manual chromatographic separation of glycans and glycopeptides [J]. *Electrophoresis*, 2013, 34(16): 2357–2367.
- [23] Halim A, Carlsson M C, Madsen C B, et al. Glycoproteomic analysis of seven major allergenic proteins reveals novel post-translational modifications [J]. *Mol. Cell Proteomics*, 2015, 14(1): 191–204.

- [24] Balen B , Krsnik-rasol M , Zamfir A D , et al. Glycoproteomic survey of *Mammillaria gracillis* tissues grown in vitro [J]. *J. Proteome Res.* , 2006 , 5(7) : 1658 – 1666.
- [25] Mathieu-rivet E , Scholz M , Arias C , et al. Exploring the N-glycosylation pathway in *Chlamydomonas reinhardtii* unravels novel complex structures [J]. *Mol. Cell Proteomics* , 2013 , 12(11) : 3160 – 3183.
- [26] Silva-sanchez C , Chen S , Li J , et al. A comparative glycoproteome study of developing endosperm in the hexose-deficient miniature1 (mn1) seed mutant and its wild type Mn1 in maize [J]. *Front Plant Sci.* , 2014(5) : 63.
- [27] Barba-espin G , Dedvisitsakul P , Hagglund P , et al. Gibberellic acid-induced aleurone layers responding to heat shock or tunicamycin provide insight into the N-glycoproteome , protein secretion , and endoplasmic reticulum stress [J]. *Plant Physiol* , 2014 , 164(2) : 951 – 965.
- [28] Budnik B A , Lee R S , Steen J A. Global methods for protein glycosylation analysis by mass spectrometry [J]. *Biochim Biophys Acta* , 2006 , 1764(12) : 1870 – 1880.
- [29] Catala C , Howe K J , Hucko S , et al. Towards characterization of the glycoproteome of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit using Concanavalin A lectin affinity chromatography and LC-MALDI-MS/MS analysis [J]. *Proteomics* , 2011 , 11(8) : 1530 – 1544.
- [30] Ligat L , Lauber E , Albenne C , et al. Analysis of the xylem sap proteome of *Brassica oleracea* reveals a high content in secreted proteins [J]. *Proteomics* , 2011 , 11(9) : 1798 – 1813.
- [31] Zhang Y , Giboulot A , Zivy M V , et al. Combining various strategies to increase the coverage of the plant cell wall glycoproteome [J]. *Phytochemistry* , 2011 , 72(10) : 1109 – 1123.
- [32] Ruiz-may E , Hucko S , Howe K J , et al. A comparative study of lectin affinity based plant N-glycoproteome profiling using tomato fruit as a model [J]. *Mol Cell Proteomics* , 2014 , 13(2) : 566 – 579.
- [33] Mustafa G , Komatsu S. Quantitative proteomics reveals the effect of protein glycosylation in soybean root under flooding stress [J]. *Front Plant Sci.* , 2014(5) : 627.
- [34] Kumar S , Kumar K , Pandey P , et al. Glycoproteome of elongating cotton fiber Cells [J]. *Mol. Cell Proteomics* , 2013 , 12(12) : 3677 – 3689.
- [35] Melo-braga M N , Verano-braga T , Leon I R , et al. Modulation of protein phosphorylation , N-glycosylation and Lys-acetylation in grape (*Vitis vinifera*) mesocarp and exocarp owing to *Lobesia botrana* infection [J]. *Mol. Cell Proteomics* , 2012 , 11(10) : 945 – 956.
- [36] Dedvisitakul P , Jacobsen S , Svensson B , et al. Glycopeptide enrichment using a combination of ZIC-HILIC and cotton wool for exploring the glycoproteome of wheat flour albumins [J]. *J. Proteome Res.* , 2014 , 13(5) : 2696 – 2703.
- [37] Zhang M , Chen G X , Lv D W , et al. N-linked glycoproteome profiling of seedling leaf in *Brachypodium distachyon* L. [J]. *J. Proteome Res.* , 2015 , 14(4) : 1727 – 1738.
- [38] Tian Y , Zhou Y , Elliott S , et al. Solid-phase extraction of N-linked glycopeptides [J]. *Nat Protoc.* , 2007 , 2(2) : 334 – 339.
- [39] Palmisano G , Antonacci D , Larsen M R. Glycoproteomic profile in wine: a ‘sweet’ molecular renaissance [J]. *J. Proteome Res.* , 2010 , 9(12) : 6148 – 6159.
- [40] Song W , Mentink R A , Henquet M G , et al. N-glycan occupancy of Arabidopsis N-glycoproteins [J]. *J. Proteomics* , 2013 , 93: 343 – 355.

The Latest Progress in Plant Glycoproteomics

SUN Yong , WANG Dan , TONG Zheng , CHANG Lili , WANG Limin , WANG Xuchu
(Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology , CATASA , Haikou , Hainan 571101 China)

Abstract: This review summarize the research progress of the research strategies on the plant N-glycosylation and the research progress of the plant glycoproteomics , and it will provided the clue and ideal for the better development in the future study on plant glycoprotein.

Keywords: Glycoprotein; Protein glycosylation; N-glycan; Glycoproteomics; Biological mass spectrometry