



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101910841 A

(43) 申请公布日 2010.12.08

(21) 申请号 200880123401.9

代理人 曹立莉

(22) 申请日 2008.10.29

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 33/534 (2006.01)

61/000,920 2007.10.29 US

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

G01N 33/532 (2006.01)

2010.06.29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/012283 2008.10.29

(87) PCT申请的公布数据

W02009/058307 EN 2009.05.07

(71) 申请人 佐治亚大学研究基金会

地址 美国佐治亚州

(72) 发明人 罗伯特·L·韦尔斯

罗纳德·C·奥兰多

斯蒂芬·达尔顿 凯利·W·莫雷曼

J·迈克尔·皮尔斯

詹姆斯·A·阿特伍德

迈克尔·蒂迈耶 威廉·S·约克

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

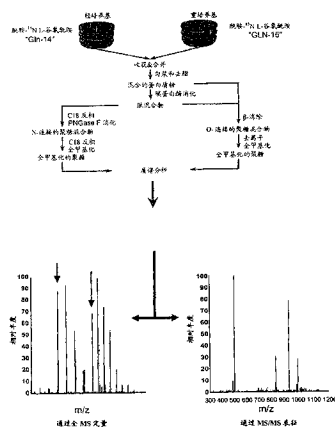
权利要求书 4 页 说明书 21 页 附图 16 页

(54) 发明名称

用于定量糖组学的体内同位素标记方法

(57) 摘要

本发明涉及同位素标记聚糖和促进生物细胞的糖组学组合物的高通量定量/比较分析的方法。该方法尤其适用于辨别分化细胞和它们的糖组学特征、分化情况、疾病和/或治疗进展,诊断疾病状态,确定药物活性,建立制造效率和确定细胞中聚糖的半衰期。



1. 与对照样品相比,比较受调节的生物样品中一种或多种感兴趣的聚糖的相对丰度的方法,其包括:

将待调节的第一生物样品在进一步包含  $^{15}\text{N}$ - 谷氨酰胺的第一培养基中培养;

将对照样品在与所述第一培养基相同且进一步包含  $^{14}\text{N}$ - 谷氨酰胺的第二培养基中培养;

在培养过程中调节所述第一样品;

加工所述第一样品和所述对照样品以从它们提取蛋白质和 / 或脂质;

在所述加工步骤后从所述样品分离所述蛋白质和 / 或脂质;

任选将所述蛋白质消化为多个肽;

任选从所述蛋白质、肽和 / 或脂质释放聚糖且从所述蛋白质、肽和 / 或脂质分离所述释放聚糖;

将所述蛋白质、所述肽、所述脂质和 / 或所述聚糖进行质谱分析以得到质谱;和

基于所述质谱确定各样品的感兴趣的所述聚糖的相对丰度。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述样品为细胞样品。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述样品为细胞样品,且所述第一细胞样品通过将前体细胞群暴露于分化剂而调节以将所述前体细胞分化为分化细胞。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述调节步骤包括将所述第一细胞样品暴露于药物或激素。

5. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述调节步骤包括将所述生物样品暴露于感兴趣的微生物以确定所述微生物对所述样品中聚糖的影响。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述微生物为细菌、病毒或真菌。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述调节步骤包括将所述样品暴露于一种或多种调节的培养条件以评估该调节的培养条件对细胞或组织的产生的影响。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的方法,其中在所述分离步骤后,所述蛋白质消化为多个肽。

9. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的方法,其中将所述蛋白质和 / 或脂质进一步分离为结合至聚糖的蛋白质和 / 或脂质和无聚糖的蛋白质和 / 或脂质。

10. 根据权利要求 1 或 9 所述的方法,其中所述聚糖从所述蛋白质和 / 或脂质释放和分离。

11. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的方法,其中将所述聚糖除了进行质谱分析还进行 NMR 分析。

12. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的方法,还包括从所述质谱确定感兴趣的所述聚糖的结构步骤。

13. 根据权利要求 11 所述的方法,还包括从所述质谱和所述 NMR 分析确定感兴趣的所述聚糖的结构步骤。

14. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述肽进一步分离为包含聚糖的肽和不含聚糖的肽。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中将所述包含聚糖的肽进行质谱分析且任选进行 NMR 分析以确定所述聚糖的肽结合位点。

16. 根据权利要求 1 所述的方法,其中将所述分离的脂质进一步分离为包含聚糖的脂质和不含聚糖的脂质。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中将所述包含聚糖的脂质进行质谱分析且任选进行 NMR 分析以确定所述聚糖的结合位点。

18. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的方法,其中所述培养基为极限必需培养基,其任选包含生长因子、视黄酸、葡萄糖、非必需氨基酸、盐(包括痕量元素)、轻或重谷氨酰胺、胰岛素、转铁蛋白、 $\beta$  巯基乙醇及其混合物。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述培养基为补充了 10% 胎牛血清、2mM 重 L-谷氨酰胺或 2mM 轻 L-谷氨酰胺和 0.1mM 2-巯基乙醇的 Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基(DMEM)。

20. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述蛋白质用蛋白水解酶消化。

21. 确定至少一种感兴趣的聚糖在细胞中的半衰期的方法,包括:

a. 将细胞样品在包含重谷氨酰胺且基本不含轻谷氨酰胺的培养基中生长一段时间以能有效用重谷氨酰胺完全标记所述细胞中的聚糖分子;

b. 从步骤 a 所得的所述样品取出一份等分部分的标记的细胞;

c. 将步骤 a 所得的所述样品的剩余部分在包含轻谷氨酰胺且基本不含重谷氨酰胺的培养基中生长;

d. 以有规律间隔从在步骤 c 的轻谷氨酰胺中生长的所述样品中取出等分部分的细胞;

e. 将步骤 d 所得的所述各份等分部分与步骤 a 所得的一份等分部分细胞混合;

f. 处理步骤 e 的所述细胞混合物并用质谱法分析所述等分部分细胞以得到各混合物的质谱;

g. 对感兴趣的所述聚糖计算作为时间的函数的重谷氨酰胺与轻谷氨酰胺的掺入比例或百分比掺入比例;和

h. 由所述计算步骤 g 获得的数据确定所述聚糖的半衰期。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述确定步骤使用百分比掺入相对时间绘制的图。

23. 根据权利要求 21 或 22 所述的方法,其中所述细胞在调节剂的存在下生长。

24. 根据权利要求 21-23 中任一项所述的方法,其中所述调节剂为至少一种分化剂,药物,激素,另一化学品、环境条件,制造条件,或在所述细胞中引起疾病状态的试剂。

25. 根据权利要求 23 或 24 所述的方法,其中所述调节剂为药物。

26. 根据权利要求 23 或 24 所述的方法,其中所述调节剂为至少一种分化剂。

27. 根据权利要求 23 或 24 所述的方法,其中所述调节剂为环境条件。

28. 根据权利要求 23 或 24 所述的方法,其中所述调节剂为制造条件。

29. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述调节剂为微生物。

30. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述微生物为细菌、病毒或真菌。

31. 根据权利要求 21-30 中任一项所述的方法,其中所述生长步骤 a 进行约 60-72 小时的一段时间。

32. 与对照样品相比,确定未知活性的化合物对调节样品和中一种或多种感兴趣的聚糖的丰度的活性的方法,其包括:

在进一步包含  $^{15}\text{N}$ - 谷氨酰胺的第一培养基中培养待调节的第一细胞样品；  
将对照样品在与所述第一培养基相同且进一步包含  $^{14}\text{N}$ - 谷氨酰胺的第二培养基中培养；  
在培养过程中用所述化合物接触所述第一细胞样品；  
加工所述第一细胞样品和所述对照样品以从它们提取蛋白质和 / 或脂质；  
在所述加工步骤后从所述样品分离所述蛋白质和 / 或脂质；  
任选将所述蛋白质消化为多个肽；  
任选从所述蛋白质、肽和 / 或脂质释放聚糖且从所述蛋白质、肽和 / 或脂质分离所述释放聚糖；  
将所述蛋白质、所述肽、所述脂质和 / 或所述聚糖进行质谱分析以得到质谱；  
通过基于所述质谱确定各样品的感兴趣的所述聚糖的相对丰度确定所述化合物的活性。

33. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中所述化合物为分化剂或多种分化剂的混合物。

34. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中所述化合物为药物。

35. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中所述化合物为嫌疑毒素。

36. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中所述调节步骤包括将所述细胞暴露于感兴趣的微生物以确定所述微生物对所述调节样品中聚糖的影响。

37. 根据权利要求 36 所述的方法, 其中所述微生物为细菌、病毒或真菌。

38. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中所述调节步骤包括将所述细胞暴露于一种或多种调节的培养条件以评估调节的培养条件对细胞的产生的影响。

39. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中在所述分离步骤后, 所述蛋白质消化为多个肽。

40. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中将所述蛋白质和 / 或脂质进一步分离为结合至聚糖的蛋白质和 / 或脂质和无聚糖的蛋白质和 / 或脂质。

41. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中所述聚糖从所述蛋白质释放和分离。

42. 根据权利要求 32-41 中任一项所述的方法, 其中将所述聚糖除了进行质谱分析还进行 NMR 分析。

43. 根据权利要求 32-42 中任一项所述的方法, 还包括从所述质谱确定感兴趣的所述聚糖的结构步骤。

44. 根据权利要求 39 所述的方法, 其中所述肽进一步分离为包含聚糖的肽和不含聚糖的肽。

45. 根据权利要求 44 所述的方法, 其中所述包含聚糖的肽进行质谱分析以确定所述聚糖的肽结合位点。

46. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中将所述分离的脂质进一步分离为包含聚糖的脂质和不含聚糖的脂质。

47. 根据权利要求 39 所述的方法, 其中所述蛋白质用蛋白水解酶消化。

48. 与对照样品相比, 确定制备条件对调节样品中一种或多种感兴趣的聚糖的丰度的影响的方法, 其包括:

在进一步包含  $^{15}\text{N}$ - 谷氨酰胺的第一培养基中培养待调节的第一生物样品;

将对照样品在与所述第一培养基相同且进一步包含  $^{14}\text{N}$ - 谷氨酰胺的第二培养基中培

养；

在调节条件下培养所述第一样品；

加工所述第一样品和所述对照样品以从它们提取蛋白质和 / 或脂质；

在所述加工步骤后从所述样品分离所述蛋白质和 / 或脂质；

任选将所述蛋白质消化为多个肽；

任选从所述蛋白质、肽和 / 或脂质释放聚糖且从所述蛋白质、肽和 / 或脂质分离所述释放聚糖；

将所述蛋白质、所述肽、所述脂质和 / 或所述聚糖进行质谱分析以得到质谱；

基于所述质谱确定所述样品中感兴趣的所述聚糖的相对丰度以确定所述调节条件的影响。

49. 根据权利要求 48 所述的方法,其中所述调节条件为不用于对照样品的分化剂或分化剂的混合物的浓度的变化。

50. 根据权利要求 48 所述的方法,其中所述调节条件为不用来培养对照样品的一段时间或温度。

51. 根据权利要求 48 所述的方法,其中所述调节条件为不用于培养对照样品的所述培养基成分或添加剂,或所述培养基成分的浓度。

52. 根据权利要求 48-51 中任一项所述的方法,其中在所述分离步骤后,所述蛋白质消化为多个肽。

53. 根据权利要求 48-51 中任一项所述的方法,其中将所述蛋白质和 / 或脂质进一步分离为结合至聚糖的蛋白质和 / 或脂质和无聚糖的蛋白质和 / 或脂质。

54. 根据权利要求 48-51 和 53 中任一项所述的方法,其中所述聚糖从所述蛋白质释放和分离。

55. 根据权利要求 48-54 中任一项所述的方法,其中将所述聚糖除了进行质谱分析还进行 NMR 分析。

56. 根据权利要求 48-55 中任一项所述的方法,还包括从所述质谱确定感兴趣的所述聚糖的结构步骤。

57. 根据权利要求 52 所述的方法,其中所述肽进一步分离为包含聚糖的肽和不含聚糖的肽。

58. 根据权利要求 57 所述的方法,其中所述包含聚糖的肽进行质谱分析以确定所述聚糖的肽结合位点。

59. 根据权利要求 53 所述的方法,其中将所述分离的脂质进一步分离为包含聚糖的脂质和不含聚糖的脂质。

60. 根据权利要求 60 所述的方法,其中所述聚糖从所述包含聚糖的脂质释放和分离。

61. 根据权利要求 52 所述的方法,其中所述蛋白质用蛋白水解酶消化。

## 用于定量糖组学的体内同位素标记方法

### 发明领域

[0001] 本发明涉及同位素标记聚糖和促进生物细胞的糖组学 (glycomic) 组合物的高通量定量 / 比较分析的方法。

[0002] 优先权要求和资金支持

[0003] 本申请要求 2007 年 10 月 29 日提交的美国临时申请流水号 61/000,920 的优先权,其名称为“IDAWG A novel quantitative method for glycomics-IDAWG”,其整个内容以其整体在此引入作为参考。

[0004] 本发明得到政府的支持,其资金号为 NIH/NCRR 5P41RR018502 和 NIH/NIDDK 1R01DK075069,由 NIH 授予。因而,美国政府对本发明具有某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] 已开发了一系列策略以用于大规模体系的高通量 (throughput) 定量 / 比较分析,以使得可比较不同生物状态之间各种分子的表达水平。在 - 组学领域,蛋白质组学领域使用的技术可能是最成熟的,且可广泛细分为两个一般流程 - 涉及使用标记的方法和不使用标记的方法。在不使用标记的方法中,肽 / 蛋白质的不同方面,如标准化的离子强度、光谱计数、质量、扫描数和信号强度,以及精确质量加保留时间已成功用于指定蛋白质表达水平以进行对比研究<sup>1-4</sup>。然而,各分析物的离子化效率取决于以下因素,如其分子量、质子 / 阳离子亲和力、表面活性、与分析物的离子化竞争或干扰分析物的离子化的其它化合物的存在等,因此离子的强度不直接与浓度相关。此外,仪器的响应可随时间改变,因此源自两项或更多项分析的数据的直接比较可产生显著不同的结果。相对定量的备选策略通过同时分析几对同位素标记的群体克服了这些问题,其提供了以下优点,即重和轻标记的肽对在完全相同的条件下分析,使得可直接比较该肽的相对丰度。同位素标记的群体之间的相对定量通过计算轻和重单同位素峰的面积或强度的比例而进行。

[0007] 已开发了众多策略用于将稳定的同位素引入蛋白质群体<sup>5-12</sup>。例如,同位素 - 编码的亲标签 (ICAT) 化学靶向肽序列中的特定氨基酸,通常为半胱氨酸,用于差别标记<sup>5</sup>。其它体外方法也靶向多肽的官能团<sup>6,8-12</sup>。也可通过代谢标记将稳定的同位素引入生物体系。例如,在细胞培养物中用氨基酸进行的稳定同位素比较 (SILAC) 提供了简单且直接的方法以在基于 MS 的蛋白质组学之前向蛋白质体内引入同位素标记物<sup>7</sup>。在 SILAC 实验中,两个细胞群在培养基中生长,该培养基相同除了其中之一包含“轻”而另一个包含“重”形式的特定氨基酸 (例如 <sup>12</sup>C 和 <sup>13</sup>C 标记的赖氨酸和精氨酸)。将该标记的氨基酸类似物代替天然氨基酸供给培养中的细胞,且其实现掺入所有新合成的蛋白质。在大量细胞分裂后,特定氨基酸的各实例由其同位素标记的类似物替换。该方法优于体外方法的一个优点为,在细胞裂解后细胞立即混合在一起。因此,来自两种类型细胞的蛋白质在样品处理、消化、纯化等过程中都经受完全相同的实验条件,其消除了当样品以平行方式分开处理时会发生的差别损耗。因此,SILAC 通常被认为是定量蛋白质组学分析的“黄金标准”<sup>13</sup>。

[0008] 比较糖组学的领域不像蛋白质组学一样成熟;然而多种定量的蛋白质组学工具已适用于糖组学分析。例如,总离子作图 (total ion mapping) (TIM) 为不使用标记的方法,

其基于碎片离子强度的总和确定聚糖个体相对样品中所有聚糖总量的流行率和百分数,且有些方面类似于蛋白质组学使用的不使用标记的方法<sup>14</sup>。体外同位素标记也已通过众多团队进行了开发。对于N-连接的聚糖和游离寡糖,已得到多种含同位素的标签以标记还原端<sup>15-18</sup>。O-连接的聚糖通常通过 $\beta$ -消除从蛋白质主链释放,因此不适合这些方法。然而,已开发了依赖 $\beta$ -消除以将质量标记引入聚糖的定量方法<sup>19</sup>。比较同位素标记寡糖的另一种建议的方法依赖于标准全甲基化过程中的重碘甲烷(<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>, <sup>12</sup>CDH<sub>2</sub>, <sup>12</sup>CHD<sub>2</sub>, 和 / 或 <sup>12</sup>CD<sub>3</sub>) 相对轻碘甲烷(<sup>12</sup>CH<sub>3</sub>) 的标记,其为MS分析N-连接的和O-连接的聚糖之前常用的衍生化步骤(<sup>14,20,21</sup>)。此外,已为N-和O-连接的聚糖开发了同量异位(isobaric)标记策略,其使用用<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>和<sup>12</sup>CDH<sub>2</sub>进行的全甲基化,且对于异构混合物中存在的聚糖个体的定量特别有用<sup>22,23</sup>。所有这些体外方法对于糖组学是有用的工具。

[0009] 附图简述

[0010] 图1A图示了己糖胺生物合成途径,其将糖醇解中间体果糖-6-磷酸转化为UDP-GlcNAc。

[0011] 图1B显示用于在有或没有重Gln的情况下标记鼠ES细胞,然后从蛋白质分离N-和O-连接的聚糖用于质谱分析的分离和分析步骤的流程图。

[0012] 图2显示从在<sup>14</sup>Gln或<sup>15</sup>NGln中生长的mESCs释放的全甲基化的N-连接的聚糖的全光谱。

[0013] 图3显示对由GlcNAcsMan<sub>7</sub>聚糖产生的双电荷分子离子(M+2Na)<sup>2+</sup>的更密切的检查,其出现在距<sup>14</sup>N和<sup>15</sup>NGln培养基中生长的聚糖的1005.5和1006.5m/z单位处。

[0014] 图4A和4B显示重和轻标记的核心岩藻糖基化的、完全唾液酸化的(fullysialyated)、双触角N-连接的聚糖的碎裂显示的碎片与<sup>15</sup>N-掺入Neu5Ac以及核心和触角GlcNAc残基一致。

[0015] 图5A-F说明将<sup>15</sup>N掺入到O-聚糖中包含的所有氨基糖中,对于包含GlcNAc和Neu5Ac的O-Man引发的聚糖、包含GlcNAc的O-GalNAc引发的结构和含两个Neu5Ac残基的O-GalNAc引发的结构显示碎裂后重和轻分离的样品的MS/MS光谱。

[0016] 图6显示表1,其表明按照本文所述的本发明<sup>15</sup>N标记N-聚糖的高标记效率。

## 发明内容

[0017] 本发明涉及同位素标记聚糖的方法。该方法用于促进生物物质(尤其包括细胞和组织)的糖组学组合物(glycomic compositions)的高通量定量/比较分析。

[0018] 本发明涉及利用对细胞培养物中聚糖进行稳定的同位素(<sup>15</sup>N)标记以进行相对定量的糖组学的方法。该方法称为用谷氨酰胺同位素检测氨基糖(IDAWG),其依赖于己糖胺的生物合成途径,该合成途径使用谷氨酰胺的侧链作为其在糖核苷酸的产生中氨基糖的氮的唯一供体源。因此,例如,向其它无Gln的培养基引入重谷氨酰胺(<sup>15</sup>N)(作为单体、二聚或多聚的谷氨酰胺和它们药学可接受的盐)可使得所有氨基糖被标记且质量位移+1道尔顿。

[0019] 本发明涉及用于重(同位素)标记细胞或组织培养物中的复合糖的体系以促进定量的糖组学。该方法依赖于以下事实,即众多细胞或组织培养物体系需要添加内源性Gln,且Gln是己糖胺生物合成途径中氨基糖的唯一氮供体。因此,假设且显示,如果在培养基中使用在侧链(酰胺基)具有<sup>15</sup>N的重Gln,则包含GlcNAc、GalNAc和唾液酸的复合糖快速将

重氮掺入这些单糖的每一种中。然后将重谷氨酰胺中生长的细胞、组织和其它生物物质分离、提取等以得到包含聚糖的肽和脂质,将它们定量和定性分析。该方法可用于评判聚糖半衰期,在两份细胞或组织培养物样品之间进行相对定量,并辅助聚糖检测、表征(聚糖的类型以及任选的聚糖缀合的肽或脂质的类型)和验证。因此,使用本方法,可测定分化、疾病或病症、药物、激素或环境因素对聚糖的数量和质量的影响并诊断性和治疗性使用以辨别分化过程中聚糖的变化,诊断疾病状态,监测治疗和测定药物、激素和环境对生物物质尤其是培养的细胞和组织的活性。

[0020] 因此,本发明涉及用  $^{15}\text{Gln}$  精确比较在生物物质尤其是细胞和组织中的聚糖水平的方法,其使用对生物物质,尤其是蛋白质和脂质上的糖基(聚糖)的质谱分析和同位素标记以及任选的核磁共振( $^{15}\text{N}$  为顺磁的)。

[0021] 在一方面,本发明允许快速地和几乎完全地将  $^{15}\text{N}$  掺入各种哺乳动物细胞和组织培养物体系中 N-连接的和 O-连接的聚糖的 GlcNAc、GalNAc 和唾液酸。除了通过 LC-MS<sup>n</sup> 和任选的 NMR 方法辅助指定结构(肽或脂质上局部的和聚糖的结构),该方法还可确定从样品分离的聚糖是从细胞过程还是血清糖蛋白获得的。重要地是,该方法还可以定量方式在两个细胞群之间比较聚糖。而且,可通过将细胞群从重标记条件转换为轻标记条件且随后在多个时间点收获且通过 LC-MS<sup>n</sup> 方法分析聚糖而对聚糖结构进行半衰期研究。因此,本发明是糖组学工具箱中易于使用且强大的新颖工具。注意到因为  $^{15}\text{N}$  为顺磁的原子,使用质谱分析的分析可以用聚焦于  $^{15}\text{N}$  的 NMR 研究来补充。

[0022] 因为糖基化在多种生理和病理生理过程中起主要作用,本发明的使用非常宽且尤其包括以下方法:

[0023] 1. 在胚胎/成人干细胞分化或任何其它类型的分化(前脂肪细胞(preadipocytes)至脂肪细胞,神经元先祖(progenitor)分化,等)后定义和定量糖组/糖蛋白组(glycoproteome)中的变化。该方法在分化过程中具有具体的适用性且可用于促进各种多能干细胞和祖细胞以及各种前体细胞的产生和方法,包括使用和包含特定类型和浓度的分化剂;

[0024] 2. 在疾病进展(诱导胰岛素耐受性(II型糖尿病)、肿瘤发生和转移潜力(癌症),等)时定义、定量和/或定性糖组/糖蛋白组中的变化。该方面可具体用于诊断疾病或监测疾病状态的进展,包括代谢综合征,I和II型糖尿病,肥胖症,心血管疾病和损伤,神经发育疾病,神经病(包括阿尔茨海默病和帕金森病),等;

[0025] 3. 在药物/小分子处理时定义和定量糖组/糖蛋白组的变化。该方面可具体用于测试药物作为细胞活性和生物功能的抑制剂/激动剂/调节剂的效能,且该活性和功能涉及聚糖产生;

[0026] 4. 定义和定量蛋白质(O-GlcNAc)的细胞内糖基化的变化,已显示该蛋白质(O-GlcNAc)在II型糖尿病、 $\tau$ 病如阿尔茨海默病和帕金森疾病、心血管损伤等中涉及。该方面可具体用于确定治疗干预在多种疾病状态/症状中的适合性;

[0027] 5. 在培养基或条件变化(为单克隆抗体或重组蛋白质产生和相关的生物产物和细胞样品按比例放大)时定义和定量糖组/糖蛋白组的变化。

[0028] 因此本发明提供以下的一项或多项:

[0029] 1. 在细胞或组织培养物中稳定的同位素标记以进行相对定量的糖组学/糖蛋白

组学实验 (A 对 B) (类似于蛋白质组学的 SILAC)。

[0030] 2. 使得细胞 / 组织中合成的糖组学结构与来自培养基污染的聚糖 / 复合糖区别。

[0031] 3. 使得进行“脉冲追踪”实验以研究聚糖结构的半衰期。这也可用于确定在许多条件下聚糖结构随时间的变化, 以提供对于可影响聚糖结构的半衰期的条件的深入了解。

[0032] 4. 在聚糖序列测定过程中辅助指定结构。

[0033] 5. 通过快速检测 2 份样品之间的差异 (简单的全 MS 光谱) 减少糖组学工作, 以使得可进行仅表征变化的结构的工作。

[0034] 6. 将稳定的同位素差异用于 MS<sup>n</sup> 分析, 使得对某结构产生多对峰, 这有助于指定结构和允许以 MS<sup>n</sup> 方式进行统计相对定量。

[0035] 本发明涉及用于糖组学研究的体内标记策略。更具体地, 本发明考虑用谷氨酰胺同位素检测氨基糖, 且其依赖于己糖胺生物合成途径, 该合成途径使用谷氨酰胺的侧链作为其在糖核苷酸的产生中氨基糖的氮的唯一供体源。因此, 将具有 <sup>15</sup>N 标记的侧链 (酰胺 -<sup>15</sup>N-Gln) 的谷氨酰胺引入无 Gln 的培养基可使得所有氨基糖, 包括 GlcNAc、GalNAc 和唾液酸, 变成用 <sup>15</sup>N 标记的。通过以此方式掺入 <sup>15</sup>N, N- 和 O- 连接的聚糖、糖脂和细胞外基质多糖的质量 (其都应每氨基糖增加 +1 道尔顿单位), 可进行测量和分析。因为 <sup>15</sup>N 为顺磁的且可适应 NMR 研究, 质谱分析数据可用 NMR 数据补充。本发明人通过分析轻和酰胺 -<sup>15</sup>N-Gln 中生长的鼠胚胎干细胞的蛋白质释放的 N- 连接的和 O- 连接的聚糖阐述了该方法的功用。本文提供的这些实验的成功清楚表明本方法可在细胞培养物中用于多种比较糖组学研究。

[0036] 本发明为细胞培养物体系中聚糖提供了易于实施且强大的同位素标记策略。本方法依赖于以下事实, 即 Gln 的酰胺侧链是己糖胺生物合成途径中 UDP-GlcNAc 的唯一氮供体且 UDP-GlcNAc 为 UDP-GalNAc 和 CMP-Neu5Ac (Gc) 的生物合成底物。因此, 本发明人使用小鼠 ES 细胞证实了, 用酰胺 -<sup>15</sup>N-Gln 代替正常 Gln 补充物可使得在 72 小时标记策略内对 N- 连接的和 O- 连接的聚糖的 GlcNAc、GalNAc 和 NeuAc 残基进行几乎完全的同位素标记。

[0037] 本发明提供了两份样品间的从蛋白质和脂质释放的聚糖的稳固的定量。而且, 该技术提供适用于直接检测和定量糖肽的标记策略。该策略在检查对于从轻和重 Gln- 标记的细胞培养物体系分离的蛋白质的动态 O-GlcNAc 修饰<sup>30</sup> 中得到证实。<sup>15</sup>N-Gln 也掺入蛋白质, 但如预期一样没有观察到其它重氨基酸, 该观察结果提供了一种标记策略, 其可单独使用或与重 Arg/Lys SILAC<sup>7</sup> 分析组合使用以定量均来自相同样品集的聚糖、蛋白质和糖蛋白 / 糖肽。本方法也可用于定性 (qualify) 糖基化和确定蛋白质和脂质上的糖基的结合位点。最后, 本方法可以计算样品中所有含氨基糖的聚糖的半衰期, 其通过首先完全标记样品, 然后以一个或多个间隔用轻 Gln 代替重 Gln 并按时间过程分离和分析样品。因此, 本方法提供了强大的新的定量和定性的工具, 以研究细胞培养物体系中聚糖、糖蛋白和糖脂的生物作用。

[0038] 在本发明一个实施方案中, 公开了用于比较一份或多份生物物质, 优选细胞或组织 (包括活细胞) 样品中聚糖的相对丰度的方法, 其中样品之一已经通过暴露于处理进行了调节, 该处理如分化, 药物, 激素, 细菌或病毒, 或刺激, 如化学刺激或环境刺激。在本发明该方面, 生物物质 (尤其是, 细胞或组织) 的第一样品在含重谷氨酰胺 (<sup>15</sup>N 谷氨酰胺) 的第一培养基中培养且生物物质的第二样品在含轻谷氨酰胺 (<sup>14</sup>N 谷氨酰胺) 的第二培养基中培养。将该样品之一 (优选暴露于重谷氨酰胺的样品, 进行调节), 然后将该样品裂解、提

取以取出蛋白质和 / 或脂质, 且剩余的 ( 未提取的 ) 蛋白质和 / 或脂质任选进一步分离为包含聚糖的蛋白质和 / 或脂质, 然后暴露于 PNGaseF 处理和  $\beta$ -消除以从样品中包含的蛋白质和 / 或脂质中释放聚糖。可使用本领域可用的标准方法从聚糖中去除蛋白质和 / 或脂质, 包括液相色谱法 ( 例如反相 HPLC ), 然后将聚糖样品通过质谱分析和任选的 NMR 进行分析, 以确定样品中发现的聚糖的数量和类型。对于对照样品进行相同的过程和实施相应分析 ( 如果使用重谷氨酰胺而非轻谷氨酰胺在生长过程中接触对照样品, 则主要为 MS, 但任选 NMR ), 且对聚糖进行定量和定性。将调节样品所得的结果与对照样品所得的结果进行比较以确定该调节对聚糖数量和质量具有的影响。

[0039] 如所指示的, 调节可采取前体细胞分化为更成熟的细胞的形式以确定分化对聚糖含量和类型的影响、疾病状态或异常状况对细胞或组织的作用 ( 诊断 ), 药物或其它小分子对细胞 ( 正常的、患病的或显示症状的 ) 的影响, 以确定药物或小分子的活性, 相对于正常的对照细胞监测患病或异常细胞 ( 显示待治疗的症状 ) 的治疗, 和确定按照制备过程的培养条件对细胞产生的影响。

[0040] 如所指示的, 也可以在重谷氨酰胺中培养各样品以不仅提供用于对聚糖残基进行质谱分析的便利, 而且提供受调节的生物物质和对照物的聚糖结构的进一步的相关信息。

[0041] 聚糖的分析可对分离的聚糖或聚糖结合的蛋白质或脂质进行。因此, 在该方面, 受调节的生物物质和 / 或对照材料的较小的样品可从剩余样品分离, 且包含聚糖的蛋白质或脂质可直接通过  $MS^n$  和任选的 NMR 分析以提供与结合至蛋白质和 / 或脂质的聚糖和聚糖结合的蛋白质和 / 或脂质的类型和量相关的信息。本发明另一方面包括在  $MS^n$  分析和任选的 NMR 分析之前使用例如, 蛋白酶或脂酶将蛋白质或脂质暴露于消化, 以确定聚糖 - 蛋白质或聚糖 - 脂质结合位点。

[0042] 如所讨论的, 聚糖从蛋白质和 / 或脂质释放, 其任选使用本领域的标准技术消化 ( 例如, 对 N- 和 O- 连接的聚糖分别为 PNGaseF 处理和  $\beta$ -消除 )。该释放的聚糖然后使用  $MS^n$  ( 例如, 线离子阱质谱仪或兼性 ( hybrid ) 线离子阱质谱仪 ) 和任选的 NMR 分析进行分析。确定聚糖的总含量和 / 或使用本领域可用的标准方法 ( 例如碎裂规则和 glycoworkbench ( 参见 [dkfz-heidelberg.de/spec/EUROCarbDB/GlycoWorkbench/](http://dkfz-heidelberg.de/spec/EUROCarbDB/GlycoWorkbench/) ) 以及 NMR 分析 ) 作出聚糖结构的结构确定。此外, 发生糖基化的蛋白质和 / 或多肽和脂质也可使用此技术 ( 从质谱分析确定结合至糖基的多肽和 / 或脂质 ) 和类似技术 ( 例如, 从不具有糖苷连接的脂质和蛋白质分离出所有具有糖苷连接的脂质和蛋白质, 然后在该群中辨别蛋白质、多肽和脂质 ) 确定。然后将所得结果与对照群获得的结果进行比较, 根据分析的目的, 其可表示其它方面与含轻谷氨酰胺的细胞培养基中生长的分析的细胞群相同的对照细胞群, 或者, 该对照群可为前体群、正常细胞群 ( 如果要检查疾病状态 ) 或有或没有重谷氨酰胺的情况下生长的其它群中的一种或多种。根据使用的对照群和细胞生长条件, 也获得对照群的糖苷含量, 然后与调节群比较。

[0043] 或者, 且优选地, 可将样品 ( 调节样品和对照 ) 合并且可将相同步骤用于合并的样品, 使得糖基化的蛋白质和 / 或糖基化的脂质被收获 / 分离, 任选消化, 并暴露于  $MS^n$  和任选的 NMR, 以提供与蛋白质和 / 或脂质上的聚糖的程度、类型和结合位点相关的信息。在本发明该方面, 调节样品或对照样品 ( 优选地, 调节样品 ) 在重谷氨酰胺的存在下生长且另一样品在轻谷氨酰胺的存在下生长, 将样品合并且如上所述进行合并的样品的分析。使用该方

法,实验处理量明显增加且产生的 MS 数据可提供同位素比例,其可使得在单一合并的(汇聚的)和分析的样品中在调节样品和对照样品之间进行直接比较。

[0044] 在本发明某些方面,将该分离的蛋白质或脂质(其可进行或不进行消化)进行质谱分析以得到质谱。细胞群中同位素质量的不同对于质谱中各蛋白质、肽、脂质和/或聚糖导致两种独特的、紧密间隔的峰(取决于样品如何被加工)。质谱中的一个峰相应于来自具有正常同位素(轻谷氨酰胺)的合并的样品的蛋白质、肽、脂质或聚糖。另一峰相应于来自富含重谷氨酰胺的样品的蛋白质、肽、脂质和/或聚糖。在质谱中的至少一对峰的峰强度之间计算比例。各样品中聚糖(结合至蛋白质、肽或脂质的或自蛋白质、肽或脂质释放的)的相对丰度可基于计算的比例确定。聚糖可通过质谱中峰的质荷比,以及本领域已知的其它手段,尤其包括 NMR 分析而鉴别。

[0045] 因此,两份样品的效果可通过用含重谷氨酰胺的培养基制备另外的样品,且调节并分析该另外的样品而同时分析。到质谱分析时,该方法步骤中没有一步将包含重谷氨酰胺的聚糖与包含轻谷氨酰胺的聚糖区分。因此,保持了来自两份样品的聚糖的原始量的比例,对样品中蛋白质的提取和分离之间的差异进行标准化。

[0046] 尽管已良好建立了对于释放的、全甲基化的聚糖的结构鉴别,但本发明允许鉴别中增加的置信度,因为观察到的轻和重碎片之间  $m/z$  的位移必须相应于提出的结构中氮的数目。而且,置信度在碰撞诱导的解离后的串联 MS/MS 光谱中获得,因为来自轻和重样品的指定的碎片离子也必须包含确切数目的氮,其基于校正的  $m/z$  位移。最后,将重和轻的光谱进行比较可使人们由那些包含氨基糖的聚糖或聚糖碎片的噪声在全 MS 光谱和碎裂光谱中描绘完整的聚糖。

[0047] 发明详述

[0048] 以下术语用于限定本发明。在术语在本文中沒有具体限定的情况下,该术语应与本领域技术人员会使用的、本发明的一个或多个方面所使用的语境中的意思一致。

[0049] 除非另有所述,本文使用的术语应理解为相关领域普通技术人员的常规用法。除了下文提供的术语的定义,也可使用分子生物学和生物化学中的常用术语的定义,例如参见 Rieger 等人,1991 *Glossary of genetics: classical and molecular*, 5th Ed., Berlin: Springer-Verlag; 及 *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel 等人, Eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1998 增刊)。应理解如在说明书和权利要求中所使用的,根据其使用的环境,“一个”或“一种”可理解为一个/种或多个/种。因此,例如,关于“一个/种细胞”可理解为可使用至少一个/种细胞。

[0050] 本文使用的术语“患者”或“受试者”是指动物,包括人,对于该动物可提供本发明的治疗、诊断或其它特征,或本发明的治疗、诊断或其它特征与该动物相关。

[0051] 所用的术语“生物物质”、“细胞”和“组织”是指培养的生物细胞或组织,包括特别是,培养的人细胞、微生物细胞,组织,器官,且可包括为了诊断从整体动物获得的组织。在优选方面,生物物质主要为在培养物中生长的细胞或组织。

[0052] 术语“调节”用于描述非对照实验条件,对该非对照实验条件使用本发明确定对生物物质的影响和分析。调节条件与对照条件相对比。调节条件可包括将细胞暴露于分化条件、药物、激素、环境条件、疾病状态和异常条件以评估相比于正常细胞该调节对细胞的糖

组学的影响。“受调节的”生物样品或“受调节的细胞或组织”是那些暴露于实验（非对照）条件以评估相比于对照样品那些条件对细胞的影响的细胞或组织。“调节剂”是一种试剂，其通常添加至培养基以按本文别处所述调节所述细胞。该调节剂可为分化剂、药物、激素、另一化学品（包括嫌疑毒素 (suspected toxin)）、环境条件、制造条件、或引起疾病状态的因子如微生物。

[0053] 术语“糖基化”用于描述一种过程，其中与糖基的连接的形成发生在蛋白质（多肽）和脂质上。“N-连接的糖基化”基于寡糖，通常（但不唯一）在长醇-脂质平台上合成，通过与多肽序列中的苏氨酸或丝氨酸间隔靠近的氨基酸天冬酰胺连接至蛋白质。相反，O-连接的糖基化基于寡糖基团通过丝氨酸或苏氨酸的羟基直连接至蛋白质。

[0054] 糖基化是将糖添加至蛋白质和脂质的过程或结果。该过程为在膜和分泌的蛋白质的合成中4个主要的共翻译和翻译后修饰步骤中的一个，且粗ER中合成的大多数蛋白质经历糖基化。其为酶-定向的位点特异的过程，与糖化的非酶促化学反应相对。如上所述，存在两种类型的糖基化：至天冬酰胺侧链的酰胺氮的N-连接的糖基化和至丝氨酸和苏氨酸侧链的羟基氧的O-连接的糖基化。

[0055] 附着至靶蛋白的多糖链有多种功能。例如，一些蛋白质只有在首先将它们糖基化后才正确折叠。而且，在蛋白质中连接在天冬酰胺的酰胺氮上的多糖对一些分泌的糖蛋白赋予稳定性。一些实验显示该情况下糖基化不是适当折叠所严格要求的，但未糖基化的蛋白质快速降解。糖基化可在细胞-细胞粘附中（免疫系统的细胞使用的机理），以及分化过程中起作用。

[0056] 对于糖基化有多种机理，尽管它们都具有一些共同的特征。糖基化为酶促的过程，供体分子为活化的核苷酸糖且该过程为位点-特异的。

[0057] N-连接的糖基化对一些真核蛋白质的折叠是重要的。N-连接的糖基化过程在所有真核生物中发生。对于N-连接的寡糖，14-糖前体（长醇）首先添加至靶蛋白的多肽链中的天冬酰胺。该前体的结构是大多数真核生物共有的，且包含3个葡萄糖，9个甘露糖，和2个N-乙酰基葡萄糖胺分子。一组复杂的反应将该分支的链附着至称为长醇的载体分子，且然后随着其移位至ER内腔中，其被转移至多肽链上合适的点。

[0058] 存在两种主要类型的N-连接的糖：高-甘露糖寡糖和复合寡糖。高-甘露糖实质上仅为两个N-乙酰基葡萄糖胺，其具有许多甘露糖残基，通常几乎与其连接至蛋白质之前在前体寡糖中观察到的一样多。

[0059] 复合寡糖如此命名是因为它们可包含几乎任何数目的其它类型的糖，包括多于初始的两个N-乙酰基葡萄糖胺。蛋白质可通过这两种类型的寡聚物 (oligos) 在蛋白质的不同部分糖基化。认为寡糖是高-甘露糖还是复合物取决于其对高尔基体中的糖修饰蛋白质的可及性 (accessibility)。如果糖相对难接近，其最有可能保持其原始高-甘露糖形式。如果其是易接近的，则很可能许多甘露糖残基将会切割掉，且糖将会如上述讨论的通过添加其它类型的基团而进一步修饰。

[0060] 寡糖链通过寡糖基转移酶附着至三肽序列 Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr 中出现的天冬酰胺，其中 X 可为任何氨基酸，除了脯氨酸。该序列已知为糖基化 sequon。附着后，一旦蛋白质正确折叠，三个葡萄糖残基从链去除，且可使得蛋白质从 ER 输出。然后将如此形成的糖蛋白运送至高尔基体，在那里可发生进一步的甘露糖残基的去除。然而，糖基化本身似乎

对于蛋白质的正确运送靶向不像人们想的那样是必需的。涉及阻断某些糖基化中步骤的药物或糖基化酶缺陷的突变体细胞的研究,仍然产生正确靶向的其它方面结构上 - 正常的蛋白质,且这种干涉似乎不严重干扰细胞的活力。成熟的糖蛋白可包含许多含 5 至 9 个甘露糖残基的寡甘露糖 N- 连接的寡糖。进一步去除甘露糖残基导致包含 3 个甘露糖和 2 个 N- 乙酰基葡萄糖胺残基的 ' 核心 ' 结构,然后可将其用许多不同的单糖伸长,该单糖包括半乳糖、N- 乙酰基葡萄糖胺、N- 乙酰基半乳糖胺、岩藻糖和唾液酸。

[0061] O- 连接的糖基化在蛋白质加工的后期发生,很可能在高尔基体中。这是通过酶 UDP-N- 乙酰基 -D- 半乳糖胺 : 多肽 N- 乙酰基氨基半乳糖基转移酶 (EC2. 4. 1. 41) 向丝氨酸或苏氨酸残基添加 N- 乙酰基 - 半乳糖胺,然后是其它碳水化合物 ( 如半乳糖和唾液酸 )。该过程对于某些类型的蛋白质如蛋白聚糖是重要的,其涉及向初始未糖基化的 " 蛋白聚糖核心蛋白质 " 添加糖胺聚糖链。这些加成物通常为丝氨酸 O- 连接的糖蛋白,其看起来具有两项主要功能中的至少一项。一项功能包括分泌以形成细胞外基质的成分,通过蛋白聚糖的大的糖复合物之间的相互作用将一个细胞粘附至另一个。另一项主要功能为作为粘膜分泌物的成分,且正是高浓度的碳水化合物倾向于给予粘液其 " 粘质的 " 感觉。血液中循环的蛋白质在正常情况中不是 O- 糖基化的,除了某些类型的抗体 (IgA1 和 IgD) 和 C1- 抑制剂。

[0062] O- 岩藻糖在 Notch 蛋白质中的 EGF 样重复的第二和第三保守半胱氨酸之间添加,且可能通过 GDP- 岩藻糖蛋白质 O- 岩藻糖基转移酶 1 为其它底物,且通过 GDP- 岩藻糖蛋白质 O- 岩藻糖基转移酶 2 添加至血小板反应蛋白重复。在 EGF 样重复的情况下, O- 岩藻糖可通过按序添加 N- 乙酰基葡萄糖胺 (GlcNAc)、半乳糖和唾液酸进一步伸长为四糖,而对于血小板反应蛋白重复,可通过添加葡萄糖伸长为二糖。这些岩藻糖基转移酶都已定位至内质网,这对于糖基转移酶是不寻常的,大多数糖基转移酶在高尔基体中起作用。O- 葡萄糖在 Notch 蛋白质中的 EGF 样重复的第一和第二保守半胱氨酸之间添加,且可能通过未鉴别的 O- 葡萄糖基转移酶为其它底物。

[0063] 将 O-N- 乙酰基葡萄糖胺 (O-GlcNAc) 通过 O-GlcNAc 转移酶添加至丝氨酸或苏氨酸。O-GlcNAc 似乎出现在其它情况中可通过丝氨酸 / 苏氨酸激酶磷酸化的丝氨酸和苏氨酸上。因此,如果发生磷酸化,则 O-GlcNAc 不会出现,且反之亦然。这是一个重要的发现,因为磷酸化和 / 或脱磷酸已成为调节细胞内的信号转导的重要指示。

[0064] 糖基化的另一形式为 GPI 锚。这种形式的糖基化发挥将蛋白质通过聚糖链附着至疏水脂质锚的功能 ( 也可参见异戊烯化 ), 在细胞表面上很常见。

[0065] 本文使用的术语 " 氨基糖 " 广泛地指任何包含氨基以代替羟基的糖。含胺的糖的衍生物,如 N- 乙酰基葡萄糖胺和唾液酸,尽管不明确地包含胺,也可认为是氨基糖。本文使用的术语 " 氨基糖 " 可特别指具有氨基或取代的氨基以代替非糖苷羟基的单糖。氨基糖包括,葡萄糖 -N- 乙酰基 (GlcNAc), 半乳糖 -N- 乙酰基 (GalNAc) 和唾液酸,其为本发明的代表性氨基糖。

[0066] 本文使用的术语 " 聚糖 " 或 " 糖基 " 表示多糖或寡糖。本文使用的术语 " 聚糖 " 或 " 糖基 " 也是指复合糖 (glycoconjugate), 如糖蛋白、糖脂或蛋白聚糖的碳水化合物部分。聚糖可为单糖残基的均聚物或杂聚物且可为线性或分支的。

[0067] 本文使用的术语 " 复合糖 " 是指与其它化学物质共价连接的碳水化合物。在糖蛋

白或蛋白聚糖中,聚糖连接至蛋白质或多肽。在糖脂或脂多糖中,聚糖连接至脂质。

[0068] 本文使用的术语“糖组学”是指对给定细胞类型或有机体的所有聚糖结构或糖组(有机体的整个糖补集(complement),无论是游离的还是在更复杂的分子中存在)的系统研究,包括遗传、生理、病理以及其它方面。糖组学,类似于基因组学和蛋白质组学的术语,是“糖组”(有机体的整个糖的补充(complement),无论是游离的还是在更复杂的分子中存在)的综合研究,包括遗传、生理、病理以及其它方面。糖组学”是给定细胞类型或有机体的所有聚糖结构的系统研究”。因此有机体中碳水化合物的整体性的身份统称为糖组。

[0069] 在本说明书中使用的术语“有效量”是描述在本发明中使用以产生预期结果的成分的浓度或量。成分的有效量是本领域普通技术人员通常知道且在本发明的方法中通常使用的那些。在本发明一个方面,同位素标记的谷氨酰胺的有效量表示待分析的细胞生长的培养基中包括的谷氨酰胺的量(约0.1至约10mM或更多,优选约0.5至5mM,约1至约3mM,约2mM)能为分析目的有效地同位素标记蛋白质和/或脂质的糖基上的氨基糖。通常,细胞培养约18-24小时(少于1天)至约1天)至约14天或更多,约24小时至约5天(120小时),约36小时至约96小时,约48小时至约84小时,约60小时至约72小时。

[0070] 在优选方面,优选<sup>15</sup>N-谷氨酰胺的高同位素富集。优选富集<sup>15</sup>N达到约90-100%水平的培养基,最优选100%富集。

[0071] 术语“细胞培养基”用于描述细胞生长培养基,在该培养基中根据本发明待分析的细胞被制备、稳定(生长),或者,从多潜能细胞或其它前体细胞,例如,干细胞(如人胚胎干细胞,成人干细胞或其它细胞)、祖细胞或其它细胞或分化细胞分为一种或多种中间的或成熟的细胞。可在本发明使用的细胞培养基是本领域熟知的且优选包含至少一种极限必需培养基加任选成分如生长因子、视黄酸、葡萄糖、非必需氨基酸、盐(包括痕量元素)、谷氨酰胺(“轻”或“重”)、胰岛素(在指明和不排除的情况中)、转铁蛋白、β-巯基乙醇和本领域熟知的和本文另外描述的其它试剂。可使用的细胞培养基包括含2%至20%(优选地,约10%)胎牛血清的细胞培养基,或对于限定的培养基不含胎牛血清和KSR,但包括例如,牛血清清蛋白)。

[0072] 可使用任何数目的细胞培养基,且其是本领域熟知的。根据待生长、稳定和/或分化的细胞类型,改变成分以最大化所需结果。DMEM/F12为优选的细胞培养基,其经常用于干细胞和/或多潜能细胞的分化和或生长。其包含10%FCS。多种其它细胞培养基也可用于本发明。本发明可用的细胞培养基是可商购的且可补充可商购的成分,该可商购的成分可获自Invitrogen Corp. (GIBCO), Cell Applications, Inc. 和 Biological Industries, Beth HaEmek, Israel, 以及众多其它商业来源。在其中前体细胞分化的优选的实施方案中,至少一种分化剂如一种或多种生长因子、视黄酸、合成剂如LY294002等多种其它试剂添加至干细胞、祖细胞或其它前体细胞生长的细胞培养基中,以促进干细胞分化为祖细胞,和祖细胞分化为胰腺内胚层细胞或肝细胞,或干细胞分化为胰腺内胚层细胞或肝细胞。本领域技术人员按照本发明将能够易于改变细胞培养基以生成祖细胞或胰腺/肝细胞。细胞分化培养基基本与细胞培养基同义且涵盖在细胞培养基之下,但在分化过程时使用,且包含细胞分化剂以将细胞分化为其它细胞。稳定培养基是一类细胞培养基,其在分化步骤之前或之后使用,以稳定细胞系以进一步使用,且有时,但不总是,与细胞通常生长的细胞培养基相同。通常,如本文所述,细胞分化培养基和稳定培养基可包括与细胞培养基基本类似的成



引入重谷氨酰胺 ( $^{15}\text{N}$ ) (作为单体、二聚或聚合的谷氨酰胺和它们药学可接受的盐) 可使得所有氨基糖变为标记的且质量位移 +1 道尔顿。

[0080] 本发明涉及用于重 (同位素) 标记细胞培养物中的复合糖的方法以促进定量的糖组学 -- 用于复合糖。该方法依赖于以下事实, 即众多细胞培养物体系需要添加内源性谷氨酰胺 (Gln), 且 Gln 是己糖胺生物合成途径中氨基糖的唯一氮供体。因此, 已确定当在培养基中使用在侧链 (酰胺) 具有  $^{15}\text{N}$  的重 Gln 时, 包含 GlcNAc、GalNAc 和唾液酸的复合糖快速将重氮掺入这些单糖的每一种中。该方法可用于评判聚糖半衰期, 在两份细胞培养物样品之间进行相对定量, 并辅助聚糖检测、表征和验证, 尤其因为其涉及分化过程细胞中的聚糖变化的影响, 包括随着细胞成熟聚糖组成的变化的影响。该方法还用于分析细胞糖基化对疾病状态和疾病进展的影响。

[0081] 在一方面, 本发明可使得快速和接近完全地将  $^{15}\text{N}$  掺入各种哺乳动物细胞培养物体系中的 N-连接的和 O-连接的聚糖的 GlcNAc、GalNAc 和唾液酸中。除了通过液相色谱法 / 质谱分析 (LC-MS<sup>n</sup>) 方法辅助指定结构, 该方法还可使我们确定从样品分离的聚糖是从细胞过程还是血清糖蛋白获得的。重要地是, 该方法可以定量方式在两个细胞群之间比较聚糖。而且, 可通过将细胞群从重标记条件转换为轻标记条件且随后在多个时间点收获且通过 LC-MS<sup>n</sup> 方法分析聚糖而对聚糖结构进行半衰期研究。因此, 本方法是糖组学工具箱中易于使用且极其强大的新颖工具。

[0082] 因为糖基化在多种生理和病理生理过程中起主要作用, 该技术的使用非常宽且尤其包括以下方法:

[0083] 1. 在胚胎 / 成人干细胞分化或任何其它类型的分化 (例如, 祖细胞至产生自祖细胞的更成熟的细胞, 前脂肪细胞至脂肪细胞, 神经元先祖分化, 等) 后定义和定量糖组 / 糖蛋白组 (glycoproteome) 中的变化。该方法在分化过程中具有具体的适用性且可用于促进各种多能干细胞和祖细胞以及各种前体细胞的产生和方法;

[0084] 2. 疾病进展 (例如, 诱导胰岛素耐受性 (II 型糖尿病)、肿瘤发生和转移潜力 (癌症), 等) 以及多种其它疾病状态如阿尔茨海默病和帕金森病和心血管损伤时定义、定量糖组 / 糖蛋白组中的变化。本发明该方面可具体用于诊断疾病或监测糖基化受影响的实际上任何疾病状态的进展;

[0085] 3. 在药物 / 小分子处理时定义和定量糖组 / 糖蛋白组的变化。该方面可具体用于测试药物作为细胞活性和生物功能的抑制剂 / 激动剂 / 调节剂的效能;

[0086] 4. 定义和定量蛋白质 (O-GlcNAc) 的细胞内糖基化的变化, 已显示该蛋白质 (O-GlcNAc) 在 II 型糖尿病、 $\tau$  病如阿尔茨海默病和帕金森疾病、心血管损伤等中涉及。该方面可具体用于确定治疗干预在多种疾病状态 / 症状中的适合性;

[0087] 5. 在培养基或条件变化 (为单克隆抗体或重组蛋白质产生和相关的生物产物和细胞样品按比例放大) 时定义和定量糖组 / 糖蛋白组的变化。该方面涉及增强细胞环境内出现的生物产品的生产能力。

[0088] 本发明的方法提供以下的一项或多项:

[0089] 1. 在细胞培养物中稳定的同位素标记以在体内进行相对定量的糖组学 / 糖蛋白组学实验 (A 对 B) (类似于蛋白质组学的 SILAC)。

[0090] 2. 使得细胞中合成的糖组学结构与来自培养基污染的聚糖 / 复合糖区别。

[0091] 3. 使得进行“脉冲追踪”实验以研究聚糖结构的半衰期。

[0092] 4. 在聚糖序列测定过程中辅助指定结构。

[0093] 5. 通过快速检测 2 份样品之间的差异（简单的全 MS 光谱）减少糖组学工作，以使其可进行仅表征变化的结构的工作。

[0094] 6. 将稳定的同位素差异用于 MS<sup>n</sup> 分析，使得对某结构产生多对峰，这有助于指定结构和允许以 MS<sup>n</sup> 方式进行统计相对定量。

[0095] 有多种使用本方法的途径。例如，一个途径为将待分析的细胞群在重谷氨酰胺细胞培养物中生长。一段时间后，收集细胞，提取，收集蛋白质和 / 或脂质且进行肽或脂质消化。使用本领域的标准技术将聚糖从消化的蛋白质和 / 或脂质释放（例如，对于 N- 和 O- 连接的聚糖分别为 PNGaseF 处理和 β- 消除）。然后将聚糖使用 MS<sup>n</sup>（例如，线离子阱质谱仪或兼性线离子阱质谱仪）和任选的 NMR 进行分析。确定聚糖的总含量和 / 或使用本领域可用的标准方法（例如碎裂规则和 glyco 工作台（参见 [dkfz-heidelberg.de/spec/EUROCarbDB/Glyco Workbench/](http://dkfz-heidelberg.de/spec/EUROCarbDB/Glyco_Workbench/)））作出聚糖结构的结构确定。此外，发生糖基化的蛋白质和 / 或多肽和脂质也可使用此技术（从质谱分析确定结合至糖基的多肽和 / 或脂质）和类似技术（例如，从不具有糖苷连接的脂质和蛋白质分离出所有具有糖苷连接的脂质和蛋白质，然后在该群中辨别蛋白质、多肽和脂质）确定。然后将所得结果与对照群获得的结果进行比较，根据分析的目的，其可表示其它方面与含轻谷氨酰胺的细胞培养基中生长的分析的细胞群相同的对照细胞群，或者，该对照群可为前体群、正常细胞群（如果要检查疾病状态）或有或没有重谷氨酰胺的情况下生长的其它群中的一种或多种。根据使用的对照群和细胞生长条件，也获得对照群的糖苷含量，然后与分析的群比较。

[0096] 尽管从释放的、全甲基化的聚糖鉴别结构是已良好建立的，但本发明允许鉴别中增加的置信度，因为观察到的轻和重峰之间 m/z 的位移必须相应于提出的结构中氮的数目。而且，置信度在碰撞诱导的解离后的串联 MS/MS 光谱中获得，因为来自轻和重样品的指定的碎片离子也必须包含确切数目的氮，其基于校正的 m/z 位移。最后，将重和轻的光谱进行比较可使人们由那些包含氨基糖的聚糖或聚糖碎片的噪声在全 MS 光谱和碎裂光谱中描绘完整的聚糖。

[0097] 在本发明优选方面，将调节样品和对照样品合并，处理且之后使用 MS 和任选的 NMR 分析进行分析。上述各步骤是相同的，除了在处理之前将对照样品和调节样品合并。用 MS 分析得到一种光谱，其提供重同位素标记的碎片与轻同位素标记的碎片的比例，且根据这些比例，可确定有关糖基化的量，存在的聚糖类型（结构）和糖基化的位点（在蛋白质、肽或脂质上）。任选使用的 NMR 数据可向糖组学分析提供进一步的输入资料。

[0098] 分化

[0099] 作为实例且不是用来限制，在为确定从前体细胞至成熟的细胞的分化过程中对糖苷含量和糖基化的蛋白质和 / 或脂质的类型和糖基化的程度的影响而进行的研究中，前体细胞在含同位素标记的谷氨酰胺的以及分化剂的细胞培养基的存在下分化（调节）为成熟的细胞。在包含轻谷氨酰胺且不含分化因子的相同培养基中生长以制备对照细胞。然后将所得分化的细胞按上述分析以确定糖基化的程度和类型以及任选的分化过程中发生糖基化的蛋白质、肽和 / 或脂质。将分化的细胞所得的结果与对照细胞进行比较，该对照细胞可在同位素标记的谷氨酰胺的存在或不存在下生长，且所得糖基化分析与分化细胞所得的

分析进行比较,从而建立糖基化的程度和类型和分化过程糖基化的蛋白质、肽和脂质。优选地,将对照细胞和分化细胞合并,一起处理和分析。所得 MS<sup>n</sup> 和任选的 NMR 分析提供的数据足以按分化细胞和前体(未分化的对照细胞)相比确定增加的/减少的糖基化的程度和类型,差别糖基化的蛋白质、肽和脂质,以及糖基化在蛋白质、肽和脂质上的位点。

[0100] 上述糖组学分析也可用于辨别会增加(例如,细胞纯度和数目)前体细胞分化至更成熟细胞的分化因子和/或细胞培养基条件。

[0101] 疾病进展/诊断

[0102] 本方法可用于通过分析发展为疾病状态或异常条件的细胞中糖组学变化确定疾病或异常条件对生物物质(细胞和/或组织)的影响。处于疾病状态或显示异常症状的细胞或组织在重谷氨酰胺的存在下在细胞培养物中生长。对照细胞(正常状态,不存在疾病或症状)也在轻谷氨酰胺的存在下在相同培养基中生长。足够时间后(如本文别处公开的,优选约 72 小时或更多),各细胞样品分开处理,或优选地,如上文进行合并并分析(MS<sup>n</sup> 和任选的 NMR)以确定疾病状态或症状对聚糖的量、类型/结构和它们与蛋白质、肽和/或脂质的结合(包括结合位点)的影响。所得结果提供了标记,其可用于诊断患者中疾病或异常条件的存在。该方法可用于诊断疾病,其通过使用本方法比较嫌疑具有疾病或异常症状的细胞样品与正常细胞以提供对各样品的糖组学分析并比较该结果而进行。该样品可分开分析,或如本文别处所述进行合并并分析。

[0103] 药物活性或毒性

[0104] 本方法也可用于确定细胞或组织暴露的药物或小分子可具有的对于细胞或组织样品的糖组学的影响。在本发明该方面,一种或多种细胞样品在含有效量的重谷氨酰胺的培养基的存在下暴露于单一浓度或不同浓度的药物或小分子。对照样品在不存在药物且包含轻谷氨酰胺的相同细胞培养基中生长。足够时间后(例如,约 72 小时或如本文别处所述),收集样品且按别处所述进行处理。各样品(包括对照样品)可进行分析以分析测试浓度的药物可对细胞或组织的糖组学产生的影响。或者,受调节的细胞样品(以单一药物浓度)可与对照样品合并且按本文别处所述进行处理以提供药物浓度对测试的细胞的糖组学的影响的指示。该方法可用于测试药物和其它小分子对于细胞的活性以及潜在毒性。

[0105] 制备/生产效率

[0106] 本方法也可用于辨别成分或条件以确定制备方法或增强细胞或组织的制备效率,尤其包括将以显著数目分化和产生的细胞或组织。在该方法中,待制备/分化的细胞样品在包含重谷氨酰胺的培养基的存在下暴露于不同培养条件(时间,温度,培养基组分,分化剂),保持与制备一致的时间(约 18 小时至几周或更多,通常约 2-5 天,取决于状况),且与对照样品制备比较,例如,最终细胞群,包括例如,从在标准分化情况下(已知时间,已知成分,已知生成的最终细胞/组织的纯度)但没有待测分化剂或其它成分且在重谷氨酰胺的存在下生长的前体细胞产生的分化的细胞群。将调节样品生长不同的时间(包括生成对照细胞的时间),且调节样品(具有测试成分和条件)使用本发明的方法在不同时间间隔分析以确定与对照样品相比分化的产物的相对效率、纯度和制备的效率。可制备多份调节样品以确定细胞/组织产物的最佳制备条件。

[0107] 聚糖半衰期

[0108] 本发明的另一应用为计算聚糖个体的半衰期。在该实验中,将细胞用酰

胺- $^{15}\text{N}$ -Gln 标记完全（持续时间范围约 24 小时至约 120 小时，优选约 60-72 小时），在该点时使用本文别处所述的方法分析细胞以提供了数量和质量的指示，包括该点时细胞的聚糖内容的结构特征。然后将细胞转移至仅包含  $^{14}\text{N}$ -Gln 的培养基。在不同时间点获取部分  $^{14}\text{N}$  标记的细胞且与全标记的  $^{15}\text{N}$  细胞混合以计算各聚糖结构的掺入比例对于时间的函数。通过将此在多个时间点进行，且绘制相对时间的 % 掺入，可计算细胞中各聚糖的半衰期。也可将该实验组合以计算在对于细胞的任何干扰，如转化、分化、药物处理或供给条件的任何变化时聚糖的半衰期。

[0109] 通常，用于与对照细胞比较分析糖苷含量变化的细胞在用  $^{15}\text{N}$  标记的重谷氨酰胺中培养。经过足够的时间后，通常至少约 18 小时，但更具体约为 60-72 小时或更多，将细胞收集、溶解，将蛋白质提取、分离 / 收集，然后使用  $\text{MS}^n$  分析以确定蛋白质个体（其可另外被消化以提供糖基化的肽，其可被测量）的总糖苷含量。可测定细胞的总糖苷含量且与不含重标记的谷氨酰胺的培养基中生长的对照细胞群比较。

[0110] 优选将生长的样品合并以提供一批中各碎片的比例以增强实验处理量。在本发明一个优选方法中，受调节的细胞 / 组织样品生长在含重谷氨酰胺的培养基中，且对照样品生长在与调节样品实质上相同的培养基中，不同地是在该培养基中使用轻谷氨酰胺而不是重谷氨酰胺，且其它成分（例如分化剂，等，其为所进行的调节的基础）也可添加至调节培养基。

[0111] 如所讨论的，优选细胞群生长的培养基是相同的，除了存在重 / 轻谷氨酰胺和调节样品中包含的调节剂。商业供应商可提供含重谷氨酰胺的培养基（Cambridge Isotope Laboratories, Inc.）。或者，该细胞可在相同培养基中生长且可将标记同位素（和调节剂）直接添加至细胞的一个培养物中。

[0112] 受调节的细胞样品通过以下方式调节，例如，分化剂、微生物（细菌 / 病毒）、化学品、药物、激素或环境变化，如温度 / 浓度 / 时间变化。也可提供其它处理或刺激。待测量的另一样品作为对照。

[0113] 处理生物物质（样品）后，质谱分析所得的糖苷比例（同位素比例）会是待分析的细胞（受调节的细胞）和对照细胞群之间糖基化的变化的指示。MS 分析，单独或与 NMR 分析组合，可提供有关聚糖结构、结合至聚糖的蛋白质、肽（在消化样品中蛋白质后）和 / 或脂质以及聚糖结合的结合位点的进一步的信息。

[0114] 在一个优选方法中，在细胞培养物中生长足够时间后，将生物物质的调节样品和对照样品合并。按本领域已知的方式将蛋白质从合并的细胞群提取。例如，该细胞膜可通过标准方法，如去污剂或在等渗的蔗糖溶液中均匀化而消化或破裂。然后将蛋白质和 / 或通过超速离心或其它本领域已知的技术从合并的细胞样品提取。例如，可使用抗体以使某些蛋白质和蛋白质复合物免疫沉淀。使用的具体方法可取决于感兴趣的具体蛋白质，如本领域所知的。可将脂质提取出。

[0115] 然后将蛋白质 / 脂质的混合物分离为蛋白质或脂质个体或蛋白质或脂质小集团，其也通过已知的技术，如一维和 / 或二维电泳，超速离心，液相色谱法或亲和结合。例如对于蛋白质可使用二维十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳（“SDS-PAGE”）。如果蛋白质或脂质个体从合并的细胞样品提取的话，如通过使用抗体、提取技术或其它方法，可不需要单独的分步步骤。

[0116] 可进一步加工该分离的蛋白质和脂质以提供肽或裂解的脂质。在分离的蛋白质的情况下,这些优选消化为肽。优选地,该蛋白质通过蛋白水解酶消化。优选胰蛋白酶,因为其在赖氨酸和精氨酸的位点精确裂解,产生双电荷的肽,其通常具有约 5 至 50 个氨基酸的长度和约 700-5,000 的分子量。这种肽尤其适用于通过质谱分析进行分析,尤其通过电喷射离子化质谱分析。其它可使用的位点特异性蛋白水解酶包括例如 Ly-C, Asp-N 和 Glu-C。胃蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶和蛋白酶 1c 是低特异性酶,其也可使用。化学试剂也可用于消化蛋白质或脂质。例如,可使用溴化氰以在甲硫氨酸的位点将蛋白质切成肽。BNPS-类臭素可用于在色氨酸的位点裂解。也可使用酸水解。也可通过分离蛋白质、肽和脂质且之后使用本领域已知的方法裂解聚糖(例如,对于 N-和 O-连接的聚糖分别为 PNGaseF 处理和  $\beta$ -消除)而处理蛋白质、肽和脂质。聚糖也可使用标准分离技术,包括液相色谱法(例如,反相 HPLC)而进一步分离。

[0117] 然后将该各自包含聚糖的蛋白质、消化的蛋白质、脂质或处理的脂质进行质谱分析。可使用任何质谱仪以分析肽或蛋白质。例如,该质谱仪可为基质-辅助激光解吸/离子化("MALDI")飞行时间("TOF")质谱仪,获自 PerSeptive Biosystems, Framingham, Massachusetts; 电喷射离子化("ESI")离子阱质谱仪,获自 Finnigan MAT, San Jose, Calif.; 或 ESI 四极质谱仪,获自 Finnigan MAT 或 Perkin-Elmer Corporation, Foster City, Calif. 也可使用线离子阱质谱仪(LTQ, ThermoFisher)或兼性线离子阱傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(LTQ-FT, ThermoFisher)。

[0118] 1 至约 5 种消化的蛋白质、脂质或聚糖的简单混合物可用上述任何质谱仪通过单级质谱法而分析。多于 6 种消化的蛋白质的混合物优选通过涉及碰撞产生的解离("CID")的二级串联质谱分析程序分析,如本领域所知的。

[0119] 同时优选地是,不需要蛋白质的消化。也可将一种或多种包含聚糖的全蛋白进行质谱分析,不需要将蛋白质消化为肽,如本领域所知的。单级质谱分析可用于同时分析大量包含聚糖的全蛋白的混合物。

[0120] 进行质谱分析的聚糖、脂质、蛋白质或肽也优选鉴别。鉴别步骤可在分离或提取单一蛋白质、肽、脂质或聚糖后的任何时间进行。使用将该质谱与蛋白质、肽、脂质和聚糖的数据库进行比较的算法的蛋白质、肽、脂质和聚糖鉴别软件是可以获得的。一种该算法, ProFound, 使用 Bayesian 算法检索蛋白质或 DNA 数据库以辨别实验数据和数据库中的蛋白质的最佳匹配。ProFound 可通过 [prowl.rockefeller.edu](http://prowl.rockefeller.edu) 和 [proteometrics.com](http://proteometrics.com) 访问。Profound 使用非冗余数据库(NR)。蛋白质鉴别的备选算法包括: Mass Search [cbrg.inf.ethz.ch/subsection\\_3.sub.--3.html](http://cbrg.inf.ethz.ch/subsection_3.sub.--3.html); MOWSE [www.seqnet.dl.ac.uk/mows.html](http://www.seqnet.dl.ac.uk/mows.html); MSFIT [prospector.ucsf.edu/ucsfhtml/msfit.htm](http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml/msfit.htm); Peptide Mass Search [www.mdc-berlin.de/.about.emu/Peptide\\_mass.html](http://www.mdc-berlin.de/.about.emu/Peptide_mass.html); 和 Peptide Search [www.mann.embl\\_heidelberg.de/services/peptide\\_search/fr\\_Peptide\\_searchform.html](http://www.mann.embl_heidelberg.de/services/peptide_search/fr_Peptide_searchform.html))。也可参见, James, Peter, "Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics", *Q. Rev. Biophysics*, Vol. 30, No. 4, pp. 279-331 (1997)。脂质也可特别使用脂质定性/定量分析(LipidQA)软件平台和相关软件从质谱分析数据(尤其是串联质谱分析)鉴别。参见,例如 Song, 等人, *Journal of the American Society for Mass Spectrography*, 2007 年 10 月, 1848-1858 页; Yetukuri, 等人, *BMC Syst Biol.* 2007;

1:12., 在线公开于 2007 年 2 月 15 日。

[0121] 蛋白质、肽和脂质也可在分离后通过电泳, 抗体 Edman 序列测定, 生物测定, 脂质提取, 液相色谱法 (反相 HPLC) 和分析, NMR 或本领域已知和使用的其它方法鉴别。聚糖可通过本文别处讨论的液相色谱法 (HPLC), NMR 和质谱分析鉴别。

[0122] 然后计算各对峰的峰强度的比例。该比例提供各样品中聚糖的相对量的测量, 如下文进一步讨论的。峰强度以常规方式计算。

[0123] 确定聚糖的总含量和 / 或然后使用本领域可用的标准方法 (例如碎裂规则和 glycoworkbench (参见 [dkfz-heidelberg.de/spec/EUROCarbDB/GlycoWorkbench/](http://dkfz-heidelberg.de/spec/EUROCarbDB/GlycoWorkbench/) 以及 NMR 分析) 作出聚糖结构的结构确定。

[0124] 因为轻谷氨酰胺中生长的对照样品和重谷氨酰胺中生长的调节样品的聚糖质量之间的差异, 质谱分析的结果通常为多对紧密间隔的峰 (closely spaced peaks), 各峰具有稍不同的  $m/z$  比 (+1, +2, 等, 取决于聚糖基上氨基糖的数目)。因为富集的同位素通常比最丰富的天然存在的同位素要重 (例如,  $^{15}\text{N}$  相对  $^{14}\text{N}$ ), 所以较高  $m/z$  比的峰通常是在富含重谷氨酰胺的培养基中生长的标记的聚糖的聚糖相对丰度的指示。较低  $m/z$  比的峰通常是含轻谷氨酰胺的培养基中生长的非标记的聚糖的聚糖相对丰度的指示。

[0125] 因为在调节样品中的细胞数可与对照样品中的细胞数不同, 对于任何给定的对峰 (pair of peaks), 相应于调节样品的聚糖的峰强度可与相应于来自对照样品的相同聚糖的峰强度不同。许多对峰之间的比例 (其为蛋白质、肽和脂质碎片和未标记的聚糖的指示) 通常相同。定期观察的比例的偏差表明两份细胞样品之间聚糖相对数量的差异, 这可由于细胞样品之一经受的调节而产生。该差异可根据本发明定量。

[0126] 在本发明优选的方法中, 在加工和分析前合并对照样品和调节样品。因为该细胞样品被合并, 峰强度差异的其它来源, 如具体蛋白质或脂质从细胞样品的提取效率的变化, 随后的蛋白质或脂质从凝胶或其它吸收介质的提取效率的变化, 使用的酶 (若有的话) 的消化效率的变化, 质谱仪对于具体蛋白质、肽、脂质或聚糖的离子化效率的变化, 以及其它该类因素, 都均等地影响两种细胞群。因此, 这些因素不应影响观察到的比例。分析该峰对的比例弥补由质谱仪对于具体聚糖的离子化效率的差异导致的质量强度差异。同位素标记两种细胞样品中的一种且观察同位素标记的和非同位素标记的聚糖的峰之间的比例也弥补细胞样品本身之间的差别效果 (differential effects), 如在各样品中存在不同数目的细胞, 在细胞样品之间提供了内标归一化 (internal normalization)。本发明的方法也可延伸以通过制备三种或更多种细胞样品且相应分析该样品来比较两种或更多种调节的作用, 优选在各情况下合并调节样品和对照样品, 然后对于总体聚糖含量、具体聚糖含量和与样品中聚糖的存在相关的结构信息进行处理和分析。

[0127] 因此本发明为细胞培养物体系中聚糖提供了易于实施且强大的同位素标记策略。本发明依赖于以下事实, 即 Gln 的酰胺侧链是己糖胺生物合成途径中 UDP-GlcNAc 的唯一氮供体且 UDP-GlcNAc 为 UDP-GalNAc 和 CMP-Neu5Ac (Gc) 的生物合成底物。因此, 本发明人在此使用小鼠 ES 细胞证实了, 用酰胺  $^{-15}\text{N}$ -Gln 代替正常 Gln 补充物可使得用 72 小时标记策略对 N- 连接的和 O- 连接的聚糖的 GlcNAc, GalNAc 和 NeuAc 残基进行几乎完全的同位素标记。

[0128] 实验方法

**[0129] 细胞培养**

**[0130]** 鼠胚胎干细胞 (ES) 基本如先前所述进行培养<sup>24</sup>。该 ES 细胞培养基由以下构成：Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基 (DMEM)，补充有 10% 胎牛血清 (FCS, Commonwealth Serum Laboratories)、2mM L- 谷氨酰胺 (<sup>14</sup>N 或酰胺 -<sup>15</sup>N)、0.1mM 2- 巯基乙醇和 1000U/ml 重组鼠白血病抑制因子 (LIF) (ESGRO, Chemicon International)。酰胺 -<sup>15</sup>N-Gln (98% 纯度) 购自 Cambridge Isotopes Inc (Andover, MA)。该 ES 细胞在 37°C 在 10% CO<sub>2</sub> 下培养。每天更换培养基保持 3 天，之后通过解离缓冲液和刮削收集 ESCs (1 × 10<sup>7</sup>)，置于 15ml 圆锥管中，以 1,000g 使其沉淀。该细胞用冰冷的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤 3 次，然后在每次洗涤后以 1000g 离心。将所有上清液从管中去除且将细胞沉淀储存在 -80°C 直到进行分析。

**[0131] ES 细胞裂解、去脂、聚糖释放和全甲基化**

**[0132]** 全甲基化的 N- 和 O- 连接的全甲基化的聚糖的分离基本上如先前所述<sup>14,22,23,25</sup>。简言之，将细胞重悬浮于水且通过超声处理裂解。使用有机提取在氯仿：甲醇：水中进行去脂。将所得蛋白质进行胰蛋白酶消化，且对于 N- 和 O- 连接的聚糖分别通过 PNGaseF 处理和 β- 消除释放聚糖。反相富集的聚糖用碘甲烷全甲基化且通过反相富集再次纯化并干燥。

**[0133] 全甲基化的聚糖的 MS 分析**

**[0134]** 将聚糖如先前所述<sup>14,22,23,25</sup> 用线离子阱质谱仪 (LTQ, ThermoFisher) 或兼性线离子阱傅里叶变换离子回旋共振质谱仪 (LTQ-FT, ThermoFisher) 进行分析。简言之，将全甲基化的聚糖溶于总共 50 μL 样品：15 μL 100% 甲醇，然后添加 35 μL 1mM NaOH 在 50% 甲醇中的溶液，且使用纳米喷雾 (nanospray) 离子源直接输入质谱仪，该纳米喷雾 (nanospray) 离子源具有熔融石英发射器 (360 × 75 × 30 μm, SilicaTip™, New Objective)，2.0kV 毛细管电压，200°C 毛细管温度，且注射流速为 0.4 μL/min。正离子和图形方式 (profile mode) 的全 ITMS (离子阱质谱分析) 光谱在 400-2000m/z 收集 30 秒，显微扫描 (microscan) 为 5 和最大注射时间 (ms) 为 150。碰撞-诱导的解离 (CID) 后的形心 (centroid) MS/MS 光谱在 400 至 2000m/z 获得，对于 N- 和 O- 连接的聚糖分别为 34% 和 28% 标准化的碰撞能，通过总离子作图 (TIM) 为 0.25 活化 Q，和 30.0ms 活化时间。对于用 TIM 扫描获得的自动化 MS/MS 光谱，母体质量步长和分离宽度分别设定为 2.0m/z 和 2.8m/z。MS<sup>n</sup> 实验以图形方式手动进行。使用 2.5m/z 的分离宽度将聚糖前体离子分离用于 MS<sup>n</sup>。对于 FTICR 分析，使用在 100,000 分辨率 (resolution) 的 10m/z 的分离宽度。所有聚糖结构的人工解释根据碎裂规则和 glyco 工作台 (workbench) (网址 [dkfz-heidelberg.de/spec/EUROCarbDB/GlycoWorkbench/](http://dkfz-heidelberg.de/spec/EUROCarbDB/GlycoWorkbench/)) 进行。

**[0135] 结果****[0136] 同位素掺入复合糖的机理**

**[0137]** 己糖胺生物合成途径将糖酵解中间体果糖 -6- 磷酸转化为 UDP-GlcNAc<sup>(26)</sup>，图 1A)。该途径中的第一个和限速的步骤将果糖 -6- 磷酸转化为葡糖胺 -6- 磷酸，且伴随 Gln 转化为 Glu<sup>27</sup>。因此，Gln 的侧链酰胺为 UDP-GlcNAc 的制备中的氮源。其它主要的含氨基糖的糖核苷酸，UDP-GalNAc 和 CMP- 唾液酸，自 UDP-GlcNAc 生物合成<sup>28,29</sup>。因此，理论上所有含 GlcNAc、GalNAc 和唾液酸的分子可通过向细胞培养基中补充酰胺 -<sup>15</sup>N-Gln 而进行同位素标记 (图 1)。

**[0138]** 进行初始实验以评估使用代谢标记作为将稳定的同位素掺入培养物中生长的细

胞的聚糖中的方法的可能性。在这些实验中, R1 鼠胚胎干细胞 (mESCs) 使用标准条件生长。用于细胞培养的培养基通常不含谷氨酰胺, 因为该氨基酸在水性条件下分解为谷氨酸和氨。这简化了 IDAWG 标记方法, 因为无需特别自培养基排除 Gln。使用酰胺  $^{-15}\text{N}$ -Gln 代替  $^{14}\text{N}$ - 形式以用推荐的浓度补充培养基, 其在该情况下为 2mM。这种直接的替换是 IDAWG 所需的正常细胞培养过程的唯一变更。因此, 本发明人用或不用重 Gln 标记鼠 ES 细胞三天, 然后从蛋白质分离 N- 和 O- 连接的聚糖, 用于基于质谱法的分析 (图 1B)。

[0139] 将  $^{15}\text{N}$  掺入 N- 连接的聚糖

[0140]  $^{15}\text{N}$  向 mESCs 的 N- 连接的聚糖的掺入通过比较在  $^{14}\text{N}$ -Gln 或酰胺  $^{-15}\text{N}$ -Gln 中生长的细胞释放的全甲基化的 N- 连接的聚糖的全光谱而进行研究 (图 2)。将两种样品按需要进行总离子作图分析和  $\text{MS}^n$  以证实结构 (数据未显示)。这些光谱观察到的富含的离子主要为高甘露糖聚糖 ( $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_{5-9}$ ), 其为带单电荷或带双电荷的 (图 2 的结构 1-3, 6, 13-14 和 16)。比较这两个光谱显示在包含酰胺  $^{-15}\text{N}$ -Gln 的培养基中生长的细胞所得的高甘露糖聚糖离子对于带双电荷的离子增加  $1\text{m/z}$  单位, 且对于带单电荷的离子增加  $2\text{m/z}$  单位。这是预期的结果, 条件是  $^{15}\text{N}$  已被掺入这些聚糖包含的两个核心 GlcNAcs, 其为高甘露糖聚糖中存在的唯一的氮。在全光谱中还包含的为代表包含 GlcNAc (图 2 的结构 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12 和 15) 和 Neu5Ac (图 2 的结构 12) 残基的复合聚糖的离子, 观察到其对于  $^{15}\text{N}$ - 掺入 GlcNAc 和 Neu5Ac 在酰胺  $^{-15}\text{N}$ -Gln 样品中位移合适的质量。为计算标记效率, 该样品通过兼性 LTQ-FT 仪器分析。对出现在距  $^{14}\text{N}$  和  $1\text{-}^{15}\text{N}$  Gln 培养基中生长的聚糖的  $1005.5$  和  $1006.5\text{m/z}$  单位处的  $\text{GlcNAcsMan}_7$  聚糖产生的双电荷分子离子  $(\text{M}+2\text{Na})^{2+}$  的更密切的检查, 示于图 3。在这些光谱中, 最强的离子出现在用  $^{14}\text{N}$  或两个  $^{15}\text{N}$  计算的单同位素质量处, 表明大多数该聚糖在其两个可能的位点掺入了  $^{15}\text{N}$ 。存在相应于标记不足的离子, 即, 掺入 0 和 1 个  $^{15}\text{N}$ , 然而优势种类是完全标记的。对理论上包含 2-5 个  $^{15}\text{N}$ - 残基的多个结构进行了缩放扫描。对  $^{15}\text{N}$  光谱中不同同位素的强度比例进行的计算表明  $^{15}\text{N}$  向 N- 连接的聚糖平均掺入 96.2% (表 1, 图 6), 其非常类似于该实验使用的谷氨酰胺中  $^{15}\text{N}$  的程度 (98%)。因此, 来自酰胺  $^{-15}\text{N}$ -Gln 的  $^{15}\text{N}$  变得广泛掺入 N- 连接的聚糖的氨基糖。而且, N- 连接的聚糖的碎裂产生的 MS/MS 光谱显示与标记一致的样式。例如, 重和轻标记的核心岩藻糖基化的、充分唾液酸化的 (sialyated)、双触角 N- 连接的聚糖的碎裂显示的碎片与  $^{15}\text{N}$ - 掺入 Neu5Ac 以及核心和触角 GlcNAc 残基一致 (图 4)。该标记可基于碎裂大大有助于指定结构, 且提供了基于 MS/MS 光谱中的多对峰进行定量的可能性。

[0141]  $^{15}\text{N}$  掺入 O- 连接的聚糖

[0142] 为研究  $^{15}\text{N}$  向 mESCs 的 O- 连接的聚糖的掺入, 将在  $^{14}\text{N}$ -Gln 或酰胺  $^{-15}\text{N}$ -Gln 中生长的细胞释放的全甲基化的 O- 连接的聚糖的全光谱进行比较。当需要时两种样品都进行总离子作图分析和  $\text{MS}^n$  以证实结构。为说明  $^{15}\text{N}$  向 O- 聚糖中包含的所有 3 种氨基糖的掺入, 对于包含 GlcNAc 和 Neu5Ac 的 O-Man 引发的聚糖, 包含 GlcNAc 的 O-GalNAc 引发的结构, 和包含两个 Neu5Ac 残基的 O-GalNAc 引发的结构显示碎裂后重和轻分离的样品的 MS/MS 光谱 (图 5)。所有 3 种 O- 连接的结构分离  $\text{m/z}$  和碎裂图 (profile) 与向所有 GlcNAc、GalNAc 和 NeuAc 单糖的  $^{15}\text{N}$ - 掺入一致。从碎裂图可以看出, 还原端 GalNAc 在重样品中被同位素标记, 如在延长的链中的 GlcNAc 和 NeuAc。这些结果重点说明了  $^{15}\text{N}$  被掺入所有 3 种氨基糖, 且轻和重结构的碎裂将对聚糖指定和定量有巨大帮助。

**[0143]**  $^{15}\text{N}$  掺入蛋白质

**[0144]** 对自  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  标记的样品获得的肽进行的散弹枪 (Shotgun) 蛋白质组学实验鉴别包含掺入的酰胺  $^{-15}\text{N}$ -Gln 的肽 (数据未显示)。然而,没有观察到向其它氨基酸掺入  $^{15}\text{N}$ 。这是预期的结果,因为 Gln 向其它氨基酸的转化中的第一步产生谷氨酸 (Glu),其导致失去酰胺  $^{-15}\text{N}$ 。这是重要的,因为其简化了数据库检索,但保留了以蛋白质水平进行相对定量,以及使用鉴别的含 Gln 的肽的能力。如果需要同位素标记肽 (超过含 Gln 的肽的范围) 和聚糖两者,上述代谢标记方法可与 SILAC 或其它基于蛋白质组学的同位素标记策略组合。

**[0145]** 本技术为从两种样品的蛋白质 (数据已显示) 和脂质 (数据未显示) 释放的聚糖提供了坚稳的定量。而且,该技术提供了可直接检测和定量糖肽的标记策略。该策略在对于从轻和重 Gln- 标记的细胞培养物体系分离的蛋白质的动态 O-GlcNAc 修饰<sup>30</sup> 的检测中证实。观察到  $^{15}\text{N}$ -Gln 也掺入蛋白质,但依照预期没有观察到其它重氨基酸,这提供了 SILAC 样标记策略,其可单独使用或与重 Arg/Lys SILAC<sup>7</sup> 组合使用以在理论上定量均来自相同组的样品的聚糖、蛋白质和糖蛋白 / 糖肽。最后,该 IDAWG 策略提供了一种选项,其可通过首先完全标记样品然后用轻 Gln 替换重 Gln,且随时间过程分离和分析样品,以计算样品中所有含氨基糖的聚糖的半衰期。因此, IDAWG 形成了用于探索细胞培养物体系中聚糖、糖蛋白和糖脂的生物作用的强大的新定量工具。

**[0146]** 参考文献

**[0147]** 1. Liu, H. ;Sadygov, R. G. ;Yates, J. R. ,3rd, A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*2004, 76, (14),4193-201.

**[0148]** 2. Radulovic, D. ;Jelveh, S. ;Ryu, S. ;Hamilton, T. G. ;Foss, E. ;Mao, Y ;Emili, A. ,Informatics platform for global proteomic profiling and biomarker discovery using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2004, 3, (10),984-97.

**[0149]** 3. Silva, J. C. ;Denny, R. ;Dorschel, C. A. ;Gorenstein, M. ;Kass, I. J. ;Li, G. Z. ;McKenna, T. ;Nold, M. J. ;Richardson, K. ;Young, P. ;Geromanos, S. , Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal Chem*2005,77, (7), 2187-200.

**[0150]** 4. Wang, W. ;Zhou, H. ;Lin, H. ;Roy, S. ;Shaler, T. A. ;Hill, L. R. ;Norton, S. ;Kumar, P. ;Anderle, M. ;Becker, C. H. , Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards. *Anal Chem*2003, 75, (18),4818-26.

**[0151]** 5. Gygi, S. P. ;Rist, B. ;Gerber, S. A. ;Turecek, F. ;Gelb, M. H. ;Abersold, R. , Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999,17, (10),994-9.

**[0152]** 6. Liu, P. ;Regnier, F. E. , An isotope coding strategy for proteomics involving both amine and carboxyl group labeling. *J Proteome Res* 2002,1, (5), 443-50.

**[0153]** 7. Ong, S. E. ;Blagoev, B. ;Kratchmarova, I. ;Kristensen, D. B. ;Steen, H. ;

Pandey, A. ;Mann, M. , Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002,1, (5),376-86.

[0154] 8. Rao, K. C. ;Carruth, R. T. ;Miyagi, M. , Proteolytic 180 labeling by peptidyl-Lys metalloendopeptidase for comparative proteomics. *J Proteome Res*2005,4, (2),507-14.

[0155] 9. Schnolzer, M. ;Jedrzejewski, P. ;Lehmann, W. D. , Protease-catalyzed incorporation of 180 into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* 1996,17, (5),945-53.

[0156] 10. Vosseller, K. ;Hansen, K. C. ;Chalkley, R. J. ;Trinidad, J. C. ;Wells, L. ;Hart, G. W. ;Burlingame, A. L. , Quantitative analysis of both protein expression and serine/threonine post-translational modifications through stable isotope labeling with dithiothreitol. *Proteomics* 2005,5, (2),388-98.

[0157] 11. Wells, L. ;Vosseller, K. ;Cole, R. N. ;Cronshaw, J. M. ;Matunis, M. J. ;Hart, G. W. , Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics* 2002,1, (10), 791-804.

[0158] 12. Yao, X. ;Freas, A. ;Ramirez, J. ;Demirev, P. A. ;Fenselau, C. , Proteolytic 180 labeling for comparative proteomics;model studies with two serotypes of adenovirus. *Anal Chem* 2001,73, (13),2836-42.

[0159] 13. Ong, S. E. ;Foster, L. J. ;Mann, M. , Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods* 2003,29, (2),124-30.

[0160] 14. Aoki, K. ;Perlman, M. ;Lim, J. M. ;Cantu, R. ;Wells, L. ;Tiemeyer, M. , Dynamic developmental elaboration of N-linked glycan complexity in the *Drosophila melanogaster* embryo. *J Biol Chem* 2007,282, (12),9127-42.

[0161] 15. Bowman, M. J. ;Zaia, J. , Tags for the stable isotopic labeling of carbohydrates and quantitative analysis by mass spectrometry. *Anal Chem* 2007, 79, (15),5777-84.

[0162] 16. Hitchcock, A. M. ;Costello, C. E. ;Zaia, J. , Glycoform quantification of chondroitin/dermatan sulfate using a liquid chromatography-tandem mass spectrometry platform. *Biochemistry* 2006,45, (7),2350-61.

[0163] 17. Xia, B. ;Kawar, Z. S. ;Ju, T. ;Alvarez, R. A. ;Sachdev, G. P. ;Cummings, R. D. , Versatile fluorescent derivatization of glycans for glycomic analysis. *Nat Methods* 2005,2, (11),845-50.

[0164] 18. Yuan, J. ;Hashii, N. ;Kawasaki, N. ;Itoh, S. ;Kawanishi, T. ;Hayakawa, T. , Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*2005,1067, (1-2),145-52.

[0165] 19. Xie, Y. ;Liu, J. ;Zhang, J. ;Hedrick, J. L. ;Lebrilla, C. B. , Method for the

comparative glycomic analyses of O-linked, mucin-type oligosaccharides. *Anal Chem* 2004, 76, (17), 5186-97.

[0166] 20. Alvarez-Manilla, G. ;Warren, N. L. ;Abney, T. ;Atwood, J. ,3rd;Azadi, P. ;York, W. S. ;Pierce, M. ;Orlando, R. , Tools for glycomics :relative quantitation of glycans by isotopic permethylation using  $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ . *Glycobiology* 2007, 17, (7), 677-87.

[0167] 21. Kang, P. ;Mechref, Y. ;Kyselova, Z. ;Goetz, J. A. ;Novotny, M. V. , Comparative glycomic mapping through quantitative permethylation and stable-isotope labeling. *Anal Chem* 2007, 79, (16), 6064-73.

[0168] 22. Atwood, J. A. ,3rd;Cheng, L. ;Alvarez-Manilla, G. ;Warren, N. L. ;York, W. S. ;Orlando, R. , Quantitation by isobaric labeling :applications to glycomics. *J Proteome Res* 2008, 7, (1), 367-74.

[0169] 23. Bothelo, J. C. ;Atwood, J. A. ,3rd;Cheng, L. ;Alvarez-Manilla, G. ;York, W. S. ;Orlando, R. , QUIBL for the Comparative Glycomic Study of O-linked Glycans. *International Journal of Mass Spectrometry* 2008, IN PRESS.

[0170] 24. Stead, E. ;White, J. ;Faast, R. ;Conn, S. ;Goldstone, S. ;Rathjen, J. ;Dhingra, U. ;Rathjen, P. ;Walker, D. ;Dalton, S. , Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene* 2002, 21, (54), 8320-33.

[0171] 25. Aoki, K. ;Porterfield, M. ;Lee, S. S. ;Dong, B. ;Nguyen, K. ;McGlamry, K. H. ;Tiemeyer, M. , The diversity of O-linked glycans expressed during *Drosophila melanogaster* development reflects stage-and tissue-specific requirements for cell signaling. *J Biol Chem* 2008.

[0172] 26. McClain, D. A. , Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *J Diabetes Complications* 2002, 16, (1), 72-80.

[0173] 27. Yki-Jarvinen, H. ;Vogt, C. ;Iozzo, P. ;Pipek, R. ;Daniels, M. C. ;Virkkamaki, A. ;Makimattila, S. ;Mandarino, L. ;DeFronzo, R. A. ;McClain, D. ;Gottschalk, W. K. , UDP-N-acetylglucosamine transferase and glutamine:fructose 6-phosphate amidotransferase activities in insulin-sensitive tissues. *Diabetologia* 1997, 40, (1), 76-81.

[0174] 28. Kean, E. L. ;Munster-Kuhnel, A. K. ;Gerardy-Schahn, R. , CMP-sialic acid synthetase of the nucleus. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1673, (1-2), 56-65.

[0175] 29. Thoden, J. B. ;Wohlert, T. M. ;Fridovich-Keil, J. L. ;Holden, H. M. , Human UDP-galactose 4-epimerase. Accommodation of UDP-N-acetylglucosamine within the active site. *J Biol Chem* 2001, 276, (18), 15131-6.

[0176] 30. Wells, L. ;Vosseller, K. ;Hart, G. W. , Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins :signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 2001, 291, (5512), 2376-8.

IDAWG: 用谷氨酰胺同位素检测氨基糖

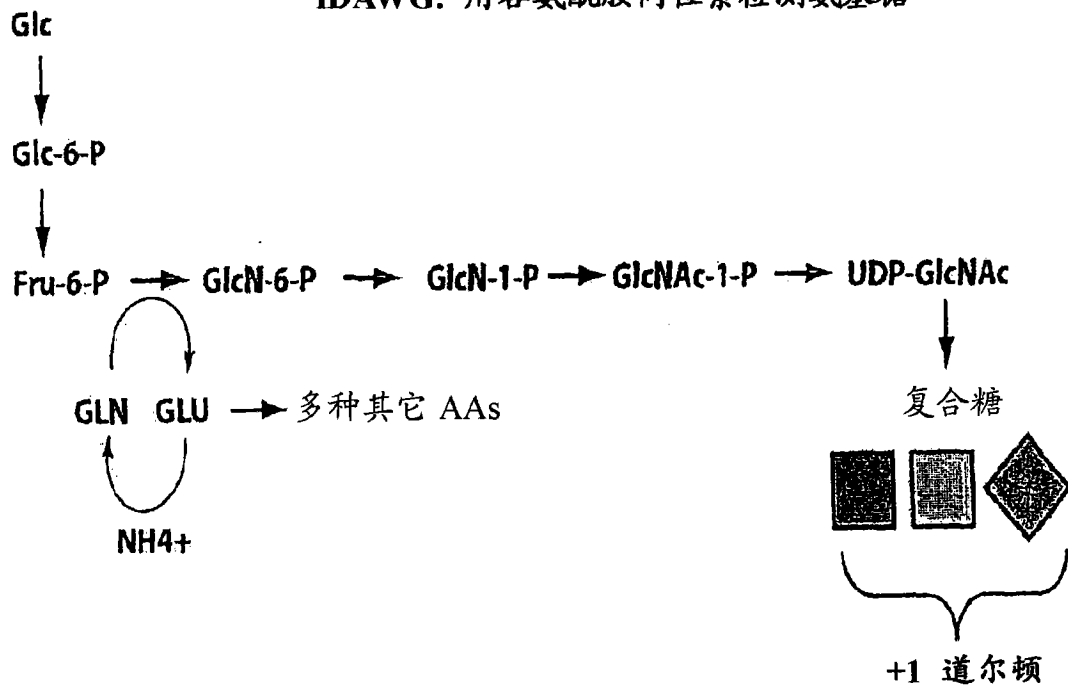


图 1A

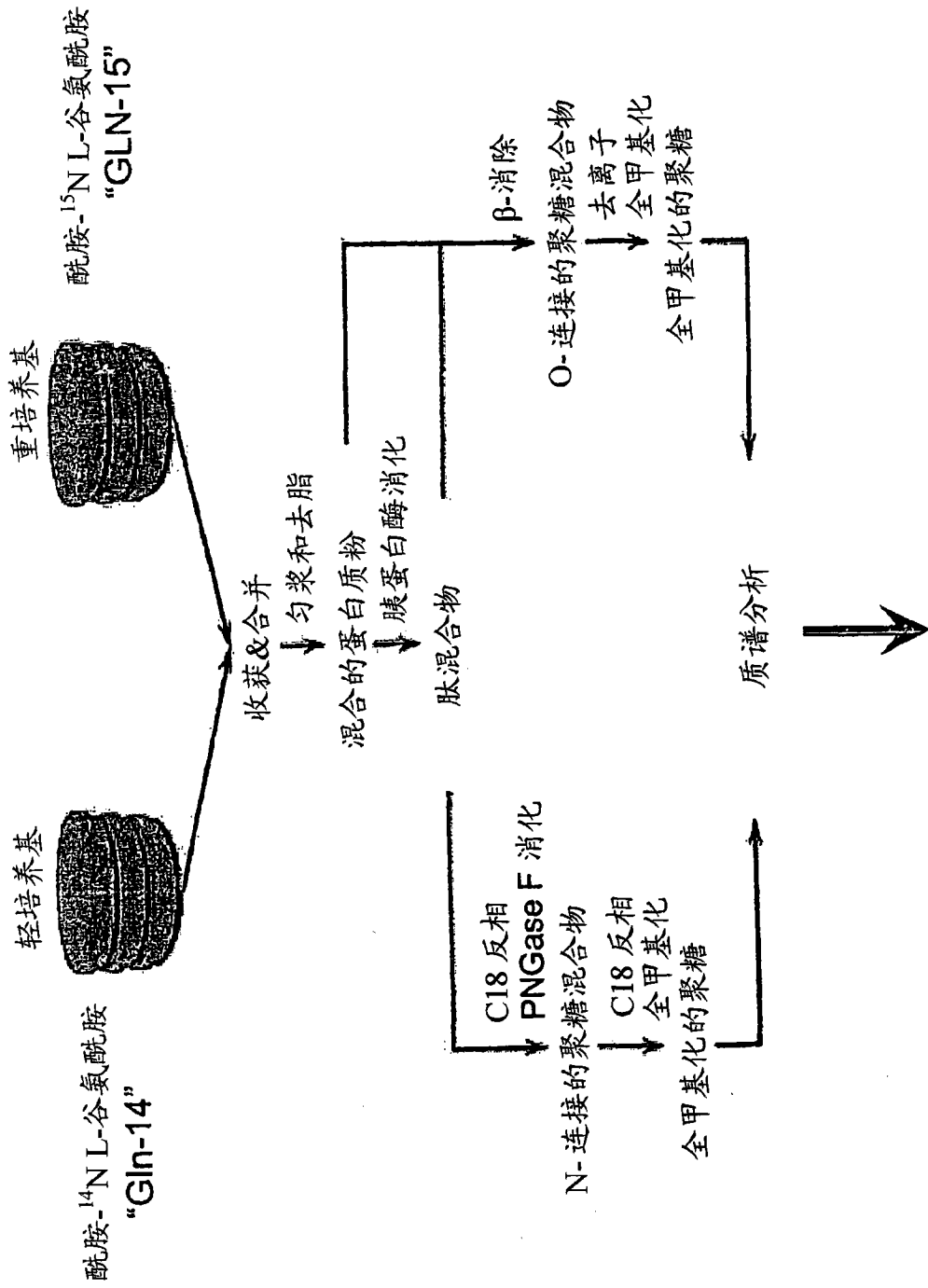


图 1B

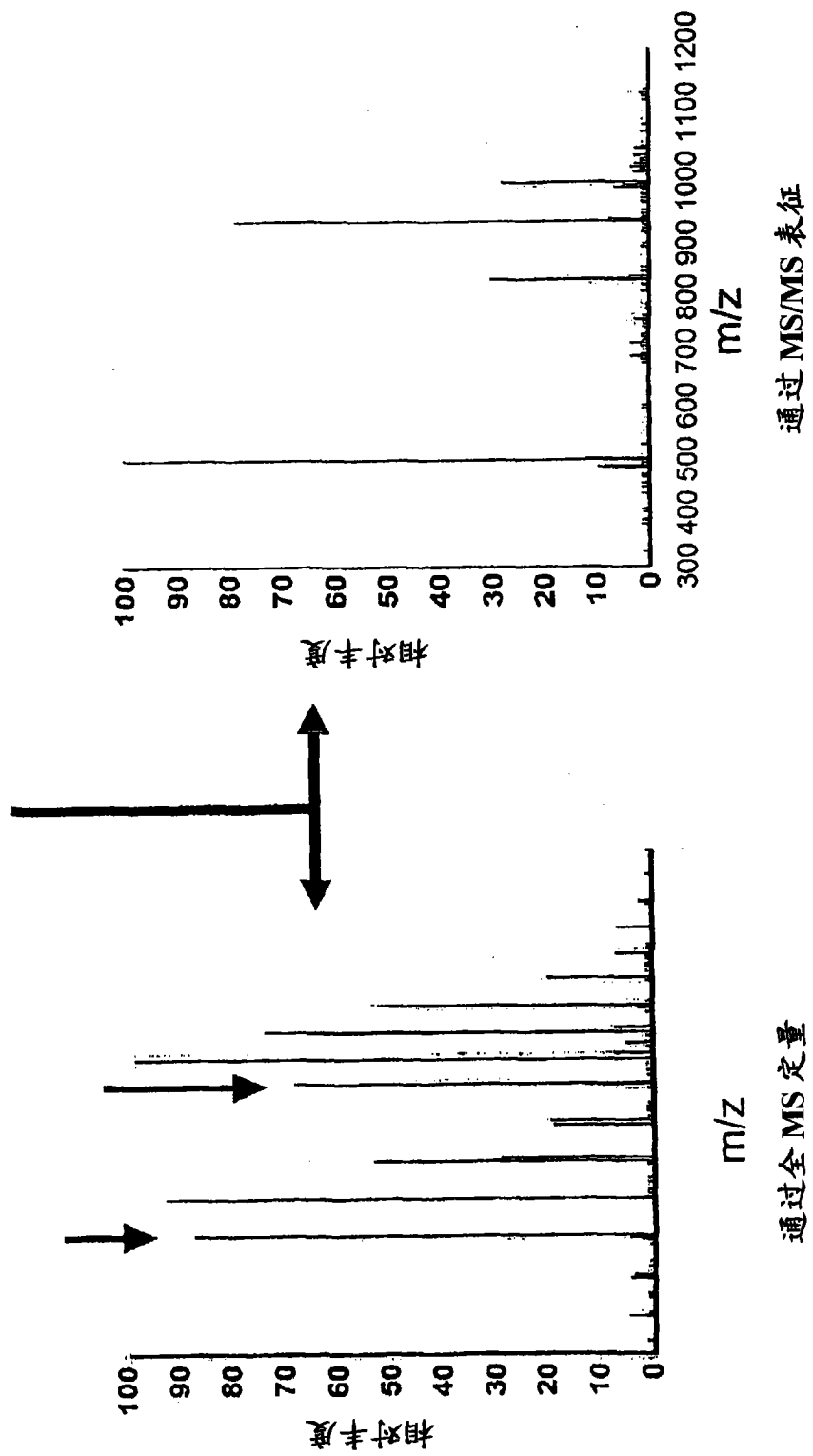


图 1B(续)

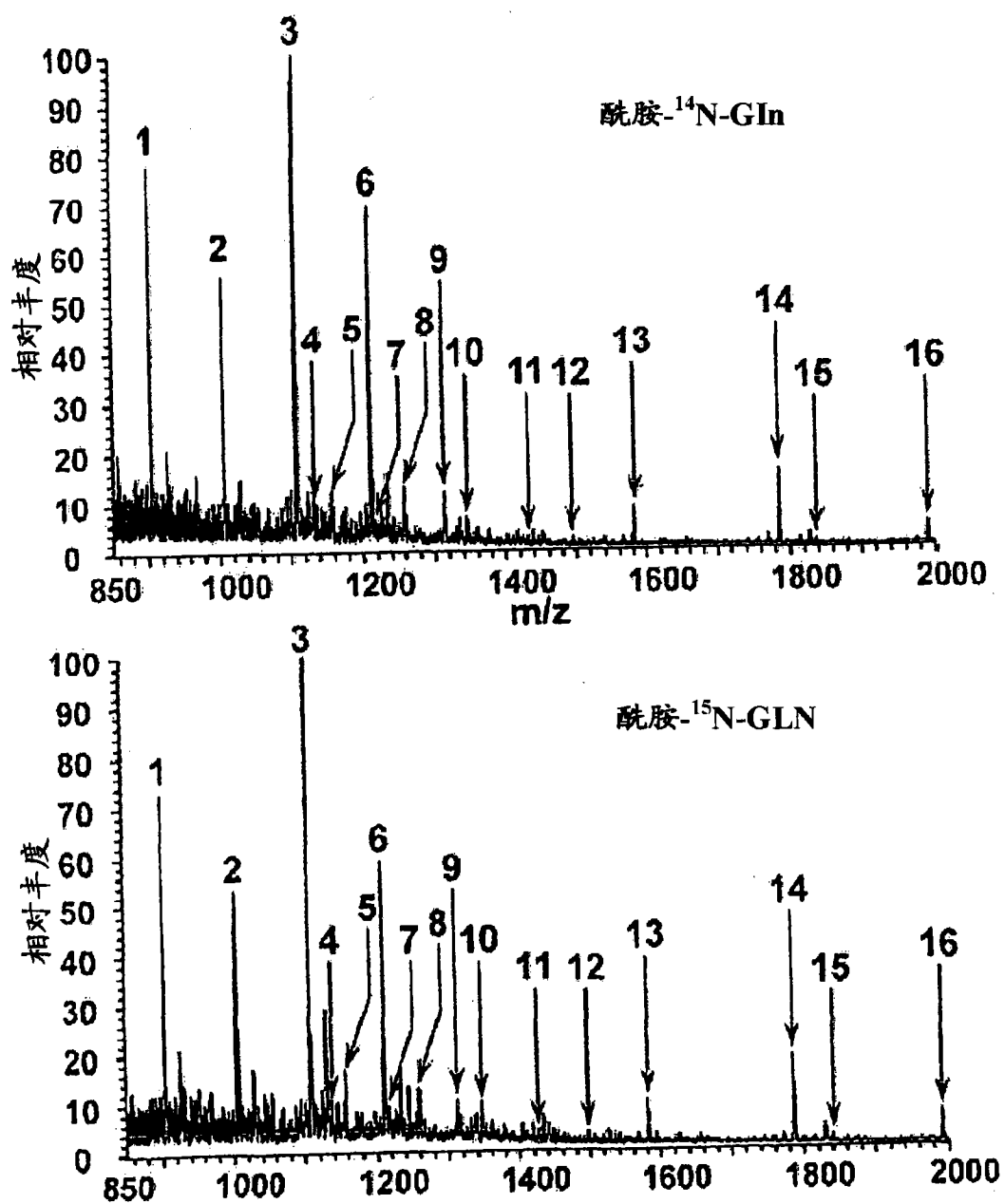


图 2

















编号	结构	N 数	Z	$M+xNa_j^{k+}$ (单)		$\Delta M$ (m/z)
				酰胺- $^{14}N$ -Gln	酰胺- $^{15}N$ -GLN	
1		2	2	903.436	904.433	0.997
2		2	2	1005.406	1006.403	0.997
3		2	2	1107.536	1108.533	0.997
4		4	2	1133.557	1135.551	1.994
5		5	2	1154.071	1156.563	2.493
6		2	2	1208.586	1210.583	0.997
7		4	2	1220.602	1222.596	1.994
8		5	2	1256.121	1258.613	2.493
9		2	2	1311.636	1312.633	0.997
10		5	2	1343.165	1345.658	2.493
11		5	2	1430.210	1432.702	2.493
12		6	2	1494.731	1497.722	2.991
13		2	1	1579.783	1581.777	1.994
14		2	1	1783.883	1785.877	1.994
15		4	1	1835.925	1839.913	3.988
16		2	1	1987.883	1989.877	1.994

图 2(续)

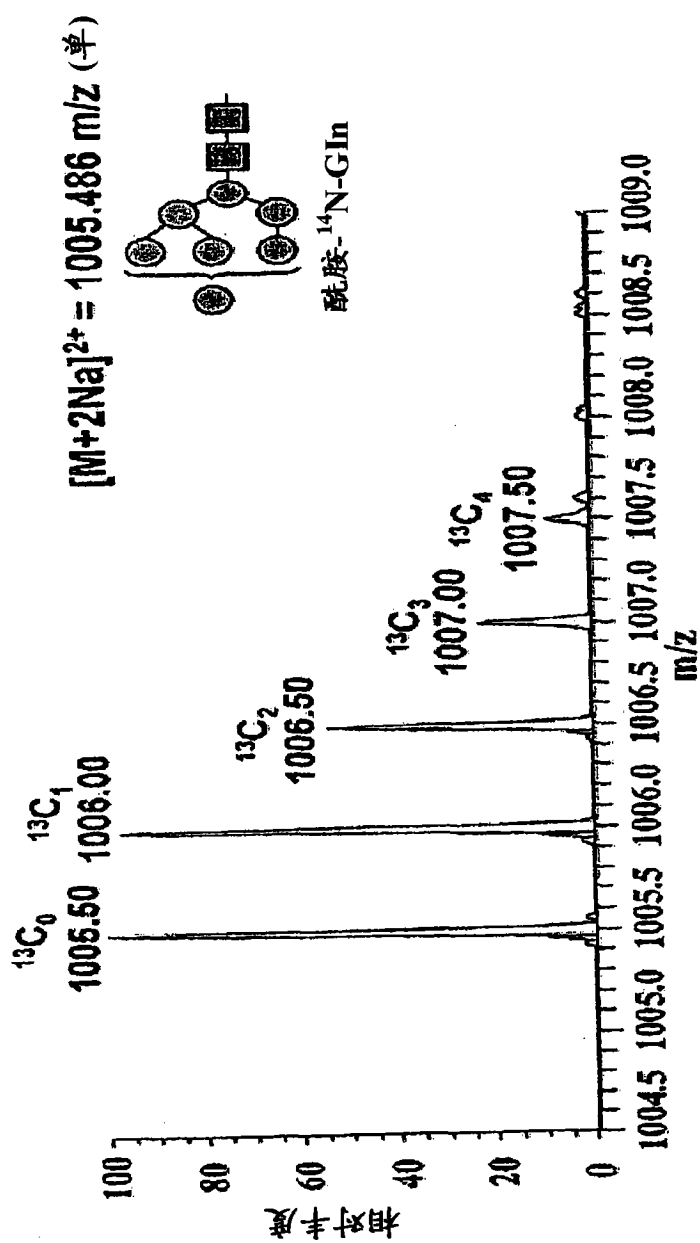


图 3

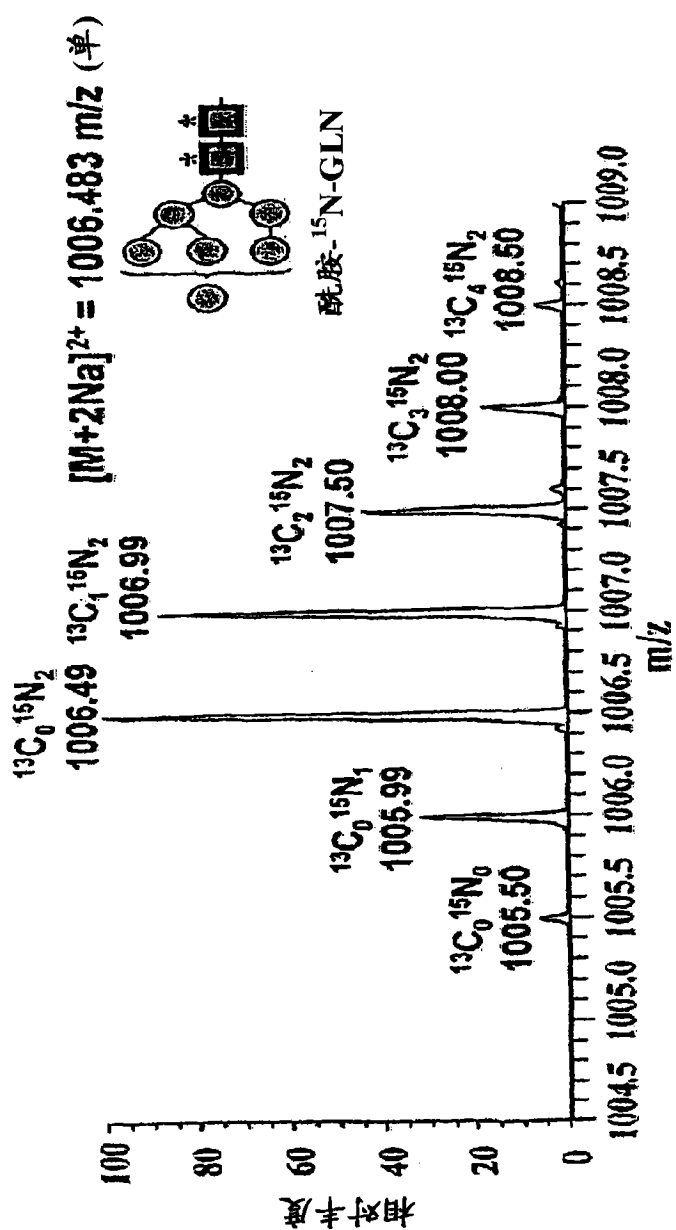


图3(续)

[M+2Na]<sup>2+</sup>: 1494.731 m/z (单)

道尔顿-MES-N #599 RT: 15.23 AV 1 NL: 3.70ES

T: ITMS + c NSI 全 ms2 1496.00@cid30.00 [150 00-2000.00]

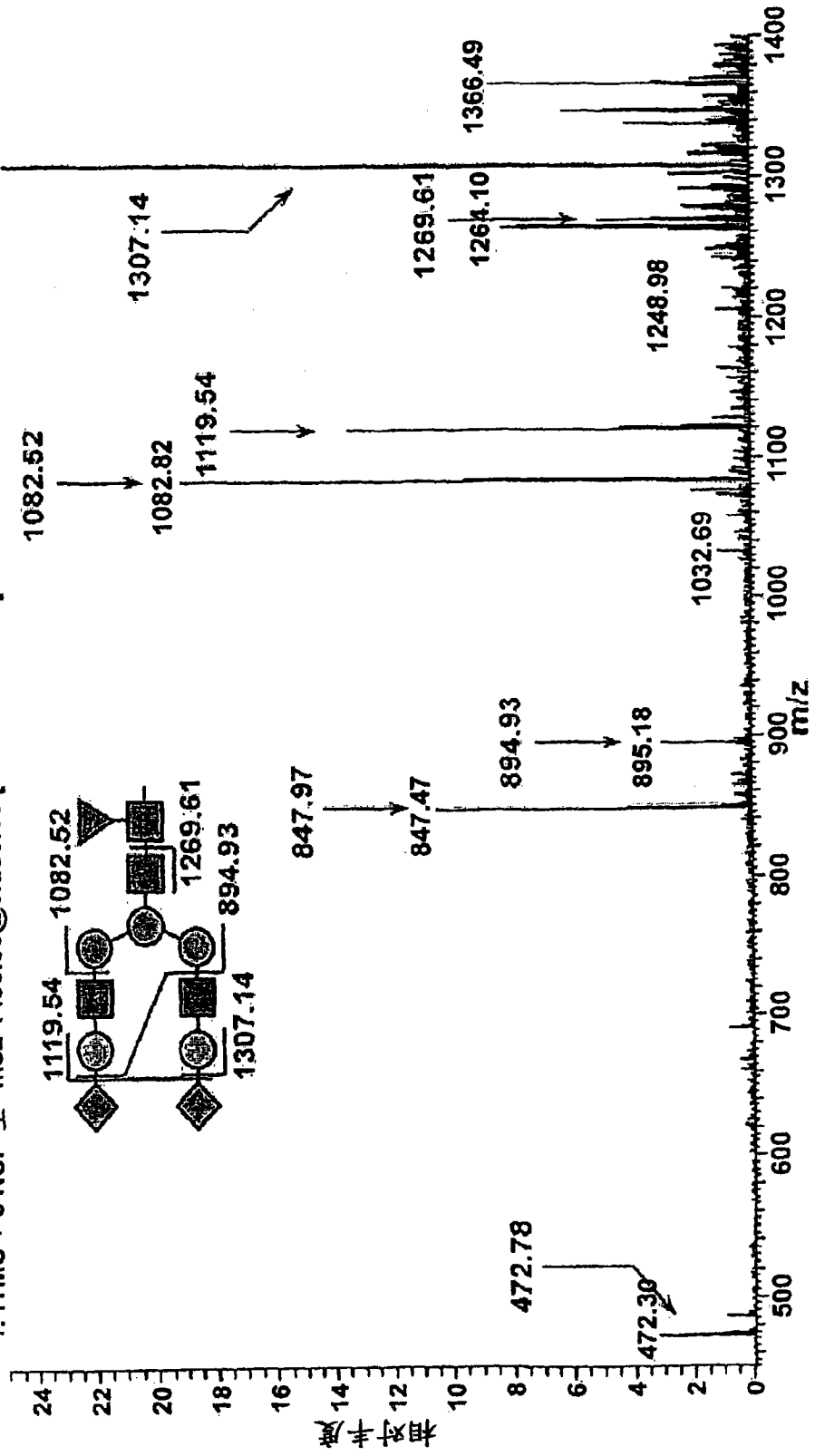


图 4A

[M+2Na]<sup>2+</sup>: 1497.722 m/z (单)

道尔顿-MES-HND3-N #600 RT: 15.44 AV. 1 NL. 6.93E3

T: ITMS + c NS: 全 ms2 1498.00@cid30.00 [150.00-2000.00]

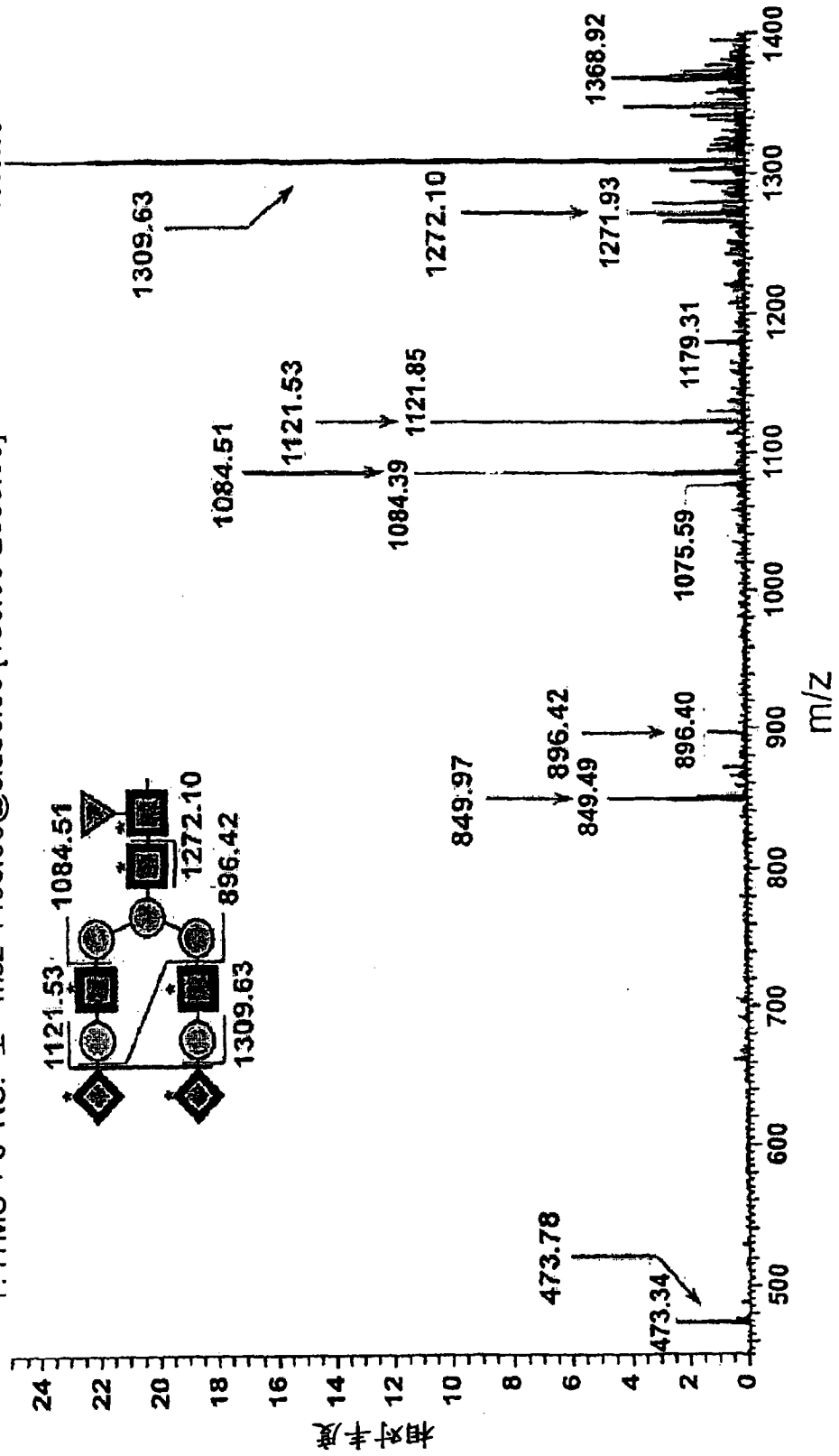


图 4B

[M+Na]<sup>+</sup>: 1099.562 m/z (单)

道尔顿-MES-C #401 RT: 3.68 AV. 1 NL. 5.82E3  
T: ITMS + c NS: 全 ms2 1100.00@cid25.00 [150.00-2000.00]

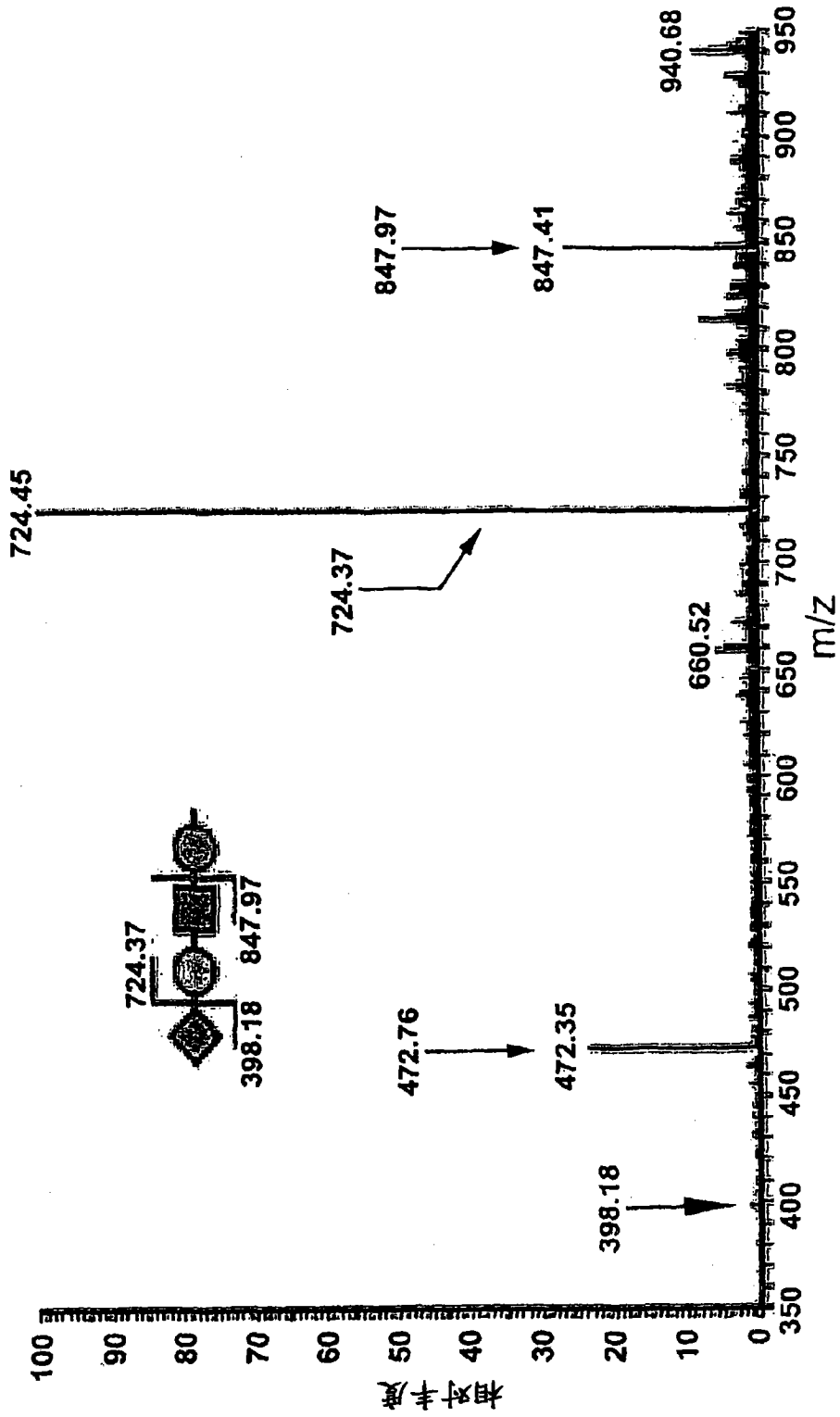


图 5A

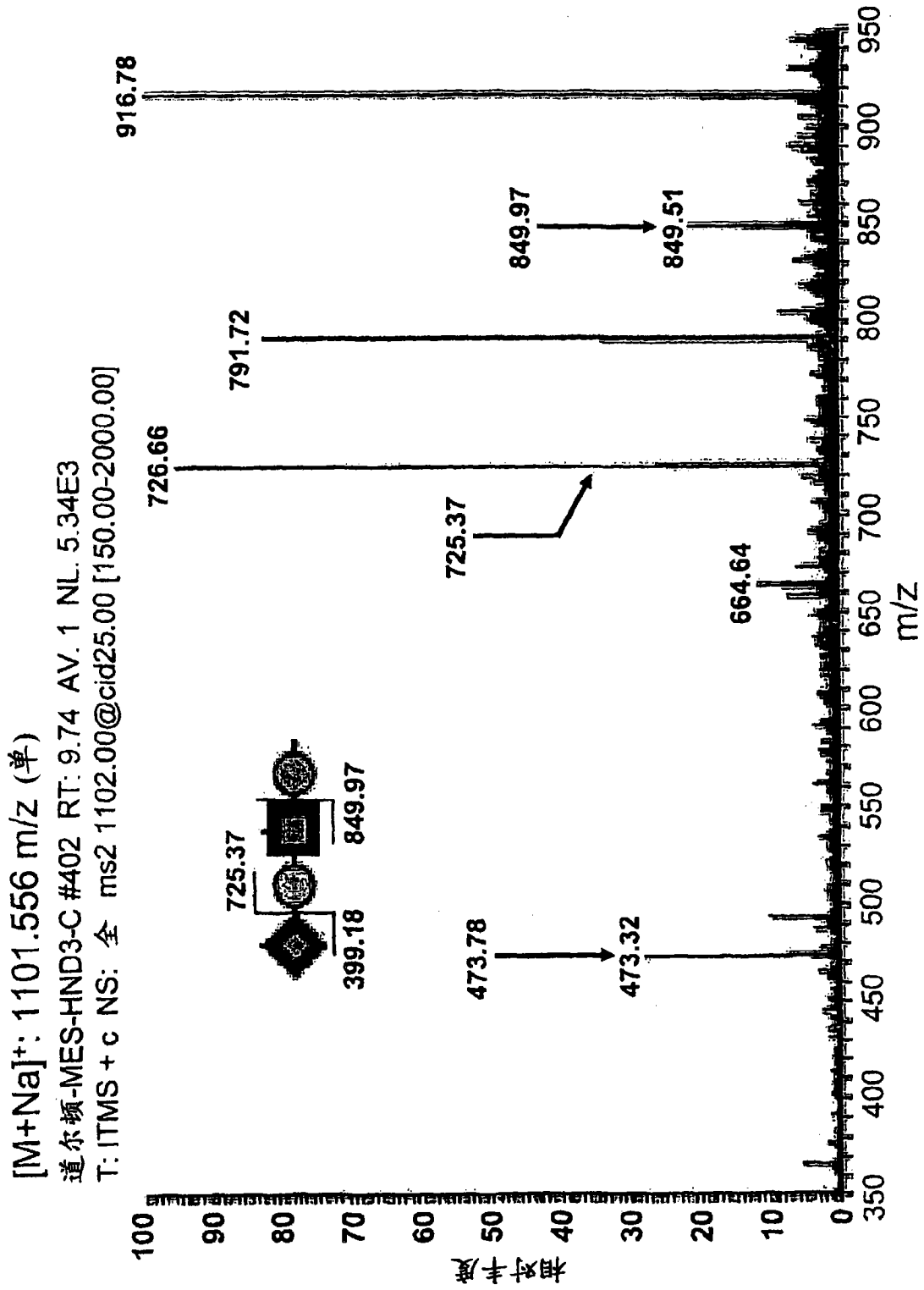


图 5B

[M+Na]<sup>+</sup>: 1187.615 m/z (单)

道尔顿-MES-C #445 RT: 10.75 AV.1 NL. 4.68E4  
T: ITMS + c NS: 全 ms2 1130.00@cid25.00 [150.00-2000.00]

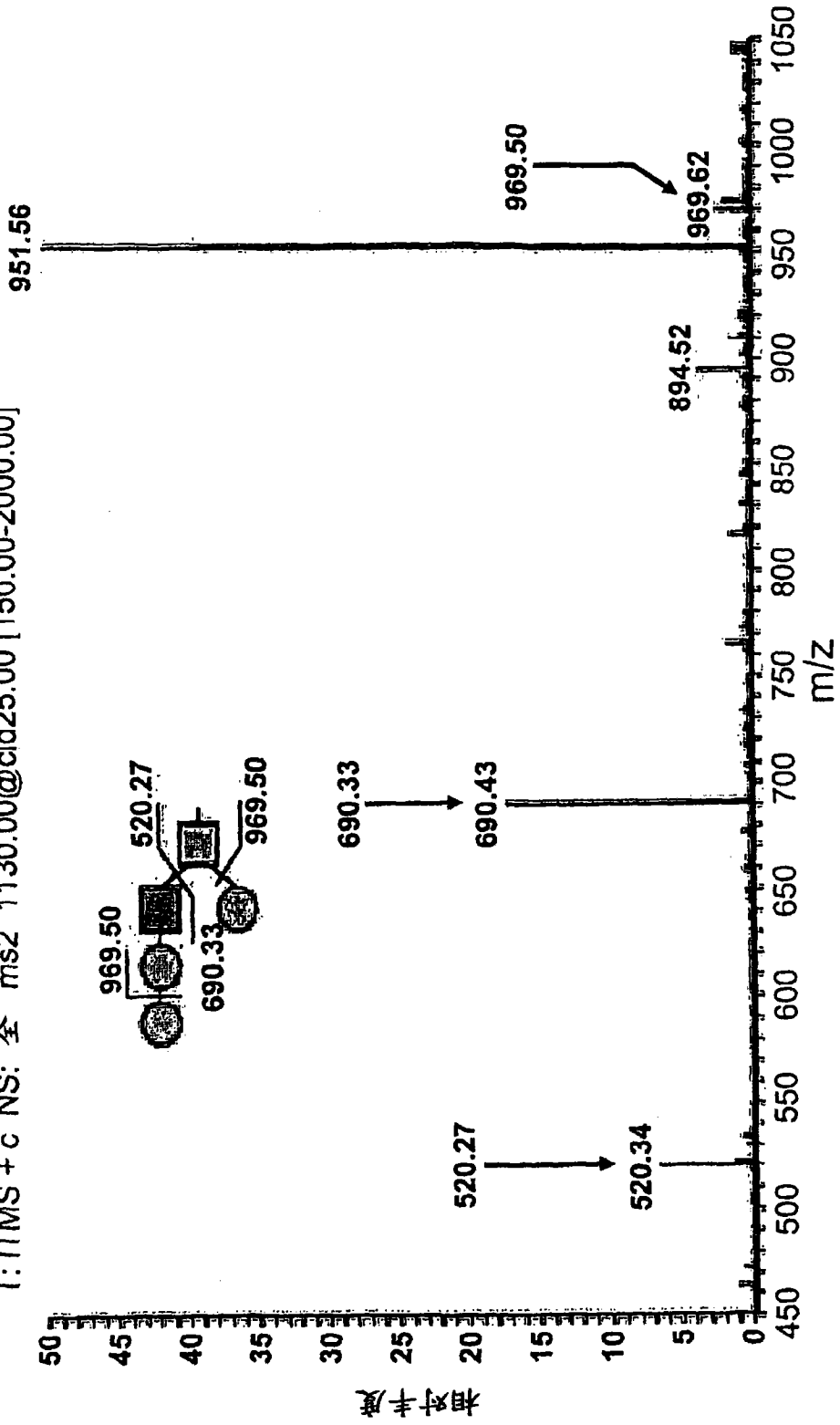


图 5C

[M+Na]<sup>+</sup>: 1189.609 m/z (单)

道尔顿-MES-HND3-C #446 RT: 10.81 AV. 1 NL. 3.31E4

T: ITMS + c NS: 全 ms2 1100.00@cid25.00 [150.00-2000.00]

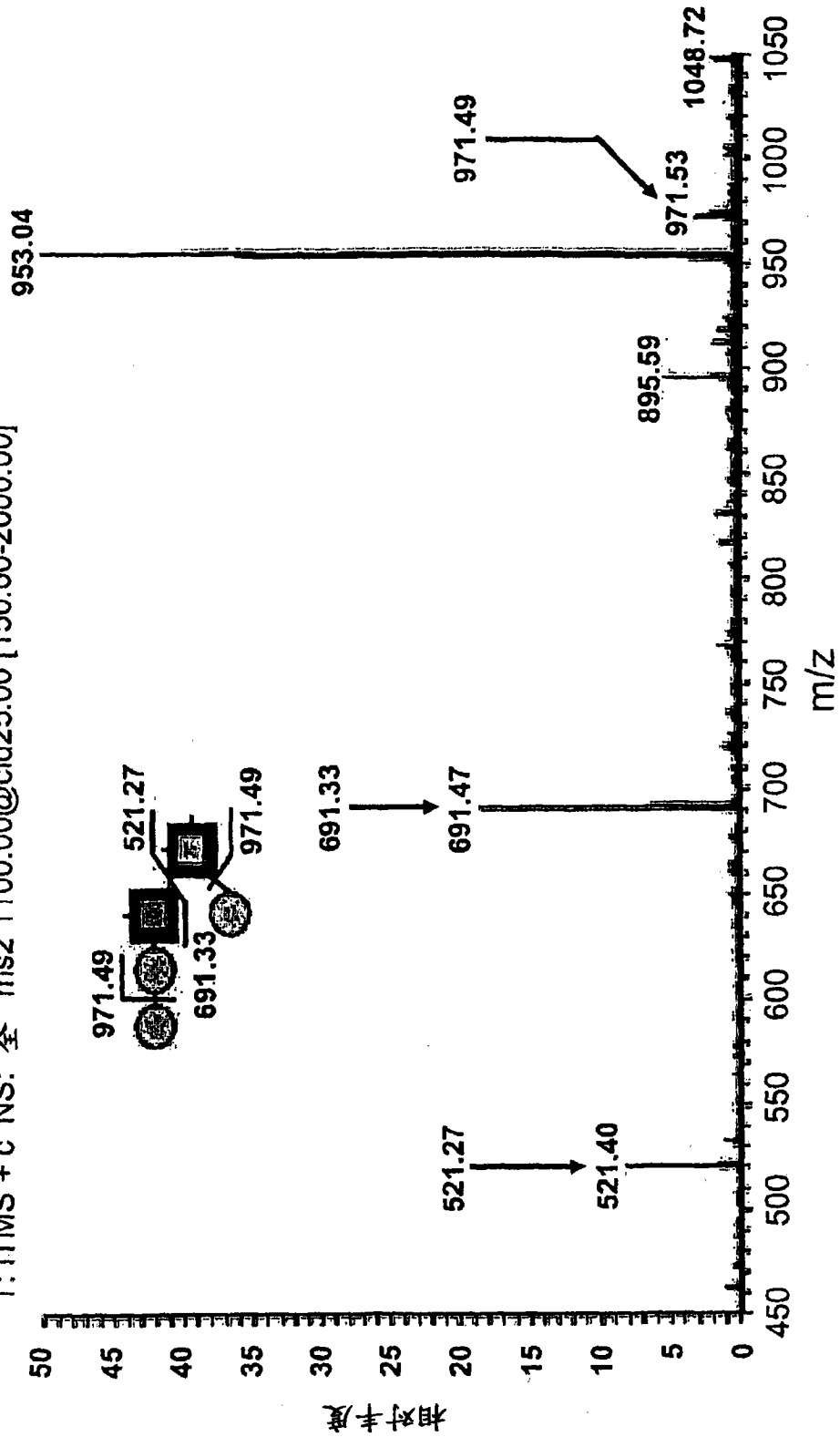


图 5D

[M+Na]<sup>+</sup>: 1256.636 m/z (单)

道尔顿-MES-C #479 RT: 11.58 AV. 1 NL. 4.88E4  
T: [TMS + c NS: 全 ms2 1256.00@cid25.00 [150.00-2000.00]

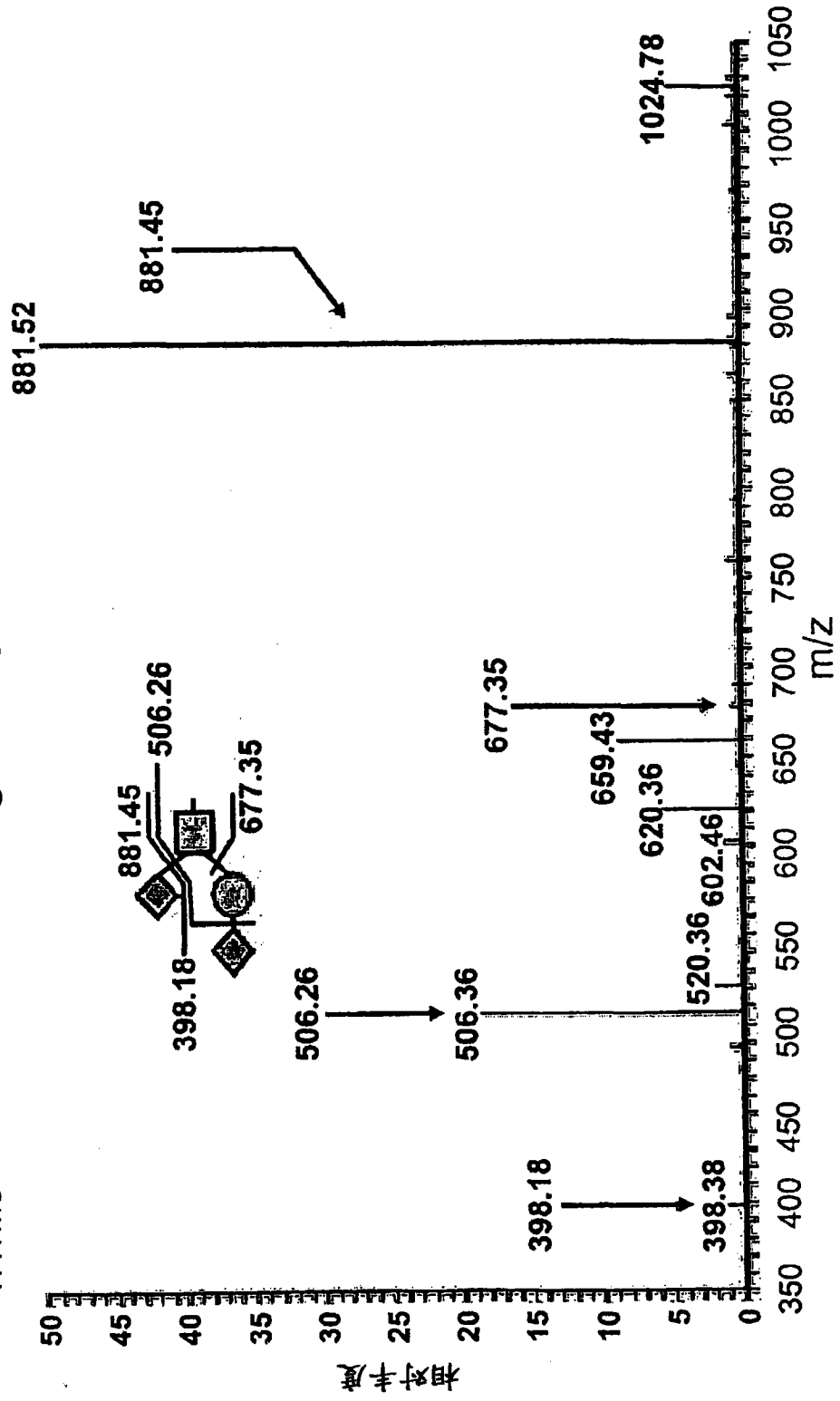


图 5E

[M+Na]<sup>+</sup>: 1259.627 m/z (单)

道尔顿-MES-HND3-C #481 RT:11.66 AV.1 NL.4.23E4

T: ITMS + c NS: 全 ms2 1150.00@cid25.00 [150.00-2000.00]

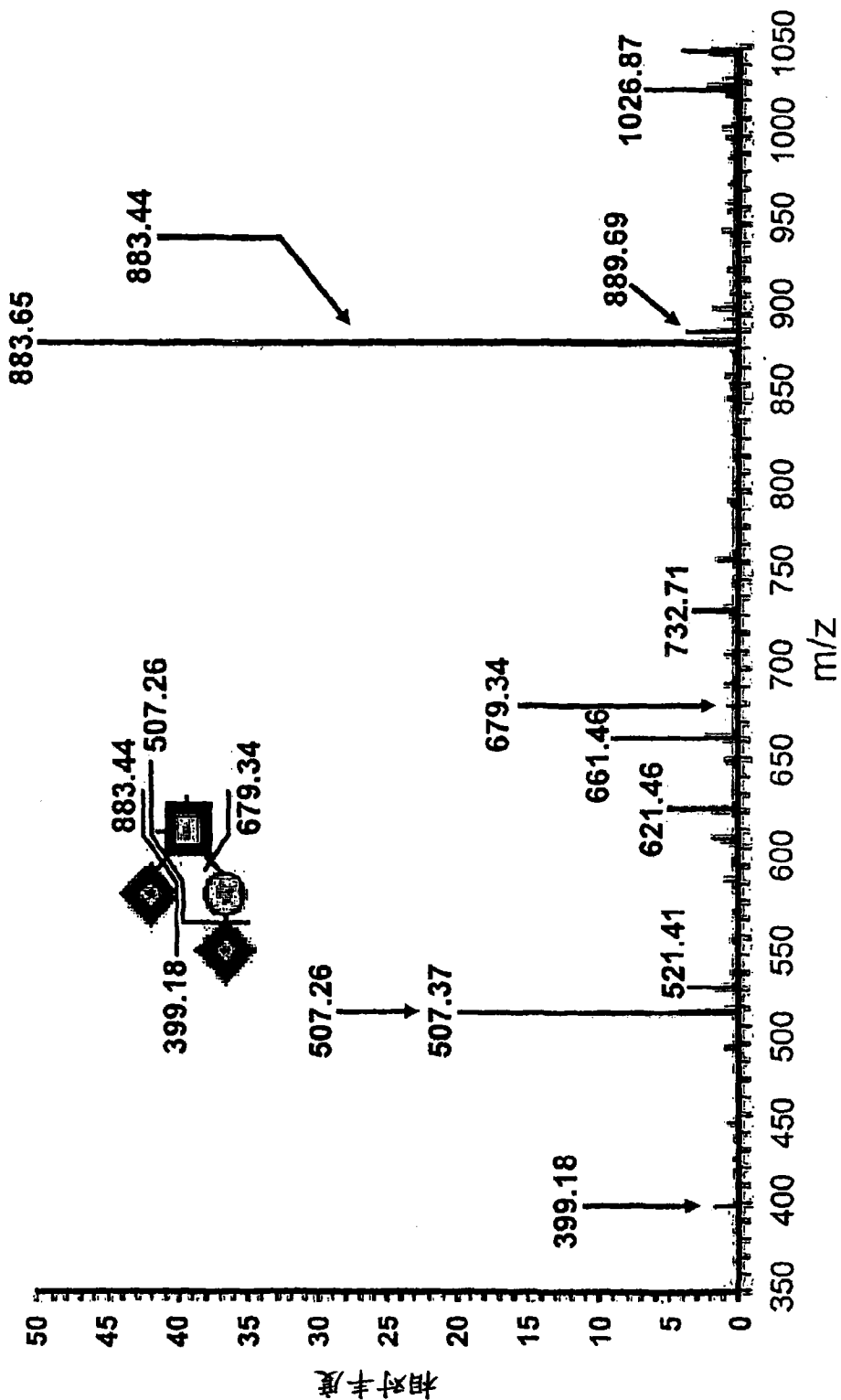


图 5F

表 1. IDAWG 标记效率

编号	N-连接的聚糖组合物	结构	氮数	[M+Na] <sup>+</sup>		[M+2Na] <sup>2+</sup>		标记效率(%)
				m/z (单)	ΔM (m/z)	m/z (单)	ΔM (m/z)	
1	(Man) <sub>4</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>		2	1887.983	1.994	1005.486	0.987	95
2	(Man) <sub>5</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>		2	2192.082	1.990	1107.536	0.997	96
3	(Gal) <sub>2</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Fuc) <sub>1</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>		4	2244.125	3.988	1133.557	1.994	96
4	(Gal) <sub>2</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Fuc) <sub>2</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>		4	2418.214	3.988	1220.602	1.994	95
5	(Gal) <sub>1</sub> (GlcNAc) <sub>3</sub> (Fuc) <sub>1</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>		5	2285.162	4.985	1154.071	2.493	97
6	(Gal) <sub>2</sub> (GlcNAc) <sub>3</sub> (Fuc) <sub>3</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>		5	2837.430	4.985	1430.210	2.493	98

图 6

专利名称(译)	用于定量糖组学的体内同位素标记方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101910841A</a>	公开(公告)日	2010-12-08
申请号	CN200880123401.9	申请日	2008-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	佐治亚大学研究基金会		
申请(专利权)人(译)	佐治亚大学研究基金会		
当前申请(专利权)人(译)	佐治亚大学研究基金会		
[标]发明人	罗伯特L韦尔斯 罗纳德C奥兰多 斯蒂芬达尔顿 凯利W莫雷曼 J迈克尔皮尔斯 詹姆斯A阿特伍德 迈克尔蒂迈耶 威廉S约克		
发明人	罗伯特·L·韦尔斯 罗纳德·C·奥兰多 斯蒂芬·达尔顿 凯利·W·莫雷曼 J·迈克尔·皮尔斯 詹姆斯·A·阿特伍德 迈克尔·蒂迈耶 威廉·S·约克		
IPC分类号	G01N33/534 G01N33/48 G01N33/68 G01N33/532		
CPC分类号	G01N2400/12 G01N33/6848 G01N2458/15 G01N33/502 G01N2400/38 G01N2400/00		
优先权	61/000920 2007-10-29 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及同位素标记聚糖和促进生物细胞的糖组学组合物的高通量定量/比较分析的方法。该方法尤其适用于辨别分化细胞和它们的糖组学特征、分化情况、疾病和/或治疗进展，诊断疾病状态，确定药物活性，建立制造效率和确定细胞中聚糖的半衰期。

