



基于聚合酶链式反应检测糖基化修饰水平

谭增琦¹, 张慧娜², 曹琳¹

(1. 西北大学 医学院/陕西省生物技术与生化工程重点实验室, 陕西 西安 710069;
2. 西北大学 生命科学学院/西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069)

摘要 糖基化是一种非常重要的蛋白质翻译后修饰, 人体内超过 50% 的蛋白具有糖基化修饰, 能够影响蛋白质的生物学功能参与多种生物学过程。在癌症、炎症或代谢性疾病的发生与进展等多种生理病理过程中会发生糖基化修饰的异常, 因此, 糖基化修饰的检测至关重要。经典的糖基化修饰检测方法, 如流式细胞术、质谱等方法对于痕量的糖基化信号难以检测。该文开发了一种基于 DNA 扩增的糖链检测方法, 将识别糖基化修饰的凝集素偶联单链 DNA(ssDNA), 凝集素与糖链的识别与结合把“糖信号”转化为“核酸信号”, 以 ssDNA 为模板进行 PCR 级联放大, 能够实现痕量的糖基化信号的检测, 为糖生物学研究和临床糖组学标志物发现提供了新的视角。

关键词 糖基化修饰; 凝集素; 聚合酶链式反应; 单链 DNA

中图分类号: Q53 **DOI:** 10.16152/j.cnki.xdxbr.2025-06-014

Detection of glycosylation modification levels based on polymerase chain reaction

TAN Zengqi¹, ZHANG Huina², CAO Lin¹

(1. Shaanxi Key Laboratory of Biotechnology and Biochemical Engineering, School of Medicine, Northwest University, Xi'an 710069, China;
2. Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education/College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract Glycosylation is an essential post-translational modification. Over 50% of proteins in the human body undergo glycosylation, which can influence their biological functions and participate in various biological processes. Abnormal glycosylation occurs in a range of physiological and pathological processes, such as cancer, inflammation, or metabolic diseases, making the detection of glycosylation essential. Classical methods for detecting glycosylation, like flow cytometry and mass spectrometry, often struggle with trace-level glycosylation signals. This study reports a DNA amplification-based method for glycan detection. Lectins that recognize and bind certain glycosylations are labeled with single-stranded DNA (ssDNA). The specific binding between lectins and glycans convert the "glycan signal" into a "nucleic acid signal". Using the ssDNA as a template for PCR amplification enables the detection of trace glycosylation signals, offering a new perspective for glycobiology research and the discovery of clinical glycomarker.

Keywords glycosylation; lectin; PCR; ssDNA

收稿日期: 2025-09-01

基金项目: 国家自然科学基金(32271338)

第一作者: 谭增琦, 男, 副教授, 博士生导师, 从事肿瘤糖生物学研究, zengqtan@nwu.edu.cn。

蛋白质糖基化修饰作为一种常见的翻译后修饰^[1],其过程是在糖基转移酶的作用下,将糖类分子(寡糖或多糖)连接到蛋白质的特定氨基酸残基上,形成糖蛋白^[2-3]。糖基化修饰能够影响蛋白质的稳定性、定位及折叠进而调控蛋白质功能,在许多疾病进展中发挥重要作用,包括肿瘤、阿尔兹海默症等,在肿瘤微环境中的作用也日益受到关注。肿瘤微环境中不仅有肿瘤细胞,还包括免疫细胞和基质细胞等,其糖基化修饰水平各不相同,糖基化修饰的异质性导致功能的多样性。肿瘤细胞上的程序性细胞死亡配体1(PD-L1)和免疫细胞上的程序性死亡受体1(PD-1)等免疫检查点分子上存在多个N-糖基化位点,糖基化修饰的异常影响PD-L1与PD-1的互作,进而调控肿瘤免疫^[4-5];肿瘤细胞及基质细胞的唾液酸糖基化可以与巨噬细胞上的异质性受体Siglec结合,降低巨噬细胞介导的吞噬作用及其抗肿瘤能力^[6]。基于肿瘤微环境的细胞异质性以及糖链结构的复杂性,从单细胞糖基化修饰水平理解肿瘤微环境中不同细胞亚群的功能具有重要的科学意义。

随着近年来检测技术的发展,已经开发了各种策略分析糖基化修饰,包括质谱(mass spectrometry, MS)、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)、核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)、毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)和凝集素印记(lectin blot)等。质谱法基于对糖链分子及其碎片离子的质荷比(m/z)的测量,通过离子化、质量分析、裂解和碎片离子解析等步骤,可以精确测定糖链的组成,结合串联质谱(MS/MS或MSn),可以确定糖链的连接方式、分支结构和修饰位点信息;亲水色谱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)是一种基于亲水相互作用的色谱技术,极性固定相表面的亲水基团与糖链的羟基形成氢键,可以分离和分析糖基化修饰,通过衍生化在糖链中引入荧光基团实现对糖链的定量检测;核磁共振通过检测原子核(如¹H)在磁场中的共振信号,可以识别糖残基的异头碳的 α -或 β -构型,并帮助确定糖链的立体结构和糖苷键的连接方式^[7]。凝集素是一类广泛存在于植物、动物和微生物中的蛋白质,具有特异性的糖结合位点,能够识别并结合特定的糖链结构,结合印记或流式细胞术等方法可以检测细胞特定糖基化水平。但上述方法无法检测单细胞或极少量细胞糖基化水平,急需开发

检测痕量糖基化修饰的新策略。

近年来,已有研究利用重组幽门螺杆菌 $\alpha 1,3$ 岩藻糖基转移酶(FucT)将带有单链DNA(single-stranded DNA, ssDNA)标记的岩藻糖残基转移到乳糖胺(LacNAc)聚糖单元的N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)的3-OH,通过测序手段同时获得单细胞转录组及乳糖胺修饰信息^[8];Yu等人将ssDNA标记的抗生物素抗体与生物素标记凝集素*Phaseolus vulgaris* agglutinin-L(PHA-L)偶联,制备出DNA标记的PHA-L,利用单细胞测序同时检测肿瘤浸润T细胞的单细胞转录组信息及分支型GlcNAc糖基化信息^[8]。上述方法受到糖基转移酶种类的限制,或受到抗体与生物素结合方式的限制,不能够对多种糖基化修饰进行检测。本研究开发了基于DNA扩增的糖链检测方法(DNA amplification based glycan determination, GlycoAmp),选择并优化多种Linker,使识别糖基化修饰的凝集素偶联ssDNA,通过凝集素与糖链的结合把“糖信号”转化为“核酸信号”,以ssDNA为模板进行PCR级联放大,方便快捷的实现痕量的糖基化信号的检测,为糖生物学研究和临床糖组学标志物发现提供了新的视角。

1 材料及方法

1.1 材料

试剂:DMEM培养基,购自以色列Biological Industries公司;胎牛血清、胰蛋白酶、二硫苏糖醇,购自美国Sigma-Aldrich公司;青霉素/链霉素溶液,购自美国Hyclone公司;快速PCR混合液(2×Rapid Taq Master Mix),购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;牛血清白蛋白,购自上海碧云天生物技术有限公司;PHA-E凝集素,购自美国Vector公司;Sulfo-SMCC、Alexa Fluor 647标记链霉亲和素、衣霉素(tunicamycin, TM),购自上海翌圣生物科技股份有限公司;小体积脱盐柱(WS-S Buffer EX Kit),购自武汉维思克思生物科技有限公司;毛喉素(forskolin, FSK),购自美国MedChemexpress生物科技公司;UNIQ-10寡聚核苷酸纯化试剂盒,购自上海生工生物工程有限公司;PC Alkyne-PEG4-NHS carbonate ester,购自陕西新研博美生物科技有限公司。

本文所使用引物如表1所示。

表 1 引物表
Tab. 1 Primer table

Primers	Sequence(5'→3')
PHA-E-ssDNA Forward	CACCGAATCCTCAATCTA
PHA-E-ssDNA Reverse	GGACTCTGGACCGACAT
Second step of overlap extension PCR-Forward	CACCGAATCCTCAATCTA
Second step of overlap extension PCR-Reverse	CAATCAAAACCCCTTCC

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物处理

人源乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 (简称 MB231) 购自上海中科院细胞库。稳定过表达 MGAT3 的乳腺癌细胞系 MDA-MB-231-OEMGAT3 由本实验室构建并保存。细胞均培养于 37 ℃, 5% CO₂ 的培养箱中, 培养基为含 10% 胎牛血清和 100 U/ml 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM。

1.2.2 考马斯亮蓝染色

1) 对样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 配置蛋白胶: 根据说明书配制分离胶及浓缩胶。

2) 蛋白上样: 在配置完成的蛋白胶中加入适量的样品及蛋白 Marker。

3) 电泳: 设置电压为 80 V, 电泳 30 min 将蛋白压缩至平齐, 接着提高电压为 120 V, 电泳 45 min。

4) 考马斯亮蓝染色: 根据制造商的说明进行配制和使用考马斯亮蓝染色液和脱色液。

在完成蛋白质电泳后, 室温下染色 1 ~ 1.5 h 至凝胶颜色与染色液颜色相近。染色完成后, 倒出染色液, 加入脱色液进行脱色, 脱色初期半小时换一次脱色液, 更换脱色液 2 ~ 4 次后, 室温过夜脱色, 直至背景蓝色基本脱去, 蛋白条带清晰可见。脱色完成后, 用凝胶成像系统记录凝胶的脱色结果。

1.2.3 流式细胞术

1) 封闭: 将收集到的细胞中加入 1 mL 含 3% BSA 的 PBS 重悬, 4 ℃ 放置 30 min。

2) 一抗孵育: 用 200 μL 含 1% BSA 的 PBS 重悬细胞, 生物素标记的 PHA-E 按照 1: 200 的比例加入, 4 ℃ 孵育 60 min, 用含 1% BSA 的 PBS 洗 3 遍。

3) 二抗孵育: 用 500 μL 含 1% BSA 的 PBS 重悬细胞, Fluor 647 标记的链霉亲和素按照 1: 500

的比例加入, 4 ℃ 避光孵育 30 min, 用含 1% BSA 的 PBS 洗 3 遍。

4) 检测: 将孵育后的样品通过流式细胞仪进行分析。

1.2.4 SMCC 交联剂偶联凝集素与 ssDNA

1) 将凝集素 *Phaseolus vulgaris* agglutinin-E (PHA-E) 溶于 55 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (含有 150 mmol/L NaCl、20 mmol/L EDTA、pH 7.2) 中。向 20 μg PHA-E 中加入 1 μL 4 mmol/L 的磺基琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸盐 (Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, SMCC), 室温下孵育 2 h。

2) 选择 50 kDa 超滤管纯化 PHA-E-SMCC, 去除游离的 PHA-E 和 SMCC。将步骤 1) 中获得的样品小心地加入超滤管中, 14 000 g 离心 10 min, 倒掉收集管中的液体, 再加入 PBS, 共清洗 3 次; 向超滤管中加入 100 μL 55 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 将超滤管倒置放在收集管中, 2 000 g 离心 5 min, 收集纯化后的 PHA-E-SMCC。

3) 用含有 100 mmol/L DTT 的 55 mmol/L 磷酸盐缓冲液还原带有二硫键标记的 ssDNA, 37 ℃ 孵育 1 h, 用 UNIQ-10 寡聚核苷酸纯化试剂盒纯化, 以去除未反应的 DTT。

4) 将 PHA-E-SMCC 与还原的 ssDNA 混合, 过夜孵育。

5) 选择 50 kDa 超滤管纯化 PHA-E-SMCC-ssDNA, 参考步骤 2), 收集纯化后的 PHA-E-SMCC-ssDNA。

1.2.5 PC Alkyne-PEG4-NHS 交联剂偶联凝集素与 ssDNA

1) 向 100 μL 的 1 mg/mL 的 PHA-E 加入 1.92 μL 的 4 mmol/L PC Alkyne-PEG₄-NHS, 黑暗条件下室温震荡孵育 2 h。然后加入 1 mol/L Tris-HCl (pH = 8) 黑暗条件下搅拌 15 min 中和过量的 PC Alkyne-PEG₄-NHS。使用小体积脱盐柱 (WS-S Buffer EX Kit) 来除去未反应和过量的 PC

Alkyne-PEG₄-NHS,通过加入 PBS 将最终体积调节至 1 mL。

2) ssDNA 凝集素偶联,将步骤 1) 产生的 PHA-E 与叠氮化物修饰的 ssDNA 反应:向 PHA-E 中加入两倍摩尔量的叠氮修饰的 ssDNA,加入终浓度为 100 μmol/L TBTA、1 mmol/L 的 CuSO₄、6 mmol/L 抗坏血酸钠、100 μmol/L 的 PC Alkyne-PEG₄-NHS,混匀,避光反应 2 ~ 4 h。通过 50 kDa 超滤膜去除未参与反应的 ssDNA。

1. 2. 6 紫外断裂 PHA-E-PC-ssDNA

取 10 μL PHA-E-PC-ssDNA,365 nmUV 照射 30 min,加 90 μL 水稀释,将 100 μL 液体加入 50 kDa 超滤管,14 000 g 离心 5 min,收集离心后的样品,即为 UV 断裂 PHA-E-PC-ssDNA 后的产物 ssDNA。

1. 2. 7 GlycoAmp 方法检测低丰度糖链

1) 封闭:将待检测的细胞加入 1 mL 含 3% BSA 的 PBS 重悬,4 ℃放置 30 min。

2) PHA-E-ssDNA 孵育:用制备的 PHA-E-ssDNA 与细胞孵育,4 ℃放置 60 min。

3) 释放:加入 100 μL 100 mmol/L 乙酸重悬细胞沉淀,4 ℃放置 60 min;或加入 10 μL 1% BSA 的 PBS 重悬细胞沉淀,通过 365 nm 紫外(Ultraviolet,UV)照射 30 min,离心收集上清,进行直接 PCR 或重叠延伸 PCR。

4) 直接 PCR:以乙酸释放的上清为模板,加入 ssDNA 特异性引物进行直接 PCR,参考 1. 2. 5

节中的方法;重叠延伸 PCR,以乙酸释放的上清或 UV 照射释放的上清为模板,引入延长片段,按照 2 × Rapid Taq Master Mix 说明书进行 PCR 反应,得到延伸产物;再以延伸产物为模板,引物如表 1 所示,进行 PCR 反应,反应产物用于琼脂糖凝胶电泳。

1. 2. 8 统计学差异分析

本文实验数据使用 GraphPad Prism. 9. 0 软件进行统计学分析,单因素两组样本均值比较采用非配对 Student’s t-test 进行分析, $p < 0. 05$ 则说明统计学中具有显著性差异。ns,无显著性差异;*, $p < 0. 05$;**, $p < 0. 01$;***, $p < 0. 001$ 。

2 结果

2. 1 GlycoAmp 技术流程

为了解决细胞亚群或单细胞上痕量糖链难以检测的问题,本研究开发了基于 DNA 扩增的糖链检测技术,命名为 GlycoAmp(见图 1)。该方法首先使用 linker 偶联凝集素与 ssDNA,将凝集素-ssDNA 与细胞共孵育,通过凝集素与糖链的结合把“糖信号”转化为“核酸信号”;其次,利用竞争性结合或乙酸处理等方法将凝集素-ssDNA 从细胞表面释放下来,以 ssDNA 为模板进行 PCR,放大糖链信号;最后,通过琼脂糖凝胶电泳,方便快捷的实现痕量糖基化信号的检测。

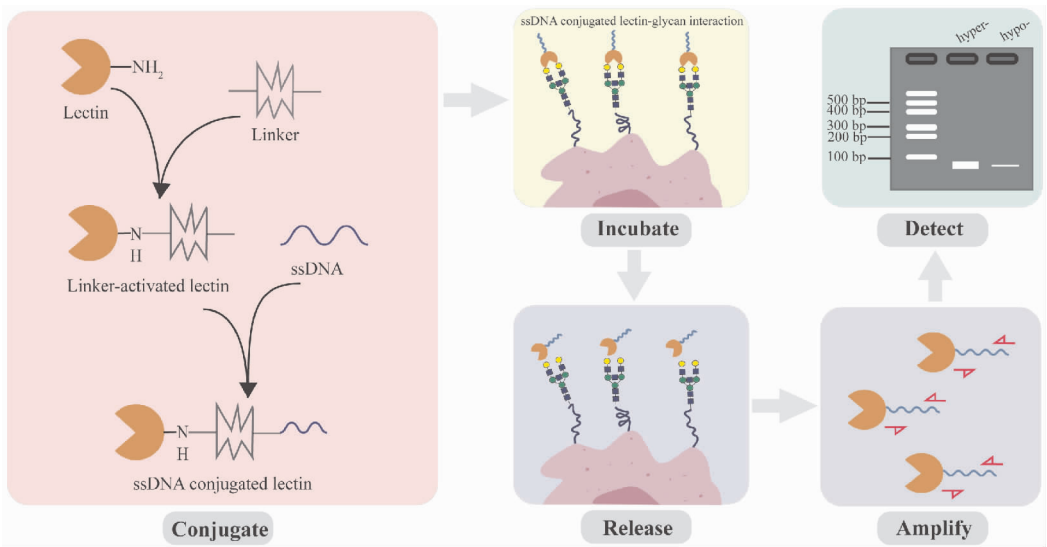


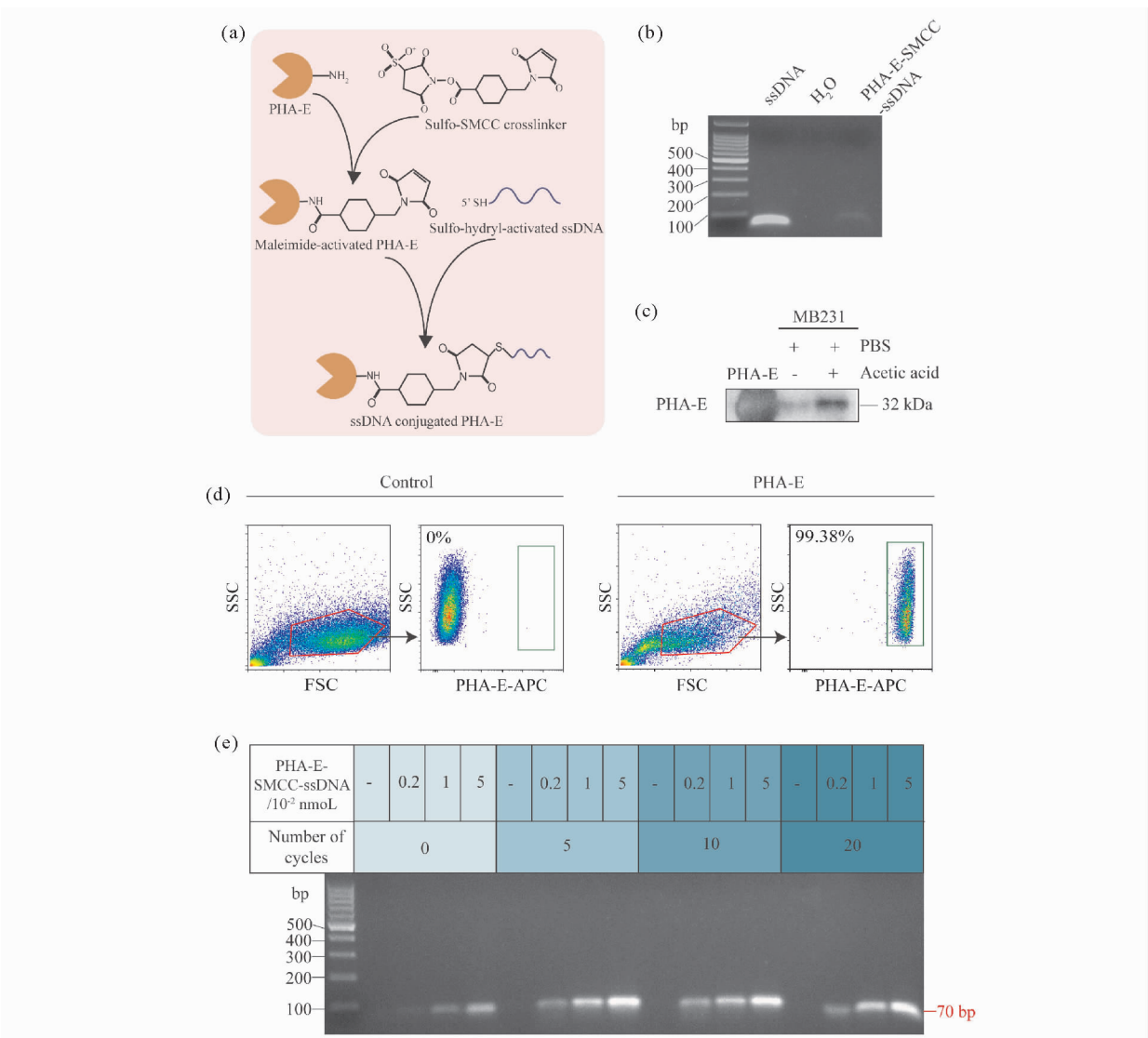
图 1 基于 DNA 扩增的糖链检测技术流程图

Fig. 1 Flowchart of GlycoAmp

2.2 GlycoAmp 技术检测细胞膜表面糖基化修饰

交联剂 SMCC 具有 N-羟基琥珀酰亚胺酯和马来酰亚胺,可以偶联有氨基的 PHA-E 和有巯基标记的 ssDNA,形成 PHA-E-SMCC-ssDNA〔见图 2(a)〕。根据凝胶迁移实验原理,在琼脂糖凝胶电泳时,相比于未结合蛋白的核酸,结合蛋白的核酸由于蛋白的存在会发生阻滞,因此核酸条带位置相对滞后。将制备的 PHA-E-SMCC-ssDNA 进行琼脂糖凝胶电泳,结果显示,与游离的 ssDNA 阳性对照组相比,PHA-E-SMCC-ssDNA 组条带位置发生上移〔见图 2(b)〕,说明 PHA-E 的存在导致

ssDNA 的迁移速度降低,证明了 SMCC 可以有效偶联 ssDNA 与 PHA-E。用 PHA-E-SMCC-ssDNA 与 MB231 细胞孵育,根据乙酸含有大量氢键可以竞争性结合 PHA-E,所以使用 100 mM 乙酸将 PHA-E-SMCC-ssDNA 洗脱后并收集,通过考马斯亮蓝检测 PHA-E 水平,结果显示,与 PBS 洗脱相比,乙酸洗脱组的条带更亮〔见图 2(c)〕,证明 100 mM 乙酸可以更有效地将 PHA-E 洗脱。为评估 PHA-E 与细胞的结合效率,本研究进行了流式细胞术分析,结果显示,与对照组相比,实验组的 PHA-E 阳性细胞比例高达 99.38%〔见图 2(d)〕。



注:(a)SMCC 偶联 PHA-E 和 ssDNA 流程图;(b) 琼脂糖凝胶电泳检测偶连效果;(c)考马斯亮蓝检测乙酸释放结合在细胞膜表面 PHA-E 的效果,PHA-E 的亚基分子量为 32 kDa;(d) 流式细胞术检测 PHA-E 与细胞结合效率;(e)不同循环数时 PHA-E-SMCC-ssDNA 定量效果分析。

图 2 SMCC 偶联 PHA-E 和 ssDNA

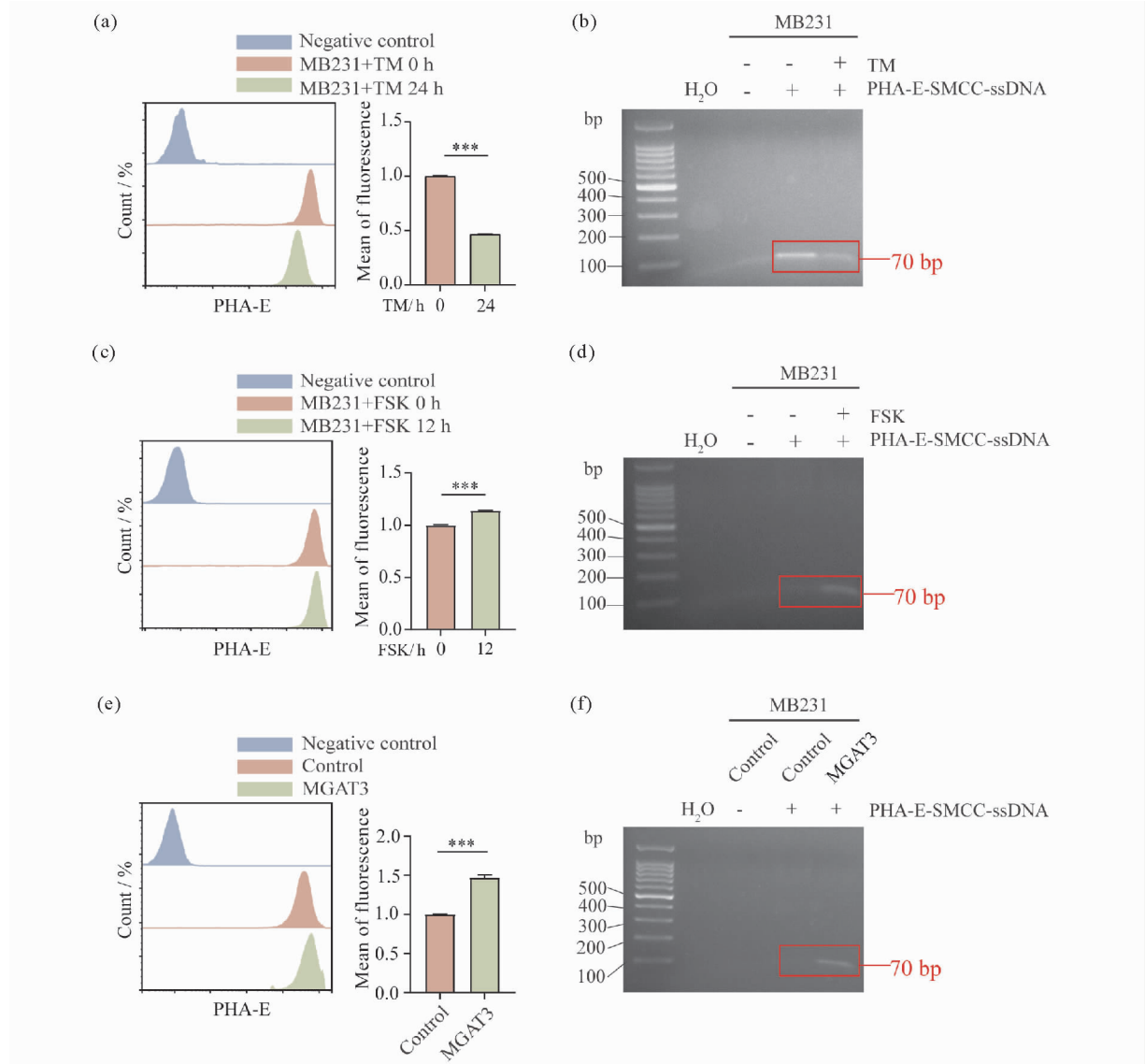
Fig.2 SMCC linker conjugates PHA-E and ssDNA

本实验进一步用不同浓度的 PHA-E-SMCC-ssDNA 为模板,进行不同循环数的 PCR,将 PCR

产物进行琼脂糖凝胶电泳验证相对定量的效果。结果发现在 0、5、10、20 个循环时,随着模板量的增大,条带亮度均显示出逐渐变亮的趋势〔见图 2 (e)〕,表明 20 个循环数内核酸信号可以反映糖链信号,而 5 个循环能够节约大量的 PCR 时间。因此,后续实验将选用 5 个循环进行 PCR 反应。

衣霉素 TM 可抑制 N-连接糖基化的从头合成^[9-11],利用经典的流式细胞术和本文方法检测 TM 处理后平分型 GlcNAc 的水平变化。流式细

胞术结果显示,相比于对照组,TM 处理组 PHA-E 的荧光信号强度显著降低〔见图 3(a)〕,说明 TM 能抑制平分型 GlcNAc 修饰水平。利用本文方法将 MB231 细胞与 PHA-E-ssDNA 孵育,100 mmol/L 乙酸释放 PHA-E-ssDNA 后,加入引物进行 PCR,琼脂糖凝胶电泳检测发现,相较于对照组,TM 处理组条带更暗〔见图 3(b)〕,说明本文方法能够准确地检测由 TM 处理引起的细胞平分型 GlcNAc 修饰水平的降低。



注:流式细胞术(a)及 GlycoAmp (b) 检测 TM 处理的 MB231 细胞糖基化水平;流式细胞术检测(c)及 GlycoAmp(d)检测 FSK 处理的 MB231 细胞糖基化水平;流式细胞术检测(e)及 GlycoAmp(f)检测过表达 MGAT3 对细胞糖基化水平的影响,Control 为 MB231 细胞,MGAT3 为过表达 MGAT3 的 MB231 细胞。

图 3 PHA-E-ssDNA 检测糖链丰度

Fig. 3 PHA-E-ssDNA detect glycan abundance

毛喉素 FSK 是一种腺苷酸环化酶激活剂^[12],能够显著升高平分型 GlcNAc 修饰水平^[13]。流式

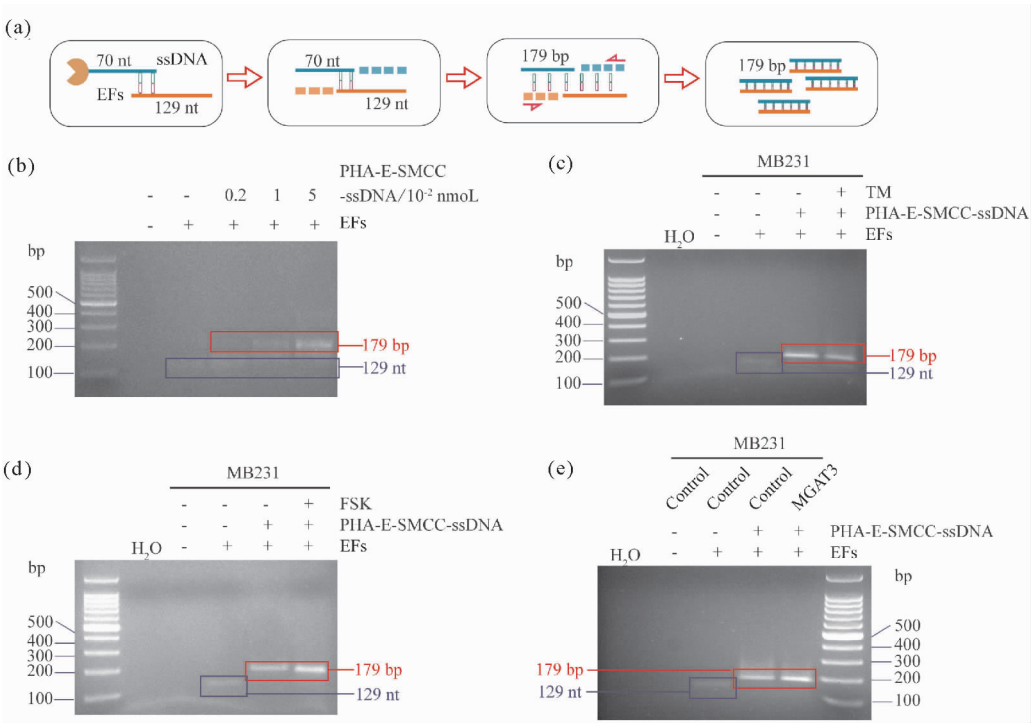
细胞术检测 FSK 处理后的 MB231 细胞,PHA-E 的荧光信号强度升高〔见图 3(c)〕。同样,利用本

文方法检测发现,相较于对照组,FSK 处理组条带更亮[见图 3(d)],说明本文方法能够准确地检测由 FSK 引起的平分型 GlcNAc 修饰水平的升高。

MGAT3 是 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶,负责将 GlcNAc 以 β -14 键连接到核心五糖的 β -甘露糖上,形成平分型 GlcNAc 结构^[14]。通过流式细胞术结果显示,MB231 细胞过表达 MGAT3 后,PHA-E 的荧光信号强度显著升高[见图 3(e)],说明过表达 MGAT3 能升高平分型 GlcNAc 修饰水平。同样,利用本文方法检测过表达 MGAT3 的 MB231 细胞,结果显示,相较于对照组,过表达 MGAT3 组条带更亮[见图 3(f)],说明本文方法能够准确地检测由过表达 MGAT3 引起的平分型 GlcNAc 修饰水平的升高。证明本文方法可以检测到由 TM 处理、FSK 处理、过表达 MGAT3 处理所引起的平分型 GlcNAc 修饰水平的改变。

2.3 重叠延伸 PCR 避免引物二聚体的干扰

引物二聚体是 PCR 中常见的非特异性扩增产物,大小约为 30 ~ 40 bp,本文测糖链丰度方法的 PCR 扩增产物小于 80 bp,使用琼脂糖凝胶电泳难以区分引物二聚体与目的片段。因此,在本文方法检测糖链丰度相同的基础上,引入了一段 129 nt 的单链 DNA 片段,称之为延长片段(extend fragments,EFs)用以结合 ssDNA 末端进行重叠延伸 PCR,两个单链 DNA 片段可以互补延伸形成 179 bp 的 DNA 双链[见图 4(a)],以避免引物二聚体的干扰。为了验证 PHA-E-SMCC-ss-DNA 与 EFs 融合效率,本实验以不同剂量的 PHA-E-SMCC-ss-DNA 为模板,加入等量的 EFs 退火延伸。结果显示,随着模板的增多,条带越来越亮[见图 4(b)],说明 PHA-E-SMCC-ssDNA 与 EFs 可有效融合。



注:(a) 重叠延伸 PCR 检测糖链丰度流程图;(b) 重叠延伸 PCR 检测 PHA-E-ssDNA 与 EFs 的融合效率,EFs 的长度为 129nt,延伸产物的长度为 179bp;GlycoAmp 检测 TM 处理(c) FSK 处理(d) 及过表达 MGAT3(e) MB231 细胞的糖基化水平,Control 为 MB231 细胞,MGAT3 为过表达 MGAT3 的 MB231 细胞。

图 4 重叠延伸 PCR 检测糖链丰度

Fig. 4 Overlap extension PCR detect glycan abundance

利用 TM 处理细胞的模型并引入 EFs,琼脂糖凝胶电泳结果显示,相较于不加 TM 的对照组, TM 处理组条带更暗[见图 4(c)],说明本文方法能够准确地检测由 TM 处理引起的平分型 Glc-

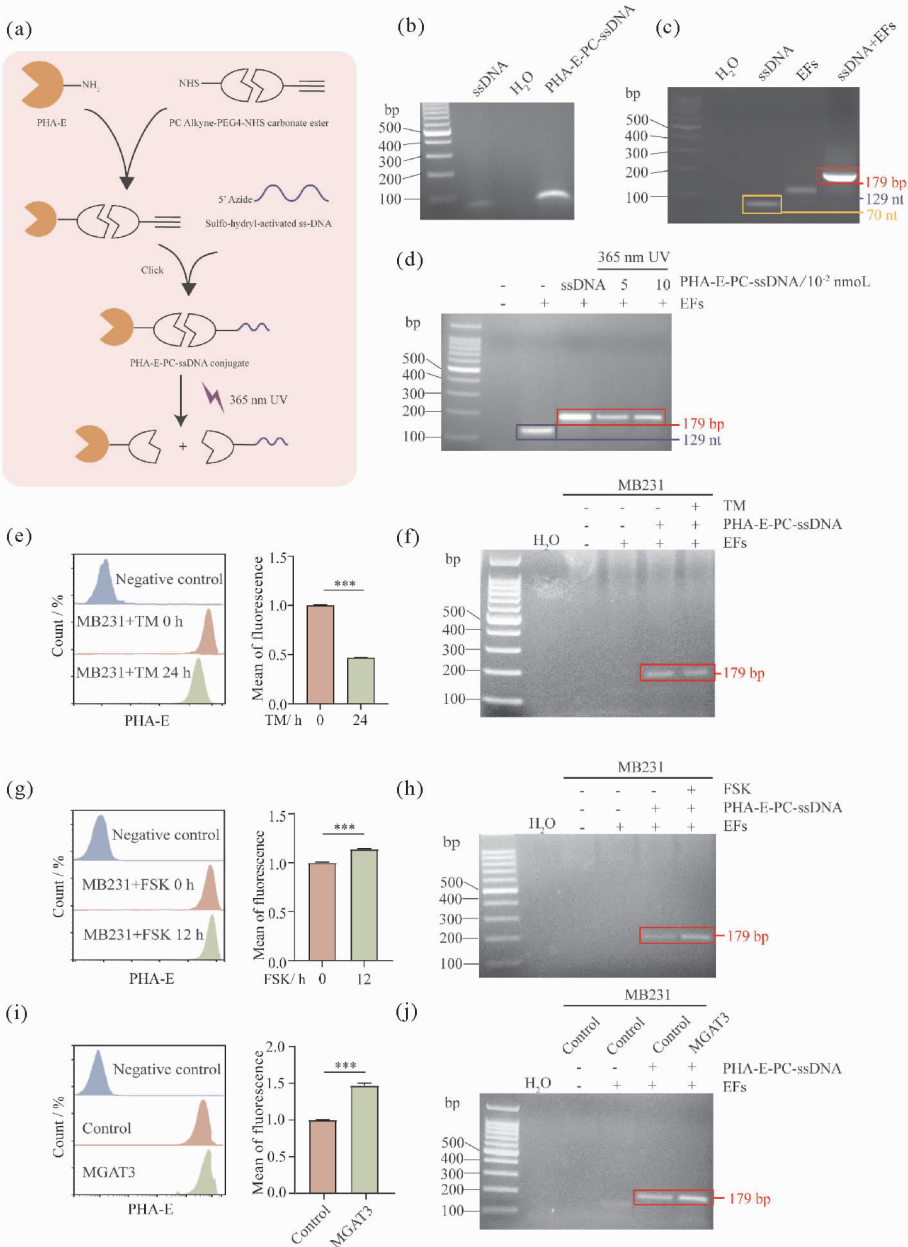
NAc 修饰水平的降低。利用 FSK 处理模型并引入 EFs,琼脂糖凝胶电泳结果显示,相较于不加 FSK 的对照组, FSK 处理组条带更亮[见图 4(d)];同样地,利用过表达 MGAT3 处理模型并引

入 EFs,琼脂糖凝胶电泳结果显示,相较于对照组,过表达 MGAT3 组条带更亮[见图 4(e)]。说明本文方法能够准确地检测过表达 MGAT3 引起的平分型 GlcNAc 修饰水平的升高。

2.4 利用光可裂解的 Linker 释放 ssDNA 利于糖基化检测

为了避免 PHA-E-ssDNA 复合物中 PHA-E 影

响 ssDNA 的扩增过程,将使用一种光可裂解的交联剂——PC Alkyne-PEG₄-NHS 偶联 PHA-E 与 ssDNA,该交联剂在 365 nm UV 照射下会使 ssDNA 从 PHA-E-PC-ssDNA 上脱落^[15][见图 5(a)],避免 PHA-E 对扩增过程的影响。



注:(a)PC Alkyne-PEG₄-NHS 偶联 PHA-E 和 ssDNA 流程图;(b) 琼脂糖凝胶电泳检测偶联效果;(c) 检测 ssDNA 与 EFs 的融合效率,ssDNA 长度为 70 nt,EFs 的长度为 129 nt,延伸产物的长度为 179 bp;(d) 琼脂糖凝胶电泳验证 UV 照射使 ssDNA 从 PHA-E-PC-ssDNA 上脱落;流式细胞术(e) 及 GlycoAmp (f) 检测 TM 处理的 MB231 细胞糖基化水平;(e) 流式细胞术检测(g) 及 GlycoAmp (h)检测 FSK 处理的 MB231 细胞糖基化水平;(e) 流式细胞术检测(i) 及 GlycoAmp (j) 检测过表达 MGAT3 对细胞糖基化水平的影响,Control 为 MB231 细胞,MGAT3 为过表达 MGAT3 的 MB231 细胞。

图 5 利用光裂解的 Linker 释放 ssDNA 检测糖链丰度

Fig. 5 Release ssDNA from photodegradable linkers detect glycan abundance

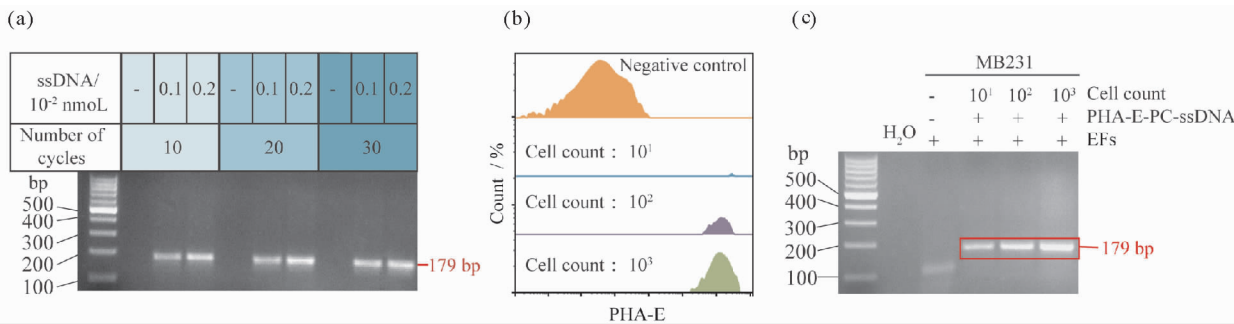
琼脂糖凝胶电泳证明了 PC Alkyne-PEG₄-NHS 能有效偶联 ssDNA 与 PHA-E[见图 5(b)]。为了验证 ssDNA 与 EFs 的融合效率,将 ssDNA 和 EFs 进行重叠延伸 PCR,琼脂糖凝胶电泳结果显示,同时加入 ssDNA 和 EFs 时,PCR 产物的大小为 179 bp[见图 5(c)],表明 ssDNA 与 EFs 可以有效融合并进行扩增。用 UV 将 PHA-E-PC-ssDNA 照射 30 min,超滤膜回收脱落下 ssDNA,并以其为模板进行重叠延伸 PCR,发现在 UV 照射后,重叠延伸 PCR 产物与阳性对照(第四泳道,模板为游离的 ssDNA)在凝胶中的位置相同,均在 179 bp[见图 5(d)],说明 UV 可使 ssDNA 从 PHA-E-PC-ssDNA 上成功脱落。

利用本文方法检测 TM 处理的 MB231 细胞上的平分型 GlcNAc 修饰[见图 5(e)]发现,相较于对照组,TM 处理组条带更暗[见图 5(f)],说明本文方法能够准确地检测到 TM 处理导致的细胞平分型 GlcNAc 修饰水平降低。同样,本文方法检测 FSK 处理[见图 5(g)]或者过表达 MGAT3[见图 5(i)]的 MB231 细胞发现,FSK 处理组[见

图 5(h)]或者过表达 MGAT3 组条带更亮[见图 5(j)],说明本文方法能够准确地检测到 FSK 处理或者过表达 MGAT3 导致的细胞平分型 GlcNAc 修饰水平升高。

2.5 GlycoAmp 技术检测极低丰度糖链

本研究探究 GlycoAmp 方法在检测低丰度糖链方面的应用潜力。首先以极低剂量 UV 照射释放的 ssDNA 模拟低丰度糖链,进行不同循环数的 PCR,产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。结果发现在 10、20、30 个循环时,最低剂量的 ssDNA 均可被观察到[见图 6(a)],表明 30 个循环数内核酸信号依然可以反映糖链信号,而 10 个循环能够节约大量的 PCR 时间。因此,后续实验将选用 10 个循环进行 PCR 反应。鉴于单个细胞表面糖链丰度极低,常规手段几乎无法检出,而 GlycoAmp 凭借核酸扩增可将糖链信号指数级放大,理论上已具备在单细胞测序流程中同步捕获膜糖链信息与转录组数据的潜力,下面进一步评估其在极限样本量下的实际表现。



注:(a) 不同循环数时极低剂量 ssDNA 的定量效果分析;(b) 流式细胞术检测不同数量 MB231 细胞的糖链信号;(c) GlycoAmp 检测 10¹、10² 及 10³ 个细胞糖基化水平,延伸产物的长度为 179 bp。

图 6 GlycoAmp 检测低丰度糖链

Fig. 6 GlycoAmp detect glycan abundance

分别取 10¹、10²、10³ 个细胞,通过流式细胞术分析发现,在 10 个细胞时几乎无法观察到荧光信号[见图 6(b)]。使用 GlycoAmp 检测发现,琼脂糖凝胶电泳可以观察到 10 个细胞级可产生明显的条带[见图 6(c)],说明本文方法检测到了低丰度的糖链信号,具有与单细胞测序结合,同时检测细胞膜表面糖链水平与 mRNA 表达的应用潜力。

3 讨论与结论

细胞表面糖基化修饰参与了一系列重要的生理病理过程,与人类的各种疾病密切相关,是生

命科学研究的重要内容。但是糖链分子自身没有发光基团,难以对糖链直接进行检测和分析,现有检测手段包括质谱、高效液相色谱、核磁共振、毛细管电泳和凝集素印记等,对于细胞亚群或者单细胞的痕量糖链难以检测。近年来,基于细菌来源糖基转移酶的化学酶法,或通过抗体生物素结合方式将 ssDNA 偶联凝集素,现实同时检测细胞膜表面糖基化及转录组的单细胞测序方法应运而生^[8, 16],但是存在操作复杂、成本高昂、检测糖链种类有限等问题。因此,本文开发了一种基于 DNA 扩增的糖链检测方法,通过 ssDNA 标记凝集素与糖链的结合,将“糖信号”转化为“核酸信

号”,通过 PCR 级联放大及琼脂糖电泳,能够低成本、较为方便的检测细胞亚群或单细胞糖基化修饰情况。

DNA 扩增技术可将微量的靶 DNA 特异性扩增上百万倍,大大的提高了对 DNA 分子的分析 and 检测能力。而糖链不能像 DNA 分子一样进行直接扩增,信号不能放大,限制了现有检测技术对痕量糖链的检测。受到 DNA 扩增技术的启发,Yu 等人将 ssDNA 偶联在 GDP 岩藻糖糖供体上,利用重组幽门螺杆菌 $\alpha 1,3$ 岩藻糖基转移酶将 ssDNA 偶联的岩藻糖连接在细胞的 LacNAc 上,再进行后续的建库扩增及测序用以检测单细胞水平的 LacNAc 修饰水平^[8]。凝集素能够识别并结合特异性糖基化修饰,被广泛应用在糖生物学研究中。利用生物素标记的凝集素与 ssDNA 偶联的生物素抗体相结合,从而将 ssDNA 连接在分支型 GlcNAc 结构上,利用单细胞测序平台扩增糖链信号,同时获得糖基化和转录组信息^[16]。本文利用 Linker 的琥珀酰亚胺基团结合凝集素的氨基,马来酰亚胺基团/炔基结合巯基/叠氮基标记的 ssDNA,分子筛去除 ssDNA,从而偶联凝集素与 ssDNA。相较于生物素标记的凝集素结合商业化 ssDNA 标记的抗体/链霉亲和素的偶联方式,该方法可以通过设计不同的 ssDNA 序列标记多种凝集素,结合实时定量 PCR 技术或高通量测序手段同时检测多种糖基化修饰。目前市售有超过 4 种凝集素,能够识别唾液酸、岩藻糖、乳糖胺、Lewis X、Lewis Y 等多种糖链结构及末端修饰,具有较高的特异性,是检测、区分不同糖基化修饰的常用工具,被科研工作者广泛使用^[17-18]。本文所建立的策略,依赖于凝集素对糖链的识别与结合,具有检测多种糖基化修饰的潜力。此外,本方法通过琼脂糖凝胶电泳即可检测放大糖基化修饰的信号,操作简便可行性高,还可以优化 ssDNA 序列,利用实时定量荧光 PCR 对糖基化信号进行“定量”分析。利用本方法还可以结合 ssDNA 偶联凝集素与 ssDNA 偶联抗体,利用邻近连接 (PLA) 及滚环扩增 (RCA) 技术,检测低丰度蛋白糖基化修饰水平^[19]。但是本方法仍有局限性,受到模板链序列特征、GC 含量等因素的影响,PCR 扩增存在偏好性,在同时检测多种糖基化修饰时,难以横向比较不同糖基化修饰之间的高低。针对上述问题,可以通过优化 ssDNA 序列降低 PCR 的偏好性,或者在 ssDNA 序列中引入 UMI(unique molec-

ular identifier)通过测序及生物信息学手段降低偏好性。

综上所述,在检测极少量细胞膜表面糖基化水平方面,传统方法如流式细胞术和凝集素印迹等对样本量需求较大、检测限较高,往往难以有效捕捉微弱的糖链信号;而单细胞测序及单分子检测技术虽具高灵敏度,却因成本较高限制了其广泛应用。本文所建立的方法主要包括凝集素偶联 ssDNA、细胞与凝集素的孵育反应以及后续 PCR 扩增等步骤,通过将糖链信号转化为更易于检测的核酸信号,实现了在无需依赖昂贵仪器的情况下,完成简便、快速且高灵敏的糖基化分析,有效填补了极低数量级细胞表面糖链检测的技术空白。此外,该方法具备良好的兼容性与扩展性,既可与单细胞测序技术联用,同步获取细胞膜表面糖基化信息与 mRNA 转录组数据,也可结合抗体实现对特定低丰度蛋白糖基化修饰水平的精准检测。

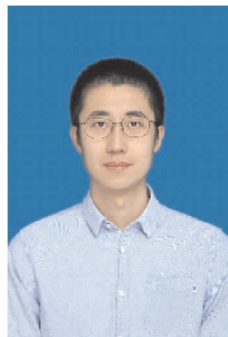
参考文献

- [1] XU X M, PENG Q, JIANG X J, et al. Altered glycosylation in cancer: Molecular functions and therapeutic potential[J]. *Cancer Communications*, 2024, 44(11): 1316-1336.
- [2] OHTSUBO K, MARTIN J D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease[J]. *Cell*, 2006, 126(5): 855-867.
- [3] STRUWE W B, ROBINSON C V. Relating glycoprotein structural heterogeneity to function-insights from native mass spectrometry[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2019, 58: 241-248.
- [4] LIU K F, TAN S G, JIN W J, et al. N-glycosylation of PD-1 promotes binding of camrelizumab[J]. *EMBO Reports*, 2020, 21(12): e51444.
- [5] REN X T, WU J P, LI J, et al. Bisecting GlcNAc enhances CD8⁺ T cell-mediated killing of breast cancer by suppressing PD-L1 expression and its binding to PD-1[J]. *Experimental Hematology & Oncology*, 2025, 14(1): 102.
- [6] KUKAN E N, FABIANO G L, COBB B A. Siglecs as modulators of macrophage phenotype and function[J]. *Seminars in Immunology*, 2024, 73: 101887.
- [7] YAO H Y Y, WANG J Q, YIN J Y, et al. A review of NMR analysis in polysaccharide structure and conformation: Progress, challenge and perspective[J]. *Food Research International*, 2021, 143: 110290.
- [8] YU W H, ZHAO X L, JALLOH A S, et al. Che-

- moenzymatic measurement of LacNAc in single-cell multiomics reveals it as a cell-surface indicator of glycolytic activity of CD8⁺T cells[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(23): 12701-12716.
- [9] HAN C C, JIN L, MEI Y D, et al. Endoplasmic reticulum stress inhibits cell cycle progression via induction of p27 in melanoma cells[J]. *Cellular Signalling*, 2013, 25(1): 144-149.
- [10] HOU H L, SUN H F, LU P, et al. Tunicamycin potentiates cisplatin anticancer efficacy through the DPAGT1/Akt/ABCG2 pathway in mouse Xenograft models of human hepatocellular carcinoma[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2013, 12(12): 2874-2884.
- [11] HSU J L, CHIANG P C, GUH J H. Tunicamycin induces resistance to camptothecin and etoposide in human hepatocellular carcinoma cells; Role of cell-cycle arrest and GRP78[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2009, 380(5): 373-382.
- [12] MATSUMIYA W, KUSUHARA S, HAYASHIBE K, et al. Forskolin modifies retinal vascular development in MRP4-knockout mice[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2012, 53(13): 8029-8035.
- [13] 董芳, 肖凡, 魏红山. 平分型 GlcNAc 糖基化修饰的生物学功能[J]. *医学分子生物学杂志*, 2009, 6(2): 138-143.
- DONG F, XIAO F, WEI H S. Bisecting N-acetylglucosamine and its biological functions[J]. *Journal of Medical Molecular Biology*, 2009, 6(2): 138-143.
- [14] TAN Z Q, CAO L, WU Y R, et al. Bisecting GlcNAc modification diminishes the pro-metastatic functions of small extracellular vesicles from breast cancer cells[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2020, 10(1): e12005.
- [15] HE S S, BHATT R, BROWN C, et al. High-plex imaging of RNA and proteins at subcellular resolution in fixed tissue by spatial molecular imaging[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(12): 1794-1806.
- [16] KEARNEY C J, VERVOORT S J, RAMSBOTTOM K M, et al. SUGAR-seq enables simultaneous detection of glycans, epitopes, and the transcriptome in single cells[J]. *Science Advances*, 2021, 7(8): eabe3610.
- [17] WANG Y C, NAKAGAWA M, GARITAONANDIA I, et al. Specific lectin biomarkers for isolation of human pluripotent stem cells identified through array-based glycomic analysis[J]. *Cell Research*, 2011, 21(11): 1551-1563.
- [18] SOJITRA M, SCHMIDT E N, LIMA G M, et al. Measuring carbohydrate recognition profile of lectins on live cells using liquid glycan array (LiGA) [J]. *Nature Protocols*, 2025, 20(4): 989-1019.
- [19] TONG Q H, TAO T, XIE L Q, et al. ELISA-PLA: A novel hybrid platform for the rapid, highly sensitive and specific quantification of proteins and post-translational modifications[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 80: 385-391.

(编辑 张 欢)

作者简介



谭增琦, 西北大学医学院副教授, 博士生导师。现任美国细胞外囊泡协会会刊 *Extracellular Vesicle* 青年编委, 陕西省抗癌协会肿瘤筛查及早诊早治专委会委员及西安医学会医学教育分会委员。从事肿瘤糖生物学方向研究, 围绕糖基化修饰在肿瘤微环境中的生物学功能, 在 *Journal of Extracellular Vesicles*、*Journal of Experimental Clinical Cancer Research*、*Journal of Pineal Research*、*Journal of Proteome Research* 等期刊上发表多篇研究论文。主持多项国家自然科学基金及省部级科研项目。