

凝集素芯片技术检测糖蛋白方法的建立及初步应用*

简 强 于汉杰 陈 超 李 铮**

(西北大学生命科学学院, 国家微检测系统工程技术研究中心, 西安 710069)

摘要 建立了凝集素芯片技术检测糖蛋白的方法, 对实验条件进行了优化, 应用凝集素芯片初步检测分析了 Chang's liver 正常肝细胞总蛋白中的糖蛋白糖链构成。将凝集素 ConA、GNA 固定于环氧化修饰的玻片表面, 用 Cy3 标记标准糖蛋白 RNaseB, 利用凝集素识别特异糖链的原理建立凝集素芯片检测糖蛋白的方法。摸索出最佳封闭剂是含 1% BSA 的磷酸缓冲液, 最佳孵育时间及温度为 3 h 和室温, 最佳孵育缓冲液为含 1% BSA 和 0.05% Tween-20 的磷酸缓冲液, 并用甘露糖抑制实验验证了凝集素芯片结合的特异性。用包含 10 种凝集素的芯片, 成功解析了标准糖蛋白 RNaseB、Fetuin 的糖链构成, 证实了凝集素芯片检测糖蛋白糖链的可行性。最后用凝集素芯片初步检测分析了 Chang's liver 正常肝细胞总蛋白中的糖蛋白糖链构成, 发现 Chang's liver 正常肝细胞总蛋白中的糖蛋白可能有多价 Sia 或 GlcNAc、terminal α -1, 3 mannose、GalNAc、Gal β -1, 4GlcNAc 这些糖链结构的存在。蛋白质糖基化是一种重要的翻译后修饰, 它在微生物感染、细胞分化、肿瘤转移、细胞癌变等生命活动中起着重要作用, 因此近年来蛋白质的糖基化研究受到广泛的重视, 但由于缺乏一种简便、快速、高通量的检测手段, 蛋白质糖基化修饰的研究发展缓慢。凝集素芯片技术的出现实现了对糖蛋白的快速、准确、高通量的检测分析。

关键词 凝集素芯片, 糖基化修饰, 糖蛋白, 糖组学, 肝细胞
学科分类号 Q5-3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00382

蛋白质的糖基化修饰广泛地存在于各种生物体中, 是一种重要的翻译后修饰作用^[1]。在微生物感染、细胞分化、肿瘤转移、细胞癌变等生命活动中, 糖基化修饰起着至关重要的作用^[2]。在病理状态下, 蛋白质和脂类糖基化的异常导致糖基化蛋白和糖脂中的糖链发生了结构和数量上的改变, 从而改变其生物学功能。随着基因组学和蛋白质组学的研究发展, 人们已逐渐认识到糖蛋白的重要性, 但目前对于糖蛋白的研究相对滞后。目前亲和层析技术、质谱、Western blotting、糖芯片技术已应用于蛋白质糖基化修饰的研究并取得大量有价值的结果, 但是它们都有不足之处。亲和层析技术、质谱技术、Western blotting 耗时长, 不能在短时间内获得检测结果和实现通量化。糖芯片把寡糖、糖脂或糖蛋白固定在固相支持物上以检测蛋白质或细胞与糖结合的性质^[3~9], 但是这种方法不能直接检测糖基化的改变, 从而限制了该技术的广泛应用。凝集素芯片是将各种不同来源的凝集素固定于醛基化、环氧化或经其他方式修饰后的玻璃片基上, 再与标记后的糖蛋白、菌体、细胞等待检测样品反应, 以检测待检测样品的糖链结构。本文中我们建立了凝

集素芯片技术检测糖蛋白的方法, 应用凝集素芯片初步检测分析了 Chang's liver 正常肝细胞总蛋白中的糖蛋白糖链构成。凝集素芯片能简便、快速、高通量地检测分析糖蛋白, 在较短时间内给出被检测糖蛋白的糖结构指纹图谱, 它的出现将加速蛋白质糖基化修饰的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

玻璃片基(76 mm×25 mm×1 mm)购于 Gold Seal 公司; 环氧基硅烷试剂(GPTS)购自 Sigma 公司; 凝集素 Con A 购自 Calbiochem 公司; 凝集素 GNA、ECA、Jacalin、LotusA、WGA、SNA、PNA、MAL、LCA 购于 Sigma 公司; 核糖核酸酶 B(RNaseB)、胎球蛋白(Fetuin)购于 Sigma 公司; Cy3 荧光染料购自于 GE 公司; 乙醇胺购于 Sigma 公司; 小牛血清白蛋白(BSA)购自北京鼎国生物技

* 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2007AA02Z413)。

** 通讯联系人。

Tel: 029-88303446, E-mail: zhengli@nwu.edu.cn

收稿日期: 2008-05-26, 接受日期: 2008-06-30

术责任有限公司；正常人肝细胞系 Chang's Liver 由上海复旦大学惠赠；DMEM 培养基购自 Gibco 公司；Cell Lysis Reagent 购自于 Sigama 公司；其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 玻片的环氧化修饰. 将玻片用无水乙醇提洗 3 次，每次提洗 10 min. 玻片离心甩干后放到 10% NaOH 内，摇洗过夜. 次日超声处理 15 min(功率 90%)，再用超纯水清洗 4 次，每次 2 min，无水乙醇清洗 2 次，每次 2 min. 配制 200 ml GPTS 包被液：190 ml 无水乙醇，加入 10 ml GPTS. 将玻片放入 GPTS 溶液中(玻片必须在液面下)，锡纸封口，摇床上反应 3 h(70 r/min). 反应结束后超声处理 15 min(功率 90%). 离心甩干后用无水乙醇彻底摇洗(110 r/min) 3 次，每次 10 min. 室温下离心甩干玻片，1 500 r/min，1 min. 再将玻片放置于

37℃ 烘箱中抽真空干燥 3 h. 最后将玻片存储于 4℃ 干燥器中.

1.2.2 凝集素芯片的制备. 将 ECA、Jacalin、ConA、LotusA、WGA、SNA、PNA、MAL、GNA 和 LCA 10 种凝集素分别溶解于厂家推荐的缓冲液中，再分别加入终浓度为 0.5 g/L 的 BSA 和 1 mmol/L 的不同单糖(表 1)共同构成点样缓冲液. 选用 1 g/L 的 BSA 作为阴性质控，Cy3 标记的 BSA 作为指示位置的 Marker，用晶芯 48 点样系统在环氧修饰后的玻片上点成 5×4 或 5×12 的矩阵，再在 60%湿度中孵育 3 h，37℃ 抽真空干燥 3 h. 封闭时先用含 0.05%Tween-20 的 10 mmol/L PBST，10 mmol/L PBS 各清洗玻片 1 次，再用含有 1% BSA 的 10 mmol/L PBS 封闭芯片 1 h，封闭结束后用含 0.05% Tween-20 的 10 mmol/L PBST, 10 mmol/L PBS 清洗玻片 2 min，最后离心甩干芯片，备用.

Table 1 Lectin panel^[10, 11]

Lectin	Abbreviation	Print concentration	Specificity	Print monosaccharide
<i>Erythrina cristagalli</i>	ECA	1 g/L	Galβ-1,4GlcNAc	Galactose
<i>Artocapus integrifolia</i>	Jacalin	1 g/L	Galβ1-3GalNAcα-Ser/Thr(T)and GalNAcα- Ser/Thr(T)	Galactose
<i>Canawalia ensiformis</i>	Con A	1 g/L	Branched and terminal mannose,terminal GlcNAc	Mannose
<i>Lotus tetragonolobus</i>	Lotus A	1 g/L	Terminalα-Fucose, Lewisx	Fucose
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	1 g/L	Multivalent Sia and (GlcNAc)n	GlcNAc
<i>Sambucus Nigra</i>	SNA	1 g/L	Sia2-6Galβ1-4Glc(NAc)	GlcNAc
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	1 g/L	Galβ1-3GalNAcα-Ser/Thr(T)	Galactose
<i>Maackia amurensis</i>	MAL	1 g/L	Sia2-3Galβ1-4Glc(NAc)	GlcNAc
<i>Galanthus nivalis</i>	GNA	1 g/L	Terminalα-1,3 mannose	Mannose
<i>Lens culinaris</i>	LCA	1 g/L	Complex (Man/GlcNAc Core with α-1,6 Fucose)	Mannose

1.2.3 Chang's liver 正常肝细胞的培养及总蛋白提取. 正常人肝细胞 Chang's liver 经由加入 10%胎牛血清的 DMEM 培养基常规传代培养. 待细胞长满瓶底 90%，经 1 ml Cell Lysis Reagent 裂解细胞，离心收集上清. 用 BCA 法定量后分装保存于-20℃.

1.2.4 Chang's liver 细胞总蛋白及糖蛋白的 Cy3 标记. 吸取 200 μl Chang's liver 细胞总蛋白提取液，用 Cy3 荧光染料标记，并用 G-25 柱分离纯化. 将 1mg RNaseB、Fetuin 溶于 1 ml 碳酸盐溶液(pH=9.3)中，吸取 200 μl 1 g/L 的 RNaseB、Fetuin 用 Cy3 荧光染料标记，并用 G-25 柱分离纯化.

1.2.5 凝集素芯片孵育. 吸取 20 μl Cy3 标记后的 RNaseB、Fetuin 或 Chang's liver 细胞总蛋白与 180 μl 含 0.05% Tween-20 和 1%BSA 的 PBS 混匀，吸取 50 μl 混匀液覆盖点样区，加盖玻片孵育 3 h，

孵育结束后用含 0.05% Tween-20 的 10 mmol/L PBST，10 mmol/L PBS 各清洗 2 次，每次 2 min，最后离心甩干芯片.

1.2.6 数据的扫描与分析. 用 Genepix 4000B 芯片扫描仪扫描芯片，光电倍增管(PMT)设为 70%，先进行预扫描，然后选定点样区域，进行精确扫描. 调节明亮度和对比度，达到最佳视觉效果. 用 GenePix3.0 软件从扫描结果图中获取荧光信号强度值和背景值等信息进行分析.

2 结果分析

2.1 凝集素芯片检测糖蛋白方法的建立及条件优化

建立方法时，选用蛋白质表面无糖链结构，不会与凝集素结合的 BSA 作为阴性质控，Cy3 标记

的 BSA 作为 Marker, 与 ConA、GNA 构成 5×4 的矩阵, 再与 Cy3 荧光标记的核糖核酸酶 B(RNaseB) 进行孵育, 以 ConA、GNA 的荧光信号值的有无、强弱来判定结果. 分别摸索确定了凝集素芯片的最佳封闭条件、最佳孵育时间及孵育温度、最佳孵育缓冲液, 并验证了 ConA、GNA 与 RNaseB 结合的特异性.

2.1.1 封闭条件的确定. 凝集素固定后要将载体上其他无蛋白质样品区域封闭, 以防止待测的蛋白质样品与之结合, 形成假阳性并使芯片背景升高. 为此, 选用了含有 50 mmol/L 乙醇胺的硼酸缓冲液和 1% BSA 磷酸缓冲液分别作为封闭剂对芯片进行封闭, 再与 Cy3 荧光标记后的 RNaseB 孵育. 结果发现, 两者封闭后背景都比较低, 用 1% BSA 磷酸缓冲液封闭的芯片 ConA 和 GNA 获得的检测信号均大于含 50 mmol/L 乙醇胺的硼酸缓冲液(图 1), 说明 1% BSA 磷酸缓冲液的封闭效果优于 50 mmol/L 乙醇胺的硼酸缓冲液.

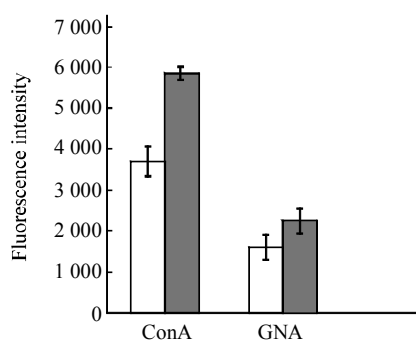


Fig. 1 Effect of blocking buffer

Data are represented for the net fluorescence intensity that ConA and GNA bind with Cy3 labeled RNaseB after blocking with 50 mmol/L ethanolamine in 50 mmol/L sodium borate buffer and 1% BSA in 10 mmol/L PBS, respectively. □: Ethanolamine; ■: BSA.

2.1.2 最佳孵育时间及孵育温度的确定. 为了评估出最优的孵育条件, 比较了不同时间以及不同温度对孵育效果的影响. 结果显示(图 2 和图 3), 孵育时间为 3 h, 孵育温度为室温时, 荧光信号最强. 凝集素与糖蛋白间的特异性结合需要一定时间反应才能达到结合的平台期, 从 1~3 h, 随着反应的进行, ConA、GNA 的信号值逐渐增高, ConA 尤为明显, 3 h 以后 ConA、GNA 的信号值波动不大, 反应达到平台期. 凝集素与糖蛋白结合时不同的温

度会影响二者之间的结合反应, 我们分别考察了 4℃、室温、37℃ 下 RNaseB 与 ConA、GNA 结合能力的变化, 发现室温下最有利于二者的结合.

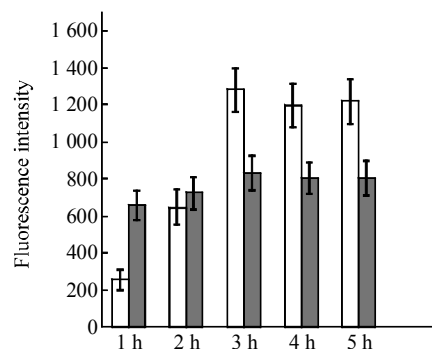


Fig. 2 Effect of incubation time

Data are represented for the net fluorescence intensity that ConA and GNA bind with Cy3 labeled RNaseB for 1 h ~ 5 h, respectively. □: ConA; ■: GNA.

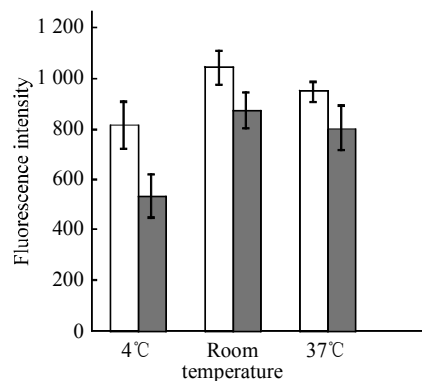


Fig. 3 Effect of temperature

Data are represented for the net fluorescence intensity that ConA and GNA bind with Cy3 labeled RNaseB under 4°C, room temperature and 37°C. □: ConA; ■: GNA.

2.1.3 最佳孵育缓冲液的确定. 为了确定不同孵育缓冲液对孵育效果的影响, 在含 1% BSA 的磷酸缓冲液中分别加入 0.05% NP-40、0.05% Triton X-100、0.05% Tween-20 和 0.05% SDS 作为孵育缓冲液, 比较了这 4 种缓冲液对凝集素 ConA、GNA 与 Cy3 标记的 RNaseB 结合的影响. 结果发现前三者作为孵育缓冲液, ConA、GNA 均能获得理想的荧光信号, 含有 0.05% Tween-20 的缓冲液作为孵育缓冲液, ConA、GNA 获得的荧光信号最强, 而含有 0.05% SDS 的缓冲液作为孵育缓冲液, ConA、GNA 获得的荧光信号微弱, 这说明强表面活性剂 (SDS) 会影响二者的特异性结合 (图 4).

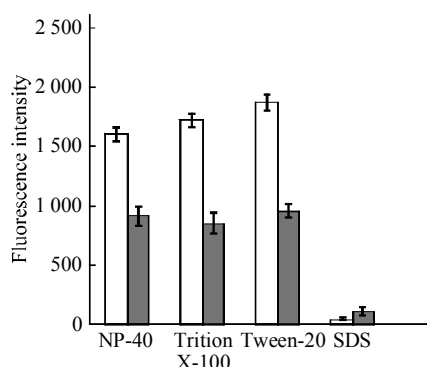


Fig. 4 Effect of incubation buffer

Data are represented for the net fluorescence intensity that ConA and GNA bind with Cy3 labeled RNaseB in different incubation buffer, respectively. □: ConA; ■: GNA.

2.1.4 反应的特异性实验. 为了确定凝集素芯片上不同凝集素结合的特异性, 在本实验中加入 0~320 mmol/L 甘露糖与 Cy3 标记的 RNaseB 一同进行孵育. 结果发现, 荧光信号值被不同浓度的甘露糖所抑制(图 5). RNaseB 是一种高甘露糖型的 N-连接型糖蛋白, ConA 能特异性识别糖链上分支或末端的甘露糖并与之结合. 我们加入甘露糖与 RNaseB 一同进行孵育, 甘露糖会与 RNaseB 竞争 ConA 上的甘露糖的结合位点, 因此加入的甘露糖越多, ConA 获得的检测到的荧光信号就越弱, 而 GNA 的检测信号不受影响.

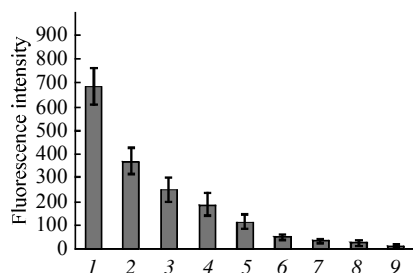


Fig. 5 Mannose competition assay with the lectin microarray

Competition assay using 0 to 320 mmol/L mannose coinubation with Cy3 labeled RNaseB. Data are represented for the net fluorescence intensity that ConA and GNA bind with Cy3 labeled RNaseB. 1: 0 mmol/L; 2: 2 mmol/L; 3: 5 mmol/L; 4: 10 mmol/L; 5: 20 mmol/L; 6: 40 mmol/L; 7: 80 mmol/L; 8: 160 mmol/L; 9: 320 mmol/L.

2.2 凝集素芯片对糖蛋白的识别

为了进一步验证凝集素芯片, 将 ECA、Jacalin、ConA、LotusA、WGA、SNA、PNA、MAL、GNA、LCA 等 10 种凝集素与阴性质控 BSA 以及指示位置的 Marker 点制成 5×12 的矩阵, 再分别与 Cy3 标记的 RNaseB、Fetuin 孵育, 观察

检测结果是否与 RNaseB、Fetuin 已知的糖链结构一致(图 6, 7). RNaseB 是一种高甘露糖型的 N-连接型糖蛋白, 只有一个糖基化位点在 Asn34 位处, 这个位点被组成为 $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ 的高甘露糖型的糖链所占据^[12~15]. Fetuin 胎球蛋白分别含有 3 个 O-连接和 3 个 N-连接糖链, 其中每个糖链的末端为 sialic acid/ Neu5Ac(WGA 结合位点)并主要以 $\alpha 2-6$ 或 $\alpha 2-3$ 的形式与后面的糖链相连, 糖链的组成中还包括 T-antigen Gal $\beta 1-3$ GalNAc (Jacalin、PNA 结合位点)、Gal $\beta 1-4$ GlcNAc(ECA 结合位点)

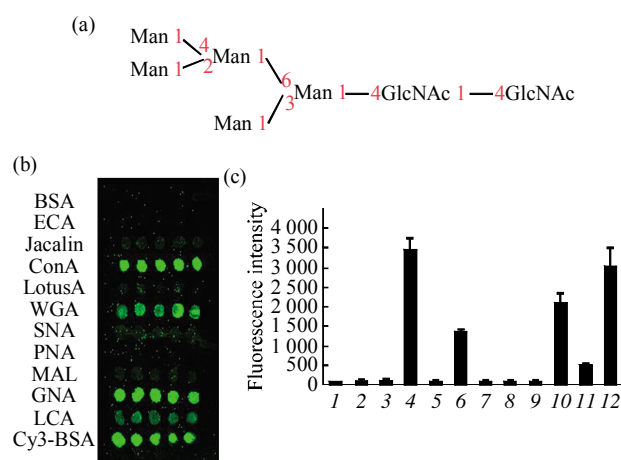


Fig. 6 Glycopatterns of RNaseB are obtained from lectin microarrays

(a) The glycan structure of RNaseB. (b) Fluorescence image of lectin microarrays incubated with Cy3-labeled RNaseB. (c) Graphical representation of the array data from the slide shown in (b). 1: BSA; 2: ECA; 3: Jacalin; 4: ConA; 5: LotusA; 6: WGA; 7: SNA; 8: PNA; 9: MAL; 10: GNA; 11: LCA; 12: Cy3-BSA.

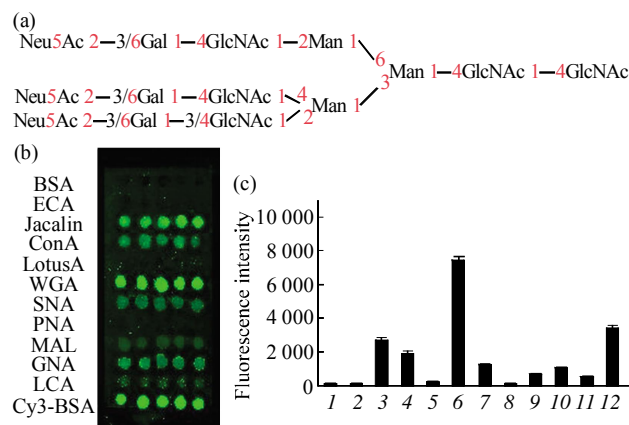


Fig. 7 Glycopatterns of Fetuin are obtained from lectin microarrays

(a) The glycan structure of Fetuin. (b) Fluorescence image of lectin microarrays incubated with Cy3-labeled Fetuin. (c) Graphical representation of the array data from the slide shown in (b). 1: BSA; 2: ECA; 3: Jacalin; 4: ConA; 5: LotusA; 6: WGA; 7: SNA; 8: PNA; 9: MAL; 10: GNA; 11: LCA; 12: Cy3-BSA.

等结构^[16]. 实验结果显示: Cy3 标记的 RNaseB 与芯片孵育后发现识别甘露糖的凝集素 ConA、GNA、LCA 与识别 GlcNAc 的凝集素 WGA 有阳性结果出现. 而 Cy3 标记的 Fetuin 与芯片反应过后发现识别甘露糖的凝集素 ConA、GNA、LCA 有信号值出现, 识别 T-antigen Gal β 1-3GalNAc 的凝集素 Jacalin 也有较强检测信号, 另一识别 O- 连接糖链结构的 SNA 也有较明显的检测信号. 其中 WGA 获得的荧光信号值最强, 这与 Fetuin 糖链末端有大量的 Sia 有关. 但是 ECA、PNA 并未出现阳性结果, 这可能是由于 ECA、PNA 识别的糖链结构存在于糖链的内部, 末端大量的分支糖链交错阻碍了 ECA、PNA 与 Fetuin 的结合. 凝集素芯片检测糖蛋白的结果与标准糖蛋白的糖链组成一致, 证实了凝集素芯片用于检测糖蛋白的可行性.

2.3 凝集素芯片对 Chang's liver 细胞总蛋白中糖蛋白的分析

将 Cy3 标记的 RNaseB 和 Chang's liver 细胞总蛋白分别与凝集素芯片的上下两个点样区孵育, 与 Cy3 标记 RNaseB 孵育的点样区作为质控, 重复 3 次, 对得到的结果进行归一化处理和数据处理. 高于阴性结果值与 3 倍标准方差值之和的荧光信号值为检测限, 大于此检测限的荧光值视为阳性结果. 结果发现, 凝集素 ECA、Jacalin、WGA、GNA 有阳性结果(图 8), 且荧光值 WGA > GNA > Jacalin > ECA, 提示 Chang's liver 细胞总蛋白中的糖蛋白表面可能存在多价 Sia 或 GlcNAc、terminal α -1, 3 mannose、GalNAc、Gal β -1, 4GlcNAc 这些糖链结构.

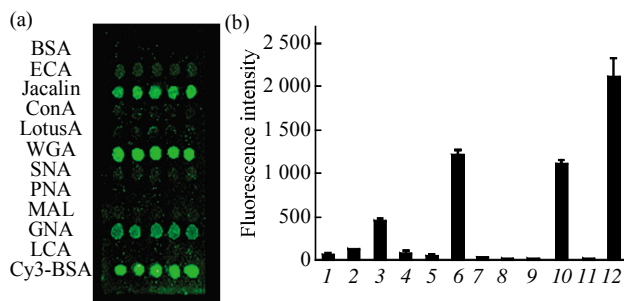


Fig. 8 Glycopatterns of whole cell extraction of

Chang's liver cells are obtained from lectin microarrays

(a) Fluorescence image of lectin microarrays incubated with Cy3-labeled whole cell extraction of Chang's liver cells. (b) Graphical representation of the array data from the slide shown in (a). 1: BSA; 2: ECA; 3: Jacalin; 4: ConA; 5: LotusA; 6: WGA; 7: SNA; 8: PNA; 9: MAL; 10: GNA; 11: LCA; 12: Cy3-BSA.

3 讨 论

蛋白质的糖基化修饰是生物体中蛋白质修饰加工最为重要的一环, 在功能蛋白质的构成上具有重要的影响. 这方面的研究已经成为蛋白质组学研究的热点, 但由于缺少一种能简便、快速、准确的检测分析技术, 蛋白质糖基化修饰的研究受到一定的限制. 凝集素作为一种能与糖蛋白糖链特异性结合的蛋白质, 多年来一直被用来研究蛋白质糖基化的状况. 我们将蛋白质芯片技术与凝集素的特殊功能结合起来建立了凝集素芯片技术, 并用标准糖蛋白 RNaseB 和 Fetuin, 验证了其在检测分析糖蛋白方面的可行性. 我们初步应用凝集素芯片对提取的 Chang's liver 正常肝细胞总蛋白中的糖蛋白进行了初步分析, 发现其中存在的糖蛋白可能有多价 Sia 或 GlcNAc、terminal α -1, 3 mannose、GalNAc、Gal β -1, 4GlcNAc 这些糖结构的存在. 凝集素芯片的出现给我们带来了一种新的能高通量研究糖基化的工具, 它可以在第一时间为研究人员提供糖蛋白糖结构组成方面的信息并帮助研究人员确定下一步的研究方法, 进而获得目的糖蛋白的细节信息. 虽然在本文中只用到了 10 种凝集素, 但是随着凝集素种类数量的增加和抗糖抗体的加入, 凝集素芯片将检测分析出更为细致的糖蛋白糖链组成信息. 凝集素芯片的出现将加快蛋白质糖基化的研究.

参 考 文 献

- 1 Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1473**(1): 4~8
- 2 Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 1993, **3**(2): 97~130
- 3 Love K R, Seeberger P H. Carbohydrate arrays as tools for glycomics. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002, **41**(19): 3583~6, 3513
- 4 Adams E W, Ratner D M, Bokesch H R, *et al.* Oligosaccharide and glycoprotein microarrays as tools in HIV glycobiochemistry glycan-dependent gp120/protein interactions. *Chem Biol*, 2004, **11** (6): 875~881
- 5 Bryan M C, Fazio F, Lee H K, *et al.* Covalent display of oligosaccharide arrays in microtiter plates. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(28): 8640~8641
- 6 Nimrichter L, Gargir A, Gortler M, *et al.* Intact cell adhesion to glycan microarrays. *Glycobiology*, 2004, **14**(2): 197~203
- 7 Houseman B T, Mrksich M. Carbohydrate arrays for the evaluation of protein binding and enzymatic modification. *Chem Biol*, 2002, **9** (4): 443~454
- 8 Ten Feizi, Fabio Fazio, Wengang Chai, *et al.* Carbohydrate

- microarrays-a new set of technologies at the frontiers of glycomics. *Current Opinion in Structural Biology*, 2003, **13**(5): 637~645
- 9 Wang D. Carbohydrate microarrays. *Proteomics*, 2003, **3** (11): 2167~2175
- 10 Hsu K L, Mahal L K. A lectin microarray approach for the rapid analysis of bacterial glycans. *Nat Protoc*, 2006, **1**(2): 543~549
- 11 Tatenno H, Uchiyama N, Kuno A, *et al.* A novel strategy for mammalian cell surface glycome profiling using lectin microarray. *Glycobiology*, 2007, **17**(10): 1138~1146
- 12 Plummer TH Jr, Tarentino A, Maley F. The glycopeptide linkage of ribonuclease B. *J Biochem*, 1968, **243**(19): 5158~5164
- 13 Liang C J, Yamashita K, Kobata A. Structural study of the carbohydrate moiety of bovine pancreatic ribonuclease B. *J Biochem*, 1980, **88**(1): 51~58
- 14 Rico M, Santoro J, González C, *et al.* 3D structure of bovine pancreatic ribonuclease A in aqueous solution: an approach to tertiary structure determination from a small basis of ¹H NMR NOE correlations. *J Biomol NMR*, 1991, **1**(3): 283~298
- 15 Joao H C, Dwek R A. Effects of glycosylation on protein structure and dynamics in ribonuclease B and some of its individual glycoforms. *Eur J Biochem*, 1993, **218** (1): 239~244
- 16 Green E D, Adelt G, Baenziger J U, *et al.* The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. *J Biol Chem*, 1988, **263** (34): 18253~18268

Establishment of a Lectin Microarray Method for The Rapid Analysis of Glycoprotein and Its Application*

JIAN Qiang, YU Han-Jie, CHEN Chao, LI Zheng**

(College of Life Sciences, Northernwuet University, National Engineering Research Center For Miniaturized Detection System, Xi'an 710069, China)

Abstract The technology of lectin microarrays was established for glycoprotein analysis and initially applied to analyze the glycopattern of whole cell extraction of Chang's liver cells. ConA and GNA were immobilized on the epoxysilane-coated slides, the standard glycoprotein RNaseB was labeled with Cy3 fluorescent dye, the detection system of lectin microarrays was established for glycoprotein detection and analysis based on the principle of lectin to glycan binding affinity. The consequence of experiment indicated that phosphate buffer containing 1% BSA was the optimal blocking buffer, the optimal incubation time and temperature as well as incubation buffer were 3 hours, room temperature and phosphate buffer containing 1% BSA and 0.05% Tween-20, respectively. Additionally, the specificity of lectin microarrays was validated through the mannose competition assay. Further, the lectin microarrays containing 10 lectins were fabricated and used to detect and analyze the glycan construction of RNaseB and Fetuin, the result verified the feasibility of our homemade lectin microarray. Eventually they were initially applied to analyze the glycopattern of whole cell extraction of Chang's liver cells. The results indicated that some glycan structure such as multivalent Sia or GlcNAc, terminal α -1,3 mannose, GalNAc and Gal β -1,4GlcNAc possibly existed in the whole cell extraction of Chang's liver cells. Glycosylation is one of the most significant posttranslational modifications of proteins, which plays an indispensable role in a wide variety of biological processes including bacterial infection, cell differentiation, tumor metastasis and cell concretization. Hence, the study on glycosylation draws the attention of researchers widely, but the process develops slowly due to lacking a method can investigate protein-carbohydrate interactions in a rapid, exact and high-throughput manner. The coming lectin microarrays possess the requests above and will promote the process of glycosylation research.

Key words lectin microarrays, glycosylation, glycoprotein, glycomics, hepatic cell

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00382

*This work is supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China (2007AA02Z413).

**Corresponding author.

Tel: 86-29-88303446, E-mail: zhengli@nwu.edu.cn

Received: May 26, 2008 Accepted: June 30, 2008