

蛋白质 N-糖基化检测方法的研究现状及其在眼科研究中的应用

彭沛毅^{1,2}, 刘庆平¹, 张铭志¹

引用:彭沛毅, 刘庆平, 张铭志. 蛋白质 N-糖基化检测方法的研究现状及其在眼科研究中的应用. 国际眼科杂志, 2026, 26(3): 458-462.

基金项目:广东省普通高校重点科研平台和项目 (No. 2022LSYS006, 2023KCXTD013)

作者单位:¹(515041) 中国广东省汕头市, 汕头大学·香港中文大学联合汕头国际眼科中心;²(515041) 中国广东省汕头市, 汕头大学医学院

作者简介:彭沛毅, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 青光眼、高度近视。

通讯作者:刘庆平, 女, 博士, 教授, 研究方向: 脂质代谢在年龄相关性黄斑变性中的机制研究. lqp@jsiec.org; 张铭志, 女, 硕士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 青光眼、白内障、视光. zmq@jsiec.org

收稿日期: 2025-11-30 修回日期: 2026-01-27

摘要

N-糖基化是一种重要的蛋白质翻译后修饰, 可以影响蛋白质的功能, 在多种生物学过程中起着关键作用。目前的研究已经发现了蛋白质 N-糖基化的改变与多种眼部疾病的发生发展密切相关。而 N-糖基化检测方法能够发现蛋白中 N-糖链的改变, 因此, 了解各类检测方法及其在眼部疾病中的应用价值具有重要意义。文章系统综述了蛋白质 N-糖基化检测方法的研究现状, 包括毛细管电泳、液相色谱及质谱检测等技术, 并详细讨论了这些技术在糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、春季角结膜炎和特发性角结膜炎等眼部疾病研究中的具体应用。

关键词: N-糖基化; 糖链分析; 糖组学; 眼部疾病; 质谱分析; 液相色谱

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2026.3.16

Research status of protein N-glycosylation detection methods and their applications in ophthalmology research

Peng Peiyi^{1,2}, Liu Qingping¹, Zhang Mingzhi¹

Foundation items: the Key Research Platforms and Projects of Guangdong Provincial Universities (No. 2022LSYS006, 2023KCXTD013)

¹Joint Shantou International Eye Center of Shantou University and the Chinese University of Hong Kong, Shantou 515041, Guangdong Province, China; ²Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China

Correspondence to: Liu Qingping. Joint Shantou International Eye Center of Shantou University and the Chinese University of Hong

Kong, Shantou 515041, Guangdong Province, China. lqp@jsiec.org; Zhang Mingzhi. Joint Shantou International Eye Center of Shantou University and the Chinese University of Hong Kong, Shantou 515041, Guangdong Province, China. zmq@jsiec.org
Received:2025-11-30 Accepted:2026-01-27

Abstract

• N-glycosylation is a crucial posttranslational modification of proteins that can modulate their functions and plays key roles in various biological processes. Current research has revealed that alterations in protein N-glycosylation are closely associated with the pathogenesis and progression of multiple ocular diseases. N-glycosylation detection methods can identify changes in N-glycans on proteins; therefore, understanding these techniques and their application value in ocular diseases is important. This article provides a systematic review of the current state of N-glycosylation detection methods, including techniques such as capillary electrophoresis, liquid chromatography, and mass spectrometry. It also offers a detailed discussion on the specific applications of these technologies in the study of various ocular diseases, including diabetic retinopathy, age-related macular degeneration and vernal keratoconjunctivitis/atopic keratoconjunctivitis.

• **KEYWORDS:** N-glycosylation; glycan analysis; glycomics; eye diseases; mass spectrometry; liquid chromatography

Citation: Peng PY, Liu QP, Zhang MZ. Research status of protein N-glycosylation detection methods and their applications in ophthalmology research. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2026, 26(3):458-462.

0 引言

蛋白质 N-糖基化是蛋白质翻译后修饰中最常见的形式之一, 是指在酶催化下将糖链共价连接至蛋白质特定天冬酰胺残基, 并经过内质网与高尔基体加工形成成熟糖链的过程^[1-3]。该修饰对蛋白质的正确折叠、稳定性、信号传导、免疫反应等关键生物学功能具有决定性影响^[1]。目前, 研究已经揭示了异常的 N-糖基化对蛋白功能的影响与包括癌症、炎症、自身免疫性疾病等全身系统性疾病密切相关^[4]。眼睛作为一个高度分化且功能精密的器官, 其生理稳态与病理过程同样依赖于蛋白质功能的精确调控^[5]。目前的蛋白质组学研究已经发现在房水、玻璃体液等眼内液及血液中蛋白质表达谱的改变与青光眼、糖尿病视网膜病变(DR)及年龄相关性黄斑变性(ARMD)等眼部

疾病密切相关^[6-9]。许多这些疾病相关蛋白均是潜在的N-糖基化蛋白,这提示了N-糖基化修饰的异常可能是眼部疾病发生发展的关键分子机制之一^[10]。因此,解析眼内蛋白质的N-糖基化图谱,对于揭示眼病病理机制、发现特异性生物标志物及治疗靶点具有重大意义。然而,蛋白质N-糖基化的分析面临固有挑战。糖链是由多个单糖通过糖苷键连接而成,不同的单糖组分、连接方式、分支结构会形成不同的复杂的三维空间结构,且其立体异构现象可能显著影响糖链的生物学功能,导致对于蛋白质N-糖基化的全面解析颇具难度^[11]。目前,凝集素印迹/微阵列、液相色谱、毛细管电泳与质谱等各项技术,均已能从不同维度提供诸如糖型结构、糖型丰度等N-糖基化修饰的重要信息。与此同时,为了获得更系统、多维度的信息,整合多种互补技术的联合分析策略正逐渐成为深入探索的重要方向。尽管这些技术方案已广泛应用于各类疾病研究,但关于它们在眼科研究的应用进展,目前仍缺乏系统评述。因此,本综述将概述当前常见的蛋白质N-糖基化检测技术的基本原理与特点,并重点梳理与评价这些技术在眼科疾病研究中的具体应用实例,以期为眼科研究者提供方法学参考,并推动对蛋白质N-糖基化在眼部疾病中具体作用机制的深入理解。

1 蛋白质N-糖基化的历史沿革

Neuberger^[12]于1936年首次证明了糖蛋白的存在,敲开了糖蛋白研究的大门。随后,在1950年代,研究者们证明了蛋白质与碳水化合物之间的连接位点位于天冬酰胺的酰胺基与N-乙酰葡萄糖胺的还原端碳原子之间。而1965-1966年的研究进一步揭示蛋白质中可能导致N-糖基化的特定氨基酸序列必须是天冬酰胺(Asn)与除了脯氨酸或半胱氨酸外的任一氨基酸(Xaa)以及丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)形成的Asn-Xaa-Ser/Thr序列^[13]。随着1980年代比利时儿科医生Jaeken等^[14]首次临床描述了2例存在N-糖基化缺陷的患者,人类开始认识到N-糖基化可能对蛋白质功能有关键影响,在大约10a后,研究者确认了N-糖基化缺陷会导致疾病的发生,而这一确认也证明了N-糖基化在维持生物体健康和疾病发展中发挥着至关重要的作用^[15]。

随着研究方法和检测技术的不断进步,N-糖基化已被证实与多种生物学过程密切相关^[16]。例如,在适应性免疫系统中,N-糖基化的改变能影响蛋白在免疫细胞的识别、信号传导和细胞间相互作用^[1]。而免疫球蛋白,特别是免疫球蛋白G,是体液免疫的关键组成部分。因此,IgG糖基化的改变与疾病的关系已受到全球范围内的高度重视^[17]。研究者已经探讨了IgG糖基化在类风湿关节炎^[18-19]、系统性红斑狼疮^[20]、衰老^[21]、血脂异常、2型糖尿病^[22]、炎性血管病^[23]、癌症^[3]、心肌梗死等疾病中的作用,揭示了N-糖基化在这些疾病发生和发展中的关键影响^[4,17]。这提示了眼部疾病同样可能与N-糖基化改变相关。

糖基化检测方法在N-糖基化与疾病关系的研究中起着至关重要的作用。20世纪末,受限于技术与方法,研究者对N-糖基化与疾病之间关系的研究仍存在对糖肽富集时容易破坏糖链结构,难以确定关键糖链结构信息等局限性。而随着质谱、液相色谱等技术的出现与发展,人类对于N-糖基化与疾病关系的认识逐渐深刻。因此,了解常见糖基化检测技术的原理及在眼部疾病中的应用价值对

于推动糖组学在眼部疾病中的发展十分重要。

2 蛋白质N-糖基化检测方法简介

2.1 凝集素印记实验及微阵列技术 凝集素是一类能够结合特定糖链结构的蛋白质,可用于分析蛋白质N-糖基化^[24-25]。基于凝集素的方法中,凝集素印记实验是从蛋白质印记实验(Western Blot)衍生而来,其利用凝集素代替抗体检测糖基化蛋白,具有操作简便、可对蛋白进行半定量分析等优点,但通量较低且难以准确定量蛋白^[26-27]。为提高分析效率,后续发展的凝集素微阵列技术通过在固相表面固定多种凝集素,实现高通量N-糖基化分析。但基于凝集素的检测方法无法对糖链结构进行精确鉴定,并且分析结果可能受不同来源或批次的凝集素的识别性能差异影响^[28-31]。

2.2 液相色谱 为了获取更精确的糖链结构信息,液相色谱法开始被用于蛋白质N-糖基化的分析中,是最常用的糖链分离技术之一^[32]。其中,亲水作用色谱(HILIC)因其对糖链的高效分离能力而被广泛应用,其分离作用是通过溶质在亲水性固定相和疏水性流动相之间的分配系数差异实现的,尤其适合分离天然糖链或还原端标记后的糖链^[33-34]。为进一步提升分析的全面性与精确性,HILIC常与质谱联用,从而获取糖链的结构与位置信息^[35]。对于结构复杂的糖链样品,有时还需结合阴离子交换色谱或反相色谱等进行多维分离^[11]。随着分析技术向高通量、高精度发展,超高效液相色谱(UPLC)逐渐得到应用。它采用更小粒径的固定相,显著提高了分离效率与分辨率,并缩短了检测时间,成为高效检测糖链样品的重要工具^[36]。

2.3 毛细管电泳 尽管基于液相色谱的N-糖基化分析方法已经成为糖组学分析的重要技术,但其分离能力主要依赖于糖链的亲水性,因此对于亲水性相近的糖链,需要一种分离机制截然不同的技术帮助分离。毛细管电泳(CE)主要通过糖链在电场中的迁移差异实现分离,因其分析速度快、样本需求量少,并与荧光检测兼容性好,成为糖链分析的有效工具之一^[37]。

为进一步提升分析通量,DNA测序仪辅助荧光糖电泳(DSA-FACE)技术得以发展^[35]。该技术仅需微量样本即可实现糖链的荧光标记、高通量分离与相对定量,具有方法简单、灵敏度高、重复性好等优点^[38],但其检测前通常需进行去唾液酸化处理,因此无法反映唾液酸分布信息,且通常需结合其他方法获取更全面的糖链结构信息^[11]。

2.4 质谱检测方法 质谱检测(MS)具有快速、简便、分辨率高、信息量大等优点,使其在结构测定和定量分析中有着越来越重要的作用^[39]。目前,最广泛应用于N-糖基化分析的质谱电离技术包括基质辅助激光解吸电离(MALDI)和电喷雾电离(ESI),其不仅可以获得糖链结构信息,还能通过糖链连接信息推断糖基化位点^[11]。

MALDI-MS作为一种软电离技术,其基本原理是通过激光照射将与基质混合的样品分子软电离为准分子离子^[40]。该方法适用于大分子糖复合物的离子化,并可与质谱成像结合,用于组织样本中N-糖基化的空间分布研究^[40-41]。ESI技术则是将溶液中大而复杂的分子复合物转化为气相中的离子并通过离子迁移和质谱进行分析^[42]。其常与液相色谱联用(LC-ESI-MS),具有灵敏度高、适合复杂样品中低丰度糖链分析的特点^[11,43]。

为进一步解析糖链的序列、分支及连接方式等精细结构,常采用串联质谱(MS/MS)技术,其主要是通过碰撞等方式使一级质谱选定的母离子发生断裂,并在第二个质谱仪中分析其碎片离子信息^[44-45]。现有的碎片化技术中碰撞诱导解离(CID)及其衍生技术如高能碰撞解离(HCD)可提供丰富的糖链碎片信息^[46-47]。

3 糖基化检测方法在眼科学中的应用

多种N-糖基化检测技术是研究者解码疾病相关糖基化信息的核心技术工具箱。虽然目前N-糖基化在眼科学领域的研究较少,但质谱检测、液相色谱和毛细管电泳等技术也已经是探索DR、ARMD、春季角结膜炎(VKC)/特应性角结膜炎(AKC)和原发性开角型青光眼(POAG)等眼部疾病中N-糖基化改变的研究中的关键因素。

3.1 DR 在DR的蛋白质N-糖基化研究领域,早期探索采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)系统分析了DR患者玻璃体液中蛋白的N-糖基化谱^[48]。该研究发现,与对照组相比,增殖性糖尿病视网膜病变(PDR)患者玻璃体中存在以唾液酸化增加为特征的N-糖基化改变,并且证实高葡萄糖环境可上调人视网膜微血管内皮细胞中唾液酸转移酶ST3GAL1和ST3GAL4的表达,为理解DR的病理机制提供了与N-糖基化相关的证据^[48]。

而后,血液中IgG的N-糖基化分析也成为探索DR相关生物标志物的重要方向,不同检测方法为该方向提供了互补的研究视角。Wu等^[49]采用UPLC结合荧光检测系统分析了DR患者血浆总IgG的N-糖链谱。该研究通过释放并标记IgG的N-糖链,鉴定出24种糖链峰,并进一步计算出54个衍生糖型特征,以反映N-糖基化修饰的整体比例。该研究发现带有平分型GlcNAc和核心岩藻糖的双半乳糖基双天线糖链(GP15)、带有核心及天线岩藻糖的双半乳糖基单唾液酸双天线糖链(GP20)以及所有中性IgG糖链中带有核心岩藻糖的双半乳糖基双天线结构(IGP54)的糖链在DR患者的血浆中显著减少;而带有平分型GlcNAc的岩藻糖化双半乳糖基双唾液酸化(IGP32)结构的糖链则明显升高^[49]。这篇文章通过UPLC技术系统构建了DR患者血浆中的IgG N-糖基化谱,提示其与衰老和促炎状态相关,为后续研究提供了重要的假设及方向。但UPLC技术无法提供N-糖基化位点特异性信息,也无法区分不同IgG亚型之间的糖型差异,因此在机制阐释层面存在一定局限。

为突破上述限制,Zhang等^[50]2023年通过从血清中靶向富集疾病特异性IgG(DSIgG)并用MALDI-TOF质谱检测分析其Fc段完整糖肽的方法,实现了对不同IgG亚型进行位点特异性完整N-糖肽的检测。该研究在181例无糖尿病视网膜病变(NDR)和206例NPDR患者的血清中鉴定到23种糖肽,其中10种来自DSIgG1和13种来自DSIgG2^[50]。研究者用糖肽信号峰强度比值反映糖基转移酶活性的变化从而发现与NDR组相比,NPDR患者的半乳糖基化水平下降($P<0.05$)、核心岩藻糖基化水平下降($P<0.01$)及唾液酸化比率降低($P<0.05$),而平分型GlcNAc比率则升高($P<0.05$),该结果在独立验证集中得到了进一步确认。基于7个关键糖肽比值构建的诊断模型在区分NDR与NPDR方面表现出良好性能[曲线下面积(AUC) >0.85],展现了其作为早期生物标志物的

潜力^[50]。

在Zhang等^[50]研究的基础上,Mao等^[51]在2025年沿用相同的质谱检测方法,进一步在研究中细化了疾病分期。该研究纳入PDR患者并对NPDR进行严重程度分层。结果显示,NPDR患者的半乳糖基化水平最低,且重度NPDR患者表现出更低半乳糖基化和更高岩藻糖基化趋势,提示该阶段炎症反应更为活跃。该研究构建的诊断模型不仅可区分DR与NDR,还能鉴别NPDR与PDR,体现了IgG N-糖基化在疾病进展监测中的动态价值^[51]。

综合上述研究可见,半乳糖基化水平的降低被一致认为是DR患者最显著的N-糖基化改变,且IgG整体N-糖基化谱呈现向促炎方向的转变,这与DR慢性炎症病理状态相符^[52]。同时,基于质谱的研究共同提示了DSIgG1 G1FN/G0FN、DSIgG2 G1F/G0F及G1FN/G0FN等糖肽比值有望成为区分疾病阶段的关键指标。然而,该领域当前仍面临一些挑战:(1)现有研究无法揭示IgG N-糖基化改变与DR发生发展之间是否存在因果关系,仍需通过更深入的研究来寻找及验证可能存在的疾病机制。(2)目前研究多聚焦于IgG,而血浆中还存在大量其他糖蛋白,其在DR中的作用尚未系统探索。

3.2 ARMD 在ARMD的研究中,蛋白质N-糖基化作为疾病进展的动态生物标志物和潜在机制窗口,也受到了关注。研究者采用高效液相色谱(HPLC)与荧光检测结合的方法,对2835名参与者的血浆及IgG蛋白中的N-糖基化进行分析^[53]。该研究将ARMD细分为早期玻璃膜疣、单侧ARMD及双侧ARMD,通过液相色谱获得的糖链峰及根据这些峰计算得出的衍生糖链其糖基化特征用于分析。分析结果显示,具有免疫调节功能的IgG双天线糖链结构(如GP18)在单侧ARMD组中显著降低,而具有促炎特性的四天线血浆糖链(DG13)以及缺乏半乳糖的IgG糖链(G0)则在双侧ARMD组中明显上升^[53]。这些结果提示,随着ARMD从单侧进展至双侧,其血浆和IgG的N-糖基化谱呈现出从免疫调节功能失调到系统性炎症激活的演变过程,为理解ARMD的疾病机制提供了潜在的生物标志物依据。但当前研究仅能揭示与ARMD相关的血浆宏观糖型变化,难以将观察到的糖基化改变精准定位至特定的功能蛋白。因此,鉴定承载这些疾病特异性糖型的核心糖蛋白,并揭示其下游分子机制将是未来的关键研究方向之一。

3.3 VKC/AKC VKC和AKC泪液中的N-糖基化也有相应的研究^[54]。Messina等^[54]收集了11名正常对照者、23例VKC患者和7例AKC患者的泪液样本,先使用MALDI-TOF MS快速、高灵敏度地获取泪液中全部N-糖链的强度值信息,再用MS/MS区分同分异构体并确认糖链的单糖组成、连接顺序和分支情况,从而系统绘制了人泪液中N-糖基化图谱。该研究共在泪液中鉴定出150多种不同的N-糖链,并发现了疾病特异性N-糖基化特征:在VKC患者中单岩藻糖基化的单唾液酸和双唾液酸双天线糖链强度最高,而AKC患者中显著高表达的是非岩藻糖基化的双唾液酸双天线糖链。同时,MS/MS对于糖链的精细结构解析还证实了泪液中N-糖链上存在Lewis^x表位,提示N-糖基化可能参与了眼表炎症过程。该研究从N-糖基化修饰层面为VKC与AKC提供了潜在生物标志物,也为阐明N-糖基化在眼表免疫炎症调节中的作用提

供了新视角。然而,该研究 AKC 组样本量较小且其结果显示糖型变化与临床严重度未显相关性,表明其可能更适用于疾病分型而非病情评估,其因果关系亦有待研究进一步验证。

3.4 POAG 在 POAG 的研究中,血浆蛋白质 N-糖基化谱的改变同样受到关注。Ng 等^[27]通过 DSA-FACE 技术,对 44 例 POAG 患者与 39 例年龄匹配的轻度年龄相关性白内障患者的血浆样本进行分析,系统描绘了 POAG 患者的血浆去唾液酸化 N-糖基化谱。该研究共鉴定出 21 个主要的 N-糖链峰并发现峰 III 和 VIII 的相对丰度在 POAG 组显著降低,而峰 X 则升高;三者联合诊断 POAG 的 AUC 达 0.792,显示出良好的诊断效能。进一步的临床相关性分析表明,Peak X 的丰度与视野平均缺损呈负相关($r = -0.422, P = 0.016$),提示 N-糖基化改变可能与 POAG 的视野损害进程相关联。该研究还通过凝集素印迹实验发现 POAG 患者血浆 IgG 的核心岩藻糖基化水平显著升高,为炎症反应参与 POAG 病理过程提供了新的糖组学证据^[27]。这些高灵敏度、高通量的 N-糖基化分析技术虽然原理不同,但被应用于眼科领域时却共同揭示了眼部疾病中蛋白质 N-糖基化修饰的异常改变,提示了异常的 N-糖基化很可能是多种眼科疾病发生发展的一个共同且关键的分子特征。尽管 N-糖基化在眼科疾病中的具体功能与机制尚未完全阐明,现有研究视角也相对局限,但这些工作揭示了 N-糖基化特征作为眼病新型诊疗标志物的巨大潜力,为在眼科领域深入开展糖组学研究奠定了重要基础。

4 小结

N-糖基化作为一种关键且复杂的蛋白质翻译后修饰,其动态变化与眼部疾病的发生发展密切相关。本文回顾了 N-糖基化的研究历史,梳理了包括液相色谱、质谱检测在内的多种 N-糖基化检测方法并探讨了这些方法在各类眼部疾病中的具体应用与发现。这些方法学的飞速发展,不仅实现了从 N-糖链宏观谱图到精细结构的解析,也逐步揭示出 N-糖基化修饰在眼免疫调节、炎症反应等病理过程中的潜在作用。然而,该领域研究仍处于发展阶段,存在若干重要挑战:(1)目前多数成果仍停留在 N-糖基化修饰整体的变化描述,难以将观察到的糖型差异精准定位至特定功能蛋白,限制了机制层面的深入阐释;(2)由于眼内液样本获取难度大,现有研究多依赖于外周血,其结果在反映眼局部病变上的特异性与敏感性仍有待验证。展望未来,蛋白质 N-糖基化研究将朝着多组学整合、技术革新与机制阐释等方向推进。通过整合糖蛋白质组学等分析,精准鉴定驱动眼病进展的核心糖蛋白。同时,开发超高灵敏度的眼内液 N-糖组学分析方案,结合功能实验深入阐明 N-糖基化修饰调控眼免疫微环境及细胞信号通路的分子机制,从而推动基于 N-糖基化的早期诊断、分型及靶向治疗策略的诞生。

利益冲突声明: 本文不存在利益冲突。

作者贡献声明: 彭沛毅论文选题与修改,文献检索,初稿撰写;刘庆平、张铭志选题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

[1] Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, et al. Glycosylation in health and

disease. *Nat Rev Nephrol*, 2019,15(6):346-366.

[2] Eichler J. Protein glycosylation. *Curr Biol*, 2019, 29(7): R229-R231.

[3] Schjoldager KT, Narimatsu Y, Joshi HJ, et al. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020,21(12):729-749.

[4] He MY, Zhou XX, Wang X. Glycosylation: mechanisms, biological functions and clinical implications. *Sig Transduct Target Ther*, 2024,9:194.

[5] Xiang H, Zhang BH, Wang YZ, et al. Region-resolved multi-omics of the mouse eye. *Cell Rep*, 2023,42(2):112121.

[6] Santos FM, Mesquita J, Castro-de-Sousa JP, et al. Vitreous humor proteome: targeting oxidative stress, inflammation, and neurodegeneration in vitreoretinal diseases. *Antioxidants*, 2022,11(3):505.

[7] Yang SP, Xin ZY, Xiong RL, et al. Proteome atlas for mechanistic discovery and risk prediction of diabetic retinopathy. *Nat Commun*, 2025,16(1):9636.

[8] Künzel SE, Flesch LTM, Frentzel DP, et al. Systemic blood proteome patterns reflect disease phenotypes in neovascular age-related macular degeneration. *Int J Mol Sci*, 2023,24(12):10327.

[9] Sharma S, Bollinger KE, Kodeboyina SK, et al. Proteomic alterations in aqueous humor from patients with primary open angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018,59(6):2635-2643.

[10] Consortium TU, Bateman A, Martin MJ, et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res*, 2025,53(D1):D609-D617.

[11] Paton B, Suarez M, Herrero P, et al. Glycosylation biomarkers associated with age-related diseases and current methods for glycan analysis. *Int J Mol Sci*, 2021,22(11):5788.

[12] Neuberger A. Carbohydrates in protein: the carbohydrate component of crystalline egg albumin. *Biochem J*, 1938, 32(9):1435-1451.

[13] Allen AK, Muir HM. Albert neuberger. *Biogr Mems Fell R Soc*, 2001,47:369-382.

[14] Jaeken J, van Eijk HG, van der Heul C, et al. Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clin Chim Acta*, 1984,144(2-3):245-247.

[15] Van Schaftingen E, Jaeken J. Phosphomannomutase Deficiency Is a Cause of Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndrome Type I. *FEBS Lett*, 1995,377(3):318-320.

[16] Yu HJ, Wang JH, Tang Z, et al. Integrated glycomics strategy for the evaluation of glycosylation alterations in salivary proteins associated with type 2 diabetes mellitus. *RSC Adv*, 2020,10(65):39739-39752.

[17] Radovani B, Nimmerjahn F. IgG glycosylation: biomarker, functional modulator, and structural component. *J Immunol*, 2024, 213(11):1573-1584.

[18] Su ZP, Xie Q, Wang YP, et al. Abberant immunoglobulin G glycosylation in rheumatoid arthritis by LTQ-ESI-MS. *Int J Mol Sci*, 2020,21(6):2045.

[19] Zhou X, Motta F, Selmi C, et al. Antibody glycosylation in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*, 2021,20(5):102804.

[20] Han J, Zhou ZC, Zhang RR, et al. Fucosylation of anti-dsDNA IgG1 correlates with disease activity of treatment-naïve systemic lupus erythematosus patients. *eBioMedicine*, 2022,77:103883.

[21] Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol*, 2018,333:65-79.

[22] Wu ZY, Li HB, Liu D, et al. IgG glycosylation profile and the glycan score are associated with type 2 diabetes in independent Chinese populations: a case-control study. *J Diabetes Res*, 2020,2020:5041346.

[23] Zhang C, Guo ZF, Liu WN, et al. PIMT is a novel and potent

suppressor of endothelial activation. *eLife*, 2023,12:e85754.

[24] Ahn YH, Kim JY, Yoo JS. Quantitative mass spectrometric analysis of glycoproteins combined with enrichment methods. *Mass Spectrom Rev*, 2015,34(2):148-165.

[25] Dragacevic L, Djordjevic B, Gavrovic - Jankulovic M, et al. ELISA based profiling of surface glycosylation in microorganisms reveals that β -glucan rich yeasts' surfaces are selectively recognized with recombinant banana lectin. *Glycoconj J*, 2020,37(1):95-105.

[26] Wang TT, Zhang ZW, Qu CD, et al. Core fucosylation regulates the ovarian response *via* FSH receptor during follicular development. *J Adv Res*, 2025,67:105-120.

[27] Ng TK, Zhang CX, Liu QP, et al. Plasma N-glycan signature as biomarker for primary open angle glaucoma. *Exp Eye Res*, 2025,261:110676.

[28] Du HQ, Yu HJ, Yang FQ, et al. Comprehensive analysis of glycosphingolipid glycans by lectin microarrays and MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Protoc*, 2021,16(7):3470-3491.

[29] Hirabayashi J, Yamada M, Kuno A, et al. Lectin microarrays: concept, principle and applications. *Chem Soc Rev*, 2013,42(10):4443-4458.

[30] Ribeiro JP, Mahal LK. Dot by dot: analyzing the glycome using lectin microarrays. *Curr Opin Chem Biol*, 2013,17(5):827-831.

[31] Dang K, Zhang WJ, Jiang SF, et al. Application of lectin microarrays for biomarker discovery. *ChemistryOpen*, 2020,9(3):285-300.

[32] Keser T, Pavić T, Lauc G, et al. Comparison of 2-aminobenzamide, procainamide and RapiFluor-MS as derivatizing agents for high-throughput HILIC-UPLC-FLR-MS N-glycan analysis. *Front Chem*, 2018,6:324.

[33] Guo Y. Separation of nucleobases, nucleosides, nucleotides and oligonucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC): a state-of-the-art review. *J Chromatogr A*, 2024,1738:465467.

[34] Takegawa Y, Deguchi K, Ito H, et al. Simple separation of isomeric sialylated N-glycopeptides by a zwitterionic type of hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci*, 2006,29(16):2533-2540.

[35] Trbojević-Akmačić I, Lageveen-Kammeijer GSM, Heijs B, et al. High-throughput glycomic methods. *Chem Rev*, 2022,122(20):15865-15913.

[36] He MJ, Wan ZH, Tsang DCW, et al. Performance indicators for a holistic evaluation of catalyst-based degradation—a case study of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs). *J Hazard Mater*, 2021,402:123460.

[37] Wang Y, Liu YY, Liu S, et al. Recent advances in N-glycan biomarker discovery among human diseases. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2024,56(8):1156-1171.

[38] Zhang C, Liu YQ, Wang L, et al. Dose-response relationship between serum N-glycan markers and liver fibrosis in chronic hepatitis B. *Hepatol Int*, 2024,18(5):1434-1447.

[39] Murtada R, Finn S, Gao JS. Development of mass spectrometric glycan characterization tags using acid-base chemistry and/or free radical chemistry. *Mass Spectrom Rev*, 2024,43(2):269-288.

[40] Lee D, Kim Y, Jalaludin I, et al. MALDI-MS analysis of disaccharide isomers using graphene oxide as MALDI matrix. *Food Chem*, 2021,342:128356.

[41] Angel PM, Mehta A, Norris-Caneda K, et al. MALDI imaging mass spectrometry of N-glycans and tryptic peptides from the same formalin-fixed, paraffin-embedded tissue section. *Tissue Proteomics*. New York, NY: Springer New York, 2017:225-241.

[42] Kohoutek KM, de B Harrington P. Electrospray ionization ion mobility mass spectrometry. *Crit Rev Anal Chem*, 2023,53(3):483-497.

[43] Vreeker GCM, Wührer M. Reversed-phase separation methods for glycan analysis. *Anal Bioanal Chem*, 2017,409(2):359-378.

[44] Sleno L, Volmer DA. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2004,39(10):1091-1112.

[45] Huang CC, Yan JY, Zhan LP, et al. Linkage and sequence analysis of neutral oligosaccharides by negative-ion MALDI tandem mass spectrometry with laser-induced dissociation. *Anal Chim Acta*, 2019,1071:25-35.

[46] Heijs B, Potthoff A, Soltwisch J, et al. MALDI-2 for the enhanced analysis of N-linked glycans by mass spectrometry imaging. *Anal Chem*, 2020,92(20):13904-13911.

[47] Zhou SY, Dong X, Veillon L, et al. LC-MS/MS analysis of permethylated N-glycans facilitating isomeric characterization. *Anal Bioanal Chem*, 2017,409(2):453-466.

[48] Inafuku S, Noda K, Amano M, et al. Alteration of N-glycan profiles in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015,56(9):5316-5322.

[49] Wu ZY, Pan HY, Liu D, et al. Variation of IgG N-linked glycosylation profile in diabetic retinopathy. *J Diabetes*, 2021,13(8):672-680.

[50] Zhang YX, Lai ZZ, Yuan ZH, et al. Serum disease-specific IgG Fc glycosylation as potential biomarkers for nonproliferative diabetic retinopathy using mass spectrometry. *Exp Eye Res*, 2023,233:109555.

[51] Mao YS, Zhang JY, Zhang YX, et al. Serum disease-specific IgG fc glycosylation as potential biomarkers for nonproliferative and proliferative diabetic retinopathy using mass spectrometry. *Mol Cell Proteom*, 2025,24(5):100967.

[52] Lin SY, Ji ZY, Gao J, et al. Poldip2 Aggravates inflammation in diabetic retinopathy by impairing mitophagy *via* the AMPK/ULK1/Pink1 pathway. *Life Sci*, 2025,373:123681.

[53] Bučan I, Škunca Herman J, Jerončić Tomić I, et al. N-glycosylation patterns across the age-related macular degeneration spectrum. *Molecules*, 2022,27(6):1774.

[54] Messina A, Palmigiano A, Tosto C, et al. Tear N-glycomics in vernal and atopic keratoconjunctivitis. *Allergy*, 2021,76(8):2500-2509.