Supporting Information for Publication

Title of Paper

Quantitative analysis of SHBG glycosylation in liver diseases by LC/MS-PRM

Authors

Wei Yuan¹, Julius Benicky¹, Renhuizi Wei¹, Radoslav Goldman^{1,2}, Miloslav Sanda^{1*}

Affiliations

1. Department of Oncology, Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown

University, Washington, DC, 20057, USA;

2. Department of Biochemistry and Molecular & Cellular Biology, Georgetown University, Washington, DC, 20057, USA.

Corresponding Author

^{*}Miloslav Sanda, Department of Oncology, Lombardi Comprehensive Cancer Center,

Georgetown University, Washington, DC, 20057, USA

Email: ms2465@georgetown.edu Phone: +1 202-6879868

Table of Contents

Table S1: MELD scores of patients with different liver diseases.

- Table S2: Parameters for the quantification of all the known SHBG glycopeptides.
- **Table S3:** Reproducibility of the measurements.
- **Table S4:** Glycosylation changes among healthy, cirrhosis, and HCC patients.

Table S5: Glycosylation changes in cirrhosis patients with different etiology.

Table S6: Changes in the outer arm fucosylation, HexNAc(4)Hex(6) N-glycoform, and O-glycan sialylation in cirrhotic patients with different etiologies and HCC.

Figure S1: Comparison of the data normalization methods.

Figure S2: Serum SHBG in liver diseases measured by ELISA.

Figure S3: Cleavage of outer arm fucose on fucosylated glycoforms of SHEIWTHSCPQSPGNGTDASH.

		НСС	HCV	HBV	ALD	NASH
pool 1	1	18	14	24	14	22
	2	15	11	16	14	11
	3	13	19	N/A	18	14
	4	12	23	14	18	11
	5	17	7	6	14	15
pool 2	1	13	9	21	12	7
-	2	17	10	12	13	N/A
	3	19	18	N/A	11	15
	4	14	19	11	18	8
	5	12	16	N/A	17	32

Table S1: MELD scores of patients with different liver diseases. N/A: not available.

LDVDALLR analyzed in typsin digest A2G2 889.4(a*) 15.03 23 1105.0(2+) 1151.0(2+) 1238.6(2+) A2G2S 986.4(a*) 15.78 24 1151.0(2+) 1238.6(2+) 1333.6(2+) A2G2SF 1035.1(3+) 15.68 26 1224.0(2+) 1406.6(2+) 1479.1(2+) A2G2SZF 1132.1(3+) 17.06 26 1285.6(2+) 1266.6(2+) 1479.1(2+) A3G3S2 940.1(4+) 16.84 18 1266.6(2+) 1479.1(2+) 1624.7(2+) A3G3S3 976.9(4+) 18.81 19 1479.1(2+) 1624.7(2+) A3G3S3 976.9(4+) 18.86 19 1479.1(2+) 1624.7(2+) A3G33 976.9(4+) 15.05 23 1070.0(2+) 1151.0(2+) 124.7(2+) A3G3 1011.1(3+) 14.99 24 1143.0(2+) 1161.0(2+) 124.0(2+) A2G2 889.4(3+) 14.82 25 133.8(2+) 143.8(2+) 124.0(2+) A2G2 982.0(4+	Glycoforms	Peptide mass (Da)	Retention Time (min)	CE(eV)	Fragments used for quantification		ation		
A2G2 888.4(3+) 15.78 24 1151.0(2+) 1256.6(2+) 133.8(2+) A2G2S 986.4(3+) 15.78 24 1151.0(2+) 123.8(2+) 133.8(2+) A2G2S 1083.4(3+) 17.06 25 1215.5(2+) 129.6(2+) 1473.1(2+) A3G3S2 940.8(4+) 16.80 18 1108.1(3+) 1296.6(2+) 1479.1(2+) 624.7(2+) A3G3S3 976.8(4+) 18.81 19 1205.6(2+) 1479.1(2+) 624.7(2+) A3G3S3 1013.4(4+) 18.68 19 1205.6(2+) 1479.1(2+) 624.7(2+) A3G3S3 1013.4(4+) 18.68 19 105.2(2+) 1479.1(2+) 624.7(2+) A3G3 1011.1(3+) 14.98 24 1179.1(2+) 624.7(2+) A3G3 1011.1(3+) 14.99 24 1145.0(2+) 1225.6(2+) 123.8(2+) A3G3 1011.1(3+) 14.98 24 1151.0(2+) 1225.2(2+) 123.8(2+) A3G3F 1098.9(3+) 14.26		LDVDQALNR	analyzed in trypsin digest						
A 2G2S A 2G2SF A 2G2SF A 2G2SF 1035.1(4+) A 2G2SF 1122.1(3+) A 2G2SF 1122.1(3+) A 2G2SF 1122.1(3+) A 2G3S2 S 04.1(4+) A 2G3S2 S 04.1(4+) A 2G3S2 S 04.1(4+) A 2G3S3 S 76.8(4+) A 2G3S S 1073.8(4+) A 2G3S S 1073.8(4+) A 2G3S S 1074.8(4+) A 2G3S S 1075.8(4+) A 2G3S S 1055.8(4+) A 2G3S S 1058.8(3+) A 2G2 S 888.4(3+) S 1058.8(3+) A 2G3 S 1058.4(3+) A 2G3 S 1058.4(3+) A 2G3 S 1058.4(3+) A 2G3 S 1058.4(3+) A 2G2 S 882.6(4+) A 2G3 S 1055.4(4+) A 2G3S S 1055.4(4+) A 2G3S S 1055.4(4+) A 2G2S S 1055.4(4+) A 2G2S S 1055.4(4+) A 2G2S S 1055.4(4+) A 2G2S S 1055.4(4+) A 2G2S S 1055.4(4+) A 2G2S S 1056.4(4+) A 2G3S S 1066.4(4+) A 2G3S A 1068.8(5+) A 2G3S A 1068.8(5+) A 2G3S A 107 A 2G3 A 107 A 2G3 A 1088.8(5+) A 2G3S A 107 A 2G3 A 1088.8(5+) A 2G3S A 107 A 2G3 A 1088.1(3+) A 1088.8(3+) A 1088.8(3+) A 1088.8(3+) A 1088.8(3+) A 1088.8(3	A2G2	889.4(3+)	15.03	23	1070.0(2+)	1151.0(2+)			
A 2022F 1035.1(2+) A 20252 1083.4(3+) 17.06 25 125 6(2+) 1296.6(2+) A 30352F 940.6(4+) 17.06 25 125 6(2+) 1296.6(2+) 1479.1(2+) A 30352F 940.6(4+) 16.90 18 1108.1(3+) 1296.0(2+) 1479.1(2+) A 30333 97.6,9(4+) 16.84 18 1296.0(2+) 1479.1(2+) 1624.7(2+) A 30335JF 1013.4(4+) 18.86 19 1479.1(2+) 1552.1(2+) 1624.7(2+) A 30335JF 1013.4(4+) 18.86 19 1479.1(2+) 1552.1(2+) 1624.7(2+) A 30335JF 1013.4(4+) 18.86 19 1479.1(2+) 1552.1(2+) 1624.7(2+) Unoccupied form 522.3(2+) 15.82 40 473.3(1+) 601.3(1+) 716.4(1+) 815.4(1+) analyzed in trypein/Neuraminidase A digest A 2022 889.4(3+) 15.05 23 1070.0(2+) 1151.0(2+) A 2633F 1019.8(3+) 14.99 24 1113.0(2+) 1224.0(2+) A 3033 1011.1(3+) 14.91 25 1070.0(2+) 125.2(5+) 1333.8(2+) A 303F 1019.8(3+) 14.92 24 1151.0(2+) 1224.0(2+) A 3033F 1019.8(3+) 14.98 24 1151.0(2+) 1224.0(2+) A 3033F 1019.8(3+) 14.98 24 1151.0(2+) 1224.0(2+) A 20252 1059.8(3+) 14.92 27 1188.1(3+) 1134.1(3+) A 20225 1005.4(4+) 12.51 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A 20225F 1001.9(4+) 12.78 27 1208.8(3+) 1285.2(3+) 1309.9(3+) A 20225F 1001.9(4+) 12.78 27 1208.8(3+) 1285.2(3+) 1309.9(3+) A 20225F 1001.9(4+) 12.78 27 1208.8(3+) 128.2(3+) 1309.9(3+) 1456.6(3+) A 202352 1128.2(4+) 13.11 28 1238.8(1+) 128.2(3+) 1285.2(3+) 1309.9(3+) 1456.5(3+) A 202352 1128.2(4+) 13.11 28 1238.8(1+) 128.2(3+) 1285.2(3+) 1309.9(3+) 1456.5(3+) A 202352 11005.0(5+) 13.03 20 1156.4(4+) 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1285.2(3+) 1309.9(3+) 1456.5(3+) A 30332 975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1285.2(3+) 1309.9(3+) 1456.5(3+) A 30332 1034.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1188.1(3+) 128.2(3+) 1406.9(3+) A 30332 1034.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1188.1(3+) 128.2(3+) 1405.9(3+) A 30332 1040.0(5+) 13.22 11 1188.1(3+) 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.8(3+) 128.2(3+) 1309.9(3+) 1358.8(3+) 128.2(3+) 148.1(3+) 1309.9(3+) 1358.8(3+) 128.2(3+) 148.1(3+) 1309.9(3+) 1358.8(3+) 148.1(3+) 1309.9(3+) 1358.8(3+) 148.1(3+) 1309.9(3+) 1358.8(3+) 148.1(3+) 1309.9(3+) 1358.8(3+) 148.1(3+) 1309.9(3+) 1358.8(3+) 148.1(3+) 1309.9(3+) 1358.8(3+) 148.1(3+) 130	A2G2S	986.4(3+)	15.78	24	1151.0(2+)	1296.6(2+)	1333.6(2+)		
A 20225 1083.4(2+) 17.06 25 12(5)(2+) 1475.1(2+) A 20352F 112.1(3+) 17.06 26 1288.6(2+) 1398.6(2+) 1475.1(2+) A 30352 904.1(4+) 16.90 18 1108.1(3+) 1296.6(2+) 1479.1(2+) 1624.7(2+) A 30353 976.9(4+) 18.81 18 1205.6(2+) 1479.1(2+) 1624.7(2+) A 30353 976.9(4+) 18.81 18 1205.0(2+) 1479.1(2+) 1624.7(2+) A 30353 976.9(4+) 18.81 18 1205.0(2+) 1479.1(2+) 1624.7(2+) A 30353 976.9(4+) 18.81 19 1479.1(2+) 152.1(2+) 1624.7(2+) A 30353 976.9(4+) 18.81 19 1479.1(2+) 152.1(2+) 1624.7(2+) A 30353 1073.9(4+) 18.81 19 1479.1(2+) 152.1(2+) 1624.7(2+) A 3035 1011.1(3+) 14.91 24 04 1143.0(2+) 1151.0(2+) 1224.0(2+) A 3033 1011.1(3+) 14.99 24 1143.0(2+) 1151.0(2+) 1224.0(2+) A 3033 1011.1(3+) 14.91 25 1070.0(2+) 1151.0(2+) 1225.2(2+) 133.8(2+) A 3037 1019.8(3+) 14.92 24 1151.0(2+) 1225.2(2+) 133.8(2+) A 3037 1098.9(3+) 14.82 25 1333.6(2+) 1406.6(2+) HexNAc(4)Hex(5) 943.4(3+) 14.98 24 1151.0(2+) 1225.2(3+) 130.9(3+) A 20225 1065.4(4+) 12.77 27 1188.1(3+) 1285.2(3+) 130.9(3+) 135.8(3+) A 20225F 1091.9(4+) 12.78 27 1128.8(3+) 1285.2(3+) 130.9(3+) 135.8(3+) A 20225F 1091.9(4+) 12.78 27 1128.8(3+) 133.8(2+) 135.8(3+) A 20225F 1091.9(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 123.1(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A 202352 1168.7(4+) 13.11 28 1226.8((3+) 133.8(3+) 135.8(3+) A 202352 1168.7(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 123.1(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A 30332 75.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1285.2(3+) A 30332 75.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1265.9(4+) A 30332 1040.0(5+) 13.22 21 1188.1(3+) 123.8(3+) 1265.8(3+) A 303357 1005.0(5+) 13.22 21 1188.1(3+) 128.6(3+) 1285.2(3+) A 303357 1003.0(5+) 13.22 21 1188.1(3+) 128.6(3+) 1285.6(3+) A 303357 1003.0(5+) 13.22 21 1188.1(3+) 128.6(3+) 1285.6(3+) A 30335 1073.9(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1308.9(3+) 138.5(3+) HexNAc-Hex 840.63(5+) 24.1772.457 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAc-Hex 840.63(5+) 24.4772.530 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAc-Hex Neu5AC 898.85(5+) 24.8772.530 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAc-Hex Neu5AC 898.85(5+) 24.8772.530 40 724.	A2G2SF	1035.1(3+)	15.68	26	1224.0(2+)	1406.6(2+)	()		
A2G252F 1132.1(3+) 17.06 26 1286.6(2+) 1369.6(2+) 1552.1(2+) A3G352 904.1(4+) 16.80 18 1108.1(3+) 1286.6(2+) 1473.1(2+) 1632.1(2+) A3G352F 940.6(4+) 16.81 19 1205.2(2+) 1473.1(2+) 1632.1(2+) 1632.1(2+) 1632.1(2+) A3G353F 1013.4(4+) 18.81 19 1205.2(1+) 1632.1(2+) 1633.1(3+) 1152.1(2+) 1633.1(3+) 1132.1(3+) 1142.1(3+) 1633.1(3+) 1132.1(3+) 1142.1(3+) 1142.1(3+) 1632.1(2+) 1232.1(2+) 1232.1(2+) 1232.1(2+)	A2G2S2	1083.4(3+)	17.06	25	1215.5(2+)	1296.6(2+)	1479.1(2+)		
A3G3S2F 940.6(4+) 16.84 18 11296.6(2+) 1479.1(2+) 124.7(2+) A3G3S3 976.9(4+) 18.81 19 1205.2(2+) 1479.1(2+) 1624.7(2+) A3G3S3F 1013.4(4+) 18.88 19 1479.1(2+) 1624.7(2+) Unoccupied form 522.3(2+) 15.82 40 473.3(1+) 601.3(1+) 716.4(1+) 815.4(1+) analyzed in trypsi/IN/euraminidase A digest A2G2 889.4(3+) 15.05 23 1070.0(2+) 1151.0(2+) 1224.0(2+) A3G33 1011.1(3+) 14.99 24 1143.0(2+) 1252.5(2+) 1333.6(2+) A3G3 1011.1(3+) 14.99 24 1143.0(2+) 1252.5(2+) 1333.6(2+) A3G3 1011.1(3+) 14.99 24 1145.0(2+) 1224.0(2+) A3G3 1011.1(3+) 14.89 24 1151.0(2+) 1224.0(2+) A3G3 1051.0(2+) 125.2(2+) 1333.6(2+) HexNAc(4)Hex(6) 943.4(3+) 14.82 25 1333.6(2+) 1406.6(2+) HexNAc(4)Hex(7) 943.4(3+) 14.98 24 1151.0(2+) 1232.0(2+) SHEIWTHSCPQSPGNGT DASH A2G2 982.6(4+) 12.51 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2S 1055.4(4+) 12.79 27 1188.1(3+) 1285.2(3+) 1309.9(3+) A2G2SF 1091.9(4+) 12.78 27 1236.8(3+) 1333.9(3+) 1355.5(3+) A2G2SF 1091.9(4+) 13.11 28 1236.8(3+) 1333.9(3+) 1355.5(3+) A3G3S2F 1164.7(4+) 13.11 28 1236.8(3+) 1279.9(3+) 1333.9(3+) 1455.6(3+) A3G3S2F 1055.0(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 102.9(4+) 1164.7(4+) A3G3S3 1033.0(5+) 13.22 21 1188.1(3+) 127.9(3+) 1333.9(3+) 1455.5(3+) A3G3S2F 1056.9(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 102.9(4+) 1164.7(4+) A3G3S3F 1036.2(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 125.5(3+) A3G3S3F 1036.2(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 125.5(3+) A3G3S3F 1036.2(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 125.6(3+) A3G3S3F 1036.2(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 125.6(3+) A3G3S3F 1036.2(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 125.6(3+) A3G3S3F 1106.2(2+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2F 926.6(4+) 11.71 25 1128.2(4+) 1164.7(4+) 125.6(1+) Unoccupied form 577.2(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1385.5(3+) HexNAc-Hex 840.63(5+) 24.8725.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAc-Hex 840.63(5+) 24.8725.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAc-Hex 840.63(5+) 24.8725.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAc-Hex NueSAC 898.85(5+) 24.8725.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex NueSAC 898.85(5+) 24.8725.30 40	A2G2S2F	1132.1(3+)	17.06	26	1288.6(2+)	1369.6(2+)	1552.1(2+)		
A3G352F 940.6(4+) 16.84 16 1296.6(2+) 1479.1(2+) 1624.7(2+) A3G353 976.9(4+) 18.81 19 1205.2(3+) 1479.1(2+) 1624.7(2+) A3G353F 1013.4(4+) 18.88 19 1478.1(2+) 1552.1(2+) 1624.7(2+) unoccupied form 522.3(2+) 15.52 A2G2 889.4(3+) 15.55 23 1070.0(2+) 1151.0(2+) A2G2F 938.1(3+) 14.99 24 1143.0(2+) 1151.0(2+) A3G3F 1059.8(3+) 14.82 25 1070.0(2+) 1225.5(2+) 133.8(2+) A3G3F 1059.8(3+) 14.82 25 1070.0(2+) 1225.5(1+) HexNAc(4)Hex(6) 943.4(3+) 14.98 24 1151.0(2+) 1232.0(2+) A2G2 982.6(4+) 12.51 23 1188.1(3+) 1232.0(2+) A2G2S 1055.4(4+) 12.78 27 1188.1(3+) 1235.2(3+) 1009.9(3+) A2G2S 1055.4(4+) 12.78 27 1236.8((3+) 1333.9(3+) 1356.5(3+) A2G2S 1055.4(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 1231.2(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A2G2S 1055.4(4+) 13.11 28 1236.8((3+) 1279.9(3+) 1333.9(3+) 1456.5(3+) A2G2S 1055.4(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 1231.2(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A2G2S 2975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1031.9(4+) 1164.7(4+) A3G3S2F 1063.0(5+) 13.03 20 1055.4(4+) 1018.4(1+) 1276.9(3+) A3G3S3 1034.0(5+) 13.22 21 1182.1(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A3G3S3F 1064.0(5+) 13.22 20 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1225.2(3+) A3G3S3F 1064.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1225.2(3+) A3G3S3F 1064.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1225.2(3+) A3G3S3F 1063.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1225.8(3+) A3G3S3F 1063.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1238.8(3+) A3G3S3F 1063.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1238.8(3+) A3G3S3F 11064.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1238.8(3+) A3G3S3F 11064.0(5+) 13.22 21 1138.2(3+) 1388.1(3+) 1238.8(3+) A3G3S3F 11064.0(5+) 13.22 21 1138.2(3+) 1388.1(3+) 1238.8(3+) A3G3S3F 11064.0(5+) 13.22 21 1138.2(3+) 1388.1(3+) 1238.8(3+) A3G3S 1073.9(4+) 11.76 28 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1335.8(3+) HexNAC-Hex Med6A.1099.9(4+) 11.6 28 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1335.8(3+) HexNAC-Hex Meu5AC 888.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex Meu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex Neu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex Neu5AC 898.	A3G3S2	904.1(4+)	16.90	18	1108.1(3+)	1296.6(2+)	1479.1(2+)		
A 3G3S3 976.8(4+) 18.81 19 1205.2(+) 1479.1(2+) 1624.7(2+) Unoccupied form 522.3(2+) 15.82 40 473.3(1+) 601.3(1+) 716.4(1+) 815.4(1+) manayzed in trypsin/Neuraminidase A digest A 2G2 889.4(3+) 15.05 23 1070.0(2+) 1151.0(2+) A 2G2F 938.1(3+) 14.99 24 1143.0(2+) 1151.0(2+) A 2G3F 1059.8(3+) 14.82 25 1070.0(2+) 1151.0(2+) 1224.0(2+) A 3G3 1011.1(3+) 14.89 24 1143.0(2+) 1124.0(2+) 1224.0(2+) A 3G3F 1059.8(3+) 14.82 25 1333.6(2+) 1406.6(2+) HexNAc(4)Hex(6) 943.4(3+) 14.82 25 1333.6(2+) 1406.6(2+) MACS 2 862.6(4+) 12.51 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A 2G2 862.6(4+) 12.79 27 1188.1(3+) 1134.1(3+) A 2G2SF 1091.9(4+) 12.78 27 1128.2(3+) 1338.9(3+) 1358.5(3+) A 2G2SF 1091.9(4+) 13.11 28 1236.8(3+) 1233.9(3+) 1358.5(3+) A 2G2SF 1091.9(4+) 13.11 28 1236.8(3+) 1233.9(3+) 1358.5(3+) A 2G2SF 1091.9(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 1231.2(4+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A 2G2SF 1095.0(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1128.1(3+) 1285.2(3+) A 3G3S2F 1005.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1285.2(3+) A 3G3S3F 11005.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1285.2(3+) A 3G3S3F 11005.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1186.1(3+) 1285.2(3+) A 3G3S3F 1100.4(4+) 11.6 28 1134.1(3+) 1309.9(3+) 338.6(3+) 1285.2(3+) A 3G3S3F 1100.4(4+) 11.6 28 1134.1(3+) 1309.9(3+) 358.5(3+) HexNAc-Hex-NeusÁAC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAc-Hex-NeusÁAC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAc-He	A3G3S2F	940.6(4+)	16.84	18	1296.6(2+)	1479.1(2+)	1624.7(2+)		
A3G33SF 1013.4(4+) 18.68 19 1479.1(2+) 1552.1(2+) 1624.7(2+) Unoccupied form 522.3(2+) 15.82 40 473.3(1+) 601.3(1+) 716.4(1+) 815.4(1+) analyzed in trypsin/Neuraminidase A digest 1070.0(2+) 1151.0(2+) 1224.0(2+) 133.6(2+) A2G2 889.4(3+) 16.95 23 1070.0(2+) 1151.0(2+) 1224.0(2+) A3G3 1011.1(3+) 14.91 25 1070.0(2+) 1232.5(2+) 133.6(2+) A3G3F 1059.8(3+) 14.82 24 1151.0(2+) 1232.0(2+) BASH analyzed in trypsin digest analyzed in trypsin digest 333.6(2+) 133.9(3+) 135.5(3+) A2G2 982.6(4+) 12.78 27 1236.8((3+) 133.9(3+) 135.5(3+) A2G2S 1059.4(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 1282.2(3+) 1406.9(3+) A2G2SE 1164.7(4+) 13.11 28 128.2(4+) 133.9(3+) 135.6(3+) A2G2SE 1194.1(4	A3G3S3	976.9(4+)	18.81	19	1205.2(3+)	1479.1(2+)	1624.7(2+)		
Unoccupied form 522.3(2+) 15.82 40 473.3(1+) 601.3(1+) 716.4(1+) 815.4(1+) A2G2 889.4(3+) 15.05 23 1070.0(2+) 1151.0(2+) 1224.0(2+) 1234.0(2+) 1234.0(2+) 1234.0(2+) 1234.0(2+) 1234.0(2+) 1234.0(2+)	A3G3S3F	1013.4(4+)	18.68	19	1479.1(2+)	1552.1(2+)	1624.7(2+)		
analyzed in trypsin/Neuraminidase A digest A2G2 888.4(3+) 15.65 23 1070.0(2+) 1151.0(2+) A2G3 1011.1(3+) 14.99 24 1143.0(2+) 1125.0(2+) 1224.0(2+) A3G3 1011.1(3+) 14.91 25 1070.0(2+) 1225.2(2+) 133.6(2+) A3G3 1011.1(3+) 14.92 25 133.6(2+) 1406.6(2+) HexNAc(4)Hex(6) 943.4(3+) 14.98 24 1151.0(2+) 1225.2(2+) 133.8(2+) A2G2 982.6(4+) 12.79 27 1188.1(3+) 1134.1(3+) 1265.2(3+) 130.9(3+) 1358.5(3+) A2G2S 1055.4(4+) 12.79 27 1288.8(3+) 129.9(3+) 133.9(3+) 1358.5(3+) A2G2S2 1128.2(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 1128.2(4+) 128.5(3+) 129.9(3+) 133.9(3+) 1358.5(3+) A2G2S2F 1166.7(4+) 13.03 20 1055.4(4+) 1128.2(4+) 128.2(3+) 128.2(3+) 128.2(3+) 128.2(3+)	Unoccupied form	522.3(2+)	15.82	40	473.3(1+)	601.3(1+)	716.4(1+)	815.4(1+)	
trypsin/Neuraminidase A digest A2G2 889 4(3+) 15,05 23 1070.0(2+) 1151.0(2+) A2G2F 938.1(3+) 14,99 24 11143.0(2+) 1224.0(2+) A3G3 1011.1(3+) 14,81 25 1070.0(2+) 1252.5(2+) 1333.6(2+) A3G3 1021.1(3+) 14.82 25 1333.6(2+) 1406.6(2+) HexNAc(4)Hex(6) 943.4(3+) 14.98 24 1151.0(2+) 1232.0(2+) MAXH 222 992.6(4+) 12.51 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2 992.6(4+) 12.51 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2S 1055.4(4+) 12.778 27 1188.1(3+) 133.9(3+) 1358.5(3+) A2G2SF 1091.9(4+) 12.778 27 1188.1(3+) 133.9(3+) 1358.5(3+) A2G2S2F 1196.4(1+) 13.11 28 1236.8(3+) 133.9(3+) 1358.5(3+) A2G2S2F 1164.7(4+) 13.11 28 1236.8(3+) 1231.2(3+) 1406.9(3+) A2G2S2F 1164.7(4+) 13.11 28 1236.8(3+) 1231.2(3+) 1465.6(3+) A3G3S2 975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1091.9(4+) 1164.7(4+) A3G3S3 1034.0(5+) 13.29 20 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1285.2(3+) 1405.6(3+) A3G3S3F 1063.0(5+) 13.29 20 1128.2(4+) 1184.1(3+) 1285.2(3+) A3G3S3F 1063.2(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) A3G3S3 1034.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 126.0(4+) Unoccupied form 577.2(4+) 13.2 35 1128.2(4+) 1164.7(4+) 126.0(4+) Unoccupied form 577.2(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2F 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.71 25 1182.8(4+) 1164.7(4+) 126.8(3+) 126.8(3+) A3G3F 1110.4(1+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) 138.5(3+) HexNAc(Hex(6) 1023.2(4+) 11.71 25 1182.8(4+) 1164.7(4+) 126.8(3+) A3G3F 1110.4(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) 138.5(3+) 138.5(3+) HexNAc(4)Hex(6) 1023.2(4+) 11.71 25 1182.8(4+) 1168.1(3+) 126.8(3+) 138.5	-		analyzed in						
digest A2G2 889.4(3) 15.05 23 1070.0(2+) 1151.0(2+) A2G2F 938.1(3+) 14.99 24 1143.0(2+) 1125.0(2+) 1224.0(2+) A3G3 1011.1(3+) 14.81 25 1070.0(2+) 1225.2(2+) 133.6(2+) A3G3F 1059.8(3+) 14.82 25 133.36(2+) 1406.6(2+) HexNAc(4)Hex(6) 943.4(3+) 14.98 24 1151.0(2+) 1225.2(2+) DASH analyzed in trypsin digest DASH 133.6(2+) 1232.0(2+) A2G2S 982.6(4+) 12.78 27 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2SF 1091.9(4+) 12.78 27 1236.8(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A2G2S2 1128.2(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 121.2(3+) 1285.2(3+) 1405.9(3+) A2G2S2 1128.2(4+) 13.30 20 1055.4(4+) 1285.2(3+) 1405.9(3+) A2G2S2 1128.2(4+) 1183.1(3+) 1285.4(3+) 133.3(3+)			trypsin/Neuraminidase A						
A2G2 889.4(2+) 15.05 23 1070.0(2+) 1151.0(2+) 122.0(2+) A3G3 1011.1(2+) 14.99 24 1143.0(2+) 1123.0(2+) 123.0(2+) 123.0(2+) A3G3 1011.1(2+) 14.82 25 1070.0(2+) 123.2(2+) 123.0(2+) HexNAc(4)Hex(6) 943.4(2+) 14.82 25 1033.0(2+) 123.0(2+) A2G2 982.6(4+) 12.51 23 1188.1(3+) 123.1(3+) 1309.9(3+) A2G2S 1055.4(4+) 12.79 27 1188.1(3+) 123.1.2(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A2G2SE 1028.2(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 123.1.2(3+) 1285.2(3+) 1405.9(3+) A2G3S2 1128.2(4+) 13.11 28 1236.8((3+) 129.9(3+) 133.3(3+) 1455.6(3+) A3G3S2 975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 102.1(4+) 128.2(3+) 148.1(3+) 128.2(3+) 148.1(3+) 128.2(3+) 148.1(3+) 128.2(3+) 148.1(3+) <td< td=""><td></td><td></td><td>digest</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></td<>			digest						
A262F 938.1(2+) 14.99 24 1143.0(2+) 1151.0(2+) 1222.(2+) A3G3 1011.1(3+) 14.91 25 1070.0(2+) 1225.2(2+) 1333.6(2+) HexNAc(4)Hex(6) 943.4(3+) 14.82 25 1333.6(2+) 1406.6(2+) HexNAc(4)Hex(6) 943.4(3+) 14.98 24 1151.0(2+) 1225.2(3+) A2G2 982.6(4+) 12.51 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2S 1055.4(4+) 12.79 27 1188.1(3+) 1285.2(3+) 1309.9(3+) A2G2S 1055.4(4+) 12.78 27 1236.8((3+) 1333.9(3+) 1358.5(3+) A2G2SZ 1128.2(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 1231.2(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A2G2SZF 1164.7(4+) 13.11 28 1236.8((3+) 1279.9(3+) 1333.9(3+) 1455.6(3+) A3G3S2 975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1012.9(4+) A3G3S3 1034.0(5+) 13.29 20 1155.4(4+) 1012.9(4+) A3G3S3 1034.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1184.1(3+) 1285.2(3+) A3G3S3 1034.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1184.1(3+) 1285.2(3+) A3G3S3 1034.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) A3G3S3 1034.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 1256.0(4+) Unoccupied form 577.2(4+) 13.2 25 587.2(1+) 1856.3(1+) A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) 1286.8(3+) A2G2 982.6(4+) 11.71 25 1182.8(3+) 1138.1(3+) 1286.8(3+) A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1309.9(3+) A2G3 1073.9(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) A2G2 982.6(4+) 11.71 25 1182.8(3+) 1309.9(3+) A2G2 982.6(4+) 11.71 25 1182.8(3+) 1309.9(3+) A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1309.9(3+) A2G2 982.6(4+) 11.71 25 1182.8(3+) 1309.9(3+) A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1309.9(3+) A2G2 982.6(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) A3G3 1073.9(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) A3G3 1073.9(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) A3G3F 1110.4(4+) 11.6 28 1134.1(3+) 1309.9(3+) A3G3F 1110.4(3+) 11.6 28 1134.1(3+) 1309.9	A2G2	889.4(3+)	15.05	23	1070.0(2+)	1151.0(2+)			
A3G3 1011.1(3+) 14.91 25 1070.0(2+) 1225.2(2+) 1333.6(2+) A3G3F 1059.8(3+) 14.82 25 1333.6(2+) 1406.6(2+) HexNAc(4)Hex(6) 943.4(2+) 14.98 24 1151.0(2+) 1232.0(2+) A2G2 SEE[WTHSCPOSPGNGT DASH analyzed in trypsin digest 1188.1(3+) 1134.1(3+) 1285.2(3+) 1309.9(3+) A2G2S 1055.4(4+) 12.79 27 1188.1(3+) 1285.2(3+) 1309.9(3+) A2G2SF 1091.9(4+) 12.78 27 1236.8((3+) 1231.2(3+) 1285.2(3+) 1405.9(3+) A2G2SF 11091.9(4+) 13.11 28 1236.8((3+) 1233.9(3+) 1358.5(3+) A2G3S2F 1005.0(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1188.1(3+) 1285.2(2+) 133.9(3+) 1455.6(3+) A3G3S2 975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1019.1(4+) 116.7(4+) A3G3S3 1034.0(5+) 13.29 20 1128.2(4+) 118.1(3+) 124+ <	A2G2F	938.1(3+)	14.99	24	1143.0(2+)	1151.0(2+)	1224.0(2+)		
A3G3F 1059.8(3+) 14.82 25 1333.6(2+) 1406.6(2+) HexNAc(4)Hex(6) 943.4(3+) 14.98 24 1151.0(2+) 1232.0(2+) A2G2 982.6(4+) 12.51 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2S 1055.4(4+) 12.79 27 1188.1(3+) 1285.2(3+) 1309.9(3+) A2G2SE 1091.9(4+) 12.78 27 1285.8(3+) 1333.9(3+) 1358.5(3+) A2G2S2 1128.2(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 1231.2(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A2G2S2F 1065.4(4+) 12.79 27 1188.1(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A2G2S2F 1064.7(4+) 13.11 28 1236.8(3+) 129.2(3+) 1455.6(3+) A3G3S2 975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1128.2(4+) 1164.7(4+) 1282.2(3+) 1495.6(3+) A3G3S3 1034.0(5+) 13.2.2 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 1256.0(4+) Unoccupied form 577.2(A3G3	1011.1(3+)	14.91	25	1070.0(2+)	1252.5(2+)	1333.6(2+)		
HexNAc(4)Hex(6) 943.4(3+) 14.98 24 1151.0(2+) 1232.0(2+) SHEIWTHSCPOSPONGT DASH A2G2 982.6(4+) 12.51 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2S 1055.4(4+) 12.79 27 1128.0(3+) 1339.9(3+) 1358.5(3+) A2G2SF 1091.9(4+) 12.78 27 1236.8(3+) 1231.2(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A2G2SS2 1128.2(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 1231.2(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A3G3S2 975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1091.9(4+) 1285.2(3+) A3G3S2F 1006.0(5+) 13.03 20 1055.4(4+) 1091.9(4+) 1164.7(4+) A3G3S3 1034.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1256.4(3+) Unoccupied form 577.2(4+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) A3G3 1073.9(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1236.8(3+) A2G2	A3G3F	1059.8(3+)	14.82	25	1333.6(2+)	1406.6(2+)	. ,		
SHEIWTHSCPQSPGNGT DASH analyzed in trypsin digest A2G2 982.6(4+) 12.51 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2S 1055.4(4+) 12.79 27 1188.1(3+) 1285.2(3+) 1309.9(3+) A2G2S 1091.9(4+) 12.78 27 1286.8((3+) 1333.9(3+) 1388.5(3+) A2G2S2 1128.2(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 1231.2(3+) 1265.2(3+) 1406.9(3+) A2G2S2 128.2(4+) 13.11 28 1236.8((3+) 1279.9(3+) 1333.9(3+) 1455.6(3+) A3G3S2 975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1188.1(3+) 1282.2(3+) A3G3S3 1034.0(5+) 13.29 20 1128.2(4+) 1184.7(4+) A3G3S3F 1063.2(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1256.0(4+) Unoccupied form 577.2(4+) 13.2 25 587.2(1+) 856.3(1+) A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 129.9(3+) A3G	HexNAc(4)Hex(6)	943.4(3+)	14.98	24	1151.0(2+)	1232.0(2+)			
DASH analyzed in typen digest A2G2 982.6(4+) 12.51 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2S 1055.4(4+) 12.79 27 1188.1(3+) 1285.2(3+) 1309.9(3+) A2G2S 1025.4(4+) 12.78 27 1236.8(i3+) 1231.2(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A2G2S2 1128.2(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 1231.2(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A2G3S2 975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1285.2(3+) A3G3S2 975.8(5+) 13.03 20 1055.4(4+) 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1286.4(3+) A3G3S3 1034.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 1256.0(4+) Unoccupied form 577.2(4+) 13.22 25 587.2(1+) 856.3(1+) 236.8(3+) A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) 1236.8(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.64 28 </td <td></td> <td>SHEIWTHSCPQSPGNGT</td> <td>analyzed in trypsin digest</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>		SHEIWTHSCPQSPGNGT	analyzed in trypsin digest						
A2G2 982.6(4+) 12.51 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2S 1055.4(4+) 12.79 27 1188.1(3+) 1285.2(3+) 1309.9(3+) A2G2SF 1091.9(4+) 12.78 27 1236.8((3+) 1333.9(3+) 1358.5(3+) A2G2S2 1128.2(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 1231.2(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A2G2S2F 1164.7(4+) 13.11 28 1236.8((3+) 1279.9(3+) 1333.9(3+) 1455.6(3+) A3G3S2 975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1091.9(4+) 1164.7(4+) A3G3S2F 1005.0(5+) 13.29 20 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1285.2(3+) A3G3S3F 1063.2(5+) 13.22 21 11128.2(4+) 1164.7(4+) 1256.0(4+) Unoccupied form 577.2(4+) 13.2 25 587.2(1+) 856.3(1+) 134.1(3+) A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) 1236.8(3+) A3G33 1073.9(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3		DASH	analyzed in trypsin digest						
A2G2S 1055.4(4+) 12.79 27 1188.1(3+) 1285.2(3+) 1309.9(3+) A2G2SF 1091.9(4+) 12.78 27 1236.8((3+) 1333.9(3+) 1358.5(3+) A2G2S2 1128.2(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 1231.2(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A2G2S2F 1164.7(4+) 13.11 28 1236.8((3+) 1279.9(3+) 1333.9(3+) 1455.6(3+) A3G3S2 975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1019.1(4+) 1285.2(3+) A3G3S3 1003.0(5+) 13.03 20 1055.4(4+) 129.1(3+) 1285.2(3+) A3G3S3F 1003.2(5+) 13.29 20 1128.2(4+) 1164.7(4+) 1256.0(4+) Unoccupied form 577.2(4+) 13.2 25 587.2(1+) 856.3(1+) 1236.8(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) 1236.8(3+) 1286.8(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.6 28 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.73 23 1188.1(3	A2G2	982.6(4+)	12.51	23	1188.1(3+)	1134.1(3+)			
A2G2SF 1091.9(4+) 12.78 27 1236.8((3+) 1333.9(3+) 1358.5(3+) A2G2S2 1128.2(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 1231.2(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A2G2S2F 1164.7(4+) 13.11 28 1236.8((3+) 1279.9(3+) 1333.9(3+) 1455.6(3+) A3G3S2 975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1285.2(3+) A3G3S2F 1005.0(5+) 13.29 20 1128.2(4+) 1164.7(4+) 1285.2(3+) A3G3S3F 1063.2(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 1256.0(4+) Unoccupied form 577.2(4+) 13.2 35 587.2(1+) 856.3(1+) 1266.0(4+) M2G2F 1019.2(4+) 11.71 25 1188.1(3+) 1134.1(3+) 1286.8(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.71 25 1182.8(3+) 1339.9(3+) 1358.5(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3+) A2G3F 1110.4(4+) 11.64 26 1134.	A2G2S	1055.4(4+)	12.79	27	1188.1(3+)	1285.2(3+)	1309.9(3+)		
A2G2S2 1128.2(4+) 13.13 29 1188.1(3+) 1231.2(3+) 1285.2(3+) 1406.9(3+) A2G2S2F 1164.7(4+) 13.11 28 1236.8((3+) 1279.9(3+) 1333.9(3+) 1455.6(3+) A3G3S2 975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1091.9(4+) 1188.1(3+) 1285.2(3+) A3G3S2F 1005.0(5+) 13.29 20 10158.4(4+) 1091.9(4+) 1164.7(4+) A3G3S3F 1063.2(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 1285.2(3+) MaG3S3 1034.0(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 1256.0(4+) MaG3S3F 1063.2(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 1256.0(4+) Unoccupied form 577.2(4+) 13.2 35 587.2(1+) 856.3(1+) 1266.0(4+) A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) 1206.8(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1236.8(3+) 1245.8(3+) A2G3 1073.9(4+) 11.64 26 1134.1	A2G2SF	1091.9(4+)	12.78	27	1236.8((3+)	1333.9(3+)	1358.5(3+)		
A2G2S2F 1164.7(4+) 13.11 28 1236.8((3+) 1279.9(3+) 1333.9(3+) 1455.6(3+) A3G3S2 975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1019.9(4+) 1164.7(4+) A3G3S2F 1005.0(5+) 13.29 20 1128.2(4+) 1219.5(4+) 1256.0(2+) A3G3S3F 1063.2(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 126.0(4+) 1256.0(4+) Unoccupied form 577.2(4+) 13.2 35 587.2(1+) 856.3(1+) 126.8(3+) A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A3G33+) A2G2F 1019.2(4+) 11.71 25 1182.8(3+) 1236.8(3+) A3G3F 1110.4(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3+) A3G3F 1110.4(4+) 11.69 25 1188.1(3+) 1242.2(3+) 1025.5(1+) HexNAc(4)Hex(6) 1023.2(4+) 11.69 25 1188.1(3+) 1242.2(3+) 1242.2(3+) LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK 24.17/24.57 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+)	A2G2S2	1128.2(4+)	13.13	29	1188.1(3+)	1231.2(3+)	1285.2(3+)	1406.9(3+)	
A3G3S2 975.8(5+) 13.07 19 1055.4(4+) 1128.2(4+) 1188.1(3+) 1285.2(3+) A3G3S2F 1005.0(5+) 13.03 20 1055.4(4+) 1091.9(4+) 1164.7(4+) A3G3S33 1034.0(5+) 13.29 20 1128.2(4+) 1219.5(4+) 1256.0(4+) A3G3S3F 1063.2(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 1256.0(4+) Unoccupied form 577.2(4+) 13.2 35 587.2(1+) 856.3(1+) 1266.0(4+) Unoccupied form 577.2(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) 126.8(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 130.9(3+) 136.8(3+) A3G35F 1110.4(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3+) HexNAc(6) 1023.2(4+) 11.69 25 1188.1(3+) 1242.2(3+) HexNAc(4)Hex(6) 1023.2(4+) 11.69 25 1188.1(3+) 1025.5(1+) HexNAc-Hex 840.63(5+) 24.17/24.57 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) <	A2G2S2F	1164.7(4+)	13.11	28	1236.8((3+)	1279.9(3+)	1333.9(3+)	1455.6(3+)	
A3G3S2F 1005.0(5+) 13.03 20 1055.4(4+) 1091.9(4+) 1164.7(4+) A3G3S3 1034.0(5+) 13.29 20 1128.2(4+) 1219.5(4+) A3G3S3F 1063.2(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 1256.0(4+) Unoccupied form 577.2(4+) 13.2 35 587.2(1+) 856.3(1+) analyzed in A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.71 25 1182.8(3+) 1309.9(3+) A3G3F 1110.4(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) A3G3F 1110.4(4+) 11.69 25 1188.1(3+) 1242.2(3+) LRPVLPTOSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK LRPVLPTOSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK HexNAc-Hex 840.63(5+) 24.17/24.57 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-2Neu5AC 957.07(5+) 25.60/25.90 40 724.4(1+)	A3G3S2	975.8(5+)	13.07	19	1055.4(4+)	1128.2(4+)	1188.1(3+)	1285.2(3+)	
A3G3S3 1034.0(5+) 13.29 20 1128.2(4+) 1219.5(4+) A3G3S3F 1063.2(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 1256.0(4+) Unoccupied form 577.2(4+) 13.2 35 587.2(1+) 856.3(1+) 1256.0(4+) unaclyzed in analyzed in trypsin/Neuraminidase A digest 1128.2(3+) 1188.1(3+) 123.4 A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) 123.6.8(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.71 25 1182.8(3+) 1188.1(3+) 123.6.8(3+) A3G33 1073.9(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3+) HexNAc(6) 1023.2(4+) 11.69 25 1188.1(3+) 1242.2(3+) LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK 1025.5(1+) 1025.5(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex 840.63(5+) 24.17/24.57 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-2Neu5AC	A3G3S2F	1005.0(5+)	13.03	20	1055.4(4+)	1091.9(4+)	1164.7(4+)		
A3G3S3F 1063.2(5+) 13.22 21 1128.2(4+) 1164.7(4+) 1256.0(4+) Unoccupied form 577.2(4+) 13.2 35 587.2(1+) 856.3(1+) analyzed in trypsin/Neuraminidase A digest	A3G3S3	1034.0(5+)	13.29	20	1128.2(4+)	1219.5(4+)	. ,		
Unoccupied form 577.2(4+) 13.2 35 587.2(1+) 856.3(1+) analyzed in trypsin/Neuraminidase A digest analyzed in trypsin/Neuraminidase A digest 587.2(1+) 856.3(1+) A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.71 25 1182.8(3+) 1188.1(3+) 1236.8(3+) A3G3 1073.9(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3+) A3G3F 1110.4(4+) 11.69 25 1188.1(3+) 1242.2(3+) LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK 11.69 25 1188.1(3+) 1242.2(3+) HexNAc-Hex 840.63(5+) 24.17/24.57 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-2Neu5AC 957.07(5+) 25.60/25.90 40 724.4(1+) 1025.5(1+) 1085.9(original)/1086.2(de aminated)(3+) Unique peptide Unique peptide 114.1G2H <td< td=""><td>A3G3S3F</td><td>1063.2(5+)</td><td>13.22</td><td>21</td><td>1128.2(4+)</td><td>1164.7(4+)</td><td>1256.0(4+)</td><td></td></td<>	A3G3S3F	1063.2(5+)	13.22	21	1128.2(4+)	1164.7(4+)	1256.0(4+)		
analyzed in trypsin/Neuraminidase A digest A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.71 25 1182.8(3+) 1188.1(3+) 1236.8(3+) A3G3 1073.9(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3+) A3G3F 1110.4(4+) 11.6 28 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3+) HexNAc(4)Hex(6) 1023.2(4+) 11.69 25 1188.1(3+) 1242.2(3+) LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK SNGPGQEPIAVMTFDLTK 1025.5(1+) 1025.5(1+) HexNAc-Hex 840.63(5+) 24.17/24.57 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-2Neu5AC 957.07(5+) 25.60/25.90 40 724.4(1+) 1025.5(1+) 1085.9(original)/1086.2(de aminated)(3+) Unique peptide IALGGLLFPASNLR 721.4(2+) 27.52 35 657.4(1+) 804.4(1+) 917.5(1+)	Unoccupied form	577.2(4+)	13.2	35	587.2(1+)	856.3(1+)	. ,		
trypsin/Neuraminidase A digest A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.71 25 1182.8(3+) 1236.8(3+) A3G3 1073.9(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) A3G3F 1110.4(4+) 11.6 28 1134.1(3+) 1309.9(3+) HexNAc(4)Hex(6) 1023.2(4+) 11.69 25 1188.1(3+) 1242.2(3+) LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK SNGPGQEPIAVMTFDLTK 1025.5(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex 840.63(5+) 24.17/24.57 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 957.07(5+) 25.60/25.90 40 724.4(1+) 855.9(original)/1086.2(de aminated)(3+) Unique peptide I I 1025.5(1+) 1025.5(1+) 1085.9(original)/1086.2(de aminated)(3+) Unique peptide I I 11.4(2+)			analyzed in		. ,	. ,			
digest A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.71 25 1182.8(3+) 1188.1(3+) 1236.8(3+) A3G3 1073.9(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3+) A3G3F 1110.4(4+) 11.6 28 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3+) LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK HexNAc-Hex 840.63(5+) 24.17/24.57 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex 840.63(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-2Neu5AC 957.07(5+) 25.60/25.90 40 724.4(1+) 1025.5(1+) 1085.9(original)/1086.2(de aminated)(3+) Unique peptide Unique peptide IALGGLLFPASNLR 721.4(2+) 27.52 35 657.4(1+)			trypsin/Neuraminidase A						
A2G2 982.6(4+) 11.73 23 1188.1(3+) 1134.1(3+) A2G2F 1019.2(4+) 11.71 25 1182.8(3+) 1188.1(3+) 1236.8(3+) A3G3 1073.9(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) A309.9(3+) A3G3F 1110.4(4+) 11.6 28 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3+) HexNAc(4)Hex(6) 1023.2(4+) 11.69 25 1188.1(3+) 1242.2(3+) LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK SNGPGQEPIAVMTFDLTK 1025.5(1+) 1025.5(1+) HexNAc-Hex 840.63(5+) 24.17/24.57 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 957.07(5+) 25.60/25.90 40 724.4(1+) 1025.5(1+) 1085.9(original)/1086.2(de aminated)(3+) Unique peptide Inique peptide Inique peptide 104.4(1+) 917.5(1+) 104.4(1+) 917.5(1+)			digest						
A2G2F 1019.2(4+) 11.71 25 1182.8(3+) 1188.1(3+) 1236.8(3+) A3G3 1073.9(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3+) A3G3F 1110.4(4+) 11.6 28 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3+) HexNAc(4)Hex(6) 1023.2(4+) 11.69 25 1188.1(3+) 1242.2(3+) LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex 840.63(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-2Neu5AC 957.07(5+) 25.60/25.90 40 724.4(1+) 1025.5(1+) 1085.9(original)/1086.2(de aminated)(3+) Unique peptide Unique peptide 25.60/25.90 40 724.4(1+) 1025.5(1+) 1085.9(original)/1086.2(de aminated)(3+) Unique peptide 25.60/25.90 40 724.4(1+) 804.4(1+) 917.5(1+)	A2G2	982.6(4+)	11.73	23	1188.1(3+)	1134.1(3+)			
A3G3 1073.9(4+) 11.64 26 1134.1(3+) 1309.9(3+) A3G3F 1110.4(4+) 11.6 28 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3+) HexNAc(4)Hex(6) 1023.2(4+) 11.69 25 1188.1(3+) 1242.2(3+) LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex 840.63(5+) 24.17/24.57 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-2Neu5AC 957.07(5+) 25.60/25.90 40 724.4(1+) 1025.5(1+) 1085.9(original)/1086.2(de aminated)(3+) Unique peptide IALGGLLFPASNLR 721.4(2+) 27.52 35 657.4(1+) 804.4(1+) 917.5(1+)	A2G2F	1019.2(4+)	11.71	25	1182.8(3+)	1188.1(3+)	1236.8(3+)		
A3G3F 1110.4(4+) 11.6 28 1134.1(3+) 1309.9(3+) 1358.5(3+) HexNAc(4)Hex(6) 1023.2(4+) 11.69 25 1188.1(3+) 1242.2(3+) LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK LRPVLPTQSAHDPPAVHL SSGPGQEPIAVMTFDLTK 1025.5(1+) 1025.5(1+) HexNAc-Hex 840.63(5+) 24.17/24.57 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-2Neu5AC 957.07(5+) 25.60/25.90 40 724.4(1+) 1025.5(1+) 1085.9(original)/1086.2(de aminated)(3+) Unique peptide Unique peptide 35 657.4(1+) 804.4(1+) 917.5(1+)	A3G3	1073.9(4+)	11.64	26	1134.1(3+)	1309.9(3+)	. ,		
HexNAc(4)Hex(6) 1023.2(4+) 11.69 25 1188.1(3+) 1242.2(3+) LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex 840.63(5+) 24.17/24.57 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-2Neu5AC 957.07(5+) 25.60/25.90 40 724.4(1+) 1025.5(1+) Unique peptide Unique peptide 10<	A3G3F	1110.4(4+)	11.6	28	1134.1(3+)	1309.9(3+)	1358.5(3+)		
LRPVLPTQSAHDPPAVHL SNGPGQEPIAVMTFDLTK HexNAc-Hex 840.63(5+) 24.17/24.57 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 998.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-2Neu5AC 957.07(5+) 25.60/25.90 40 724.4(1+) 1025.5(1+) Unique peptide Unique peptide 27.52 35 657.4(1+) 804.4(1+) 917.5(1+)	HexNAc(4)Hex(6)	1023.2(4+)	11.69	25	1188.1(3+)	1242.2(3+)			
<th colsection<="" t<="" td=""><td></td><td></td><td></td><td></td><td>. ,</td><td>. ,</td><td></td><td></td></th>	<td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>. ,</td> <td>. ,</td> <td></td> <td></td>					. ,	. ,		
HexNAc-Hex 840.63(5+) 24.17/24.57 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-Neu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-2Neu5AC 957.07(5+) 25.60/25.90 40 724.4(1+) 1025.5(1+) 1085.9(original)/1086.2(de aminated)(3+) Unique peptide IALGGLLFPASNLR 721.4(2+) 27.52 35 657.4(1+) 804.4(1+) 917.5(1+)		SNGPGQEPIAVMTFDLTK							
HexNAC-Hex-Neu5AC 898.85(5+) 24.87/25.30 40 724.4(1+) 855.4(1+) 1025.5(1+) HexNAC-Hex-2Neu5AC 957.07(5+) 25.60/25.90 40 724.4(1+) 1025.5(1+) 1085.9(original)/1086.2(de aminated)(3+) Unique peptide IALGGLLFPASNLR 721.4(2+) 27.52 35 657.4(1+) 804.4(1+) 917.5(1+)	HexNAc-Hex	840.63(5+)	24.17/24.57	40	724.4(1+)	855.4(1+)	1025.5(1+)		
HexNAC-Hex-2Neu5AC 957.07(5+) 25.60/25.90 40 724.4(1+) 1025.5(1+) 1085.9(original)/1086.2(de aminated)(3+) Unique peptide IALGGLLFPASNLR 721.4(2+) 27.52 35 657.4(1+) 804.4(1+) 917.5(1+)	HexNAC-Hex-Neu5AC	898.85(5+)	24.87/25.30	40	724.4(1+)	855.4(1+)	1025.5(1+)		
Unique peptide IALGGLLFPASNLR 721.4(2+) 27.52 35 657.4(1+) 804.4(1+) 917.5(1+)	HexNAC-Hex-2Neu5AC	957.07(5+)	25.60/25.90	40	724.4(1+)	1025.5(1+)	1085.9(origin aminat	al)/1086.2(de ed)(3+)	
IALGGLLFPASNLR 721.4(2+) 27.52 35 657.4(1+) 804.4(1+) 917.5(1+)		Unique peptide							
	IALGGLLFPASNLR	721.4(2+)	27.52	35	657.4(1+)	804.4(1+)	917.5(1+)		

Table S2. Parameters for the quantification of all the known SHBG glycopeptides.

Table S3. Reproducibility of the measurements. Reproducibility is expressed as RSD (%) of the intra- (n=4) and inter- (n=9) sample variability of quantification.

Peaks were normalized to the sum of all	Intra sample reproducibility (n=4)	Inter sample reproducibility (n=9)
forms of LDVDQALNR	RSD(%)	RSD(%)
A2G2S	3.7	10.9
A2G2SF	1.9	17.9
A2G2S2	0.6	1.0
A2G2S2F	7.1	9.2
A3G3S3	33.7	14.0
A3G3S2F	12.7	16.0
A3G3S2F	11.0	14.8
A3G3S3F	34.7	ND
LDVDQALNR(non-occupied)	4.4	15.3
average	12.2	12.4

Table S4. Glycosylation changes among healthy, cirrhosis, and HCC patients. H: healthy controls; CIR: cirrhotic patients; HCC: hepatocellular carcinoma patients. Total fucosylation (%) represents the percentage of fucosylated species in all detected glycoforms quantified by the LC/MS PRM method. Branching represents the ratio of the sum of triantennary glycoforms to the sum of the biantennary glycoforms. Data is shown as mean \pm standard deviation from duplicated analyses of 2 pooled samples each group. Number in Bold: significantly different from healthy control by one way Anova with Bonferroni procedure at p<0.05; *: significantly different from CIR group by one way Anova with Bonferroni procedure at p<0.05.

	Н	CIR HCC		ANOVA (p)		
	LDVDQALNR					
A2G2S2F/A2G2S2	0.014 ± 0.001	0.023 ± 0.004	0.024 ± 0.003	<0.001		
A2G2SF/A2G2S	0.202 ± 0.05	1.356 ± 0.6	1.303 ± 0.7	0.008		
A3G3S3F/A3G3S3	0.164 ± 0.05	0.284 ± 0.07	0.317 ± 0.02	0.003		
Total fucosylation (%)	1.853 ± 0.2	3.266 ± 0.4	3.609 ± 0.5	<0.001		
(A2G2S2F+A2G2S2)/ (A2G2S+A2G2SF)	95.209 ± 10	107.891 ± 40	79.210 ± 40	0.370		
A2G2S2/A2G2S	112.533 ± 10	259.527 ± 100	197.482 ± 100	0.129		
A2G2S2F/A2G2SF	8.083 ± 2	4.411 ± 1	3.175 ± 0.6	<0.001		
(A3G3S3+A3G3S3F)/ (A3G3S2+A3G3S2F)	9.290 ± 2	17.514 ± 8	12.800 ± 7	0.136		
A3G3S3/A3G3S2	8.052 ± 2	13.558 ± 6	9.752 ± 6	0.176		
Branching	3.741 ± 1	3.867 ± 1	4.253 ± 0.9	0.823		
		SHEIWTHSCPG	SPGNGTDASH			
A2G2S2F/A2G2S2	0.082 ± 0.01	0.182 ± 0.04	0.190 ± 0.03	<0.001		
A2G2SF/A2G2S	0.239 ± 0.06	0.680 ± 0.2	0.795 ± 0.3	0.002		
A3G3S3F/A3G3S3	0.480 ± 0.09	1.031 ± 0.3	1.168 ± 0.09	<0.001		
A3G3S2F/A3G3S2	0.405 ± 0.08	1.422 ± 0.3	1.818 ± 0.2	<0.001		
Total fucosylation (%)	9.908 ± 0.5	19.593 ± 3	20.690 ± 3	<0.001		
(A2G2S2F+A2G2S2)/ (A2G2S+A2G2SF)	210.136 ± 40	290.983 ± 200	415.794 ± 400	0.494		
A2G2S2/A2G2S	239.018 ± 40	407.149 ± 300	695.229 ± 700	0.240		
A2G2S2F/A2G2SF	90.652 ± 40	118.829 ± 100	132.020 ± 100	0.832		
(A3G3S3+A3G3S3F)/ (A3G3S2+A3G3S2F)	42.895 ± 2	22.591 ± 6	16.425 ± 0.9	<0.001		
A3G3S3/A3G3S2	40.960 ± 5	26.745 ± 7	21.378 ± 2	<0.001		
A3G3S3F/A3G3S2F	48.784 ± 8	19.726 ± 6	13.759 ± 1	<0.001		
Branching	10.498 ± 0.7	14.281 ± 5	14.042 ± 4	0.370		
	LRPVLPTQSAHDPPAVHLSNGPGQEPIAVMTFDLTK					
HexNAc-Hex-2Neu5Ac/ HexNAc-Hex-Neu5Ac	0.139 ± 0.03	0.256 ± 0.07	0.509 ± 0.07*	<0.001		

Table S5. Glycosylation changes in cirrhosis patients with different etiology. H: healthy control; ALD: alcoholic; NASH: non-alcoholic steatohepatitis; HBV: hepatitis B; HCV: hepatitis C. Total fucosylation (%) represents the percentage of fucosylated species in all detected glycoforms quantified by the LC/MS PRM method. Data is shown as mean \pm standard deviation from duplicated analyses of 2 pooled samples each group. Number in Bold: significantly different from healthy controls by one way Anova with Bonferroni procedure at p<0.05.

	н	ALD	NASH	HBV	НСУ	ANOVA (p)		
			LDVDQALNR					
A2G2S2F/ A2G2S2	0.014 ± 0.001	0.024 ± 0.005	0.025 ± 0.002	0.022 ± 0.002	0.020 ± 0.004	<0.001		
A2G2SF/ A2G2S	0.202 ± 0.05	0.973 ± 0.6	1.559 ± 0.5	0.991 ± 0.3	1.899 ± 0.8	0.003		
A3G3S3F/ A3G3S3	0.164 ± 0.05	0.241 ± 0.08	0.346 ± 0.03	0.293 ± 0.08	0.254 ± 0.03	0.007		
Total fucosylation (%)	1.853 ± 0.2	3.190 ± 0.4	3.799 ± 0.2	3.108 ± 0.2	2.967 ± 0.4	<0.001		
A2G2S2F/ A2G2SF	8.083 ± 2	5.181 ± 1	4.087 ± 2	3.864 ± 2	4.510 ± 0.6	0.011		
	SHEIWTHSCPQSPGNGTDASH							
A2G2S2F/ A2G2S2	0.082 ± 0.01	0.225 ± 0.03	0.186 ± 0.02	0.146 ± 0.01	0.169 ± 0.05	<0.001		
A2G2SF/ A2G2S	0.239 ± 0.06	0.664 ± 0.1	0.648 ± 0.1	0.545 ± 0.03	0.862 ± 0.3	0.001		
A3G3S3F/ A3G3S3	0.480 ± 0.09	1.018 ± 0.4	1.235 ± 0.2	0.979 ± 0.2	0.891 ± 0.08	0.003		
A3G3S2F/ A3G3S2	0.405 ± 0.08	1.207 ± 0.5	1.461 ± 0.2	1.328 ± 0.1	1.693 ± 0.3	<0.001		
Total fucosylation (%)	9.908 ± 0.5	22.116 ± 2	21.743 ± 0.7	15.723 ± 1	18.789 ± 3	<0.001		
A3G3S3/ A3G3S2	40.960 ± 5	24.851 ± 4	32.050 ± 6	20.126 ± 2	29.953 ± 7	<0.001		
A3G3S3F/ A3G3S2F	48.784 ± 8	20.603 ± 2	27.140 ± 6	15.172 ± 5	15.990 ± 4	<0.001		
(A3G3S3+A3G3S3F)/ (A3G3S2+A3G3S2F)	42.895 ± 2	22.693 ± 3	29.149 ± 6	17.267 ± 3	21.253 ± 5	<0.001		

Table S6. Changes in the outer arm fucosylation, HexNAc(4)Hex(6) N-glycoform, and O-glycan sialylation in cirrhotic patients with different etiologies and HCC. H: healthy control; ALD: alcoholic; NASH: non-alcoholic steatohepatitis; HBV: hepatitis B; HBC: hepatitis C. Relative intensity of outer arm fucosylation of A2G2F on SHEIWTHSCPQSPGNGTDASH was calculated as follows: (Relative intensity of A2G2F glycoform - Nonfucosylated Y)/[(Fucosylated Y - Nonfucosylated Y)/2 + Nonfucosylated Y] based on the molar contribution of the fragments. The corresponding core fucosylation was calculated by subtracting the contribution of outer arm fucosylation from the relative intensity of A2G2F glycoform. Data is shown as mean \pm standard deviation from duplicated analyses of 2 pooled samples each group. Number in Bold: significantly different from healthy control by one way Anova with Bonferroni procedure at p<0.05.

	н	ALD	NASH	HBV	HCV	нсс	ANOVA (p)
Relative Intensity	LDVDQALNR						
A2G2F	0.021 ± 0.002	0.038 ± 0.008	0.040 ± 0.002	0.038 ± 0.001	0.032 ± 0.006	0.038 ± 0.002	<0.001
A3G3F	0.018 ± 0.003	0.035 ± 0.005	0.043 ± 0.002	0.035 ± 0.002	0.040 ± 0.006	0.042 ± 0.006	<0.001
			SHEIWTHSCPC	SPGNGTDASH			
A2G2F	0.137 ± 0.002	0.237 ± 0.02	0.224 ± 0.02	0.206 ± 0.003	0.192 ± 0.03	0.233 ± 0.006	<0.001
A3G3F	0.055 ± 0.009	0.083 ± 0.004	0.097 ± 0.03	0.076 ± 0.004	0.080 ± 0.01	0.088 ± 0.02	0.016
nonfucosylated Y ion/ fucosylated Y ion	LDVDQALNR						
A2G2F	0.323 ± 0.02	0.307 ± 0.01	0.319 ± 0.02	0.344 ± 0.02	0.323 ±0.008	0.310 ± 0.01	0.056
A3G3F	0.812 ± 0.04	0.820 ± 0.01	0.807 ± 0.02	0.820 ± 0.02	0.826 ± 0.02	0.794 ± 0.03	0.463
			SHEIWTHSCPG	SPGNGTDASH			
A2G2F	0.128 ± 0.02	0.166 ± 0.01	0.157 ± 0.01	0.168 ± 0.02	0.142 ± 0.01	0.149 ± 0.005	0.005
A3G3F	0.743 ± 0.06	0.700 ± 0.08	0.789 ± 0.06	0.805 ± 0.02	0.781 ± 0.02	0.768 ± 0.02	0.105
			SHEIWTHSCPG	SPGNGTDASH			
Calculated relative intensity of outer arm fucosylation in A2G2F	0.031 ± 0.003	0.068 ± 0.01	0.061 ± 0.007	0.059 ± 0.006	0.048 ± 0.007	0.060 ± 0.003	<0.001
Calculated relative intensity of core fucosylation in A2G2F	0.106 ± 0.004	0.169 ± 0.01	0.163 ± 0.02	0.147 ± 0.006	0.144 ± 0.02	0.173 ± 0.005	<0.001
	HexNAc(4)Hex(6) (%)						
LDVDQALNR	0.329 ± 0.03	0.396 ± 0.02	0.333 ± 0.02	0.307 ± 0.03	0.310 ± 0.02	0.281 ± 0.01	<0.001
SHEIWTHSCPQSPGNGTDASH	0.135 ± 0.02	0.203 ± 0.02	0.173 ± 0.03	0.181 ± 0.02	0.143 ± 0.01	0.154 ± 0.01	0.001
		HexN	Ac-Hex-2Neu5Ad	/HexNAc-Hex-N	eu5Ac		
LRPVLPTQSAHDPPAVHLSNGPGQEPIAV MTFDLTK	0.139 ± 0.03	0.191 ± 0.01	0.279 ± 0.02	0.214 ± 0.08	0.340 ± 0.05	0.509 ± 0.07	<0.001

Figure S1. Comparison of the data normalization methods. The results represent an average of four injections.



Figure S2. Serum SHBG in liver diseases measured by ELISA. H: healthy control; CIR: cirrhotic patients; HCC: hepatocellular carcinoma patients. *: significantly different from healthy control by one way Anova with Bonferroni procedure at p<0.05.



Figure S3. Cleavage of outer arm fucose on fucosylated glycoforms of SHEIWTHSCPQSPGNGTDASH. Completed removal of outer arm fucose on fucosylated triantennary glycoform of SHEIWTHSCPQSPGNGTDASH (A-C); incomplete digestion of outer arm fucose on fucosylated biantennary glycoform of SHEIWTHSCPQSPGNGTDASH (D-E). MSMS spectrum of the fucosylated triantennary (A) and biantennary (D) glycoforms; XIC of the following analytes treated with Neuraminidase A alone (Blue) or Neuraminidase A followed by α 1-3,4 and α 1,-2 Fucosidases (Pink): (B) non-fucosylated fragment m/z 1309.8 (3+) and (C) oxonium ion m/z 512.2 (1+) specific for outer arm fucose of the fucosylated triantennary glycoform; (E) non-fucosylated fragment m/z 1188.1 (3+) and (F) oxonium ion m/z 512.2 (1+) of the fucosylated biantennary glycoform. square: GlcNAc, green circle: Man, yellow circle: Gal; red triangle: Fuc.



• : - α 1-3,4 Fucosidase; α 1-2 Fucosidase • : + α 1-3,4 Fucosidase; α 1-2 Fucosidase

Identification of SHBG glycoforms by Orbitrap Fusion Lumos

Digested protein was separated using a 90 minute ACN gradient on a 150 mm x 75 μ m C18 pepmap column at a flow rate of 0.3 μ L/min. In brief, peptide and glycopeptide separation was achieved by a 5 min trapping/washing step using 99% solvent A (2% acetonitrile containing 0.1% formic acid) at 10 μ L/min followed by a 90 min acetonitrile gradient at a flow rate of 0.3 μ L/min: 0-3min 2% B, 3-5min from 2% to 10% solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile); 5-60 min from 10% to 45% solvent B; 60-65 from 35% to 98% solvent B; 65-70min at 98% solvent B, 70.1-90min equilibration by 2% solvent B.

Glycopeptides were analyzed using an Orbitrap Lumos Fusion mass spectrometer. The electrospray ionization voltage was set to 2.3 kV, and the capillary temperature was set to 275 °C. MS1 scans were performed over m/z 400–1800 with the wide quadrupole isolation on at a resolution of 120, 000 (m/z 200), RF Lens was set to 40%, intensity threshold for MS2 was set to 2.0e4, selected precursors for MS2 were with charge state 2-7, Dynamic exclusion was set for 30s. Data-dependent HCD tandem mass spectra were collected with a resolution of 15, 000 in the Orbitrap with fixed first mass 110 and normalized collision energy 25%. The identification of glycopeptides was performed manually.