

## X500B QTOF系统确定蛋白序列突变及复杂翻译后修饰

### Determination of Protein Sequence Mutation and Complex Post Translation Modification on the X500B QTOF System

吕小磊<sup>1</sup>, 罗继<sup>1</sup>, 郭立海<sup>1</sup>

Lv Xiaolei<sup>1</sup>, Luo Ji<sup>1</sup>, Guo Lihai<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SCIEX中国应用支持中心, 上海

**Key Words:** Biopharmaceutical Characterization; Sequence Mutation; Post Translation Modification

#### 引言

近年来, 抗体类蛋白药物发展迅速, 在生物治疗领域占据着越来越高的地位, 因此对药物的安全性和有效性进行质量控制就显得尤为重要。而产品表征分析对蛋白药物的影响很大, 也是药物质量控制关注的重点。由于蛋白分子量比较大和其固有的异质性, 使得蛋白药物在生产过程中容易发生序列突变、降解和翻译后修饰, 这些变化对于药物的有效性和安全性都会造成影响。质谱分析作为一种强大的蛋白表征工具, 能够实现快速准确的质量分析。

生物药的表征分析主要包括完整蛋白分子量的精确测定和肽图测定, 后者包括序列覆盖度、蛋白序列测定、翻译后修饰、二硫键分析等。在进行完整分子量测定时, 如果遇到蛋白理论分子量和测得的分子量不一致的情况, 需要考虑蛋白是否发生了翻译后修饰或者序列改变, 例如对于糖基化修饰, 可以使用糖苷酶切糖之后进行测定, 如果去糖以后蛋白分子量仍然不一致, 在使用蛋白酶对蛋白进行酶解以后测定肽图时, 需要通过软件检索匹配以确定样品中发生的序列突变和翻译后修饰。另外, 一些抗体类药物是由轻链和重链通过二硫键结合而成, 需要使用还原剂 (如DTT) 进行还原反应以打开二硫键, 从而测定轻链和重链的精确分子量, 而在肽图测定时, 如果要确定二硫键的位置, 酶解之前不需要进行还原烷基化处理。

在此我们展示了在X500B QTOF高分辨质谱系统上, 结合使用BioPharmaView™软件的简单、快速和准确的数据处理功能, 确定蛋白序列突变及复杂翻译后修饰。



SCIEX ExionLC™液相和X500B质谱系统

#### 材料与方法

蛋白来自于厂家纯化后的样品, 进行完整蛋白分子量检测时, 样品用流动相A稀释成1 mg/mL, 或者使用PNGase F酶切掉糖链后进行检测。肽图测定时, 蛋白样品使用二硫苏糖醇 (DTT) 和碘乙酰胺 (IAA) 进行还原烷基化处理后, 用胰蛋白酶进行酶解, 使用IDA模式采集数据。

使用ExionLC™液相和X500B质谱系统进行LC-MS/MS检测, 连接 Waters Acquity UPLC® Protein BEH C18 色谱柱 (130A 1.7 μm, 2.1 mm×50 mm) 进行分离, 柱温 40°C。流动相为, A:水 + 0.1%甲酸, B:乙腈 + 0.1%甲酸。

#### 液相色谱条件:

完整蛋白分子量检测条件:

Time (min)	A (%)	B (%)
0	80	20
4	80	20
15	50	50
15.5	20	80
20	20	80
20.5	80	20
25	80	20

流速: 0.2 mL/min

肽图检测条件:

Time (min)	A (%)	B (%)
0	98	2
25	75	25
35	45	55
35.5	20	80
40	20	80
40.5	80	2
45	80	2

流速: 0.3 mL/min

### 质谱条件:

Source Parameters	
Curtain Gas(CUR)	30psi
Collision Gas(CAD)	7psi
IonSpray Voltage(IS)	5500v
Temperature(TEM)	550 °C
Declustering Potential(DP)	150v
Ion Source Gas(GS1)	55psi
Ion Source Gas(GS2)	55psi

完整蛋白分子量检测时, 采用TOFMS扫描, 范围设置为600-3000 m/z; 肽图检测时, 采用IDA模式, TOFMS扫描范围设置为200-2000 m/z, TOFMSMS扫描范围设置为100-2000 m/z, 采用Dynamic CE模式, CES设置为5。

### 数据处理

数据在OS软件和BioPharmaView™软件中进行处理。

### 结果与讨论

对样品进行完整分子量和肽图检测, 未去糖和去糖的情况下, 蛋白序列覆盖度均未能达到100% (图1), 并且去卷积后得到的分子量和蛋白的理论分子量相差很大 (图2)。

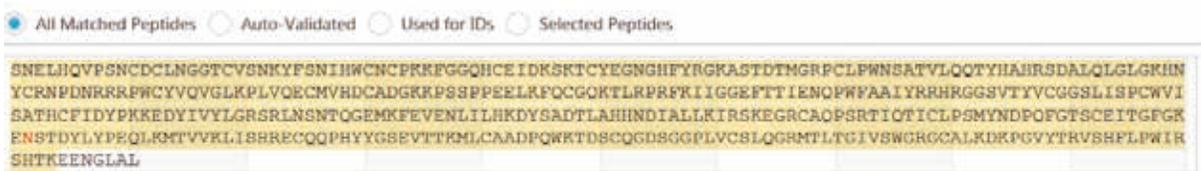


图1. 蛋白序列覆盖度未达到100%。

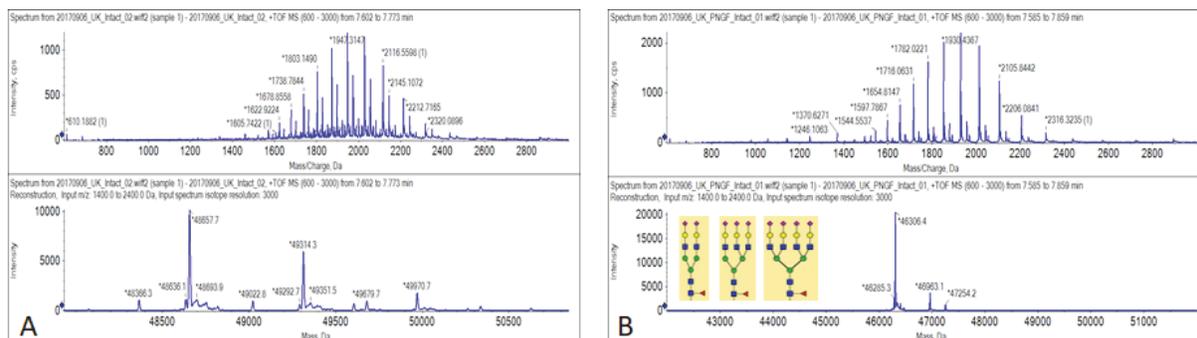


图2. 未去糖 (A) 和去糖 (B) 的蛋白分子量。

对肽图的结果进行分析，根据一级和二级谱图的结果，首先确认蛋白的末端序列应该是EENGL（图3），而不是EENGLAL，但是使用这一序列进行匹配分子量和蛋白理论分子量仍有差距，推测蛋白中应该还存在未发现的其他变化，如序列突变或者翻译后修饰等。

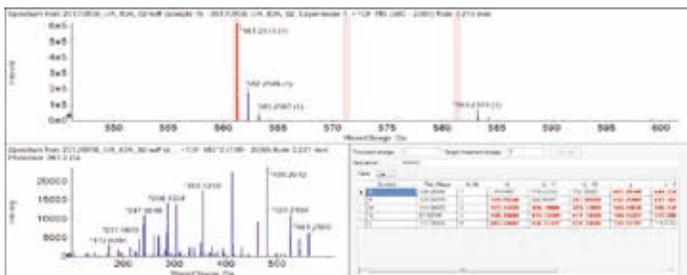


图3. 确认蛋白的末端序列。

进一步分析肽图的结果，发现N端序列SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNK虽然能够覆盖到（图5），但是在这一肽段的同一保留时间处，有另外一条肽段的信号强度更高（图4），根据一级和二级谱图，可以确认肽段上的第9位丝氨酸上发生了O-糖基化修饰（dHex），两者相比较，未发生O-糖基化修饰的肽段的量只有发生O-糖基化修饰的肽段量的5.56%，说明发生糖基化的蛋白是样品中的主要成分，最终可以确认蛋白N端序列为SNELHQVPS[dHex]NC[CAM]DC[CAM]LNGGTC[CAM]VSNK。

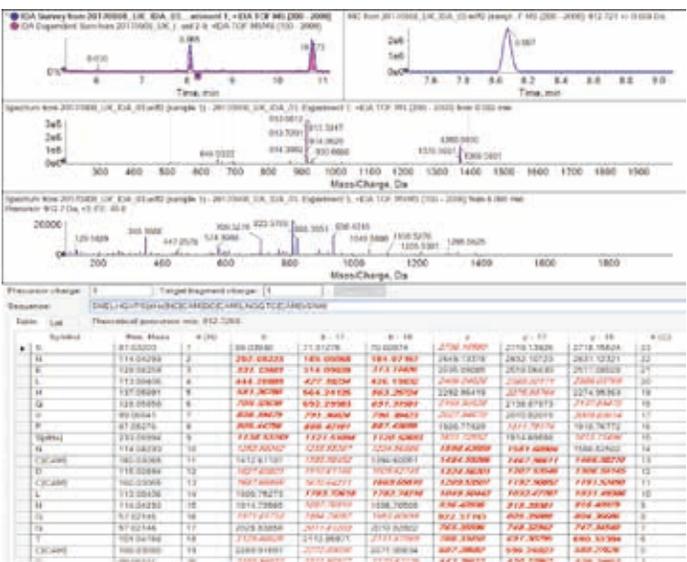


图4. 最终确定蛋白的N端序列。



图5. 蛋白理论上的N端序列。

使用最终确定的蛋白序列进行完整分子量和肽图分析，蛋白的分子量完全匹配（图6），序列覆盖度达到100%（图7）。

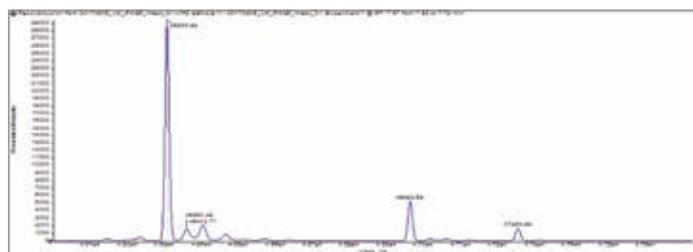


图6. 最终确定的蛋白分子量。

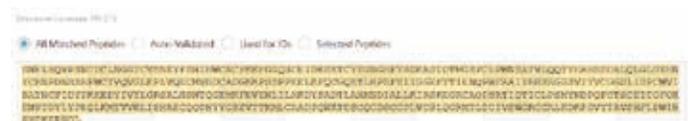


图7. 蛋白序列覆盖度达到100%。

## 结论

在进行生物药表征分析时，由于蛋白的异质性，可能会影响实验结果，如完整分子量、序列覆盖度等。因此在分析时，要结合完整分子量和肽图检测，综合考虑蛋白可能发生的变化，如序列的变异和翻译后修饰等，特别是糖基化修饰（包括N-糖基化修饰和O-糖基化修饰）对表征实验的结果有较大的影响，同时还要对各种修饰类型的肽段和蛋白进行相对定量分析，确定样品中的各种成分。

本文介绍了基于X500B QTOF高分辨质谱系统和BioPharmaView™软件的快速准确的数据处理功能，对蛋白样品进行表征分析，肽段序列覆盖度达到100%，发现蛋白末端序列存在氨基酸缺失，N端序列发生了O-糖基化修饰，为准确测定蛋白药物的完整分子量和序列提供了完整的解决方案。

## 参考文献

1. K. Pohl; A. Boudreau and A. Uppal. BioPharmaView™ Software as a Robust Tool for Automated Quantitation of Oxidation Sites in Monoclonal Antibody Characterization. SCIEX Technical Note:RUO-MKT-02-6379-A.
2. N-and O-Glycosylation Analysis of Etanercept Using Liquid Chromatography and Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Equipped with Electron-Transfer Dissociation Functionality. Anal. Chem. 2014, 86, 576-584
3. S. Heidelberger and S. McCarthy. Routine workflow for comparability assessment of protein biopharmaceuticals Trastuzumab. SCIEX Technical Note: RUO-MKT-02-5590-A.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。

获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅 <https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。

本文提及的商标和/或注册商标的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。AB SCIEX™ 商标经许可使用。

© 2019 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-10610-ZH-B



### SCIEX中国公司

#### 北京分公司

地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层

电话：010-5808 1388

传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

#### 上海公司及中国区应用支持中心

地址：上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室

电话：021-2419 7200

传真：021-2419 7333

网址：sciex.com.cn

#### 广州分公司

地址：广州市天河区珠江江西路15号  
珠江城1907室

电话：020-8510 0200

传真：020-3876 0835

官方微信：ABSciex-China