

CESI-MS/MS和NanoLC-MS/MS技术对促红细胞生成素糖肽的分析

Analysis of Glycopeptides in Erythropoietin by CESI-MS/MS and NanoLC-MS/MS Techniques

王文涛¹, 赵颖华¹, 陈泓序¹, 肖志良¹, 罗继¹, 刘冰², 李响³

Wang Wentao¹, Zhao Yinghua¹, Chen Hongxu¹, Xiao Zhiliang¹, Luo Ji¹, Liu Bing², Li Xiang³

¹ SCIEX中国, ² 重庆市食品药品检验检测研究院; ³ 中国食品药品检定研究院

¹ SCIEX China; ² Chongqing Institute for Food and Drug Control; ³ National Institutes for Food and Drug Control

Keywords: Erythropoietin; Glycopeptide; CESI-MS/MS; NanoLC-MS/MS;

1. 前言

促红细胞生成素 (EPO) 是一种糖蛋白激素, 可刺激红细胞生成, 是多种贫血病临床治疗的主要药物。EPO同时含有3个N-糖基化位点和1个O-糖基化位点, 糖链约占总分子量的40%, 对其体内的生物活性有较大影响。EPO以其高度的异质性闻名, 因此它的糖基化分析十分具有挑战性。EPO糖基化的分析方法主要为毛细管电泳 (CE)、液相色谱 (LC) 及其与质谱 (MS) 的联用方法, 通过这些方法可对其进行三个水平的分析: 完整糖蛋白、糖肽和糖基水平的分析。完整 EPO 的分析虽然具有样品消耗量少、前处理简单 (不需化学或酶解处理) 等优点, 有效避免了人为因素的干扰, 可以获得比较准确的糖型信息, 但是对质谱仪器和数据解析软件提出了很高的要求。糖基分析为EPO糖基化提供了详细的信息, 除了可以识别EPO分子上存在的特定糖基, 也可获得其准确的结构信息, 但无法获得糖基化位点的信息。相比而言, 对酶切后的样品进行糖肽水平的分析, 能够获得糖基和糖基化位点间的对应关系的信息, 对于EPO糖基化分析具有非常重要的意义。

本文以高糖基化蛋白药物EPO为分析对象, 使用胰蛋白酶进行酶解, 使用无鞘液毛细管电泳质谱联用 (CESI-MS/MS) 和纳升液相色谱质谱联用 (NanoLC-MS/MS) 的检测方法, 从糖肽水平上对EPO的N-糖基化进行分析 (如图1), 并对糖肽的鉴定结果进行了对比。

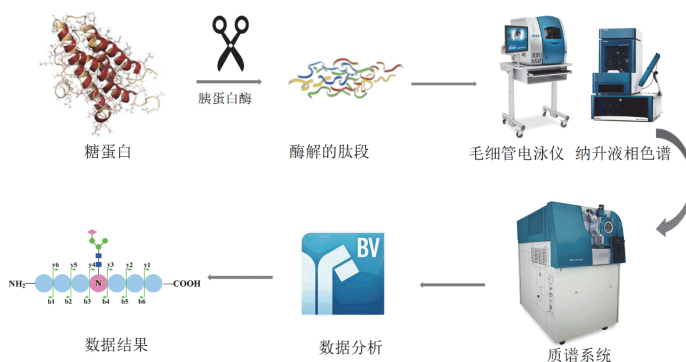


图1. CESI-MS/MS和NanoLC-MS/MS技术对EPO糖肽的分析流程。

2. 仪器与试剂

2.1. 仪器与试剂

CESI 8000 Plus (SCIEX), NanoSpray[®] III离子源 (SCIEX), NanoLC[™] 425 HPLC系统 (SCIEX), YMC C18色谱柱 (150 × 2.1mm, Phenomenex), TripleTOF[®] 5600+ LC-MS/MS系统 (SCIEX, 数据采集软件Analyst[®]软件1.7; 数据处理软件PeakView[®]软件2.2和BioPharmaView[™]软件3.0), OptiMS熔融石英毛细管卡盒 (91 cm × 30 μm ID, SCIEX), 10 K超滤管 (Millipore)。冰醋酸 (HAc, 质谱纯, Sigma-Aldrich公司), 二次去离子水 (Millipore公司), 甲醇 (质谱纯, Merck公司), 甲酸 (质谱纯, Sigma-Aldrich公司), 乙腈 (质谱纯, Sigma-Aldrich公司)。二硫苏糖

醇 (DTT)、盐酸胍、碘乙酰胺 (IAM)，碳酸氢铵均为分析纯试剂，均购自Sigma-Aldrich。背景电解质 (BGE)：10% HAc溶液；导电液 (CL)：10% HAc溶液。胰蛋白酶 (Promega公司)，欧洲药典EPO标准品 (EDQM公司) 均在-20 °C下保存。

OptiMS熔融石英毛细管卡盒初次使用时：用甲醇在100 psi下冲洗毛细管10分钟，然后分别依次用水、0.1 M NaOH、0.1 M HCl和水在100 psi下各冲洗10分钟，最后用BGE在100 psi下冲洗10分钟。在针与针之间依次用0.1 M NaOH、0.1 M HCl和水在100 psi下各冲洗4分钟，最后用BGE在100 psi下冲洗5分钟。

2.2. 样品处理

- 1) 取100 µg EPO蛋白溶液置于10 K超滤管中，用50 mM碳酸氢铵溶液补足体积至60 µL，14000 g离心至见底。

- 2) 加入40 µL 7 M盐酸胍进行变性处理，再加入1 µL 1 M DTT (溶于7 M盐酸胍) 进行还原处理，涡旋震荡后低速离心，之后55 °C 孵育1小时。
- 3) 加入4 µL 1 M IAM (溶于7 M盐酸胍)，涡旋震荡后低速离心，室温避光放置30分钟进行烷基化。之后加入40 µL 50 mM 碳酸氢铵，14000 g离心至见底，重复两次。
- 4) 将超滤管取出置于新的接收管中，加入40 µL 50 mM碳酸氢铵，加入0.2 µg·µL⁻¹的胰蛋白酶25 µL，旋涡震荡后短时离心，密封后放置于37 °C恒温箱中过夜。
- 5) 过夜后离心收集溶液，往超滤管中再加入50 µL水，充分震荡，离心收集溶液，与之前的溶液混合，加入1 µL甲酸终止反应。每50 µL分装一管，抽干备用。

3. 方法设置

3.1. CESI-MS/MS方法

表1. CESI-MS/MS方法设置。

	CESI条件设置	MS条件设置	
CE 类型	CESI 8000 Plus	质谱型号	Triple TOF® 5600+ LC-MS/MS系统
CE 卡盒	OptiMS 熔融石英毛细管卡盒	极性	正离子模式
BGE	10% HAc溶液	雾化气/辅助气	0
导电液	10% HAc溶液	气帘气	5
样品缓冲液	100 mM NH ₄ Ac, pH 4.0溶液	喷雾电压	+1650 V
毛细管温度	25	源温度	50 °C
样品温度	10	一级扫描范围 (m/z)	350-1250
分离条件	30 kV, 45 min with 1.0 psi	一级累计扫描时间	250 ms
进样	压力进样: 5 psi 60 s	候选离子	20
		二级扫描范围 (m/z)	100-1500
		二级累计扫描时间	50 ms
		去簇电压	100
		碰撞能量 (Rolling CE)	True

3.2. NanoLC-MS/MS方法

表2. NanoLC-MS/MS方法设置。

LC条件设置		MS条件设置	
LC 型号	NanoLC™ 425 HPLC系统	质谱型号	TripleTOF® 5600+ LC-MS/MS系统
色谱柱	YMC C18 色谱柱	极性	正离子模式检测
A相	98% Water/0.1% Formic Acid	雾化气	15
B相	98% Acetonitrile/0.1% Formic Acid	辅助气	20
进样温度	4 °C	气帘气	30
柱温	30 °C	喷雾电压	5500 V
流速	Loading: 10µl/min, gradient: 5µl/min	源温度	300 °C
分离时间	45 min	一级扫描范围 (m/z)	350-1250
时间	梯度 (B相%)	一级累计时间	250 ms
0	5	候选离子	20
2	12	二级扫描范围 (m/z)	100-1500
30	35	二级累计时间	50 ms
31	80	去簇电压	100
38	80	碰撞能量 (Rolling CE)	True
39	5		
45	5		

4. 结果与讨论

4.1. BiopharmaView™ 软件3.0数据检索

采用BiopharmaView™软件3.0进行糖肽的谱图解析，首先将EPO的氨基酸序列导入软件，将N-糖基修饰作为预设蛋白翻译后修饰来定义EPO蛋白的修饰信息，同时配带好EPO的二硫键信息。在软件中选择IAM进行半胱氨酸烷基化处理，胰蛋白酶酶解，在还原状态下产生EPO胰蛋白酶酶解后的理论肽段信息。将采集得到的原始数据（wiff 格式）导入到BiopharmaView™软件3.0中，进行自动搜库，通过肽段质量数可确定EPO的糖肽信息，并给出具体的糖型和糖基化位点信息。

4.2. CESI-MS/MS和NanoLC-MS/MS方法对EPO糖肽的分析

NanoLC-MS/MS技术是蛋白药肽段分析的常用方法之一，目前以使用反向色谱柱（C18）居多，适合于非极性肽段的分析。CESI-MS/MS方法是另外一种进行肽段分析的方法，主要根据电荷/体积比的差异进行分离，对极性肽段表现了较佳的分离效果，可

为糖肽的分析提供新的方法。本文中，利用胰蛋白酶对EPO进行酶解，使用CESI-MS/MS和NanoLC-MS/MS方法对EPO的酶解产物进行分析，采用BiopharmaView™ 软件3.0对其结果进行解析。如图2所示，CESI-MS/MS方法可以单独鉴定出32条糖肽，NanoLC-MS/MS方法可以单独鉴定到42条糖肽；通过两种方法结合使用，共鉴定到86条糖肽，共涉及到58种糖基。该结果充分证明，CESI-MS/MS方法与NanoLC-MS/MS方法之间具有很好的互补性，可以鉴定到更多的糖肽信息。

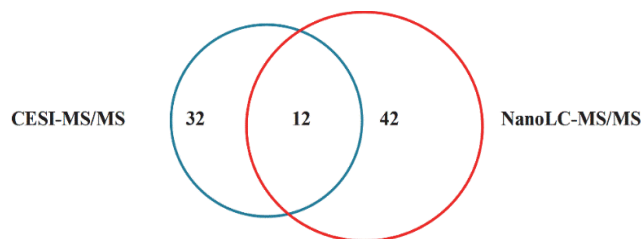


图2. CESI-MS/MS和NanoLC-MS/MS技术鉴定到的糖肽数目比较。

为了更好地分析CESI-MS/MS和NanoLC-MS/MS技术对蛋白药糖肽分析的差别，本文选取了4条氨基酸序列相同但糖基修饰不同的糖肽（详见表3）对两种分析方法的分离效果进行了比较。如图3A、3C所示，这4条糖肽在反相色谱柱上的保留时间相近，分离效果较差；而利用CESI-MS/MS方法进行分析时，4条糖肽的迁移时

间相差较大，具有更好的分离效果（如图3B、3D）。此外，CESI-MS/MS方法可以得到更好的峰型，从而更加有利于糖肽的准确定量。这主要是由于糖基的修饰导致肽段极性增强，更有助于CE方法进行分离。

表3. CESI-MS/MS和NanoLC-MS/MS方法对4种糖肽的鉴定信息。

序号	肽段序列	糖基	糖基结构	糖肽理论分子量 (Da)	糖肽实测分子量(Da)		时间 (min)	
					CESI-MS/MS	NanoLC-MS/MS	CESI-MS/MS	NanoLC-MS/MS
NO.1	GQALLVNSSQPWEPLQLHVDK	FA3G3S1		4787.12944	4787.16032	4787.09296	24.02026	17.78306
NO.2		FA3G3S3		5370.32755	5369.34108	5370.31135	26.14864	18.22461
NO.3		FA4G4Lac1S4		6392.69460	6392.74068	6392.68926	27.00404	17.55979
NO.4		FA4G4S2		5444.36430	5443.38648	5444.36940	24.64285	17.77313

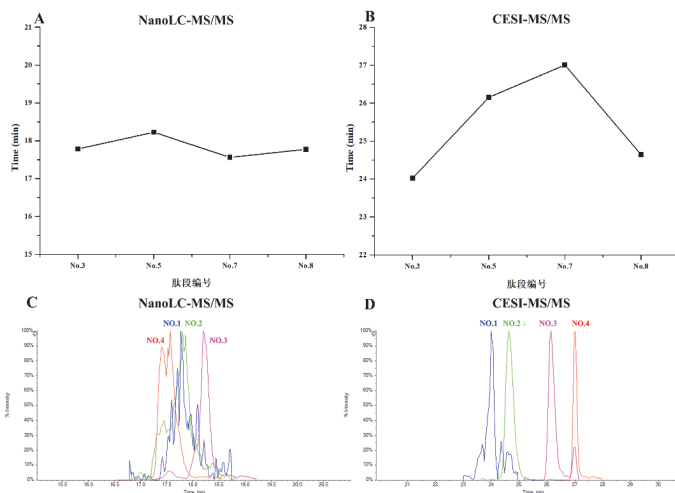


图3. 4种糖肽在CESI-MS/MS和NanoLC-MS/MS方法中的结果比较。保留/迁移时间比较（图3A、3B）；MS中提取离子流图比较（图3C、3D）。

此外，对CESI-MS/MS与NanoLC-MS/MS所鉴定到的糖肽分子量分布进行了比较，如图4所示，CESI-MS/MS方法鉴定到的糖肽质量范围为4500~10000 Da，NanoLC-MS/MS方法鉴定到的糖肽质量范围为4500~7500 Da。通过两种方法的对比结果可以发现，CESI-MS/MS方法鉴定出的糖肽分子量范围更宽。对于高分子量的糖肽，在NanoLC-MS/MS方法中未鉴定到，但可以在CESI-MS/MS方法中得以成功鉴定。这主要是由于长肽段在反向色谱柱上不易被洗脱下来，从而导致分析效果欠佳。相比而言，CE-MS/MS方法无需使用固定相，不存在样品残留，有效促进了糖肽的分离。

5. 结论

本文利用胰蛋白酶对EPO进行酶解，采用CESI-MS/MS和NanoLC-MS/MS方法对EPO的糖肽进行了深入分析。CESI-MS/MS方法主要依据不同糖肽的电荷与体积比差异进行分离，NanoLC-MS/MS方法则主要依据不同糖肽的疏水性进行分析。通过两种技术的

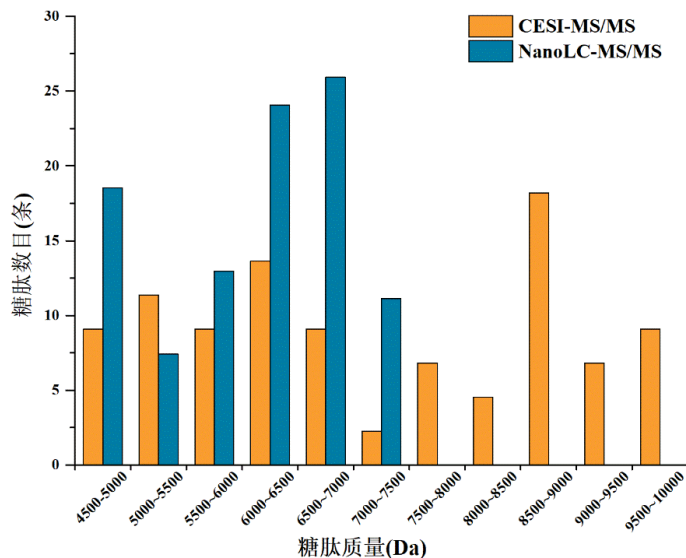


图4. CESI-MS/MS和NanoLC-MS/MS方法所鉴定的糖肽分子量分布。

有效结合，有助于提高糖肽鉴定的数目，加深对EPO糖基化的研究。对于选定的4条糖肽来说，其氨基酸序列完全相同的，仅在糖基修饰方面存在差别，CESI-MS/MS方法表现了更优异的分离效果，并获得了更好的峰型，从而更加有助于糖肽的准确定量。此外，CESI-MS/MS方法鉴定出的糖肽分子量范围更宽。结果充分证明，CESI-MS/MS技术结合了CE对极性化合物高分离效率的优势，在蛋白药糖肽分析方面是NanoLC-MS/MS极佳的互补工具，为糖蛋白在糖肽水平的全面表征和准确定量提供了互补的解决方案。

更多详细信息，可参考：

CESI-MS/MS和NanoLC-MS/MS技术对促红细胞生成素中糖肽的分析，药物分析杂志。

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。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-11894-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
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
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
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
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)