

使用高分辨质谱ZenoTOF® 7600系统对降纤酶进行结构表征

Structural Characterization of Defibrinase using ZenoTOF® 7600 system

胡龙龙, 罗继, 陈泓序, 郭立海
Hu Longlong, Luo Ji, Chen Hongxu, Guo Lihai
SCIEX应用支持中心, 中国
SCIEX, China

Key words: ZenoTOF® 7600, 降纤酶, 分子量, 序列变异

前言:

降纤酶是一种具有抗凝血、溶血栓、止血等功效的类凝血酶¹, 最早由中科院昆明动物研究所在20世纪80年代从尖吻蝮蛇毒中提取², 临床上被广泛用于治疗短暂性脑缺血发作、脑梗死、脑栓塞等心脑血管疾病。目前, 制备降纤酶的主流方法还是利用各种色谱分离技术从蛇毒中提取分离³。通过对目前市面上降纤酶的质量研究, 发现不同厂商降纤酶的序列结构存在差异。因此, 为系统了解降纤酶结构与生物活性之间的关系, 便于更安全的临床应用, 有必要精准解析降纤酶的结构和序列变异情况。

近些年, 质谱技术在生物药领域应用广泛, 其在解析蛋白翻译后修饰方面的突出作用既可以了解蛋白结构对功能的影响, 还能推动改进生产工艺, 有助于在早期阶段指导生物药的开发。基于此, 本文以SCIEX高分辨质谱 ZenoTOF® 7600系统采集数据, 结合SCIEX Biologics Explorer软件的流程式分析, 对降纤酶结构进行表征, 通过分析降纤酶的分子量和序列变异情况, 旨在为降纤酶的质量研究提供数据支撑, 从而更好的指导临床用药。

样品信息:

降纤酶样品序列:

MVLIRVLANLILQLSYAQKSELVIGGVECDINEHRFLVALYELTSMFTLCG
GTLINQEWVTAHCDRLQLYLIGMHDKYVKFDDEQGREPIEKYFYNCNNLT
TRDKDIMLIRLDRPVDNSTHIAPLSLPSRPPSVGSVCRVMGWGAISSRDVLPD
VPHCVNINLVNNAECRRAYPRLPATSRITLCAGVMQGGIDSCNRDSSGGPLICDG
QFQGVNWGNGPCAQPNMPALYTKVYDYNWIRSITAGNTTAACPP

降纤酶样品, 分别进行脱糖和Trypsin酶切处理, 用于分子量和肽图分析。

色谱方法:

分子量测定条件: 使用ExionLC AD系统, 色谱柱为ACQUITY UPLC® BEH SEC柱, 1.7 μm, 4.6 × 150mm。流动相A: 水, 0.1%甲酸; 流动相B: 乙腈, 0.1%甲酸。流速为0.22 mL/min, 柱温: 40°C; 进样量: 1 μL。

表1. 降纤酶完整分子量测定的液相梯度

Time [min]	Flow [mL/min]	B.Conc [%]
initial	0.22	35
10.00	0.22	35

肽图测定条件: 使用ExionLC AD系统, 色谱柱为ACQUITY UPLC® BEH C18柱, 1.7 μm, 2.1x100mm。流动相A: 2%乙腈/水, 0.1%甲酸; 流动相B: 98%乙腈/水, 0.1%甲酸。流速为0.5 mL/min, 柱温: 40°C; 进样量: 1 μL。

表2. 降纤酶肽图测定的液相梯度

Time [min]	Flow [mL/min]	B.Conc [%]
initial	0.50	2
1.00	0.50	2
40.00	0.50	28
50.00	0.50	55
50.50	0.50	85
55.00	0.50	85
60.00	0.50	2

质谱方法:

分子量测定条件: 使用SCIEX ZenoTOF® 7600系统采集数据, 源气参数如下: 喷雾气: 55 psi, 辅助加热气: 25 psi, 气帘气: 35 psi, 离子源温度: 550°C, 离子源电压: 5500 V, 碰撞气: 55 psi, 去簇电压: 120 V。采集模式: TOF MS, 一级扫描范围600-4000。

肽图测定条件: 使用SCIEX ZenoTOF® 7600系统采集数据, 源气参数如下: 喷雾气: 55 psi, 气帘气: 35 psi, 离子源温度: 550°C, 离子源电压: 5500 V, 碰撞气: 55 psi, 去簇电压: 100 V。采集模式: TOF MS, 一级扫描范围200-2000, 一级累积时间0.25 s。

数据处理:

SCIEX ZenoTOF® 7600系统采集的原始数据, 上传至SCIEX Biologics Explorer软件, 进行完整分子量和肽图分析。

降纤酶分子量分析结果:

使用SCIEX ZenoTOF® 7600系统TOF MS模式采集样品, TIC图显示样品在3.5-4.5 min之间出峰, 提取XIC图发现样品有多个片段峰, 主要是分子量为26091Da和26119Da的片段(图1)。

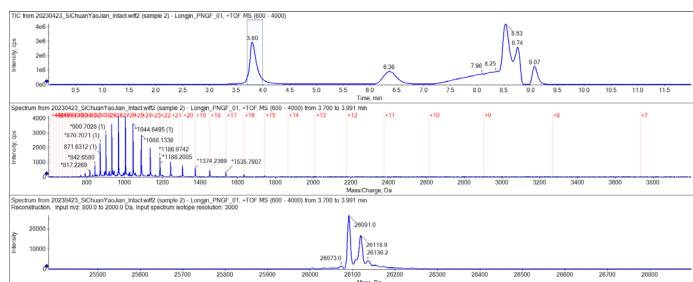


图1. 降纤酶的一级质谱图以及解卷积之后的完整分子量分布图

使用SCIEX Biologics Explorer软件, 选择Inact_AutomatedDeconvolution_MS模式, 上传原始数据, 分析样品去N糖后的完整分子量。分析结果显示, 样品中含有两个最显著的片段, 26090.8Da和26118.8Da。在输入理论完整序列的情况下, 通过软件对一级分子量图谱进行比对, 26118.8Da片段能匹配到25-260位的理论蛋白序列, 而主峰26090.8Da则与理论序列匹配不上(图2), 推测主峰26090.8Da可能是理论序列突变的结果, 需要进一步通过序列变异分析进行确定。

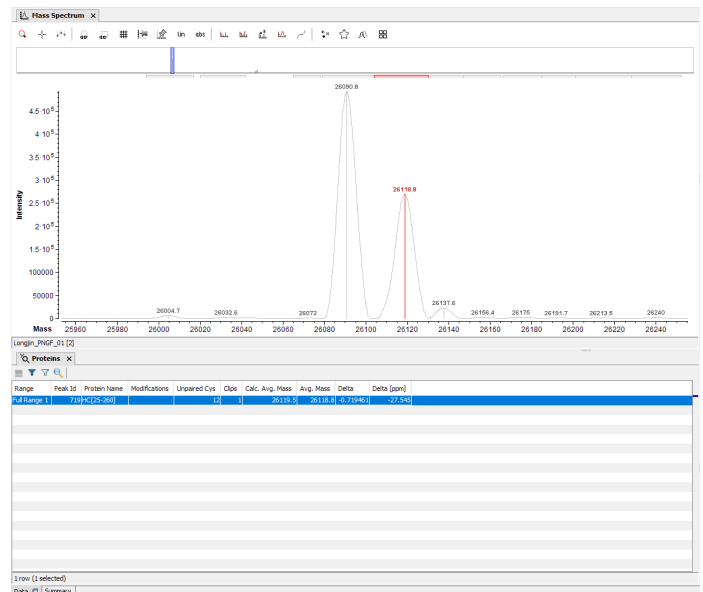


图2. SCIEX Biologics Explorer软件分析样品的完整分子量

肽图分析结果:

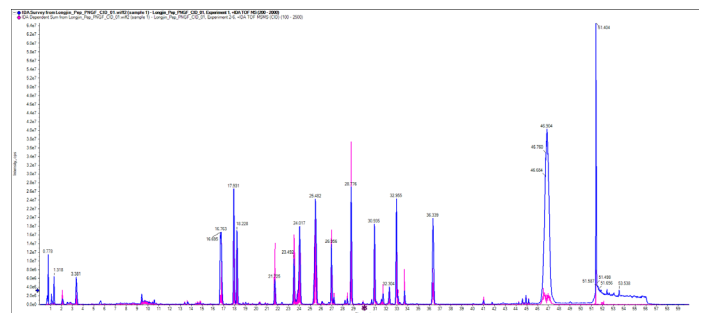


图3. 样品的肽图图谱

分析降纤酶的肽图, TIC显示肽段在60 min的有效梯度内得到很好的分离(图3)。使用SCIEX Biologics Explorer软件, 选择Pep-map_Simple模式, 上传原始数据, 进行序列比对分析。在输入理论完整序列的情况下, 通过软件对MSMS图谱进行比对, 同样匹配到25-260位的蛋白序列, 这点与依据完整分子量结果做出的推断完全一致。按理论序列进行序列覆盖分析, C末端部分序列未覆盖(图4), 推测是样品发生了序列变异。



图4. 样品的序列覆盖分析

为了分析样品中的变异序列，开启SCIEX Biologics Explorer软件的序列变异检索功能，进一步分析样本序列。鉴定到样品中一些多肽发生了序列变异（表1），其中序列1和序列2发生了精氨酸（R）和谷氨酰胺（Q）的变异，对两段多肽进行定性及相对量比较分析，发现样品中突变的多肽占了绝大多数（图5）。除此之外，还有其他序列发生了相应的变异，例如序列3和序列4，不过根据定性及定量分析，这些多肽的突变只占了一半左右（图5）。

表1. 降纤酶样品的主要序列变异列表

变异序列	突变前	突变后	比例(%)
DSGGPLICDGGQFQGVNWWGGNPCAQPNM	Q	R	98.2
PALYTK	R	Q	99.9
VYDNDWIRSITAGNTTAACPP	R	Q	99.9
LDRPVDNSTHIAPLSLPSRPPSVGVSVC	R	N	62.1
VMGWGAISPSR	V	I	64.2

根据样品的序列变异信息，尝试将这些肽段层面的序列变异整合到完整蛋白水平寻找其对应关系。例如，在完整蛋白层面，片段峰26118.8Da与主峰26090.8Da的分子量相差28 Da，在序列1中绝大部分Q突变为R，分子量增加28Da，而序列2中绝大部分R又突变为

Q分子量又减少28Da，这两部分高比例的突变使得分子量基本保持不变。但序列3中，R突变为N分子量减少42Da，序列4中V突变为I，分子量增加14Da，这两部分突变比例大概都为60%，抵消后使得蛋白的分子量的减少了28Da，推测这些突变是主峰26090.8Da形成的原因。虽然其他序列的突变对完整分子量也会影响，但考虑到以上序列变异的比率及主峰与片段峰的比例关系，可将其看作是影响最显著的变异修饰。总之，不同修饰引起的序列变异都会影响降纤酶的完整分子量，完整分子量的形成是多种序列变异的综合结果。本研究中，得益于SCIEX ZenoTOF® 7600系统的高分辨扫描，可精准快速的鉴定降纤酶的分子量和肽图，结合SCIEX Biologics Explorer软件，并高效的捕获其序列变异情况，进而完成对降纤酶样品的结构表征。

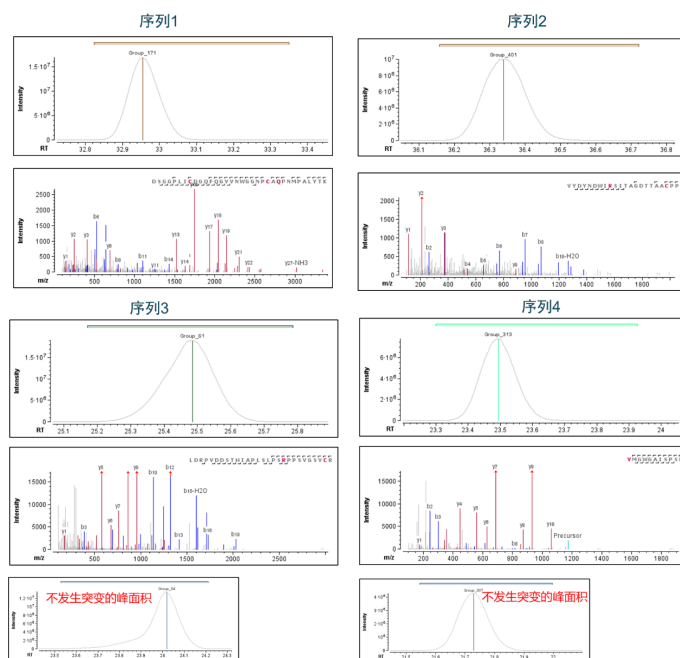


图5. 多肽变异序列1-4的定性及相对量比较分析

总结：

1. SCIEX ZenoTOF® 7600系统对降纤酶样品进行采集，设定不同的扫描范围可以保证采集完整分子量和肽图数据的高质量和精准度。
2. 使用SCIEX Biologics Explorer软件可以高效的表征降纤酶的完整分子量和氨基酸修饰，通过与理论序列对比，确定样品的序列信息。

3. 借助SCIEX Biologics Explorer软件的序列变异功能，对多肽序列进行了定性及相对量比较分析，高效的鉴定了多个变异序列。
4. 结合降纤酶的理论序列及序列变异分析，可解释完整分子量中主峰及其他片段峰形成的原因。

参考文献：

1. Cooperative Group for Reassessment of Defibrase. Reassessment of defibrase in treatment of acute cerebral infarction: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Chin Med Sci J. 2005 Sep;20(3):151-8. PMID: 16261883.
2. 李炎，林涛，王叔桥等. 降纤酶质量研究[J]. 中国药师, 2015, 18(10): 1695-1700.
3. 罗晓清，杨化新，金少鸿. 降纤酶研究进展[J]. 中国药事, 2008(11): 1008-1013.

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，也包括相关的标识、标志的所有权，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。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15815-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：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)