

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¹, 罗继¹, 郭立海¹

Lv Xiaolei¹, Luo Ji¹, Guo Lihai¹

¹ 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)。

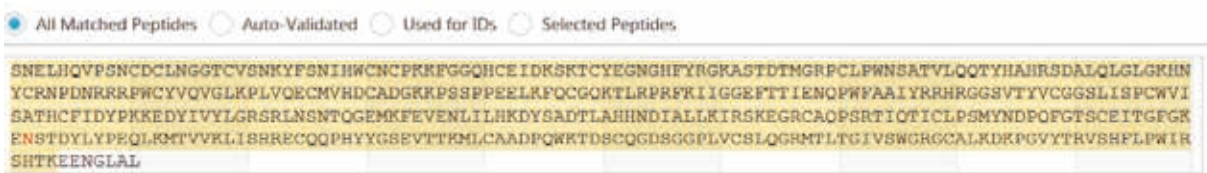


图1. 蛋白序列覆盖度未达到100%。

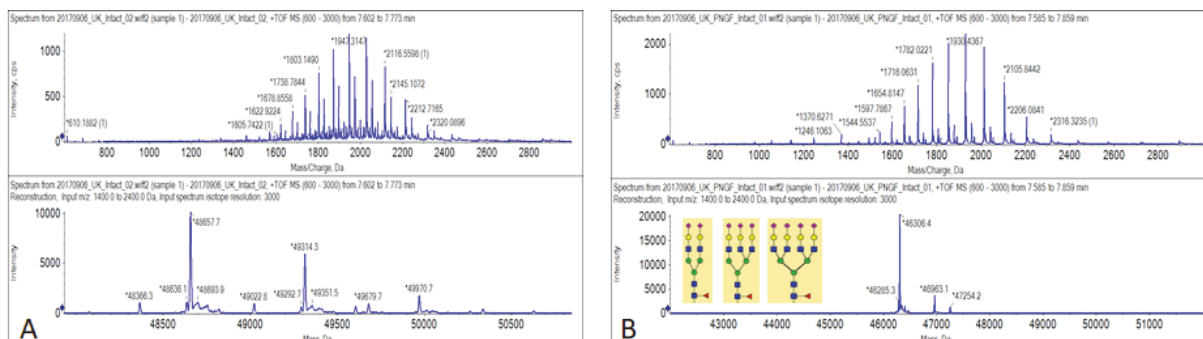


图2. 未去糖 (A) 和去糖 (B) 的蛋白分子量。

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。

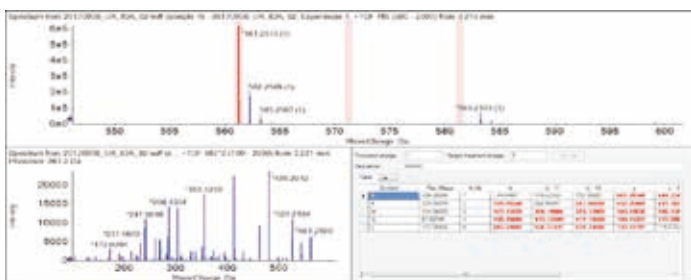


图3. 确认蛋白的末端序列。

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。

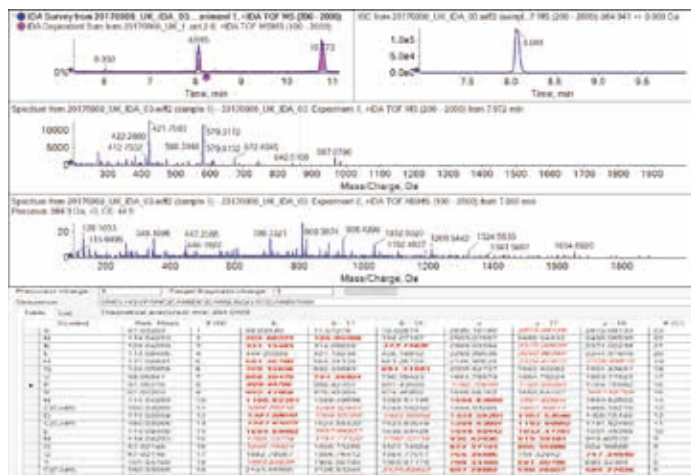


图5. 蛋白理论上的N端序列。

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）。

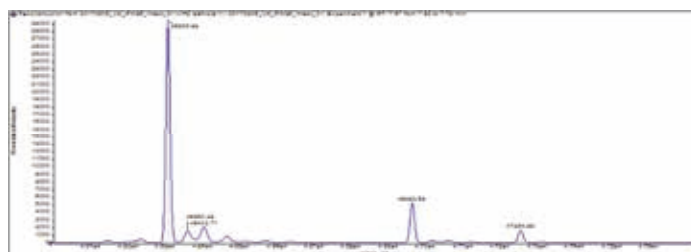


图6. 最终确定的蛋白分子量。



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各种变化，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

官方微信：ABSciex-China

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