[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

利用HILIC UPLC/FLR/QTof MS进行重组凝血IX因子和血浆提取IX因子的N-糖分析

Ying Qing Yu
沃特世公司，美国马萨诸塞州米尔福德

应用优势

HILIC UPLC/FLR/QTof MS适用于对复杂糖基化蛋白样品进行分析的强有力工具。传统的HPLC方法分离度能力差且灵敏度低，而且需要将每个色谱峰进行馏分收集后才可进行后续的质谱分析。ACQUITY UPLC-Xevo QTof MS联用完全克服了这些问题，可以直接得到糖结构的信息。SimGlycan软件是系统解决方案的一个组成部分，它用来处理和解析碰撞碎片数据，是Glycan结构鉴定的一个工具。

沃特世方案

ACQUITY UPLC® 系统

ACQUITY UPLC 荧光检测器

ACQUITY UPLC BEH Glycan 分析专用色谱柱

Xevo ® QTof MS,

SimGlycan (Premier Biosoft)

关键词

Glycan，重组IX因子蛋白(rFIX)，源于血浆的IX因子蛋白(pd-FIX)，2-氨基苯甲酰胺(2AB)，唾液酸，结构鉴定

引言

分析治疗性蛋白质药物的糖基化非常重要，因为糖基化是影响蛋白质药物临床效果的关键因素。本应用报告研究了用于治疗B型血友病的两种凝血IX因子的生物制剂中的N-糖；一个是重组技术药物(rFIX, BeneFIX)，另一个源于人血浆(pd-FIX，凝血因子IX粉针剂)。这两种IX因子蛋白药物都是严重糖基化的蛋白质(图1)[1]。以前对其糖型的研究主要是采用正交HPLC分离技术的，由于IX因子糖基化非常复杂，通常都会采用离子交换色谱(IEX)和亲水相互作用(HILIC)模式。如果需要进行质谱分析和结构鉴定，通常需要将感兴趣的LC色谱峰进行收集，然后通过质谱(MS)进行离线分析。

沃特世开发了一种基于HILIC UPLC®/FLR/QTof MS(亲水相互作用色谱 UPLC/荧光检测/QTof质谱检测)方法对荧光标记的聚糖进行分析鉴定的平台，显著改善了蛋白质糖基化研究的效果，具有最高的分辨率(即使位置异构体的Glycan也能达到基线分离)、分析速度更快、灵敏度也更高，同时对于含量低的Glycan也能够准确分析。同时，ACQUITY UPLC系统与Xevo QTof MS在线联用，无需组分收集即可同时获得质谱数据。本应用报告即为利用该平台进行重组凝血九因子与血浆来源的凝血九因子Glycan的比较研究。

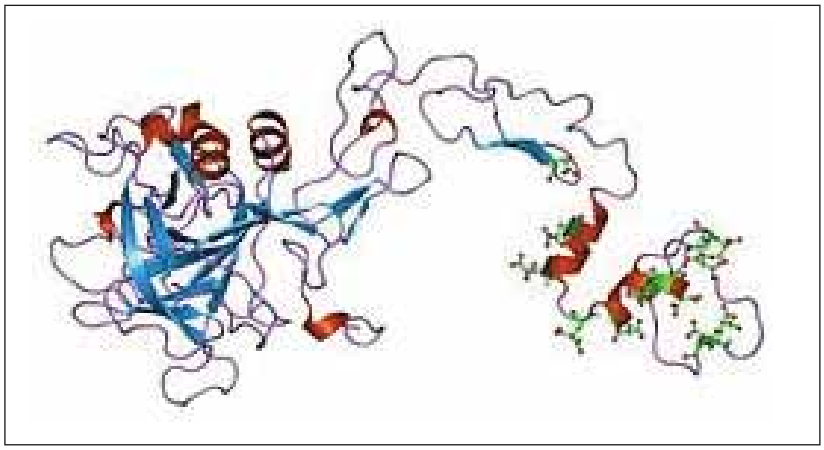


图1. 凝血IX因子结构。

实验条件

样本

图2显示了Glycan分析的基本流程。首先使用DTT和IAM对凝血IX因子样品进行还原和烷基化处理，然后用PNGase F酶水解过夜以释放Glycan；酶切后的样品混合物通过HILIC固相萃取提取和富集Glycan，然后用2-氨基苯甲酰胺(2-AB)对Glycan进行标记，再用HILIC固相萃取法去除过量的衍生试剂[2]。

LC 条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC
检测器:	ACQUITY UPLC FLR
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEHGlycan分析专用色谱柱(2.1 x 150毫米)
柱温:	60 °C
样品温度:	10 °C
进样量:	5 µL
流速:	0.4 mL/min
流动相A:	100 mM甲酸铵 (~ pH 4.3)
流动相B:	乙腈(费舍尔最优级)

梯度表

时间(分钟)	流速	%A	%B	梯度曲线
初值	0.400	39.0	70.0	
60.00	0.400	50.0	50.0	6
60.10	0.250	95.0	5.0	6
63.00	0.250	95.0	5.0	6
64.00	0.300	30.0	70.0	6
65.00	0.400	30.0	70.0	6
72.00	0.400	30.0	70.0	6

质谱条件

质谱系统:	Xevo QTOF MS
电离模式:	ESI正离子
毛细管电压:	3200伏
锥孔电压:	30伏
脱溶剂气温度:	350 °C
脱溶剂气体流速:	800 L/h
源温度:	100 °C
采集范围:	700 ~ 2,000 m/z
碰撞能量:	4伏
Lockmass:	1µg/µL碘化铯(CsI)

软件和数据处理

使用MassLynx 4.1控制仪器、采集数据
SimGlycan v. 2.9 (Premier Biosoft) 进行数据处理

结果与讨论

从图3和图4可以看出，两种凝血九因子的Glycan图谱差异很大。重组九因子rFIX的Glycan大多数为岩藻糖基化的二天线、三天线和四天线复合型Glycan，在某些Glycan中还发现了其它氨基乳糖苷单元。还鉴定出多了一个岩藻糖的甘露糖5和核心N-聚糖(表1)。来源于血浆的九因子pd-FIX的Glycan的非均一性(heterogeneity)更加明显，特别是较大的Glycan。

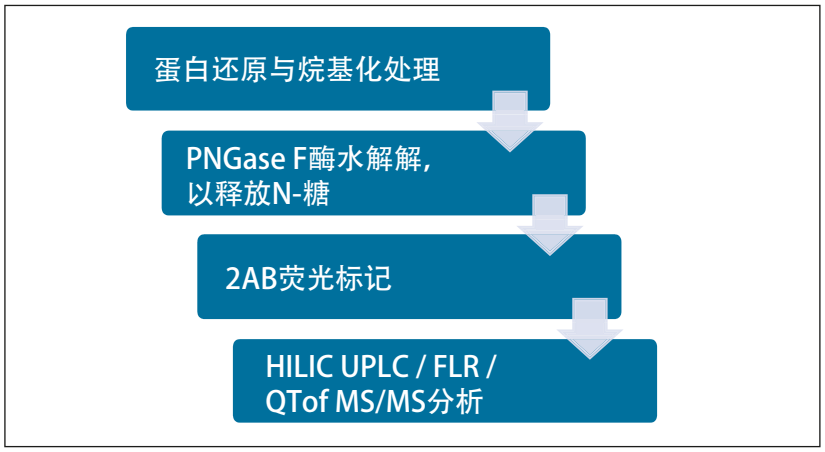


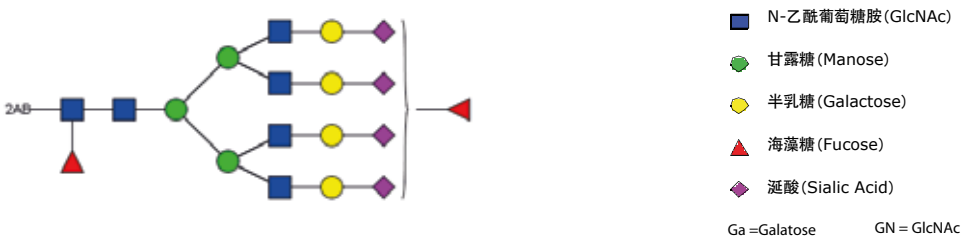
图2. 聚糖分析工作流程。

从pd-FIX中只观察到含有多聚氨基乳糖苷单元的复合型Glycan；岩藻糖基化程度为0~2(见表1)。并且我们观察到了两个尚无文献报道的磺酸化二天线Glycan；同时，这些磺酸化的Glycan与非磺酸化的同种Glycan达到了非常好的分离(见图4)。通过碱性磷酸酶反应，我们排除了磷酸化修饰的可能性(此处数据未显示)。另外，利用MS/MS碎片离子可进一步确认鉴定结果(见图5)。

峰编号	Glycan	rFIX (BeneFIX)	pd-FIX (Mononine)	实测分子量	理论分子量
1	Man3 + 1F	+	—	1176.456	1176.455
2	GOF - GN	+	—	1379.534	1379.534
3	GOF	+	—	1582.612	1582.674
4	Man5	+	—	1354.511	1354.502
5	1A/1F - GN	+	—	1541.587	1541.587
6	2A/1F	+	—	1906.710	1906.719
7	2A/1F + GN	+	—	2109.760	2109.798
8	2A/1F/1S	+	—	2197.816	2197.814
9	3A/1F	+	—	2271.840	2271.850
10	2A/2S	—	+	2342.880	2342.851
11	2A/2S/SO3	—	+	2422.814	2422.808
12	2A/1F/2S	+	+	2488.912	2488.909
13	3A/1F/1S	+	—	2562.924	2563.945
14	2A/1F/2S/SO3	—	+	2568.868	2568.866
15	4A/1F	+	—	2636.962	2637.982
16	3A/1F/2S	+	—	2854.042	2854.042
17	4A/1F/1S	+	—	2928.066	2928.07
18	3A/3S	—	+	2999.112	2999.079
19	3A/1F/3S	+	+	3145.112	3145.137
20	4A/1F/2S	+	—	3219.134	3219.174
21	3A/2F/3S	—	+	3291.188	3291.195
22	4A/1F/3S	+	—	3510.224	3510.269
23	4A/4S	—	+	3655.277	3655.306
24	4A/1F/4S	+	+	3801.358	3801.365
25	4A/1F/3S +(GN+Ga)	+	—	3875.401	3875.402
26	4A/2F/4S	—	+	3947.373	3947.423
27	4A/1F/4S +(GN+Ga)	+	—	4166.418	4166.497
28	4A/1F/3S +2(GN+Ga)	+	—	4240.533	4240.533
29	4A/1F/4S +2(GN+Ga)	+	—	4531.617	4531.629
30	4A/2F/2S + 2(GN+Ga)	—	+	4677.610	4677.687
31	4A/3F/4S + 2(GN+Ga)	—	+	4823.694	4823.745
32	4A/1F/4S + 3(GN+Ga)	+	—	4896.783	4896.761

表1. 在重组九因子rFIX和血浆来源九因子pd-FIX中检测到的2-AB标记Glycan列表。找到了不同程度唾液酸化的复合型Glycan以及Man5和Man3/1F，平均质量误差小于5 ppm。

Glycan命名举例：4A/2F/4S



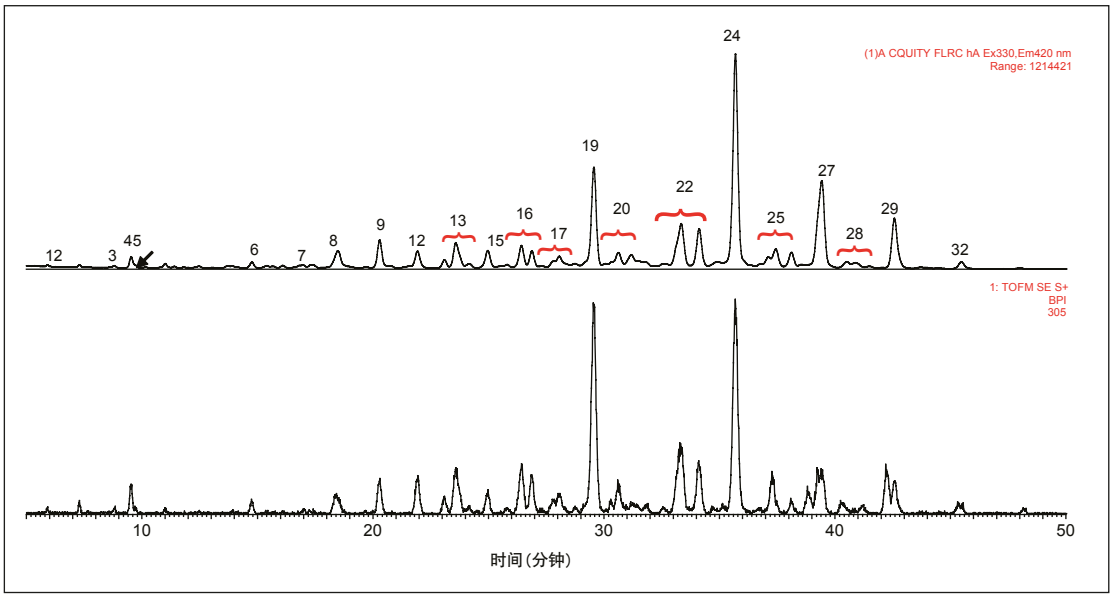


图3. 2AB标记的rFIX (BeneFIX) Glycan的HILIC UPLC/FLR/QTof质谱。通过质谱分析发现并确认了低质量区的低浓度Glycan。另外，还很好地观察到同分异构Glycan(唾液酸位置异构体)。峰编号与表1中所列的Glycan编号是一致的。

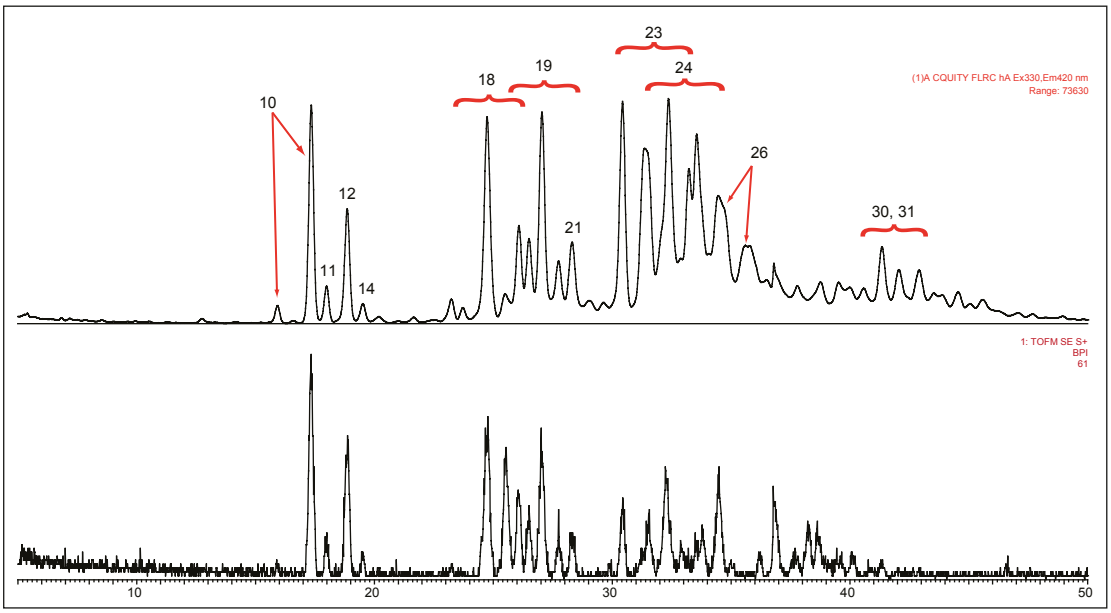


图4. 2AB标记的pd-FIX (Mononine)Glycan的HILIC UPLC/FLR/MS。鉴定了更多的Glycan，如：磺酸化Glycan和复合岩藻糖基化glycan。通过碱性磷酸酶反应，我们排除了磷酸化修饰的可能性(数据未显示)。另外，利用MSMS碎裂信息可进一步确认其鉴定结果(见图书5A-C)。

凝血IX因子的Glycan图谱非常复杂，HPLC法不能提供足够的分离度对各种Glycan进行定性鉴定和定量分析。ACQUITY UPLC系统配合ACQUITY UPLC BEH Glycan分析专用色谱柱能够对不同质量和不同唾液酸化程度的Glycan进行基线分离；同时唾液酸化的Glycan同分异构体也能被很好地分离出来。

Xevo QTof MS精确的质量测量使得Glycan的确认非常可靠。MS/MS碎裂信息配合SimGlycan软件处理可进一步证实Glycan的结构。图6中显示，从rFIX和pd-FIX中都观察到Glycan4A/1F/4S；尽管液相色谱分析中四天线糖的保留时间相同，但CID碎裂信息则告诉我们这些Glycan存在明显的差异，即岩藻糖在Glycan上的位置不同(图5B)。图7显示了如何用CID碎裂信息来区分rFIX和pd-FIX中双重岩藻糖基化Glycan的异构体，与，同样还是用碎片离子的信息来区分岩藻糖的位置。文献中已有报导说岩藻糖位置不同会造成生物学活性不同。

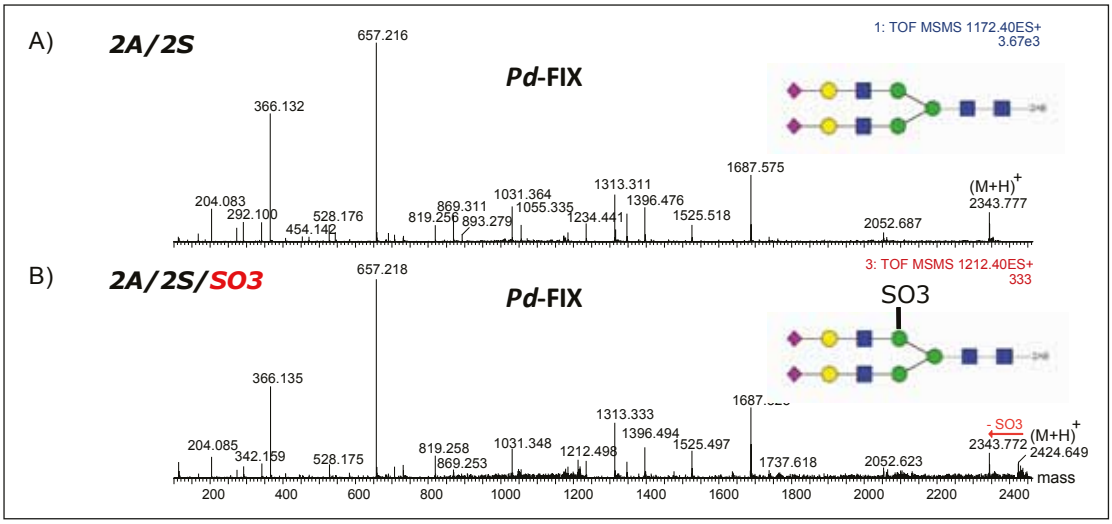


图5. 将磺酸化Glycan (如2A/2S/SO_3) 的MS/MS碎裂信息与未磺酸化的Glycan2A/2S的碎裂信息进行比较，可以看出SO_3 (-80 Da)非常容易碎裂丢失。MS/MS数据经MaxEnt3去卷积化处理后提交到SimGlycan软件进行结构指认，同时SimGlycan软件对提出的结构加以验证。

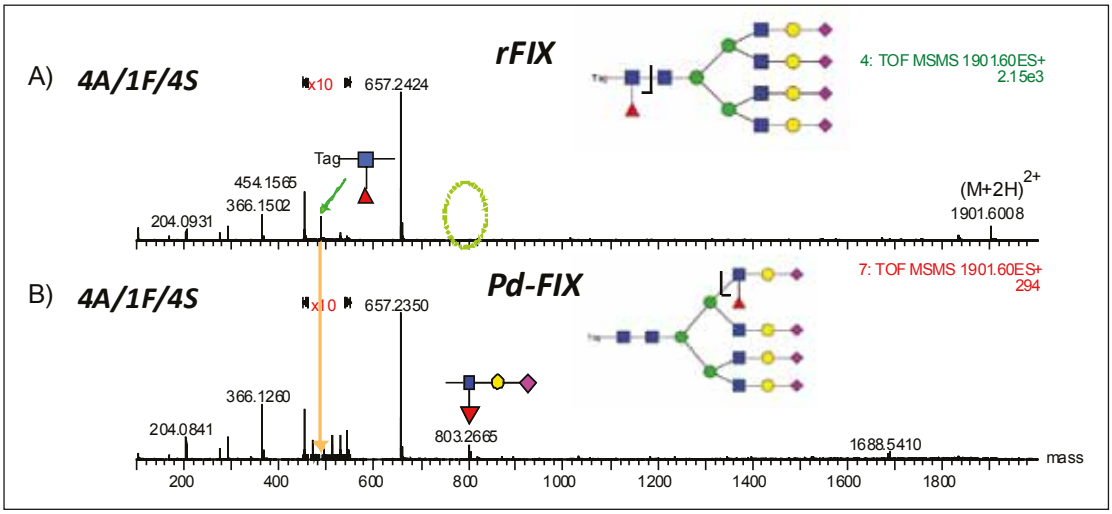


图6. rFIX和pd-FIX中观察到岩藻糖基化程度不同。rFIX中的岩藻糖位于核心结构中的第一个GlcNAc残基；而大多数单一岩藻糖基化pd-FIX聚糖的岩藻糖基化点位于天线分支结构中。m/z 488和803处的碎片离子是确定岩藻糖基化位点的标志性离子。

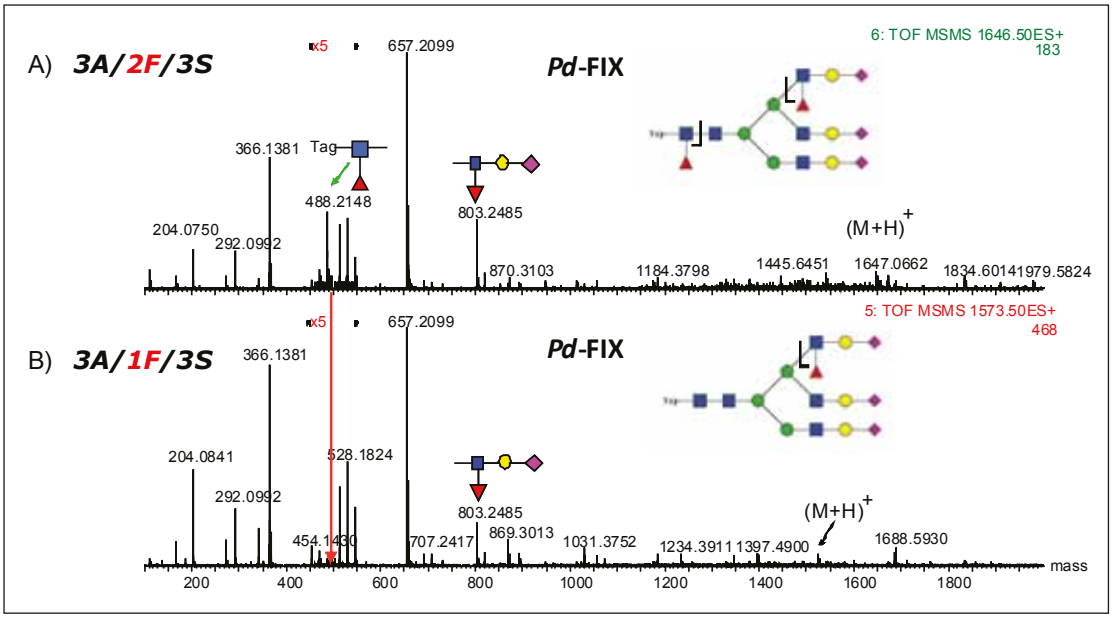


图7. pd-FIX样本中观察到一些双重岩藻糖基化Glycan。在m/z 488和803处观察到两个标志性离子，表明一个岩藻糖位于第一个GlcNAc残基(核心结构)，而另一个位于天线分支结构中。

结论

众所周知，血液蛋白的Glycan具有高度非均一性(heterogeneous)和复杂性，因此对其进行定性和定量分析对生物制药领域的分析科学家是一个巨大的挑战。UPLC/FLR/QTof MS平台是经过充分验证的专门针对复杂Glycan进行定性和定量分析的解决方案。

ACQUITY UPLC技术一方面缩短了分析时间，同时HILIC UPLC在分离度方面比传统的HPLC法有了非常明显的提高：例如，对唾液酸化Glycan位置异构体的分离，以及实验中观测到的磺酸化和唾液酸化glycan的分离。

MS/MS碎裂信息和SimGlycan软件通过数据库检索以帮助进行glycan结构鉴定，使聚糖结构的指定更加可靠。

ACQUITY UPLC/FLR/Xevo QTof MS分析平台加上SimGlycan软件是进行复杂Glycan鉴定的一种强有力的工具，可以作为一套标准化的分析流程进行常规分析。Glycan分离、图谱分析、质量确认和结构鉴定都能够在一套LC/MS系统平台进行。分析时间短、分离效率高，分析人员可以非常方便地获得高品质分析数据，这对于从事糖蛋白药物研究的科学家来讲是一个非常有价值的工具。

如有任何疑问，请发送邮件至：
WatersChina_info@waters.com

参考文献

1. Yasushi Makino, Kaoru Omichi, Nahoki Kuraya, Hideyuki Ogawa, Hitoshi Nishimura, Sadaaki Iwanaga and Sumihiro Hase. J. Biochem. 128, 175-180 (2000).
2. Ying Qing Yu, Martin Gilar, Jennifer Kaska and John C. Gebler. *Deglycosylation and Sample Cleanup Method for Mass Spectrometry Analysis of N-linked Glycan.* Waters Application Note. 2007. 720001146EN.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters、CQUITY UPLC、UPLC和Xevo为沃特世公司的注册商标。
The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。
其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2011年 沃特世公司。中国印刷。
2011年6月 720004019ZH AG-PDF

沃特世科技（上海）有限公司
北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555

沃特斯中国有限公司
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com