Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

使用 SYNAPT G2-S HDMS 的电子转移解离（ETD）功能分析重组单抗的糖肽结构

Jonathan P. Williams、Jeffery M. Brown、Stephane Houel、Ying Qing Yu和Weibin Chen
沃特世公司，美国马萨诸塞州米尔福德

方案优势

由"超级电荷"试剂辅助的ETD碎裂技术可提高糖肽碎裂效率。经证明配备ETD源的SYNAPT® G2-S HDMS™系统是蛋白糖基化分析不可缺少的工具。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® H-Class Bio四元高分辨生物分析液相色谱系统

SYNAPT G2-S HDMS高清质谱

ACQUITY UPLC BEH300 C18 2.1 x 150 mm，1.7 µm色谱柱

关键词

电子转移解离，间硝基苄醇，间硝基苯甲醇超级电荷，糖肽，曲妥珠单抗，重组

引言

蛋白质糖基化修饰是重组抗体药物生产的一个主要要求，对药效和安全性有重要影响。典型的糖基化分析方法包括游离多糖分析、糖基化位点鉴定和糖基化位点的异质性分析。

过去几年里，生物制药实验室已经使用配备光学检测器的液相色谱法进行多糖表达谱分析。串联质谱方法是分析糖基化位点的一种快速且灵敏的方法。众所周知，电子转移解离（ETD）是一项功能强大的碎裂技术，特别适用于不稳定的翻译后修饰（PTM）确证，通常这些修饰难以通过碰撞诱导电离（CID）技术进行表征。本应用详细介绍了使用ETD碎裂技术进行重组单抗的糖肽结构分析。

前体离子的价态会影响解离的效率，对ETD技术应用至关重要响[1]。当前体离子的电荷数下降时，通常会观察到非解离的电子转移。因此，在色谱柱后加入间硝基苯甲醇（m-NBA）来增加ESI离子源产生的离子的带电状态，从而提高ETD的效果[2]。

这里我们展示了基于ETD的质谱技术，用于N-联多糖和O-联多糖分析，描述其修饰位点和序列信息。本文以常见的重组单克隆抗体曲妥珠为例进行研究。

实验条件

质谱条件

质谱仪：	SYNAPT G2-S HDMS
毛细管电压：	2.0 kV
试剂辉光放电电流：	70 µA
源温度：	100°C
采样锥孔电压：	25 V
提取锥孔电压：	3 V
试剂补偿气体流速：	25 mL/min
脱溶剂气温度：	200°C
锥孔气体流速：	30.0 L/h
ETD试剂：	1,3-苯二腈（m/z 128）
Trap池波高电压：	0.25 V
Trap 池射频电压：	500 V

样品制备

3-硝基苯甲醇（m-NBA）购自Fluka（Part number 73148），ETD试剂1,3-苯二腈购自Sigma-Aldrich（Part number 145858）。使用DTT（二硫苏糖醇）和IAA（碘乙酰胺）将曲妥珠单抗还原并烷基化，胰蛋白酶消化过夜。

UPLC条件

ACQUITY UPLC H-Class Bio 系统直接与配有ETD的SYNAPT G2-S HDMS质谱仪的标准电喷雾离子接口相连。在ACQUITY UPLC BEH300 C_{18}，2.1 x 150 mm，1.7-µm色谱柱上进行1~10 pmol的胰蛋白酶水解的肽混合物反相色谱分离。流动相A和B分别为水和乙腈，流动相C为1%甲酸，保持C%为10%。使用5%~35% B以100 µL/min梯度流速将胰蛋白酶水解的肽混合物从色谱中洗脱，洗脱时间为35分钟。梯度进一步升高至50% B，持续洗脱10分钟，然后80% B，持续1分钟，然后保持5分钟，流速为200 µL/min。柱后通过VALCO三通加入约0.4%的m-NBA（一种“超级电荷”试剂）。

结果与讨论

ETD碎裂已经被用作CID碎裂技术的补充，用于蛋白质翻译后修饰的分析。糖肽的CID碎裂通常发生中性丢失（即与肽段相连的糖首先断裂），因此，通常在低m/z区域检测到强度很高的氧 离子。由于CID获得的碎片信息通常被多糖相关的碎片离子占据，不能获得丰富的肽段的序列信息。这影响了对重要的翻译后修饰位点进行确证的精确性。

幸运的是，ETD采用不同的碎裂机理，其中糖肽的多糖部分被保留在c和z碎片离子上。而且，由于ETD碎裂发生在色谱分离之后，因此，产生的碎片离子与在多糖部分CID分析具有相同的保留时间。

重组单抗药物曲妥珠单抗的胰蛋白酶水解物用于ETD分析。曲妥珠单抗在Fc区的重链上有一个N-糖基化位点。糖肽的色谱保留时间由UPLC®/MS^{E}实验确定。由于来自于高能碎裂数据通道的常见氧 离子（例如m/z 204.09、366.14）是主要的碎片（如图1所示），通过提取其信号获得糖肽的保留时间和质荷比数值。获得的信息（保留时间和前体质荷比）用于设置后续的EDT实验。

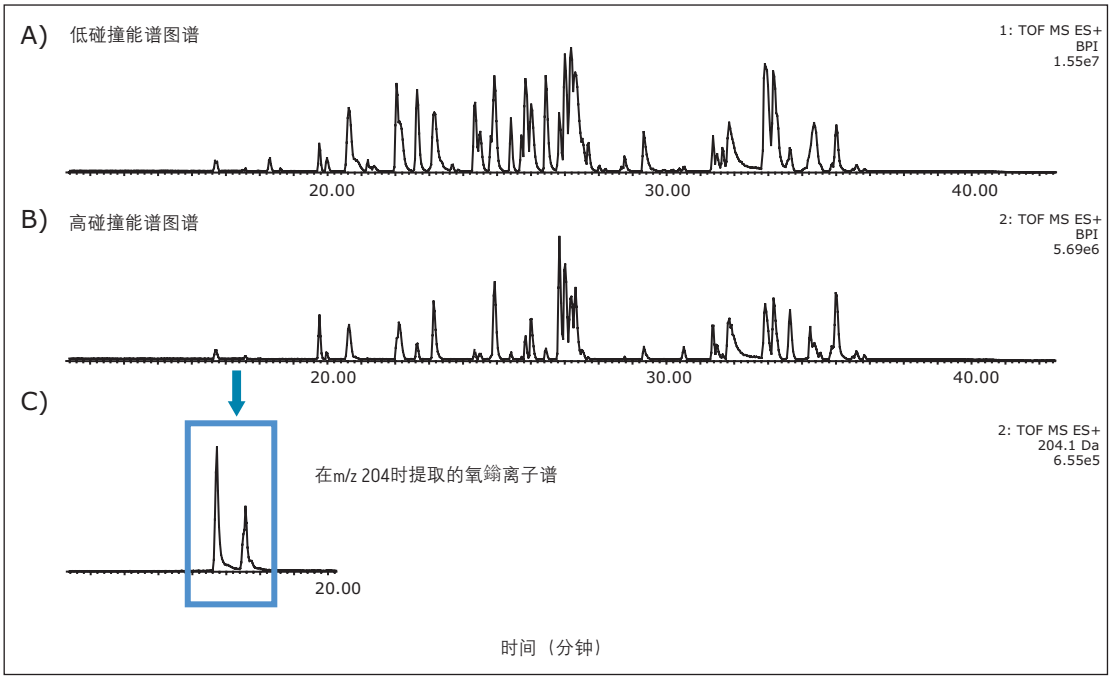

图1 UPLC/MS^{E}基峰强度图谱A）低碰撞能数据通道；B）高碰撞能数据通道；C）在m/z 204（氧 离子）时提取的图谱显示，糖肽先出峰。

通过柱后加入超级离子试剂m-NBA，目标糖肽的价态向高电荷移动，如图2所示。当前体离子的电荷数下降时，通常会观察到非解离的电子转移。图3A显示带3个电荷的肽前体离子（含有GOF）的碎裂图谱，在没有m-NBA加入时，产生的碎片离子为电荷数降低的2价和1价离子，几乎没有得到有关肽链的碎片信息。图3B显示当加入0.4% m-NBA来促进带4个电荷的前体离子ETD时，产生了高强度c离子和z离子。其中c_4和c_5（以及z_4至z_5）离子之间的净质量差与Asn和GOF的总和（1558.6 Da的质量差）相符。

除GOF以外，曲妥珠单抗的其它两种糖型主要为G1F和G2F。图4A-B显示了带4个电荷的糖肽前体离子的ETD碎裂，此图谱中的c离子和z离子信息可以非常可信地确认肽的序列信息。此外，几乎看不到多糖部分的中性丢失信号。因此，完整多糖的质量可归属为糖基化位点，分辨率能够到单个氨基酸。

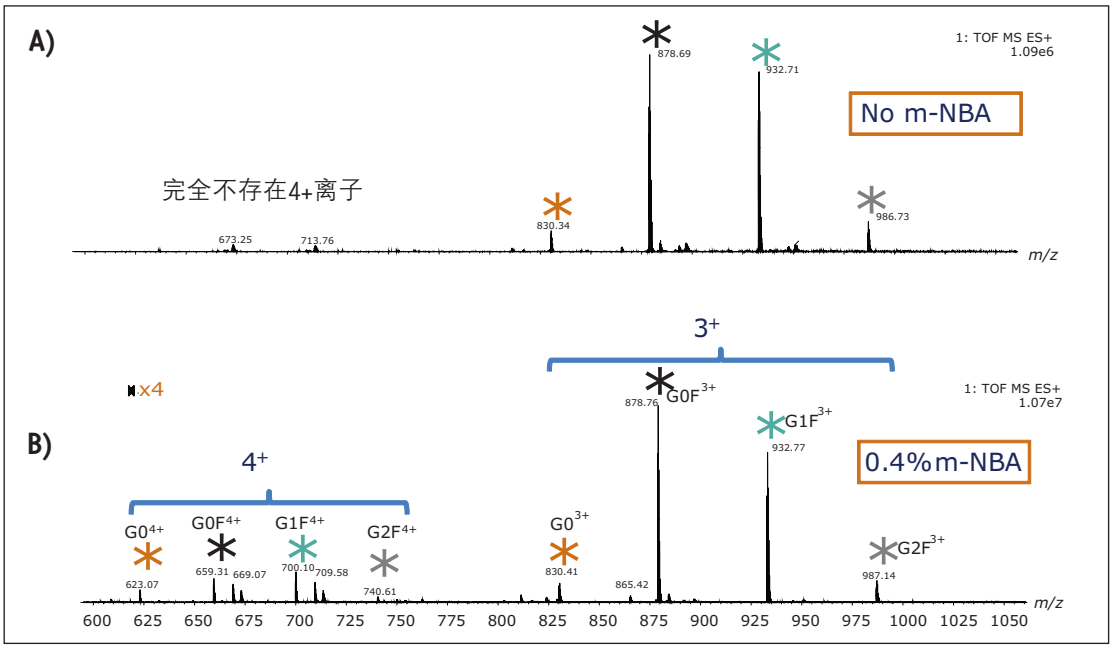

图2 在15-18分钟之间出峰的糖肽的叠加质谱图。A）不加入超级碱m-NBA时，没有观察到带4个电荷的信号。B）加入超级试剂m-NBA时，糖肽的电荷状态变为4+（见放大部分）。

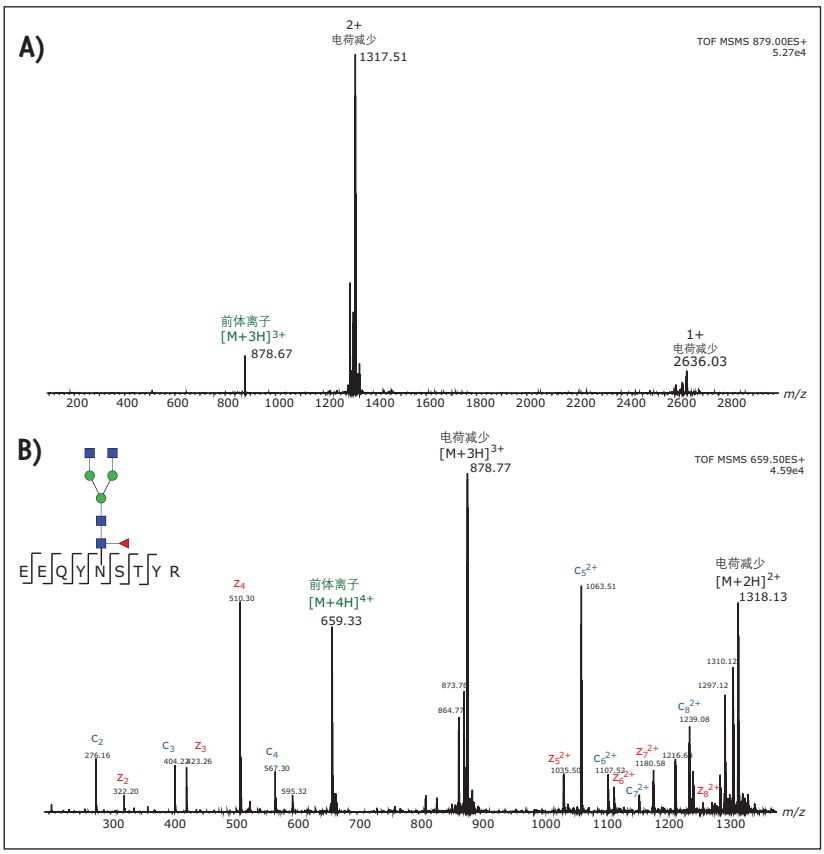

图3 A）未加m-NBA时，含有G0F的糖肽3+离子（m/z 878.7）的电子转移解离图谱显示没有序列特异性碎片离子。可能的解释是没有超级电荷试剂参与，因为带有高电荷数的的离子可能更适于ETD碎裂。B）加入m-NBA后，可能产生4+电子转移解离，可观察到高强度的c/z离子

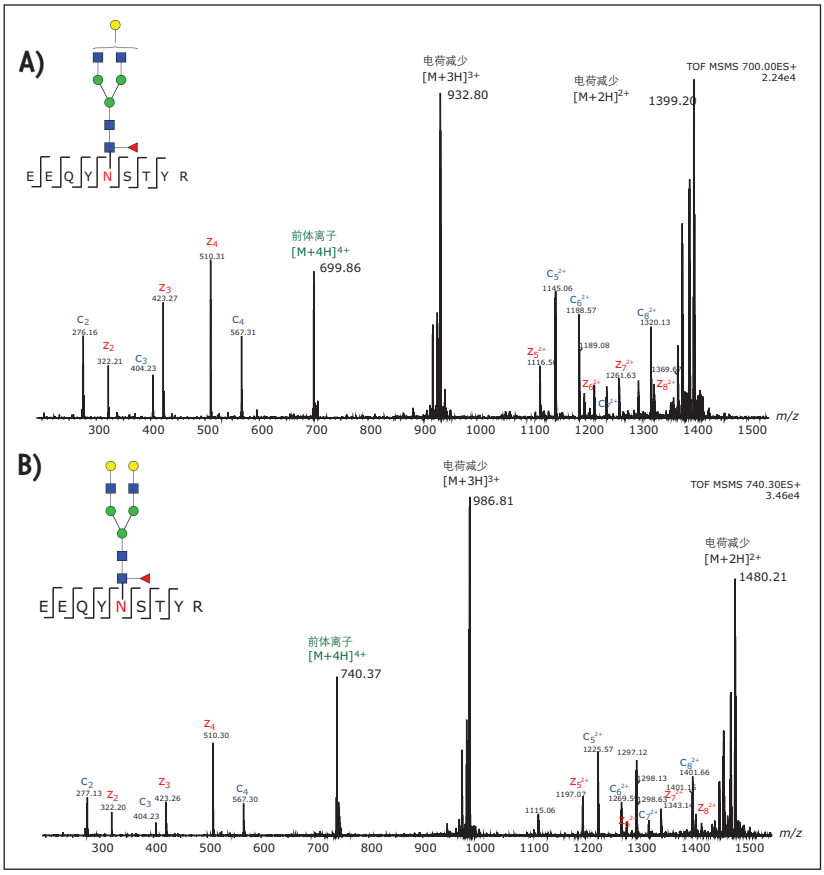

图4 由含有G1F（A）和G2F（B）糖肽的4+前体得到的另外两个ETD图谱。超级碱m-NBA对于产生肽主链碎片信息至关重要。

结论

ETD已经被证明是表征蛋白质药物翻译后修饰的重要工具。实验数据表明，单克隆抗体曲妥珠单抗中的糖肽位点的异质性可以通过在SYNAPT G2-S HDMS系统上在柱后加入m-NBA的方式、使用ETD功能实现。

- *de novo sequencing*信息、多糖键合位点和多糖质量可以从碎裂数据中非常可靠地获得。
- 采用CID和ETD的超高效液相色谱-质谱（UPLC/MS^E）联用是一种蛋白质药物表征的强大工具。
- 此外，这种ETD方法可以使用分析级色谱设置和分析级质谱离子源进行，从而尽量减少方法优化所需的时间。

参考文献

1. *Anal. Chem.* 2007; 79: 477-485.
2. *Anal. Chem.* 2007; 79: 9243-9252.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters、SYNAPT、ACQUITY UPLC和UPLC是沃特世公司注册商标。HDMS和The Science of What's Possible是沃特世公司商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2012年 沃特世公司。印制于中国。

2012年10月 720004481ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
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
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

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