Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

IgG中G0F及G1F糖肽的MS/MS数据特点分析

贾伟
沃特世科技（上海）有限公司 实验中心

关键词：
免疫球蛋白G（IgG） 糖基化 G0F G1F MS/MS Q-ToF™

引言

IgG作为最为常见的抗体药物种类，IgG的结构分析工作是新药研发、质量控制的基础与关键。而IgG中糖基化的构型对其药效往往起到至关重要的作用。经典方法中，通过肽-N糖苷酶F(PNGase F)处理IgG，并采用2-AB等试剂衍生后，可以对其N-链的糖型结构进行分析。而随着质谱成为蛋白药物结构分析的必须手段，采用MS/MS串联质谱技术，直接分析IgG的蛋白酶解产物中的N-糖肽，可以更加高效地获得其准确的结构信息。本文探讨了IgG中最常见的糖基化序列EEQYNSTYR的两种糖基化形式(G0F与G1F)的质谱行为规律，旨在为免疫球蛋白抗体类药物的糖型结构的质谱分析提供参考依据。

实验方法

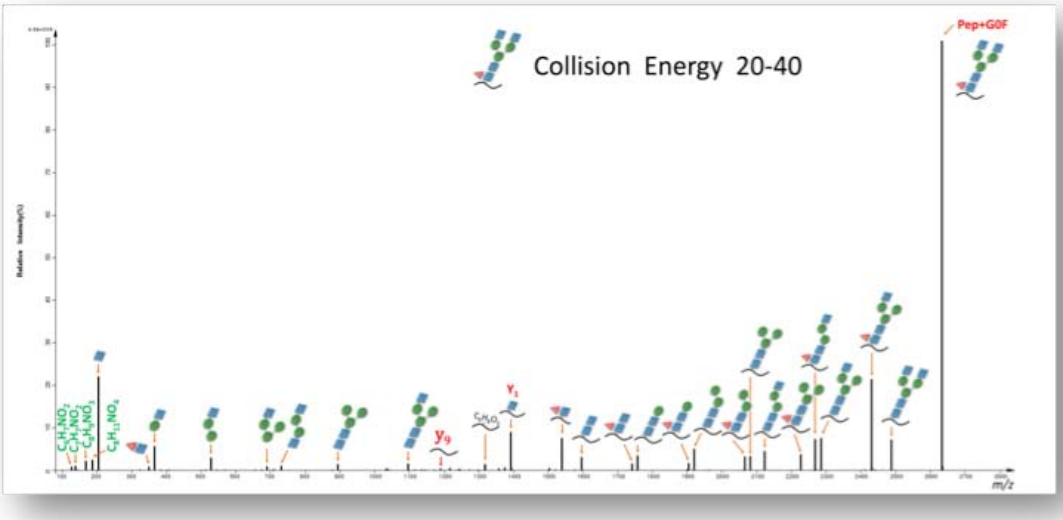
使用反相UPLC® Xevo® G2 Q-ToF，采集IgG胰蛋白酶切片段的EEQYNSTYR的G0F与G1F两种形式糖肽的MS/MS质谱数据(采集2+离子：1317.53m/z及1398.55m/z)。使用20V-40V、30V-50V、40V-60V、50V-70V、60V-80V等5种不同的MS/MS碰撞能量(Collision Energy)，以发现最优化二级质谱条件。二级质谱数据使用MaxEnt™ 3软件去卷积后进行碎片离子确认。

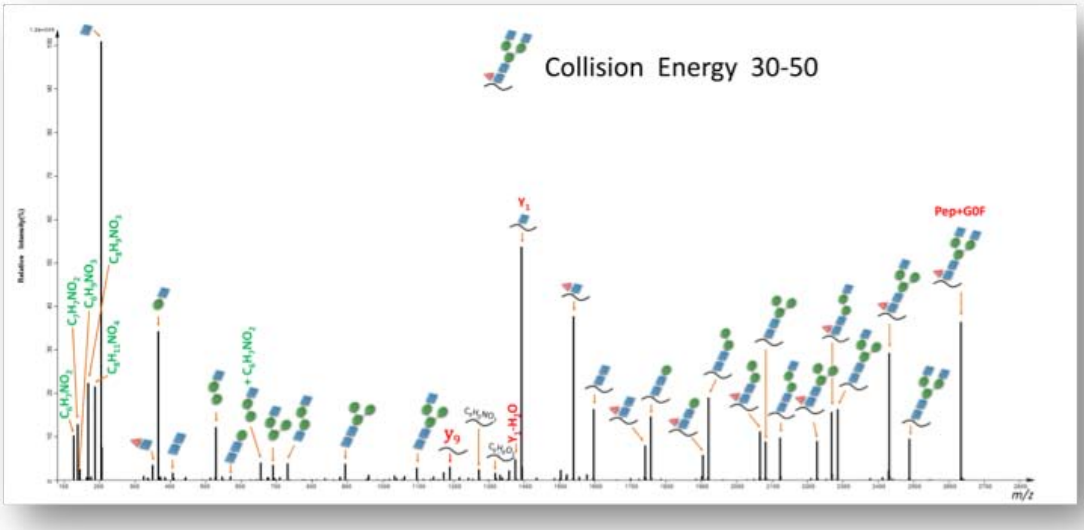
结果与讨论

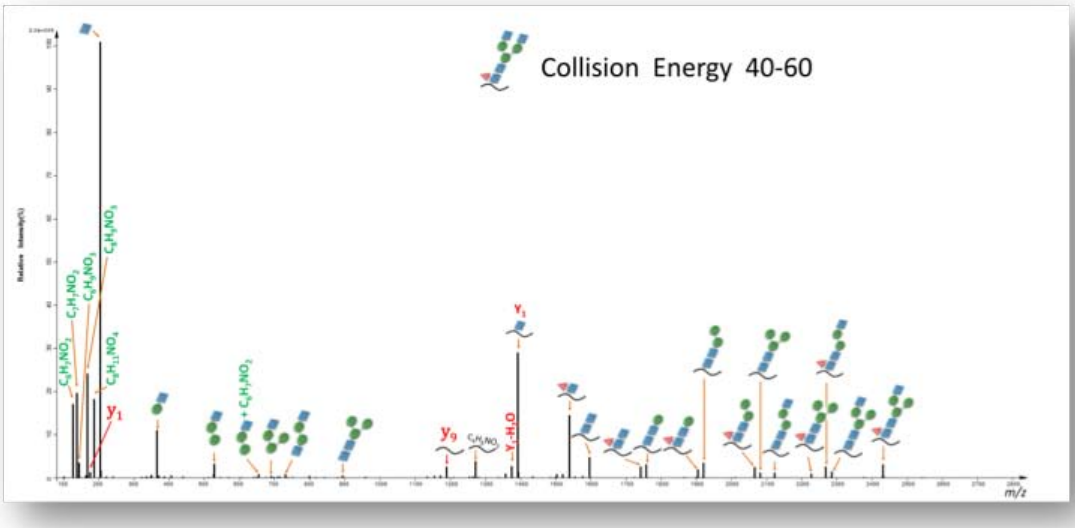
UPLC Xevo G2 Q-ToF卓越的性能为得到高质量的N-糖肽二级质谱数据提供了保证。在数据中可以发现完整的糖Y离子碎片系列，以及丰富的多肽b、y离子碎片。

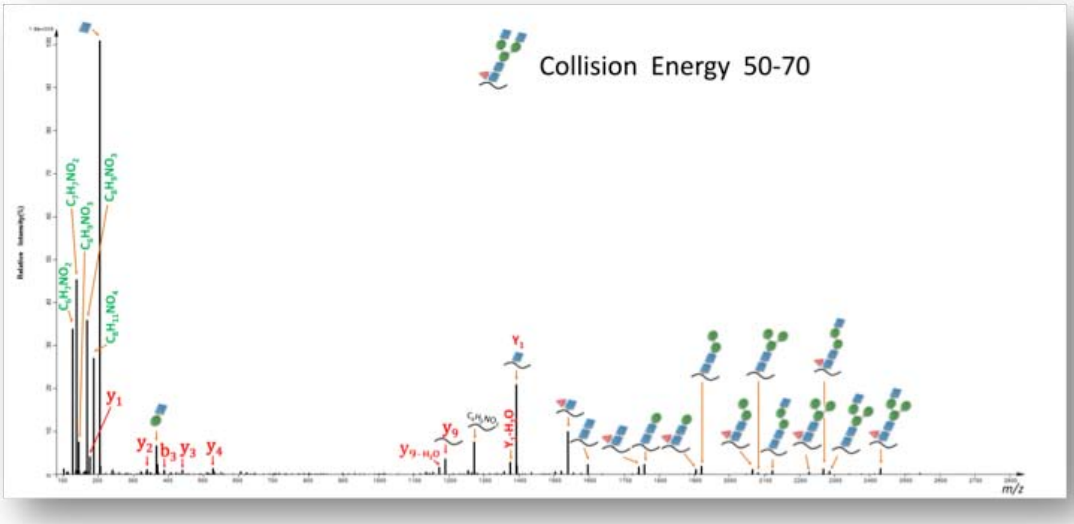
一、G0F糖肽分析

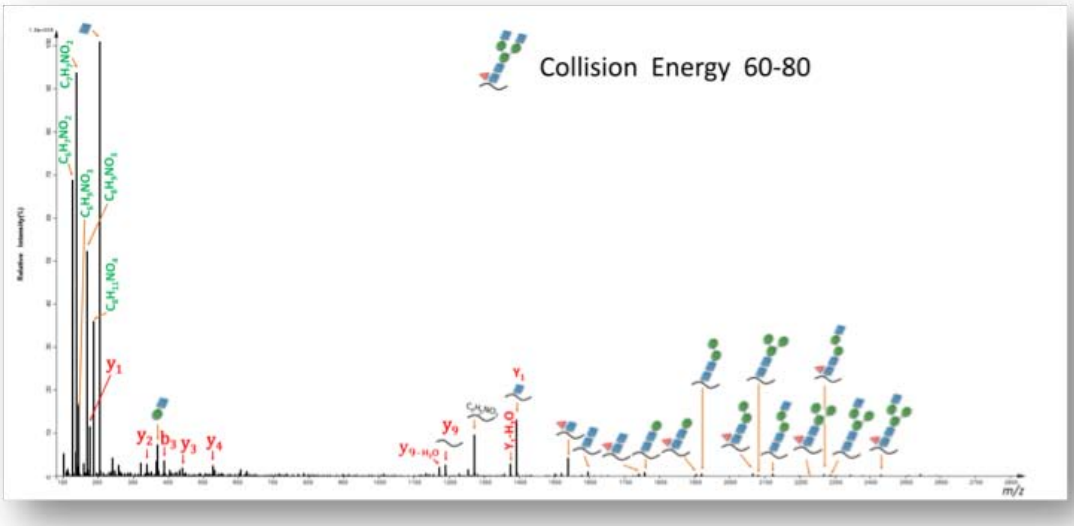
以下5张图谱为不同碰撞能量下，糖型为G0F的N-糖肽二级质谱去卷积后匹配图。




Collision Energy 30-50
Pep+G0F
m/z


Collision Energy 40-60
m/z


Collision Energy 50-70
m/z



通过观察可以发现:

1.采集一般多肽碎片常使用的20V-40V碰撞能量，不能使此糖肽充分碎裂，其母离子信号仍为最强;

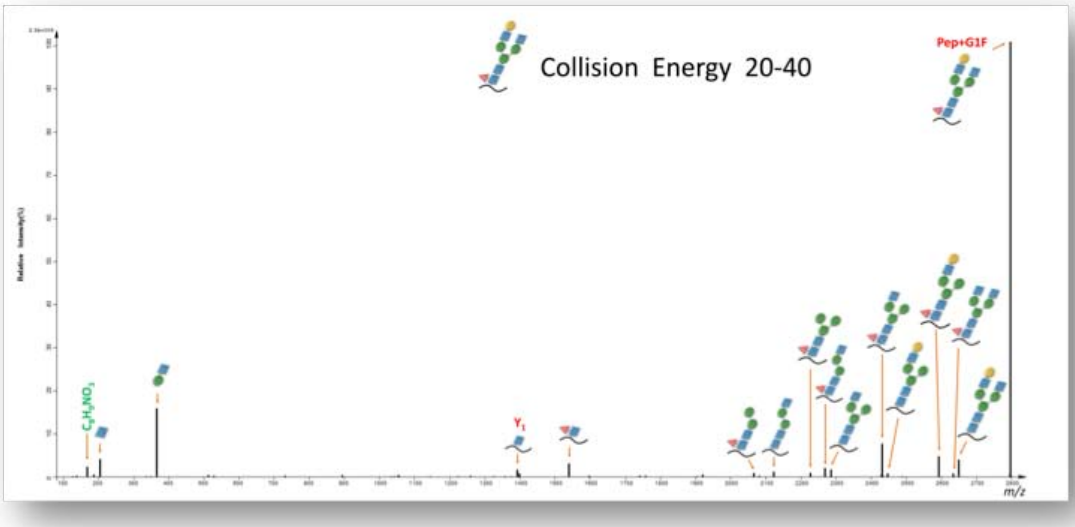
2.30V-50V碰撞能量下，获得了完整的糖链的Y离子碎片，且强度较为均匀，为糖型序列准确地解读提供了完整、充分的信息;

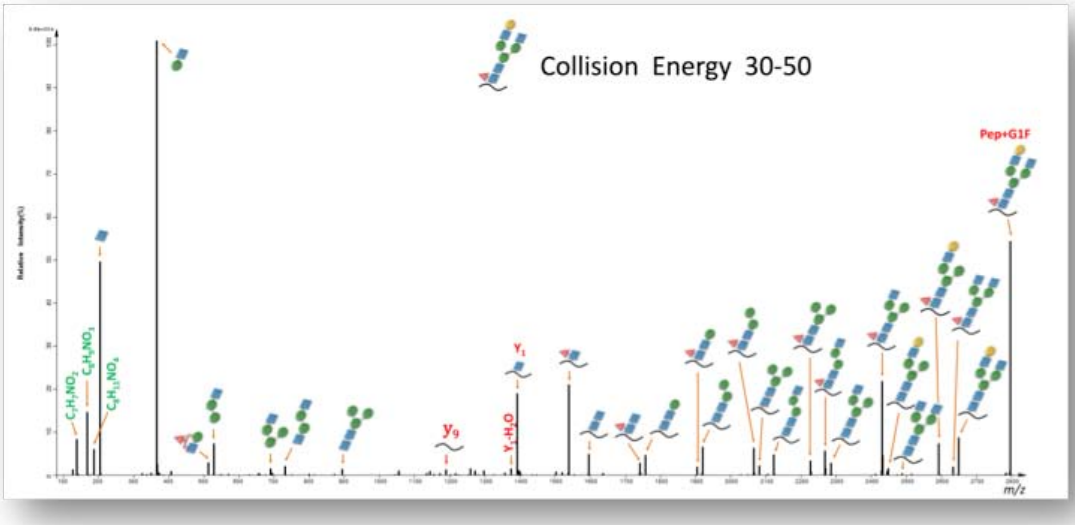
3.碰撞能量由低到高的递增过程中，高质量端的糖Y碎片离子强度逐渐降低，而糖诊断离子(如$C_8H_{13}NO_5$+、$C_{14}H_{23}NO_{10}$+)强度逐渐增强;

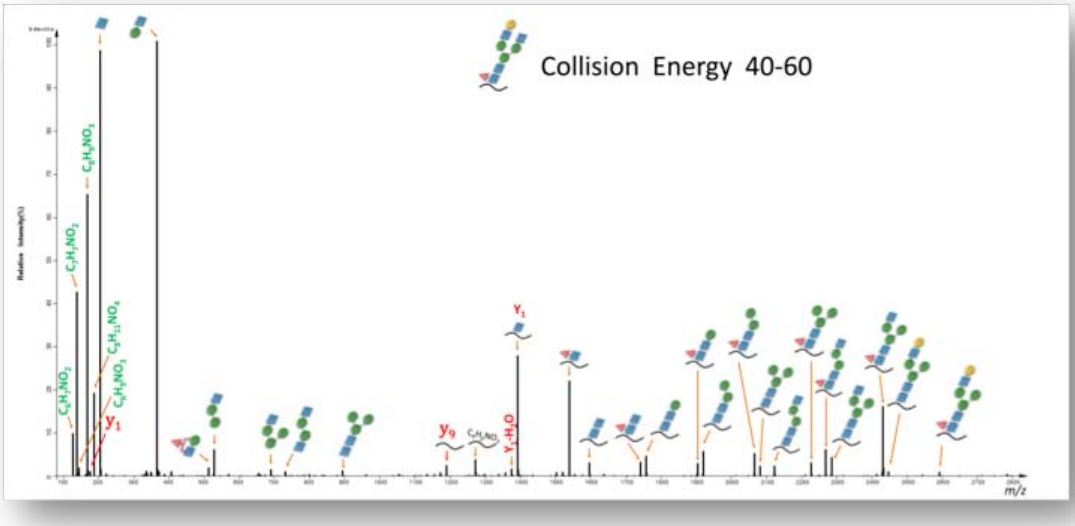
4.50V-70V与60V-80V碰撞能量下，都可得到较丰富的肽段b、y离子碎片，但50V-70V条件下的b、y离子信号更为清晰。

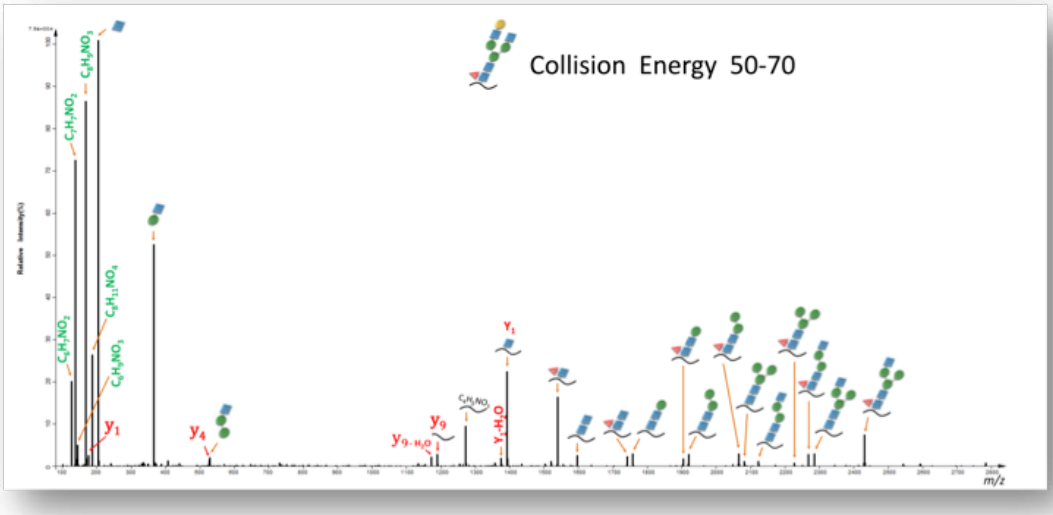
二、G1F糖肽分析

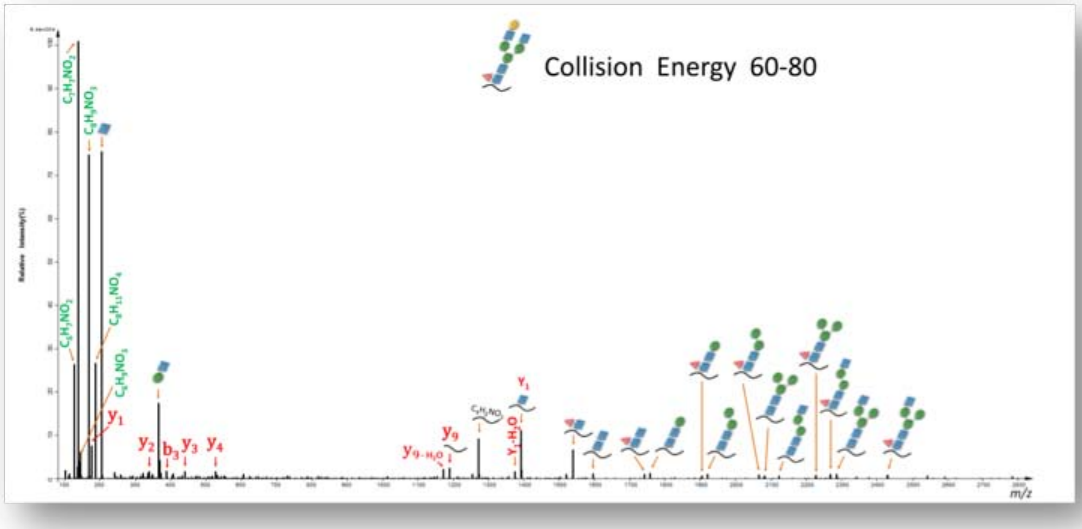
以下5张图谱为不同碰撞能量下，糖型为G1F的N-糖肽二级质谱去卷积后匹配图。




Collision Energy 30-50
Pep+G1F
Relative Intensity(%)
m/z


Collision Energy 40-60
Relative Intensity(%)
m/z


Collision Energy 50-70
Relative Intensity(%)
m/z



G1F糖肽具有G0F糖肽的前三个碎片特点，但G1F糖肽需要在60V-80V碰撞能量下，获得丰富的肽段碎片。对照两者图谱特点可以发现：y9、y1、y4、y2、y3、b3为易出现的EEQYNSTYR糖肽的b、y离子。此外，在G1F中，岩藻糖在MS/MS中的重排信号 ，在G1F中更为明显。

三、EEQYNSTYR序列的G0F与G1F糖肽的糖Y离子，以及糖诊断离子列表如下(红三角：岩藻糖、蓝方块：N-乙酰氨基葡萄糖、绿圆：甘露糖、黄圆：半乳糖、紫菱形：唾液酸)。

糖Y离子列表

Ion					[M]+	Ion					[M]+	Ion					[M]+
	0	Partial	0	0	1272.55		0	2	2	0	1919.78		0	3	3	1	2446.96
	0	Partial	0	0	1317.56		1	2	2	0	2065.83		0	4	3	0	2487.99
	0	1	0	0	1392.59		0	2	3	0	2081.83		1	3	3	1	2593.02
	1	1	0	0	1538.65		0	3	2	0	2122.86		1	4	3	0	2634.05
	0	2	0	0	1595.67		1	2	3	0	2227.89		0	4	3	1	2650.04
	1	2	0	0	1741.73		1	3	2	0	2268.91		1	4	3	1	2796.10
	0	2	1	0	1757.72		0	3	3	0	2284.91		0	4	3	2	2812.09
	1	2	1	0	1903.78		1	3	3	0	2430.97		1	4	3	2	2958.15

糖诊断离子列表

Diagnostics		[Mass]+	Diagnostics		[Mass]+	Diagnostics		[Mass]+	Diagnostics		[Mass]+
$C_6H_7NO_2$	Partial	126.06	$C_8H_{13}NO_5$		204.09	$C_{16}H_{26}N_2O_{10}$		407.17	$C_{25}H_{40}N_2O_{18}$		657.11
$C_7H_7NO_2$	Partial	138.06	$C_{11}H_{15}NO_7$	$-H_2O$	274.09	$C_{20}H_{33}NO_{14}$		512.20	$C_{26}H_{43}NO_{20}$		690.25
$C_6H_9NO_3$	Partial	144.07	$C_{11}H_{17}NO_8$		292.10	$C_{20}H_{33}NO_{15}$		528.19	$C_{28}H_{46}N_2O_{20}$		731.27
$C_8H_9NO_3$	Partial	168.07	$C_{14}H_{23}NO_9$		350.15	$C_{22}H_{36}N_2O_{14}$		569.22	$C_{34}H_{56}N_2O_{23}$		893.33
$C_8H_{11}NO_4$	Partial	186.08	$C_{14}H_{23}NO_{10}$		366.14	$C_{26}H_{41}N_3O_{17}$		654.25	$C_{42}H_{69}N_3O_{30}$		1096.40

小结

使用UPLC Xevo G2 Q-ToF可以直接分析IgG中的N-糖肽。本文通过对IgG中最为常见的EEQYNSTYR序列的G0F及G1F的MS/MS数据的探讨，明确了在碰撞能量30V-50V下，可获得其完整的糖Y离子碎片。此外y9、y1、y4为最易出现的肽段部分的碎片，y2、y3、b3次之，这些信息对于判断信号较弱碎片的可信度具有借鉴意义。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

LLOYD'S REGISTER QUALITY ASSURANCE ISO9001
UKAS QUALITY MANAGEMENT 001
VIT

沃特世科技（上海）有限公司
沃特斯中国有限公司

上海：021 - 6156 2666
北京：010 - 5209 3866
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

©2012 沃特世公司 中国印刷
2012 年 5 月