

CZE-MS 方法对位点特异性蛋白糖基化进行快速分析

目的

采用电渗流驱动鞘流液 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 利用 CZE-MS 方法对位点特异性蛋白糖基化进行快速分析。

背景

蛋白糖基化的表征对疾病预后和治疗药物中重组抗体的质量控制具有重要意义。为方便分析, 通常需要通过内切酶把聚糖从蛋白质上释放出来, 然后再分别对蛋白和聚糖进行分析, 但这种方法丢失了蛋白质修饰中每个位点的聚糖的信息。蛋白糖基化位点分析需要先将蛋白通过胰蛋白酶酶解, 然后对所得到的糖肽进行质谱表征。糖肽分析具有一定的挑战性, 这不仅因为聚糖种类复杂, 同时由于不同种类糖肽的丰度差异很大, 导致质谱检测时需要覆盖很宽的动态范围。反相液相色谱 (RPLC) 结合电喷雾质 (ESI-MS) 分析位点特异性糖基化时往往需要大量的样品和较长的分析时间, 并且很多情况下糖肽的分离效果不理想。毛细管区电泳 (CZE) 的分离主要通过离子的电泳迁移率差异来实现, 是 RPLC 方法的一个强有力的补充或替代方案。本次研究利用 CZE-MS 技术对蛋白质糖基化的微观异质性进行分析, 以获得聚糖异质性的全面表征信息。

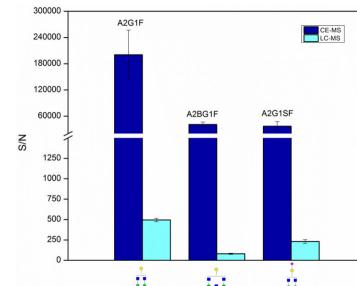


图1. CZE-ESI-MS 与 nanoLC-ESI-MS 分析中糖肽的 S/N 对比图。

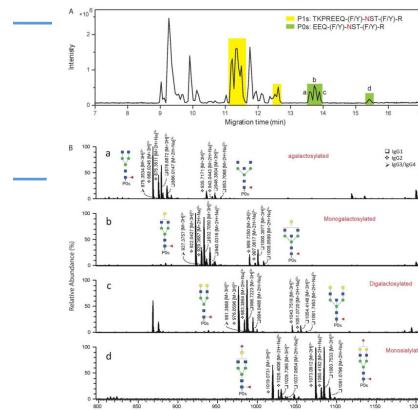


图2. CZE-MS 对 IgG 酶解后所得糖肽的分析结果。

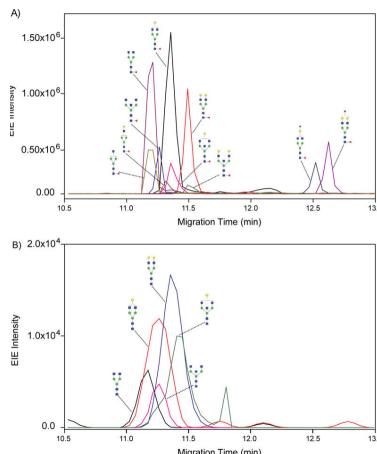


图3. 从 IgG 酶解液中富集到的岩藻糖化(A)和非岩藻糖化(B)糖肽 P1 (TKPREEQFN-176STFR, IgG2) 的提取离子电泳图。

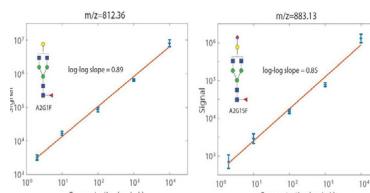


图4. CZE-MS 检测两种糖肽时得到的线性。

解决方案

仪器试剂:

CMP Scientific ECE-001 型毛细管电泳仪。EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源 (CMPScientific, P/N: EM3001-T)。80cm 和 42cmBFS 分离毛细管 (CMP Scientific, P/N:E-SC-BFS-360/150-50-80-B1、E-SC-BFS-360/150-50-42-B1)。BGE 为 0.5% 甲酸。SL 为 0.1% 甲酸和 10% 甲醇。

实验方法:

样品进样 30 psi, 5 s。喷针开口 15 μm。质谱分析采集范围 350–2,000 m/z。毛细管分离电压 +30 kV。ESI 1.8 kV。AGC 目标值 3E6。最大离子注入时间 50ms。NCE 28。

样本制备:

100 μg 免疫球蛋白 (IgG) 和触珠蛋白 (haptoglobin) 经 DTT 还原, IAA 烷基化后, 加入胰酶酶解, 用 FA 甲酸化后终止反应。蛋白质酶解液用 C18-SepPak 柱脱盐, 然后用真空浓缩器冻干, 用缓冲液中溶解。糖肽富集采用亲水作用色谱 (HILIC), 通过填充聚糖捕获树脂进行富集, 收集洗脱后的糖肽部分, 真空浓缩器冻干。

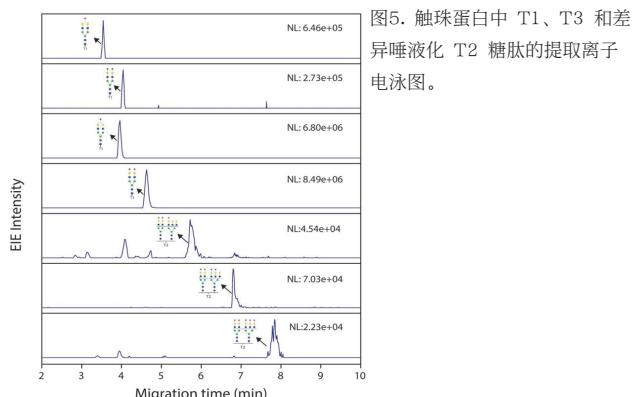


图5. 触珠蛋白中 T1、T3 和差异唾液化 T2 糖肽的提取离子电泳图。

结果

约 34 fmol 的 IgG 糖肽通过 80cm 长的 BFS 毛细管进行电泳分离。如 图1 所示, 糖肽的进样量相同时, CZE-MS 获得的信噪比要比 nanoRPLC-MS 高两个数量级。如 图2 所示, CZE-MS 可以检测到两个序列不同的肽段, 这些序列被命名为 P0 和 P1, 图2 中 a-d 显示的是不同糖基化修饰的 P0 的质谱图。如 图3 为从 IgG 酶解液中富集到的岩藻糖化 (A) 和非岩藻糖化 (B) 糖肽的提取离子电泳图, RPLC 根据聚糖亲水性和唾液酸修饰的差异对糖肽进行, 但 RPLC 对肽段相同但聚糖修饰不同的糖肽的分离度远低于 CZE, 对于不同唾液酸修饰的糖肽尤其如此。如 图4 为 CZE-MS 分析 IgG 来源的两个糖肽所得到的线性结果, 线性范围可达四个数量级。图5 展示的是触珠蛋白中 T1、T3 和差异唾液化 T2 糖肽的提取离子电泳图, 这些糖肽疏水性很强, 在常规的 RPLC 分析柱上很难被洗脱, 而通过 CZE-MS 可以在 9 分钟内对这些糖肽实现高效快速的分离。

总结

本研究利用 EMASS-II 型 CZE-MS 系统建立了抗体药物完整糖肽的分析方法。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好和线性范围宽等优点, 适用于对各种蛋白糖基化的表征分析。

www.evergauge.cn

www.cmpscientific.com

永道致远科学技术有限公司

上海市浦东新区康新公路3399弄26号楼218室