

CE-MS 方法对重组人促红细胞生成素肽图的分析

目的

采用电渗流驱动鞘流液EMASS-II型离子源, 利用 CE-MS方法对重组人促红细胞生成素 (rHuEPO) 肽图的在线分析。

背景

重组人促红细胞生成素 (rhEPO) 是一种主要由肾脏产生的糖蛋白激素, 起到维持红细胞数量和组织氧供应在足够水平的作用。rhEPO 是一个约 30kDa 的糖基化蛋白, 其有三种复杂类型的N-聚糖 (Asn24、Asn38和Asn83) 和一个O-聚糖 (Ser126) 糖基化位点, 多种的糖基化修饰导致 rhEPO 具有复杂的异质体。近年来, 毛细管电泳结合质谱 (CE-MS) 已被广泛应用于完整糖蛋白的表征, 以及酶切后得到的糖肽和聚糖的分析。本实验采用 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 建立了毛细管电泳与高分辨质谱联用技术对 rhEPO 肽图的分析方法。



图1. rhEPO的三维结构图。

```

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCA
EHCSLNE NITVPDTKVN FYAWKRMEVG
QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNS
SQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRAL
GAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKL
FRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR
  
```

图2. rhEPO 的氨基酸序列。

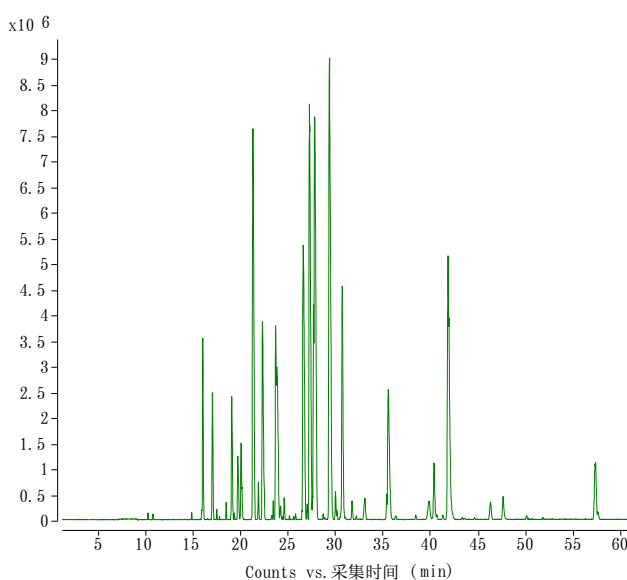


图3. rhEPO 在 CE-MS 上得到的肽图, 共检测到 55 个肽段, 序列覆盖率75%。

解决方案

仪器试剂:

CMP Scientific ECE-001 型毛细管电泳仪。EMASS-II 离子源 (CMP Scientific, P/N: EM3001-A)。100 cm PS2 涂层分离毛细管 (CMP Scientific, P/N: E-SC-PS2-360/150-50-100-B1)。BGE 为 1% 甲酸。SL 为 0.5% 甲酸和 10% 异丙醇。

实验方法:

样品进样 100 mbar, 15 s。质谱分析采集范围 250-3,200 m/z。毛细管分离电压 +30kV。ESI 2.2 kV。Vcap 0 V。干燥气体 365°C, 6 L/min。Fragmentor 电压 175V。Skimmer 电压 65 V。

样本制备:

取适量的 rhEPO 原液用 10 kDa 超滤管超滤, 用水将 rhEPO 浓度调整到 1000 mg/L。取适量 rhEPO 水溶液至 100 μL 的 50 mM 碳酸氢铵 (pH7.9) 中混匀。加入胰蛋白酶, 使酶与蛋白比例为 1: 40, 37°C 的水浴中孵育 18 小时。在沸水中加热 5 min 后停止酶解, -20°C 下保存。

结果

图1为 rhEPO 的三维结构图, 在 rhEPO 中存在包括N-糖和O-糖多种形式的糖基化修饰。图 2 为 rhEPO 的氨基酸序列, 彩色标注的氨基酸为存在的糖基化修饰位点。图 3 为 CE-MS 对 rhEPO 肽图的分析结果, 此方法共检测到 55 个肽段, 序列覆盖率为 71%。

总结

本实验采用 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, PS2 中性涂层管, 建立了 CE-MS 对 rhEPO 肽图的分析方法。此方法简单、快速、可靠, 适用于复杂糖蛋白来源的糖肽的分析。



扫一扫, 关注永道致远微信

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