

CE-MS 联用方法对重组治疗蛋白质 N-聚糖的在线分析

目的

采用BFS型无涂层毛细管, 通过电渗流驱动的同轴鞘液 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 对 NIST 单抗的 N-聚糖实现快速的 CE-MS 分析。

背景

N-聚糖是一个附着在蛋白质的天冬酰胺残基上的低聚糖家族。大多数重组治疗蛋白是带有 N-聚糖的糖蛋白, 鉴于 N-聚糖的结构多样性, 聚糖种类的定性鉴定和相对定量对于重组蛋白质质量的评估十分重要。目前对 N-聚糖的分析方法是先使用酶消化, 从蛋白质中释放聚糖, 然后用荧光染料标记后进行检测。然而, 由于传统 CE-MS 联用离子源技术存在多种局限, CE-MS联用和在线毛细管电泳-激光诱导荧光-电喷雾质谱 (CE-LIF-MS) 联用技术一直具有挑战性。本方法通过电渗流驱动的同轴鞘液 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 克服了传统 CE-MS 联用时灵敏度低和稳定性差的缺点, 成功实现了对荧光标记的N-聚糖在线的 CE-MS 和 CE-LIF-MS 分析。

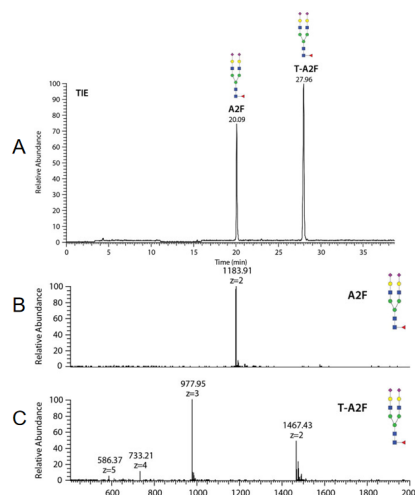


图2.氨水作为BGE, 对Teal标记的A2F和非标记的A2F聚糖混合物进行CE-MS分析的结果。

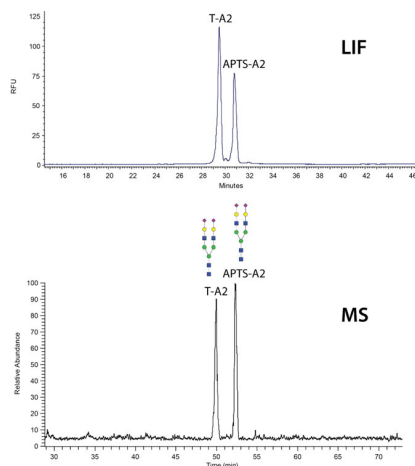


图3. 不同标记 (Teal/APTS) 的聚糖混合物进行 CE-LIF-MS 分析的结果。

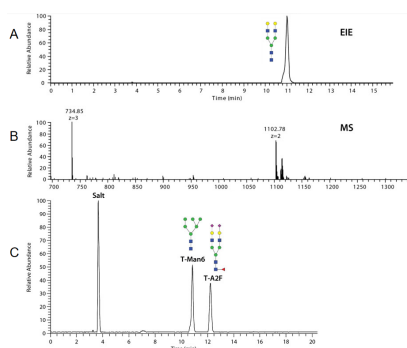


图1. A)Teal标记的G2聚糖的提取离子电泳图。B)对应的质谱图。C)Teal标记的Man6和A2F混合物的电泳图。

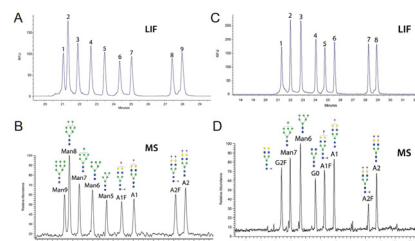


图4. N-聚糖标记后的复合聚糖混合物进行 CE-LIF-MS 分析的结果。

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 (CMP Scientific, P/N: EM3001-T)。70cm BFS 型无涂层分离毛细管 (CMP Scientific, P/N: E-SC-BFS-360/150-50-70-B1), 115cm BFS 型无涂层分离毛细管 (CMP Scientific, P/N: E-SC-BFS-360/150-50-115-B1)。BGE 为 10mM 醋酸铵、20% 异丙醇和 20% 乙腈; 0.7N 氨水和 70% 甲醇。SL 为 5mM 醋酸铵和 80% 乙腈; 10mM 碳酸氢铵和 99% 甲醇。

实验方法:

样品进样 7psi, 7s。分离电离电压 30kV。外接电源电喷雾电压 -1.7 kV。样品进样 0.3-1.5psi, 5s。BGE 注入 0.3-1psi, 5s。分离电离电压 30kV。外接电源电喷雾电压 -1.9kV。喷针尖端到质谱距离 2-4 mm。

质谱参数:

电离模式: 负离子。质谱分辨率 30,000。毛细管温度 250°C, 电压 -35V。Tube Lens -100V。

结果

图1 是本方法最优 BGE 条件对 Teal 标记的 G2 聚糖及聚糖混合物进行 CE-MS 分析的结果, 结果表明 CE-MS 具有良好的在线脱盐的效果和很高的分离效率, 且实验重现性也表现优异。图2 是以氨水作为 BGE, 对Teal 标记的 A2F 和非标记的A2F聚糖混合物进行 CE-MS 分析的结果, 较长的分离窗口为复杂混

合物的分离提供了必要的条件。图3 是对用不同荧光标记 (Teal/APTS) 的聚糖混合物进行 CE-LTF-MS 分析的结果。结果表明聚糖在不同的荧光标记下, 通过 CE-MS 分析均能获得高效的分离, LIF 和 MS 均具有很高的检测灵敏度。图4 是对N-聚糖标记后的复合聚糖混合物进行 CE-LIF-MS 分析的结果。在两个样本组中, 所有标记的聚糖均可在基线分离的条件下被检测出来。LIF 检测与 MS 检测的出峰顺序相同, 峰的相对丰度基本一致, 表明本方法可同时实现 LIF 定量和 MS 鉴定。

总结

在本方法中, 采用BFS型无涂层毛细管、ECE-001型毛细管电泳仪、和EMASS-II型 CE-MS联用离子源, 对NIST单抗的N-聚糖进行CE-LIF-MS分析, 实现了对N-聚糖的高效分离和高灵敏度分析, 证明了CE-MS方法在治疗性蛋白药物表征方面的巨大应用潜力。



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