

利用 Agilent 1290 Infinity UHPLC 和 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统对单克隆抗体进行高分离度快速肽谱分析

应用简报

作者

Ning Tang
安捷伦科技有限公司
Santa Clara, CA, USA

James Martosella 和 Alex Zhu
安捷伦科技有限公司
Wilmington, DE, USA

前言

肽谱分析是表征生物治疗性蛋白质的一种常用分析技术。首先用一种或两种蛋白酶将蛋白质酶解成小分子肽。肽混合物通常采用反相色谱法分离，然后通过紫外或质谱检测器进行检测。质谱可以提供肽的质量数据，从而大大扩充肽谱分析的信息含量。由于增加了质量分离模式，可以轻松鉴定出共流出的多肽，同时也可以大幅缩短梯度时长。此外，串联质谱可以将肽碎裂为更小的片段，并为肽的氨基酸序列以及糖基化、磷酸化、氧化和脱酰氨基化等翻译后修饰 (PTM) 提供证据。

本应用简报介绍了如何使用新型表面多孔肽谱分析色谱柱配合 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统对一种 IgG (1) 治疗性单克隆抗体 (mAb) 进行肽谱分析。结合 MS/MS 分析，肽谱分析色谱柱独特的分离能力可以最大限度提高分离度和效率，可确保实现可靠灵敏的肽鉴定，而且只需 15 分钟的运行即可实现高序列覆盖。6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统可为肽鉴定提供出色的质量准确度和灵敏度，而 MS/MS 功能则有助于更可靠地确定被修饰肽的鉴定结果。此外，本文还探讨了通过 IgG (1) 肽谱分析梯度和 LC/MS/MS 参数的优化，实现稳定、快速、可靠的 mAb 肽谱分析。



Agilent Technologies

实验部分

样品前处理

首先将 20 μ L mAb IgG1 (30 mg/mL) 与 20 μ L 100 mM 碳酸氢铵 (pH 8) 混合。然后，在蛋白质样品中加入 50 μ L 三氟乙醇和 5 μ L 200 mM 二硫苏糖醇 (DTT)，并在 65 $^{\circ}$ C 下加热 30 min 进行蛋白变性和还原。蛋白质冷却至室温后，向样品中加入 20 μ L 200 mM 碘乙酰胺 (IAM)。将样品在室温避光条件下放置 1 小时。然后，在样品中加入 5 μ L DTT，与过量 IAM 反应 1 小时。用 200 μ L 100 mM 碳酸氢铵和 600 μ L 水稀释样品。加入 40 μ L 胰蛋白酶的，在 37 $^{\circ}$ C 下振荡 (300 rpm) 温育过夜。温育过夜后，加入 5 μ L 纯甲酸淬灭消化。

仪器

液相色谱系统

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 G4220A
- Agilent 1290 Infinity TCC G1316C
- Agilent 1290 Infinity 进样器 G4226A
- Agilent 1290 Infinity FC/ALS 温控装置 G1330B

质谱系统

配置安捷伦喷射流离子源的 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统

LC/MS 参数

参数		Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统		
色谱柱		Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 \times 250 mm, 2.7 μ m (部件号 651750-902)		
柱温		60 $^{\circ}$ C		
样品恒温器		5 $^{\circ}$ C		
流动相 A		0.1% 甲酸水溶液		
流动相 B		0.1% 甲酸的 90% 乙腈水溶液		
梯度		0 min 3% B 10 min 35% B 12 min 90% B 14 min 90% B 15 min 3% B		
停止时间		15 min		
后运行时间		10 min		
流速		0.5 mL/min		
参数		Agilent 6550 Q-TOF LC/MS 系统		
电离模式		正离子模式		
离子源		安捷伦双喷射流离子源		
干燥气温度		250 $^{\circ}$ C		
干燥气流速		14 L/min		
鞘气温度		250 $^{\circ}$ C		
鞘气流速		11 L/min		
雾化器压力		35 psi		
毛细管电压		3500 V		
喷嘴电压		0 V		
MS 范围 (m/z)		300-1700		
MS/MS 范围 (m/z)		50-1700		
MS 扫描速率 (质谱图/秒)		8		
MS/MS 扫描速率 (质谱图/秒)		3		
斜升的碰撞能量		电荷态	斜率	偏移
		2	3.1	1
		3 和 > 3	3.6	-4.8
		1	3.5	6
数据分析		LC/MS 的数据采用 Agilent MassHunter 定性分析软件 B.06 及 Agilent MassHunter BioConfirm 软件 B.06 进行分析		

结果与讨论

肽谱分析实验中可能包含数百种具有各种修饰的肽。自动化数据处理可以提高数据挖掘效率。图 1 所示为 Agilent MassHunter BioConfirm 提供的肽谱分析工作流程。采集数据后，根据色谱特征自动提取化合物。然后将化合物表与具有可能修饰基团时肽的理论酶解物列表进行匹配。使用肽的 b/y 碎片离子解析每种肽的 MS/MS 谱图。肽鉴定完成后，会编写序列覆盖图，工作流程结束时自动生成肽谱分析报告。

为了获得理想的分离度，传统的肽谱分析方法通常需要 90 分钟甚至更长的梯度时间。随着 UHPLC 和相关色谱柱技术的进步，肽谱分析所需的梯度时间大大缩短，而 LC 与 MS 检测技术的联用则提供了质量域的一个新维度。本研究使用新型表面多孔肽色谱柱配合 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统，对一种 IgG (1) 治疗性单克隆抗体 (mAb)

进行肽谱分析。结合 MS/MS 分析，肽谱分析色谱柱独特的分离能力可以最大限度提高分离度和效率，可确保实现可靠灵敏的多肽鉴定。

mAb IgG1 在 15 分钟的梯度时间内达到 92.1% 的序列覆盖率。MS/MS 共鉴定出 77 种肽，包括糖基化、氧化和脱酰胺基等多种 PTM。采用 60 分钟

的梯度时，MS/MS 鉴定出 82 种肽，序列覆盖率达到 95.1%。60 分钟的梯度再未鉴定出其他 PTM。使用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱和 15 分钟的大斜率梯度，获得了高序列覆盖的高分离度和高峰容量的肽谱。图 2 显示了 (A) 15 分钟梯度和 (B) 60 分钟梯度的提取化合物叠加色谱图。



图 1. Agilent MassHunter BioConfirm 可实现自动化肽谱数据采集和分析工作流程

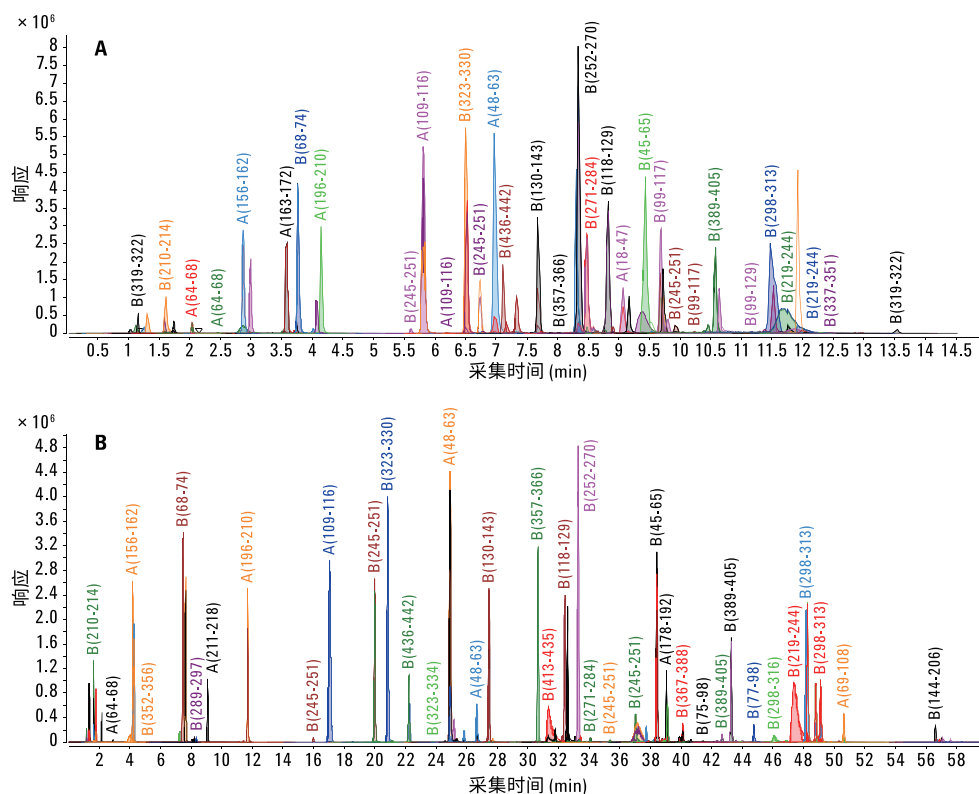


图 2. (A) 15 分钟梯度和 (B) 60 分钟梯度运行鉴定的肽质谱图

脱酰氨基化是肽谱分析中需要监测的一个重要 PTM。储存、纯化和样品处理过程中均有可能发生脱酰氨基化。可通过 LC/MS/MS 肽谱分析实验来确定脱酰氨基化。脱酰氨基化会因添加负电荷而引起结构和功能的变化。在 15 分钟内快速产生的肽谱中，鉴定出含有 Asn 53 的轻链肽 48-63。其天然形式和两种脱酰胺基化形式，即异天冬氨酸和天冬氨酸，被分离为三个峰（图 3A）。图 3B 所示为三个峰的母离子质谱图，图中清楚显示峰 2 和 3 增加了 0.98 Da。异天冬氨酸和天冬氨酸是同质异位素。图 3C 显示了三种肽的 MS/MS 谱图，其中 γ 系列碎片离子是优势的离子。

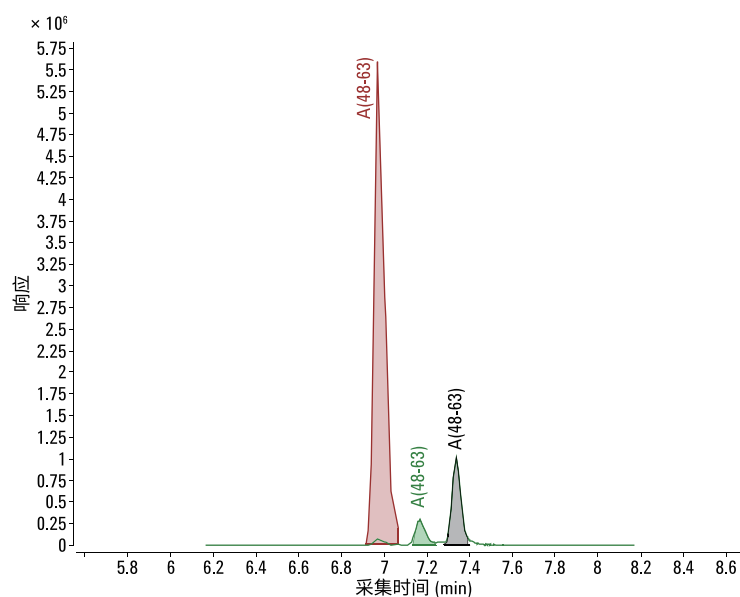


图 3A. 天然肽及其脱酰胺基化肽的提取化合物叠加色谱图。

三种肽均有相同的 γ_{10} 碎片离子，但从 γ_{11} 碎片离子开始，峰 2 和 3 的离子高出 0.98 Da，因此在图 3C 中标出了三个峰的对应序列。自动化合物提取（分子特征提取）还加入了属于肽的所有离子强度（同位素、电荷态、加合物等），在图 3D 肽表中表示为“强度”。通过数据可轻松推导出修饰肽的百分比。在此样品中，两种脱酰胺基形式占比分别为 3.7% 和 13%。

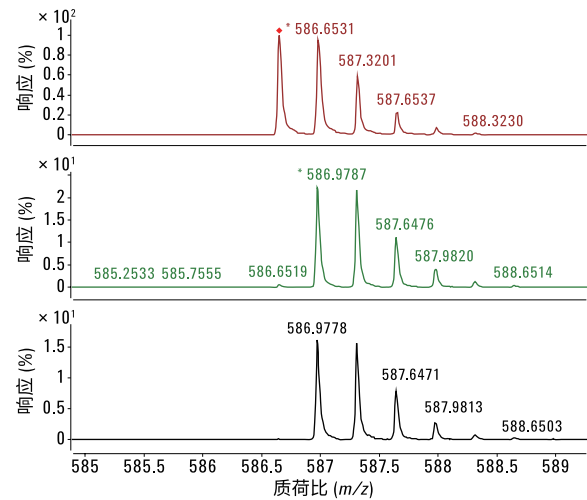


图 3B. 三种肽的 MS 谱图，显示质量差值为 0.98 Da

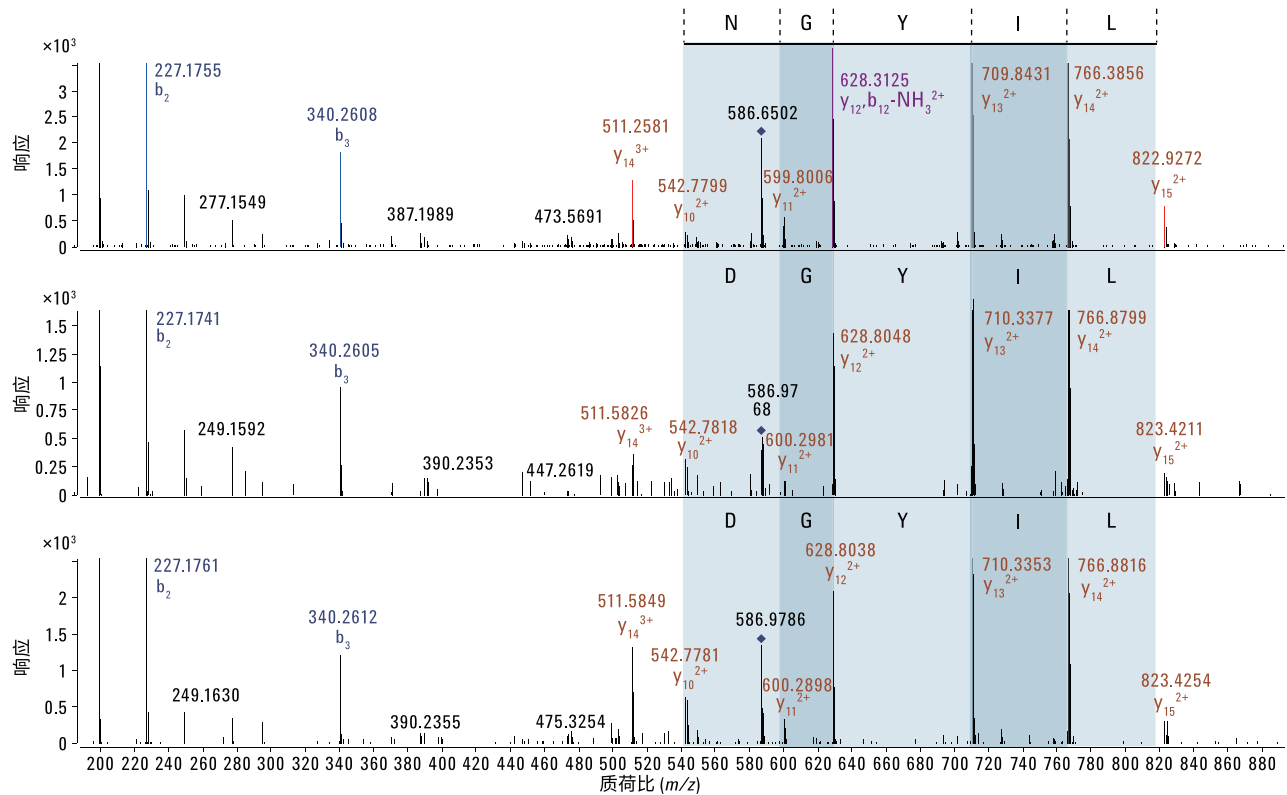


图 3C. 三种肽的 MS/MS 谱图

Compound List							
Automatically Show Columns							
	File	Label	Sequence	Pred Mods	RT	Mass	Vol
1	21_IgG1_AJS_15m_M_PS25_05-r002.d	A(48-63)	LLIYGNSNRPSGVPDR		6.973	1756.9294	19378806
2	21_IgG1_AJS_15m_M_PS25_05-r002.d	A(48-63)	LLIYGNSNRPSGVPDR	1*Deamidation(+0.984016)A53	7.168	1757.917	862153
3	21_IgG1_AJS_15m_M_PS25_05-r002.d	A(48-63)	LLIYGNSNRPSGVPDR	1*Deamidation(+0.984016)A53	7.34	1757.9128	3006008

图 3D. 肽列表，显示了天然肽 A (48-63) 及两种脱酰胺基形式的序列、修饰、保留时间、质量和强度

结论

本文介绍了 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统联用对单克隆抗体所实施的肽谱分析。LC/MS/MS 可确保实现可靠灵敏的肽鉴定。

- 使用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱可对单克隆抗体 (IgG1) 进行快速有效的 HPLC 肽谱分析。分离速度和效率与亚 2 μ m UHPLC 色谱柱性能相当，而系统背压仅为亚 2 μ m 色谱柱的一小部分
- 1290 Infinity 液相色谱系统具有快速和卓越的分离能力，6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统则可为肽鉴定提供出色的质量准确度和灵敏度。MS/MS 功能有助于确认肽鉴定结果，特别适用于修饰的肽。只需 15 分钟运行即可达到 92% 的序列覆盖率
- Agilent MassHunter BioConfirm 软件可实现自动化的数据提取、序列匹配、PTM 鉴定和序列覆盖率计算

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
2013 年 11 月 22 日，中国出版
5991-3600CHCN



Agilent Technologies