



# 利用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 实现常规肽谱分析

## 应用简报

### 作者

David L. Wong  
安捷伦科技有限公司  
Santa Clara, CA, USA

Jing Chen  
安捷伦科技有限公司  
Madison, WI, USA

### 前言

作为当前研究热点的单克隆抗体 (mAb) 是一类迅速扩展的蛋白质生物分子。由于蛋白质药物的异质性，必须对此类生物分子进行广泛的分析表征。

将液相色谱与电喷雾质谱 (LC/MS) 相结合进行肽谱分析是生物制药行业中用于确证 mAb 一级序列的一项成熟技术。全面的表征不仅能提供 mAb 及其异构体的完整氨基酸序列，还能够获得翻译后修饰 (PTM) 及位置的信息<sup>1-3</sup>。然而，数据处理和结果解析自动化工作流程的缺失成为大多数生物制药分析或临床研究实验室的瓶颈。

在本研究中，我们开发了高通量的工作流程，使用 Agilent AssayMAP Bravo 液体处理自动化系统、Agilent 1290 Infinity II UHPLC 系统、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 以及 Agilent BioConfirm 软件（实现自动化数据分析）进行完整的序列映射分析。



图 1. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统

## 实验部分

### 材料与amp;方法

单克隆抗体 (mAb) 标准品 RM 8671 购自美国国家标准技术研究院 (NIST)。DL-二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺 (IAA) 和盐酸胍均购自 Sigma-Aldrich 公司。高品质质谱级胰蛋白酶/Lys-C 混合酶购自 Promega 公司。AssayMAP C18 小柱来自安捷伦科技公司。

Agilent AssayMAP Bravo 液体处理系统用于稀释、消解和脱盐 NIST mAb 样品。然后将样品干燥，使用 0.1% TFA 去离子水溶液对样品进行重悬。在每次 LC/MS/MS 分析中进样约 0.5  $\mu\text{g}$  的 mAb 消解样品。

### LC/MS 分析

将 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 系统与配备安捷伦双喷射流电喷雾离子源的 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统联用，进行 LC/MS 分析。利用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 (2.1  $\times$  150 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ) 进行液相色谱分离。表 1 和表 2 列出了所采用的 LC/MS 参数。

### 数据处理

使用 Agilent MassHunter BioConfirm B.08.00 软件处理从 LC/MS/MS 中采集的原始数据。这种强大的算法简化了下游的数据分析，通过与 NIST mAb 的理论消解序列对比，实现了多肽和 PTM 的自动鉴定。

表 1. 液相色谱参数

Agilent 1290 Infinity II UHPLC 系统	
色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱, 2.1 $\times$ 150 mm, 2.7 $\mu\text{m}$ (部件号 653750-902)
恒温器	4 $^{\circ}\text{C}$
溶剂 A	0.1% 甲酸的水溶液
溶剂 B	0.1% 甲酸的 90% 乙腈溶液
梯度	0-15 min 内 B 由 0 升至 40% 15-18 min 内 B 由 40% 升至 90% 18-20 min 内 B 保持 90%
柱温	60 $^{\circ}\text{C}$
流速	0.4 mL/min
进样量	3.0 $\mu\text{L}$

表 2. 质谱采集参数

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统	
干燥气温度	325 $^{\circ}\text{C}$
干燥气	13 L/min
雾化器压力	35 psig
鞘气温度	275 $^{\circ}\text{C}$
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	500 V
碎裂电压	175 V
锥孔电压	65
四极杆 AMU	95
参比质量	121.0509, 922.0098
采集模式	扩展动态范围 (2 GHz)
质量数范围	$m/z$ 100-1700
采集速率	5 质谱图/秒
自动 MS/MS 范围	$m/z$ 50-1700
最小 MS/MS 采集速率	3 质谱图/秒
分离峰宽	窄 (约 1.3 $m/z$ )
母离子/循环	前十
碰撞能量	$3.6 \cdot (m/z) / 100 - 4.8$
MS/MS 阈值	3000 响应值和 0.001%
动态排除	开启; 重复 3 次, 然后排除 0.2 min
基于母离子丰度的扫描速率	是
目标值	25000
使用 MS/MS 累积时间限	是
纯度	严格性 100%, 截留率 30%
同位素模型	多肽
母离子排序	仅按丰度进行排序; +2, +3, > +3

## 结果与讨论

抗体的全面肽谱分析既复杂又耗时，因为需要对具有各种修饰的数百种多肽进行必要的样品前处理和数据分析。我们使用高通量的 AssayMAP Bravo 液体处理系统、Agilent Infinity II

UHPLC 和安捷伦精确质量 AdvanceBio Q-TOF 系统来应对这些挑战。此外，Agilent MassHunter BioConfirm B.08 软件的自动化数据处理工作流程显著改善了总体数据挖掘和结果准确性。图 2 展示了胰蛋白酶/Lys-C 消解的

NIST mAb 中多肽的提取化合物色谱图 (ECC)。在较短的梯度时间 (15 min) 下获得了出色的色谱分离度。NIST mAb 轻链和重链上每个已识别的多肽用其相应的序列编号进行标记。

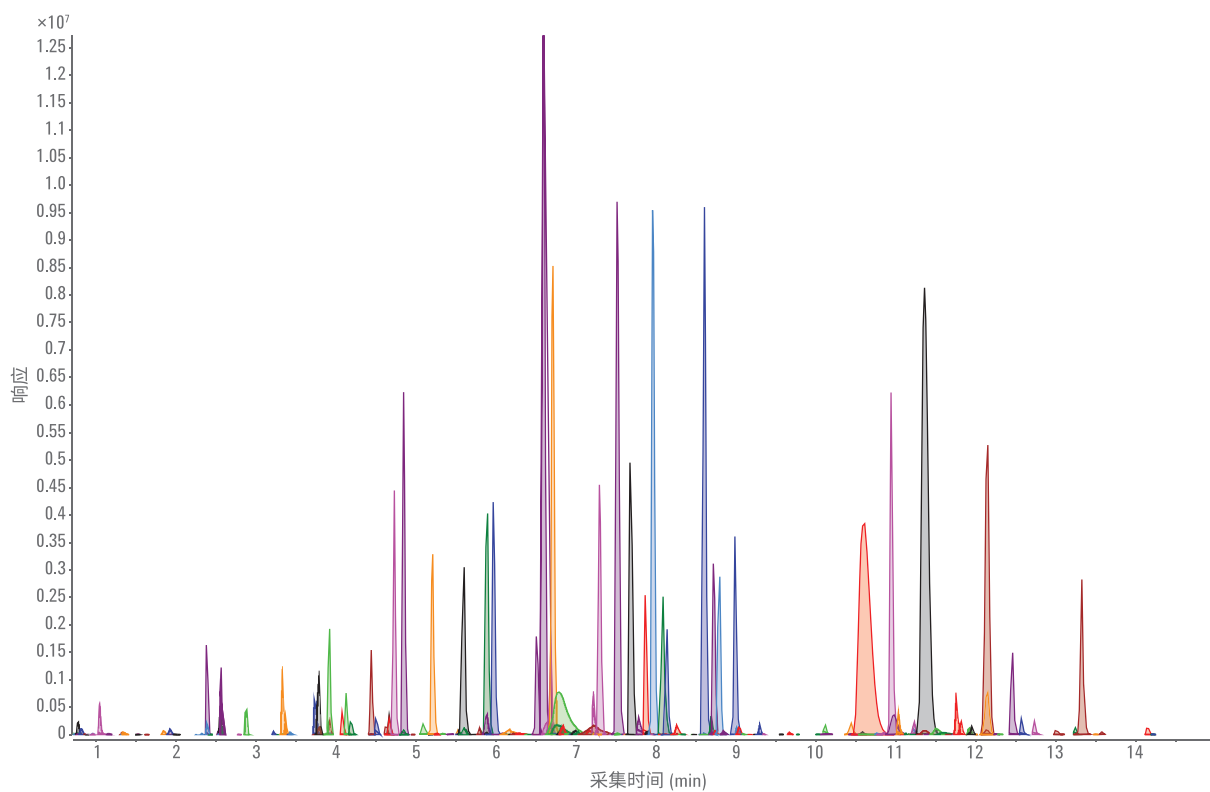


图 2. 采用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱分离的胰蛋白酶/Lys-C 消解 NIST mAb 标准品 RM 8671 的多肽 ECC

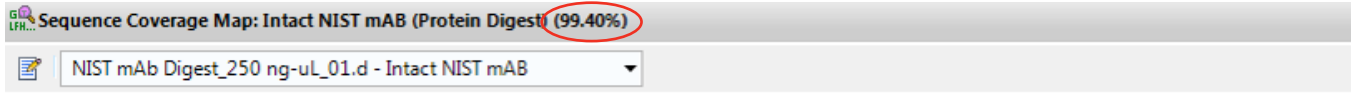
在我们的肽谱分析工作流程中，需要所有匹配的多肽具有 < 5 ppm 的质谱质量数误差，并且具有至少一个确证性 MS/MS 谱图。BioConfirm 得分算法考虑的因素包括：b、y 碎片离子和亚胺离子的存在、质量准确度、MS/MS 峰强度以及其他参数。图 3A 突出显

示了采用 BioConfirm 软件鉴定出的多肽的详细示例。大多数鉴定出的多肽显示了出色的质量准确度，且误差小于 1 ppm。完成多肽鉴定后，系统自动报告 mAb 序列覆盖图。图 3B 显示了利用 15 分钟 UHPLC 梯度所获得的 NIST mAb 的序列覆盖率为 99.4%。

BioConfirm 中的肽谱分析结果汇总（图 4）方便快速查看详细的多肽信息，包括质量数、保留时间、匹配的多肽序列、修饰和匹配得分。使用户能够查看样品的 TIC 和各个多肽的 MS 和 MS/MS 谱图。此外，还提供了用于相对定量分析的前体分子及其碎片离子的丰度。

Score	Mass	RT	Score (MFE)	Seq Loc	Tgt Seq Mass	Diff (Bio, ppm)
88.15	1796.8876	12.1442	100	A(126-141)/ C(126-141)	1796.888	-0.18
84.09	1723.9	6.7992	87.7	B(344-358)/ D(344-358)	1723.9006	-0.33
78.65	1285.6665	7.2351	80	B(348-358)/ D(348-358)	1285.6667	-0.12
77.35	1080.5225	4.7314	100	A(19-28)/ C(19-28)	1080.5234	-0.78
77.03	2101.119	10.6051	100	A(107-125)/ C(107-125)	2101.1208	-0.85
75.94	1320.6706	7.9666	100	B(137-150)/ D(137-150)	1320.6708	-0.14
75.12	1923.0328	6.1898	80	B(342-358)/ D(342-358)	1923.0326	0.07
75.07	3043.3936	7.6842	100	B(418-442)/ D(418-442)	3043.393	0.19
74.63	1501.7518	8.9926	100	A(169-182)/ C(169-182)	1501.7512	0.44
72.94	1806.9981	11.7542	100	B(305-320)/ D(305-320)	1806.9992	-0.61
72.84	785.4405	4.5012	99	A(53-60)/ C(53-60)	785.4396	1.18
71.52	1945.0193	11.6124	80.3	A(108-125)/ C(108-125)	1945.0197	-0.21
71.46	1891.8935	7.8711	100	A(1-18)/ C(1-18)	1891.8946	-0.54
71.22	6712.3081	13.3296	100	B(151-213)/ D(151-213)	6712.3072	0.14
69.7	1872.9134	10.9458	100	B(396-412)/ D(396-412)	1872.9146	-0.6
69.36	1185.6395	9.04	100	B(125-136)/ D(125-136)	1185.6394	0.13
69.19	1160.6214	8.6107	100	B(364-373)/ D(364-373)	1160.6223	-0.81
68.93	1797.872	10.7793	100	A(126-141)/ C(126-141)	1797.872	-0.01
68.64	1676.794	8.7257	100	B(278-291)/ D(278-291)	1676.7947	-0.4
68.24	1847.7825	7.2197	100	B(84-99)/ D(84-99)	1847.7818	0.36
68.23	951.5279	7.5208	100	A(45-52)/ C(45-52)	951.5277	0.16
67.57	1787.889	12.5731	100	B(46-59)/ D(46-59)	1787.8883	0.38
67.42	659.3488	7.2981	100	B(443-449)/ D(443-449)	659.349	-0.28
67.13	1923.0327	6.3056	63.1	B(342-358)/ D(342-358)	1923.0326	0.04
66.7	2228.1847	11.2323	100	B(305-323)/ D(305-323)	2228.1841	0.26
65.35	834.4266	6.6893	100	B(252-258)/ D(252-258)	834.4269	-0.42
65.15	2138.0206	8.795	100	B(259-277)/ D(259-277)	2138.0202	0.22
64.64	487.3003	3.7822	100	A(103-106)/ C(103-106)	487.3006	-0.59
64.38	559.3119	4.4421	100	A(145-148)/ C(145-148)	559.3118	0.06
64.1	574.3323	3.9175	100	B(413-417)/ D(413-417)	574.3326	-0.6

图 3A. Agilent MassHunter BioConfirm B.08 肽谱分析结果表的示例，汇总了 NIST mAb 消化物中所有匹配的多肽的详细信息。大部分鉴定出的多肽的质量准确度小于 1（红框）



A: NIST mAb\_LC Monoisotopic mass: 23113.3043 Average mass: 23127.9774 Molecular formula: C1020H1578N270O330S7

1 N-term DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCSASSRVGMHWYQKPKGKAPKLLIYDTSKSLASGVPSR 60  
 61 FSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCFQGSYPTFFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS 130  
 131 VVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL 200  
 201 SSPVTKSFNRGEC C-term 213

B: NIST mAb\_HC Monoisotopic mass: 49430.7257 Average mass: 49462.5065 Molecular formula: C2212H3430N580O673S17

1 N-term QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTAGMSVGVIRQPPGKALEWLADIWDDKKH 60  
 61 YNPSLKDRLLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARDMIFNFYFDVWQGGTFTVTVSSASTKGPVFP 130  
 131 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT 200  
 201 YICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVDS 270  
 271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI S 340  
 341 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY 410  
 411 SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHTQKSLSPG C-term 449

图 3B. NIST mAb 序列覆盖率汇总

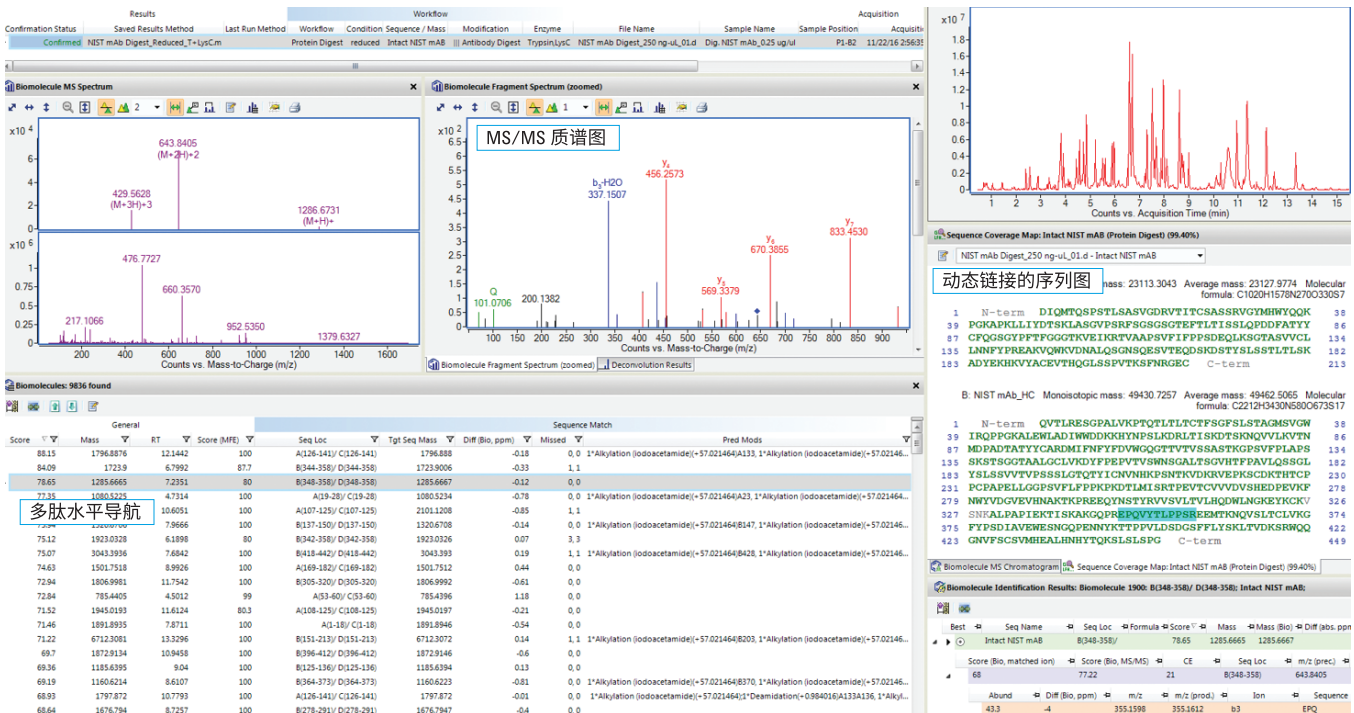


图 4. Agilent MassHunter BioConfirm B.08 软件中典型肽谱分析结果及蛋白质序列覆盖率的屏幕截图

图 5 显示了天然多肽（母离子位于  $m/z = 631.6385$  处, +3) 和 Met 氧化多肽（母离子位于  $m/z = 636.9698$  处, +3) 的 MS/MS 谱图对比结果。b<sub>4</sub>-b<sub>7</sub> 碎片离子（绿框）的主要差异 (+15.99 Da) 明确区分了天然形式和修饰形式，并指出了轻链中 Met-4 是氧化的位置。

类似地，图 6 显示了天然多肽和脱酰胺多肽的 MS/MS 谱图，其中，b<sub>2</sub>-b<sub>3</sub> 碎片离子（紫框）均显示了 0.98 Da 的特征质量数偏移，明确指明了脱酰胺的存在。此外，由于大部分的 y 离子（y<sub>4</sub>-y<sub>8</sub>，以红色突出显示）仍然与天然形式（上图）相同（除了 y<sub>10</sub> 离子），很显然，脱酰胺作用发生在重链 Asn-364 位置。

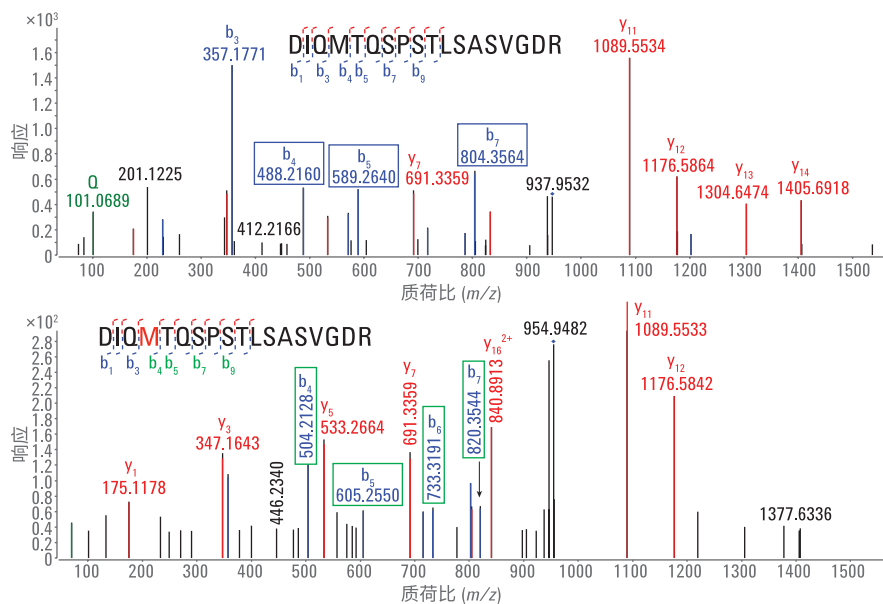


图 5. 翻译后修饰（甲硫氨酸氧化）分析。天然多肽和 Met 氧化多肽（轻链多肽 1-18）的 MS/MS 谱图。上图：天然多肽，下图：在 Met 4 处氧化的多肽（绿框中已确认的碎片离子）

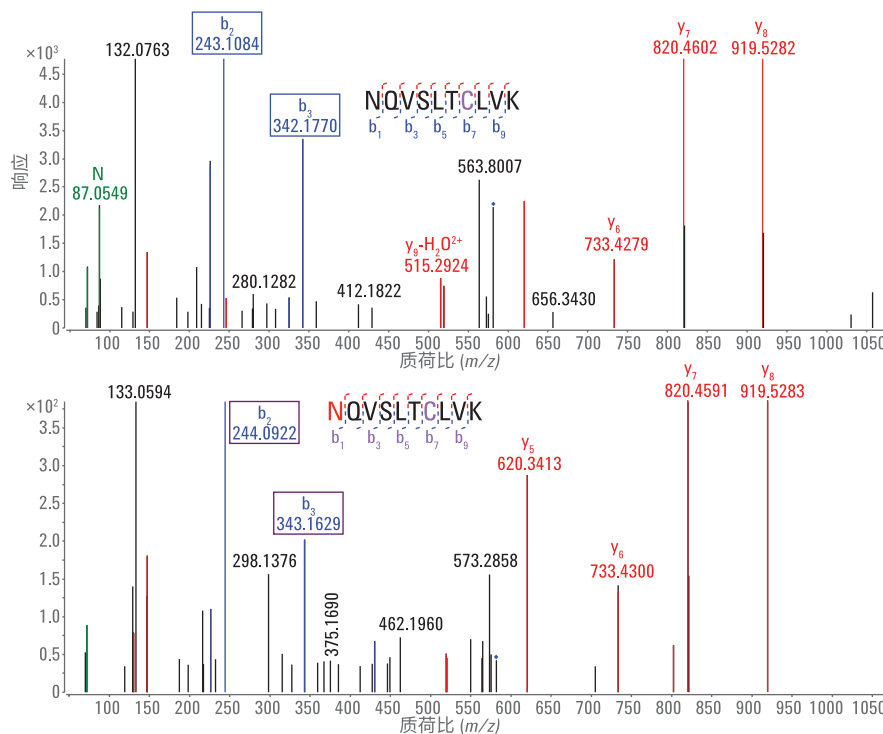


图 6. 翻译后修饰（脱酰胺基作用）分析。天然和脱酰胺多肽（重链：364-373）的 MS/MS 谱图。上图：天然多肽，下图：在 Asn 364 处发生脱酰胺基作用的多肽

## 结论

自动化的样品前处理、快速分离、可靠检测与简化的数据处理的结合，改变了多肽分析的流程，将这项耗时而又繁琐的操作转变成常规工作流程。这可能源于该流程中每个组件的可靠特性以及高性能，包括 Agilent AssayMAP Bravo，以及 Agilent MassHunter BioConfirm B.08 的数据处理功能。Agilent 1290 Infinity II UHPLC 和 Agilent AdvanceBio 多肽分析色谱柱的分离功能，以及 MassHunter BioConfirm 自动化的处理功能大大缩短了总的分析时间。Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的高准确度和分辨率体现在分析完整的蛋白质消解物时所获得的一致精确结果。

## 参考文献

1. 自动化液质联用样品前处理：  
通过 Agilent AssayMAP Bravo 平台实现高通量溶液内酶解和多肽纯化，安捷伦科技公司，出版号 5991-2957CHCN
2. 快速高效的单克隆抗体 (mAb) 肽谱分析：UHPLC 性能与表面多孔颗粒相结合，安捷伦科技公司，出版号 5991-3585CHCN
3. High Resolution and Rapid Peptide Mapping of Monoclonal Antibody Using an Agilent 1290 Infinity UHPLC and an Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS System (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的快速肽谱分析)，安捷伦科技公司，出版号 5991-3600EN

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

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，2017

2017年2月22日，中国出版

5991-7815CHCN



**Agilent Technologies**