

使用 Agilent AssayMAP Bravo 和 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 分析宿主细胞蛋白质

作者

Linfeng Wu、Shuai Wu
和 Te-Wei Chu
安捷伦科技有限公司，
美国加利福尼亚州圣克拉拉市

前言

生物药物（如单克隆抗体 (mAb)）的使用正在快速增加。生物药物为生物来源，因此即使经过多个纯化步骤，最终产品中仍然可能残留一些低浓度宿主细胞蛋白质 (HCP)。由于它们可能影响产品安全性和功效，因此根据法规要求必须对药品中的 HCP 浓度进行监测和控制¹。传统上，酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 是定量分析蛋白质治疗药物中 HCP 的标准方法。然而，ELISA 的特异性和覆盖率不足以鉴定并定量分析各种 HCP。因此，LC/MS 技术成为 HCP 分析的选择之一。在 HCP 的 LC/MS 分析过程中，主要挑战在于低丰度 HCP 肽段与高丰度药品肽段的共洗脱。这要求 LC/MS 系统具有更出色的肽段分离度以及宽动态范围。

本研究展示了一种 HCP 分析工作流程，该工作流程包括采用 Agilent AssayMAP Bravo 平台进行自动化样品前处理，采用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 进行 LC-MS/MS 分析，以及采用 Protein Metrics 的厂商中立的软件进行数据分析（图 1）。利用 AssayMAP Bravo 平台进行自动化样品前处理，包括蛋白质消解、脱盐、柱上高 pH 反相 (HPRP) 分馏。对经过或未经 HPRP 分馏的消解样品进行 LC-MS/MS 分析，以考察平台性能。结果表明，采用新型采集方法（即迭代 MS/MS）能够改善蛋白质鉴定。此标准流程 LC/Q-TOF 系统表现出宽动态范围、优异的重现性和半定量能力。结果还表明，通过将柱上样品分馏与迭代 MS/MS 联用，所有高于 2 ppm 的 HCP 均得到可靠鉴定。



图 1. 安捷伦 HCP 工作流程概述

实验部分

材料

人 IgG1 mAb（来自合作伙伴的一种研发产品）由中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞产生，并经过 Protein A 纯化。蛋白质组学动态范围标样组 (UPS2) 购自 Sigma-Aldrich。

仪器

- Agilent AssayMAP Bravo 系统
- Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统，包括：
 - Agilent 1290 Infinity II 高速泵 G7120A
 - Agilent 1290 Infinity II Multisampler G7167B
 - Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 G7116B
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
- 安捷伦双喷射流电喷雾离子源

样品前处理

按 1:1000 的比例将 UPS2 加标至 mAb 中。同时制备第二个样品（包含 mAb，未加标 UPS2）并作为阴性对照进行平行分析，以确保鉴定出的 UPS2 蛋白质不是来源于对照样品中存在的序列同源物。使用 AssayMAP Bravo 系统对两个样品进行还原、烷基化、胰蛋白酶消解和脱盐。然后将样品等分，一份等分样品使用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统直接进行 LC-MS/MS 分析，另一份等分样品在 AssayMAP Bravo 系统上使用 HPRP 方法进行分馏，然后进行 LC-MS/MS 分析。

HPRP 分馏

使用 AssayMAP Bravo 上预配置的蛋白质样品前处理工作台 Fractionation 应用程序，在安捷伦反相 (RP-S) 小柱上将溶解后的样品分馏得到六种馏分 (图 2)。首先用 70% 乙腈 (ACN)、0.1% 三氟乙酸 (TFA) 灌注 RP-S 柱，并用 0.1% TFA 平衡。然后，将 150 µg 溶解后的样品上样到每根小柱上，并使用 10 mmol/L 甲酸铵缓冲液 (pH 10，其中 ACN 含量按 10%、15%、20%、25%、30% 和 90% 逐渐增加) 洗脱得到六种馏分。

LC/MS 分析

在 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱 (2.1 × 150 mm, 2.7 µm, 部件号 675950-902) 上采用 60 min 液相色谱方法进行液相色谱分离，流速为 0.4 mL/min (表 1)。每个样品在 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统上使用传统的自动 MS/MS 方法或迭代 MS/MS 方法 (如表 2 中所示) 进行分析。

表 1. 液相色谱参数

液相色谱参数	
分析柱	AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 × 150 mm, 2.7 µm (部件号 675950-902)
流动相 A	H ₂ O, 0.1% 甲酸
流动相 B	90% ACN, 0.1% 甲酸
流速	0.4 mL/min
梯度	1.0 分钟时 B 为 3% 50.0 分钟时 B 为 21% 53.0 分钟时 B 为 90% 55.0 分钟时 B 为 90% 55.1 分钟时 B 为 3%
停止时间	60 分钟
柱温	60 °C

表 2. 质谱参数

质谱参数	
干燥气温度	290 °C
干燥气流速	13 L/min
雾化器	35 psi
鞘气温度	275 °C
鞘气流速	12 L/min
分离峰宽	窄 (约 1.3 m/z)
运行内的动态排除	0.2 分钟后发布 1 幅色谱图
MS 质量数范围	250–1700 m/z
MS 采集速率	10 幅谱图/秒
MS/MS 质量数范围	50–1700 m/z
MS/MS 采集速率	3 幅谱图/秒
采集模式	如所示的迭代 MS/MS 或自动 MS/MS
迭代 MS/MS	质量数误差范围: 15 ppm 保留时间排除范围: -0.2 分钟至 +0.4 分钟

Fractionation: Using AssayMAP v1.0

A. Run Plate Stacking Utility
Number of Fractions: 6

B. Application Settings
Number of Full Columns of Cartridges: 1

Step	Conduct Step?	Volume (µL)	Flow Rate (µL/min)	Wash Cycles
Initial Syringe Wash	<input checked="" type="checkbox"/>			3
Prime Cartridges	<input checked="" type="checkbox"/>	100	300	1
Equilibrate Cartridges	<input checked="" type="checkbox"/>	50	10	1
Load Sample	<input checked="" type="checkbox"/>	100	5	3
Collect Flow Through	<input checked="" type="checkbox"/>			
Cartridge Cup Wash	<input checked="" type="checkbox"/>	50		1
Internal Cartridge Wash	<input checked="" type="checkbox"/>	25	5	3
Add Wash to Flow Through	<input checked="" type="checkbox"/>			
Predispense Elution Buffer	<input checked="" type="checkbox"/>	25		
Elute Fraction 1	<input checked="" type="checkbox"/>	25	5	1
Elute Fraction 2	<input checked="" type="checkbox"/>	25	5	1
Elute Fraction 3	<input checked="" type="checkbox"/>	25	5	1
Elute Fraction 4	<input checked="" type="checkbox"/>	25	5	1
Elute Fraction 5	<input checked="" type="checkbox"/>	25	5	1
Elute Fraction 6	<input checked="" type="checkbox"/>	25	5	1
Final Syringe Wash	<input checked="" type="checkbox"/>			3

C. Deck Layout

1. Wash Station
2. Cartridges
3. Organic Waste Plate
4. Elution Buffer Stack
5. Sample Plate
6. Priming Buffer Plate
7. Fraction Collection Stack
8. Flow Through Plate
9. Equilibration Buffer Plate

D. Labware Table

Deck Location	Labware Type
1	96AM Wash Station
2	96AM Cartridge & Tip Seating Station
3	96 AbGene 1127, 1 mL Deep Well, Square Well, Round Bottom
4	Stack of n*: 96 Greiner 650201, U-Bottom Standard PolyPro
5	96 Greiner 650201, U-Bottom Standard PolyPro
6	96 Greiner 650201, U-Bottom Standard PolyPro
7	Stack of n*: 96 Greiner 650201, U-Bottom Standard PolyPro
8	96 Greiner 650201, U-Bottom Standard PolyPro
9	96 Greiner 650201, U-Bottom Standard PolyPro

* The number of plates in a stack equals the Number of Fractions (0 to 6).

Status

- Stack Plates
- Run Fractionation
- Pause Protocol
- Save Settings
- Restore Defaults
- App Library

图 2. 采用默认设置的 Fractionation 应用程序用户界面

数据处理

使用来自 Protein Metrics Inc. 的软件对原始数据文件进行处理。采用 Preview 对一个原始数据文件进行搜索以生成 Byonic 参数。所有原始数据文件均在 Uniprot CHO K1 蛋白质数据库中进行搜索，该数据库使用 Byonic 与 mAb 和 UPS2 蛋白质序列相关联。搜索参数包括半特异性胰蛋白酶消解、最多两个未裂解肽段、20 ppm 母离子质量数容差、30 ppm 碎片离子质量数容差、固定半胱氨酸 (C) 烷基化、可变甲硫氨酸 (M) 氧化、天冬酰胺 (N) 和谷氨酰胺 (Q) 脱酰胺基化以及 Preview 分析所表明的其他可变修饰。将 Byonic 结果文件导入 Byologic，对较小的蛋白质序列组进行进一步详细分析，并报告结果。在 MS2 搜索中，采用最低得分 150 对肽段进行筛选。

结果与讨论

迭代 MS/MS 与自动 MS/MS 的比较

Agilent 6545XT AdvanceBio Q-TOF 系统提供了一种全新的数据采集方法，即迭代 MS/MS，该方法改善了对低丰度母离子的鉴定（图 3）。使用这种方法，对蛋白质消解样品进行多次 LC-MS/MS 分析。第一次分析为传统的自动 MS/MS 运行，使用数据依赖型采集。在随后的迭代 LC-MS/MS 分析中，采用自定义的质量数误差范围和保留时间排除范围自动循环排除此前选择进行 MS/MS 碎裂的母离子。因此，通过 LC-MS/MS 自动审查了更多母离子。

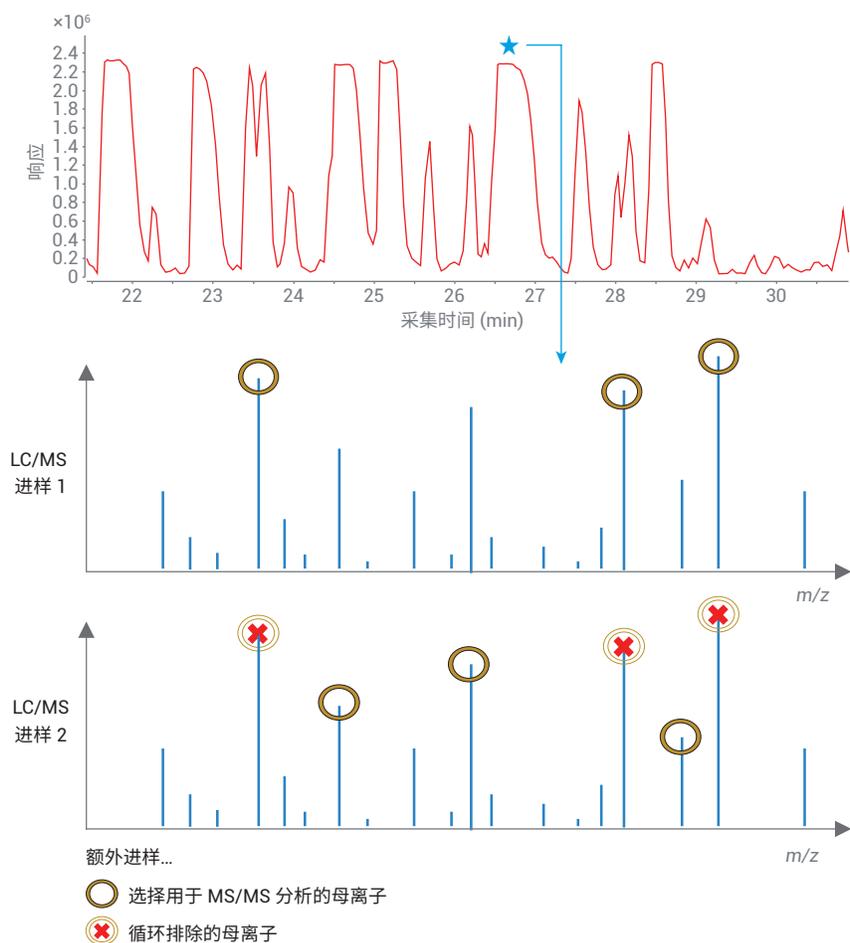


图 3. 自动迭代 MS/MS 采集方法示意图

我们首先使用不包括任何离线分馏的 LC/Q-TOF 系统对迭代 MS/MS 与自动 MS/MS 进行比较，即利用两种方法对加标 UPS2 的纯化后的 mAb 进行分析。UPS2 是由 Sigma-Aldrich 生产的蛋白质组学动态范围标样，该标样是包含 48 种人类蛋白质的复杂蛋白质混合物，这些蛋白质有六种浓度水平，处于 500 amol 至

50 pmol 范围内。在消解之前按 1:1000 的比例 (w/w) 将 UPS2 加入 mAb 样品中，使蛋白质浓度在 0.0004 ppm 至 313 ppm 范围内，其中 19 种蛋白质的浓度高于 1 ppm。此加标样品模拟治疗蛋白质中存在的 HCP 的宽动态范围。我们还可以使用此加标样品评估本研究所考察的不同方法的灵敏度和动态范围。

表 3 展示了通过各种采集方法鉴定出的 mAb 和 UPS2 蛋白质的独特肽段序列的总数。将具有相同氨基酸序列但经过不同修饰的肽段视为一种独特肽段序列。每次进样的载样量为 32 μg ，每种采集方法进行三次进样。总体而言，对于每个蛋白质，迭代 MS/MS 可在宽动态范围内鉴定出更多的独特肽段序列。所有浓度高于 8 ppm 的加标蛋白质均得到可靠鉴定。本文展示的所有其他结果均通过迭代 MS/MS 得到。

色谱重现性和动态范围

我们还使用上述迭代 MS/MS 分析中三次进样所采集的数据集对色谱重现性和动态范围进行了评估。图 4 展示了由三次迭代 LC-MS/MS 运行得到的基峰色谱图 (BPC) 的叠加谱图以及四种共洗脱母离子的提取离子色谱图。由于色谱柱上的载样量较高，因此 mAb 肽段产生的许多信号使质谱检测器饱和，在 BPC 中表现为平台段。有关这四种共洗脱肽段母离子的详细信息汇总于表 4 中。观察到共洗脱肽

表 3. 采用迭代 MS/MS 或自动 MS/MS 采集方法鉴定出的独特肽段序列的数量

蛋白质标识	分子量 (kDa)	蛋白质加标浓度 (ppm)	每种方法进样三次	
			迭代 MS/MS	自动 MS/MS
mAb_HC	49.7	不适用	419	382
mAb_LC	24.0	不适用	201	186
ALBU_HUMAN_spike	66.4	313.0	46	43
CAH2_HUMAN_spike	29.1	137.3	19	15
CAH1_HUMAN_spike	28.7	135.6	9	9
LEP_HUMAN_spike	16.2	76.2	4	1
HBB_HUMAN_spike	15.9	74.8	12	10
HBA_HUMAN_spike	15.1	71.3	7	6
UBIQ_HUMAN_spike	10.6	50.0	6	6
CO5_HUMAN_spike	8.6	40.4	4	4
CATA_HUMAN_spike	59.6	28.1	2	2
SUMO1_HUMAN_spike	38.8	18.3	3	1
NQO1_HUMAN_spike	30.7	14.5	2	0
PRDX1_HUMAN_spike	22.0	10.4	3	0
PPIA_HUMAN_spike	20.2	9.5	4	4
MYG_HUMAN_spike	17.1	8.0	2	1

段具有优异的色谱重现性，并且在极宽的动态范围内获得了出色的定量重现性 (峰强度为 6.76×10^3 至 1.38×10^8)。对于丰度最低的肌红蛋白肽 (加标浓度为

8 ppm)，RSD 值为 10.3%。这些数据表明 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统具有优异的谱图内动态范围和重现性。

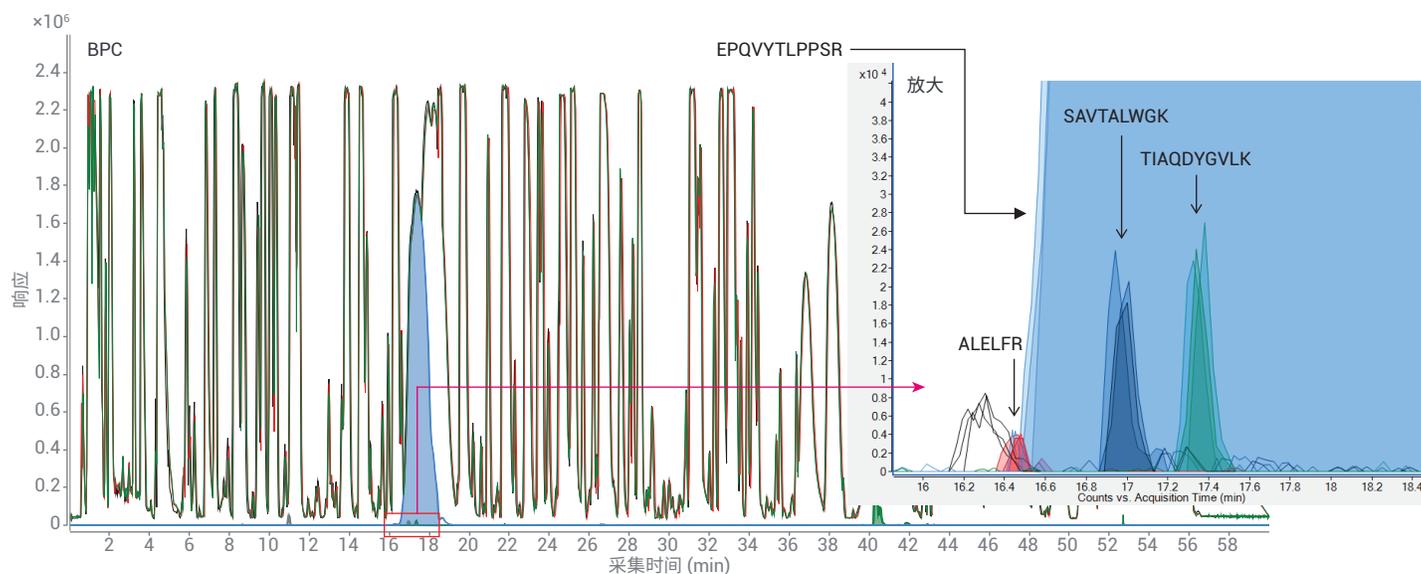


图 4. 三次 LC-MS/MS 运行的 BPC 叠加色谱图和所选的四种肽段母离子的提取离子色谱图

半定量分析

我们还使用上述迭代 MS/MS 分析中三次进样所采集的数据文件探讨了此工作流程解决方案的半定量分析能力。将使用所有测得的肽段鉴定出的每种 UPS2 蛋白质的总提取离子色谱图 (XIC) 归一化至样品中浓度最高的蛋白质 (本研究中为 mAb 重链), 并将值直接从 Byologic 软件中导出。图 5 展示了 mAb 对照样品 (蓝色) 和 UPS2 加标样品 (橙色) 中每种蛋白质的归一化 XIC (左侧 Y 轴) 相对于加标样品中实际 UPS2 蛋白质浓度 (绿色, 右侧 Y 轴) 所绘制的图。与预期结果一样, mAb 对照样品中不存在来源于 UPS2 蛋白质的 XIC 信号, 证明此工作流程解决方案具有高特异性。在 UPS2 加标样品中, 归一化 XIC 与 ppm 级的实际蛋白质加标浓度相关。这些结果表明, Byologic 软件报告的归一化 XIC 值提供了对 HCP 丰度的半定量估计结果。

表 4. 所选的四种肽段母离子的数据

肽段	母离子 (m/z)	质量数误差 (ppm)	强度	强度 %RSD	蛋白质加标浓度 (ppm)	蛋白质名称
ALELFR	374.7208	-1.1	6.76E+03	10.3%	8	肌红蛋白
TIAQDYGVLK	554.3049	-1.8	1.51E+05	6.2%	10.4	过氧化物酶 1
SAVTALWGK	466.7659	4.8	1.36E+05	6.0%	74.8	血红蛋白 β 亚基
EPQVYTLPPSR	643.844	1.0	1.38E+08	1.2%	不适用	mAb

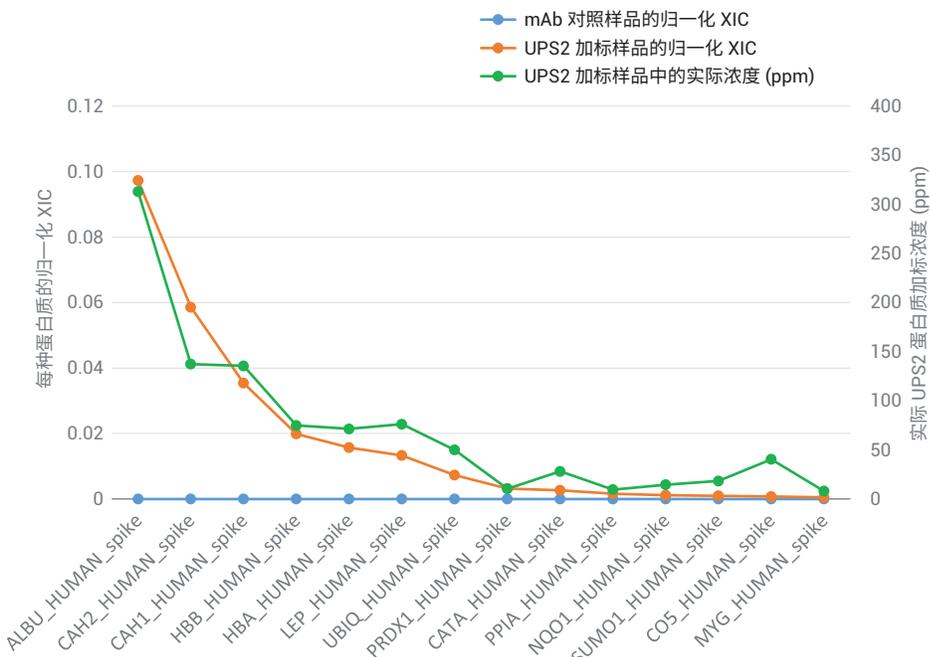


图 5. 每种蛋白质的归一化 XIC 与实际 UPS2 加标浓度之间的对比。将每种蛋白质的 XIC 归一化至 mAb 重链, 并将 mAb 对照样品 (蓝色) 和 UPS2 加标样品 (橙色) 中的这些值与 UPS2 加标样品中实际蛋白质浓度 (绿色) 作图

使用 AssayMAP Bravo 通过 HPRP 分馏改善鉴定

使用 Agilent AssayMAP Bravo 样品前处理平台，通过微量色谱柱以及以任务为中心的自动化方案，实现了多种核心蛋白质样品前处理工作的自动化（例如，

蛋白质消解、肽段净化、免疫亲和纯化等)²⁻⁴。利用同一自动化平台，我们还证明了使用 RP-S 小柱进行 HPRP 分馏能够改善鉴定灵敏度。将 150 μg 的消解样品上样到各个 RP-S 小柱，并使用简便易用的高 pH 分馏方案洗脱为六种馏分。每

种馏分进行两次迭代 MS/MS 分析。图 6 展示了 LC-MS/MS 分析未分馏样品以及 HPRP 洗脱物的 TIC 信号对比，证明了 RP-S 小柱的色谱分离效果。

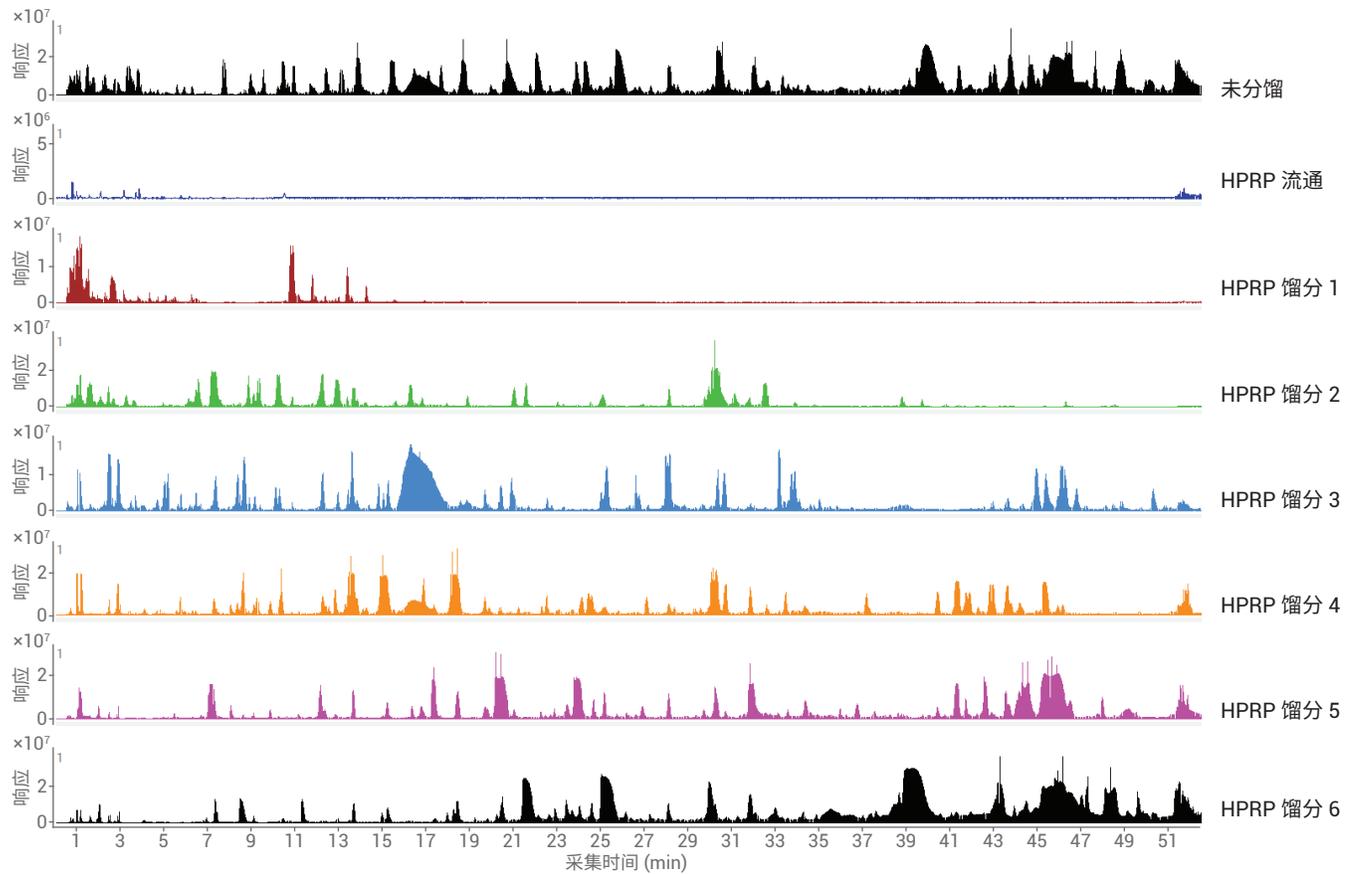


图 6. 由未分馏样品和 HPRP 分馏样品得到的 TIC 信号

手动检查来自低丰度加标蛋白质的肽段的 MS/MS 谱图，确保获得高质量谱图并且不存在来源于内源性 CHO HCP 的同源物污染。所有浓度高于 2 ppm 的加标蛋白质均得到可靠鉴定，证明使用 HPRP 分馏能够提高鉴定灵敏度（表 5，与表 3 比较）。图 7 展示了来自人 KCRM 蛋白质（加标浓度为 2 ppm）的肽段 IEEIFK 的 MS/MS 谱图。

表 5. 将 AssayMAP HPRP 分馏与每种馏分运行两次迭代 MS/MS 联用来鉴定 UPS2 加标蛋白质中的独特肽段序列

蛋白质标识	分子量 (kDa)	蛋白质加标浓度 (ppm)	独特肽段序列数量
ALBU_HUMAN_spike	66.4	313.0	79
CAH2_HUMAN_spike	29.1	137.3	32
CAH1_HUMAN_spike	28.7	135.6	15
LEP_HUMAN_spike	16.2	76.2	6
HBB_HUMAN_spike	15.9	74.8	22
HBA_HUMAN_spike	15.1	71.3	14
UBIQ_HUMAN_spike	10.6	50.0	9
CO5_HUMAN_spike	8.6	40.4	6
CATA_HUMAN_spike	59.6	28.1	14
SUMO1_HUMAN_spike	38.8	18.3	11
NQO1_HUMAN_spike	30.7	14.5	8
PRDX1_HUMAN_spike	22.0	10.4	9
PPIA_HUMAN_spike	20.2	9.5	11
MYG_HUMAN_spike	17.1	8.0	2
CYB5_HUMAN_spike	16.0	7.6	2
EGR_HUMAN_spike	6.4	3.0	1
SYHC_HUMAN_spike	58.2	2.7	5
KCRM_HUMAN_spike	43.1	2.0	3

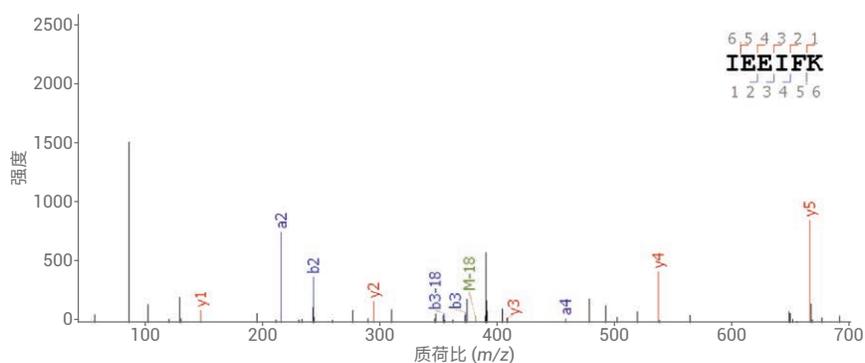


图 7. 来源于加标浓度为 2 ppm 的 KCRM 蛋白质的肽段 IEEIFK 的 MS/MS 谱图

还考察了 HPRP 分馏对鉴定内源性 CHO HCP 的影响。图 8 展示了在 1% 蛋白质假阳性率下未分馏样品和 HPRP 分馏样品之间鉴定出的 CHO 蛋白质的数量。未分馏样品进行三次迭代 MS/MS 分析，HPRP 分馏样品的每种馏分进行两次迭代 MS/MS 分析。结果表明，使用 HPRP 分馏与迭代 MS/MS 联用鉴定出的蛋白质增加了三倍（138 对 38）。

所有上述结果证明了柱上 HPRP 分馏在改善 HCP 鉴定中的优势。

结论

本研究展示了一种宿主细胞蛋白质分析工作流程，该工作流程包括采用 AssayMAP Bravo 平台进行自动化样品前处理，采用 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 进行 LC-MS/MS 分析，以及采用 Protein Metrics 的厂商中立软件进行数据分析。

- 采用微量色谱柱和以任务为中心的自动化方案的 AssayMAP Bravo 平台为样品前处理自动化带来了前所未有的重现性、可扩展性、灵活性和简便易用性
- 迭代 MS/MS 改善了蛋白质鉴定覆盖率。将 LC-MS/MS 与迭代 MS/MS 采集联用，所有浓度高于 8 ppm 的加标标准蛋白质均可得到可靠鉴定

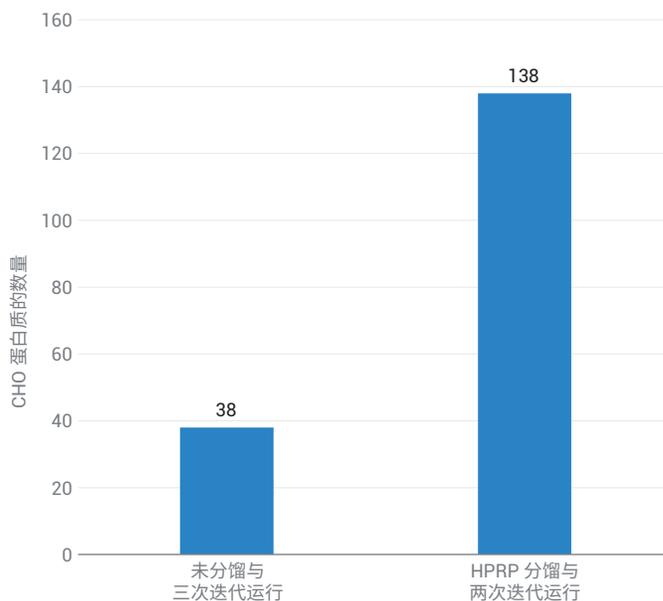


图 8. 通过与迭代 MS/MS 采集联用，在未分馏样品与 HPRP 分馏样品中鉴定出的内源性 CHO HCP 的数量对比

- 此标准流程 LC/Q-TOF 系统表现出了宽动态范围和优异的重现性
- 通过使用 AssayMAP Bravo 进行 HPRP 分馏，所有浓度高于 2 ppm 的加标蛋白质均得到可靠鉴定
- 利用数据依赖型采集的数据文件可实现简单快速的蛋白质鉴定和半定量

参考文献

1. ICH Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products
2. 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
3. Automation of Sample Preparation for Accurate and Scalable Quantification and Characterization of Biotherapeutic Proteins Using the Agilent AssayMAP Bravo Platform (利用 Agilent AssayMAP Bravo 平台，通过自动化样品前处理实现生物治疗蛋白质准确而可扩展的定量和表征分析)，安捷伦科技公司，出版号 5991-4872EN
4. Agilent AssayMAP Bravo Technology Enables Reproducible Automated Phosphopeptide Enrichment from Complex Mixtures Using High Capacity Fe(III)-NTA Cartridges (采用大容量 Fe(III)-NTA 小柱通过 Agilent AssayMAP Bravo 技术实现复杂混合物中可重现的自动化磷酸肽富集)，安捷伦科技公司，出版号 5991-6073EN

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

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，2018
2018 年 7 月 2 日，中国出版
5991-9300ZHCN

 **Agilent**
Trusted Answers