

LC|GC's **CHROM**academy

powered by crawford scientific

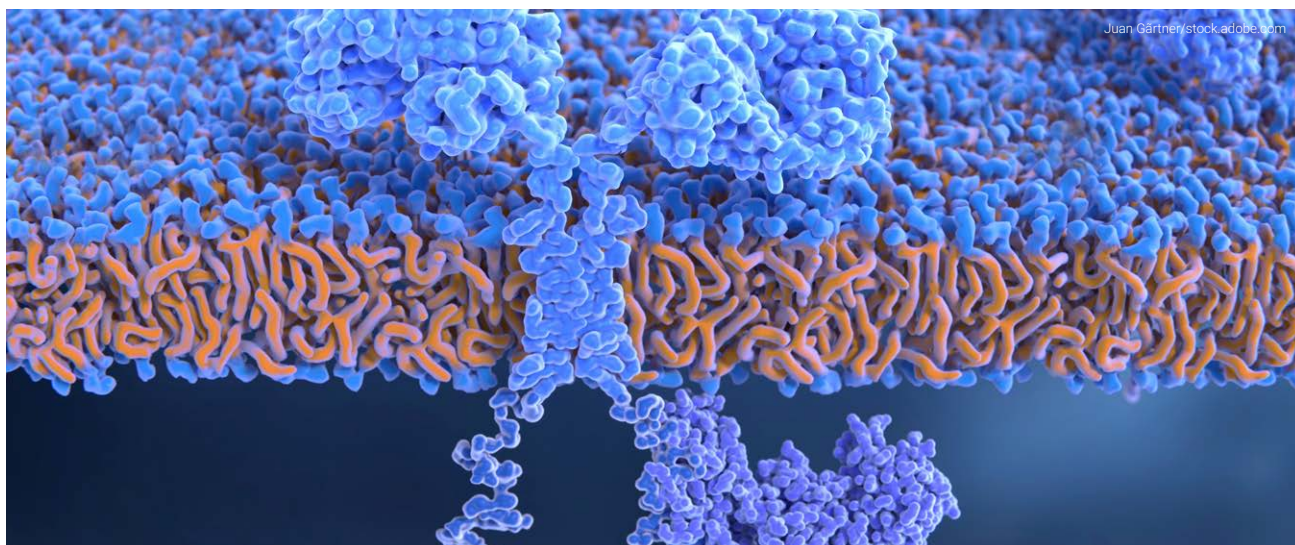


用于分离、鉴定和定量生物分子的创新解决方案

生物治疗性糖蛋白的糖基化和唾液酸分析

用于生物分子分离的二维液相色谱法

SARS-CoV-2 刺突糖肽的鉴定、分析和定量



生物治疗性糖蛋白的糖基化和唾液酸分析

John Yan

使用基于板的方法和 LC/FLD/MS 方法鉴定不同唾液酸化 N-糖类物质以及定量生物治疗性糖蛋白唾液酸含量的方法。

前言

唾液酸在介导重组治疗性糖蛋白的有效性中具有非常重要的作用。多聚糖的非还原末端是否存在唾液酸会影响生物治疗蛋白质的药代动力学以及潜在的免疫原性。因此, 在生产过程中必须对唾液酸化进行监测和控制。本文介绍了一种方法, 使用基于板的方法以及液相色谱 (LC) 与荧光 (FL) 和质谱 (MS) 检测方法鉴定不同唾液酸化 N-糖类物质以及定量生物治疗性糖蛋白的唾液酸含量。还讨论了荧光染料在 N-糖分析方面的优势、改进的唾液酸定量和分析工作流程, 以及利用荧光和质谱 (MS) 检测的色谱分离选项。

生物治疗性糖蛋白的糖基化和唾液酸分析

糖基化生物治疗药物

尽管糖组学不像基因组学和蛋白质组学那样备受关注, 但已知 SwissProt 数据库中五分之一的蛋白质含糖基化修饰。糖基化可能影响蛋白质折叠、稳定性和功能, 并基于糖基化位点、多聚糖组成、多聚糖长度和结构赋予其多样性。超过 60% 的上市生物治疗药物含糖基化修饰。糖基化是一种关键质量属性, 同时作为产品质量属性进行监测。两种主要的糖基化类型是 O-糖和 N-糖的加成, 但 N-糖基化 (其中在定义的共有序列内, 多聚糖连接至天冬酰胺残基的酰胺氮原子) 是生物治疗药物中最常见的糖基化类型。

2010 年, 在十大畅销药品中, 只有 Epogen 是糖基化分子。到 2018 年, 十大畅销药品中有七种是糖基化生物制剂, 其中最畅销的是修美乐 (Humira), 这突出体现了制药行业向生物药物的总体转变。

从分析表征的角度来看, 生物治疗药物比小分子要复杂得多。例如, 小分子药物阿司匹林的分子量约为 180 Da。相比之下, 基于免疫球蛋白 G (IgG) 的生物药物的分子量约为 150000 Da, 并具有多种可能影响药物作用的翻译后修饰 (包括糖基化)。多聚糖由多个单糖单元构成, 例如岩藻糖、甘露糖、半乳糖、N-乙酰氨基葡萄糖和多种唾液酸, 如

图 1: N-糖结构对生物治疗药物的影响

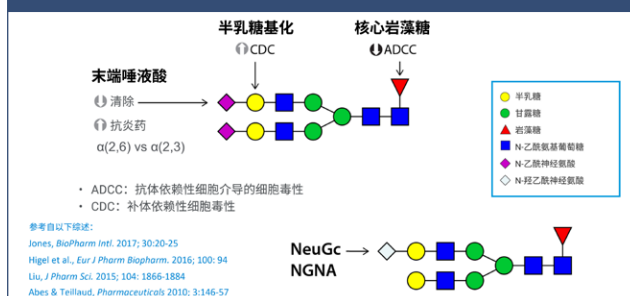


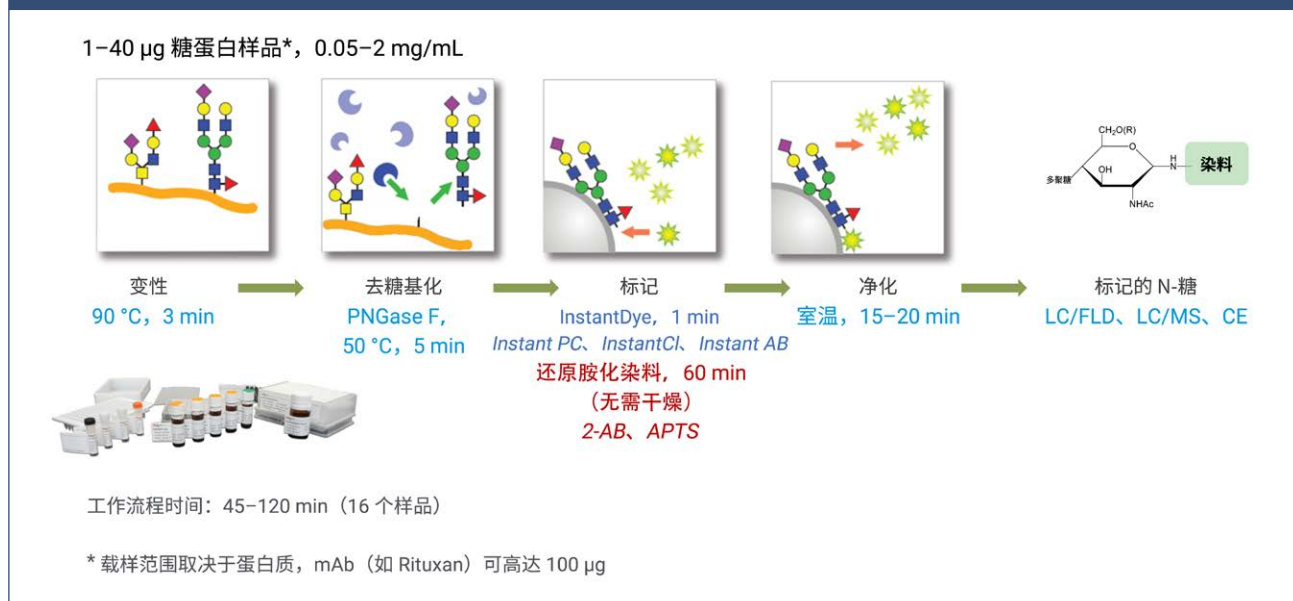
图 1 所示。核心岩藻糖的存在会降低抗体依赖性细胞毒性 (ADCC), 这对于癌症治疗非常重要。因此, 开发生物治疗药物的公司尝试降低核心岩藻糖的含量, 从而尽可能提高 ADCC 活性。文献中还表明, 半乳糖基化的存在会提高补体依赖性细胞毒性 (CDC) 活性, 而末端唾液酸的存在会降低清除率, 从而延长治疗药物在体内停留的时间。

N-糖分析

可使用许多不同的技术进行 N-糖分析。在完整蛋白质水平, 液相色谱分离与高分辨率精确质谱可以结合用于提供有关存在的多聚糖类型的信息。另一种选择是使用蛋白酶将糖蛋白酶解成肽, 这些肽可以通过液相色谱进行分离, 并通过串联质谱进行分析, 使用数据库搜索获得位点特异性糖基化信息。另一种方法涉及使用酶 (如 PNGase F) 分析糖蛋白中 N-糖的酶促释放。游离多聚糖可以按原样进行分析, 或通常用荧光标签进行

生物治疗性糖蛋白的糖基化和唾液酸分析

图 2: Gly-X N-糖样品前处理技术



标记, 从而可以使用液相色谱或毛细管电泳 (CE) 分离技术与荧光检测进行分析, 获得的数据通常表示为不同多聚糖种类的相对面积百分比。

也可以在酸水解后, 直接或在用荧光标签标记后在单个单糖水平监测多聚糖。

N-糖样品前处理

传统的 N-糖样品前处理是一个非常耗时的过程, 需要一到数天的时间进行过夜去糖基化和标记步骤。几年前, 推出了一种一体化解决方案工作流程, 使用传统的还原胺化荧光团 (例如 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 和氨基苝三磺酸盐), 将样品前处理时间缩短至 5 小时。

然后使用快速糖胺反应性染料进行了进一步的改进, 将前处理时间缩短至 3–4 小时。最近推出了 AdvanceBio Gly-X 样品前处理平台。这种新平台将还原胺化 (2-AB、APTS) 的前处理时间缩短至 2 小时, 而使用即时糖胺反应性染料 (InstantPC) 的前处理时间则缩短至不到 1 小时。

AdvanceBio Gly-X N-糖样品前处理平台的示意图如图 2 所示。首先在 90 °C 下用专有试剂将糖蛋白变性处理 3 分钟, 通过 PNGase F 打开蛋白质以实现去糖基化, 该过程在 50 °C 下进行 5 分钟。接下来, 在约 1 分钟内用荧光团 (例如糖胺反应性染料 InstantPC) 标记游离多聚糖, 或在 60 分钟内用还原胺化染料

生物治疗性糖蛋白的糖基化和唾液酸分析

(例如 2-AB) 进行标记。标记后, 净化处理标记的多聚糖以去除多余染料, 然后可用于分析。

InstantPC 标记 N-糖的分离

用于分离和分析荧光标记多聚糖的一种常用方法是带荧光检测器的亲水相互作用液相色谱 (HILIC)。也可以选择在线 MS 检测, 其有助于鉴定不同的多聚糖类物质。图 3 突出显示了一种 60 分钟 HILIC 梯度方法, 用于从 IgG 治疗药物利妥昔单抗中分离和分析 InstantPC 标记的多聚糖。

也使用 MS 检测。图 4 所示为标记的恩利 N-糖的总离子流色谱响应。可以看到, InstantPC 标记样品的质谱总离子流色谱图几乎与荧光响应一致, 这有助于鉴定低丰度的多聚糖种类。此外还提供多种标记的 N-糖标准品, 可在 MS 不可用时帮助完成鉴定工作。其中包括单一多聚糖标准品 (例如中国仓鼠卵巢细胞表达的 IgG 分子上可能存在的常见二天线型 N-糖), 以及预标记的多聚糖文库 (例如人 IgG 以及 α -(2,6)-唾液酸化文库和 α -(2,3)-唾液酸化文库)。

2-AB 工作流程

2-AB 是一种用于游离多聚糖分析的传统染料。使用 2-AB 的传统工作流程可能非常耗时, 但

在更新且高效的工作流程中使用时, 2-AB 标记非常适合那些希望从快速工作流程中获益并需要关联新数据与历史数据的人。图 2 展示了采用 AdvanceBio Gly-X 技术的 Express 工作流程。结合使用熟悉的溶液内变性和去糖基化步骤与 96 孔净化板中的基质上还原胺化反应, 无需额外的干燥步骤。标记后, 净化处理多聚糖以去除多余染料, 然后可用于分析。前处理时间约为 2 小时, 而旧方法则需要更长的时间。图 5 显示了从利妥昔单抗中分离和分析多聚糖的示例; 显示的主要是二天线中性型 2-AB 标记的多聚糖 G0F、G1F 和 G2F, 并且所有主要多聚糖种类的 %CV 值均较低。

唾液酸定量分析

唾液酸在介导治疗性糖蛋白的有效性中具有非常重要的作用。N-糖或 O-糖的非还原末端是否存在唾液酸会影响蛋白质的药代动力学以及免疫原性。因此, 对蛋白质治疗药物中的唾液酸含量进行保持和控制至关重要。AdvanceBio 总唾液酸定量分析试剂盒为总唾液酸定量分析提供了一种灵敏的高通量方法。基于 96 孔板的分析以酶反应为基础, 首先将唾液酸酶 A 释放的唾液酸转化为过氧化氢, 然后与荧光染料一对一反应, 生成高强度的荧光或吸光度信号。不同的糖蛋白具有不同的糖基化水平, 同时也意味着唾液酸化

生物治疗性糖蛋白的糖基化和唾液酸分析

图 3: 利妥昔单抗 InstantPC 多聚糖

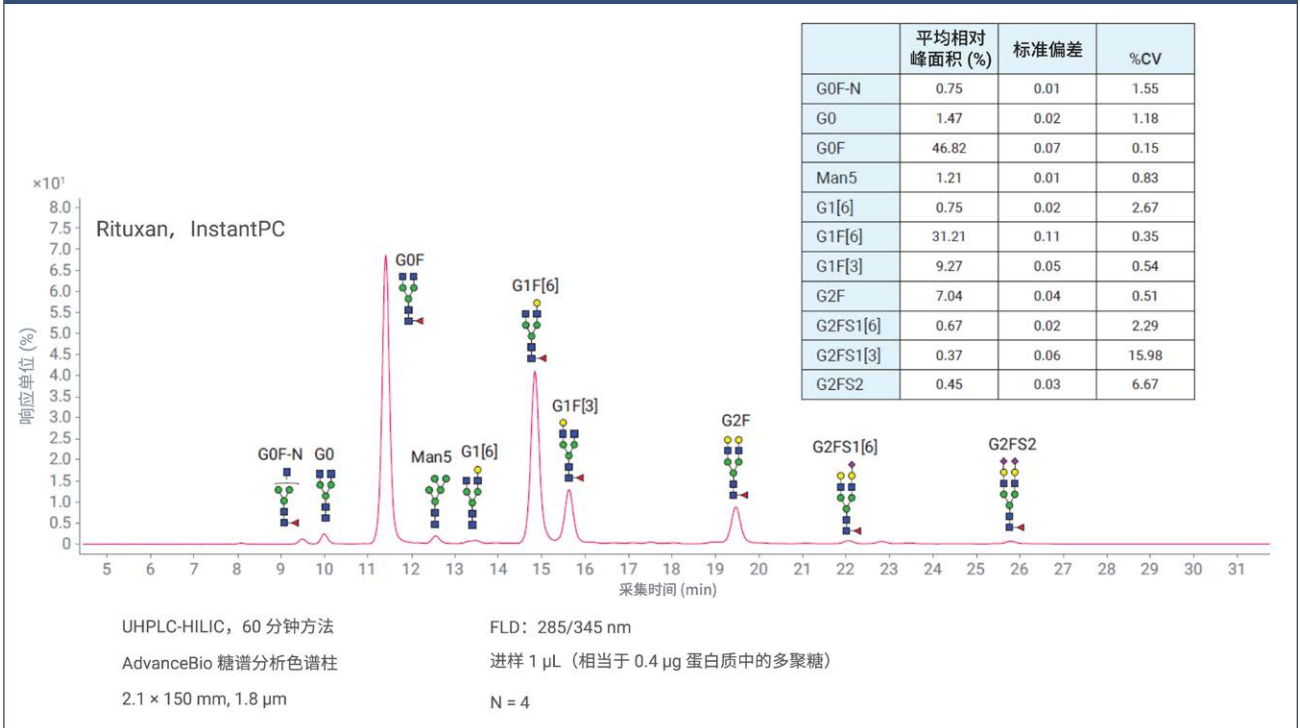
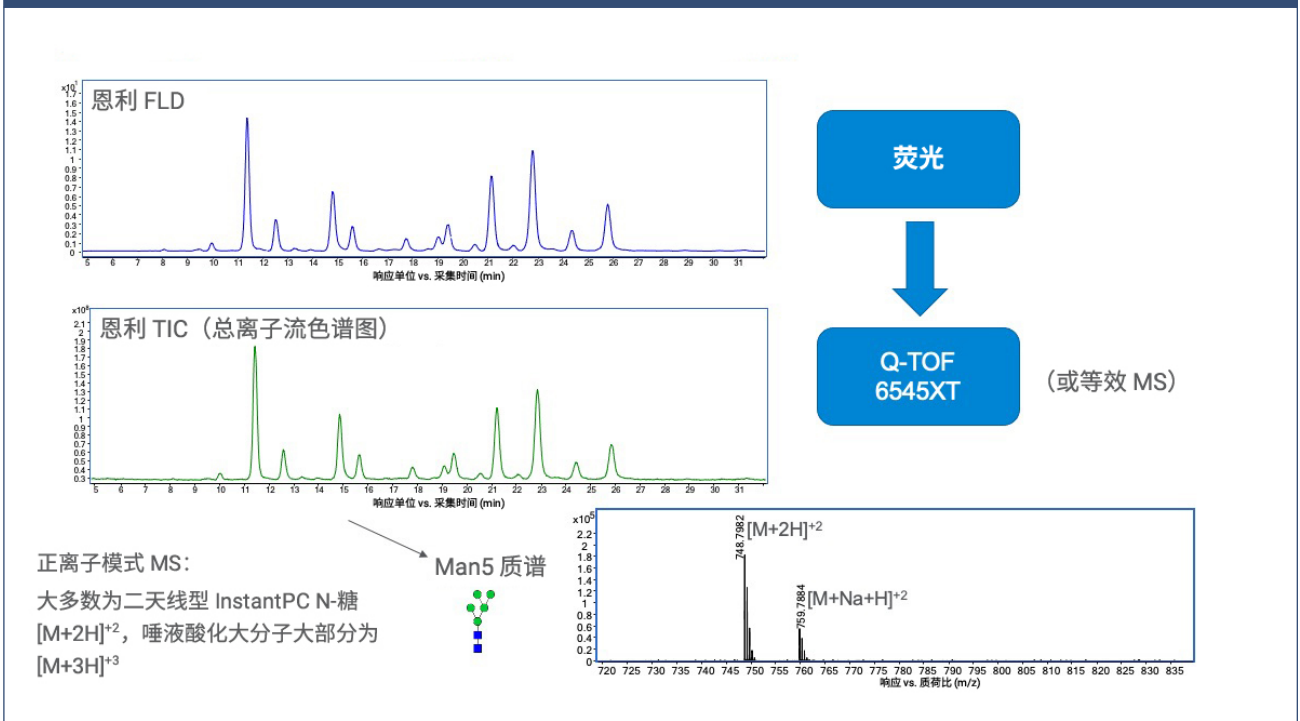
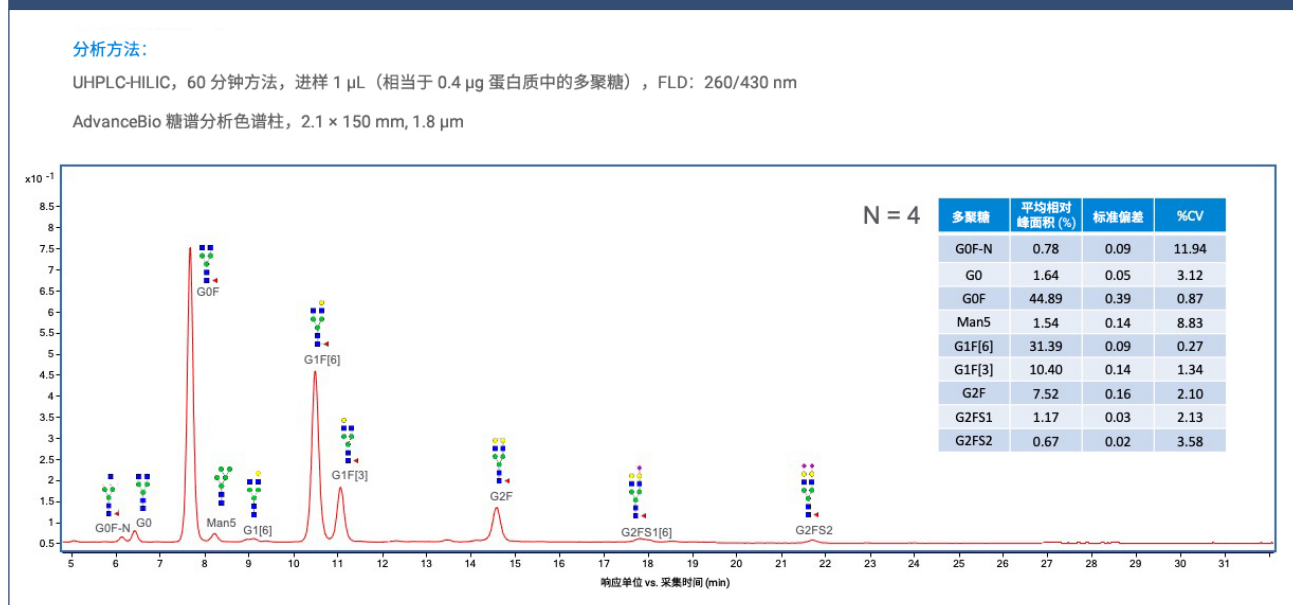


图 4: InstantPC 标记恩利 N-糖的质谱总离子流色谱图



生物治疗性糖蛋白的糖基化和唾液酸分析

图 5: 利妥昔单抗 Gly-X 2-AB Express N-糖



水平不同。因此, 从能够生成良好信号的蛋白质含量开始非常重要。例如, 美罗华的唾液酸含量较低, 因此需要大量的蛋白质, 而胎球蛋白或恩利的唾液酸含量较高, 因此需要的蛋白质较少。

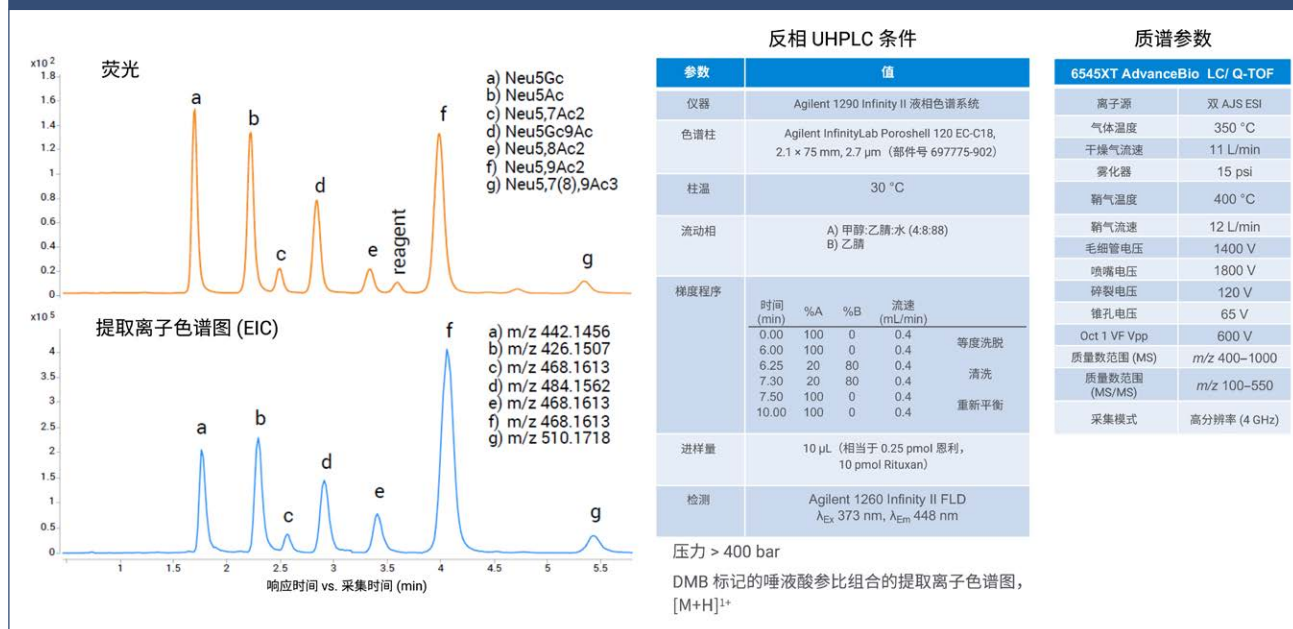
N-乙酰神经氨酸 (NANA) 和 N-羟乙酰神经氨酸 (NGNA) 是两种结构相似的唾液酸, 唯一的区别在于是否添加了羟基 (NGNA)。这一细微差异足以使 NGNA 对人类具有潜在的免疫原性。为了区分这两种唾液酸, 一种常用的方法是从 1,2-二氨基-4,5-亚甲基二氧基苯二盐酸盐 (DMB) 染料标记的多聚糖中释放唾液酸, 该过程用于 AdvanceBio 唾液酸分析

与定量试剂盒, 其中还包括 NANA 和 NGNA 定量标准品。标记后进行液相色谱分离以及荧光和/或质谱检测。图 6 显示了对唾液酸参比组合 (DMB 标记的不同唾液酸类型的混合物) 进行液相色谱分析以及荧光和质谱检测的示例。色谱图中的前两个峰分别为 NGNA 和 NANA, 其余峰为自然界中观察到的不同形式的唾液酸。

“N-糖或 O-糖的非还原末端是否存在唾液酸会影响蛋白质的药代动力学以及免疫原性。”

生物治疗性糖蛋白的糖基化和唾液酸分析

图 6: DMB 标记的唾液酸参比组合 (SARP)



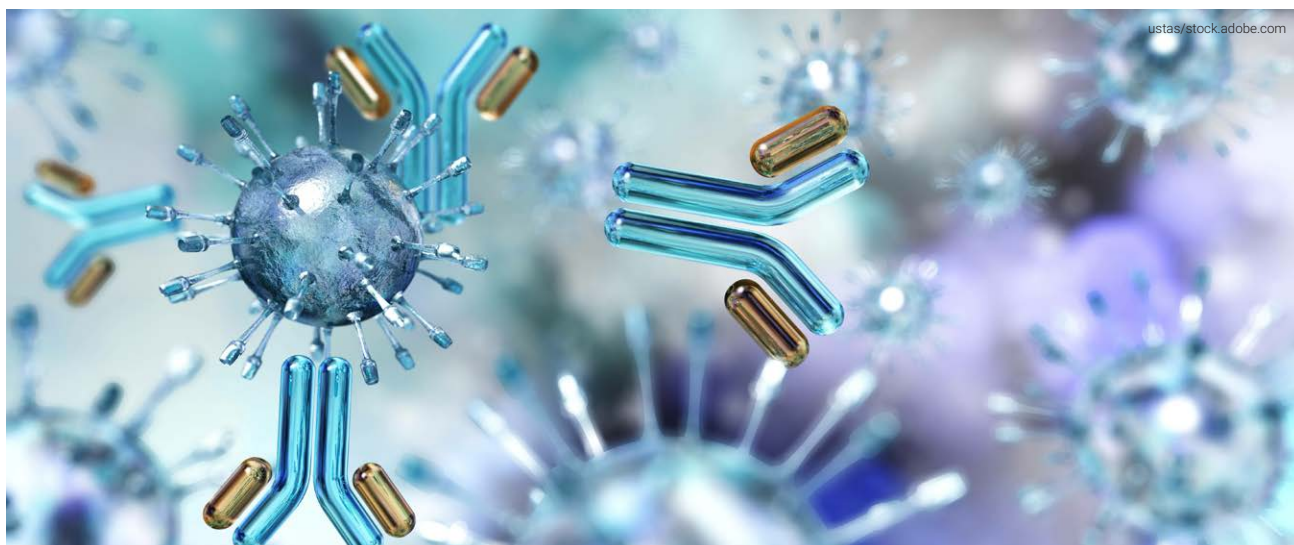
结论

研究人员可以使用许多不同的工具来制备、分离、检测和鉴定典型生物治疗性糖蛋白中的 N-糖。AdvanceBio Gly-X 样品前处理试剂盒等现代工作流程利用技术快速释放、标记和分离多聚糖, 从而通过荧光检测进行定量。除了这些新的快速样品前处理工作流程外, InstantPC 等新型染料具有高离子化效率, 可通过质谱对游离多聚糖进行可靠表征。这些新的工作流程也可用于传统的多聚糖标记染料 (例如 2-AB), 为希望关联新数据和历史数据的分析人员提供了方便快捷的样品前处理选项。除了游离多聚糖分析外,

安捷伦还提供用于唾液酸定量与分析的产品, 从而完善了用于糖基化生物治疗药物分析的强大工具包。

John Yan

John Yan 博士, 安捷伦应用化学家



用于生物分子分离的二维液相色谱法简介

Dwight R. Stoll

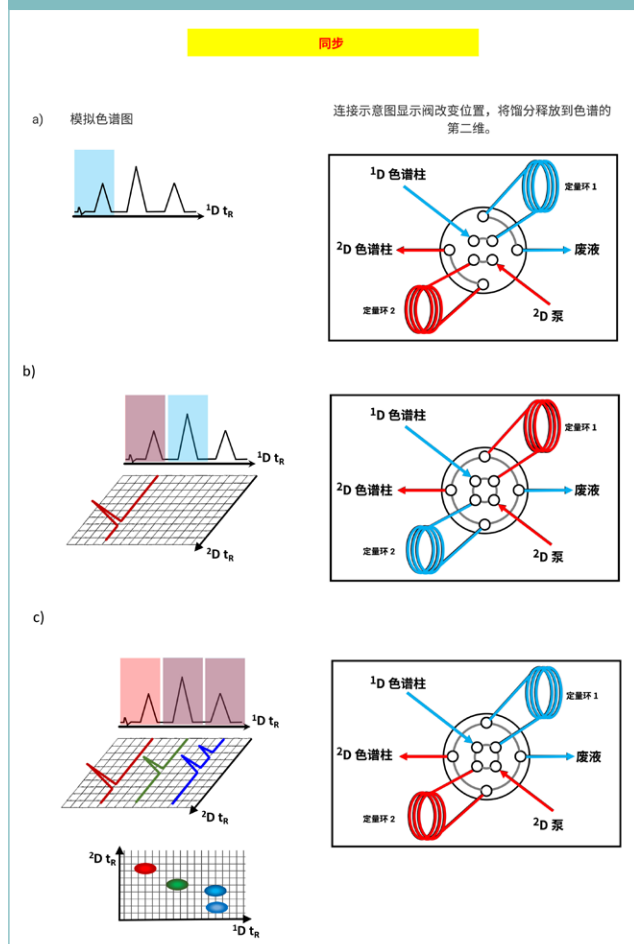
二维液相色谱
基础知识及其
当前的生物分
析应用。

前言

虽然传统的一维液相色谱 (1D-LC) 在生物分析中仍然是一种有用的工具, 但增加另一个维度的色谱分离会更加有利。使用两根串联色谱柱或二维液相色谱 (2D-LC) 进行分析分离, 无需大量延长分离时间即可显著提高分析物分离度。根据特定的混合样品条件和目标分析物定制分离参数, 有助于尽可能提高二维液相色谱的分析产量。本摘要将介绍二维液相色谱分离的概念, 涵盖二维液相色谱的一些关键模式和操作原理, 并提供二维液相色谱如何为解决生物分析挑战带来切实益处的相关示例。

用于生物分子分离的二维液相色谱法简介

图 1: 二维液相色谱的工作原理



使用两个液相色谱维度会为何更有利。在不根据单一性质（例如大小或电荷）进行分离的情况下，将产生足够高的分析物分离度，通过这两种性质分离分析物可以使不同的物质完全分离。

作为 2D-LC 分离增强的一种定量方式，常用的峰容量指标可提供数据化解释，说明从分析的角度来看，第二个液相色谱维度如何比简单地延长 1D-LC 的色谱柱更为有利。对于色谱的各个维度，分析测量基本上根据分离的有效性和仪器响应占空比进行区间分组。从而创建仪器响应随时间变化的线性关系区间组。通过添加第二个维度，将峰容量相乘，生成二维测量区间组。通过明智地选择互补色谱柱和分离条件，可以利用这一分离空间来区分以前未分离的分析物。此外，可以根据给定分析的需要添加第二个维度 — 二维液相色谱操作模式允许有针对性地应用第二维 (2D) 分离阶段。

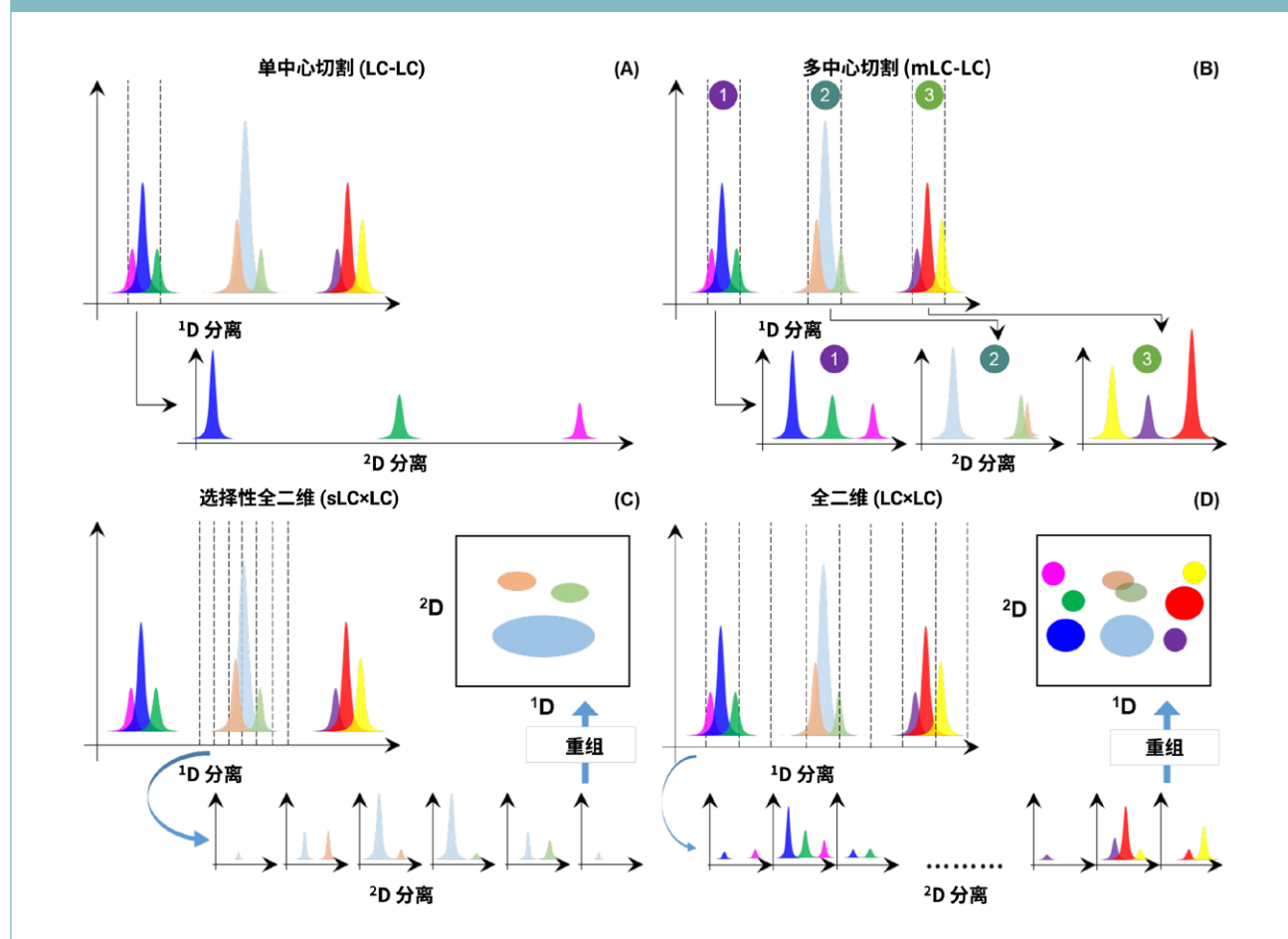
二维液相色谱分离基础知识

在生物分子分析中，即使看似简单的样品也可能非常复杂，在色谱分离中出现未分离的峰。因此，可能会出现单级液相色谱不足以分离混合物中物质的情况，特别是对于结构与异构体混合物密切相关的分析物，或需要鉴定分析物的未知物质。图 1A 提供了一个理想化的示例，显示的模拟色谱图可阐明

与 1D-LC 一样，2D-LC 所需的仪器设备包括切换阀，但还增加了一些用于进样时序控制的组件。适当的阀切换时序控制和两个样品定量环的加载允许在两根色谱柱上同时进行分离（图 1B）。将来自一维色谱柱的部分洗脱物转移到已知体积的样品定量环中，填充完毕后，样品定量环中的溶液将注入二维色谱柱。因此，第一维 (1D) 分离得到的片段在注

用于生物分子分离的二维液相色谱法简介

图 2: 二维分离模式^[6]



入到第二根色谱柱之前将有效地合并。2D-LC 得到的色谱数据揭示了如何根据二维条件从每个一维峰中进一步分离分析物。二维中出现的一维以外的任何后续组分分离将在二维色谱图中显示为附加峰。

按应用确定二维液相色谱操作模式

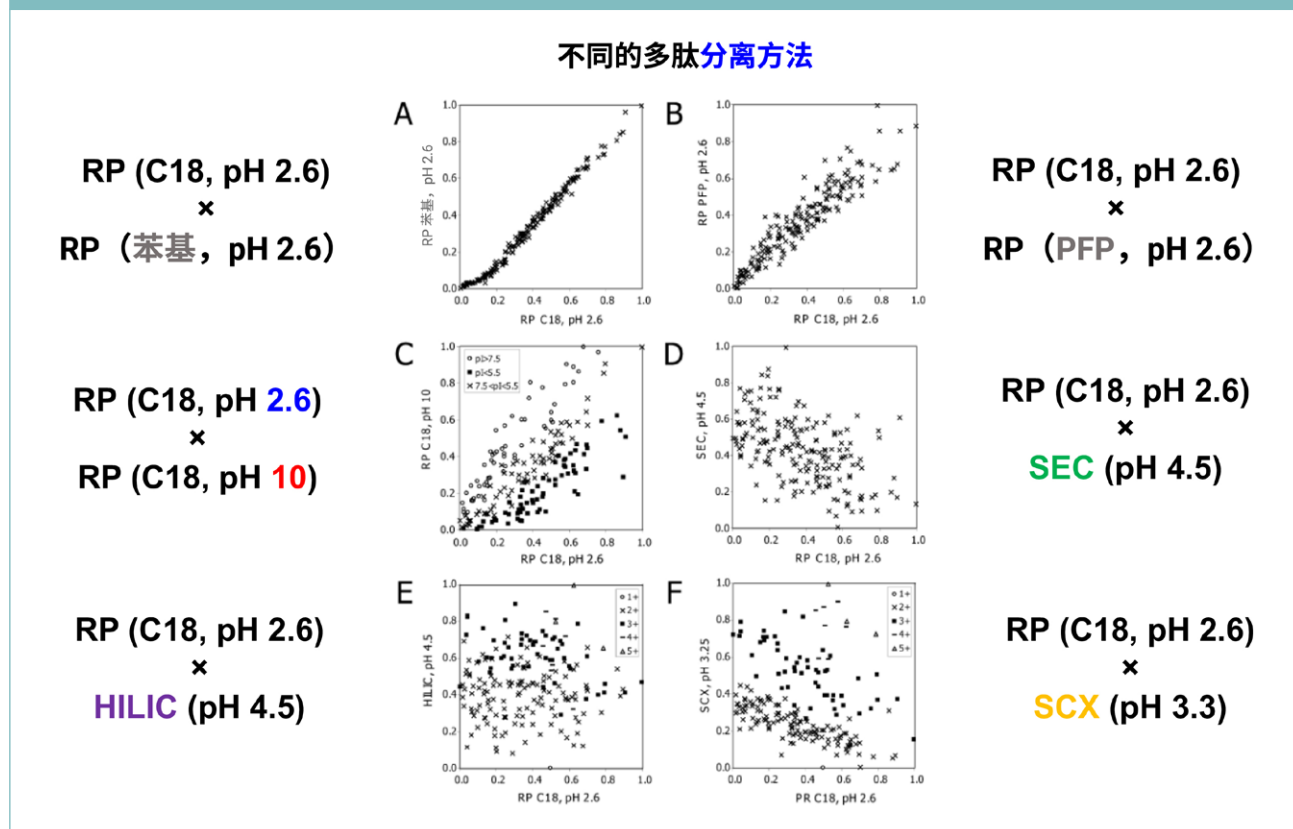
在 2D-LC 的范围内, 有两种主要操作模式以及两种主要操作模式的有效混合模式; 四种模式如图 2 所示。

第一种主要操作模式称为单中心切割, 缩写为 LC-LC (图 2A)。单中心切割 2D-LC 的方法涉及从一维色谱图的单个时间段提取洗脱物 (例如单个峰或峰簇), 然后在二维色谱柱上分离部分洗脱物。LC-LC 是为从一维鉴定出的单个目标区域提供其他表征的最有效方式。

对于 2D-LC 中的第二种主要操作模式, 所有来自一维的洗脱物均以馏分形式导入二维,

用于生物分子分离的二维液相色谱法简介

图 3: 优化使用二维分离空间^[10]



并在全二维液相色谱（缩写为 LC×LC）中进行分离（图 2D）。LC×LC 提供关于目标混合物中组分的完整数据集。此模式尤其适用于可能包含多种未分离和重叠物质的高度复杂样品，或未知混合物的完整评估。

2D-LC 除两种主要操作模式外，可用的两种混合模式包括多中心切割 (mLC-LC) 和选择性全二维 (sLC×LC)。多中心切割与单中心切割的操作原理类似，其中将来自一维的特定洗

脱部分注入二维进行分离，但每次色谱运行采集多个中心切割样品（图 2B）。mLC-LC 技术适用于需要对色谱图的多个区域进行强化表征的情况，但无法达到 LC×LC 能够达到的程度。对于选择性全二维，LC×LC 的主要目的是在特定时间窗口内对多个时间段进行采样，但不适用于整个分析过程（图 2C）。sLC×LC 操作模式非常适用于特定目标物质的全面评估（例如深度蛋白质表征），其中只有部分色谱运行需要进一步的分析审查。

用于生物分子分离的二维液相色谱法简介

“与传统 1D-LC 一样, 执行 2D-LC 需要根据所用检测器的灵敏度仔细调整分离条件。”

利用色谱柱正交性获得理想分离度

二维液相色谱可能导致峰容量成倍增加, 这在很大程度上取决于在一维和二维色谱柱上使用合适的互补或正交固定相。在尝试使用两根固定相和流动相条件基本相同的色谱柱进行 2D-LC 分离时, 不会因为添加第二个维度而获得任何高效的分离改进。相反, 维度之间应存在某种形式的差异, 才能在 2D 空间中实现分离增强。根据图 3A 中的示例, 具有相同流动相 pH 值的 C18 和苯基固定相的组合基本上不会使分析物峰扩散到色谱柱之间分析物洗脱大约 1:1 相关线之外的分离空间区域。然而, 通过简单地用氟化苯基固定相替换二维色谱柱 (图 3B), 各分离阶段的分析物之间产生了其他的区别。即使在一维和二维使用相同的色谱柱类型 (图 3C), 改变两个维度的流动相 pH 值也会使分离条件产生足够大的差异, 从而显著提高整个分析空

间的峰分离度。同样, 可以通过在不同维度之间使用明显不同的色谱柱来提高分离度, 如图 3D-F 所示。

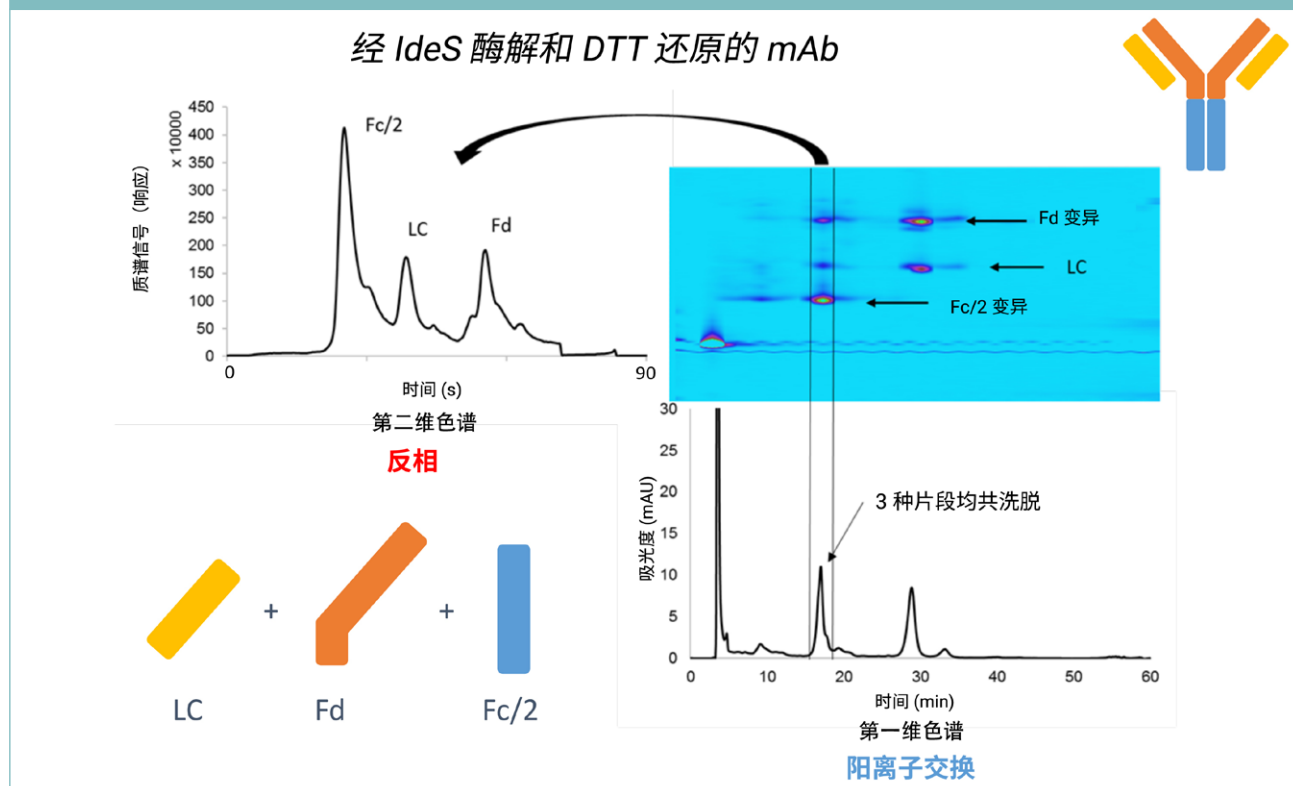
优化二维采样速率避免采样不足

2D-LC 分离时序控制的一个关键要点是避免用于二维分离的一维色谱柱洗脱物采样不足, 即采样不足或重复混合问题。如果在一维峰采集的样品太少, 所产生的影响本质上是对一维分离的所有物质进行平均或重新混合, 从而减小了第一分离阶段所得的值。根据 Murphy-Schure-Foley 理论^[1], 为了尽可能降低采样不足的影响, 从一维色谱峰区域内采集的样品不应少于 4 个。此外, 还需要优化采样速率以平衡一维和二维的速率, 从而为整个系统提供理想的净峰容量。

与传统 1D-LC 一样, 执行 2D-LC 需要根据所用检测器的灵敏度仔细调整分离条件。对于色谱分析的每个阶段 (一维和二维), 洗脱液中分析物的浓度将低于初始进样至每根色谱柱时的浓度。因此, 需要设定最小进样量和采样时间, 以确保有足够的分析物。

用于生物分子分离的二维液相色谱法简介

图 4: 通过 LC×LC 对 mAb 进行亚基水平的 2D-LC-MS 分析^[7]



克服不同维度之间流动相不匹配的问题

除采样不足外, 2D-LC 的另一个重要考虑因素在于防止色谱柱之间流动相不匹配而造成不利的影响。这个问题是由于流动相与分析物从一维有效共洗脱成为二维的进样溶剂, 因此要求流动相兼容性。这对某些色谱柱和流动相组合的影响可能很小, 但对其他组合却至关重要。例如, 离子交换分离的流动相组成中通常含水, 因此在反相分离开始时通

常与主要水相流动相兼容。相比之下, 正相色谱中使用的高有机含量流动相会给正相一维与反相 (RP) 二维结合带来挑战, 并可能导致前伸峰或分析物分离的其他损失。

然而, 利用活性溶剂调制 (ASM) 技术可以克服流动相的不兼容性。与安捷伦合作开发的 2D-LC 系统使用 ASM, 可调整注入二维色谱柱的样品溶剂组成, 从而提高兼容性。通过引入平行样品定量环, 在样品到达二维色谱

用于生物分子分离的二维液相色谱法简介

柱之前稀释从第一维采集的洗脱物, 从而降低二维进样溶剂的强度。尽管对样品进行了稀释, ASM 仍可提高二维分离度, 因为降低的溶剂强度可防止分析物穿透, 否则会因分离开始时分析物在流动相中的不适当高度溶解而导致这一问题。

利用 2D-LC 实现“二合一”分析

2D-LC 非常适用于这样的一类情况, 即需要两个或多个独立实验才能获得从单次 2D-LC 分析中获得的结果。在质谱 (MS) 不兼容的条件下表征色谱图中的未知峰时可以说明这一点, Luo 等人^[2] 对此进行了研究。Luo 等人没有在 MS 兼容的分离条件下开发额外的分离, 而是在液相色谱的第一阶段添加了与 MS 兼容的第二个维度, 从而允许直接鉴定未知峰。正如 Karongo 等人得到的结果, 使用 sLC×LC 对治疗性多肽中杂质进行的表征表明存在 3 种杂质, 这些杂质与目标肽共洗脱, 且会被 1D-LC 遗漏^[3]。通过组合一维非手性 RP 色谱柱和二维手性 WAX 色谱柱, Woiwode 等人证明 sLC×LC 可在一次分析中对所有氨基酸进行对映选择性分离^[4]。Muller 等人的研究表明, 对于植物源性提取物 (例如茶或葡萄酒的提取物) 的表征, LC×LC 在鉴定酚类物质方面具有至关重要的作用^[5]。

深度蛋白质表征方法

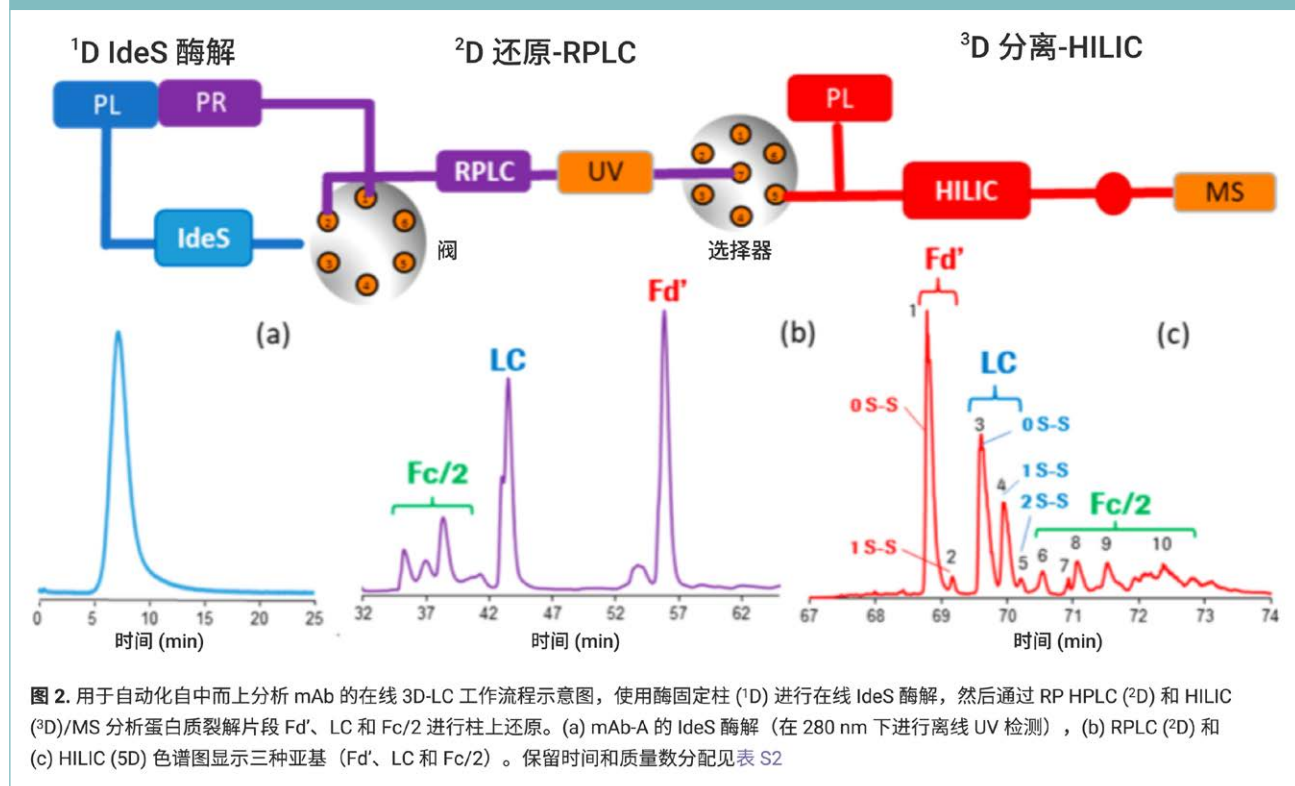
2D-LC 尤其能够提供有用信息的另一种分析类型是蛋白质的深度表征。当与后端质谱分析相结合时, 二维分离可以大大简化样品鉴定过程。通过适当的样品处理以及 2D-LC 和质谱检测, 可以完成对单克隆抗体结构和组成的全面评估。研究表明, 抗体亚基、轻链和重链、连接的多聚糖和组分多肽可通过这种多维方法进行鉴定^[6]。此外, Sorensen 等人报告的结果证实, 如果单独使用第一维液相色谱, 由于酶解抗体片段的共洗脱, 需要进行两个阶段的液相色谱分离^[7] (图 4)。

自动化 2D-LC 分析的开发

2D-LC 可以帮助克服的生物分析挑战之一是耗时的样品前处理和手动选择峰进行进一步分析的问题。这些步骤可以与自动化 2D-LC 集成, 而不是离线执行每个样品处理 (例如胰蛋白酶酶解或二硫苏糖醇 (DTT) 还原)。Gstöttner 等人的研究中涉及抗体分离的一个具体示例包括一个工作流程, 首先在离子交换柱上分离样品并在线收集馏分, 然后将其送入还原反应器柱, 并进行 2D-RP 分离和质谱检测^[8]。类似地, Camperi 等人设计了一种表征单克隆抗体糖基化变异的程序 — 样品经

用于生物分子分离的二维液相色谱法简介

图 5: 当前应用 — mAb 的自动化表征系统^[9]



IdeS 酶解、还原并在 RP 色谱柱上分离, 以及亲水相互作用色谱 (HILIC) 分离, 然后再通过质谱进行检测^[9] (图 5)。研究表明, 在概念验证实验中, Camperi 等人开发的自动化方法与离线样品处理相比没有显著差异。

结论

多维分离因可提供超越 1D-LC 的丰富分析信息, 且几乎无需额外工作而迅速为人们所知。然而, 为了使这项技术产生理想结果, 仍应考虑化学分析背后的传统原理。与其他

分析仪器一样, 2D-LC 的方法开发要求针对样品类型以及分析所需的信息类型使用相应的操作模式 (LC-LC、mLC-LC、sLC×LC 或 LC×LC)。在考虑了操作模式之后, 重要的是使用充分正交的分离条件。在二维空间中, 理想分离不仅取决于互补的固定相, 还取决于流动相条件 (例如 pH 值取决于分析物类别), 因此务必考虑分子特性。此外, 应注意不要使一维阶段采样不足, 因为这可能会使第一维中的分离增益无效。但这需要与检测器的灵敏度进行平衡; 二维中分离的馏分体

用于生物分子分离的二维液相色谱法简介

积不应太小, 因此分析物含量不应太低, 避免无法检测。此外, 还应检查各维度之间的流动相兼容性, 尽可能避免不匹配。在不可避免流动相不匹配时, 应使用适当的变通方法和 ASM 技术。

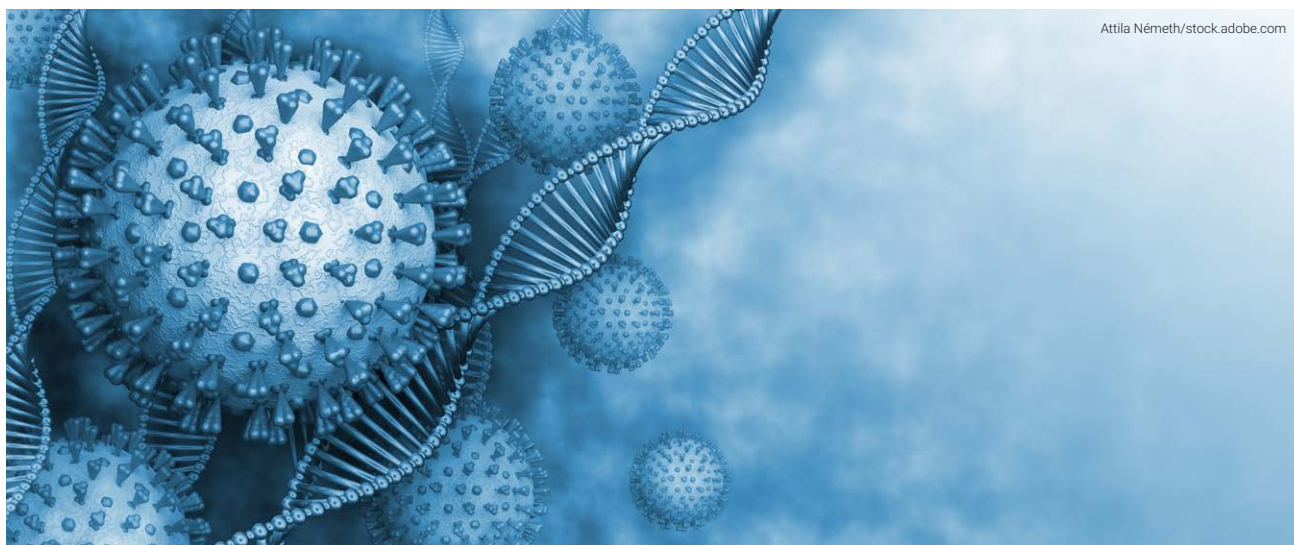
参考文献

1. R. E. Murphy, et al., *Anal. Chem.* **70**(8), 1585-1594 (1998). DOI: 10.1021/ac971184b
2. H. Luo, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **137**, 139-145 (2017). DOI: 10.1016/j.jpba.2016.11.012
3. R. Karongo, et al., *J. Chrom.A*, **1627**, 461430 (2020). DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461430
4. U. Woiwode, et al., *J. Chrom. A*, **1562**, 69-77 (2018). DOI: 10.1016/j.chroma.2018.05.062
5. M. Muller, et al., *Chromatographia*, **82**, 181-196 (2019). DOI: 10.1007/s10337-018-3662-6
6. D. R. Stoll, et al., in *Advances in Chromatography*, (CRC Press: Boca Raton, FL, 2018).
7. M. Sorensen, et al., *mAbs*, **8**(7), 1224-1234 (2016). DOI: 10.1080/19420862.2016.1203497
8. C. Gstöttner et al., *Anal. Chem.* **90**(3), 2119-2125 (2017). DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04372
9. J. Camperi et al., *Anal. Chem.* **92**(6), 4357-4363 (2020). DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05193
10. M. Gilar, et al., *Anal. Chem.* **77**(19), 6426-6434 (2005). DOI: 10.1021/ac050923i

Dwight R. Stoll 博士

古斯塔夫奥德罗普学院教授





Attila Németh/stock.adobe.com

通过质谱-保留时间指纹图谱对 SARS-CoV-2 刺突糖肽进行鉴定、分析和相对定量

Rod Chalk

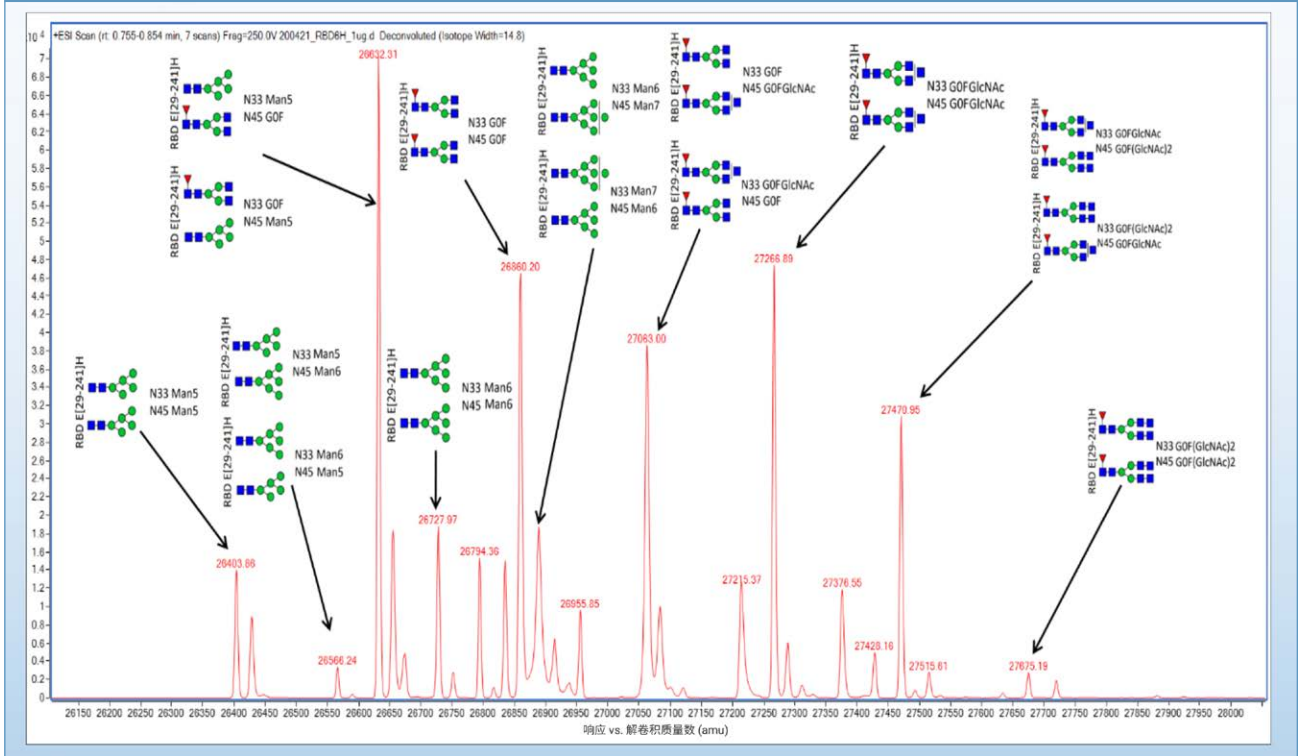
用于对刺突蛋白上的糖肽进行指纹分析的主数据库大大简化了这一复杂且耗时的过程。

前言

SARS-CoV-2 病毒刺突蛋白中存在的复杂糖基化被认为与免疫逃逸有关, 并可能使其具有更高的致病性。许多实验室出于研究目的表达刺突蛋白, 需要可靠的分析工作流程来对其进行全面表征。这一点非常重要, 因为糖基化模式由所使用的宿主细胞表达系统以及生长条件决定。这些条件难以得到精确控制, 并可能导致所生产刺突蛋白的批间差异。这种糖基化的复杂性给蛋白质的全面表征带来了许多技术障碍。通过反相液相色谱质谱 (LC-MS) 进行完整质量数分析或许不可行, 因为 22 个糖基化位点均有大量可能的多聚糖, 导致极高的多分散性及由此造成的信号稀释。即使可行, 也不会提供所需的多聚糖位置信息。游离多聚糖分析可行, 但也不会提供位置信息。

通过质谱-保留时间指纹图谱对 SARS-CoV-2 刺突糖肽进行鉴定、分析和相对定量

图 1: SARS-CoV2 的刺突受体结合域有两个糖基化位点 (N343 和 N331), 多种多聚糖可以与这些位点关联



本文讨论了一种新方法, 该方法首先使用 LC-Q-TOF MSMS 生成糖肽质量数和保留时间数据库。该数据库本质上是各糖肽的精确质量数保留时间指纹集合, 可以整合到一个简单、强大、快速且稳定的表征工作流程中。

刺突蛋白带来的挑战

全长刺突蛋白以三聚体的形式存在。刺突单体的受体结合域 (RBD) 部分只有两个糖基化位点 (N343 和 N331), 但均含有多种可能的多聚糖。尽管 RBD 的糖基化位点数量较少, 但它的糖基化谱图却十分复杂, 且其完整质

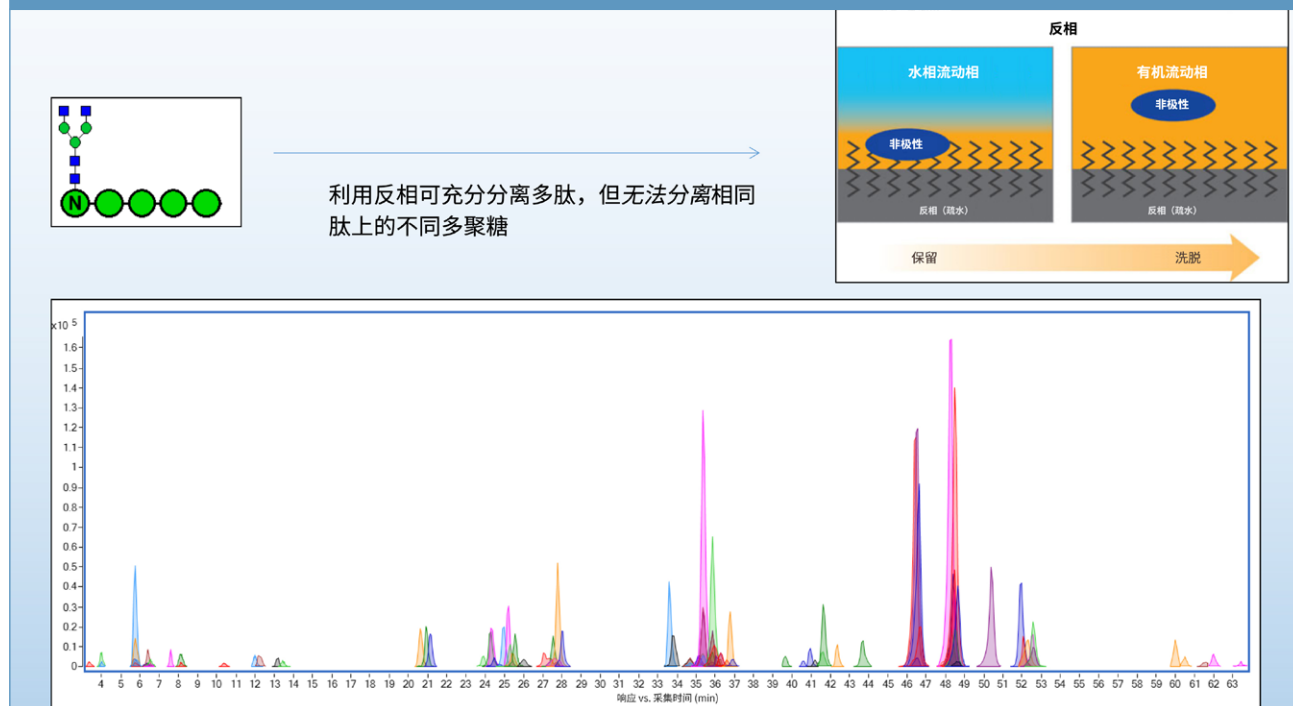
量数谱图还显示了样品之间的差异 (图 1)。因为存在两个位点, 在某些情况下, 针对给定质量有两种可能的结构, 无法确定哪一种结构是正确的, 因而无法实现全面鉴定。

而全长刺突蛋白的情况则更为复杂。其中存在 22 个糖基化位点, 即使假设每个位点只有 6 种多聚糖, 可能的糖型总数将达到 1300 亿左右, 使得无法对刺突蛋白进行完整质量数分析。此外, 这种分析不会提供位置信息。

另一种挑战是糖肽分析。在这种情况下, 有必要为每个肽生成一个糖基化位点, 并对每

通过质谱-保留时间指纹图谱对 SARS-COV-2 刺突糖肽进行鉴定、分析和相对定量

图 2: 反相分离糖肽



个位点进行明确定位。不能单独使用胰蛋白酶，因为 RBD 内的两个糖基化位点之间缺少胰蛋白酶裂解位点。此外，由于母离子质量数未知，无法使用母离子数据库进行匹配，因此需要 MS/MS。但必须考虑一些问题：糖肽分子由肽主链和多聚糖结构混合组成，并且每种主链和结构具有不同的理想碎裂条件。多聚糖的理想碎裂保留肽不分解；而理想多肽碎裂则意味着将丢失多聚糖信息。

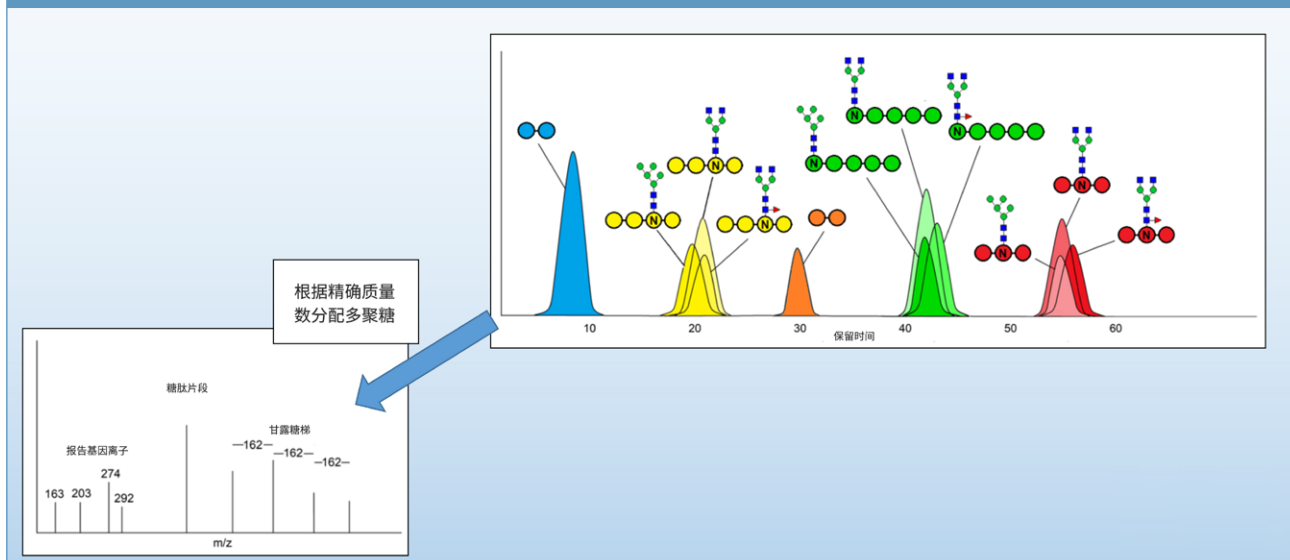
改进的分离和检测

由于使用多种酶会提高复杂性，牛津大学药物研发中心的研究人员决定使用一种酶 — 弹

性蛋白酶，它比胰蛋白酶的切割更频繁并生成更短的肽段。更重要的是，弹性蛋白酶为每个糖基化位点生成一种肽段，这对于明确定位至关重要。由于多聚糖主要为极性，使用亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 可使它们获得良好的分离，而相对非极性的肽则通过反相 (RP)-HPLC 实现理想分离。短链肽使 MS 中的总离子流色谱图 (TIC) 信号增强，且更容易通过 RP-HPLC 实现分离。该分离方法显示了对多肽的出色分离，但不能分离共洗脱的单个多聚糖，它们以多个重叠峰的形式显示 (图 2)。

通过质谱-保留时间指纹图谱对 SARS-COV-2 刺突糖肽进行鉴定、分析和相对定量

图 5: 甘露糖梯是含甘露糖的多聚糖结构特征



虽然这可能是一个问题，但研究人员利用这一特征开发了一种新方法来说明和分析这些糖肽。该团队使用安捷伦的 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱分离多肽，并观察到含有不同多聚糖的相同肽同时洗脱。因此，具有相同保留时间的多聚糖可对应相同的肽。由于来自相同肽的多聚糖具有相同的保留时间，并且它们的精确质量数已知，精确质量数和保留时间的组合提供了一个指纹，可全面鉴定糖肽。

创建数据库

糖肽发现工作流程。工作流程（图 3）从弹性蛋白酶过夜酶解开始，得到肽和糖肽的混合物。接下来进行 RP-HPLC 分析，来自相同肽的多聚糖在此过程中共洗脱，并可通过其

保留时间进行鉴定。例如，肽段 GEVFNAT-具有 27 种不同的糖型，图 4 中的放大离子色谱图显示它们均在 4 分钟的保留时间窗口内洗脱。下一步是使用精确质量数鉴定多聚糖。LC-MS/MS 运行中包含许多种物质。通过代表游离糖、肽段以及甘露糖梯（含甘露糖的多聚糖结构特征，如图 5 所示）的特定报告基因离子对糖肽进行表征。解卷积质谱图显示了多聚糖的完整序列，其中单个糖的质量准确度在 10 ppm 以内。

工作流程的第二阶段涉及多肽鉴定。这一步骤由伪 MS3 完成，该程序涉及在 MS 仪器上使用高碎裂电压来执行糖肽的源内碎裂和多聚糖的丢失。在四极杆中选择肽段作为目标质量数，并执行碰撞诱导解离，生成肽段序列。

通过质谱-保留时间指纹图谱对 SARS-COV-2 刺突糖肽进行鉴定、分析和相对定量

在这种情况下不需要使用 MS/MS, 因为现在可以使用 LC-MS 运行得到的质量保留时间查询数据库, 从而以良好的置信水平分配糖肽结构。使用 Agilent MassHunter 定性分析 B.07 版软件和分子特征提取工具可自动完成这一工作 (图 6)。此工作流程的另一个优点在于, 它不要求具备多聚糖分析的专业知识。

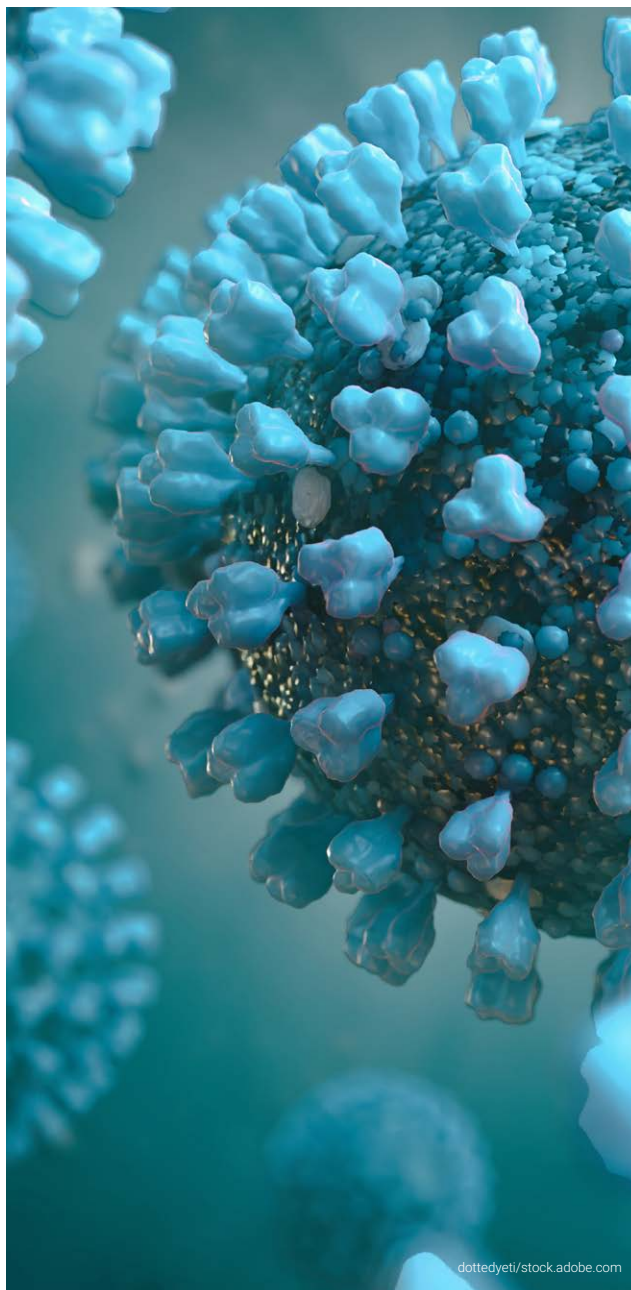
结论

由详细的多肽发现分析生成的质量-保留时间数据库大大简化了 SARS-CoV-2 刺突糖肽的分析, 无需进行复杂的 MS/MS 分析。它允许仅使用液相色谱保留时间和精确质量数来鉴定糖肽结构。这种简单的工作流程可转移到各种 HPLC-MS 仪器和配置。未来将免费提供详细的方法 (Chalk, R., Greenland, W. et al., "Identification, Mapping and Relative Quantitation of SARS-CoV-2 Spike Glycopeptides by Mass-Retention Time Fingerprinting", 待发表), 现可在线获取数据库 (Chalk, R., Greenland, W. et al., (2020). SARS-COV2 Spike Glycopeptide Mass-Retention Time PCDL database (Version 1) [Data set]. Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.3958218>)。

仅限科研使用。不用于临床诊断用途。安捷伦产品未获得批准用于新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 检测、诊断、治疗或缓解。安捷伦产品尚未得到验证可用于新型冠状病毒检测。

Rod Chalk 博士

牛津大学药物研发中心质谱分析负责人



dottedyeti/stock.adobe.com