

使用单四极杆液质联用系统在完整蛋白质和亚基水平监测抗体的糖基化

作者

Stephen Sciuto
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent InfinityLab Pro iQ Plus 单四极杆质谱仪 (MS) 在完整蛋白质和亚基水平监测曲妥珠单抗不同糖型的相对丰度。在完整蛋白质水平，通过质谱图解卷积软件鉴定出五种糖基化组分，它们的相对丰度与之前在安捷伦高分辨精确质量系统上测得的相对丰度一致。在亚基水平，曲妥珠单抗轻链表现为单一组分，与其氨基酸序列特征相符，而曲妥珠单抗重链则检测到四个特征峰，分别对应于 G0、G0F、G1F 和 G2F 糖型。可靠的糖基化相对丰度检测能力与出色的质谱峰形，充分体现了 Agilent Pro iQ Plus 质谱仪的卓越性能。

前言

糖基化会影响治疗药物的结构稳定性、安全性和有效性，是生物制药行业需要监测的一项重要参数^[1]。为确保蛋白质糖基化相对丰度始终处于可接受范围内，需将其作为一项常规质量指标进行持续监测。如果相对丰度未通过质量控制 (QC) 团队规定的标准，则需要对治疗药物的生产工艺展开进一步调查。由于质谱技术非常灵敏、稳健，能够有效表征单克隆抗体 (mAbs)，因此成为多聚糖表征的理想选择。

本研究采用 Agilent InfinityLab Pro iQ Plus 液质联用 (LC/MS) 系统，在完整蛋白质和亚基水平 (HC/LC) 进行糖基化检测，可提供更宽的质量数检测范围和更出色的质谱峰形。解卷积后的糖基化相对丰度数据表明，该检测平台可提供关于蛋白质糖基化的关键信息^[2]。

实验部分

化学品和溶液配制

使用以下购自 Sigma-Aldrich (美国密苏里州圣路易斯) 的溶液进行还原反应：

- A. 8 M 盐酸胍，pH 8.5 (部件号 G7294, 100 mL)
- B. 0.2 M DTT (DL-二硫苏糖醇，部件号 D9779, 1 g)
- C. 1 M Tris 缓冲液，pH 8.0 (部件号 648314, 100 mL)

变性：6.4 M 盐酸胍，200 mM Tris-HCl 缓冲液，pH 8.1

将 80 mL 8.0 M 盐酸胍溶液与 20 mL 1 M Tris-HCl 缓冲液加入 100 mL 容量瓶中。倒置混匀后，用移液枪吸取少量液体至 pH 试纸进行测定并记录 pH 值。若 pH 值介于 7.2 和 8.5 之间，即可进行后续还原步骤。

还原：200 mM DTT 的 50 mM Tris-HCl 溶液

使用分析天平称量 31 mg DTT，加入 1 mL 50 mM Tris-HCl 溶液将其溶解。在还原步骤之前需涡旋混匀溶液。

标样和样品前处理

单克隆抗体 (mAb) 曲妥珠单抗 (浓度为 22 mg/mL) 购自 Genentech (加利福尼亚州南旧金山)。取 10 μ L 储备液加入 210 μ L 0.1% 甲酸水溶液中，将其稀释至 1 μ g/ μ L。取 55 μ L 上述 1 μ g/ μ L 溶液加入 165 μ L 0.1% 甲酸水溶液中，获得浓度为 250 ng/ μ L 的最终溶液，以备 LC/MS 分析。

用于还原曲妥珠单抗的样品前处理流程如下：

1. 取 2.3 μ L 曲妥珠单抗储备液 (22 mg/mL)，加入 27.4 μ L 含 6.4 M 氯化胍的 200 mM Tris-HCl 溶液中
2. 取 6.3 μ L 200 mM DTT (溶于 50 mM Tris-HCl) 加入曲妥珠单抗溶液中。轻轻混匀并离心，然后在 37 °C 下孵育 30 分钟 (也可在 60 °C 下孵育 30 分钟)
3. 为终止还原反应，应将溶液酸化，使甲酸浓度最终达 1% (v/v%)。向步骤 2 中的还原溶液中加入 4 μ L 10% FA。轻轻涡旋混匀并离心

4. 加入 160 μ L 0.1% 甲酸，使最终体积达到 200 μ L。还原后的曲妥珠单抗溶液浓度为 250 ng/ μ L，可直接用于 LC/MS 分析

LC/MS 分析

使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱与 Agilent InfinityLab Pro iQ Plus 单四极杆 LC/MS 的联用系统进行 LC/MS 分析 (图 1)。采用 Agilent PLRP-S 色谱柱 (2.1 \times 50 mm, 5 μ m) 进行色谱分离。LC 和 MS 参数如表 1 和表 2 所示。



图 1. Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 Agilent Pro iQ Plus 单四极杆质谱仪

液相色谱

表 1. Agilent 1290 Infinity II 液相色谱方法

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统		
色谱柱	Agilent PLRP-S, 2.1 × 50 mm, 5 µm (部件号 PL1912-1502)	
进样器温度	5 °C	
流动相 A	0.1% 甲酸水溶液	
流动相 B	含 0.1% 甲酸的乙腈溶液	
流速	0.5 mL/min	
进样量	2 µL	
柱温	80 °C	
梯度程序 (完整蛋白质)	时间 (min)	%B
	0	10
	5	60
	6	10
	8	10
梯度程序 (还原态)	0	5
	0.1	20
	8	40
	8.1	70
	9.1	70
	9.2	5
	11	5

质谱

表 2. 质谱参数

Agilent Pro iQ Plus 单四极杆质谱仪	
离子源	安捷伦喷射流 ESI 离子源
极性	正
时间过滤窗口	0.1 min
停止时间	跟随泵/无限制
MS1 扫描范围	<i>m/z</i> 1000–3000 (完整蛋白质) <i>m/z</i> 600–2400 (还原态)
扫描时间	1500 ms
检测器增益因子	1
碎裂电压	275 V (完整蛋白质) 175 V (还原态)
碎裂电压升高?	未启用
数据存储	轮廓图模式
气流量	12 L/min
雾化器	50 psi
鞘气流量	11 L/min
毛细管电压	4500 V
喷嘴电压	2000 V
气体温度	350 °C
鞘气温度	360 °C
分流阀	已启用; 0–1 min LC 液流流向废液, 1–8 min LC 液流流向质谱 (完整蛋白质) / 1–11 min LC 液流流向质谱 (还原态)
运行后分流阀位置	至废液

数据处理

使用 Agilent OpenLab CDS 软件 2.8 版处理 LC/MS 数据。完整抗体的解卷积参数如图 2 所示。对于还原态 mAb 的解卷积分析，将外部背景时间范围设为 3.0–4.3 分钟，自动解卷积保留时间 (RT) 窗口设为 4.3–5.6 分钟，解卷积质量数范围设为 10000–60000 Da，绝对噪音阈值设为 2000，相对丰度阈值设为 25%，MW 算法设为棒状。

结果与讨论

完整曲妥珠单抗的总离子流色谱图

图 3A 为 500 ng 完整曲妥珠单抗的总离子流色谱图 (TIC)。正如预期，TIC 表现为在 2.6 分钟左右洗脱的单峰。为避免大量的水和盐进入质谱仪，在 LC/MS 方法运行的第一分钟内，将 LC 液流切换至废液。在 1–8 分钟，将分流阀切换为直接流向 Pro iQ Plus，以检测 mAb 信号。

完整曲妥珠单抗的原始质谱图和解卷积质谱图

完整曲妥珠单抗的原始质谱图和解卷积质谱图分别如图 3B 和 3C 所示。Agilent Pro iQ Plus 单四极杆质谱仪的扫描范围可达 m/z 3000，可以检测完整曲妥珠单抗的多种电荷态并获得高质量的解卷积质谱图。图 3B 插图显示了曲妥珠单抗其中一种电荷态的原始峰形，其相对丰度与图 3C 解卷积质谱图中的相对丰度一致，验证了解卷积质谱图和所鉴定的五个主要糖基化峰的可靠性。在 OpenLab CDS 质谱解卷积选项卡的 Basic Settings（基本设置）中（图 2），Minimum Peaks in Set

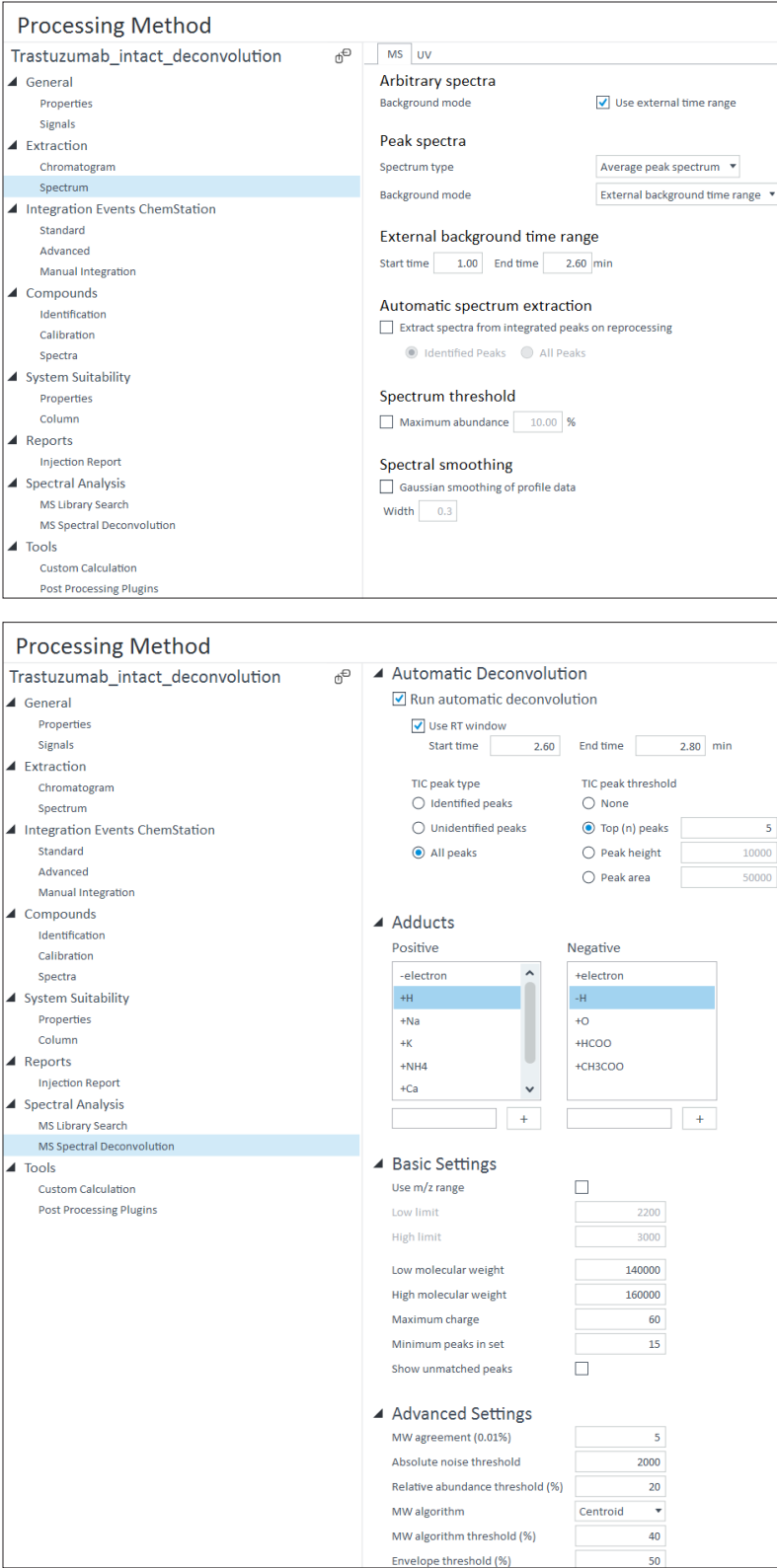


图 2. Agilent OpenLab CDS 软件 2.8 版用于完整 mAb 解卷积的处理参数

(组内最小峰数) 这一参数能有效减少解卷积谱图中的杂峰干扰。对于完整 mAb 和还原态 mAb 的解卷积处理, 将此参数设为 15, 则软件将仅对至少包含 15 个电荷态的峰进行解卷积。这是一个非常重要的参数, 因为它能提高解卷积质谱图中检出峰的质量。用户可根据目标分子原始质谱中观察到的电荷态数量对该参数进行调整。

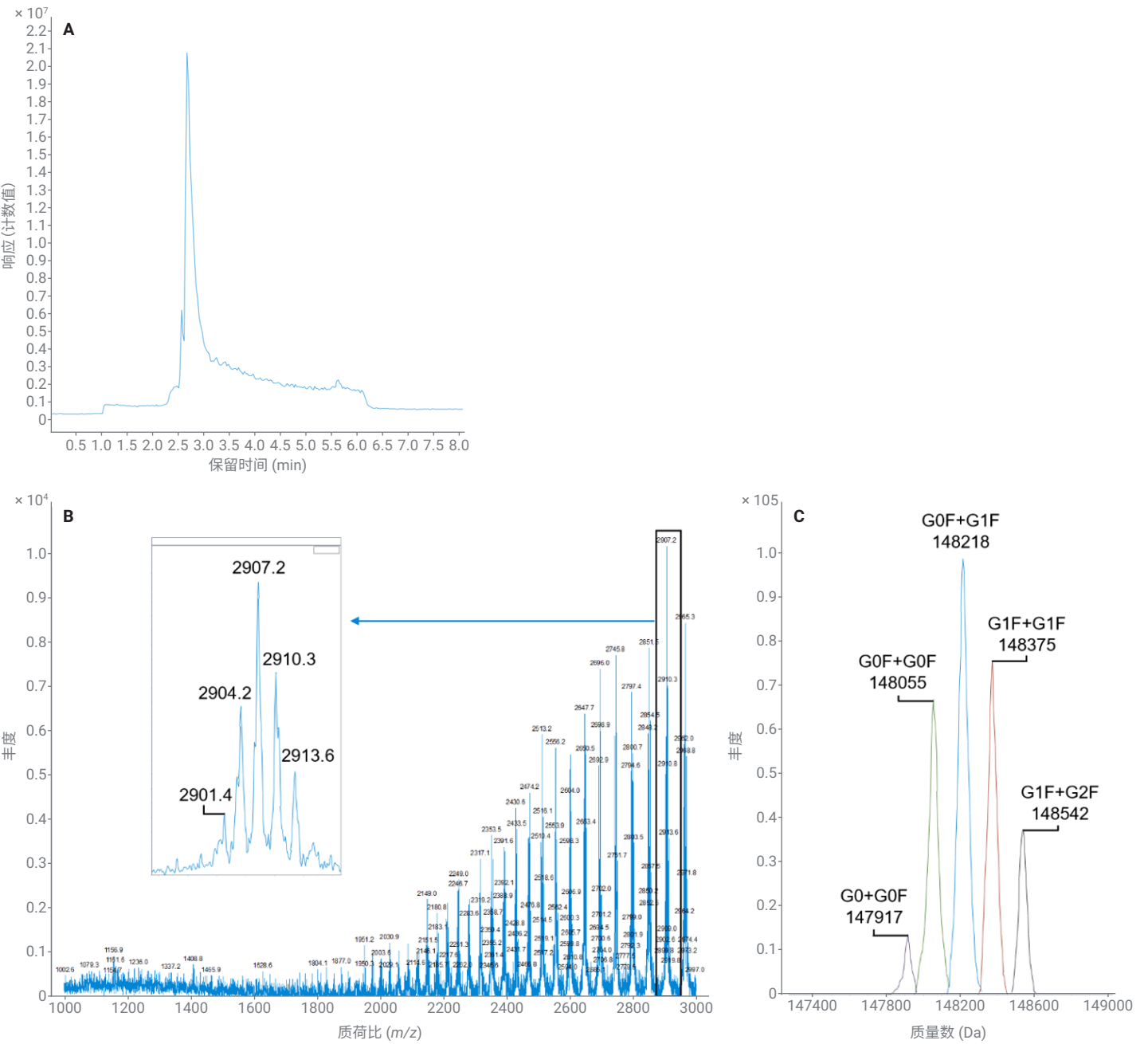


图 3. (A) 使用 Agilent Pro iQ Plus 单四极杆质谱仪采集的完整曲妥珠单抗的 TIC。(B) 曲妥珠单抗的原始质谱图。插图为其其中一个电荷态的放大图。(C) 曲妥珠单抗的解卷积质谱图, 给出了实测质量数和推测糖型。LC/MS 设置见表 1 和表 2, 处理参数如图 2 所示, 质量误差计算值如表 3 所示

还原态 mAb 色谱图、原始质谱图和解卷积质谱图

为增加糖基化分析的维度，可以将完整 mAb 还原为亚基以降低复杂性。还原态曲妥珠单抗的 TIC 色谱图如图 4A 所示，其中观察到轻链和重链的两个峰。测得

的轻链质谱信号强度是重链的 4 倍。尽管如此，使用 Agilent Pro iQ Plus 仍获得了丰富的 HC 糖基化信息和高质量的质谱图。图 4B 和 4D 的插图分别为曲妥珠单抗 LC 和 HC 的局部放大图。由于曲妥珠单抗的糖基化位点通常在特定的保守序列

上（即糖基化仅发生在符合 NXS/T 这一特定序列模式的天冬酰胺残基上），因此 LC 的氨基酸序列理论上不会发生多聚糖修饰，将表现为单个峰。另一方面，曲妥珠单抗 HC 具有 NXS/T 基序，Fc 区域的天冬酰胺残基可以发生糖基化。图 4D

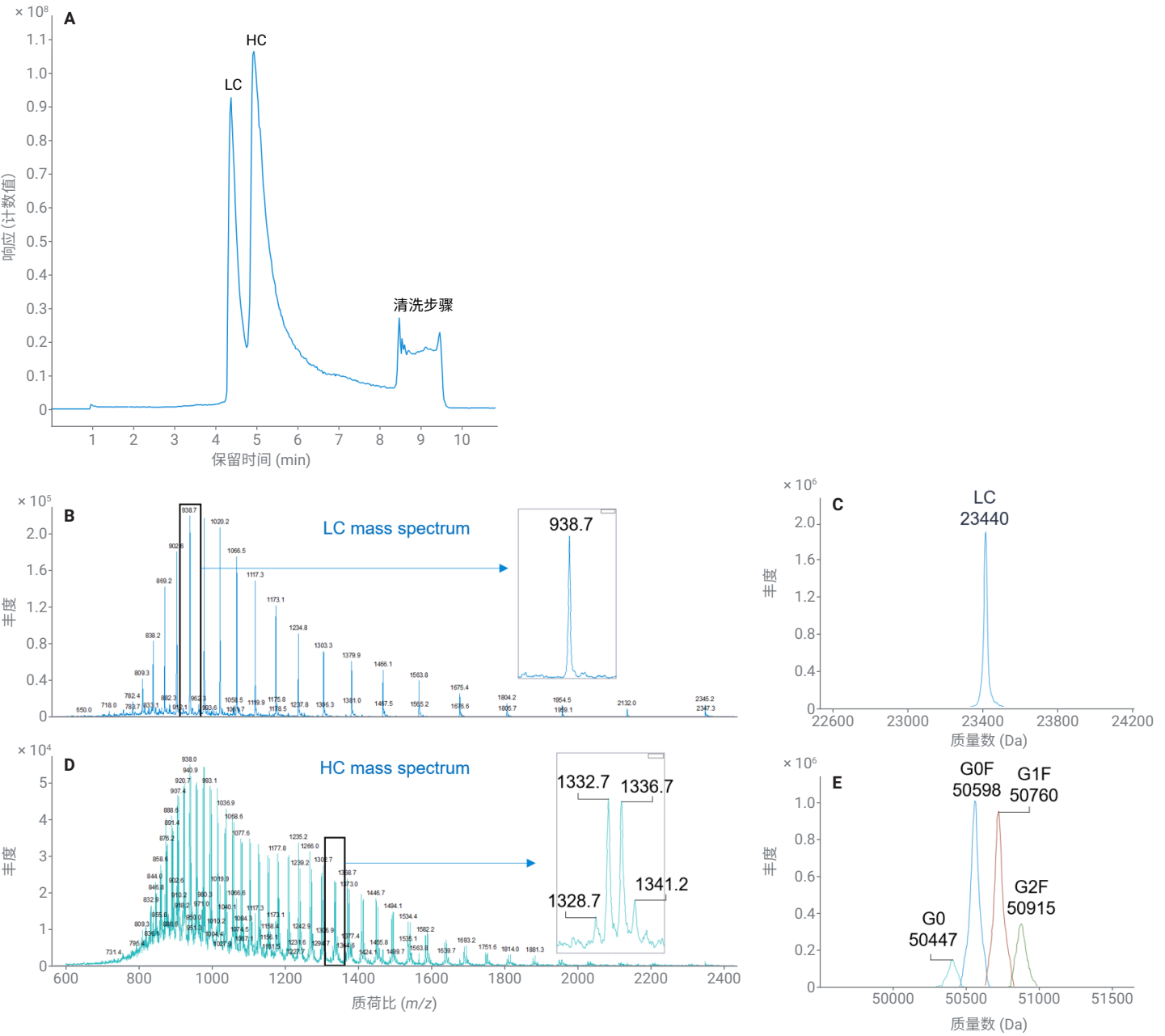


图 4. (A) 使用 Agilent Pro iQ Plus 单四极杆质谱仪采集的还原态曲妥珠单抗的 TIC。(B+D) 分别为曲妥珠单抗轻链和重链的原始质谱图。插图显示了仪器的原始质谱图质量。(C+E) 分别为曲妥珠单抗轻链和重链的解卷积质谱图。质量数误差计算值如表 3 所示

插图显示原始质谱图中存在四个峰，分别对应 G0、G0F、G1F 和 G2F 糖型。LC 和 HC 的解卷积质谱图分别如图 4C 和 4E 所示。还原态曲妥珠单抗所用的处理参数与图 2 列出的完整 mAb 的处理参数基本一致。唯一的区别是解卷积质量数范围变为 10000–60000 Da，相对丰度阈值设为 25%。值得注意的是，曲妥珠单抗 HC 解卷积质谱中糖基化峰的相对强度与原始质谱插图中观察到的相对强度相似。虽然 HC 不同电荷态的糖基化峰相对强度存在差异，但能够将原始质谱图中的相对丰度与解卷积质谱图中的结果相关联，可以提高解卷积质谱图的可信度。在还原态和完整蛋白质水平报告糖基化相对丰度非常重要，因为若这些丰度不满足既定标准，则生物制药实验室的 QA/QC 团队将启动进一步调查。

完整蛋白质/亚基水平的相对丰度和质谱图解卷积报告

表 4 分别给出了在完整蛋白质和亚基水平测得的曲妥珠单抗相对丰度。相对丰度 (%) 是将各组分丰度相对于最强组分进

行归一化计算得到的，而相对定量 (%) 则是计算各组分绝对丰度相对于所有组分总丰度的百分比。相对丰度 (%) 和相对定量 (%) 均可用于监测产品的一致性和质量。

表 3. 使用 Agilent OpenLab CDS 软件进行解卷积，比较理论平均分子量和实测分子量

使用 Agilent Pro iQ Plus 质谱仪进行测量的实验误差					
分子	修饰	理论质量数 (Da)	质量数实验值 (Da)	Δ 质量数 (Da)	质量误差 (ppm)
完整曲妥珠单抗	G0+G0F	147912.7	147916.7	4.0	27
	G0F+G0F	148058.8	148055.1	-3.7	-25
	G0F+G1F	148221.0	148217.7	-3.3	-22
	G1F+G1F	148383.1	148374.7	-8.4	-57
	G1F+G2F	148545.3	148542.0	-3.3	-22
曲妥珠单抗 HC	G0	50456.1	50447.3	-8.8	-174
	G0F	50602.2	50597.9	-4.3	-85
	G1F	50764.4	50759.9	-4.5	-89
	G2F	50926.5	50915.4	-11.1	-218
曲妥珠单抗 LC	无	23443.3	23440.5	-2.8	-119

表 4. 解卷积后 (A) 完整蛋白质水平和 (B) 还原态水平的相对丰度

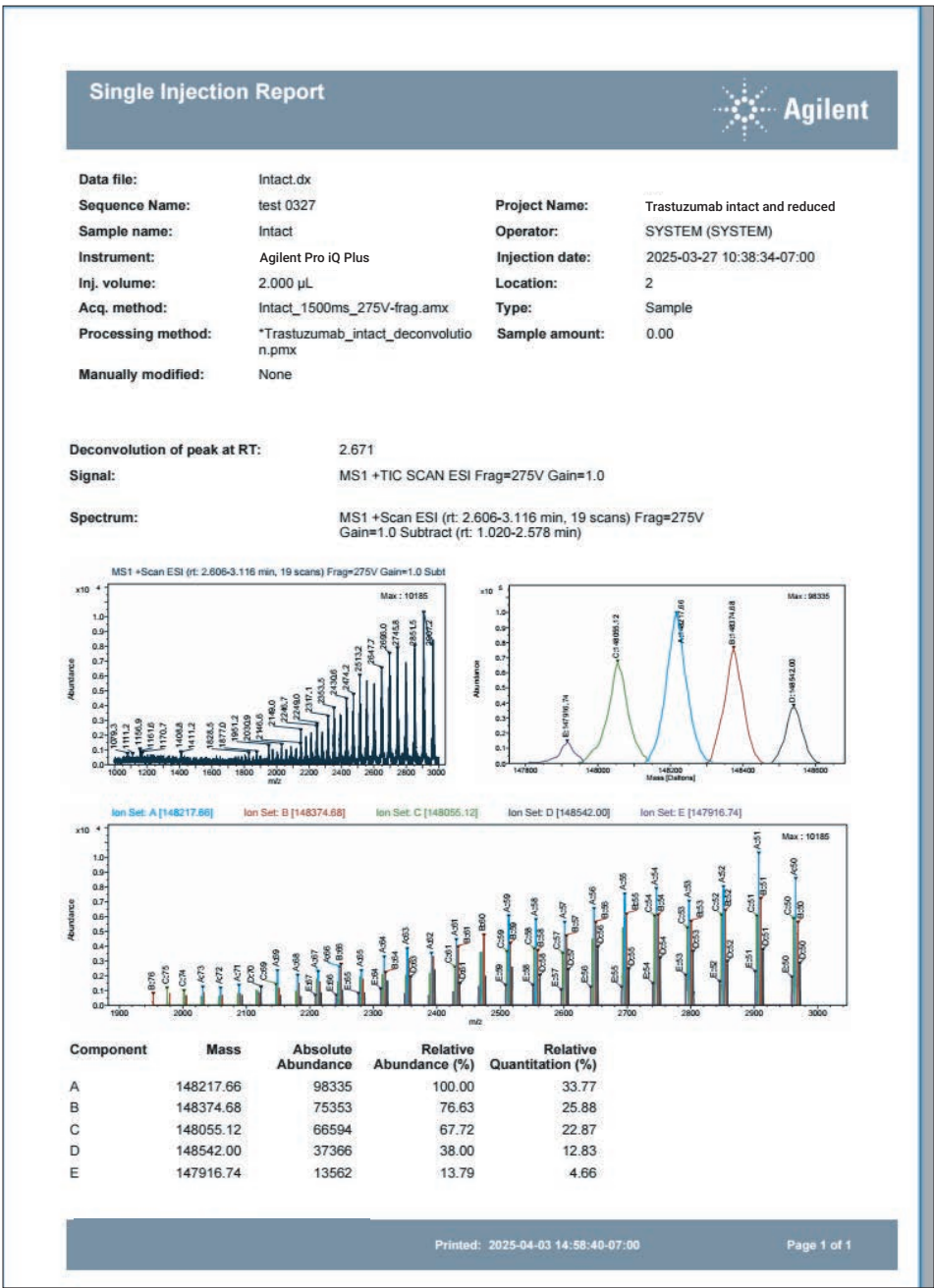
完整曲妥珠单抗相对丰度				
组分	实测质量数	推测糖型	相对丰度 (%)	相对定量 (%)
A	148218 Da	G0F+G1F	100	33.77
B	148375 Da	G1F+G1F	76.63	25.88
C	148055 Da	G0F+G0F	67.72	22.87
D	148542 Da	G1F+G2F	38.00	12.83
E	147917 Da	G0+G0F	13.79	4.66

曲妥珠单抗重链相对丰度				
组分	实测质量数	推测糖型	相对丰度 (%)	相对定量 (%)
A	50598 Da	G0F	100	41.22
B	50760 Da	G1F	94.13	38.80
C	50915 Da	G2F	33.71	13.90
D	50447 Da	G0	14.73	6.07

图 5 为完整曲妥珠单抗的质谱图解卷积软件报告示例。在 OpenLab CDS 软件的报告编辑器选项卡中，可以轻松对该报告进行自定义。此处所示的报告给出了采集和处理方法、进样量、样品瓶位置和进样日期等详细信息，以确保可追溯性。此外，还包含原始质谱图、解卷积质谱图及检测到的组分。解卷积谱图中各组分的相对丰度 (%) 和相对定量 (%) 数据也将在报告中列明。

结论

LC/MS 完整质量数分析是生物制药实验室常用的一种糖基化相对丰度监测技术。这些分析对于确保产品的有效性和安全性非常重要。Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱与 Agilent InfinityLab Pro iQ Plus 的联用系统为需要稳健系统进行常规分析的实验室提供了体积小且经济高效的 LC/MS 仪器。本研究使用 Pro iQ Plus LC/MS 系统报告了治疗药物在完整蛋白质和还原态下的糖基化峰相对丰度。在完整蛋白质水平鉴定出五个糖基化峰，其相对丰度与安捷伦高分辨精确质量系统测得的结果一致。此外，还测定了曲妥珠单抗重链的相对丰度，并鉴定出四个峰，分别对应于 G0、G0F、G1F 和 G2F 糖型。可靠的糖基化相对丰度检测能力与出色的质谱峰形，充分体现了 Agilent Pro iQ Plus 单四极杆质谱仪的卓越性能。



参考文献

1. Higel, F.; Seidl, A.; Sörgel, F.; Friess, W.
N-glycosylation Heterogeneity and
the Influence on Structure, Function
and Pharmacokinetics of Monoclonal
Antibodies And Fc Fusion Proteins.
Eur. J. Pharm. Biopharm. **2016**, *100*,
94–100. [https://doi.org/10.1016/
j.ejpb.2016.01.005](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.01.005)
2. Wang, D.; Baudys, J.; Bundy, J.;
Solano, M.; Keppel, T.; Barr, J.
Comprehensive Analysis of the
Glycan Component of SARS-CoV-2
Spike Proteins Using Signature Ions-
Triggered Electron-Transfer/Higher-
Energy Collisional Dissociation
(ET_hCD) Mass spectrometry. *Anal.*
Chem. **2020**, *92*, *21*, 14730–14739.
[https://doi.org/10.1021/acs.
analchem.0c03301](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03301)

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

DE-006222

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，2025
2025 年 5 月 13 日，中国出版
5994-8345ZHCN