

使用BioAccord系统对热不稳定性肽进行属性监测的最佳实践

Nilini Ranbaduge, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

本应用纪要报告了在定义肽分析适用的BioAccord系统“通用”参数方面的探索。糖肽常被用作一种测试案例，代表典型肽图分析中一些稳定性非常低的肽。

优势

优化肽图分析和监测分析的MS设置，大幅减少源内碎片，增强定量不稳定性肽的能力。

简介

Waters BioAccord系统是一款小体积、SmartMS赋能的LC-MS系统，专为辅助当前生物治疗药物分析而设计。该系统吸收了液相色谱-质谱仪器和信息学方面的技术改进，可为常规的蛋白质、游离寡糖、肽、寡核苷酸分析提供基于工作流程的解决方案。对于未曾应用过高性能LC-MS技术的实验室，实现精简部署和操作所需的核心功能包括自动化系统启动和校准、主动健康状态检查，以及自动化数据采集、处理和报告工作流程。这一新方法可显著减少用户干预，从而缩短获取高质量数据所需的周转时间，为曾经高度依赖MS专家的组织提供高性能LC-MS解决

方案。

在电喷雾电离质谱仪器中，电离分子在MS进样口处压力更高的离子源和离子源后区域发生碰撞活化，生成碎片离子，此过程常产生源内碎片。对于稳定性更低（容易受到影响）的肽而言，这可能会导致肽骨架内酰胺键或侧链改性剂的裂解。糖基化等修饰尤其容易受到糖残基之间糖苷键源内断裂的影响，而断裂会导致完整糖肽的肽信号丢失。在肽属性监测研究中，我们可以根据单个糖肽的MS信号与糖肽变体总信号之比来评估各种糖肽的相对丰度。源内碎片离子的存在可能会改变该比率，导致相对修饰水平的准确度降低。BioAccord系统可针对在不同条件下进样至MS检测器的样品提供MS离子源调谐的关键参数，帮助用户实现性能优化。得益于这些标准的优化，BioAccord系统可为肽分析提供接近理想的条件，包括大幅减少源内碎片。本应用纪要报告了在定义肽分析适用的BioAccord系统“通用”参数方面的探索。糖肽常被用作一种测试案例，代表典型肽图分析中一些稳定性非常低的肽。

实验

样品前处理

使用200 μL 含0.1%甲酸的LC-MS级水溶解mAb酶解标准品（部件号：186009126），制成终浓度为0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溶液以备MS离子源优化实验使用。每次LC-MS运行进样5.0 μL ，酶解物的柱上进样量为1.0 μg 。这是获得理想灵敏度和色谱峰形的推荐上样量。

使用酶解缓冲液（pH 7.5的0.25 M Tris缓冲液和5.2 M GndHCl）稀释得到1.0 mg/mL的曲妥珠单抗（基因泰克，美国加利福尼亚州）和英夫利昔单抗（Janssen Biotech, Inc., 美国宾夕法尼亚州）胰蛋白酶酶解物。在使用胰蛋白酶(20/1, w/w)酶解4小时之前，每份样品均已经过还原和烷基化。酸化样品，并用0.1%甲酸溶液稀释至终浓度0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，以备LC-MS分析（柱上上样量1 μg ）。

液相色谱条件

mAb酶解标准品：使用50 min线性梯度（见表1），流动相A为0.1%甲酸的水溶液，流动相B为0.1%甲酸的乙腈溶液，在ACQUITY UPLC CSH C_{18} 肽分析专用柱，130 \AA , 1.7 μm , 2.1 mm, 100 mm（部件号：186006937）上分离肽。

曲妥珠单抗和英夫利昔单抗样品：在ACQUITY UPLC BEH C_{18} 肽分析专用柱，130 \AA , 1.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm（部件号：186003555）上分离肽，使用的梯度同上。

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B
0.00	0.200	99.0	1.0
2.00	0.200	99.0	1.0
52.00	0.200	65.0	35.0
57.00	0.200	15.0	85.0
62.00	0.200	15.0	85.0
67.00	0.200	99.0	1.0
80.00	0.200	99.0	1.0

表1. *mAb*酶解标准品的LC梯度

质谱条件

质谱系统：	ACQUITY RDa质谱检测器
电离模式：	ESI+
采集模式：	碎裂模式下的全扫描MS（在低（固定）和高（梯度）锥孔电压下同时进行双功能通道采集）
采集范围：	m/z 50~2000
毛细管电压：	1.2 kV和1.5 kV

锥孔电压（固定）：	测试值分别设定为20 V、30 V、40 V和50 V
碎裂锥孔电压：	60-120 V
脱溶剂气温度：	200–500°C（每次进样的测试值增加50 °C）
智能数据捕获(IDC)：	开启 ¹

优化后的MS设置

毛细管电压：	1.2 kV
锥孔电压：	20 V
脱溶剂气温度：	350 °C

数据管理

在配备肽图（精确质量数MS）工作流程处理方法的waters_connect中使用UNIFI科学信息系统分配肽鉴定结果，使用开发版的目标肽监测软件进行肽的相对定量。

结果与讨论

用于优化的MS离子源参数

众所周知，源内碎片是电喷雾电离质谱分析的一个常见问题，会导致热不稳定性肽发生离子源诱导解离²。该现象有时可用于生成肽骨架碎片离子以表征肽序列或修饰，但由于该现象会增加MS谱图的复杂性并导致完整肽变体MS信号丢失，因此仍然存在对不稳定性肽修饰相对定量产生负面影响的问题。

ACQUITY RDa质谱检测器离子源和传输区域的设计旨在大幅减少生物分子的源内碎片。然而，某些不稳定性侧链修饰的定量，如糖基化修饰，需要“更温和的”MS离子源条件以保留糖肽基团的结构。

一直以来，通过优化MS离子源来减少源内碎片对于未受过MS专业培训的分析科学家而言困难重重，这极大程度上是因为可调整的参数数量庞大。ACQUITY RDa质谱检测器专为解决这一难题而设计，它的所有参数均固定为标称的最佳值，以下三种与进样条件相关的关键离子源参数除外：毛细管电压、锥孔电压和脱溶剂气温度（这三种参数因方法/样品类型而异）。用户可通过分析方法获取这些参数，如图1所示。

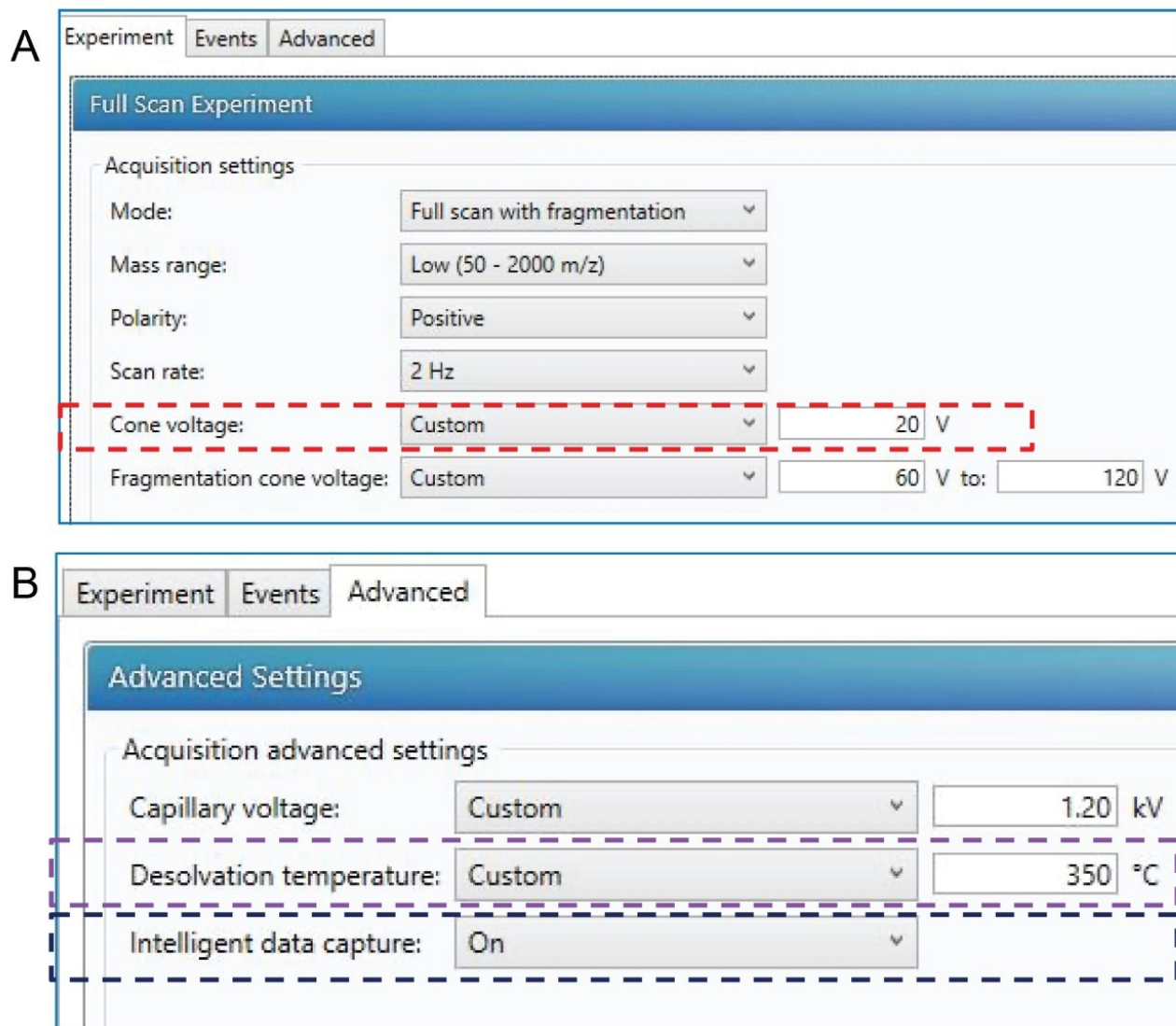


图1.用户可通过分析方法获取方法优化参数，也可使用UNIFI中的已优化参数。最佳锥孔电压设置(A)和脱溶剂气温度设置(B)分别见红框和紫框。(A)中的锥孔电压递增条件显示为“裂解锥孔电压”，用于生成碎片数据，独立于低碰撞能量MS扫描。*请注意，仅使用低碰撞能量MS数据通道进行修饰肽的相对定量(%)。对于肽分析，建议将智能数据捕获项选择“开启”，以便在不牺牲数据质量的同时精简数据文件。

毛细管电压、锥孔电压和脱溶剂气温度的影响

在本研究中，毛细管电压对糖肽的源内碎片水平影响非常小（数据未显示）。MS响应值随毛细管电压升高而增加

，在升高至大于1.2 kV后，截至达到最大值1.5 kV时，响应值仅有少量增加。因此将1.2 kV作为毛细管电压的固定值，用于评价改变脱溶剂气温度和锥孔电压的影响。

研究观察到脱溶剂气温度和锥孔电压对源内碎片的影响更大²，随后我们对这两个参数进行了系统性评价，旨在确定大幅减少糖肽碎片（图2A）并且保持绝对MS信号强度的理想设置³。

本研究使用NISTmAb胰蛋白酶酶解肽作为测试样品。我们选择 m/z 366.1395 Da和204.0866 Da处的两种糖基氧鎓离子作为源内碎片标记，监测了离子计数（图2B）。分别在锥孔电压20、30、40和50 V以及脱溶剂气温度200–500 °C（增幅为50 °C）的条件下监测了氧鎓离子强度。观察到最佳参数组合为锥孔电压20 V和脱溶剂气温度350 °C。

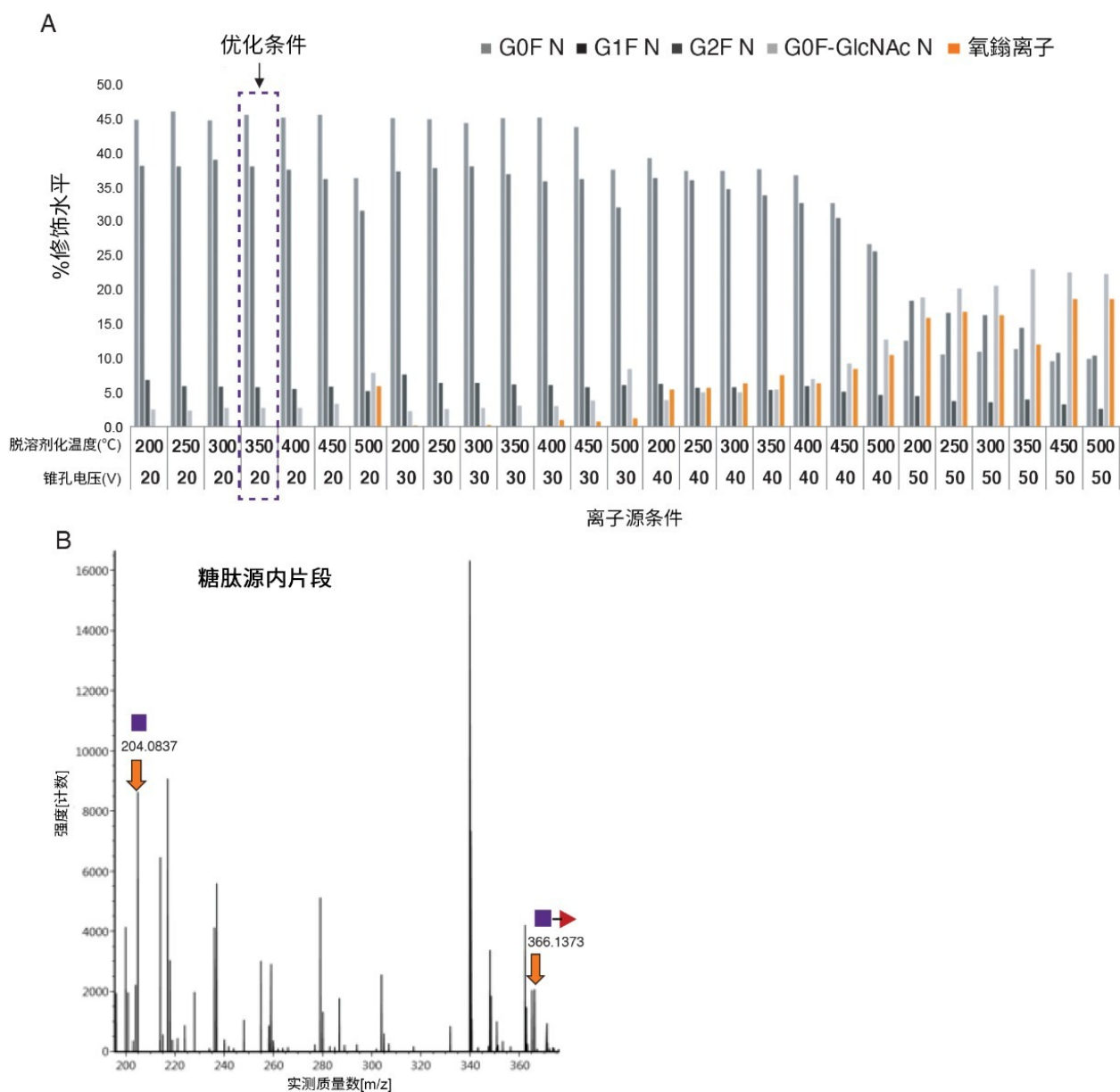


图2.(A) 通过多次LC-MS进样筛选锥孔电压和脱溶剂气温度以确定研究监测的4种糖肽的MS离子源优化条件。氧鎘离子的百分比代表了来自所有糖肽的综合相对信号。(B) 此分析中监测的氧鎘离子为GlcNAc (204.0866 Da)和GlcNAc+Gal (366.1395 Da)。在锥孔电压20 V和脱溶剂气温度350 °C (如图A的框内所示) 条件下得到的糖肽结果最佳, 并且源内碎片减少。

相比于此前在重点生成肽分配结果的肽图定量分析中发表的BioAccord系统离子源参数 (沃特世应用纪要

，720006466ZH)³，即锥孔电压30 V、脱溶剂气温度350 °C，本研究中新选出的参数可使选定糖肽的源内碎片减少0.7%。此外，与既往报告的数据相比，多个NISTmAb糖肽分析的优化条件可使糖肽的绝对MS强度水平以及修饰水平(%)保持在相近的水平（表2）。我们在另外两套BioAccord系统上进一步验证了这些优化条件（数据未显示）。

糖肽或碎片离子	锥孔电压20 V 脱溶剂气温度350 °C		锥孔电压30 V 脱溶剂气温度350 °C	
	MS响应	%修饰水平	MS响应	%修饰水平
G0F	4.0E+05	46.5	3.9E+05	46.4
G0F-GlcNAc	2.5E+04	2.9	2.7E+04	3.2
G1F	3.5E+05	40.5	3.3E+05	38.6
G1F-GlcNAc	2.5E+04	2.9	2.7E+04	3.2
G2F	5.1E+04	5.9	5.7E+04	6.7
Man5	1.0E+04	1.2	1.1E+04	1.3
氧鎇	未检出	未检出	5.6E+03	0.7

表2.使用锥孔电压20 V和脱溶剂气温度350 °C条件的既往研究与使用锥孔电压30 V和脱溶剂气温度350 °C条件（优化）的本研究相比，六种选定糖肽的MS响应值及修饰水平(%)。

我们随后使用这些优化设置在三次连续LC-MS进样中监测了多种糖肽。在NISTmAb中，Man5丰度较低，相对于基峰肽信号(VVSAVLTVLHQDWLNGK)的相对丰度为0.02%。我们通过重复进样发现，优化后的离子源设置具有高MS灵敏度和重现性，RSD为3.8%（图3）。

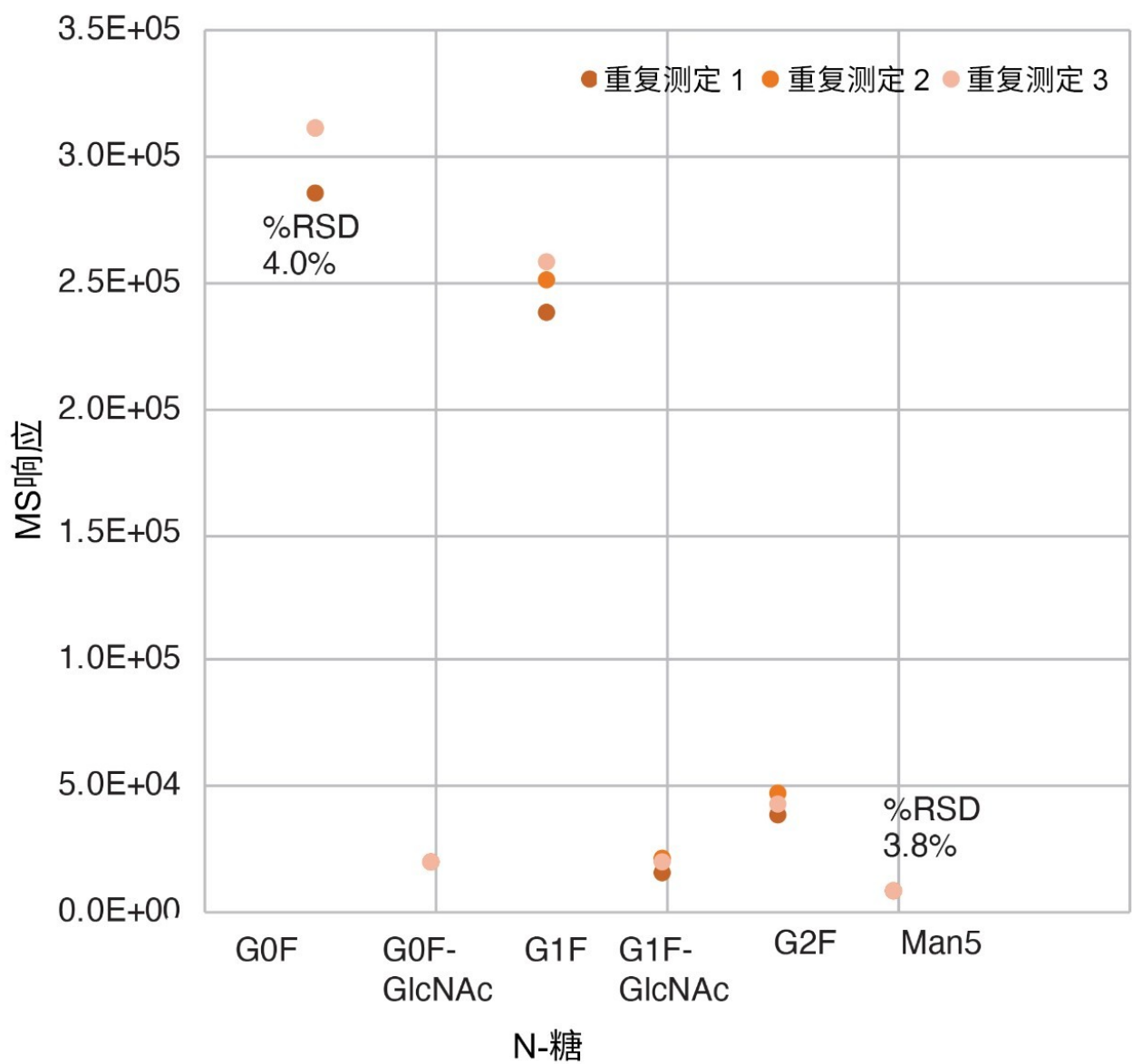


图3.在锥孔电压20 V和脱溶剂气温度350 °C条件下监测的六种选定糖肽的绝对MS强度。根据G0F糖肽的丰度%（基峰肽VVS AVLTVLHQDWLNGK的0.89%）得到的三次重复进样的MS响应值%RSD为4.0%。丰度更低的Man5糖肽（基峰的0.02%）的%RSD结果为3.8%，与G0F相似。

优化后的离子源条件用于其他mAb产品时可产生相似的数据

我们随后使用另外两种mAb（曲妥珠单抗和英夫利昔单抗）的胰蛋白酶酶解物确认了由NISTmAb肽得到的初始

MS离子源优化设置。分析均采用相同的两种源内碎片标记离子 (m/z 366.1395 Da和204.0866 Da) 来确定氧鎗离子总体水平。

数据显示，所有mAb酶解物的源内碎片水平相似（图4）。这进一步证实，上述针对mAb酶解标准品所选出的锥孔电压和脱溶剂气温度也适用于其他单克隆抗体分子，可用于监测糖肽等热不稳定性肽。

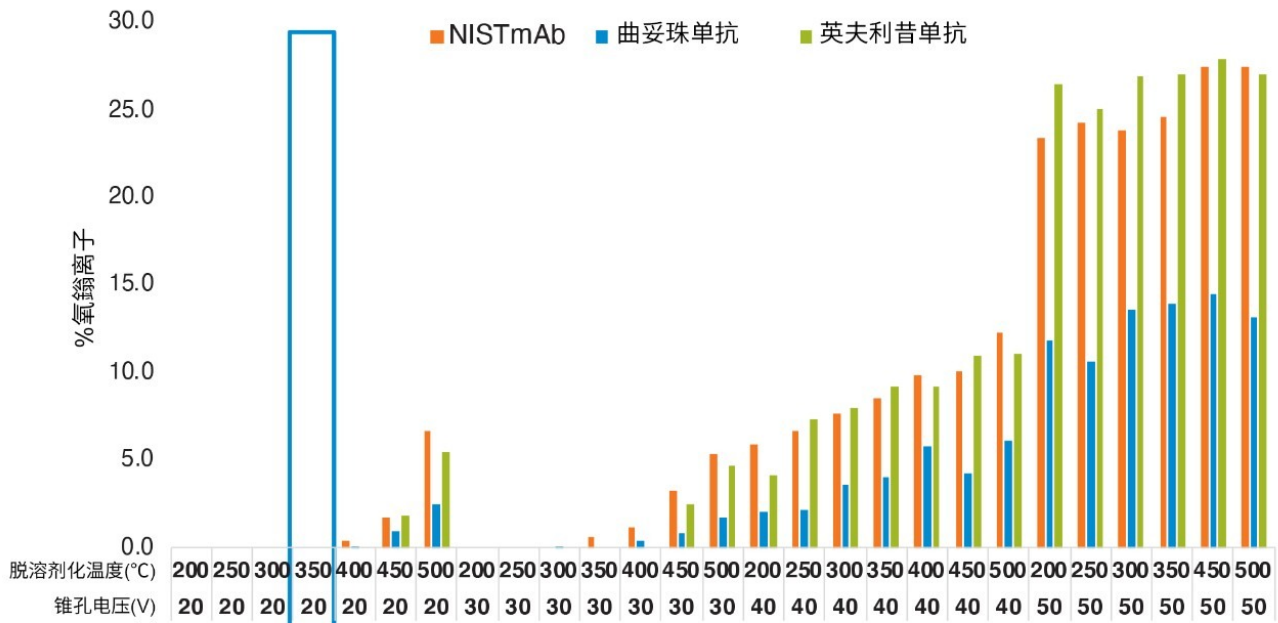


图4.本研究在不同的锥孔电压(20–50 V)和脱溶剂气温度(200–500 °C)条件下分析了NISTmab、曲妥珠单抗和英夫利昔单抗的肽酶解物。我们使用GlcNAc和GlcNAc+ Gal氧鎗离子与选定糖肽变体 (G0F、G1F、G2F、G0F-GlcNAc、G1F-GlcNAc和Man5) 的相对MS响应，监测了每种条件下糖肽的源内碎片氧鎗离子标记水平(%)。

结论

BioAccord系统的集成分析工作流程可促进自动化肽图分析和生物治疗药物的产品变体属性监测。本研究展示了在BioAccord系统上监测不稳定性糖肽的通用MS离子源优化参数。毛细管电压1.2 kV、锥孔电压20 V和脱溶剂气温度350 °C是较为理想的条件，可大幅减少源内碎片水平，同时保持Man5等难电离的低丰度糖肽的MS灵敏度。相对丰度测量结果表明，选出的条件可用于低丰度不稳定性肽的相对定量，且多次进样糖肽的修饰水平%重现性良

好。我们建议在BioAccord系统中进行肽图定性分析和肽属性定量监测时采取上述离子源条件，大幅提升生物治疗药物分析的数据质量。

参考资料

1. Mortishire-Smith, R.; Richardson, K.; Denny, R.; and Hughes, C. Intelligent Data Capture: Real-Time Noise Reduction for High Resolution Mass Spectrometry. Waters Application Note, 720006567EN, 2019.
2. Kim, J.S et al. In-Source Fragmentation and the Sources of Partially Tryptic Peptides in Shotgun Proteomics. J Proteome Res., 2013, 12(2):910–916.
3. Ranbaduge, N.; Shion, H.; and Yu, Y. Q. 使用BioAccord系统进行常规肽图分析. 沃特世应用纪要, 720006466 ZH, 2019.

特色产品

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/135005818>>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

720006855ZH, 2020年4月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.