

应用纪要

剖析新型冠状病毒肺炎(COVID-19): 反相液相色谱(RPLC)法分析严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2)的完整刺突蛋白

Jennifer M. Nguyen, Matthew A. Lauber

Waters Corporation



需要帮助? 如需详细了解沃特世如何为您抗击新型冠状病毒肺炎(COVID-19)提供助

力，请联系 [新型冠状病毒肺炎\(COVID-19\)疫情创新响应团队](#)

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

为应对全球新型冠状病毒肺炎(COVID-19)大流行疫情，人们进行了大量的新型冠状病毒疫苗开发工作。疫苗靶点的确定需要借助稳定耐用的分析方法来掌握SARS-CoV-2的结构生物学特征。SARS-CoV-2的完整刺突蛋白在病毒发病机制中发挥重要作用，可作为疫苗开发的潜在靶点，本研究重点介绍该刺突蛋白的反相液相色谱分析^{1,2}。研究表明，使用二氟乙酸(DFA)替代甲酸(FA)作为流动相改性剂可提高完整蛋白分析的色谱分离度。此外，该方法配合N-糖苷酶和O-糖苷酶处理可能有助于实现更加详尽的完整蛋白MS研究。

优势

使用DFA替代FA作为流动相改性剂能够：

- 提高低丰度蛋白形态的分离度
- 使梯度峰容量提高3倍

简介

SARS-CoV-2刺突蛋白会促进宿主细胞感染，由于可用作新型冠状病毒(COVID-19)疫苗的潜在靶点，现已成为重点研究对象。正确表征新型冠状病毒蛋白需要借助稳定耐用的鉴定和纯度测试方法。目前已经有大量针对SARS-CoV-2刺突蛋白糖基和糖肽研究的表征工作，而通过反相液相色谱法(RPLC)分析完整蛋白时，无论是否使用内切糖苷酶处理，均有可能提供独特的分析见解^{3,4}。

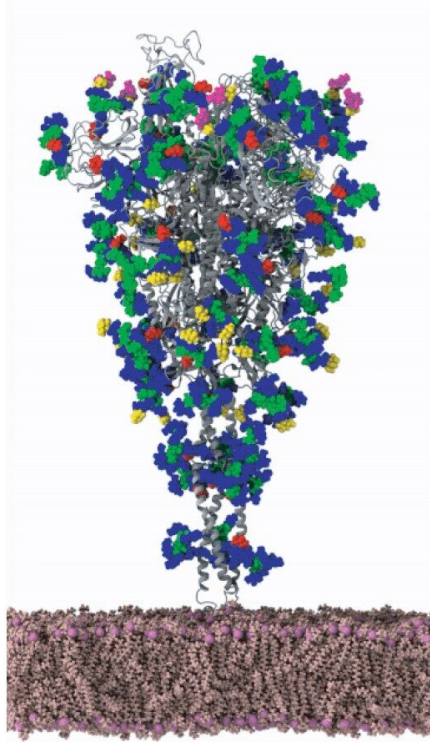


图1.SARS-CoV-2刺突蛋白（灰色）及其表面的糖基模型。Lorenzo Casalino、Zied Gaieb和Rommie Amaro，加州大学圣地亚哥分校

为助力此研究，沃特世分享了以下方法：

- 对比使用二氟乙酸(DFA)或甲酸(FA)作为流动相改性剂时的完整RPLC图谱。结果表明DFA能够在保持MS兼容性的同时提高分离能力。

实验

以下是通过RPLC-FLR-MS法对SARS-CoV-2刺突蛋白进行完整蛋白分析时所采用的实验条件。

LC条件

LC系统：

ACQUITY UPLC I-Class

检测条件:	FLR (280 nm发射波长, 320 nm激发波长)
样品瓶:	QuanRecovery样品瓶
色谱柱:	BioResolve RP, 2.7 μm , 450 \AA , 2.1 x 50 mm
柱温:	80 $^{\circ}\text{C}$
样品温度:	8 $^{\circ}\text{C}$
进样体积:	1 μL
流速:	0.2 mL/min
流动相A:	0.1% IonHance DFA或FA的水溶液
流动相B:	0.1% IonHance DFA或FA的乙腈溶液
梯度:	流动相B在20 min内从15%增加到55%

MS条件

MS系统:	Vion IMS QToF质谱仪
电离模式:	ESI+
采集范围:	1500-4000 m/z
毛细管电压:	2.25 kV
碰撞能量:	6 V
锥孔电压:	140 V

结果与讨论

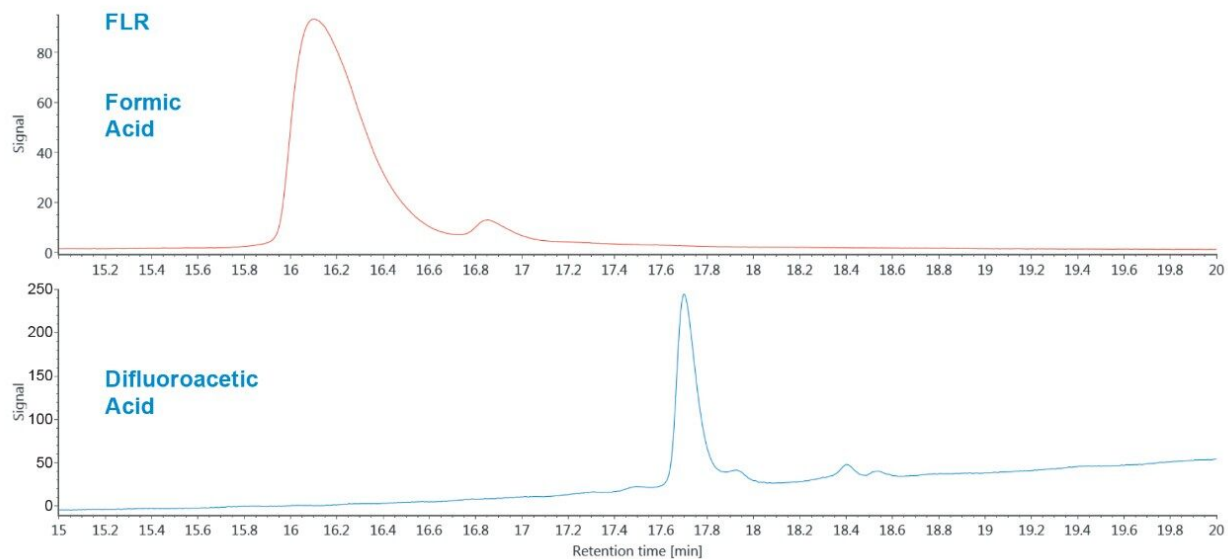


图2.FA与DFA条件下完整蛋白的荧光信号比较

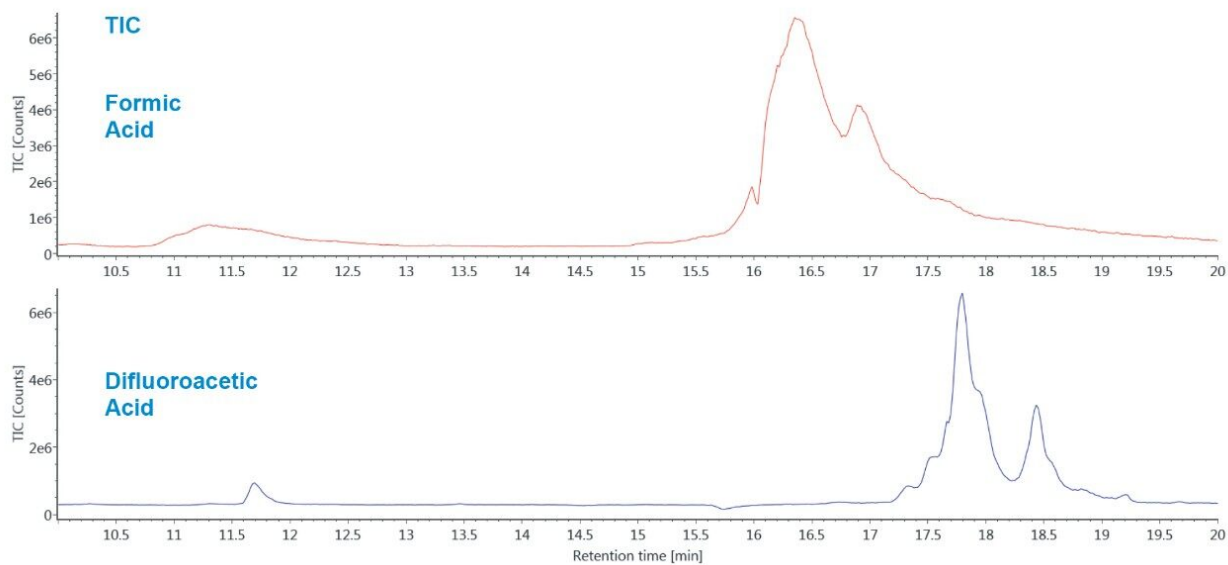


图3.FA与DFA条件下完整蛋白的总离子流色谱图比较

从色谱图可以看出，使用DFA作为流动相改性剂时的分离度相对较高。与使用FA作为流动相改性剂相比，使用

DFA的梯度峰容量提高了3倍以上，低丰度蛋白形态也实现了良好分离。将该色谱分析方法配合N-糖苷酶和O-糖苷酶处理可能有助于在完整蛋白分析层面上实现更加详尽的MS研究。

结论

由于SARS-CoV-2刺突蛋白与病毒致病机制有关，因此将其作为疫苗开发靶点。要开发出有效的治疗药物，需要全面掌握SARS-CoV-2刺突蛋白靶点的结构和功能。利用RPLC法分析完整蛋白有助于深入了解SARS-CoV-2刺突蛋白，进而识别和开发有望治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的新型药物。本研究证明使用DFA替代FA作为流动相改性剂可在保持MS兼容性的同时提高方法分离能力。

参考文献

1. Pinto, D. *et al.* Structural and functional analysis of a potent sarbecovirus neutralizing antibody. *bioRxiv* 2020.04.07.023903 (2020). doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.023903> <
<https://doi.org/10.1101/2020.04.07.023903>>
2. Stawiski, E.W. *et al.* Human ACE2 receptor polymorphisms predict SARS-CoV-2 susceptibility. *bioRxiv* 2020.04.07.024752 (2020). doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.024752> <
<https://doi.org/10.1101/2020.04.07.024752>>
3. Liu, X. , Lauber, M. Comprehending COVID-19: Rapid and Sensitive Characterization of N-Glycans from SARS-CoV-2 Spike Protein. Waters Application Highlight 720006914.
4. Novokmet, Mislav *et al.* Understanding glycans in COVID-19 drug design.
<https://www.genengnews.com/insights/understanding-glycans-in-covid-19-drug-design/> <
<https://www.genengnews.com/insights/understanding-glycans-in-covid-19-drug-design/>>

©2020 Waters Corporation. All Rights Reserved.