

剖析新型冠状病毒肺炎(COVID-19)：利用肽图分析对SARS-CoV-2刺突蛋白进行初步检测

Wenjing Li, 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

SARS-CoV-2刺突蛋白作为蛋白质类COVID-19疫苗的主要候选靶点自然备受关注。已有多项研究表明，新型冠状病毒康复患者体内的中和抗体能够结合刺突蛋白上的肽和肽聚糖抗原表位。因此，在针对新型冠状病毒开发全新的蛋白质类候选疫苗以及QC分析过程中，使用液相色谱和质谱技术的肽图分析可能会发挥重要作用。

优势

- BioAccord LC-MS系统可对蛋白质一级序列进行可靠、准确的确定，并监控翻译后修饰。
- 使用UNIFI科学信息系统进行数据分析，高效且简便易用。

简介

SARS-CoV-2与其它冠状病毒一样，依靠刺突蛋白入侵宿主细胞¹。新型冠状病毒的刺突蛋白是一种分子量约540 kDa的同源三聚体糖蛋白（66个N-糖位点处存在各种不同的修饰），Watanabe等人近期对其进行了表征。虽然已通过计算建模预测了蛋白的O-糖基化修饰，但尚未达到全面、细致的程度^{2,3}。刺突蛋白虽然十分复杂，但值得我们进行多种分析测试以进一步挖掘SARS-CoV-2的病毒学信息。掌握这些新信息可能有助于提升COVID-19全新候选疫苗开发和生产的可靠性。使用肽图分析对重组蛋白进行全面表征和监测是鉴定和跟踪翻译后修饰（例如之前提到的糖基）的常用技术。本研究将利用胰蛋白酶肽图分析法和BioAccord LC-MS系统分析重组SARS-CoV-2刺突蛋白，旨在确认序列信息以及对特异位点的糖基化异质性进行初步评估。

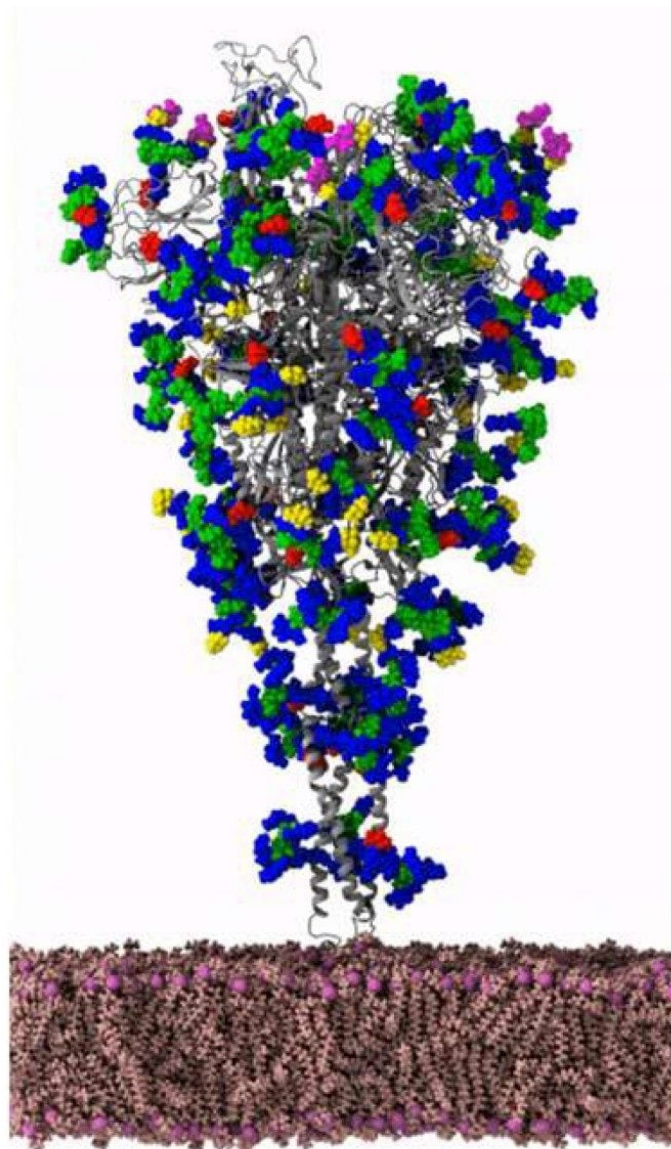


图1.SARS-CoV-2刺突蛋白（灰色）及其表面的糖基模型。Lorenzo Casalino、Zied Gaieb和Rommie Amaro，加州大学圣地亚哥分校

实验

对重组SARS-CoV-2刺突蛋白（通过HEK293细胞表达和纯化）进行变性（使用8 M GuHCl）、还原以及烷基化处理，然后先脱盐（使用筛分介质），再酶解（使用胰蛋白酶）过夜。向一份样品中加入PNGase F使N-糖水解。使用BioAccord LC-MS系统内集成的肽图分析工作流程分析所得到的肽。使用UNIFI处理数据，包括归属肽鉴定结果、通过高能量MS碎片离子数据确认氨基酸序列以及识别翻译后修饰。

LC-MS条件

LC-MS系统：	BioAccord LC-MS
检测条件：	ACQUITY TUV
样品瓶：	QuanRecovery, 96孔
色谱柱：	ACQUITY UPLC Peptide BEH C ₁₈ 肽分析专用柱 (部件号186003555)
柱温：	65 °C
样品温度：	6 °C
进样体积：	10 µL
流速：	0.25 mL/min
流动相A：	0.1%甲酸水溶液
流动相B：	0.1%甲酸的乙腈溶液
电离模式：	ESI+
采集范围：	<i>m/z</i> 50~2000
毛细管电压：	1.2 kV

碰撞能量： 60-130 V

锥孔电压： 30 V

梯度表

Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
0	0.25	99	1	6
5	0.25	99	1	6
65	0.25	60	40	6
68	0.25	30	70	6
70	0.25	30	70	6
71	0.25	99	1	6
85	0.25	99	1	6

数据管理

UNIFI科学信息系统

UNIFI 1.9.4

结果与讨论

在肽图分析实验中的条件下，重组SARS-COV-2刺突蛋白的序列覆盖率达到大约90%（图2）。UNIFI中的肽鉴定匹配标准设定为：母离子质量精度15 ppm，且b或y碎片离子数大于等于3。由于可以预见糖苷键的不稳定性会导致肽骨架断裂不足，因此对于糖肽将标准放宽到碎片离子数大于等于1。最终成功归属了90%以上的已报道N-和O-糖基化位点。特征性N-糖肽得到可靠鉴定，尤其是丰富的寡甘露糖型N234糖肽（参与受体结合位点保护）（图3）。T323处的O-糖基化也在最近的报告中得到了证实⁴。这些数据表明，基于BioAccord的肽图分析工作流程在确定复杂重组糖蛋白的糖基化位点/糖型方面具有潜力。采用其它（不同）酶处理做进一步研究可能会在使用胰蛋

白酶进行前处理所获取信息的基础上扩大信息的覆盖范围。

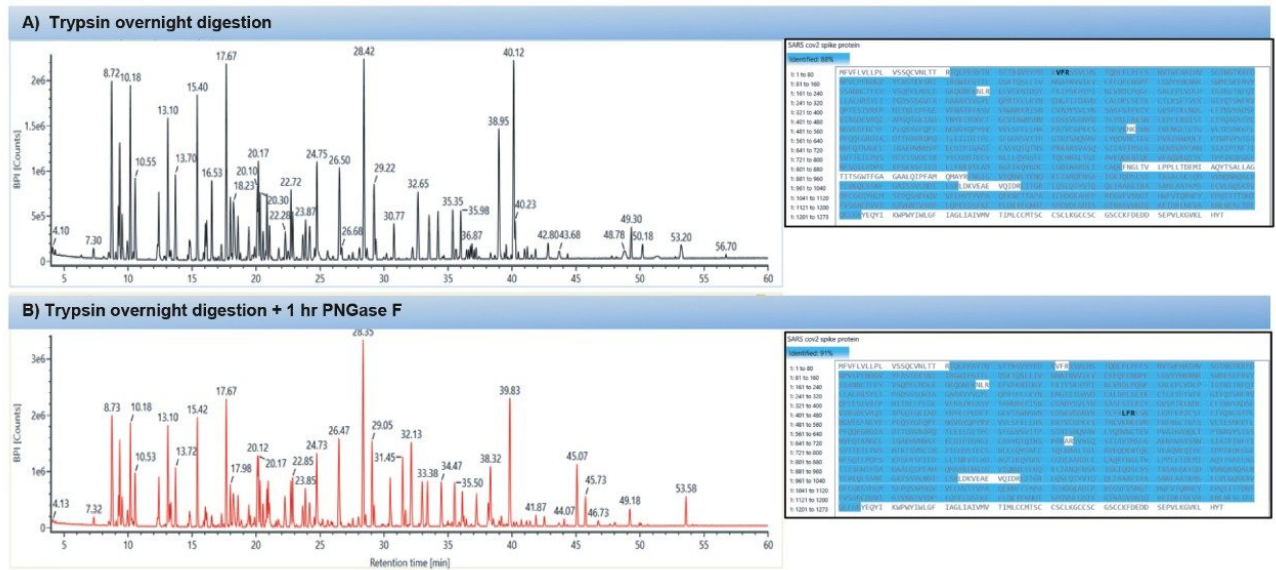


图2.经过A)胰蛋白酶酶解；B)胰蛋白酶酶解+ 1 h PNGase F后得到的SARS-COV-2刺突蛋白肽图。插图所示为UNIFI处理得到的序列覆盖情况。

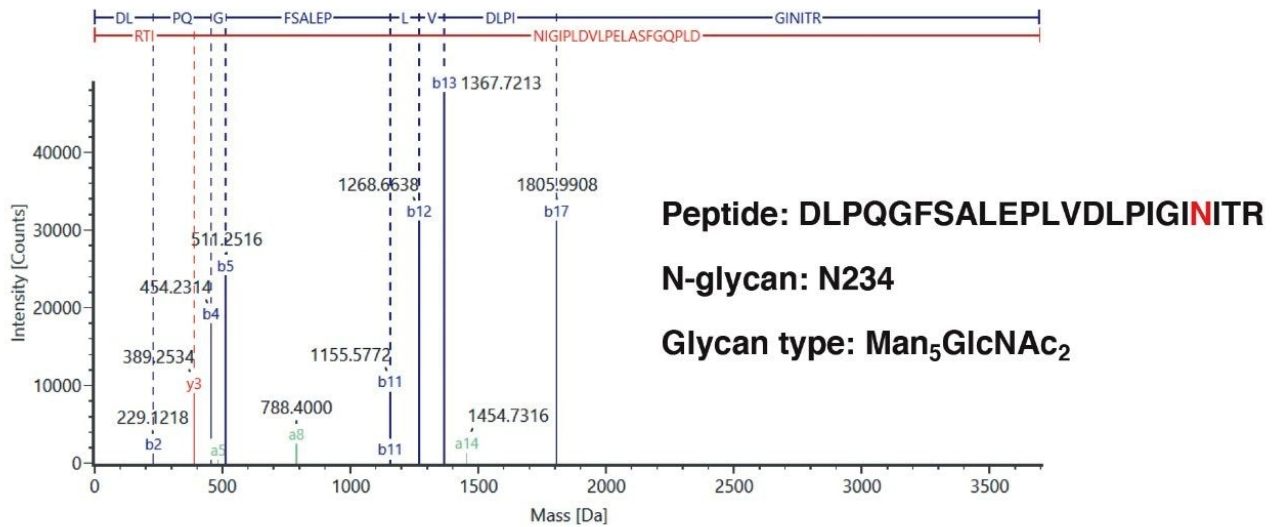


图3.根据高能碎片离子数据得到的位点N234处N-糖肽归属结果

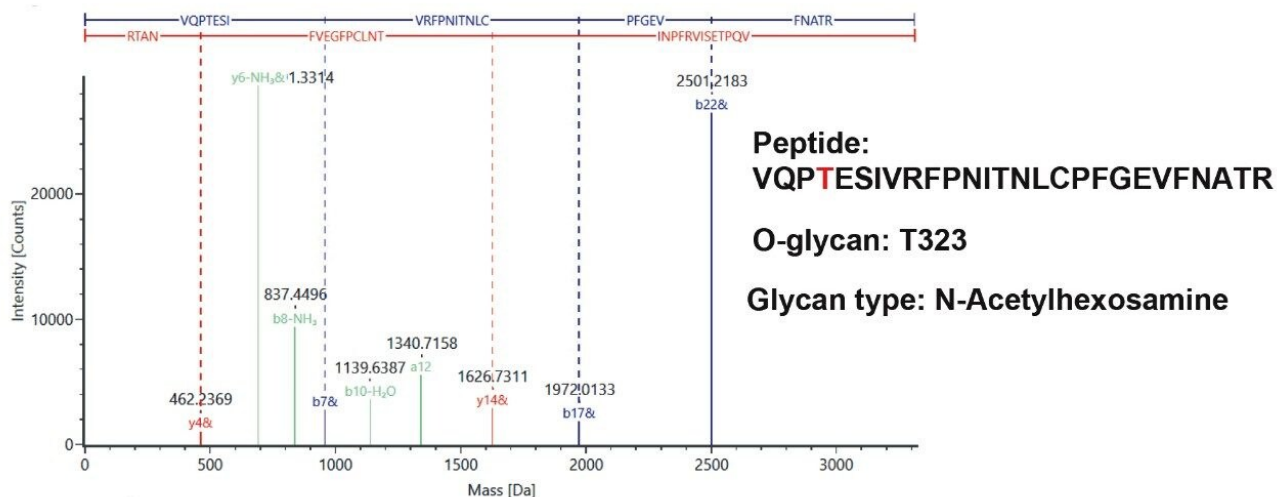


图4.根据高能碎片离子数据得到的位点T323处O-糖肽归属结果

结论

要有效开发COVID-19疫苗，需要对蛋白质抗原进行全面分析表征。诱导出目标水平免疫应答的关键在于，蛋白质类COVID-19候选疫苗要反映天然病毒的抗原结构特征。为解决新型冠状病毒研究在这方面的分析难题，沃特世采用了一种基于BioAccord系统的简便易用型高效肽图分析工作流程。本研究利用BioAccord准确并且可重现地确认了序列覆盖率，并且已经开始进行SARS-CoV-2刺突蛋白的PTM分析。该方法能够在整个工艺开发和生产阶段对糖基化、氧化、脱酰胺和裁剪活动进行监测。

参考文献

1. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2):281 - 292.e6.
2. Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-

2 spike [提前在线发表, 2020年5月4日].*Science*.2020;eabb9983.

3. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*. 2020;26(4):450 - 452.

4. Shajahan A, Supekar NT, Gleinich AS, Azadi P. Deducing the N- and O- glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2 [提前在线发表, 2020年5月4日]. *Glycobiology*.2020 ;cwaa042.

特色产品

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

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

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

720006909ZH, 2020年5月

©2020 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号