

IC与Q Exactive高分辨质谱仪联用 实现未标记IgG N-糖链的鉴定

陈兵, 韩春霞 赛默飞世尔科技(中国)有限公司色谱质谱部

关键词:

Q Exactive; 离子色谱; 未标记; N-糖链

前言

糖基化对蛋白药物的疗效, 稳定性, 免疫原性具有重要的影响。以单克隆抗体为例, 常见的N-糖型主要为G0F、G1F、G2F、G1F-GlcNAc、G0F-GlcNAc等; 如果出现OligoMan、Gal-a-1,3-Gal、NGNA、Xyl-1,2 Fuc-1,3等糖型, 则会影响免疫原性或半衰期, 需要避免; 另外, 可以通过细胞工程及分子生物学技术, 提高A-Fuc, GlcNAc bisecting, G2F, Hyper Sialylation(NANA)的含量, 以增强ADCC, CDC, Anti-inflammatory等效能。寡糖为非模板型合成, 并呈树状结构, 其结构极其复杂, 仅由6种单糖组成的寡糖链, 其理论结构就可达到10¹²种, 因此要求用于寡糖的分析设备具有强悍的分析性能。

糖链常用的分析方法有: 液相色谱法、毛细管电泳法和高效阴离子交换色谱法。其中, 液相色谱法为当前最常用的分析方法, 主要采用HILIC色谱柱和赛默飞独有的GlycanPac AXH-1色谱柱进行分离, 90%以上的糖链分析都使用此方法。高效阴离子交换色谱法一般与脉冲安培检测器联用 (HPAE-PAD) 对寡糖进行检测。

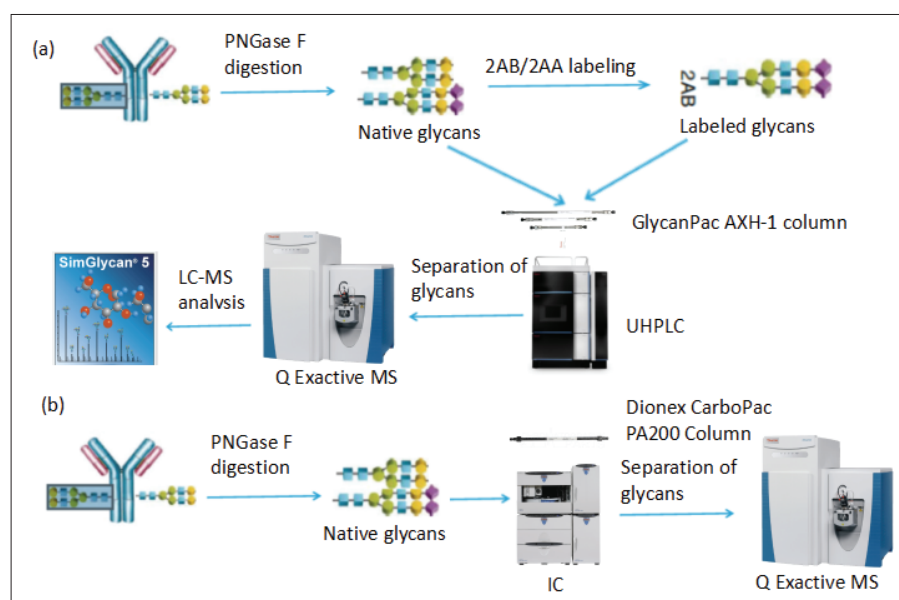


图1. 单克隆抗体N-糖链 (a) LC-MS/MS完整分析流程, (b) IC-MS分析流程

LC-MS联用分析N-糖链（由天冬酰胺连接寡糖）结构的流程包括寡糖链释放、标记、液质联用分析和数据处理四个步骤（图1a）。寡糖链释放需根据不同的糖基化类型选择不同的方法，N-糖链主要使用PNGase F酶切。衍生化标记可以增强寡糖的质谱响应，其中，还原末端标记2-AB等苯胺或杂环化合物还可以使寡糖链通过荧光检测，全甲基化标记增强寡糖链的疏水性，实现反相分离检测。以Q Exactive为代表的Orbitrap超高分辨率质谱具有高灵敏度的优势，用于糖链分析能取得满意的结果。然而LCMS的方法要求将糖链衍生化后再进行分析，样品前处理耗时长，操作复杂。而HPAE-PAD可以直接分析未衍生化的糖链，避免样品在标记过程中唾液的降解，减少了前处理的步骤和样品前处理的时间。图1b为ICMS联用分析N-糖链的工作流程，IgG寡糖链释放后直接用Dionex CarboPac PA200色谱柱分离，再用安培检测器和Q Exactive质谱分析。

本实验建立了基于IC-Q Exactive的未标记IgG N-糖链分析流程（图1b），为未标记N-糖链提供快速、简便的分析方法。



图2. Thermo Scientific Dionex ICS-5000+离子色谱与Q Exactive质谱仪联用实物图

2.实验部分

2.1仪器和试剂

质谱仪器：Q Exactive (赛默飞世尔科技，美国)；

色谱仪器：U3000液相色谱系统 (赛默飞世尔科技，美国)；

色谱柱：Dionex CarboPac PA200 (3x250) PN 062896

试剂：二次去离子水，氢氧化钠(分析纯)，乙酸钠(分析纯)。

2.2仪器方法

离子色谱分析条件：具体见表1；

质谱分析条件：具体见表2；

2.3数据分析方法

Thermo Xcalibur Qual Browser定性浏览器

表1.离子色谱分析条件

淋洗液	A: 50 mM NaOH
	B: 250 mM sodium acetate in 50 mM NaOH
	C: 200 mM NaOH
流速	0.5 mL/min
柱温	30°C
检测器温度	30°C
进样体积	50 µL
检测器	PAD: Quadruple-potential Carbohydrate Waveform 2 Hz (see box below)
参比电极	Ag/AgCl
工作电极	Au on PTFE 0.002" gasket
抑制器	ERD 500 2mm PN 085089
洗脱梯度	
Time (min)	A (%) B (%) C (%) Slope
-5	100 0 0 5
10	100 0 0 5
25	98 2 0 5
55	84 16 0 5
80	60 40 0 5
80.1	0 100 0 5
85	0 100 0 5
85.1	0 0 100 5
90	0 0 100 5

表2. 质谱分析条件

扫描模式	负离子
喷雾电压	3.3kV
毛细管加热温度	320°C
S-lens	50%
鞘气流速	40 (arb)
辅助气流速	10 (arb)
质量扫描范围	m/z 400-2200
分辨率	140,000 @m/z 200

3.结果与讨论

本实验使用Dionex CarboPac PA200色谱柱，按表1的洗脱梯度对未标记的IgG N-糖链进行分离，用Q Exactive高分辨质谱进行检测，质谱参数详见表2。离子色谱用的淋洗液为50mM 氢氧化钠和250mM醋酸钠，在阴离子交换色谱柱上通过梯度洗脱将糖链分离。由于淋洗液中含有高浓度非挥发性的盐，在淋洗液进质谱前必须用抑制器将Na⁺离子置换成H⁺离子从而达到在线脱盐的目的。本次实验在安培检测器上鉴定到17种N糖型，在质谱上鉴定到27种N糖型(见图3)。质谱结果中各糖型实测质量与理论质量相比，质量偏差都在3 ppm以内。图4为G0F、G1F、G2F、G1F-GlcNAc和G0F-GlcNAc糖型的提取离子色谱图，质谱对未标记的N-糖型检测也能达到非常强的响应强度。

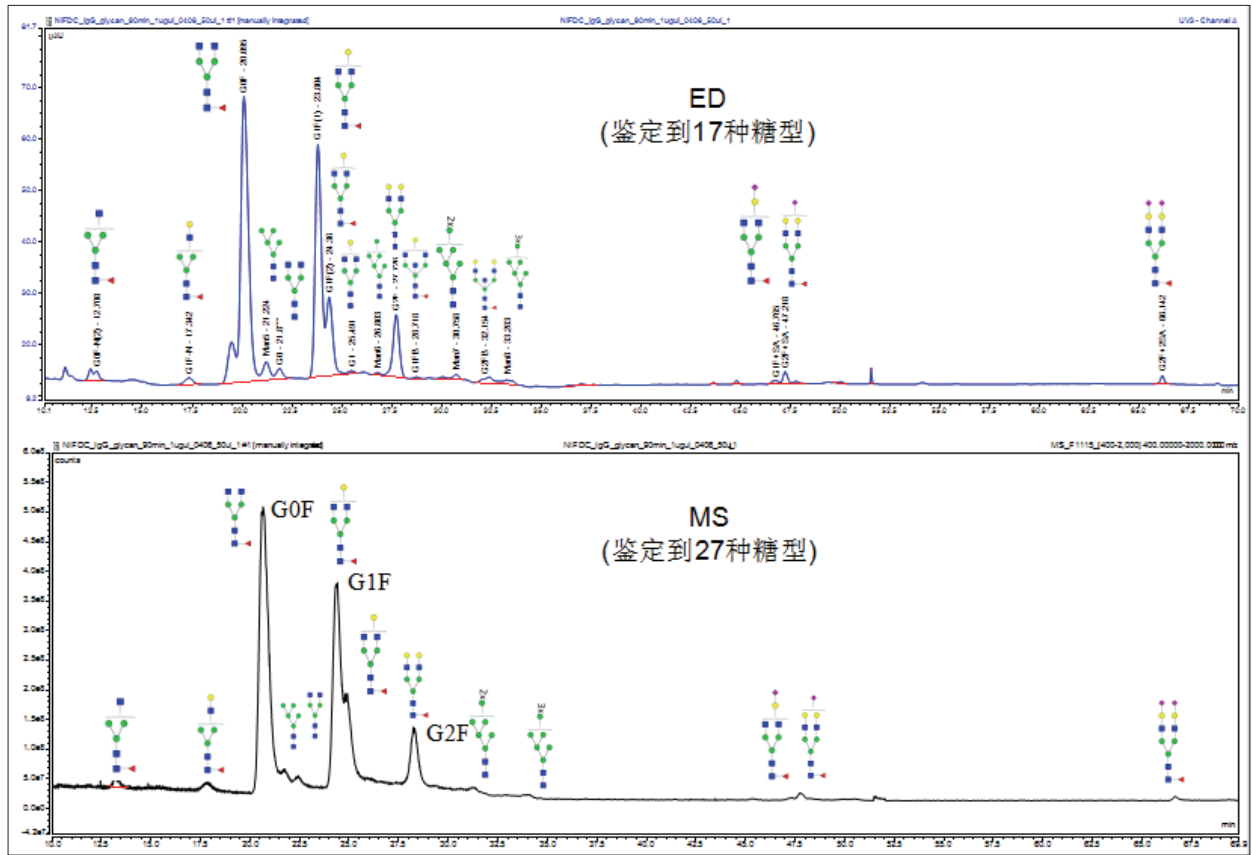


图3. ED安培检测器和MS检测N-糖型结果

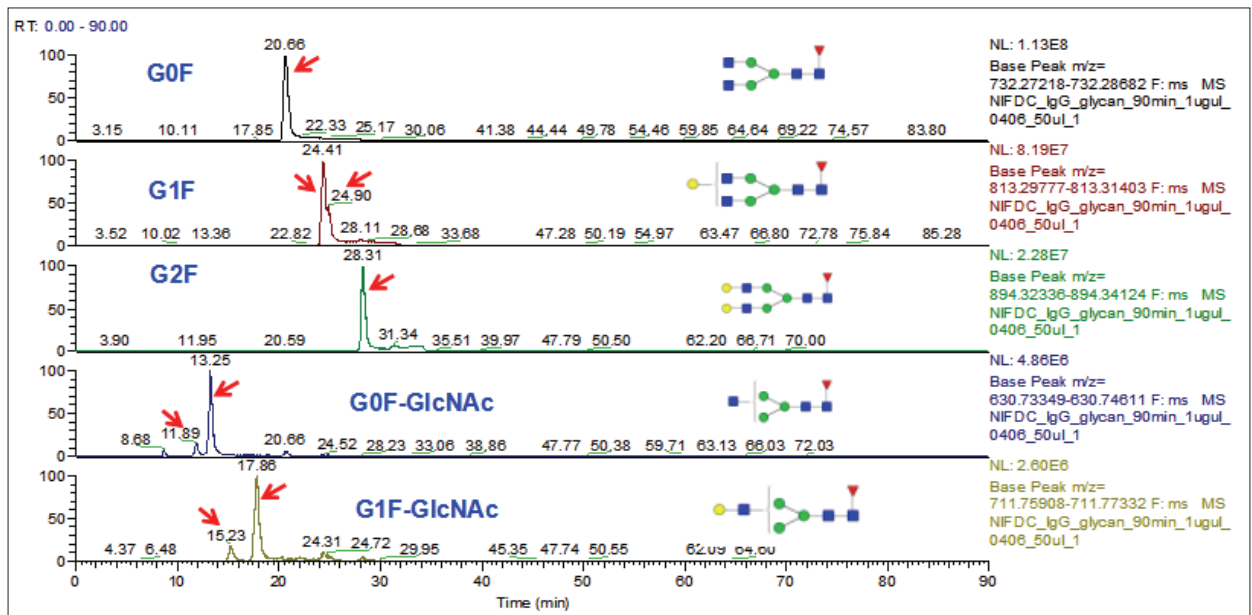


图4. 部分糖型的提取离子色谱图

4.结论

本实验采用IC-Q Exactive高分辨质谱仪对未标记IgG N-糖链进行测定，建立了IC-Q Exactive分析N-糖链的色谱和质谱方法，为糖蛋白N-糖链的研发和生产检测提供快速、简便的分析平台。实验结果表明IC-Q Exactive在糖型分析中有诸多优势：无标记过程，减少唾液酸降解，糖型检出覆盖率高，适用于复杂唾液酸修饰糖型，极大的完善和推动了糖蛋白类药物N-糖链的质控分析。



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
S C I E N T I F I C