

基于高分辨质谱、HCD 和 EThcD 碎裂的重度脂肪酸链修饰多肽解析

龙珍 祝翔

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键字：甘油酯，脂质，脂蛋白，脂肽，ETD，EThcD，高分辨质谱

1. 引言

治疗和预防性重组蛋白药物通常具有丰富的修饰，例如糖基化、磷酸化 / 硫酸化、酰胺化、乙酰化和脂质修饰。在这些修饰中，脂质修饰的分析尤其困难。脂质修饰的蛋白以膜蛋白为主，从单脂肪酸链修饰到甘油酯修饰都用于了生物药的研发。其中，甘油酯 + 单脂肪酸链混合修饰的蛋白的表征非常困难。第一，脂修饰的蛋白，酶解得到的脂肽通常疏水性较强，从而导致非常显著的色谱残留，为不同样品的分析带来挑战。第二，该脂质修饰的多肽分子量较大，较大分子量的碎裂是对质谱碎裂模式的挑战。第三，如何归属脂肽碎裂得到的碎片，用于推导脂质修饰的结构。

在一些文献中，单脂肪酸链的修饰分析已经做了介绍^[1]。本文以某膜蛋白为例，讲解蛋白的油脂 + 单脂肪酸链混合修饰解析。如图 1 所示，其中红色标识的部分为该蛋白的 N 端氨基酸残基（C），蛋白 N 端半胱氨酸残基 C 上的氨基通过脱水缩合与脂肪酸链（R₁）形成酰胺键。半胱氨酸残基的巯基（-SH）与甘油单脂或双脂脱水缩合形成 R₂ 或 / 和 R₃ 的脂肪酸链修饰。由于脂肪酸链的种类较多，只是通过一级质量数，难以推测该脂质修饰的结构信息。因此，本实验采用 EThcD 和 HCD 尝试推测 R₁-R₃ 的类型。

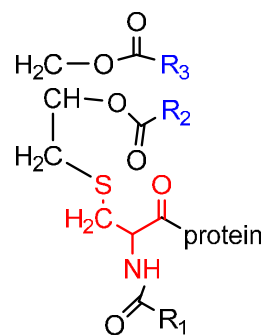


图1 本研究所用膜蛋白的脂质修饰结构。

2. 实验部分

取适量样品用 50 mM 碳酸氢铵稀释到 1 mg/mL，然后加入 trypsin 或 GluC，37 °C，过夜酶切。21000 g 离心上述样品，然后取上清液做 LCMS 分析。

3. 仪器及方法

质谱仪器：Orbitrap Eclipse™ Tribrid™；

色谱仪器：Vanquish Flex 液相色谱系统；

3.1 仪器方法

1) NanoLC-EThcD 分析

分析柱：MabPacRP (2.1 x 50 mm, 4 μm)；柱温：60 °C；流动相：A: 0.1% FA- 水； B: 0.1% FA- 乙腈；分析流速：0.3 mL/min；上样量：5 μL。

分析泵梯度：

时间 (min)	B/%
0	10
10	45
30	95
35	95
35.1	10
40	10

质谱条件：

离子化方式：ESI+；喷雾电压：3.6 kV；鞘气：35；辅助气：10；离子传输管温度：320 ℃；雾化气温度：350 ℃；扫描范围：200-2000 m/z MS1；110 m/z MS2 first mass；AGC：standard MS1, 150% MS2；碎裂模式：EThcD，补偿能量 30%。

4. 数据采集及分析

Thermo Xcalibur Qual Browser 定性浏览器

BioPharma Finder 5.2

Mass Frontier 8.1

5. 结果与讨论

5.1 液相方法的选择

如图 2 所示，由于甘油酯修饰的多肽疏水性较强，用 C18 作为固定相分析该样品，脂肽洗脱时的乙腈比例较高（90% 左右），容易与色谱柱中残留的其他干扰物质一并洗脱，从而产生较强的抑制。用 MabPacRP 作为固定相，受到的干扰较少（双脂修饰洗脱的有机相比比例大约 55%），而且可以实现脂肽的快速洗脱和分离。

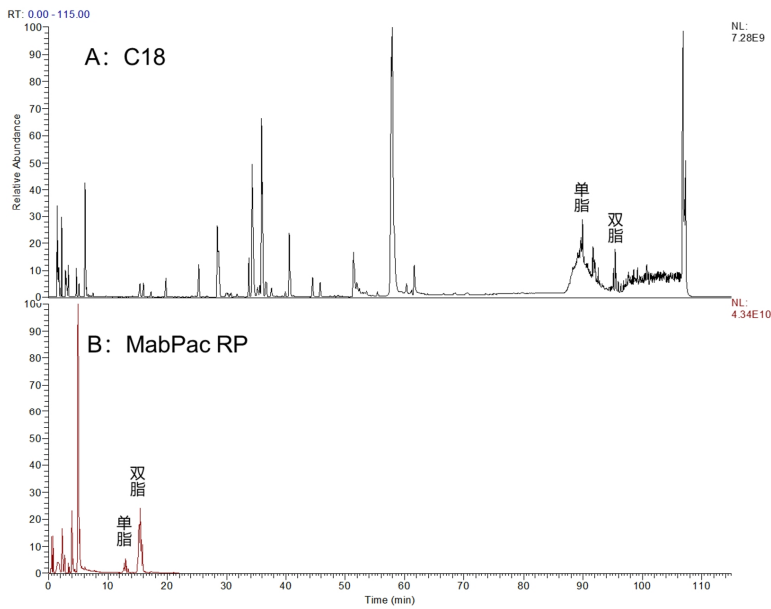


图2 C18（A）和MabPac RP（B）分离脂肽的TIC图。

5.2 甘油双脂修饰的解析

5.2.1 HCD 碎裂甘油双脂修饰的多肽

从 TIC 图可以看到，该蛋白以甘油双脂修饰为主。本节以修饰的质量数为 800.7258 Da 的脂肽为例讲解甘油双脂修饰的脂肽的脂肪链类型推测（图 3）。在质谱图中可以检测到该脂肽的多个价态（2,3,4），以 BPF 为检索软件，对二级谱图中的碎片

进行归属，可以得到如图 3 所示的二级覆盖图和带标识的 MS2 图。从二级碎片覆盖图可以看到，HCD 可以为该肽段获得大量的 b、y 离子，实现所有氨基酸连接的验证 (ASR=1.0)，证明该肽段氨基酸序列的正确性。同时 b 离子和极小的一级偏差 (2.17 ppm)，说明该修饰的存在。质量数为 800.7258 Da 的甘油酯修饰可以有多种组合，比如连接在氨基上的 C16 脂肪链、连接在甘油上的 C17 脂肪链 (或含双键) 和 C16 脂肪链 (或含双键)。为了探索该修饰的组成，需要深度解析该肽段的二级碎片。

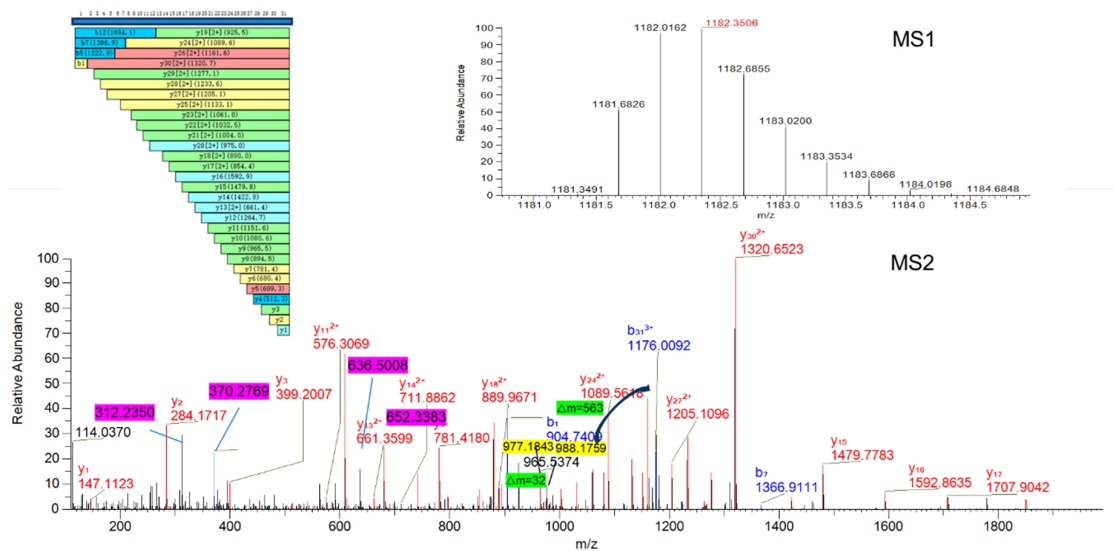


图3 修饰为800.7258 Da的脂肽的一级和二级信息（HCD碎裂所得）。紫色底的字体为b1离子丢失部分脂肪链后的碎片。黄色底的字体为脂肽丢失部分脂肪链后的碎片。

在二级碎片中（图 4-7），首先解析丰度较高的碎片，如 m/z 636.5010。当肽段的 N 端连接 C16 饱和脂肪酸链时，该脂肪酸链断裂后会形成 m/z 为 636.5020 的碎片，其碎裂规律如图 4 所示。m/z 652.3383 与甘油上的 C17 脂肪链断裂后的 b1 碎片 m/z 相近（652.4969，图 5）。m/z 370.2766 和 m/z 312.2350 与两条甘油脂肪链（C16 和 C17，其中一个带双键）断裂后的 b1 碎片质量数接近（m/z 370.2774，m/z 312.2356）。由于 m/z 652.3383 证明了 C17 饱和脂肪链修饰的存在，所以另一条脂肪链只能是含一个双键的 C16 脂肪链。

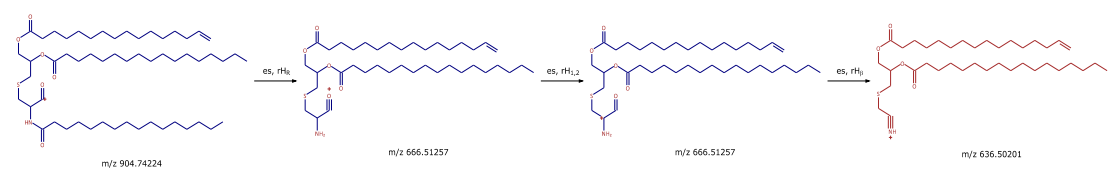


图4 m/z为636.5020的碎片裂解规律

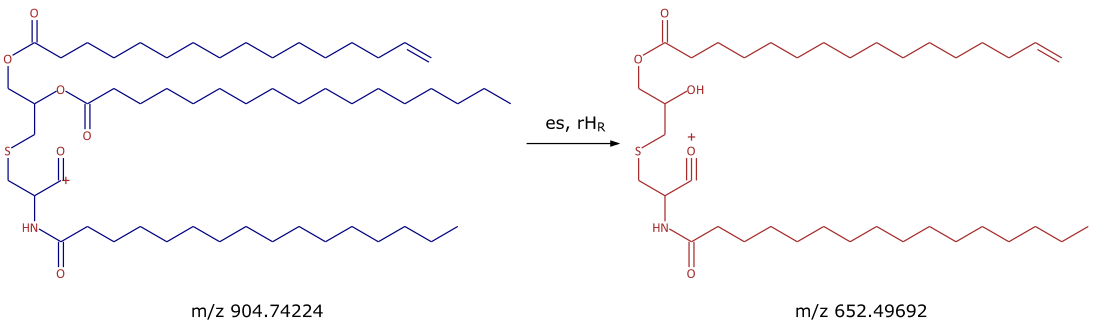


图5 m/z为652.4969的碎片裂解规律

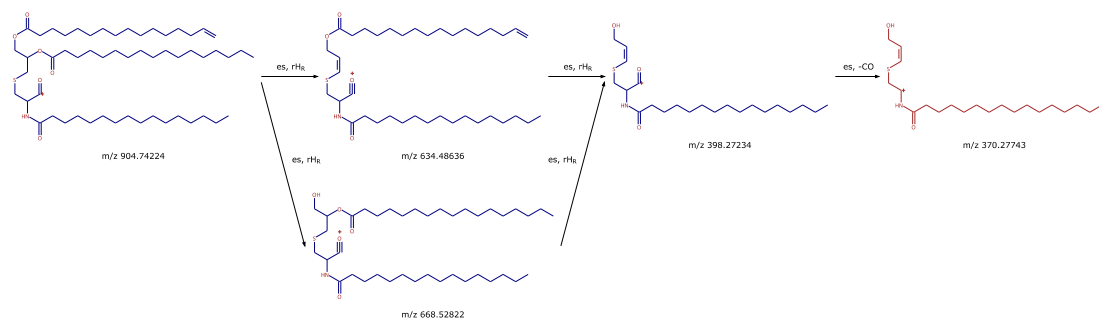


图6 m/z为379.2774的碎片裂解规律

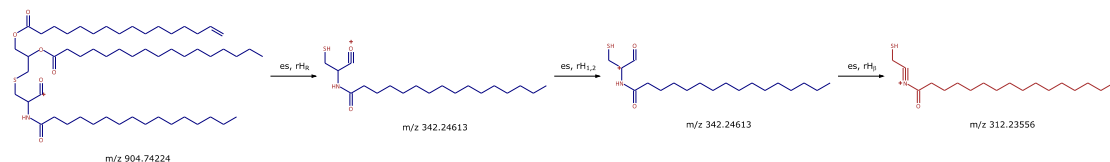


图7 m/z为312.2356的碎片裂解规律

除b1 离子碎裂产生的碎片以外, b31 离子丢失脂肪链的信息也证明了这些脂肪链的存在。如图 3 所示, m/z 988.1759 与 b31 (m/z 1176.0092) 的质量差均为 563 Da, 即丢失甘油双脂 (C16+C17, 其中一个含有一个双键) 后的碎片。m/z 977.1843 与 m/z 988.1759 相差 32 Da, 是巯基连接的甘油脂的两种碎裂方式^[2], 即丢失巯基和不丢失巯基。

5.2.2 EThcD 碎裂甘油双脂修饰的多肽

相比 HCD 碎裂, EThcD 碎裂 (图 8) 不仅可以获得 b、y 离子, 还可以获得丰富的 c、z 离子, 两类碎片相互印证, 为该肽段的修饰和氨基酸序列验证提供了可靠保障。但与 HCD 相比, ETD 的碎裂更加温和, 在 EThcD 的碎裂中, 可以看到多肽丢失脂肪链后的碎片。如图 8 所示, m/z 1645.4003 与分子离子峰相差 254 Da, 是丢失一分子 C16 饱和脂肪酸链修饰后的碎片。m/z 1491.2626 与 m/z 与分子离子峰相差 562 Da, 是丢失甘油双脂修饰后的碎片 (C16+C17, 其中一个含双键)。m/z 1474.7737 与分子离子峰相差 562+32 Da, 是丢失甘油双脂修饰 +S 后形成的碎片。m/z 1347.6517 与分子离子峰相差 562+32+254, 丢失甘油双脂 +S+C16 饱和脂肪烃链修饰后的碎片。

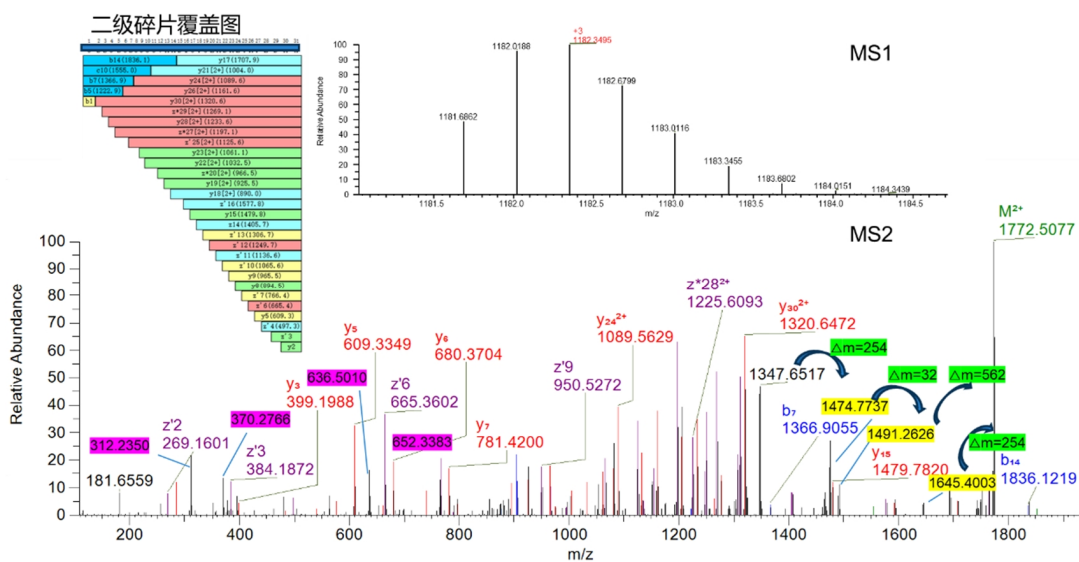


图8 修饰为800.7258 Da的脂肽的一级和二级信息 (EThcD碎裂所得)。紫色底的字体为b1离子丢失部分脂肪链后的碎片。黄色底的字体为脂肽丢失部分脂肪链后的碎片。

此外，在 EThcD 的谱图中，也检测到了 HCD 的一些碎片，例如 m/z 636.5010, 652.3383, m/z 370.2766 和 m/z 312.2350。他们证明了甘油双脂含有一个 C17 饱和脂肪酸链和一个 C16（带一个双键）的脂肪酸链。综合以上信息， m/z 为 800.7258 Da 的修饰是 C16 饱和脂肪烃修饰 N 端和甘油酯，甘油酯带一个 C17 饱和脂肪烃链和一个 C16 脂肪烃（含一个双键）链。

5.3 甘油单脂修饰的解析

5.3.1 HCD 碎裂甘油单脂修饰的多肽

甘油单脂的修饰，我们以修饰分子量为 562.4962 Da 为例进行解析。该分子式，有两种修饰的可能：第一，甘油双脂修饰巯基，肽段 N 端没有脂肪链修饰；第二，甘油单脂修饰巯基，肽段 N 端以脂肪链修饰。首先，图 9 中丰富的 b、y 离子碎片（所有氨基酸连接均可验证，ASR=1.0）和极小的一级偏差（-0.51 ppm）说明该修饰和肽段序列的正确性。图 9 和 10， m/z 256.2632 与 b1 离子丢失掉甘油单脂（含一个双键的 C17 脂肪链）形成的碎片 m/z 相近。此外， m/z 987.5054 与 b313+ 离子的质量差为 326.2941，该质量数也与含一个双键的 C17 脂肪链修饰的甘油单脂相近。此外 m/z 976.8475 也说明了该修饰的存在。 m/z 358.2404 和 m/z 398.2731 是 b1 离子丢失 C16 脂肪链修饰后的碎片。综上所述，修饰分子量为 562.4962 Da 的多肽是甘油单脂修饰巯基（含一个双键的 C17 脂肪链）和肽段 N 端以脂肪链（C16 饱和脂肪酸链）修饰的多肽。

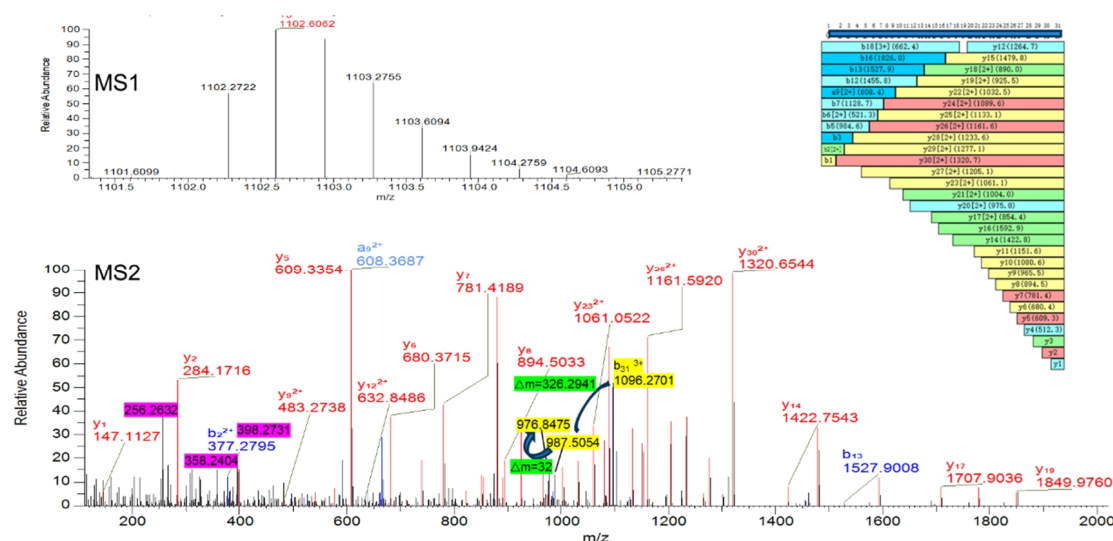


图9 修饰分子量为562.4962 Da的肽脂一级和二级质谱图（HCD碎裂所得）

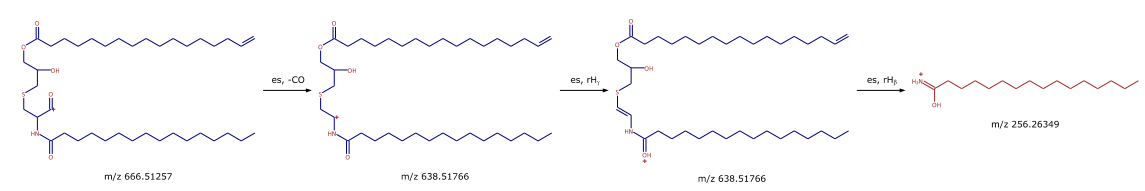


图10 m/z 256.2634碎片的裂解规律

5.3.2 EThcD 碎裂甘油单脂修饰的多肽

相比 HCD，EThcD 可以获得更丰富的碎片。如图 11 所示，EThcD 不仅可以获得丰富的 b、y 离子碎片，还可以得到 c、z 碎片，不同的碎裂方式所得碎片相互印证，实现该肽段所有氨基酸连接信息的获取（ASR=1.0）。此外，ETD 还可以获得多肽直接丢失甘油脂后的碎片信息。例如， m/z 1491.2665, m/z 1475.2816, m/z 1347.6533 分别是该肽段丢失甘油单脂，丢失甘油单脂 +S，丢失甘油单脂 +S+C16 脂肪链后的碎片。

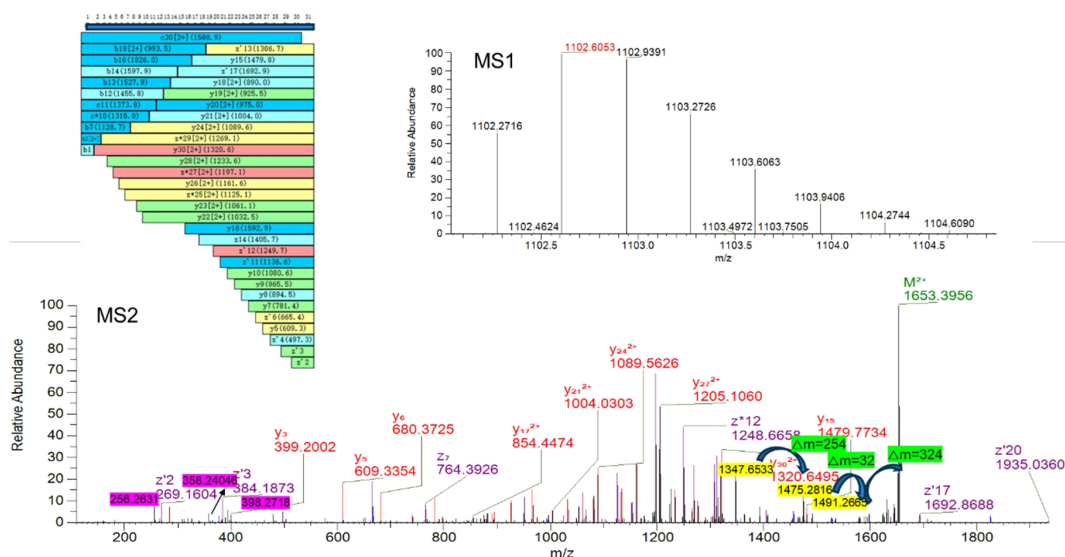


图11 修饰分子量为562.4962 Da的脂肽一级和二级质谱图（EThcD碎裂所得）

结论

Orbitrap 为质量分析器的质谱可以提供多种碎裂。HCD 具有较高的碎裂能力，可以为较大脂肪酸链修饰的长肽（本案例的多肽为 31 肽）提供丰富的碎片，实现所有氨基酸的连接确证。同时 HCD 还具有二次碎裂能力，实现肽键碎裂的同时，还可以获得脂肪酸链的碎裂的信息，为脂肪酸链的组成推导提供依据。EThcD 结合了 HCD 的高能碎裂和 ETD 较温和的碎裂，可以获得多肽碎裂脂肪酸链而不碎裂肽键的信息，为推导脂肪酸链的组成提供进一步依据。无论是哪一种碎裂方式，都可以结合 Orbitrap 的高质量准确性和高灵敏度，实现复杂脂肪酸链修饰的长肽段的直接解析。

参考文献

- [1]M.D. Hoffman, J. Kast, Mass spectrometric characterization of lipid-modified peptides for the analysis of acylated proteins, Journal of mass spectrometry : JMS, 41 (2006) 229-241.
- [2]M.A. Kaczorowska, H.J. Cooper, Electron Capture Dissociation and Collision Induced Dissociation of S-Dipalmitoylated Peptides, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 24 (2013) 1224-1227.



赛默飞
官方微信

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

thermo scientific