

基于 ETD 和三级高分辨质谱的多肽复杂二硫键鉴定方法

龙珍 祝翔 连浩志 郭兴奎

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键字：复杂二硫键，多肽，Orbitrap，ETcD，ETciD，三级质谱

1. 引言

随着多肽和蛋白药物的快速发展，对该类药物的深度解析和全面的质量评价也随之提上日程。例如，多肽类药物的质量评价不止局限在分子量和 N 端测序，还要求杂质鉴定和定量、全序列和修饰鉴定、以及二硫键的连接确证和错配分析^[1]。蛋白类药物的肽谱分析中也不止局限于序列覆盖度、翻译后修饰的分析，还要求对二硫键的连接和错配进行分析^[2]。

在这些质量评价的项目中，二硫键，尤其是复杂二硫键的鉴定是分析的难点。复杂二硫键通常存在于多肽药物、双抗、融合蛋白和部分重组蛋白中。这些样品即使通过联合酶切，获得的肽段中仍然包含两对或两对以上二硫键^[3]，以红蝎毒素（又名芋螺肽）为例（图 1），即使使用胰蛋白酶酶解，所得肽段仍然包含 3 对二硫键，仅仅使用常规的碎裂方式，如碰撞诱导解离（CID）无法确定这些肽段中二硫键的连接方式。CID 仅仅能获得肽键断裂后的碎片，从这些碎片无法推测二硫键的连接顺序。一些分子量较大的肽段使用 CID 碎裂还会出现，碎片离子少，不仅不能确定二硫键连接方式，也不能实现肽段序列的确定。高能碰撞解离（HCD）可以为这样的肽段获得丰富的碎裂，但 HCD 也以碎裂肽键为主，难以碎裂二

硫键，所以仍然无法确定这些肽段的二硫键连接方式，如图 1 所示。电子转移解离（ETD）是一种更倾向于断裂链间二硫键 ETD 的碎裂方式，通过 ETD 碎裂可以获得链间二硫键碎裂后的肽段信息，但仅有 ETD 无法鉴定二硫键断裂后的肽段序列。赛默飞的三合一系列支持三级质谱分析^[3, 4]，可将 ETD 和 CID/HCD 结合起来，不仅鉴定二硫键的连接，还可以对链间二硫键碎裂后的肽段做鉴定，实现包含复杂二硫键的多肽的完整鉴定。



图1 红蝎毒素未酶解时的二硫键连接（左）和胰蛋白酶酶解后的二硫键连接（右）。其中X代表一种特殊的修饰，Z为某非天然氨基酸。

本文以红蝎毒素为例，讲解基于 ETD 和三级高分辨质谱的多肽药物复杂二硫键鉴定流程，如图 2 所示。在该鉴定流程的每一个环节，我们都将分享该环节我们曾经遇到的问题解决的方法，以期为类似分析带来一些启示和帮助。

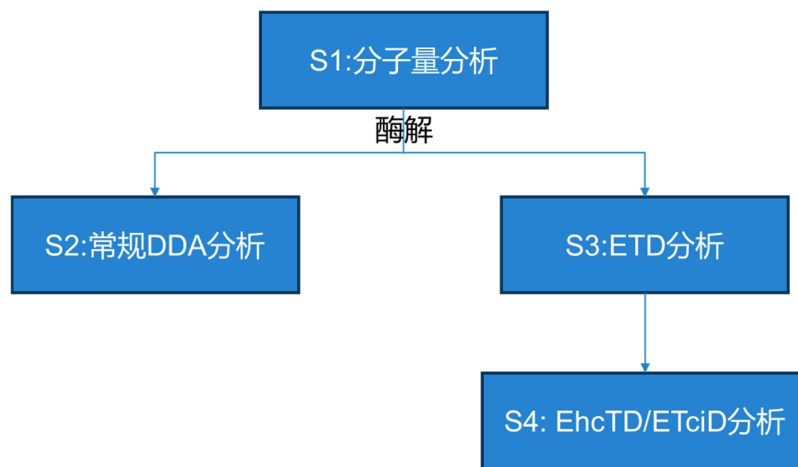


图2 复杂二硫键的简单流程。

2. 实验部分

取适量样品用 pH 6.5 的 tris-HCl 溶解，加入 NEM（终浓度为 2 mM），37℃，孵育 2 h。加入测序级 trypsin (1:50)，37℃，孵育 4 后，加入终浓度 1%FA 酸化，做二硫键分析。

3. 仪器及方法

质谱仪器：Orbitrap Eclipse™ Tribrid™；

色谱仪器：Vanquish Neo 液相色谱系统；

3.1 仪器方法

1) NanoLC-EThcD 分析

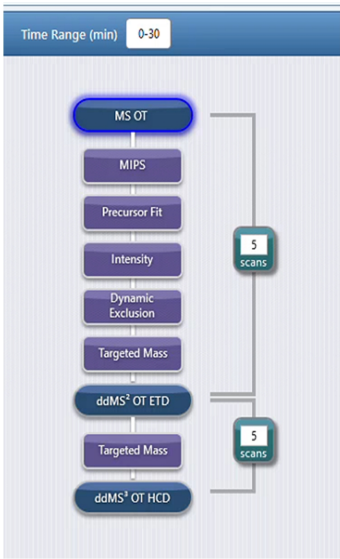
分析柱：Acclaim PepMap™ 100Å 75 μm x 250 mm, 2 μm, 货号 164941；柱温：室温（如果有柱温箱，设置 50 °C 柱温，保留时间稳定性和峰型会更好）；流动相：A: 0.1% FA- 水； B: 0.1% FA: 乙腈（20:80，v/v）；上样压力：1000 bar；分析流速：0.3 μL/min；上样量：1 μL；

分析泵梯度：

时间 (min)	B/%
0	3
4	3
20	30
22	90
25	90
26	3
36	3

质谱条件:

1) 质谱流程和源区参数



检测模式	+
喷雾电压	2.3 kV
毛细管温度	320℃

一级质谱参数和二级 trigger 信息:

MS Scan Properties

Detector Type: Orbitrap

Orbitrap Resolution: 120000

Mass Range: Normal

Use Quadrupole Isolation: ☒

Scan Range (m/z): 200-1000

RF Lens (%): 30

AGC Target: Standard

Maximum Injection Time Mode: Auto

Microscans: 1

Data Type: Profile

Polarity: Positive

Source Fragmentation: ☐

Scan Description:

ADD DELETE IMPORT EXPORT

Compound	m/z
1	516.197
2	416.762
3	520.7
4	693.932

Mass Tolerance: m/z

Low: 0.5

High: 0.5

Set Collision Energy per Compound: ☐

Perform dependent scan on most intense ion if no targets are found: ☐

二级质谱参数和三级 trigger 信息:

Data-Dependent MS² Scan Properties

Isolation Window (m/z): 1.2

Isolation Offset: Off

Activation Type: ETD

Use Calibrated Charge-Dependent ETD Parameters: ☐

ETD Reaction Time (ms): 50

ETD Reagent Target: 2.0e5

Max ETD Reagent Injection Time (ms): 200

ETD Supplemental Activation: ☐

Detector Type: Orbitrap

Orbitrap Resolution: 15000

First Mass (m/z): 110

Normalized AGC Target (%): 300

Maximum Injection Time (ms): 200

Microscans: 1

Data Type: Centroid

ADD DELETE IMPORT EXPORT

Compound	m/z
1	351.1155
2	480.1996
3	463.1994
4	788.2778
5	787.2857

Mass Tolerance: ppm

Low: 25

High: 25

Perform dependent scan on most intense ion if no targets are found: ☐

Use Group IDs: ☐

三级质谱信息:

Data-Dependent MS³ Scan Properties

MS³ Level: 3

Synchronous Precursor Selection: ☐

MS Isolation Window (m/z): 1.2

MS² Isolation Window (m/z): 2

Isolation Offset: Off

Activation Type: HCD

HCD Collision Energy (%): 30

Detector Type: Orbitrap

Orbitrap Resolution: 15000

First Mass (m/z): 110

Normalized AGC Target (%): 300

Maximum Injection Time (ms): 200

Microscans: 1

Data Type: Centroid

4. 数据采集及分析

Thermo Xcalibur Qual Browser 定性浏览器
BioPharma Finder 5.2

5. 结果与讨论

5.1 分子量分析

在做二硫键分析前，首先要对待测样品的分子量进行分析，因为在我们检测到的多肽样品中，存在一些分析者对所分析样品的序列 / 修饰不明确的现象，甚至有送错样品的现象。分子量分析可以快速确定多肽样品组成。Orbitrap 检测多肽样品可以获得单同位素的分子量，所得分子量可精确到小数点后 2-3 位。因此，在仪器正常的情况下（QC 样品检测仪器状态），如果测得的分子量与送样者提供的信息不符，应该及时与送样者确定样品信息。在确定样品的序列和修饰信息完善后，再进行二硫键样品的肽谱分析。

5.2 常规分析确定二硫键的存在

在做 ETD 分析之前，我们需要确定酶解所得二硫键的肽段信息。虽然这些信息可以通过理论推测获得，但不是每次酶解都能获得完全符合理论推测的肽段，或者理论推测的肽段未必是响应最好的肽段，具体情况受酶解的影响较大（例如酶的活性等）。所以用 DDA 先分析一下样品，有利于快速了解酶解的情况，避免 ETD 优化中不必要的失败。

如图 3 所示，通过 DDA 分析后，对包含二硫键的信息做峰面积排序，可以知道该样品中含量最高的二硫键肽段包含 3 对二硫键，该肽段可以检测到 3 种价态，分别是 3、4 和 5 价。通过二级匹配，可以推测这些肽段中包含的序列信息。

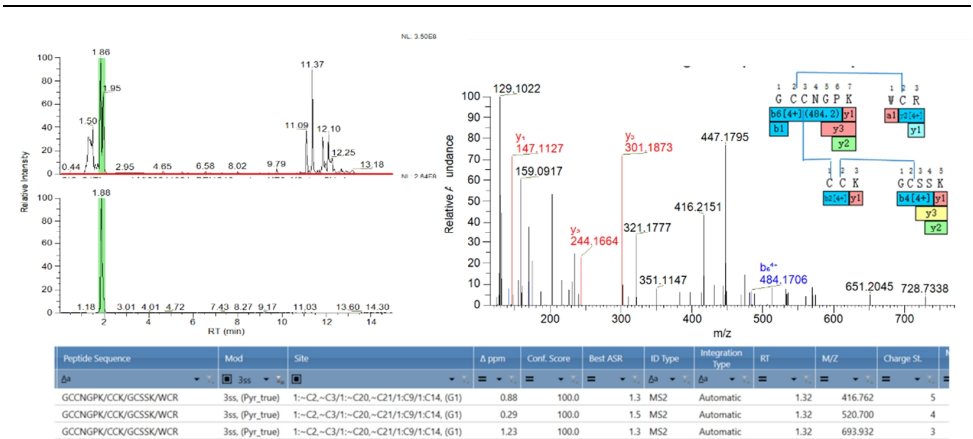


图3 DDA快速分析获取红蝎毒素二硫键连接情况

5.3 ETD 做 MS2 分析获得链间二硫键断裂后的肽段谱

在 DDA 分析后，我们确定了样品的状态（酶解程度等），同时也获得了 ETD 分析的 trigger 信息为 m/z 416.762、520.700 和 693.932。ETD 做肽段的碎裂基于以下原理(图 4)：汤逊放电产生电子，放出的电子与加热挥发出来的茈菀反应形成茈菀负离子。茈菀负离子是 ETD 检测的反应试剂。ETD 碎片化发生在两个步骤中。第一步，多电荷前体离子与电子供体发生反应，导致电子转移到前体离子。这一步导致前体离子电荷状态降低并形成不稳定的自由基阳离子。第二步，第一步形成的自由基阳离子分裂，导致产生两个带电碎片。肽离子的碎片化主要发生在 N-Calpha 键中，产生 c 和 z 离子。在二硫键的分析中，ETD 容易让链间二硫键碎裂，从而形成自由基和带质子的肽段^[5]，在这个碎裂中还容易出现重排，从而脱去一分子 H₂，形成 P-2H 的肽段^[3]。在包含多对二硫键的肽段中，链间二硫键的碎裂还会形成带有未碎裂另一对链间二硫键肽段的信号，这些现象在红蝎毒素的检测中均有观察到，如图 5 所示。

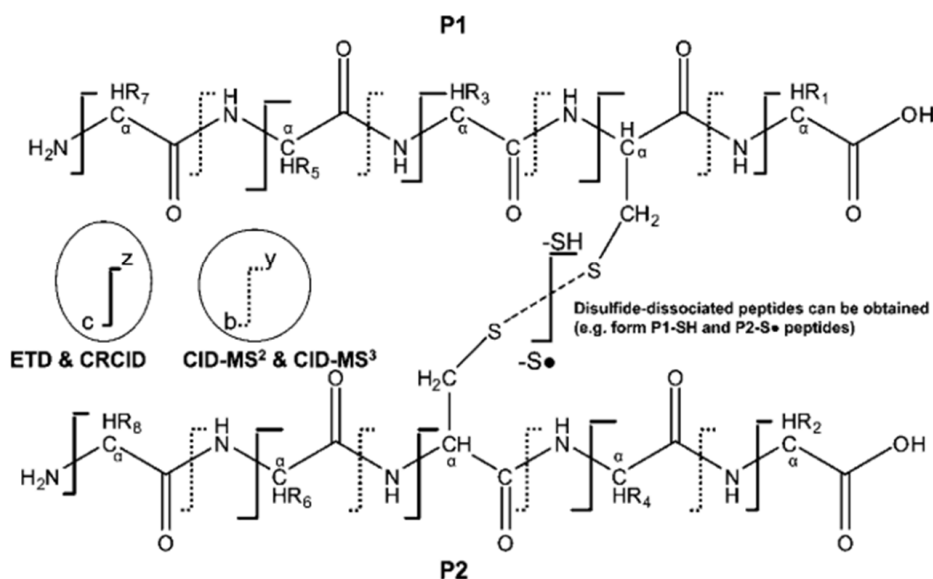
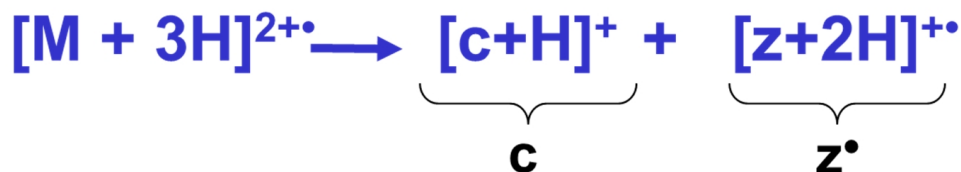
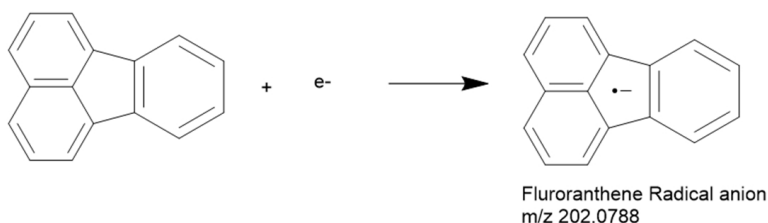


图4 ETD碎裂肽段（上）和链间二硫键（下）原理图

需要说明的是，我们在二级的触发中选择了多个价态的信号均可以获得较好的二级谱图，但以 m/z 416.762 (5+) 为母离子获得的二级谱图信息最丰富。在该谱图中，链间二硫键断裂形成的 P2⁺、P4⁺ 和重排后形成的 [P3-2H]⁺ 和 [P1-2H]⁺ 信号最强。除此以外，还可以检测到仅断裂一对或者两对二硫键的肽段，如 P1 与 P3、P1 与 P2、P3 与 P4 后形成肽段。例如 [P1-2H+P3-2H]⁺ 是 P1 与 P2 以及 P3 与 P4 间二硫键断裂后形成的肽段，该信号说明 P1 和 P2 以二硫键连接，P3 和 P4 也以二硫键连接，而且这些二硫键断裂时会分别导致 P1 和 P3 出现重排。肽段组 P1-2H+P3+P4 中 P1 的 z4 和 z5 离子 399.2129 和 1333.4429 证明 P1 和 P2 通过 C3 连接，肽段 P1 的 C4 与 P3 连接。肽段组 P1-2H+P3+P4 中 P3 的 y2 离子 728.2769 说明 P3 的 C22 与 P4 连接，P3 的 C21 与 P1 的 C4 连接。

ETD 的碎裂需要优化 ETD 的反应时间，同时也可以选择以 HCD 或者 CID 作为能量补偿进行碎裂。本样品仅使用了 ETD (50 ms) 作为碎裂，即可获得较好的二级谱图。因此，没有使用 SA。在其它样品的 ETD 碎裂中，例如糖肽和磷酸化肽等，通常加入适当的 SA 能量后可以获得更好的谱图。

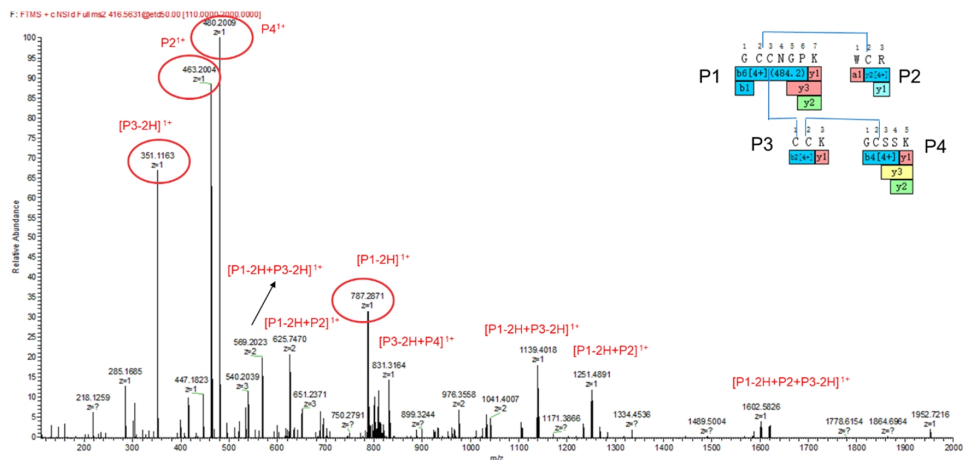


图5 ETD碎裂获得的红蝎毒素二级质谱图

5.4 基于 HCD 的三级质谱，鉴定多肽序列

在用 ETD 获得链间二硫键断裂的肽段后，可以使用三级质谱继续碎裂相关肽段，从而通过三级质谱的碎片推测肽段的氨基酸序列。本样品的三级触发 trigger 信号分别是 m/z 351.1155、463.1994、480.1996 和 787.2857。HCD 和 CID 都可以作为三级质谱的碎裂方式，具体选用哪一种方式，需要根据样品的性质做考察和优化。本样品的检测中，HCD 相对于 CID 可以获得更丰富的三级碎片，因此选用 HCD 作为三级碎裂方式。图 6- 图 9 是 HCD 为 4 组肽段获得的三级质谱图，HCD 获得的三级质谱图兼具高质量准确度和高灵敏度，所有肽段的所有肽键碎裂均可鉴定，证明该肽段氨基酸序列的准确性。

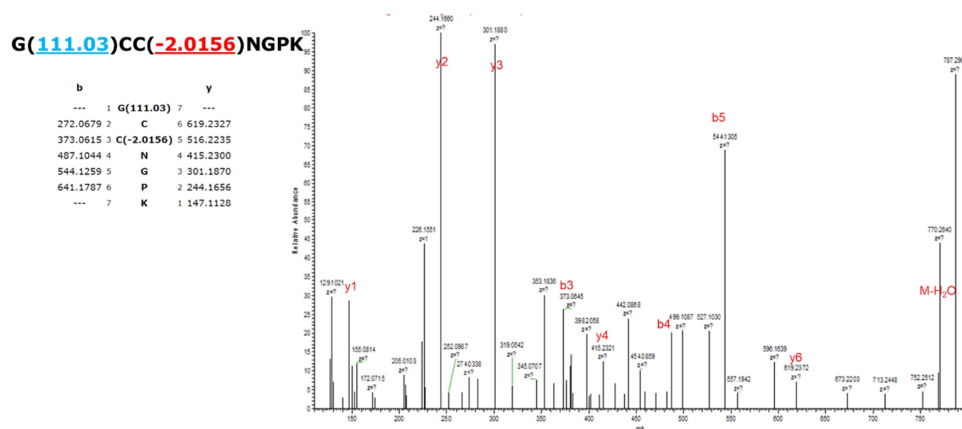


图6 P1-2H的三级鉴定论列表（左）和实测谱图（右）

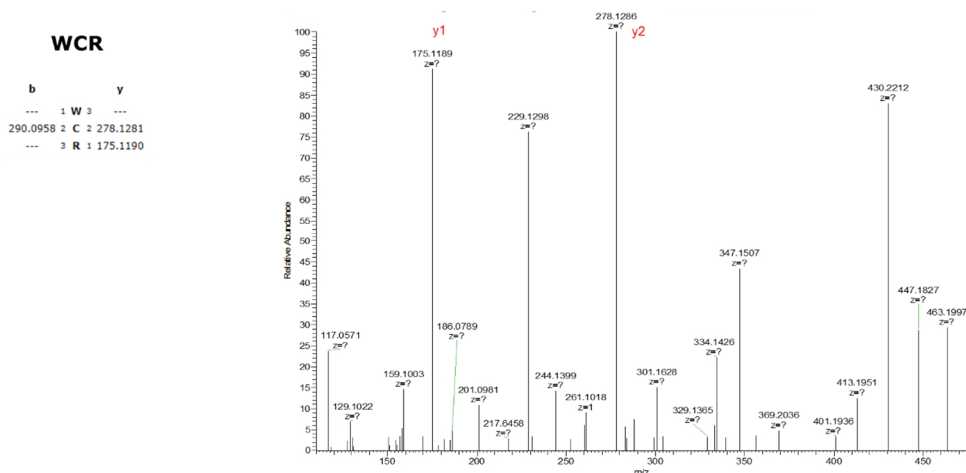


图7 P2的三级鉴定论列表（左）和实测谱图（右）

C(-2.0156)CK

b		y
---	1 C(-2.0156) 3	---
205.0100	2 C	2 250.1220
---	3 K	1 147.1128

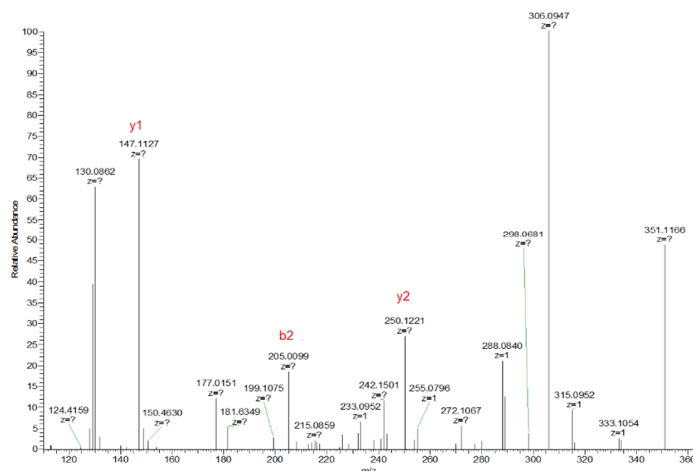


图8 P3-2H的三级鉴定理论列表（左）和实测谱图（右）

GCSSK

b		y
---	1 G 5	---
161.0379	2 C	4 424.1860
248.0700	3 S	3 321.1769
335.1020	4 S	2 234.1448
---	5 K	1 147.1128

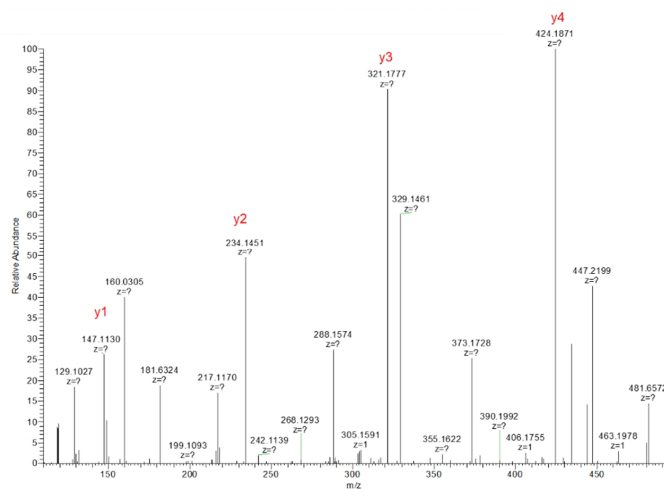


图9 P4的三级鉴定理论列表（左）和实测谱图（右）

结论

Orbitrap 三合一质谱系列具有多种碎裂方式，为复杂二硫键和肽段的修饰鉴定提供了丰富的碎片离子。三合一质谱的多级碎裂能力，为复杂二硫键的精准鉴定提供了可靠信息。同时，Orbitrap 的高灵敏度和高分辨率获得的高质量准确度和高信噪比的 MS1、MS2 和 MS3 谱图，是复杂二硫键鉴定的有力保障。

致谢

感谢中国科学院上海免疫与感染研究所曹勇老师在谱图解析中的帮助。

参考文献

- [1] M. Góngora-Benítez, J. Tulla-Puche, M. Paradís-Bas, O. Werbitzky, M. Giraud, F. Albericio, Optimized Fmoc solid-phase synthesis of the cysteine-rich peptide linacotide, Biopolymers, 96 (2011) 69-80.
- [2] D. Wang, C. Nowak, B. Mason, A. Katiyar, H. Liu, Analytical artifacts in characterization of recombinant monoclonal antibody therapeutics, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 183 (2020) 113131.
- [3] L.-J. Huang, C.-W. Chiang, S.-L. Chen, S.-Y. Wei, S.-H. Chen, Complete mapping of disulfide linkages for etanercept products by multi-enzyme digestion coupled with LC-MS/MS using multi-fragmentations including CID and ETD, Journal of Food and Drug Analysis, 27 (2019) 531-541.

- [4] C.N. Cramer, C.D. Kelstrup, J.V. Olsen, K.F. Haselmann, P.K. Nielsen, Complete Mapping of Complex Disulfide Patterns with Closely-Spaced Cysteines by In-Source Reduction and Data-Dependent Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 89 (2017) 5949-5957.
- [5] S.-L. Wu, H. Jiang, Q. Lu, S. Dai, W.S. Hancock, B.L. Karger, Mass Spectrometric Determination of Disulfide Linkages in Recombinant Therapeutic Proteins Using Online LC-MS with Electron-Transfer Dissociation, *Analytical Chemistry*, 81 (2009) 112-122.



赛默飞
官方微信

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

thermo scientific