

# SCX-MS 用于复杂糖基化修饰蛋白的分子量分析

龙珍 祝翔 张劭阳

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

**关键字：唾液酸化、高度糖基化、糖蛋白、分子量、SCX**

## 1. 引言

几乎所有真核表达的蛋白都或多或少的包含了糖修饰。从广义上来说糖修饰可以分为 3 种类型，第一，由高尔基体在蛋白的表达的过程中修饰导致，例如绝大多数的单抗（不是所有的单抗都糖基化）、双抗、多抗、融合蛋白、部分重组蛋白等。这一类修饰通常称为糖基化<sup>[1]</sup>。第二，通过一系列理化技术，在特定氨基酸残基或基团上人为修饰的糖，例如多糖蛋白结合疫苗<sup>[2]</sup>。这一类修饰没有特定名称。第三，在生物药发酵过程中，通过氨基酸残基上的氨基与溶液中过剩的葡萄糖醛基发生反应，从而实现的糖修饰<sup>[3]</sup>。这一类修饰通常称为糖化。

蛋白质的糖基化可根据与糖链连接的氨基酸残基以及连接方式的不同分为 N-糖基化<sup>[1]</sup>、O-糖基化<sup>[4,5]</sup>、C-糖基化和糖基化磷脂酰肌醇锚 (GPI-anchored)。N-糖基化是糖链的还原端连接在蛋白质的天冬氨酸残基侧链上，由于 N-糖基化发生于特定氨基酸序列中 (NXS/T/C, X 可以是除了脯氨酸以外的任意氨基酸)，因而相对容易确定糖基化发生的位点，也是目前研究最为广泛的糖基化之一；O-糖基化是糖链的还原末端连到蛋白质的丝氨酸 (serine) 或苏氨酸 (threonine) 残基侧链上；C-糖基化是糖链的还原末端连到蛋白质的半胱氨酸残基侧链上；而 GPI-anchored 的糖基化是蛋白质通过肽链的 C 端共价连接的糖基磷脂酰肌醇锚定在膜脂上。不同种类的糖基化，在糖链的结构和功能上有着很大的不同。

对于糖基化修饰的蛋白通常有几个维度的研究：糖蛋白、糖肽、糖链和单糖。其中，以糖肽和糖链的研究最为广泛。但无论是糖链还是糖肽水平的研究都是整个蛋白药物平均水平的研究。相比糖链和糖肽水平获得的平均信息，糖蛋白水平上获得的糖型分布信息可以反应更为精细的糖蛋白药物分布。在糖链水平和糖肽水平上没有差异的糖蛋白，未必在糖蛋白水平上没有差异。糖蛋白水平上的糖型差异直接影响蛋白的结构甚至与抗原结合的活力。因此，直接分析糖蛋白的分子量非常有必要。

如果是单一糖基化位点的蛋白，直接检测可以获得糖蛋白的分子量。如果蛋白包含多个糖基化位点 (2 个以上)，尤其是蛋白还存在其它类型的异构体，如体积异构体、脱酰胺、氧化等，蛋白的异质性增强，导致蛋白在完整分子量水平检测的信号相互叠加、抑制，从而导致质谱图的信号轮廓发生变化，去卷积结果发生较大的偏移。当异质性进一步增加，还会导致不同修饰的蛋白信号相互抑制，从而无法获得较好的信噪比 (出现“死亡驼峰”：，如图 1) ——无法去卷积得到分子量。为了实现这类蛋白的分子量分析，需要减少蛋白信号的重叠。减少蛋白信号的重叠，通常有两种方式：第一，将蛋白的质谱信号移向高质量端 (使用 native mass<sup>[6]</sup>、PTCR 等技术)；第二，实现蛋白的分离，减少同时进入质谱的蛋白的种类。本文使用强阳离子交换 (SCX) 实现蛋白异构体的分离，同时结合 SCX 的 pH 洗脱后 native mass 检测的优势<sup>[7]</sup>，使得蛋白信号移向高质量端的优势，实现较为复杂糖蛋白的分子量直接检测。

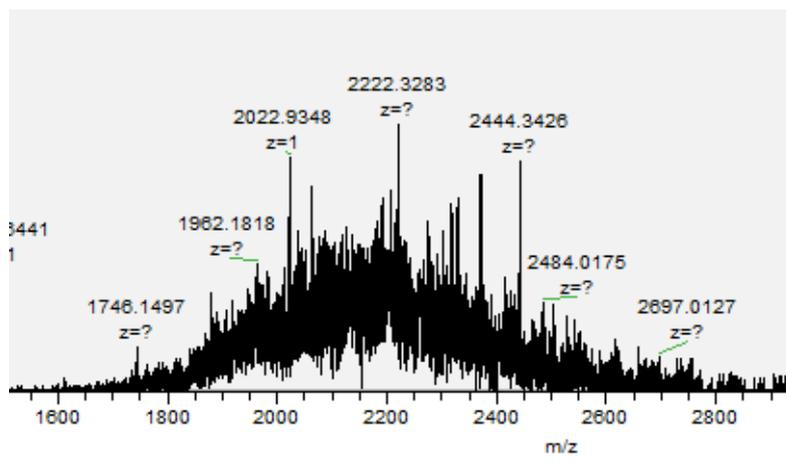


图1 典型的糖蛋白质谱图（死亡驼峰）

## 2. 实验部分

### 2.1 分子量分析

1) S 蛋白的 RBD 三聚体（以下简称 RBD 三聚体），10 kDa 超滤膜脱盐后，用水复溶吸出，用于 LCMS 分析。

2) Enbrel 的单链，DTT 还原后，10 kDa 超滤膜脱盐后，用水复溶吸出，用于 LCMS 分析。

### 2.2 其他的前处理

为了验证 SCX 分析的结果，本文还进行了脱糖后分子量、肽谱和糖链分析，如图 2 所示。由于以下均为常规酶解，相关流程本文不再赘述。

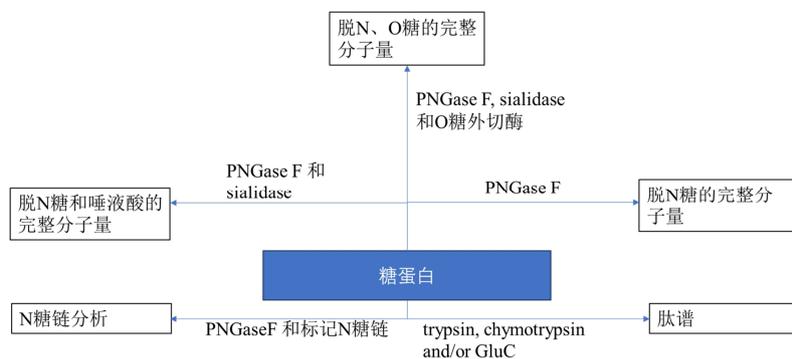


图2 样品前处理workflow

## 3. 仪器及方法

质谱仪器：Orbitrap Exploris 240；

色谱仪器：Vanquish Flex 液相色谱系统；

色谱柱：MabPac SCX column (2.1 x 50 mm, 5 μm)

流动相：A-25 mmol/L 碳酸氢铵，pH 5.3， B-10 mmol/L 氨水，pH 10.2

柱温：30 °C

梯度:

Enbrel单链			RBD三聚体		
Flow rate	Time(min)	B%	Flow rate	Time(min)	B%
0.3 mL/min	0	43	0.3 mL/min	0	40
	20	55		10	100
	22	100		18	100
	22.1	0		18.1	0
	24	0		20	0
	24.1	43		20.1	40
	32	43		28	40

质谱条件:

扫描范围: m/z 1500–8000; 分辨率: 15,000 @ m/z 200; AGC: 500%; IT: 150 ms; microscan: 5; 鞘气: 40; 辅助气: 15; 离子传输管温度: 250 °C; 雾化气温度: 200 °C; 喷雾电压: 3.8 kV; S-lens RF: 150; SID: 110 V.

#### 4. 数据采集及分析

数据采集: Xcalibur™ 4.4 软件; 数据处理: BioPharma Finder™ 5.2 软件, 数据处理参数见表 1。

表1 数据处理参数

	Enbrel 单体	S 蛋白的 RBD 三聚体
<b>Chromatogram parameters</b>	m/z range	2900–4500
<b>Deconvolution algorithm</b>	Deconvolution algorithm	ReSpect™
	Model mass range	55,000 to 70,000 Da
	Mass tolerance	20 ppm
	Charge state range	5 to 35
	Minimum adjacent charges	3 to 3
<b>Sliding window merging parameters</b>	RT range	9–20 min
	Target avg. spectrum width	1 min
	Target avg. spectrum offset	25%
	Merge tolerance	30 ppm
	Max RT gap	1 min
	Min. number of detected intervals	3

## 5. 结果与讨论

### 5.1 Enbrel 单链分析

Enbrel 的单链裸蛋白分子量 51.2 kDa, 含有 3 个 N 糖基化位点和 13 个 O 糖基位点。多糖基化位点和每个位点糖型的多样性导致该蛋白样品复杂程度较高, 如果使用抗体常用的分子量分析方法, 如 RPLC-MS 方法分析 (图 3A), 所得质谱图重叠严重、难以实现去卷积和分子量的获得 (图 3D)。用乙酸铵为流动相的 SEC 分析, 可以实现蛋白在 native 条件下洗脱。在 native 条件下, 蛋白所带电荷更少, 质谱信号向高质量端移动, 从而减少蛋白的质谱信号重叠。但 Enbrel 单链的异质性很强, 即使采用 SEC-MS 分析 (图 3B) 也难以获得较好的质谱图 (图 3E)。这是因为复杂的蛋白在 SEC 上没有显著分离, 同时进入质谱, 导致了谱图的重叠。Enbrel 的糖高度唾液酸化, 被不同程度唾液酸化的糖修饰的蛋白呈现出不同的 pI, 因此使用 SCX 可以实现这些蛋白异构体在一定程度上的分离 (图 3C), 从而降低同时进入质谱的样品的复杂程度, 再结合 native 洗脱的优势, 可以实现 enbrel 单链在不脱糖的情况下的分子量检测 (图 3F)。

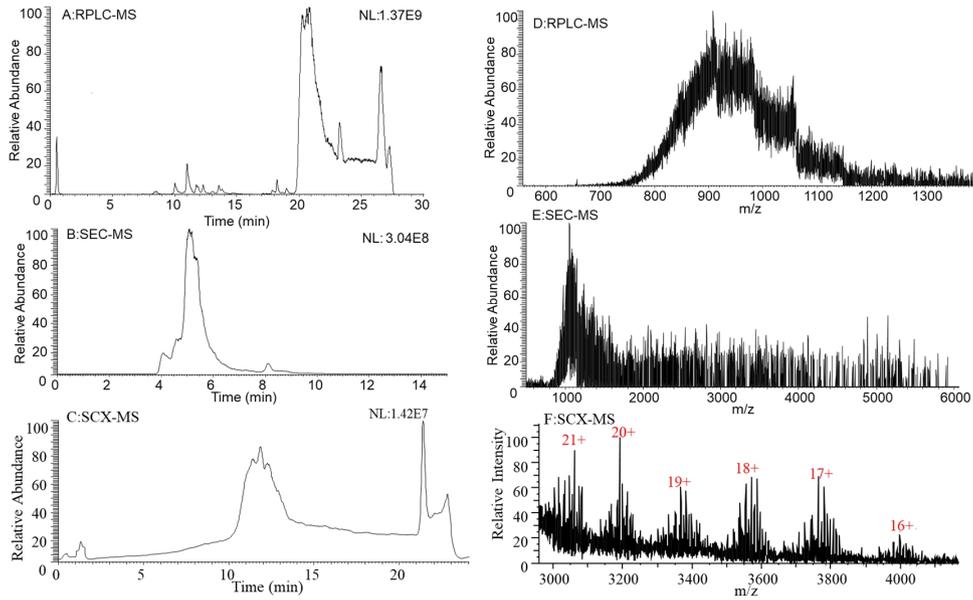


图3 不同色谱质谱方法分析Enbrel单链的TIC图（左）和MS图（右）

为了归属去卷积图上的信号，我们在糖肽和糖链水平上检测了该样品的糖型、糖基化位点，并用脱糖的方式确定了裸蛋白的分子量。结合以上信息，归属蛋白信号如图 4 所示。由于 Enbrel 的糖链、糖基化位点有大量文献报道<sup>[8]</sup>，本文不再赘述相关细节。

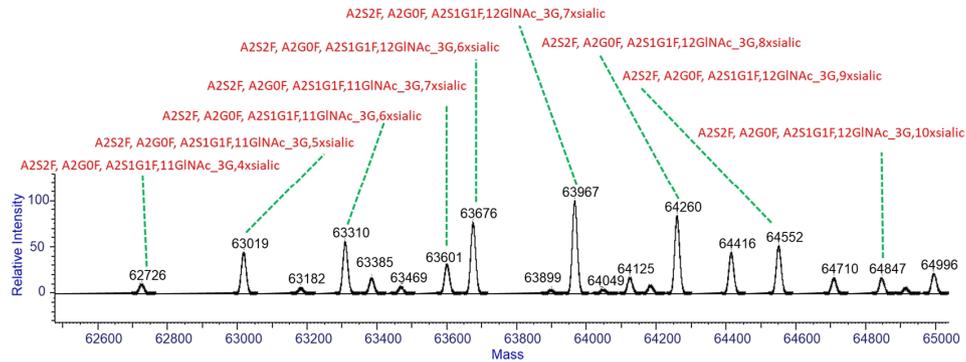


图4 Enbrel单链的去卷积图

## 5.2S 蛋白三聚体分析

在以 Enbrel 单链为样品发展了 SCX-MS 方法后，我们又将该方法用于了另一个高度唾液酸化糖蛋白 - RBD 三聚体的分析。该糖蛋白的裸蛋白分子量为 73.8 kDa，包括 3 个 N 糖基化位点和 6 个 O 糖基化位点。与 Enbrel 单链类似，该蛋白的复杂程度同样使得其在常规的 RPLC-MS 和 SEC-MS 分析下无法获得高质量的质谱图（图 5A-B, D-E）。采用 SCX 分离后，不同唾液酸化程度修饰的糖蛋白可以获得分离（图 5C），从而减少了进入 MS 的复杂程度，最终在 native mass 的环境中获得较好信噪比的质谱图（图 5 F）。将 19 价到 21 价的质谱图放大（图 5G-I），可以看到，得益于 Orbitrap 的高分辨率，不同异构体的信号可以实现较好的分离和检测，从而实现低含量组分的检出。

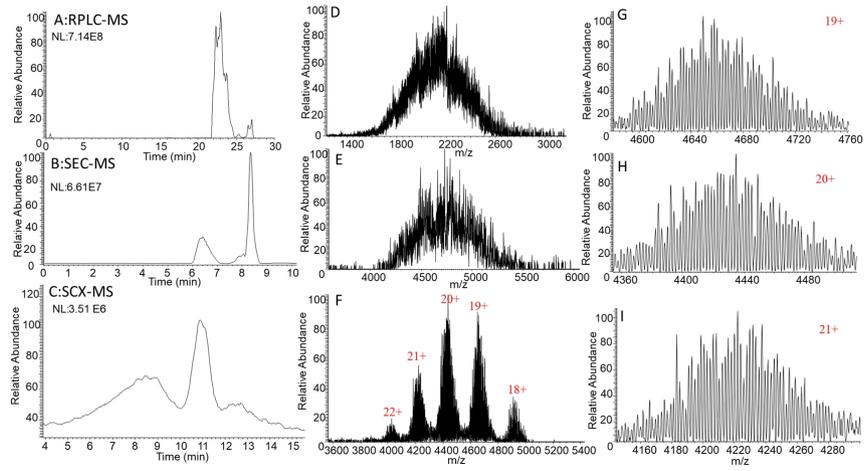


图5 联合酶切后UHPLC+HCD鉴定T184修饰

将RBD三聚体的质谱图去卷积后得到图6所示谱图, 分子量从86500-91000 Da, 显示出该蛋白糖基化修饰的复杂性。结合糖肽、糖链和脱糖分子量检测的结果, 在允许误差为50 ppm的条件下, 对其中丰度较高的16种蛋白信号尝试标识, 结果如表2所示。

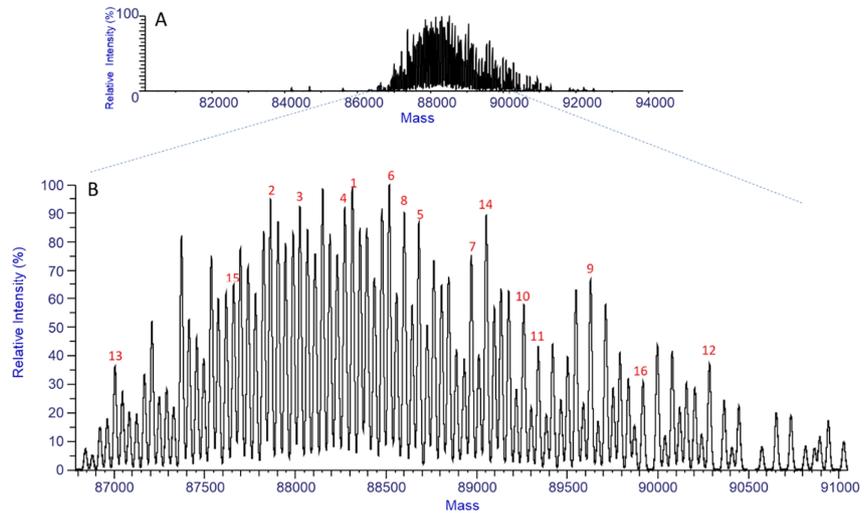


图6 RBD三聚体去卷积图及放大图

表2 RBD部分分子量信号的归属

Peak No.	Annotation	Experimental Mass (Da)	Theoretical Mass (Da)	ppm
1	6x A2S2F, 1x GalNAc-3G	88313.81	88313.91	-1.13
2	5x A2S2F, 1x A2S1G0F, 1x GalNAc-3G	87861.95	87861.56	4.39
3	6x A2S2F, 1x GalNAc-3SG	88024.54	88022.82	19.61
4	5x A2S2F, 1x A2S1G0F, 2x GalNAc-3G	88226.31	88225.90	4.65
5	6x A2S2F, 2x GalNAc-3G	88680.73	88679.05	18.99
6	6x A2S2F, 1x GalNAc-3G, 1x GalNAc	88518.28	88517.01	14.36
7	6x A2S2F, 1x GalNAc-3G, 1x GalNAc-3SG	88969.94	88970.16	-2.44
8	6x A2S2F, 1x GalNAc-3SG	88602.23	88605.04	-31.69
9	6x A2S2F, 1x GalNAc-3G, 2x GalNAc-3SG	89627.97	89626.39	17.66
10	6x A2S2F, 2x GalNAc-3SG	89260.06	89261.27	-13.49
11	6x A2S2F, 2x GalNAc-3G, 1x GalNAc-3SG	89338.97	89335.28	41.35
12	6x A2S2F, 1x GalNAc-3G, 2x GalNAc-3SG	90284.21	90282.61	17.67
13	4x A2S2F, 2x A2S1G0F, 1x GalNAc-6Gn-3SG	87005.66	87001.47	1.64
14	6x A2S2F, 3x GalNAc-3G	89048.41	89044.17	47.65
15	5x A2S2F, 1x A2S1G1F	87656.51	87657.71	-13.64
16	6x A2S2F, 3x GalNAc-3SG	89916.54	89917.49	-10.65

为了探究 RBD 的 O 糖核心类型，我们检测了脱除 N 糖和唾液酸后的蛋白分子量，结合裸蛋白的分子量信息，推测含量最高的 O 糖核心为 GalNAc-3G 和 GalNAc-3SG。在脱除 N 糖的分子量图中，可以进一步看到 O 糖的糖型，以 GalNAc-3SG 为主，其次是 GalNAc-3G 和 GalNAc-6S-3SG。

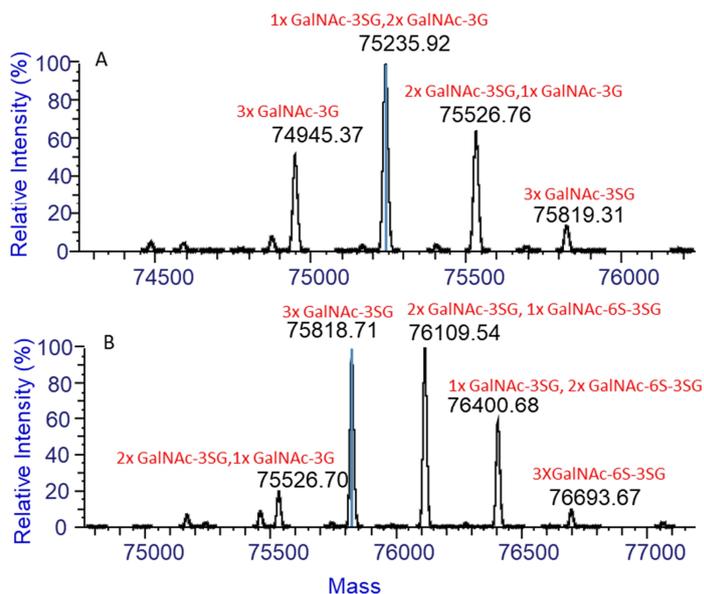
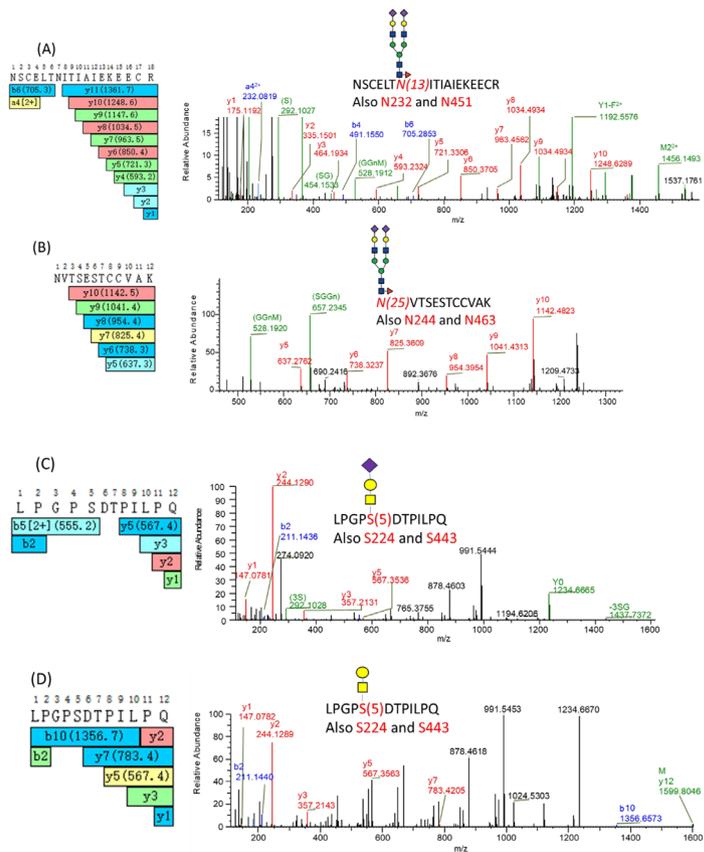


图7 RBD三聚体脱除N糖和唾液酸 (A) 和只脱除N糖 (B) 的分子量检测图

为了探索 RBD 三聚体的 N 糖和 O 类型，分别在糖肽和 N 糖链（结果未展示）两个维度对该样品进行了分析。在糖肽水平，可以看到丰度最高的 N 糖型为 A2S2F，丰度最高的 O 糖为 GalNAc-3SG，典型谱图如图 8 所示。



在完整解析该蛋白修饰后，我们将 SCX-MS 的方法用于脱糖分子量分析和糖链分析没有显著差异的几个批次 RBD 样品分析。如图 9 所示，相对于脱糖分子量和糖肽、糖链分子量水平的检测，糖蛋白可以提供更精细的信息。例如批次 1 的分子量相对于批次 3-4 显著增加，由于不同批次的脱糖分子量一致、糖链类型也一致，推测不同批次糖蛋白的差异是糖型修饰的相对丰度差异导致。

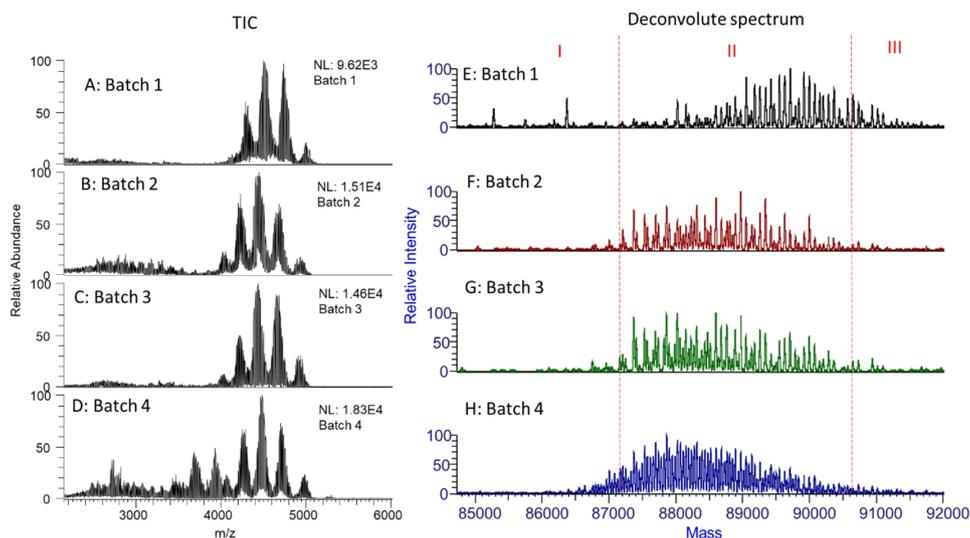


图9 不同批次RBD三聚体质谱图和去卷积图的对比。

### 5.3 本方法的局限性

本方法是以普通的生物制药表征质谱为平台（OE240）发展的，只适用于复杂程度中等的唾液酸修饰的糖蛋白样品（例如 pI 高于 7）。对于极端复杂的样品，例如 Enbrel 或者纯度较低的 Enbrel 单链，该方法无法获得良好的质谱图。本文在分析 Enbrel 单链的同时也做了依那西普仿制药的分析，虽然在脱糖分子量水平、糖肽水平和糖链水平有一些仿制药与原研一致，但用该方法无法实现未脱糖单链分子量的分析，推测是检测的仿制药相对于原研具有更高的异质性。面对异质性更高的样品，需要使用特殊的质谱，例如 UHMR 以及带有 CDMS 功能的 UHMR 质谱做解析<sup>[6]</sup>。这是因为 native 条件下，蛋白容易加合溶剂、缓冲盐和其他一些小分子<sup>[9]</sup>，从而导致质谱图展宽和重叠严重，最后无法实现分子量的检测，而且异质性越大、分子量越大的样品这样的加合导致的谱图恶化越明显。UHMR 不仅具有较宽的质量轴，还具有良好的去除溶剂加合的功能，可以实现复杂样品，例如 mRNA、膜蛋白和大颗粒病毒，如 AAV 的分子量直接检测<sup>[10, 11]</sup>。

### 结论

糖蛋白的分子量直接检测对新型糖蛋白药物开发、仿制药与原研药的差异对比和药物的批次异质性评价都具有重要的意义。本文在常规生物制药表征质谱的基础上发展了 SCX-MS 的方法，用于部分解决糖蛋白分子量分析的问题。同时，我们也在分析的过程中看到了方法的局限和进一步解决该问题需要的实验条件。将 SCX 的分离能力，与常规生物药表征 Orbitrap 以及特殊的 Orbitrap（UHMR）结合，可以实现生物制药更精细程度的开发研究和质量评价。该方向在国外已经被大型制药企业广泛研究，但在国内尚未引起同行重视。

## 参考文献

- [1] A. Beck, E. Wagner-Rousset, D. Ayoub, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianferani, Characterization of therapeutic antibodies and related products, *Analytical chemistry*, 85 (2013) 715-736.
- [2] N.K. Vadlamudi, K. Parhar, K.L. Altre Malana, A. Kang, F. Marra, Immunogenicity and safety of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine compared to 23-valent pneumococcal polysaccharide in immunocompetent adults: A systematic review and meta-analysis, *Vaccine*, 37 (2019) 1021-1029.
- [3] M. Butko, H. Pallat, A. Cordoba, X.C. Yu, Recombinant antibody color resulting from advanced glycation end product modifications, *Analytical chemistry*, 86 (2014) 9816-9823.
- [4] Z. Li, W. Chai, Mucin O-glycan microarrays, *Current Opinion in Structural Biology*, 56 (2019) 187-197.
- [5] W. Yang, A. Song, M. Ao, Y. Xu, H. Zhang, Large-scale site-specific mapping of the O-GalNAc glycoproteome, *Nature Protocols*, 15 (2020) 2589-2610.
- [6] Y. Li, W. Li, Y. Zheng, T. Wang, R. Pu, Z. Zhang, Desalting strategies for native mass spectrometry, *Talanta*, 281 (2025) 126824.
- [7] F. Fussl, B. Bones, A global pH-gradient based charge variant analysis directly coupled to HRAM-MS (CVA-MS) for mAb analysis.
- [8] T. Wohlschlager, K. Scheffler, I.C. Forstenlehner, W. Skala, S. Senn, E. Damoc, J. Holzmann, C.G. Huber, Native mass spectrometry combined with enzymatic dissection unravels glycoform heterogeneity of biopharmaceuticals, *Nature Communications*, 9 (2018) 1713.
- [9] M. Barth, C. Schmidt, Native mass spectrometry—A valuable tool in structural biology, *Journal of Mass Spectrometry*, 55 (2020) e4578.
- [10] Y. Yan, T. Xing, A.P. Liu, Z. Zhang, S. Wang, N. Li, Post-Column Denaturation-Assisted Native Size-Exclusion Chromatography–Mass Spectrometry for Rapid and In-Depth Characterization of High Molecular Weight Variants in Therapeutic Monoclonal Antibodies, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, DOI 10.1021/jasms.1c00289(2021).
- [11] X. Shao, M. Tian, J. Yin, H. Duan, Y. Tian, H. Wang, C. Xia, Z. Wang, Y. Zhu, Y. Wang, L. Chaihu, M. Tan, H. Wang, Y. Huang, J. Wang, G. Wang, Biofunctionalized dissolvable hydrogel microbeads enable efficient characterization of native protein complexes, *Nature Communications*, 15 (2024) 8633.



赛默飞  
官方微信

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

**thermo** scientific