

不同来源百日咳抗原蛋白氨基酸覆盖度和含量对比

龙珍 漆倩

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词

百日咳 PT FHA PRN Orbitrap 高分辨液相色谱质谱

引言

百日破 (DTP, diphtheria tetanus pertussis) 是一种全世界广泛使用的计划免疫类三联疫苗, 由白喉类毒素、破伤风类毒素和百日咳疫苗组成, 用于预防白喉、破伤风和百日咳三种疾病。此外, 百日破还是四联疫苗 (百日破-Hib)、五联疫苗 (百日破-Hib-IPV) 和六联疫苗 (百日破-Hib-IPV-乙肝) 的重要组成部分。因此, 百日破疫苗的质量与全世界儿童的健康息息相关。虽然百日破疫苗在全世界的接种率已名列前茅1, 但百日咳的发病率仍然在部分地区增高, 包括一些高接种率的发达地区。是什么因素导致儿童接种百日破疫苗后仍然感染百日咳? 近年来, 不断有研究人员呼吁改进百日咳疫苗2,3。目前, 百日咳疫苗主要有共纯化和组分两种生产工艺。共纯化百日咳疫苗通过百日咳杆菌发酵后, 经过过滤、盐析、粗制、精制等步骤收获含有PT (pertussis toxin)、FHA (filamentous hemagglutinin)、PRN (pertactin)、ACT (adenylate cyclase toxin, 或许含有)、FIM (fimbria subunit, 或许含有) 4等主要抗原蛋白和部分杂蛋白在内的蛋白混合物, 将其与一定比例铝佐剂混合后制成百日咳疫苗。组分百日咳疫苗通过百日咳杆菌发酵后, 经过柱沉析, 分别制备得到纯度较高的PT、FHA和PRN, 将三者按一定比例与铝佐剂混合后制成组分百日咳疫苗。从上述工艺可以看出, 无论是组分百日咳疫苗还是共纯化百日咳疫苗, PT、FHA和PRN均是主要的抗原蛋白。因此, 控制PT、FHA和PRN的质量对百日咳疫苗质量控制十分重要。氨基酸序列覆盖度是蛋白类药物的重要质量属性。早在2008年Tummala等5用液相色谱质谱报道了来自Tohama菌株的PT的氨基酸序列。百日咳的其它两种抗原蛋白FHA和PRN虽然有网络报道氨基酸序列, 但少有文献报道来自百日咳疫苗的FHA和PRN氨基酸序列。

Orbitrap具有其它质谱难以匹敌的质量稳定性、分辨率和灵敏度, 用于肽图分析时可实现低含量肽段的检测以及长肽段的检测, 有利于提高肽段覆盖度^{6, 7}。本文以Orbitrap为平台, 对比CS菌株与Tohama菌株生产的PT氨基酸序列; 对比不同来源PT的氨基酸序列覆盖度和肽段响应强度, 为PT对照品的筛选提供数据参考; 解析不同来源FHA和PRN的氨基酸序列与网络理论序列的对比, 分析百日咳杆菌生产的FHA和PRN可能的氨基酸序列。

2. 实验部分

2.1 样品

表1 百日咳抗原蛋白样品

样品编号	厂家	菌种	抗原名称	浓度 (µg/ml)
1	国内标品	CS	PT	1000
2	国内标品	CS	FHA	1000
3	国内标品	CS	PRN	1000
4	厂家1	CS	PT	1000
5	厂家1	CS	FHA	1000
6	厂家1	CS	PRN	1000
7	厂家2	CS	PT	1000
8	厂家3	CS	PT	1000
9	厂家3	CS	FHA	1000
10	厂家4	Tohama	PT	392
11	厂家4	Tohama	FHA	1289
12	厂家5	Tohama	PT	1290
13	国际标品1	Tohama	PT	1000
14	国际标品2	Tohama	PT	1000
15	国际标品3	Tohama	PT	400

取相同量的上述蛋白样品取样品100 μL，加入同等体积0.1%Rapigest溶液，60℃孵育15 min。加入10 μL 500 mmol/L的二硫苏糖醇溶液，60℃反应60 min。冷却至室温，加入10 μL 1mol/L的碘代乙酰胺溶液，室温避光反应30 min。加入765 μL50 mmol/L碳酸氢铵水溶液和10 μL胰蛋白酶溶液（或酶蛋白酶溶液），37℃（如果是糜蛋白酶溶液，反应温度为25℃）反应过夜，加入5 μL三氟乙酸终止酶解，37℃反应30 min。14000 r/min，离心10 min后取上清液用于LC-MS/MS分析。CS菌和Tohama菌生产的PT对照品除了用胰蛋白酶酶解以外，还采用糜蛋白酶酶解，综合两者所得肽段信息用于氨基酸序列覆盖度的对比。

2.2 仪器及试剂

质谱仪器：Q Exactive plus (赛默飞世尔科技，美国)；

色谱仪器：Vaquish Flex液相色谱系统 (赛默飞世尔科技，美国)；

色谱柱：BioC18, 3 μm, 2.1×150 mm (公司)；

试剂：二次去离子水，乙腈（质谱级），甲酸（质谱级）。

2.3 仪器方法

色谱分析条件：具体见表1；

表1 肽谱检测色谱条件

流动相	A相 (%) :	B相 (%) :
	0.1%甲酸-水	0.1%甲酸-乙腈
流速 (ml/min)	0.3	
柱温 (°C)	35	
色谱梯度	时间 (min)	B相浓度 (%)
	0	3
	2	3
	50	40
	55	90
	60	90
	60.1	3
	70	3

质谱分析条件：具体见表2；

表2 质谱条件

喷雾电压	3.5 kV
质量范围	m/z 300-2000;
分辨率	一级70,000/二级35,000
采集模式	dd-MS2
NCE	28%
AGC	一级3e6/二级1e5
毛细管加热温度	320℃
鞘气/辅助气	35/10
S-Lens	50

2.3 数据采集及分析

Thermo Xcalibur Qual Browser定性浏览器

BioPharma finder 4.0处理数据，参数设置如下：固定修饰carbamidomethylation，可变修饰Deamidation (NQ)、Oxidation (M)，检索特异性high，谱图匹配方式为二级谱图，允许二级质量偏差为10 ppm。

3. 结果与讨论

3.1 国际PT标品与国内PT标品氨基酸序列对比

首先以胰蛋白酶酶解液对比4种国际、国内PT标品，如表2所示。从统计结果可以看到，无论是国际还是国内PT标品S4的氨基酸覆盖度均较高，S1-S3的氨基酸覆盖度在70%以上，但S5亚基的氨基酸覆盖度差异较大。其中国际PT标品1的S5亚基氨基酸覆盖度可达98%以上，而国内PT标品仅41%。图1对比了四种标品中S5亚基的氨基酸覆盖情况。第一，无论何种来源的PT标品在胰蛋白酶酶解液中肽段IYSPADVAGLPTHTLYK和NFTVQELALK均是响应最强的两条肽段，该结果与之前报道的PT定量肽段一致8。第二，虽然国内PT标品、国际PT标品1和国际PT标品2标识的蛋白浓度均为1000 μg/mL，但肽段IYSPADVAGLPTHTLYK和NFTVQELALK响应差异较大。国际PT标品1与国内PT标品在这两条定量肽段上的响应相对一致，国际PT标品2肽段NFTVQELALK的响应明显强于其他两种标品。国际PT标品3虽然标识的浓度为400 μg/mL，但两条定量肽段的响应明显强于以上三种PT标品。因此，标品的选择对定量结果的影响很大，尤其是PT的S5亚基。第三，其余肽段虽然在国际PT标品中可以检测到，但其质谱响应相对于以上两条肽段更弱。推测导致国内PT标品S5亚基氨基酸覆盖度较差的原因有1) S5亚基从48号到107号残基所得胰蛋白酶酶解肽段较长且质谱响应较弱，被响应较强的肽段信号掩盖；2) 中国标品S5亚基部分丢失48-107号氨基酸残基，导致中国标品中该部分氨基酸残基对应的肽段浓度比国际标品更低。

表2 胰蛋白酶酶解所得国际PT标品与国内PT标品氨基酸覆盖度

样品编号	名称	氨基酸覆盖度				
		S1	S2	S3	S4	S5
1	国内PT标品	85.1%	73.4%	85.4%	96.4%	41.1%
13	国际PT标品1	85.1%	84.4%	89.9%	100.0%	98.1%
14	国际PT标品2	92.3%	82.4%	86.9%	100.0%	68.2%
15	国际PT标品3	92.3%	92.5%	86.9%	96.4%	70.1%

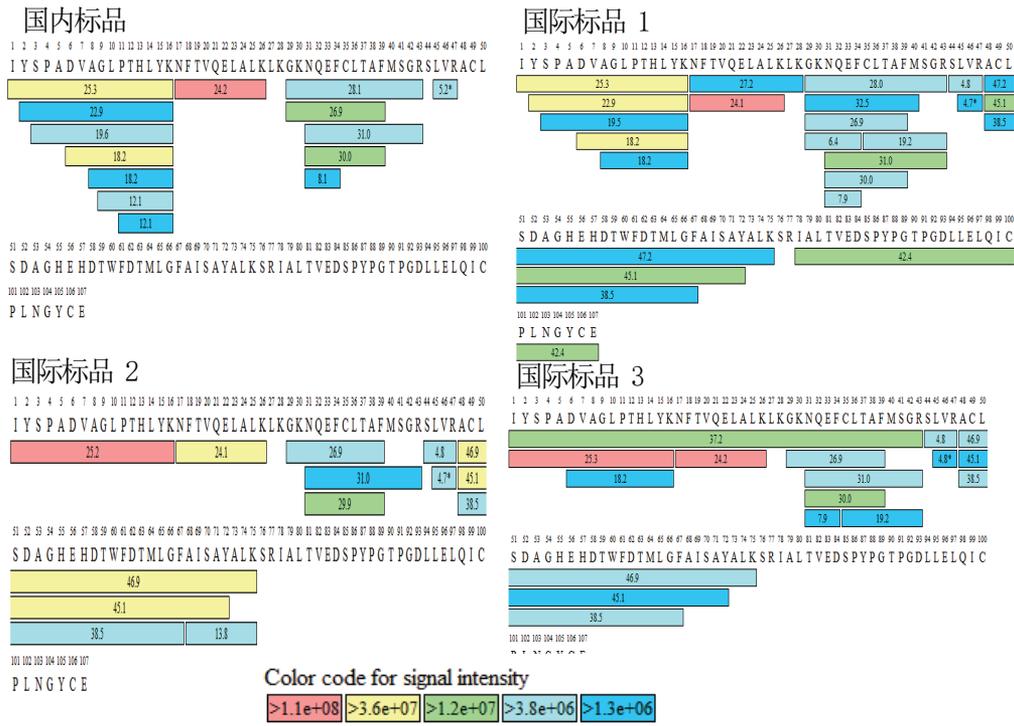


图1 TCT一级质谱总离子流图 (a) 和质谱图 (b)

从48到107号氨基酸残基，用胰蛋白酶酶解可得到2-3个肽段，其中48-75和78-107为超过25个氨基酸残基的长肽段。长肽段的质谱响应通常比短肽段的质谱响应更弱，因此长肽段的检测对质谱灵敏度要求较高。此外，为了更好的识别长肽段的电荷数避免假阳性结果，长肽段的检测对质谱的分辨率要求也较高。Orbitrap的高灵敏度和高分辨率可为长肽段的检测提供良好的响应。如图2，Orbitrap可检测到国际PT标品2中48-75残基对应的肽段且提供了高质量的二级质谱图。二级质谱图中b、y离子连续匹配，且m/z与理论值匹配情良好。由于相同蛋白浓度的国际PT标品2中可检测到长肽段，因此排除长肽段导致中国PT标品氨基酸覆盖度较低。推测导致中国PT标品S5亚基氨基酸覆盖度较低的原因是S5亚基部分丢失48-107号残基，导致胰蛋白酶解液中该片段对应的肽段浓度降低，响应较弱从而无法有效检测。

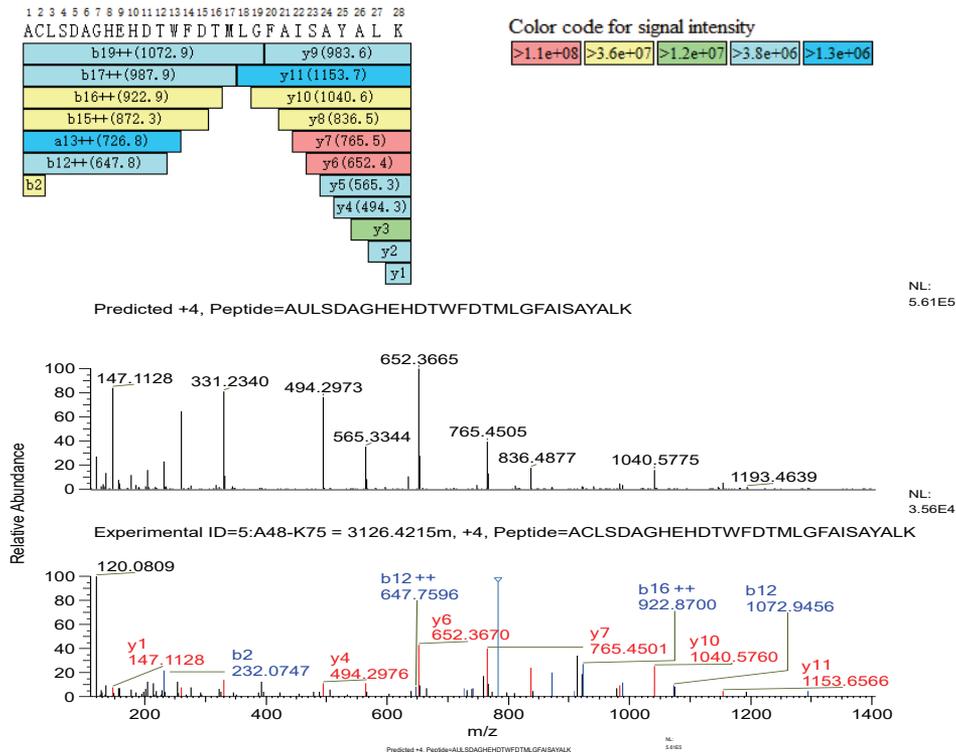


图2 国际PT标品2中48-75号残基肽段鉴定结果

为了鉴定中国PT标品中S5亚基是完全丢失48-107号残基还是部分丢失，用糜蛋白酶酶解中国PT标品，将48-107号残基酶解成质谱响应更好、长度适宜的肽段。如图3所示，糜蛋白酶酶解后可从中国PT标品中检测到所有S5亚基对应的氨基酸残基，但48-107号氨基酸残基对应肽段整体响应较弱。综上所述，CS菌种与Tohama菌种表达的PT氨基酸序列相同，但由于纯化工艺不同，导致不同厂家得到的PT亚基存在部分丢失。

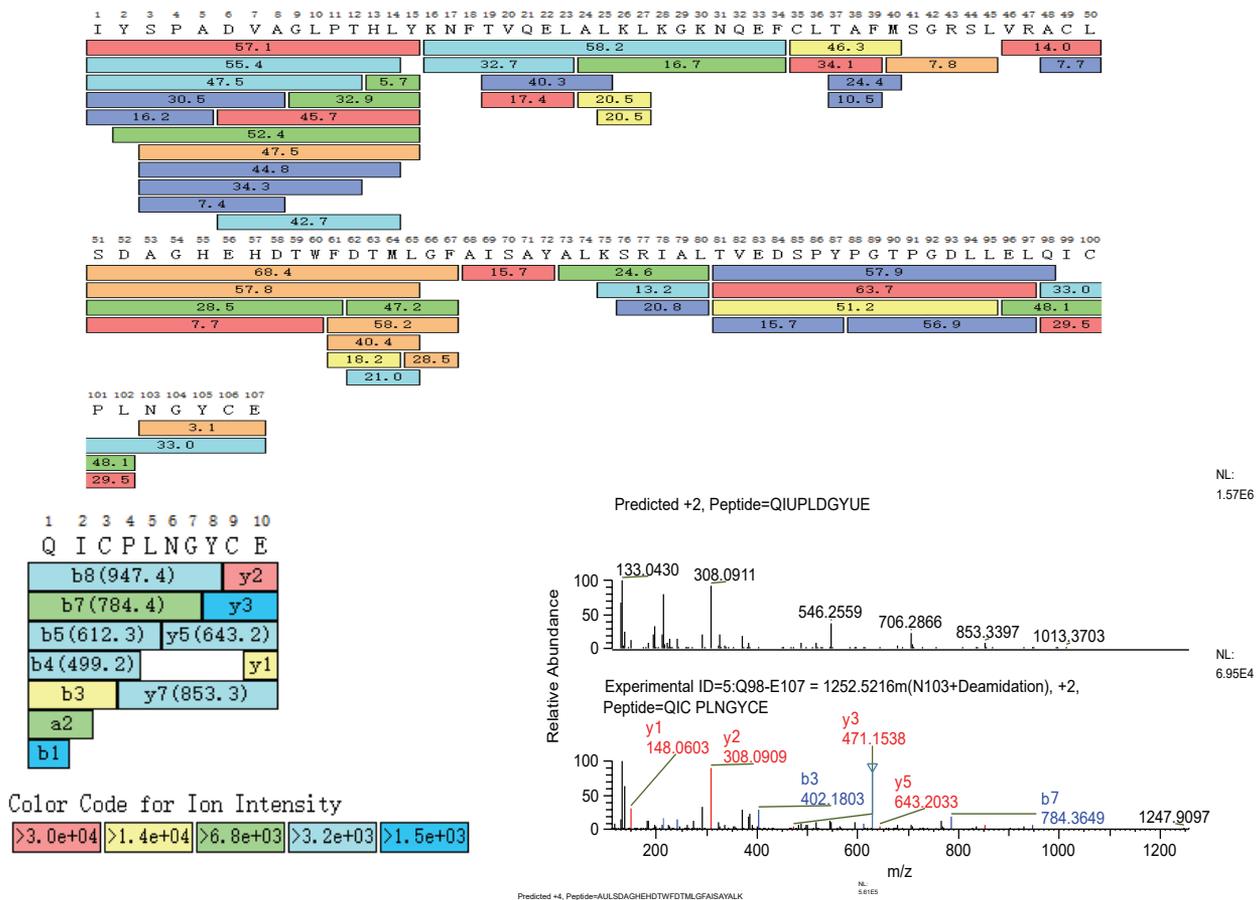


图3 中国PT标品糜蛋白酶酶解液分析所得氨基酸覆盖度（上）和典型肽段二级碎片（下）

3.2 不同厂家PT样品氨基酸覆盖度对比

对比国内PT标品和各厂家PT样品如表3所示。六种来源的PT样品S1-S4亚基氨基酸覆盖度相当，厂家1、2、3和5的S5亚基氨基酸覆盖度高于中国标品和厂家4。厂家1和厂家3提供的PT与其他样品相比，样品中未匹配成分的峰面积百分比更少，推测该样品中PT的有效成分更高，杂质（未知突变、修饰）更少。综上所述，从氨基酸覆盖度和未匹配成分峰面积百分比两个指标来看，厂家1和厂家3的样品更优。进一步对比这两个样品，还需要从含量、活性和其他纯度验证手段上评价。

表3 胰蛋白酶酶解所得国内PT标品与5个不同厂家PT样品氨基酸覆盖度对比

样品编号	名称	氨基酸覆盖度					未匹配成分峰面积百分比
		S1	S2	S3	S4	S5	
1	国内PT标品	85.1%	73.4%	85.4%	96.4%	41.1%	56.40%
4	厂家1	85.1%	76.4%	82.9%	100.0%	60.7%	19.10%
7	厂家2	79.6%	79.4%	81.9%	100.0%	67.3%	43.20%
8	厂家3	92.3%	73.9%	85.4%	100.0%	67.3%	17.90%
10	厂家4	91.9%	80.9%	77.9%	100.0%	42.1%	32.00%
12	厂家5	92.3%	72.9%	89.4%	100.0%	61.7%	65.80%

3.3 FHA氨基酸覆盖度

本次共对比了三种不同来源的FHA样品的胰蛋白酶酶解液，如表4所示。三种样品的检测结果类似，响应较强的肽段（响应大于 $5.4e7$ ）主要位于理论序列1641-2349号氨基酸残基之间。国内FHA标品有部分检出肽段（质谱响应 $5.3e5-1.7e7$ 之间）位于89-1641以及3100-3467。没有位于1-88，2368-3100和3467-3590的肽段检出。厂家1的FHA产品与国内标品检出情况类似。厂家3的FHA样品在3100-3467没有肽段检出。三种样品中，厂家3的氨基酸覆盖度最低、未匹配成分峰面积百分比最高。厂家1样品与国内标品较为一致。用糜蛋白酶酶解中国标品得到的结果与胰蛋白酶结果类似：响应较高的肽段位于理论序列1651-2347号氨基酸残基之间。理论序列84-1650之间有部分肽段检出，但响应较弱（ $5.3e5-1.7e7$ ）。综上所述，初步判断CS菌发酵得到的FHA蛋白表达了理论序列从84-2349之间的氨基酸。进一步确定该序列还需要结合氨基酸分析、电泳和完整分子量检测等手段综合判断。

表4 胰蛋白酶酶解所得国内FHA、PRN与厂家样品氨基酸覆盖度对比

样品编号	来源	FHA 氨基酸覆盖度	未匹配成分峰面积百分比	PRN 氨基酸覆盖度	未匹配成分峰面积百分比
2/3	国内标品	61.2%	32.0%	57.4%	23.2%
5/6	厂家1	64.0%	26.4%	57.3%	15.7%
9	厂家3	54.1%	74.9%		

3.4 PRN氨基酸覆盖度

如表4所示，国内标品和厂家1的PRN氨基酸覆盖度一致，但厂家1样品中未匹配成分峰面积百分比更低。国内标品和厂家1的PRN样品检出的肽段的区域一致，都集中在理论序列35-636号氨基酸残基之间。1-34和637-915号残基之间没有肽段检出。用糜蛋白酶酶解国内PRN标品，得到相同的结果，有肽段检出的区域集中在理论序列35-636号氨基酸残基之间。初步判断CS菌发酵得到的PRN蛋白表达了理论序列从35-636之间的氨基酸。进一步确定该序列还需要结合氨基酸分析、电泳和完整分子量检测等手段综合判断。

结论

本文以Orbitrap为平台，系统比较了中国PT标品和国际PT标品的差异。通过双酶酶切结果初步判断CS菌表达的PT与文献报道的Tohama菌表达的PT序列一致。但由于纯化工艺不同，导致不同来源的PT标品的亚基（尤其是S5）存在不同程度的肽段丢失。本文还对比了中国PT标品与国际、国内5个厂家提供的PT样品，发现厂家1和厂家3可提供较好的PT样品，但有待更多数据对这两家产品进行对比。通过双酶酶切和对比不同来源的FHA和PRN，初步推测两种抗原蛋白的氨基酸序列分别为理论序列的84-2349和35-636部分。在之后的工作中，我们将通过分子量检测、二硫键检测等手段进一步对比不同来源的抗原蛋白，为标品筛选和研究中国百日咳抗原蛋白质量和优化工艺提供数据。

参考文献

1. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage>.
2. Di Mattia, G.; Nicolai, A.; Frassanito, A.; Petrarca, L.; Nenna, R.; Midulla, F., Pertussis: New preventive strategies for an old disease. Paediatric Respiratory Reviews 2019, 29, 68-73.
3. Latasa, P.; García-Comas, L.; Gil de Miguel, A.; Barranco, M. D.; Rodero, I.; Sanz, J. C.; Ordobás, M.; Arce, A.; Garrido-Esteba, M., Effectiveness of acellular pertussis vaccine and evolution of pertussis incidence in the community of Madrid from 1998 to 2015. Vaccine 2018, 36, 1643-1649.
4. Long, Z.; Wei, C.; Zhan, Z.; Li, X.; Li, Y.; Ma, X.; Li, C.; Wang, L.; Huang, T., The effects of manufacture processes on post-translational modifications of bioactive proteins in pertussis vaccine. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2020, 190, 113536.
5. Tummala, M.; Hu, P.; Lee, S.-M.; Robinson, A.; Chess, E., Characterization of pertussis toxin by LC-MS/MS. Analytical Biochemistry 2008, 374, 16-24.
6. Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Graham Cooks, R., The Orbitrap: a new mass spectrometer. Journal of Mass Spectrometry 2005, 40, 430-443.

7. Zubarev, R. A.; Makarov, A., Orbitrap Mass Spectrometry. Analytical Chemistry 2013, 85, 5288-5296.
8. Long, Z.; Wei, C.; Zhan, Z.; Ma, X.; Li, X.; Li, Y.; Yao, J.; Ji, F.; Li, C.; Huang, T., Quantitative determination of bioactive proteins in diphtheria tetanus acellular pertussis (DTaP) vaccine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2019, 169, 30-40.



赛默飞
官方微信

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

Thermo Fisher
S C I E N T I F I C