

SWATH®——数据非依赖型采集模式在生物药肽图表征研究中的应用

SCIEX X500B QTOF质谱系统SWATH®方案特辑

Zoe Zhang¹, Annu Uppal²; Harini Kaluarachchi³; Sibylle Heidelberger³

¹ SCIEX Redwood City, California (USA); ² SCIEX Gurgaon Haryana (India); ³ SCIEX Ontario (Canada)

生物药表征研究中的主要挑战

- 目标样品的全覆盖信息
- 低丰度分析物的鉴定和确证
- 翻译后修饰的准确定量

SCIEX SWATH®采集模式的特点

- 一个采集方法适用于所有的分析物
- 能够采集所有潜在化合物的碎片离子信息
- 更宽的动态范围
- 重现性和灵敏度更佳
- 使用BioPharmaView™软件能够实现对低丰度修饰的鉴定和定量

背景介绍

肽图分析是生物制药分析流程中常见的一种分析项目。它通过对抗体药的深入分析，能够鉴定到所有预期的和非预期的肽段修饰，进而保证产品的质量、安全性和效价始终如一。其中对于低丰度肽段修饰的鉴定则是保证生物药产品质量和安全性的关键环节。

在本次研究中，我们通过SCIEX数据非依赖型采集模式——SWATH®对曲妥珠单抗（Trastuzumab）进行分析。SWATH®是一种对化合物无歧视的采集方式，在采用SWATH®模式采集数据的时候，质谱会将需要扫描的质荷比范围划分为多个特定宽度的窗口，每次二级扫描时Q1会将其中一个窗口内的所有化合物送到碰撞室中同时打碎，质谱就能够采集到该窗口内所有化合物的MS/MS谱图，实现化合物的深度分析。肽图分析的工作流程中，在分析共洗脱的肽段时，不同于数据依赖型采集模式（Data dependent

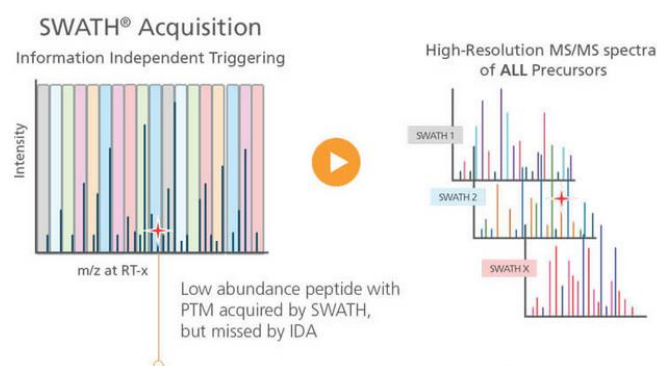


图1. SCIEX SWATH®在样品全信息覆盖度采集上的工作流程展示。

acquisition, DDA) 需要通过设置筛选参数对肽段母离子进行选择从而依次对肽段进行分析，SWATH®可以直接采集所有肽段的MS/MS谱图，从而在对低丰度化合物的定性和定量分析中有更好的覆盖度和重现性。

实验方案：

样品制备：

曲妥珠单抗购自Myoderm (Norristown, PA, USA)，胰蛋白酶增强剂ProteaseMax和胰蛋白酶均购自Promega (Madison WI, USA)。抗体使用ProteaseMax变性后溶解于pH为7.8的50 mM Tris缓冲液中。接下来使用DL-dithiothreitol进行还原，使用2-iodoacetamide进行烷基化封闭（均购自Sigma Aldrich）。之后按照质量比1:25加入胰蛋白酶，37摄氏度孵育3小时，最后加入TFA酸化。离心取上清后送到LC-MS系统上进行分析。

液相色谱条件：

使用搭载Phenomenex Kinetex 1.7 μ m C18 100 Å 50 × 2.1 mm 色谱柱的 ExionLC液相系统在40 °C 进行分析。流动相A：水+0.1%

甲酸，流动相B：乙腈+0.1%甲酸，流速设定为250 μ L/min，在25分钟的时间内B相浓度从5%至40%，上样量为8 μ L。

质谱条件：

使用搭载IonDrive™离子源和电喷雾电离喷针的SCIEX X500B QTOF系统进行SWATH®数据的采集，对于SWATH®采集方法而言，每个150 ms时长的TOF-MS扫描后接28个窗口的二级扫描，每个二级扫描的时长为50 ms。

数据处理：

使用BioPharmaView™软件的默认参数来处理SWATH®数据，通过批处理的方法来处理重复样本。

结果与讨论：

我们使用相同的液相方法和SWATH®数据采集模式对曲妥珠单抗的肽图数据进行了三次重复采集。Figure.2A是这三次重复数据

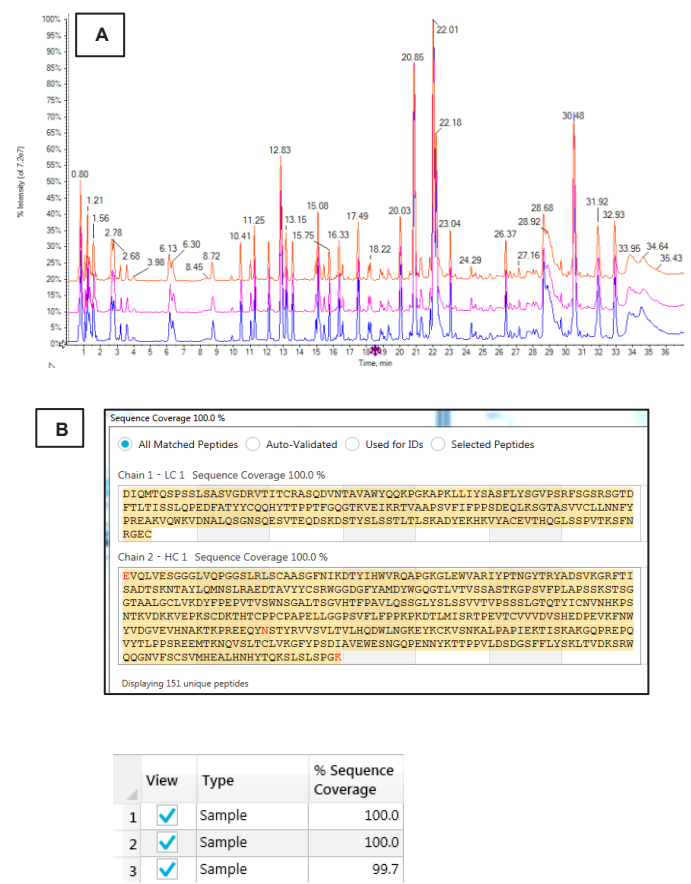


图2。（A）三次重复采集的曲妥珠单抗肽图的TIC叠加图；（B）三次重复均能够提供非常接近100%的肽段覆盖度。

的色谱叠加图，可以看到液相和X500B QTOF系统的稳定性和重现性都非常的好。三次重复数据的肽段覆盖率都超过99%，绝大部分鉴定到的修饰的质量偏差都在5 ppm以内（Figure 2B）。

使用SWATH®模式采集的数据能够尽可能多的发现低丰度的肽段及其修饰。例如我们在2.44分钟发现了EEQYNSTYR肽段上发生的低丰度的deamidation修饰。在三次重复中，该修饰在这条肽段上的平均修饰比例为0.1%（表1）。由于其糖基化形式是高丰度形式且与deamidation修饰形式存在共洗脱，所以如果使用传统的数据依赖型采集模式则会存在丢失这条肽段信息的可能。而SWATH®则不受cycle time，母离子信号强度和共洗脱母离子的影响，因此能够对所有高丰度和低丰度的肽段均进行很好的二级谱图的采集，进而达到最高的序列覆盖度和修饰鉴定率。

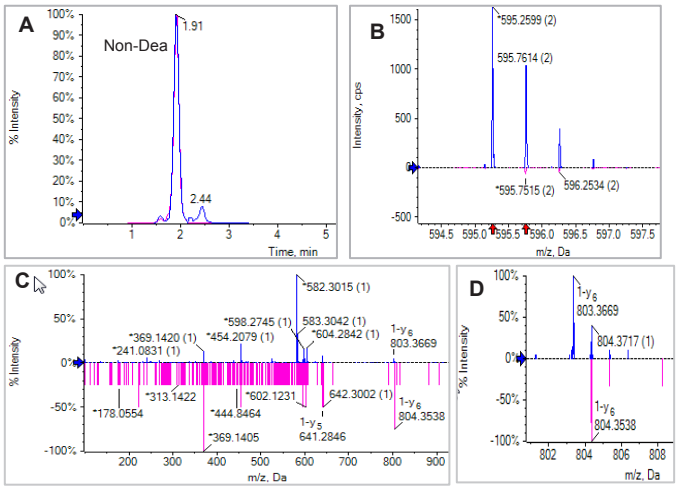


图3. EEQYNSTYR肽段无deamidation修饰（蓝色）和deamidation修饰（粉色）的（A）XIC图（B）SWATH®一级谱图（C）SWATH®二级谱图（D）y6离子谱图。

表1. BioPharmaView™软件所检测到的肽段EEQYNSTYR和FNWYVDGVEVHNAK上deamidation的修饰比例信息。

	Sample	% modification	Average	% CV
EEQYNSTYR	1	0.11%	0.11%	5.1%
	2	0.12%		
	3	0.11%		
FNWYVDGVEVHNAK	1	0.40%	0.44%	8.2%
	2	0.45%		
	3	0.47%		

Figure 4展示了BioPharmaView™软件鉴定到的另外一个存在于FNWYVDGVEVHNAK肽段上的低丰度的deamidation修饰。

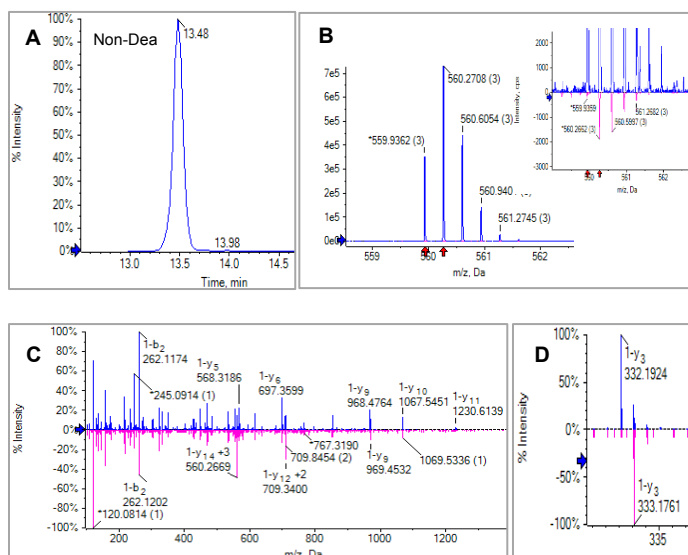


图4. SWATH®数据中肽段FNWYVDGVEVHNAK上无deamidation修饰 (蓝色) 和deamidation修饰 (粉色) 的 (A) XIC图, (B) SWATH®一级谱图, (C) SWATH®二级谱图以及 (D) 确证deamidation修饰的谱图。

此外, 我们还从EEQYNSTYR肽段上发现了糖基化修饰。数据经过BioPharmaView™处理后, 我们发现该条肽段上存在低丰度的mannose-5 糖基化修饰。我们可以通过SWATH®采集到的高质量MS/MS数据进行进一步的确证 (Figure 4B)。无论目标肽段是高丰度还是低丰度, SWATH®数据采集模式不需要设置母离子的选择规则就能够提供高质量的MS/MS信息, 为糖基化修饰的进一步确证提供可靠的依据。

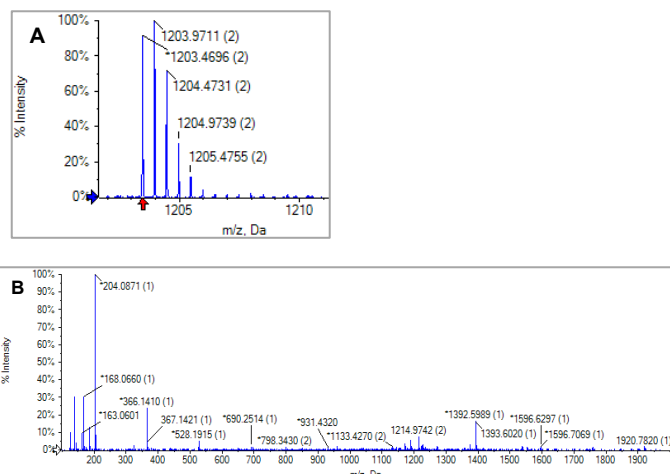


图5. 肽段EEQYNSTYR上Mannose 5修饰的 (A) TOF-MS谱图 (B) MS/MS谱图。

结论

SWATH®解决方案能够提供几乎全覆盖的曲妥珠单抗肽图信息, 通过提供高分辨率的碎片离子XIC图来降低其他肽段的干扰, 能够对低丰度的肽段修饰进行可靠的鉴定和确证。这种非常低丰度肽段修饰的鉴定能力对于提高可信肽段覆盖度和鉴定生物分子的潜在重要质控指标提供了很大的帮助。

参考文献：

1. MS/MSALL with SWATH® Acquisition - Comprehensive Quantification with Qualitative Confirmation using the TripleTOF® 5600+ System. AB SCIEX Technical note, 3330111-03.

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte.

Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-6927-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390
全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333
网址：www.sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835
微博：@SCIEX