

在X500B QTOF质谱平台上同位素分辨抗体亚基

Fan Zhang², Sean McCarthy¹

¹ SCIEX, MA, USA, ² SCIEX, CA USA

前言

使用高分辨质谱进行蛋白亚基的分析是生物药开发过程中常用的分析技术。相对于完整蛋白分析，蛋白亚基在色谱上更容易获得好的分离效果，质谱分析的灵敏度也更高。近年来，随着质谱分辨率的不断提升，在蛋白亚基分子量测定时获得同位素峰分辨率能提高定性分析的准确度。SCIEX X500B QTOF是专门为生物药表征而设计的高分辨质谱平台，在完整蛋白分析、亚基分析以及肽图分析等生物药分析流程方面均能获得高质量的数据。在本技术文档中我们将展示使用SCIEX X500B QTOF高分辨质谱进行Ides酶切后抗体的亚基分子量分析，对于分子量相近的蛋白或者蛋白亚基分子量测定时能获得同位素峰的分辨，我们将展示如何优化质谱以及数据处理参数获得高质量的数据结果。



实验条件和方法

样品前处理

NIST单抗首先经Ides (V7511, 普洛麦格) 酶切，在磷酸盐缓冲溶液中，1U的蛋白酶可以酶切1微克的蛋白质，酶切反应在37度水浴中进行1个小时。酶切后的样品进一步使用TCEP还原，样品处理完成后直接进行液质分析，进样量为5微升。

X500B QTOF高分辨质谱平台的技术优势

- 分辨率高，能满足不同层次生物药表征的需求
- 在蛋白亚基分子量测定时能获得同位素峰分辨
- 紧凑型台式质谱仪，节省实验室空间
- 硬件和软件重新设计，接受度高，适合于不同层次的用户

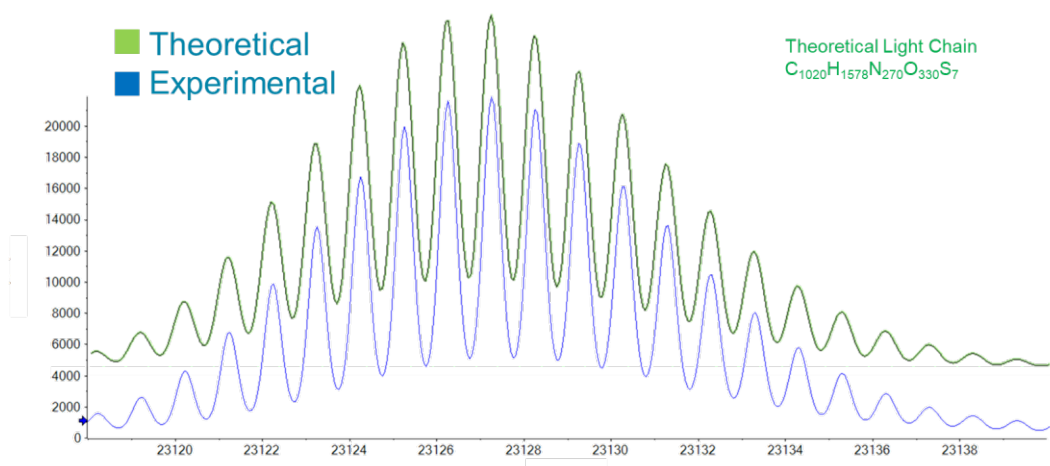


图1. NIST单抗轻链理论和实际检测分子量对比。

色谱条件

色谱分离在岛津ExionLC™液相色谱系统上进行，色谱柱使用安捷伦PLRP-S（2.1mm × 50mm, 300Å, 5 μm），柱温为80摄氏度，色谱梯度如表1所示。流动相A是纯水加0.1%甲酸，流动相B是乙腈加0.1%甲酸。

表1. 液相色谱分离梯度表。

Time (min)	%A	%B	Flow Rate ml/min
Initial	75	25	0.25
3.0	75	25	0.25
9.0	10	90	0.25
11.4	10	90	0.25
11.5	75	25	0.25
17.0	75	25	0.25

质谱条件

质谱分析使用配备Turbo V离子源的SCIEX X500B高分辨质谱，数据采集使用的是TOF-MS采集模式，关闭完整蛋白功能。质谱采集参数如表2所示。

Table 2. MS Parameters.

Parameter	Setting
Scan Mode	Positive
GS1	50
GS2	50
Curtain Gas	35
Temperature	400°C
Ion Spray Voltage	5000 V
Time Bins to Sum	6
Accumulation Time (ms)	0.5 sec
TOF Start Mas (Da)	400
TOF Stop Mas (Da)	3000
Declustering Potential	150.0
Collision Energy	10

数据处理

数据处理使用SCIEX OS软件和Bio Tool Kit软件。蛋白亚基去卷积参数如表3所示。

Table 3. Reconstruction Parameters.

Parameter	Setting
Start Mass	Fc 25000 Da LC 22600 Da Fd 25200 Da
Stop Mass	Fc 26000 Da LC 23600 Da Fd 26200 Da
Step Mass	0.05 Da
Input Spectrum Isotope Resolution	30000

结果与讨论

单克隆抗体经Ides酶切和TCEP还原后，生成三种分子量相近的片段，分别为轻链，Fc/2和Fd三种亚基。Ides蛋白酶在第一次被报道处理单克隆抗体之后就获得了广泛的关注^[1]。相对于完整蛋白分析，Ides酶切生成的抗体片段能显著降低样品的复杂程度，相对于肽图分析，样品前处理和数据分析更为简便。单抗样品经Ides酶切后生成的三种亚基片段的分子量都在25000左右，使用高分辨质谱进行分子量测定时能达到同位素峰的分辨，相对于完整蛋白分子量测定，蛋白亚基水平分子量测定的准确度要更高。图2-4展示的是NIST单抗经Ides酶切后三种亚基片段分子量测定结果，每一片段都能达到同位素峰分辨，实验结果与之前文献报道结果一致^[2]。

为了验证数据结果的准确性，我们根据NIST单抗轻链的元素组成模拟了轻链的理论分子量的质谱图，理论质谱图 and 实际观测的质谱图使用相同的分辨率（30000），图1展示的是轻链理论模拟的质谱图 and 实际观测质谱图对比，实验观测分子量的结果（蓝线）与理论模拟的分子量测结果（绿线）的匹配度非常高。

NIST单抗经Ides酶切后生成的三个亚基的单同位素峰由于丰度太低而不能被检测到，这个结果也与之前的文献报道结果一致^[2]。在这种情况下，我们使用实际观测到的可分辨的同位素峰与之相对应的理论同位素峰的分子量进行比较来验证分析结果的准确度，分析结果如表4所示，实际观测到的可分辨的同位素峰和与之对应的理论的同位素峰的分子量的平均质量偏差为3.46 ppm，结果显示使用X500B QTOF高分辨质谱进行蛋白亚基分子量测定时能获得非常高的准确度。

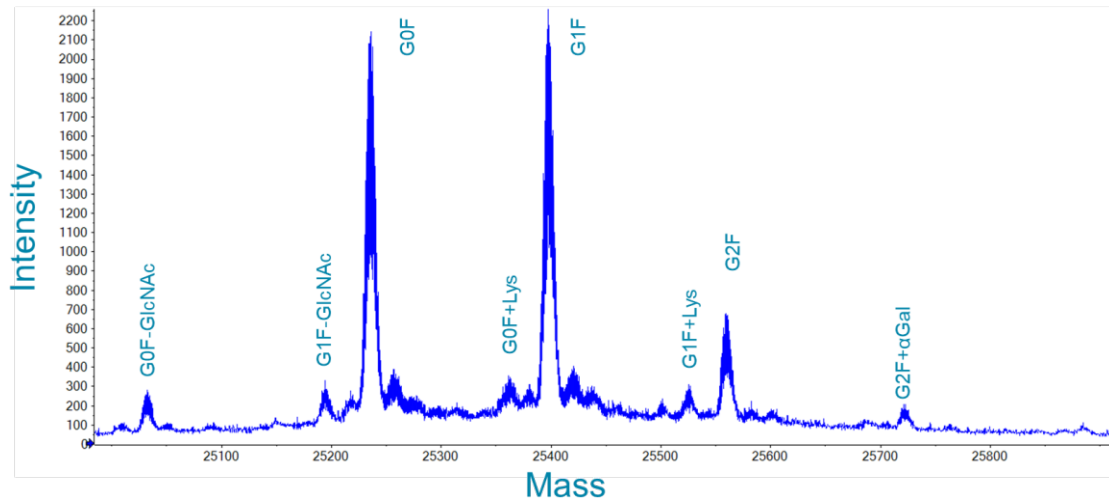


图2. NIST单抗经Ides酶切后Fc/2片段的去卷积分子量结果。

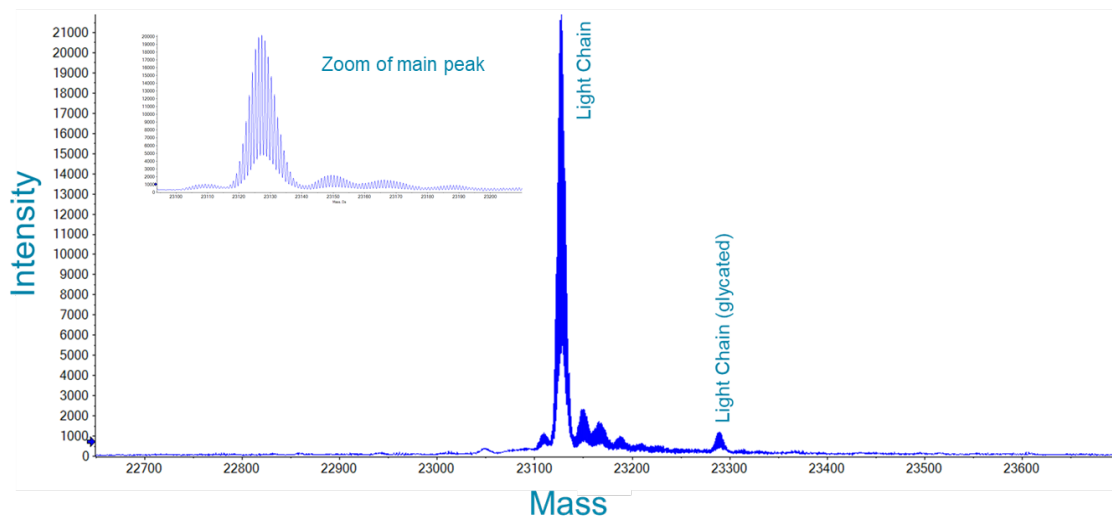


图3. NIST单抗经Ides酶切后轻链片段的去卷积分子量结果。

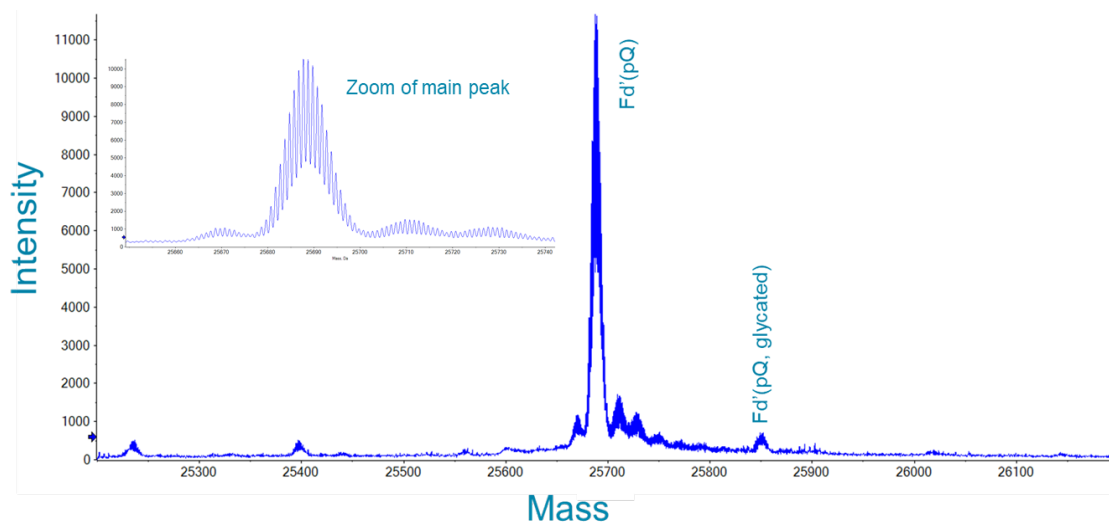


图4. NIST单抗经Ides酶切后Fd片段的去卷积分子量结果。

表4. NIST单抗轻链分子量测定结果以及对应的质量偏差。

Theoretical	Observed	PPM
23118.318	23118.222	-4.13
23119.320	23119.222	-4.25
23120.323	23120.226	-4.19
23121.325	23121.237	-3.82
23122.328	23122.238	-3.89
23123.330	23123.25	-3.48
23124.333	23124.256	-3.33
23125.335	23125.257	-3.39
23126.338	23126.255	-3.58
23127.340	23127.257	-3.60
23128.343	23128.264	-3.40
23129.345	23129.267	-3.37
23130.347	23130.273	-3.22
23131.350	23131.277	-3.14
23132.352	23132.281	-3.07
23133.354	23133.292	-2.70
23134.357	23134.291	-2.84
23135.359	23135.294	-2.81
AVERAGE		3.46

结论

- 使用X500B高分辨质谱平台对经Ides酶切后的单抗的亚基分子量测定时能达到同位素峰分辨的效果，在鉴定蛋白翻译后修饰方面准确度更高。
- 蛋白亚基分子量测定时，理论模拟与实际观测到的结果的匹配度非常高。
- 使用X500B进行蛋白亚基分子量的测定结果与之前文献中报道的结果一致。

参考文献

- An, Y., Zhang, Y., Mueller, H.-M., Shameem, M., Chen, X., A New Tool for Monoclonal Antibody Analysis. mAbs. 2014;6(4):879-893. doi: 10.4161/mabs.28762.
- John E. Schiel, Darryl L. Davis, Oleg V. Borisov (Eds.). Vol 1201, 2015 State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume2. Biopharmaceutical Characterization: The NISTmAb Case Study. Vol 1201, American Chemical Society.

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-02-8241-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：广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX