

利用高分辨液质联用仪进行替尔泊肽结构确认

LCMS-QTOF-104

摘要： 本文采用岛津 LCMS-9050 高分辨液质联用仪对替尔泊肽酶切后样品进行数据采集，并结合 PEAKS 软件对采集结果解析，对替尔泊肽的结构进行了确认。结果显示，使用 Lys-C 酶切能够实现 100% 的序列覆盖度，并且推测出序列中氨基酸的修饰位点。该结果可为多肽药物的结构确证提供方法参考。

关键词： 替尔泊肽 PEAKS 结构确证

技术特点：

- ❖ Lys-C 酶切相对于其他酶切（如 trypsin）在替尔泊肽结构确认上具有明显优势，可实现 100% 的序列覆盖度。
- ❖ PEAKS Studio 软件可基于 sequence tag 的搜库算法，完成替尔泊肽的结构确认，保证鉴定结果的准确性。

多肽药物是介于大分子蛋白 / 抗体类药物和小分子药物之间的一类重要的药物分子，因其生物活性高、靶向专一性强、毒副作用低等优点而被广泛应用于疾病治疗领域。近年来，随着多肽药物研发数量的不断增长，对这类药物结构确证方面的研究也在不断开展。目前常用的肽和蛋白质 N 端测序方法有 Edman 降解法和串联质谱法，两种方法互相补充，互相佐证。随着测序技术和仪器的发展，串联质谱法

已成为一种高效、高灵敏和高通量的肽类测序工具，尤其在有复杂修饰的多肽药物分子结构确证方面发挥了重要作用。

本文采用岛津 LCMS-9050 高分辨液质联用仪对替尔泊肽酶解后肽段进行分析，并结合 PEAKS 软件对检测结果进行解析，高效快速的成功确认了其氨基酸序列，为多肽药物的研究与生产提供了坚实的支持。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-9050，配置信息如下：

系统控制器：	SCL-40	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40D X3×2	柱温箱：	CTO-40C
自动进样器：	SIL-40C X3	质谱仪：	LCMS-9050
色谱工作站：	Labsolutions Ver. 5.118		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：	Shim-pack GIST C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 2 μm, P/N: 227-30001-04)		
流动相：	A 相 -0.1% 甲酸水, B 相 -0.1% 甲酸乙腈		
进样体积：	2.0 μL		
流速：	0.3 mL/min	柱温：	45°C
洗脱方式：	梯度洗脱，B 相起始浓度为 2%，时间程序如表 1 所示。		

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
2.00	泵	B Conc	2.0
20.00	泵	B Conc	30.0
30.00	泵	B Conc	55.0
32.00	泵	B Conc	55.0
35.00	泵	B Conc	95.0
35.01	泵	B Conc	2.0
40.00	控制	STOP	

质谱条件:

离子化模式 : ESI+	雾化气流速 : 3.0 L/min
接口温度 : 300°C	干燥气流速 : 10.0 L/min
D L 温度 : 250°C	加热气流速 : 10.0 L/min
加热模块温度 : 400°C	碰撞气 : 氦气
扫描模式 : DDA	喷针位置 : +1.0 mm
DDA 参数 : MS m/z 250 - 2000, MS/MS(DDA) m/z 50 - 2000	

1.3 样品前处理

利用 50 mM 碳酸氢铵水溶液将替尔泊肽粉末溶解至 1.0 mg/mL, 然后吸取 20 μ L 该溶液样品, 加入 180 μ L 酶解缓冲液 (50 mM 碳酸氢铵) 和 4 μ L Lys-C 溶液 (含 2 μ g Lys-C) 在 37°C 下反应 16 小时, 酶解结束后, 加入 2 μ L 50% 甲酸水溶液终止酶解反应。

■ 结果与讨论

2.1 替尔泊肽肽段色谱图

对替尔泊肽酶解后样品进行数据采集, 按照其理论序列使用 Lys-C 酶切后应产生三个肽段, 但在替尔泊肽 Lys20 处有长的侧链, 由于空间位阻的作用导致 Lys20 处漏切, 最终得到两个肽段, 其总离子流色谱图见图 1。

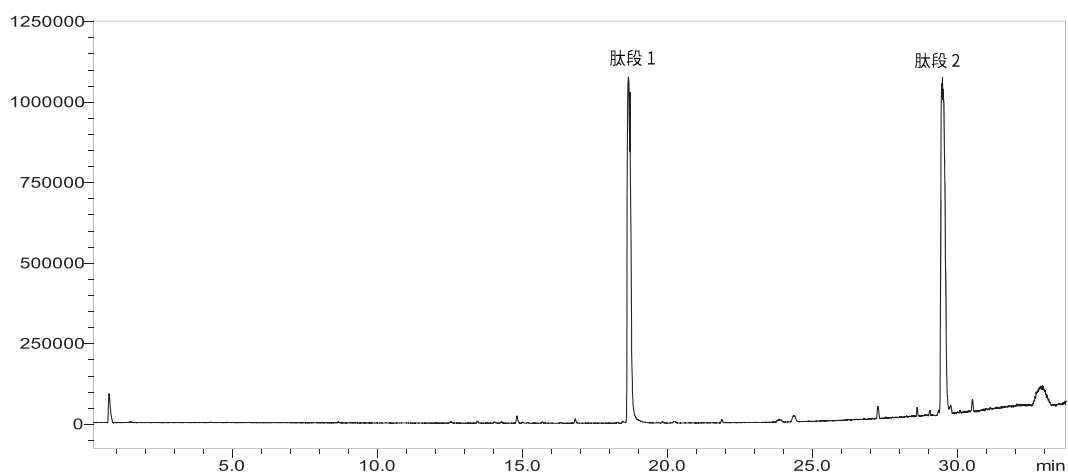


图 1 替尔泊肽酶解后的总离子流色谱图

2.2 PEAKS 结果解析

将 LabSolutions 采集好的数据直接导入到 PEAKS 软件中，选择 DB Search 工作流，并导入替尔泊肽的氨基酸序列，可自动进行氨基酸序列确证，具体结果解析流程图见图 2。

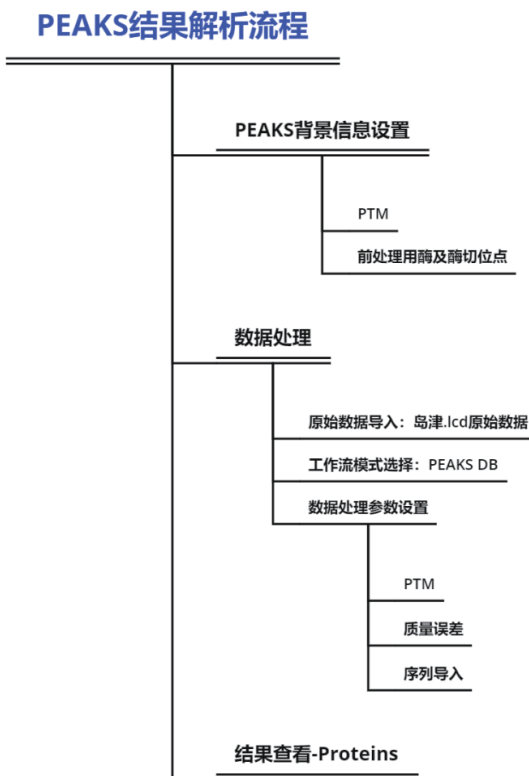


图 2 PEAKS 软件结果解析流程图

替尔泊肽序列覆盖结果如图 3 所示，其氨基酸序列覆盖率为 100%，并给出了序列中存在的修饰类型。从肽段覆盖视图中可以看出，其修饰位点在第 2、13、20、39 位氨基酸处，和实际结构相符。图 4 为肽段的详细信息，包括了肽段的氨基酸长度，置信度评分，m/z 偏差，肽特征峰面积等。肽段的偏差显示的是 -4.6 ppm，表明质谱质量轴稳定，质谱精度高。

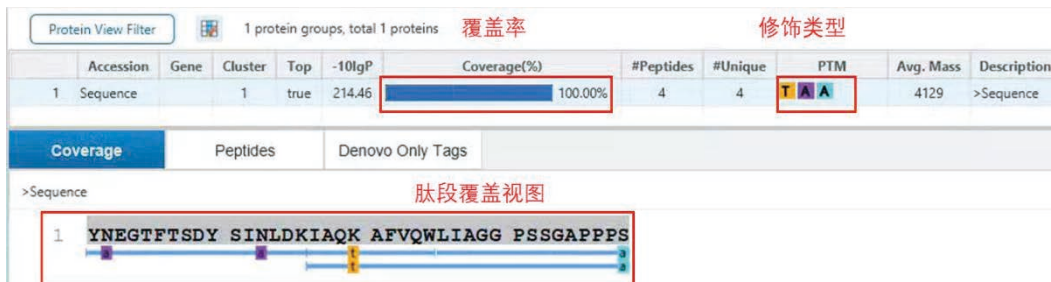


图 3 替尔泊肽序列覆盖结果

	Peptide	Unique	-10lgP	Mass	Length	ppm	m/z	RT	Area trypisen+lys-c...	Scan	#Feature	Start	End	PTM
1	YN(-28.99)EGTFTSDYSIN(-28.99)LDKI	true	141.80	1807.8516	16	-4.6	904.9290	18.67	4.5E5	11791	1	1	16	A A
2	KIAQK(+743.46)AFVQWLIAGGSSGAPPPS(-0.98)	true	116.24	3020.6838	23	-1.1	1511.3475	29.53	1.83E5	19172	1	17	39	T A

图 4 肽段详细信息

图 4 中显示的两个肽段为 Lys-C 酶切后的肽段，可完成替尔泊肽序列的全覆盖。肽段 1 碎裂产生的碎片离子见图 5，b₁ 是 N 端的第一个氨基酸碎裂产生的碎片离子。以此类推，y₁~y₁₅ 对应 C 端第 1~15 个氨基酸处肽键断裂产生的碎片离子，b₁~b₁₅ 对应 N 端第 1~15 个氨基酸处肽键断裂产生的碎片离子。从图中可以看出，y₁~y₁₅ 的离子碎片全都检测到，可实现每个氨基酸的覆盖。第二个肽段碎裂产生的碎片离子见图 6，从图中可以看出，y₂~y₁₈ 的离子碎片全都检测到，另外通过 Database search，可进一步确认其序列为 KIAQKAFVQWL IAGGPSSGAPPPS，与理论吻合。

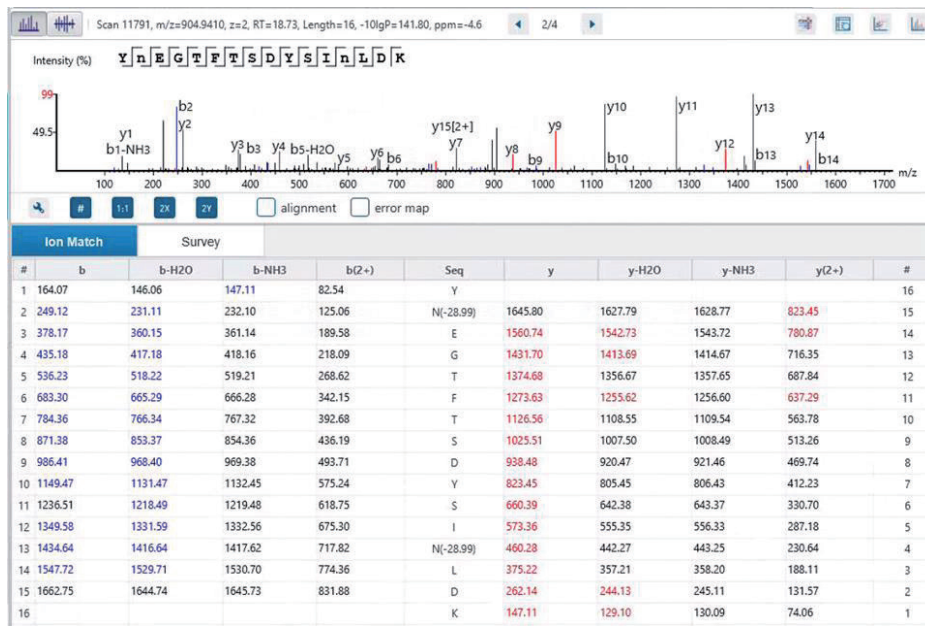


图 5 肽段 1 二级质谱图及氨基酸碎片归属

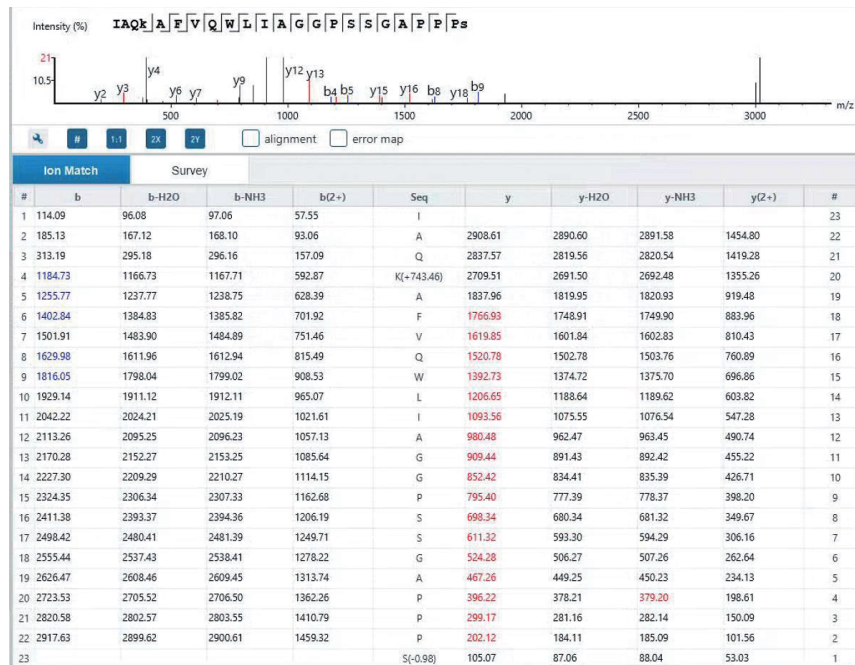


图 6 肽段 2 二级质谱图及氨基酸碎片归属

■ 结论

本文基于岛津 Q-TOF 高分辨液质联用仪 LCMS-9050 和 PEAKS Studio 数据分析软件，成功确证多肽类药物替尔泊肽的氨基酸序列。LCMS-9050 具有分辨率高、质量数准确度的特点，结合 PEAKS Studio 软件快速、自动的工作流程，助力多肽药物结构准确表征，为生物药研发和产品质量保驾护航。

岛津应用云

