

Application News

No. B78

MALDI-TOF 质量分析法

使用台式 MALDI-TOF 质谱 MALDI-8020 的源内裂解 (ISD) 检测甲硫氨酸氧化修饰

MALDI-TOF MS 是获得肽或蛋白质分子量及一级结构相关信息的一种迅速而又简便的方法。在各种裂解方法中,源内裂解 (ISD) 可以用于“自上而下”蛋白质组学,得到蛋白质序列。它可利用氢自由基迁移生成 c- 及 z- 碎片离子系列。与源后裂解 (PSD) 相比,ISD 的一大优势在于理论上不受样品质量的限制,无需进行酶消化,可以直接对较大的蛋白质进行测序。MALDI-ISD 工作流程的概要如图 1 所示。

在制药行业的药品开发过程中,为了对失活、毒性等对治疗带来影响的可能性进行监控,作为质量管理 (QC) 过程的一个组成部分,对制剂配方或降解等导致的变化进行跟踪是非常重要的。其中,肽或蛋白质的甲硫氨酸残基氧化就是一个伴随降解出现修饰的例子。甲硫氨酸同其他氨基酸相比,非常容易氧化。

在这里我们为您介绍通过使用台式 MALDI-TOF 质谱 MALDI-8020 进行精确的完整分子量分析和自上而下的序列解析,确定 Exendin-4 肽的甲硫氨酸氧化 (Met-O) 修饰的实例。可以说,在生物药品的 QC 中,这种方法对确定不希望生产工艺中出现的变化来说是一种有效的方法。

S. Salivo, (Y. Yamazaki)

■ 样品和方法

Exendin-4 肽购自 Sigma-Aldrich。甲硫氨酸的氧化按照以下方法进行: Exendin-4 与 1% 过氧化氢 (H₂O₂, pH 中性) 在 37°C 条件下孵育 15 分钟。对样品溶液进行酸化处理,使用 ZipTip® C18 (Millipore 公司生产) 对肽进行纯化。

将天然肽及 Met-O 肽与 α- 氰基 -4- 羟基肉桂酸 (CHCA, 5 mg/mL, 50% 乙腈 / 0.1% 三氟乙酸) 混合,取 1 μL 滴在靶板上并干燥。为了进行 ISD 分析,将天然肽及氧化型肽与 1,5-二氨基萘 (1,5-DAN, 溶解于 50% 乙腈 / 0.1% 三氟乙酸中的饱和溶液) 混合,取 1 μL 滴在靶板上并干燥。

使用台式 MALDI-TOFMS 中的 MALDI-8020, 按照图 1 中所述的测定条件进行分析。

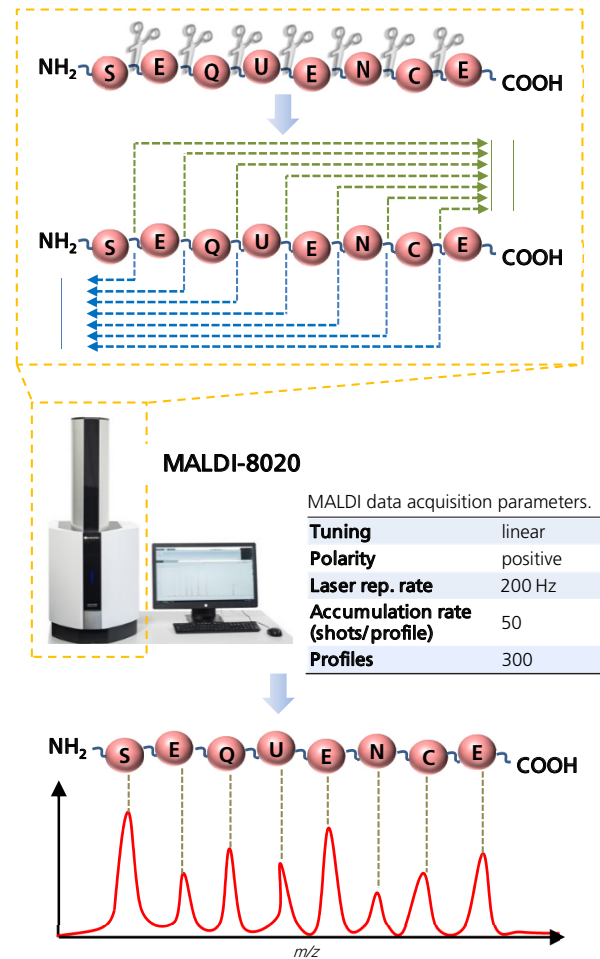


图 1 MALDI-ISD 的工作流程及质谱采集参数

结果

Exendin-4 是存在于吉拉毒蜥 (*Heloderma suspectum*) 唾液中的天然肽。它的合成形式 -Exenatide, 用于治疗 2 型糖尿病。

天然 Exendin-4 的 MALDI-MSD 谱图如图 2 a) 所示。图中质量标签与检测到的单同位素峰相对应。

从图 2 b) 的摄像机图像中可以看出, 通过优化的样品制备方法而得到的样品具有非常好的均一性。在质谱的放大区域 (图 2 c) 及 d) 中, 显示出碎片离子 (m/z 1200-2800 范围) 单同位素峰的良好分辨率。

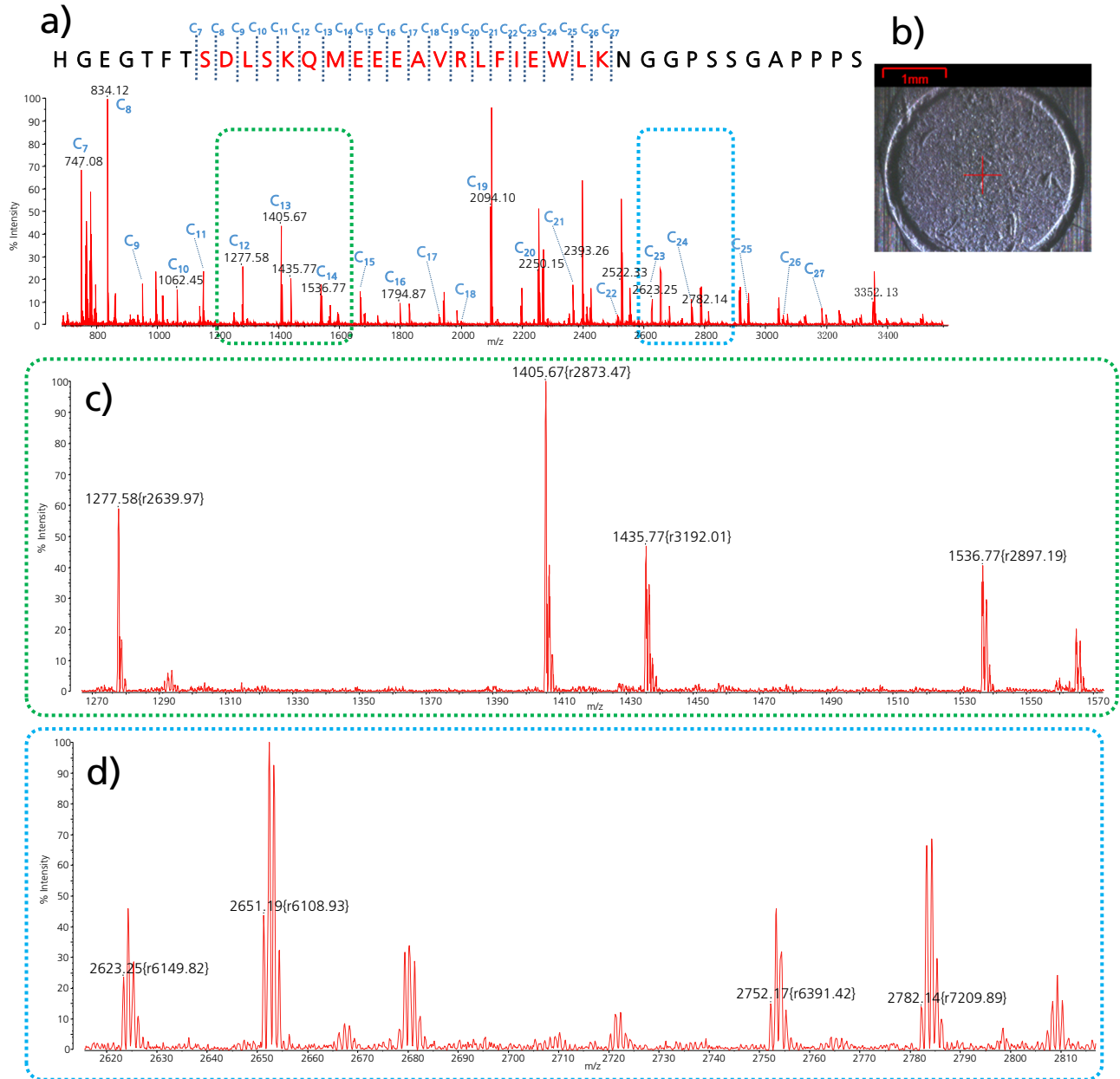


图 2 a) 天然 Exendin-4 的 MALDI-MSD 谱图; b) 使用 1,5-DAN 作为基质的良好的摄像机图像; c) & d) ISD 谱图的放大图

为了进行 Mascot-ISC 数据库检索，创建了添加 Exendin-4 序列的定制版 Swiss-Prot 数据库，然后，使用 MALDI Solutions 软件的检索工具进行了 Mascot-ISC 检索。结果如图 3 所示，得到了有效的得分（图 3 a）和序列覆盖率（72%；图 3 b）。

完成氧化反应后，对样品进行了肽分子量的测定，确认成功发生了氧化反应。在使用 CHCA 基质得到的图 4 的谱图中，天然型（红线）及氧化型（蓝线）Exendin-4 的质谱表现出非常好的质谱精度和分辨率。正如预测所示，在 Exendin-4 中有一处甲硫氨酸支链被氧化，检测到了与生成的亚砷形式相对应的 +16Da 的质量迁移。

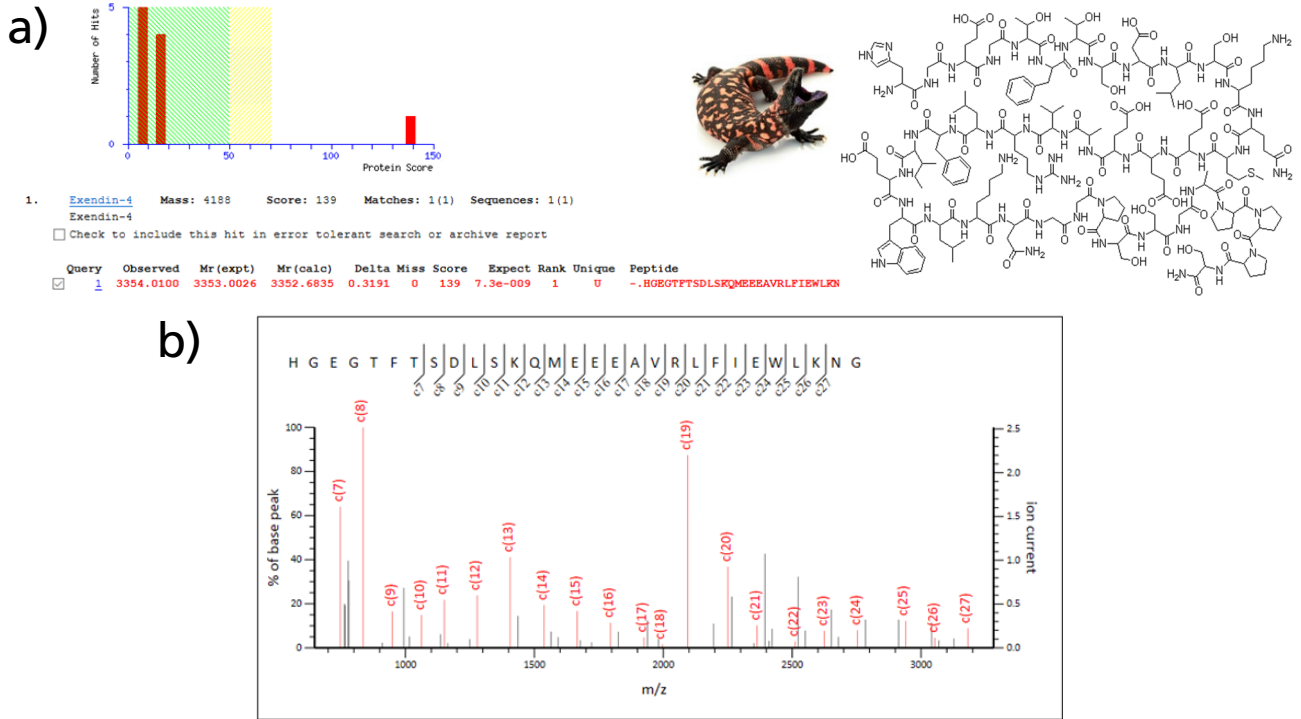


图 3 a) MALDI-ISC 的 Mascot 检索结果；b) Mascot 碎片离子匹配图

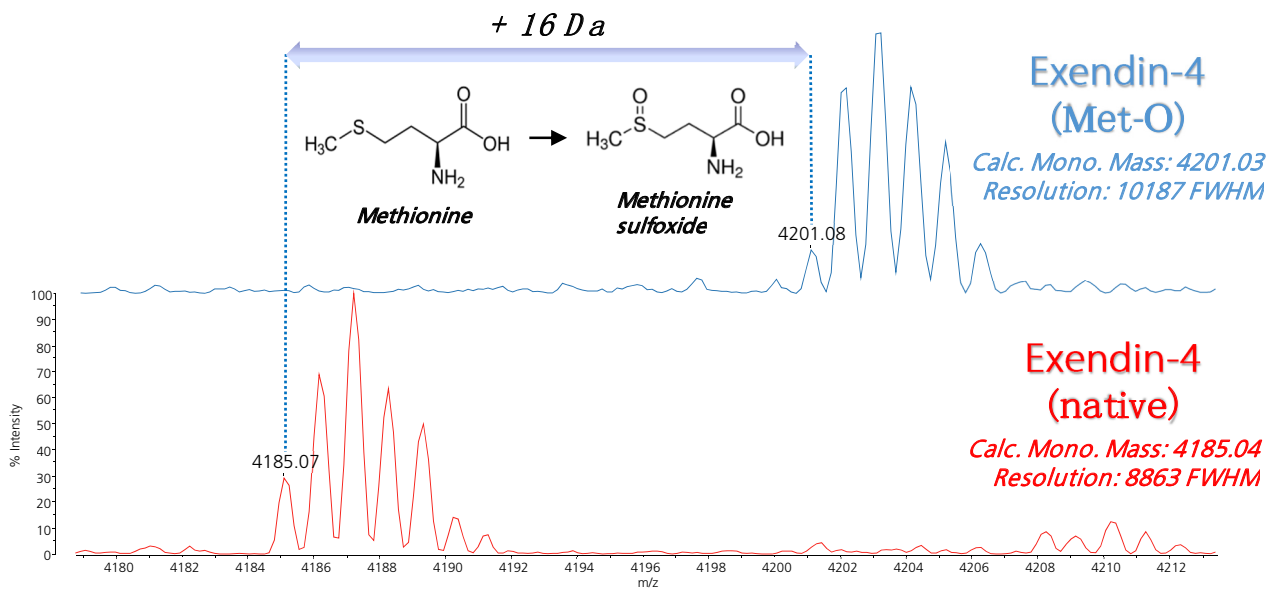


图 4 天然型 Exendin-4 (红线) 及 Met-O (蓝线) Exendin-4 的一级质谱图 (基质: CHCA)

氧化型 Exendin-4 的 MALDI-MSD 谱图如图 5 a) 所示。通过 ISD 检测到了在 N 末端生成的 c- 离子系列 (c9-c13) 及 16Da 迁移的 c- 离子 (c14-c29)。c14 离子 (用绿色显示) 是与含甲硫氨酸残基的氧化部位相对应的碎片离子。

在图 5 b) 中对天然 (红线) 和氧化型 (蓝线) Exendin-4 的碎片离子 (m/z 1400-1650) 进行了比较。这里显示的碎片离子信号也表现出良好的同位素分离。

正如所期待的那样, c14 离子 (HGEGFTSDLSKQM) 显示了与甲硫氨酸的氧化相对应的 16 Da 的质量迁移。Exendin-4 (Met-O) ISD 图谱的 Mascot 检索采用了先前创建的定制数据库, 并指定甲硫氨酸氧化为固定修饰, 其结果如图 5 c) 所示, 获得了有效的 Mascot 得分。

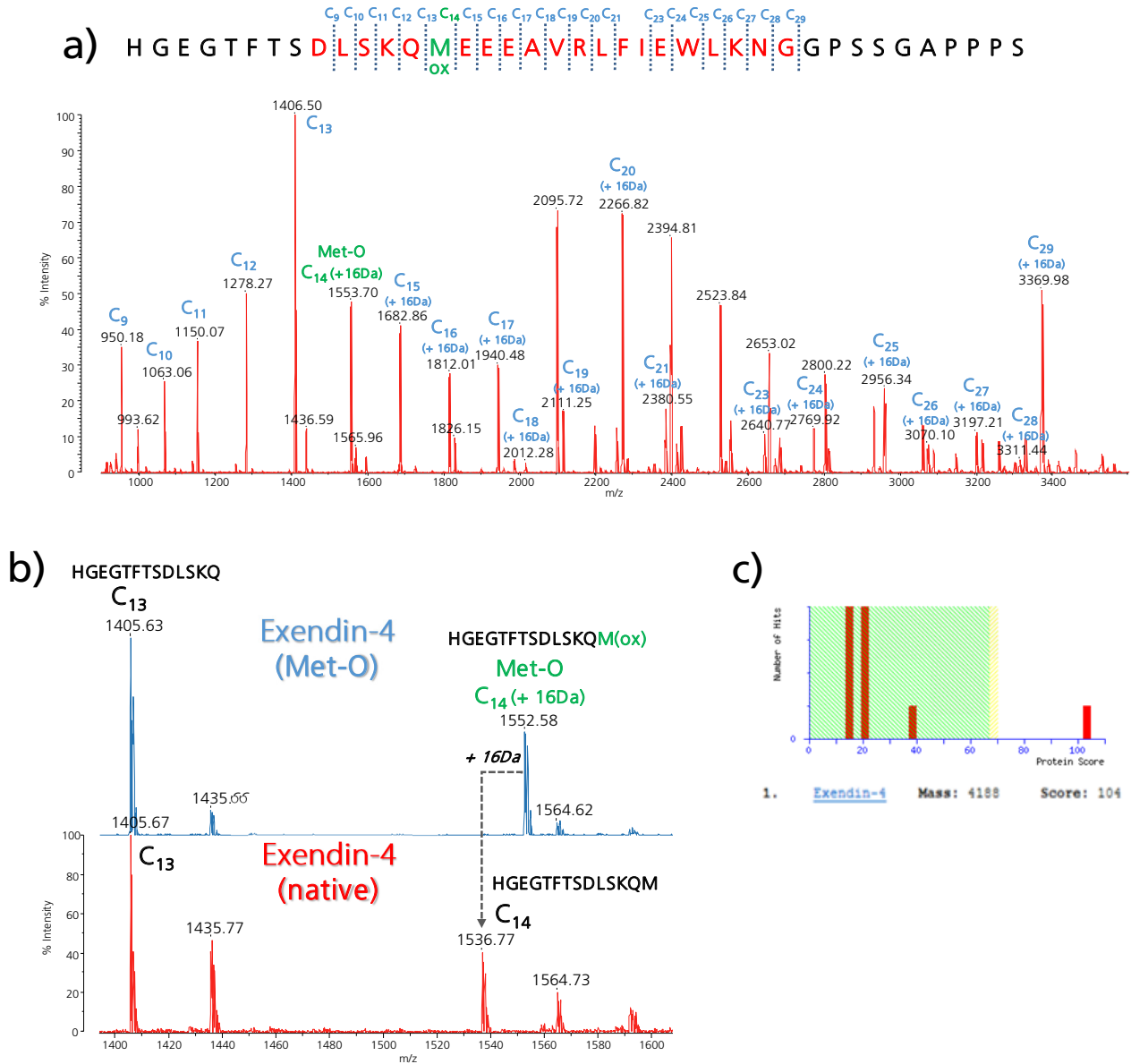


图 5 a) Exendin-4 (Met-O) 的 MALDI-MSD 谱图; b) 因甲硫氨酸氧化显示出质量迁移的碎片离子 (c14) 的局部放大图; c) Exendin-4 (Met-O) 的 Mascot-MSD 得分

ZipTip 是 Merck KgaA 的注册商标。



岛津企业管理 (中国) 有限公司
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2018 年 3 月