

利用 Q-TOF 结合 PEAKS 软件对多肽药物进行氨基酸序列确证

LCMS-QTOF-096

摘要： 本文采用岛津 LCMS-Q-TOF 液质联用系统，对多肽类药物生长抑素进行了分析，获得其二级质谱图，并结合 PEAKS 软件 DB search 功能进行数据分析，对生长抑素的氨基酸序列进行了确证。实验结果显示，该方法可以确证多肽类药物生长抑素的氨基酸序列，并且可以推测出序列中氨基酸的修饰位点。

关键词： 多肽药物 氨基酸序列 Q-TOF PEAKS 软件

技术特点：

- ❖ 采用 PEAKS 数据处理软件快速准确确证多肽药物的氨基酸序列；
- ❖ LCMS-9050 协同稳定的高质量精度和灵敏度，保障序列分析准确度。

多肽药物具有高生物活性、靶向性、选择性以及较低的毒副作用等优势，在疾病治疗方面展现出巨大潜力，其使其成为备受关注的药物分子。氨基酸序列是多肽药物的分子基础，其正确性直接决定了药物的生物活性和功能。在研发和生产过程中，药物的氨基酸序列确证必不可少。质谱法通过将样品离子化并分析其碎片离子，能够提供详细的分子

量信息和结构信息，结合专业的序列确证软件可对多肽分子量进行快速确证。

本文采用岛津 LCMS-Q-TOF 液质联用系统，得到精确的质谱信息，并借助蛋白质组学专业软件 PEAKS 对生长抑素的质谱数据进行分析，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 LCMS-Q-TOF 液质联用系统，配置信息如下：

系统控制器：	CBM-40lite	自动进样器：	SIL-40C XS
脱气机：	DGU-403	柱温箱：	CTO-40S
输液泵：	LC-40D XS×2	检测器：	LCMS-9050
色谱工作站：	Labsolutions Ver. 5.120	数据处理软件：	PEAKS studio Ver.12.0

1.2 分析条件

- 色谱柱：Shim-pack GIST C18 (50 mm×2.1 mm I.D., 2 μm), 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30001-02
- 流动相：A相: 0.1% 甲酸水溶液; B相: 0.1% 甲酸乙腈溶液
- 流速：0.4 mL/min
- 进样体积：3 μL
- 柱温：50°C
- 洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为3%，时间程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间	单元	处理命令	值
5.0	泵	B.conc	40.0
5.1	泵	B.conc	3.0
8.0	控制器	Stop	

质谱条件

离子化模式：	ESI(+)	加热模块温度：	400°C
雾化器流速：	3.0 L/min	干燥气流速：	10.0 L/min
接口温度：	300°C	扫描模式：	MS+DDA
DL 温度：	250°C	接口电压：	4.5 kv
碰撞气：	氦气	事件时间：	0.1 s

1.3 样品前处理

称取生长抑素适量,用 50 mM 碳酸氢铵水溶液溶解至 10 mg/mL,取 2 μ L 加 93.5 μ L 50 mM 碳酸氢铵水溶液,混匀,加 1 μ L 0.5 M 二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT) 溶液,水浴 56°C 反应 20 min,加 2.7 μ L 0.55 M 碘乙酰胺溶液,避光室温反应 15 min, 上机测试。

■ 结果与讨论

2.1 生长抑素图谱解析

此生长抑素由 14 个氨基酸组成,其中第 3 位和第 14 位氨基酸由二硫键链接,其分子量为 1736.7166 Da。样品用 DTT 处理,将对还原剂敏感的二硫键的巯基还原为自由巯基,再利用碘乙酰胺试剂对自由巯基进行封闭保护(图 1)。还原烷基化处理后的生长抑素理论分子量为 1752.7752 Da。

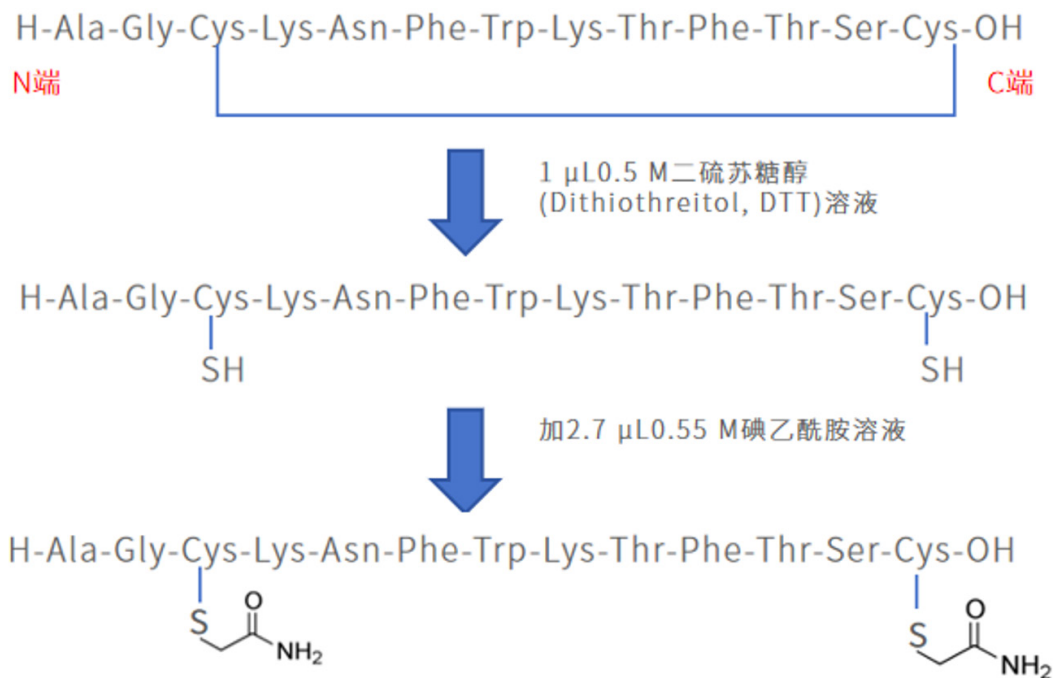


图 1 生长抑素前处理反应过程

按照 1.2 分析条件,对处理后样品溶液上机分析,得到色谱图(图 2),生长抑素的保留时间为 4.010 min。查看其一级质谱图, m/z 为 585.2620, 877.3906, 其中 m/z 585.2620 为 $[M+3H]^{3+}$, m/z 877.3906 为 $[M+2H]^{2+}$ 。

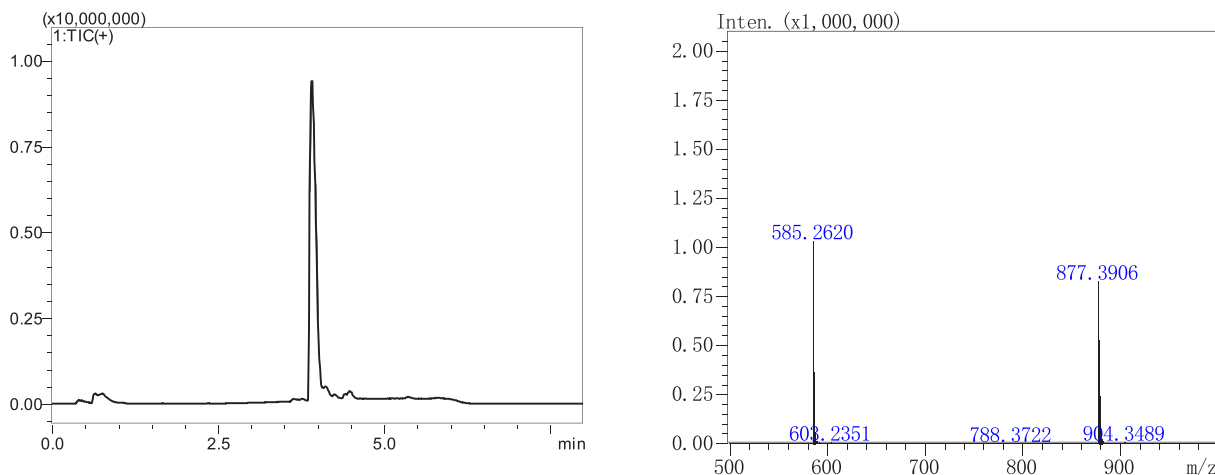


图 2 生长抑素还原 - 烷基化后的色谱图与一级质谱图

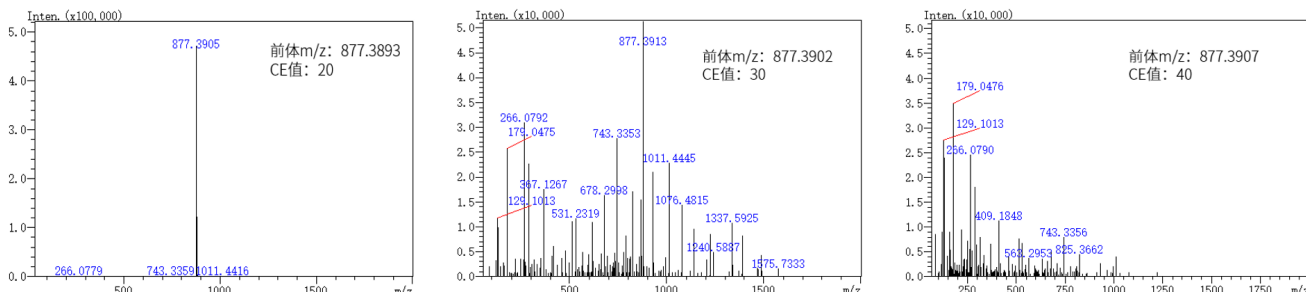


图 3 生长抑素不同 CE 值的二级质谱图

图 3 展示了使用不同 CE 值 (20 V, 30 V, 40 V) 情况下以 m/z 877.3906 作为前提离子用 DDA 模式采集的二级质谱图。从图可以看出, CE 值为 20 V 时, 二级碎片较少, 且强度小, CE 值提高至 30 V 和 40 V 时, 二级碎片较多, 且强度较高。将上述数据分别用 PEAKS 软件解析后, 发现 CE 值选择为 30 V 时, 生长抑素的氨基酸序列匹配度最好, 可见数据的碎片质量及灵敏度对解析多肽或蛋白质的氨基酸序列至关重要。

2.2 PEAKS 结果解析

将 LabSolutions 采集好的数据直接导入 PEAKS 软件中, 选择 DB Search 工作流程, 并导入生长抑素的理论氨基酸序列, 可自动进行氨基酸序列确证。

生长抑素氨基酸序列覆盖结果如图 4 所示, 可以看到氨基酸序列覆盖率为 100%, 并给出了序列中存在的修饰类型 (烷基化, 简称 C)。从肽段覆盖视图中可以看出, 还原烷基化修饰位点为在第 3 和第 14 位氨基酸处, 和实际结构相符。图 5 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 -3.3 ppm, 表明质谱质量轴稳定, 质谱精度较高。

Protein View Filter		1 protein groups, total 3 proteins		覆盖率	蛋白修饰类型					
Accession	Gene	Cluster	Top	-10lgP	Coverage(%)	#Peptides	#Unique	PTM	Avg. Mass	Description
UniRef90_P61298		1	true	74.51	100.00%	1	1	C	1640	Somatostatin-14 n=207 Tax=Euteleostomi TaxID=...

Coverage	Peptides	Denovo Only Tags
>UniRef90_P61298 Somatostatin-14 n=207 Tax=Euteleostomi TaxID=117571 RepID=SMS_ALLMI		
1	AGCKNFFWKT FTSC	肽段覆盖视图

图 4 肽段覆盖率表

Coverage	Peptides	Denovo Only Tags															
	Peptide	Unique	-10lgP [▼]	Mass	Length	ppm	m/z	RT	Area	Sample 1	Scan	#Feature	Start	End	PTM	AScore	Found By
1	AGC(+57.02)KNFFWKFTSC(+57.02)	true	74.51	1752.7752	14	-3.3	877.3920	4.14	6.22E5		2456	2	1	14	C C		DB Search

图 5 多肽详细信息

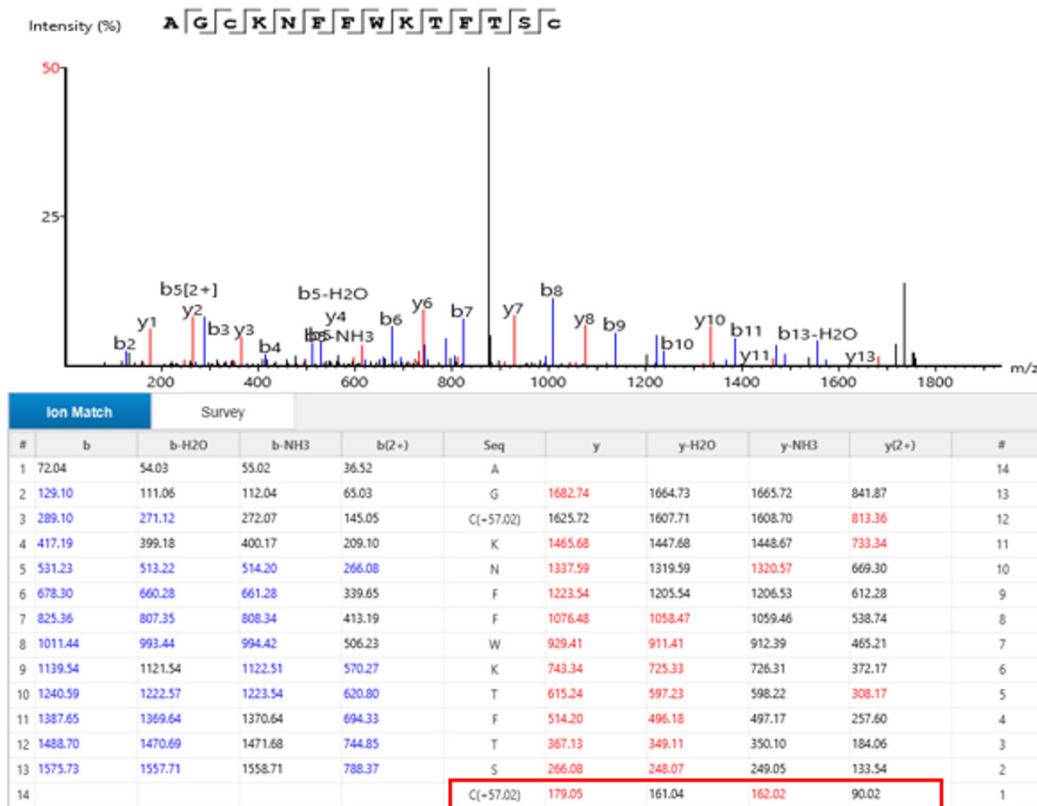


图 6 二级质谱图及氨基酸碎片归属

图 6 为生长抑素的二级质谱图及氨基酸碎片归属，其中，y1 表示 C 端的第一个氨基酸碎裂产生的碎片离子，b1 是 N 端的第一个氨基酸碎裂产生的碎片离子。以此类推，y2~y13 对应 C 端第 2~13 个氨基酸处肽键断裂产生的碎片离子，b2~b13 对应 N 端第 2~13 个氨基酸处肽键断裂产生的碎片离子。从图中可以看出，y1-y13，b2-b13 的离子碎片全都检测到，并列出了具体的 b 离子和 y 离子。例如，C 端的第一个氨基酸是半胱氨酸（缩写 C），分子量为 121.0197 Da，还原烷基化反应后加上了乙酰氨基（分子量为 57.02 Da），所以产生的碎片离子理论 m/z 为 179.0490，实际检测到 y1 离子为 179.02，与理论吻合。

■ 结论

本文基于岛津 Q-TOF 高分辨液质联用仪 LCMS-9050 和 PEAKS 数据分析软件，成功确证多肽类药物生长抑素中氨基酸序列。LCMS-9050 具有分辨高、质量数准确度的特点，结合 PEAKS 软件快速、自动的工作流程，助力多肽药物氨基酸序列确证，为生物药研发和产品质量保驾护航。

岛津应用云

