

利用 MassWorks 谱图准确度准确定量脱酰胺基肽的含量

Ming Gu (Cerno Bioscience)

概述

- 用 LC/MS 分析了单克隆抗体的消化产物，以脱酰胺基肽为例评估了谱图准确度定量分析多肽的可能性。
- 对 8 对原生肽及其脱酰氨基肽的质谱峰形进行校正，并计算了原生肽及两种混合肽的谱图准确度。
- 对脱酰氨基肽的相对含量进行了测定。

引言

天门冬氨酸在脱酰胺反应后转化成天冬氨酸或异天冬氨酸。这种重组蛋白产生的副产物可能危及生物制剂的疗效，为患者带来安全风险。监管机构要求必须对这些脱酰胺基蛋白质的含量进行测定。由于脱酰胺基肽和未修饰的原生肽具有相似的疏水性，且 m/z 差值接近 1amu，因此它们很难被 HPLC 或 MS 分离。在 HPLC/MS 分析中，它们几乎总是以混合物的形式出现，这就给定量分析带来了挑战。尽管传统的离子色谱法或由 HPLC 与 ERLIC（静电斥力-亲水作用色谱）组成的 2D 分离方法^[1]能提供准确的脱酰胺基肽或蛋白质的定量结果，但这些方法都是非常耗时耗力的工作。最近出现了一种利用原生肽和脱酰胺基肽的重叠质谱谱图的去卷积运算来定量 γ S-crystallin 脱酰胺基肽的方法^[2]，在复杂混合体系的定量分析中，这种方法能替代传统的定量方法。我们提出了一种新的数学方法来分离混合物，即利用谱图准确度来实现脱酰胺基肽的准确定量。

方法

- 样品：完整的单克隆抗体（购自 Waters 公司）；抗体还原和烷基化试剂（7mM DTT 和 14mM Iodoacetamide，购自 Sigma 公司）。LYS-C（WAKO）以 1:20 的比例添加至单抗样品中。
- HPLC：安捷伦 1100 二元泵，Vydac 柱（218TP52）。流动相：A（水 0.1%TFA）和 B（ACN 0.1%TFA）。梯度：170min 内将 B 的比例从 0%升至 100%。
- 数据采集：所有的 LC / MS 和 LC / MS / MS 数据以 Profile 模式采集，质量范围 400~2070；Thermo Orbitrap MS 的质谱分辨率设定在 30K。

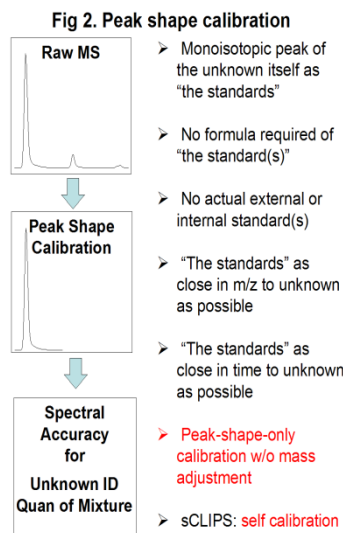
- **MassWorks 数据处理：**将所有的 MS 数据从 Xcalibur 导出后，直接导入到 MassWorks 软件中，根据目标离子的单同位素峰的峰形，利用 sCLIPS（自校正线形同位素轮廓检索）功能对峰形进行校正。峰形校正后，计算得到的谱图准确度将被用于理论峰形和校正峰形的同位素分布模式的匹配，以实现脱酰胺基肽的定量。

结果与讨论

最近在 *Analytical Chemistry* 发表的封面文章^[3]介绍了质谱数据的谱图准确度的概念，这是一种独特的质谱数据校正方法，它能极大地改善并提高高分辨质谱数据的峰形。峰形的谱图准确度是通过数学拟合的方式将观察到的质谱信号转换成理论计算的峰形来实现的，而且这两种峰形能完美的重合。在本研究中，我们将介绍一种新的方法，即将实测谱图中完全重合的同位素分布谱图计算为理论的同位素分布谱图来直接测定脱酰胺基肽的含量。

图 1 中的 8 对原生肽和脱酰胺基肽用 MassWorks 的 sCLIPS(见图 2)进行了定量分析。对于每一对肽，不仅计算了原生肽的谱图准确度，还计算了原生肽和脱酰胺基肽重叠谱图的谱图准确度。总体来说，相比于仅用原生肽计算谱图准确度，将原生肽和脱酰胺基肽的混合谱图同时用于谱图准确度计算时，得到的谱图准确度结果要明显高得多。这些谱图准确度结果不仅能证明脱酰胺基肽与原生肽在谱图上的发生了重叠，

而且还能直接计算出它们的相对含量，表 1 的结果表明，8 种脱酰胺基肽的相对浓度在 4.6% 至 53.6% 之间。接下来的一个例子将阐述如何利用谱图准确度从重叠谱图中计算脱酰氨基酸的含量。为了计算原生肽及其相应的脱酰胺基产物，需要对肽的各组成元素的数量上限和下限进行限定，见图 3。需要重点说明的是 MassWorks 能提供一项独特的功能，即在计算重叠谱图时允许输入可能的肽修饰规则，例如在此例中用“+ O /-NH”来表示脱酰氨基酸。将肽修饰规则用于谱图准确度的计算，校正谱图（实测峰峰形校正后的谱图）与混合谱图就能通过最小二乘法的拟合实现两者峰形之间完美匹配。



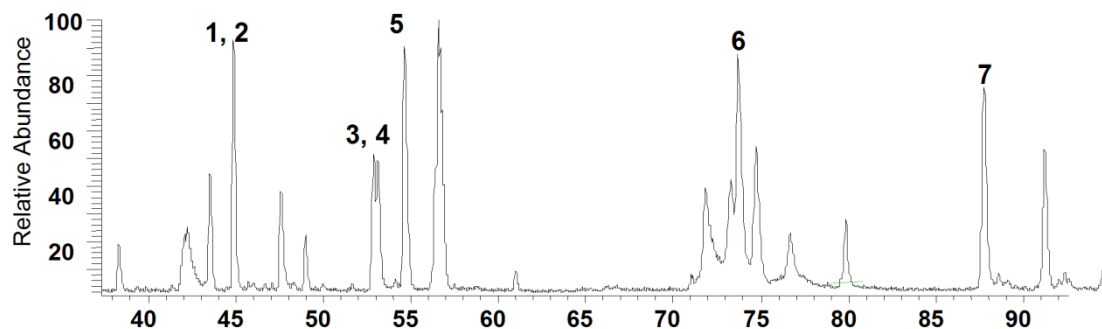


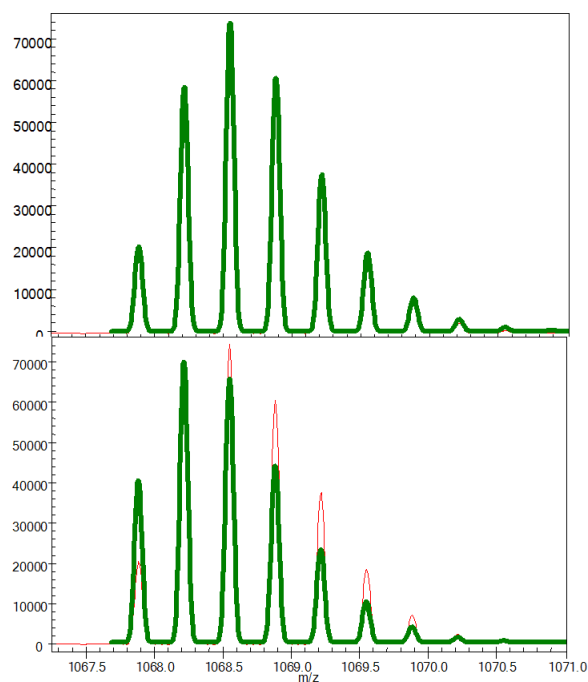
Fig 1. TIC of mAb Digests with Deamidated Peptides labeled

Table 1. Quantitative Analysis of Deamidated Peptides by Spectral Accuracy

Peak	Elemental Composition	Charge	Rt (min)	m/z [Da] Measured	Spectral Accuracy for Native Peptide	Spectral Accuracy for mixture	Quan of Deamidated (%)
1	C68H112N20O20S1	2	44.4	780.4213	96.59	99.35	0.046
	C68H111N19O21S1	2	45.5	780.9136			
2	C92H147N29O37	2	44.5	1125.0514	87.29	98.77	0.17
	C92H146N28O38	2	45.3	1125.5443			
3	C87H130N20O30S1	2	52	983.4711	97.36	97.70	0.02
	C87H129N19O31S1	2	53.7	983.9638			
4	C109H170N33O39	3	52.3	855.0974	86.58	97.42	0.217
	C109H169N32O40	3	53.2	855.4270			
5	C124H184N39O41S1	3	55.7	969.1303	97.09	97.54	0.03
	C124H183N38O42S1	3	56.8	969.4593			
6	C144H220N37O44S1	3	72	1067.8852	72.05	98.82	0.536
	C144H219N36O45S1	3	74.1	1068.2148			
7	C246H390N66O79S2	4	88.8	1399.2306	96.01	98.37	0.099
	C246H389N65O80S2	4	85.5	1399.4776			

Fig 3. Spectral Accuracy Calculation Parameters

Fig 4. Overlays of Calibrated and Calculated Spectra



在本例中，混合谱图的谱图准确度高达 98.8%。这样的结果对准确地计算脱酰胺基肽的含量非常有利，分析结果表明该混合肽中原生肽和脱酰氨基肽的相对含量分别为 46.4% 和 53.6%。相反，如果不输入“+ O /- NH”的肽修饰规则，则谱图准确度仅能达到 72.1%。图 4 上图（红=校准；绿色=理论）显示了输入“+ O /- NH”后的校正谱图和理论谱图的匹配情况，二者能近乎完美的重叠。图 4 下图表明，如果不考虑脱酰胺基肽，则校正谱图和理论谱图存在明显的不匹配。

结论

- 谱图准确度是一个强大的工具，在峰形校正技术的基础上，可从重叠的质谱图中计算出脱酰胺基肽的相对含量。
- 根据我们目前的研究结果，即使脱酰胺基肽的相对含量低至 3%，利用谱图准确度也能从原生肽和脱酰胺基肽的混合物中得到脱酰胺基肽的相对定量结果。
- 谱图准确度定量重叠信号的方法亦可适用于 O^{18} 标记的肽和 C^{14} 标记的药物代谢物的定量分析。
- 今后的研究工作将利用离子交换色谱等方法来确证谱图准确度的准确定量结果。

参考文献

(1) Piliang Hao , Jingru Qian , Bamaprasad Dutta , Esther Sok Hwee Cheow , Kae Hwan Sim , Wei Meng , Sunil S. Adav , Andrew Alpert , and Siu Kwan Sze ; Enhanced Separation and Characterization of Deamidated Peptides with RP-ERLIC-Based Multidimensional Chromatography Coupled with Tandem Mass ; J. Proteome Res., 2012, 11 (3), pp 1804 – 1811.

(2) Surendra Dasari¹, Phillip A. Wilmarth², Ashok P. Reddy³, Lucinda J. G. Robertson², Srinivasa R. Nagalla^{1,3}, and Larry L. David^{2,*} Quantification of Isotopically Overlapping Deamidated and ^{18}O Labeled Peptides Using Isotopic Envelope Mixture Modeling. J Proteome Res. 2009 March 6; 8(3): 1263 – 1270.

(3) Yongdong Wang and Ming Gu The Concept of Spectral Accuracy for MS. Anal. Chem. 2010, 82, 7055 – 7062