

利用高分辨质谱技术综合解析胰岛素类制品复杂二硫键结构

胡馨月[#], 丁晓丽[#], 孙悦, 张慧, 李晶^{*}, 梁成罡^{*}

(中国食品药品检定研究院激素室, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629)

摘要: 二硫键的正确配对维持了多肽和蛋白类药物的正确折叠方式和高级结构的形成, 对产品的质量控制在至关重要。为了确保二硫键正确配对, 二硫键分析是多肽和蛋白质药物表征中必不可少的重要部分。质谱分析技术可用于二硫键分析, 然而, 胰岛素及其类似物中存在两对没有酶切位点的二硫键, 常规的碰撞诱导解离 (CID) 和高能诱导裂解 (HCD) 无法实现该复杂二硫键的准确定位。本研究通过 3 种方法综合定位该复杂二硫键, 包括酶切加关键肽段源内碎裂 (ISD) 法、酶切加部分还原烷基化法、完整蛋白源内碎裂和电子转移解离 (ETD) 裂解法, 并且考察了门冬胰岛素、赖脯胰岛素和甘精胰岛素的适用性, 为胰岛素及其类似物二硫键连接方式的质量控制提供了新途径, 也为含该类复杂二硫键多肽或蛋白类生物制品的二硫键定位提供借鉴。

关键词: 胰岛素及其类似物; 二硫键定位; 部分还原烷基化; 源内碎裂; 电子转移裂解

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)01-0188-10

Comprehensive analysis of insulin products complex disulfide bonds structure by high resolution mass spectrum

HU Xin-yue[#], DING Xiao-li[#], SUN Yue, ZHANG Hui, LI Jing^{*}, LINAG Cheng-gang^{*}

(Division of Hormone, National Institutes for Food and Drug Control, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, Beijing 102629, China)

Abstract: The correct pairing of disulfide bonds maintains the correct folding mode and high-level structure formation of peptides and protein drugs, which is crucial for the quality control of products. In order to ensure that the disulfide bonds are correctly paired, disulfide bond analysis is an essential part of peptides and protein drug characterization. Mass spectrometry can be used to analyze disulfide bonds. However, insulin and its analogues have two pairs of disulfide bonds without restriction enzyme cutting site. Conventional collision-induced dissociation (CID) and high-energy induced cleavage (HCD) cannot accurately locate the complex disulfide bond. In our study, three methods were used to localize the complex disulfide, including enzyme digestion combined with key peptide fragment in source decay (ISD) fragmentation method, enzyme digestion combined with partial reduction alkylation method, intact protein source ISD and electron transfer dissociation (ETD) cleavage method. The applicability of insulin aspart, insulin lispro and insulin glargine were also investigated. This study provides a new way for the quality control of disulfide bonding mode of insulin and its analogues, and also provides a reference for the disulfide bond localization of peptides or proteins containing this complex disulfide bond.

收稿日期: 2023-03-09; 修回日期: 2023-07-31.

基金项目: 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金课题 (2022A3); 国家重点研发计划课题 (2021YFF0600804).

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者 Tel: 86-10-53851638, E-mail: liangchenggang@nifdc.org.cn;

Tel: 86-10-53851465, E-mail: li_jing@nifdc.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0284

Key words: insulin; disulfide bond localization; partial reduction alkylation; in source decay; electron transfer dissociation

多肽和蛋白质中的二硫键对其热力学、力学和化学稳定性至关重要,同时也参与对蛋白酶的抗性和活性的调节^[1]。胰岛素及其类似物共含有三条二硫键,A链中存在一个链内二硫键,位于A链6位和11位的半胱氨酸之间;A和B链则通过另外两对二硫键连接,第一条在A链7位和B链7位半胱氨酸之间,第二条在A链20位和B链19位半胱氨酸之间^[2],三对二硫键的正确配对维持了胰岛素及其类似物的正确折叠方式和高级结构的形成,对产品质量也有至关重要的影响。

早期二硫键的定位方法主要包括X射线衍射晶体法^[3]、多维核磁共振波谱法^[4]、Edman降解法等。X射线衍射晶体法需要培养高度有序的蛋白结晶,且X射线衍射晶体法和多维核磁共振波谱2种方法对样品需求量很大,对样品纯度要求也较高。Edman降解法无法直接对含有链内二硫键和N端被封闭的多肽和蛋白质进行测序。近年来,随着生物质谱的发展,质谱技术逐渐应用到二硫键的定位研究中,完整的蛋白质或多肽酶解成含有不同定位信息的肽段(自下而上法,即“Bottom-up”法)^[5],通过软件分析实现对二硫键配对方式的表征,但当多对二硫键同时存在时,酶切片段中可能同时存在多对二硫键,质谱对这种复杂二硫键的分析有一定的挑战性。胰岛素及其类似物的A: C6-A: C11和A: C7-B: C7这2个二硫键之间没有酶切位点,A6和A7又是相邻的半胱氨酸,使这2对二硫键所连接的肽段成为一个闭环的结构,因为常规的碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)和高能诱导裂解(higher energy collision induced dissociation, HCD)产生的碰撞能量相对较低,仅能够裂解多肽骨架,几乎不能断裂二硫键^[6],采用CID或HCD裂解方式对带有该复杂二硫键的肽段序列进行分析,则不能将肽段-C⁶C⁷TSIC¹¹-进行碎片化裂解,所以无法判定上述2对复杂二硫键正确连接方式。虽然人们已对胰岛素的结构和功能进行了深入研究^[7],但是对胰岛素二硫键定位的方法的报道仍然较少。黄亚娟等^[8]报道了酶切质谱法联合氰基化裂解法对新型重组人门冬胰岛素的二硫键进行定位,成功解析了门冬胰岛素两对复杂的二硫键,但是氰基化裂解法也存在着操作较为繁琐,多步前处理过程,大量数据的处理和分析等问题。因此,探索高效、快速、准确的方法来定位胰岛素及其类似物复杂二硫键,具有一定挑战和意义。

随着质谱技术的发展,质谱解离技术也渐渐丰富

起来,如CID、HCD、源内碎裂(in source decay, ISD)技术、电子转移解离(electron transfer dissociation, ETD)等。CID和HCD使酰胺键发生断裂主要生成b/y类型的碎片离子,HCD理论上可产生比CID更丰富的离子;ETD主要使N-C α 键断裂生成c/z类型的碎片离子;ISD技术是在ESI离子源产生离子,允许所有价态的离子发生断裂,主要也是生成b/y类型的碎片离子。以上多种质谱解离技术常用做蛋白或者多肽的质谱鉴定分析^[9]。胰岛素及其类似物的品种很多,但其二硫键位置一致,以人胰岛素的二硫键定位为例,本研究工作尝试并且探讨了以下3种二硫键定位的方法,包括酶切加关键肽段ISD法、酶切加部分还原烷基化法、完整蛋白ISD和ETD裂解法。以上3种方法综合定位胰岛素的两对复杂二硫键,并且考察了门冬胰岛素、赖脯胰岛素和甘精胰岛素的适用性,为胰岛素及其类似物二硫键连接方式的质量控制提供了新途径,也为含该复杂二硫键多肽或蛋白类生物制品的二硫键定位提供借鉴。

材料与方法

材料与试剂 人胰岛素、门冬胰岛素、赖脯胰岛素、甘精胰岛素(中国食品药品检定研究院激素室留样,批号:GHIA19003,023C220210603,GLPA20009,GCB2021002);乙腈(批号:164788)、甲酸(批号:195715)、马来酰亚胺-PEG2-生物素(M-biotin,批号:A39261),赛默飞世尔科技(中国)有限公司;三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP·HCl,批号:LSBZ2552)、二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT,批号:SLBV6582)、碘乙酰胺(Iodoacetamide, IAM,批号:SLCC6164)、糜蛋白酶(批号:11418467001),西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;ETD试剂盒[批号:W28102021,沃特世(美国)公司];GLU-C酶(Worthington公司,美国,批号:57E17522A)。

仪器耗材 Waters UPLC I-Class/SYNAPT Q-TOF和Waters-UNIFI数据处理软件[沃特世(美国)公司];Orbitrap Exploris 480和Biopharma Finder数据处理软件[赛默飞世尔科技(美国)公司];电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)

酶切法的样品前处理 取10 mg胰岛素溶于10 mL TE溶液(tris-EDTA, pH 7.5),取上述溶液100 μ L,加入10 μ L的Glu-C酶(1 mg溶于1 mL的水中,10 μ g),37 $^{\circ}$ C

孵育 4 h, TE 稀释至 1 mL 停止反应, 进行液质分析。

酶切+部分还原烷基化法的样品前处理 取 10 mg 胰岛素溶于 10 mL TE 溶液 (tris-EDTA, pH 6.5), 取上述溶液 100 μL , 加入 5 μL 的糜蛋白酶 (25 μg 溶于 25 μL 水, 加入 5 μg) 或 10 μL Glu-C 酶 (1 mg 溶于 1 mL 水中, 加入 10 μg), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 上述溶液用 TE 稀释至 1 mL, 加入 1 μL 的 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TCEP-HCl 和 1 μL M-biotin (将 2 mg M-biotin 溶于 40 μL 水, 配成浓度约为 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 室温孵育 1 h。向反应体系中加入 1 μL 的 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 加入 2 μL 氨水, 调节反应体系至碱性, 加入 3 μL 的 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IAM, 暗处, 室温孵育 30 min, 直接进行液质分析。

完整蛋白 ISD 和 ETD 裂解法的溶液配制方法 称取样品约 10 mg, 用 0.1% 甲酸/水溶液定容至 5 mL, 配成浓度为 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品溶液; 取上述胰岛素样品溶液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵水溶液定容至刻度, 混匀, 作为供试品溶液。

HCD 裂解 A: C20-B: C19 二硫键鉴别液质方法 液相条件: 色谱柱 ACQUITY UPLC peptide BEH C18 (150 mm \times 2.1 mm, 300 \AA , 1.7 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸/水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸/乙腈溶液, 梯度洗脱: 0~3 min, 3% B; 3~85 min, 3%~32% B; 85~90 min, 32%~90% B; 90~95 min, 90% B; 95.1~100 min, 3% B。流速 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 50 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 3 μL 。质谱条件: 液质联用仪器为 Orbitrap Exploris 480; 离子源: 电喷雾离子源正离子模式; 采集模式: 数据依赖采集模式; 毛细管电压 3.8 kV, 源温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气 35 Arb, 辅助气 10 Arb, 正离子喷雾电压 3 800 V, 一级 m/z 150~2 000, 一级分辨率 60 000@ m/z 200, 二级分辨率 15 000@ m/z 200。

酶切+关键肽段 ISD 法的液质方法 液相条件: 色谱柱 ACQUITY UPLC peptide BEH C18 (150 mm \times 2.1 mm, 300 \AA , 1.7 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸/水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸/乙腈溶液, 梯度洗脱: 0~3 min, 1% B; 3~13 min, 1%~50% B; 13~14.5 min, 50%~90% B; 14.5~15.5 min, 90% B; 15.5~16 min, 90%~1% B; 16~20 min, 1% B。流速 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 50 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 3 μL 。质谱条件: 液质联用仪器为 Waters UPLC I-Class/SYNAPT Q-TOF; 实时校正: 亮氨酸-脑啡肽 (leucine enkephalin, LE, 200 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$); 离子源: 电喷雾离子源正离子模式; 采集模式: MS 模式; 毛细管电压: 2.5 kV, 源温度 120 $^{\circ}\text{C}$, 锥孔电压: 80~90 V; 扫描范围: m/z 50~2 000。

酶切加部分还原烷基化法的液质方法 液相条件: 色谱柱 ACQUITY UPLC peptide BEH C18 (150 mm \times

2.1 mm, 300 \AA , 1.7 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸/水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸/乙腈溶液, 梯度洗脱: 0~3 min, 3%~10% B; 3~16 min, 10%~60% B; 16~21.5 min, 60%~90% B; 21.5~24.5 min, 90% B; 25~30 min, 3% B。流速 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 50 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 3 μL 。质谱条件: 液质联用仪器为 Orbitrap Exploris 480; 离子源: 电喷雾离子源正离子模式; 采集模式: 数据依赖采集模式; 毛细管电压 3.8 kV, 源温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气 35 Arb, 辅助气 10 Arb, 正离子喷雾电压 3 800 V, 一级 m/z 150~2 000, 一级分辨率 60 000@ m/z 200, 二级分辨率 15 000@ m/z 200。

完整蛋白 ISD 的液质方法 同酶切加关键肽段源内碎裂 (ISD) 法的液质方法。

完整蛋白 ETD 裂解法的质谱方法 质谱直接进样法, 质谱方法如下: 液质联用仪器为 Waters UPLC I-Class/SYNAPT Q-TOF; 离子源: 电喷雾离子源正离子模式; 采集模式: 母离子 m/z 969.0, MS/MS 模式; 毛细管电压: 2.5 kV, 源温度 120 $^{\circ}\text{C}$, 锥孔电压: 30 V; 试剂放电电压: 0.9 kV, 试剂光放电电流: 80.0 μA , 样品流速 2.5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, ETD 试剂: 1,3-苯二腈 (m/z 128), Trap 池波高电压: 0.14 V, 扫描范围: m/z 50~2 000。

数据处理 利用 Biopharma Finder 数据处理软件和 Waters-UNIFI 数据处理软件, 输入胰岛素序列, 一级二级质量数偏差设置为 50×10^{-6} 。方法涉及酶解时, 编辑对应的酶, 烷基化修饰设置可变修饰为 M-biotin 和半胱氨酸碘乙酰胺化 (carbamidomethylation)。

结果

1 A: C20-B: C19 位点鉴别结果

人胰岛素主要产生 2 条与二硫键相关的肽段, 其中, NYCN/ALYLVCGE 肽段保留时间为 46.20 min, 单一同位素分子质量为 1 376.572 5 Da, 包含一对二硫键。如图 1A、B 所示, NYCN 和 ALYLVCGE 的碎片离子丰富, 基本覆盖全部氨基酸, 充分证明了 A 和 B 两条链通过 A: C20 和 B: C19 (按照胰岛素整体序列编号, 下同) 的半胱氨酸相连接。QCCTSICSLYQLE/FVNQHLCGSHLVE 肽段保留时间为 58.95 min, 单一同位素分子质量为 2 967.315 7 Da, 该肽段包含 2 条二硫键, A: C6/C7/C11-B: C7, 如图 1C、D 所示, FVNQHLCGSHLVE 片段碎片离子较为丰富, 而 QCCTSICSLYQLE 碎片离子少, 不能将肽段-CCTSIC-之间的离子进行碎片化裂解, 因此无法推断出与 B 链 FVNQHLCGSHLVE 片段的 C7 连接位点。门冬胰岛素、赖脯胰岛素、甘精胰岛素与人胰岛素结果相似, 无法推断 QCCTSICSLYQLE/FVNQHLCGSHLVE 肽段中二硫键的连接方式。

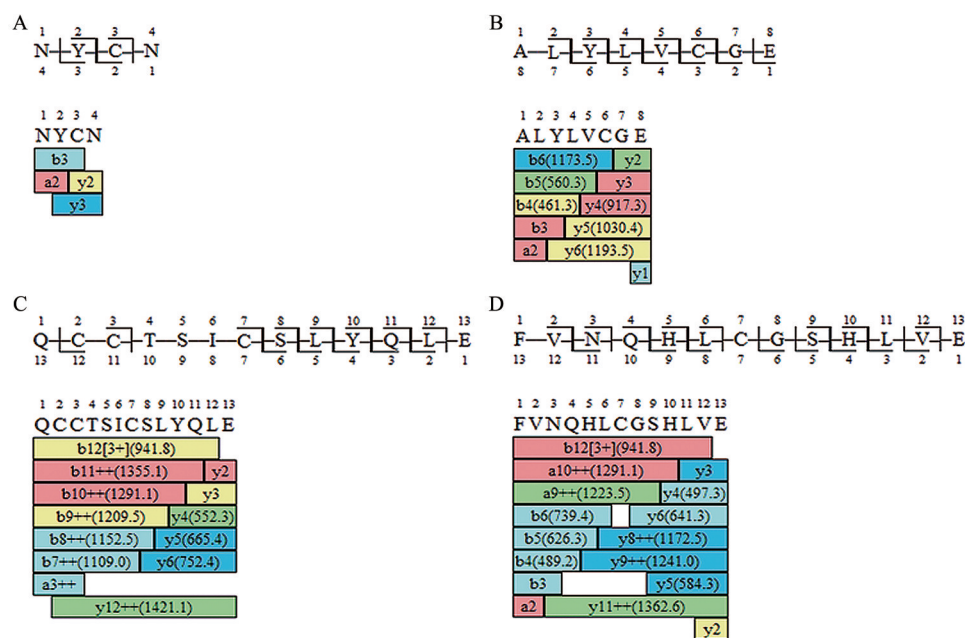


Figure 1 NYCYN/ALYLVCGE and QCCTSICSLYQLE/FVNQHLCGSHLVE peptides secondary coverage. A: NYCYN secondary coverage; B: ALYLVCGE secondary coverage; C: QCCTSICSLYQLE secondary coverage; D: FVNQHLCGSHLVE secondary coverage

2 酶切+关键肽段 ISD 法对 QCCTSICSLYQLE/FVNQHLCGSHLVE 肽段中的复杂二硫键间接定位结果

ISD 裂解能较 CID 和 HCD 能量高, 无需选择前体母离子即可在源内产生碎片离子, 从而引起整个肽段骨架的碎裂, 包括链间和链内二硫键的裂解。通过碎片离子的分析, 结果并未找到能够直接证明 A: C6-A: C11 二硫键连接方式的碎片离子, 如 b2-y7 等。通过进一步分析, 可以找到间接证明 A: C7-B: C7 的碎片, 如图 2A~D 所示的 4 个碎片离子, 可以推断出 A 和 B 链的连接有 2 种方式 A: C7-B: C7 或者 A: C6-B: C7; 如图 2E~H 所示的 4 个碎片离子, A 和 B 链的连接 A: C7-B: C7 或者 A: C11-B: C7。综上, 间接推断出连接 QCCTSICSLYQLE/FVNQHLCGSHLVE 肽段 A 和 B 链的二硫键为 A: C7-B: C7。以上碎片离子也说明 ISD 裂解引起了 A: C6-A: C11 链内二硫键的断裂, 即 A: C6-A: C11 的定位也可推断出。对门冬胰岛素、赖脯胰岛素和甘精胰岛素同法采集和处理, 皆可得到间接证明该复杂二硫键连接方式碎片离子组, 门冬胰岛素碎片离子为 a4-2/b12 (1 740.771 Da, 偏差 -3.45×10^{-6}), b6-2/b8 (1 504.631 Da, 偏差 -12.63×10^{-6}), b6-2/a12 (1 940.871 Da, 偏差 -11.33×10^{-6}), b6-2/yMax (2 115.939 Da, 偏差 -1.28×10^{-6}), y11-2/b10 (2 380.054 Da, 偏差 0.50×10^{-6}), y11-2/b11 (2 493.155 Da, 偏差 7.62×10^{-6}), y11-2/y11 (2 493.155 Da, 偏差 13.72×10^{-6}), y11-2/yMax (2 739.308 Da, 偏差 18.23×10^{-6})。赖脯胰岛素碎片离子为 a3-2/b11 (1 540.691 Da, 偏差 $19.47 \times$

10^{-6}), a5-2/a10 (1 587.673 Da, 偏差 7.24×10^{-6}), b5-2/y8 (1 377.553 Da, 偏差 -5.44×10^{-6}), b5-2/yMax (2 002.853 Da, 偏差 2.10×10^{-6}), y11-2/a12 (2 564.169 Da, 偏差 -15.83×10^{-6}), y11-2/y11 (2 493.084 Da, 偏差 -14.84×10^{-6}), y11-2/y11-NH₃ (2 476.052 Da, 偏差 -17.08×10^{-6}), y11-NH₃-2/y11 (2 476.052 Da, 偏差 -17.08×10^{-6})。甘精胰岛素碎片离子为 b5-2/b9 (1 506.563 Da, 偏差 -19.71×10^{-6}), b5-2/yMax (2 002.891 Da, 偏差 16.73×10^{-6}), b6-2/b11 (1 869.824 Da, 偏差 1.98×10^{-6}), b6-2/yMax (2 115.921 Da, 偏差 9.45×10^{-6}), y11-2/a12 (2 564.208 Da, 偏差 -0.90×10^{-6}), y11-2/y7 (2 000.842 Da, 偏差 -17.59×10^{-6}), y11-2/yMax (2 739.296 Da, 偏差 13.87×10^{-6}), y11-NH₃-2/yMax (2 722.222 Da, 偏差 -3.38×10^{-6}) (注: 如 2/y 或 2/b 表示 B 链的 y 或 b 离子)。以上结果说明, 间接定位的离子组的第一组碎片离子需包含 A: C6, A: C7 和 B: C7, 第二组碎片离子名称必须有 A 链的 y11 离子, B 链需包含 B: C7 位。

3 酶切+部分还原烷基化法定位胰岛素的复杂二硫键结果

用 GLU-C 酶 (主要酶切位点为 E) 和糜蛋白酶 (主要酶切位点为 Y) 2 种蛋白酶分别处理人胰岛素, 酶切后的肽段经 TCEP·HCl 部分还原和 M-biotin 烷基化, 随后经 DTT 完全还原和 IAM 烷基化。高分辨质谱对烷基化肽段进行分析, 通过半胱氨酸上 M-biotin 和 IAM 修饰的类型达到确认二硫键的目的, 分析流程图如图 3 所示。GLU-C 酶酶切+部分还原烷基化结果如

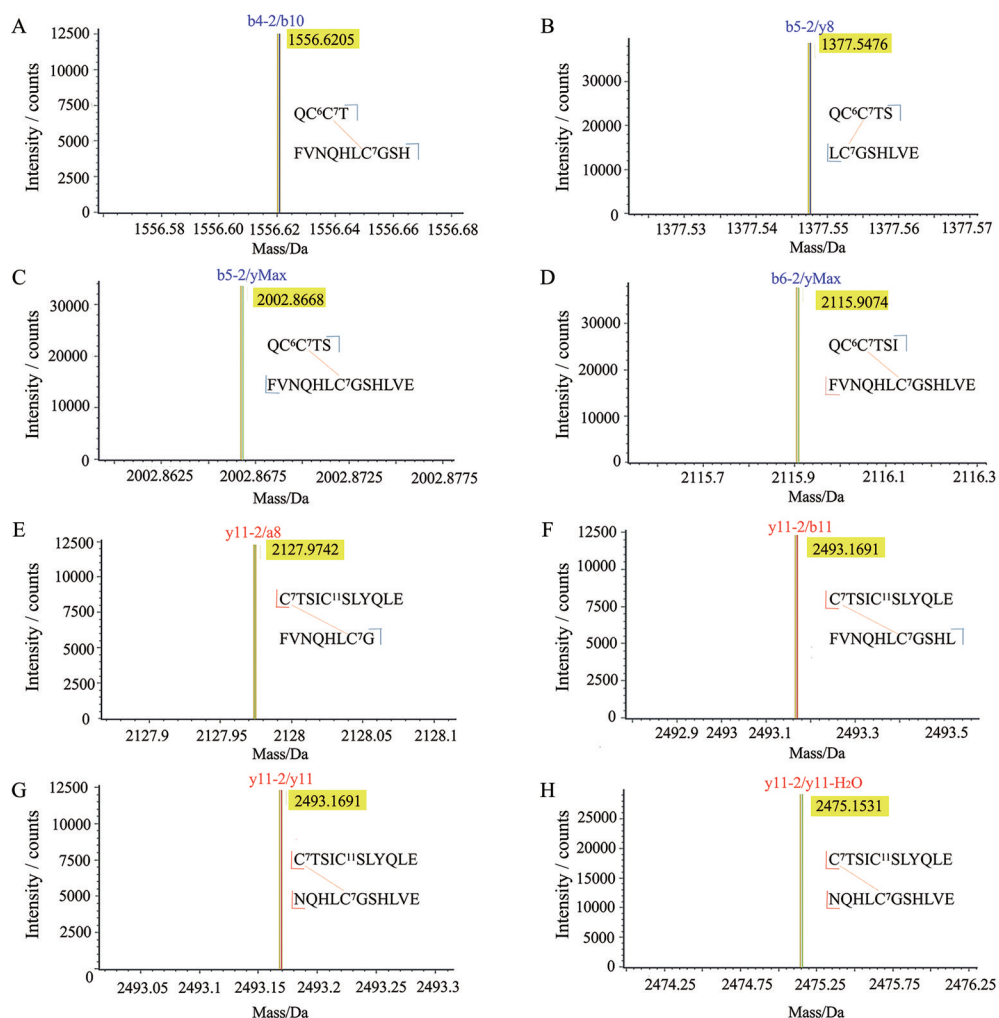


Figure 2 Mass spectra of associated fragment ions of A: C6/C7-B: C7 and A: C7/C11-B: C7. A: b4-2/b10 ions; B: b5-2/y8 ions; C: b5-2/yMax ions; D: b6-2/yMax ions; E: y11-2/a8 ions; F: y11-2/b11 ions; G: y11-2/y11 ions; H: y11-2/y11-H₂O ions

表 1 所示, QCCTSICSLYQLE 和 FVNQHLCGSHLVE 是有烷基化的肽段, FVNQHLCGSHLVE 中 B: C7 和 QCCTSICSLYQLE 中 A: C7 为 TCEP 还原的链间二硫键 (部分还原条件下链间二硫键比链内二硫键更容易打开), 修饰位点为 M-biotin, 可定位 A: C7-B: C7; QCCTSICSLYQLE 中 A: C6 和 A: C11 为 DTT 全部还原的链内二硫键, 烷基化为 IAM, 即可证明 A: C6-A: C11。同理, 采用酶切位点较为复杂的糜蛋白酶处理人胰岛素, 主要关注 Y 酶切位点, 得到的两条肽段 GIVEQCCTSICSLY 和 FVNQHLCGSHLVEALY, 其修饰位点与 GLU-C 酶切时一致, 进一步证明了该两对复

杂二硫键位置。如图 4A~D, 无论是 GLU-C 酶还是糜蛋白酶酶切加部分还原烷基化处理, 4 条肽段的碎片离子丰富, 基本覆盖所有氨基酸, 且分子量偏差均在 5×10^{-6} 之内, 结果可靠、准确。另外, 对门冬胰岛素、赖脯胰岛素和甘精胰岛素分别用 GLU-C 酶和糜蛋白酶同法处理, 得到的肽段与修饰位点与人胰岛素一致, 表明该方法适用性良好。

4 ISD 与 ETD 裂解胰岛素完整蛋白结果

鉴于以上 2 种方法均需要酶切处理后再进行质谱采集, 本研究进一步尝试了对胰岛素分子整体碎裂的方法, 首先, 采用 ISD-MS 的方法, 寻找 A: C20-B: C19

Table 1 Information table of GLU-C and chymotrypsin digestion of human insulin peptides respectively

Peptide name	Modification site	Modified name	Observed mass/Da	Mass error /Da
QCCTSICSLYQLE	(C6, C7, C11)	(IAM carbamidomethylation, M-biotin, IAM carbamidomethylation)	2 128.891 1	-1.25×10^{-6}
FVNQHLCGSHLVE	(C7)	(M biotin)	2 006.928 6	-2.82×10^{-6}
GIVEQCCTSICSLY	(C6, C7, C11)	(IAM carbamidomethylation, M-biotin, IAM carbamidomethylation)	2 156.920 2	-2.26×10^{-6}
FVNQHLCGSHLVEALY	(C7)	(M biotin)	2 354.112 1	-2.85×10^{-6}

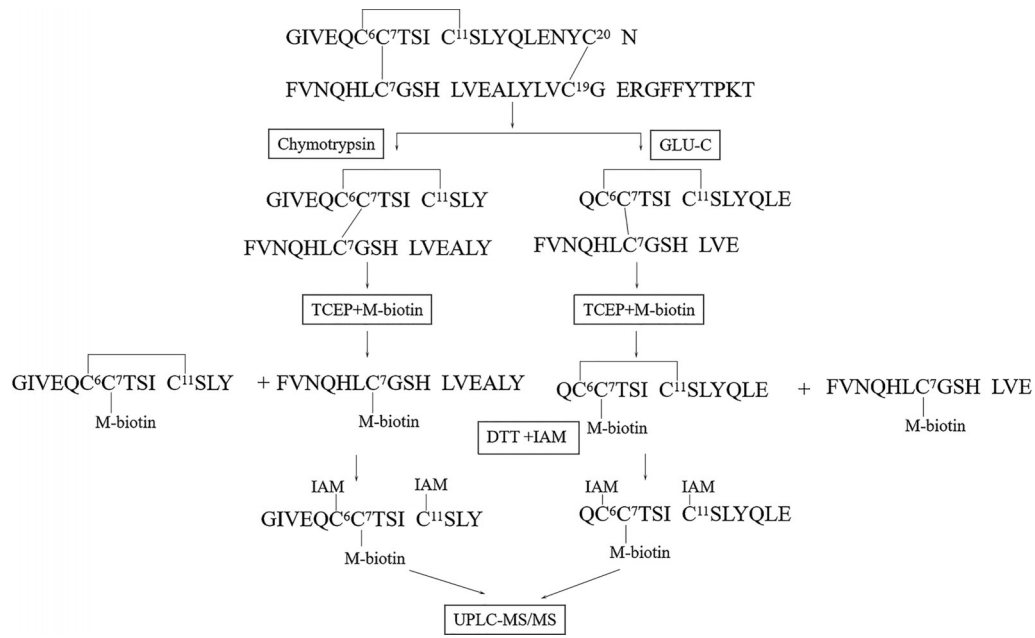


Figure 3 Flow diagram of GLU-C and chymotrypsin digestion combined with partial reduction alkylation for localization of complex disulfide bonds in human insulin

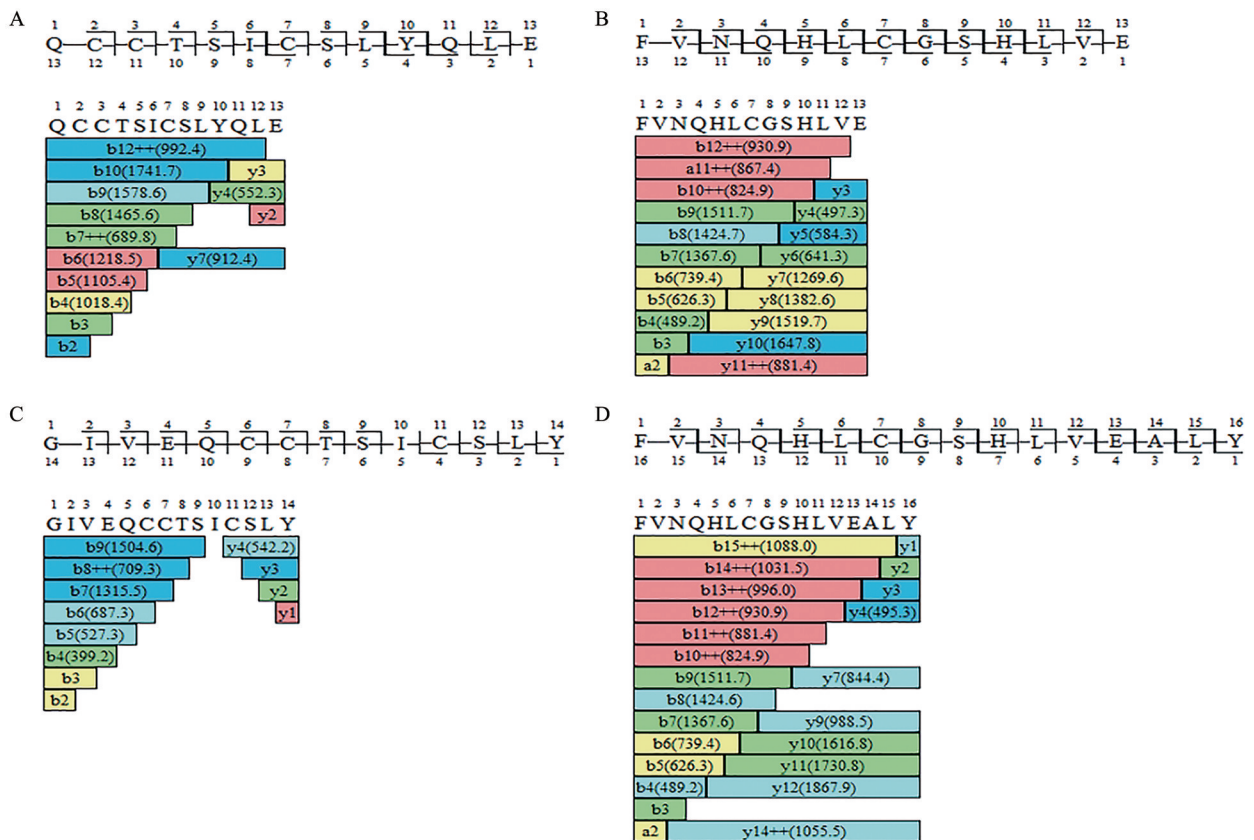


Figure 4 Secondary sequence coverage of major peptides of insulin by GLU-C and chymotrypsin digestion combined with partial reduction alkylation. A: QCCTSICSLYQLE; B: FVNQHLCGSHLVE; C: GIVEQCCTSICSLY; D: FVNQHLCGSHLVEALY

定位的关键碎片离子, 如图 5A~C 所示, y₂₋₂/y₁₈, y₇₋₂/y₁₃ 和 y₆₋₂/y₁₂ 离子, 皆可以直接确定 A: C₂₀-B: C₁₉ 二硫键; 在已知该二硫键前提下, 如图 5D~F 所示, b₆₋₁/

y₁₃₋₂/y₁₃, b₆₋₁/y₁₃₋₂/y₁₄ 和 b₆₋₁/y₁₁₋₂/y₂₃ 离子可以证明 A: C₆-A: C₁₁ 二硫键位置, 则 A: C₇-B: C₇ 的链间二硫键位置也可确定。另外, 选择前体母离子 *m/z*

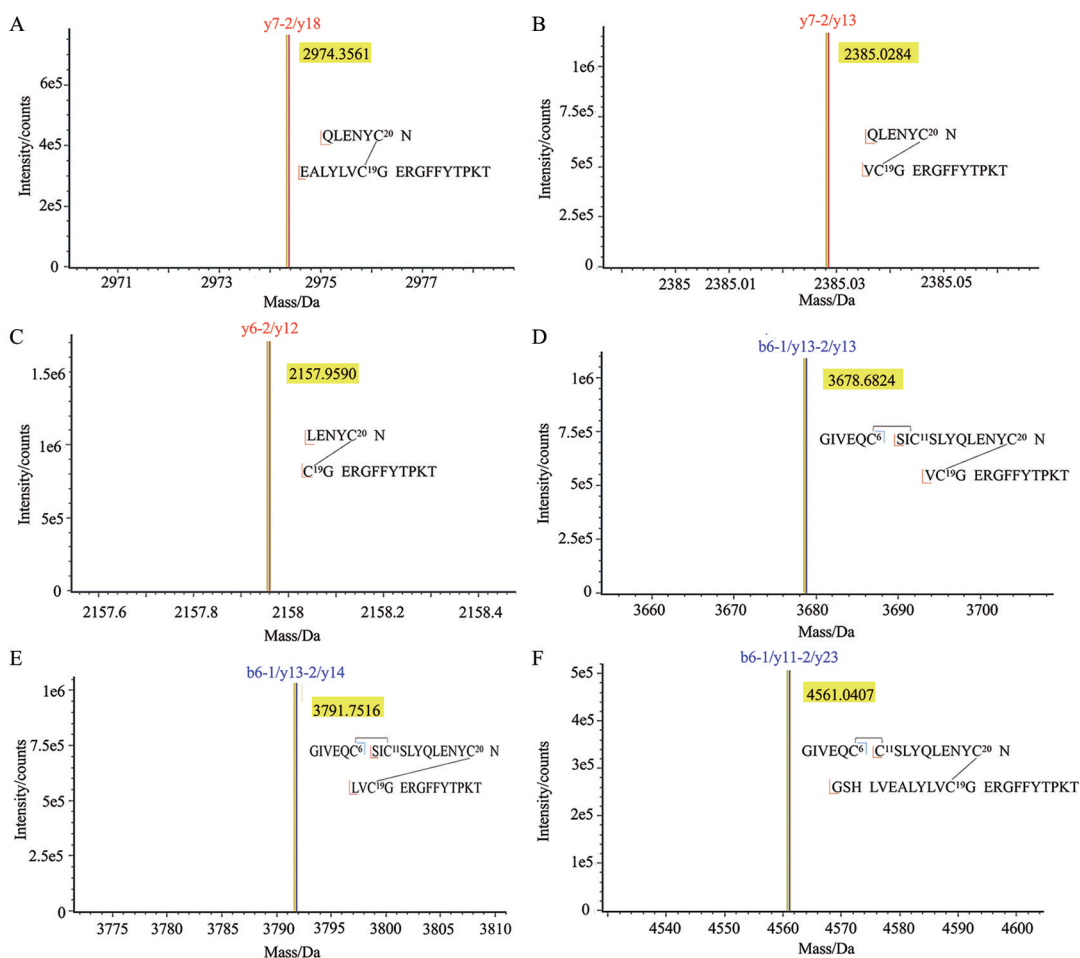


Figure 5 Mass spectra of key fragment ions of insulin of disulfide bond localization by ISD. A: $y7-2/y18$; B: $y7-2/y13$; C: $y6-2/y12$; D: $b6-1/y13-2/y13$; E: $b-1/y13-2/y14$; F: $b6-1/y11-2/y23$

969.0 ($6H^+$), 进一步尝试 ETD-MS/MS 的碎裂方式, 虽然产生的碎片离子不如 ISD 裂解丰富, 但是仍可以按照以上思路, 获得至少 4 对碎片离子, 确定 3 对二硫键位置。如图 6A、B 所示, $z'3-2/z'22+H$ 和 $z'2-2/z'23$ 离子, 皆定位 A: C20-B: C19 二硫键; 在已知该对二硫键前提下, 如图 6C~D, $c''6-1/z'11-2/z'16$ 和 $c''6-1/y11-2/z'21$ 离子可以证明 A: C6-A: C11 二硫键位置, A: C7-B: C7 的链间二硫键位置即可确定。本研究继续对门冬胰岛素、赖脯胰岛素和甘精胰岛素进行完整蛋白 ISD 和 ETD 碎裂采集分析, 结果如表 2 和表 3 所示, 门冬胰岛素、赖脯胰岛素完整分子裂解均有定位 3 对二硫键的关键碎片离子, 甘精胰岛素仅有 A: C20-B: C19 定位的关键碎片离子, 另外两对复杂二硫键定位离子未找到。虽然完整蛋白直接裂解的方法对甘精胰岛素具有一定局限性, 但是仍然可以为复杂二硫键的定位提供一定的思路。寻找 A: C20-B: C19 定位的关键碎片离子, 该类离子必须仅包含 A: C20 和 B: C19, 之后确定另外两对二硫键位置, 推断 A: C6-A: C11 二硫键的关

键碎片离子必须包含 A 链的 C6 和 C11 氨基酸, 但是不能包含 A 链 C7 和 B 链 C7 氨基酸。

讨论

本研究对复杂闭环二硫键的定位采用了 3 种方法, 其中包含了利用化学试剂还原反应烷基化修饰定位的方法, 即酶切加部分还原烷基化法。该方法依赖还原剂和不同的烷基化试剂, DTT 的还原能力较强, 对闭环二硫键来说, 无差别地全部还原, 无法定位这两对二硫键。选择 TCEP 作为还原剂, 它能够在酸性环境下还原^[10], 进而抑制反应过程中二硫键错配的发生。在低浓度的 TCEP ($0.1\sim 0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 下链间二硫键比链内二硫键更容易发生断裂, 可以将二硫键选择性的部分还原。针对烷基化封端的问题, 常用的烷基化试剂有碘乙酸 (IAA)、碘乙酰胺 (IAM) 和 *N*-乙基马来酰亚胺 (NEM)^[11] 等。部分还原的目的在于对 2 对复杂二硫键打开后的巯基分别标记不同的烷基化试剂, 通过肽段不同的烷基化修饰确定二硫键正确的连接位

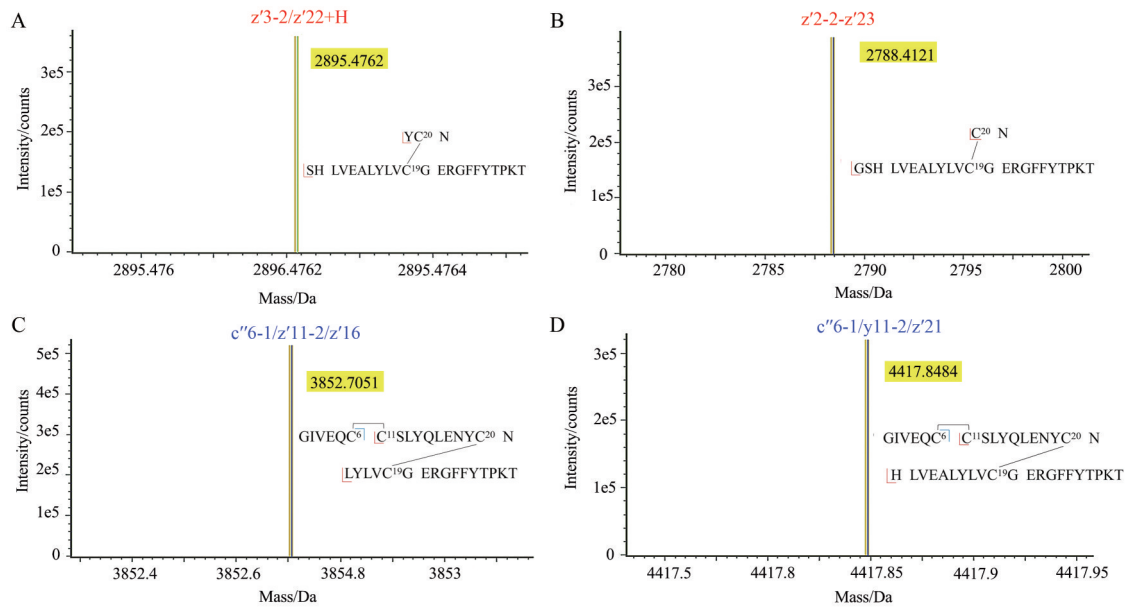


Figure 6 Mass spectra of key fragment ions of insulin of disulfide bond localization by ETD. A: z'3-2/z'22+H; B: z'2-2/z'23; C: c''6-1/z'11-2/z'16; D: c''6-1/y11-2/z'21

Table 2 Key fragment ions of disulfide bond localization by in source decay (ISD) for other insulin analogue

Insulin name	Fragment ion	Observed mass/Da	Expected mass/Da	Mass error/Da
Insulin aspart	b6-1/y14-2/y21	4 736.117	4 736.182	-13.83×10 ⁻⁶
	b6-1/y13-2/y23	4 779.118	4 779.188	-14.56×10 ⁻⁶
	b6-1/y14-2/y23	4 880.166	4 880.236	-14.34×10 ⁻⁶
	y7-2/y14	2 516.136	2 516.123	5.13×10 ⁻⁶
	y7-2/y12	2 303.971	2 303.970	0.39×10 ⁻⁶
	y6-2/y12	2 175.922	2 175.912	4.64×10 ⁻⁶
Insulin lispro	b6-1/y13-2/y13	3 678.633	3 678.638	-1.28×10 ⁻⁶
	b6-1/y13-2/y14	3 791.727	3 791.722	1.27×10 ⁻⁶
	b6-1/y13-2/y15	3 954.814	3 954.785	7.43×10 ⁻⁶
	y7-2/y14	2 498.151	2 498.148	1.00×10 ⁻⁶
	y7-2/y12	2 285.995	2 285.996	-0.52×10 ⁻⁶
	y6-2/y14	2 370.096	2 370.090	2.40×10 ⁻⁶
Insulin glargine	y7-2/y14	2 541.196	2 541.177	4.03×10 ⁻⁶
	y7-2/y15	2 640.246	2 640.245	3.87×10 ⁻⁶
	y6-2/y14	2 413.164	2 413.118	19.19×10 ⁻⁶

Table 3 Key fragment ions of disulfide bond localization by electron transfer dissociation (ETD) for other insulin analogue

Insulin name	Fragment ion	Observed mass/Da	Expected mass/Da	Mass error/Da
Insulin aspart	z'3-2/z'22	2 912.471	2 912.328	49.14×10 ⁻⁶
	z'3-2/z'23+H	2 970.446	2 970.357	30.03×10 ⁻⁶
	c''6-1/z'14-2/z'23	4 865.017	4 865.225	-42.77×10 ⁻⁶
	c''6-1/y14-2/z'14	3 911.643	3 911.751	-27.69×10 ⁻⁶
Insulin lispro	z'5-2/z'20+H	2 914.472	2 914.356	39.80×10 ⁻⁶
	z'3-2/z'22+H	2 895.479	2 895.361	40.69×10 ⁻⁶
	c''6-1/z'14-2/y23	4 863.460	4 863.269	39.17×10 ⁻⁶
	c''6-1/z'11-2/z'16	3 852.720	3 852.742	-5.74×10 ⁻⁶
	z'5-2/z'21	3 055.548	3 055.445	43.23×10 ⁻⁶
Insulin glargine	z'8-2/z'21+H	3 460.808	3 460.658	33.84×10 ⁻⁶

置。部分研究表明 TCEP 在酸性环境中进行还原时可能也有较少部分二硫键交换反应 (错配) 的发生, 而烷基化试剂 (M-biotin) 的存在可以更加有效地减少这种

现象的发生^[12], 另外, 巯基和马来酰亚胺的加成反应快速高效^[13], 所以本研究在 TCEP 部分还原后选择带有马来酰亚胺接头的 PEG 亲水性烷基化试剂 M-biotin 封

端, 确定该复杂二硫键中的链间二硫键; 最后经 DTT 全部还原, 溶液 pH 调至碱性后, IAM 烷基化, 实现另外 1 对二硫键的定位, 该方法对人胰岛素、门冬胰岛素、赖脯胰岛素和甘精胰岛素二硫键定位均适用。本研究尝试了 ISD 和 ETD 2 种断裂方式, 相对 CID 和 HCD 裂解来说, ISD 和 ETD 裂解会同时发生二硫键和多肽骨架的断裂, 通过寻找关键碎片离子的方式定位二硫键, 无需进一步的前处理过程。ETD 裂解是由电子亲和力足够低的负离子作为电子供体, 通过将电子转移给多肽离子从而触发氢自由基的释放。释放的氢自由基可以结合到多肽骨架的羧基基团, 导致肽链 N-C α 键发生断裂, 主要产生 c 和 z 离子^[14-16], ETD 裂解在对糖肽分析方面中已被报道卓有成效^[17,18]。研究发现 ISD 比 ETD 裂解产生更多的碎片离子, 可能因为 ETD 裂解较依赖肽段的位置、大小和电荷等因素^[19], 而 ISD 是在离子从源向质谱仪真空室转移的过程中, ESI 离子源所产生的离子是在一个相对高的压力区域产生的, 无需前体离子, 可以允许所有价态的离子发生断裂^[20]。QCCTSICSLYQLE/FVNQHLCGSHLVE 肽段解析过程中, ISD 裂解引起了链内二硫键的断裂, 产生间接定位闭环二硫键的离子, 该方法对人胰岛素、门冬胰岛素、赖脯胰岛素和甘精胰岛素二硫键定位均适用, 而 ETD 裂解对该肽段进行分析时, 产生的碎片较少, 无法分析, 故在本文中未给出详细解析。研究也尝试了如不经过酶切还原烷基化等复杂的前处理过程, 直接对胰岛素完整蛋白进行 ISD 或 ETD 裂解, 考察其能否达到定位该两对复杂二硫键的目的。判断结果是通过先定位 A: C20-B: C19, 后定位 A: C6-A: C11 去实现, 该方法对人胰岛素、门冬胰岛素和赖脯胰岛素具有良好的适用性, 而甘精胰岛素没有可定位的 A: C6-A: C11, 可能因为甘精胰岛素的 A 链和 B 链序列或结构与人胰岛素、门冬胰岛素和赖脯胰岛素有一定差异, 使整体分子离子化效率较低。但是该方法也为胰岛素类二硫键定位和含复杂二硫键的多肽或者蛋白定位提供一定的思路, 在不经复杂前处理的过程中, 直接运用质谱的不同裂解方式的解析, 省时省力。综上 3 种方法, 酶切加部分还原烷基化法较其他两种方法能够更加直观、直接地评价胰岛素及其类似物的二硫键的位置。

随着重组类多肽或蛋白药物的推陈出新, 对其二硫键结构及相关质量控制方法也会越来越深入, 开发准确、快速的分析方法是极为重要。本文探讨的胰岛素类二硫键的定位方法为胰岛素及其类似物二硫键连接方式的质量控制提供了新途径, 也为含复杂二硫键多肽或蛋白类生物制品的二硫键定位提供借鉴。

致谢: Waters 工程师何娟和 ThermoFisher 工程师龙珍在质谱数据采集和数据处理方面给予了专业意见和指导。

作者贡献: 胡馨月负责总体实验设计、实验操作、数据整理及文章撰写; 丁晓丽负责实验设计、数据处理及文章修改; 孙悦负责部分试验数据采集和分析; 张慧负责提出研究思路 and 解决实验问题; 李晶负责指导论文写作并对论文进行了修改; 梁成罡负责把握研究思路、指导论文写作和对论文进行检查。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Lakhub JC, Shipman JT, Desaire H. Recent mass spectrometry-based techniques and considerations for disulfide bond characterization in proteins [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410: 2467-2484.
- [2] Chang SG, Choi KD, Jang SH, et al. Role of disulfide bonds in the structure and activity of human insulin [J]. *Mol Cells*, 2003, 16: 323-330.
- [3] Liu D, Cowburn D. Combining biophysical methods to analyze the disulfide bond in SH₂ domain of C-terminal Src kinase [J]. *Biophys Rep*, 2016, 2: 33-43.
- [4] Mobli M, King G F. NMR methods for determining disulfide-bond connectivities [J]. *Toxicon*, 2010, 56: 849-854.
- [5] Wang XY, Yan GQ, Zhou XW, et al. Assignment of polypeptide disulfide bonds by chemical cleavage and bio-mass spectrometry [J]. *Chem J Chin Univ (高等学校化学学报)*, 2020, 41: 1505-1512.
- [6] Lioe H, O'Hair RA. A novel salt bridge mechanism highlights the need for nonmobile proton conditions to promote disulfide bond cleavage in protonated peptides under low-energy collisional activation [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2007, 18: 1109-1123.
- [7] Olsen HB, Ludvigsen S, Kaarsholm NC. Solution structure of an engineered insulin monomer at neutral pH [J]. *Biochemistry*, 1996, 35: 8836-8845.
- [8] Huang YJ, Fu HY, Hou LP, et al. Combination of enzymatic digestion - mass spectrometry and cyanation cleavage to analyze disulfide bonds of new drug recombinant human insulin aspart [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2013, 33: 1649-1655.
- [9] Li X, Gao XD, Tao L, et al. Measurement of the amino acid sequence for the fusion protein FP3 with LC-MS/MS [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 47: 216-222.
- [10] Qiu XY, Cui M, Liu ZQ, et al. Protein disulfide bond determination and its analysis by mass spectrometry [J]. *Prog Chem (化学进展)*, 2008, 20: 976-983.
- [11] Li M, Wu PZ. Research progress on disulfide bond assignment analysis based on mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc (质谱学报)*, 2021, 42: 986-994.

- [12] Yen TY, Macher BA, Bryson S, et al. Highly conserved cysteines of mouse core $2\beta 1, 6-N$ -acetylglucosaminyltransferase I form a network of disulfide bonds and include a thiol that affects enzyme activity [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 45864-45881.
- [13] Tumey LN, Charati M, He T, et al. Mild method for succinimide hydrolysis on ADCs: impact on ADC potency, stability, exposure, and efficacy [J]. *Bioconj Chem*, 2014, 25: 1871-1880.
- [14] Wiese H, Kuhlmann K, Wiese S, et al. Comparison of alternative MS/MS and bioinformatics approaches for confident phosphorylation site localization [J]. *J Proteome Res*, 2014, 13: 1128-1137.
- [15] Sobott F, J Watt S, Smith J, et al. Comparison of CID *versus* ETD based MS/MS fragmentation for the analysis of protein ubiquitination[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20: 1652-1659.
- [16] Miao L, Sun MQ, Lin X, et al. A parallel experimental strategy for label-free liquid chromatography/mass spectrometry proteomics study [J]. *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 2011, 39: 1021-1026.
- [17] Cao L, Qu Y, Zhang ZR, et al. Intact glycopeptide characterization using mass spectrometry [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2016, 13: 513-522.
- [18] Wang JF, Jiang J, Peng B, et al. Advance in mass spectrometry-based analysis of intact glycopeptides [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc (质谱学报)*, 2014, 35: 109-117
- [19] Ganisl B, Breuker K. Does electron capture dissociation cleave protein disulfide bonds [J]. *ChemistryOpen*, 2012, 1: 260-268.
- [20] Li X, Yang X, Hoang V, et al. Characterization of protein disulfide linkages by MS in-Source dissociation comparing to CID and ETD tandem MS [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2019, 30: 519-528.