

# 利用高分辨质谱法表征重组人促卵泡激素二硫键的方法研究

胡馨月<sup>1</sup>, 向禹兴<sup>2</sup>, 孙悦<sup>1</sup>, 王绿音<sup>1</sup>, 李懿<sup>1</sup>, 张孝明<sup>1</sup>, 吕萍<sup>1</sup>, 梁成罡<sup>1\*</sup>, 李晶<sup>1\*</sup> (1. 中国食品药品检定研究院, 药品监管科学全国重点实验室, 国家卫生健康委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生物制品质量研究与评价重点实验室, 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; 2. 中国药科大学, 南京 210009)

**摘要:**目的 建立高分辨质谱法表征重组人促卵泡激素二硫键的方法。方法 前处理方法是將卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)原液用稀释液稀释至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 分别加入枯草杆菌蛋白酶、胰蛋白酶、PNGase F酶解, 最后加入 $1 \mu\text{L}$  10%的甲酸, 停止反应。液质方法: 采用ACQUITY UPLC Peptide BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ), 以0.1%甲酸/水溶液(A)-0.1%甲酸/乙腈溶液(B)为流动相, 梯度洗脱; 质谱采集模式为ddMS<sup>2</sup>, 离子源为ESI<sup>+</sup>, 扫描范 $m/z$  250 ~ 2 000。结果 成功鉴定出 $\beta$ 亚基6对二硫键, 分别为 $\beta$ :C3 =  $\beta$ :C51;  $\beta$ :C17 =  $\beta$ :C66;  $\beta$ :C20 =  $\beta$ :C104;  $\beta$ :C28 =  $\beta$ :C82;  $\beta$ :C32 =  $\beta$ :C84;  $\beta$ :C87 =  $\beta$ :C94; 成功鉴定出 $\alpha$ 亚基5对二硫键, 分别为 $\alpha$ :C7 =  $\alpha$ :C31;  $\alpha$ :C10 =  $\alpha$ :C60;  $\alpha$ :C28 =  $\alpha$ :C82;  $\alpha$ :C32 =  $\alpha$ :C84;  $\alpha$ :C59 =  $\alpha$ :C87。结论 建立了重组人促卵泡激素二硫键的定位方法, 为该类产品的二硫键连接方式的质量控制提供了新思路。

**关键词:** 重组人促卵泡激素; 二硫键定位; 高分辨质谱; 酶解法

doi: 10.11669/cpj.2025.01.011 中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2025)01-0086-08

## Characterization of Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone Disulfide Bonds by High Resolution Mass Spectrometry

HU Xinyue<sup>1</sup>, XIANG Yuxing<sup>2</sup>, SUN Yue<sup>1</sup>, WANG Lüyin, LI Yi<sup>1</sup>, ZHANG Xiaoming<sup>1</sup>, LÜ Ping<sup>1</sup>, LIANG Cheng-gang<sup>1\*</sup>, LI Jing<sup>1\*</sup> (1. State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a high resolution mass spectrometry method for characterization of recombinant human follicle-stimulating hormone disulfide bonds. **METHODS** For pre-treatment, follicle-stimulating hormone (FSH) was diluted to  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  with diluent, subtilin, trypsin, and PNGase F were added into the stock solution respectively, and  $1 \mu\text{L}$  10% formic acid was finally added to stop the reaction. For LC-MS analysis, ACQUITY UPLC Peptide BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) column was used, the mobile phase was 0.1% formic acid/aqueous solution (A)-0.1% formic acid/acetonitrile solution (B), and gradient elution was performed. The mass spectrum acquisition mode was ddMS<sup>2</sup>, the ion source was ESI<sup>+</sup>, and the scanning range was  $m/z$  250 - 2 000. **RESULTS** The 6-*p*-disulfide bond of  $\beta$ -subunit was successfully identified, with the values  $\beta$  as follows: C3 =  $\beta$ :C51.  $\beta$ :C17 =  $\beta$ :C66;  $\beta$ :C20 =  $\beta$ :C104;  $\beta$ :C28 =  $\beta$ :C82;  $\beta$ :C32 =  $\beta$ :C84;  $\beta$ :C87 =  $\beta$ :C94. The 5-*p*-disulfide bond of  $\alpha$ -subunit was successfully identified,  $\alpha$ :C7 =  $\alpha$ :C31;  $\alpha$ :C10 =  $\alpha$ :C60;  $\alpha$ :C28 =  $\alpha$ :C82;  $\alpha$ :C32 =  $\alpha$ :C84;  $\alpha$ :C59 =  $\alpha$ :C87. **CONCLUSION** The localization method of disulfide bond of recombinant human follicle stimulating hormone (hFSH) is established, which provides a new idea for the quality control of disulfide bond connection.

**KEY WORDS:** recombinant human follicle-stimulating hormone; disulfide bond localization; high resolution mass spectrometry; enzymolysis

重组人促卵泡激素 (human follicle-stimulating hormone, hFSH) 是糖蛋白激素 (Glycoprotein hormones, GPHs) 家族的一员。GPHs 还包括人促黄体生成素 (human luteinizing hormone, hLH)、人促甲状

腺激素 (human thyroid-stimulating hormone, hTSH) 和人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG)。GPHs 家族都是由 1 个共同的  $\alpha$  和 1 个激素特异性  $\beta$  亚基的非共价结合形成的异二聚

**基金项目:** 药品监管科学全国重点实验室第一批课题项目资助 (2023SKLDRS0108); 药品监管科学全国重点实验室第二批课题项目资助 (2024SKLDRS0203); 中国食品药品检定研究院化学药品检定所重点实验室项目资助 (2024HYZX23)

**作者简介:** 胡馨月, 女, 博士, 助理研究员 研究方向: 激素类药物质量控制; 向禹兴, 男, 硕士研究生 研究方向: 生物技术药物分析。胡馨月与向禹兴为共同第一作者 \* **通讯作者:** 梁成罡, 男, 博士, 研究员 研究方向: 激素类药物质量控制及标准研究 Tel: (010) 53851638; 李晶, 女, 博士, 研究员 研究方向: 激素类药物质量控制及标准研究 Tel: (010) 53851465

体<sup>[1-2]</sup>,两个亚基通过β半胱氨酸环相互作用连接。hFSH是相对分子质量为 $35.5 \times 10^3$ 的异源二聚体,α亚基由92个氨基酸组成,包含2个N糖基化位点(Asn-52和Asn-78),含有10个半胱氨酸残基,形成5对链内二硫桥;β亚基由111个氨基酸组成,分别包含2个N糖基化位点(Asn-7和Asn-24),包含12个半胱氨酸残基,形成6对链内二硫键<sup>[3]</sup>(图1)。在结构方面,两个亚基具有的二硫键共价连接蛋白两部分,形成蛋白的疏水核心。在功能方面,稳定蛋白结构,帮助蛋白折叠;利用氧化还原反应,调节蛋白功能。二硫键的正确配对是维持FSH正确折叠方式和高级结构形成的关键因素,对产品的质量控制在至关重要。根据国际人用药品注册技术协调会(ICH)Q6B指导原则及《中国药典》2020年版三部人用重组DNA蛋白制品总论的通则要求,应对该类药物进行包括二硫键是否正确配对在内的结

构特性分析。FSH两个亚基具有复杂而又丰富多样的二硫键结构<sup>[4]</sup>,特别是α亚基中的第31和32位、59和60位,分别存在4个紧密相邻的半胱氨酸,并各自与其他位置的半胱氨酸形成二硫键,很难被特异性蛋白酶有效切割,从而给该类家族蛋白药物α亚基二硫键的准确表征带来较大困难。GPHs家族所有糖蛋白激素药物的α亚基二硫键位置均高度相似,α亚基在这些激素中起到一定的交叉反应作用,但并不决定它们的特异性功能,β亚基则是GPHs家族特有的,这两个亚基共同决定了GPHs家族的生物学特性和功能。审批审评中对该类家族创新药物2个亚基二硫键的特性表征要求,尤其对α亚基二硫键定位解析定位鲜有报道,技术上存在较大难点,研发企业很难提供信噪比较高的二级质谱图谱,一定程度上制约了该类药物的研发上市进程。

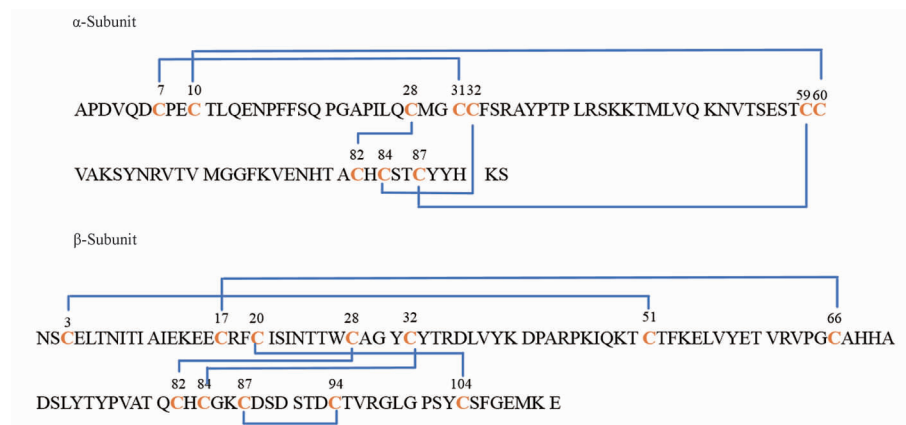


图1 重组人促卵泡激素(hFSH)结构图

Fig. 1 The structure of human follicle-stimulating hormone(hFSH)

早期阶段,通过X射线衍射晶体法对FSH的二硫键进行定位。而X射线衍射晶体法需要培养高度有序的蛋白结晶,且对样品需求量很大,对样品纯度要求也较高。质谱分析技术可用于二硫键分析,经过蛋白前处理和LC-MS/MS分析,匹配正确的二硫键位置。现研究蛋白质二硫键的实验方法中,自上而下质谱法较为普遍,主要有两种手段<sup>[5]</sup>:非还原条件下分析完成二硫键肽段或者还原条件下断开二硫键分析半胱氨酸定位,获得的肽段结构信息,数据分析软件与手动解析相结合鉴定二硫键结构。然而,FSH二硫键定位的难点在于无特异性理想的水解酶可以将每对相邻二硫键所含肽段酶解,往往一条肽段包含两个以上半胱氨酸,无法确定其连接位点;使用还原或部分还原方法也不能很好地控制二硫键的选择性断裂。

本研究采用非特异性酶和特异性酶相结合的策略,非还原酶切和非还原酶切后还原处理相对比的手段,利用高分辨质谱仪器,最终通过分析软件成功解析出FSH的11对二硫键,方法可行,且准确度高;尤其是对α亚基二硫键的解析,可为GPHs家族复杂糖蛋白激素药物的审批审评与科学监管提供一定的技术储备。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 仪器 Orbitrap Exploris 480(美国赛默飞世尔科技公司);Waters-UNIFI数据处理软件(美国沃特世公司);电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.1.2 试剂 乙腈(批号:164788)、甲酸(批号:

195715)[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)、枯草杆菌酶(批号:P5459,来源地衣芽孢杆菌, glycerol solution 50%)[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司];胰蛋白酶(批号:V5111,每支 25 μg, Promega 北京); PNGase F(批号:P0704L, NEW ENGLAND BioLabs)。

## 1.2 方法

**1.2.1 溶液配制** ①原液稀释液:取 0.193 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 0.067 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,加入 100 mL纯化水,混匀即得。②100 mmol·L<sup>-1</sup>的 TCEP 溶液:取 28.6 mg 的 TCEP·HCl,加入 1 mL 纯化水混匀即得。

**1.2.2 非还原酶切处理** 将 FSH 原液用稀释液稀释至 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>,取该溶液 100 μL 加入枯草杆菌蛋白酶 1 μL(取 10 μL 枯草杆菌酶加入 840 μL 超纯水,混匀),37 °C 酶解 17 h;后加入 1 μL 胰蛋白酶(取每支 25 μg 的胰蛋白酶 1 支,加超纯水 25 μL 溶解,混匀),37 °C 酶解 8 h;最后,加入 1 μL PNGase F,37 °C 酶解 17 h,加入 1 μL 体积分数 10% 的甲酸,停止反应。

**1.2.3 非还原酶切后还原处理** 将 FSH 原液用稀释液稀释至 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>,取该溶液 100 μL 加入枯草杆菌蛋白酶 1 μL(取 10 μL 枯草杆菌酶加入 840 μL 超纯水,混匀),37 °C 酶解 17 h;后加入 1 μL 胰蛋白酶(取规格为 25 μg/支胰蛋白酶 1 支,加入超纯水 25 μL,混匀),37 °C 酶解 8 h;最后,加入 1 μL PNGase F,37 °C 酶解 17 h,加入 1 μL 100 mmol·L<sup>-1</sup> 的 TCEP 溶液,37 °C 孵育 30 min,加入 1 μL 体积分数 10% 的甲酸,停止反应。

**1.2.4 液质条件** 液相条件:采用 ACQUITY UPLC Peptide BEH C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),以 0.1% 甲酸/水溶液(A)-0.1% 甲酸/乙腈溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~60 min, 0.5% B→20% B;60~70 min, 20% B→98% B;70~75 min, 98% B;75~75.1 min, 98% B→0.5% B;75.1~85 min, 0.5% B),流速为 0.2 mL·min<sup>-1</sup>,柱温为 60 °C,进样量 20 μL。

质谱条件:质谱采集模式为 ddMS<sup>2</sup>,鞘气 35,辅气 10;离子源为正离子,离子源传输管温度 320 °C,扫描范围 *m/z* 250~2 000,一级分辨率 60 000@110 *m/z*;二级分辨率 15 000@110 *m/z*。

**1.2.5 处理方法** β 亚基处理方法设置:输入 β 亚基理论序列,可变修饰为氧化、还原、半胱氨酸化,设置检测下限强度为 1×10<sup>5</sup>,偏差 10×10<sup>-6</sup>,非特异性酶切(nonspecific);α 亚基处理方法设置:输入 α 亚基理论序列,可变修饰为氧化、还原、半胱氨酸化,

设置检测下限强度为 1×10<sup>4</sup>,偏差 10×10<sup>-6</sup>,非特异性酶切(nonspecific)。

## 2 实验结果

### 2.1 β 亚基鉴定结果

对检索结果进行筛选,分别搜索 β:C3=β:C51, β:C17=β:C66, β:C20=β:C104, β:C28=β:C82, β:C32=β:C84, β:C87=β:C94 的 6 对二硫键具有 MS2 的肽段。如表 1 所示,6 对二硫键均检出多对可定位的 C=C 连接肽段,一级偏差均在 10×10<sup>-6</sup>之内,每条肽段的平均结构分辨率(average structural resolution, ASR)为 1.0。选择 β:C3=β:C51 的 NSCE=KTCTF 和 β:C17=β:C66 的 ECR=PGACH 肽段(图 2),选择 β:C20=β:C104 的 FCIS=YCSF 肽段和 β:C28=β:C82 的 WCA=TQCH 肽段(图 3),选择 β:C32=β:C84 的 GYCY=HCGK 肽段和 β:C87=β:C94 的 GKCD=DCTVR 肽段(图 4),进一步对以上 6 条 C=C 肽段进行二级图谱详细解析,通过分析互补的碎片离子,可确认 β 亚基 6 对二硫键的连接方式。其中,图 2A 中的 b<sub>3</sub>、y<sub>2</sub>、y<sub>3</sub>,图 2B 中的 y<sub>3</sub>、y<sub>4</sub> 和 b<sub>3</sub> 可确认 NSCE=KTCTF 的 C3-C3 连接方式;图 2C 中的 b<sub>2</sub>、y<sub>2</sub>,以及图 2D 中的 y<sub>3</sub>、y<sub>4</sub> 和 b<sub>3</sub>、b<sub>4</sub>,可确认 ECR=PGACH 的 C2-C4 连接方式;图 3A 中 b<sub>2</sub>、b<sub>3</sub>、y<sub>3</sub> 和图 3B 中的 b<sub>2</sub>、b<sub>3</sub>、y<sub>3</sub> 可确认 FCIS=YCSF 的 C2-C2 连接方式;图 3C 中 b<sub>2</sub>、y<sub>2</sub> 和 3D 中 b<sub>3</sub>、y<sub>2</sub>、y<sub>3</sub> 可确认 WCA=TQCH 的 C2-C3 的连接方式;图 4A 中 b<sub>3</sub>、y<sub>2</sub>、y<sub>3</sub> 和图 4B 中 y<sub>3</sub> 可确认 GYCY=HCGK 的 C3-C2 连接方式;图 4C 中 b<sub>3</sub>、y<sub>2</sub>、y<sub>3</sub> 和图 4D 中 y<sub>4</sub> 可确认 GKCD=DCTVR 的 C3 和 C2 连接方式。

### 2.2 α 亚基鉴定结果

α 亚基中存在 2 个相邻半胱氨酸分别与其他位置半胱氨酸成二硫键的情况,分别为 C31、C32 和 C59、C60,则要求水解酶必须在以上 2 个相邻半胱氨酸之间进行酶解,设置检测限较 β 亚基更低,符合肽段长度可能更短。经过检索,分别搜索 α:C7=α:C31, α:C10=α:C60, α:C28=α:C82, α:C32=α:C84, α:C59=α:C87 的 5 对二硫键具有 MS2 的肽段(表 2)。α:C10=α:C60, α:C28=α:C82, α:C32=α:C84 二硫键均具有多对可定位的 C=C 连接肽段,一级偏差均在 10×10<sup>-6</sup>之内, Average structural resolution 均小于 1.5。α:C59=α:C87 检索到 1 个匹配肽段,一级偏差均在 10×10<sup>-6</sup>之内。值得注意的是,α:C7=α:C31 的证明肽段解析难度很大,可以直接定位的肽段需要仅包含 29 位 M 到 31

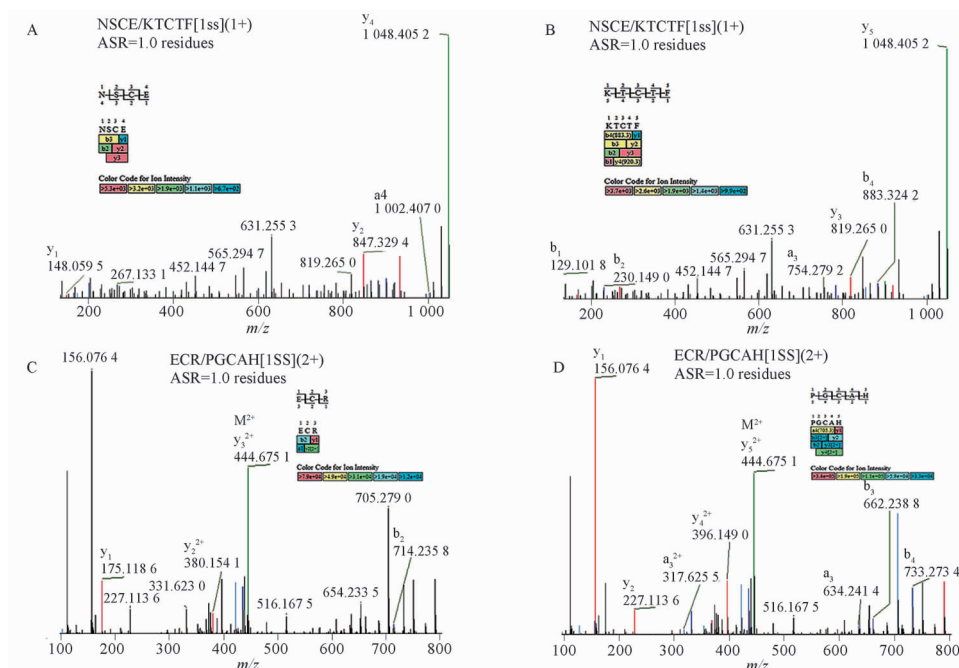
表 1 hFSH 的  $\beta$  亚基二硫键匹配肽段信息

Tab. 1 Information of  $\beta$ -subunit disulfide bond matching peptide of FSH

Connection type	The peptide containing disulfide bonds	MW(Theoretical)	MW(Measured)	Deviation/ $\times 10^{-6}$	ASR
$\beta$ :C3 = $\beta$ :C51	NSCE = KTCTF	1 047.399 0	1 047.400 1	-1.0	1.0
	NSCE = CTF	818.256 2	818.257 5	-1.6	1.0
	NSCEL = KTCTF	1 160.480 2	1 160.484 2	-3.4	1.0
	CE = CTF	617.181 8	617.182 5	-1.1	1.0
$\beta$ :C17 = $\beta$ :C66	ECR = PGACH	887.334 9	887.337 8	-3.2	1.0
	ECR = RVPGCA	1 005.445 9	1 005.448 4	-2.5	1.0
	CRF = VPGCAH	1 004.430 5	1 004.432 0	-1.5	1.0
	ECRF = PGCAH	1 034.403 4	1 034.406 2	-2.7	1.0
	ECRF = CAH	880.330 0	880.332 0	-2.3	1.0
$\beta$ :C20 = $\beta$ :C104	FCIS = YCSF	984.370 7	984.372 1	-1.4	1.0
	FCI = GPSYCS	991.374 3	991.377 9	-3.6	1.0
	FCI = SYCS	837.301 4	837.303 7	-2.7	1.0
$\beta$ :C28 = $\beta$ :C82	WCA = TQCH	863.304 3	863.305 4	-1.3	1.0
	WCA = CH	634.197 8	634.199 2	-2.2	1.0
$\beta$ :C32 = $\beta$ :C84	GYCY = HCGK	945.344 9	945.347 3	-2.5	1.0
	GYCYT = HCGK	1 046.393 1	1 046.395 0	-1.8	1.0
	GYCY = CGK	808.286 4	808.288 4	-2.5	1.0
	YCY = CG	623.170 7	623.172 0	-2.1	1.0
$\beta$ :C87 = $\beta$ :C94	GKCD = DCTVR	1 011.407 8	1 011.411 4	-3.6	1.0
	GKCD = STDCTVR	1 199.487 5	1 199.491 1	-3.0	1.0
	GKCD = TDCTVR	1 112.456 1	1 112.459 0	-2.6	1.0

注: MW - 相对分子质量; ASR - 平均结构分辨率。

Note: MW - molecular weight; ASR - average structural resolution.



A -  $\beta$ :C3 =  $\beta$ :C51 中 NSCE 端二级质谱图; B -  $\beta$ :C3 =  $\beta$ :C51 中 KTCTF 端二级质谱图; C -  $\beta$ :C17 =  $\beta$ :C66 中 ECR 端二级质谱图; D -  $\beta$ :C17 =  $\beta$ :C66 中 PGCAH 端二级质谱图。

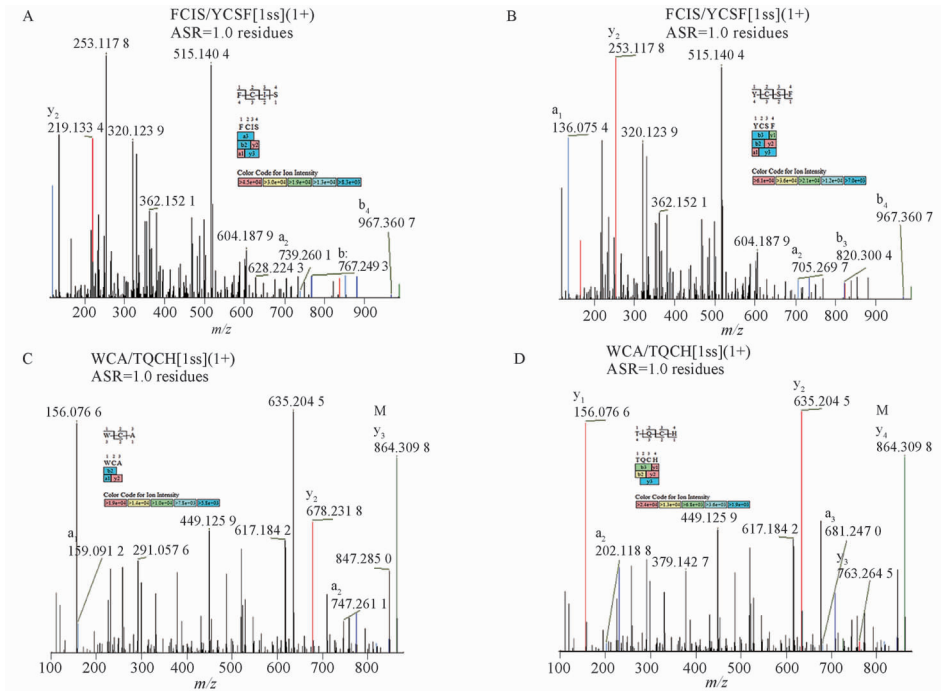
A -  $\beta$ :C3 =  $\beta$ :C51 NSCE terminal secondary mass spectrometry; B -  $\beta$ :C3 =  $\beta$ :C51 KTCTF terminal secondary mass spectrometry; C -  $\beta$ :C17 =  $\beta$ :C66 ECR terminal secondary mass spectrometry; D -  $\beta$ :C17 =  $\beta$ :C66 PGCAH terminal secondary mass spectrometry.

图 2 hFSH 的  $\beta$  亚基  $\beta$ :C3 =  $\beta$ :C51 和  $\beta$ :C17 =  $\beta$ :C66 肽段二级质谱图

Fig. 2 Secondary mass spectra of  $\beta$ :C3 =  $\beta$ :C51 and  $\beta$ :C17 =  $\beta$ :C66 peptides in  $\beta$ -subunit of hFSH

位 C 的 3 个氨基酸序列 MGC 或者仅有 GC 两个氨基酸序列的肽段, 实际检出了 1 个目标肽段为 CP = GC, ASR 为 1.0; 另外一个为 DCP = C, 它的重复检出率很高, 因 DCP = C 不能确定为哪个位置的 C, 判

断时采用排除法, 首先检索到了  $\alpha$ :C7 ~  $\alpha$ :C31/ $\alpha$ :C32 的肽段, 虽然不确定 C7 与 C31 和 C32 的连接, 通过  $\alpha$ :C32 =  $\alpha$ :C84 多条肽段的确定, 排除 C7 与 C32 的连接, 确定 DCP = C 为  $\alpha$ :C7 =  $\alpha$ :C31 的连接,

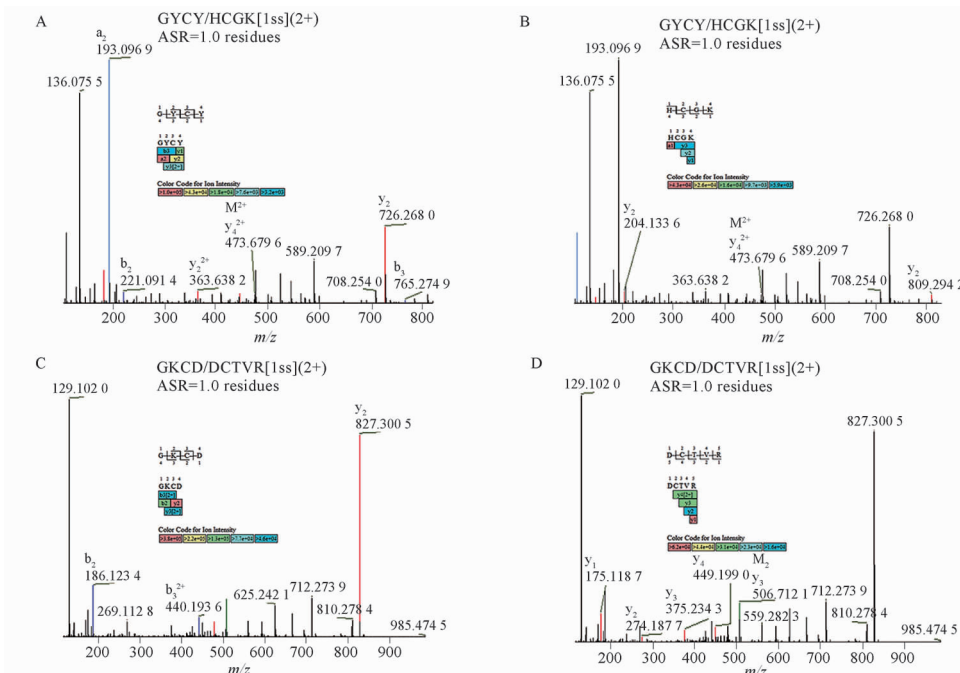


A -  $\beta$ :C20 =  $\beta$ :C104 中 FCIS 端二级质谱图; B -  $\beta$ :C20 =  $\beta$ :C104 中 YCSF 端二级质谱图; C -  $\beta$ :C28 =  $\beta$ :C82 中 WCA 端二级质谱图; D -  $\beta$ :C28 =  $\beta$ :C82 中 TQCH 端二级质谱图。

A -  $\beta$ :C20 =  $\beta$ :C104 FCIS terminal secondary mass spectrometry; B -  $\beta$ :C20 =  $\beta$ :C104 YCSF terminal secondary mass spectrometry; C -  $\beta$ :C28 =  $\beta$ :C82 WCA terminal secondary mass spectrometry; D -  $\beta$ :C28 =  $\beta$ :C82 TQCH terminal secondary mass spectrometry.

图 3 hFSH 的  $\beta$  亚基  $\beta$ :C20 =  $\beta$ :C104 和  $\beta$ :C28 =  $\beta$ :C82 肽段二级质谱图

Fig. 3 Secondary mass spectra of  $\beta$ :C20 =  $\beta$ :C104 and  $\beta$ :C28 =  $\beta$ :C82 peptides in  $\beta$ -subunit of hFSH



A -  $\beta$ :C32 =  $\beta$ :C84 中 GYCY 端二级质谱图; B -  $\beta$ :C32 =  $\beta$ :C84 中 HCGK 端二级质谱图; C -  $\beta$ :C87 =  $\beta$ :C94 中 GKCD 端二级质谱图; D -  $\beta$ :C87 =  $\beta$ :C94 中 DCTVR 端二级质谱图。

A -  $\beta$ :C32 =  $\beta$ :C84 GYCY terminal secondary mass spectrometry; B -  $\beta$ :C32 =  $\beta$ :C84 HCGK terminal secondary mass spectrum; C -  $\beta$ :C87 =  $\beta$ :C94 GKCD terminal secondary mass spectrometry; D -  $\beta$ :C87 =  $\beta$ :C94 DCTVR terminal secondary mass spectrometry.

图 4 hFSH 的  $\beta$  亚基  $\beta$ :C32 =  $\beta$ :C84 肽段和  $\beta$ :C87 =  $\beta$ :C94 肽段二级质谱图

Fig. 4 Secondary mass spectra of  $\beta$ :C32 =  $\beta$ :C84 peptide and  $\beta$ :C87 =  $\beta$ :C94 peptide in  $\beta$ -subunit of hFSH

虽然是间接判断,但是可以作为该对二硫键定位的补充。

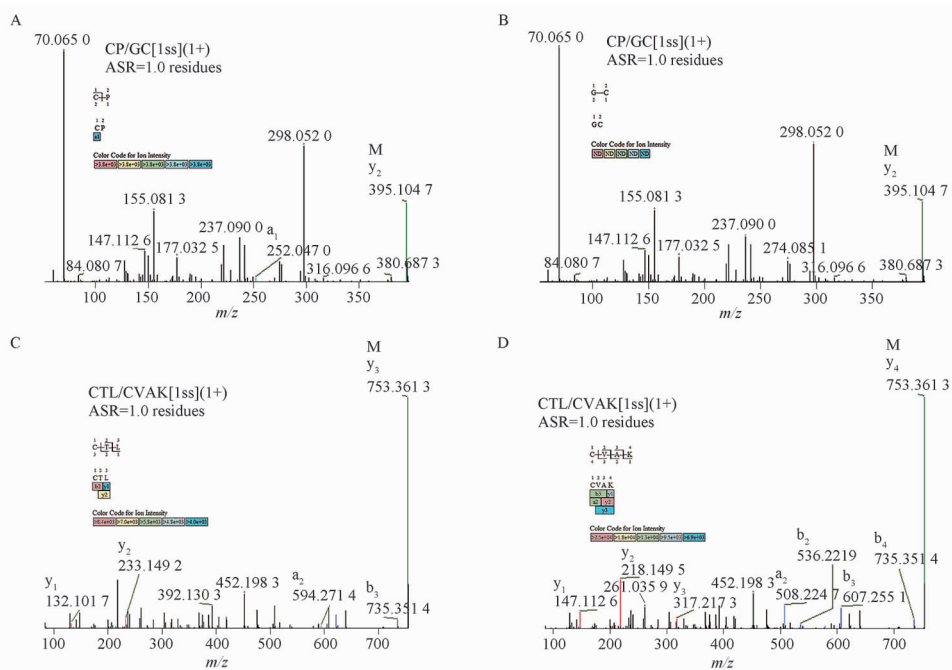
对以下肽段进行二级碎片分析:选择  $\alpha$ :C7 =  $\alpha$ :C31 的 CP = GC 和  $\alpha$ :C10 =  $\alpha$ :C60 的 CTL = CVAK 肽段(图 5),选择  $\alpha$ :C28 =  $\alpha$ :C82 的 LQC = AC 肽段和  $\alpha$ :C32 =  $\alpha$ :C84 的 CF = HCS 肽段, $\alpha$ :C59 =  $\alpha$ :C87 的 TC = TCY(图 6)。图 5A 中的 a1 离子可证明 CP = GC 的 C1-C2 连接方式;图 5C、5D 中所有氨基酸均具有二级碎片,可证明 CTL = CVAK 的 C1-C1 连接方式;图 6A、6B 具有二级碎片,但无直接证明 LQC = AC 连接方式碎片离子;图 6C、6D 具有二级碎片,但无直接证明 CF = HCS 连接方式的碎片离子;图 6E 中 y1、图 6F 中的 y2 离子可证明

TC = TCY 的 C1-C2 连接方式。虽然存在无直接证明 C-C 连接的碎片离子,以上 5 条肽段每条仅有两个半胱氨酸,两条肽段仅能通过两个 C-C 键相连接,所以可以定位  $\alpha$  亚基 5 对二硫键。为增加判定准确性,对比非还原酶切和非还原酶切后还原处理的两组样品数据,将非还原酶切处理后样品数据的 5 对 C = C 肽段提取离子流(XIC)信号(图 7),再对酶切后还原处理的数据手动提取以上 5 对 C = C 肽段提取离子流,根据保留时间进行判断。结果显示,非还原酶切后还原处理的样品数据并未提取到以上 5 对 C = C 肽段提取离子流信号,证明在非还原酶切后还原处理的样品中以上均二硫键打开。综上,可进一步确认  $\alpha$  亚基 5 对二硫键的连接方式。

表 2 hFSH 的  $\alpha$  亚基二硫键匹配肽段信息

Tab. 2 Information of  $\alpha$ -subunit disulfide matching peptide of hFSH

Connection type	The peptide containing disulfide bonds	MW(Theoretical)	MW(Measured)	Deviation/ $\times 10^{-6}$	ASR
$\alpha$ :C7 = $\alpha$ :C31	CP = GC	394.098 1	394.097 2	-2.2	1.0
	DCP = C	452.102 8	452.103 6	-1.8	3.0
$\alpha$ :C10 = $\alpha$ :C60	CTL = CVAK	752.353 9	752.356 1	-2.9	1.0
	CTL = CV	553.222 7	553.224 0	-2.3	1.0
	CTLQENP = CV	1 021.418 0	1 021.420 9	-2.8	1.0
$\alpha$ :C28 = $\alpha$ :C82	LQC = AC	552.202 1	552.203 6	-2.7	1.0
	ILQC = TAC	766.332 8	766.335 3	-3.3	1.3
$\alpha$ :C32 = $\alpha$ :C84	CF = HCS	611.190 1	611.183 2	-1.1	1.5
	CF = CST	575.169 2	575.172 0	-4.8	1.0
$\alpha$ :C59 = $\alpha$ :C87	TC = TCY	605.178 6	605.182 5	-6.4	1.0

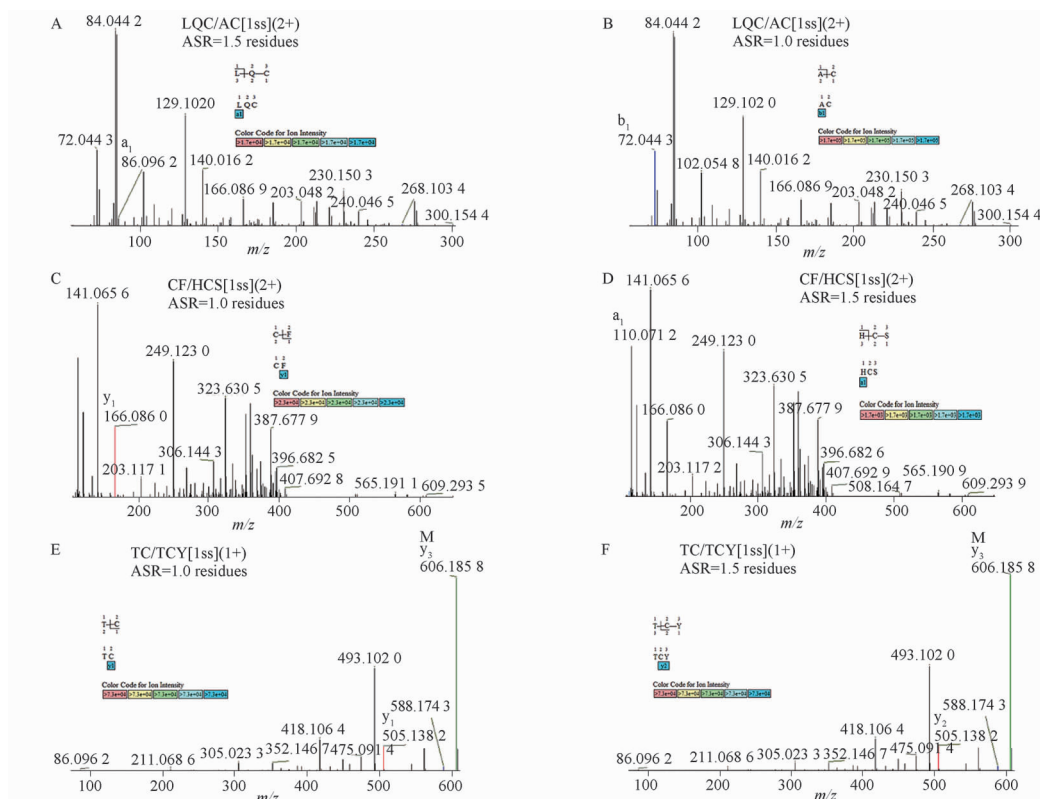


A -  $\alpha$ :C7 =  $\alpha$ :C31 中 CP 端二级质谱图; B -  $\alpha$ :C7 =  $\alpha$ :C31 中 GC 端二级质谱图; C -  $\alpha$ :C10 =  $\alpha$ :C60 中 CTL 端二级质谱图; D -  $\alpha$ :C10 =  $\alpha$ :C60 中 CVAK 端二级质谱图。

A -  $\alpha$ :C7 =  $\alpha$ :C31 CP terminal secondary mass spectrometry; B -  $\alpha$ :C7 =  $\alpha$ :C31 GC terminal secondary mass spectrum; C -  $\alpha$ :C10 =  $\alpha$ :C60 CTL terminal secondary mass spectrometry; D -  $\alpha$ :C10 =  $\alpha$ :C60 CVAK terminal secondary mass spectrum.

图 5 hFSH 的  $\alpha$  亚基  $\alpha$ :C7 =  $\alpha$ :C31 肽段和  $\alpha$ :C10 =  $\alpha$ :C60 肽段二级质谱图

Fig. 5 Secondary mass spectra of  $\alpha$ :C7 =  $\alpha$ :C31 peptide and  $\alpha$ :C10 =  $\alpha$ :C60 peptide in  $\alpha$ -subunit of hFSH



A -  $\alpha$ :C28 =  $\alpha$ :C82 中 LQC 端二级质谱图; B -  $\alpha$ :C28 =  $\alpha$ :C82 中 AC 端二级质谱图; C -  $\alpha$ :C32 =  $\alpha$ :C84 中 CF 端二级质谱图; D -  $\alpha$ :C32 =  $\alpha$ :C84 中 HCS 端二级质谱图; E -  $\alpha$ :C59 =  $\alpha$ :C87 中 TC 端二级质谱图; F -  $\alpha$ :C59 =  $\alpha$ :C87 中 TCY 端二级质谱图。

A -  $\alpha$ :C28 =  $\alpha$ :C82 LQC terminal secondary mass spectrometry; B -  $\alpha$ :C28 =  $\alpha$ :C82 AC terminal secondary mass spectrometry; C -  $\alpha$ :C32 =  $\alpha$ :C84 CF terminal secondary mass spectrometry; D -  $\alpha$ :C32 =  $\alpha$ :C84 HCS terminal secondary mass spectrometry; E -  $\alpha$ :C59 =  $\alpha$ :C87 TC terminal secondary mass spectrometry; F -  $\alpha$ :C59 =  $\alpha$ :C87 TCY terminal secondary mass spectrometry.

图 6 hFSH 的  $\alpha$  亚基  $\alpha$ :C28 =  $\alpha$ :C82 肽段、 $\alpha$ :C32 =  $\alpha$ :C84 肽段和  $\alpha$ :C59 =  $\alpha$ :C87 肽段二级质谱图

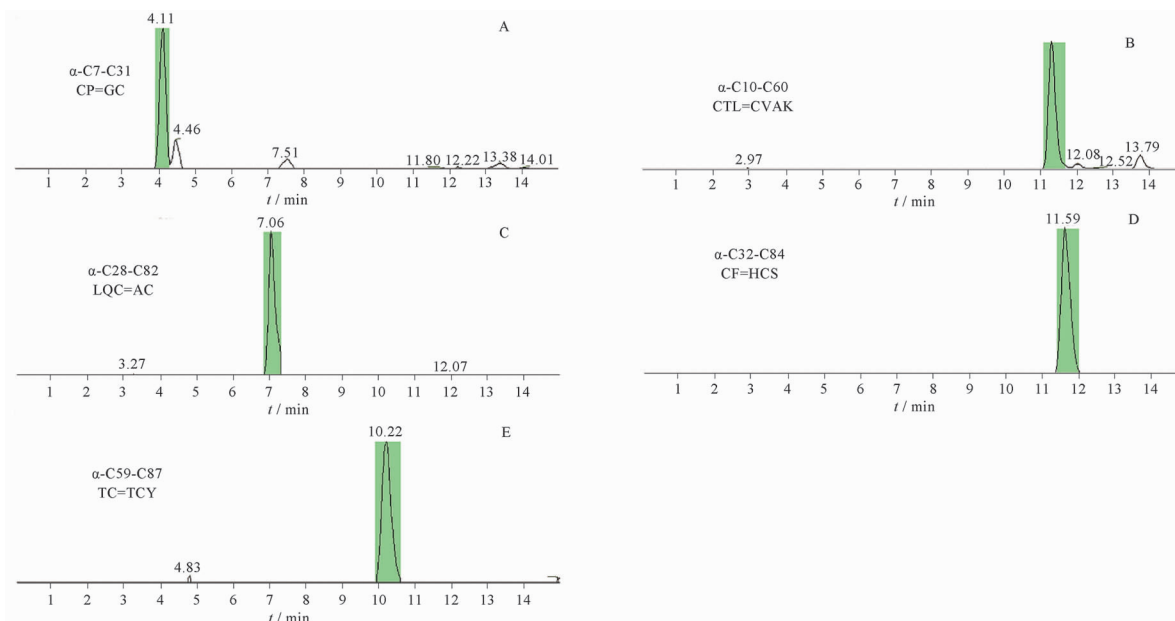
Fig. 6 Secondary mass spectra of  $\alpha$ :C28 =  $\alpha$ :C82 peptide,  $\alpha$ :C32 =  $\alpha$ :C84 peptide and  $\alpha$ :C59 =  $\alpha$ :C87 peptide in  $\alpha$ -subunit of hFSH

### 3 讨论

《中国药典》2020 年版三部人用重组制品总论一级结构测定中要求“一级结构,即包括二硫键连接方式的氨基酸序列(包含二硫键的完整性和正确性)”。二硫键不仅维持蛋白的功能与稳定性,而且其表征为结构的质量控制的重要组成部分,对产品的质量的控制至关重要。Yin 等<sup>[6]</sup>利用胰蛋白酶水解的方法解析出溶酶菌的 4 对二硫键,为 cys6-cys127、cys30-cys115、cys64-cys80、cys76-cys94;Zhao 等<sup>[7]</sup>使用 NEM 封闭游离巯基加胰蛋白酶水解的方法定位了 CD79b 为靶点的抗体偶联药物二硫键,以上两种均采用“自下而上”质谱分析策略,特异性的酶将蛋白分解为肽段,并且一条肽段中仅含有一对二硫键,如链间二硫键或链内二硫键。二硫键具有复杂多样性,其中也包含酶解肽段同时包含二对二硫键,如胰岛素类经特异性酶解后同时包含了链间和链内二硫键,我们在先前的研究中利用了部分还原酶解与质谱不同的裂解方式多种手段成功解析了胰岛素类的

复杂二硫键<sup>[8]</sup>。然而对于 FSH 来说,二硫键类型更加复杂多样,酶切的肽段可能包含多个半胱氨酸残基,不局限于以上两种二硫键的组合方式,尤其是  $\alpha$  亚基中还存在 2 对相邻半胱氨酸分别与其他位置半胱氨酸成二硫键的情况,分别为 C31、C32 和 C59、C60,要求水解酶必须在这 2 个相邻半胱氨酸之间进行酶解才可能有效鉴别。其他 GPHs 家族也同样存在此类棘手问题,鉴于现实存在的技术难点,目前在新药申报审评中对该类产品的特性鉴定二硫键鉴别并未做出明确要求,如每个亚基的每对二硫键是否可以定位并具有一级二级质谱信息等。因此,给新药审评机构相关药学或质量控制指导原则的制定带来困扰,同时企业申报过程中对该类产品二硫键解析也没有明确的方向。

有关报道文献利用了非特异性酶和特异性酶联合酶解的方式定位了 FSH 的  $\beta$  亚基 6 对二硫键<sup>[9]</sup>,但近年来  $\alpha$  亚基的二硫键定位未见文献报道。本研究仍采用非特异性枯草杆菌酶和特异性胰蛋白酶



A - 肽段 CP = GC 提取离子流图; B - 肽段 CTL = CVAK 提取离子流图; C - 肽段 LQC = AC 提取离子流图; D - 肽段 CF = HCS 提取离子流图; E - 肽段 TC = TCY 提取离子流图。

A - peptide CP = GC extraction ion flow diagram; B - peptide CTL = CVAK extraction ion flow diagram; C - peptide LQC = AC extraction ion flow diagram; D - peptide CF = HCS extraction ion flow diagram; E - peptide TC = TCY extraction ion flow diagram.

图7  $\alpha$  亚基二硫键肽段提取离子流

Fig. 7 Extracted ion chromatogram of alpha subunit disulfide peptide

联合水解 FSH, 其优势主要有几点: ①枯草杆菌酶有利于释放亚基的紧密构象; ②防止形成 1 个以上的 S-S 桥的团簇, 分离出单个半胱氨酸残基的肽段; ③提供有助于解析质谱数据的裂解肽段。采用该种策略可以产生足以分开二硫键配对位点的多肽片段, 但也不可避免肽段长度过小, 响应较低的问题。经多次重复实验表明,  $\beta$  亚基输入全序列解析, 每对二硫键均有多对肽段相匹配, 二级碎片质量良好, 可明确定位。 $\alpha$  亚基可识别二硫键的肽段较  $\beta$  亚基, 长度更小, 响应更低, 并且保留时间靠前, 还出现肽段保留时间相近或共流出的现象,  $\alpha$ :C7 =  $\alpha$ :C31 和  $\alpha$ :C59 =  $\alpha$ :C87 解析难度最大, 建议鉴定  $\alpha$  亚基二硫键时, 可直接提取目标肽段的  $m/z$  或输入目标肽段序列进行二级解析, 同时增加非还原酶切后还原处理的样品进行对比佐证。另外, 在前处理过程中, 不可避免地有少量半胱氨酸发生交换反应, 在解析过程中也可发现少部分游离的半胱氨酸或二硫键交换的产物, 应注意枯草杆菌酶的选择和浓度、缓冲体系及 pH、仪器状态等, 保证实验的重现性和相应目标肽段的重复检出。

本研究探讨了重组人促卵泡激素二硫键的定位方法, 并成功鉴定出  $\beta$  亚基 6 对二硫键和  $\alpha$  亚基 5 对二硫键, 为 FSH 乃至长效 FSH (如 FSH-CTP, FSH-Fc 等)

二硫键连接方式的质量控制提供新思路, 也为制定 GPHs 家族类生物制品的药学评价指导原则提供借鉴。

## REFERENCES

- CAHOREAU C, KLETT D, COMBARNOUS Y. Structure-function relationships of glycoprotein hormones and their subunits' ancestors. [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015, 6:26.
- ULLOA-AGUIRRE A, ZARIÑÁN T, JARDÓN-VALADEZ E, et al. Structure-function relationships of the follicle-stimulating hormone receptor[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9:707.
- BOUSFIELD G R, HARVEY D J. Follicle-stimulating hormone glycobiochemistry[J]. *Endocrinology*, 2019, 160(6):1515-1535.
- XU H, et al. Identification and characterization of disulfide bonds in proteins and peptides from tandem MS data by use of the Mass Matrix MS/MS search engine[J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(1), 138-144.
- WANG X Y, YAN G Q, ZHOU X W, 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, 7(41):1505-1512.
- YIN H R, ZHANG Y, FANG X X, et al. Analysis and study on the primary structure of the lysozyme using UPLC-Q TOF MS[J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2023, 43(1):12-19.
- ZHAO X Y, LI M, WU G, et al. Primary structure characterization of anti-CD79b antibody-vc-MMAE[J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2023, 58(1):33-40.
- HU X Y, DINGX L, SUN Y, et al. Comprehensive analysis of insulin products complex disulfide bonds structure by high resolution mass spectrum[J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59(1):188-197.
- AMORESANO A, ORRÙ S, SICILIANO R A, et al. Assignment of the complete disulphide bridge pattern in the human recombinant follitropin  $\beta$ -chain [J]. *Biol Chem*, 2001, 383(6):961-968. (收稿日期:2024-07-30)