联合酶解法结合 UPLC Q-TOF 高分辨质谱检测重组水蛭素蛋白的二硫键结构

徐金华[1,2]，赵丽丽[2,3]，柳常青[1]，张贵民[4]，刘　忠[4*]

（1. 山东新时代药业有限公司，山东临沂 273400；2. 哺乳动物细胞高效表达国家工程实验室，山东临沂 273400；
3. 鲁南新时代生物技术有限公司，山东临沂 273400；4. 鲁南制药集团股份有限公司，山东临沂 276000）

摘要：采用联合酶切法结合 UPLC Q-TOF 高分辨质谱解析重组水蛭素蛋白的复杂二硫键交联结构。首先从蛋白水平验证重组水蛭素蛋白是否含有游离半胱氨酸，包括高分辨质谱表征相对分子质量和定量检测游离巯基；然后利用单一酶解法标注每个或每组二硫键在蛋白序列中所处的位置；最后根据单酶所测结果，设计混合酶切的方式确定具体的二硫键配对方式，并利用二硫苏糖醇还原法加以验证，最终确证重组水蛭素蛋白的二硫键位置。结果显示，重组水蛭素蛋白存在 10 个半胱氨酸，共形成 5 对二硫键，分别为 Ṣ1（Cys1-Cys2）、Ṣ2-Ṣ3（Cys3-Cys5/Cys4-Cys6 或 Cys3-Cys6/Cys4-Cys5）、Ṣ4（Cys7-Cys9）和 Ṣ5（Cys8-Cys10）。

关键词：UPLC Q-TOF 高分辨质谱；二硫键；蛋白类药物；联合酶解

中图分类号：O657.63；TQ937　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2023）11-1636-10

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.11.013

Determination of the Disulfide Bonds in Recombinant Hirudin Protein by Joint Enzymes Digestion with UPLC Q-TOF High Resolution Mass Spectrometry

XU Jinhua[1,2], ZHAO Lili[2,3], LIU Changqing[1], ZHANG Guimin[4], LIU Zhong[4*]

(*1. Shandong New Time Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 273400; 2. State Engineering Lab. of High Expression of Mammalian Cells, Linyi 273400; 3. Lunan New Era Biotechnology Co., Ltd., Linyi 273400; 4. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000*)

ABSTRACT: The complex disulfide crosslinking structure of recombinant hirudin protein was analyzed by joint enzyme digestion with UPLC Q-TOF high resolution mass spectrometry. It was verified whether the recombinant hirudin protein contained free cysteine from the protein level by high resolution mass spectrometry and the free thiol quantitative detection. Then, single enzyme method was used to label the position of each or each group of disulfide bonds in the protein sequence. Finally, according to the results of the single enzyme, the specific disulfide bond pairing method was designed and verified by dithiothreitol reduction method, and the disulfide bond position of recombinant hirudin protein was finally confirmed. It was showed that there were ten cysteine residues included in recombinant hirudin protein sequence, they could establish five pairs of disulfide bonds, including Ṣ1 (Cys1-Cys2), Ṣ2-Ṣ3 (Cys3-Cys5/Cys4-Cys6 or Cys3-Cys6/Cys4-Cys5), Ṣ4 (Cys7-Cys9) and Ṣ5 (Cys8-Cys10).

Key Words: UPLC Q-TOF high resolution mass spectrometry; disulfide bond; protein drug; joint enzyme digest

近 10 年来，现代生物质谱学发展非常迅速，大幅提升了蛋白质分子的定性、定量和翻译后修饰的分析能力，其中二硫键的定位是蛋白质一级结构分析中非常重要的一个方面[1—2]。二硫键是蛋白质多肽中一类由 2 个半胱氨酸（cysteine，Cys）形成

收稿日期：2022-09-30

基金项目：山东省重点研发计划（泰山产业领军人才工程）项目（2018TSCYCX-30、tscy20200329、tscx202306088）

作者简介：徐金华（1987—），女，硕士，从事药物质量表征研究。

通信作者：刘　忠（1975—），男，博士，高级研究员，从事蛋白药物研究与开发。

E-mail：clevertree@163.com

的共价键，对稳定蛋白质的空间结构、维持正确的折叠构象、保持及调节其生物活性等都有至关重要的作用[3—5]。

重组水蛭素蛋白主要用于术后血栓形成、体外循环、血管成形术和深静脉血栓形成等的抗血栓治疗，是一种广泛应用的基因工程药物[6]。对蛋白质类药物中的二硫键进行定位，对于质量控制有非常重要的意义。传统定位二硫键的方法主要为非片段法和片段法：非片段法包括 X 射线衍射晶体结构解析法、多维核磁共振波谱法和合成对照法等；片段法包括对角线法、二硫键异构及突变分析法、酶解法和化学裂解法、部分还原测序法以及氰化半胱氨酸裂解法等。由于二硫键多肽分子的二级质谱图非常复杂，这些传统的二硫键质谱分析费时、费力且不准确。现代质谱技术因具有操作简单、分析快速、灵敏度高等优点，逐渐成为二硫键分析的重要手段。

建立使用 LC-MS 检测二硫键的方法，首先要利用特异性的蛋白质内切酶（如胰蛋白酶、内切酶 Lys-C 等）在非还原条件下将蛋白酶解，得到含二硫键的肽段；其次，比较酶切肽段实测得到的精确相对分子质量与理论值的差异，确认是否能够检测到二硫键；然后，部分样品经还原剂还原，使二硫键打开，作为对照组样品进行确认。

本研究利用联合酶解法结合 Q-TOF 高分辨质谱技术对重组水蛭素蛋白中参与二硫键配对的多肽进行解析，结合 UNIFI 软件（1.9.3.071）分析和手动谱图确认，准确地获得了二硫键配对的可靠信息。同时，对比非还原条件和还原条件下处理的 2 组样品。以期为 Q-TOF 高分辨质谱技术在重组水蛭素蛋白和同类型产品二硫键解析的应用中提供研究思路和参考。

1 仪器与试药

Neo2 型多功能酶标仪（美国 BioTek 公司）；XevoG2-XS Q-TOF 型高分辨质谱仪和 Acquity UPLC H-Class 型超高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）。

重组水蛭素蛋白（山东新时代药业有限公司自制，批号 F00820180301M，于 2 ～ 8 ℃保存）；游离巯基检测试剂盒（产品名称 Measure-iT™ Thiol Assay Kit，美国 Invitrogen 公司，于 －20 ℃保存，批号 M30550）、胰蛋白酶（批号 V511C）、胰蛋白酶 / 内切酶 Lys C（批号 V507A）、内切酶 Glu C（批号 V165A）、内切酶 Asp N（批号 VA116A）均购于美国 Promega 公司，均于 －20 ℃保存。

N- 乙基马来酰亚胺（NEM，美国 Thermo 公司，规格 25 g，批号 23030）；碘乙酰胺（IAM，美国 Sigma 公司，规格 10 g，批号 16125）；二硫苏糖醇（DTT，德国 Merck 公司，规格 25 g，批号 1114740025）；2- 氨基 -2-（羟甲基）-1,3- 丙二醇（Tris，北京欣惠泽奥科技有限公司，规格 100 g，批号 18C0256050）；乙腈和甲酸为质谱级，尿素、盐酸胍、盐酸、氨水、乙酸钠均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定位重组水蛭素蛋白中二硫键配对方式的试验原理

重组水蛭素蛋白中的二硫键定位试验照图 1 所示的试验思路进行检测。

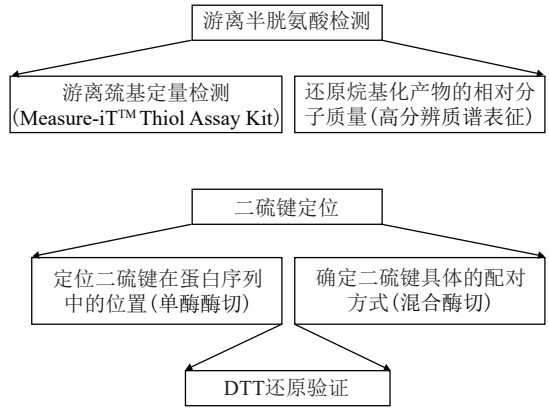


图 1 定位重组水蛭素蛋白中二硫键配对方式的原理示意图

Fig.1 Schematic Diagram of Disulfide Bond Pairing Mode of Recombinant Hirudin Protein

2.2 游离半胱氨酸的检测

2.2.1 游离巯基的定量检测

重组水蛭素蛋白序列中含有 10 个半胱氨酸，能形成 5 对二硫键。此蛋白在纯化的过程中会经由包涵体的形式发生变性 - 复性的反应，若发生不正确折叠或二硫键错配，会导致半胱氨酸残基的产生，因此会有游离巯基的存在。荧光反应试剂能与游离

巯基基团反应，形成荧光产物，其荧光强度与分析物中游离巯基基团的含量呈正相关。基于此，通过检测荧光强度可以计算样品游离巯基的含量。

采用 Measure-iT™ Thiol Assay Kit（M30550）试剂盒定量检测供试品中的游离巯基，在试验开始前需将所用试剂平衡至室温，然后取游离巯基检测试剂盒中的定量标准品 3 mg，加入超纯水 150 μL 进行溶解，配制成 110 mmol/L 的贮备液；再取上述贮备液 5 μL，加入超纯水 4 995 μL，配制成 110 μmol/L 标准品；然后，取 110 μmol/L 标准品 100 μL 加至超纯水 900 μL 中，稀释成 11 μmol/L 标准品；最后，取 11 μmol/L 标准品 100 μL 加至超纯水 1 000 μL 中，稀释成 1 μmol/L 的标准品工作液。

用超纯水稀释上述标准品工作液，得到浓度为 1、0.8、0.5、0.4、0.2、0.1、0.05 和 0 μmol/L 的终浓度标准品溶液。根据用量，用游离巯基检测试剂盒中的试剂稀释液成分 B 100 倍稀释定量试剂成分 A，标记为反应物工作液（需注意，本试剂不能用玻璃容器进行稀释），使用时间为 1 h。取反应物工作液 100 μL，加至黑色 96 孔板中，取浓度为 1、0.8、0.5、0.4、0.2、0.1、0.05 和 0 μmol/L 的终浓度标准品溶液 10 μL，加至相应孔中，混匀；取重组水蛭素蛋白 10 μL，加至相应孔中，混匀。

随后置酶标仪中进行荧光信号检测，激发和发射波长分别设置为 494 和 517 nm。5 min 之内获得的荧光信号最强，且荧光信号在 1 h 之内可保持稳定（±10%）。以标准品浓度对荧光信号进行线性回归，绘制标准曲线，计算供试品中游离巯基的含量 /(μmol·L^{-1})·(μmol·L^{-1})$^{-1}$。

结果显示，3 个复孔的平均游离巯基含量为 0.503%，说明重组水蛭素蛋白中的半胱氨酸均呈配对状态，未见处于游离状态的半胱氨酸。

2.2.2　高分辨质谱表征还原烷基化产物的相对分子质量

未发生二硫键配对的半胱氨酸在避光条件下会和 IAM 发生烷基化反应，形成相对分子质量增加 57.05 的稳定肽段。如果供试品中含有游离半胱氨酸，与 IAM 反生烷基化应后，其蛋白相对分子质量会发生 *n*×57.05 的增加，其中 *n* 表示未发生二硫键配对的游离半胱氨酸个数[7—8]。

将重组水蛭素蛋白用 pH 7.6 的 50 mmol/L Tris-HCl 溶液（称取 Tris 0.121 1 g，加水约 17 mL 溶解，用盐酸调至 pH 7.6±0.1，并用水定容至 20 mL）稀释至 1 mg/mL，加入终浓度为 20 mmol/L 的 IAM 溶液，置暗处进行烷基化反应 30 min，作为游离半胱氨酸检测组。向重组水蛭素蛋白中加入终浓度为 10 mmol/L 的 DTT 溶液，置 56 ℃还原孵育 30 min 之后，加入终浓度为 20 mmol/L 的 IAM 溶液，置暗处烷基化反应 30 min，作为对照组。如果游离半胱氨酸检测组与未经任何处理的重组水蛭素蛋白相对分子质量一致，且对照组发生了 10×57.05 的相对分子质量增加，则证明重组水蛭素蛋白不含有游离的半胱氨酸。

各样品经去卷积处理后的检测结果显示，对照组的相对分子质量增加 580.8（32 105.95－31 525.15），相当于 10 个半胱氨酸被还原烷基化（10×57.05=570.05）。而只加入 IAM、未经 DTT 还原的重组水蛭素蛋白相对分子质量与原液的相对分子质量一致，表明供试品中不含有未发生二硫键配对的游离半胱氨酸。

2.3　肽段水平的二硫键定位

2.3.1　色谱和质谱条件

色谱条件：色谱柱 Peptide BEH C_{18} 柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）；流动相 A 为 0.1%甲酸溶液，B 为 0.1%甲酸的乙腈溶液，梯度洗脱（0—2 min，A 98%；2—63 min，A 98%—60%；63—63.1 min，A 60%—10%；63.1—66 min，A 10%；66—66.1 min，A 10%—98%；66.1—75 min，A 98%）；流速 0.3 mL/min；检测波长 214 nm；柱温 60 ℃；进样量 10 μL。

质谱条件：分析时长 75 min；数据采集模式 MS^E；检测方式 正离子模式；母离子扫描范围 *m*/*z* 200 ～ *m*/*z* 2 000；毛细管电压 3 kV；锥孔电压 40 V；离子源温度 120 ℃；脱气温度 500 ℃；扫描时间 0.3 s；低碰撞能 6 eV；高碰撞能 20 ～ 45 eV；扫描时间 0.25 s；采集间隔 30 s。

质谱数据的处理是通过 UNIFI 软件（1.9.3.071）查库比对进行分析。需要注意的是，在对胰蛋白酶的单酶酶切数据进行处理参数设置时，漏切位点设置为 1，对于联合酶切的数据，为防止软件在计算过程中遗漏数据，漏切位点设置为 2。

质谱数据处理参数：工具酶 胰蛋白酶、内切酶 Glu C、胰蛋白酶 / 内切酶 Lys C、内切酶 Asp N，翻译后修饰；质荷比误差 $\pm1\times10^{-5}$；碎片误差 $\pm2\times10^{-5}$；数据库 重组水蛭素蛋白氨基酸序列；过滤参数 最小碎片离子为 3，肽段包含“=”号，肽段包含“C”，组分名称不包含“/”。

2.3.2 非还原酶解

NEM 在相对低的 pH 值（pH<6.5）条件下具备较高的烷基化反应能力，因此将重组水蛭素蛋白用 pH 7.6、50 mmol/L Tris-HCl 溶液稀释至 5 mg/mL，即得 5 mg/mL 的水蛭素蛋白溶液。取上述 5 mg/mL 的水蛭素蛋白溶液 20 μL，加入 pH 5.0 变性液（含 100 mmol/L 乙酸钠和 8 mol/L 盐酸胍）80 μL，再加入终浓度为 20 mmol/L 的 NEM 溶液，置 37 ℃孵育 40 min，用于封闭游离的巯基。然后将重组水蛭素蛋白转移至截留相对分子质量为 10 000 的超滤管中进行溶液置换，最终置换到 50 mmol/L Tris-HCl、pH 7.6 的溶液中进行酶解反应。

酶切总共分为 3 种类型，分别是胰蛋白酶单独酶切、内切酶 Glu C 与胰蛋白酶 / 内切酶 Lys C 联合酶切、内切酶 Asp N 与胰蛋白酶联合酶切。其中，单独胰蛋白酶酶切是照酶与蛋白比例为 1 ∶ 50 加入蛋白酶，置 37 ℃水浴孵育 12 h，作为单独酶切样品。在内切酶 Glu C 与胰蛋白酶 / 内切酶 Lys C 的联合酶切中，先照酶与蛋白比例为 1 ∶ 25 加入内切酶 Glu C，于 37 ℃酶切 3 h，然后照酶与蛋白比例为 1 ∶ 50 加入胰蛋白酶 / 内切酶 Lys C，再联合酶切 12 h，作为联合酶切样品 1。在内切酶 Asp N 和胰蛋白酶的联合酶切中，先照酶与蛋白比例为 1 ∶ 25 加入内切酶 Asp N，于 37 ℃酶切 3 h，然后照 1 ∶ 50 的比例加入胰蛋白酶，再联合酶切 12 h，作为联合酶切样品 2。

2.3.3 单独酶切样品的 UPLC Q-TOF 高分辨质谱检测结果

取“**2.3.2**”项下的单独酶切样品，按“**2.3.1**”项下色谱质谱条件进样分析，经数据过滤，结果如表 1 和图 2 所示。每个二硫键所在肽段的 UPLC/MS^E 高分辨质谱图谱背景干净，响应值均大于 10^8，所测肽段的实际相对分子质量与理论相对分子质量相比，误差值均小于 1×10^{-5}，进一步说明所测二硫键肽段的准确性。

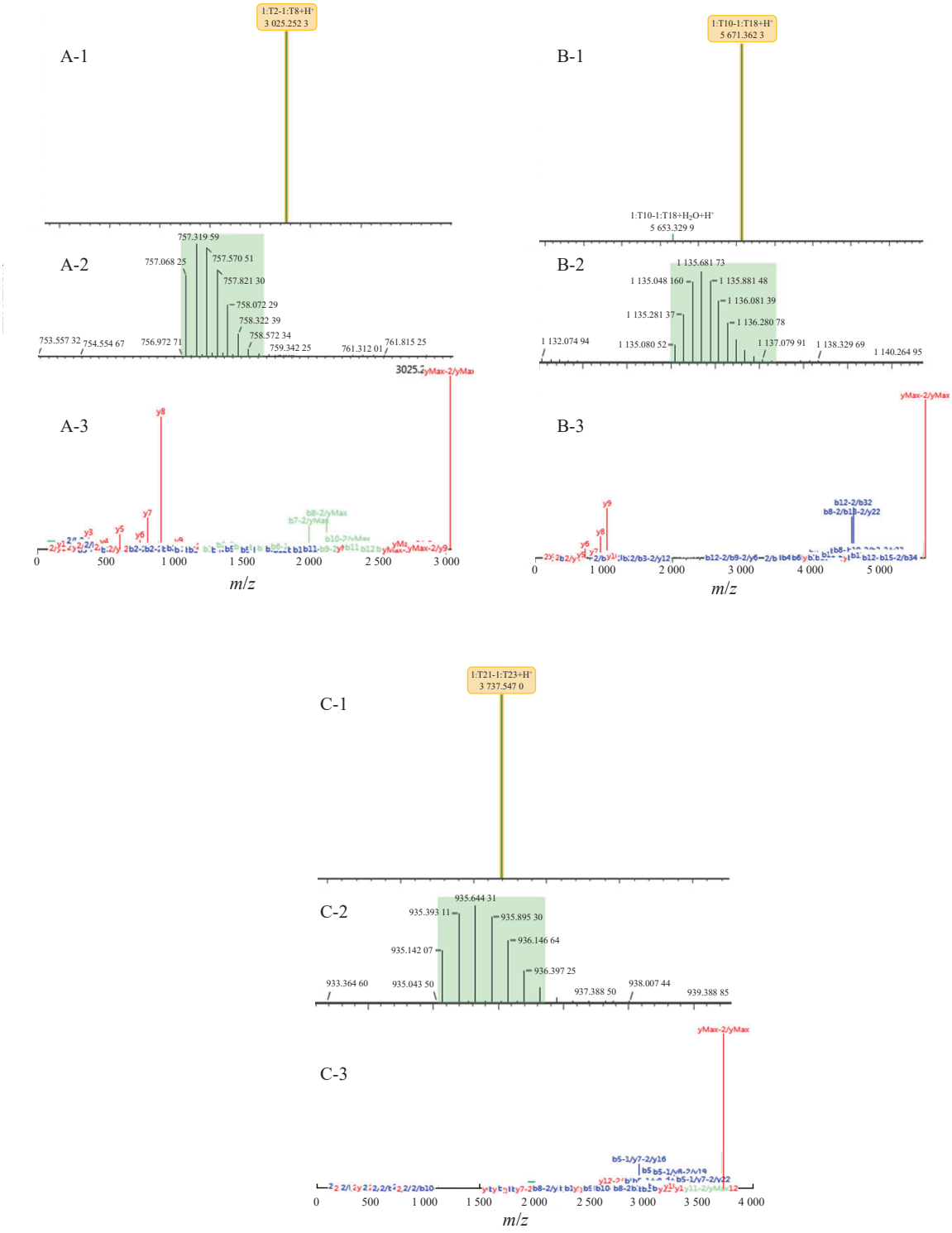
重组水蛭素蛋白经胰蛋白酶单酶非还原酶切之后共得到 3 个二硫键肽段，可以确定的是 Ṣ1 的配对方式为 Cys1-Cys2，其中有 2 个肽段中含有 2 对二硫键，其中 Ṣ2-Ṣ3 所在肽段的检索结果显示，其二硫键存在可能的配对方式为 Cys3-Cys4/Cys5-Cys6、Cys3-Cys5/Cys4-Cys6 和 Cys3-Cys6/Cys4-Cys5 三种方式；Ṣ4-Ṣ5 可能的配对方式为 Cys7-Cys9/Cys8-Cys10、Cys7-Cys10/Cys8-Cys9 两种方式。

样品酶切产生的肽段经在线 LC-MS 检测，总离子流（TIC）图谱如图 3 所示，样品在非还原和还原条件下的酶切肽段均可以较好地分离。由于 DTT 还原剂可特异性地将二硫键打断，通过对比还原前后的样品，可进一步确证以上非还原样品中检测到的含二硫键片段的真实性。

表 1 重组水蛭素蛋白经胰蛋白酶非还原酶切所得的二硫键质谱检测结果

Tab.1 Detection Results of Disulfide Bonds in Recombinant Hirudin Protein Digested by Trypsin under Nonreduction Condition Tested by LC-MS

二硫键	肽段编号	肽段	实测相对分子质量	误差/$\times10^{-6}$	保留时间/min	实测质荷比（*m*/*z*）
Ṣ1	1:T2-1:T8+H^+	CPQNGTEMPGFNDSIR=YLEYDCEAEK	3 025.25	4.1	24.79	757.07
Ṣ2-Ṣ3	1:T10-1:T18+H^+	NCSDSSSPPEGYDENK=FGCAVVNCPLGEIDDETNHDGETYATTIHVVCHYPK=	5 671.36	5.6	30.62	1 135.08
Ṣ4- Ṣ5	1:T21-1:T23+H^+	VGTPCDDCSEYTK=ADNTTSADPVCIPDDGVCFIGSK	3 737.54	3.4	30.68	935.14



A-1—二硫键 Ṣ1 的组分标记图谱；A-2—二硫键 Ṣ1 的质谱同位素图谱；A-3—二硫键 Ṣ1 的碎片可视化图谱；B-1—二硫键 Ṣ2-Ṣ3 的组分标记图谱；B-2—二硫键 Ṣ2-Ṣ3 的质谱同位素图谱；B-3—二硫键 Ṣ2-Ṣ3 的碎片可视化图谱；C-1—二硫键 Ṣ4-Ṣ5 的组分标记；C-2—二硫键 Ṣ4-Ṣ5 的质谱同位素图谱；C-3—二硫键 Ṣ4-Ṣ5 的碎片可视化图谱。

图 2　重组水蛭素蛋白经胰蛋白酶单酶非还原酶切的组分标记图谱和质谱同位素图谱及碎片可视化图谱

Fig.2　The Component Plot Figures, Spectrum Figures and Fragmentation Viewer Figures of Recombinant Hirudin Protein Digested by Single Trypsin

通过以上分析结果，二硫键配对的大体位置目前已经确定，为进一步确证二硫键配对的确切位置指明了方向。肽段 T18 中存在 3 个半胱氨酸，为简化 Ṣ2-Ṣ3 分析，后续研究进一步加入内切酶 Glu C 进行混合酶切。

2.3.4 联合酶切样品 1 的 UPLC Q-TOF 检测结果

取“**2.3.2**”项下的联合酶切样品 1，按“**2.3.1**”项下色谱质谱条件进样分析，重组水蛭素蛋白的二硫键检测结果如表 2 所示。可以看出 Ṣ2-Ṣ3 的二硫键连接减少为 2 种可能的方式：即 Cys3-Cys4/Cys5-Cys6 和 Cys3-Cys5/Cys4-Cys6。Ṣ2-Ṣ3 二硫键肽段的组分标记图谱、质谱同位素图谱以及碎片可视化图谱如图 4 所示。DTT 还原与非还原的 TIC 对比图如图 5 所示：非还原状态下 29.1 min 处的峰在还原 TIC 谱图中消失，也进一步说明 Ṣ2-Ṣ3 在经胰蛋白酶 + 内切酶 Lys C+ 内切酶 Glu C 联合酶切条件下所测结果的准确性。

Ṣ4-Ṣ5 所在的 2 个肽段中，Cys7 和 Cys8 存在于一条肽段中，中间存在 2 个天冬氨酸（D）连接，Cys9 和 Cys10 中间也存在 2 个天冬氨酸（D）。为确定 Ṣ4-Ṣ5 具体的连接方式，后续研究进一步使用胰蛋白酶和内切酶 Asp N 联合酶切的方式进行酶解。

2.3.5 联合酶切样品 2 的 UPLC Q-TOF 检测结果

取“**2.3.2**”项下的联合酶切样品 2，按“**2.3.1**”项下色谱质谱条件进样分析。Asp N 为一种内切型门冬氨酸（Asp）蛋白酶，能特异性水解门冬氨酸的

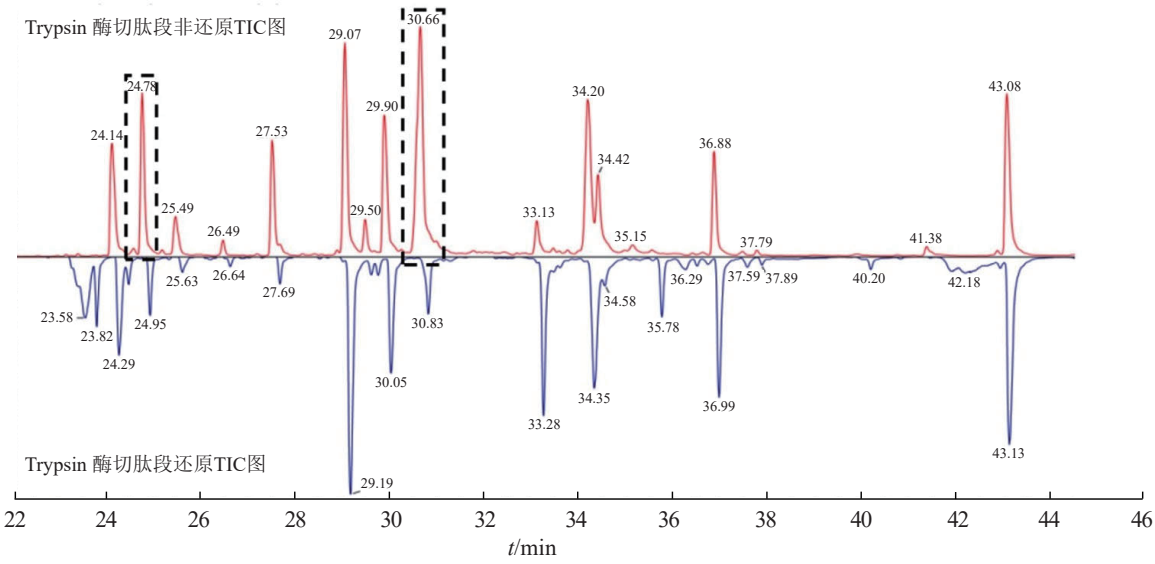


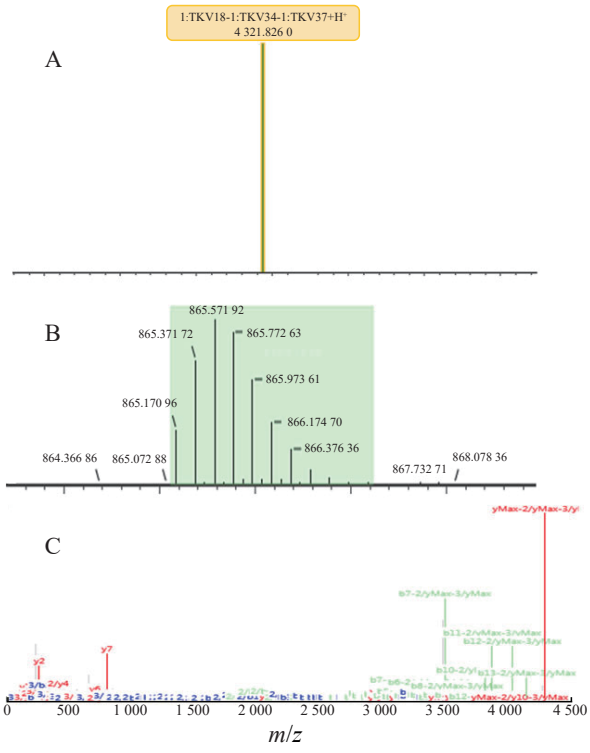
图 3 重组水蛭素蛋白 Trypsin 非还原与还原状态下的 TIC 镜像对比图

Fig.3 TIC Mirror Image of Recombinant Hirudin Protein Digested by Trypsin under Nonreduction and Reduction Conditions

表 2 重组水蛭素蛋白经 Trypsin+Lys C+Glu C 酶解之后的二硫键质谱检测结果

Tab.2 Detection Results of Disulfide Bonds in Recombinant Hirudin Protein Digested by Trypsin+ Lys C+Glu C under Nonreduction Condition Tested by LC-MS

二硫键	肽段编号	肽段	实测相对分子质量	相对分子质量误差/$\times10^{-6}$	保留时间/min	实测质荷比（*m*/*z*）
Ṣ1	1:TKV3-4-1:TKV14+H$^+$	CPQNGTEMPGFNDSIR=YDCE	2 291.890 4	－4.3	23.26	764.635
Ṣ2-Ṣ3	1:TKV18-19-1:TKV34-1:TKV37+H$^+$	NCSDSSSPPEGYDE=FGCAVVN CPLGE=TYATTIHVVCHYPK	4 321.826 0	－4.6	29.10	865.171
Ṣ4-Ṣ5	1:TKV41-1:TKV44+H$^+$	VGTPCDDCSE=ADNTTSADPVC IPDDGVCFIGSK	3 345.348 7	－1.5	32.82	1 115.787



A—组分标记图谱；B—质谱同位素图谱；C—碎片可视化图谱。

图 4　重组水蛭素蛋白经 Trypsin+Lys C+Glu C 混合非还原酶切的组分标记图谱和质谱同位素图谱及碎片可视化图谱

Fig.4　The Component Plot Figure, Spectrum Figure and Fragmentation Viewer Figure of Recombinant Hirudin Protein by Trypsin+Lys C+Glu C Combined Digestion

氨基端，Ṣ4-Ṣ5 经胰蛋白酶 + 内切酶 Asp N 混合酶切之后形成 4 个含有半胱氨酸的肽段，如此便表征出 Ṣ4、Ṣ5 的二硫键连接方式分别为 Cys7-Cys9 和 Cys8-Cys10。所测二硫键信息见表 3 所示，Ṣ4、Ṣ5 的组分标记图谱和质谱同位素图谱及碎片可视化图谱如图 6 所示。

重组水蛭素蛋白经胰蛋白酶 + 内切酶 Asp N 联合酶切后，DTT 还原与非还原 TIC 对比图如图 7 所示。Ṣ1、Ṣ2-Ṣ3、Ṣ4、Ṣ5 在非还原状态下的出峰时间分别为 16.26、28.92、23.00、17.65 min，其中 Ṣ1、Ṣ2-Ṣ3、Ṣ4 在 DTT 还原 TIC 图谱相应位置的质谱峰消失了，说明质谱检测的准确性，但是 Ṣ5 在 17.65 min 的质谱峰在还原 TIC 图谱中并没有消失，这是因为 17.65 min 的质谱峰中，Ṣ5 所在肽段并不是主要的成分（如图 8 所示），其主要成分是不含二硫键的肽段，所以 DTT 还原处理对此处 TIC 峰的影响不大。根据图谱可以看出，质荷比 *m*/*z* 为 628.26 的 Ṣ5 肽段在 DTT 还原处理之后信号明显降低，进一步证实质谱搜索结果的可靠性。

3　讨论

对于蛋白类药物来说，二硫键是建立和维持其三维空间结构和功能的关键特性，研究二硫键在蛋白质中的位置有助于进一步揭示蛋白的高级结构及

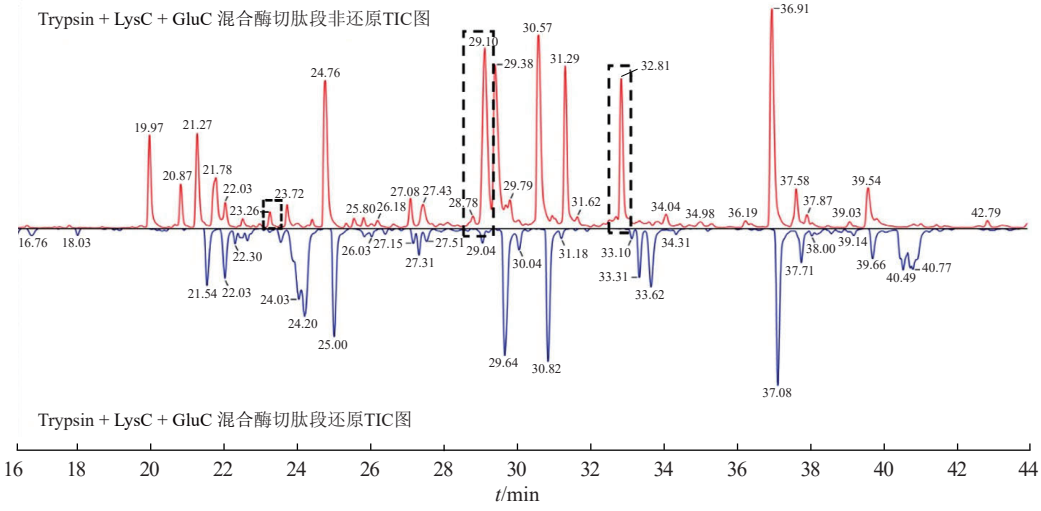
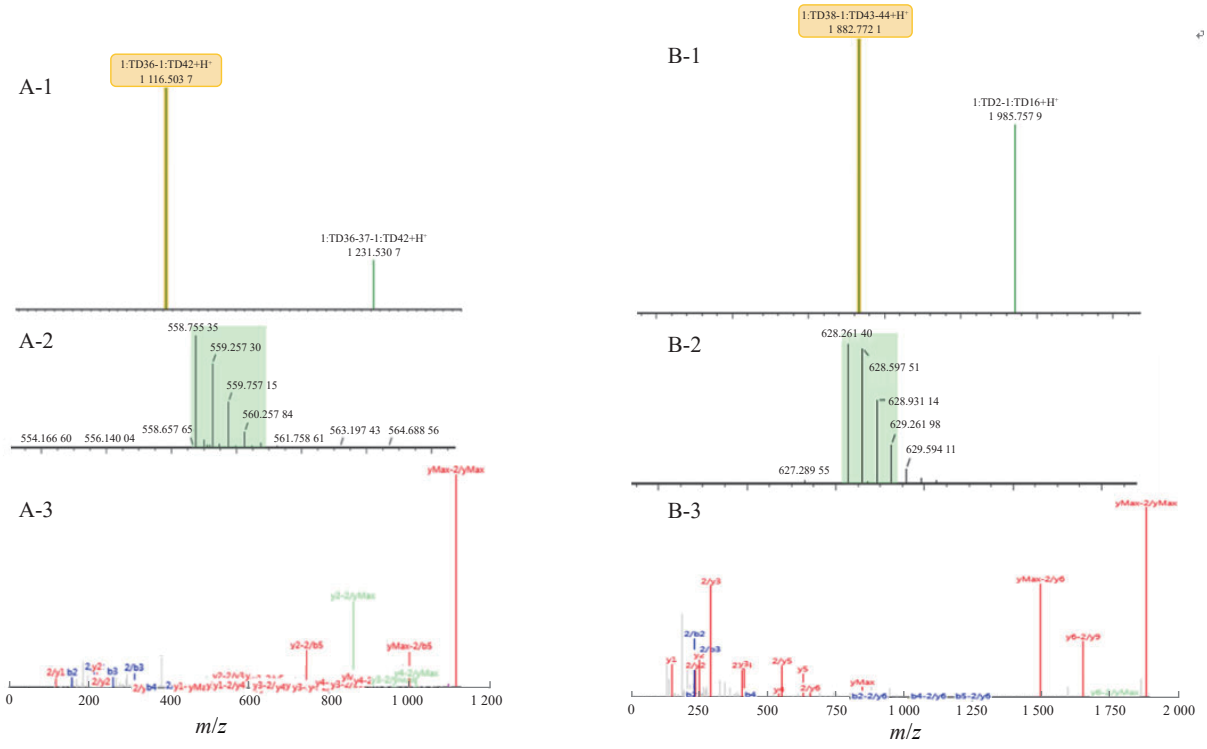


图 5　重组水蛭素蛋白经 Trypsin+Lys C+Glu C 混合酶切非还原与还原状态下的 TIC 镜像对比图

Fig.5　TIC Mirror Image of Recombinant Hirudin Protein Digested by Trypsin+Lys C+Glu C under Nonreduction and Reduction Conditions



A-1—Ṡ4 的组分标记图谱；A-2—Ṡ4 的质谱同位素图谱；A-3—Ṡ4 的碎片可视化图谱；
B-1—Ṡ5 的组分标记图谱；B-2—Ṡ5 的质谱同位素图谱；B-3—Ṡ5 的碎片可视化图谱。

图 6　重组水蛭素蛋白经 Trypsin+Asp N 联合非还原酶切的组分标记图谱和质谱同位素图谱及碎片可视化图谱

Fig.6　The Component Plot Figures, Spectrum Figures and Fragmentation Viewer Figures of Recombinant Hirudin Protein by Trypsin+Asp N Combined Digestion

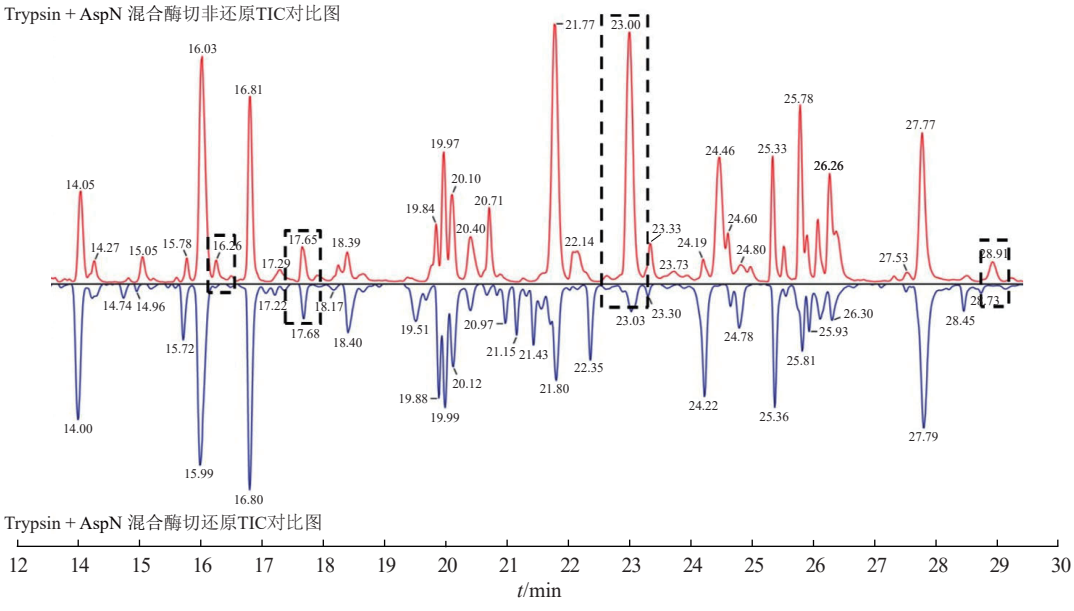


图 7　重组水蛭素蛋白经 Trypsin+Asp N 混合酶切非还原与还原状态下的 TIC 镜像对比图

Fig.7　TIC Mirror Image of Recombinant Hirudin Protein Digested by Trypsin+Asp N under Nonreduction and Reduction Conditions

表 3　重组水蛭素蛋白经 Trypsin+Lys C+Glu C 酶解后的二硫键质谱检测结果

Tab.3　Detection Results of Disulfide Bonds in Recombinant Hirudin Protein Digested by Trypsin+ Lys C+ Glu C under Nonreduction Condition Tested by LC-MS

二硫键	肽段编号	肽段	实测相对分子质量	相对分子质量误差/$\times10^{-6}$	保留时间/min	实测质荷比(m/z)
Ṣ1	1:TD2-1:TD16+H^+	CPQNGTEMPGFN=DCEAEK	1 985.758	－4.8	16.26	662.591
Ṣ2-Ṣ3	1:TD18-1:TD30-31-1:TD33+H^+	NCS=FGCAVVNCPLGEID=DGETYATTIHVVCHYPK	3 687.592	－8.3	28.92	738.324
Ṣ4	1:TD36-1:TD42+H^+	VGTPC=DPVCIP	1 116.504	－2.5	22.99	558.756
Ṣ5	1:TD38-1:TD43-44+H^+	DCSEYTK=DDGVCFIGSK	1 882.772	－6	17.66	628.262

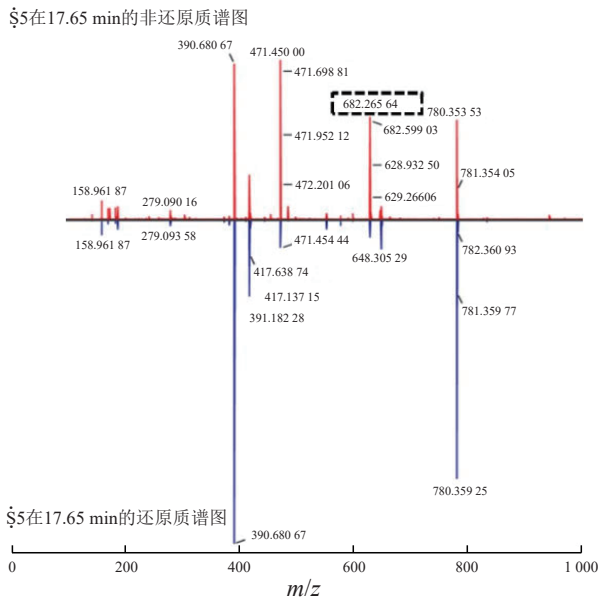


图 8　Ṣ5 在 17.65 min 处的还原与非还原镜像质谱图

Fig.8　Mirror Image of Ṣ5 Spectrum at 17.65 min under Nonreduction and Reduction Conditions

其生物学功能。二硫键的正确连接也是蛋白质类生物大分子药物质量控制的重要指标，在蛋白质的结构分析中，准确定位和表征二硫键就显得尤为重要。由于二硫键会出现不完全配对和错配[9—10]，因此对于半胱氨酸含量比较多的蛋白类药物来说，表征其二硫键配对方式比确定氨基酸序列更加耗时并更具有挑战性。目前，表征二硫键的常用方法是蛋白酶切结合 LC-MS 的方法；与其他方法相比，质谱分析以其快速、准确、灵敏和易于自动化等显著特点已成为当前蛋白质组学、核酸和药物代谢等生命科学研究领域的重要手段，并成功地应用于二硫键的定位分析[11—13]。但是由于可能存在大量的肽段二硫键异构体[4]，使得含有半胱氨酸较多的蛋白类药物的二硫键表征比较困难。如果一种蛋白药物含有 8 个半胱氨酸，那么会存在 105 种可能的二硫键配对方式，而选择合适的样品前处理方式可以大大简化分析的难度。

在非还原 Trypsin 酶切样品中，2 个含有半胱氨酸的酶切肽段将以二硫键连接的方式形成一个肽段，以实际测到的肽段相对分子质量与可能的二硫键异构体的理论肽段相对分子质量相比较，可以判断二硫键的位点及连接方式。重组水蛭素蛋白的氨基酸序列上含有 10 个理论的半胱氨酸位点，存在 5 对理论二硫键，可形成多种组合方式，因此需简化分析的复杂程度。

每种质谱在样品采集方式和碎裂方式上的不同会使检测结果存在差异，因此，对于只拥有一台高分辨质谱仪的实验室来说，为提高质谱检测结果的准确性和可靠性，需充分利用不同的样品处理方式，如多种酶切方式、还原验证等方式，使单一质谱的检测得到最大限度利用。

本实验室结合蛋白质分子在溶液内的非还原酶解和 LC-MS/MS，对重组水蛭素蛋白的二硫键配对方式进行分析，并提供确定这些二硫键配对方式的试验证据。经过还原剂烷基化后的酶切肽图中，由于二硫键的断裂，2 个半胱氨酸形成自由巯基结合烷基化试剂，原有的二硫键连接肽段消失，并产生新的烷化的肽段，以此作为对照，进一步证明质谱表征结果的准确性，使单一质谱的检测性能得到最大限度利用。

重组水蛭素蛋白的 5 对理论二硫键，经不同混合酶在非还原条件下联合酶切会产生 4 个不重复的含二硫键的片段。检测结果表明，各酶切条件下的

含二硫键肽段的母离子相对分子质量均与理论片段吻合，基本明确了水蛭素重组蛋白的二硫键配对方式。由于 Ṣ2-Ṣ3 两对二硫键在本测试中出现在同一个肽段当中，现有试验条件下只能确定肽段由 2 对二硫键连接，连接方式有 2 种可能。

综上所述，本研究成功建立了从单酶到混合酶切结合 UPLC Q-TOF 高分辨质谱法检测蛋白类药物复杂、未知二硫键连接方式的表征方法，为蛋白类药物二硫键定位研究提供了一定的参考。

参考文献：

[1] GUPTA K, KUMAE M, BALARAM P. Disulfide bond assignments by mass spectrometry of native natural peptides: cysteine pairing in disulfide bonded conotoxins [J]. *Anal Chem*, 2010, **82**: 8313-8319.

[2] CHUMSAE C, GAZA-BULSECO G, LIU H. Identification and localization of unpaired cysteine residues in monoclonal antibodies by fluorescence labeling and mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2009, **81**: 6449-6457.

[3] WEN D, WILDES C P, SILVIAN L, *et al*. Disulfide structure of the leucine-rich repeat C-terminal stalk region of Nogo-66 receptor [J]. *Biochemistry*, 2005, **44**: 16491-16501.

[4] ZHANG W, MARZILLI L A, ROUSE J C, *et al*. Complete disulfide bond assignment of a recombinant immunoglobulin G4 monoclonal antibody [J]. *Anal Biochem*, 2002, **311**: 1-9.

[5] WETZEL R. Assignment of the disulphide bonds of leukocyte interferon [J]. *Nature*, 1981, **289**: 606-607.

[6] 郑巧燕. 水蛭素及重组水蛭素的研究概况[J]. 海峡药学, 2013, **25**(8): 108-111.

[7] 仇晓燕, 崔 勐, 刘志强, 等. 蛋白质中二硫键的定位及其质谱分析[J]. 化学进展, 2008, **20**(6): 975-983.

[8] 张 平. HPLC MALDI-TOF质谱法检测IFN-α2b二硫键结构[J]. 海峡药学, 2016, **28**(5): 65-69.

[9] 陶 磊, 裴德宁, 韩春梅, 等. 液质联用进行干扰素理化对照品的一级结构鉴定及比对研究[J]. 药学学报, 2015, **50**(1): 75-80.

[10] 赵 峰, 张宜俊, 冉艳红, 等. rhIL-12 二硫键、*N*-糖基化位点及C端氨基酸序列分析[J]. 中国生物工程杂志, 2014, **34**(5): 3953.

[11] AHSAN F, ARIF A, MAHMOOD N, *et al*. Characterization and bioassay of post-translationally modified interferon α-2b expressed in *Escherichia coli* [J]. *J Biotechnol*, 2014, **184**: 11-16.

[12] XIE H, CHAKRABORTY A, AHH J, *et al*. Rapid comparison of a candidate biosimilar to an innovator monoclonal antibody with advanced liquid chromatography and mass spectrometry technologies [J]. *Mabs*, 2010, **2**: 379-394.

[13] XIE H, CHAKRABORTY A B, CHEN W. Towards fast mapping of protein disulfide bonds: an integrated workflow for automatic assignment of disulfide pairing [J]. *Mass Spec*, 2010, **9**: 8-10.