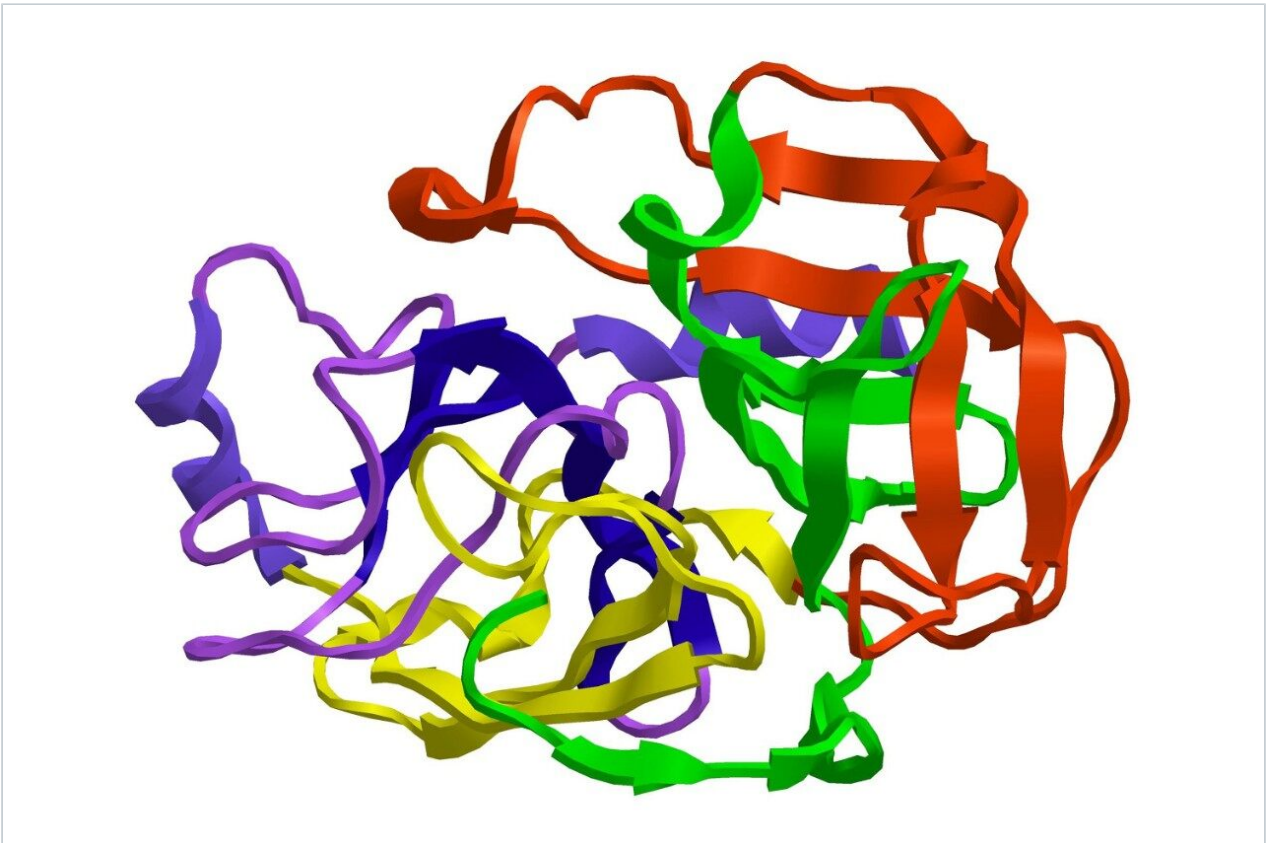


应用纪要

氢氘交换与SELECT SERIES Cyclic IMS质谱仪联用以实现更高的工作流程效率

Lindsay Morrison, Malcolm Anderson, Alexandre Gomes

Waters Corporation



仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

氘代交换越来越多地用于大分子蛋白质和蛋白质复合物的研究以及候选药物的筛选应用中。这些更具挑战性的实验推动了改善LC-MS系统容量方面性能的需求。新型SELECT SERIES Cyclic IMS具有更高的离子淌度和质量分辨率，可提供更高的峰容量以应对这些挑战。本研究相对于SYNAPT G2-Si和SYNAPT XS以及样品有限的应用，证明了循环IMS系统用于氘代交换的性能。

优势

- SELECT SERIES Cyclic IMS系统具有更出色的灵敏度、检测器动态范围、质量分辨率和离子淌度性能，改善了肽鉴定结果，并减少了高丰度肽的峰饱和现象
- Cyclic IMS系统的灵敏度和峰容量更高，预计允许使用截短的色谱梯度，从而提高每日通量并减少酰胺交换

简介

表征蛋白质和蛋白质复合物的高级结构，是理解蛋白质作用的功能和机理必不可缺的一环，对治疗性生物分子的评估和开发至关重要。氘代交换(HDX)有助于定位结合位点和构象变化区域，并提供有关柔性和蛋白质动力学的信息。HDX与NMR、冷冻电镜和X射线晶体学等高空间分辨率技术相辅相成，并且通常能够以更高的通量获得结果。因此，HDX已被用作一种经济有效的表位定位筛选方法，进一步提升该方法的通量预计将带来诸多益处¹。

酰胺氘代交换在溶液中自发发生，可用于监测沿蛋白质骨架发生的氢键保护现象。典型的实验方案包括用氘代缓冲液稀释蛋白质储备液。在氘代缓冲液中温育可变的时间段，可以在数秒至数小时内测量蛋白质骨架动力学。氘含量的测量过程包括低温、低pH淬灭，然后进行快速胃蛋白酶酶解和LC-MS分析。缩短色谱梯度有助于提高氘保留性能，但会导致谱图复杂程度增加，难以进行计算机模拟数据库搜索。因此，实验数据的质量通常需要在蛋白质大小与色谱分析时间之间进行平衡。近年来，业界愈加倾向于研究通常具有数十个亚基的大分子蛋白质复合物，谱图复杂程度日益成为一项挑战。

实验

样品描述

用10 mM磷酸盐缓冲液(pH 7.0)稀释磷酸化酶B (部件号186006930 < <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186006930-hdx-phos-b-check-standard.html>>) , 得到浓度为8、16和32 μM 的储备液。

方法条件

将完整蛋白按1:20的比率与10 mM磷酸盐缓冲液(pH 7.0)混合, 在0 °C下用100 mM磷酸盐缓冲液(pH 2.4)以1:1稀释液淬灭, 然后进样至液相色谱系统中。使完整蛋白通过Waters Enzymate胃蛋白酶色谱柱, 并将其收集到VanGuard C₁₈捕集柱上。在0 °C下使用1 mm \times 100 mm BEH C₁₈色谱柱进行LC-MS分析。梯度、捕集时间和流速设置见下表。利用7 min的有效梯度, 通过HDMS^E方法使用单圈或多圈离子淌度池分析肽段。HDMS^E是一种数据非依赖型采集模式, 能够以快速周期交替采集所有肽的低能量和高能量数据。利用保留时间和离子淌度漂移时间对齐进行数据处理, 以关联肽段母离子及其相应的碎片离子。Cyclic IMS的行波及其他相关仪器参数如下所列; SYNAPT G2-S和SYNAPT XS的仪器参数之前已有报道²。

液相色谱条件

液相色谱系统:	配备HDX-2自动化管理器的ACQUITY UPLC M-Class
检测器:	SELECT SERIES Cyclic IMS
样品瓶:	全回收
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ VanGuard预柱, 2.1 \times 5 mm, 部件号186003975; ACQUITY UPLC 1 \times 100 mm BEH C ₁₈ 色谱柱, 1.7 μm 颗粒, 部件号186002346; Enzymate BEH胃蛋白酶色谱柱, 部件号186007233
柱温:	0 °C
样品温度:	0 °C
进样体积:	50 μL

流速： 40 $\mu\text{L}/\text{min}$

流动相A： 含0.1%甲酸的水溶液

流动相B： 含0.1%甲酸的乙腈溶液

梯度表1

时间 (min)	流速 ($\mu\text{L}/\text{min}$)	%A	%B	曲线
捕集： 0.0	75	100	NA	6
捕集： 0.2	100	100	NA	6
捕集： 1.0	100	100	NA	6
捕集： 1.2	200	100	NA	6
捕集： 2.0	200	100	NA	6
捕集： 2.9	75	100	NA	6
0.0	40	95	5	6
7.0	40	65	35	6
7.5	40	15	85	6
8.5	40	15	85	6
9.0	40	95	5	6
12.0	40	95	5	6

质谱条件

质谱系统： SELECT SERIES Cyclic IMS

电离模式： 正

采集范围： 50~2000

毛细管电压： 2.8 kV

碰撞能量： 20 V~29 V

锥孔电压:	30V
StepWave1漂移	8V
StepWave2漂移	12V
圈数	1~2
跑道行波电压	25V
跑道行波波速	375 m/s
ADC推进次数/bin	1

数据管理

色谱软件:	MassLynx SCN 1016
质谱软件:	Quartz 2.4.1
信息学软件:	PLGS 3.0.3, DynamX 3.0

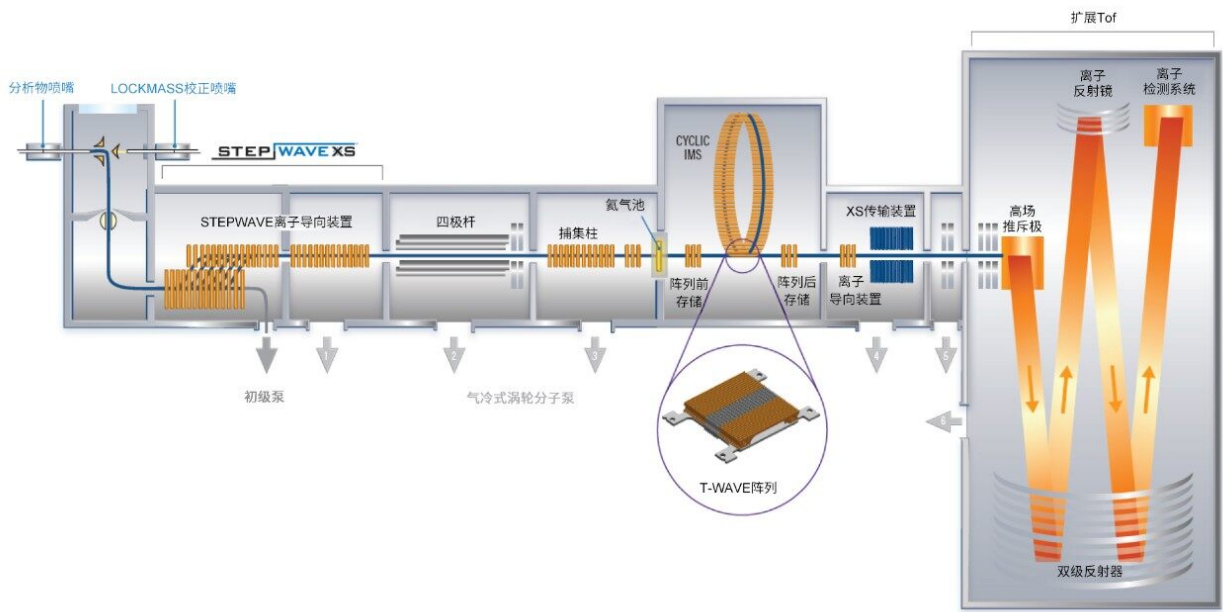


图1.SELECT SERIES Cyclic IMS仪器示意图

结果与讨论

实施初步实验，对Cyclic IMS系统相对于SYNAPT G2-Si和最近发布的SYNAPT XS质谱仪的性能进行基准测试。在SYNAPT XS和Cyclic IMS中，使用32 μ M蛋白质储备液和相同的StepWave设置，通过HDMS^E采集数据。利用磷酸化酶B的肽图分析实验，根据复杂混合物中的肽鉴定结果来评估系统性能。在PLGS 3.0.3中使用标准处理参数单独处理三次重复进样，然后将所得的肽文件导入DynamX中，并按照之前所述的方法进行筛选³。图2中报告了在这三种仪器上鉴定出的肽数量和所得到的序列覆盖率。相对于SYNAPT G2-Si，在SYNAPT XS和Cyclic IMS上观察到更出色的性能，包括鉴定出更多的肽数量并得到更高的序列覆盖率。使用SYNAPT G2-Si、SYNAPT XS和Cyclic IMS分别鉴定出约240、360和560种肽。在SYNAPT XS和Cyclic IMS中增加StepWave XS装置可以提高灵敏度，从而可能有助于增加鉴定结果数量。Cyclic IMS系统还拥有其他多种属性，包括可扩展的IMS分辨率、XS传输装置和双增益ADC检测系统，相对于SYNAPT XS可能具有更高的性能。重要的是，双增益ADC为高丰度离子提供了更宽的动态范围。采用三种仪器获得的序列覆盖率分别为89%、98.5%和100%。SYNAPT XS和Cyclic IMS在覆盖率方面的微小差异是覆盖率已经非常高的直接结果 - 具有更长序列的蛋白质可能会得到更高的覆盖率。因此，针对Cyclic IMS实施了上样量和梯度截短实验，以评估在较低上样量和较短色谱分离时间下的HDX肽图分析性能。

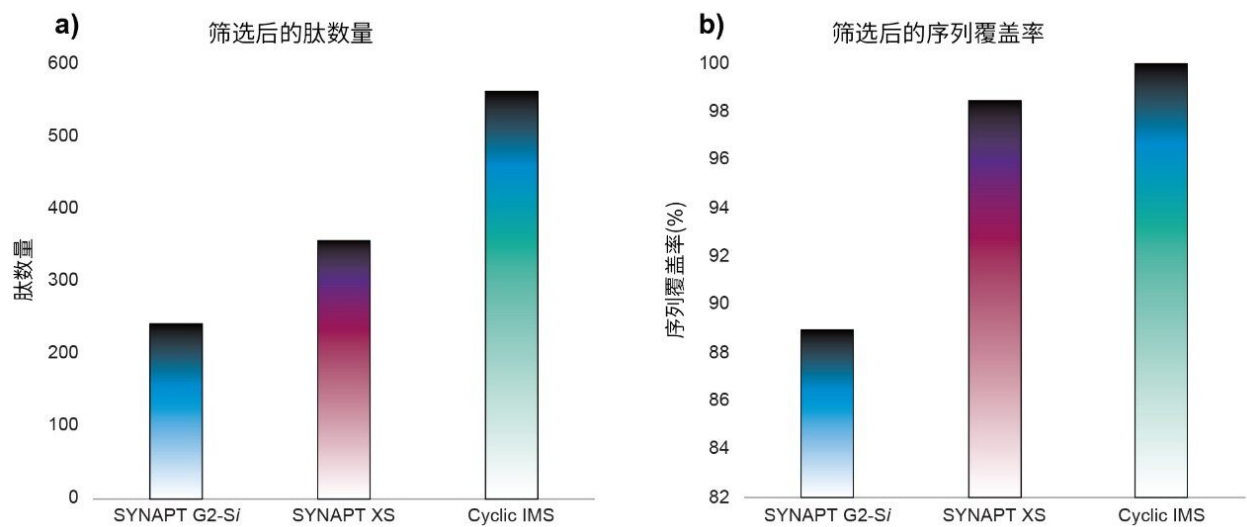


图2.使用SYNAPT G2-Si、SYNAPT XS和Cyclic IMS质谱仪筛选磷酸化酶B后，鉴定出的胃酶解肽的数量和序列覆盖率

HDX实验面临的挑战在于，经常需要监测低频率胃蛋白酶裂解得到的肽，以便研究蛋白质序列的特定区域。因此，通常在实验中使用高上样量以使这些肽获得更出色的信号。结果，高丰度肽经常表现为饱和且扭曲的同位素比，并且经常包含由于检测器过载而导致的伪峰。Cyclic IMS系统采用双增益ADC检测器，改善了高丰度离子检测的动态范围，且ADC改善了在强离子电流下检测器的线性响应。据推测，该功能将减轻HDX实验中经常发生的离子饱和现象，获得的数据也支持这一推测。图3展示了在SYNAPT XS（下图）和Cyclic IMS（中图）上获得的两种肽离子的同位素分布，证明高强度离子的同位素测量准确度得到改善。两种离子的理论同位素分布如上图所示。

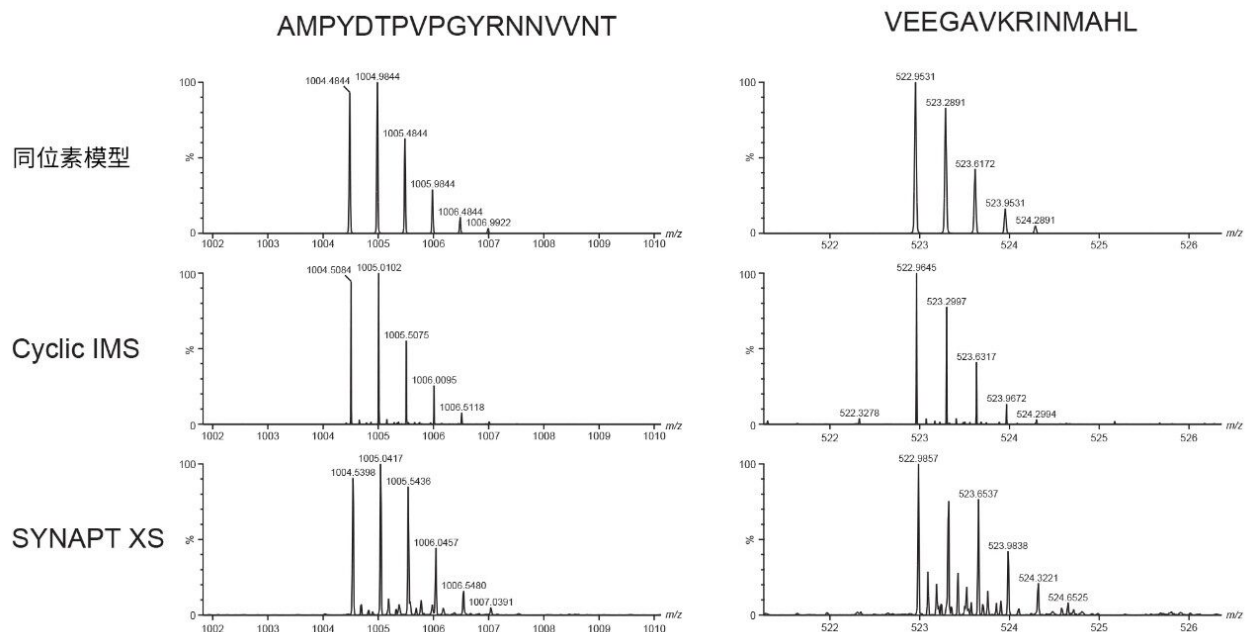


图3.在SYNAPT XS (下图) 和Cyclic IMS (中图) 上获得的肽段AMPYDTPVPGYRNNVVNT和VEEGAVKRINMAHL的同位素分布。每种肽断的理论同位素分布显示在上图中以供参考。

使用8、16和32 μM 储备液考察磷酸化酶B的肽鉴定和序列覆盖率，在样品量更少的情况下评估Cyclic IMS上的HDX性能。使用标记(1:20)和淬灭稀释液(1:1)以及50 μL 定量环，这些条件对应于10、20和40 pmol进样。使用上述相同的条件，在HDMS^E模式下采集数据。使用PLGS 3.0.3处理数据，但采用经过改进的肽3D参数，专门解决在长时间淌度分离中观察到的到达时间分布稍宽的问题。结果在32 μM 储备液进样中得到的肽数量增加至588种。图4总结了该实验的结果。如预期一样，上样量较低时，得到的肽鉴定数量较少；但是，需要注意的是，所有三种条件均采用相同的阈值。通过降低低上样量数据的阈值，有可能恢复对某些肽的鉴定。但是，16 μM 和8 μM 溶液获得的筛选后序列覆盖率均高于90%，分别为93%和95%，表明使用较低浓度的储备液可以实现具有良好性能的HDX肽图分析，从而可以研究更多样品有限的蛋白质。

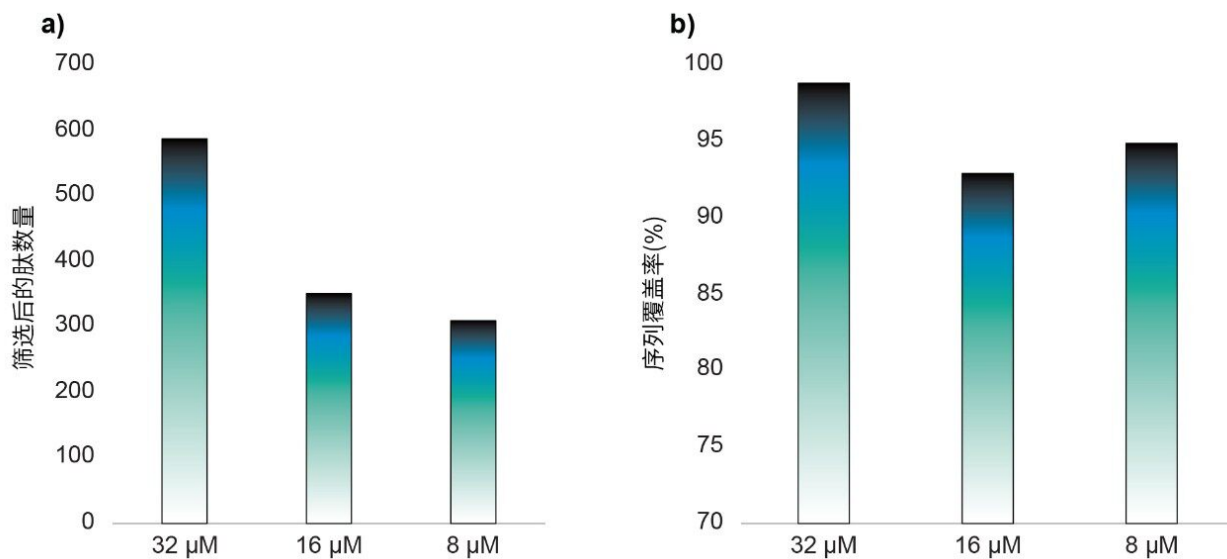


图4.在采用Cyclic IMS进行的在线HDX肽图分析中，使用32、16和8 μM储备液筛选磷酸化酶B后鉴定出的胃酶解肽的数量和序列覆盖率。

结论

我们之前已经证明，采用SYNAPT XS获得的HDX数据质量相比于上一代系统SYNAPT G2-Si得到显著改善。本文表明，新型SELECT SERIES Cyclic IMS提供了更高水平的性能，并对可用于氢-氘交换实验的数据质量产生了极大影响。与SYNAPT XS相比，质量和离子淌度分辨率以及灵敏度方面的改善使肽鉴定数量增加了30%，而双增益检测器提供的动态范围则允许更准确地测量高丰度肽的同位素分布。系统灵敏度的改善允许将上样量减少为原来的1/4，同时保留高于95%的序列覆盖率。预计该系统对峰容量和灵敏度的明显改善将支持采用截短的色谱梯度，提高每日通量，并降低系统的每次进样成本。

参考资料

1. Puchades, C., Kückler, B., Diefenbach, O. *et al.* Epitope Mapping of Diverse Influenza Hemagglutinin Drug Candidates using HDX-MS. *Sci Rep* 9, 4735 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41179-0> <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-41179-0>> .

2. Morrison, L., Anderson, M., Quinn, C. Enhanced Performance of the SYNAPT XS and Its Impact on Hydrogen Deuterium Exchange Mass Spectrometry (HDX MS) Data Quality. Waters Technical Note. 720006870EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/enhanced-performance-of-the-synapt-xs-and-its-impact-on-hydrogen-deuterium-exchange-mass-spectrometry-hdx-ms-data-quality.html>> .
3. Sørensen, L., Salbo, R. Optimized Workflow for Selecting Peptides for HDX-MS Data Analyses. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 29, 2278–2281 (2018). <https://doi.org/10.1007/s13361-018-2056-1> <<https://doi.org/10.1007/s13361-018-2056-1>> .

特色产品

采用ACQUITY UPLC M-Class系统的HDX平台 <<https://www.waters.com/134778571>>

SELECT SERIES Cyclic IMS <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135021297>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

ProteinLynx Global SERVER (PLGS) <<https://www.waters.com/513821>>

720007151ZH, 2021年2月