

# 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子质量肽图分析及二硫键定位

刘冰, 王莹, 董衍东, 邹寒艳\* (重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121)

**摘要:** 目的 采用液相色谱-质谱联用技术绘制重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的质量肽图并鉴定二硫键位点。方法 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子原液经变性、还原、烷基化、脱盐、胰蛋白酶和 V<sub>8</sub> 酶分别酶解后进行质量肽图分析; 原液经变性、烷基化、脱盐、V<sub>8</sub> 酶和 V<sub>8</sub> 酶结合胰蛋白酶分别酶解后进行二硫键定位鉴定。结果 胰蛋白酶酶切的质量肽图共发现 14 个匹配肽段, V<sub>8</sub> 酶酶切的质量肽图共发现 18 个匹配肽段, 肽段覆盖率均为 100%。经 V<sub>8</sub> 酶酶切仅鉴定到 1 种二硫键匹配方式即 Cys55-Cys97, 经 V<sub>8</sub> 酶结合胰蛋白酶酶切鉴定到 2 种二硫键匹配方式即 Cys55-Cys97 和 Cys89-Cys122。结论 应用液相色谱-质谱联用技术进行质量肽图分析和二硫键定位可作为重组蛋白药物质量控制方法。

**关键词:** 人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子; 质量肽图; 二硫键; 液相色谱-质谱联用

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)16-2277-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222339

引用本文: 刘冰, 王莹, 董衍东, 等. 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子质量肽图分析及二硫键定位[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(16): 2277-2281.

## Peptide Mass Mapping Analysis and Localization of Disulfide Bonds of Recombinant Human Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor

LIU Bing, WANG Ying, DONG Yandong, ZOU Hanyan\* (Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To analyze the peptide mass mapping and localization of disulfide bonds of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor(rhGM-CSF) by using mass spectrometry combined with ultra-performance liquid chromatography. **METHODS** The bulk of rhGM-CSF was denatured, reduced, alkylated and finally digested by the enzyme of trypsin and V<sub>8</sub> respectively to analyse the peptide mass mapping. The bulk was denatured, alkylated and digested by V<sub>8</sub> and V<sub>8</sub> with trypsin respectively to identify the sites of disulfide bonds. **RESULTS** Fourteen matched peptides were found in the peptide mass mapping of rhGM-CSF digested by trypsin and eighteen matched peptides were found digested by V<sub>8</sub>. The fraction of coverage was both 100.0%. The site of disulfide bond Cys55-Cys97 was identified by digestion of V<sub>8</sub>, and the types of disulfide bonds Cys55-Cys97 and Cys89-Cys122 were identified by digestion of V<sub>8</sub> with trypsin. **CONCLUSION** The peptide mass mapping analysis and localization of disulfide bonds using LC-MS/MS can be used for the quality control of recombination protein.

**KEYWORDS:** human granulocyte-macrophage colony stimulating factor; peptide mass mapping; disulfide bonds; LC-MS/MS

重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor, rhGM-CSF)为造血祖细胞体外生存、增殖与分化所必需的,临床上主要用于肿瘤化疗等引起的白细胞减少症,是治疗性重组生物制品的产品之一<sup>[1-2]</sup>。GM-CSF由128个氨基酸组成,平均相对分子质量为14 604.55(N端不含甲硫氨酸,平均相对分子质量为14 473.35),共含有4个半胱氨酸,形成2对二硫键,即Cys55-Cys97和Cys89-Cys122<sup>[3]</sup>。重组蛋白药物大多为具有特定活性的生物大分子药物,具有相对分子质量大、空间结构复杂、生产工艺复杂等特点,作为用于人体的异源蛋白,重组蛋白制品需进行严格的质量控制,

其中氨基酸序列和二硫键配对正确与否是质量控制的关键内容。因此,为保证蛋白药物的安全性,对其结构表征进行有效的质量控制是必须的<sup>[4-6]</sup>。

质谱技术现已成为重组蛋白药物结构表征的关键技术手段,可在分子水平上对肽图和二硫键连接等进行鉴定,解析结果具有高度的精确性和可信度<sup>[7-9]</sup>。特别是在肽图分析中,常规的液相-紫外检测方法无法确证每个特征峰的信息,且对共流出组分无法进行组成分析,而质谱检测可为上述问题提供重要的参考信息。本研究应用液相色谱-质谱联用技术,对rhGM-CSF质量肽图和二硫键配对方式进行分析,为该制品的质量研究提供方法和依据。

作者简介: 刘冰,女,硕士,工程师  
zouhanyan@cqifdc.org.cn

E-mail: liubing@cqifdc.org.cn

\*通信作者: 邹寒艳,女,博士,工程师

E-mail:

## 1 仪器与试剂

Waters UPLC H-class 和 AB Sciex Triple TOF 5600 型超高液相色谱-质谱联用仪(美国 Waters 公司和 AB Sciex 公司)。

rhGM-CSF 原液(实验室留样, 哈药集团生物工程股份有限公司, 批号: 20171101); 脱盐柱 Micro Bio-Spin 6 columns(凝胶柱, 美国 BIO-RAD 公司); 盐酸胍、二硫苏糖醇和碘乙酰胺均购自德国 Sigma 公司; 胰蛋白酶和 V<sub>8</sub> 酶(美国 Promega 公司); 乙腈和甲酸(质谱级, 美国 Fisher Scientific 公司); 水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品制备

质量肽图: 取本品约 60 μg 2 份, 分别加入 40 μL 6 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸胍, 振荡使其充分变性, 加入 2 μL 1 mol·L<sup>-1</sup> 二硫苏糖醇, 37 °C 温育 30 min, 加入 5 μL 1 mol·L<sup>-1</sup> 碘乙酰胺, 室温避光温育 30 min, 经脱盐柱脱盐后, 一份加入 2 μg 胰蛋白酶, 37 °C 温育 4 h, 一份加入 3 μg V<sub>8</sub> 酶, 37 °C 温育 16 h, 最后加入 1.2 μL 甲酸终止反应, 离心, 取上清即得。

二硫键分析: 取本品约 60 μg 2 份, 分别加入 40 μL 6 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸胍, 37 °C 温育 1 h 使其充分变性, 加入 5 μL 1 mol·L<sup>-1</sup> 碘乙酰胺, 室温避光温育 30 min, 经脱盐柱脱盐后, 一份加入 3 μg V<sub>8</sub> 酶, 37 °C 温育 16 h, 一份加入 3 μg V<sub>8</sub> 酶, 37 °C 温育 16 h 后再加入 2 μg 胰蛋白酶, 37 °C 温育 4 h, 最后加入 1.2 μL 甲酸终止反应, 离心, 取上清即得。

### 2.2 液相和质谱条件

色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC CSH130, C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 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(0~42 min, 流动相 B 为 1%→37%), 流速为 0.2 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 45 °C。采用 ESI 离子源, 正离子模式, 母离子扫描范围为 *m/z* 100~2 000, 子离子扫描范围为 *m/z* 100~1 800, 离子源温度为 550 °C, 喷雾电压为 5 500 V, 去簇电压为 20 V, 碰撞能量为 30 eV, 雾化气为 45 psi, 辅助气为 45 psi, 气帘气为 35 psi。

### 2.3 数据分析

用 BiopharmaView 软件对采集的数据进行分析处理, 设置固定修饰为烷基化, 漏切位点为 2, 质量偏差为 10, 肽段一级与二级碎片离子确证匹配最低得分 3.0(匹配得分是分析软件基于一级与二级碎

片离子匹配程度的打分, 得分越高可信度越高, BiopharmaView 软件可信标准要求为得分≥3.0)。

### 2.4 质量肽图分析

rhGM-CSF 原液经胰蛋白酶酶切后共发现 14 个匹配肽段, 肽段覆盖率达 100%, 各肽段实测相对分子量与理论相对分子量偏差均在±5 以内, 且除较短肽段 T7 和 T9 外, 其他肽段一级与二级碎片离子确证匹配得分均>3.0, 结果见表 1 和图 1A。其中肽段 T3(Lys25)未检测到, 原因可能是肽段太短或离子抑制导致质谱不能检出, 肽段 T3 和 T4、T9 和 T10、T12 和 T13 之间部分理论酶切位点没有切开, 原因可能是受蛋白空间结构影响。rhGM-CSF 原液经 V<sub>8</sub> 酶酶切后共发现 18 个匹配肽段, 肽段覆盖率达 100%, 各肽段实测相对分子量与理论相对分子量偏差在±5 以内, 且除较短肽段 G5、G6 和 G8 外, 其他肽段一级与二级碎片离子确证匹配得分均>3.0, 结果见表 2 和图 1B。其中肽段 G3 和 G4, G8 和 G9, G13、G14 和 G15 之间部分理论酶切位点没有切开, 原因是 V<sub>8</sub> 酶对酶切位点谷氨酸 E 的水解速率远高于天门冬氨酸 D。

### 2.5 二硫键定位鉴定分析

GM-CSF 含有 4 个半胱氨酸, 形成 2 对二硫键。由 V<sub>8</sub> 酶酶切后理论上 2 对二硫键各将 2 条肽段连接在一起, 即 Cys55-Cys97, PTC<sub>55</sub>LQTRLE=TSC<sub>97</sub>ATQIITFE 和 Cys89-Cys122, LYKQGLRGLT KLKGPLTMMASHYKQHC<sub>89</sub>PPTPE=C<sub>122</sub>WEPVQE (“=”代表二硫键, 下同), 实测中仅鉴定到 1 对二硫键即 Cys55-Cys97, MFDLQEPTC<sub>55</sub>LQTRLE=TSC<sub>97</sub>ATQIITFE, 其中含 Cys55 的肽段有 2 个理论位点漏切, 而 Cys89-Cys122 未检测到, 可能是由于酶切形成的肽段太长, 离子化程度差造成的。由 V<sub>8</sub> 酶结合胰蛋白酶酶切后理论上 2 对二硫键各将 2 条肽段连接在一起, 即 Cys55-Cys97, PTC<sub>55</sub>LQTR=TSC<sub>97</sub>ATQIITFE 和 Cys89-Cys122, QHC<sub>89</sub>PPTPE=C<sub>122</sub>WEPVQE, 实测中 2 对二硫键均鉴定到, 即 Cys55-Cys97, MFDLQEPTC<sub>55</sub>LQTR=TSC<sub>97</sub>ATQIITFE 和 Cys89-Cys122, QHC<sub>89</sub>PPTPE=FLLVIPFDC<sub>122</sub>WEPVQE, 其中含 Cys55 的肽段有 2 个理论位点漏切, 含 Cys122 的肽段有 2 个理论位点漏切。rhGM-CSF 原液二硫键鉴定结果及 MS/MS 谱图见表 3 和图 2, 结果显示, 含二硫键各肽段实测相对分子量与理论相对分子量偏差均在±5 以内, 且各肽段具有丰富的 b/y 二级碎片离子, 一

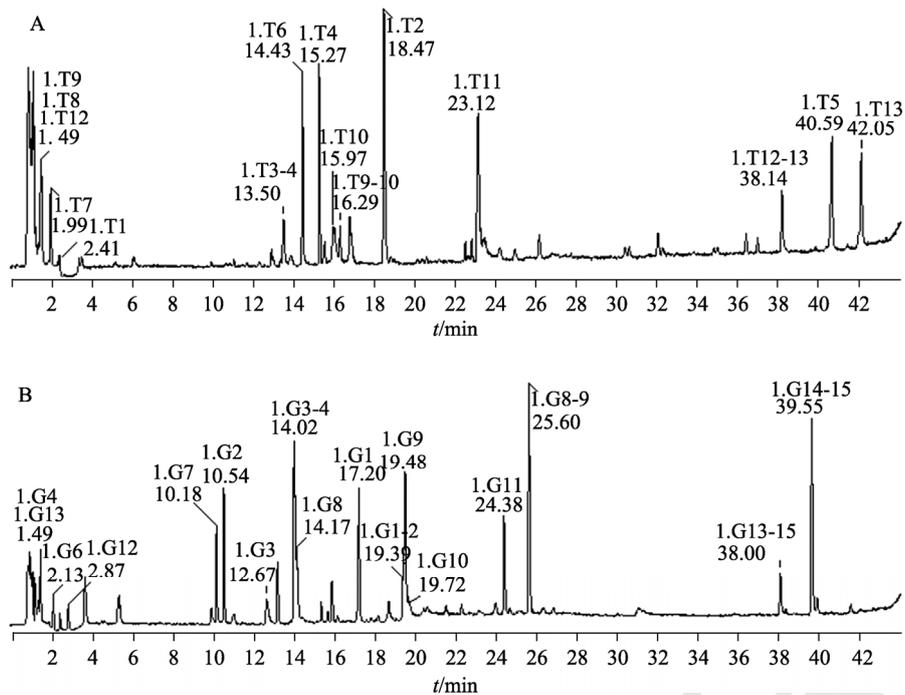


图1 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子质量肽图  
A-胰蛋白酶; B-V<sub>8</sub>酶。

Fig. 1 Peptide mapping of rhGM-CSF  
A-trypsin; B-V<sub>8</sub>.

表1 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子胰蛋白酶酶切的质量肽图结果  
Tab. 1 Results of peptides mass mapping of rhGM-CSF digested by trypsin

肽段编号	氨基酸位置	肽段序列	理论相对分子质量	实测相对分子质量	电荷	偏差	匹配得分
T1	1~5	MAPAR	545.286 4	545.286 4	+1	0.0	4.399
T2	6~24	SPSPSTQPWEHVNAIQEAR	712.015 3	712.016 4	+3	1.6	21.581
T3-4	25~31	RLLNLSR	436.277 2	436.278 1	+2	1.9	9.116
T4	26~31	LLNLSR	358.226 7	358.228 1	+2	4.1	6.709
T5	32~59	DTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTR	1 086.493 1	1 086.493 3	+3	0.2	12.213
T6	60~64	LELVK	333.197 1	333.198 5	+2	4.4	4.735
T7	65~68	QGLR	237.145 2	237.146 2	+2	4.6	1.983
T8	69~73	GSLTK	505.298 0	505.297 6	+1	-0.9	5.844
T9	74~75	LK	260.196 9	260.197 1	+1	0.9	1.102
T9-10	74~86	LKGPLTMMASHYK	492.928 2	492.928 9	+3	1.4	12.877
T10	76~86	GPLTMMASHYK	618.299 2	618.299 5	+2	0.5	14.933
T11	87~108	QHCPPTPETS CATQIITFESFK	860.401 7	860.402 4	+3	0.8	17.050
T12	109~112	ENLK	503.282 4	503.282 4	+1	0.0	4.391
T12-13	109~128	ENLKD FLLVIPFDCWEPVQE	1 246.114 3	1 246.114 4	+2	0.1	3.519
T13	113~128	DFLLVIPFDCWEPVQE	1 003.982 1	1 003.981 8	+2	-0.2	15.416

级与二级碎片离子确证匹配得分均>3.0, 由此确证 rhGM-CSF 原液二硫键连接方式为 Cys55-Cys97 和 Cys89-Cys122, 与理论连接方式一致。

### 3 讨论

重组蛋白制品结构正确与否是质量控制的关键内容, 错误的结构不仅影响生物学活性, 还可能产生免疫原性。肽图分析是鉴定蛋白质一级结

构准确性和完整性的重要方法, 采用液质联用技术, 不仅可以获得肽段的分离图谱, 还可以快速和准确地判断出每个洗脱峰的肽段归属。本研究将重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子原液分别经胰蛋白酶和 V<sub>8</sub> 酶酶解后进行质量肽图分析, 肽段覆盖率均达 100%, 表明胰蛋白酶或 V<sub>8</sub> 酶均可作为肽图分析的裂解酶。二硫键是蛋白质中一种

表 2 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 V<sub>8</sub> 酶酶切的质量肽图结果

Tab. 2 Results of peptides mass mapping of rhGM-CSF digested by V<sub>8</sub>

肽段编号	氨基酸位置	肽段序列	理论相对分子质量	实测相对分子质量	电荷	偏差	匹配得分
G1	1~15	MAPARSPSPSTQPWE	821.388 1	821.388 8	+2	0.9	12.384
G1-2	1~22	MAPARSPSPSTQPWEHVNAIQE	811.725 4	811.726 4	+3	1.3	9.671
G2	16~22	HVNAIQE	405.708 9	405.710 0	+2	2.8	6.372
G3	23~32	ARRLLNLSRD	405.242 3	405.243 8	+3	3.7	8.778
G3-4	23~36	ARRLLNLSRDAAE	529.297 1	529.298 7	+3	2.9	7.547
G4	33~36	TAAE	391.182 3	391.182 2	+1	-0.3	7.130
G5	37~39	MNE	393.143 8	393.144 1	+1	0.7	2.746
G6	40~42	TVE	348.176 5	348.177 1	+1	1.7	2.988
G7	43~46	WISE	447.244 9	447.245 2	+1	0.7	5.759
G8	47~49	MFD	412.153 7	412.153 8	+1	0.4	2.004
G8-9	47~61	MFDLQEP TCLQTRLE	940.947 7	940.948 8	+2	1.1	15.620
G9	50~61	LQEP TCLQTRLE	744.379 8	744.380 9	+2	1.5	13.351
G10	62~94	LYKQGLRGLSTKLGPLTMMASHYKQHCPPTPE	754.396 7	754.398 7	+5	2.5	3.259
G11	95~105	TSCATQITFE	635.802 8	635.803 7	+2	1.6	19.736
G12	106~109	SFKE	510.255 8	510.255 8	+1	0.0	4.144
G13	110~113	NLKD	489.266 7	489.266 6	+1	-0.3	5.759
G13-15	110~128	NLKDFLLVIPFDCWEPVQE	1 181.593 0	1 181.593 7	+2	0.6	7.362
G14-15	114~128	FLLVIPFDCWEPVQE	946.468 6	946.468 7	+2	0.1	17.233

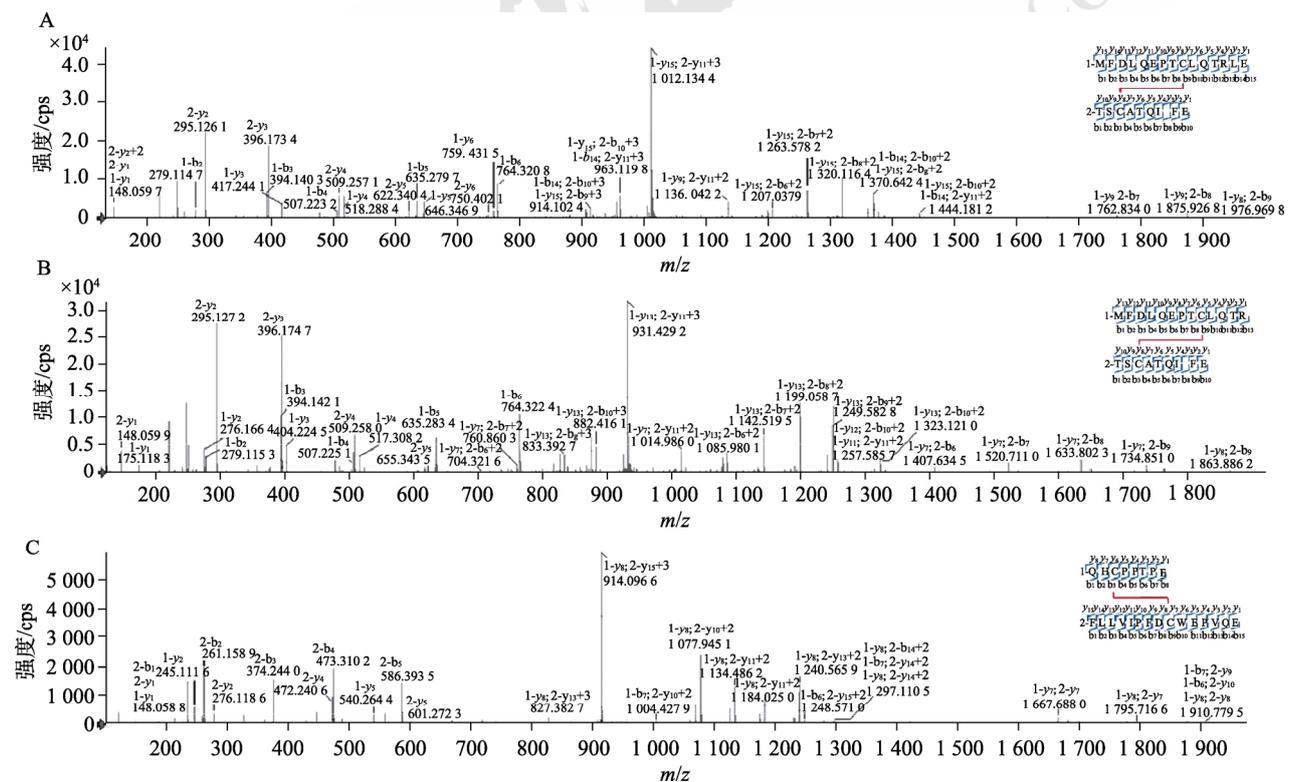


图 2 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子二硫键鉴定 MS/MS 谱图

A-V<sub>8</sub> 酶 Cys55-Cys97; B-V<sub>8</sub> 酶和胰蛋白酶 Cys55-Cys97; C-V<sub>8</sub> 酶和胰蛋白酶 Cys89-Cys122。

Fig. 2 MS/MS spectrum of disulfide bonds of rhGM-CSF

A-Cys55-Cys97 digested by V<sub>8</sub>; B-Cys55-Cys97 digested by V<sub>8</sub> and trypsin; C-Cys89-Cys122 digested by V<sub>8</sub> and trypsin.

表 3 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子二硫键鉴定信息

Tab. 3 Identification of disulfide bonds of rhGM-CSF

水解酶	二硫键 匹配方式	肽段序列	理论相对 分子质量	实测相对 分子质量	电荷	偏差	匹配 得分
V <sub>8</sub> 酶	Cys55-Cys97	MFDLQEPTCLQTRLE=TSCATQIITFE	1 012.145 1	1 012.145 5	+3	0.4	14.887
V <sub>8</sub> 酶和胰蛋白酶	Cys55-Cys97	MFDLQEPTCLQTR=TSCATQIITFE	931.436 2	931.438 0	+3	2.0	14.073
	Cys89-Cys122	QHCPPTPE=FLLVIPFDCWEPVQE	914.097 7	914.097 5	+3	-0.2	8.192

关键的共价键，对维持蛋白质正常空间结构具有重要作用，二硫键的断裂或错配会直接导致蛋白空间结构的改变进而影响药物活性和免疫原性。本研究采用液质联用技术将重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子原液分别经 V<sub>8</sub>酶和 V<sub>8</sub>酶结合胰蛋白酶酶解后进行二硫键鉴定，结果表明，V<sub>8</sub>酶结合胰蛋白酶可以将含二硫键肽段酶解至合适长度，鉴定到 2 种与理论连接方式一致的二硫键即 Cys55-97 和 Cys89-Cys122，而 V<sub>8</sub>酶酶解因形成含二硫键 Cys89-Cys122 肽段太长未检测到，仅鉴定到二硫键 Cys55-Cys97，因此，可以选择 V<sub>8</sub>酶结合胰蛋白酶作为裂解酶进行二硫键分析。重组蛋白药物的结构及特性各不相同，根据制品特点制定相应的结构确证分析方法，可为产品的质量分析和控制提供参考和依据。

#### REFERENCES

[1] LEE K M C, ACHUTHAN A A, HAMILTON J A. GM-CSF: A promising target in inflammation and autoimmunity[J]. Immunotargets Ther, 2020(9): 225-240.  
 [2] LI B B, BAI M, YANG Y. Review on the research progress of recombinant human granulocyte-macrophage colony

stimulating factor[J]. Heilongjiang Med J(黑龙江医药), 2010, 23(3): 407-408.

[3] TAO L, HAN C M, LIU L, et al. Identification and quantification of product-related proteins in the bulk of recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor produced in China[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2018, 38(11): 1875-1880.  
 [4] 中国药典.三部[S].:2020: 349-351.  
 [5] RAO C M. Establishment and application of the quality control technology system for recombinant drugs in China: a review[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2016, 51(13): 1057-1066.  
 [6] TAO L, RAO C M, WANG J Z. Analysis and evaluation of the heterogeneity of therapeutic recombinant protein drugs[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(21): 2562-2565.  
 [7] ZHU W W, LI M L, ZHANG J L. Development of mass spectrometry technique for quality assessment of monoclonal antibodies[J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2020, 55(12): 2843-2853.  
 [8] WANG Z R, SUN X, FU Y, et al. The hydrolysis of Aβ42 by truncated metalloproteinase sADAM 10[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2020, 9(10): 103-1109.  
 [9] RAO C M, TAO L, SHI X C, et al. Peptide mass mapping analysis of rhIFN-α1b and localization of disulfide bonds[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2007, 27(10): 1505-1510.  
 收稿日期: 2022-07-01  
 (本文责编: 曹粤锋)