

应用非变性质谱-行波式离子淌度谱表征完整糖蛋白复合物的稳定性及小规模结构差异

徐 香^{1,2}, 柴胡玲潇¹, 王冠博^{2,3}

(1. 南京师范大学化学与材料科学学院, 江苏 南京 210023;

2. 深圳湾实验室细胞分析研究所, 广东 深圳 518132; 3. 北京大学生物医学前沿创新中心, 北京 100871)

摘要:在完整复合物层面表征糖蛋白复合物的高级结构和动态学,对于研究蛋白质功能具有重要意义。行波式离子淌度与非变性质谱结合不仅可提供额外的正交分离维度,还可通过测定碰撞截面积(CCS)获取分析物的几何特征信息,助力结构表征。本工作针对糖蛋白复合物稳定性及小规模结构差异的表征需求,选取由不同物种表达的亲和素作为糖蛋白模式复合物,探究离子淌度在非变性质谱分析中可提供的结构信息。结果表明,离子淌度可在完整复合物水平上分离蛋白型亚群分布,能够反映高阶复合物的几何特征,以及蛋白在气相解离条件、电荷调控条件和经电荷调控的气相解离条件下的构象变化程度,可应用于糖蛋白复合物体系的稳定性评价。

关键词:离子淌度(IM);非变性质谱(nMS);糖蛋白;蛋白质复合物;电荷调控

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2022)05-0653-10

doi:10.7538/zpzb.2022.0144

Characterization of Stability and Small-scale Structural Differences of Intact Glycoprotein Complexes Using Native Mass Spectrometry-Travelling-Wave Ion Mobility Spectrometry

XU Xiang^{1,2}, CHAIHU Ling-xiao¹, WANG Guan-bo^{2,3}

(1. School of Chemistry and Materials Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China;

2. Institute for Cell Analysis, Shenzhen Bay Laboratory, Shenzhen 518132, China;

3. Biomedical Pioneering Innovation Centre, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Glycosylation is one of the most common types of post-translational modifications (PTMs) of proteins, which affects protein properties including conformation, stability and solubility, and plays essential roles in functions including molecular recognition, signaling and immune defense. Characterizing the higher-order structures and dynamics of glycoprotein complexes at the intact level is essential for studying the biological functions of glycoproteins. Particularly, accessing structural information such as glycosylation pattern, proteoform distribution, protein interaction, and dynamic conformational evolution requires direct measurement of intact species. Native mass

spectrometry (nMS) allows preservation of non-covalent inter-protein interactions and direct analysis of topology, stoichiometry and dynamic assembly/disassembly at the intact complex level, highly complementing the conventional biophysical techniques. The combination of nMS with travelling-wave ion mobility spectrometry (TWIMS) provides not only an additional orthogonal dimension of separation, but also geometric features of the analytes through collisional cross-section (CCS) determination, thereby facilitating the structural characterization. The macro- and micro-heterogeneity caused by glycosylation, as well as binding with small molecules, induce structural changes of glycoproteins and their complexes on a scale smaller than those resulting from unfolding or macromolecular association/dissociation. However, the benefits of nMS-IMS for characterization of small-scale structural changes or differences of glycoprotein complexes remain to be further demonstrated, in aspects including proteoform-specific structural analysis, distinguishing different binding states of glycoprotein complexes in complex with small molecules, and solution-parameter-induced conformational or stability changes. In this work, aiming at characterizing the stability and small-scale structural differences of glycoprotein complexes, two formats of avidin (tetrameric biotin-binding glycoprotein) that were expressed from different species and exhibit differing carbohydrate contents and proteoform patterns were used as model systems, and the benefits of implementing ion mobility analysis in nMS for structural analysis of both intact complexes and subunits released in the gas-phase were evaluated. It was demonstrated that IMS allows separation of subpopulations of proteoforms, which facilitates not only profiling of proteoform distribution for intact glycoproteins by MS, but also investigation of correlation between glycosylation and CCS. We also demonstrated the power of IMS in measuring the geometric features of the protein complexes in complex with small molecules, and characterizing the extent of conformational changes of glycoproteins under conditions including gas-phase dissociation, supercharging, charge-reduction, and charge-manipulated dissociation. These advantages enable the stability evaluation for glycoprotein complexes.

Key words: ion mobility (IM); native mass spectrometry (nMS); glycoprotein; protein complex; charge manipulation

蛋白的糖基化是最为常见和多样化的翻译后修饰,影响着蛋白质的构象、稳定性和溶解度,同时在分子识别、信号传导和免疫防御等方面具有关键作用^[1-2]。研究糖蛋白生物功能有赖于对糖蛋白进行多层次结构分析和动态性分析。其中,获取关于糖蛋白修饰程度、蛋白型(proteoform)分布、糖蛋白相互作用、结合计量关系、构象动态变化等方面的信息,则有赖于在完整糖蛋白或完整复合物层面的结构表征。作为与X射线晶体衍射、冷冻电镜、核磁共振等经典生物物理学手段高度互补的技术,生物质谱能够在分析物尺寸、纯度或复杂度、空间分辨能力(部分情况下)、即时性等方面突破局限,已

成为生物大分子结构表征的有力工具^[3]。在结构质谱策略中,非变性质谱能够在分析过程中最大限度地保持生物大分子体系中关键的非共价作用^[4],从而维系完整的复合物体系和初始构象,在蛋白质高级结构和动态学分析中发挥独特作用^[5]。为丰富可获取的结构表征信息,科研人员将非变性质谱与串联质谱联用以增加结构表征的深度,并与离子淌度谱联用以增加结构表征的维度^[6]。离子淌度不仅可基于不同离子的气相淌度差异实现离子分离、降低质谱图复杂度,还可在行波式(travelling-wave)离子淌度等特定类型的淌度方案中实现碰撞截面积(CCS)的测定,提供分析物几何形貌层面的

结构信息^[7]。行波式离子淌度模块可置于质谱仪器内部的不同质量分析器之间,利用行波原理取代传统的漂移管原理,能够大幅减少离子损失,提高灵敏度^[8]。这一特性对于分析生物大分子具有独特优势,离子淌度谱与非变性质谱的结合已在蛋白质及蛋白质复合物分析中发挥了重要作用,在分析蛋白质构象变化、去折叠/重折叠、蛋白凝集、蛋白质复合物的组装和结构演变等方面提供关键信息^[9]。

除以上提及的大规模结构变化外,小规模结构变化或差异的表征对于糖蛋白结构分析也具有重要意义。糖蛋白分子中含有分子质量及个数各不相同的单糖残基,形成宏观异质性(糖基化位点的占据程度差异)和微观异质性(各糖基化位点的糖链结构差异),由此产生的各蛋白型呈现一定的分子质量分布^[10]。糖蛋白的蛋白型异质性解析和针对特定蛋白型亚群分布的分析对于糖基化与构象关联性^[11]、糖基化与亲和力关联性^[12]、以及蛋白质药物的关键质量属性分析^[13]等具有重要意义。离子淌度谱已被用于在游离糖链或糖肽层面进行异质性或异构体解析^[14-19],并在完整蛋白层面体现了部分蛋白型的淌度差异^[20-21],但对于是否能够实现蛋白型的有效分离尚有待深入验证。在蛋白质-配体复合物结构分析方面,离子淌度可揭示配体结合所引起的构象变化^[22],然而糖蛋白自身的异质性增大了糖蛋白自身复合物的异质性,进而增大了复合物与其他分子所形成的高阶复合物的复杂程度,离子淌度对此类高阶复合物的分辨能力有待证明。此外,蛋白质复合物的质谱分析常使用减电荷试剂降低蛋白离子价态以降低谱图的复杂性或强化生物大分子复合物的稳定性^[23],也常使用增电荷试剂提高蛋白离子价态以改善串联质谱性能^[24]。明确这些电荷调控操作是否会造成蛋白质分析物结构的人为改变以及改变程度对于方法准确性评价至关重要,尤其在已有证据表明部分增电荷试剂可导致一定程度构象变化的情况下则更具迫切性^[25-26]。离子淌度已被用于监测增、减电荷试剂对蛋白构象的影响^[27-30],但不同蛋白型在电荷调控条件下的结构和稳定性是否存在差异尚有待深入研究。

针对上述问题,本研究以亲和素复合物及亲

和素-生物素复合物作为模式蛋白体系,利用与行波式离子淌度相结合的非变性质谱及串联质谱探究离子淌度对于复合物层面及亚基层面的蛋白型亚群分辨与分离、亚基解离过程伴随的构象变化、复合物结合小分子形成高阶复合物的形态变化、电荷调控条件下的结构响应等方面所能提供的结构信息收益;并通过由不同物种表达的亲和素在上述方面的 CCS 差异,探索离子淌度应用于蛋白复合物稳定性评价的可行性。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Synapt XS 三重四极杆-离子淌度-飞行时间质谱仪:英国 Waters 公司产品,配有静态纳升电喷雾离子源(nanoESI);5424R 台式冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品;DS-11+光谱仪:美国 Denovix 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

重组亲和素(avidin 1,由玉米细胞表达,经亲和纯化提取, ≥ 12 units/mg,纯度 $\geq 80\%$,质量水平 200)、天然亲和素(avidin 2,由鸡蛋蛋白经亲和纯化提取, ≥ 10 units/mg,纯度 $\geq 98\%$,质量水平 200);牛血清白蛋白(BSA)、牛红细胞细胞泛素(ubiquitin)、马心肌肌红蛋白(myoglobin)、马心肌细胞色素 c 蛋白(cytochrome c)、生物素(biotin,色谱级)、乙酸三甲基铵(triethylammonium acetate, TEAA,色谱级)、间硝基苄醇(*m*-nitrobenzyl alcohol, *m*-NBA,质谱级):均为美国 Sigma-Aldrich 公司产品;醋酸铵(NH₄Ac,色谱级):阿拉丁(中国)公司产品;乙酸(色谱级):麦克林(中国)公司产品;甲醇(色谱级):美国 Thermo Fisher 公司产品;离心超滤套装(分子质量截留 10 ku):美国 Merck Millipore 公司产品。

1.3 实验条件

1.3.1 样品制备 将蛋白粉末用 150 mmol/L 醋酸铵溶液溶解,使用 10 ku 截留的超滤管,以 11 000 r/min 离心过滤,将亲和素等蛋白质样品的原缓冲液置换为 150 mmol/L 醋酸铵溶液,制得浓溶液。对于非变性条件的蛋白样品,以 150 mmol/L 醋酸铵溶液将蛋白浓溶液稀释至 7 μ mol/L(亲和素)或 10 μ mol/L(其他校正蛋白);对于变性条件的蛋白样品(仅用于校

正),以甲醇-水-乙酸溶液(49:49:2,V/V/V)将校正蛋白浓溶液稀释至 $10\ \mu\text{mol/L}$ 。向亲和素溶液中加入过量生物素以制备亲和素-生物素复合物。

1.3.2 质谱条件 使用静态纳升电喷雾离子源进样,离子源温度 $120\ ^\circ\text{C}$,补偿30,源离子引导波速 $10\ \text{m/s}$,波形高 $1\ \text{V}$,四极杆分辨4.7。在高纯氮气(纯度 $>99.99\%$)下进行离子淌度测定,波速 $4.6\ \text{m/s}$,波形高 $43.3\ \text{V}$;传输波速 $17.1\ \text{m/s}$,波形高 $4\ \text{V}$ 。在亲和素单体测定中,采用碰撞诱导解离(CID)将亲和素单体从四聚体形式解离出来。为获得更宽的单体价态分布,且减弱四聚体母离子的特定价态对单体价态及去折叠程度的影响,四聚体的全部价态均用作生成单体的母离子。

1.4 数据处理

质谱及离子淌度数据使用MassLynx v4.2(Waters,英国)、DriftScope v2.9(Waters,英国)及Origin Pro(OriginLab,美国)软件处理。

离子淌度测定中的迁移时间校正及CCS校正依据文献^[31-32]进行。

2 结果与讨论

2.1 同种糖蛋白复合物不同蛋白型的分辨与分离

尽管来自鸡蛋蛋白的avidin 2及由玉米细胞表达的重组avidin 1蛋白的氨基酸序列完全一致,但由于糖基化等修饰程度不同而呈现明显的分子质量分布差异。非变性条件下,avidin以四聚体形式存在,肽链的理论分子质量为 $57.2\ \text{ku}$ 。Avidin 1及avidin 2四聚体最高丰度蛋白型的实测分子质量分别为 62.3 、 $63.7\ \text{ku}$,示于图1a。与avidin 1相比,avidin 2四聚体的分子质量分布更宽,且呈现可部分分辨的多重亚群分布。其中,将丰度次高及最高的亚群分布分别记为分布I和分布II,各自对应的最高丰度蛋白型的实测分子质量分别为 62.3 、 $63.7\ \text{ku}$ 。Avidin 1及avidin 2的各价态四聚体

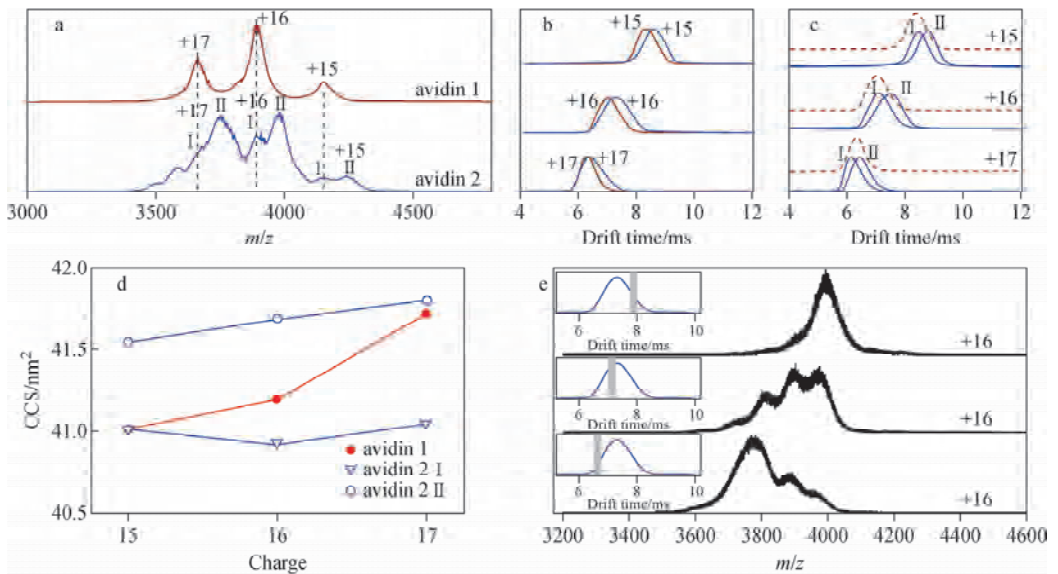


图1 Avidin 1和avidin 2四聚体蛋白的质谱图(a)和四聚体+15~+17价离子的迁移时间谱图(b); avidin 2四聚体+15~+17价离子中分布I和II的迁移时间谱图(c);

avidin 1和avidin 2中分布I和II的四聚体离子CCS值(d);

在 $0.2\ \text{ms}$ 区间不同迁移时间窗口内检测到的+16价avidin 2四聚体离子不同亚群的质谱图(e)

Fig. 1 Mass spectra of tetrameric avidin 1 and avidin 2 (a); drift time profiles of tetrameric avidin 1 and avidin 2 ions in charge states +15-+17 (b); drift time profiles of distribution I and II of tetrameric avidin 2 ions in charge states +15-+17 (c); CCS values calculated for the tetrameric ions of avidin 1 and distribution I and II of avidin 2 (d); mass spectra of subpopulations of +16 charged avidin 2 tetramer ions collected within $0.2\ \text{ms}$ drift-time windows illustrated by the insets (e)

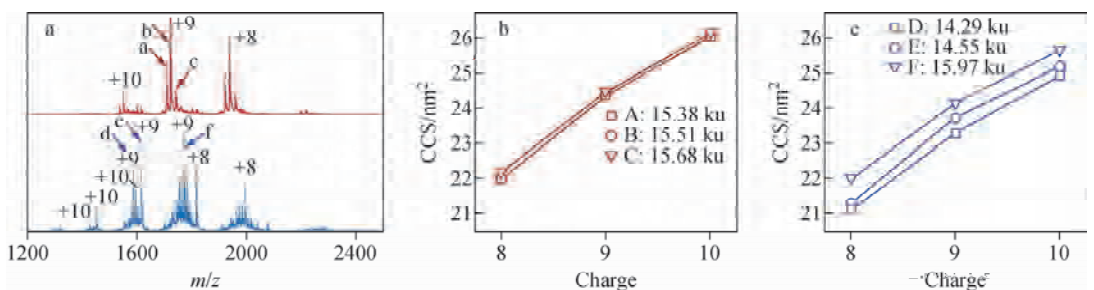
离子均呈现稳定的迁移时间差异(示于图 1b, 取覆盖最高丰度蛋白型、半峰宽 m/z 150 的分布亚群), 糖基化程度较高、分子质量较大的 avidin 2 迁移时间稍长。分别提取 avidin 2 分布 I 和 II 中亚群离子的迁移时间谱(取覆盖最高丰度蛋白型、半峰宽 m/z 50 的分布亚群), 二者在各价态上均呈现稳定的差异, 糖基化程度较高、分子质量较大的亚群离子迁移时间更长, 示于图 1c。尽管 avidin 2 分布 I 的分子质量略高于 avidin 1, 但前者的迁移时间短于后者。针对上述糖蛋白复合物的 CCS 计算结果, avidin 1 的 CCS 介于 avidin 2 的分布 I 和 II 之间, 示于图 1d。结果表明, 利用行波式离子淌度模块可以在迁移时间维度上有效地分离糖基化程度不同的蛋白型亚群。由于上述复合物的分子质量差异源自糖基化成分, 而对于具有分支结构的糖链, 其空间伸展程度并不单纯地与分子质量相关(不对称性较高的糖型结构, 如 Man5GlcNAc2 比分子质量相近的对称糖型空间伸展程度更高; 具有多重分支结构的糖型, 如 Man5GlcNAc5 比分子质量相近的具有双分支主体结构的其他常见糖型伸展程度更低; 这些糖型均存在于 avidin 中^[33]), 这表明由玉米细胞表达的 avidin 1 糖链结构整体伸展程度高于 avidin 2。

随后, 本工作研究了基于离子淌度分离维度上针对糖基化程度不同的蛋白型亚群进行分离的可行性。在 0.2 ms 迁移时间窗口、不同迁移时间内, 经质谱检测的单一价态离子呈现显著收窄的分子质量分布, 有效地分离了部分主

要蛋白型, 示于图 1e, 这种分离模式与色谱-质谱联用相似。在完整蛋白层面, 同种糖蛋白不同蛋白型之间多肽链主干及宏观构象相同, 糖基化差异体现的化学或物理性质差异难以体现蛋白整体的理化性质差异, 因此, 难以利用常规的液相色谱等方式进行分离。在质谱测定中, 较大尺寸的糖蛋白及其复合物随着糖基化位点和糖型组合的增多, 各蛋白型的分子质量差异不足以超过蛋白型亚群分子质量的分布宽度, 因此质谱信号高度重叠, 难以实现有效地蛋白型分离。在行波式离子淌度与质谱联用条件下, 多个蛋白型亚群的气相分离得以实现, 能够可控地提取特定分布的蛋白型亚群, 为大型糖蛋白及糖蛋白复合物的异质性解析和精细结构分析提供了有效的方案。

2.2 糖蛋白复合物解离所得亚基的结构差异

Avidin 四聚体经 CID 作用可解离为亚基单体。由于单体所含糖基化位点减少、各糖型组合的可能性减少, 各蛋白型信号在飞行时间质谱中得以充分分辨, 示于图 2a。与 avidin 1 相比, avidin 2 单体的蛋白型分布更复杂, 分子质量分布更宽, 且高丰度蛋白型分子质量数值更大, 与对 avidin 四聚体的分子质量分布表征结果一致。值得注意的是, 在 avidin 2 的单体信号中出现了显著的不同价态信号交错现象, 看似同一价态的信号簇内实际上包含不同价态的蛋白型信号, 因此需对单体信号进行细致地价态和分子质量分析, 以免引起 CCS 值的错误计算。分子质量不同的各蛋白型在离子淌度测定中呈现程度不等的迁移时间差异, 导致差异



注: 红色表示 avidin 1, 蓝色表示 avidin 2; 箭头所示为用于离子淌度分析的蛋白型 A-B 的 +9 价离子对应的质谱信号

图 2 由四聚体解离获得的 avidin 1 和 avidin 2 单体蛋白的质谱图, avidin 1 单体蛋白型 A~C(b) 和 avidin 2 单体蛋白型 D~F(c) 的 CCS 值

Fig. 2 Mass spectra of monomeric avidin 1 and avidin 2 released from the corresponding tetramers (a), calculated CCS values of proteoforms A-C of avidin 1 (b) and proteoforms D-F of avidin 2 (c)

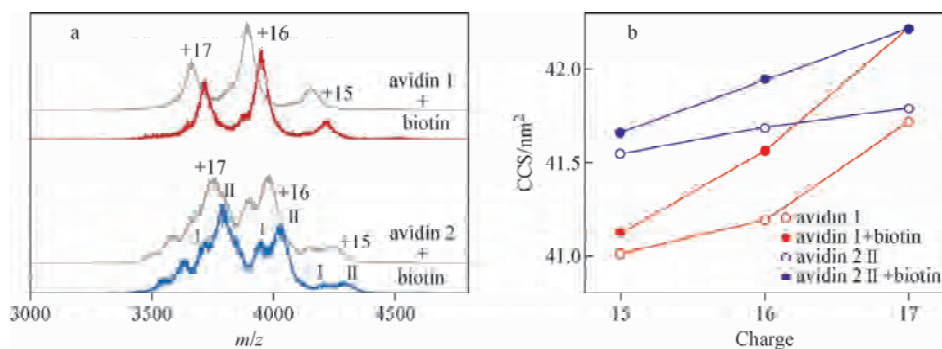
程度不等的 CCS 计算值。本工作在 avidin 1 中选取分子质量分别为 15.38、15.51、15.68 ku 的 3 种主要蛋白型(记为 A、B、C)作为示例,示于图 2b。3 种蛋白型在 +8~+10 的 3 个主要价态下的 CCS 排序与分子质量排序一致,均仅呈现微小的 CCS 差别(小于 0.1 nm^2)。而 avidin 2 中分子质量分别为 14.29、14.55、15.57 ku 的 3 个蛋白型(记为 D、E、F)之间则体现了较大的 CCS 差异,示于图 2c。蛋白型 D 与 E 的分子质量相差 0.3 ku,但二者之间的 CCS 差异可超过 0.4 nm^2 ,远超过同样具有 0.3 ku 分子质量差异的 avidin 1 蛋白型 A 与 C 之间的 CCS 差异。

在 avidin 四聚体的离子淌度测定中,avidin 2 的蛋白型整体 CCS 高于 avidin 1,示于图 1d;但在对解离单体的离子淌度测定中,avidin 2 单体的 CCS 普遍低于 avidin 1,甚至分子质量较高的 avidin 2 蛋白型 F 的 CCS 也并未高于分子质量较低的 avidin 1 蛋白型 C,示于图 2c。由于此处测定的 avidin 单体均由四聚体经 CID 碎裂产生,单体的空间伸展程度既与自身结构相关,也受碰撞过程中能量传递的影响。在对蛋白质复合物的非变性质谱及基于 CID 的串联质谱测定中,蛋白亚基解离往往伴随非对称电荷分配现象,即被解离的亚基所携带的电荷占母离子整体电荷的比例远高于其质量占比^[34],其自身也发生高度的去折叠^[35],二者之间可互为因果^[5]。Avidin 1 及 avidin 2 解离单体的 CCS 值均远大于四聚体实测 CCS 值的

1/4(已接近 60%),体现了离去亚基的去折叠程度。离去亚基发生去折叠所需的能量来源于碰撞过程,去折叠程度与能量相关^[5]。由于各样品中不同蛋白型离子均在相同的碰撞条件下生成,可获取的额外能量均等,但克服分子间相互作用脱离原复合物所需的能量可能因蛋白型的修饰程度不同而异。分子质量相近的不同蛋白型,如因糖链组成和结构差异引起的亲和力差异^[36],可能导致在具有相同碰撞能量输入的情况下,克服解离所需能垒后剩余的额外能量不同,从而使解离产物中呈现不同的去折叠程度,导致 CCS 值的差异。而 avidin 2 解离单体 CCS 值普遍低于 avidin 1 的现象表明,天然的 avidin 2 复合物内亚基间亲和力高于人工重组的 avidin 1。

2.3 高阶糖蛋白复合物结构

与过量 biotin(分子质量 244.3 u)混合后,每 1 分子 avidin 四聚体与 4 分子 biotin 结合形成高阶复合物,分子质量增大 977 u。由于 biotin 与 avidin 的亲和力极高($K_d \approx 10^{-15} \text{ mol/L}$)^[37]、结合计量比高度确定,因此 biotin 的结合不改变 avidin 蛋白型的原有分布,示于图 3a。Biotin 的结合使 avidin 四聚体的 CCS 值略有增大,但对于 avidin 1 和 avidin 2 四聚体,biotin 结合前后引起的 CCS 变化均不大于分子质量差异更小的 avidin 不同蛋白型分布之间的 CCS 差异,示于图 3b。在水溶液中,biotin 取代若干处于与 avidin 结合态的溶剂分子而与 avidin 结合,结合位点处于复合物空间结构内的空腔区域,并



注:红色表示 avidin 1 与 biotin 的复合物;蓝色表示 avidin 2 与 biotin 的复合物;灰色表示未与 biotin 结合的 avidin

图 3 Avidin 1、avidin 2 四聚体与 biotin 复合物及未结合 biotin 四聚体的质谱图(a), avidin 四聚体与 biotin 结合前后的 CCS 值比较(b)

Fig. 3 Mass spectra of tetrameric avidin 1 and avidin 2 in complex with biotin and unbound tetramers (a), comparison of calculated CCS values of avidin tetramers before and after binding with biotin (b)

不引起水合半径的显著变化^[38]。离子淌度测定结果表明,在非变性质谱分析中,avidin-biotin复合物进入气相后,原处于空腔区域的 biotin 并未显著暴露于外部,CCS 值并未显著增加,符合非变性质谱条件不显著改变蛋白复合物原有架构的预期。结合 biotin 后,糖基化程度不同的 avidin 复合物蛋白型之间仍呈现原有程度的 CCS 差异。

2.4 电荷调控条件下糖蛋白复合物及亚基构象变化

使用 TEAA 对 avidin 进行减电荷处理后,四聚体的主要价态由常规条件下的 +15~+17 减小到 +11、+12,示于图 4a。相应地,使用 mNBA 对 avidin 进行增电荷处理后,四聚体主

要价态显著升高,其中 avidin 1 的升高程度显著高于 avidin 2。此外,在增电荷测定中,未施加任何源内碎裂条件下,avidin 2 仍保持稳定的四聚体复合状态,而 avidin 1 发生了显著解离,在质谱图中呈现游离的二聚体及单体信号。这些解离产物的电荷密度较高,体现了不对称电荷分配,因此可判定为气相解离产物而非溶液相解离产物^[5]。这表明,经 mNBA 处理后的 avidin 1 四聚体稳定性显著减弱,在未施加源内碎裂的常规温和条件下易发生气相解离。而同样经 mNBA 处理后的 avidin 2 四聚体仍保持完整,验证了 2.2 节中关于天然 avidin 2 复合物内亚基间亲和力高于人工重组 avidin 1 的推论。对比常规条件及电荷调控条件下 avidin 四

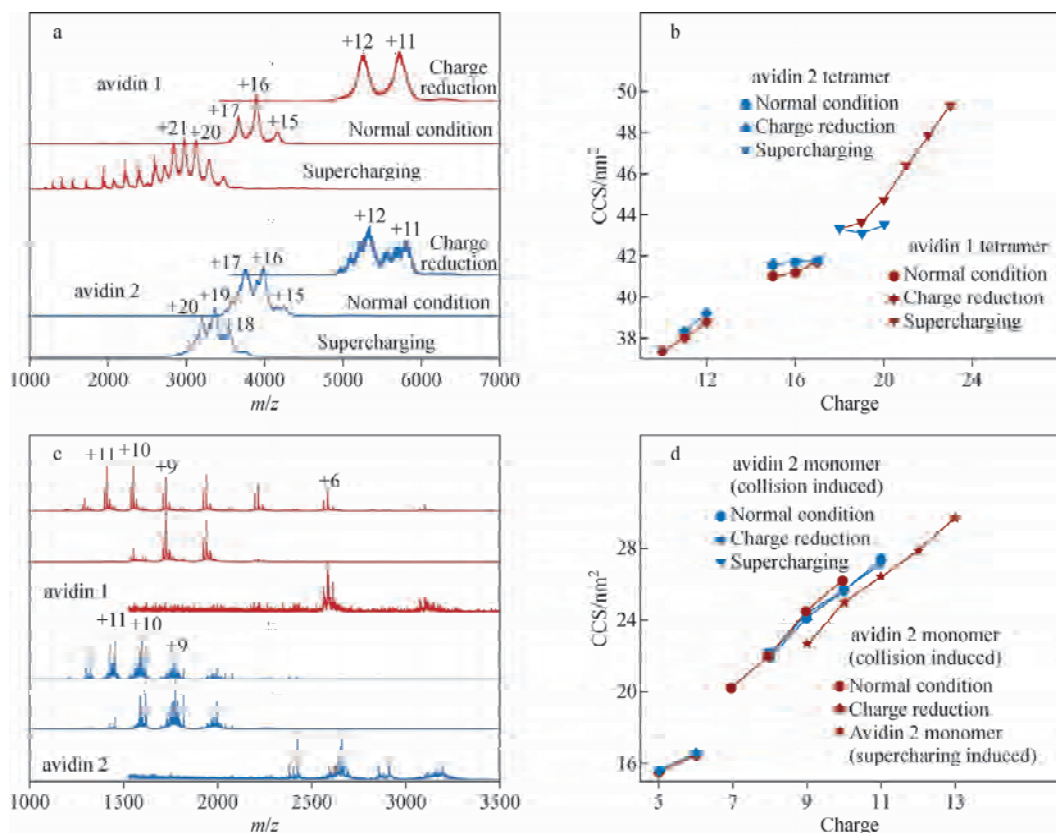


图 4 Avidin 1、avidin 2 在减电荷、常规及增电荷条件的质谱图(a);avidin 四聚体在常规及电荷调控条件的 CCS 值对比(b);avidin 1、avidin 2 在增电荷、常规及减电荷条件下通过 CID 所得单体的质谱图(c);avidin 单体在常规及电荷调控条件下的 CCS 值对比(d)

Fig. 4 Mass spectra of avidin 1 and avidin 2 acquired under charge-reduction, normal and supercharging conditions (a); comparison of calculated CCS values of avidin tetramers

under normal and charge manipulation conditions (b); mass spectra of monomeric avidin 1 and avidin 2 released through CID under supercharging, normal and charge-reduction conditions (c);

comparison of calculated CCS values of avidin monomers under normal and charge manipulation conditions (d)

聚体的 CCS 测定值,增、减电荷处理均使不同价态间四聚体离子的 CCS 差异增大,示于图 4b。在人工调控电荷的条件下,复合物整体价态升高意味着表面电荷密度增大,电荷间斥力可导致气相蛋白离子能量升高、稳定性降低、松散程度增大;反之亦然。离子淌度测定结果与此相符。经 mNBA 增电荷获得的 avidin 1 和 avidin 2 四聚体离子 CCS 较常规条件获得的离子 CCS 增加幅度可分别达到 19%和 4%,后者与同样使用 mNBA 增电荷处理的 630 ku 复合物 CCS 增加幅度相当^[26],凸显了 avidin 1 在增电荷试剂作用下的显著失稳效应。经 TEAA 减电荷获得的 avidin 1 和 avidin 2 四聚体离子 CCS 较常规条件获得的离子 CCS 分别减小 8%和 7%,幅度高于以咪唑作为减电荷试剂对分子质量超过 800 ku 的大型复合物产生的 CCS 减小效果(约 5%)^[28]。此外,增电荷条件下,avidin 1 四聚体 CCS 随价态升高的上升幅度显著大于 avidin 2,进一步佐证了 avidin 2 复合物的稳定性强于 avidin 1。离子淌度数据与质谱数据对稳定性评价的一致性表明,在评价环境条件对蛋白复合物稳定性影响时,CCS 变化幅度可作为评价指标。在条件变化不足以破坏复合物完整性时,单纯的质谱数据难以提供评价依据,此时离子淌度测定可发挥重要作用。

在电荷调控条件下,由于复合物整体稳定性和复合物可提供的电荷总量发生变化,由复合物解离所得的单体价态分布随之发生相应变化。Avidin 四聚体增电荷处理后,经 CID 解离所得单体的最高丰度价态提升 1~2 个单位,而减电荷处理后单体价态可降低 3 个单位,示于图 4c。本工作选取 avidin 1 的最高丰度蛋白型 B 和 avidin 2 的最高丰度蛋白型 F 进行 CCS 分析,示于图 4d。在减电荷条件下,avidin 1 和 avidin 2 的单体 CCS 值差异程度与常规条件相当,表明减电荷操作未引起二者去折叠程度的显著差异。在增电荷条件下,avidin 2 经 CID 所得单体 CCS 值并未显著增加,表明增电荷条件并未显著提升单体的去折叠程度,进一步验证了 avidin 2 复合物的稳定性未受显著影响。增电荷 avidin 1 在一级质谱条件下所得单体的 CCS 值(图 4d 星状数据点)显著低于上述高价态 avidin 单体的 CCS 值。这表明,

尽管在弱碰撞条件下获得的单体价态分布与 CID 条件所得的单体难以区分,但可在 CCS 值上呈现显著差异。非变性质谱条件下的价态分布常用作蛋白构象的变化依据^[39],基于离子淌度分析获得的 CCS 值可以更灵敏地反映构象变化。

3 结论

本工作以由不同物种表达 avidin 作为模式糖蛋白复合物体系,针对常见的糖蛋白复合物表征需求,在蛋白型分辨与分离、糖蛋白复合物亚基解离、高阶复合物结构、电荷调控条件下的构象变化等方面,考察了行波式离子淌度分析在非变性质谱分析中可为糖蛋白复合物稳定性和小规模结构变化表征发挥的作用。离子淌度具备在完整糖蛋白或复合物水平上对部分蛋白型亚群分布进行气相分离的能力,能够可控地提取特定分布的蛋白型亚群,有利于完整糖蛋白及复合物的异质性解析;能够反映非变性质谱条件下高阶复合物的架构维系;能够以较高的分辨能力灵敏地反映蛋白质在气相解离、电荷调控以及经电荷调控的气相解离条件下的构象变化程度,从而应用于蛋白复合物体系的稳定性分析。不同物种表达的 avidin 复合物体现了显著的稳定性差异,以及自身结构对电荷调控的响应差异。这些结果证明了离子淌度在完整蛋白层面对糖蛋白及复合物稳定性和小规模结构变化及差异的分析能力,可与多种质谱手段结合,为糖蛋白及复合物的多层次精细结构及动态结构解析提供灵活有效的研究方案。

致谢:感谢深圳湾实验室多组学质谱平台提供的仪器支持,以及殷海娣博士的技术协助。

参考文献:

- [1] MOREMEN K W, TIEMEYER M, NAIRN A V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(7): 448-462.
- [2] WOLFERT M A, BOONS G J. Adaptive immune activation: glycosylation does matter[J]. *Nature Chemical Biology*, 2013, 9(12): 776-784.
- [3] LIU X R, ZHANG M M, GROSS M L. Mass spectrometry-based protein footprinting for higher-

- order structure analysis: fundamentals and applications[J]. *Chem Rev*, 2020, 120(10): 4 355-4 454.
- [4] LENEY A C, HECK A J. Native mass spectrometry: what is in the name?[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2017, 28(1): 5-13.
- [5] TONG W, WANG G. How can native mass spectrometry contribute to characterization of biomacromolecular higher-order structure and interactions?[J]. *Methods*, 2018, 144: 3-13.
- [6] KONIJNENBERG A, BUTTERER A, SOBOTT F. Native ion mobility-mass spectrometry and related methods in structural biology[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2013, 1 834(6): 1 239-1 256.
- [7] LANUCARA F, HOLMAN S W, GRAY C J, EYERS C E. The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics[J]. *Nat Chem*, 2014, 6(4): 281-294.
- [8] SMITH D P, KNAPMAN T W, CAMPUZANO I, MALHAM R W, BERRYMAN J T, RADFORD S E, ASHCROFT A E. Deciphering drift time measurements from travelling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry studies [J]. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*, 2009, 15(2): 113-130.
- [9] UETRECHT C, ROSE R J, van DUIJN E, LORENZEN K, HECK A J R. Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies[J]. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39 (5): 1 633-1 655.
- [10] YANG Y, LIU F, FRANC V, HALIM L A, SCHELLEKENS H, HECK A J R. Hybrid mass spectrometry approaches in glycoprotein analysis and their usage in scoring biosimilarity [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13 397.
- [11] BORROK M J, JUNG S T, KANG T H, MONZINGO A F, GEORGIU G. Revisiting the role of glycosylation in the structure of human IgG Fc[J]. *ACS Chemical Biology*, 2012, 7(9): 1 596-1 602.
- [12] SCHEID J F, BARNES C O, ERASLAN B, HUDAK A, KEEFFE J R, COSIMI L A, BROWN E M, MUECKSCH F, WEISBLUM Y, ZHANG S, DELOREY T, WOOLLEY A E, GHANTOUS F, PARK S M, PHILLIPS D, TUSI B, HUEY-TUBMAN K E, COHEN A A, GNANAPRAGASAM P N P, RZASA K, HATZIOANNO T, DURNEY M A, GU X, TADA T, LANDAU N R, WEST A P, ROZENBLATT-ROSEN O, SEAMAN M S, BARDEN L R, GRAHAM D B, DEGUINE J, BIENIASZ P D, REGEV A, HUNG D, BJORKMAN P J, XAVIER R J. B cell genomics behind cross-neutralization of SARS-CoV-2 variants and SARS-CoV [J]. *Cell*, 2021, 184 (12): 3 205-3 221.
- [13] KAWASAKI N, ITOH S, HASHII N, TAKAKURA D, QIN Y, HUANG X, YAMAGUCHI T. The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals[J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(5): 796-800.
- [14] PALLISTER E G, CHOO M S F, WALSH I, TAI J N, TAY S J, YANG Y S, NG S K, RUDD P M, FLITSCH S L, NGUYEN-KHUONG T. Utility of ion-mobility spectrometry for deducing branching of multiply charged glycans and glycopeptides in a high-throughput positive ion LC-FLR-IMS-MS Workflow[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(23): 15 323-15 335.
- [15] CREESE A J, COOPER H J. Separation and identification of isomeric glycopeptides by high field asymmetric waveform ion mobility spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84 (5): 2 597-2 601.
- [16] PATHAK P, BAIRD M A, SHVARTSBURG A A. High-resolution ion mobility separations of isomeric glycoforms with variations on the peptide and glycan levels[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2020, 31 (7): 1 603-1 609.
- [17] HOFMANN J, PAGEL K. Glycan analysis by ion mobility-mass spectrometry[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(29): 8 342-8 349.
- [18] SARBU M, ZHU F, PETER-KATALINIĆ J, CLEMMER D E, ZAMFIR A D. Application of ion mobility tandem mass spectrometry to compositional and structural analysis of glycopeptides extracted from the urine of a patient diagnosed with Schindler disease[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2015, 29(21): 1 929-1 937.
- [19] LI H, BENDIAK B, SIEMS W F, GANG D R, HILL H H. Ion mobility-mass correlation trend line separation of glycoprotein digests without deglycosylation[J]. *Int J Ion Mobil Spectrom*, 2013, 16(2): 105-115.
- [20] BARROSO A, GIMÉNEZ E, KONIJNENBERG A, SANCHO J, SANZ-NEBOT V, SOBOTT F. Evaluation of ion mobility for the separation of glycoconjugate isomers due to different types

- of sialic acid linkage, at the intact glycoprotein, glycopeptide and glycan level[J]. *Journal of Proteomics*, 2018, 173: 22-31.
- [21] LIU F C, CROPLEY T C, RIDGEWAY M E, PARK M A, BLEIHOLDER C. Structural analysis of the glycoprotein complex avidin by tandem-trapped ion mobility spectrometry-mass spectrometry (tandem-TIMS/MS)[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(6): 4 459-4 467.
- [22] GÖTH M, PAGEL K. Ion mobility-mass spectrometry as a tool to investigate protein-ligand interactions[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409 (18): 4 305-4 310.
- [23] DYACHENKO A, GRUBER R, SHIMON L, HOROVITZ A, SHARON M. Allosteric mechanisms can be distinguished using structural mass spectrometry[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(18): 7 235-7 239.
- [24] ABAYE D A, AGBO I A, NIELSEN B V. Current perspectives on supercharging reagents in electrospray ionization mass spectrometry[J]. *RSC Advances*, 2021, 11(33): 20 355-20 369.
- [25] STERLING H J, DALY M P, FELD G K, THOREN K L, KINTZER A F, KRANTZ B A, WILLIAMS E R. Effects of supercharging reagents on noncovalent complex structure in electrospray ionization from aqueous solutions [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2010, 21(10): 1 762-1 774.
- [26] STERLING H J, KINTZER A F, FELD G K, CASSOU C A, KRANTZ B A, WILLIAMS E R. Supercharging protein complexes from aqueous solution disrupts their native conformations [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2012, 23(2): 191-200.
- [27] CHAN D S H, MATAK -VINKOVIĆ D, COYNE A G, ABELL C. Insight into protein conformation and subcharging by DMSO from native ion mobility mass spectrometry[J]. *Chemistry Select*, 2016, 1(18): 5 686-5 690.
- [28] van DUIJN E, BARENDREGT A, SYNOWSKY S, VERSLUIS C, HECK A J. Chaperonin complexes monitored by ion mobility mass spectrometry [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(4): 1 452-1 459.
- [29] BORNSCHEIN R E, HYUNG S J, RUOTOLO B T. Ion mobility-mass spectrometry reveals conformational changes in charge reduced multiprotein complexes[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2011, 22(10): 1 690-1 698.
- [30] FLICK T G, WILLIAMS E R. Supercharging with trivalent metal ions in native mass spectrometry[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2012, 23 (11): 1 885-1 895.
- [31] RUOTOLO B T, BENESCH J L P, SANDERCOCK A M, HYUNG S J, ROBINSON C V. Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(7): 1 139-1 152.
- [32] BUSH M F, HALL Z, GILES K, HOYES J, ROBINSON C V, RUOTOLO B T. Collision cross sections of proteins and their complexes: a calibration framework and database for gas-phase structural biology[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(22): 9 557-9 565.
- [33] BRUCH R C, WHITE H B. Compositional and structural heterogeneity of avidin glycopeptides [J]. *Biochemistry*, 1982, 21(21): 5 334-5 341.
- [34] ROSTOM A A, ROBINSON C V. Disassembly of intact multiprotein complexes in the gas phase[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1999, 9(1): 135-141.
- [35] SCIUTO S V, LIU J, KONERMANN L. An electrostatic charge partitioning model for the dissociation of protein complexes in the gas phase [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2011, 22(10): 1 679.
- [36] WANG G, de JONG R N, van den BREMER E T, BEURSKENS F J, LABRIJN A F, UGURLAR D, GROS P, SCHUURMAN J, PARREN P W, HECK A J. Molecular basis of assembly and activation of complement component C1 in complex with immunoglobulin G1 and antigen[J]. *Mol Cell*, 2016, 63(1): 135-145.
- [37] GREEN N M. The use of (¹⁴C) biotin for kinetic studies and for assay[J]. *Biochem J*, 1963, 89 (3): 585-591.
- [38] LIVNAH O, BAYER E A, WILCHEK M, SUSSMAN J L. Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(11): 5 076-5 080.
- [39] KALTASHOV I A, ABZALIMOV R R. Do ionic charges in ESI MS provide useful information on macromolecular structure?[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2008, 19(9): 1 239-1 246.