

MALDI-TOF-MS 分析基因重组 糖蛋白 rhEPO 的一级结构

蔡耘 王红霞 魏开华 钱小红 杨松成

(国家生物医学分析中心 100850)

糖蛋白是一类由糖类和蛋白质以共价键连接而成的结合蛋白，其结构与功能研究，在生物学及医学上有着重要的意义，随着生物化学、免疫化学，以及分子生物学研究的深入，也促进了对糖蛋白研究的发展。近 20 年来，人们在研究中发现，许多糖蛋白中糖链的存在与否，与其功能密切相关，糖蛋白类药物在治疗多种疾病中颇具疗效，糖蛋白的结构分析受到了普遍的关注，糖蛋白中糖的含量、多肽链中糖基化的位点、糖链的结构及其组成的微不均一性等方面的研究，使人们对糖蛋白一级结构乃至空间结构有了详细的了解。

重组人促红细胞生成素 (rhEPO) 是一种应用广泛的药物，它能够调节红细胞生成的速率，用于治疗各种贫血及红细胞增多症。本文应用 MALDI-TOF-MS 对国产基因工程药物 rhEPO 的分子量、不同类型的糖含量及糖基化位点等一系列糖蛋白一级结构的重要指标进行了分析，得到了可靠的结果。

1 分子量及糖含量的测定

EPO 是一种糖蛋白，分子量为 30-39KD，其肽链部分由 166 个氨基酸组成，有两个链内二硫键，分子量为 18398Da。重组人 EPO 有三个 N-糖基化部位 (24、38 和 83 位天冬酰胺残基)，126 位丝氨酸残基为 O-糖基化部位。

我们将 EPO 样品用 ZipTip 脱盐，进行 MALDI-TOF-MS 测定，其平均分子量在 28085Da 左右，文献报导完全糖基化的重组和天然 EPO 的分子量都应在 30400 Da 以上，我们断定此样品为非完全糖基化。研究已经证实 126 位 O-糖链的主要组成为一个 N-乙酰氨基半乳糖连接一个半乳糖并与丝氨酸连接，端基分别被唾液酸修饰，此糖链的分子量为 915Da，而我们用 O-聚糖酶处理过的 EPO 样品，其分子离子峰基本未发生变化，说明糖蛋白样品中无 GalNAc-Ser 型 O-糖链，只存在 N-连接糖链，同时，本样品的糖链缺失有 2300 Da 左右，所以，我们初步断定此样品不仅有 O-糖链丢失，很可能还存在于 N-糖链丢失。

唾液酸的含量也是糖蛋白的结构指标之一，由于唾液酸一般均处于糖链外侧，我们用唾液酸酶可以直接进行酶切反应并做 MALDI-TOF-MS 测定，样品分子量降低了 2415Da，这一部分为样品中唾液酸的质量，因此，本样品中唾液酸含量为 $2415/28085 \times 100\% = 8.6\%$ 。内糖苷键酶 F 切断 N-糖链五糖核心最内侧的 GlcNAc-GlcNAc

糖苷键，得到含一个 GlcNAc (M=203Da) 的肽链，用内糖苷键酶 F 酶切后，EPO 样品的分子离子峰，与理论值相比差 422Da，恰好为两个 GlcNAc (203 2=406Da)，由此我们断定此样品中很可能只有两个 N-糖基化位点。同时，我们可以计算出，此样品的糖含量为： $(28085-18820+406) / 28085 \times 100\% = 34.4\%$ ，理论上 EPO 的糖链应占 39%。

2 糖基化位点的确定

经还原烷基化并 Glu-C 酶切的质谱图中出现了一些肽段，在此基础上进一步用肽-N-聚糖酶 (PNGase-F) 处理后，可明显看出新增的两个峰，这两个峰所代表的肽段应为含糖肽段，我们对这两个肽段进行联网数据库检索，得到了其氨基酸序列，分别为第 32-55 位氨基酸：HCSLNE^{NIT}VPDTKVNIFYAWKRME，及第 73-117 位氨基酸：AVLRGQALLV^{NSS}QPWEPLQLHVDKAV SGLRSLTLLRALGAQKE，其中都含有 N-糖链特异连接位点----天冬酰氨序列子 (Asn-X-Thr/Ser)，它们在 EPO 的氨基酸序列中分别是 38 位及 83 位，由此，我们确定了此 EPO 样品中的 N-糖基化位点。

本文建立了用生物质谱测定糖蛋白分子量、糖含量，确定糖苷键类型及糖基化位点等一系列系统的方法，对重组的人促红细胞生成素 (EPO) 样品的结构进行了测定，结果可靠，拓宽了质谱在生命科学领域中的应用，为生物工程产品的质量控制在新的手段，具有良好的实际应用价值。

Primary Structure Analysis of rhEPO by MALDI-TOF-MS

Cai Yun, Wang Hongxia, Wei Kaihua, Qian Xiaohong, Yang Songcheng

(National Center of Biomedical Analysis, Academy of Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract

Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) is a rather new 'soft ionization' techniques. Because of its high sensitivity and accuracy, it has been widely used in detection and characterization of macromolecules such as peptides, proteins and oligonucleotides. It also has been applied successfully in the analysis of posttranslational modification of proteins, such as phosphorylation and glycosylation. Compared with the conventional chemical methods, mass spectrometry is simple, rapid and does not require radiolabeling.

In this research, a systematic method to analyse glycoprotein by MALDI-TOF-MS was developed. A practical sample—recombinant human erythropoietin was analysed by the method. The molecular weight, content of carbohydrate and glycosylation sites of the glycoprotein were determined by MALDI-TOF-MS, combined with the endo-glycosidase digestion and peptide mapping. The experimental result shows that MALDI-TOF-MS is a very powerful technique in the characterization of glycosylation proteins.