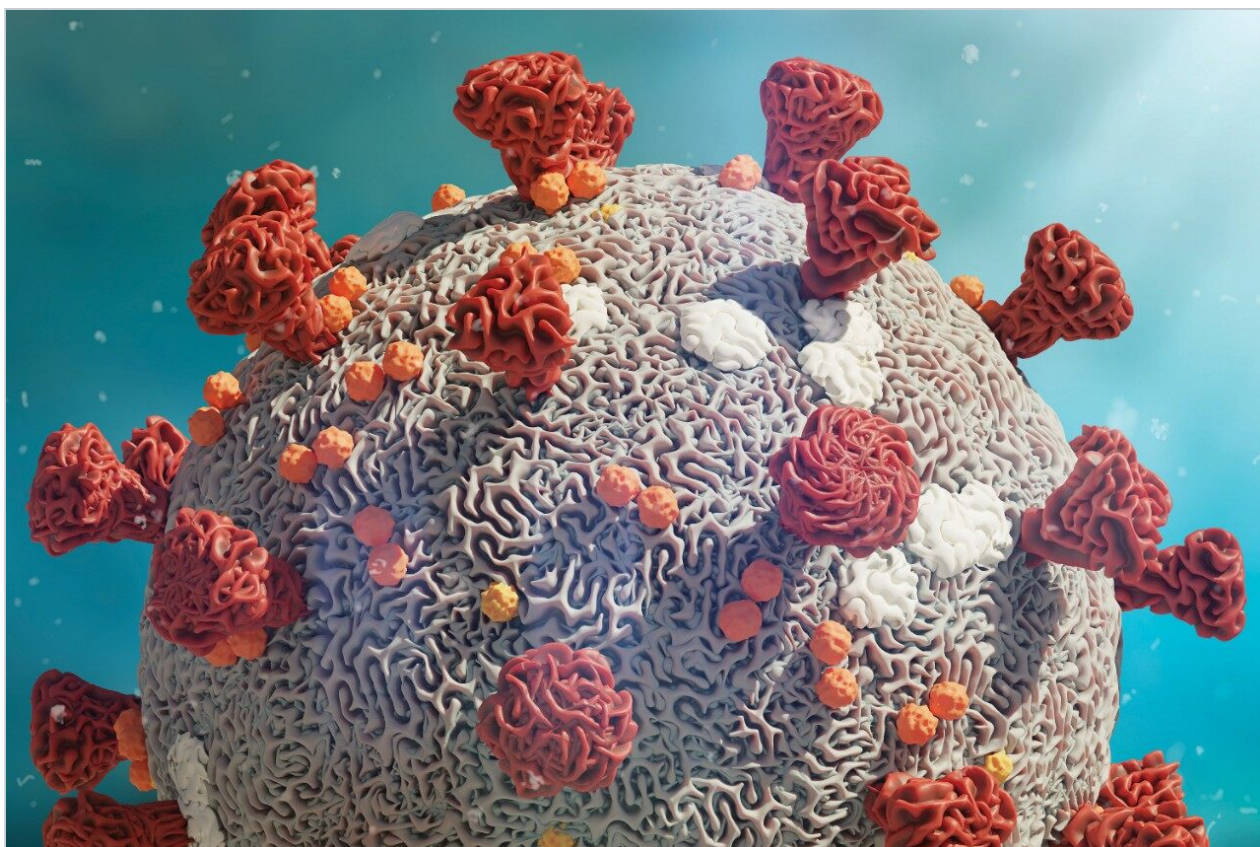


剖析新型冠状病毒病(COVID-19)：使用环形离子淌度分离技术对O-联糖肽的糖基组成进行结构表征

Lindsay Morrison

Waters Corporation, Georgetown University Medical Center, Lombardi Comprehensive Cancer Center



仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

高度糖基化的SARS-CoV-2刺突蛋白与COVID-19的传染性有关，因此，研究人员在表征衣壳刺突蛋白的糖基化模式上开展大量工作，以便为疫苗和免疫药物的开发提供指导。本研究利用新型SELECT SERIES Cyclic IMS的新颖配置，对在刺突蛋白的弗林蛋白酶切位点附近发现的O-联糖肽进行糖基结构和键表征；弗林蛋白酶切会使刺突蛋白的融合序列暴露，导致S1亚基与S2亚基分离，这一过程是病毒进入细胞的必要条件。另外，还鉴定出同时具有 α 2-3和 α 2-6唾液酸键的扩展核心1和核心2型结构；研究表明，糖基化会改变底物识别机制，核心2和扩展核心1结构的比率可能影响新型冠状病毒的毒力。

优势

SELECT SERIES Cyclic IMS的新颖设计能够对SARS-CoV-2刺突蛋白中低水平O-联糖肽的糖基结构进行位点特异性、键特异性表征。利用捕集阱碎裂模式从O-糖区域释放出氧鎓离子碎片，并用高分辨率离子淌度技术分离和分析碎片离子。

简介

近期爆发的COVID-19大流行疫情由SARS-CoV-2冠状病毒引起，已导致数百万人患病，迄今为止已经造成全球200万人死亡¹。由于是一种新病毒，科学界一直致力于快速表征和编译其生物物理特征，希望能够帮助开发有效的疫苗和免疫药物。SARS-CoV-2病毒颗粒通过用突起的跨膜刺突蛋白与宿主细胞ACE2（血管紧张素转化酶2）受体结合而进入细胞²。SARS-CoV-2冠状病毒刺突蛋白为同源三聚体I类融合蛋白，由两个高度糖基化的亚基S1和S2组成^{3,4}。之前对已知病毒病原体（包括流感）的研究表明，外壳的糖基成分在免疫逃逸中发挥至关重要的作用，特别是通过免疫识别位点的空间位阻起作用⁵⁻⁷。

SARS-CoV-2病原体的表征工作包括对冠状病毒刺突蛋白糖基化的多项综合研究。迄今为止，这些研究已经表明，在22个可用的N-糖基化位点中有14个共有占用位点，其余7个位点的占用则存在冲突⁸⁻¹⁶。此外，Shajahan等人的研究证明，S1结构域上有三个O-联糖基化位点，其中一个已由Sanda等人确证^{10,11}。在SARS-CoV-2刺突蛋白的序列分析中，Andersen和同事预测了S1和S2亚基侧翼连接区中的弗林蛋白酶切位点，该位点对蛋白质激活至关重要²。他们进一步预测，这个含有弗林蛋白酶切位点的区域包含至多三个额外的O-联糖基化位点，推测这些位点的功能与传染性和传播性有关²。众所周知，O-糖的表征非常困难，原因有：缺乏共有序列、糖型之间的异质性高、相对丰度低。因此，表征这类分析物需要采用高性能色谱与高分辨率

、高灵敏度质谱。先前使用沃特世SYNAPT平台进行的研究表明，该平台能够解析游离寡糖异构体的支链和线性糖基结构，并从游离寡糖标准品中分离出 α 2-3和 α 2-6键合异构体¹²⁻¹⁶。SELECT SERIES Cyclic IMS的MS/MS碎裂为多元弗林蛋白酶切位点之前沿连接区的O-联糖基化提供了清晰的证据，并利用环形离子淌度技术对O-糖结构进行位点特异性分离和表征。此项独特实验提供的可扩展分辨率表明存在核心1、扩展核心1和核心2结构混合物，为NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc和NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc提供了分辨率，这两种异构体具有非常相似的碰撞截面。

实验

样品描述

重组SARS-CoV-2刺突蛋白在HEK 293细胞中表达，购自Acrobiosystems。用DTT还原刺突蛋白中的二硫键，并用碘乙酰胺进行处理，使半胱氨酸残基烷基化，然后用PNGaseF和胰蛋白酶进行酶解。

方法条件

表1、2和3列出了色谱和质谱分析的一般条件。使用五圈环形装置的Cyclic IMS方法之前已经用源自血红素结合蛋白的O-联糖肽针对三糖和二糖碎片进行了优化。源自SARS-CoV-2刺突蛋白的O-糖肽经四极杆分离，然后在SELECT SERIES Cyclic IMS的捕集区中发生碰撞活化（如图1所示）。使用环形离子淌度池分离糖肽的碎片。进行方法优化，使三糖碎片在喷射和检测之前通过装置五次。

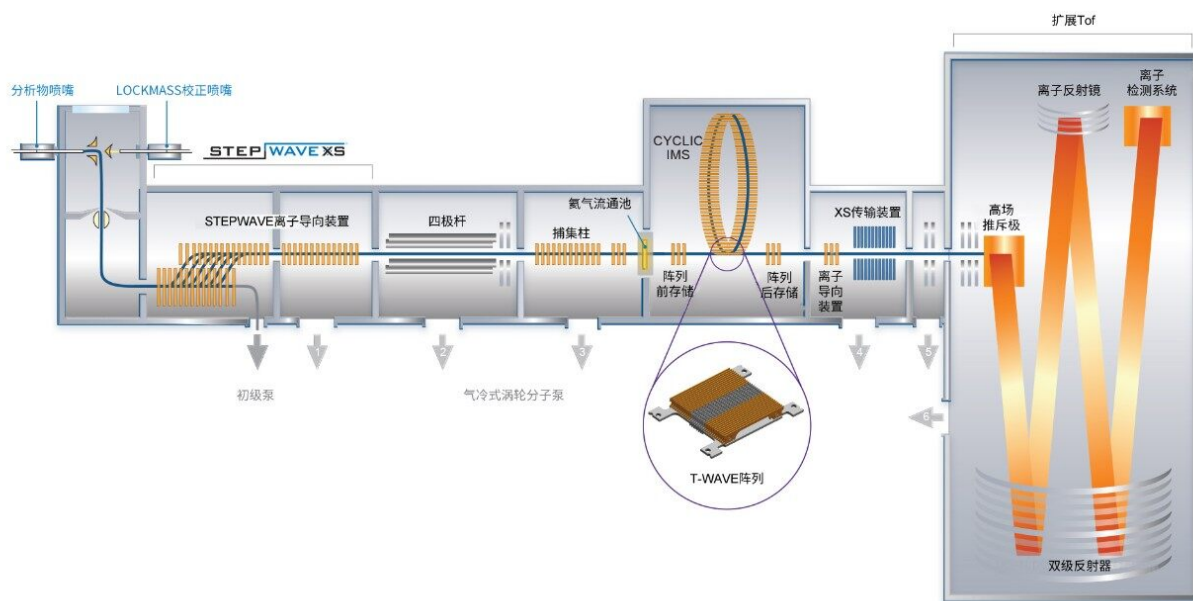


图1.SELECT SERIES Cyclic IMS的仪器示意图

LC条件

液相色谱系统:

ACQUITY UPLC M-Class

检测:

SELECT SERIES Cyclic IMS

样品瓶:

QuanRecovery

色谱柱:

nanoEase M/Z HSS T3 100 Å, 1.8 μm (75 μm × 15 cm) (部件号: 186008816)

nanoEase M/Z Symmetry C₁₈ 100 Å, 5 μm (180 μm × 20 mm)捕集阱 (部件号: 186008821)

柱温:

60 °C

样品温度:

8 °C

进样体积:

1–5 μL

流速：500 nL/min

流动相A：H₂O, 0.1% FA, 1 ppm柠檬酸

流动相B：ACN, 0.1% FA, 1 ppm柠檬酸

梯度

时间 (min)	流速 (μ L/min)	%A	%B	曲线
捕集: 0.0	15	99	1	6
捕集: 5.0	15	99	1	6
0.0	0.5	99	1	6
3.0	0.5	90	10	6
63.0	0.5	65	35	6
66.0	0.5	15	85	6
69.0	0.5	15	85	6
69.5	0.5	99	1	6
80.0	0.5	99	1	6

MS条件

MS系统：Cyclic IMS

电离模式：ESI+

采集范围： m/z 50~2000

毛细管电压：2.8 kV

碰撞能量：30 V–70 V

锥孔电压：20 V

圈数：5

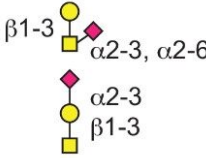
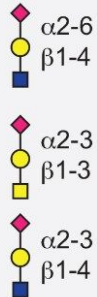
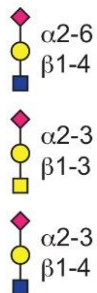
Racetrack TW高度：	22 V
Racetrack TW速度：	375 m/s
IMS顺序：	进样、分离、喷射和采集
IMS运行周期：	100 ms

数据管理

色谱软件：	MassLynx SCN1016 Release 3
MS软件：	用于Cyclic IMS Release 4的沃特世嵌入式分析仪平台
信息学软件：	DriftScope 2.9，针对Cyclic IMS进行了改进

结果与讨论

对观察到的胰蛋白酶解肽
AGC(carbamidomethyl)LIGAEHVDNSYEC(carbamidomethyl)DIPIGAGIC(carbamidomethyl)ASYQTQTNSPR（标记为T56）的O-联糖型进行靶向离子淌度MS/MS实验，在捕集区中进行碎裂，生成肽段和氧鎓离子碎片，然后进入离子淌度池。通过碰撞活化释放后，利用环形离子淌度(cIM)仪器的可扩展分辨率分离糖基异构体。之前针对三糖碎片1次和5次通过循环装置开发出两种方法，利用这两种方法分离T56-HexNAc(1)-Hex(1)-NeuAc(1)、T56-HexNAc(1)-Hex(1)-NeuAc(2)、T56-HexNAc(2)-Hex(1)-NeuAc(1)、T56-HexNAc(2)-Hex(2)-NeuAc(1)和T56-HexNAc(2)-Hex(2)-NeuAc(2)的HexNAc-Hex和HexNAc-Hex-NeuAc氧鎓离子碎片的同分异构体。这些肽在表1中以糖肽A-D列出。

母离子名称	糖肽 ID	NeuAc-Hex-HexNAc 的实测漂移时间 (ms)	分配的 氧鎗离子结构
T56-HexNAc(1)-Hex(1)-NeuAc(1)	A	73.8	
T56-HexNAc(1)-Hex(1)-NeuAc(2)	B	68.7 70.4 73.8	
T56-HexNAc(2)-Hex(2)-NeuAc(1)	C	73.2 73.8 80.2	
T56-HexNAc(2)-Hex(2)-NeuAc(2)	D	73.2 73.8 80.2	

- N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)
- N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)
- HexNAc (GalNAc或GlcNAc)
- 半乳糖(Gal)
- ◆ N-乙酰神经氨酸(NeuAc)

表1.利用LC-MS-IM-MS研究的O-糖肽以及m/z 657 Neu-Ac-Hex-HexNAc氧鎗离子实测到达时间分布的漂移时间

利用DriftScope 2.9对产生三电荷未修饰T56肽段碎片的色谱峰进行积分，提取离子淌度信息。一般来说，每种糖型可观察到2~4个色谱峰，表明某些具有异质性的异构体可通过反相色谱法分离。T56糖肽的碰撞诱导碎裂通常会产生肽段、氧鎗与肽+糖基碎片的混合物。图2展示了A)糖肽A和B)糖肽C的MS/MS谱图，证明较大的氧鎗离子碎片具有高产率，对于糖肽C而言尤其如此。m/z 1022处HexNAc(2)-Hex(2)-NeuAc(1)氧鎗离子碎片的观察结果确认存在单个五糖糖型，而不是单独的三糖和二糖成分各自位于两个不同位点。m/z 528和819处的氧鎗离子确认存在扩展核心1结构。

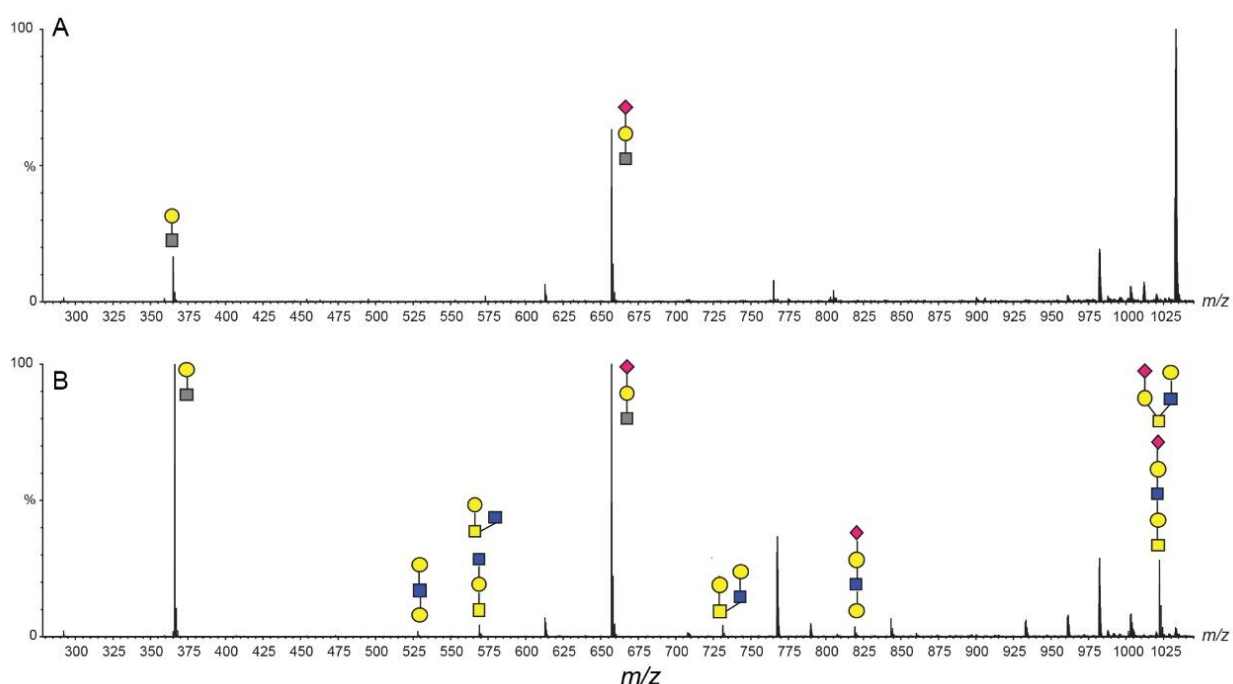


图2. m/z 250与 m/z 1050范围内A) *T56-HexNAc(1)-Hex(1)-NeuAc(2)* (糖肽A) 和B) *T56-HexNAc(2)-Hex(2)-NeuAc(1)* (糖肽C) 的MS/MS放大谱图，突出显示若干个观察到的氧鎓离子碎片，确认糖肽C中同时存在扩展核心1和核心2结构。如果不明确糖的种类 (*GalNAc*或*GlcNAc*)，则用灰色正方形阴影表示*HexNAc*残基；所有其他颜色均对应于SNFG表示法 (糖基的符号命名法)。

对HexNAc-Hex-NeuAc氧鎓离子实施单圈和多圈 (5圈) 离子淌度实验。使用变化的碰撞能量分析糖肽C所得的到达时间分布如图3 (B-D)所示。使用单圈环形离子淌度时，可明显看到两个离子淌度群；使用五圈离子淌度时，更紧凑的物质进一步分离为两种部分分离的异构体。使用Major Mix IMS校准标样作为参比，计算单圈得到的碰撞截面。单圈实验观察到的两个到达时间分布计算出的碰撞截面分别为234.1和245.4 Å²。Guttman等人¹²之前测得NeuAcα2-6Galβ1-4GlcNAc和NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAc的CCS值分别为236.9 Å²和247.2 Å²。测得的最细长的HexNAc-Hex-NeuAc异构体与NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAc高度吻合。使用五圈环形离子淌度装置时，在234.1 Å²处观察到的单个离子淌度峰分离为两种子结构。先前的研究表明，α2-6唾液酸键比α2-3键更稳定；因此使用变化的碰撞能量进行实验，结果见图3 (B-D)¹⁷。对于通过5圈方法可分离的三种最紧凑的异构体，提高碰撞能量能够增加相对丰度。核心1型结构(NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAc)是最常见的O-联糖肽结构；因此，5圈分离中更细长且更不稳定的紧凑异构体与NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAc 1型核心结构一致。更紧凑且更不稳定的结构可分配给NeuAcα2-6Galβ1-4GlcNAc，其符合核心2结构的预期碎裂结果。

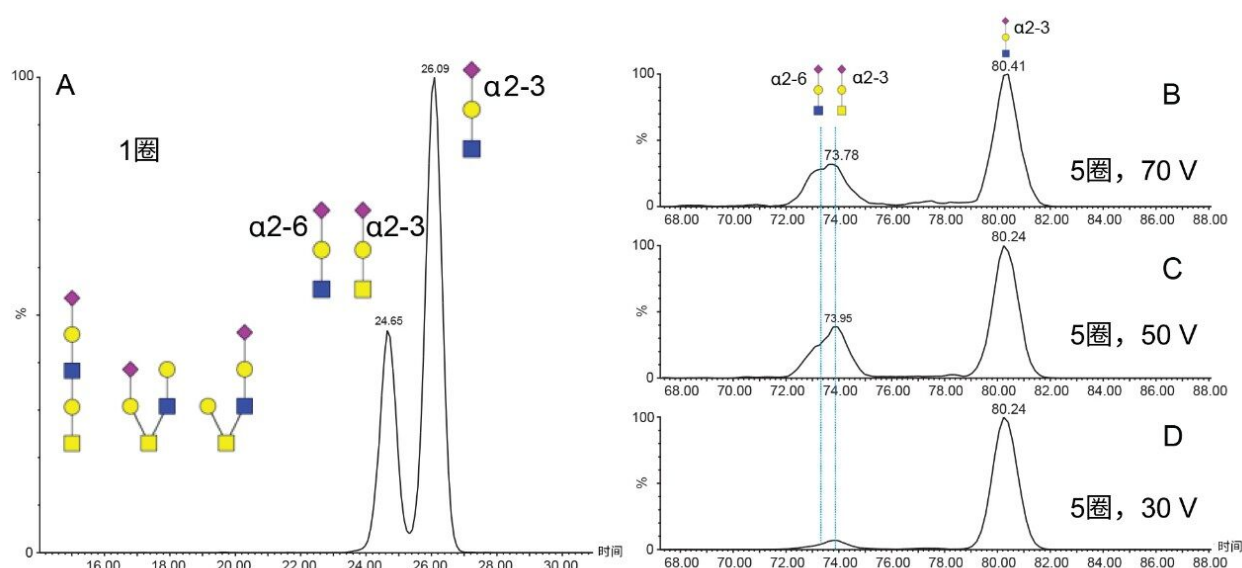


图3.使用A)单圈环形装置和B-D)五圈环形装置分析糖肽C的 m/z 657氧鎧离子所得的到达时间分布，实验在捕集阱中采用70 V、50 V和30 V活化，以生成氧鎧离子碎片。额外的四圈是区分 $NeuAc\alpha 2-6Gal\beta 1-4GlcNAc$ 和 $NeuAc\alpha 2-3Gal\beta 1-3GalNAc$ 异构体碎片的必要条件。

利用五圈环形离子淌度技术分析剩余糖肽中的 m/z 657 (HexNAc-Hex-NeuAc)氧鎧离子，结果见图4。拥有两个HexNAc残基（C和D）的糖肽得到类似的离子淌度到达时间分布(ATD)，表明存在扩展核心1和核心2结构的混合物，如图3所示。最简单的糖肽具有单个HexNAc、Hex和NeuAc残基(A)，在73.8 ms处形成单个离子淌度分布，将其分配给T56-HexNAc(2)-Hex(2)-NeuAc(1)糖肽的 $NeuAc\alpha 2-3Gal\beta 1-3GalNAc$ ，符合已知的糖生物学信息。相比之下，从T56-HexNAc(1)-Hex(1)-NeuAc(2)糖肽中分离出的 m/z 657氧鎧离子在68.7 ms和70.4 ms处产生两个额外的离子淌度峰。这些可能是支化结构，在这些结构中，NeuAc残基通过2-3或2-6键与GalNAc连接。在糖肽D中未观察到这些峰，表明核心GalNAc残基（图4B）的唾液酸化对于T56糖肽而言较为罕见，仅存在于简单的核心1结构中。

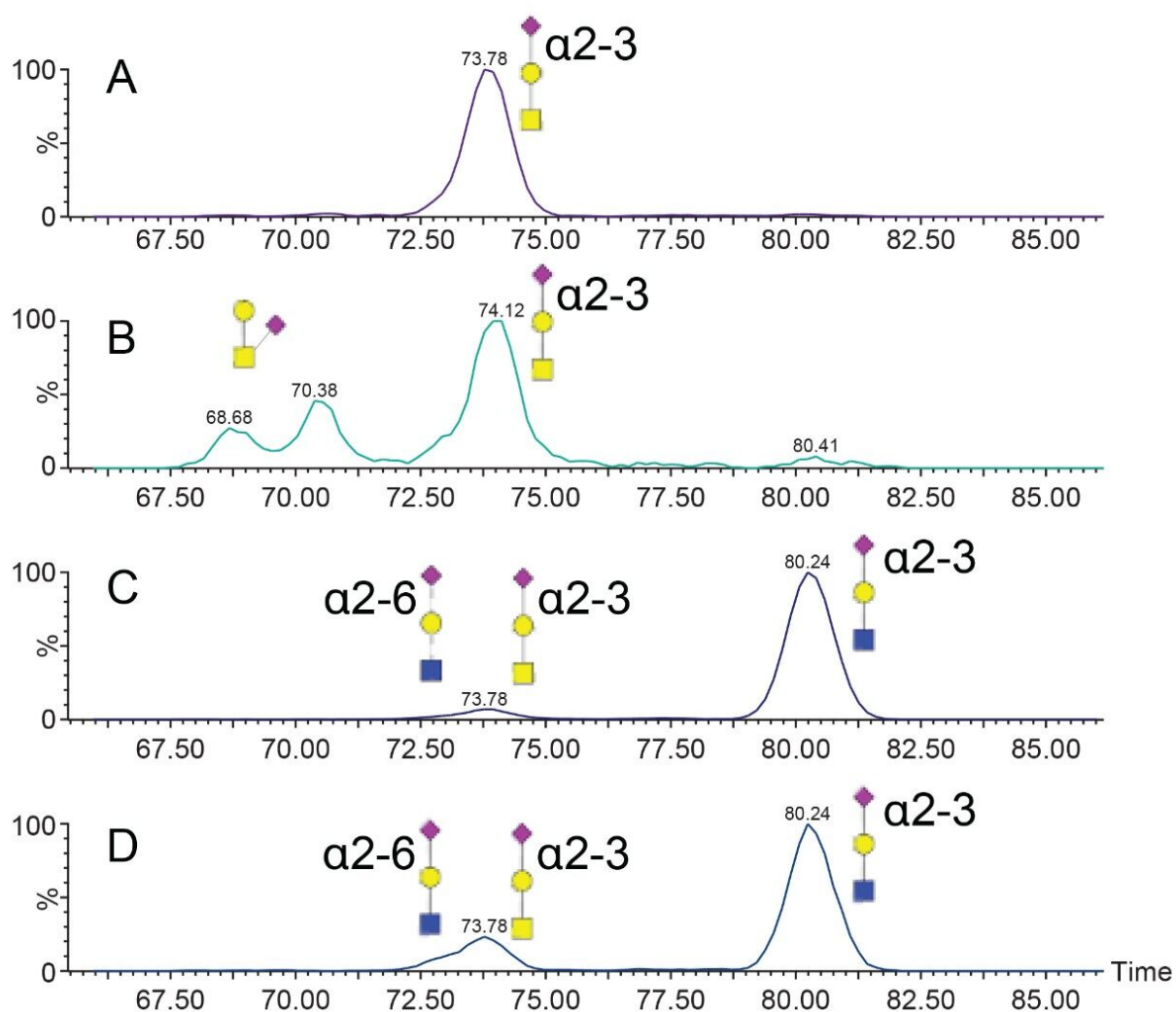


图4.A)糖肽A、B)糖肽B、C)糖肽C和D)糖肽D中 m/z 657氧鎢离子的到达时间分布

结论

本研究证明SELECT SERIES Cyclic IMS能够分离SARS-CoV-2刺突蛋白O-糖肽的氧鎢离子碎片，提供有关糖肽中糖结构的位点特异性和键特异性信息。Cyclic IMS仪器拥有高灵敏度、可扩展的离子淌度分辨率和独特的几何结构，可用于低含量O-糖肽的靶向CID-cIM-MS实验，实现高异质性蛋白质的位点特异性结构表征。该策略能够为正在全球开展的SARS-CoV-2病毒表征、理解和靶向作用研究提供更多详细信息。

参考资料

1. Johns Hopkins Resource Center.COVID-19 Case Tracker.<https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e>
2. Andersen K.G., Rambaut A., Lipkin W.I. *et al.* The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med* 2020; 26:450–452.
3. Tortorici AM, Veasler D. Chapter Four–Structural insights into coronavirus entry, Editor(s): Félix A. Rey, Advances in Virus Research, Academic Press, 2019, 105:93-116, ISSN 0065-3527, ISBN 9780128184561.
4. Walls, AC., Park YJ, Tortorici A, Wall A, McGuire AT, Veasler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein, *Cell*, 2020;181(2):281-292.e6, ISSN 0092–8674.
5. Clark GF. The Role of Glycans in Immune Evasion: The Human Fetoembryonic Defence System Hypothesis revisited, *Molecular Human Reproduction*. 2014 Mar; 20(3):185–199.
6. Chang D, Zaia J. Why Glycosylation Matters in Building a Better Flu Vaccine. *Molecular & Cellular Proteomics* 2019 Dec; 18 (12):2348–2358.
7. Khatri K, Klein JA, White MR, Grant OC, Leymarie N, Woods RJ, Hartshorn KL, Zaia J. Integrated Omics and Computational Glycobiology Reveal Structural Basis for Influenza A Virus Glycan Microheterogeneity and Host Interactions. *Molecular & Cellular Proteomics* 2016 Jun; 15 (6):1895–1912.
8. Kumar S, Maurya VK, Prasad AK, Bhatt MLB, Saxena SK. Structural, Glycosylation and Antigenic Variation between 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) and SARS Coronavirus (SARS-CoV). *Virusdisease*. 2020;31(1):13–21.
9. Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-Specific Glycan Analysis of the SARS-CoV-2 Spike. *Science*. 2020;eabb9983.
10. Shajahan A, Supekar NT, Gleinich AS, Azadi P. Deducing the N- and O- Glycosylation Profile of the Spike Protein of Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Glycobiology*. 2020; cwaa042. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa042>.
11. Sanda M, Morrison L, and Goldman R. N- and O-Glycosylation of the SARS-CoV-2 Spike Protein.

Anal. Chem. 2021.

12. Guttman M and Lee KK. Site-Specific Mapping of Sialic Acid Linkage Isomers by Ion Mobility Spectrometry. *Anal. Chem.* 2016; 88(10):5212–5217.
13. Jin C, Harvey DJ, Struwe WB, and Karlsson NG. Separation of Isomeric O-Glycans by Ion Mobility and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2019. 91(16): 10604–10613.
14. Harvey DJ, Seabright GE, Vasiljevic S, Crispin M, and Struwe WB. Isomer Information from Ion Mobility Separation of High-Mannos Glycan Fragments. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2018; 29(5): 972–988.
15. Barroso A, Giménez A, 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. Proteom.* 2018. 173:22–31.
16. Hofmann J, Hahm HS, Seeberger PH, and Pagel K. Identification of Carbohydrate Anomers using Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Nature.* 2015. 526:241-244.
17. Depland AD, Renois-Predelus G, Schindler B, Compagnon I. Identification of Sialic Acid Linkage Isomers in Glycans using Coupled InfraRed Multiple Photon Dissociation (IRMPD) Spectroscopy and Mass Spectrometry. *Int.J. Mass Spectrom.* 2018; 434:64–69.

特色产品

SELECT SERIES Cyclic IMS <<https://www.waters.com/135021297>>

ACQUITY UPLC M-Class系统 <<https://www.waters.com/134776759>>

离子淌度质谱 <<https://www.waters.com/134656158>>

720007081ZH, 2020年11月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.