

蛋白质测序仪PPSQ在生物药N-末端 氨基酸序列分析的应用

—抗体药、蛋白质药、N-末端甲硫氨酸缺失或焦谷氨酸环化封闭等—



序言

目前，在制药领域，生物药得到越来越多的关注。生物药是利用 DNA 重组、细胞融合、细胞培养等生物技术开发出的蛋白质药物、抗体药物等。几乎所有蛋白质合成都起始于 N-末端，其序列组成对于蛋白质整体的生物学功能有着重要的影响力，因此蛋白质的序列分析对于生物药效果非常关键。目前，2015 版《中国药典》三部人用重组 DNA 技术产品总论对生物药的生产及质量控制方面，针对其蛋白质结构提出技术要求，应测定目标产品的氨基酸序列，并与其基因序列推断的理论氨基酸序列进行比较。因此，N-末端氨基酸序列分析是很多已上市生物药的年检项目，如重组人促红素注射液（CHO 细胞）、重组人粒细胞刺激因子注射液等。此外，国际法规中也有对于生物药 N-末端氨基酸序列测定的要求。药品注册的国际协调组织颁布的指导法规 ICH-Q6B 规定，生物药进行申报时，必须提供 N-末端氨基酸序列信息。《欧洲药典》中规定，生物仿制药申报也必须提供 N-末端序列。

Edman 降解法是蛋白质 N-末端测序的常用方法，岛津公司的蛋白质测序仪（Protein Sequencer）PPSQ 以 Edman 降解法为基础，将蛋白质从 N-末端顺次切断进行序列分析。此方法具有直接测定、可靠性高的优势。近期，岛津推出新型的蛋白质测序仪 PPSQ 51A/53，配备 SPD-M30A 高灵敏度检测器、软件满足 FDA 21 CFR Part 11 数据完整性的要求。PPSQ 51A/53 梯度洗脱系统更是在等度洗脱系统基础上，提高检测灵敏度，适合微量样品的氨基酸序列分析。

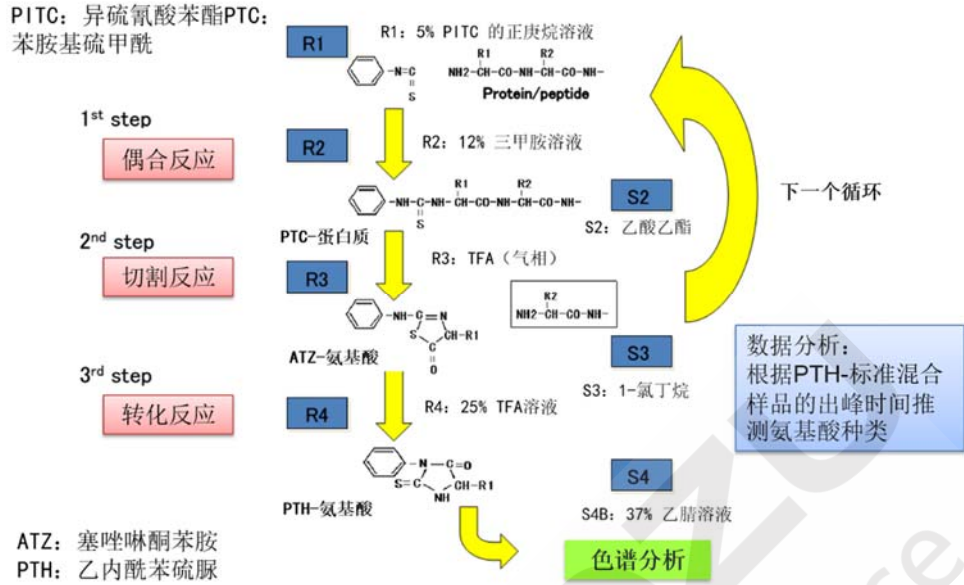
在这里，我们应用岛津 PPSQ 51A/53A 开发了单克隆抗体药、重组蛋白药的 N-末端氨基酸序列分析方法，另外，也开发了具有特殊结构的生物药 N-末端氨基酸序列分析方法，如甲硫氨酸缺失、焦谷氨酸环化封闭等样品，编写了《蛋白质测序仪 PPSQ 在生物药 N-末端氨基酸序列分析的应用》文集：包括经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离轻链和重链，从而测定 N-末端氨基酸序列的单克隆抗体药贝伐单抗和曲妥珠单抗等；含有特殊结构的如 N-末端部分甲硫氨酸缺失的重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子注射液原液、N-末端焦谷氨酸环化封闭类单克隆抗体帕尼单抗、含有二硫键的溶菌酶和催产素；用自制的脱盐装置分析具有高浓度盐的蛋白质药物重组人促红素原液（CHO 细胞）和重组人粒细胞刺激因子注射液。

真心期待我们的努力能为您工作提供便利。

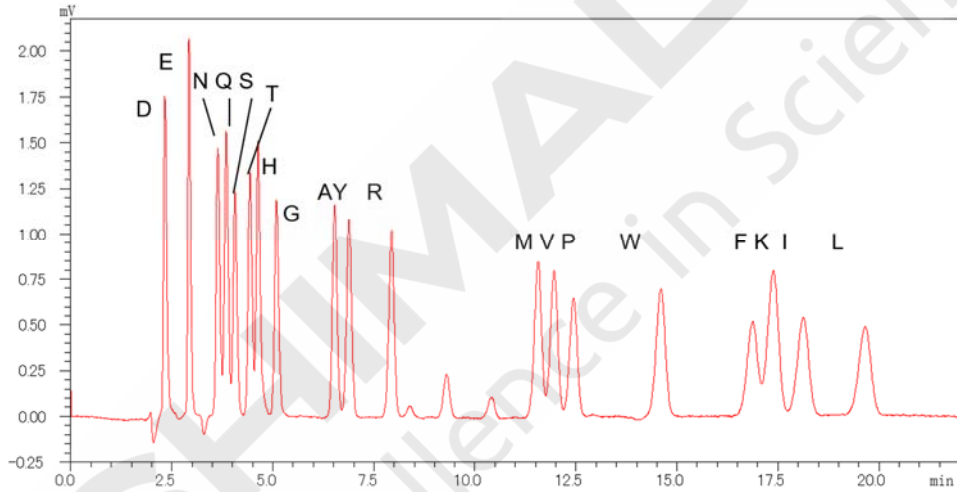
岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

1.分析方案介绍	1
2.SDS-PAGE 分离单抗药轻链与重链	3
蛋白质测序仪 PPSQ-53A 分析贝伐单抗 <i>N</i> -末端氨基酸序列	3
应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定曲妥珠单抗的 <i>N</i> -末端氨基酸序列	6
应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定小鼠 IgG 抗体 <i>N</i> -末端氨基酸序列	17
应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定重组人血管内皮生长因子受体-抗体融合蛋白的 <i>N</i> -末端氨基酸序列.....	21
3.<i>N</i>-末端特殊结构处理：甲硫氨酸缺失、焦谷氨酸环化封闭及二硫键	26
应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定 <i>N</i> -末端部分甲硫氨酸缺失的蛋白质类药物的 <i>N</i> -末端氨基酸序列	26
应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定 <i>N</i> -末端焦谷氨酸环化封闭类单克隆抗体的 <i>N</i> -末端序列	32
应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 检测溶菌酶 Lysozyme 的 <i>N</i> -末端氨基酸序列	38
应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 对催产素 Oxytocin 二硫键在线还原烷基化及 <i>N</i> -末端氨基酸序列分析	41
4.高含量盐的脱盐处理	43
应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定蛋白质药物注射用重组人促红素原液的 <i>N</i> -末端氨基酸序列	43
应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定重组人粒细胞刺激因子的 <i>N</i> -末端氨基酸序列.....	50



蛋白质测序仪 PPSQ 基于 Edman 降解原理分析氨基酸序列



蛋白质测序仪 PPSQ 分析 PTH-氨基酸标准品色谱图

蛋白质测序仪 PPSQ 51/53A 系统特点

蛋白质测序仪 PPSQ 51/53A 等度洗脱系统配备了 SPD-M30A 高灵敏度检测器，与 PPSQ 31/33A 相比，检测信噪比提高 5 倍，PPSQ 51A/53 梯度洗脱系统更是在等度洗脱系统基础上，提高检测灵敏度，适合微量样品的氨基酸序列分析。另外，PPSQ 51/53A 软件满足 FDA 21 CFR Part 11 中电子签名相关规定，目前食品和医药制造行业多遵依照此标准，PPSQ 51A/53 系统软件可确保电子数据的有效性和可靠性。

2.SDS-PAGE 分离单抗药轻链与重链

蛋白质测序仪 PPSQ-53A 分析贝伐单抗 N-末端氨基酸序列

摘要: 为了测定贝伐单抗 N-末端氨基酸序列, 本文使用 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳) 将贝伐单抗的重链和轻链分离后, 电转移到 PVDF (聚偏氟乙烯) 膜上, 应用氨基酸序列分析仪 PPSQ 分析 N-末端氨基酸序列。实验结果显示测定的重链和轻链的 N-末端氨基酸序列与理论相符, 验证了方法的准确性, 表明此方法适合抗体药 N-末端的氨基酸序列分析。

关键词: 蛋白质测序仪 PPSQ-53A 氨基酸序列 贝伐单抗 轻链 重链

贝伐单抗是重组的人源化单克隆抗体。2004 年 2 月 26 日获得 FDA 的批准, 是美国第一个获得批准上市的抑制肿瘤血管生成的药。本文应用 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳) 将贝伐单抗的重链和轻链进行分离, 使用电转印方法将 SDS-PAGE 膜上的样品转移到 PPSQ 使用的 PVDF 膜上, 使用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 对贝伐单抗进行 N-末端氨基酸序列分析。本文可作为分析抗体药 N-末端氨基酸序列分析时的参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

PPSQ-53A

1.2 试剂和样品

5% phenyl isothiocyanate n-heptane solution (Wako, Code: 161-27341); 12% trimethylamine solution (Wako, Code: 200-20021); 25% trifluoroacetic acid (Wako, Code: 204-20041); PTH-amino acids mobile phase (Wako, Code: 168-27351); Trifluoroacetic acid (Wako, Code: 207-20031); Glass fiber disks, TFA treated (Wako, Code: 072-06461); Wakopak Wakosil- II PTH- 4.6 × 250 mm (Wako, Code: 235-63951); PTH-amino acids mixture standard (Wako, Code: 165-27361); Ethyl acetate (Wako, Code: 052-09041); 1-chlorobutane (Wako, Code: 033-24371); 37% acetonitrile solution (Wako, Code: 018-26041); Polybrene (Sigma, Code: S2667); 样品: 贝伐单抗样品

1.3 试剂和样品准备方法

抗体的基本构造有 2 种链, 重链 H 链和轻链 L 链。需要使用 SDS-PAGE 电泳 (图 1) 将 H 链和 L 链进行分离。电泳分离后, 将 SDS-PAGE 膜上抗体药的 H 链和 L 链电转印到 PVDF 膜, 如图 2, 将分离的链待测部分剪下, 装入 PPSQ 反应器中, 安装好反应器。



图 1 SDS-PAGE 电泳分离贝伐单抗重链和轻链

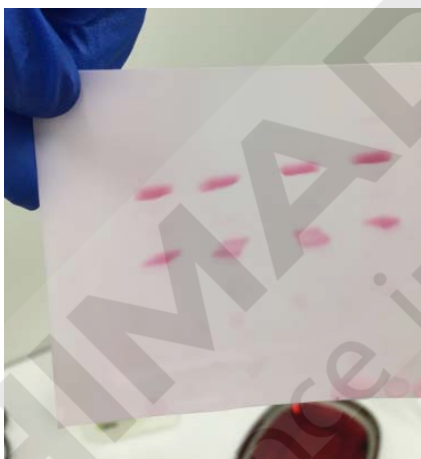


图 2 SDS-PAGE 膜上的抗体重链和轻链电转印到 PVDF 膜

2. 结果讨论

图 3、图 4 和图 5 是贝伐单抗重链 *N*-末端前 15 个氨基酸差减色谱图，测得氨基酸序列为 Glu-Val-Gln-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Gln-Pro-Gly。图 6、图 7 和图 8 是贝伐单抗轻链 *N*-末端前 15 个氨基酸差减色谱图，氨基酸序列为 Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ser-Ser-Leu-Ser-Ala-Ser-Val。测得的序列结果与贝伐单抗的理论氨基酸序列符合。

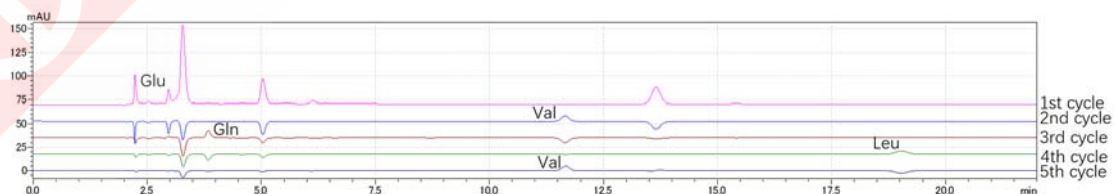


图 3 PPSQ-53A 分析贝伐单抗重链 *N*-末端的第 1 至第 5 个循环的氨基酸差减色谱图

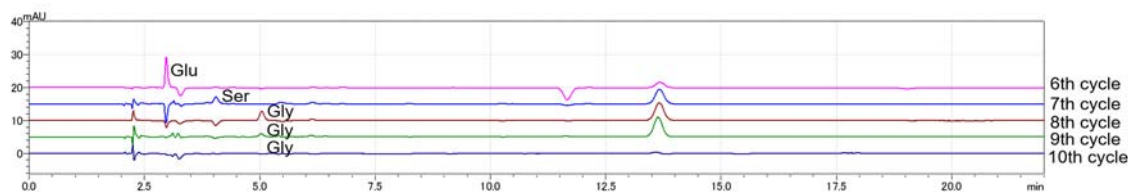


图 4 PPSQ-53A 分析贝伐单抗重链 *N*-末端的第 6 至第 10 个循环的氨基酸差减色谱图

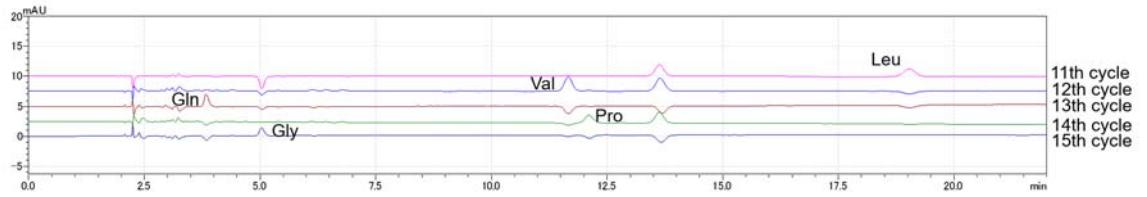


图 5 PPSQ-53A 分析贝伐单抗重链 *N*-末端的第 11 至第 15 个循环的氨基酸差减色谱图

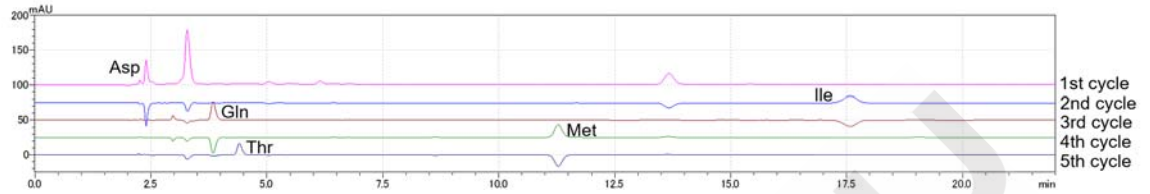


图 6 PPSQ-53A 分析贝伐单抗轻链 *N*-末端的第 1 至第 5 个循环的氨基酸差减色谱图

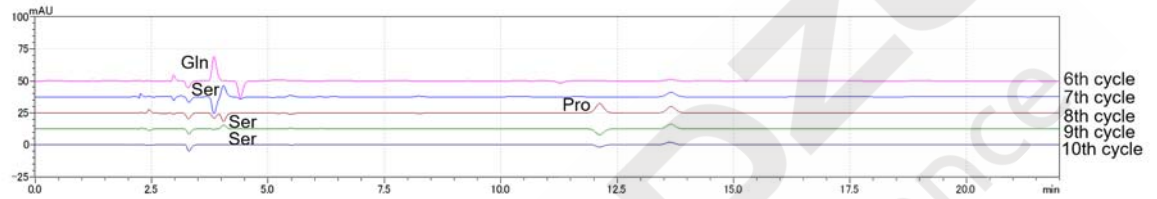


图 7 PPSQ-53A 分析贝伐单抗轻链 *N*-末端的第 6 至第 10 个循环的氨基酸差减色谱图

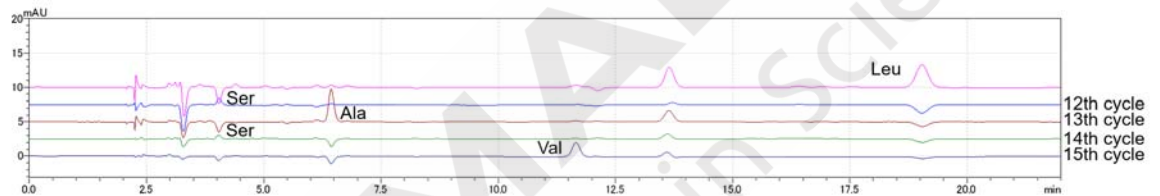


图 8 PPSQ-53A 分析贝伐单抗轻链 *N*-末端的第 11 至第 15 个循环的氨基酸差减色谱图

3. 结论

本文应用 PPSQ-53A 对贝伐单抗进行 *N*-末端氨基酸序列分析，测得的氨基酸序列结果与理论氨基酸序列结果一致，验证了此方法的准确性，此方法是抗体药 *N*-末端氨基酸序列分析的有力工具。

应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定曲妥珠单抗的 *N*-末端氨基酸序列

摘要： 本文使用 SDS-PAGE（十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳）将曲妥珠单抗的重链和轻链进行分离后，通过电转印方法将凝胶上的样品转移到 PVDF 膜（聚偏氟乙烯膜）上，应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 分别测定重链和轻链的 *N*-末端氨基酸序列，结果与理论序列一致，验证了此方法的准确性。

关键词： 蛋白质测序仪；PPSQ-53A；氨基酸序列；抗体药物；曲妥珠单抗；赫赛汀

抗体药物作为一种具有独特优势的生物靶向性治疗药物，因其高度特异性及优越的药代动力学特性，在疾病的诊断和治疗中显示出其他类型药物无可比拟的优势，是目前全球药物研发的热点。作为一种蛋白质类药物，抗体药物一般注射给药，药品在储存过程中可能会发生降解和聚合，需要对其进行质量均一性评价以进行质量控制。ICH-Q6B（人用药品注册技术要求国际协调会三方协调指导原则质量标准：生物技术产品及生物制品的检测方法和验收标准）中明确规定蛋白质类药物申报需要提供 *N*-末端氨基酸序列作为质量均一性评价的证据，生物仿制药相关规定（EMA）也要求生物仿制药需要对 *N*-末端氨基酸序列进行确认而且应与原研药相同。Edman 降解法是目前直接进行 *N*-末端氨基酸序列分析的主要方法，应用岛津公司的蛋白质测序仪 PPSQ-51A/53A，可以自动化实现 Edman 降解反应，进行蛋白质和多肽 *N*-末端的氨基酸序列测定。本文演示了应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定国内已经上市的代表性抗体药物-曲妥珠单抗（赫赛汀，临床上用于治疗乳腺癌）的 *N*-末端氨基酸序列的方法及结果。该方法操作简单、检测灵敏可靠，可作为生物技术药物 *N*-末端氨基酸序列分析的应用参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

PPSQ-53A

1.2 试剂和样品

5% phenyl isothiocyanate n-heptane solution (Wako, Code: 161-27341)

12% trimethylamine solution (Wako, Code: 200-20021)

25% trifluoroacetic acid (Wako, Code: 204-20041)

PTH-amino acids mobile phase (Wako, Code: 168-27351)

Trifluoroacetic acid (Wako, Code: 207-20031)

Wakopak Wakosil- II PTH- 4.6 × 250 mm (Wako, Code: 235-63951)

PTH-amino acids mixture standard (Wako, Code: 165-27361)

Ethyl acetate (Wako, Code: 052-09041)

1-chlorobutane (Wako, Code: 033-24371)

37% acetonitrile solution (Wako, Code: 018-26041)

PVDF 膜 (碧云天, Code: FFP32)

样品: 注射用曲妥珠单抗原液 (赫赛汀)

1.3 样品前处理

取 100 pmol 样品进行 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳) 分离后, 电转印至 PVDF 膜上, 使用丽春红染液进行染色, 待自然晾干后分别剪切重链和轻链的条带, 依次安装到反应器上进行分析, 测试样品 *N*-末端前 15 个氨基酸的序列。

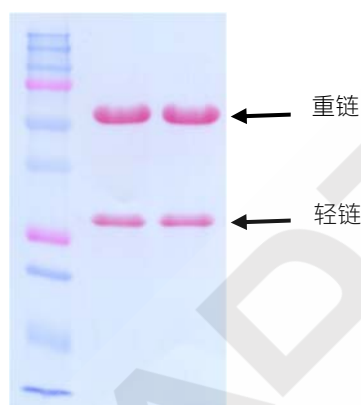


图 1 曲妥珠单抗 SDS-PAGE 电转印结果

1.4 PPSQ 分析条件

PVDF 分析模式, 循环数设置为 16 (第一个循环不参与反应)

2. 结果讨论

2.1 PTH-氨基酸混合标准品测试色谱图

为对 19 种 PTH-氨基酸进行校准, 先测试 19 种 PTH 氨基酸的混合标准品, 校准测试混合标准品图谱见图 2。

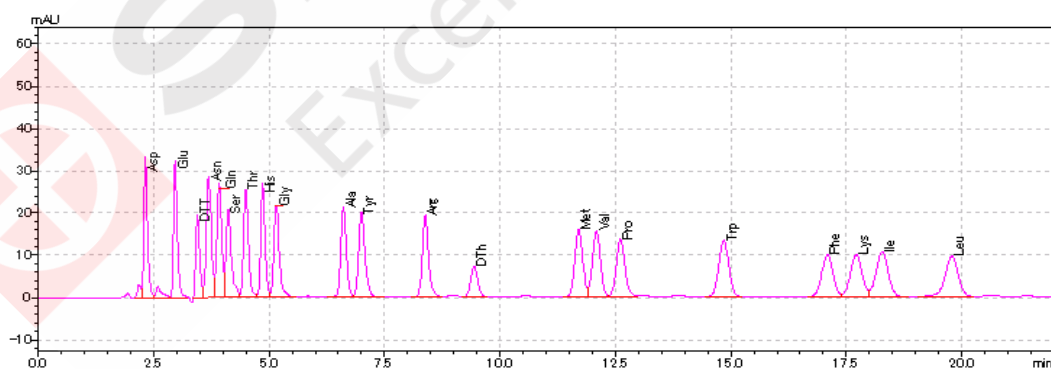


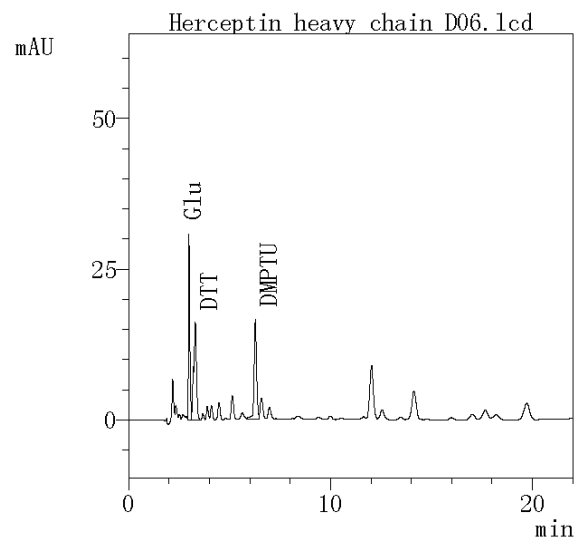
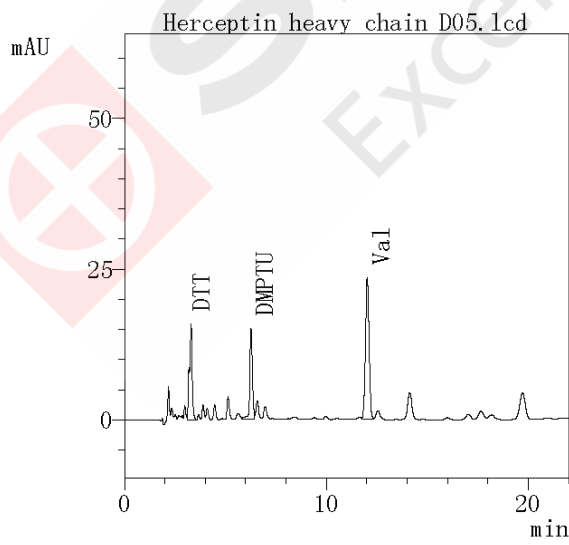
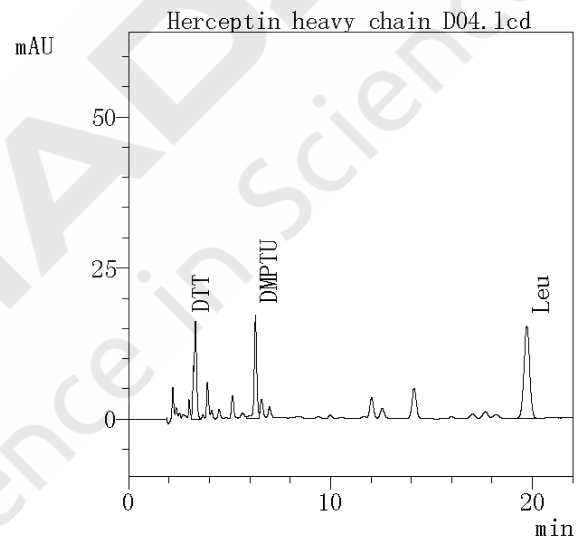
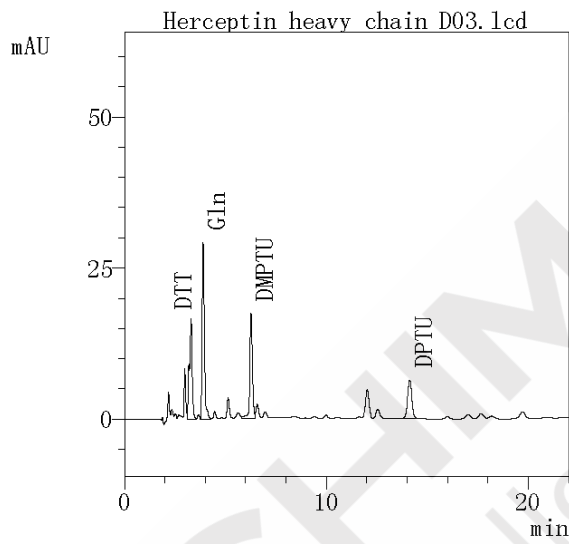
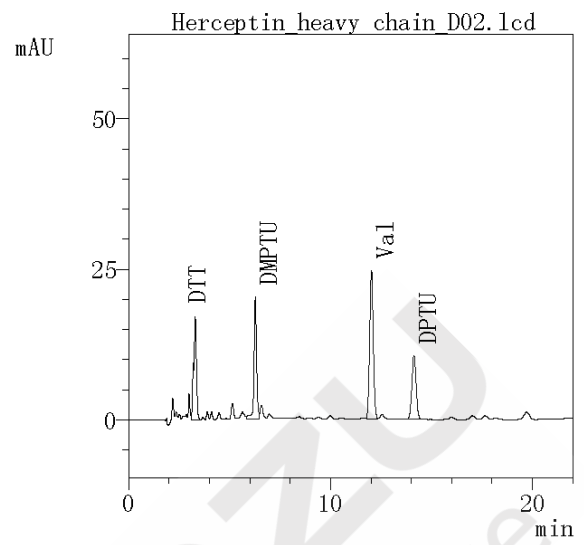
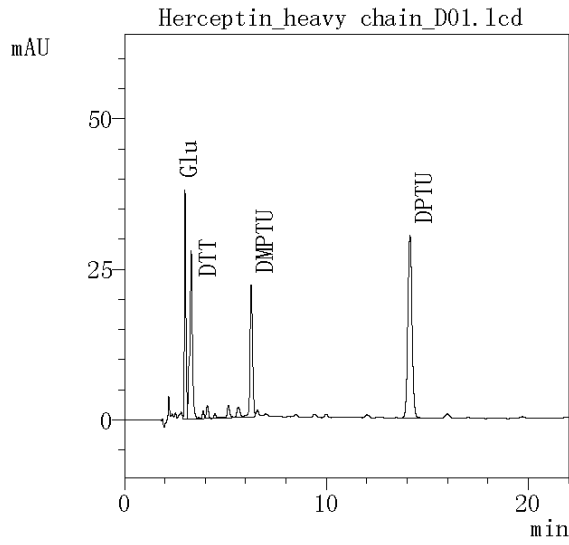
图 2 PTH-氨基酸混合标准品校准测试图谱

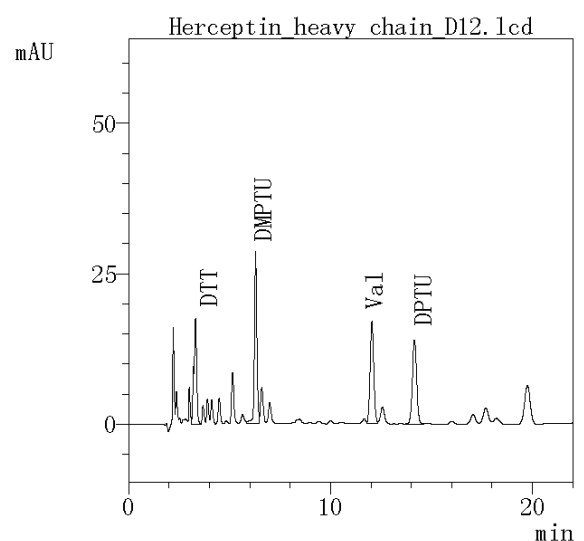
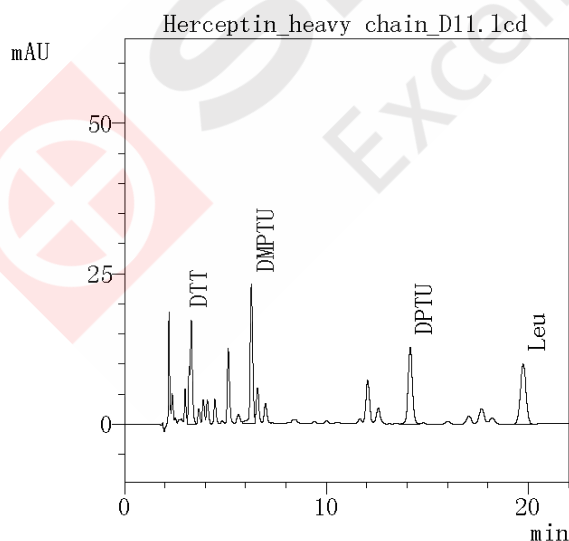
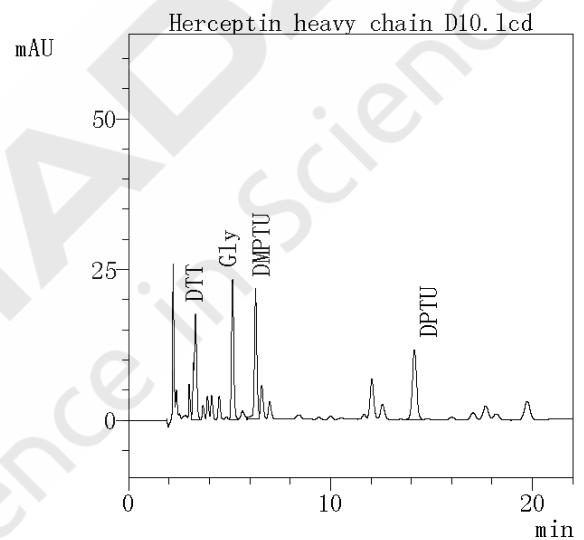
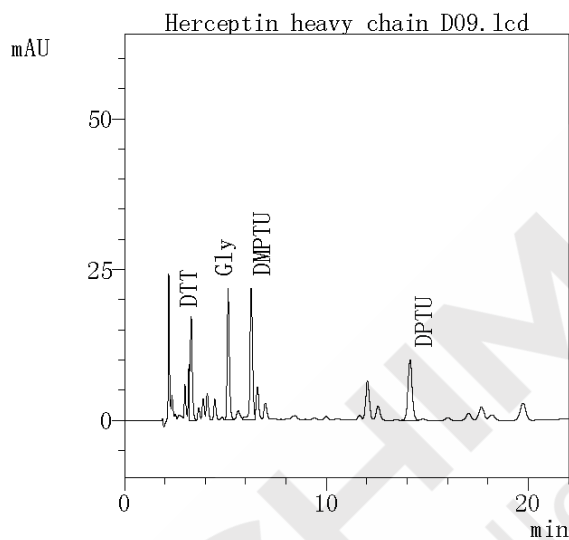
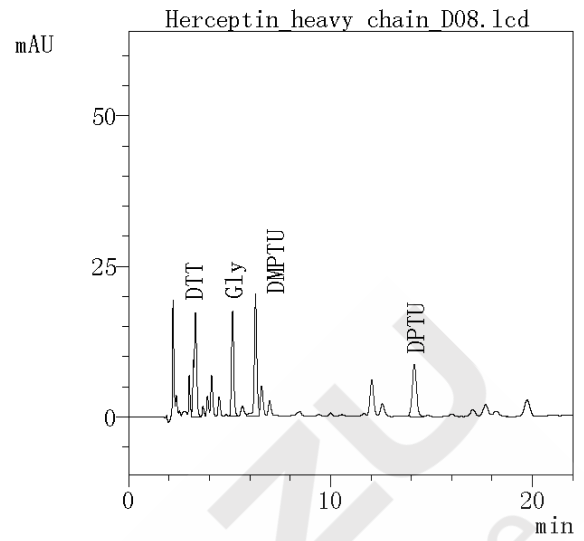
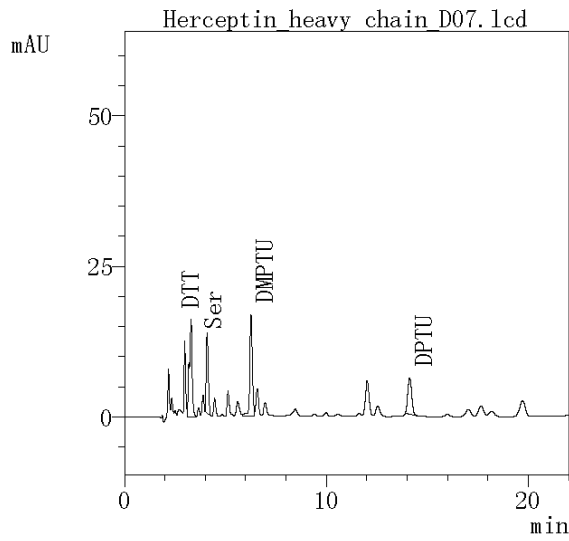
2.2 曲妥珠单抗 N-末端氨基酸序列分析色谱图

图 3-图 4 分别是曲妥珠单抗重链 N-末端氨基酸分析的原始色谱图和差减色谱图，由图所示，重链 N-末端第一个循环是 Glu，第二个循环是 Val，以此类推，前 15 个循环氨基酸按顺序依次是 Glu-Val-Gln-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Gln-Pro-Gly，与理论氨基酸序列一致。图 5-图 6 分别是曲妥珠单抗轻链 N-末端氨基酸分析的原始色谱图和差减色谱图。由图 5 和图 6 所示，轻链 N-末端第一个循环是 Asp，第二个循环是 Ile，以此类推，前 15 个循环氨基酸按顺序依次是 Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ser-Ser-Leu-Ser-Ala-Ser-Val，与理论氨基酸序列相符合。



SHIMADZU
Excellence in Science





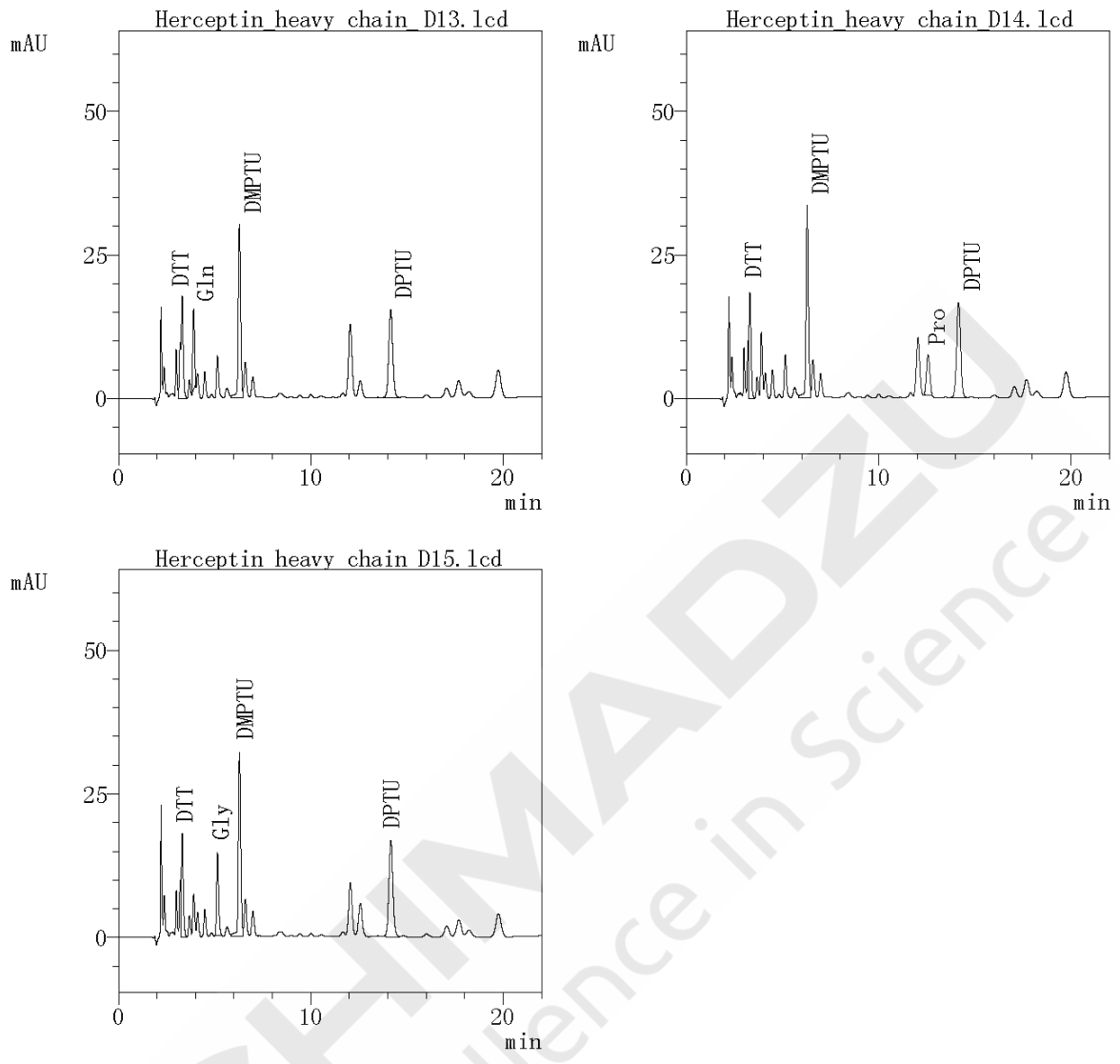
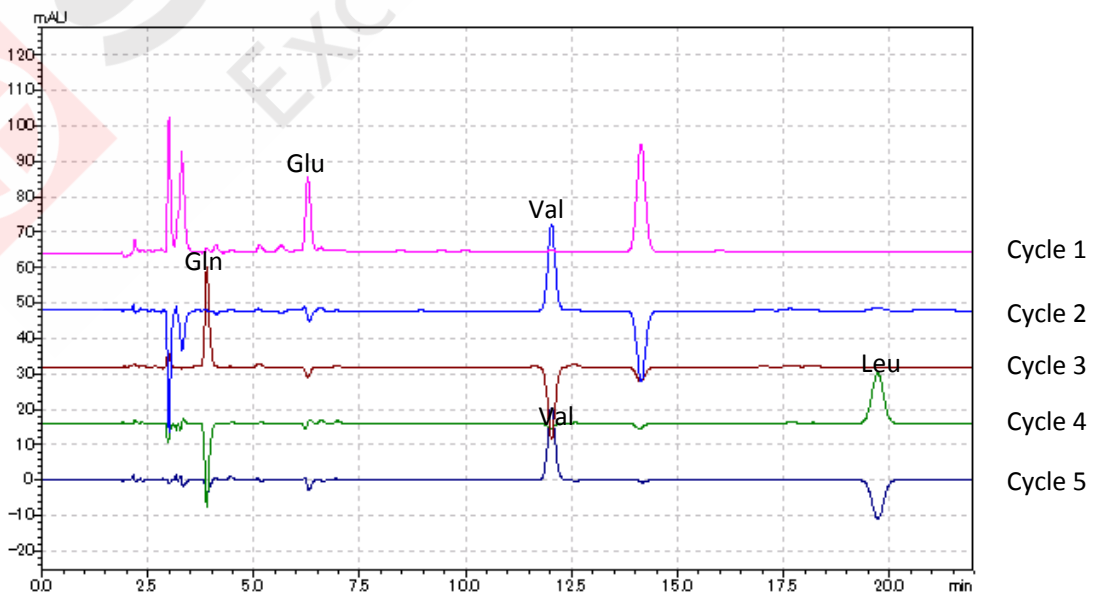


图3 曲妥珠单抗重链N-末端氨基酸序列分析色谱图



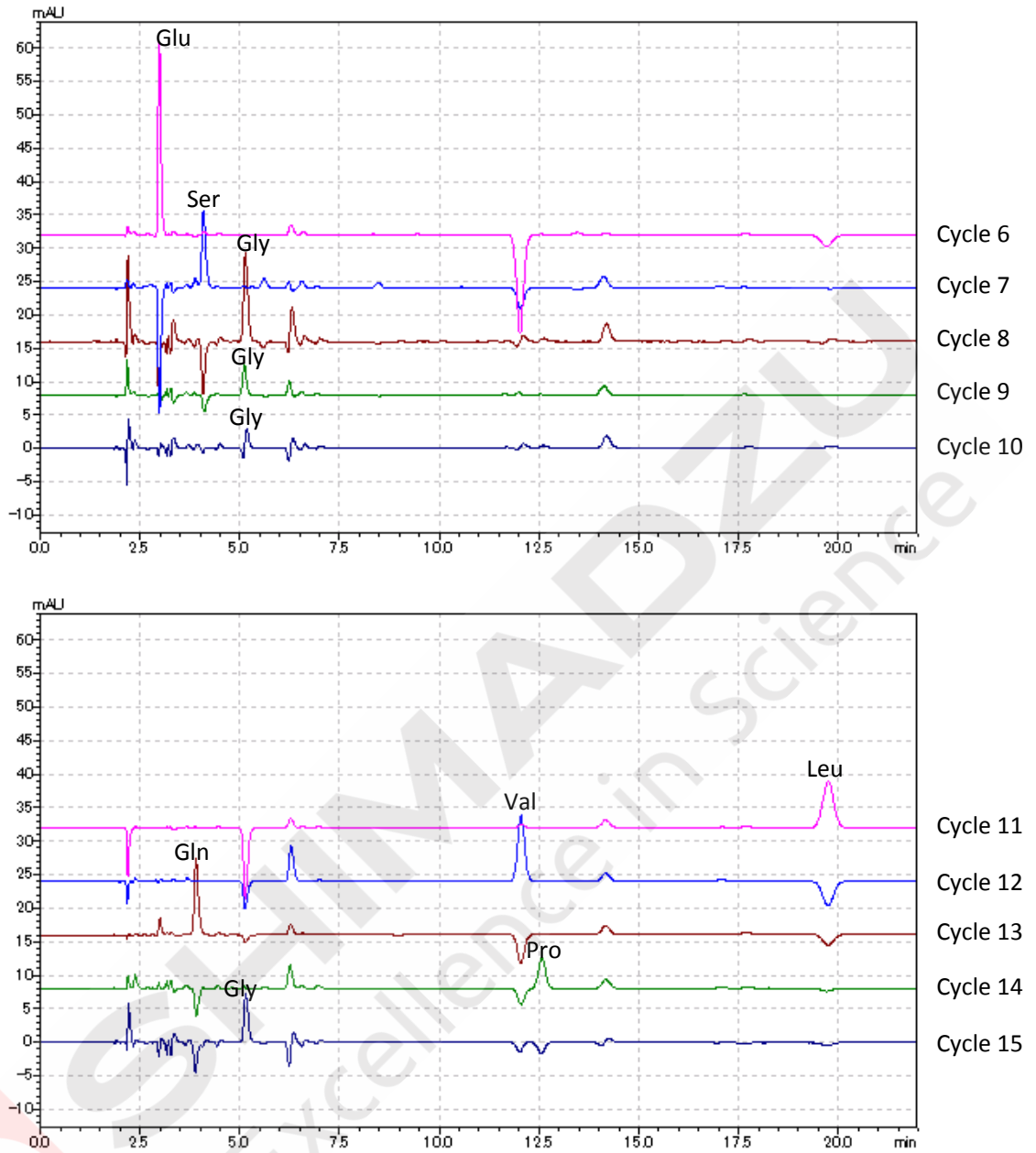
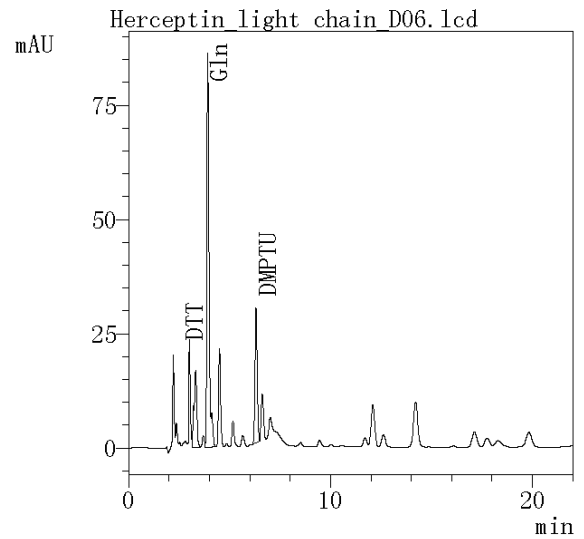
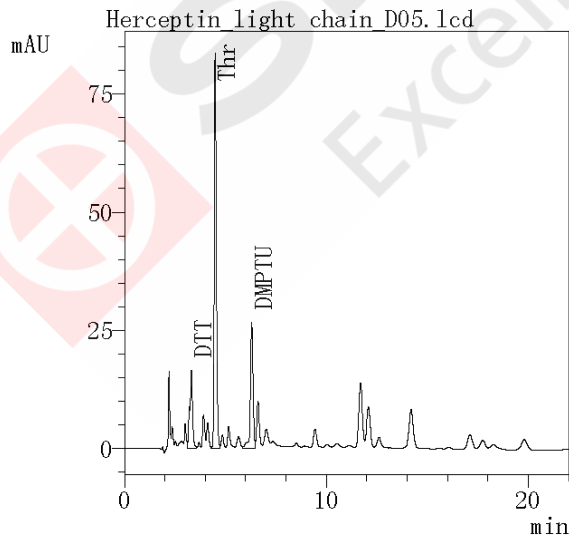
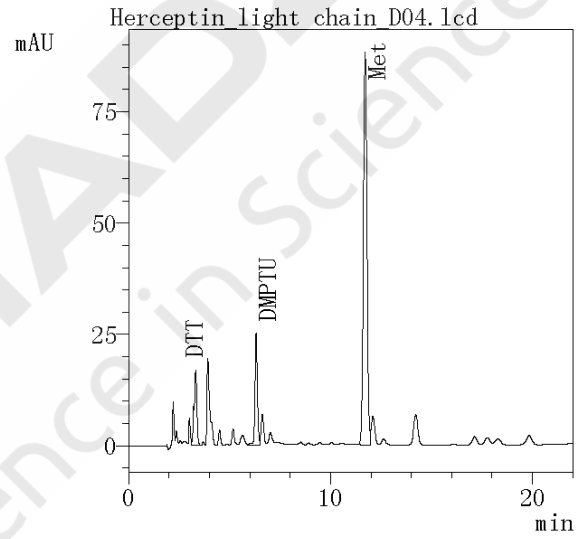
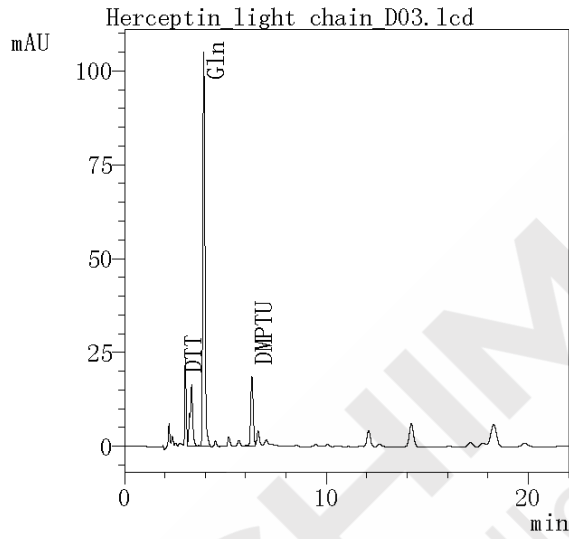
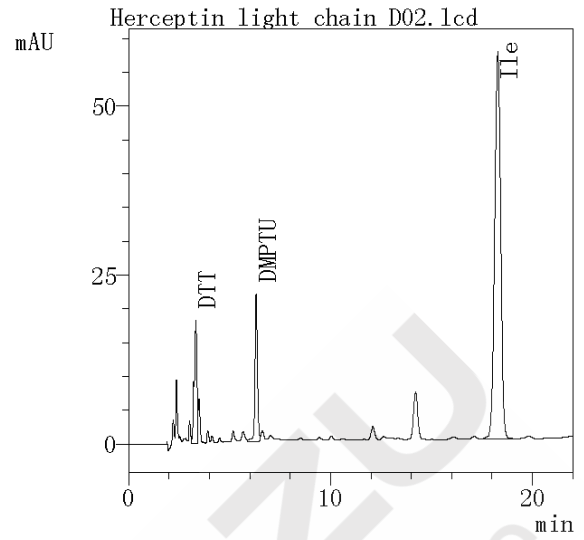
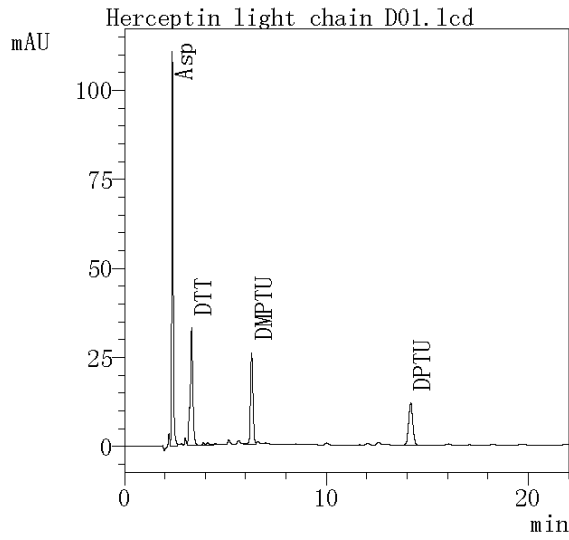
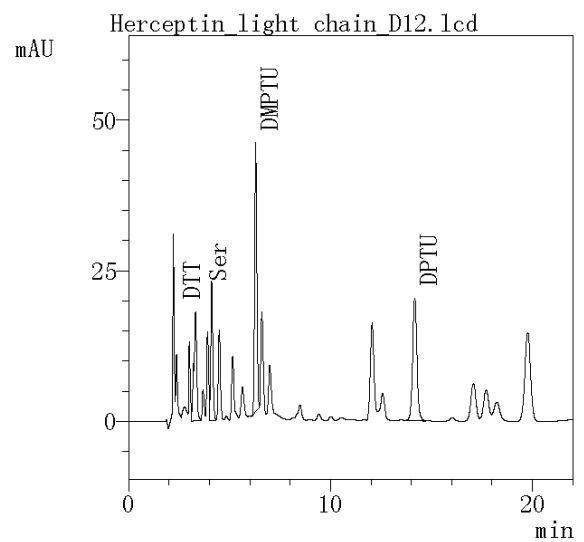
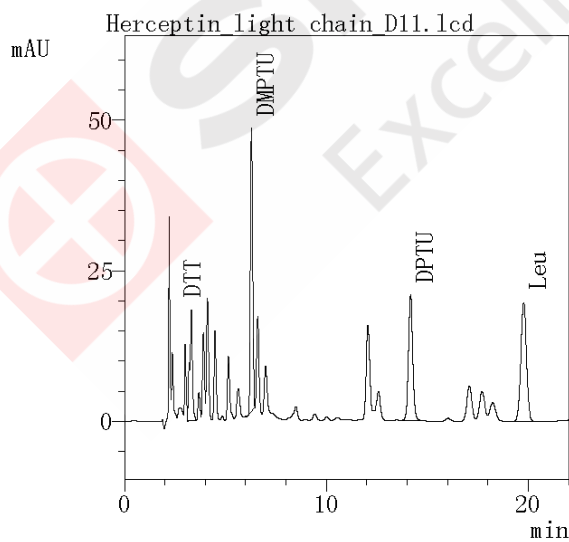
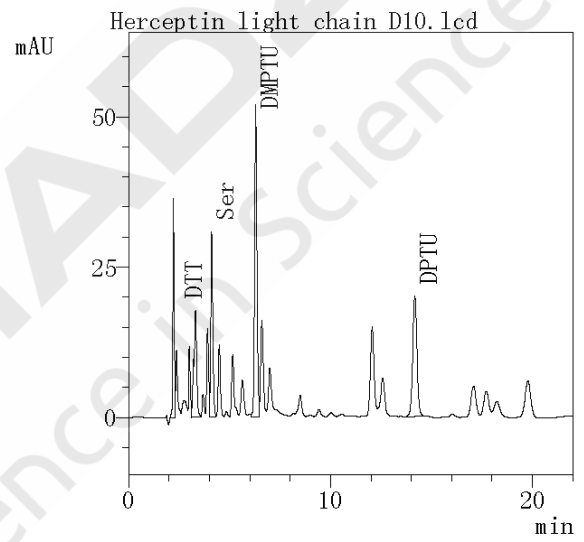
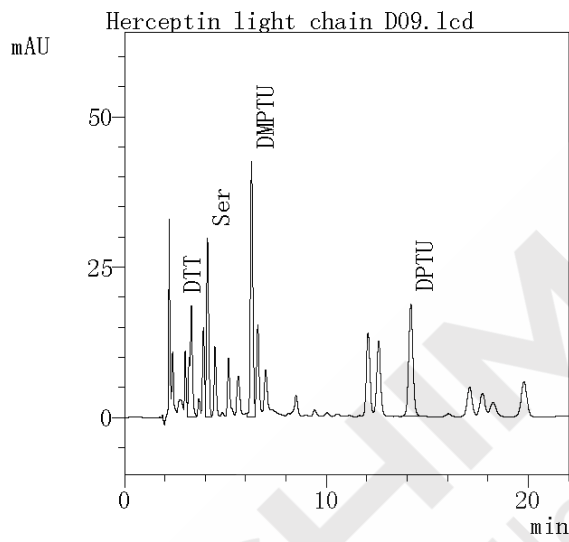
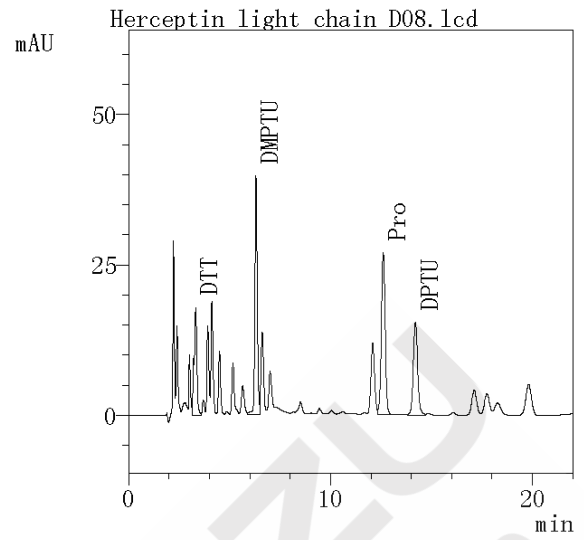
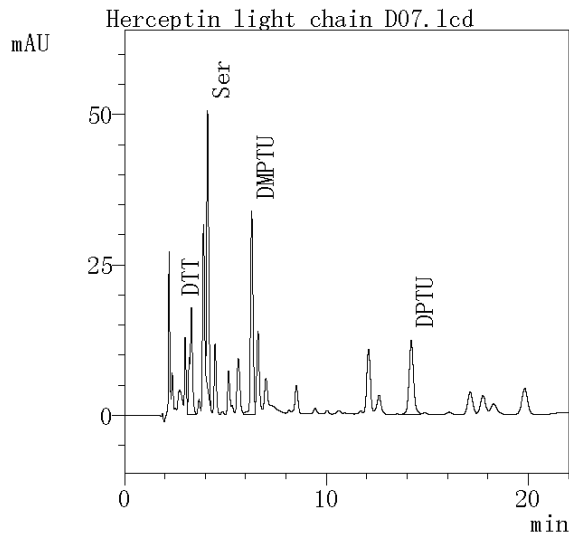


图4 曲妥珠单抗重链N-末端氨基酸序列分析差减色谱图





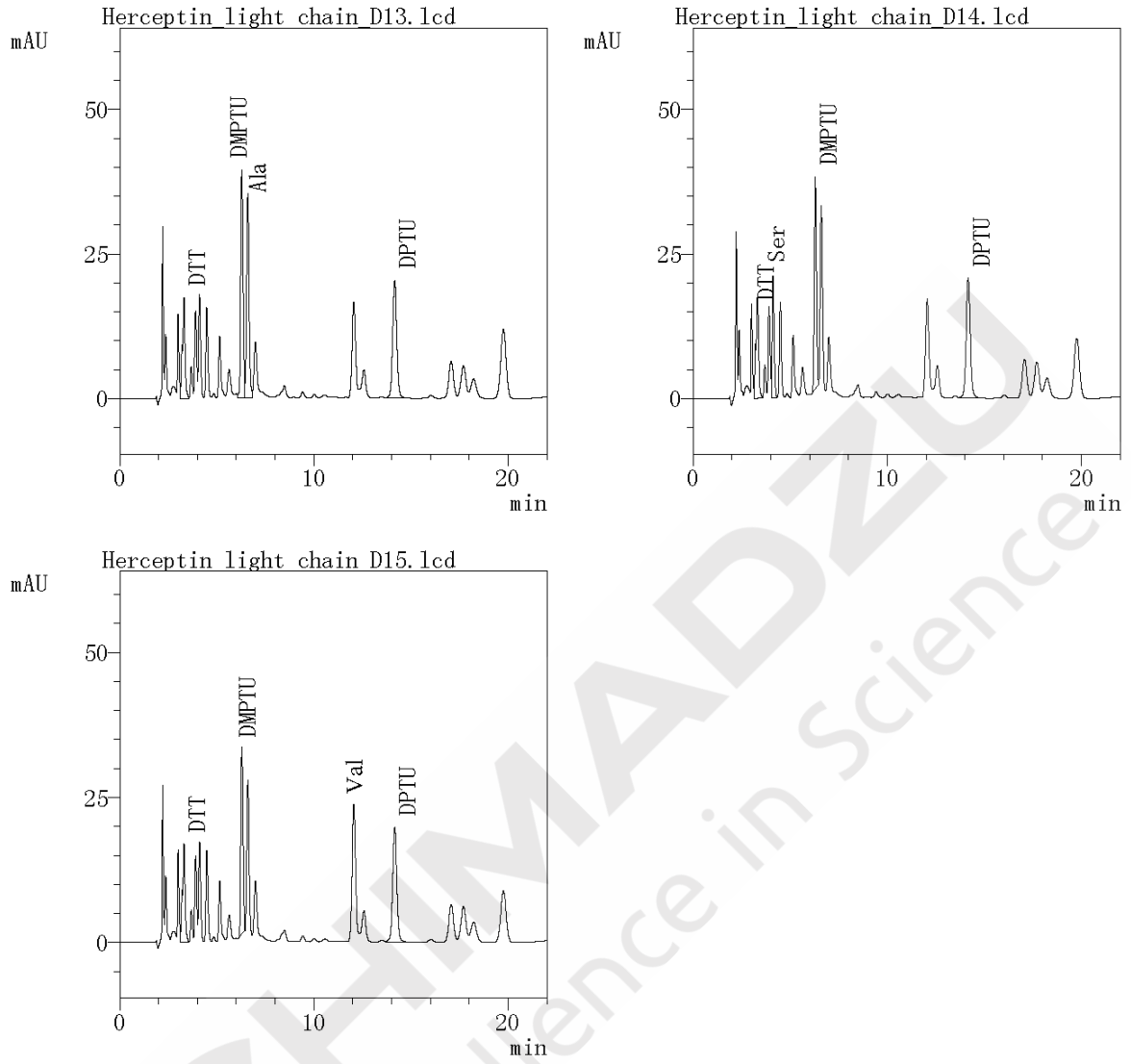
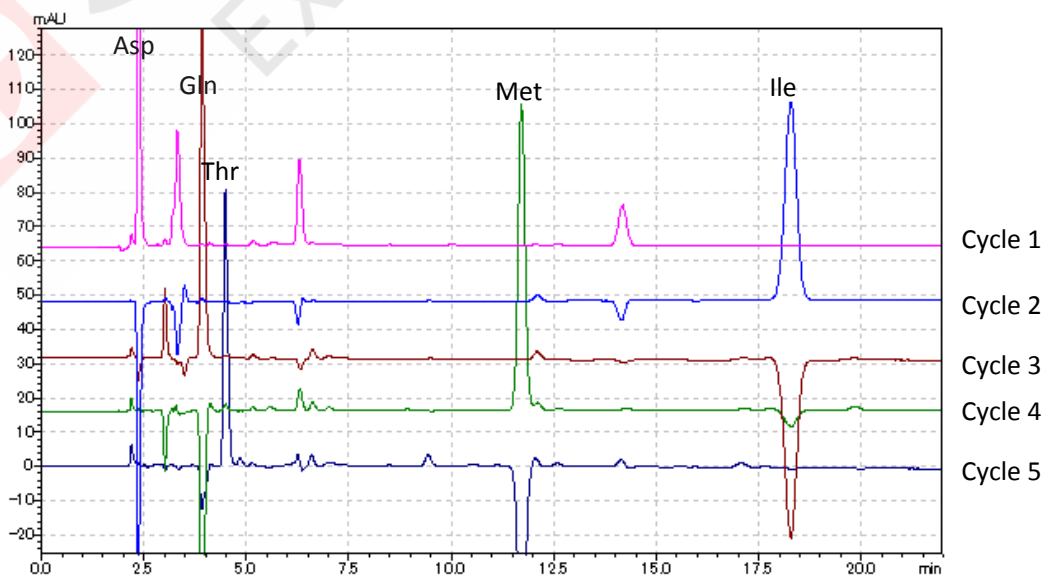


图5 曲妥珠单抗轻链N-末端氨基酸序列分析色谱图



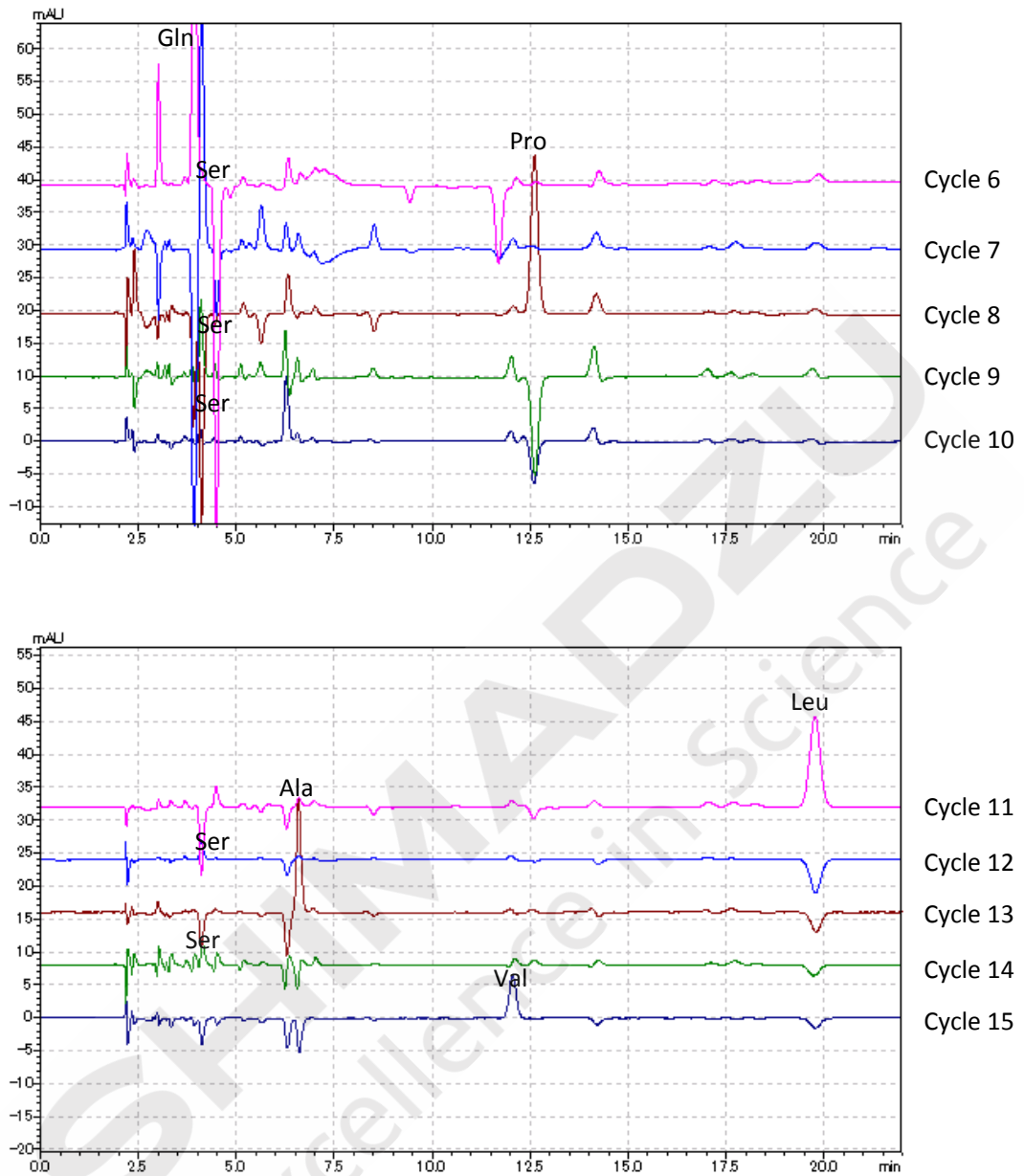


图6 曲妥珠单抗轻链N-末端氨基酸序列分析差减色谱图

3. 结论

本文应用 PPSQ-53A 成功分析了抗体药物曲妥珠单抗（赫赛汀）的重链和轻链的 N-末端前 15 个氨基酸序列，结果与理论一致，表明使用 PPSQ 可以检测蛋白质的 N-末端序列，是生物技术药物研发和质控管理中具有重要作用的分析手段。

应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定小鼠 IgG 抗体 N-末端氨基酸序列

摘要: 为了分析小鼠 IgG 抗体 N-末端氨基酸序列, 本文使用 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳) 将小鼠 IgG 抗体的重链和轻链进行分离, 使用电转印方法将 SDS-PAGE 膜上的样品转移到 PPSQ 使用的 PVDF 膜上, 应用 PPSQ 分析 IgG 抗体轻链的氨基酸序列, 其结果与理论序列结果一致, 验证了此方法的准确性。

关键词: 蛋白质测序仪 PPSQ-53A 氨基酸序列 IgG 抗体

目前, 在制药领域, 生物技术药物得到越来越多的关注。生物技术药物是利用 DNA 重组、细胞融合、细胞培养等生物技术开发出的蛋白质药物、抗体药物等。与具有小分子量的化学药物相比, 生物技术药物通常具有较高的分子量。生物技术药物被期待具有药效高、副作用少及对疾病适用性广泛的优点。但是, 与小分子药物不同, 生物技术药物不能像化学合成品般大量生产。生物技术药物的生产涉及制造、精制、储藏等多个过程。为了保证生物技术药物的质量, 除了进行制品的质控试验, 原材料及制造过程的影响也需要考虑。因此, 生物技术药物的制造管理和品质管理与化学小分子药物有很多差异。目前, 已有针对生物技术药物品质评价的指导方针, 其中, N-末端氨基酸序列分析是性质分析的必需项目。对于此分析, 使用 Edman 降解法可以实现。此方法是将蛋白质从 N-末端顺次切断, 此氨基酸序列测定方法具有直接测定、可靠性高的优点。这里岛津公司的 PPSQ-51A/53A 可以自动化实现 Edman 降解反应, 进行蛋白质和多肽 N-末端的氨基酸序列测定。

本文演示了应用岛津公司 PPSQ-53A 测定了小鼠抗体 IgG 轻链的 N-末端氨基酸序列, 由于 IgG 由轻、重两种链组成, 使用 SDS-PAGE 进行混合样品的分离, 然后将 SDS-PAGE 膜上的样品通过电转印到 PPSQ 所使用的 PVDF 膜上, 剪下所需的分析样品, 加样到 PPSQ 进行氨基酸序列分析。本文实现了混合蛋白质样品氨基酸序列分析, 可作为生物技术药物 N-末端氨基酸序列分析的应用例。

1. 实验部分

1.1 仪器

PPSQ-53A

1.2 试剂和样品

5% phenyl isothiocyanate n-heptane solution (Wako, Code: 161-27341); 12% trimethylamine solution (Wako, Code: 200-20021); 25% trifluoroacetic acid (Wako, Code: 204-20041); PTH-amino acids mobile phase (Wako, Code: 168-27351); Trifluoroacetic acid (Wako, Code: 207-20031); Glass fiber disks, TFA treated (Wako, Code: 072-06461); Wakopak Wakosil- II PTH- 4.6 × 250 mm (Wako, Code: 235-63951); PTH-amino acids mixture standard (Wako, Code: 165-27361); Ethyl acetate (Wako, Code: 052-09041); 1-chlorobutane (Wako, Code: 033-24371)

37% acetonitrile solution (Wako, Code: 018-26041); 小鼠 IgG 抗体 (Wako, Code: 140-09511)
Polybrene (Sigma, Code: S2667)

1.3 样品前处理

抗体的基本构造有 2 种链, 重链 H 链和轻链 L 链。完整抗体的分子量非常大, 约 150 KDa, 难于直接进行蛋白质 N-末端氨基酸测序。当使用 PPSQ 分析 IgG 时, 先使用 SDS-PAGE 将 20 pmol IgG H 链和 L 链分离, 如图 1 所示, 然后将 SDS-PAGE 膜电转印 PPSQ 的 PVDF 膜, 如图 2, 将 L 链待测部分剪下, 装入 PPSQ 反应器中, 安装好反应器。

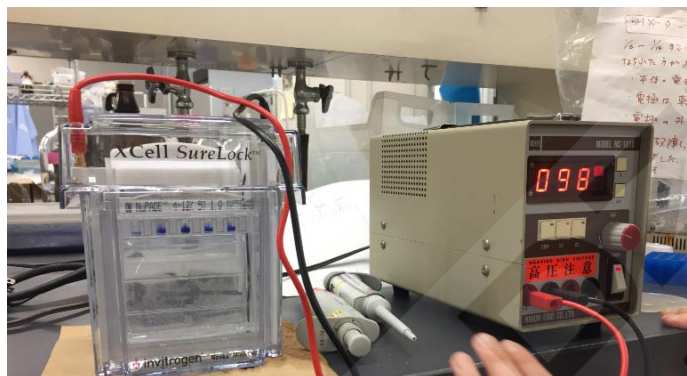


图 1 SDS-PAGE 分离 IgG H 链和 L 链

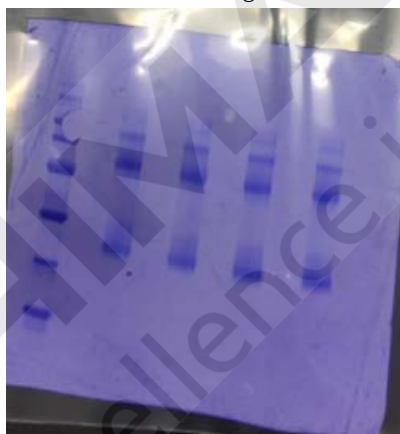


图 2 SDS-PAGE 膜电转印 PVDF 膜上样品

2. 结果讨论

图 3-图 12 是分析小鼠 IgG 抗体 L 链氨基酸的色谱图。由图 1 所示, L 链 N-末端第一个循环是氨基酸 Asp, 第二个循环是 Ile, 以此类推, 前 10 个循环氨基酸按顺序依次是 Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ser-Thr。此结果与理论结果的氨基酸序列相符合。

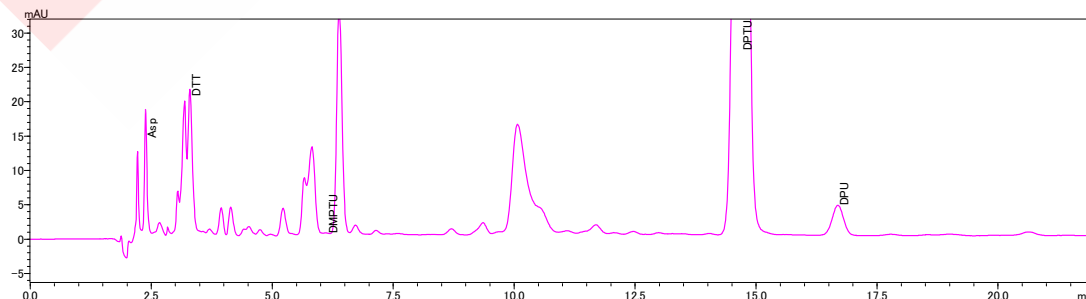


图 3 PPSQ-53A 分析小鼠 IgG 抗体 L 链 N-末端氨基酸第 1 个循环色谱图

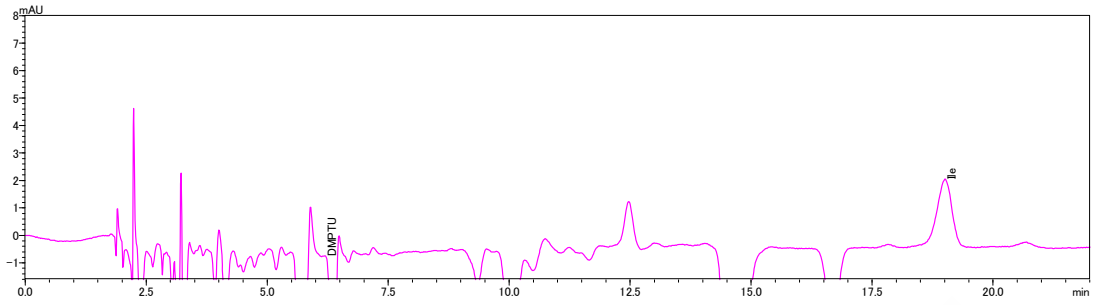


图 4 PPSQ-53A 分析小鼠 IgG 抗体 L 链 N-末端氨基酸第 2 个循环差减色谱图

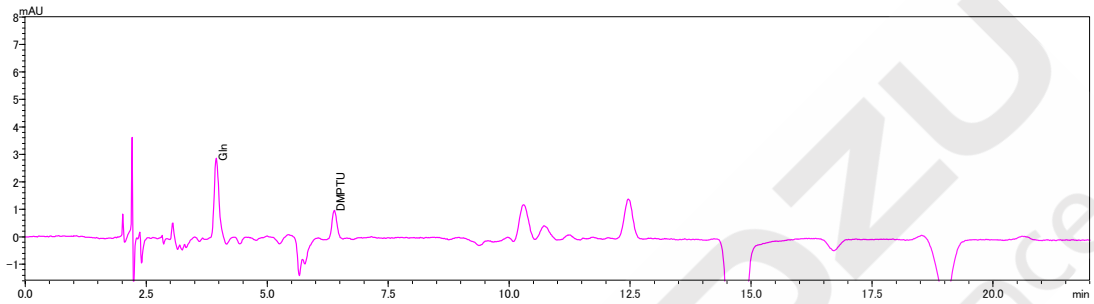


图 5 PPSQ-53A 分析小鼠 IgG 抗体 L 链 N-末端氨基酸第 3 个循环差减色谱图

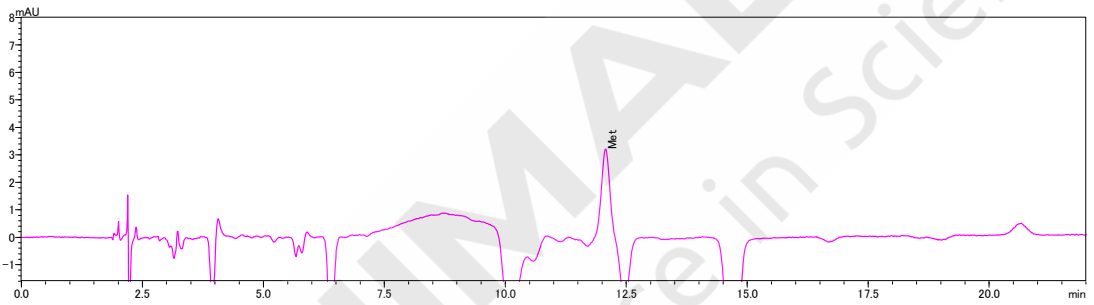


图 6 PPSQ-53A 分析小鼠 IgG 抗体 L 链 N-末端氨基酸第 4 个循环差减色谱图

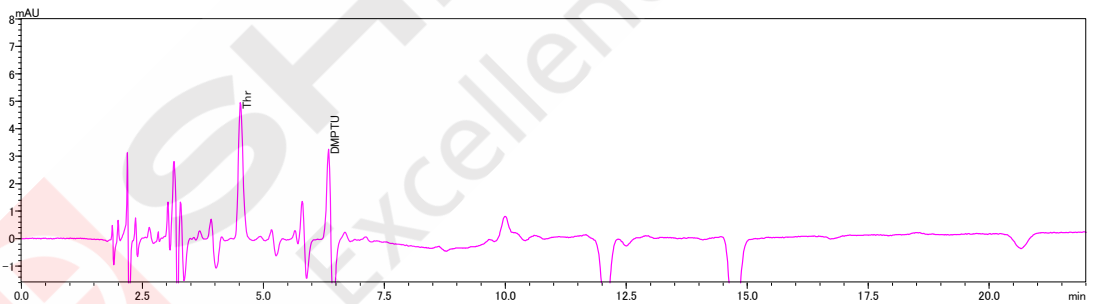


图 7 PPSQ-53A 分析小鼠 IgG 抗体 L 链 N-末端氨基酸第 5 个循环差减色谱图

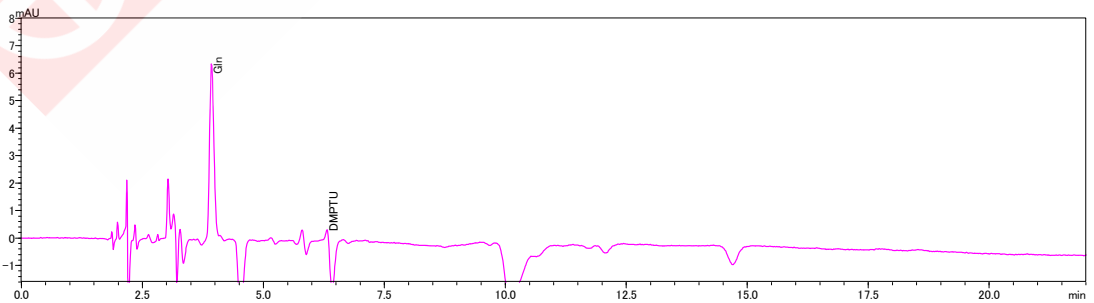


图 8 PPSQ-53A 分析小鼠 IgG 抗体 L 链 N-末端氨基酸第 6 个循环差减色谱图

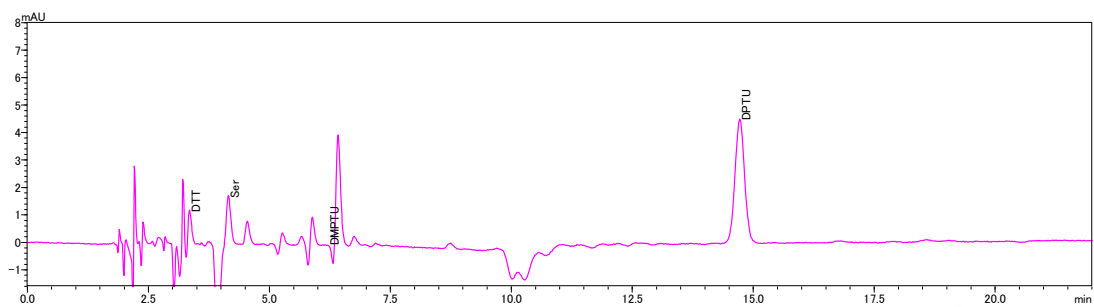


图 9 PPSQ-53A 分析小鼠 IgG 抗体 L 链 N-末端氨基酸第 7 个循环差减色谱图

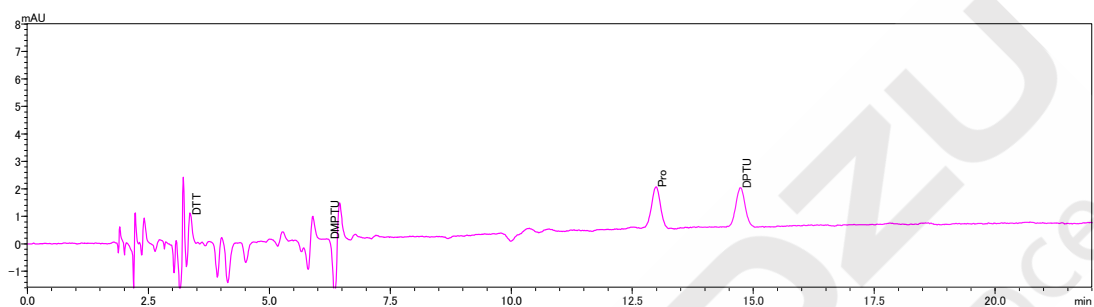


图 10 PPSQ-53A 分析小鼠 IgG 抗体 L 链 N-末端氨基酸第 8 个循环差减色谱图

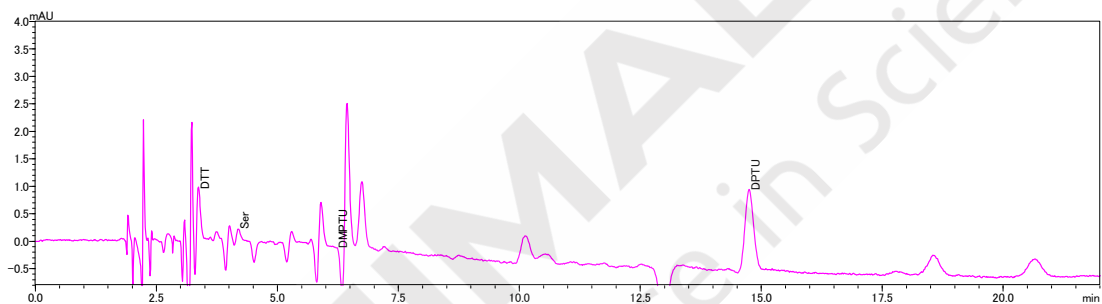


图 11 PPSQ-53A 分析小鼠 IgG 抗体 L 链 N-末端氨基酸第 9 个循环差减色谱图

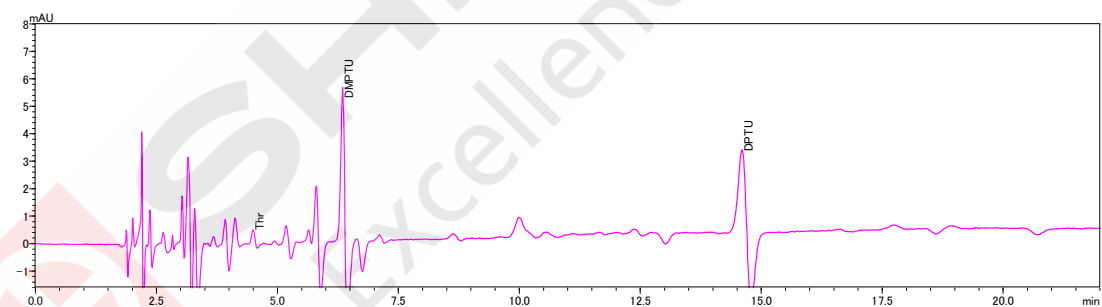


图 12 PPSQ-53A 分析小鼠 IgG 抗体 L 链 N-末端氨基酸第 10 个循环差减色谱图

3. 结论

本文应用 PPSQ-53A 成功分析了小鼠 IgG 抗体 L 链的 N-末端的前 10 个氨基酸序列，结果与理论一致，表明使用 PPSQ 可以检测蛋白质的 N-末端序列，是生物技术药物研发和质控管理中具有重要作用的分析手段。

应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定重组人血管内皮生长因子受体-抗体融合蛋白的 N-末端氨基酸序列

摘要: 本文通过 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳) 对融合蛋白质类药物重组人血管内皮生长因子受体-抗体融合蛋白进行分离后, 电转印至 PVDF 膜 (聚偏氟乙烯膜) 上, 剪切目标条带, 应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定 N-末端前 15 个氨基酸的序列, 结果与理论序列一致, 验证了此方法的准确性, 展示了重组人血管内皮生长因子受体-抗体融合蛋白的分析结果。

关键词: 蛋白质测序仪; PPSQ-53A; N-末端氨基酸序列; 重组人血管内皮生长因子受体-抗体融合蛋白

重组人血管内皮生长因子受体-抗体融合蛋白 (药品名称为康柏西普眼用注射液, 英文名为“Conbercept”), 是新一代的抗 VEGF (血管内皮生长因子) 融合蛋白, 为中国首个获得世界卫生组织国际通用名的拥有全自主知识产权的生物 I 类新药, 临床用于治疗湿性年龄相关性黄斑变性 (AMD)。作为直接注射给药的蛋白质类药物, 药物的 N-末端氨基酸序列测定是药品质控的重要依据。本文展示了应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定重组人血管内皮生长因子受体-抗体融合蛋白的 N-末端氨基酸序列的方法及结果。该方法操作简单、检测灵敏可靠, 可作为生物药物 N-末端氨基酸序列分析的应用参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

蛋白质测序仪 PPSQ-53A

1.2 试剂和样品

5% phenyl isothiocyanate n-heptane solution (Wako, Code: 161-27341)

12% trimethylamine solution (Wako, Code: 200-20021)

25% trifluoroacetic acid (Wako, Code: 204-20041)

PTH-amino acids mobile phase (Wako, Code: 168-27351)

Trifluoroacetic acid (Wako, Code: 207-20031)

Wakopak Wakosil- II PTH- 4.6 × 250 mm (Wako, Code: 235-63951)

PTH-amino acids mixture standard (Wako, Code: 165-27361)

Ethyl acetate (Wako, Code: 052-09041)

1-chlorobutane (Wako, Code: 033-24371)

37% acetonitrile solution (Wako, Code: 018-26041)

PVDF 膜 (聚偏氟乙烯膜) (碧云天, Code: FFP32)

样品: 重组人血管内皮生长因子受体-抗体融合蛋白原液

1.3 样品前处理

将样品通过 SDS-PAGE（十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳）分离后，电转印至 PVDF 膜上，使用丽春红染液染色，待自然晾干后剪切部分条带，安装到反应器上进行分析，测试样品 *N*-末端前 15 个氨基酸的序列。

1.4 PPSQ 分析条件

PVDF 分析模式，循环数设置为 16（第一个循环不参与反应）。

2. 结果讨论

2.1 PTH-氨基酸混合标准品测试色谱图

测试 19 种 PTH 氨基酸的混合标准品进行校准，校准测试混合标准品图谱见图 1。

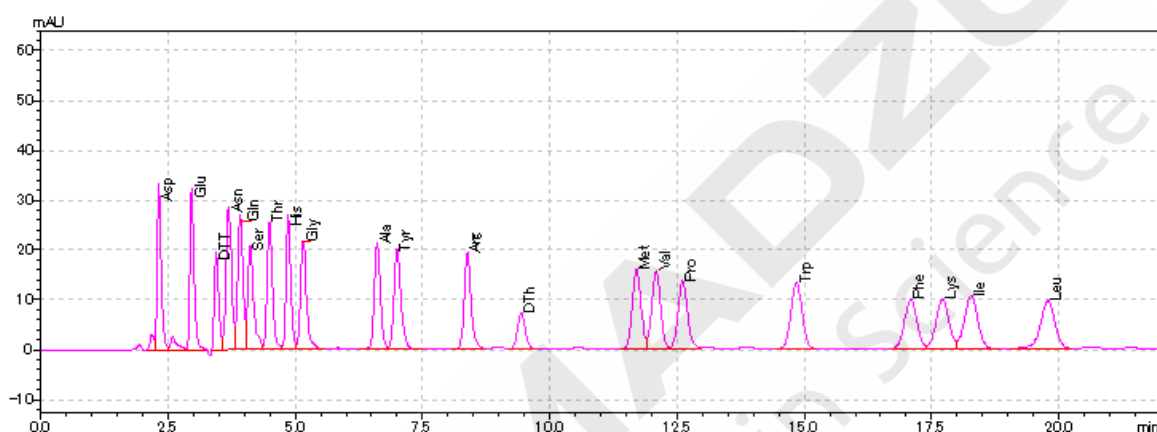
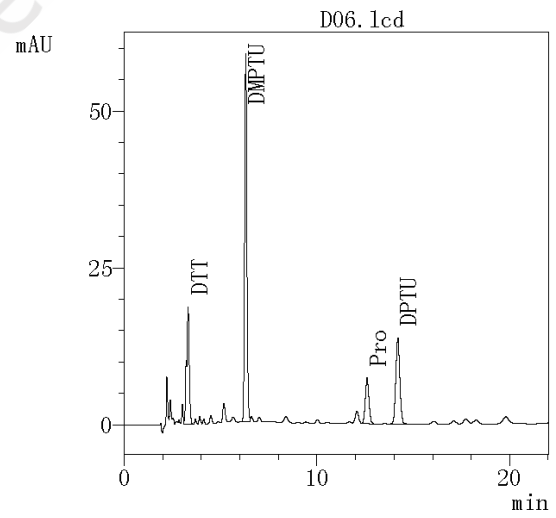
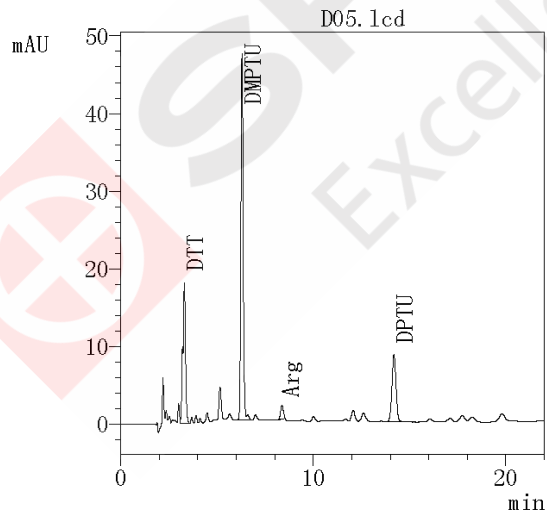
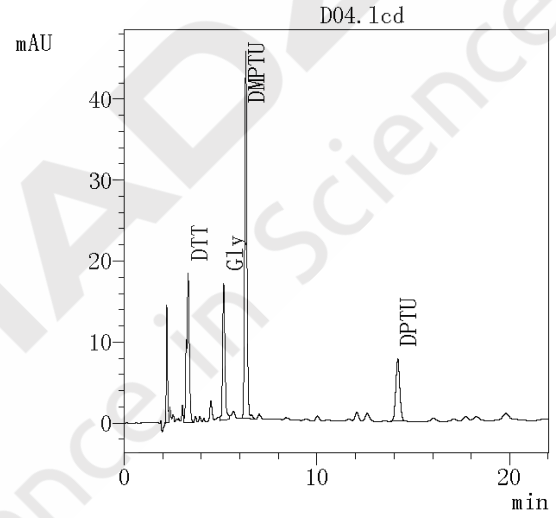
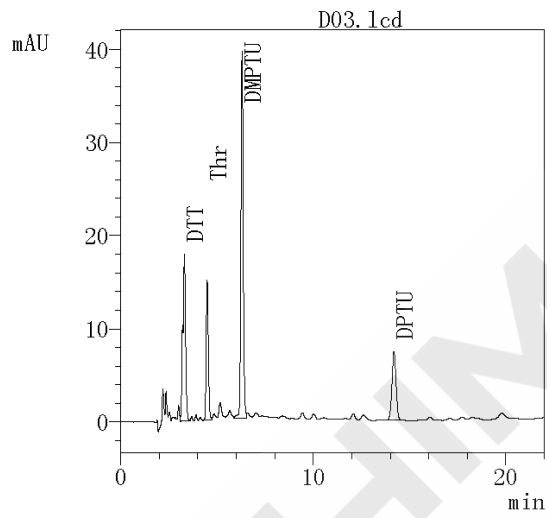
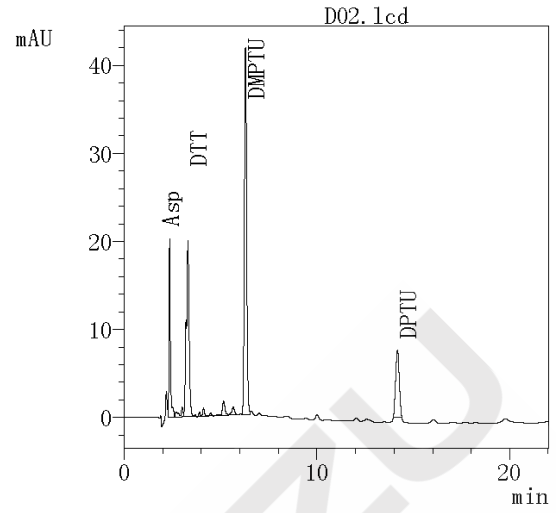
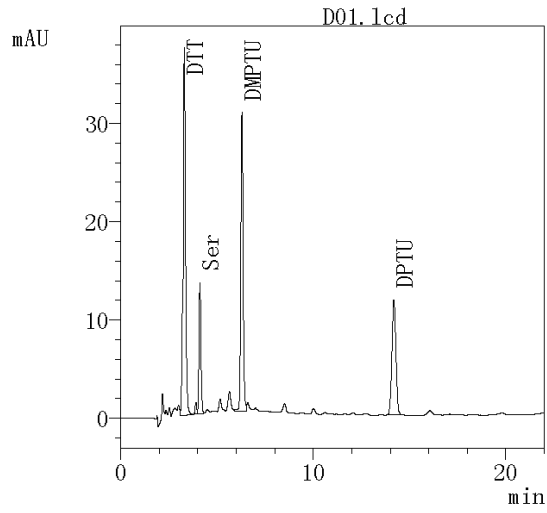
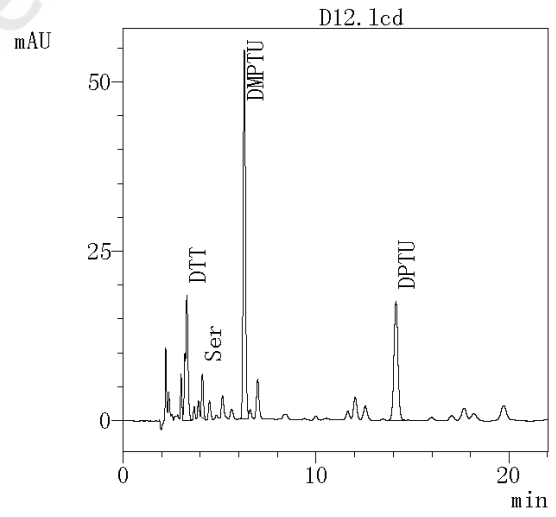
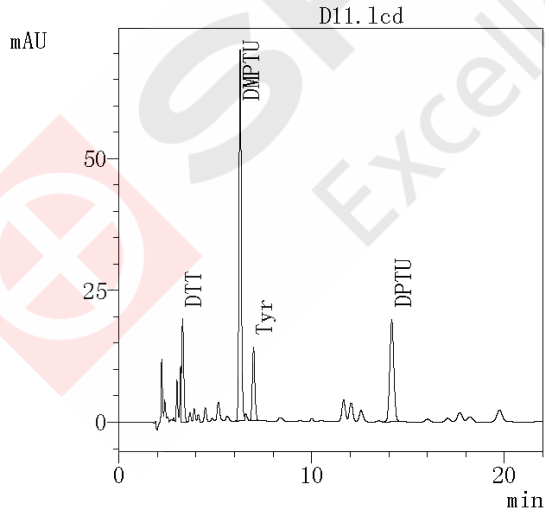
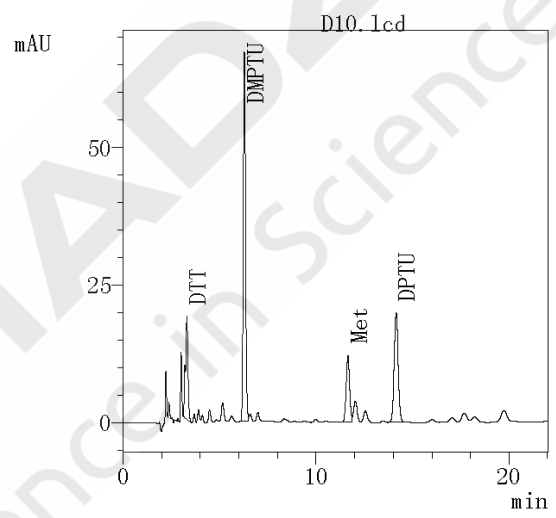
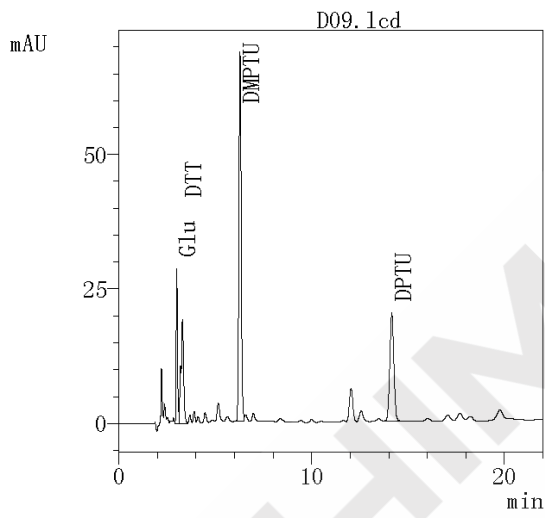
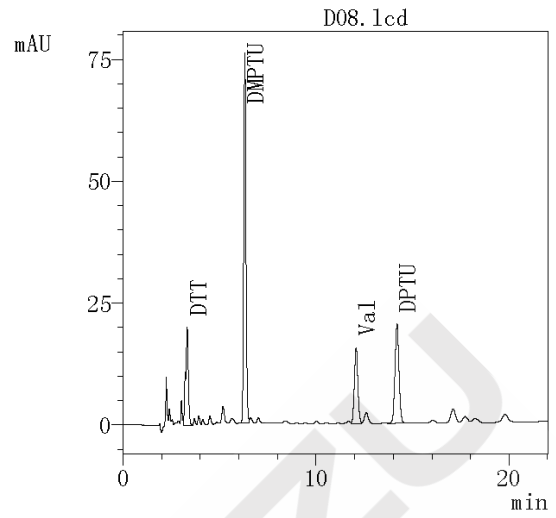
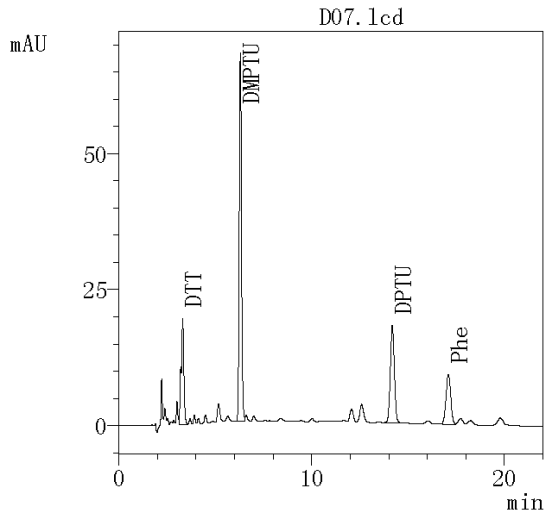


图 1 PTH-氨基酸混合标准品校准测试图谱

2.2 重组人血管内皮生长因子受体-抗体融合蛋白 *N*-末端氨基酸序列分析色谱图

重组人血管内皮生长因子受体-抗体融合蛋白注射液原液的 *N*-末端测序结果见图 2。如图所示，*N*-末端第一个循环是 Ser，第二个循环是 Asp，以此类推，前 15 个循环氨基酸按顺序依次是 Ser-Asp-Thr-Gly-Arg-Pro-Phe-Val-Glu-Met-Tyr-Ser-Glu-Ile-Pro，与理论序列一致。





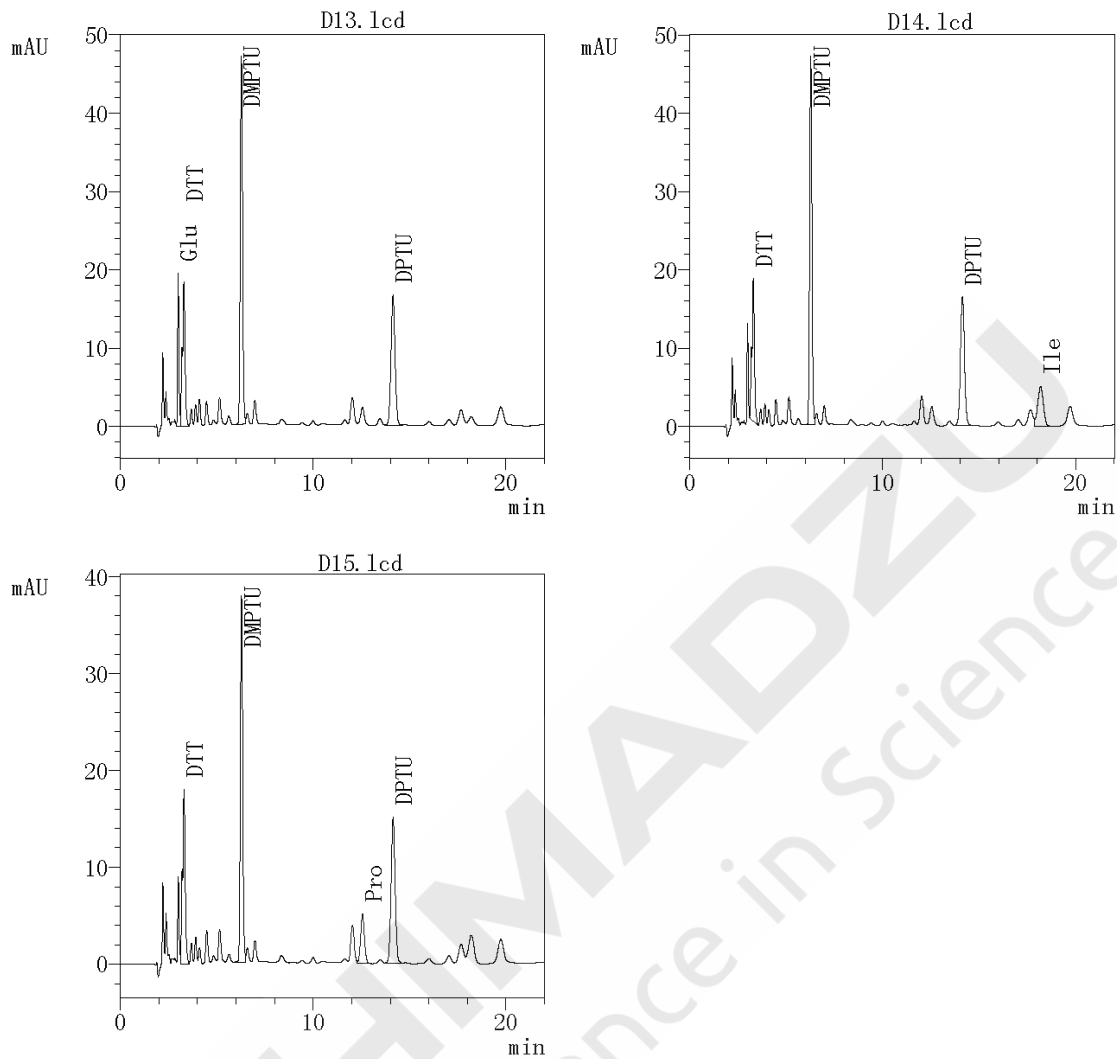


图2 重组人血管内皮生长因子受体-抗体融合蛋白的 *N*-末端氨基酸序列分析色谱图
(图中 DTT、DMPTU、DPTU 为反应副产物)

3. 结论

本文应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 对重组人血管内皮生长因子受体-抗体融合蛋白注射液原液进行 *N*-末端氨基酸序列分析, 成功测定了样品 *N*-末端前 15 个氨基酸的序列, 结果与理论一致。PPSQ-53A 采用 SPD-M30A 检测器, 检测灵敏度高、操作简便, 是生物药物研发和质控管理中有力的分析工具。

3. *N*-末端特殊结构处理：甲硫氨酸缺失、焦谷氨酸环化封闭及二硫键

应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定 *N*-末端部分甲硫氨酸缺失的蛋白质类药物的 *N*-末端氨基酸序列

摘要：生物体在合成蛋白质时，*N*-末端首位的甲硫氨酸在蛋白质加工过程中可能被酶切除。本文应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定了发生 *N*-末端部分甲硫氨酸切除的蛋白质类药物重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子的 *N*-末端前 16 个氨基酸的序列，结果与理论序列一致。除了氨基酸定性，根据信号峰强度，可以粗略估计样品 *N*-末端甲硫氨酸的缺失比例。以上表明应用 PPSQ-53A 可以测定 *N*-末端部分甲硫氨酸缺失的蛋白质的 *N*-末端氨基酸序列。

关键词：蛋白质测序仪；PPSQ-53A；氨基酸序列；蛋白质类药物；重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子

蛋白质作为生命的物质基础，其合成起始于遗传信息中的起始密码子，绝大多数生物的起始密码子都是 AUG。AUG 作为多肽链合成的起始信号，在原核生物中编码甲酰甲硫氨酸 (fMet)，在真核生物中翻译为甲硫氨酸 (Met)，fMet 和 Met 在蛋白质合成加工过程中可以被甲硫氨酰氨肽酶选择性地切除，切除率与 *N*-末端第二位的氨基酸侧链大小及细胞生长条件有关，但受前者影响最大[1]。Met 的切除率随着第二位氨基酸侧链的增大而降低，但当第三位氨基酸是 Pro 时，切除率则被显著抑制。如果 Met 被部分切除，则蛋白质就会存在 Met 起始和非 Met 起始两种肽链形式。

本文以蛋白质类药物重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子注射液原液为例，演示了应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 进行 *N*-末端甲硫氨酸部分缺失的蛋白质分析的方法和结果，可作为此类生物药物样品分析时的参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

蛋白质测序仪 PPSQ-53A

1.2 试剂和样品

5% phenyl isothiocyanate n-heptane solution (Wako, Code: 161-27341)

12% trimethylamine solution (Wako, Code: 200-20021)

25% trifluoroacetic acid (Wako, Code: 204-20041)

PTH-amino acids mobile phase (Wako, Code: 168-27351)

Trifluoroacetic acid (Wako, Code: 207-20031)

Wakopak Wakosil- II PTH- 4.6 × 250 mm (Wako, Code: 235-63951)

PTH-amino acids mixture standard (Wako, Code: 165-27361)

Ethyl acetate (Wako, Code: 052-09041)

1-chlorobutane (Wako, Code: 033-24371)

37% acetonitrile solution (Wako, Code: 018-26041)

PVDF 膜 (聚偏氟乙烯膜) (碧云天, Code: FFP32)

样品: 重组人粒细胞刺激因子原液

1.3 样品前处理

重组人粒细胞刺激因子原液含有蛋白质稳定剂和一定量盐分,可能会干扰分析、损害仪器,需要对样品进行脱盐处理。剪切适当大小的 PVDF 膜,放入 13 mm 可换膜针式过滤头内,过滤头 PVDF 膜面朝上,置于 1.5 mL 离心管中,与 20 mL 规格 (其他规格亦可) 的注射器一起构成自制脱盐装置 (图 1)。应用移液枪在过滤头内加入 100 μ L 的甲醇,通过注射器施压使甲醇通过 PVDF 膜,重复一次,对 PVDF 膜进行活化;取适量样品加水稀释至 100 μ L,加入过滤头内,注射器施压,液体流出,蛋白质则结合在 PVDF 膜上;加入 100 μ L 的 0.1% TFA 溶液,注射器施压, PVDF 膜上残留的盐分随溶液一起排出,重复 3 次。将过滤头拆开取出 PVDF 膜,自然晾干后剪除边缘部分,剪切一半大小的 PVDF 膜,安装到反应器上进行分析,测试样品 *N*-末端前 16 个氨基酸的序列。

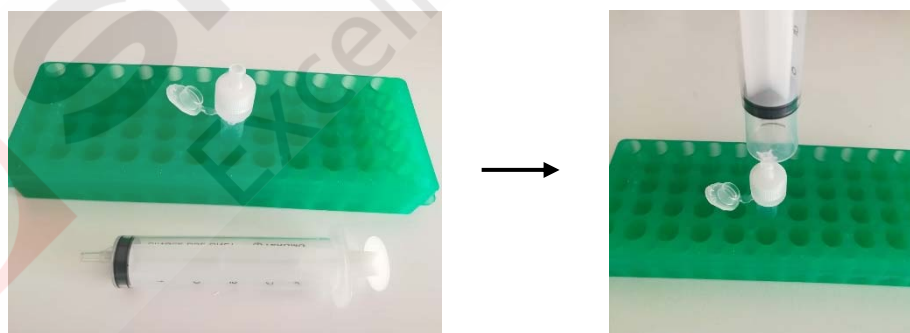


图 1 自制蛋白质脱盐装置

1.4 PPSQ 分析条件

PVDF 分析模式,循环数设置为 17 (第一个循环不参与反应)。

2. 结果讨论

2.1 PTH-氨基酸混合标准品测试色谱图。

为对 19 种 PTH-氨基酸进行校准,先测试 19 种 PTH 氨基酸的混合标准品,校准测试混合

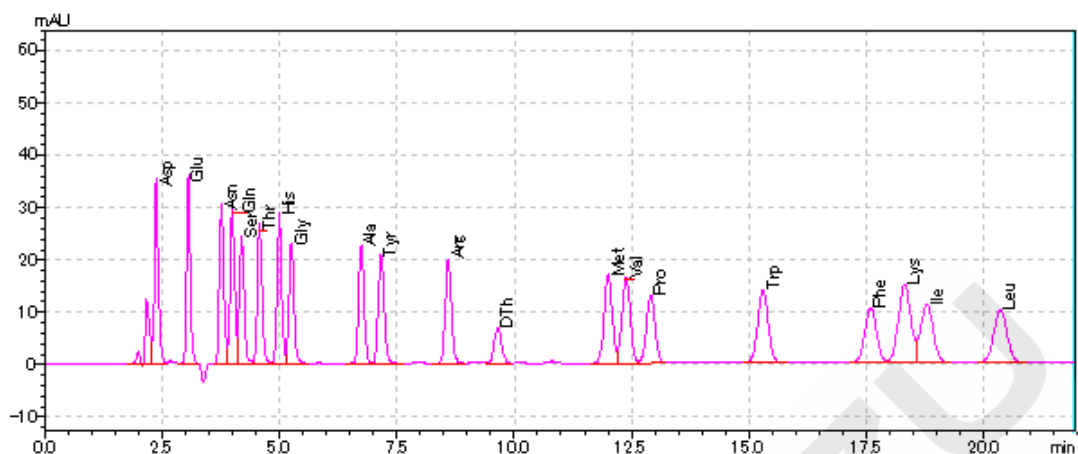
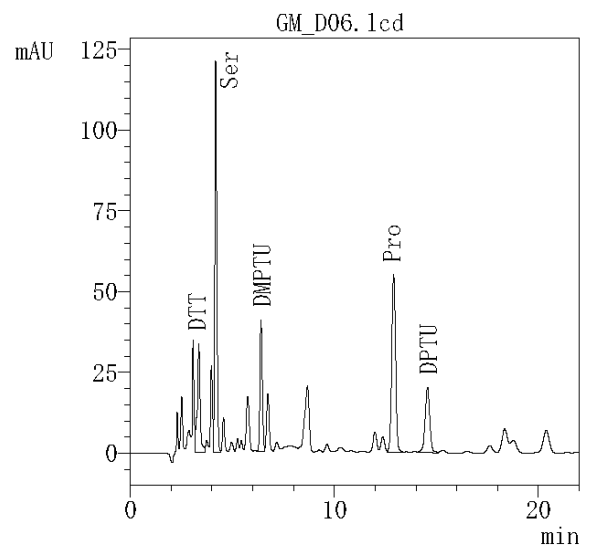
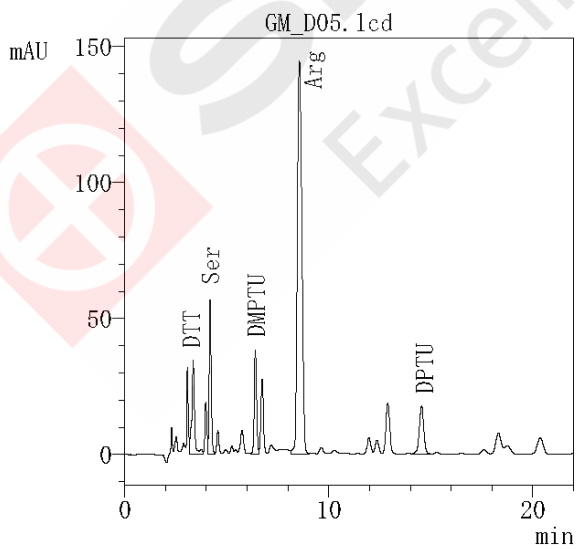
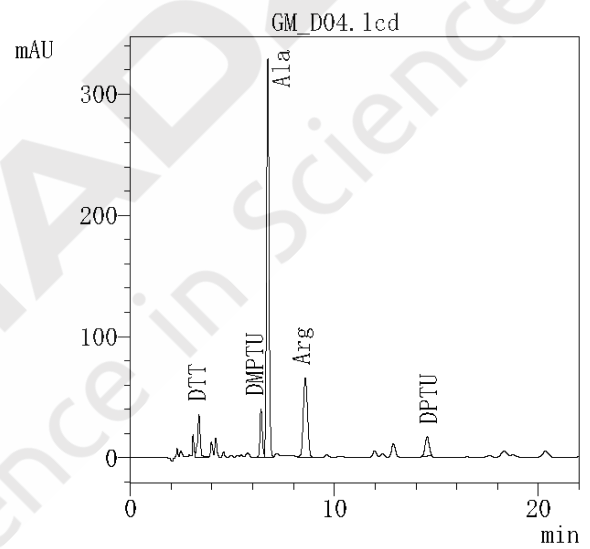
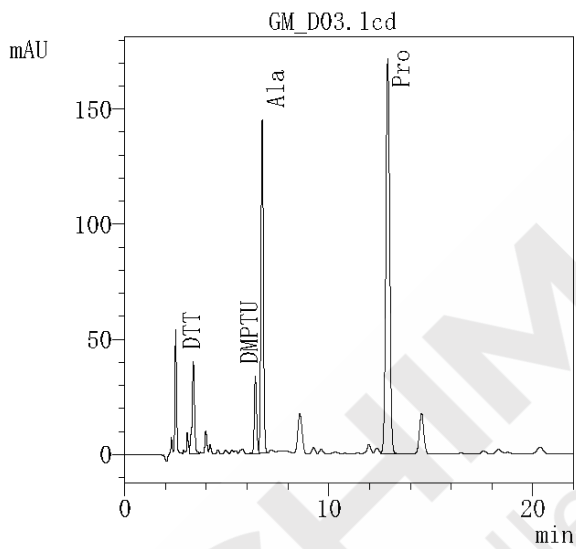
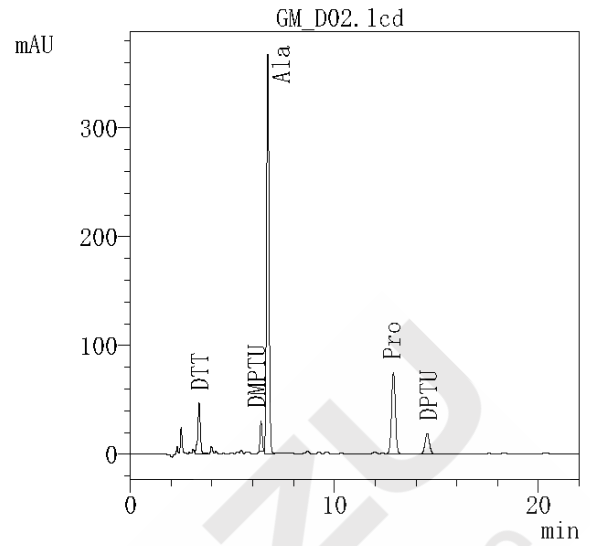
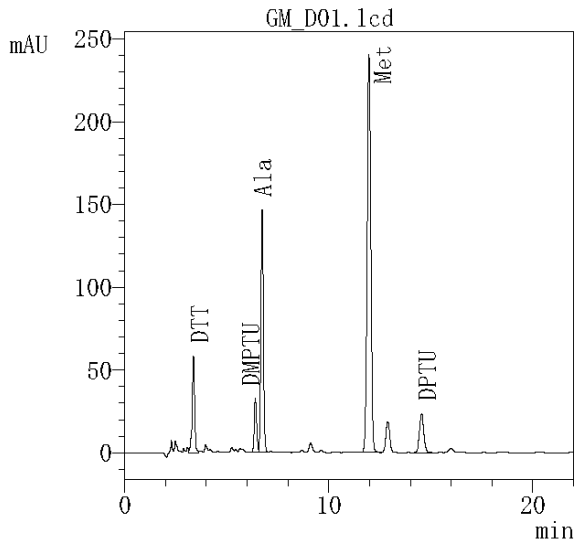
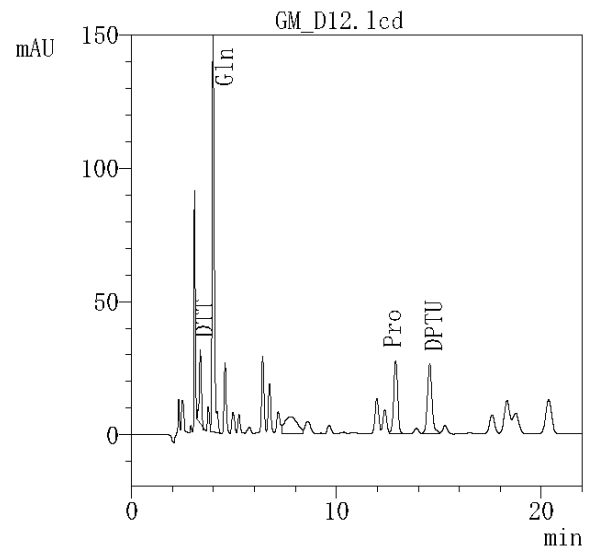
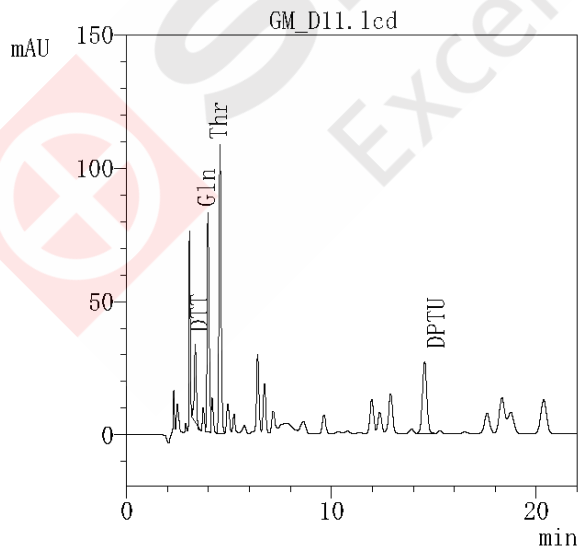
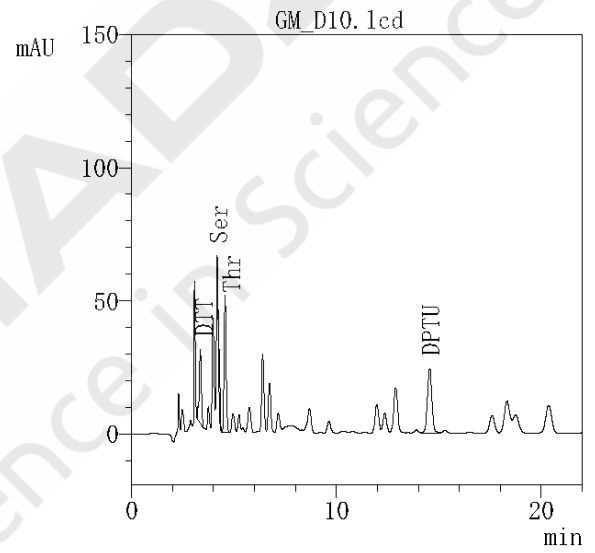
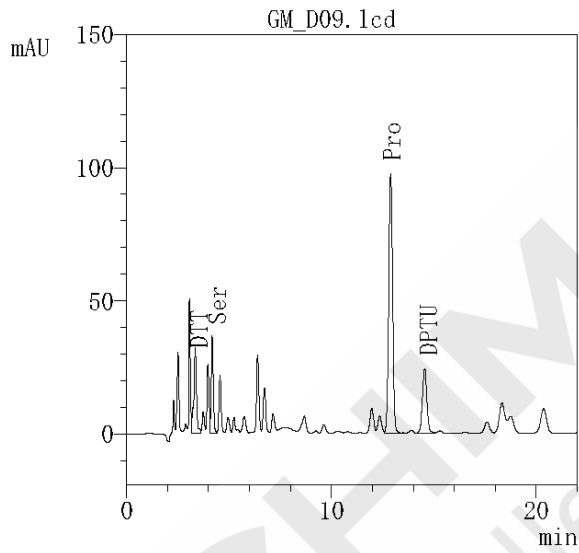
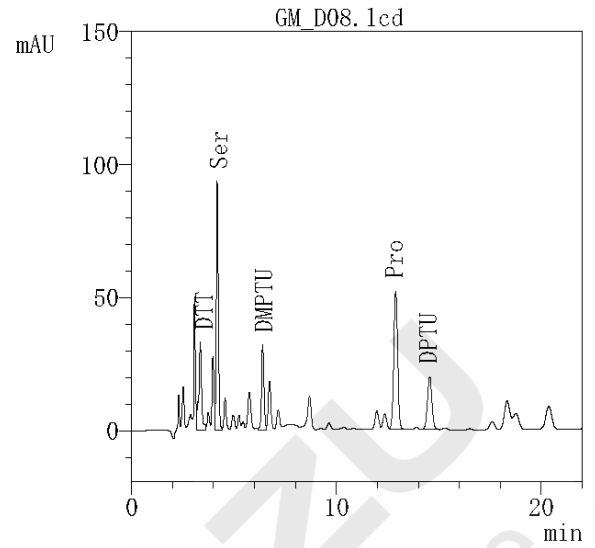
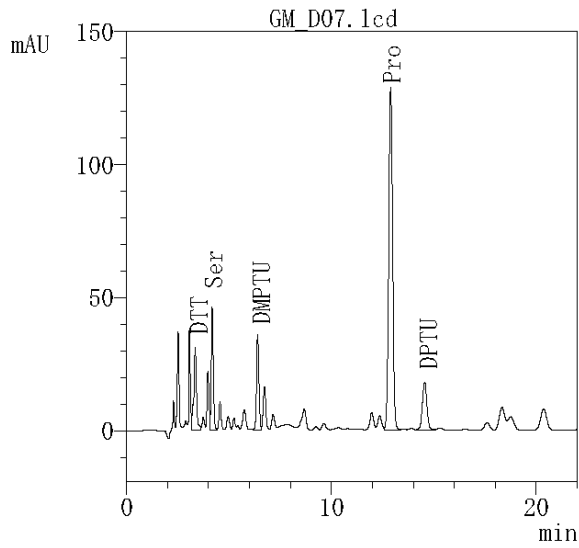


图 2 PTH-氨基酸混合标准品校准测试图谱

2.2 样品 *N*-末端氨基酸序列分析色谱图

重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子的 *N*-末端氨基酸序列分析结果见图 3。如图所示，样品每个循环均存在两个信号峰，第一个循环主峰为 Met、副峰为 Ala，第二个循环主峰为 Ala、副峰为 Pro，第三个循环主峰为 Pro、副峰为 Ala（本循环 Pro 的信号强度只比 Ala 高出不足 20%，可能与两种氨基酸的回收率不同有关），第四个循环主峰为 Ala、副峰为 Arg，依次类推，样品前 16 个循环氨基酸顺序依次是 Met-Ala-Pro-Ala-Arg-Ser-Pro-Ser-Pro-Ser-Thr-Gln-Pro-Trp-Glu-His 和 Ala-Pro-Ala-Arg-Ser-Pro-Ser-Pro-Ser-Thr-Gln-Pro-Trp-Glu-His-Val，与理论序列 (Met)-Ala-Pro-Ala-Arg-Ser-Pro-Ser-Pro-Ser-Thr-Gln-Pro-Trp-Glu-His-Val 一致。从信号强度来看，两条链的比例大约为 2:1（Met 起始链：Ala 起始链）。据文献报道[1]，当 *N*-末端第二位的氨基酸为 Ala 时，末端 Met 的切除率大于 90%，但该切除率会被第三位的 Pro 显著抑制，这与本实验观察到的结果一致（本实验中 Ala 起始链的比例远低于 90%）。需要注意的是，由于不同氨基酸的回收率有差异，当样品中存在两条肽链且分布比例差别不大时，可能会混淆每个循环氨基酸种类与样品肽链的归属关系。所以，对于含有两条肽链的样品，肽链比例差异越大，应用蛋白质测序仪进行氨基酸顺序判断就越准确。





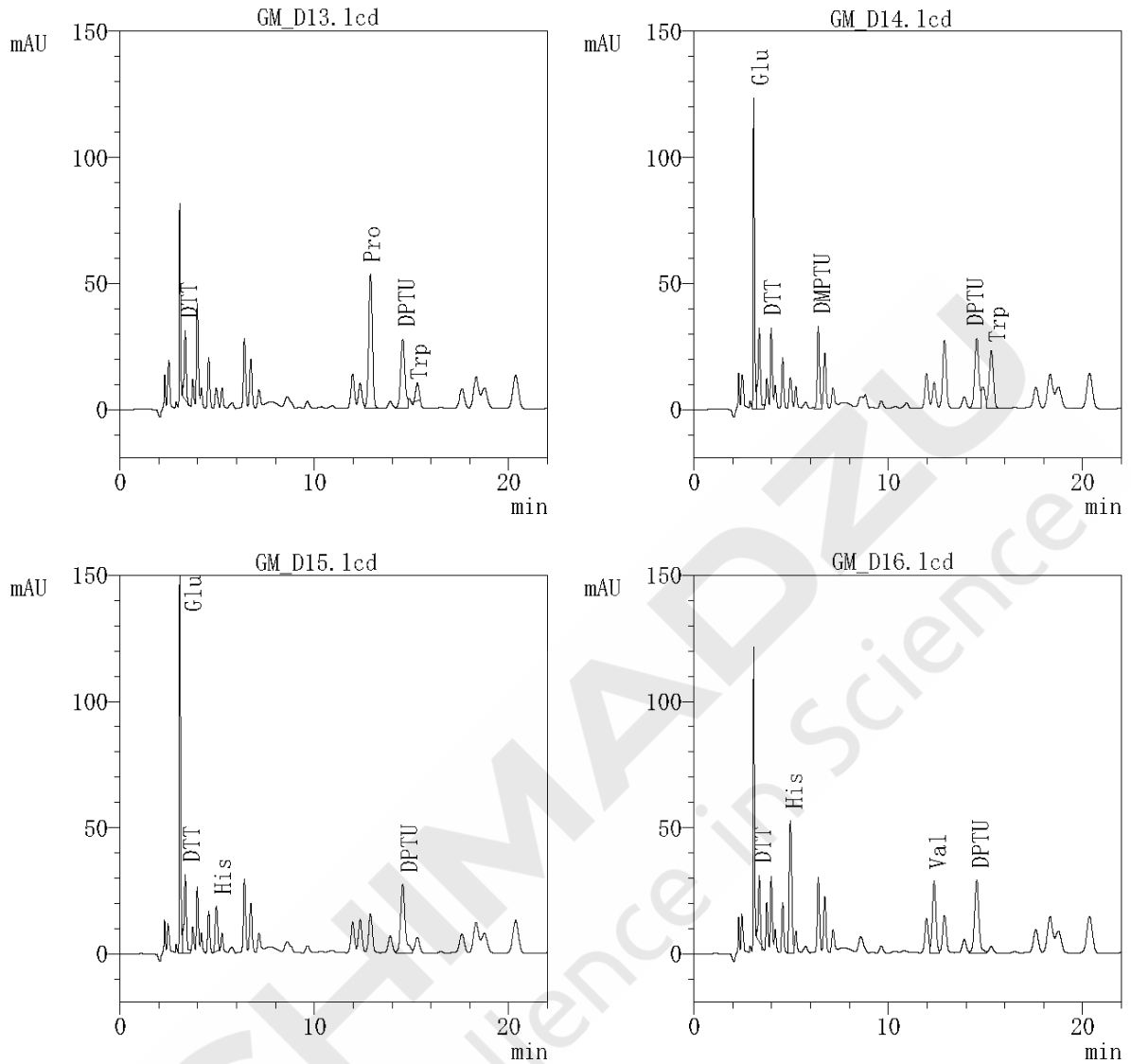


图3 重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子 N-末端氨基酸序列分析色谱图

3. 结论

本文应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 对重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子注射液原液进行 N-末端氨基酸序列分析, 确认样品存在 N-末端 Met 缺失, 氨基酸序列与理论信息一致, 同时根据两条肽链的信号峰强度比例粗略估计了 N-末端 Met 切除率。PPSQ-53A 检测灵敏度高, 可以直接进行 N-末端氨基酸序列分析, 是生物药物研发和质控管理中强有力的分析工具。

参考文献

- [1] *Extent of N-terminal methionine excision from Escherichia coli proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid.* Hirel PH, Schmitter MJ, Dessen P, Fayat G, Blanquet S. *PNAS*.1989. 86 (21) 8247-8251
- [2] *UNIT 11.10 N-Terminal Sequence Analysis of Proteins and Peptides.* Kaye D. Speicher, Nicole Gorman, and David W. Speicher. *Curr Protoc Protein Sci*. 2001.

应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定 N-末端焦谷氨酸环化封闭类单克隆抗体的 N-末端序列

摘要： N-末端焦谷氨酸环化封闭类单克隆抗体药物因 N-末端缺乏自由的 α 氨基，不能通过 Edman 降解法直接进行 N-末端测序。本文以帕尼单抗为例，加入焦谷氨酸氨肽酶切除环化的焦谷氨酸后，测定重链 N-端前 15 个氨基酸序列，与理论信息一致，表明对 N-末端焦谷氨酸环化封闭类样品进行去焦谷氨酸环化处理后，应用 PPSQ-53A 可以测定 N-末端氨基酸序列。

关键词： 蛋白质测序仪；PPSQ-53A；氨基酸序列；抗体药物；帕尼单抗；焦谷氨酸环化

单克隆抗体药物因其高靶向性、低细胞毒性，是生物制药产业增长最快的领域之一。抗体药物在进行研究开发、临床申报、生产质控时，需要进行 N-末端测序以进行质量评价，Edman 降解法是目前生物制品进行 N-末端测序的标准方法。在抗体药物中，有些抗体的重、轻链 N-末端第一个氨基酸为谷氨酸 (E) 或谷氨酰胺 (Q)，自然状态下会发生脱水或脱氨反应生成焦谷氨酸 (见图 1)。由于 N-末端缺乏自由的 α 氨基，在进行 Edman 降解法测序时，无法与 PITC (异硫氰酸苯酯) 试剂结合，使得 Edman 降解反应无法进行下去，不能进行 N-末端蛋白质序列分析。需要采用特定方法解除 N-末端封闭，以进行 N-末端氨基酸序列分析。

本文以抗体药物帕尼单抗 (Vectibix) (临床用于治疗结直肠癌) 为例，取样品直接进行 N-末端测序，没有获得有效氨基酸信号；将样品应用焦谷氨酸氨肽酶切除环化的焦谷氨酸后再进行 N-末端测序，成功测得样品重链的 N-末端氨基酸序列。

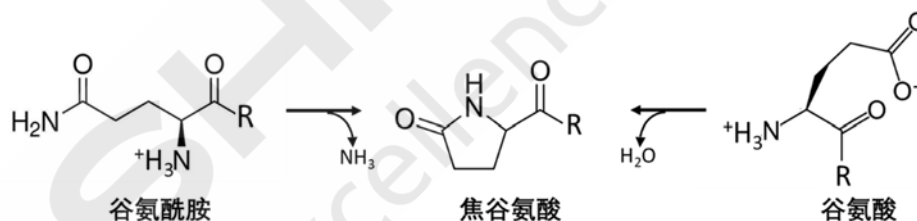


图 1 N-末端谷氨酸/谷氨酰胺生成焦谷氨酸反应过程

1. 实验部分

1.1 仪器

蛋白质测序仪 PPSQ-53A

1.2 试剂和样品

5% phenyl isothiocyanate n-heptane solution (Wako, Code: 161-27341)

12% trimethylamine solution (Wako, Code: 200-20021)

25% trifluoroacetic acid (Wako, Code: 204-20041)

PTH-amino acids mobile phase (Wako, Code: 168-27351)

Trifluoroacetic acid (Wako, Code: 207-20031)

Wakopak Wakosil- II PTH- 4.6 \times 250 mm (Wako, Code: 235-63951)

PTH-amino acids mixture standard (Wako, Code: 165-27361)

Ethyl acetate (Wako, Code: 052-09041)
1-chlorobutane (Wako, Code: 033-24371)
37% acetonitrile solution (Wako, Code: 018-26041)
Pfu Pyroglutamate Aminopeptidase (焦谷氨酸氨肽酶) (Takara, code: 7334)
PVDF 膜 (聚偏氟乙烯膜) (碧云天, Code: FFP32)
样品: 帕尼单抗 (Vectibix) 注射液 (20 mg/mL) (重链 *N*-末端环化封闭)

1.3 样品前处理

取 10 μ g 帕尼单抗注射液样品进行 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳) 分离后, 电转印至 PVDF 膜上, 使用丽春红染液进行染色, 待自然晾干后剪切重链条带, 安装到反应器上进行分析, 测试样品 *N*-末端前 5 个氨基酸的序列。

取 20 μ g 样品, 加入 1 \times 消化缓冲液、0.1% Tween-20 (促溶作用)、5 mU 焦谷氨酸氨肽酶, 加水补齐到 100 μ L, 75 $^{\circ}$ C 孵育 6 h。取孵育产物进行 SDS-PAGE 电泳和电转印, 剪切重链条带, 安装到反应器上进行分析, 测试样品 *N*-末端前 15 个氨基酸的序列。

1.4 PPSQ 分析条件

分析模式: PVDF

循环数: 未经切焦谷氨酸处理样品循环数为 6, 经去焦谷氨酸环化处理样品循环数为 16, 其中第一个循环不参与反应。

2. 结果讨论

2.1 PTH-氨基酸混合标准品测试色谱图

为进行校准, 先测试 19 种 PTH 氨基酸的混合标准品, 校准测试混合标准品图谱见图 2。

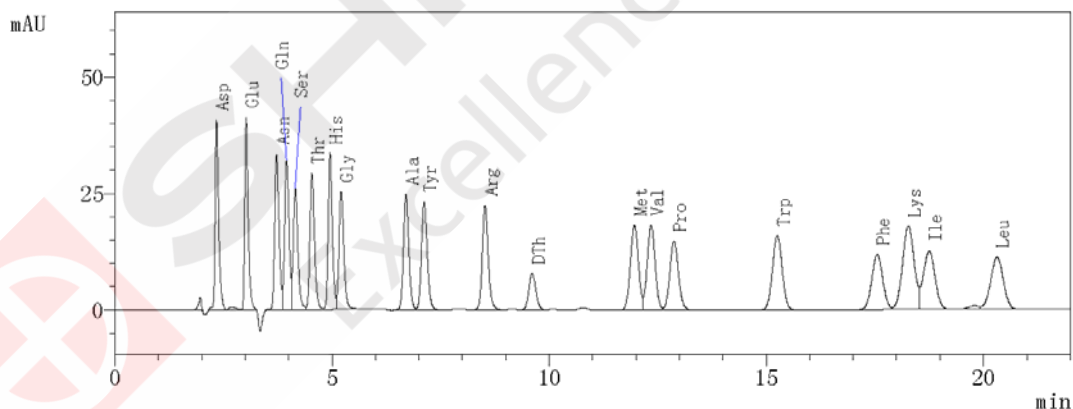


图 2 PTH-氨基酸混合标准品校准测试图谱

2.2 样品直接电转印后进行 *N*-末端测序的色谱图

将样品直接电转印至 PVDF 膜上, 剪切重链条带安装至 PPSQ-53A 上, 测定 *N*-末端前 5 个氨基酸的序列, 结果见图 3。由图可知, 样品未检测到有效信号峰, 这是由于样品重链 *N*-末端焦谷氨酸环化封闭, 不能进行 Edman 降解反应, 无法直接通过蛋白质测序仪进行 *N*-末端测序。

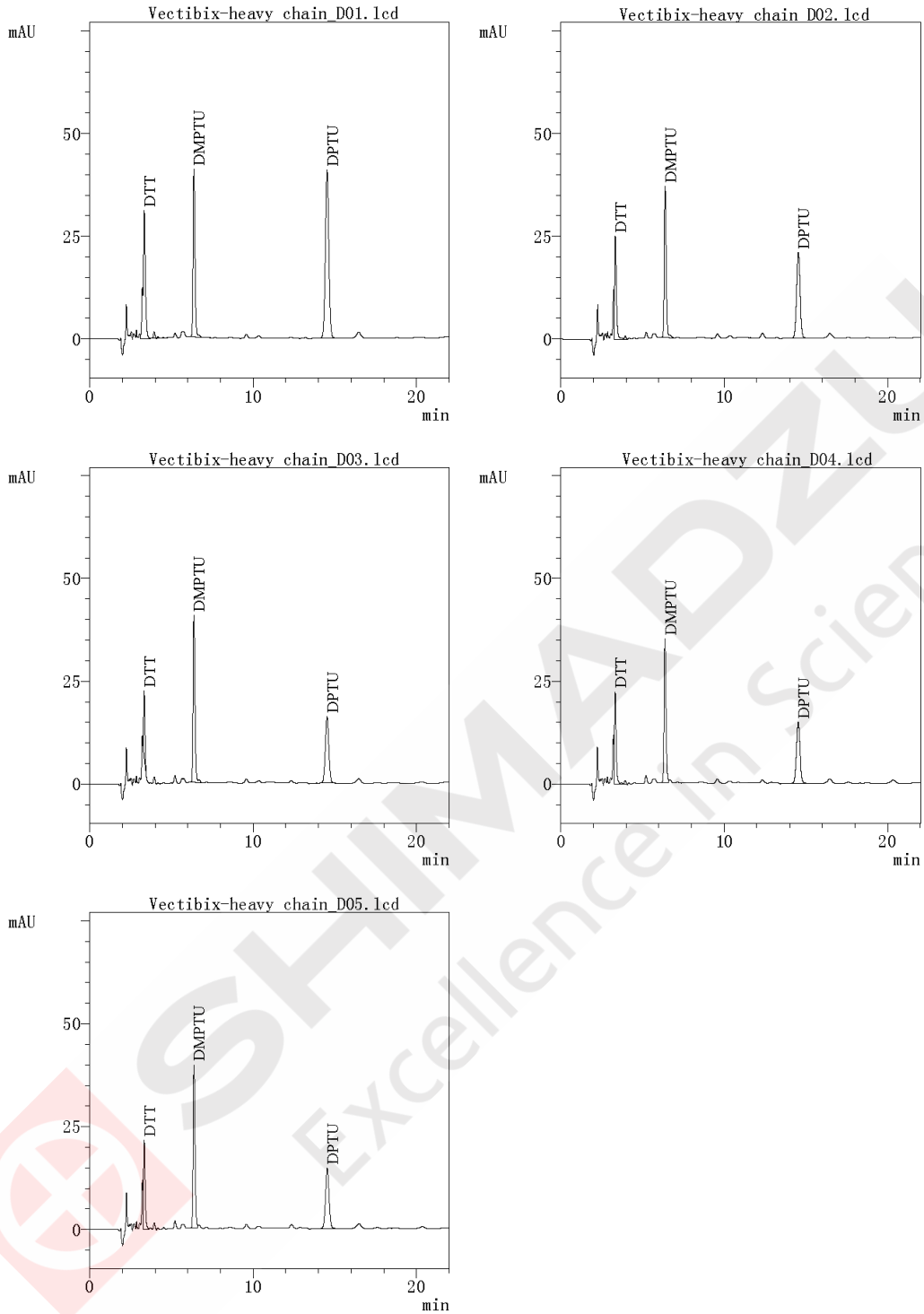


图3 未经切焦谷氨酸处理的帕尼单抗 *N*-末端氨基酸序列分析色谱图

2.3 样品切焦谷氨酸后 *N*-末端氨基酸序列分析色谱图

将样品应用焦谷氨酸氨肽酶进行去焦谷氨酸环化处理(见图4),测定重链 *N*-末端前15个氨基酸的序列,结果如图5所示。由图可知,样品重链 *N*-末端氨基酸序列为VQLQESGPGLVKPSE,与理论序列一致QVQLQESGPGLVKPSE(*N*-末端第一个氨基酸Q被焦谷氨酸氨肽酶切除)。

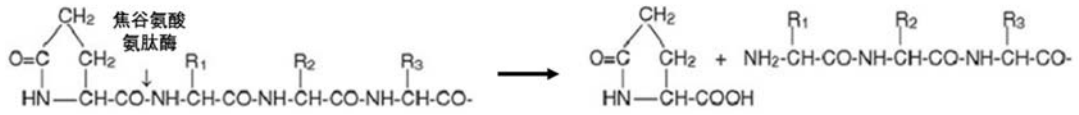
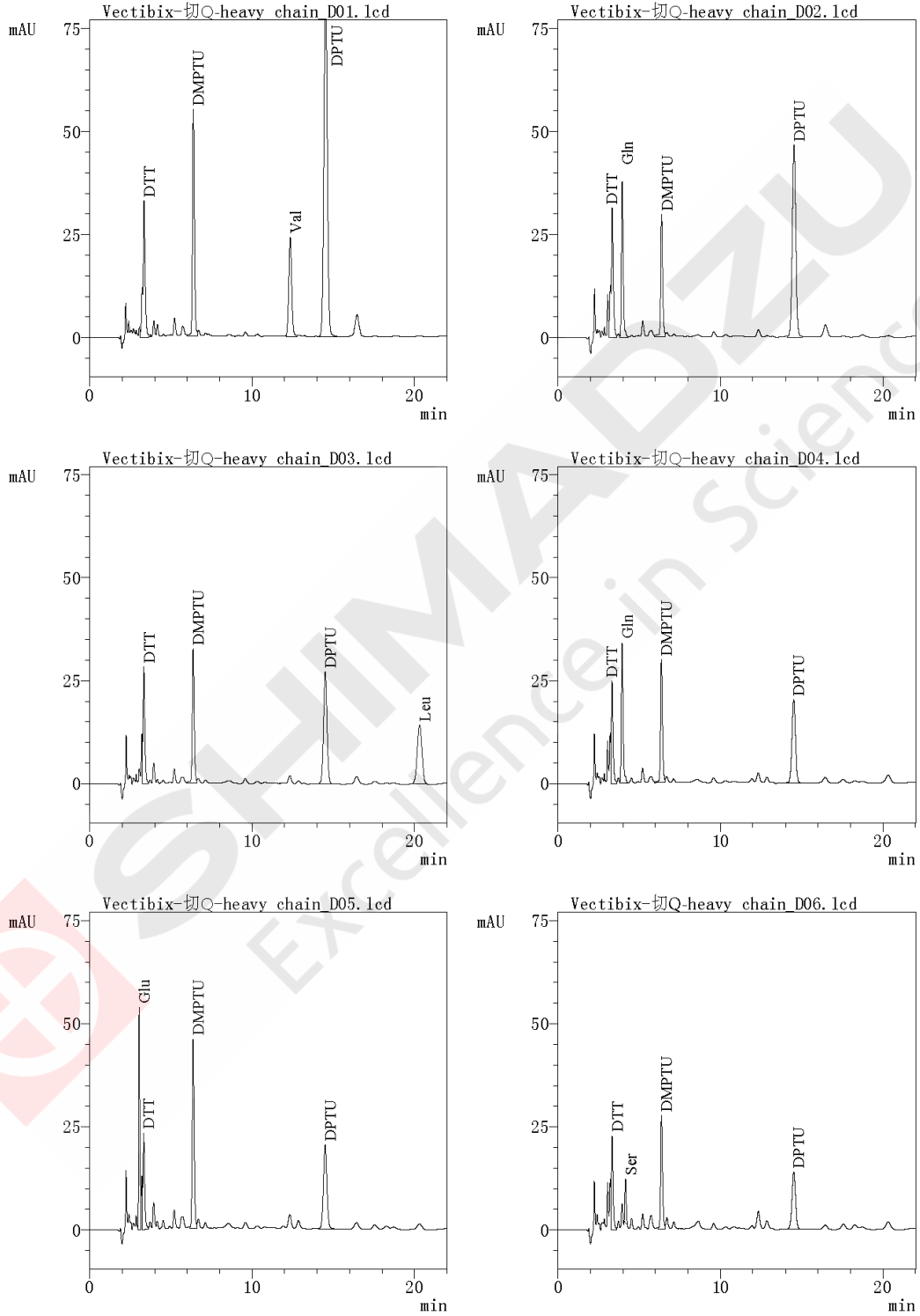
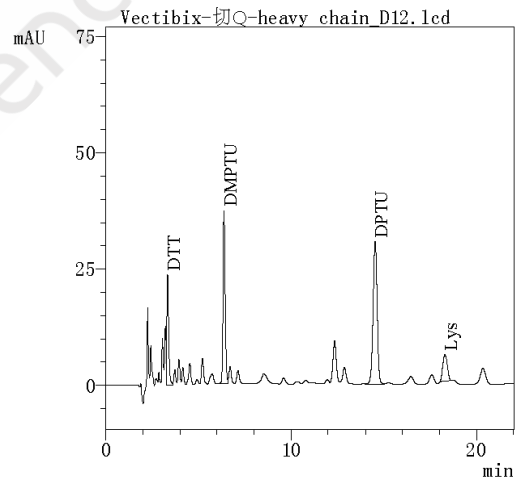
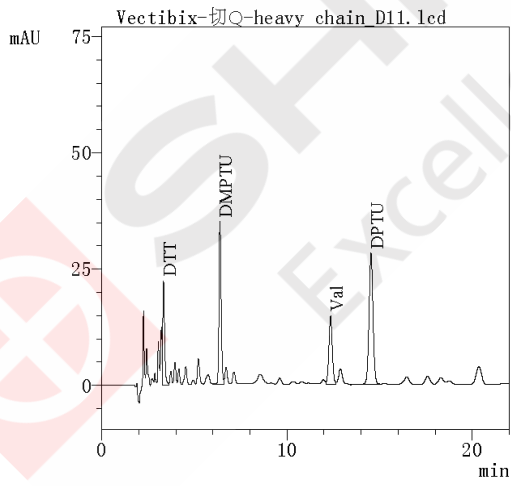
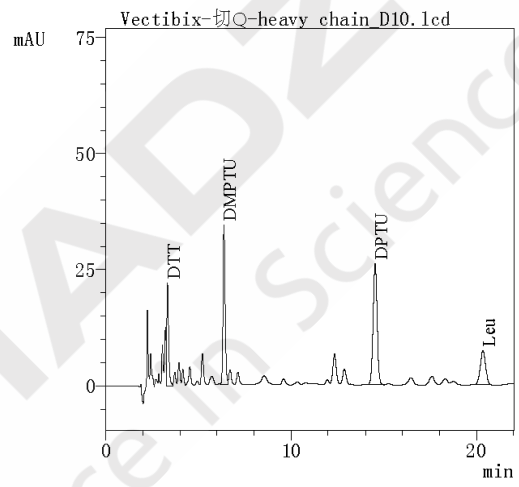
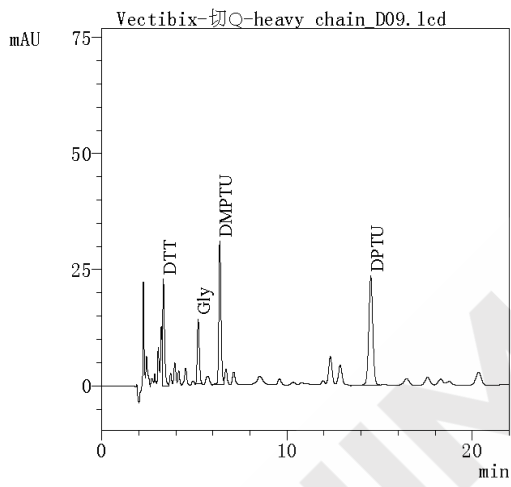
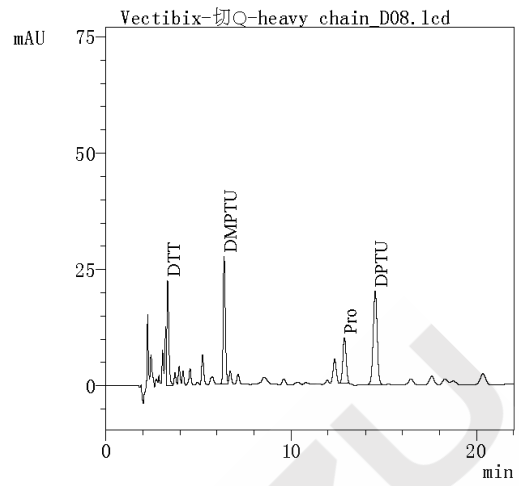
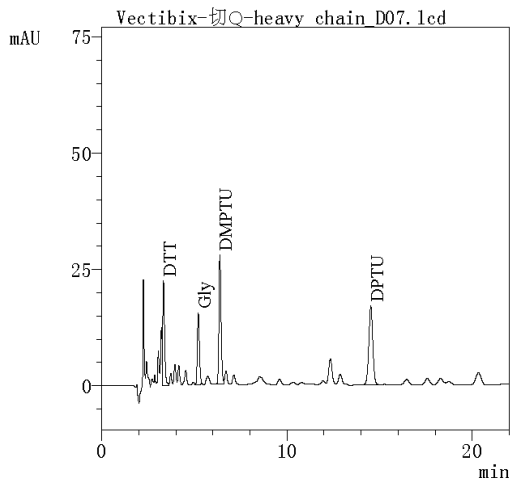


图4 焦谷氨酸氨肽酶切去焦谷氨酸





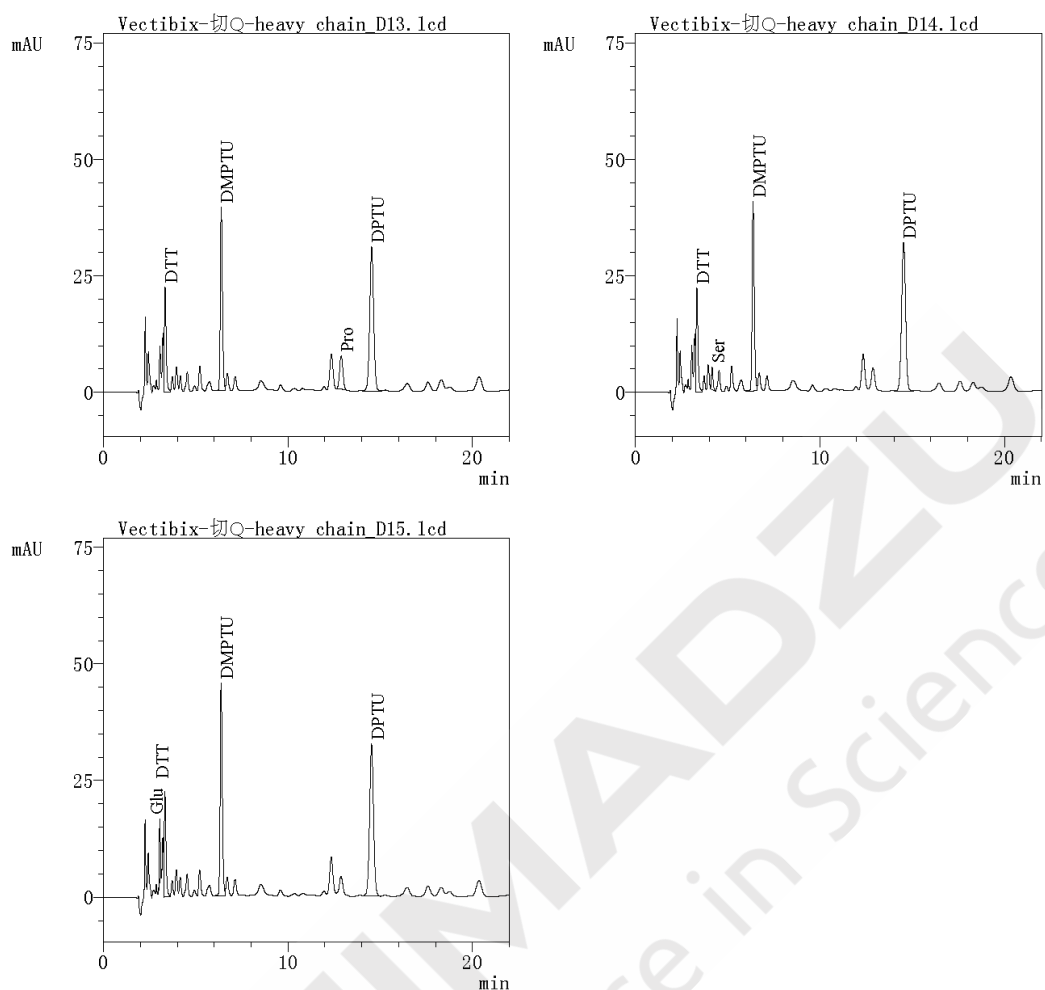


图5 帕尼单抗切焦谷氨酸后的 *N*-末端氨基酸序列分析色谱图

3. 结论

本文应用焦谷氨酸氨肽酶对 *N*-末端因焦谷氨酸环化而封闭的抗体药物帕尼单抗进行切焦谷氨酸后，使用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定 *N*-末端氨基酸序列，结果与理论信息一致，表明 PPSQ-53A 可以检测类似药物的 *N*-末端氨基酸序列，是生物技术药物研发和质控管理中强有力的分析工具。

应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 检测溶菌酶 Lysozyme 的 *N*-末端氨基酸序列

摘要: 溶菌酶 Lysozyme 是由 18 种 129 个肽链构成的氨基酸，其中第 6 个和第 127 个氨基酸的半胱氨酸易形成二硫键。为了测定 Lysozyme 的 *N*-末端氨基酸序列，应用 DTT (二硫苏糖醇) 和 4-乙烯吡啶将 Lysozyme 进行还原烷基化后，再使用蛋白质测序仪 PPSQ 测得了 *N*-末端前 7 个氨基酸序列，与理论结果一致。而使用 PPSQ 直接分析 Lysozyme，则检测不到组成二硫键的半胱氨酸的衍生物，表明二硫键还原烷基化的必要性。本例可为分析含有二硫键的蛋白质或多肽氨基酸序列样品时提供参考。

关键词: 蛋白质测序仪 PPSQ-53A 氨基酸序列 溶菌酶 Lysozyme

溶菌酶 Lysozyme 是一种专门作用于微生物细胞壁的水解酶，又称细胞壁溶解酶，具有抗菌消炎、抗病毒、增加免疫力等药理作用，具有生物相容性好、对组织无刺激、无毒性等特点。目前已经在医学领域、食品生产领域得到广泛应用。其主要作用包括: 1、用于畜禽及水生动物，由球菌、杆菌等细菌引起黄白痢、肠胃炎等疾病的治疗和预防，效果显著。2、抗病毒，对流感、高热和呼吸道疾病及水生动物中的病毒性疾病都有显著的防治效果。3、与抗生素类药物合并用药时具有增效功能，可适当减少抗生素的用量，以防止产生耐药菌。溶菌酶是由 18 种 129 个肽链构成的氨基酸，其中第 6 个和第 127 个氨基酸的半胱氨酸易形成二硫键。本文演示了使用 PPSQ-53A 测定含有二硫键的溶菌酶 *N*-末端氨基酸的序列的方法。当二硫键存在时，基于 Edman 降解法的氨基酸测序，需要先将二硫键进行还原烷基化，再进行序列分析，否则，由于 Edman 降解法不能将二硫键降解切下，检测不到形成二硫键的半胱氨酸的序列。

本文可作为具有二硫键的蛋白质和多肽进行 *N*-末端氨基酸序列分析进行参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

PPSQ-53A

1.2 试剂和样品

5% phenyl isothiocyanate n-heptane solution (Wako, Code: 161-27341); 12% trimethylamine solution (Wako, Code: 200-20021); 25% trifluoroacetic acid (Wako, Code: 204-20041); PTH-amino acids mobile phase (Wako, Code: 168-27351); Trifluoroacetic acid (Wako, Code: 207-20031); Glass fiber disks, TFA treated (Wako, Code: 072-06461); Wakopak Wakosil- II PTH- 4.6 × 250 mm (Wako, Code: 235-63951); PTH-amino acids mixture standard (Wako, Code: 165-27361); Ethyl acetate (Wako, Code: 052-09041); 1-chlorobutane (Wako, Code: 033-24371)

37% acetonitrile solution (Wako, Code: 018-26041); Polybrene (Sigma, Code: S2667)

样品: 溶菌酶 Lysozyme (Sigma, Code: L6876)

1.3 样品前处理

二硫键的还原烷基化：将溶菌酶 Lysozyme 配制成 100 pmol/ μ L，与 25 μ L 0.1 mol/L Tris-HCl Buffer 和 3 μ L 0.1 mol/L DTT（二硫苏糖醇）进行混合，56 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时后，再与 4% 4-乙烯吡啶，90% 乙腈，10% 0.1 mol/L Tris-HCl Buffer 3 μ L 混合，60 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时后，加水 14 μ L 配置成浓度为 10 pmol/ μ L。将 5 μ L 样品滴到 PVDF 膜上，装入 PPSQ 反应器中，安装好反应器。

为了与未进行二硫键还原烷基化的样品进行比较，实验中也分析了未经处理的溶菌酶样品。

2. 结果讨论

如图 1 和图 2 所示，使用 PPSQ 分析经 DTT 和 4-乙烯吡啶还原烷基化的 Lysozyme，得到 *N*-末端前 7 个氨基酸序列。由于 Lysozyme 在其第 6 个和第 127 个氨基酸的半胱氨酸形成二硫键，经还原烷基化后，其中第 6 个循环为乙烯基吡啶化的半胱氨酸的衍生物，标记为 PEC，出峰时间 9.296 min。根据分析结果，Lysozyme 得 *N*-末端前 7 个氨基酸序列为 Lys-Val-Phe-Gly-Arg-Cys-Glu，此序列与 Lysozyme 的氨基酸序列一致。

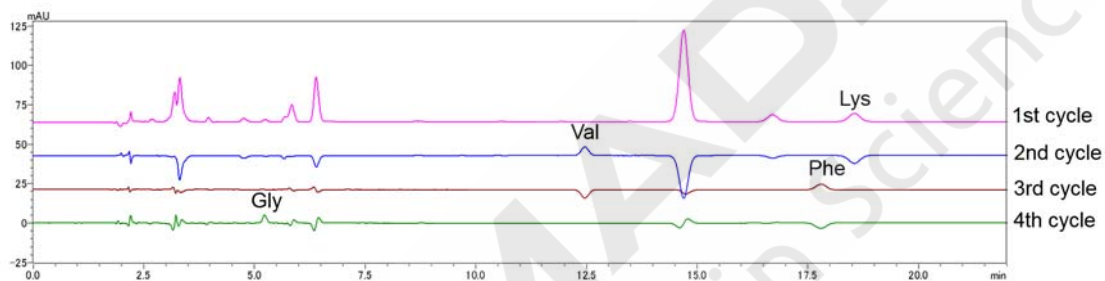


图 1 PPSQ-53A 分析经还原烷基化的 Lysozyme 的第 1 至第 4 个循环的氨基酸差减色谱图

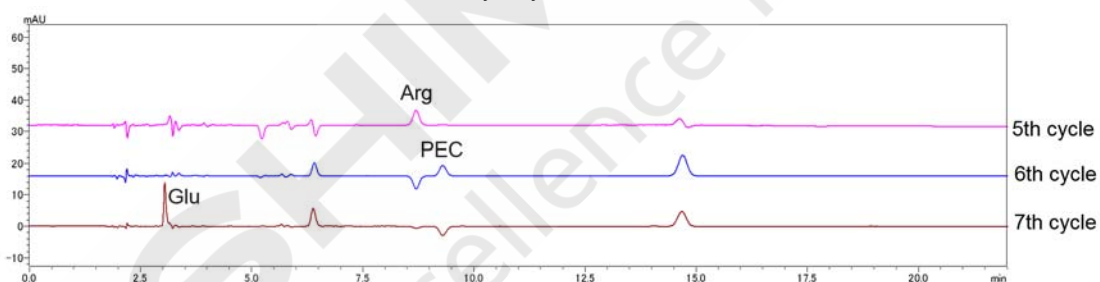


图 2 PPSQ-53A 分析经还原烷基化的 Lysozyme 的第 5 至第 7 个循环的氨基酸差减色谱图

图 3 和图 4 是 PPSQ 分析未经还原烷基化处理的 Lysozyme 的差减色谱图。其中第 1 到第 5 个循环及第 7 个循环得到的结果与还原烷基化的 Lysozyme 相同。但在第 6 个循环时未检测到相应氨基酸衍生物，这是由于 Lysozyme 第 6 个和第 127 个氨基酸的半胱氨酸形成二硫键，虽然 Edman 降解法能将第 6 和第 7 个氨基酸之间的肽键切断，但不能将二硫键切断，故萃取不出 ATZ-Cys（2-苯氨基噻唑啉酮-半胱氨酸）。因此，若分析带有二硫键的蛋白质或多肽，需先离线将二硫键进行还原烷基化后，再使用 PPSQ 进行氨基酸序列分析。另外，也可以使用 PPSQ 在线的还原烷基化程序，对此类样品进行分析。

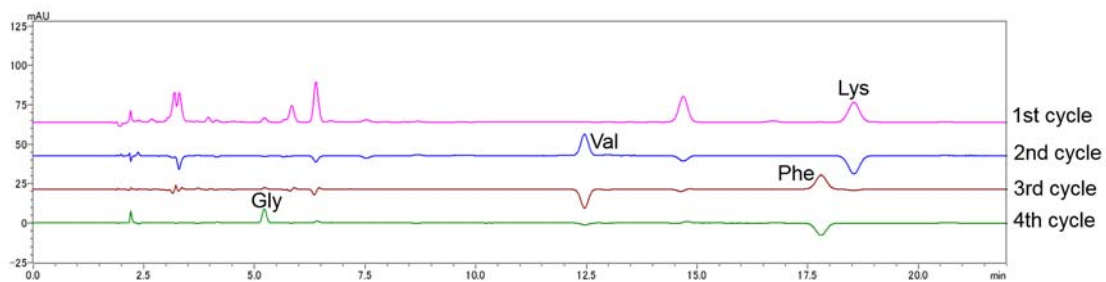


图 3 PPSQ-53A 分析未经还原烷基化的 Lysozyme 的第 1 至第 4 个循环的氨基酸差减色谱图

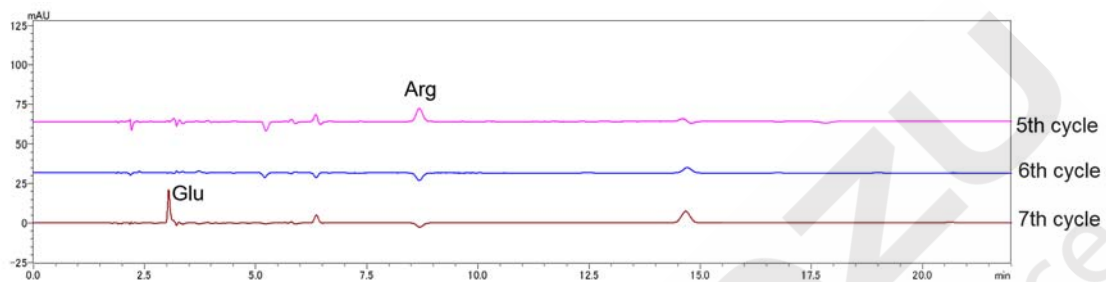


图 4 PPSQ-53A 分析未经还原烷基化的 Lysozyme 的第 5 至第 7 个循环的氨基酸差减色谱图

3. 结论

本文应用 PPSQ-53A 对含有二硫键的溶菌酶 Lysozyme 进行了 *N*-末端氨基酸序列分析。当分析含有二硫键的蛋白质或多肽样品的氨基酸序列时，本方法可作为参考。

应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 对催产素 Oxytocin 二硫键在线还原烷基化及 N-末端氨基酸序列分析

摘要: 为了简便快速地测定含有二硫键的多肽 N-末端氨基酸序列, 本文以催产素 Oxytocin 为例, 演示了使用 PPSQ-53A 进行二硫键在线还原烷基化和氨基酸序列分析的过程。实验结果显示成功测得了经二硫键在线还原烷基化得到的半胱氨酸的衍生物, 另外, 其氨基酸序列结果也与 Oxytocin 实际的氨基酸序列结果一致, 验证了此方法的准确性。

关键词: 蛋白质测序仪 PPSQ-53A 氨基酸序列 在线二硫键还原烷基化 催产素 Oxytocin

催产素 Oxytocin 是第一个人工全合成成功的具有生物活性的九肽激素, 具有刺激宫缩和促宫颈成熟的生理作用, 被广泛应用与催产、引产和防止产后出血。催产素由 9 个氨基酸组成, 其中两个半胱氨酸在 1,6 位组成一个二硫键, 分子量为 1007, 在血液循环中以自由肽的形式存在。对于存在二硫键的蛋白质或多肽, 进行氨基酸序列分析时, 需先进行二硫键烷基化反应。本文应用岛津蛋白质测序仪 PPSQ-53A 对 Oxytocin 进行二硫键在线还原烷基化后直接进行氨基酸序列测定, 无需进行离线的二硫键还原烷基化过程, 操作简便。

本文可作为具有二硫键的蛋白质和多肽进行 N-末端氨基酸序列分析进行参考。本文可作为具有二硫键的蛋白质和多肽进行 N-末端氨基酸序列分析进行参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

PPSQ-53A

1.2 试剂和样品

5% phenyl isothiocyanate n-heptane solution (Wako, Code: 161-27341); 12% trimethylamine solution (Wako, Code: 200-20021); 25% trifluoroacetic acid (Wako, Code: 204-20041); PTH-amino acids mobile phase (Wako, Code: 168-27351); Trifluoroacetic acid (Wako, Code: 207-20031); Glass fiber disks, TFA treated (Wako, Code: 072-06461); Wakopak Wakosil- II PTH- 4.6 × 250 mm (Wako, Code: 235-63951); PTH-amino acids mixture standard (Wako, Code: 165-27361); Ethyl acetate (Wako, Code: 052-09041); 1-chlorobutane (Wako, Code: 033-24371)

37% acetonitrile solution (Wako, Code: 018-26041); Polybrene (Sigma, Code: S2667);

样品: 催产素 Oxytocin (Sigma, Code: O3251)

1.3 试剂和样品准备方法

还原烷基化试剂组成为 0.16% 4-乙烯基吡啶、0.08% 三丁基膦、80%乙腈溶液。将样品 Oxytocin 配制浓度为 10 pmol/μL 的溶液, 加样品到经聚酰胺处理过的玻璃纤维膜上, 加入上述还原烷基化试剂 10 μL, 无需干燥, 执行 PPSQ-53A 中 PE 分析程序。

2. 结果讨论

如图 1 和图 2 为 Oxytocin 经二硫键在线烷基化和氨基酸序列分析的结果, 其中第 1 个和

第 6 个循环为乙烯基吡啶化的半胱氨酸的衍生物，标记为 PEC 所示，出峰时间为 9.335 min 和 9.340 min。根据分析结果，Oxytocin 的 *N*-末端前 8 个氨基酸序列为 Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu，此序列与 Oxytocin 的实际氨基酸序列符合。

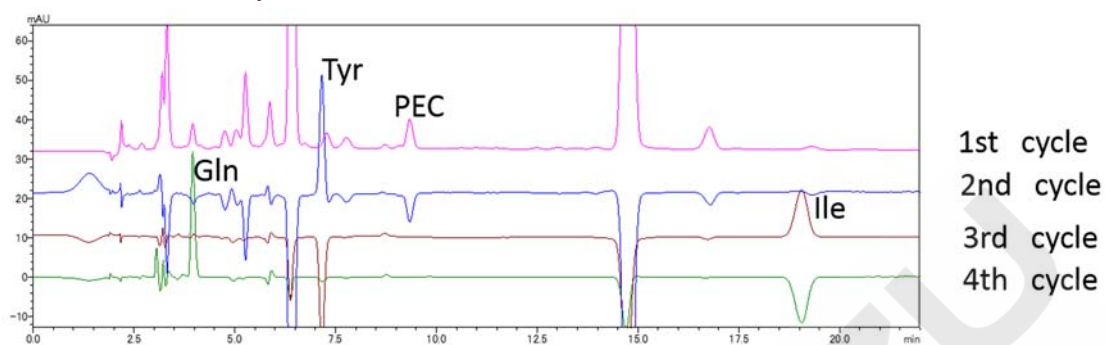


图 1 PPSQ-53A 分析 Oxytocin 的第 1 至第 4 个循环的氨基酸差减色谱图

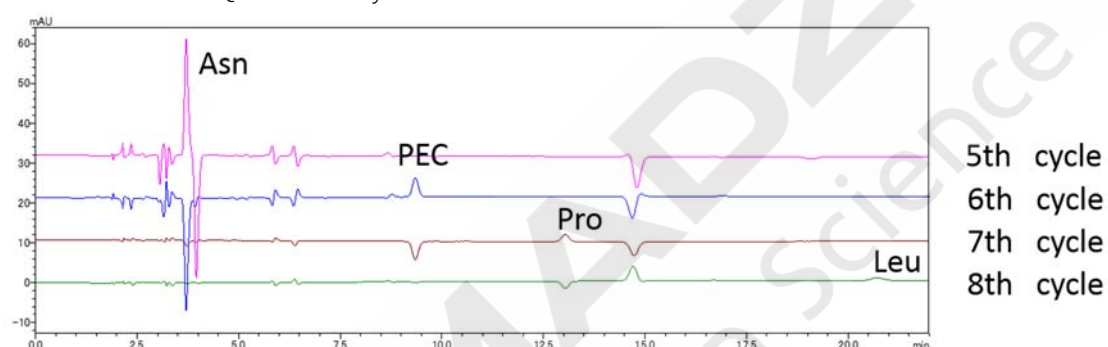


图 2 PPSQ-53A 分析 Oxytocin 的第 5 至第 8 个循环的氨基酸差减色谱图

3. 结论

本文应用 PPSQ-53A 对催产素 Oxytocin 进行二硫键在线还原烷基化，测定 *N*-末端氨基酸序列，测得的氨基酸序列结果与 Oxytocin 实际氨基酸序列结果一致，验证了此方法的准确性，应用此方法可简便地进行含有二硫键的生物药 *N*-末端氨基酸序列分析。

4.高含量盐的脱盐处理

应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定蛋白质药物注射用重组人促红素原液的 N-末端氨基酸序列

摘要：蛋白质药物注射用重组人促红素原液（CHO 细胞）含有高浓度盐分及蛋白质稳定剂，不能直接用于 N-末端氨基酸序列分析。本文利用自制脱盐装置对样品进行脱盐处理后应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定 N-末端前 15 个氨基酸的序列，结果与理论序列一致，验证了此方法的准确性，表明本方法可以实现对含高浓度盐分的蛋白质类药物的 N-末端氨基酸序列分析。

关键词：蛋白质测序仪 PPSQ-53A 氨基酸序列 蛋白质药物 重组人促红素

与传统小分子药物相比，蛋白质类药物因其高活性、高特异性、低毒性，生物功能明确，有利于临床应用，是目前药物研发的热点。重组人促红素（rh-EPO），是最早应用于临床的基因工程药物之一，用于肾功能不全所致贫血，包括慢性肾功能衰竭行血液透析、腹膜透析治疗及非透析病人。作为直接注射给药的蛋白质药物，药品的 N-末端氨基酸组成是其质量均一性的质控依据，对药品质量及安全性的判定尤为重要，是原研药及仿制药申报以及批次质控的必要数据。Edman 降解法是目前直接进行 N-末端氨基酸序列分析的主要方法，应用岛津公司的蛋白质测序仪 PPSQ-51A/53A，可以自动化实现 Edman 降解反应，进行蛋白质和多肽 N-末端的氨基酸序列测定。本文演示了应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定注射用重组人促红素原液（CHO 细胞）的 N-末端氨基酸序列的方法及结果。该方法操作简单、检测灵敏可靠，可作为生物技术药物 N-末端氨基酸序列分析的应用参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

PPSQ-53A

1.2 试剂和样品

5% phenyl isothiocyanate n-heptane solution (Wako, Code: 161-27341); 12% trimethylamine solution (Wako, Code: 200-20021); 25% trifluoroacetic acid (Wako, Code: 204-20041); PTH-amino acids mobile phase (Wako, Code: 168-27351); Trifluoroacetic acid (Wako, Code: 207-20031); Glass fiber disks, TFA treated (Wako, Code: 072-06461); Wakopak Wakosil- II PTH- 4.6 × 250 mm (Wako, Code: 235-63951); PTH-amino acids mixture standard (Wako, Code: 165-27361); Ethyl acetate (Wako, Code: 052-09041); 1-chlorobutane (Wako, Code: 033-24371)

37% acetonitrile solution (Wako, Code: 018-26041); PVDF 膜（聚偏氟乙烯膜）（碧云天，Code: FFP32）样品：注射用重组人促红素原液（CHO 细胞）

1.3 样品前处理

剪切适当大小的 PVDF 膜，放入 13 mm 可换膜针式过滤头内，过滤头 PVDF 膜面朝上，置于 1.5 mL 离心管中，与 20 mL 规格（其他规格亦可）的注射器一起构成自制脱盐装置（图 1）。应用移液枪在过滤头内加入 100 μ L 的甲醇，通过注射器施压使甲醇通过 PVDF 膜，重复一次，对 PVDF 膜进行活化；取适量样品加水稀释至 100 μ L，加入过滤头内，注射器施压，液体流出，蛋白质则结合在 PVDF 膜上；加入 100 μ L 的 0.1% TFA 溶液，注射器施压，PVDF 膜上残留的盐分随溶液一起排出，重复 3 次。将过滤头拆开展取出 PVDF 膜，自然晾干后剪除边缘部分，剪切一半大小的 PVDF 膜，安装到反应器上进行分析，测试样品 *N*-末端前 15 个氨基酸的序列。

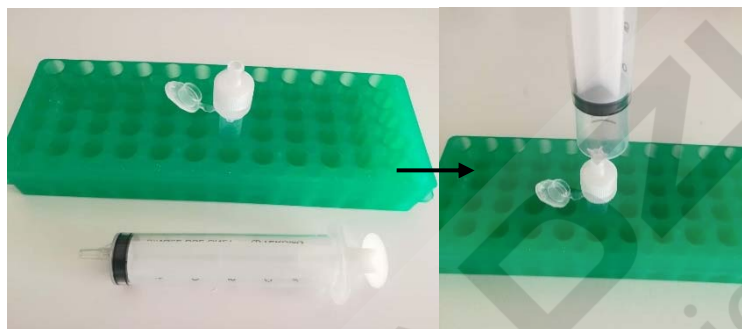


图 1 自制蛋白质脱盐装置

1.4 PPSQ 分析条件

PVDF 分析模式，循环数设置为 16（第一个循环不参与反应）。

2. 结果讨论

2.1 PTH-氨基酸混合标准品测试色谱图

为对 19 种 PTH-氨基酸进行校准，先测试 19 种 PTH 氨基酸的混合标准品，校准测试混合标准品图谱见图 2。

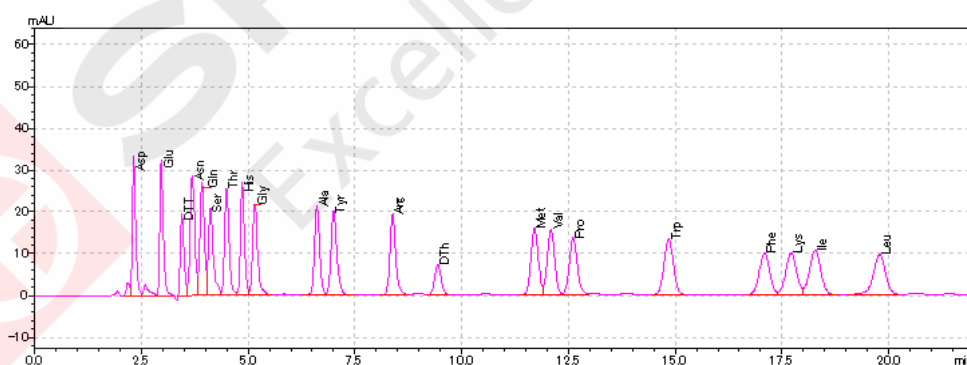


图 2 PTH-氨基酸混合标准品校准测试图谱

2.2 重组人促红素 *N*-末端氨基酸序列分析色谱图

重组人促红素的分子骨架为 165 个氨基酸组成的肽链，第 7 位与第 161 位、第 29 位与第 33 位半胱氨酸之间形成两对二硫键。《欧洲药典》9.0 版中规定应用 Edman 降解法对重组人促红素进行 *N*-末端序列分析，前 15 个氨基酸的序列应为：Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-(no recovered peak)-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr。本例中图 3 和图 4 分别是重组人促红素 *N*-末端氨基酸分析的原始色谱图和差减色谱图，如图所示，*N*-末端第一个循环是 Ala，第二个循

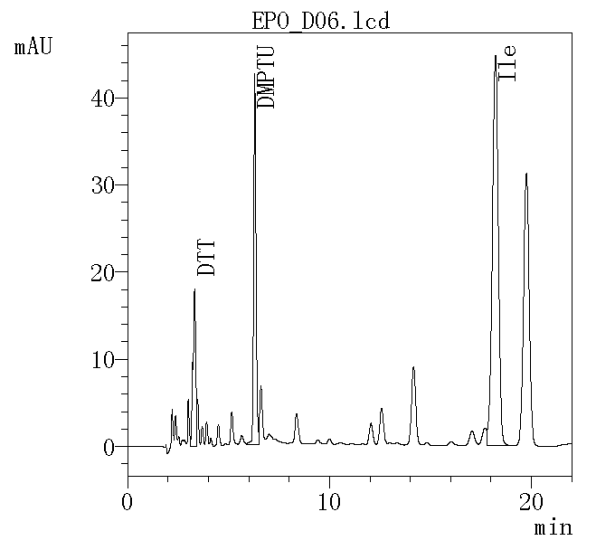
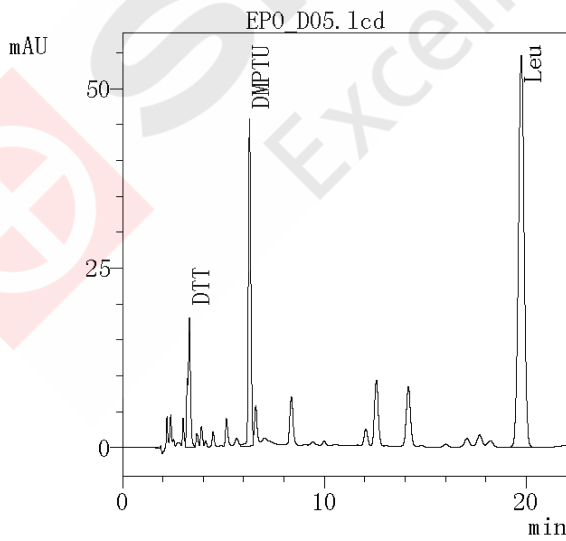
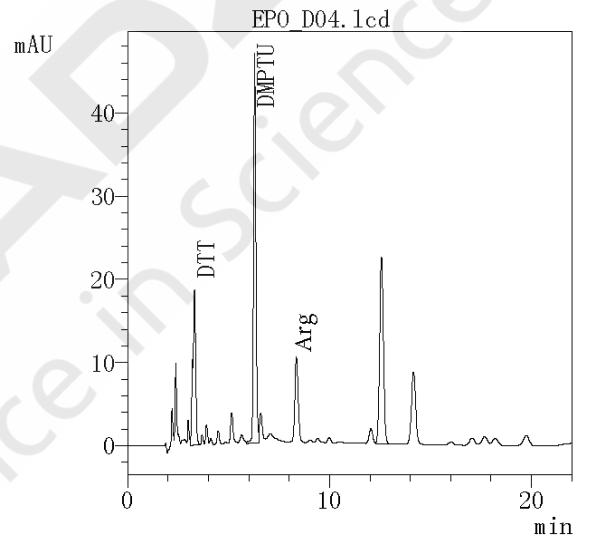
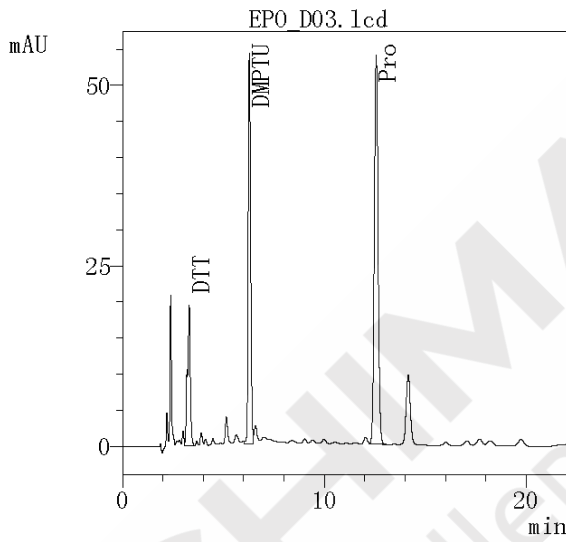
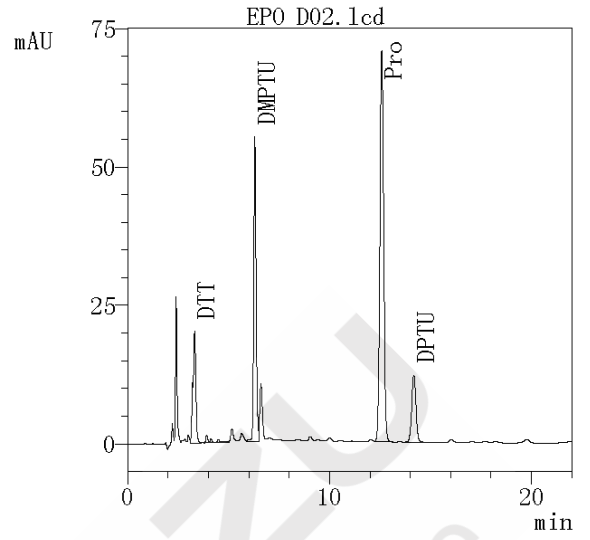
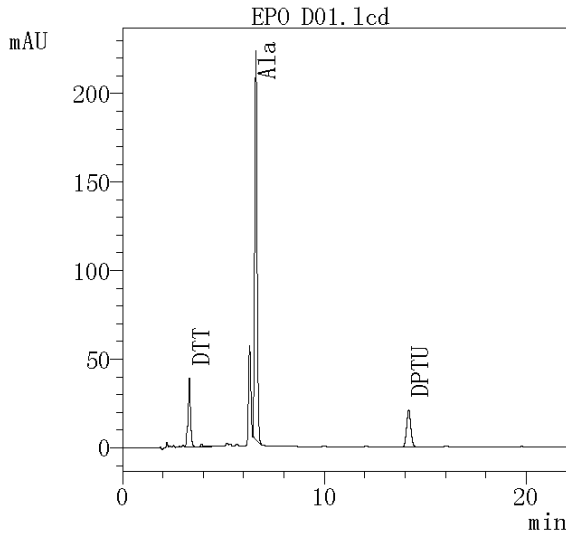
环是 Pro, 以此类推, 前 15 个循环氨基酸按顺序依次是 Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-(no peak)-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr, 与《欧洲药典》一致。

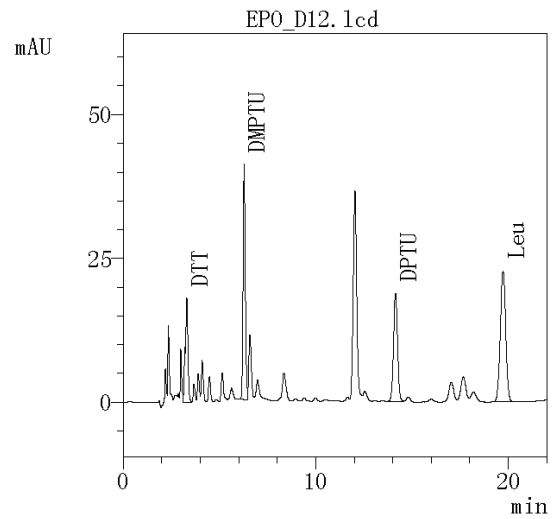
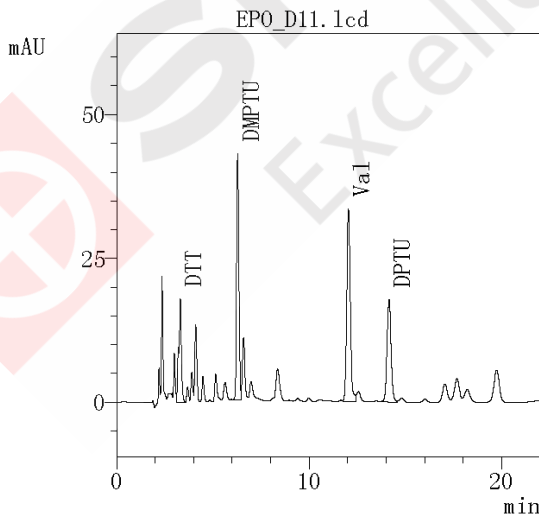
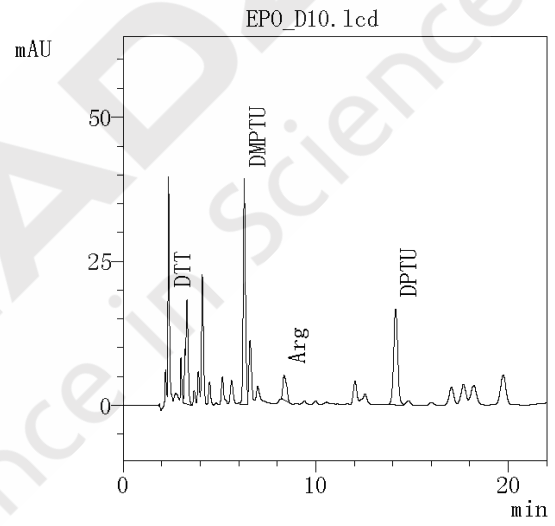
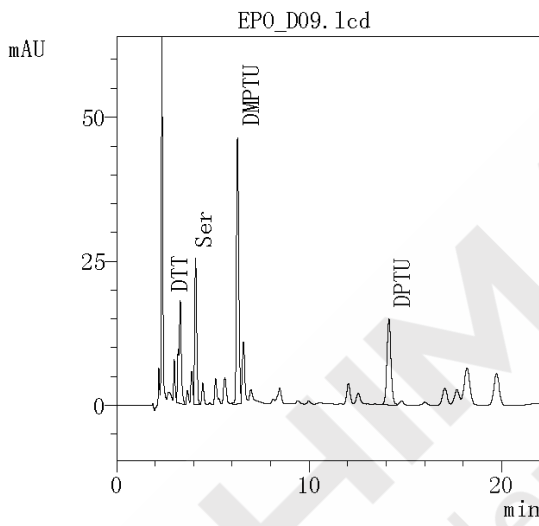
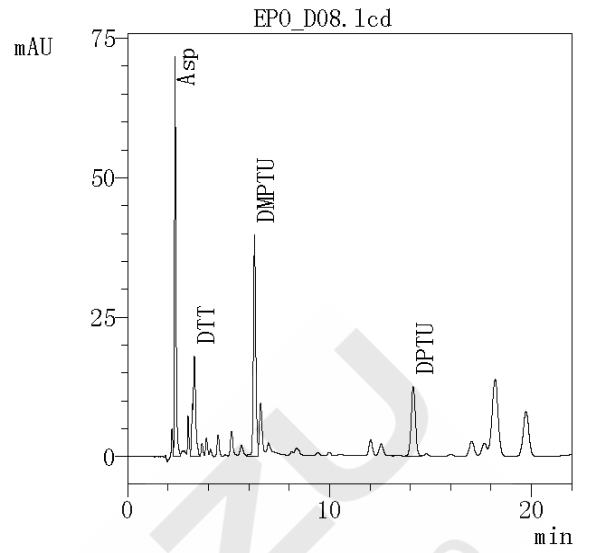
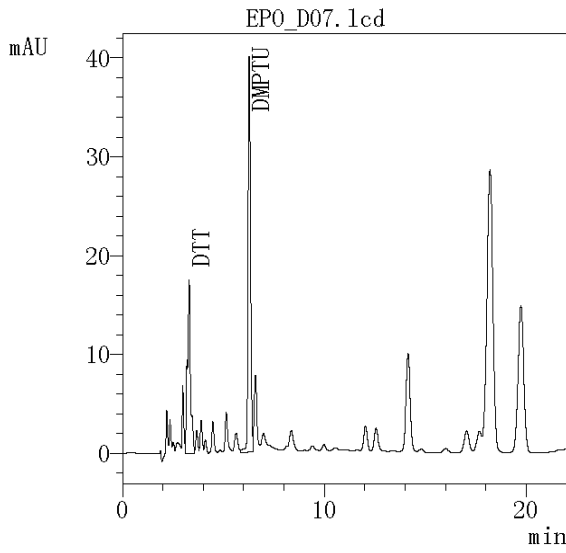
重组人促红素第 7 位为 Cys, 因二硫键的存在, 在未经还原处理的情况下第七个循环不出峰。如果样品在分析前加入还原烷基化试剂 (0.16% 4-乙烯基吡啶、0.08% 三丁基膦、80% 乙醇溶液) 通过 PPSQ-53A 的二硫键在线还原功能进行处理, 二硫键连接的 Cys 经原位吡啶乙基化后会在第七个循环出现 Cys 的衍生峰 PEC (PTH-吡啶乙基半胱氨酸), 研究者可以根据需要决定是否在分析前进行二硫键的还原烷基化处理。

另外, 注射用重组人促红素原液含有一定量的盐分及蛋白质稳定剂, 可能会损害仪器干扰分析, 上样前需要进行脱盐处理。传统的脱盐方法是在超滤管上通过离心进行溶液置换, 或使用预制的脱盐柱进行脱盐, 但这两种方法前者费时费力, 后者成本较高。本文利用自制的可重复使用的脱盐装置进行脱盐, 操作简便, 省时省力, 最大程度地降低了脱盐成本, 可作为蛋白质脱盐的参考。



SHIMADZU
Excellence in Science





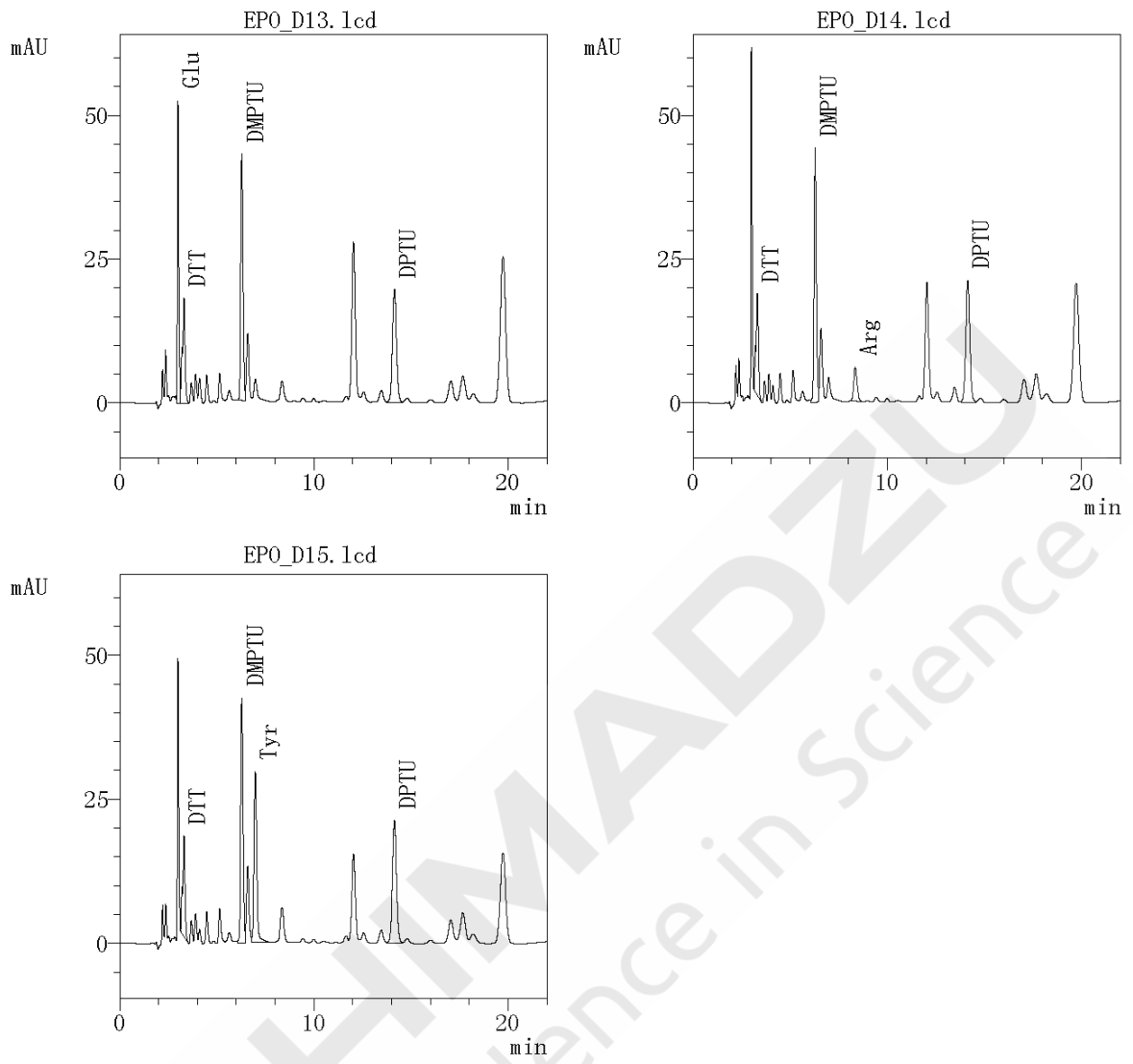
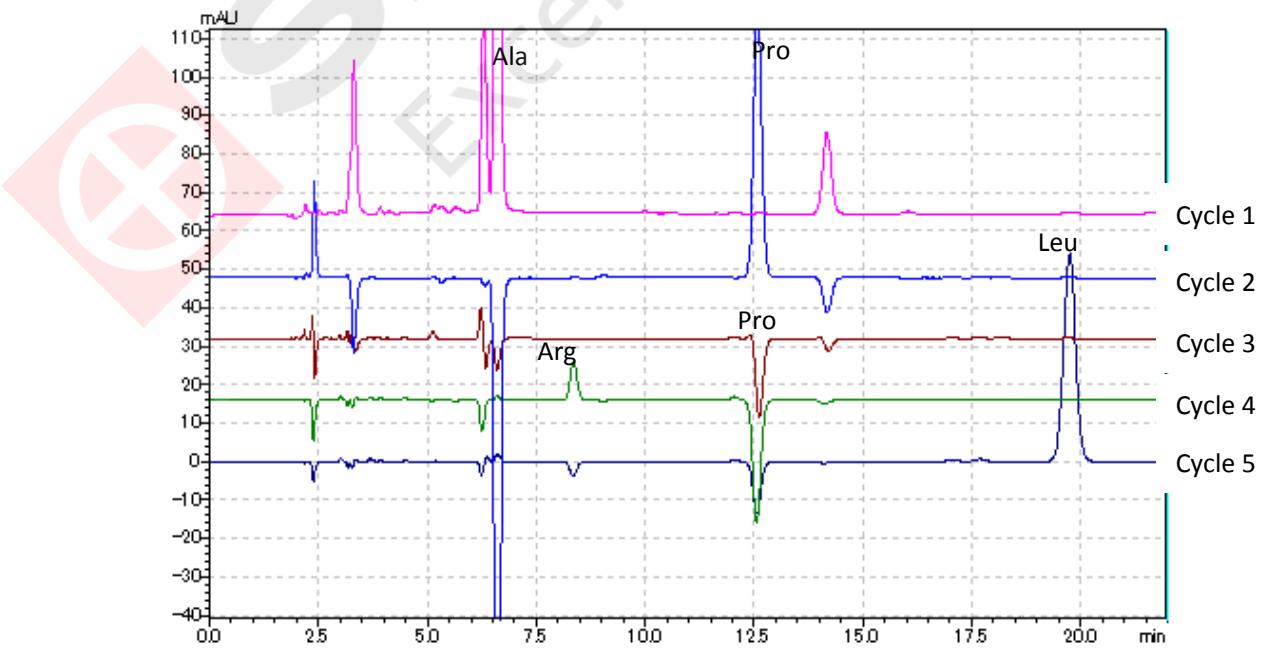


图3 重组人促红素 N-末端氨基酸序列分析色谱图



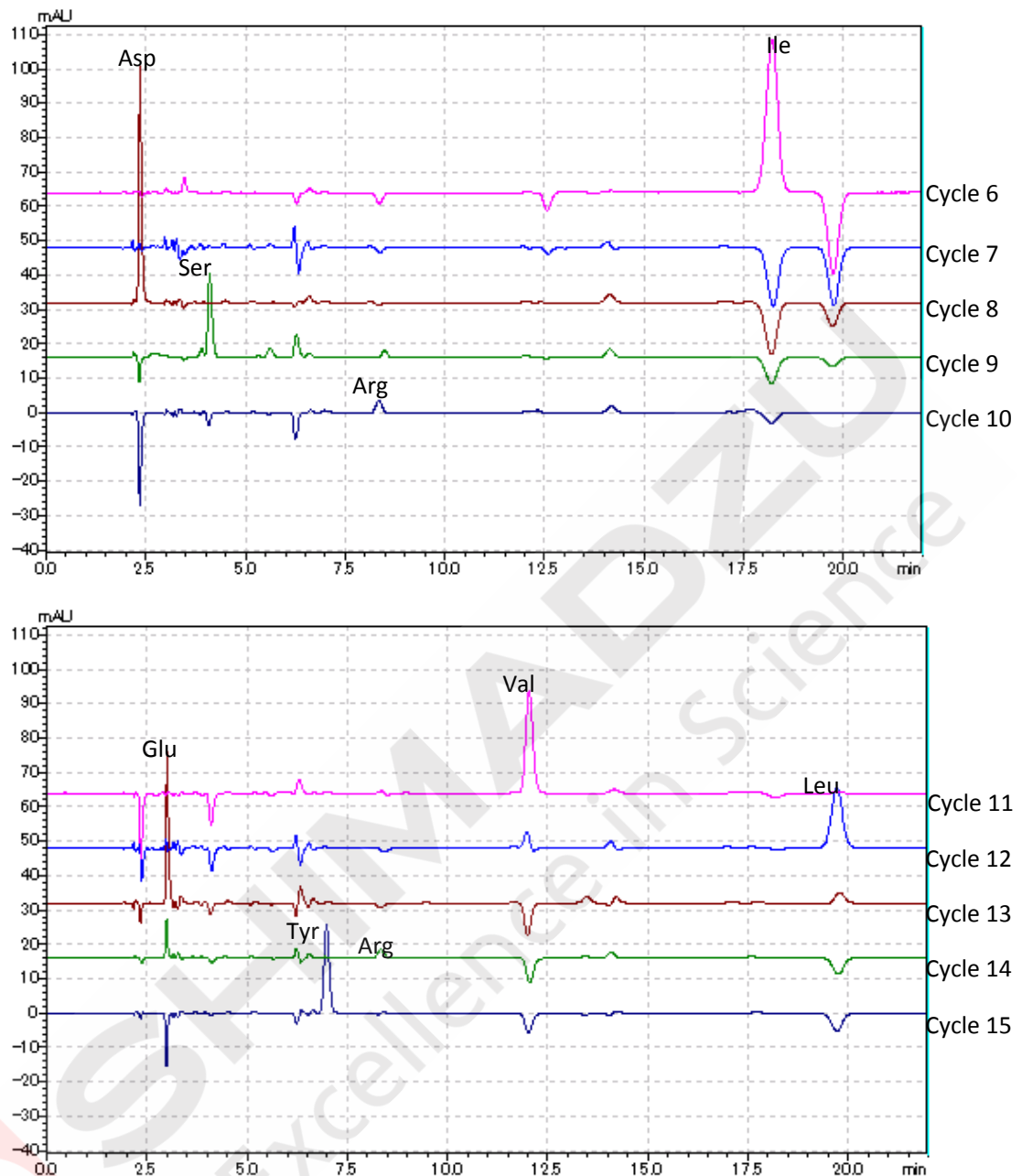


图 4 重组人促红素 N-末端氨基酸序列分析差减色谱图

3. 结论

本文通过自制脱盐装置对蛋白质药物注射用重组人促红素原液 (CHO 细胞) 进行脱盐处理, 应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 进行重组人促红素的 N-末端氨基酸序列分析, 避免了盐分干扰和对仪器的损害, 成功测定了样品 N-末端前 15 个氨基酸的序列, 结果与理论一致, 表明使用 PPSQ 可以检测蛋白质的 N-末端序列, 是生物技术药物研发和质控管理中具有重要作用的分析手段。

应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定重组人粒细胞刺激因子的 N-末端氨基酸序列

摘要：本文对基因工程药物重组人粒细胞刺激因子原液除盐后，应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定 N-末端前 16 个氨基酸的序列，结果与理论序列一致，验证了此方法的准确性，展示了重组人粒细胞刺激因子的分析结果。

关键词：蛋白质测序仪；PPSQ-53A；N-末端氨基酸序列；重组人粒细胞刺激因子

重组人粒细胞刺激因子注射液（rhG-CSF）是上世纪 90 年代研制成功的重要造血因子之一，临床用于预防和治疗肿瘤放疗或化疗后引起的中性粒细胞减少症、促进中性粒细胞数量的增加，被医药界公认为目前基因工程药物中最具有使用价值的三个药品之一，市场应用前景广阔，目前国内有多家企业生产。作为直接注射给药的蛋白质类药物，药物的 N-末端氨基酸序列测定是药品质控的重要依据。重组人粒细胞刺激因子注射液原液含有蛋白质稳定剂和一定量盐分，直接上样可能会损害仪器、干扰分析，不能直接进行 N-末端测序。本文利用自制蛋白质脱盐装置对样品进行脱盐处理后，应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定 N-末端前 16 个氨基酸的序列，结果与理论序列一致。该方法操作简单、检测灵敏可靠，可作为生物药物 N-末端氨基酸序列分析的应用参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

蛋白质测序仪 PPSQ-53A

1.2 试剂和样品

5% phenyl isothiocyanate n-heptane solution (Wako, Code: 161-27341)

12% trimethylamine solution (Wako, Code: 200-20021)

25% trifluoroacetic acid (Wako, Code: 204-20041)

PTH-amino acids mobile phase (Wako, Code: 168-27351)

Trifluoroacetic acid (Wako, Code: 207-20031)

Wakopak Wakosil- II PTH- 4.6 × 250 mm (Wako, Code: 235-63951)

PTH-amino acids mixture standard (Wako, Code: 165-27361)

Ethyl acetate (Wako, Code: 052-09041)

1-chlorobutane (Wako, Code: 033-24371)

37% acetonitrile solution (Wako, Code: 018-26041)

PVDF 膜（聚偏氟乙烯膜）（碧云天，Code: FFP32）

样品：重组人粒细胞刺激因子原液

1.3 样品前处理

将样品稀释后加入装有经甲醇活化的 PVDF 膜的过滤头内，加入 0.1% TFA 清洗三次除盐。

将过滤头拆开展取出 PVDF 膜，自然晾干后剪除边缘部分，剪切一半大小的 PVDF 膜，安装到反应器上进行分析，测试样品 *N*-末端前 16 个氨基酸的序列。

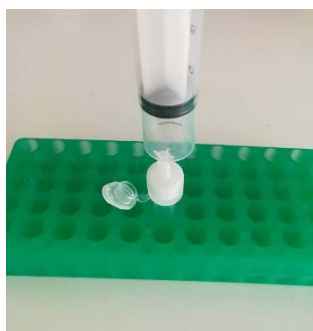


图 1 自制蛋白质脱盐装置

1.4 PPSQ 分析条件

PVDF 分析模式，循环数设置为 17（第一个循环不参与反应）。

2. 结果讨论

2.1 PTH-氨基酸混合标准品测试色谱图

测试 19 种 PTH 氨基酸的混合标准品进行校准，校准测试混合标准品图谱见图 2。

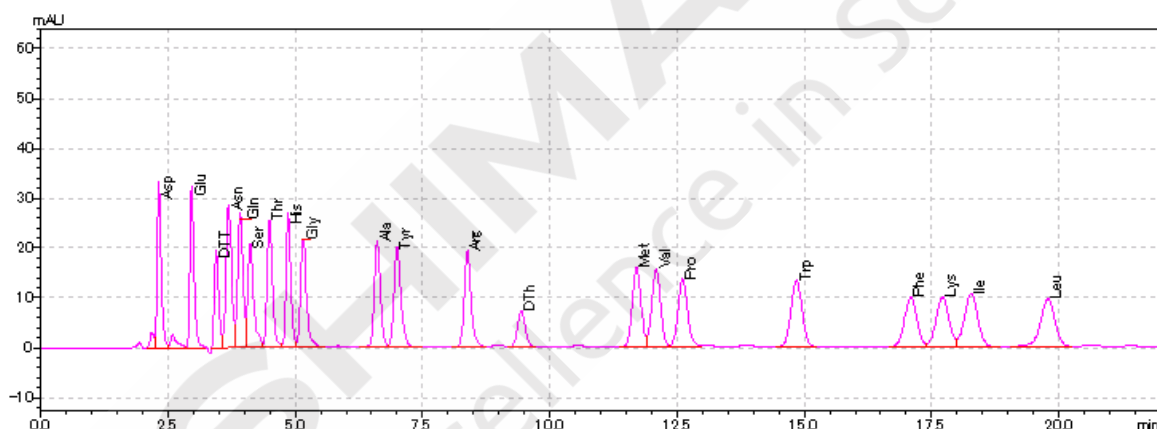
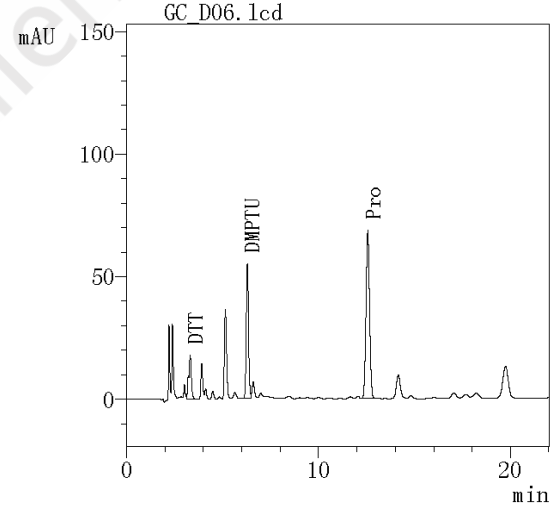
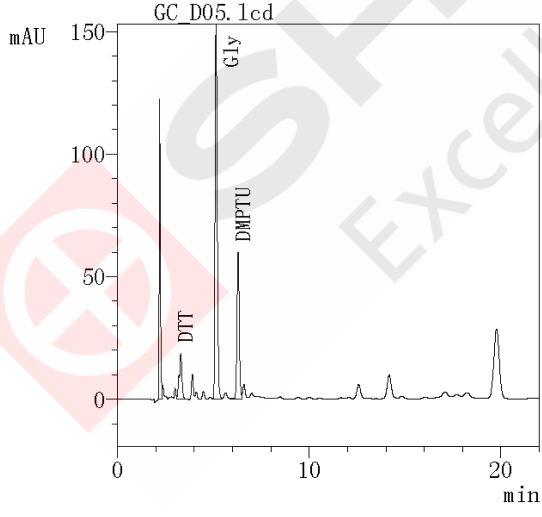
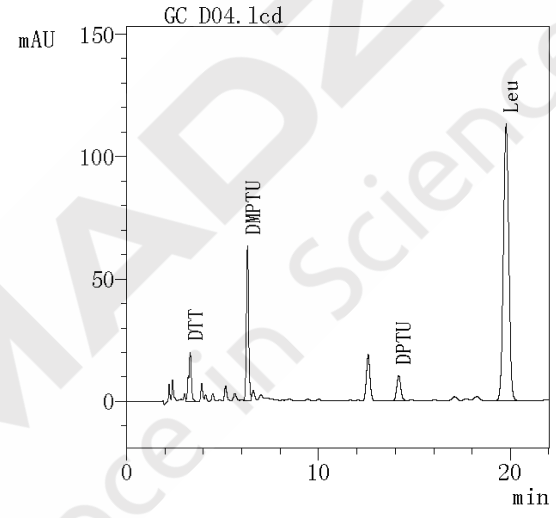
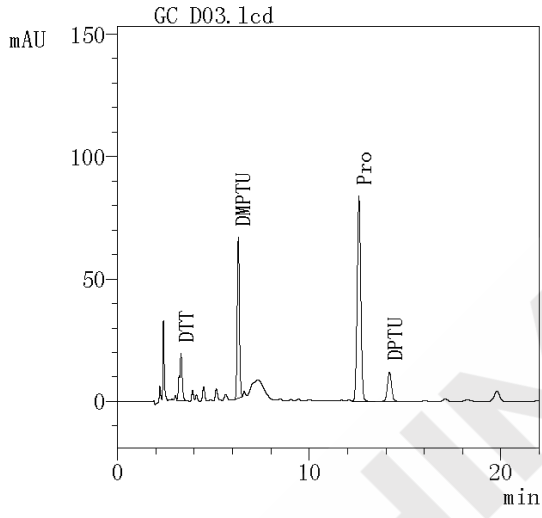
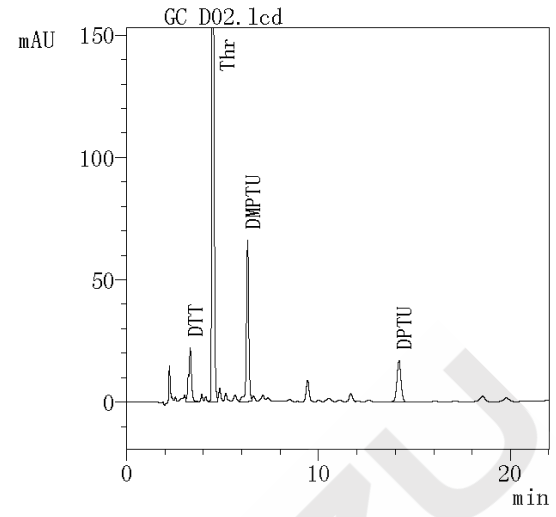
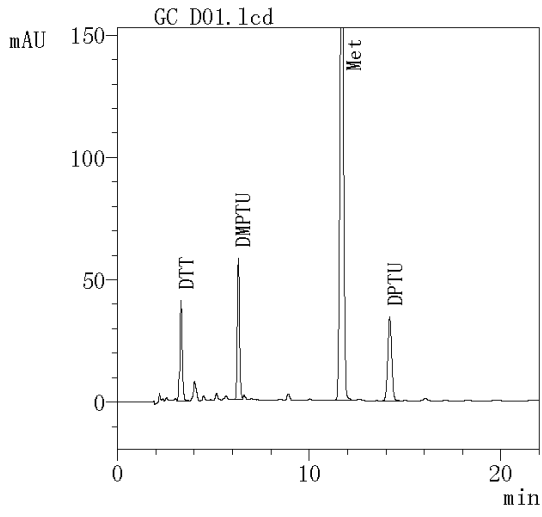
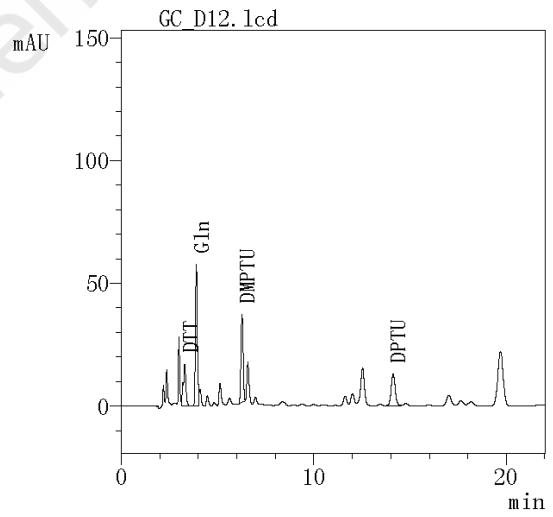
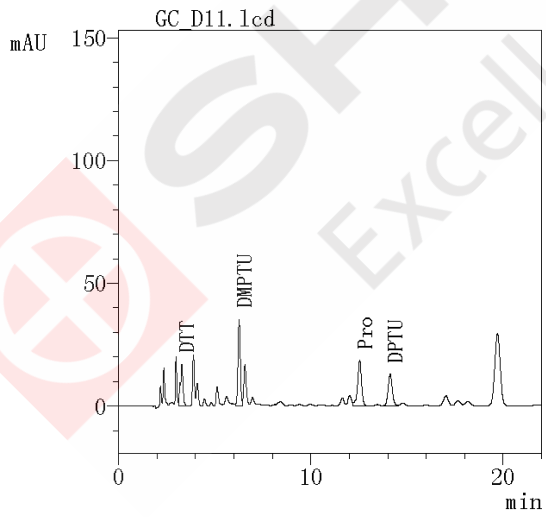
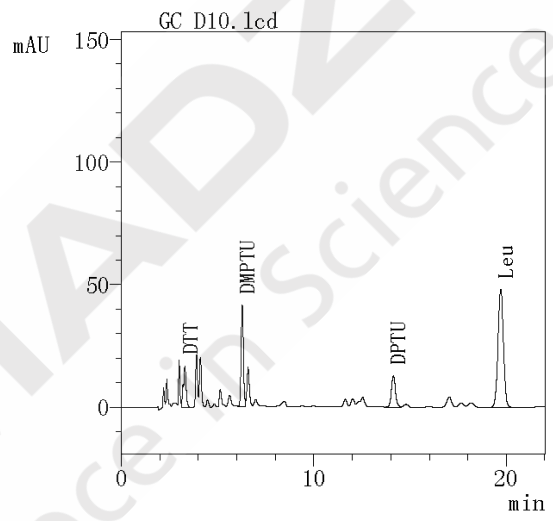
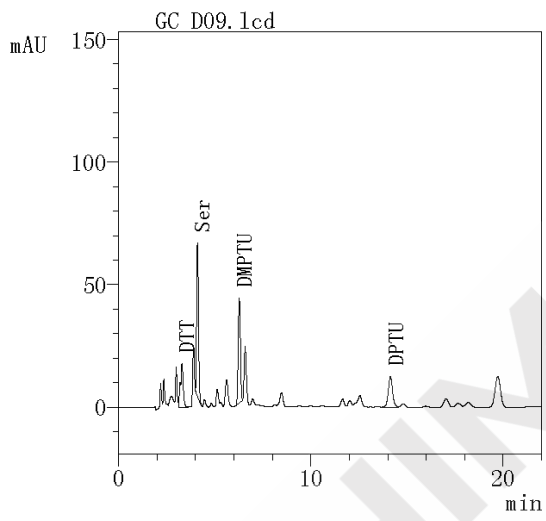
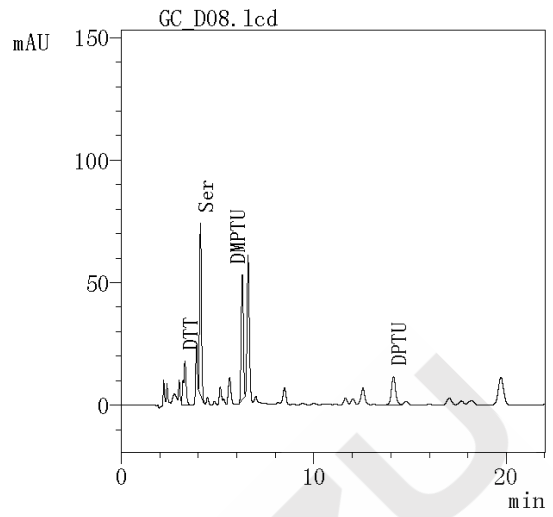
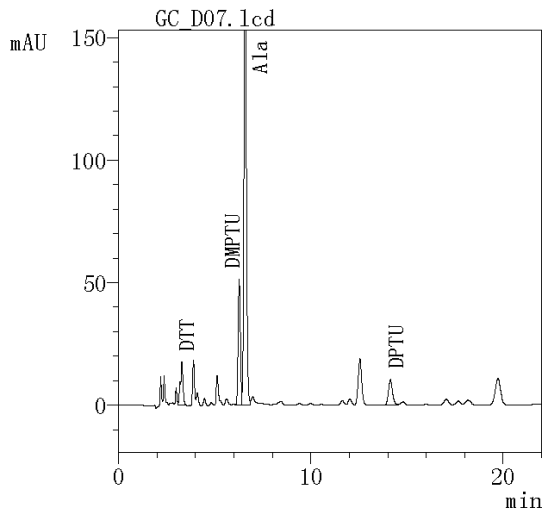


图 2 PTH-氨基酸混合标准品校准测试图谱

2.2 重组人粒细胞刺激因子 *N*-末端氨基酸序列分析色谱图

重组人粒细胞刺激因子的 *N*-末端测序结果见图 3。如图所示，*N*-末端第一个循环是 Met，第二个循环是 Thr，以此类推，前 16 个循环氨基酸按顺序依次是 Met-Thr-Pro-Leu-Gly-Pro-Ala-Ser-Ser-Leu-Pro-Gln-Ser-Phe-Leu-Leu，与理论序列一致。PPSQ-53A 配备 SPD-M30A 检测器，检测灵敏度高，分析稳定可靠。





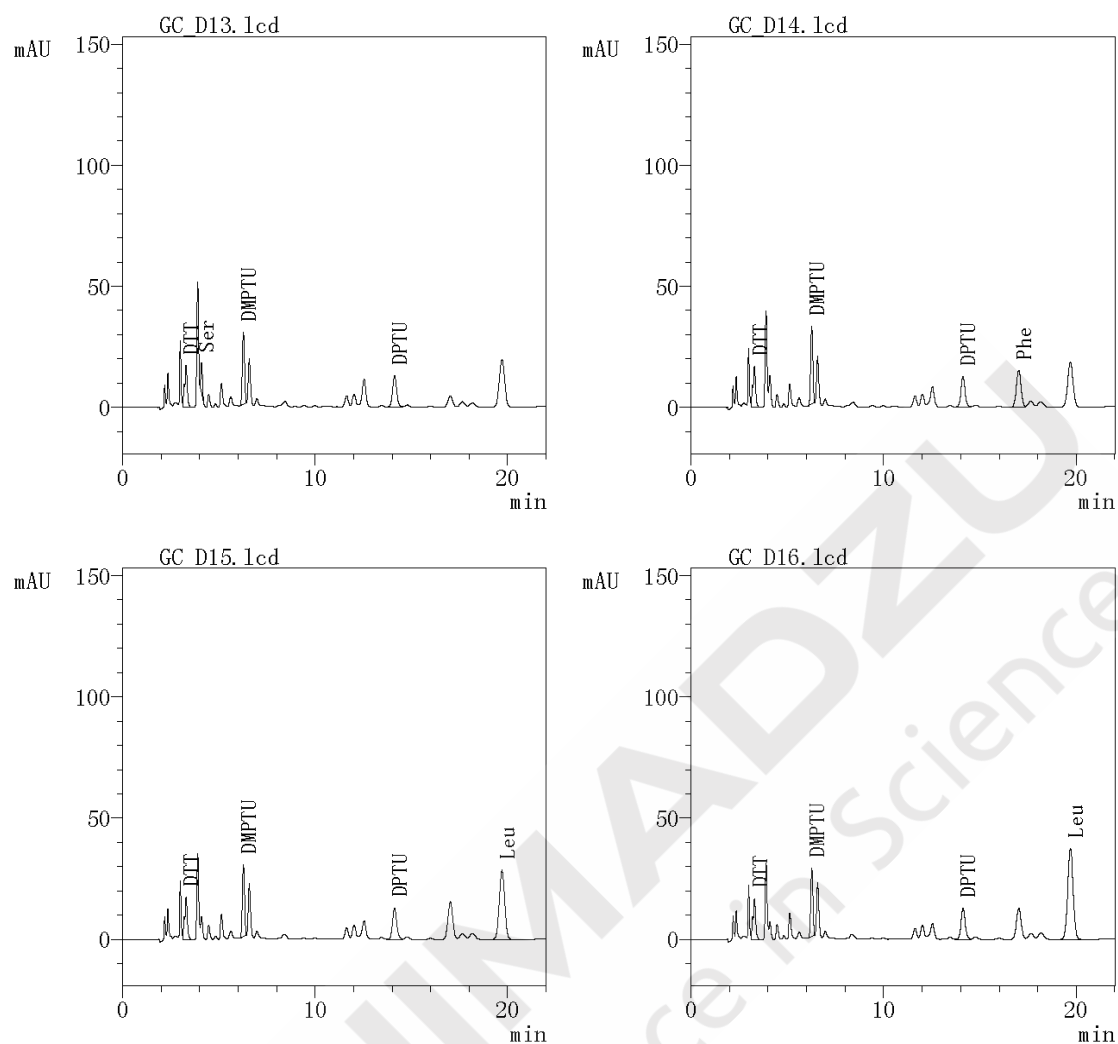


图3 重组人粒细胞刺激因子的 *N*-末端氨基酸序列分析色谱图
(图中 DTT、DMPTU、DPTU 为反应副产物)

3. 结论

本文应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 对重组人粒细胞刺激因子进行 *N*-末端氨基酸序列分析，成功测定了样品 *N*-末端前 16 个氨基酸的序列，结果与理论一致。应用 PPSQ-53A 进行 *N*-末端测序检测灵敏度高、操作简便，是生物药物研发和质控管理中具有重要作用的分析手段。



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

⊕ 岛津企业管理 (中国) 有限公司 / 岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街 16 号中国人寿大厦 14F
 邮政编码: 100020
 电话: (010) 8525-2310/2312
 传真: (010) 8525-2326/2329

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫天地二期C801栋
 邮政编码: 200233
 电话: (021) 3419-3888
 传真: (021) 3419-3666

沈阳

辽宁省沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11F
 邮政编码: 110016
 电话: (024) 2325-5577
 传真: (024) 2383-6378

四川

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞创意成都B座12层
 邮政编码: 610015
 电话: (028) 8619-8421/8422
 传真: (028) 8619-8420

武汉

武汉市汉口建设大道568号新世界国贸大厦1座41层4116室
 邮政编码: 430022
 电话: (027) 8555-7910
 传真: (027) 8555-7920

广州

广州市流花路109号之9达宝广场7楼
 邮政编码: 510010
 电话: (020) 8710-8603
 传真: (020) 8710-8698

西安

陕西省西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
 邮政编码: 710000
 电话: (029) 6273-7878
 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14层H座
 邮政编码: 830000
 电话: (0991) 230-6271/6272
 传真: (0991) 230-6273

昆明

昆明市青年路 432 号天恒大酒店 908 室
 邮政编码: 650021
 电话: (0871) 315-2987
 传真: (0871) 315-2991

南京

南京市鼓楼区汉中中路2号金陵饭店亚太商务楼27层B单元
 邮政编码: 210005
 电话: (025) 8689-0258
 传真: (025) 8689-0237

重庆

重庆市渝中区青年路 38 号重庆国贸中心 1702 室
 邮政编码: 400010
 电话: (023) 6380-6057/6058
 传真: (023) 6380-6551

深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼F2. 6-1C
 邮政编码: 518042
 电话: (0755) 8340-2852
 传真: (0755) 8389-3100

河南

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
 邮政编码: 450007
 电话: (0371) 8663-2981
 传真: (0371) 8663-2982

香港

Suite 1028, Ocean Centre, Harbour City,
 Tsim Sha tsui, Kowloon, Hong-Kong
 电话: (00852) 2375-4979
 传真: (00852) 2199-7438

用户服务热线电话: 800-8100439
 400-6500439

本产品样本所宣传的内容, 以本版本为准
 样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注: 此样本所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知
 印刷日期: 2016年5月