

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

PPSQ-007

**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 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 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 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 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 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 端氨基酸序列分析的应用参考。

## 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 端前 16 个氨基酸的序列。

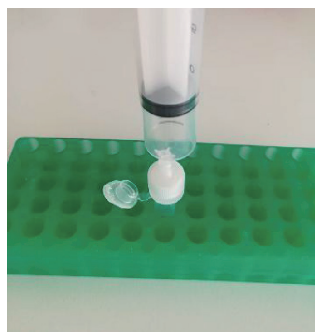


图1 自制蛋白质脱盐装置

### 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）。

## ■ 结果与讨论

### 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。

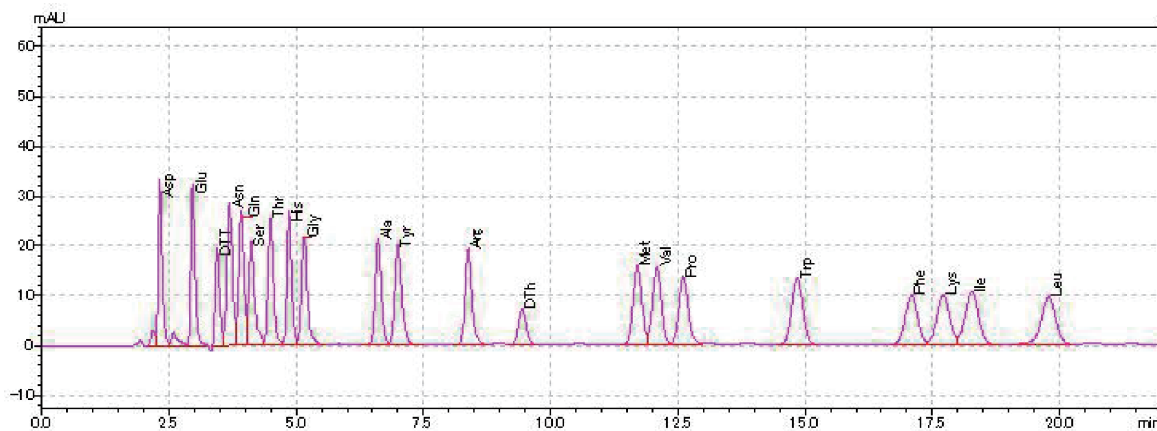
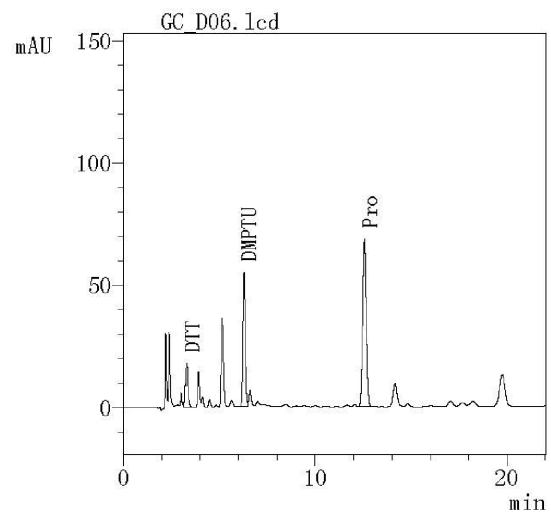
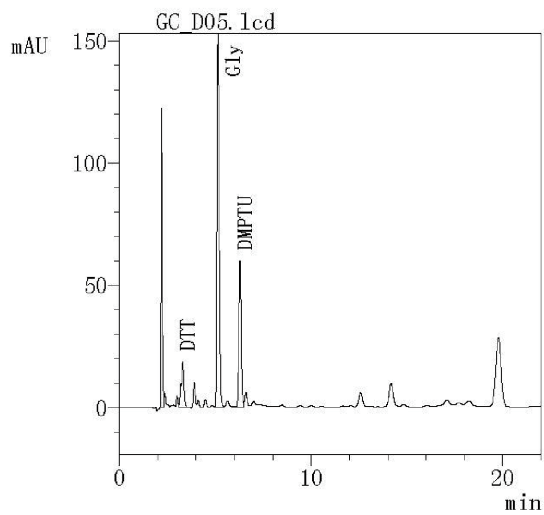
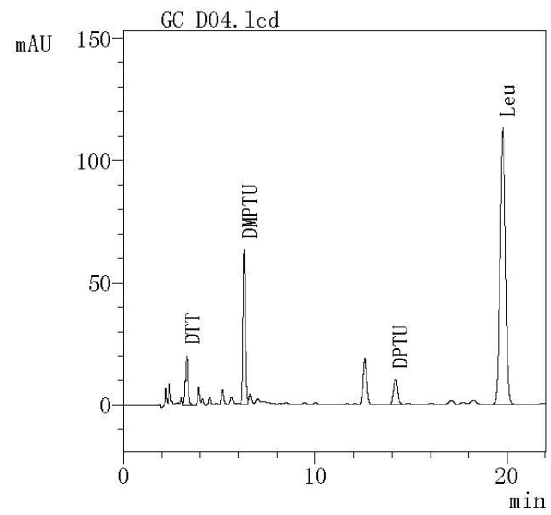
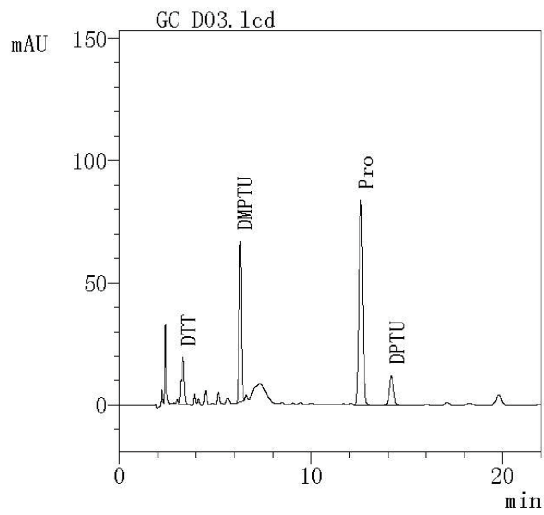
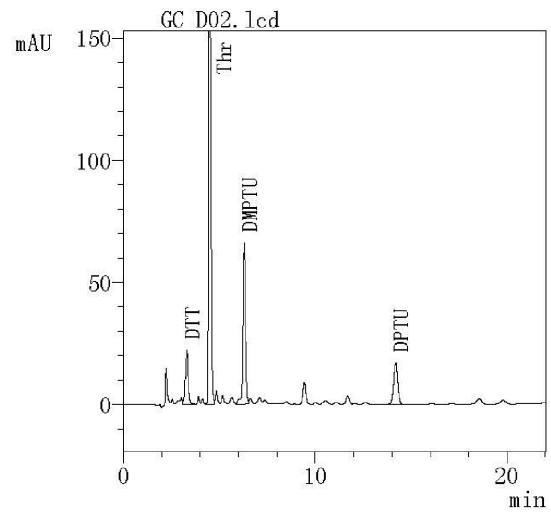
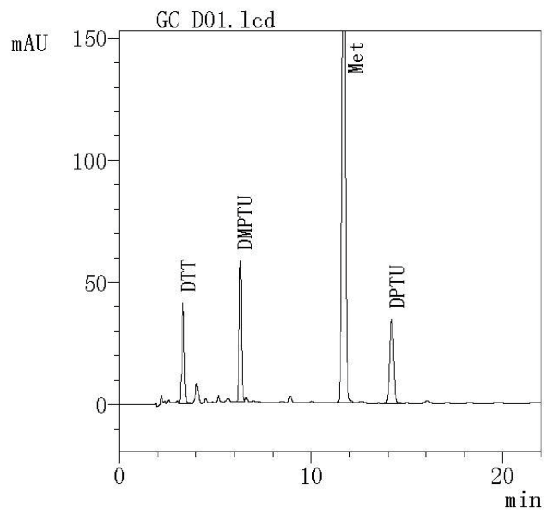
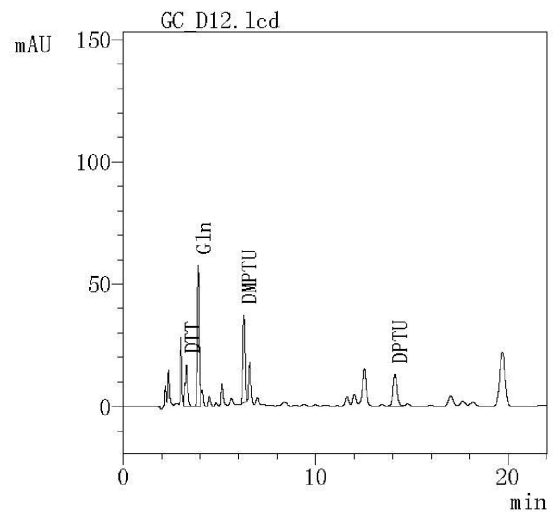
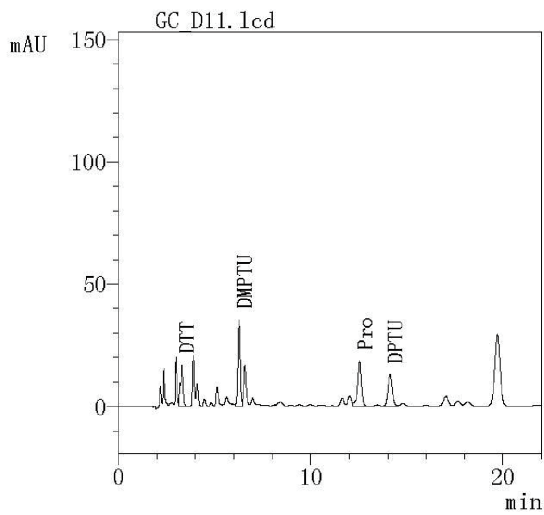
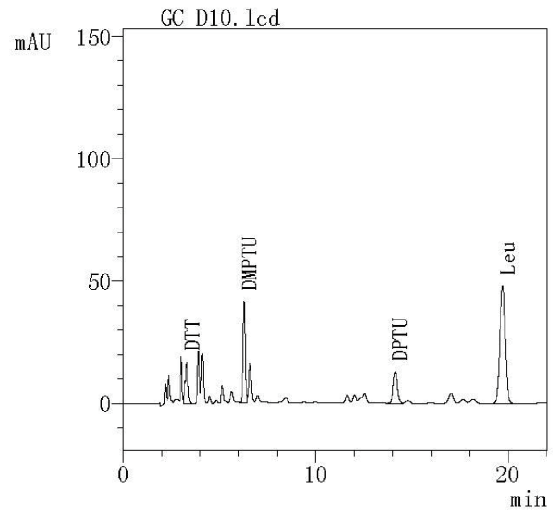
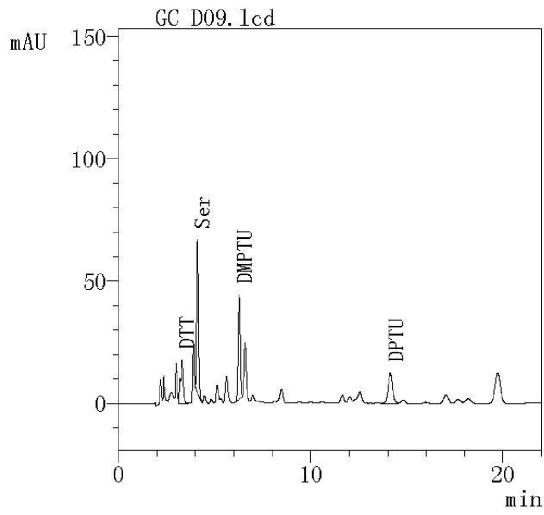
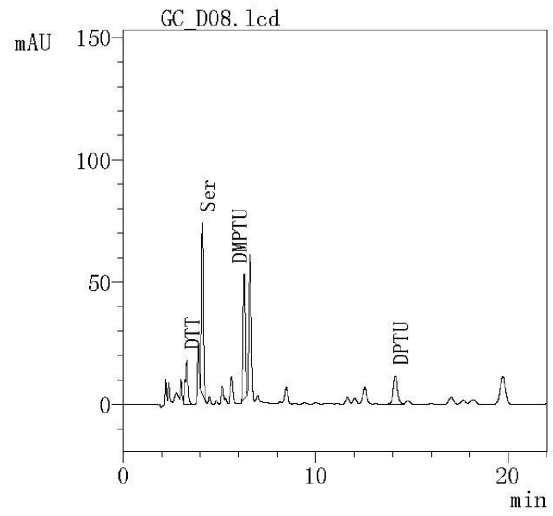
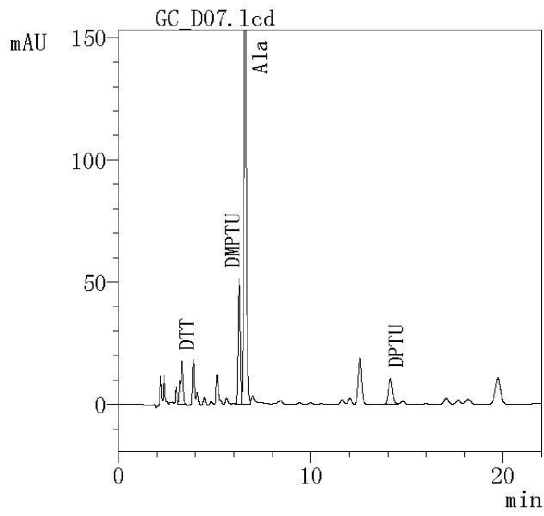


图2 PTH-氨基酸混合标准品校准测试图谱

### 2.2 重组人粒细胞刺激因子 N 端氨基酸序列分析色谱图

重组人粒细胞刺激因子的 N 端测序结果见图 3。如图所示，N 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。





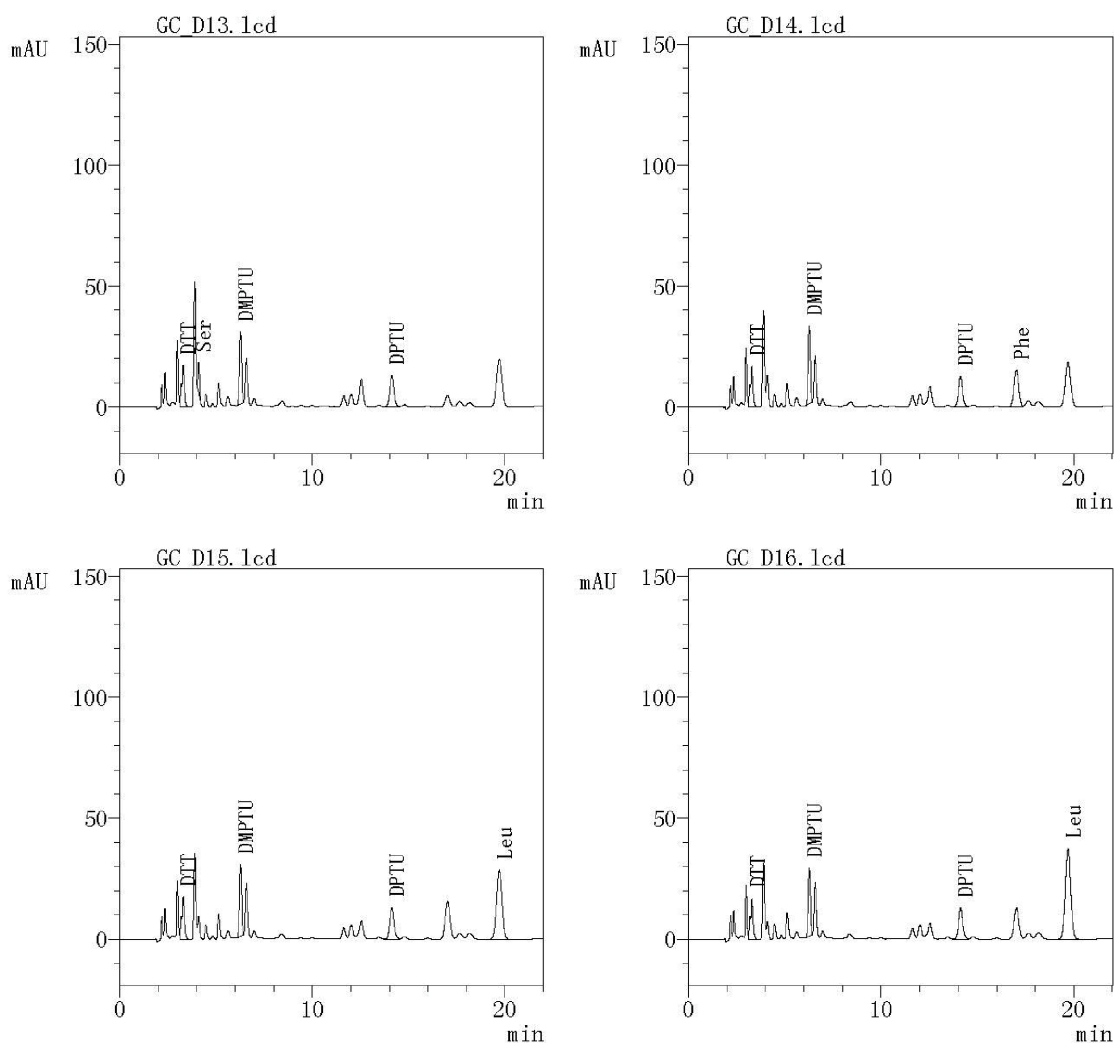


图3 重组人粒细胞刺激因子的N端氨基酸序列分析色谱图  
(图中DTT、DMPTU、DPTU为反应副产物)

## ■ 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 端氨基酸序列分析，成功测定了样品 N 端前 16 个氨基酸的序列，结果与理论一致。应用 PPSQ-53A 进行 N 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。