

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 端氨基酸序列

PPSQ-008

摘要：生物体在合成蛋白质时，N 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 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 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 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。

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：重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子原液

1.3 样品前处理

重组人粒细胞巨噬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。

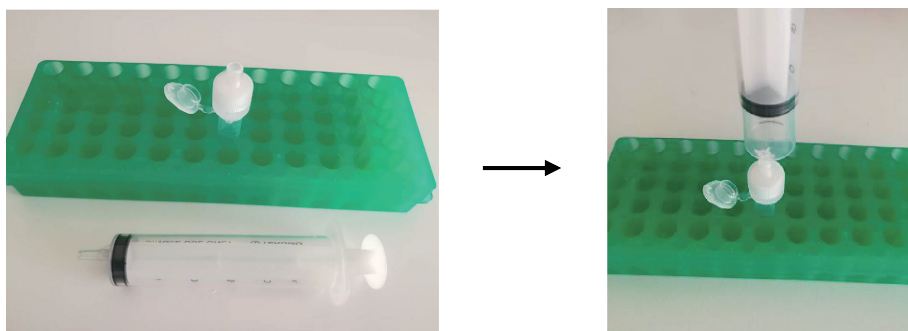


图1 自制蛋白质脱盐装置

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）。

结果与讨论

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。

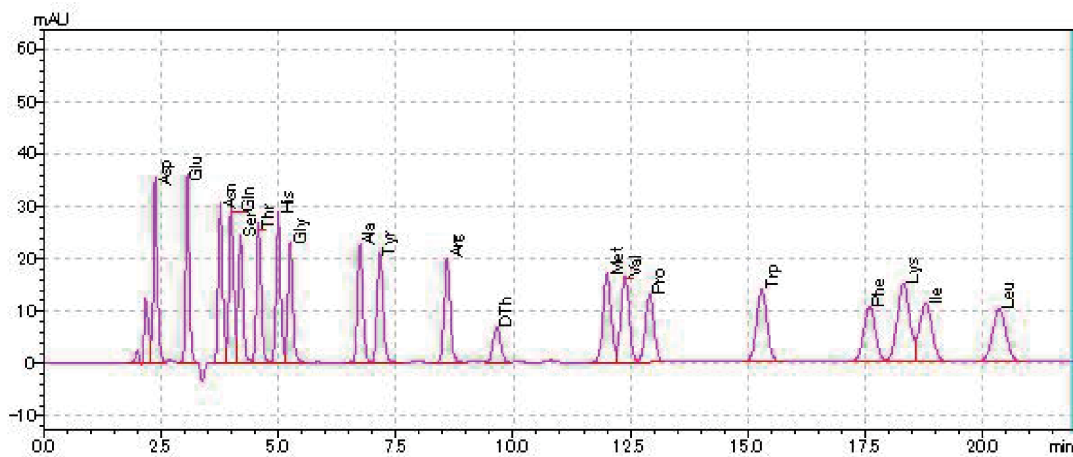
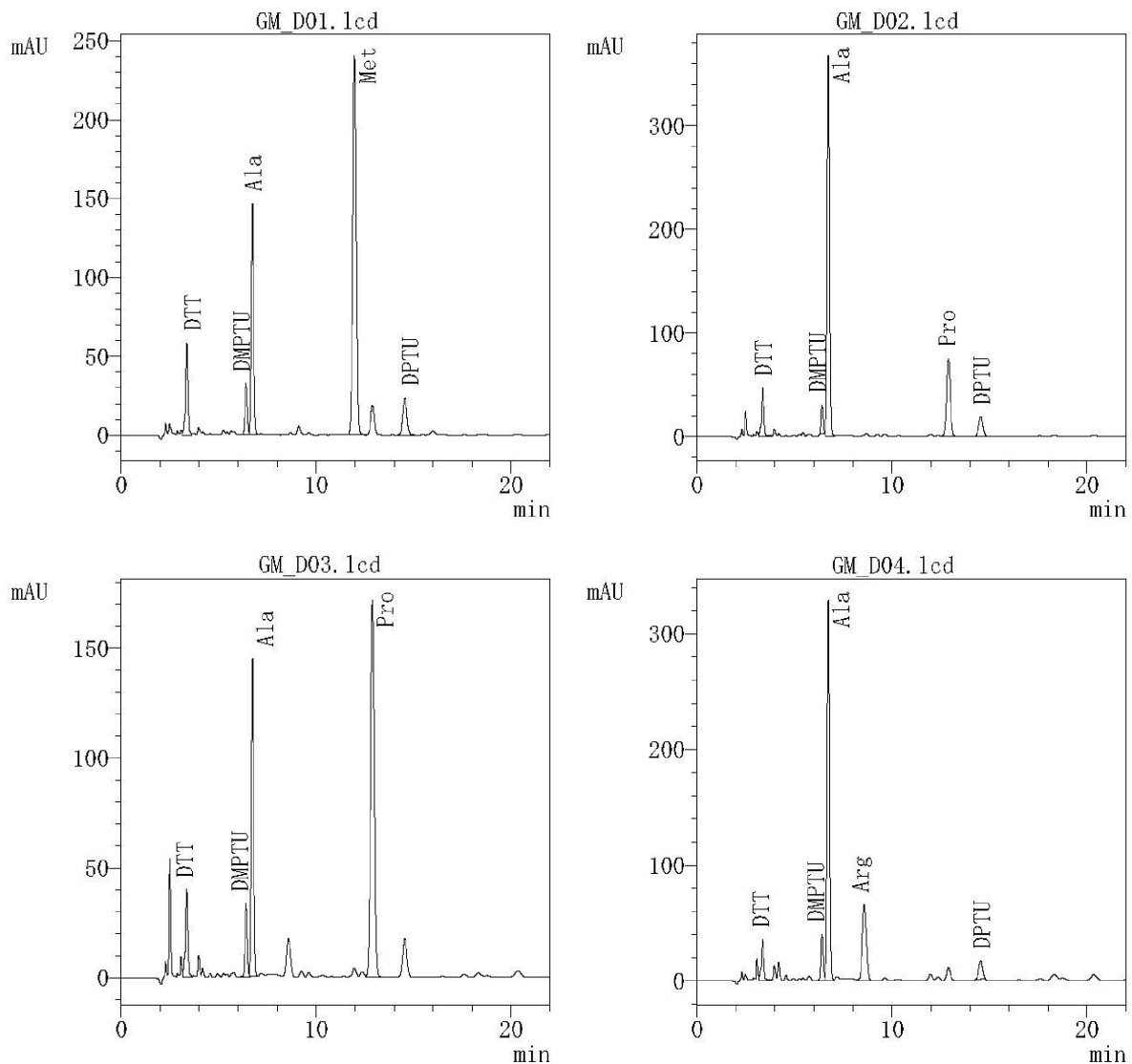
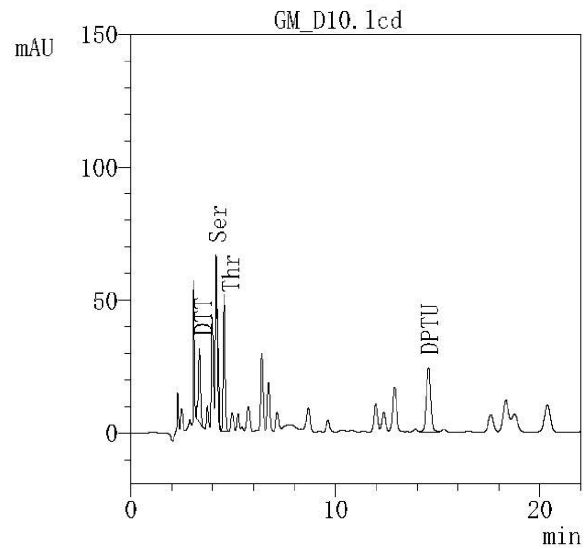
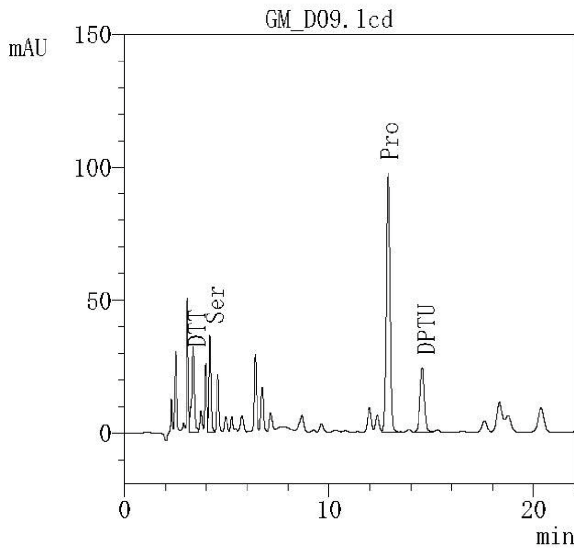
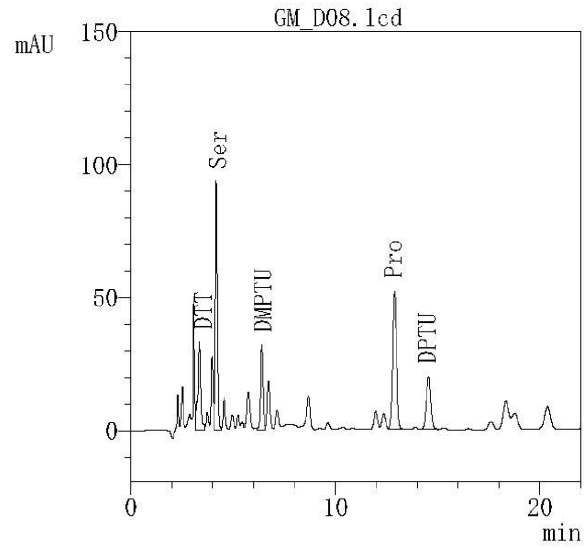
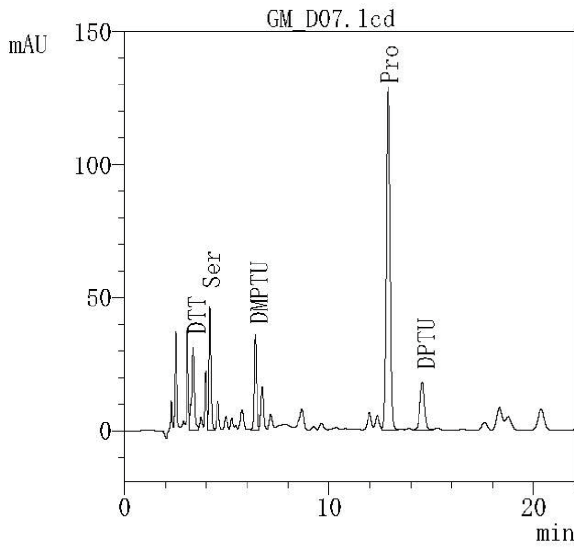
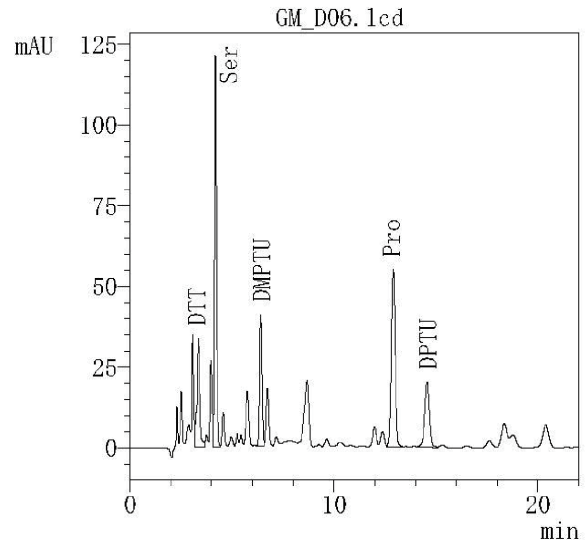
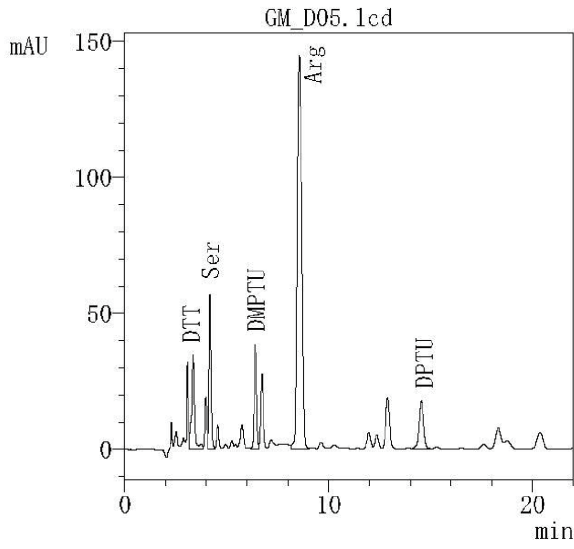


图2 PTH-氨基酸混合标准品校准测试图谱

2.2 样品 N 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 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 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。





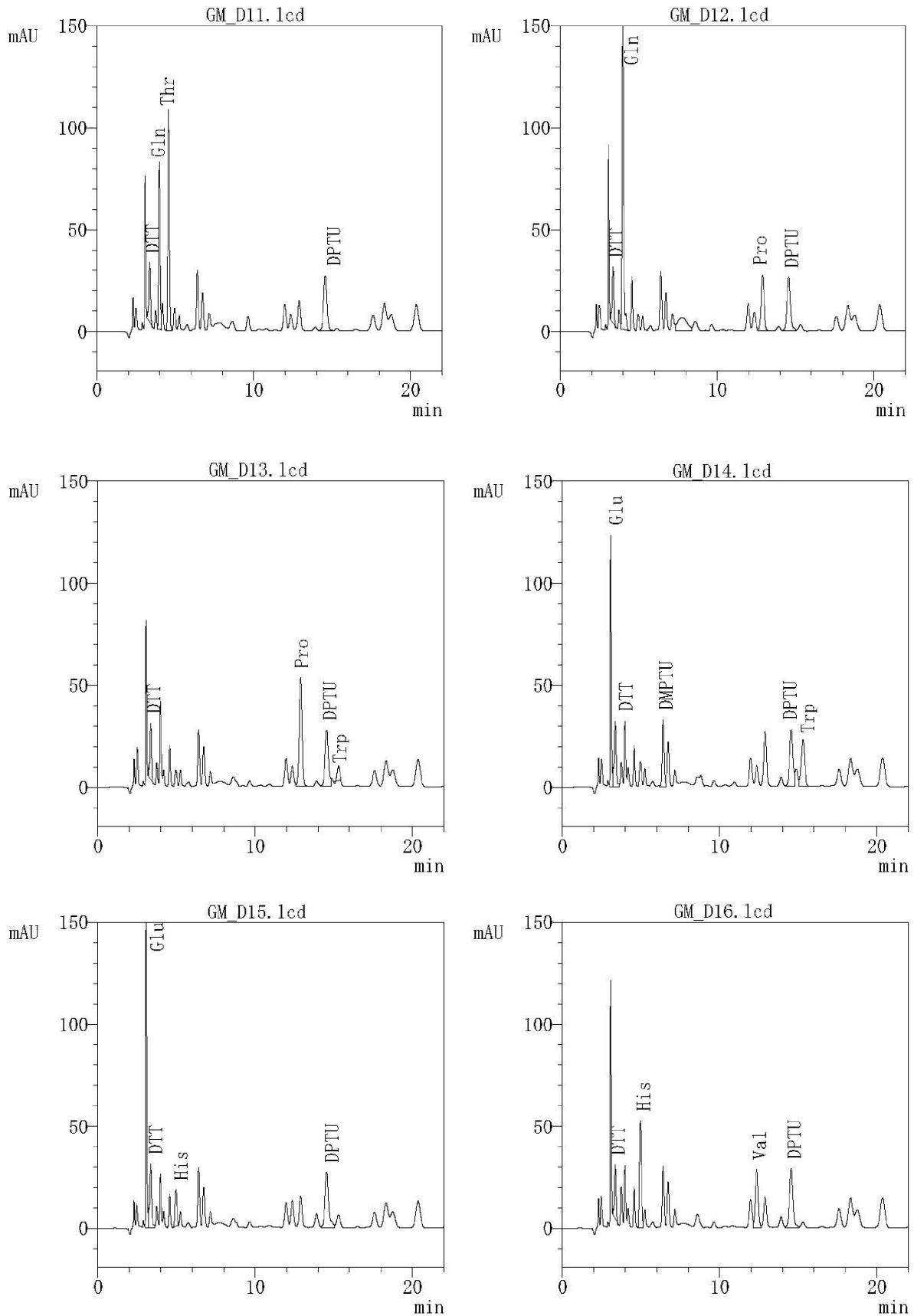


图3 重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子N端氨基酸序列分析色谱图

■ 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 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 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.