

# 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 端氨基酸序列

PPSQ-006

**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 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 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 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 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 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 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）。

## 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 1。

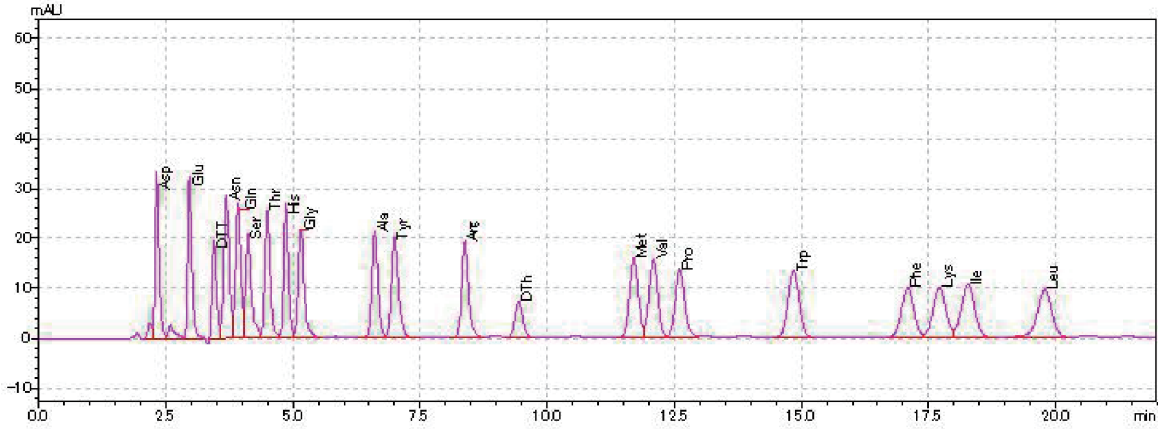
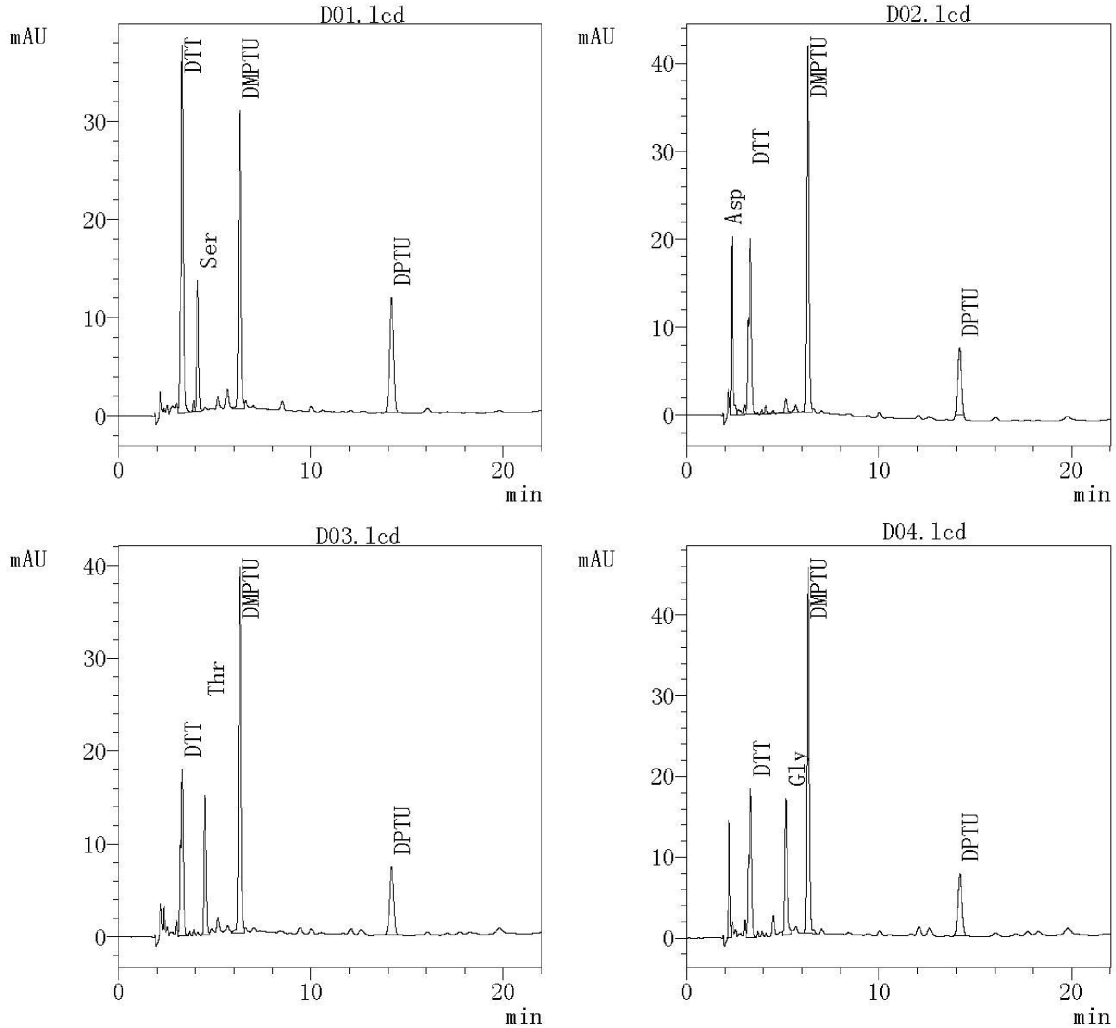
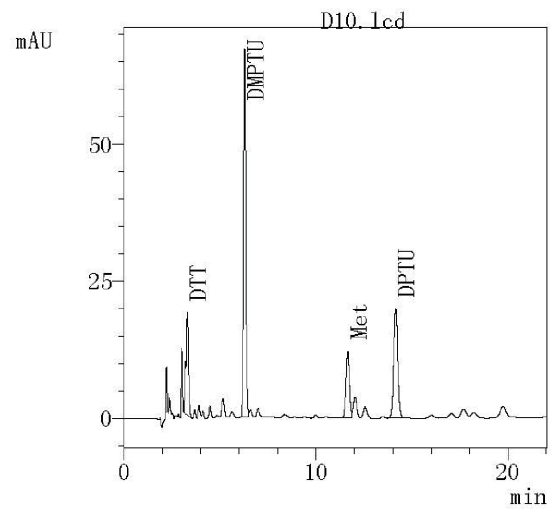
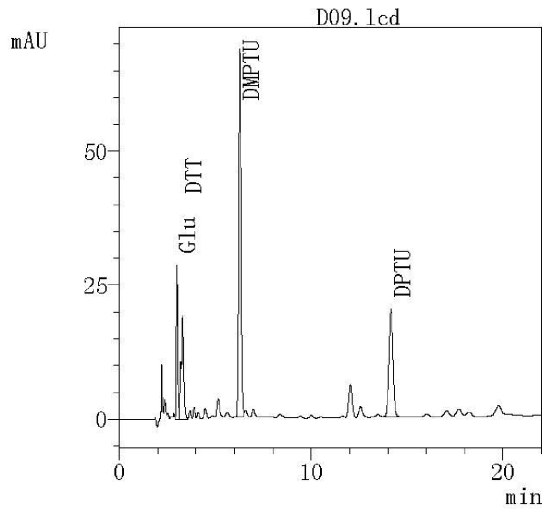
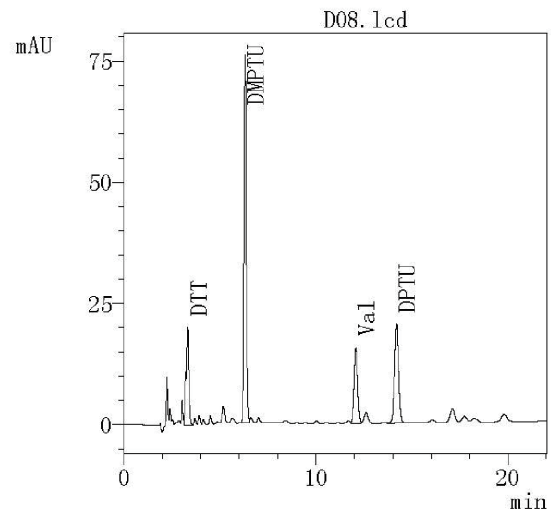
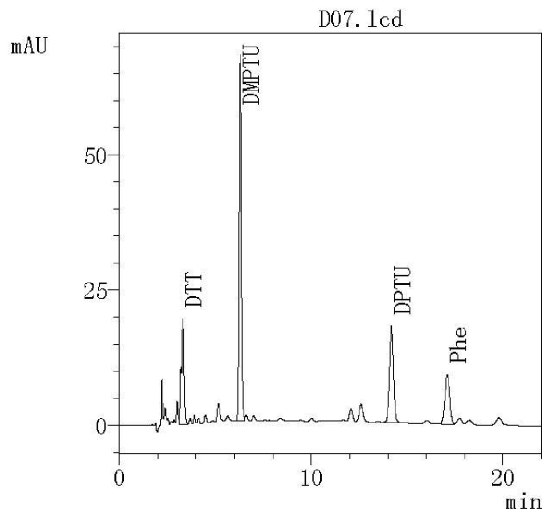
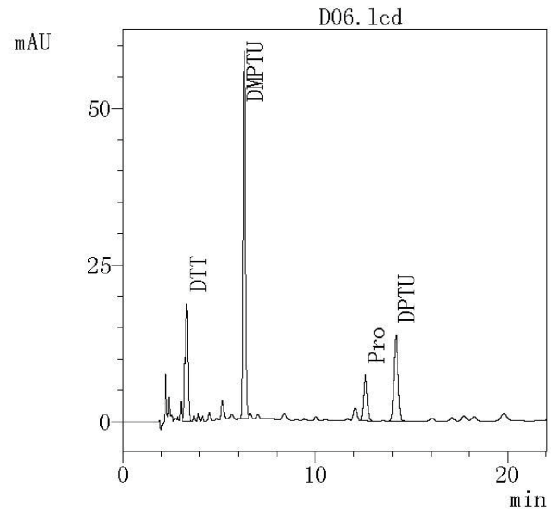
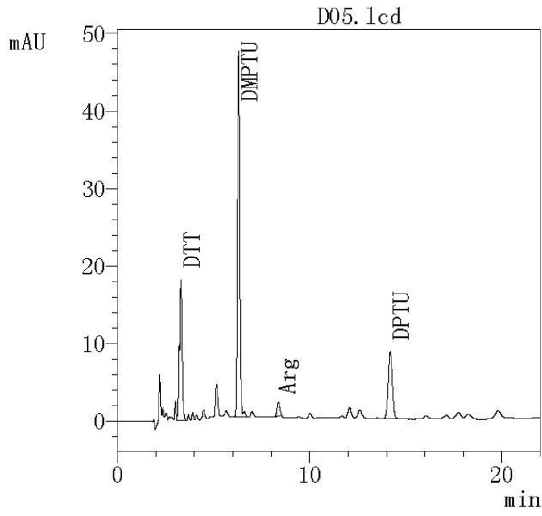


图1 PTH-氨基酸混合标准品校准测试图谱

### 2.2 重组人血管内皮生长因子受体 - 抗体融合蛋白 N 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 端测序结果见图 2。如图所示，N 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。





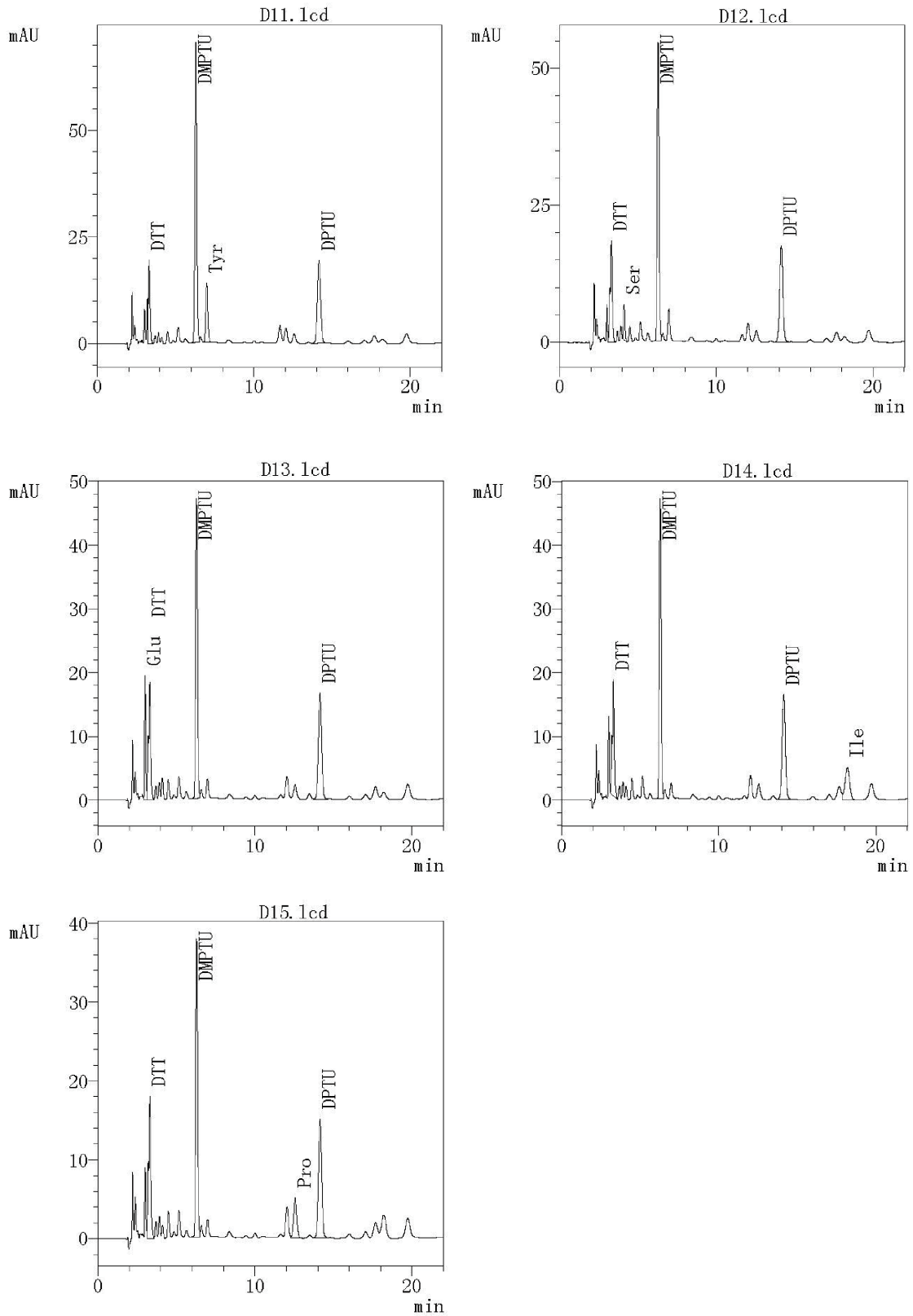


图2 重组人血管内皮生长因子受体-抗体融合蛋白的N端氨基酸序列分析色谱图  
(图中DTT、DMPTU、DPTU为反应副产物)

## ■ 结论

本文应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 对重组人血管内皮生长因子受体 - 抗体融合蛋白注射液原液进行 N 端氨基酸序列分析，成功测定了样品 N 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。