

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

PPSQ-004

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。

■ 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（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。

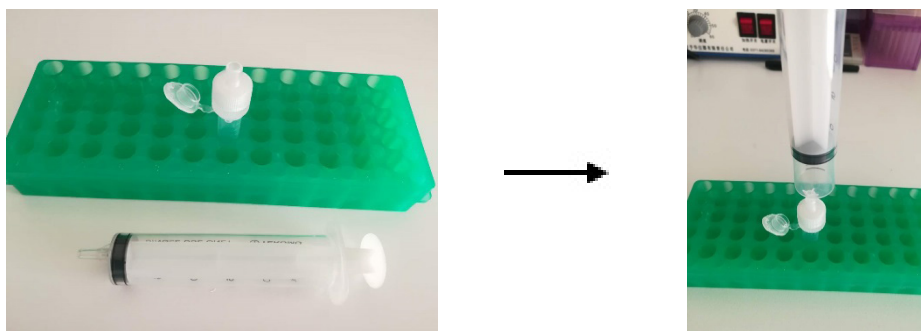


图 1 自制蛋白质脱盐装置

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）。

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。

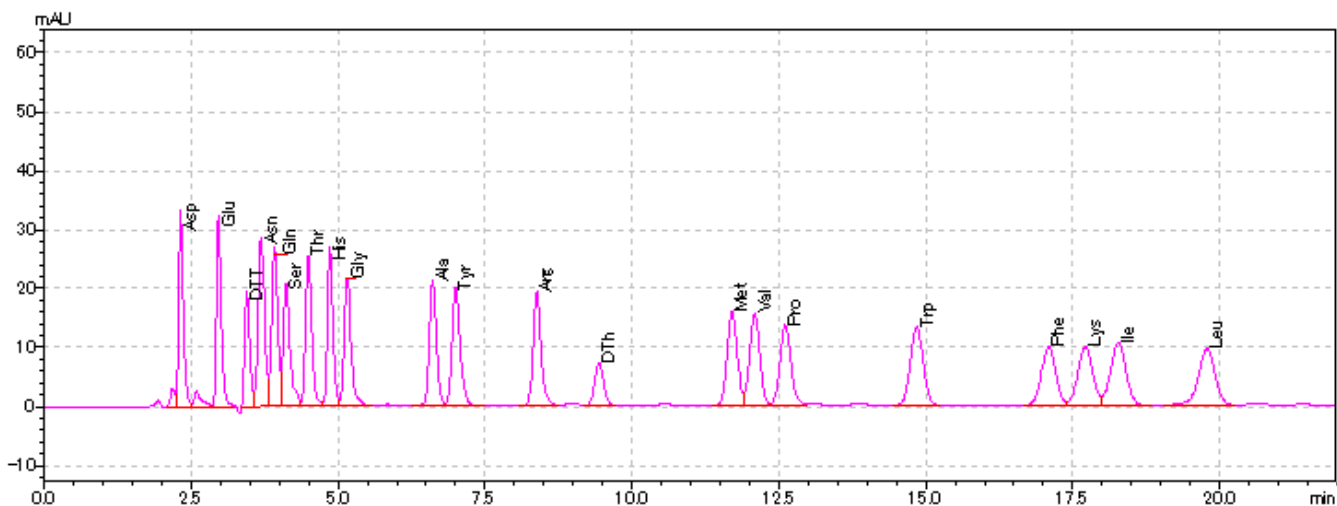


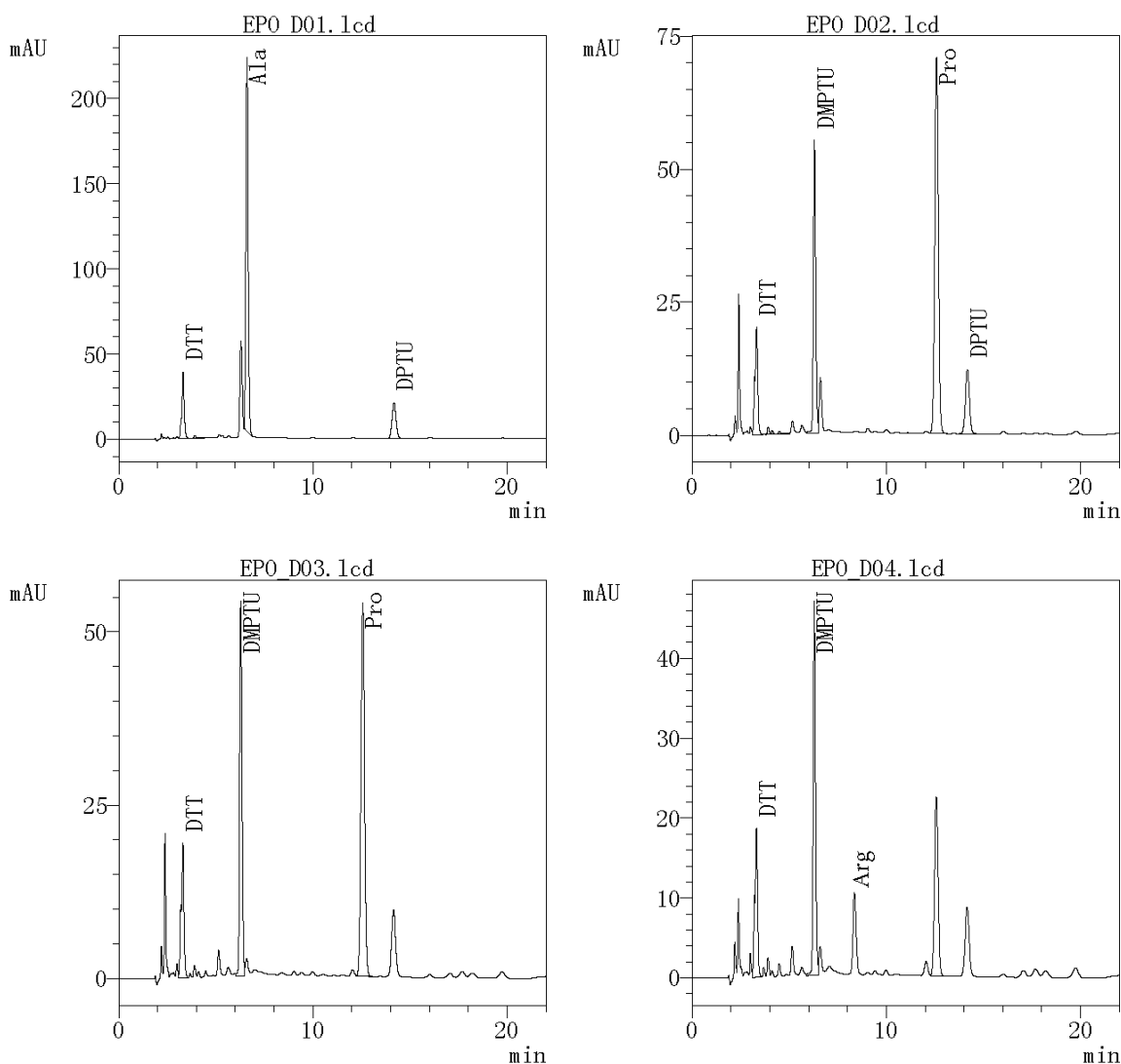
图 2 PTH-氨基酸混合标准品校准测试图谱

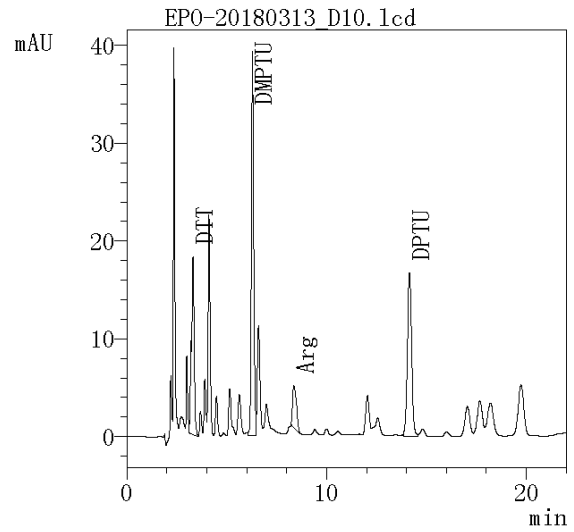
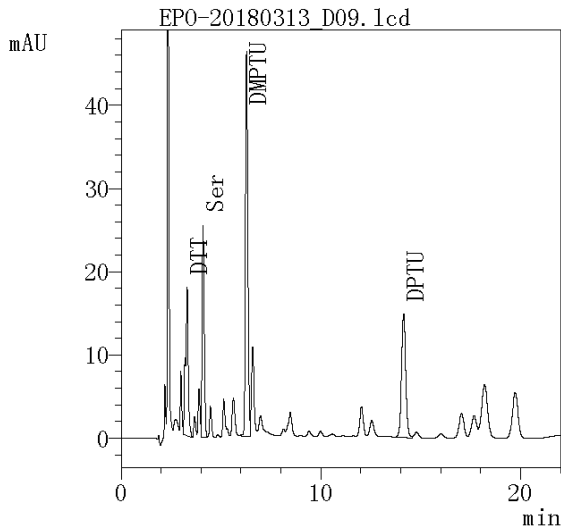
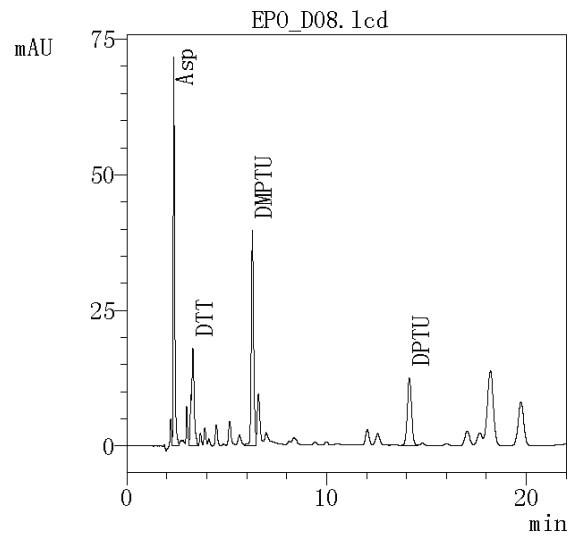
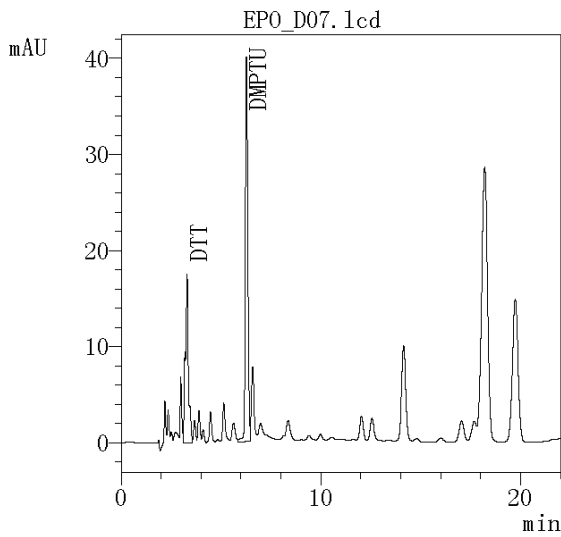
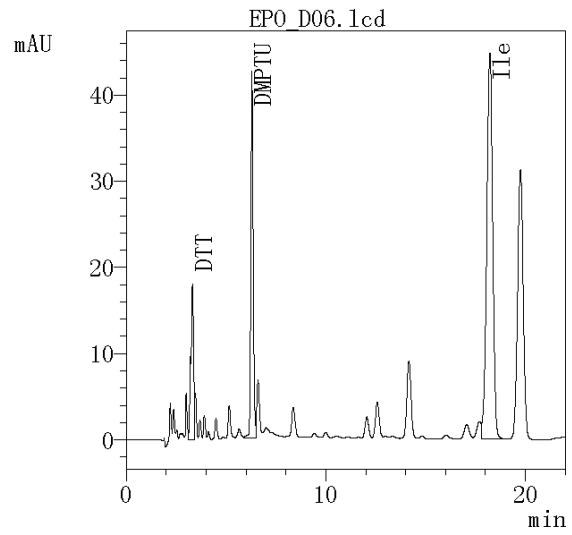
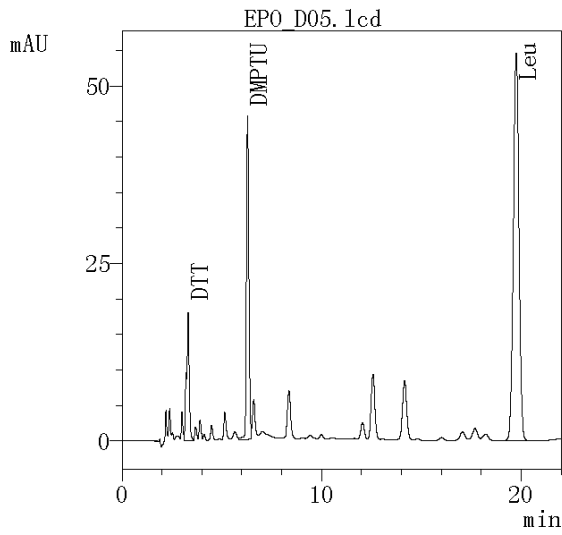
2.2 重组人促红素 N- 末端氨基酸序列分析色谱图

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 是重组人促红素 N- 末端氨基酸分析的原始色谱图，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% 乙腈溶液）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。





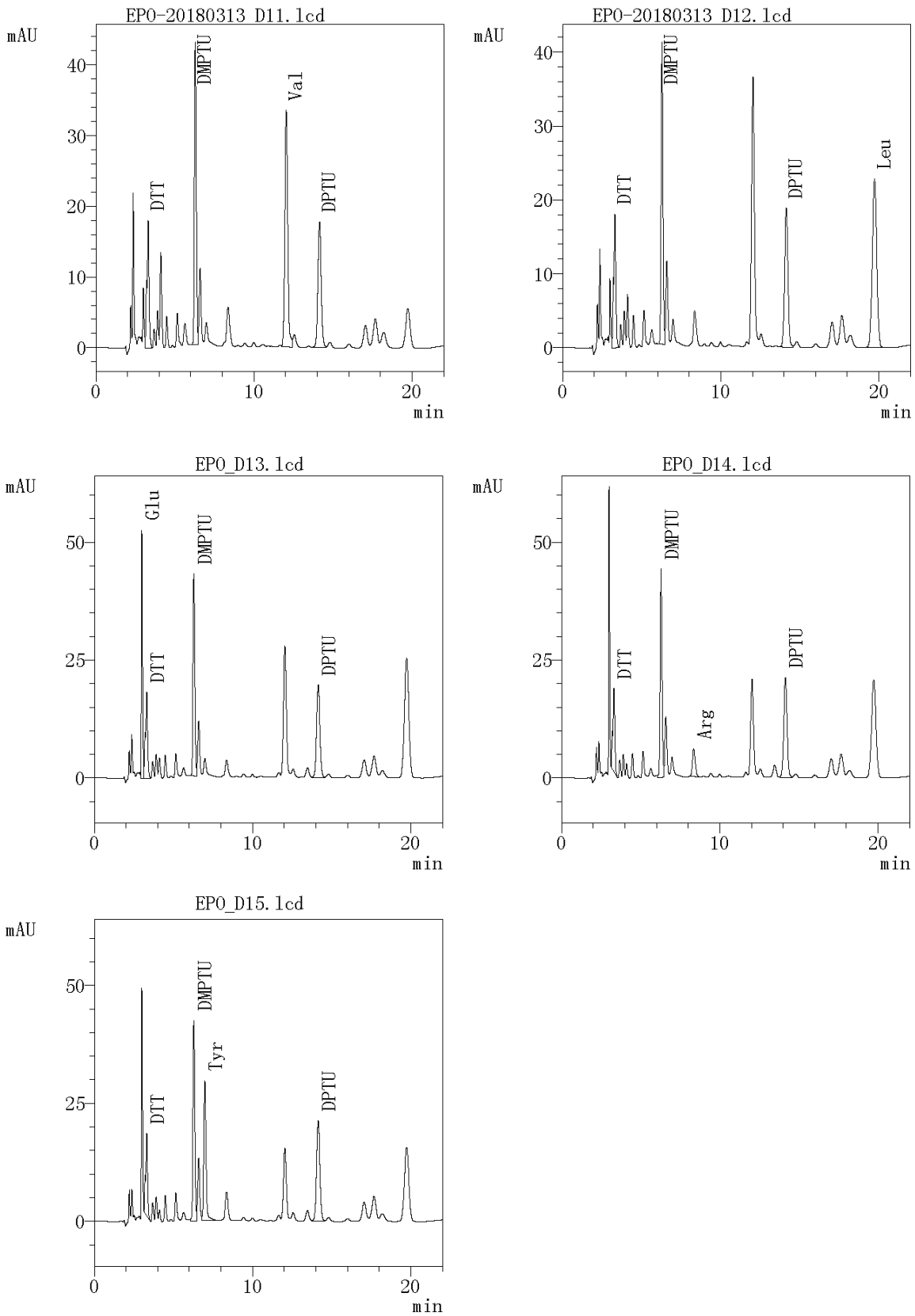


图3 重组人促红素 N-末端氨基酸序列分析色谱图

■ 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。