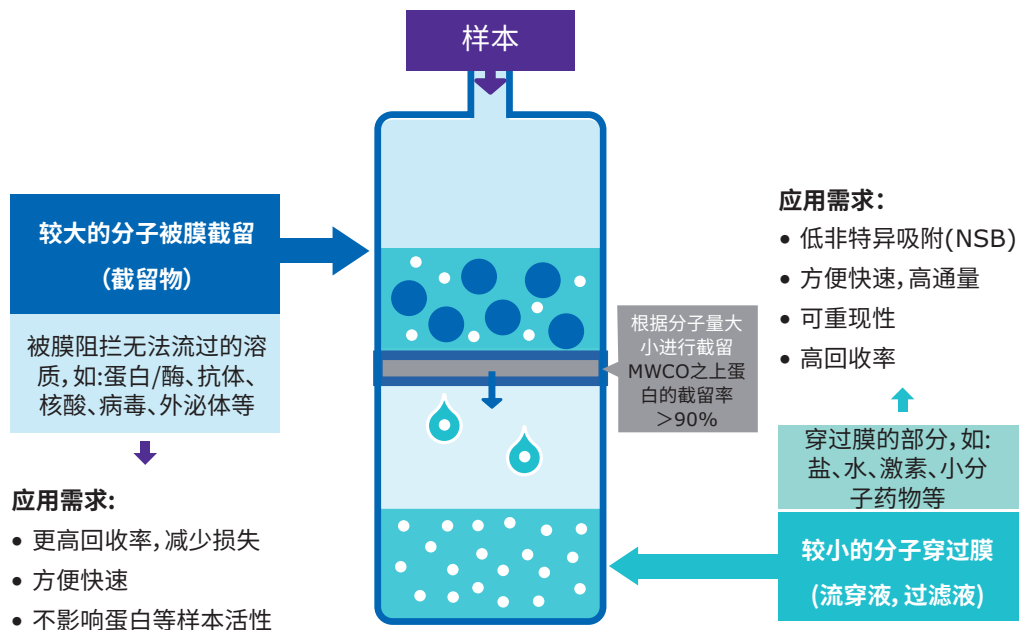


# Amicon® Ultra超滤管

## 让样本制备如此简单

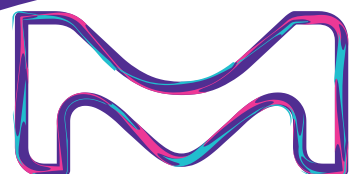
用膜进行样品处理的方法操作简便,效果稳定可靠,成本效益高,在样品处理中得到了广泛应用,包括截留样品的纯化、浓缩,及流穿样本的处理等。



### Amicon® Ultra超滤管的独特优势:

- **高回收率:** 超滤膜的截留精准,非特异吸附低, >90%回收率
- **不易堵塞:** 双侧竖膜设计,不易堵塞,提高效率
- **避免污染:** 热封技术,无粘合剂,防止溶出物污染
- **性能稳定:** 一体化设计,合理死体积,数据平行性、重现性好
- **广泛兼容:** pH 3-13适用,化学兼容性好

默克Amicon® Ultra超滤管因其优异的性能,已被广泛应用于多种样品制备的场景,包括蛋白/ 抗体/ 酶/ 核酸等生物样本的浓缩、脱盐和缓冲液置换、病毒/ 噬菌体/ 外泌体/ 纳米粒子等样本的浓缩和纯化、分析样品前处理、大分子/小分子去除、药物递送载体研究、药物筛选、药物结合实验等。



# FASP

## 快速、高效的制备蛋白质组学或肽图分析样本

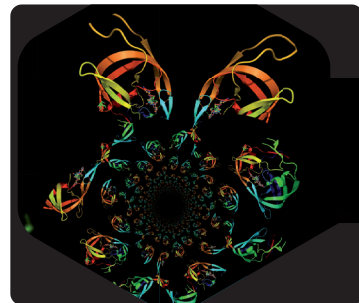
蛋白质组研究在大规模水平上研究蛋白质的特征,包括蛋白质的表达水平,翻译后的修饰,蛋白与蛋白相互作用等,由此获得蛋白质水平上的关于疾病发生,细胞代谢等过程的整体而全面的认识。蛋白质组研究不仅能为生命活动规律提供物质基础,也为众多疾病机理的阐明及攻克提供理论根据和解决途径,是当前生物制药发展非常迅速的热门领域之一。

质谱(MS)技术是在蛋白质组研究的高通量分析中广泛使用的“金标准”,在该工作流程中,上机前的样品制备和前处理对获得准确和深度的分析结果尤其重要。

传统的样品制备方法包括胶内酶解和溶液内酶解,其中胶内酶解是非常强大的技术,而溶液内酶解更容易自动化,并最大限度地减少样品处理。2009年Matthias Mann小组发表的过滤辅助蛋白质组制备方法(Filter-Aided Sample Preparation, FASP)则结合了二者的优点,且通过对操作过程大大简化,提高了酶切的简便性、成功率与重现性。

FASP样品制备方法可以对用洗涤剂溶解的生物样品进行无凝胶处理,借助超滤膜对大分子质量的蛋白或多肽进行截留或通过,使酶解反应在尽量少的容器中完成。在过滤器上消化后洗脱的肽是纯净的,允许进行细胞器的单次分析和前所未有的蛋白质组覆盖深度,已成为备受青睐的蛋白质组学研究的操作流程。

经过十余年的广泛应用,根据不同的样本类型、样本特点、研究目的等,研究人员对FASP法进行了不断的调整和优化,但基本流程和操作方法都是类似的,如下方案供参考。



## 所需材料

- SDT-lysis buffer: 4%(w/v) SDS, 100mM Tris/HCl pH 7.6, 0.1M DTT
- UA溶液: 8 M尿素 (货号:**U5128**) 溶于 0.1 M Tris/HCl, pH 8.5
- UB溶液: 8 M尿素 (货号:**U5128**) 溶于0.1 M Tris/HCl, pH 8.0
- IAA溶液: 含0.05 M 碘乙酰胺的 UA
- Lys-C内切蛋白酶(货号:**ENDOLYSS-RO**): 5 µg/µl储存液
- 胰蛋白酶(货号:**T1426**): 0.4 µg/µl储存液
- 0.5M NaCl水溶液
- ABC溶液: 0.05M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>水溶液
- 过滤装置: 30kDa Microcon® 超滤管(货号:**MRCFOR030**) 或10kDa Microcon® 超滤管(货号:**MRCPRT010**)
- C18-SD萃取装置: 7mm/ 3 ml

备注: UA, UB和IAA solutions must be prepared freshly and used within a day.

## 实验方法

### 1. 样品裂解

1:10比例使用SDT-裂解缓冲液在95°C下裂解细胞或组织3-5分钟,使用超声法剪切DNA以降低样品的粘度。在开始样品处理之前,裂解液必须在16000 x g离心5分钟澄清。

备注:1) 加热前需要使用搅拌器将组织在裂解液中进行均一化;2) 避免使用钾盐或温度低于15°C以避免浓缩SDS的沉淀

### 2. 样品处理

- 2.1 混合最多30 $\mu$ l的蛋白质提取物与200 $\mu$ l的UA并加入Microcon<sup>®</sup>超滤管中,14,000 x g离心40分钟
- 2.2 再往过滤装置中加入200 $\mu$ l的UA,14,000 x g离心40分钟
- 2.3 丢弃收集管中的滤液
- 2.4 加入100  $\mu$ l IAA溶液,在热混合器中以600 rpm混合1 min,然后静止孵育5 min
- 2.5 将超滤装置14000 x g离心30分钟
- 2.6 加入100  $\mu$ l UB,14000 x g离心40分钟,重复此步骤2次
- 2.7 加入40  $\mu$ l含Lys-C(酶蛋白比1:50)的UB,在热混合器中以600 rpm混匀1 min
- 2.8 在保湿箱中孵育过夜
- 2.9 将超滤装置转移到新的收集管中
- 2.10 加入120  $\mu$ l ABC和胰蛋白酶(酶蛋白比1:100),在热混合器中600 rpm混匀1 min
- 2.11 室温下孵育4小时
- 2.12 将超滤装置14000 x g离心40分钟
- 2.13 加入50  $\mu$ l 0.5M NaCl,超滤装置14000 x g离心20 min
- 2.14 流穿液用CF<sub>3</sub>COOH酸化并脱盐

### 3. 多肽脱盐

直接进行LC-MS分析的少量消化物可以使用ZipTips<sup>®</sup> (货号:**ZTC18S096**)脱盐。大量肽混合物必须使用SPE萃取柱进行脱盐,可参考如下步骤:

- 3.1 将3ml的SPE萃取盘(C18-SD)放入15ml的锥形管中,或使用萃取小柱(货号:**57089**)
- 3.2 加入1ml CH<sub>3</sub>OH,1500 x g下离心1分钟
- 3.3 加入0.5 ml含0.1% CF<sub>3</sub>COOH,70% CH<sub>3</sub>CN的水溶液,1500 x g下离心1分钟
- 3.4 加入0.5 ml含0.1% CF<sub>3</sub>COOH的水溶液,1500 x g下离心1分钟
- 3.5 加入上述滤液(步骤2.14),150 x g离心3分钟
- 3.6 加入0.5 ml含0.1% CF<sub>3</sub>COOH的水溶液,150 x g离心3分钟
- 3.7 将萃取盘转移到新管中,加入0.5 ml含70% CH<sub>3</sub>CN的水溶液,150 x g离心3分钟
- 3.8 收集脱盐的多肽洗脱液

### 4. 得率鉴定

可以通过紫外光谱仪估算多肽的浓度。

#### 参考文献:

1. Wiśniewski et al. (2009). Universal Sample Preparation Method for Proteome Analysis. *Nature Methods* 6, 359-362.
2. Wiśniewski, Zielinska and Mann (2010). Comparison of Ultrafiltration Units for Proteomic and N-glycoproteomic Analysis by the Filter-Aided Sample Preparation Method. *Analytical Biochemistry* 410(2), 307-309.
3. Ledvinová et al. (2018) Filter-Aided Sample Preparation Procedure for Mass Spectrometric Analysis of Plant Histones. *Front. Plant Sci.* 9:1373.

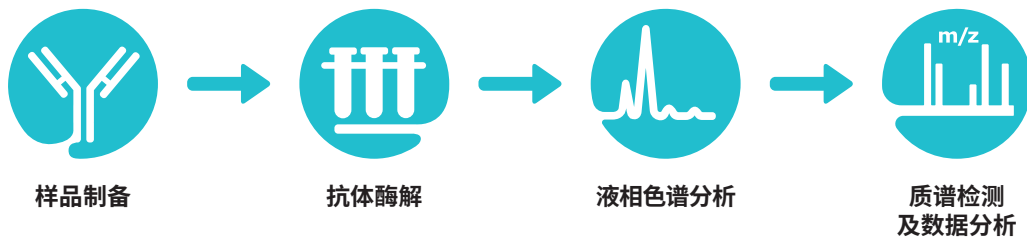
## 应用举例

### 单克隆抗体肽谱分析方案

在蛋白质生物治疗药物的肽图分析中,先用酶消化蛋白质使其酶解,待产生肽片段之后,再将其进一步用于表征特定的肽区域和修饰。蛋白质酶解结果对于蛋白质结构表征、蛋白质鉴定和蛋白质修饰监测至关重要,包括翻译后修饰、产品相关杂质、多属性监测(MAM)方法等等。然而,肽图分析的样品前处理相当复杂和繁琐,且通常要花很长的时间进行酶解。

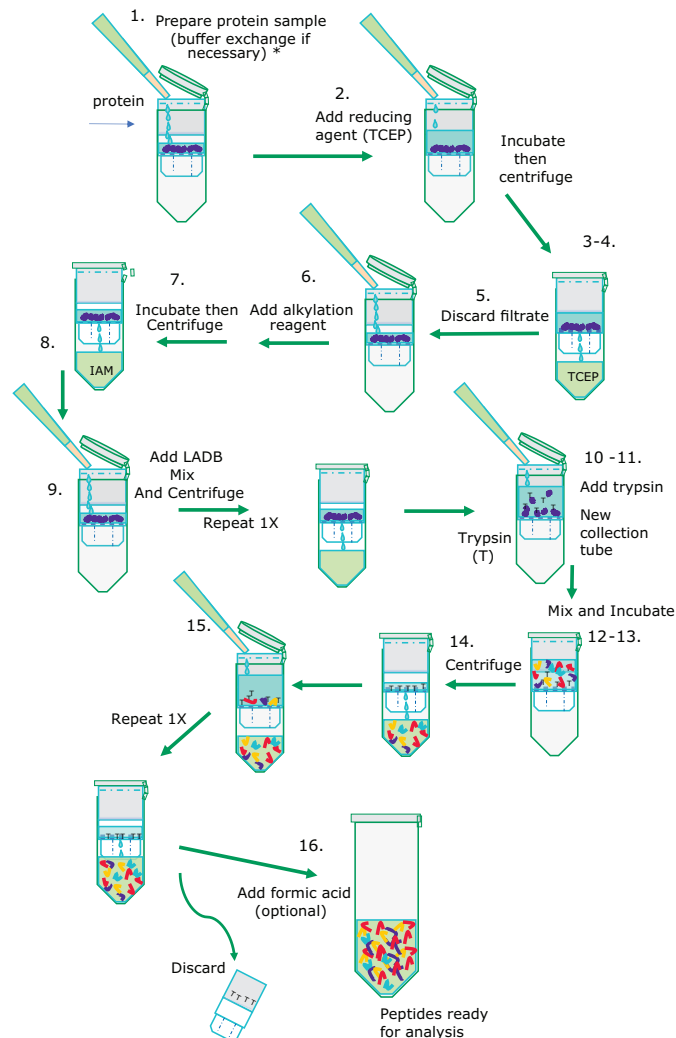
我们以阿达木单抗为例,开发了一种优化的低伪影胰酶消化和肽图分析的方法。该方法采用过滤辅助样品制备(FASP)方法减少了去垢剂洗涤和试剂去除的步骤,配合使用最小化氨基酸氧化和脱氨的专有缓冲液配方,完整、彻底的分析治疗性单克隆抗体(mab)的表征信息,以确保产品的安全性和有效性。

### 主要流程:



### 样品制备流程图:

样品制备是在截留分子量30kDa的超滤管中进行的,因为这样可以简化试剂的洗涤和去除步骤。感兴趣的单抗会保留在滤膜上方直到消化过程完成,随后多肽可以通过离心穿过滤膜,而与胰蛋白酶分离。下图描述了样品制备步骤:



## 仪器:

色谱仪: Waters H-Class Acquity UPLC Chromatography System

质谱仪: Thermo Q Exactive Plus mass spectrometer

## 试剂与耗材:

试剂与耗材	货号
<b>样品和系统适用性试剂</b>	
SILu™ Lite SigmaMAb 阿达木单抗	MSQC16
稳定同位素标记的SILu™ Lite SigmaMAb阿达木单抗	MSQC11
MS-RT校准混合物	MSRT1
<b>样品制备试剂耗材</b>	
尿素	U5128
LC-MS级甲酸	5.33002
三(2-羧基乙基)磷酸盐, TCEP溶液	646547
碘乙酰胺	A3221
低伪影消解缓冲液	EMS0011
配有Ultrasel-30超滤膜的30kDa Microcon® 超滤管	<b>MRCFOR030</b>
<b>酶</b>	
SOLu-胰蛋白酶	EMS0004
蛋白内切酶Glu-C来源于金黄色葡萄球菌V8	P6181
蛋白内切酶Asp-N来源于莓实假单胞菌突变菌株	P3303
<b>HPLC</b>	
Ascentis® Express Peptide ES-C18, 2.7µm毛细管HPLC色谱柱	53561-U

## 实验步骤

### 1. 试剂制备

- 8M尿素溶液: 将2.25克尿素溶于3毫升水中。在混合时, 可以稍微加热溶液, 以帮助溶解, 但不要超过30°C。现用现配。
- 100mM TCEP溶液: 200µL 0.5M TCEP溶液中加入800µL 8M尿素制备得100mM TCEP溶液。
- 100mM碘乙酰胺溶液: 取1瓶用606µL 8 M尿素溶解得到500mM的原液。将200 µL 500mM碘乙酰胺原液与800µL 8M尿素混合, 进一步稀释为100mM浓度。因为IAM在溶液中降解很快, 所以需要现用现配。
- SOLu-Trypsin溶液: 配置为1 mg/mL浓度, 可在2-8°C保存长达两年。
- 底伪影消解缓冲液 (LADB): 本品直接可用, 可在2-8°C保存长达两年。

### 2. 样品制备

- 2.1 蛋白质的量宜不少于50 µg。样品溶液应大于等于20 µL但不应超过100 µL。若小于20 µL, 则加水调至20 µL。  
注: 若样品溶剂会干扰还原或烷基化过程, 则需替换为8M尿素溶液
- 2.2 在pH6.5条件下加入100µL 100mM TCEP溶液。37°C还原30分钟, 同时以300rpm的速率混匀
- 2.3 将还原后的样品加入30kDa Microcon® 超滤管中
- 2.4 14000g离心5分钟
- 2.5 弃去收集管中的滤液
- 2.6 加入100µL 100mM IAM溶液, 涡旋混匀1分钟, 在避光处反应20分钟
- 2.7 14000g离心5分钟
- 2.8 加入150µL LADB, 14000g离心5分钟, 重复一次
- 2.9 将超滤装置转移至新的接收管中, 加入100µL LADB
- 2.10 加入适量的1mg/mL SOLu-Trypsin至酶与蛋白质质量比约为1 : 10
- 2.11 用封口膜密封, 防止蒸发
- 2.12 37°C反应4个小时, 同时以300rpm的速率混匀
- 2.13 14000g离心5分钟
- 2.14 加入40µL LADB, 14000g离心3分钟。重复一次。注: 为避免氧化风险, 每次离心时间不宜超过5分钟
- 2.15 加入2µL甲酸, 涡旋, 快速离心。注: 此步骤非必要

### 3. HPLC参数

流速	0.08 ml/min
进样体积	10 $\mu$ l
柱温	室温
流动相	A: 含有0.1%甲酸的水; B: 含有0.1%甲酸的乙腈
洗脱梯度	0-120min: 1-35%B; 120-121min: 35-97%B; 121-136min: 97%B; 136-137min: 97-1%B; 137-162min: 1%B

### 质谱仪参数

离子源	ESI
喷雾电压	4 KV
毛细管温度	320 $^{\circ}$ C
m/z范围	300-4000
ddMS2	Top 10
扫描质量范围	300-4000
碰撞能量	30%

### 4. 数据分析

原始MS文件经过BioPharma Finder™3.0进行分析。通过对阿达木单抗序列的处理数据进行肽鉴定。所使用的搜索参数为:选择具有中等特异性的胰蛋白酶,将羧甲基化(+58.005Da)设置为Cys残基的静态修饰;Met和Trp的氧化(+15.995Da); Asn和Gln的脱酰胺化(+0.984 Da); N端Glu的焦谷氨酰胺化Glu(-18.011 Da);C端剩余Lys (+128.095 Da),以及常见的单克隆抗体糖基化如G0、G0F、G1F、G2F设置为可变修饰。数据经过过滤,仅报告质量耐受性为 $\pm 15$  ppm的多肽。

### 5. 结果分析

#### 5.1 系统适用性

MSRT1是含有14种合成肽的标准品,用于评估LC-MS系统的性能、比较LC梯度和色谱柱或监测其他系统变化。MSRT1也被用于预测LC-MS平台上肽的保留时间。每段多肽都包含一个重同位素标记的氨基酸,以消除样品中多肽的干扰。MSRT1可用于多反应监测(MRM)实验。结果如图1所示:

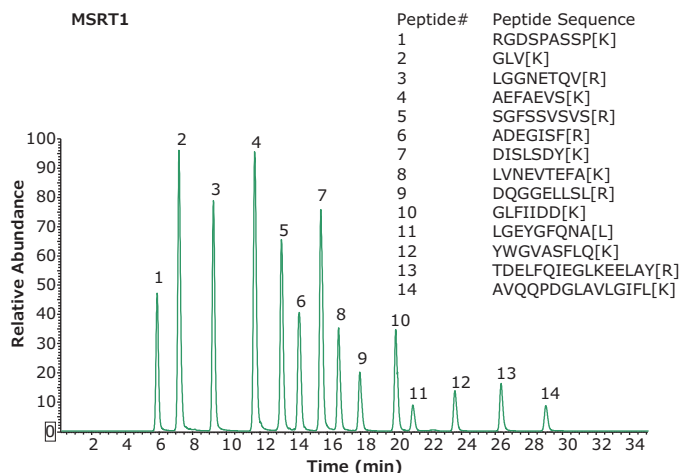


图1:使用两根Ascenents™ Express Peptide ES-C18色谱柱(1.0mmx150 mm, 2.7 $\mu$ m)分离MSRT1肽的基峰色谱图。插图中括号内的氨基酸表示同位素标记的氨基酸

#### 5.2 肽谱分析

传统的LC-MS肽谱分析过程通常很繁琐,需要在较高的pH值和温度下对样品进行隔夜蛋白酶消化。这些步骤中可能发生天冬酰胺脱酰胺和蛋氨酸氧化,其程度取决于条件,如所用试剂、离子强度、温度、pH值和孵育时间等。本解决方案提供的方法可以最大限度地减少假阳性结果,以获得更准确的内源性脱酰胺和氧化水平的测定。此外,通过使用Microcon® 离心超滤管,整个过程得到进一步地简化。

两根色谱柱偶联得到的分离结果如图2所示。由于Ascenents™ Express使用的熔融核颗粒柱压较低,因此可以满足偶联时的背压要求。实验结果也表明使用两根色谱柱偶联可以对亲水多肽更好地保留和分离。

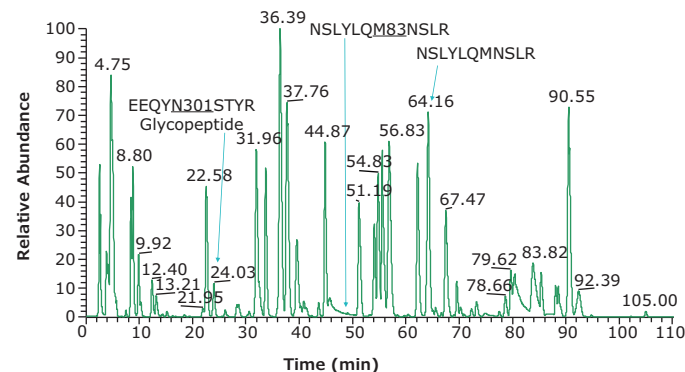


图2:阿达木单抗酶解得到多肽的基峰色谱图。重链糖基化肽(EEQYN301STYR)在24.03分钟被洗脱。使用双柱偶联,我们观察到了一些亲水多肽如PGK, SCDK, VDK分别在3.95, 2.57和2.76分钟被洗脱。多肽NSLYLQM83NSLR及其氧化形式NSLYLQMNSLR分别在49.30和64.16 min被洗脱。

重链糖基化肽(EEQYN301STYR)的质谱图及丰度统计图如图3所示。

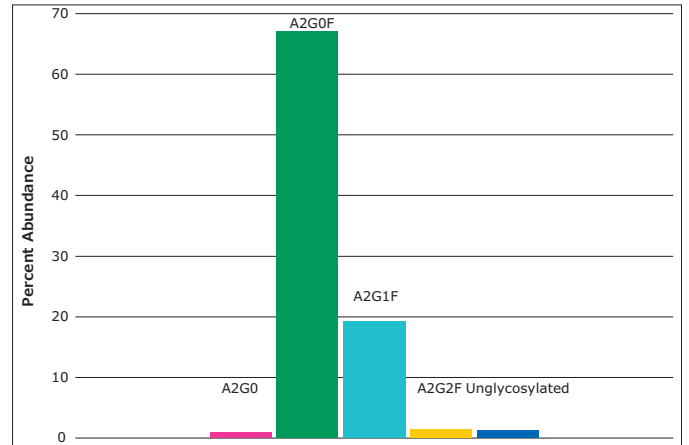
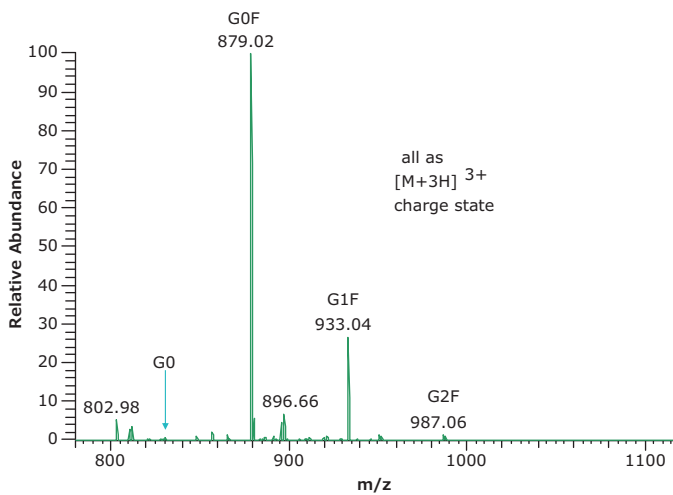


图3: 在天冬酰胺N301上发现的聚糖的质谱(左)和丰度百分比(右)

图4显示了阿达木单抗获得的序列覆盖图,表1总结了序列覆盖结果。再次体现了将两根ascendes® Express Peptide ES-C18柱偶联所获得的优秀:阿达木单抗的重链和轻链的覆盖率均高于93%。

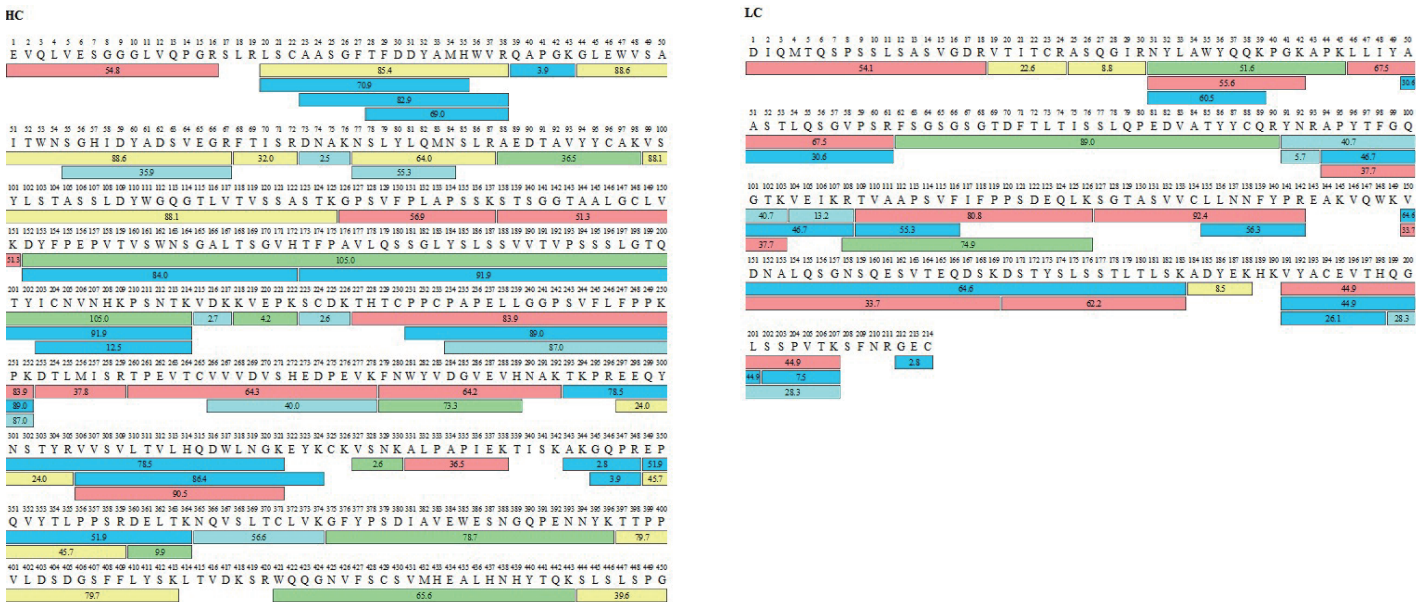


图4: 阿达木单抗重链及轻链序列多肽覆盖率图

表1: 多肽覆盖率统计

亚基	质谱峰数	覆盖率%
重链	127	96.4%
轻链	86	93.9%

本方案使用的低伪影消解缓冲液和消解步骤有助于最大限度地减少样品制备阶段可能发生的氧化和脱酰胺。在这个过程中，基本上没有观察到脱酰胺(低于1%)。图5表明，在几个甲硫氨酸位点发现了氧化，但总体氧化程度低于5%。图6则显示了含有M83氧化位点的肽段。图6中的色谱图显示了一个漏切的例子，尽管这些未被发现的水平被认为是显著的。

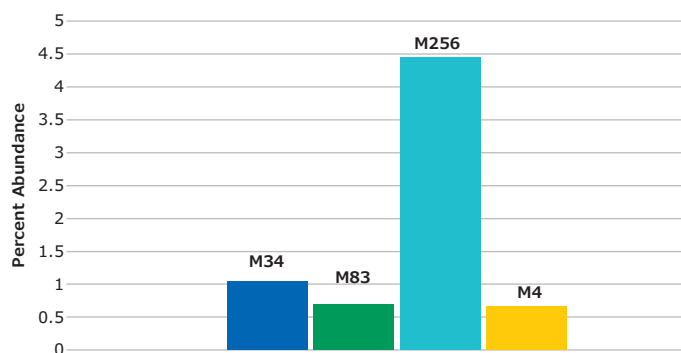


图5: 氧化位点丰度统计图

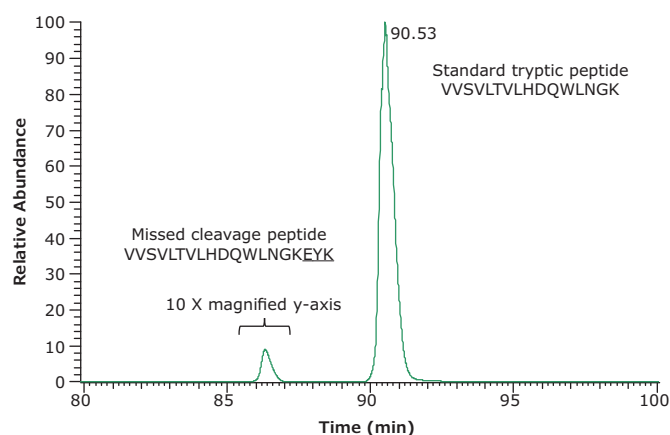


图6: 一个漏切的例子。提取了缺少一个裂解位点的VVSVLTVLHDQWLNGK及对应肽段VVSVLTVLHDQWLNGKEYK的离子色谱图。漏切的肽占总肽的0.6%

## 结论

开发了一个完整的LC-MS/MS解决方案用于单克隆抗体的肽谱分析。本解决方案提供了以下内容:

- 用14种同位素标记的合成多肽混合物进行系统适用性测试
- 过滤系统辅助样品制备程序
- 使用快速酶解试剂盒,用4小时在低伪影消化缓冲液中完成酶解。
- 高序列覆盖率
- 所有试剂、耗材、色谱柱及相关产品的完整清单

## 参考文献:

1. Rogers RS, Nightlinger NS, Livingston B, Campbell P, Bailey R, Balland A. Development of a quantitative mass spectrometry multi-attribute method for characterization, quality control testing and disposition of biologics. *MAbs*. 2015;7(5):881-90.
2. Jenkins N. Modifications of therapeutic proteins: challenges and prospects. *Cytotechnology*. 2007 Apr;53(1-3):121-5.
3. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009 May;6(5):359-62.
4. Vialas V, et al. A multicentric study to evaluate the use of relative retention times in targeted proteomics. *J Proteomics*. 2017 Jan 30; 152:138-149.
5. Analytical artifacts in characterization of recombinant monoclonal antibody therapeutics. D. Wang, C. Nowak, B. Mason, A. Katiyar, and H. Liu. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 183, 113-131 (2020).

<p><b>上海</b> 上海市浦东新区东育路227弄3号 前滩世贸中心(二期)C栋15-20层 电话: (021)20338288 传真: (021)50803042 邮编: 200126</p>	<p><b>北京</b> 北京市朝阳区将台路甲2号 诺金中心25层 电话: (010)59072688 传真: (010)59072699 邮编: 100016</p>	<p><b>广州</b> 广州市天河区冼村路5号 凯华国际中心1201-1204 电话: (020)32255333 传真: (020)32255380 邮编: 510623</p>	<p><b>成都</b> 成都市锦江区人民南路二段1号 仁恒置地广场1706室 电话: (028)80740222 传真: (028)80740227 邮编: 610016</p>
---	--	---	--



**默克生命科学**  
致力于解决生命科学中的棘手问题



**默克生命科学微客服**  
一站式产品货期、定单物流、  
发票、账款查询平台

默克生命科学技术服务热线: 400 620 3333或400 889 1988转2号线  
中国技术服务中心: [tscn@merckgroup.com](mailto:tscn@merckgroup.com)  
更多详情, 敬请登录: [www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com) [www.sigmaaldrich.cn](http://www.sigmaaldrich.cn)  
资料编号: 10/2023