

重组抗体的 N-端氨基酸序列测定

魏敬双 程立均 贾茜

【摘要】目的 建立具有焦谷氨酸封闭 N-端的重组抗体 N-端氨基酸序列分析方法。**方法** 利用高温稳定的焦谷氨酸胺酶,在重组人源抗狂犬病毒单抗样品高温变性条件下,去除其 N-端焦谷氨酸封闭。经还原 SDS-PAGE 和电印迹后,进行 N-端氨基酸序列测定,并与电印迹后在 PVDF 膜上去封闭处理效果进行比较。**结果** 用该方法去封闭后的抗体样品 N-端焦谷氨酸去除效果较好,可顺利进行 N-端氨基酸序列测定;而电印迹后在 PVDF 膜上去封闭处理, N-端焦谷氨酸不能充分去除,无法进行 N-端氨基酸序列测定。**结论** 该方法适于具有焦谷氨酸封闭 N-端的单抗的 N-端氨基酸序列分析。

【关键词】 重组单克隆抗体;焦谷氨酸封闭;N-端氨基酸;序列测定

Sequencing of Amino Acids at N-terminus of Recombinant Antibody

WEI Jing-shuang, CHENG Li-jun, JIA Qian (New Drug R&D Center, North China Pharmaceutical Corporation, Shijiazhuang 050015, China)

【Abstract】 Objective To develop a method for sequencing of amino acids at N-terminus of recombinant antibody with pyroglutamate blockage. **Methods** The pyroglutamate at N-terminus of recombinant human anti-rabies virus McAb was removed at high temperature by using thermal-stable Pfu pyroglutamate aminopeptidase, based on which the McAb was identified by reduced SDS-PAGE and electroblotting and analyzed for sequence at N-terminus. The result was compared with that of McAb deblocked on PVDF membrane after electroblotting. **Results** The pyroglutamate at N-terminus of recombinant human anti-rabies virus McAb was removed effectively by the developed method, and the N-terminal amino acids of McAb after deblocking was sequenced successfully. However, the pyroglutamate at N-terminus of McAb deblocked on PVDF membrane after electroblotting could not be removed effectively, and the N-terminal amino acids could not be sequenced. **Conclusion** The developed method was suitable for the N-terminal amino acid sequencing of McAb with pyroglutamate blockage.

【Key words】 Recombinant monoclonal antibody; Pyroglutamate blockage; N-terminal amino acid; Sequencing

生物工程产品的质量控制是保障产品质量的关键,其中 N-端氨基酸序列测定是分析蛋白质一级结构的一个重要环节,可以考察信号肽切割是否整齐、目的产物在培养液中以及分离纯化过程中是否有降解等。

重组人源抗狂犬病毒单克隆抗体(Recombinant human anti-rabies virus monoclonal antibody, rhRMcAb)是采用基因工程技术,用 CHO 细胞表达的全人源抗体,属于 IgG1 亚型,用于狂犬病病毒暴露后预防。该抗体的轻链、重链 N-端氨基酸均为谷氨酰胺,由于自发环化反应成为焦谷氨酸,造成 N-端封闭,无法直接进行基于 Edman 降解反应的氨基酸序列测定。本研究对去除 N-端焦谷氨酸封闭的方法进行了摸索,确定了简便、快速的去封闭方法。去封闭后的样品经 SDS-PAGE、电印迹后,用氨基酸序列分析仪可顺利进行 N-端氨基酸序列测定。

1. 材料与方法

1.1 试剂及仪器

焦谷氨酸胺酶, Pfu Pyroglutamate Aminopeptidase, 10 mU, 购自 TaKaRa 公司;焦谷氨酸胺酶, Pyroglutamate Aminopeptidase from *E. coli*, 0.01 U, 购自 Fluka 公司;重组人源抗狂犬病毒单抗原液(批号 20060501)及理化测定对照品(批号 20051101), 浓度约 2.0 mg/ml, 均由本公司制备;SDS-PAGE 及电印迹装置为 Bio-Rad 公司产品;PVDF 电转膜为 Millipore 公司产品。

1.2 电印迹后在 PVDF 膜上去封闭处理

按文献[1]方法进行。重组人源抗狂犬病毒单抗原液经还原 SDS-PAGE 分离轻链、重链后,电印迹至 PVDF 膜上。切下膜上带有蛋白质条带的部分,用少量乙腈润湿,再浸泡于含 100 mmol/L 乙酸的 0.5% (v/w) 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)-40 中,在 37℃ 保温 30 min 以封闭膜上未结合蛋白质的位点;用 5 ml 去离子水冲洗膜片至少 10 次后,将膜浸泡于含 5 mmol/L 二巯苏糖醇(DTT)、10 mmol/L EDTA 和 10% (w/v) 乙腈的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 8.0)中,加入 Flu-

基金项目:“十一五”863 计划生物和医药技术领域重大项目(2006AA02A247)。

作者单位:华北制药集团新药研究开发有限责任公司生物技术研究室(石家庄 050015)。

通讯作者:魏敬双, E-mail: weijsh@hotmail.com

ka 焦谷氨酸胺酶(0.2 mU/ μ l), 30℃反应 24 h; 用去离子水清洗膜片后, 晾干。干燥后的 PVDF 膜送北京大学生命科学院, 用 ABI Procise 491 测序仪测定 N-端氨基酸序列。

1.3 在溶液中去封闭处理后再电印迹

在 1.5 ml 离心管中, 依次加入 TaKaRa 焦谷氨酸胺酶(10 mU/50 μ l) 25 μ l, 消化缓冲液(50 mmol/L PB, 10 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, pH 7.0) 68 μ l, 5% Tween-20 溶液 2 μ l, 重组人源抗狂犬病毒单抗原液 5 μ l, 混匀, 置于 75℃水浴中反应 6 h。进行还原 SDS-PAGE, 分离胶浓度 12.5%。将蛋白带电印迹至 PVDF 膜上, 考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色, 晾干。干燥后的 PVDF 膜送北京大学生命科学院, 用 ABI Procise 491 测序仪测定 N-端氨基酸序列。

2. 结果

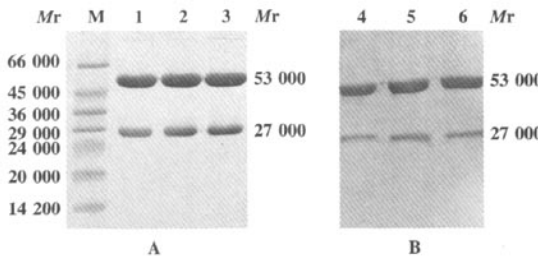
2.1 电印迹后在 PVDF 膜上去封闭处理的效果

抗体样品经还原 SDS-PAGE 分离重链、轻链的图谱及电印迹膜染色图谱见图 1。电印迹后在 PVDF 膜上进行去封闭处理, N-端的焦谷氨酸不能充分去除, 仍有大量焦谷氨酸存在于肽链 N-端, 用氨基酸序列分析仪仍无法进行测定。

2.2 在溶液中去封闭处理后再电印迹的效果

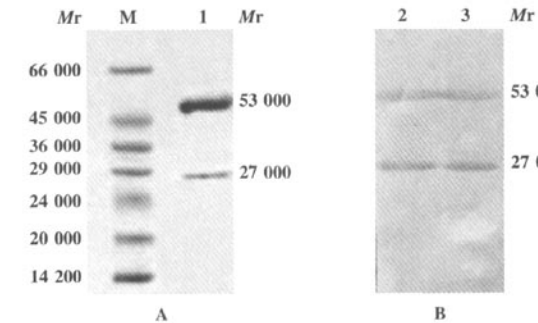
抗体样品在溶液中进行高温去封闭处理后, 还原 SDS-PAGE 和电印迹膜考马斯亮蓝染色图谱与抗体样品直接进行还原 SDS-PAGE 和电印迹的图谱一致, 见图 2。在电印迹膜上用测序仪可顺利测出 N-端氨基酸序列。用此方法对重组人源抗狂犬病毒单抗原液(批号 20060501)和理化测定对照品(批号 20051101)进行 N-端 15 个氨基酸的序列测定, 原液样品的 N-端前 3 个氨基酸的测序结果见图 3 和图

4, N-端 15 个氨基酸的测定结果见表 1, 与理论序列一致。



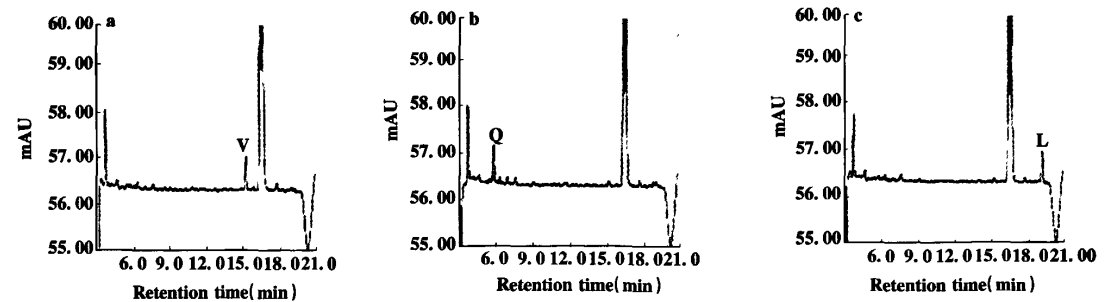
M: protein Mr marker; 1 ~ 6: rhRMCAb.
图 1 rhRMCAb 还原 SDS-PAGE(A)及电印迹膜考马斯亮蓝染色(B)图谱

Fig 1. Reduced SDS-PAGE (A) and PVDF membrane (B) profiles of rhRIG after Coomassie brilliant blue staining

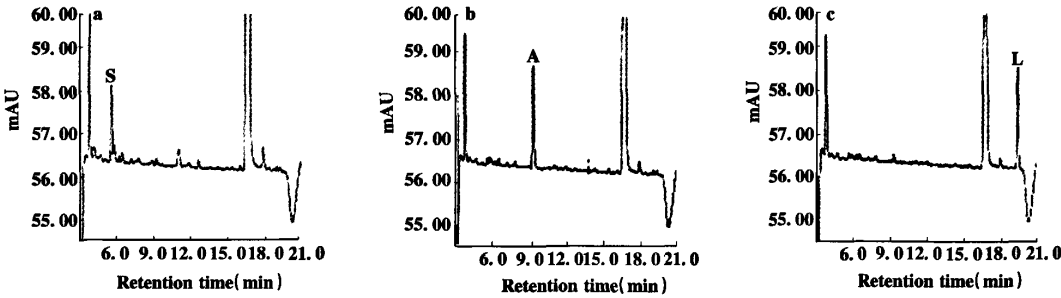


M: protein Mr marker; 1 ~ 3: rhRMCAb.
图 2 rhRMCAb 去封闭处理后的 SDS-PAGE(A)和电印迹膜考马斯亮蓝染色(B)图谱

Fig 2. SDS-PAGE(A) and PVDF membrane (B) profiles of rhRMCAb after deblocking treatment (stained with Coomassie brilliant blue)



a: Residue 1; b: Residue 2; c: Residue 3.
图 3 用焦谷氨酸胺酶消化后 rhRMCAb 重链的 N-端前 3 个氨基酸测序图
Fig 3. Sequencing of 3 amino acid residues at N-terminus of rhRMCAb heavy chain after digestion with pyroglutamate aminopeptidase



a: Residue 1; b: Residue 2; c: Residue 3.

图 4 用焦谷氨酸胺酶消化后 rhRMcAb 轻链的 N-端前 3 个氨基酸测序图

Fig 4. Sequencing of 3 amino acid residues at N-terminus of rhRMcAb light chain after digestion with pyroglutamate aminopeptidase

表 1 封闭处理后 rhRMcAb N-端 15 个氨基酸测序结果

Tab 1. Sequencing of 15 amino acids at N-terminus of rhRMcAb after deblocking treatment

No.	Amino acid residue	
	Heavy chain	Light chain
1	Val	Ser
2	Gln	Ala
3	Leu	Leu
4	Val	Thr
5	Gln	Gln
6	Ser	Pro
7	Gly	Arg
8	Ala	Ser
9	Glu	Val
10	Val	Ser
11	Lys	Gly
12	Lys	Ser
13	Pro	Pro
14	Gly	Gly
15	Ser	Gln

3. 讨论

重组蛋白质药物的 N-端氨基酸序列测定是其质量控制的一个重要环节。对于 N-端焦谷氨酸的去除,已进行了多方面的实验探索^[1-4]。目前,市场上有多个不同来源的焦谷氨酸胺酶产品,其推荐的使用方法也不尽相同^[2-4]。因此,需要根据大多数目标产品的情况,建立适合的去封闭的方法。

在电印迹后的膜片上进行原位去封闭处理,首先需要将含有蛋白质条带的膜片剪得很小,尽量去除不含蛋白质条带的部分,尽管如此,要保证膜片被反应溶液充分浸泡并反应完全仍存在较大困难。本实验室用这种方法进行过多次重复试验,但均未获得预期效果。

在溶液中进行去封闭处理后再进行电泳、电印迹,相对于在膜片上进行去封闭处理,可以对更多的蛋白质样品进行处理。为了从一个很大的蛋白质分子的 N-端去除焦谷氨酸,如何使焦谷氨酸胺酶有效地接近 N-端的焦谷氨酸成为首先需要解决的问题。芬兰 Turku 大学的研究者证明,破坏免疫球蛋白肽链的二级结构作用力以使肽链充分伸展,将 N-端残

基充分暴露,是酶解法去除 N-端焦谷氨酸残基的必要条件^[4]。如何保证肽链的充分伸展,不同研究者尝试了多种方法^[2,3]。以前常采用的方法是首先用变性剂对封闭蛋白进行变性处理,还原二硫键并对巯基进行烷基化保护,使得多肽链充分伸展后,再用焦谷氨酸胺酶对样品进行去除焦谷氨酸的消化反应。由于前处理步骤繁多,反应时间长,反应效率较低。

TaKaRa 公司的外切型氨肽酶 Pfu Pyroglutamate Aminopeptidase 来源于高度耐热古细菌 *Pyrococcus furiosus*, 因此高度耐热,能从被焦谷氨酸修饰的蛋白质或肽的 N-端上水解释放焦谷氨酸。由于能够在高温蛋白质变性条件下产生有效作用,因此蛋白质样品不必再进行变性剂处理以及还原、巯基烷基化等复杂操作。高温变性条件下,多肽链充分伸展,N-端的焦谷氨酸可充分暴露,被氨肽酶水解后释放到溶液中。表面活性剂 Tween-20 在溶液中增加了变性条件下蛋白质样品的溶解性,使得消化反应更加完全。

使用高温稳定的焦谷氨酸胺酶在高温变性蛋白质溶液中进行去封闭处理的方法操作简便、回收率高,重复性好。用该方法对本公司的另外两种重链 N-端具有焦谷氨酸封闭序列的重组抗体进行去封闭处理,同样得到了较好的效果。

参考文献

[1] 坎普 RM, 威特曼-利伯德 B, 乔里-帕帕多普洛 T. 蛋白质结构分析: 制备、鉴定与微量测序. 施维瀚, 饶子和, 陈常庆, 等. 译. 北京: 科学出版社, 2000: 115-116.
[2] Werner WE, Wu S, Mulkerrin M. The removal of pyroglutamic acid from monoclonal antibodies without denaturation of the protein chains. Anal Biochem, 2005, 342(1): 120-125.
[3] Mozdzanowski J, Bongers J, Anumula K. High-yield deblocking of amino termini of recombinant immunoglobulins with pyroglutamate aminopeptidase. Anal Biochem, 1998, 260(2): 183-187.
[4] Hellström JL, Vehniäinen M, Mustonen M, et al. Unfolding of the immunoglobulin light and heavy chains is required for the enzymatic removal of N-terminal pyroglutamyl residues. Biochim Biophys Acta, 2006, 1764(11): 1735-1740.

(收稿日期: 2008-04-30)