

抗体表征工具

Antibody Characterization Tools

抗体纯化用磁珠

Antibody Purification

抗体肽谱用蛋白酶

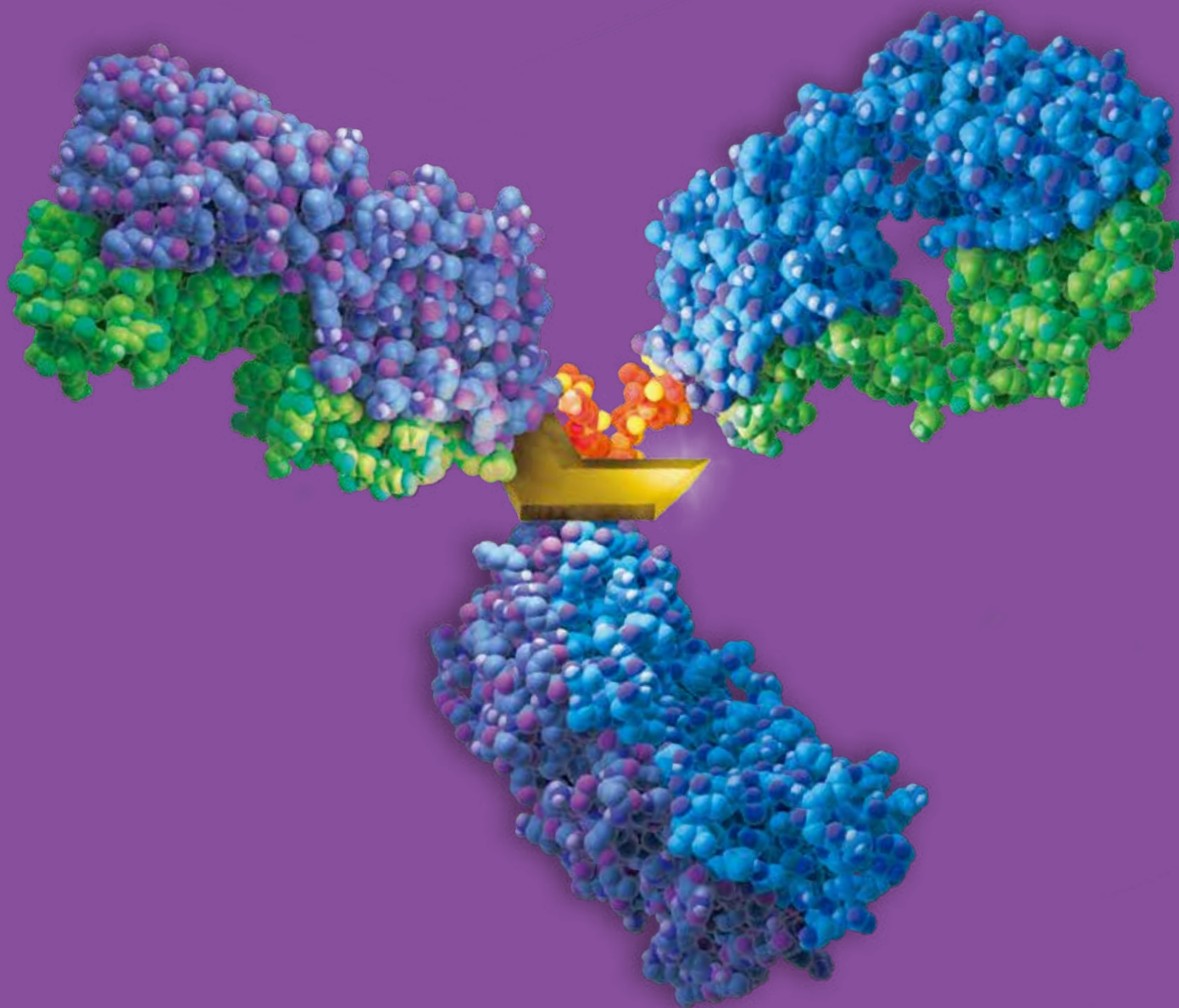
MS Proteases

糖基化分析

Glycosylation

抗体稳定性检测

Antibody Stability





抗体是具有复杂、异质性结构的大分子，通常不稳定且对外部条件敏感。鉴于其高度复杂性，抗体作为生物药物的开发过程需要一套全面的、高度准确和稳健的生物分析工具，用于：

- 抗体特性鉴定
- 单克隆抗体 (mAb) 的纯化
- 肽谱分析
- 糖基化分析
- 翻译后修饰 (PTM) 分析
- 单克隆抗体的内吞作用分析

在整个大分子药物开发流程的所有阶段中，蛋白分析鉴定都是至关重要的。**Promega 可提供多种抗体表征分析工具组合**，用于抗体纯化、肽谱分析、糖基化及翻译后修饰的分析等，且久经验证，推动药物研发的整个进程。另外还提供抗体生产过程中残留物的检测。

目录 Content

抗体纯化

- Magne® Protein G 与 Magne® Protein A Beads P4

抗体肽谱分析样本制备

- IdeS & IdeZ P6
- Trypsin Platinum P8
- ProAlanaase P10
- rAsp-N P12
- rLys-C P13
- AccuMAP™ Low pH Protein Digestion Kit P14

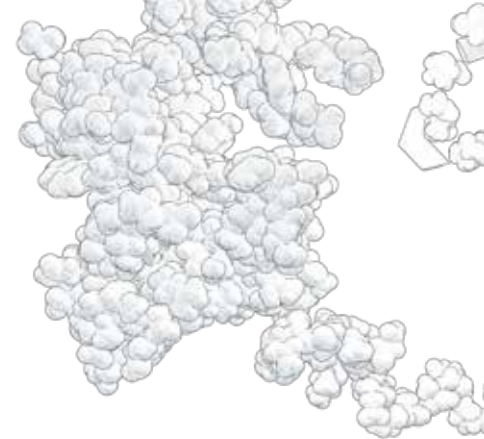
糖基化分析

- 糖苷酶 - PNGase F, Endo H P16

抗体稳定性检测

- ISOQUANT® Isoaspartate Detection Kit P18

产品汇总列表 P19

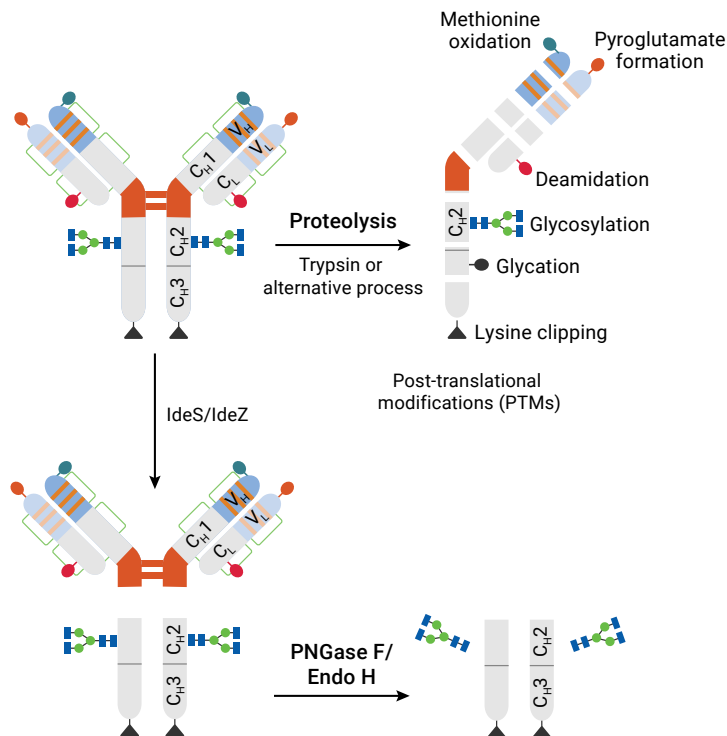


产品选择指导

	抗体纯化	抗体表征与片段分析样本处理					抗体稳定性检测
实验需求 Needs	免疫球蛋白 IgG 纯化	免疫球蛋白 IgG 降解生成 Fc 和 Fab 段	准确的生物治疗蛋白表征（优越的自身蛋白水解抗性；不含动物源性成分）	胰蛋白酶不适用的质谱分析场景中高效的替代方案（不含动物源性成分）	抑制人为造成的非酶 PTMs 的蛋白消化分析	糖基化分析	抗体生产或储存过程中是否发生脱酰胺
推荐产品 Products	抗体纯化磁珠 - Magne[®] Protein G Beads - Magne[®] Protein A Beads	免疫球蛋白水解酶 - IdeS - IdeZ	重组胰酶 Trypsin Platinum	重组可替代蛋白酶 - ProAlanas - rLys-C - rAsp-N	低 pH 蛋白酶 AccuMAP[™] Low pH Protein Digestion Kit	糖苷酶 - PNGase F - Endo H	异天冬氨酸检测试剂盒 ISOQUANT[®] Isoaspartate Detection Kit
使用注意事项 Notes	- 产品为磁珠浆液。 - 搭配磁力架使用。	- 冻干粉。 - 需自行配制反应缓冲液。	- 冻干粉。 - 需自行配制反应缓冲液。 - 更多胰酶产品详见“肽谱分析用蛋白酶类产品”产品介绍手册。	- ProAlanas 为冻溶液。 - rAsp-N 和 rLys-C 为冻干粉。 - 需自行配制反应缓冲液。 - 更多可替代蛋白酶产品详见“肽谱分析用蛋白酶类产品”产品介绍手册。	完整试剂盒。	- 冻溶液。 - 可配套 Promega 提供的 Fetuin 糖蛋白标准品完成实验。	- 完整试剂盒。 - 使用了 FDA 推荐的 HPLC 方法。 - 可配套 Promega 胰酶产品一起完成检测。

常见抗体鉴定方法

Common Antibody Characterization Methods



抗体蛋白纯化磁珠

Magne[®] Protein G Beads 和 Magne[®] Protein A Beads

✓ 重组蛋白 A 和 G

✓ 高纯度，低非特异性结合

✓ 高结合力

✓ 抗体损失率低

Magne[®] Protein G 和 Magne[®] Protein A Beads 是高特异性和高容量的磁性亲和珠，专门用于从细胞培养基、腹水及血清样本中便捷地纯化抗体。无论是单个样品还是多路平行处理，甚至是进行高通量自动化操作，这些磁珠都能轻松完成抗体纯化工作。

Magne[®] Protein A Beads 采用重组的金黄色葡萄球菌来源的蛋白 A，而 Magne[®] Protein G Beads 则采用链球菌来源的重组蛋白 G，两者都通过共价且定向的方式固定于磁性微珠表面。

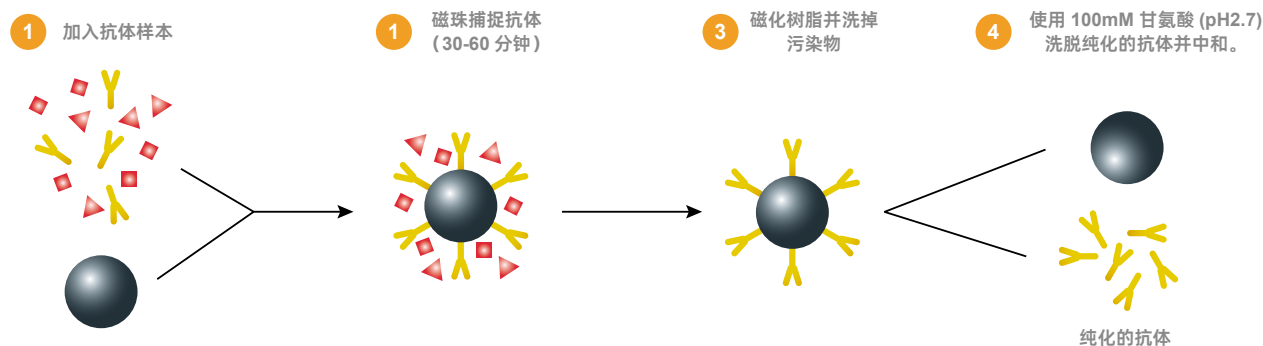
特点

- 简单易用。
- 纯化抗体的纯度和回收率高。
- 不需要昂贵的仪器。
- 并行处理 1-96 个样本。
- 轻松处理 20μl 至 50ml 的样品体积。
- 净化可以自动化。

	Magne [®] Protein A Beads	Magne [®] Protein G Beads
目录号与规格	G8781 (1ml) G8782 (5X1ml) G8783 (50ml)	G7471 (1ml) G7472 (5X1ml) G7473 (50ml)
蛋白来源	金黄色葡萄球菌来源的重组蛋白 A	链球菌来源的重组蛋白 G
抗体高亲和力 (其他抗体亲和力见说明书)	• 人类多克隆抗体 IgG 和单克隆抗体 IgG1, IgG2, IgG4。 • 小鼠单克隆抗体 IgG2A。 • 兔多克隆抗体。	• 人类多克隆抗体 IgG 和单克隆抗体 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4。 • 小鼠单克隆抗体 IgG2A。 • 大鼠 IgG2a。 • 兔、牛、山羊多克隆抗体。
磁珠成分	大孔纤维素磁珠	
化学成分	使用 HaloTag [®] 技术定向共价连接蛋白质 A 或蛋白质 G	
适用样本类型	细胞培养基，腹水和血清标本	
粒径	30-80μm	
抗体结合力	≥18mg 人类 IgG / 1ml settled 磁珠 (即 5ml 磁珠浆液)	
产品形式	20% 乙醇中的 20% 磁珠浆液	
适配磁力架	MagneSphere [®] Technology Magnetic Separation Stand (目录号 Z5331, Z5332, Z5333, Z5341, Z5342, Z5343, Z5410, V3031)	

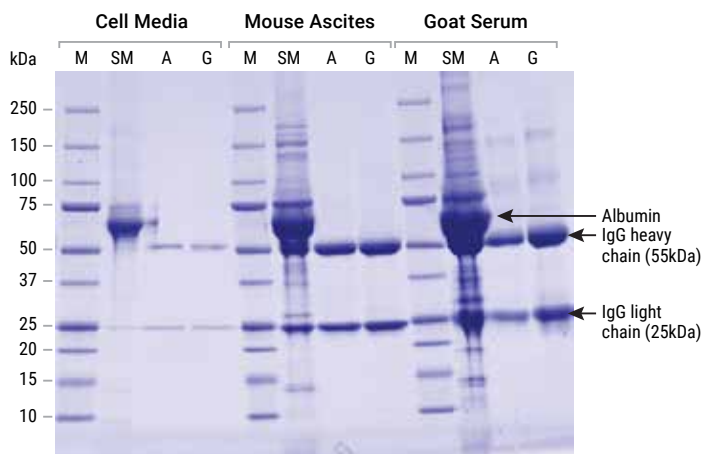
简要操作流程

当加入生物样本后，样本中的抗体即被这些磁珠捕获。借助磁性分离装置，磁珠可以轻松吸附，未结合的杂质则被洗去。最后，通过低 pH 缓冲液将抗体洗脱下来，并对溶液进行中和处理，从而回收得到纯化的抗体。见下图：



使用 Magne® Protein G Beads 和 Magne® Protein A Beads 从各种样品类型中纯化的抗体。

右图：根据说明书（Technical Manual #TM371），用 50μl Magne® Protein A Beads（A）和 Magne® Protein G Beads（G）从 50μl 细胞培养基（小鼠 IgG1）、小鼠腹水（IgG2a）和山羊血清中纯化抗体。通过加入 1μl 起始材料（SM）或 5μl 纯化样品（A 或 G），通过 SDS-PAGE 分离样品，并用考马斯亮蓝染色。



应用文献

Citations

1. A Single-Cell Atlas of the Tumor and Immune Ecosystem of Human Breast Cancer. *Cell*. 2019 May 16; 177(5): 1330–1345.
产品：Magne® Protein A Beads (G8781)
2. DNA methylation changes underlie the long-term association between periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 21 April 2023.
产品：Magne® Protein A Beads (G8781)
3. Spike-Dependent Opsonization Indicates Both Dose-Dependent Inhibition of Phagocytosis and That Non-Neutralizing Antibodies Can Confer Protection to SARS-CoV-2. *Frontiers in Immunology*, Jan 2022, vol 12 ,808932
产品：Magne® Protein G Beads
4. On-bead antibody-small molecule conjugation using high-capacity magnetic beads. *Journal of Immunological Methods*, 426 (2015) 95–103
产品：Magne® Protein A Beads 和 Magne® Protein G Beads

免疫球蛋白 IgG 降解酶

IdeS 与 IdeZ

✓ 重组蛋白酶

✓ 高度特异性的 IgG 切割

✓ 产生 Fc 和 Fab 片段

✓ 最快可在 30 分钟内完成消化

免疫球蛋白降解酶 S(IdeS) 和免疫球蛋白降解酶 Z(IdeZ) 是 E.coli 中重组高度特异性蛋白酶，特异性酶切免疫球蛋白 G (IgG)，酶切后产生 F(ab')₂ 和 Fc 片段，基本上可以达到 100% 完全消化。两种蛋白酶上均含有 His 标签，可通过亲和纯化去除蛋白酶，只保留需要的目的蛋白片段。

特点

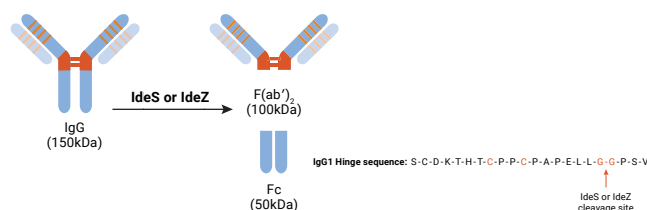
- **快速简便：**最快 30 分钟内消化，无需优化。
- **高度特异性和可重复性：**仅在抗体铰链下方的单个位点切割，产生 F(ab')₂ 和 Fc 片段。
- **多功能：**IdeS 和 IdeZ 都能有效切割人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4、猴子、绵羊、兔子、人源化和嵌合 IgG 以及 Fc 融合蛋白。然而，IdeZ 蛋白酶对小鼠 IgG2a 和 IgG3 的切割能力明显优于 IdeS 蛋白酶。
- **高性能：**基本上完全消化。

应用

- LC/MS 分析以展示待测治疗性抗体的特性。
- 目前有文献和实际应用案例表明 IdeS 也可以用于基因治疗药物临床前动物模型实验给药前，动物体内 AAV 中和抗体的消除。（见应用文献 1）

	IdeS	IdeZ
目录号与规格	V7511 (5000u) V7515 (5X5000u)	V8341 (5000u) V8345 (5X5000u)
产品性质	冻干粉	
来源	<i>Streptococcus pyogenes</i> 化脓性链球菌 (主要宿主：人)	<i>Streptococcus equi</i> 兽疫链球菌 (主要宿主：马)
酶切位点	IgG 铰链区下方的单一位点	
酶切样本类型	• 人，人源以及嵌合 IgG； • 猴，绵羊，兔的 IgG； • 小鼠 IgG 不推荐，切割活性低 • Fc 融合蛋白。	• 人，人源以及嵌合 IgG； • 猴，绵羊，兔的 IgG； • 小鼠 IgG2a 和 IgG3； • Fc 融合蛋白。
蛋白酶：蛋白比	1u 酶：1μg IgG	
消化的 pH 范围	近中性 pH 值的缓冲液中活性最高	
消化时间	37°C 孵育 30–60 分钟	
反应条件	推荐使用 50mM 磷酸钠，150mM NaCl (pH 6.6)，但常规生物缓冲液如 Tris 或 PBS 也可。	

酶切位点示意图

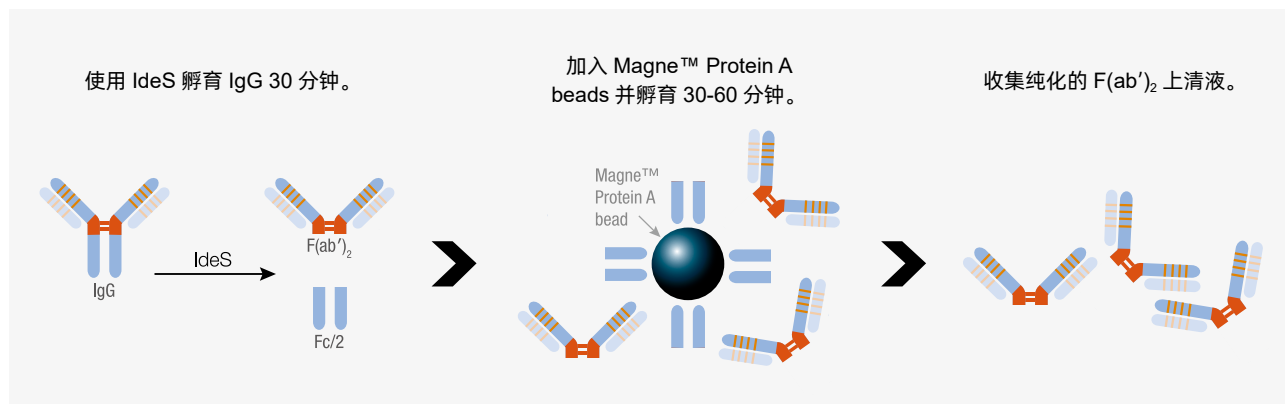


IdeS 和 IdeZ 蛋白酶对人和小鼠 IgG 亚类的活性差别。切割位置用粗体字母表示。

Subclass	Hinge/CH2 Sequence	IdeS Activity	IdeZ Activity
人类	—		
IgG1	CPPCPAPELL GG PSVF	+++	+++
IgG2	CPPCPAPP_ V AGPSVF	+++	+++
IgG3	CPRCPAPELL GG PSVF	+++	+++
IgG4	AHHAQAPEFL GG PSVF	+++	+++

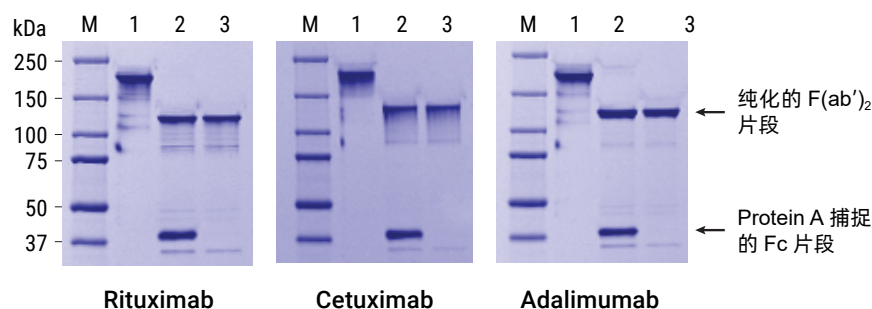
Subclass	Hinge/CH2 Sequence	IdeS Activity	IdeZ Activity
小鼠			
IgG1	PCICTVPEV_S S VF	—	—
IgG2a	CPPCAAPNLL GG PSVF	+	+++
IgG2b	CHKCPAPNLEGGPSVF	—	—
IgG3	GSSCPAGNILL GG PSVF	+	+++

使用 IdeS 蛋白酶和 Magne™ Protein A Beads 制备 F(ab')₂ 片段的简要流程



通过凝胶电泳确定从三个抗体中分离出的 F(ab')₂ 和 Fc 片段。

Fc 片段使用 Magne™ Protein A beads 捕捉。



左图：泳道 1，单独的 IgGs；泳道 2，使用 IdeS 蛋白酶消化 30 分钟以产生 F(ab')₂ 和 Fc 片段；泳道 3，泳道 2 中的消化产物与 Magne™ Protein A 磁珠孵育 30 分钟。Fc 片段被保留在磁性颗粒上，从而在上清液中留下纯化的 F(ab')₂ 片段。如有需要，Fc 片段可以单独在低 pH 缓冲液中洗脱出来。

应用文献

Citations

1. IgG-cleaving endopeptidase enables in vivo gene therapy in the presence of anti-AAV neutralizing antibodies. *Nature medicine* vol. 26,7 1096-1101. (2020)
产品：IdeS
2. Evaluation of automated Wes system as an analytical and characterization tool to support monoclonal antibody drug product development. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 139, 263-8. (2017)
产品：IdeS
3. Excess reactive oxygen species production mediates monoclonal antibody-induced human embryonic stem cell death via oncosis. *Cell Death Differ.* 24, 546-58. (2017)
产品：IdeS

质谱级重组胰蛋白酶

Trypsin Platinum, Mass Spectrometry Grade



重组蛋白酶



高蛋白水解效率



不含动物源性污染蛋白



抗自水解

抗体蛋白的肽谱分析具有一定的特殊性，对所使用的蛋白酶要求与普通蛋白分析相比更为严格。Promega 提供的新型胰蛋白酶 -Trypsin Platinum，具有更高的特异性切割效率，减少了自体消化，增强了对难消化位点的酶解能力，并确保了更纯净的来源与批次间的高度一致性，且不含动物源性蛋白污染，从而为生物治疗性蛋白质的鉴定与分析提供了更为精准可靠的工具。

特点

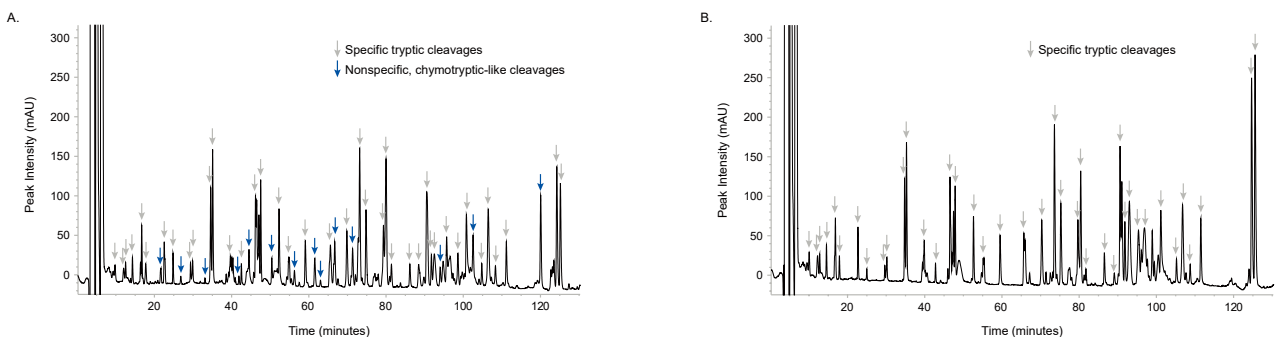
- 蛋白质组学和质谱级胰蛋白酶中常见的无糜蛋白酶活性
- 卓越的抗自水解性
- 适用于任何现有的胰蛋白酶方案
- 出色的批量再现性
- 无动物来源蛋白污染

应用

- 抗体或常规蛋白质谱鉴定与分析
- 适用于 LC/MS 和 RP-HPLC-UV

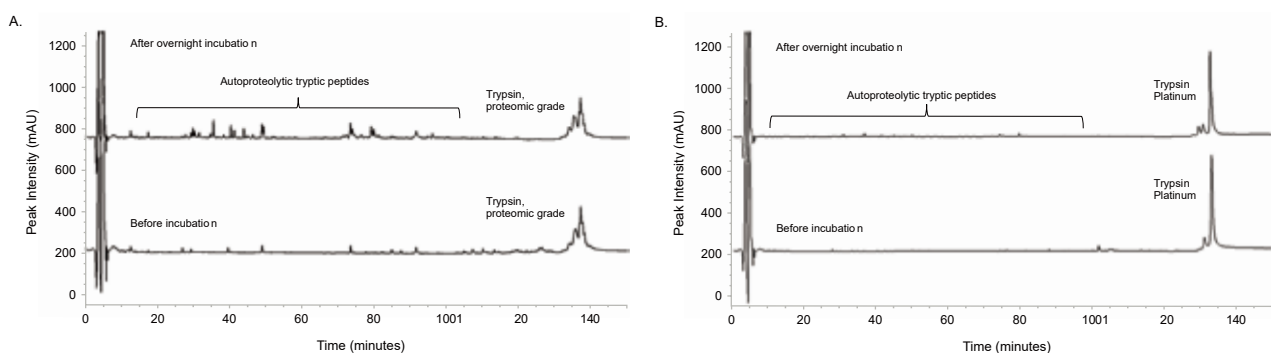
Trypsin Platinum 和其他品牌胰酶的非特异性蛋白水解活性比较

抗体样品：Panitumumab（帕尼单抗）



上图. 以 Panitumumab（Vectibix®）作为蛋白底物。消化反应的胰酶：蛋白比为 1:10。消化的肽以 RP-HPLC-UV 进行分析。用 LC-MS 对肽峰进行分配，以区分特异性切割和非特异性切割。图 A. 数据表明，来自其他品牌的质谱级胰蛋白酶具有显著的非特异性蛋白水解活性。图 B. Trypsin Platinum 仅产生特异性胰酶酶切。

Trypsin Platinum 和其他品牌胰酶的自水解活性比较



上图 . 用传统消化条件孵育品牌 S 的胰酶和 Trypsin Platinum。胰酶以 100mM Tris-HCl (pH 8)/ 2mM CaCl₂ 的溶液重悬, 并在 37°C 孵育过夜。自水解产物以 RP-HPLC-UV 分析。新鲜的, 未孵育的胰酶作为对照进行分析。比较图 A 和图 B, 图 A 中品牌 S 的胰酶 (Proteomic grade trypsin) 可见显著的自水解, 而图 B 中 Trypsin Platinum 的自水解已低到可忽略的水平。

应用文献 Citations

1. CLSTN3B enhances adipocyte lipid droplet structure and function via endoplasmic reticulum contact. *BioRxiv*, January 21, 2024.
2. Improved isolation of extracellular vesicles by removal of both free proteins and lipoproteins. *eLife*, 2023;12.
3. Development of a simple non-reduced peptide mapping method that prevents disulfide scrambling of mAbs without affecting tryptic enzyme activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol 209, 5 February 2022, 114541.

可替代蛋白酶

ProAlanase

✓ 酸性条件下有高活性

✓ PTM 分析样本制备

✓ 消化时间短，只需 1-2 小时

ProAlanase 在抗体蛋白分析中有独特优势，尤其是在需要高度特异性、优化的消化条件或处理复杂修饰时，能够补充或替代传统的蛋白酶，以适应不断发展的生物技术和药物开发需求。

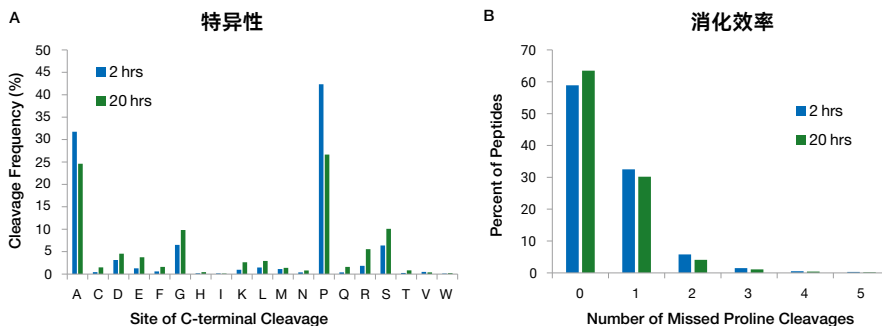
特点

- 特异性切割：**ProAlanase 主要在脯氨酸和丙氨酸残基的 C 端侧进行切割，而抗体序列中可能包含多个脯氨酸和丙氨酸残基，有利于抗体序列的确认、糖基化或其他翻译后修饰的分析，以及对抗体结构域的精细研究。
- 优化的消化条件：**ProAlanase 在酸性 pH 值下表现出高活性，这与许多抗体蛋白的稳定条件相匹配，尤其是在抗体药物和其他生物治疗制品的分析。
- 处理难消化区域：**某些抗体区域可能因为结构原因（如紧密折叠或二硫键形成）而难以被传统蛋白酶完全消化。ProAlanase 的特殊活性可更彻底地消化这些顽固区域，提高肽段的覆盖率和分析的深度。
- PTMs 分析：**抗体中的翻译后修饰（PTMs），如糖基化、磷酸化等，对功能至关重要。ProAlanase 的使用可能有助于保护这些修饰位点免受破坏，从而更好地揭示和分析这些关键的生物标志物。
- 避免干扰：**在抗体纯化和分析过程中，使用 ProAlanase 可以减少潜在的自身消化问题，避免了因胰蛋白酶不特异性的切割而导致的分析干扰，提高了数据的可靠性和准确性。

	ProAlanase, Mass Spec Grade	ProAlanase Plus, Mass Spec Grade
目录号与规格	VA2161 (5µg)	VA2171 (15µg)
产品性质	冻溶液 (0.2µg/µl)	冻溶液 (0.5µg/µl)
来源	<i>Aspergillus niger</i>	
酶切位点	主要切割脯氨酸和丙氨酸残基的羧基端，与胰酶相比，对紧密折叠或二硫键形成区域更有效。	
蛋白酶：蛋白比 (w/w)	1:10 到 1:500	
消化的 pH 范围	pH 1.0 到 5.5	
消化时间	通常只需消化 1-2 小时	
反应条件	建议的起始条件：HCl (pH 1-2.5)，盐酸甘氨酸 (pH 1-2.5)，柠檬酸钠 (pH 3-4)，乙酸钠 (pH 4.5-5.5)，pH 1.5, 37°C 消化不超过 2 小时。	
胶内消化	可以	

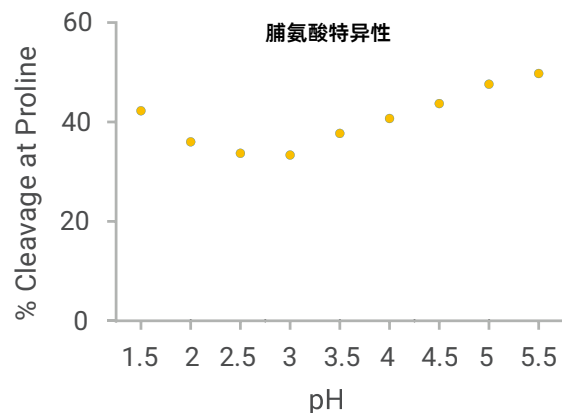
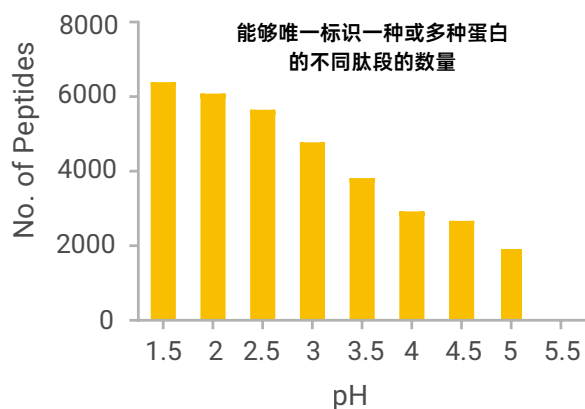
消化时间短，性能更佳

右图：对于 ProAlanase，短时间的消化即能达到最佳的消化效率和特异性（图 A）。较长的消化时间会导致特异性丧失，消化效率也无明显提高（图 B）。



pH 1.5 时的最佳消化效果

下图：当反应环境的 pH 值设定为 1.5 时，ProAlanase 不仅能最有效地识别并切割肽段，而且特别擅长处理或识别那些含有脯氨酸的肽段，从而展现出最佳的活性和选择性



应用文献

Citations

1. Molecular insight into the enzymatic macrocyclization of multiply backbone N-methylated peptides. *bioRxiv*. April 26, 2023
2. Proteomic Analysis of Methylglyoxal Modifications Reveals Susceptibility of Glycolytic Enzymes to Dicarbonyl Stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 3689.
3. ProAlanase is an Effective Alternative to Trypsin for Proteomics Applications and Disulfide Bond Mapping. *Mol Cell Proteomics* (2020) 19(12) 2139–2156.
4. Recycling of cell surface membrane proteins from yeast endosomes is regulated by ubiquitinated Ist1. *J. Cell Biol.* 2022 Vol. 221 No. 11.

可替代蛋白酶

rAsp-N, Mass Spec Grade

✓ 重组蛋白酶

✓ 高活性

✓ 适用于复杂生物样本

rAsp-N, Mass Spec Grade, 是一种重组蛋白酶, 具有很高的活性, 非常适合用于复杂混合物的蛋白质组学分析, 以及纯化蛋白 (比如治疗性单克隆抗体) 的肽图谱分析。

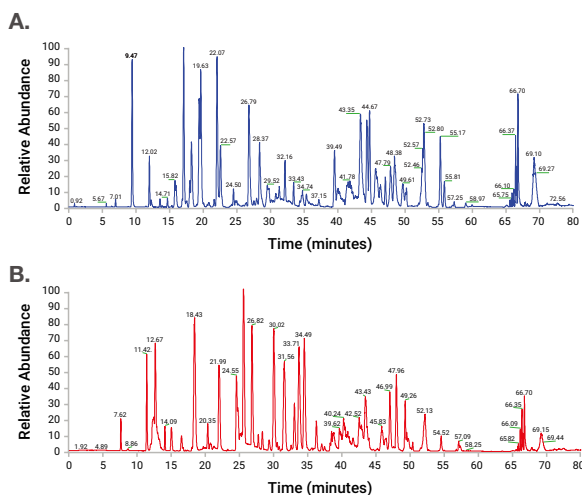
rAsp-N 的特点是其在解析复杂生物样本中的蛋白质组成和结构方面表现出色, 能高效地将蛋白质切割成肽段, 这对于后续通过质谱进行精确鉴定至关重要。

该产品以 10μg 包装供应, 便于用户进行快速且一致的重悬的操作, 保证每次实验的重现性和可靠性。

特点

- 与天然型 Asp-N 相比, 性价比更高。
- 与天然型 Asp-N 相比体积更大 (5 倍的蛋白酶), 制备时一致性更高。
- 用于复杂混合物的蛋白质组分析以及纯化蛋白的肽谱分析

	rAsp-N, Mass Spec Grade
目录号与规格	VA1160 (10μg)
产品性质	冻干粉
来源	克隆自 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , 从 <i>E.coli</i> 纯化
酶切位点	天冬氨酸残基 (Asp) 和谷氨酸残基 (Glu) N 末端的肽键。
蛋白酶 : 蛋白比 (w/w)	1:10 到 1:100
消化的 pH 范围	pH 6-9
消化时间	37°C 消化 60 分钟。
反应条件	50mM Tris (pH 8.0)
胶内消化	未测试



C.

	Sequence Coverage (%)	
mAb Fragment	rAsp-N Digest	Trypsin/Lys-C Digest
Heavy Chain	100	92
Light Chain	100	90

用 rAsp-N 或 Trypsin/Lys-C 进行抗体的肽谱分析

抗体样品: NISTmAb

用 rAsp-N (图 A; 50:1w:w) 或用 Trypsin/Lys-C (图 B; 25:1w:w) 消化 NISTmAb 18 小时的基峰色谱图。使用质谱仪对消化产物进行分析。每个消化产物的序列覆盖范围如表所示 (图 C)。

应用文献

Citations

- REGEN-COVr antibody cocktail bioanalytical strategy: comparison of LC-MRM-MS and immunoassay methods for drug quantification. *Bioanalysis*. 8 November 2021.
- The interactome of the N-terminus of band 3 regulates red blood cell metabolism and storage quality. *Haematologica*, 2021 May.
- Site-specific N-glycan profiles of $\alpha 5 \beta 1$ integrin from rat liver. *Biology of the cell*. 19 March 2022.

可替代蛋白酶

rLys-C, Mass Spec Grade

- ✓ 重组蛋白酶
- ✓ pH8-9 范围内活性最佳
- ✓ 在变性条件下 (如 8M 尿素) 仍有活性

rLys-C, Mass Spec Grade 是在 E.coli 中表达的重组 Lys-C, 与天然的 Lys-C 类似, 非常特异地切割赖氨酸残基的 C 末端。即使在蛋白变性条件 (如 8M 尿素) 下, rLys-C 也能保持蛋白水解活性, 从而可用于提高对不易水解的蛋白质的消化, 改善蛋白水解抗性蛋白质的消化。当 pH 值范围在 8-9 时, rLys-C 具有最佳活性。使用 Promega 提供的配套重悬缓冲液制备的 rLys-C 溶液可在 -20°C 保存 1 个月, 几乎不会损失活性。用 rLys-C 消化单一蛋白和复杂的蛋白混合物, 我们推荐在溶液中或在凝胶中进行。

	rLys-C, Mass Spec Grade
目录号与规格	V1671 (15µg)
产品性质	冻干粉 (提供了重悬缓冲液)
来源	Pseudomonas aeruginosa , 重组酶在 E.coli 中表达
酶切位点	特异地切割赖氨酸残基的羧基端, 如果赖氨酸后面跟脯氨酸, 则不切割。
蛋白酶 : 蛋白比 (w/w)	1:20 到 1:50
消化的 pH 范围	pH 8-9
消化时间	37°C消化 2-18 小时。
反应条件	50-100mM Tris-HCl (pH 8) 或 50mM NH ₄ HCO ₃ (pH 7.8)。
胶内消化	可以

应用文献 Citations

1. Medium-throughput imagebased phenotypic siRNA screen to unveil the molecular basis of B cell polarization. *Scientific Data*, Jun,2023.
2. Multi-Cell Line Analysis of Lysosomal Proteomes Reveals Unique Features and Novel Lysosomal Proteins.*Mol Cell Proteomics* (2023) 22(3) 100509
3. CYP450 core involvement in multiple resistance strains of Aedes aegypti from French Guiana highlighted by proteomics,molecular and biochemical studies. *PLOS ONE*, January 11, 2021.
4. Systemic long-distance sulfur transport and its role in symbiotic root nodule protein turnover. *Journal of Plant Physiology* 297 (2024) 154260.
5. Actin nucleation at the centrosome controls lymphocyte polarity. *Nature Communications*. 18 Mar 2016.
6. Streptomyces polyketides mediate bacteria– fungi interactions across soil environments. *Nature Microbiology* , Vol 8. July 2023, 1348–1361

低 pH 蛋白降解试剂盒

AccuMAP™ Low pH Protein Digestion Kit



PTM 分析样本制备



还原性蛋白和非还原性蛋白消化

4.5-5 小时内可完成

LC/MS 或 UV HPLC 分析

非酶翻译后修饰 (PTMs) 是生物治疗用蛋白在生产 and 储存过程中会自发发生的情况。主要的非酶 PTM 包括脱酰胺、二硫键干扰和氧化。这些修饰会影响生物治疗用蛋白的疗效和稳定性，是需要监测的情况。非酶 PTMs 也可以在制备肽图谱的蛋白质样品制备过程中产生并影响分析。样品制备过程中引起非酶 PTMs 的主要原因包括碱性 pH 和具有蛋白质氧化活性的杂质。

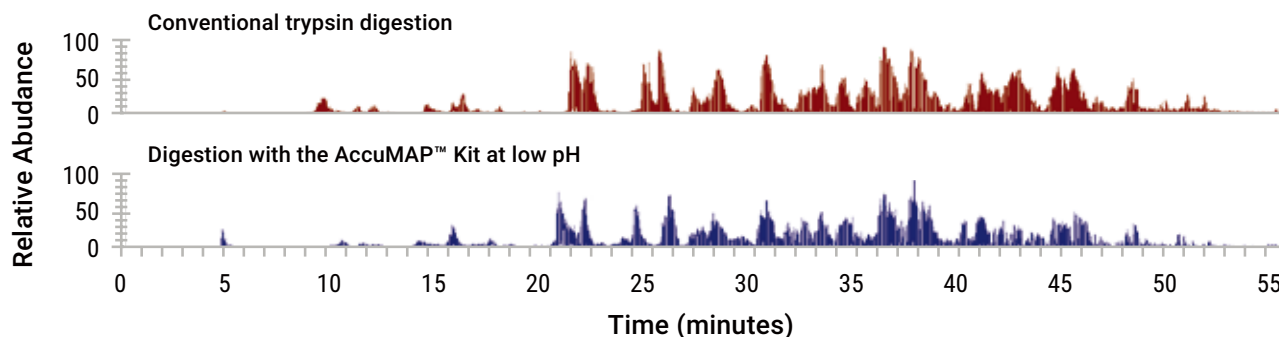
通常用于肽谱分析样品制备时，胰蛋白酶和其他蛋白酶在碱性 pH 值条件下更有效地消化蛋白质。为了避免在这些条件下诱发人工非酶性 PTMs，我们研发了在低 pH 条件下进行胰蛋白酶消化的方法。为了恢复赖氨酸位点的胰蛋白酶切割效率，我们用一种特殊的、低 pH 抗性的重组 Lys-C (rLys-C) 蛋白酶来辅助胰蛋白酶。通过在胰蛋白酶中添加耐低 pH 的 rLys-C，我们在低 pH 下获得了高效的胰蛋白酶消化。

	AccuMAP™ Low pH Protein Digestion Mini Kit	AccuMAP™ Low pH Protein Digestion Maxi Kit
目录号与规格	VA1040 (10 reactions)	VA1050 (100 reactions)
产品所含蛋白酶	含有 Trypsin 溶液和 rLys-C 溶液	
产品性质	试剂盒，含有多种实验所需组分，无需自行配制反应缓冲液。	
酶切位点	即 Trypsin 和 Lys-C 的酶切位点	
消化的 pH 范围	还原和烷基化步骤在 pH 5.6–5.8 下进行 在消化步骤中，pH 值变为 5.2–5.4	
消化时间	4.5-5 小时内可完成	
反应条件	根据试剂盒说明操作	
下游分析应用	LC/MS 或 UV HPLC 分析	

低 pH 条件下的抗体蛋白降解

抗体样品：cetuximab(利妥昔单抗)

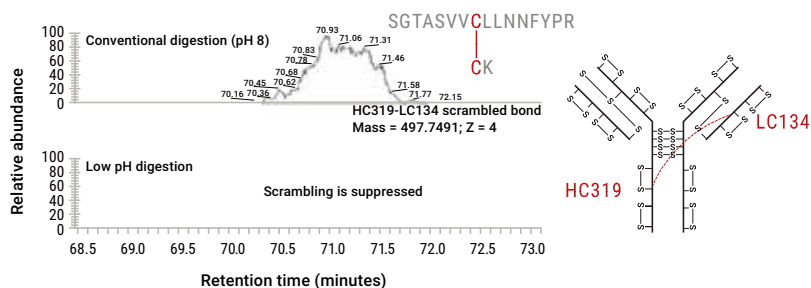
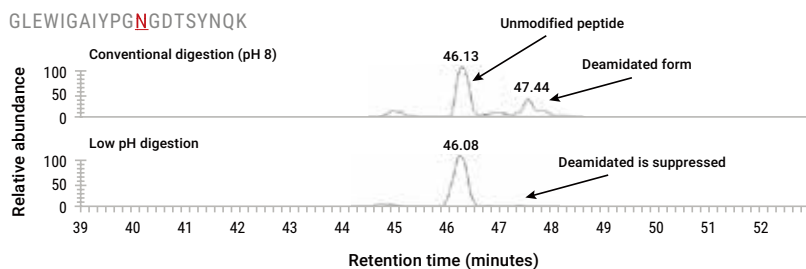
下图：低 pH 条件下，使用 AccuMAP™ Low pH Protein Digestion Kit 高效消化。利妥昔单抗根据常规消化说明书 (pH 8) 或 AccuMAP™ Low pH Protein Digestion Kit 进行消化，用 LC/MS 进行分析。结果表明，低 pH 条件下的消化与常规条件下的消化相当。



抑制脱酰胺和二硫键干扰

抗体样品：cetuximab（利妥昔单抗）

显示以传统条件（pH 8）和低 pH 条件使用 AccuMAP™ Low pH Protein Digestion Kit 从利妥昔单抗中获得的 GLEWIGAIYPGNGDTSYNQK 肽段的萃取离子层析色谱。

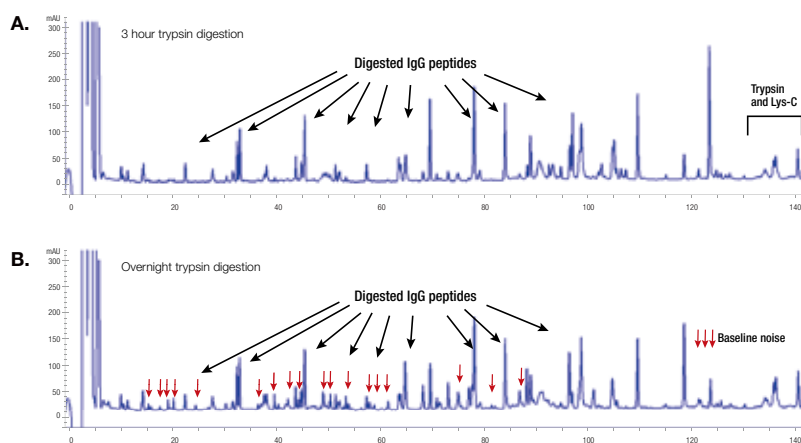


胰酶水解产物中的最小基线噪声

抗体样品：Panitumumab（帕尼单抗）

Panitumumab 的消化产物的 UV-HPLC 图谱。

帕尼单抗首先用 AccuMAP™ Low pH Resistant rLys-C 预消化，然后将反应液稀释，并通过与 AccuMAP™ Modified Trypsin 孵育 3 小时（图 A）或过夜（图 B）来完成消化。在这个实验中，我们使用了 1:5 的胰蛋白酶与蛋白比例。注意面板 B 中过夜消化所示的基础噪音积累。



应用文献 Citations

1. Regulation of the Dimerization and Activity of SARS-CoV-2 Main Protease through Reversible Glutathionylation of Cysteine 300. *mBio*. 2021. Vol 12 Issue 4 e02094-21.
2. Characterization and quantification of succinimide using peptide mapping under low-pH conditions and hydrophobic interaction chromatography. *Analytical Biochemistry*. 566 (2019) 151–1.

糖基化分析

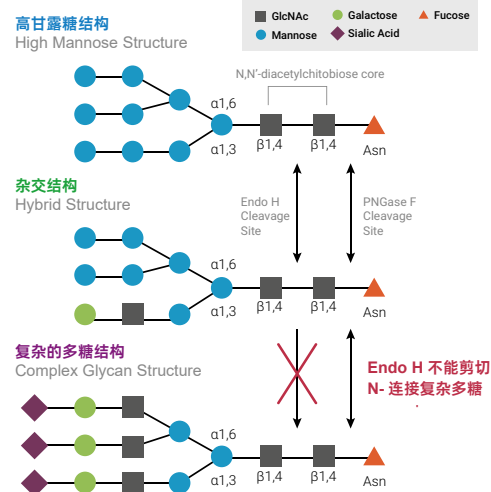
PNGase F, Endo H 糖苷酶

✓ 重组糖苷酶

✓ N 糖基化位置和结构确定

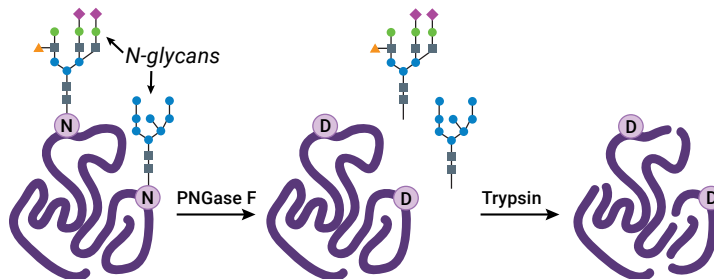
	PNGase F	Endo H (Endoglycosidase H)
中文名	肽 N- 糖苷内切酶 F	糖苷内切酶 H
目录号 / 规格	V4831 (500u)	V4871 (10000u) V4875 (50000u)
产品性质	冻溶液 ((10u/μl)	冻溶液 (500u/μl)
来源	克隆自 <i>Elizabethkingia miricola</i>	克隆自 <i>Streptomyces plicatus</i>
类型	重组糖苷酶	重组糖苷酶
切割	- 在 N- 连糖蛋白的高甘露糖、杂合和复合寡糖部分最内侧的 N- 乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 和天冬酰胺残基之间进行切割。 - 不会去除常见植物糖蛋白上含有核心 α-(1,3)- 岩藻糖连接的寡糖。	- 对 N- 糖蛋白中的高甘露糖和某些杂合型寡糖的核心壳二糖核心进行切割，而不切割复杂多糖。 - 酶切反应切割寡糖二乙酰壳二糖核心的两个 N- 乙酰葡萄糖胺残基，切割后保留天冬酰胺的一个 N- 乙酰葡萄糖胺残基。
应用	- 蛋白质 N- 糖基化位置的确定 - 糖蛋白和聚糖结构的表征 - 蛋白质转运研究，监测蛋白质运输（内质网、高尔基体） - 结构和功能数据的相关性研究	
相关产品	Fetuin	
糖蛋白标准品	目录号及规格：V4961(50ul, 浓度 10mg/ml) 可作为去糖基化底物对照物的糖蛋白，具有 O- 端和 N- 端糖基化位点，用于 PNGase F, EndoH 的活性监测	

PNGase F 和 Endo H 的酶切特异性

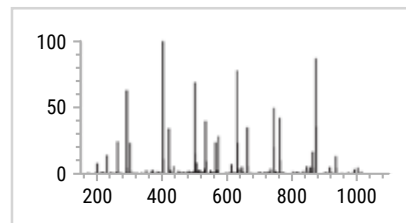


蛋白质中 N- 糖基化位点的鉴定。

Asn 连接的聚糖可以被 PNGase F 酶切，产生完整的低聚糖和一种蛋白质，其中 N- 糖基化位点的 Asn 残基转化为 Asp。



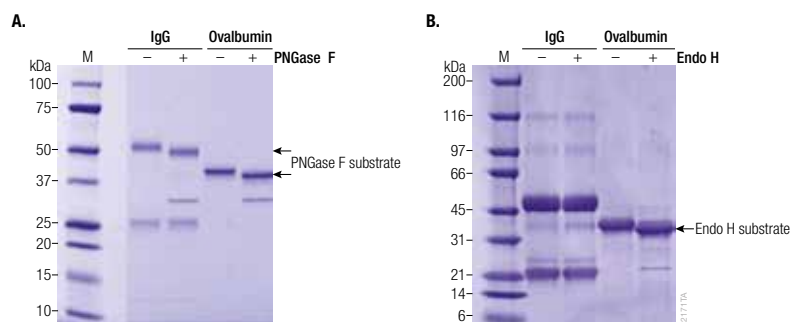
Mass Spec Analysis of Peptides



SDS-PAGE 中 N-糖基化蛋白的检测

样品: IgG, Ovalbumin

聚糖裂解后, 各自的蛋白质在 SDS-PAGE 中显示出更高的流动性。PNGase F (图 A) 和 Endo H (图 B) 的应用对于存在复杂糖结构的情况是有信息价值的, 如该示例中的 IgG 分析结果所示。

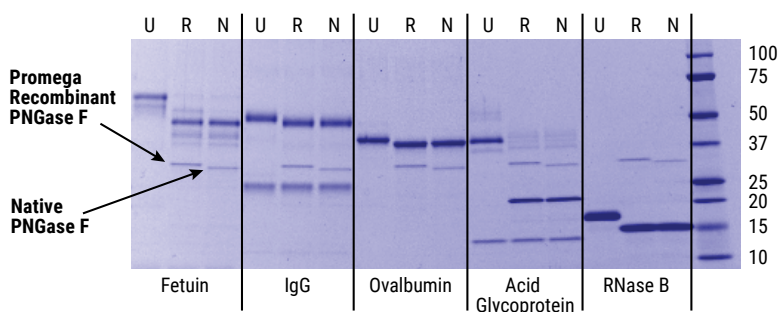


重组和天然 PNGase F 酶对不同糖蛋白的糖基化检测

样品: 多种糖蛋白

用 10u 的 Promega 重组或天然 PNGase F 在 37°C 下处理 20 µg 各种变性糖蛋白标准品 1 小时。通过 SDS-PAGE 的凝胶迁移监测指示去糖基化。

U: Untreated
R: Promega Recombinant PNGase F
N: Native PNGase F



应用文献

Citations

1. Site-specific N-glycan profiles of $\alpha 5 \beta 1$ integrin from rat liver. *Biology of the cell*. 19 March 2022.
产品: PNGase F
2. Identification of gamma heavy chain disease using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2020 March ; 77: 57–61.
产品: PNGase F
3. 2-deoxyglucose transiently inhibits yeast AMPK signaling and triggers glucose transporter endocytosis, potentiating the drug toxicity. *PLOS GENETICS*. August 11, 2022
产品: Endo H
4. DRG2 is required for surface localization of PD-L1 and the efficacy of anti-PD-1 therapy. *Cell Death Discovery* (2024) 10:260.
产品: Endo H

抗体脱酰胺检测

ISOQUANT[®] Isoaspartate Detection Kit

✓ 采用 FDA 推荐的 HPLC 分析

✓ 检测反应可在 1 小时内完成

✓ 灵活的分析通量

ISOQUANT[®] Isoaspartate Detection Kit (ISOQUANT[®] 异天冬氨酸检测试剂盒) 是众多制药企业的优选检测系统, 用于定量检测蛋白及多肽中异天冬氨酸残基, 如单克隆抗体。这种残基可来源于天冬酰胺逐步的非酶化的脱酰胺作用, 或者在储存或处理过程中发生天冬氨酸残基重排。由于本试剂盒不是对电荷的改变量进行监测, 因此电荷的不均一性不会影响分析。

1 样品准备

2 ISOQUANT[®] 异天冬氨酸检测

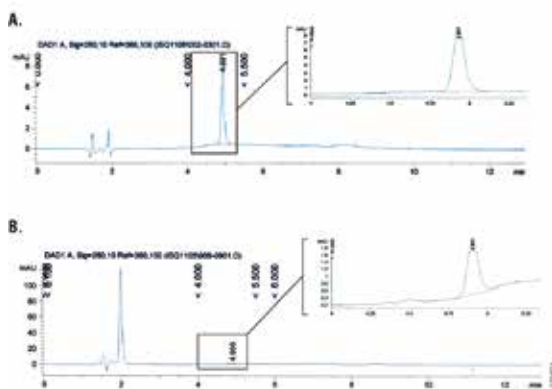
3 RP HPLC 分析

特点

- **使用 FDA 推荐的 HPLC 检测法:** 久经验证, 是众多制药企业的选择。
- **节省成本:** HPLC 检测价格便宜, 又免除了放射性原料处理的麻烦。
- **高效:** 程序简单, 反应在 **1 小时** 内可完成。可使用 HPLC 进行自动样本处理。
- **易分析:** 能够提供定量结果。
- **检测通量灵活:** 既可单样本处理, 也可批量处理。小型样本使分析结果适用于分析研究的方法、试剂配方及流程的改进工作。
- **稳定:** 不受常见缓冲液成分的影响。
- **HPLC 检测方法:** 适用于现有的仪器与技术。
- **灵敏:** 检测由于天冬氨酸重排及脱酰胺作用产生的异天冬氨酸。

	ISOQUANT [®] Isoaspartate Detection Kit
目录号与规格	MA1010 (100 assays)
产品性质	试剂盒, 含有多种实验所需组分。
检测原理	用蛋白质异天冬氨酸甲基转移酶 (PIMT) 来特异性检测目标蛋白中异天冬氨酸残基的存在。
操作时间	反应可在 1 小时内完成。
检测灵敏度	可以实现低至 10pmol 的检测水平*。
下游检测	HPLC

* 如果被测定的肽与 SAH 共洗脱, 则测定的灵敏度可能受到限制。如果发生这种情况, 可能需要优化洗脱条件或样品的预处理, 以获得最大的灵敏度。



SAH 标准品和 Isoasp-DSIP 参照物反应的 RP-HPLC 色谱图

图 A. 50pmol SAH 标准品。

图 B. 10pmol Isoasp-DSIP 参照物。根据标准操作流程制备和 RP-HPLC 分析样本。样本以 1ml/min 的速度自动注射入仪器。以 10% HPLC 级流动相 B 洗脱, 再以 30% 流动相 B 洗脱, 然后再注射下一个样本前以 10% 流动相 B 平衡柱子。色谱图显示 260nm 处有峰。

应用文献

Citations

1. Intracellular Protein Modification Associated with Altered T Cell Functions in Autoimmunity. *J Immunol.* 2006; 177:4541-4549;
2. Deamidation of labile asparagine residues in the autoregulatory sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* 270,929-938 (2003).

产品汇总列表

Product List

应用	产品名	规格	目录号
抗体纯化磁珠	Magne® Protein A Beads	1ml	G8781
		5X1ml	G8782
		50ml	G8783
	Magne® Protein G Beads	1ml	G7471
		5X1ml	G7472
		50ml	G7473
抗体纯化磁力架	MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand(two-position)	0.5ml	Z5331
		1.5ml	Z5332
		12 X 75mm	Z5333
	MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand(twelve-position)	0.5ml	Z5341
		1.5ml	Z5342
		12 X 75mm	Z5343
	PolyATtract® System 1000 Magnetic Separation Stand	15ml/50ml	Z5410
	Deep Well MagnaBot® 96 Magnetic Separation Device	96 wells	V3031
抗体消化生成 Fc,F(ab') ₂ 段	IdeS Protease	5000u	V7511
		25000u	V7515
	IdeZ Protease	5000u	V8341
		25000u	V8345
抗体肽谱分析样本制备用蛋白酶	Trypsin Platinum, Mass Spec Grade	100µg	VA9000
	ProAlanaase	5µg	VA2161
		15µg	VA2171
	rAsp-N, Mass Spec Grade	10µg	VA1160
	rLys-C, Mass Spec Grade	15µg	V1671
	AccuMAP™ Low pH Protein Digestion on Mini Kit	10 reactions	VA1040
	AccuMAP™ Low pH Protein Digestion on Maxi Kit	100 reactions	VA1050
抗体糖基化分析	PNGase F	500u	V4831
	Endoglycosidase H	10000u	V4871
		50000u	V4875
	Fetuin	50µl	V4961
抗体生产异天冬氨酸残留分析	ISOQUANT® Isoaspartate Detection Kit	100 assays	MA1010

Better Experience

on Antibody Characterization/Fragmentation

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd

地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909

电话：010-58256268

网址：www.promega.com

技术支持电话：400 810 8133

技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

更新时间：2024.08



Promega
生命科学