

# CE-SDS纯度检测试剂盒使用说明书

## OPERATION MANUAL OF CE-SDS PURITY ASSAY KIT

### CE-SDS纯度检测试剂盒基本信息

组成	数量	货号
毛细管 50 $\mu$ m内径 非涂层	3	ZF-CE-0002
SDS 样品缓冲液A (PH=9.0)	50mL	ZF-CE-0003
SDS 样品缓冲液B (PH=6.5)	50mL	ZF-CE-0004
凝胶缓冲液 (专有配方)	100mL	ZF-CE-0005
内控标准品( 14.3KD 蛋白, 5mg/ml)	0.5mL	ZF-CE-0006
酸冲洗液	100mL	ZF-CE-0007
碱冲洗液	100mL	ZF-CE-0008
蛋白分子量标准品 (用于CE-MW, 可选购)	0.5mL	ZF-CE-0009

#### 备注

以上产品可以根据货号单独采购, 蛋白分子量标准品不包括在试剂盒中, 可根据货号单独采购。

#### 【概述】

蛋白质的分子大小变异体检测是蛋白质生产过程中至关重要的检测指标, CE-SDS法检测广泛应用于包括单抗在内的各种蛋白质纯度检测中。CE-SDS纯度检测试剂盒是经过验证的灵敏度、准确度、性价比、质量标准更高的国产化新型检测试剂盒。试剂盒中包含优化的SDS样品缓冲液A (PH=9.0)、SDS样品缓冲液B (PH=6.5) [1]、非涂层毛细管、优化的凝胶缓冲液 (保密配方)、内控标准品、酸碱冲洗液等试剂及耗材。经过验证, 试剂盒可广泛应用于蛋白质还原及非还原CE-SDS纯度检测, 并且可在市面上常见毛细管电泳系统中使用。

#### 【试剂盒成分信息】

##### 1. 试剂盒储存条件

组成	储存条件
毛细管 50 $\mu$ m内径 非涂层	室温
SDS 样品缓冲液A (PH=9.0)	室温
SDS 样品缓冲液B (PH=6.5)	室温
凝胶缓冲液 (专有配方)	室温
蛋白分子量标准品 (可选购)	-20 $^{\circ}$ C
内控标准品 (14.3KD, 5mg/ml)	2-8 $^{\circ}$ C
酸冲洗液	室温
碱冲洗液	室温

#### 注意:

凝胶缓冲液或者SDS样品缓冲液在使用之前, 若注意到试剂瓶底部有沉淀, 需室温搅拌或者超声波超声直至试剂瓶中缓冲液完全溶解后方可使用。在吸取缓冲液进毛细管电泳系统进样之前, 缓冲液需保证在室温中放置至少4小时。

##### 2. 蛋白分子量标准信息

蛋白分子量标准品包含14.3, 29.0, 44.2, 55.0, 66.4, 105及150KD的蛋白质, 用于CE-MW蛋白质分子量测定实验, 该产品不包括在试剂盒中, 需单独采购。

##### 3. 内控标准信息

14.3KDa的蛋白质作为迁移标记物, 用于蛋白样品相对于内标的相对迁移来计算分子量, 可获得更准确的分子量结果和鉴定信息。另外, 内控标准品可作为常规蛋白纯度检测内标, 用于校准出峰时间。

#### 【样品处理】

##### 1. 蛋白分子量标准品制备

###### (1) 非还原模式

用样品缓冲液溶解稀释蛋白分子量标准品, 使蛋白的终浓度0.2-2mg/ml之间, 总体积95 $\mu$ L。加入5 $\mu$ L N-乙基马来酰亚胺 (NEM) 溶液。盖好瓶盖, 用封口膜封好, 并充分混匀, 离心机6000rpm离心至少1分钟。70 $^{\circ}$ C水浴10分钟。室温冷却至少3分钟, 离心机6000rpm离心至少1分钟。转移95 $\mu$ L制备好的样品至内插管中, 内插管放入进样瓶中, 盖好进样瓶盖。

###### (2) 还原模式

用样品缓冲液溶解稀释蛋白分子量标准品, 使蛋白的终浓度在0.2-2.0mg/mL之间, 总体积为95 $\mu$ L。加入5 $\mu$ L 2-巯基乙醇, 盖上瓶盖, 用封口膜封好, 并充分混匀, 离心机6000rpm离心至少1分钟。70 $^{\circ}$ C水浴10分钟。室温冷却至少3分钟, 离心机6000rpm离心至少1分钟。转移95 $\mu$ L制备好的样品至内插管中, 内插管放入进样瓶中, 盖好进样瓶盖。

##### 2. 蛋白样品预处理

**蛋白样品的脱盐:** 信号强度和分离度对于蛋白中盐的浓度十分敏感, 如果蛋白样品浓度低于10mg/ml并且缓冲液盐的终浓度高于50mM, 样品的进样效率就会降低, 以下是使用超滤法对样品的脱盐步骤。

向超滤离心管中加入1mL蛋白样品, 再加入1mL SDS样品缓冲液。7000g离心20 min。再加入2 mL样品缓冲液, 7000 g离心20 min。上下颠倒超滤离心管使上层溶液在滤膜作用下滤到新的小瓶中, 并在5000g下离心3min。将蛋白样品转移到样品管中, 加入样品缓冲液使终量为1 mL。

##### 3. 蛋白样品的浓度

保证在加入SDS样品缓冲液后, 蛋白的浓度在0.2-2.0mg/mL之间, 推荐最佳蛋白浓度为1mg/mL。如果蛋白浓度过高, 与蛋白结合的SDS就会不足, 导致峰变宽而且分辨率降低; 如果蛋白浓度过低, 信号就会相应变低。

##### 4. 非还原样品处理

对比一个蛋白的还原和非还原状态可以得到一些结构信息, 通过烷基化蛋白样品可以减少由于蛋白自动还原产生的蛋白异质性。以下是配制非还原蛋白样品的过程。

###### (1) 烷基化试剂的制备

使用100mM N-乙基马来酰亚胺 (NEM) 或800 mM碘乙酰胺 (IAM) 作为烷基化试剂[2][3]。加入蛋白质和分析样品中后分别稀释20倍至终浓度5 mM或40 mM。

a) 称取12.5mg NEM或148mg IAM置于1.5mL离心管中。

b) 加入1000 $\mu$ L超纯水, 盖好瓶盖并充分混合并标记。2-8 $^{\circ}$ C避光保存, 有效期5天。

###### (2) 样品的制备

用样品缓冲液溶解稀释样品, 使蛋白的终浓度0.2-2mg/ml之间, 总体积95 $\mu$ L。加入2 $\mu$ L的内标。加入5 $\mu$ L N-乙基马来酰亚胺 (NEM) 溶液。盖好瓶盖, 用封口膜封好, 并充分混匀, 离心机6000rpm离心至少1分钟。70 $^{\circ}$ C水浴10分钟。室温冷却至少3分钟, 离心机6000rpm离心至少1分钟。转移95 $\mu$ L制备好的样品至内插管中, 内插管放入进样瓶中, 盖好进样瓶盖。

##### 5. 还原样品处理

用样品缓冲液溶解稀释样品, 使蛋白的终浓度在0.2-2.0mg/mL之间, 总体积为95 $\mu$ L。加入2 $\mu$ L的内标。加入5 $\mu$ L 2-巯基乙醇, 盖上瓶盖, 用封口膜封好, 并充分混匀, 离心机6000rpm离心至少1分钟。70 $^{\circ}$ C水浴10分钟。室温冷却至少3分钟, 离心机6000rpm离心至少1分钟。转移95 $\mu$ L制备好的样品至内插管中, 内插管放入进样瓶中, 盖好进样瓶盖。

### 【温馨提示】

巯基乙醇相关操作应在通风橱操作

本试剂盒相关操作需使用超纯水

样品缓冲液A (PH=9.0) 是参考2015版药典[4], 已有项目的检测方法未发生变更, 建议使用样品缓冲液A。

样品缓冲液B (PH=6.5) 是参考2020版药典[5], 根据报道[6], 蛋白质样品预处理时, 在高温高碱条件下, 蛋白质更易产生异常碎片, 影响非还原CE-SDS实验数据准确度。新项目的检测方法, 方法开发阶段, 建议使用样品缓冲液B。

### 【毛细管电泳实验运行】

#### 1. 毛细管电泳仪

Beckman Pa800, Agilent 7100, Maurice等。

#### 2. 基本条件设置

样品盘温度: 10±2℃      毛细管温度: 20±2℃

#### 3. 毛细管预处理

碱冲洗液在60psi压力下冲洗3分钟, 然后用酸冲洗液60psi压力下冲洗2分钟。最后用超纯水在70psi压力下冲洗1分钟, 在每次样品运行前都应进行该步骤。

#### 4. 凝胶缓冲液预填充

凝胶缓冲液在50psi压力下冲洗15分钟, 每次样品运行前都应该进行该步骤。

#### 5. 样品进样

正端进样: -5KV, 20S

反端进样: 5KV, 20S

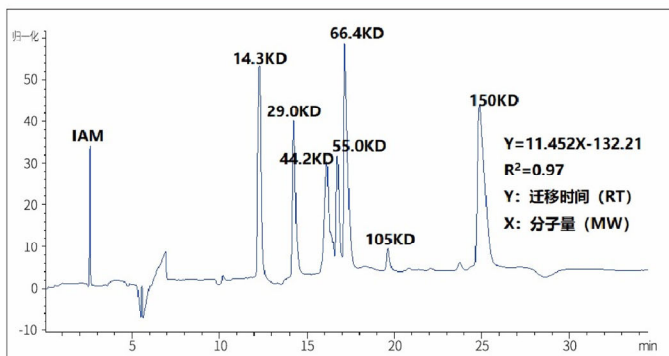
#### 6. 样品分离

正端分离: 电压-15KV 分离时间40分钟。

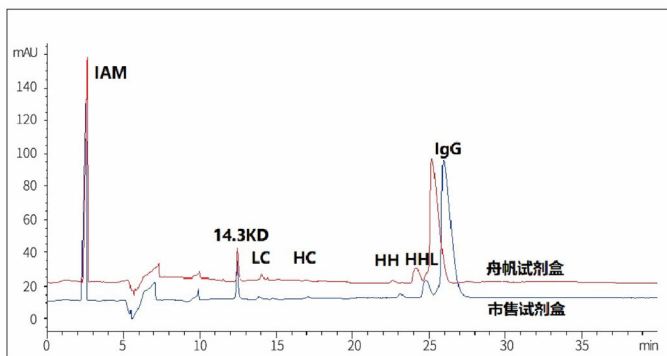
反端分离: 电压15KV 分离时间15分钟。

### 【典型图谱】

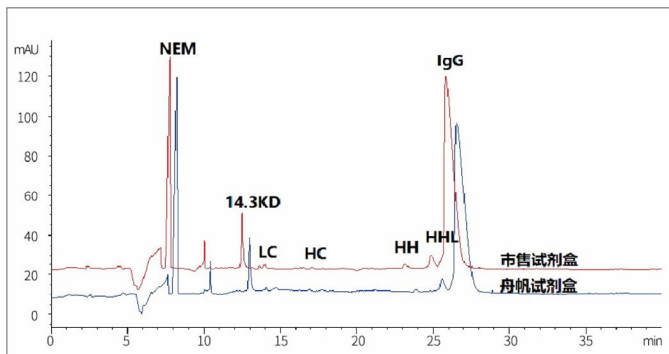
#### 1. 蛋白质分子量标准品典型图谱



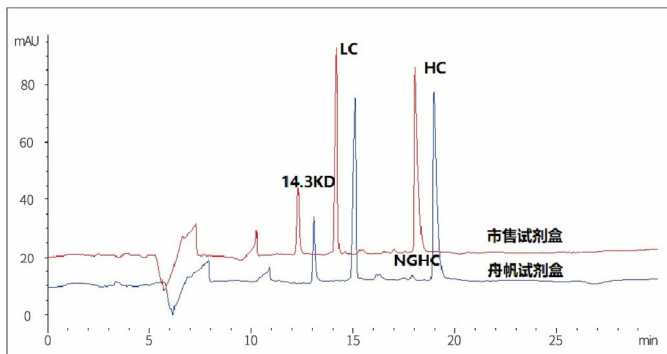
#### 2. 单抗在非还原模式下的CE-SDS典型图谱 (IAM)



#### 3. 单抗在非还原模式下的CE-SDS典型图谱 (NEM)



#### 4. 单抗在还原模式下的CE-SDS典型图谱



### 【参考文献】

- [1] 方伟杰, 王海彬, 黄春晖, 王宗襄, 张中伟, 白骅. 2016. 一种含有保护剂的毛细管凝胶电泳检测试剂盒
- [2] Bin-Bin Shen, Zhongwei Zhang, Jun-Jie Yuan, Aiping Zheng, Su Zeng, Jian-Qing Gao, Wenhan Bao, James Barnard, Haibin Wang, Wei-Jie Fang. Formation of an Unprecedented Impurity during CE-SDS Analysis of a Recombinant Protein. Pharm Res.2020;37:228
- [3] Zhiqing C.Zhu, Yingchen Chen, Michael S.Ackerman, Bei Wang, Wei Wu, Bo Li, Linda Obenauer-Kutner, Rulin Zhao, Li Tao, Peter M.Ihnat, Jinping Liu, Rajesh B. Gandhi, Bo Qiu. Investigation of monoclonal antibody fragmentation artifacts in non-reduced SDS-PAGE.
- [4] 国家药典委员会, 中华人民共和国2015年版[四部]
- [5] 国家药典委员会, 中华人民共和国2020年版[四部]
- [6] Junge zhang, Sudhir Burman, Sri Gunturi, Joe P. Foley. Method development and validation of capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for the characterization of a monoclonal antibody.