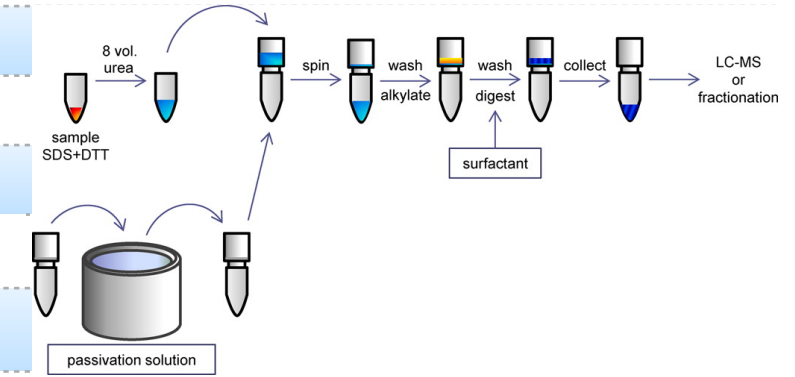


## mAb抗体 Peptide Mapping and MAM分析

### 标准操作规范SOP

#### Part I: 样品前处理流程

试剂的准备:		样品准备: 10 ug/ul mAb* 50ul
A1	3% BT Surfactant w/ 10mM TCEP: 取5mg BT Surfactant试剂加150ul 超纯水, 加8ul 200mM TCEP 混匀	
A2	200mM TCEP: 称取57.3 mg TCEP 溶解在1mL 50mM ABC中	
A3	Digest Buffer: 5mg BT Surfactant溶解在4.5ml 50mM 碳酸氢铵中	
A3	0.11M IAA: 称取20.5mg IAA 溶解在1ml 50mM 碳酸氢铵中	
A4	50mM 碳酸氢铵 (ABC) 缓冲液 (pH 8.5): 称取198mg 碳酸氢铵溶解在50 mL 超纯水中.	
A5	rPNGase F糖苷酶:1ug/ul	
A6	1ug/ul Trypsin: 100ug干粉中加100ul 1mM HCl 溶解	
A7	50%甲酸: 500ul甲酸加入500ul超纯水中混匀	
A8	10%乙腈/0.1%甲酸: 100ul乙腈加入900ul超纯水中, 加1ul 甲酸混匀	
A9	3%乙腈/0.1%甲酸: 30ul乙腈加入900ul超纯水中, 加1ul 甲酸混匀	



序号	操作流程	添加体积	试剂	设备	时间	温度	说明
B-1	取 10ul 10ug/ul mAb 样品加入1.5ml低蛋白吸附离心管	10ul	10ug/ul mAb	1.5ml离心管			低吸附蛋白离心管
B-2	加 10ul 3% BT Surfactant w/10mM TCEP 变性还原缓冲液 (50mM ABC, PH=8.0) 混匀	10ul	3%BT Surfactant w/10mM TCEP				
B-3	干浴95°C 加热3min; 然后冷却至室温			干浴仪	3min	95°C	
B-4	加 2ul 0.11M IAA 混匀, 室温避光 30min	2ul	0.11M IAA		30min	RT	
B-5	加 6ul 1ug/ul rPNGase F糖苷酶 混匀, 干浴50°C 孵育30min	6ul	1ug/ul rPNGase	干浴仪	30min	50°C	
B-6	10K Pall UFD超滤管中加入200ul Digest Buffer, 静置10min	200ul	Digest Buffer	10K Pall UFD			Pall超滤管是平底
B-7	加入4ul 1ug/ul Trypsin, 14000RPM 离心 10min	4ul	1ug/ul Trypsin	离心机	10min		
B-8	加入28ul还原烷基化样品于预处理UFD超滤管中, 然后加入200ul Digest	28ul+200ul	28ul样品和200ul Digest Buffer	离心机	10min		
B-9	再加入 200ul Digest Buffer, 14000RPM 离心10min, 重复洗2次	200ul	Digest Buffer	离心机	10min		
B-10	加入4ul 1ug/ul Trypsin ,然后加入200ul Digest Buffer 混匀, 42°C孵育4h	4ul+200ul	4ul Trypsin 和 200ul Digest Buffer	干浴仪	4h		
B-11	加入12ul 50%甲酸, 45°孵育30min	12ul	50%甲酸	干浴仪	30min		
B-12	14000RPM 离心10min, 收集滤液转移至1.5ml低吸附蛋白离心管中			离心机	10min		
B-13	10k超滤管中再加入100ul 10%乙腈/0.1%甲酸, 14000RPM 离心 10min	100ul	10%乙腈/0.1%甲酸	离心机	10min		
B-14	合并离心滤液, 总体积300ul, 冻干或离心浓缩			冻干机	3h		
B-15	冻干多肽加200ul 3% 乙腈/0.1%甲酸 复溶, 用于质谱分析						

#### Part II: LC-MS分析方法

试剂的准备: (推荐使用LC-MS级水, ACN和甲酸)		样品准备: 50ul					
B1	流动相A: 97%水: 3%乙腈 (含0.1%甲酸)						
B-2	流动相B: 99%乙腈:1%水 (含0.1%甲酸)						
B-3	色谱柱	柱温	流速(uL/min)	进样量	雾化气	内衬管	进样器清洗液
B-4	毛细管一体柱 C18, 130 Å, 3 μm, 0.15 x 250 mm, Tip: 10um	RT	1.5	3ul	40	100ul	97%水/3%ACN/ 0.1%FA
B-5							
B-6	色谱梯度:	Time(min)	流速(uL/min)	%A	%B	曲线	
		0.00	1.5	100	0	6	
		50.00	1.5	65	35	6	
		50.10	1.5	0	100	6	
		60.00	1.5	0	100	6	

#### Part III: DDA and DIA采集数据

