

N-糖蛋白处理实验方案



标准操作规范SOP

Part I: 试剂准备及样品前处理流程

序号 试剂的准备:				样品准备: 1.5 ug/ul 脱盐mAb* 50ul				
A-1	3% BT Surfactant w/ 5mM TCEP: 加210ul超纯水溶解混匀			订货号: HLS BTSTCEP				
A-2	N-聚糖标签试剂: 4.5mg 溶解在55ul 无水DMF中 (室温有效期4h)			订货号: HLS GLAB01W 温馨提示: 存储在-80℃, 使用前恒温到室温后打开瓶盖!				
A-3	rPNGase F糖苷酶: rPNGase F糖苷酶50ul 加200ul超纯水稀释混匀即 2 unit/ul			订货号: HLS PNG001C				
A-4	无水DMF: 200ul			订货号: HLS DMF001				
序号	操作流程		添加体积	试剂	设备	时间	温度	说明
B-1	取 10ul 1.5 ug/ul mAb 脱盐样品加入0.5ml低蛋白吸附离心管		10ul	1.5 ug/ul 脱盐mAb	0.5ml离心管			低吸附蛋白离心管
B-2	加 10ul 3% BT Surfactant w/5mM TCEP混匀		10ul	3%BT Surfactant w/5mM TCEP				
B-3	干浴95℃ 加热3min; 然后冷却至室温				干浴仪	3min	95℃	
B-4	加 10ul 2 unit/ul rPNGase F糖苷酶 混匀, 干浴50℃ 孵育15-30min		10ul	2 unit/ul rPNGase F糖苷酶	干浴仪	15-30min	50℃	
B-5	样品冷却 5 min至室温					3 min	25℃	
B-6	加 10ul N-聚糖标签试剂混匀, 室温反应5min		10ul	N-聚糖标签试剂	点震器	5min	25℃	
B-7	加 15ul 无水DMF混匀		15ul	无水DMF	点震器			
B-8	加45ul 乙腈混匀		45ul	乙腈	点震器	1min		
B-9	标记后的N聚糖样品用于LC-FLR or LC-MS检测分析							
温馨提示: 1. 抗体样品必须脱盐处理, 避免离子亲和试剂干扰标记								
2. 亲和试剂SDS, Tris, DTT, 胺, 硫醇等浓度大于0.1mM不稳定								
3.建议使用TCEP, 而不使用基于硫醇的亲核还原性试剂(例如DTT)								
4.标记试剂浓度为35 mM、糖蛋白浓度为0.35 mg/mL的条件下进行N-聚糖标记反应								
5. 抗体脱盐建议使用0.5ml Millipore 10K UFD超滤管, 100ug样品用50mM HEPES 超滤置换3次								

Part II: 标记后的N-聚糖色谱分析方法

序号	试剂的准备:			样品准备: 100ul			
C-1	流动相A: 50 mM甲酸铵溶液 (630mg 甲酸铵溶解在200ml超纯水中, 加160ul质谱级甲酸) pH= 4.4						
C-2	流动相B: 100%乙腈 (推荐使用LC-MS级ACN)						
C-3	色谱柱	柱温	荧光监测波长	进样量	流速	内衬管	进样器清洗液
C-4	Amide HILIC column, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 x 150	60 °C	EX 265/EM 425 nm	10ul	0.40	100ul	30%MS级水/70%ACN
C-5							
C-6	色谱梯度	Time(min)	流速(mL/min)	%A	%B	曲线	
		0.00	0.40	25	75	6	
		35.0	0.40	46	54	6	
		36.5	0.20	100	0	6	
		39.5	0.20	100	0	6	
		43.1	0.20	25	75	6	
		47.6	0.40	25	75	6	
		55.0	0.40	25	75	6	

Part III: 标记后的N-聚糖质谱分析方法

