

生物检定

液质联用鉴定重组 CHO 细胞株目的蛋白的表达研究

康赵飞, 王可心, 韩春乐, 庞琳*, 饶春明*

(北京昭衍药物检定研究有限公司, 北京 102600)

摘要 目的: 采用高分辨四极杆-飞行时间液质联用(LC-Q TOF MS)技术, 探索重组中国仓鼠卵巢(CHO)细胞株目的蛋白的表达鉴定方法。方法: 选择1株表达抗体的重组CHO细胞株, 将该细胞悬液 $12\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 取上清液, 使用碳酸氢铵溶液($50\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)置换液体, 加入胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)进行酶切, 采用Advance Bio Peptide($100\ \text{mm} \times 2.1\ \text{mm}, 2.7\ \mu\text{m}$)色谱柱, 通过Sciex TRIPLE TOF 5600+与Agilent Q TOF G6545 2台液质联用仪进行对比分析。根据保密要求和氨基酸覆盖率选择合适的特征肽段, 并将该抗体目的蛋白重链与轻链的特征肽氨基酸序列分别输入SCIEX BioPharmaView Version 3.0与Agilent MassHunter BioConfirm 12.0软件中, 建立数据库, 对样品中实际检测得到的肽段进行搜库检索, 验证并鉴定出目的蛋白特征肽。结果: 样品通过Sciex TRIPLE TOF 5600+仪器分析得到8条特征肽段, 氨基酸覆盖率为100%; 样品通过Agilent Q TOF G6545仪器分析得到12条特征肽段, 氨基酸覆盖率为100%。结论: 本研究建立的方法操作简单, 覆盖率高, 稳定性好, 可用于该抗体重组CHO细胞株目的蛋白的表达鉴定, 也可为同类细胞株其他蛋白的表达鉴定提供参考。

关键词: 重组蛋白; 液质联用; 氨基酸序列; 特征肽鉴定; 胰凝乳蛋白酶; 胰蛋白酶

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2024)01-99-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0285

Study of liquid chromatography-mass spectrometry identification of target protein expression in recombinant CHO cell lines

KANG Zhao-fei, WANG Ke-xin, HAN Chun-le, PANG Lin*, RAO Chun-ming*

[JOINN Pharmaceutical Quality Research and Testing (Beijing) Co., Ltd., Beijing 102600, China]

Abstract Objective: To optimize an LC-Q TOF MS method for the determination of target proteins expressed in recombinant cells from a cell bank. **Methods:** The recombinant Chinese hamster ovary (CHO) cell line expressing antibodies was selected. The supernatant of recombinant CHO cell suspensions was retained after $12\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ centrifuging for 10 min and treated with $50\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{NH}_4\text{HCO}_3$ solution. Chymotrypsin was added for enzymatic digestion, and the comparative analyses were carried out using two LC-Q TOF MS with Advance Bio Peptide

* 通信作者 饶春明 Tel:(010)67869966; E-mail: raochunming@joinn-lab.com

庞琳 Tel:(010)67869966; E-mail: panglin@joinn-lab.com

第一作者 康赵飞 Tel:(010)67869966; E-mail: kangzhaofei@joinn-lab.com

王可心 Tel:(010)67869966; E-mail: wangkexin@joinn-lab.com

(100 mm × 2.1 mm, 2.7 μm) column, the Sciex TRIPLE TOF 5600+ and the Agilent Q TOF G6545, respectively. To establish the database, the amino acid sequences of the characteristic peptides of the protein heavy and light chains were entered into SCIEX BioPharmaView Version 3.0 and Agilent MassHunter BioConfirm 12.0 software, respectively. The peptides detected in the samples were searched to identify the target peptides. **Results:** The samples were analysed by a Sciex TRIPLE TOF 5600+ instrument to obtain 8 characteristic peptides with 100% amino acid sequence coverage and the samples were analysed by an Agilent Q TOF G6545 instrument to obtain 12 characteristic peptides with 100% amino acid sequence coverage. **Conclusion:** The method established in this study is simple to operate, has high coverage and good stability, can be used to identify the expression of target proteins in recombinant CHO cell lines. It also provides a reference for the expression identification of target proteins in similar cell lines.

Keywords: recombinant protein; LC-MS; amino acid sequences; characteristic peptide identification; chymotrypsin; trypsin

中国仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞是哺乳动物细胞表达系统,具有能够稳定表达外源蛋白以及进行蛋白质翻译后的加工修饰,且携带完整的蛋白质糖化修饰系统等优势^[1-3],与原核表达系统比较,CHO 细胞表达的重组蛋白药物在结构、生物活性等方面与天然蛋白形态相似度高,是生物技术药物生产中的关键起始原材料^[4-5]。

生产用重组细胞基质进行细胞库检定时常常仅针对细胞基质总的要求进行评价,如细胞鉴别试验、无菌检查、支原体检查、内外源病毒因子检查等,但与重组细胞专属性密切相关的重组目的基因或表达的目的蛋白鉴定往往在细胞株检定中是缺失的^[6-7]。2020 年版《中华人民共和国药典》三部“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”通则中明确指出对于重组细胞而言,除细胞鉴别试验外,应对目的蛋白基因或目的蛋白进行检测^[8]。然而,《中华人民共和国药典》中并未给出具体试验方法,已有文献对于此项技术的研究也鲜有报道,目前常用的重组蛋白鉴定方法主要包括酶联免疫吸附法、免疫印迹法和质谱分析等,但是否能有效地应用于重组细胞中目的蛋白的表达鉴定还有待进一步方法开发和验证。本文选择 1 株表达抗体的重组 CHO 细胞株,采用高分辨四极杆-飞行时间液质联用 (LC-Q TOF MS) 技术,探索重组 CHO 细胞株目的蛋白的表达鉴定方法,为重组细胞库的质量控制提供技术支持。

液质联用技术是一种强大的分析技术,其中,液相色谱系统为分离系统,质谱系统为检测系统^[9]。在分析样品时,质谱质量分析器将离子碎片按质荷比

进行分离,通过检测器得到质谱图^[10]。因其精密度高,重复性好,并且在方法开发阶段的高灵活性和多功能性,近年来在生物技术药物领域广泛应用。传统上,质谱分析方法要想获得高序列覆盖率甚至 100% 覆盖率,需要采取多种办法。例如高度复杂的蛋白混合物应在分析前对目的蛋白进行有效的分离纯化^[11],其次使用不同蛋白酶的组合适用^[12],又或者结合基质辅助激光解吸 (MALDI) 和电喷雾电离源 (ESI) 的互补使用^[13]。上述这些传统的方法开发不利于质谱技术在生物技术药物应用上的推广。因此,本研究旨在建立重组 CHO 细胞株目的蛋白表达鉴定方法,通过筛选重组蛋白的特异氨基酸序列,探索出适合样本的处理条件,利用液质联用技术进行重组细胞库中目的蛋白的鉴定,序列覆盖率 ≥ 95%。并在不同型号液质联用仪进行目的蛋白鉴定的重复,以验证此方法的重现性,从而保证该生产用重组细胞库的质量可控性,满足此类产品的注册和评价需求。

1 仪器、试剂与样品

1.1 仪器

5430R/5910Ri 高速冷冻离心机购自 Eppendorf 公司; Eppendorf ThermoMixer C 恒温混匀仪购自 Eppendorf 公司; TRIPLE TOF 5600+ 高分辨四极杆-飞行时间质谱仪 (Q TOF MS) 购自 Sciex 公司,配有 Sciex ExionLC AD UHPLC 系统; Q TOF G6545 高分辨四极杆-飞行时间质谱仪 (Q TOF MS) 购自 Agilent 公司,配有 Agilent Infinity 1290 UHPLC 系统。

1.2 试剂

碳酸氢铵购自 Thermo 公司; RapiGest SF 试剂

购自 Waters 公司;二硫苏糖醇、碘乙酰胺、氯化钙购自 Sigma-Aldrich 公司;测序级胰蛋白酶 (trypsin) 与胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin) 购自 Promega 公司;质谱级甲酸购自 Dikma 公司;质谱级甲醇、乙腈购自 Fisher Chemical 公司。

1.3 样品

本研究使用的重组 CHO 细胞悬液为同一批次,由舒泰神公司提供(可公开重链序列:SSASTKGPSVFPL;轻链序列:TFGGGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQL)。

2 方法与结果

2.1 酶切处理

取重组 CHO 细胞悬液 120 μL , 12 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 去除样品中可沉淀异物,取上清液置于超滤管中,12 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃去滤液。在超滤管中加入碳酸氢铵水溶液 (50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 120 μL , 12 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,超滤换液重复 3 次,弃去滤液。将滤芯倒置于新的外管中,12 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取外管中全部液体,用碳酸氢铵水溶液 (50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 定容至 100 μL 。

在上述液体中加入 1% RapiGest SF 溶液 10 μL , 加入二硫苏糖醇溶液 (100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 10 μL , 恒温涡旋混匀仪 85 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 25 min, 加入碘乙酰胺溶液 (200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 10 μL , 室温避光反应至少 30 min, 按照实验分组分别加入不同种类蛋白酶。本研究选取 3 种蛋白酶组合: a. 加入胰蛋白酶进行酶切; b. 胰凝乳蛋白酶进行酶切; c. 胰蛋白酶与胰凝乳蛋白酶 (1 : 1) 进行酶切。每种酶质量浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 加入的体积均为 5 μL , 并且, b 组与 c 组样品中需要加入氯化钙水溶液 (100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 10 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 3~5 h。然后,加入甲酸 10 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 12 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清液, 以待后续分析。

2.2 TRIPLE TOF 5600+ 液质联用仪分析

2.2.1 色谱-质谱条件

2.2.1.1 色谱条件 采用 Advance Bio Peptide (100 mm \times 2.1 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 自动进样器温度 4 $^{\circ}\text{C}$, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 以 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 含 0.1% 甲酸乙腈溶液 (B) 为流动相, 流速 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 梯度洗脱 (表 1), 以 50% 甲醇水溶液为洗针液, 进样体积 10 μL 。

2.2.1.2 质谱条件 离子源为 ESI, 采用高灵敏度 IDA 正离子模式, 雾化气流速 55 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$, 辅助气流速 55 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$, 气帘气流速 30 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$, 离子源温度 500 $^{\circ}\text{C}$,

喷雾电压 5.5 kV, 一级质谱扫描范围 100~2 000, 二级质谱扫描范围 50~2 000。

表 1 Sciex ExionLC AD UHPLC 梯度洗脱条件

Tab. 1 Gradient elution conditions of Sciex ExionLC AD

<i>t</i> /min	UHPLC	
	流动相比例 (ratio of mobile phase) /%	
	流动相 (mobile phase) A	流动相 (mobile phase) B
0.00	95	5
1.00	95	5
40.00	60	40
45.00	10	90
50.00	10	90
50.10	95	5
60.00	95	5

2.2.2 数据处理

将目的蛋白重链与轻链的特征肽氨基酸序列输入 SCIEX BioPharmaView Version 3.0 软件中, 建立数据库。将样品进行酶切处理后按“2.2.1”项下方法进样检测, 得到的肽段进行搜索检索, 鉴定出目的蛋白特征肽。分析参数: 酶类型为胰凝乳蛋白酶, 最大漏切位点 5, 肽段最大组合修饰数 4, *m/z* 容差 $\pm 0.005\%$, 最小肽链长度 3, MS/MS 匹配容差 0.03。

不同蛋白酶具有不同的酶切位点, 因此, 会对样品酶切产生的肽段产生影响, 进而导致目的蛋白特征肽氨基酸序列鉴定结果覆盖率不一致。本研究中, 3 种不同酶切方式的覆盖率分别 11.9%、100%、64.3%。其中, b 组样品一共搜索到 8 条相关肽段 (表 2)。接下来, 为验证此方法可行性与稳定性, 选择胰凝乳蛋白酶, 在其他实验条件相同的情况下, 使用 LC-Q TOF MS 进行分析。

2.3 Q TOF G6545 液质联用仪分析

2.3.1 分析条件

采用 Advance Bio Peptide (100 mm \times 2.1 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 自动进样器 4 $^{\circ}\text{C}$, 柱温 60 $^{\circ}\text{C}$, 以 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 含 0.1% 甲酸乙腈溶液 (B) 为流动相, 流速 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 梯度洗脱 (表 3), 以 50% 甲醇水溶液为洗针液, 进样体积 10 μL 。

离子源为 ESI, 采用 Auto MS/MS 正离子模式, 鞘气流速 11 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 鞘气温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气流速 8 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 干燥气温度 320 $^{\circ}\text{C}$, 喷雾电压 1 kV, 毛细管电压 3.5 kV, 一级质谱扫描范围 *m/z* 100~1 700, 二级质谱扫描范围 *m/z* 100~1 700。

表 2 TRIPLE TOF 5600+ 鉴定的目标肽段

Tab. 2 Target peptides identified by TRIPLE TOF 5600+

序号 (No.)	序列 (sequence)	序列位置 (sequence location)	保留时间 (retention time) /min	<i>m/z</i>	偏差 (diff) × 10 ⁻⁶	打分 (score)
1	EIKRTVAAPSVF	L(9-20)	13.721 87	659.378 66	-1.865 53	14.118
2	EIKRTVAAPSVF	L(9-20)	14.093 03	659.366 41	-20.455 25	-
3	GGGTKL	L(3-8)	2.024 1	532.309 21	0.512 15	8.056
4	GGGTKL	L(3-8)	2.023 27	266.659 04	3.509 26	-
5	GGGTKLEI	L(3-10)	25.823 69	774.438 86	4.211 13	-
6	IFPPSDEQL	L(21-29)	7.975 18	523.276 51	24.553 7	2.747
7	SSASTKGPSVFPL	H(1-13)	18.697 4	639.337 34	-4.847 8	12.233
8	TFGGGTKL	L(1-8)	9.789 67	780.423 75	-1.634 34	8.47

表 3 Infinity 1290 UHPLC 梯度洗脱条件

Tab. 3 Gradient elution conditions of infinity 1290 UHPLC

<i>t</i> /min	流动相比例 (ratio of mobile phase) /%	
	流动相 (mobile phase) A	流动相 (mobile phase) B
0.00	95	5
1.00	95	5
40.00	60	40
45.00	10	90
50.00	10	90
50.10	95	5
60.00	95	5

2.3.2 数据处理

将目的蛋白重链与轻链的特征肽氨基酸序列输入 Agilent MassHunter BioConfirm 12.0 软件中, 建立数据库。将样品中实际检测得到的肽段进行搜库检索, 鉴定出目的蛋白特征肽。分析参数: 工作类型为 Protein Digest, 酶类型为胰凝乳蛋白酶, 绝对峰高 ≥ 50 counts, 保留时间范围 0~80 min, 修饰类型为烷基化 (碘乙酰胺), *m/z* 容差 30 × 10⁻⁶。经软件搜库鉴定后, 样品中目的蛋白覆盖率为 100%, 共搜索到 12 条肽段 (表 4)。

表 4 Q TOF G6545 鉴定的目标肽段

Tab. 4 Target peptides identified by Q TOF G6545

序号 (No.)	序列 (sequence)	序列位置 (sequence location)	保留时间 (retention time) /min	<i>m/z</i>	偏差 (diff) × 10 ⁻⁶	打分 (score)
1	GGGTKL	L(3-8)	1.018	532.308 5	-0.83	79.18
2	GGGTKL	L(3-8)	18.040	532.308 1	-1.56	79.03
3	TFGGGTKL	L(1-8)	18.041	390.716 1	-0.45	83.35
4	EIKRTVAAPSVF	L(9-20)	25.216	659.379 7	-0.17	89.47
5	VAAPSVF	L(14-20)	27.947	690.381 7	-0.55	82.50
7	TVAAPSVF	L(13-20)	29.201	791.426 9	-3.68	79.34
8	IFPPSDEQL	L(21-29)	29.674	523.263 7	-0.58	74.62
9	VFPL	H(10-13)	30.898	475.291 6	0.14	68.57
10	KGPSVFPL	H(6-13)	31.518	422.750 3	0.16	80.85
11	SSASTKGPSVFPL	H(1-13)	31.643	639.340 1	-0.62	86.80
12	SASTKGPSVFPL	H(2-13)	31.742	595.824 8	0.52	87.95

4 讨论

本研究利用 LC-Q TOF MS 技术, 在不进行重组蛋白纯化分离的情况下, 根据重组蛋白的一级序列来筛选出更为合适的蛋白酶, 引入 RapiGest SF 表面活性剂, 提高了蛋白质酶解的速度和回收率, 缩短了酶解反应时间, 仅用 1 d 时间即可完成混合蛋白的样本处理^[14-16]; 为了快速准确鉴定重组 CHO 细胞悬液目的蛋白的表达, 本研究最终选取包含该目的蛋白的轻

链及重链可变区与恒定区的一部分作为目标序列, 在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上利用 blastp 工具将选取的序列与 Chinese hamster (taxid:10029) 蛋白数据库进行了序列比对, 比对结果证明选取序列是特异性的, 这样可以保证同时兼顾表达的目的蛋白的特异性与方法的稳定性; 为了获得高覆盖率, 在不增加样本处理过程复杂度的情况下, 通过筛选不同的蛋白酶, 设想通过使用一种蛋白酶即可达到设

定目标,最终仅利用胰凝乳蛋白酶,得到 100% 的覆盖率。而 Yates 等^[12]用 3 种不同的酶(胰蛋白酶, Glu-C、Subtilisin)消化从血液中获得的红蛋白,并用微毛细管液相色谱系统分析 3 种酶消化的混合肽样本才可获得 >99% 的序列覆盖率。Prokai 等^[13]利用 ESI-IT-MS 和 MALDI-TOF 2 种质谱检测系统,获得了从海藻中纯化的细胞溶解素蛋白 95% 以上的序列覆盖率。为了验证本方法的适用性,先后在 Sciex TRIPLE TOF 5600+ 与 Agilent Q TOF G6545 2 套 LC-Q TOF MS 仪上进行酶解后的重组蛋白表达鉴定,均得到 100% 的覆盖率。不同的是,Sciex TRIPLE TOF 5600+ 检测到 8 条肽段,Agilent Q TOF G6545 检测到 12 条肽段。2 种质谱检测到的肽段数目差异主要是因为质谱仪器的灵敏度和分辨率不同造成的。Agilent Q TOF G6545 分辨率最高可达到 50 000, 1 pg 利血平柱上进样检测灵敏度可以达到信噪比 1 500 : 1, 而 Sciex TRIPLE TOF 5600+ 的最高分辨率只有 40 000。虽然 2 种质谱鉴定得到的肽段数目不同,但都能够获得 100% 覆盖率,达到了对重组 CHO 细胞株目的蛋白表达鉴定的目的。

本文开发的重组细胞株目的蛋白表达鉴定思路是通用的,但需要注意的是,应用于其他重组细胞目的蛋白快速鉴定时,还需重新考虑选择合适的蛋白酶,根据测得的覆盖率结果选择合适的特征肽段,以及数据算法对目的蛋白序列覆盖率的影响等。

综上所述,重组细胞目的蛋白是否表达是药物研发工作者和质量控制部门关心的核心问题,本研究首先在细胞水平上利用 DNA 指纹条码技术鉴定了该细胞系种属,然后采用液质联用技术对该重组细胞的目的蛋白表达进行了鉴定,得到的目标序列 100% 与该蛋白特征肽理论序列匹配。该法操作简单,覆盖率高,稳定性好,可用于该制品细胞株目的蛋白的表达鉴定,也可为同类细胞株其他蛋白的表达鉴定提供参考。

参考文献

- [1] BODDAPATI S, GILMORE J, BOONE K, *et al.* Evidence for co-translational misincorporation of non-canonical amino acid hydroxyproline in recombinant antibodies produced in Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines [J]. *PLoS One*, 2020, 15(10): e0241250
- [2] FISCHER S, HANDRICK R, OTTE K. The art of CHO cell engineering: a comprehensive retrospect and future perspectives [J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(8): 1878
- [3] KUO CC, CHIANG AW, SHAMIE I, *et al.* The emerging role of systems biology for engineering protein production in CHO cells [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 51: 64
- [4] TIHANYI B, NYITRAY L. Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2021, 38: 25
- [5] 吴海涛,胡云龙,陈松,等. 重组蛋白在中国仓鼠卵巢细胞中高效表达的影响因素 [J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(8): 1
- [5] WU HT, HU YL, CHEN S, *et al.* The factors influencing the high-level expression of recombinant protein in CHO cells [J]. *China Biotechnol*, 2004, 24(8): 1
- [6] 高凯,陶磊,王军志. 重组抗体药物的质量控制 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(19): 1848
- [6] GAO K, TAO L, WANG ZJ. Quality control for recombinant therapeutic antibodies [J]. *Chin J New Drugs*, 2011, 20(19): 1848
- [7] 高凯,任跃明,王兰,等. 关于我国药典重组 DNA 技术产品总论的思考 [J]. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(5): 107
- [7] GAO K, REN YM, WANG L, *et al.* Points to consider for the general monograph of products prepared by recombinant DNA technology in Chinese Pharmacopoeia [J]. *China Biotechnol*, 2014, 34(5): 107
- [8] 中华人民共和国药典 2020 年版·三部 [S]. 2020: 11
- [8] ChP 2020. Vol III [S]. 2020: 11
- [9] BECCARIA M, CABOOTER D. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis [J]. *Analyst*, 2020, 145(4): 1129
- [10] FANG ZZ, GONZALEZ FJ. LC-MS-based metabolomics: an update [J]. *Arch Toxicol*, 2014, 88: 1491
- [11] BALDWIN MA. Protein identification by mass spectrometry: issues to be considered [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(1): 1
- [12] GATLIN CL, ENG JK, CROSS ST, *et al.* Automated identification of amino acid sequence variations in proteins by HPLC/microspray tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2000, 72: 757
- [13] STEVENS SM JR, KEM WR, PROKAI L. Investigation of cytolysin variants by peptide mapping: enhanced protein characterization using complementary ionization and mass spectrometric techniques [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, 16(22): 2094
- [14] 陶磊,于雷,丁有学,等. 液质联用分析重组人尿激酶原的糖基修饰异质性 [J]. *药学学报*, 2020, 55(11): 2713
- [14] TAO L, YU L, DING YX, *et al.* Analysis of the glycosylation heterogeneity of recombinant human pro-urokinase using UPLC-MS [J]. *Acta Pharm Sin*, 2020, 55(11): 2713
- [15] ZHANG X, JIN X, LIU L, *et al.* Optimized reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry methods for intact protein analysis and peptide mapping of adeno-associated virus proteins [J]. *Hum Gene Ther*, 2021, 32(23-24): 1501
- [16] YU YQ, GILAR M, LEE PJ, *et al.* Enzyme-friendly, mass spectrometry-compatible surfactant for in-solution enzymatic digestion of proteins [J]. *Anal Chem*, 2003, 75(21): 6023

(本文于 2024 年 4 月 29 日收到)