重组胰蛋白酶和 TPCK 胰蛋白酶用于曲妥珠单抗肽图分析的对比研究

刘　巧[1]，刘　晓[2]，温学美[1]，李素霞[2*]，潘红娟[1*]
（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海雅心生物技术有限公司，上海 201499）

摘要：该研究采用曲妥珠单抗作为肽图分析样本，从常规酶量快速酶切、低酶量过夜酶切和酶活测定 3 个方面，综合对比了重组胰蛋白酶和 *N*-（对甲苯磺酰基）-L- 苯丙氨酰甲基氯酮（TPCK）处理胰蛋白酶的性能。结果显示，单抗经 2 种胰蛋白酶处理后轻链覆盖度均为 100%；而经重组胰蛋白酶处理后，重链的序列覆盖度优于 TPCK 胰蛋白酶处理组。快速酶切结果显示，相较 TPCK 胰蛋白酶，尽管重组胰蛋白酶的漏切和非特异性酶切相对丰度更高，但在短时间内对单抗的酶切更完全。低酶量过夜酶切结果显示，重组胰蛋白酶处理的单抗漏切和非特异性酶切相对丰度低于 TPCK 胰蛋白酶处理组。此外，TPCK 胰蛋白酶的酶切结果含有糜蛋白酶水解位点（F，苯丙氨酸）。进一步酶活测定试验结果表明，重组胰蛋白酶的活性和稳定性优于 TPCK 胰蛋白酶。综上所述，2 种胰蛋白酶都可用于常规用量和酶切时间的肽图分析，但重组胰蛋白酶具备更好的活性、酶切特异性和稳定性，是生物制品肽图分析和其他结构表征前处理的更优选择。

关键词：重组胰蛋白酶；TPCK 胰蛋白酶；曲妥珠单抗；肽图分析；快速酶切；过夜酶切；酶活
中图分类号：Q814.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)10-1282-11
引用：刘　巧，刘　晓，温学美，等．重组胰蛋白酶和 TPCK 胰蛋白酶用于曲妥珠单抗肽图分析的对比研究［J］．中国医药工业杂志，2025, **56**(10)：1282-1292．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.10.006

Comparative Study of Recombinant Trypsin and TPCK-treated Trypsin Applied to Trastuzumab Peptide Mapping Analysis

LIU Qiao[1], LIU Xiao[2], WEN Xuemei[1], LI Suxia[2*], PAN Hongjuan[1*]
(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Shanghai Yaxin Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201499*)

ABSTRACT: This study utilized trastuzumab as a model sample for peptide mapping analysis to comprehensively compare the performance of recombinant trypsin and *N*-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK)-treated trypsin across three aspects: rapid digestion with conventional enzyme amounts, overnight digestion with low enzyme amounts, and enzyme activity assays. The results demonstrated that both trypsins achieved 100% sequence coverage for the light chain of the monoclonal antibody. However, recombinant trypsin provided superior heavy chain sequence coverage compared to TPCK-treated trypsin. Results of rapid digestion tests revealed that recombinant trypsin achieved more complete antibody digestion within shorter timeframes, though with relatively higher abundances of missed cleavages and non-specific cleavages than TPCK-treated trypsin. Conversely, under low-enzyme overnight digestion conditions, recombinant trypsin generated lower abundances of missed cleavages and non-specific cleavages than TPCK-treated trypsin. Additionally, digests with TPCK-treated trypsin contained chymotrypsin cleavage sites (F, phenylalanine). Further enzyme activity assays confirmed that recombinant trypsin exhibited better activity and stability than TPCK-treated trypsin. In conclusion, while both trypsins are suitable for standard peptide mapping protocols using conventional enzyme amounts and digestion times, recombinant trypsin demonstrates superior activity, cleavage specificity, and stability, making it the preferred choice for peptide mapping analysis and other structural characterization sample preparations of biologics.

Key Words: recombinant trypsin; TPCK-treated trypsin; trastuzumab ; peptide mapping analysis; rapid digestion; overnight digestion; enzyme activity

肽图（peptide mapping，PM）分析是研究蛋白质一级结构的重要方法，可鉴定蛋白质的氨基酸序列信息，也可监控降解情况，包括脱酰胺（deamidation）或氧化（oxidation）等程度[1—2]。肽图在蛋白质类药物的研发和质量控制中都发挥着关键作用。肽图分析通常包括 4 个主要步骤：样品的预处理、蛋白质特异性裂解、肽段分离和检测、结果分析和判定。其中，蛋白质特异性裂解的首选蛋白酶为胰蛋白酶（trypsin）。胰蛋白酶可高效、高特异性地催化水解多肽和蛋白质上精氨酸（R）和赖氨酸（K）残基与其他氨基酸残基相连的靠近 C 端的肽键[3—6]，形成在酸性环境下更易结合质子的、含 N 原子的氨基酸残基，有利于质谱检测[7]。

胰蛋白酶最早是从猪或牛的胰腺中纯化得到的，其切割位点特异性均较高[8]。但分离、纯化的天然胰蛋白酶中往往还含有其他蛋白酶，如糜蛋白酶（chymotrypsin）。因此，采用天然来源的胰酶进行酶切处理后，会出现非精氨酸和赖氨酸位点断裂的肽段，导致分析结果的特异性降低。为解决该问题，纯化后的胰蛋白酶会利用糜蛋白酶抑制剂 *N*-（对甲苯磺酰基）-L- 苯丙氨酰甲基氯酮（*N*-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone，TPCK）[9] 降低糜蛋白酶的活性。但实际应用中，糜蛋白酶活性的残留不可完全避免。此外，提取的胰蛋白酶因包含自水解位点而稳定性差，在不适宜的温度和 pH 值环境中易降解、失活，对长期活性产生明显影响[10]。通过基因工程获得的重组胰蛋白酶的自水解位点经突变和甲基化修饰，结构更稳定、酶切能力更好，可显著改善非特异性酶切反应和稳定性。

注射用曲妥珠单抗（trastuzumab，商品名为赫赛汀）是一种利用中国仓鼠卵巢细胞（CHO 细胞）生产的重组免疫球蛋白 G 1（immunoglobulin G 1，IgG1）人源化单抗，单条轻链和重链共含 664 个氨基酸，平均相对分子质量约为 145 500，临床主要用于治疗人表皮生长因子受体 2 过表达的转移性乳腺癌[11]。本研究采用该代表性单抗药物作为肽图分析样本，从常规酶量快速酶切、低酶量过夜酶切和酶活测定 3 个方面，综合对比重组胰蛋白酶和 TPCK 胰蛋白酶的性能，以期在基于快速酶切和低酶量过夜酶切所得肽图的分析和筛选中选择更具优势的胰蛋白酶。

1 仪器和试药

Vanquish-Q-Exactive HFX 型液质联用仪（美国 Thermo Fisher 公司）；THZ-C 型恒温振荡仪（苏州培英实验室设备有限公司）。

注射用曲妥珠单抗（美国罗氏公司，规格 440 mg，批号 N7468-1）；甲酸（formic acid，FA，质谱级）、TPCK 胰蛋白酶（质谱级，批号 0000596068）均购于美国 Promega 公司；乙腈（美国 Thermo Fisher 公司，质谱级）；重组胰蛋白酶酶切试剂盒［含重组胰蛋白酶、盐酸胍（GuHCl）、碘乙酰胺（iodoacetamide，IAM）、二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT）和酶切缓冲液（pH 7.5），上海雅心生物技术有限公司，批号 SRT K240101］；*N*- 苯甲酰基 -L- 精氨酸乙酯（德国 Sigma-Aldrich 公司，批号 P2566729）；试验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 单抗的变性、还原和烷基化

取注射用曲妥珠单抗水溶液（5 μg/μL）20 μL，加入 8 mol/L 的 GuHCl 溶液 50 μL 和 1 mol/L 的 DTT 溶液 2 μL，混匀，使 GuHCl 的终浓度为 5.56 mol/L，在 56 ℃反应 30 min。待反应液冷却至室温后，加入 1 mol/L 的 IAM 溶液 4 μL，避光反应 30 min。加入酶切缓冲液（pH 7.5）124 μL，混匀，得到稀释反应液（GuHCl 终浓度为 2 mol/L）。

2.2 稀释法酶切

快速酶切：在稀释反应液中按酶和单抗的质量比（m_E ∶ m_P）为 1 ∶ 20 加入胰蛋白酶，分别在 37 ℃孵育 20、30、45、60 和 120 min，加入 10% FA 终止反应，样品终浓度约为 0.48 μg/μL。

低酶量过夜酶切：在稀释反应液中按 m_E ∶ m_P 为 1 ∶ 100、1 ∶ 125、1 ∶ 150 和 1 ∶ 200 分别加入胰蛋白酶，在 37 ℃过夜（约 14 h）孵育，加入

收稿日期：2025-03-10
基金项目：研究生创新基金项目（YJS2023033）
作者简介：刘 巧，硕士研究生，专业方向：生物大分子的结构表征和质量控制。
通信作者：李素霞，副教授，从事生物化学与分子生物学及酶学新技术和新方法的研究与开发。
潘红娟，研究员，硕士生导师，从事药品质量控制研究及新技术和新方法的研究与开发。

10% FA 终止反应，样品终浓度约为 0.48 μg/μL。

2.3 数据分析

用 BioPharma Finder 5.0 软件对采集的数据进行肽图分析，设置固定修饰为烷基化，质谱（MS）噪声水平为 100，*S/N* 阈值设置为 10，一级离子质量偏差在 ±5 以内，二级离子碎片偏差在 ±15 以内，置信度分数≥ 80，最佳自动评分（best ASR）≤ 2.0（b 或 y 离子碎片在目标肽段中的匹配度≥ 50%）。

2.4 LC-MS/MS 肽图分析

取酶切后的反应液进行 LC-MS/MS 分析。

色谱条件：色谱柱 Acquity Premier CSH C_{18} 柱（2.1 mm×150 mm，1.7 μm）；流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液，B 为 0.1%甲酸乙腈溶液，梯度洗脱（0—3 min，B 2%；3—100 min，B 2%—38%；100—105 min，B 38%—90%；105—110 min，B 90%；110—111 min，B 90%—2%；111—120 min，B 2%）；流速 0.2 mL/min；柱温 50 ℃；检测波长 214 nm；进样量 2 μL。

质谱条件：离子源 电喷雾电离源；电离模式 正离子模式；鞘气流速 241.33 kPa（35 psi）；辅气流速 68.95 kPa（10 psi）；反吹气流速 0；喷雾电压 3.8 kV；毛细管温度 320 ℃；离子漏斗射频电压 50 V；辅气加热温度 350 ℃；默认电荷态 2。

全质谱 微扫描 1；分辨率 60 000；自动增益目标值 3×10^6；最大进样时间 100 ms；扫描范围 *m/z* 150 ～ *m/z* 2 000；图谱数据类型 轮廓型。

二级质谱 微扫描 1；分辨率 15 000；自动增益目标值 1×10^5；最大进样时间 100 ms；分离窗口 2；固定第一质谱分数 110；归一碰撞能量 27 eV；数据类型 棒状型；最小自动增益目标值 1×10^3；电荷排除 未分配 ≥ 8；排除同位素 on；动态排除 10.0 s。

2.5 2 种胰蛋白酶快速酶切的对比

2.5.1 重组胰蛋白酶快速酶切时间的考察

取“**2.2**”项下快速酶切反应液，按“**2.4**”项下 LC-MS/MS 分析方法进行分析，结果如表 1 所示。酶切时间不同的 5 组肽段的轻链序列覆盖度均为 100%；酶切时间为 20 和 30 min 的重链覆盖度分别为 69.8%、74.2%，酶切 45、60、120 min 时均为 97.1%；且肽段总丰度随酶切时间的延长而增加。45、60、120 min 时的酶切结果符合肽图分析的覆盖度要求（≥ 95%），且这 3 组未检测到的肽段均为重链上的 T292-R304。这是因为 T292 为羟基氨基酸，可与 K291 之间产生氢键相互作用，导致该位点短时间内酶切效果较差。

表 1　重组胰蛋白酶酶切不同时间后曲妥珠单抗的轻重链序列覆盖度和总丰度

Tab.1　Light and Heavy Chain Sequence Coverage and Total Abundance of Trastuzumab Treated by Recombinant Trypsin at Different Enzymolysis Time Points

酶切时间 /min	轻链 /%	重链 /%	总丰度
20	100	69.8	5.79×10^8
30	100	74.2	7.48×10^8
45	100	97.1	8.39×10^8
60	100	97.1	1.07×10^9
120	100	97.1	1.79×10^9

经过快速酶切处理和 LC-MS/MS 分析，5 组肽段的漏切相对丰度和非特异性酶切相对丰度结果如图 1 所示。5 组肽段的严格漏切（1 个肽段中漏切数目 > 0 时）相对丰度为 87.21% ～ 92.53%。酶切 30 min 后有更多长肽段的酶切位点被切割，肽段总丰度增加，序列覆盖度提高，严格漏切的相对丰度逐渐降低。常规漏切（1 个肽段中漏切数目≥ 2 时）相对丰度为 33.64% ～ 49.61%。同样，酶切 30 min 是漏切相对丰度最高的点，漏切水平随酶切时间的增加总体呈降低趋势。在所考察的 5 个酶切时间中，非特异性酶切相对丰度均保持低水平（低于 0.4%），且随酶切时间延长相对丰度逐渐增加。各组肽段的非特异性酶切位点如表 2 所示，非特异性酶切易发生在亮氨酸（L）、天冬氨酸（D）和异亮氨酸（I）位点。

酶切 45 和 60 min 时的序列覆盖度良好，漏切和非特异性酶切相对丰度较低。因此选择这 2 个时间作为快速酶切方法的酶切时间，对比重组胰蛋白酶和 TPCK 胰蛋白酶在曲妥珠单抗肽图分析上的性能。

2.5.2 2 种胰蛋白酶快速酶切的肽图覆盖度对比

基于项“**2.5.1**”的结果，选择 45 和 60 min 作为快速酶切方法的酶切时间。按“**2.2**”项下方法，

分别采用重组胰蛋白酶和 TPCK 胰蛋白酶对曲妥珠单抗进行酶切处理，每组重复 3 次，并按“**2.4**”项下方法进行肽图分析。轻重链序列覆盖度和肽段总丰度如表 3 所示。2 种胰蛋白酶处理的轻链覆盖度均为 100%；重组胰蛋白酶处理后单抗重链序列覆盖度均 >77%，TPCK 胰蛋白酶处理组的结果为 47%～73%。以上结果说明单抗经重组胰蛋白酶处理后所得的轻、重链序列覆盖度更好。

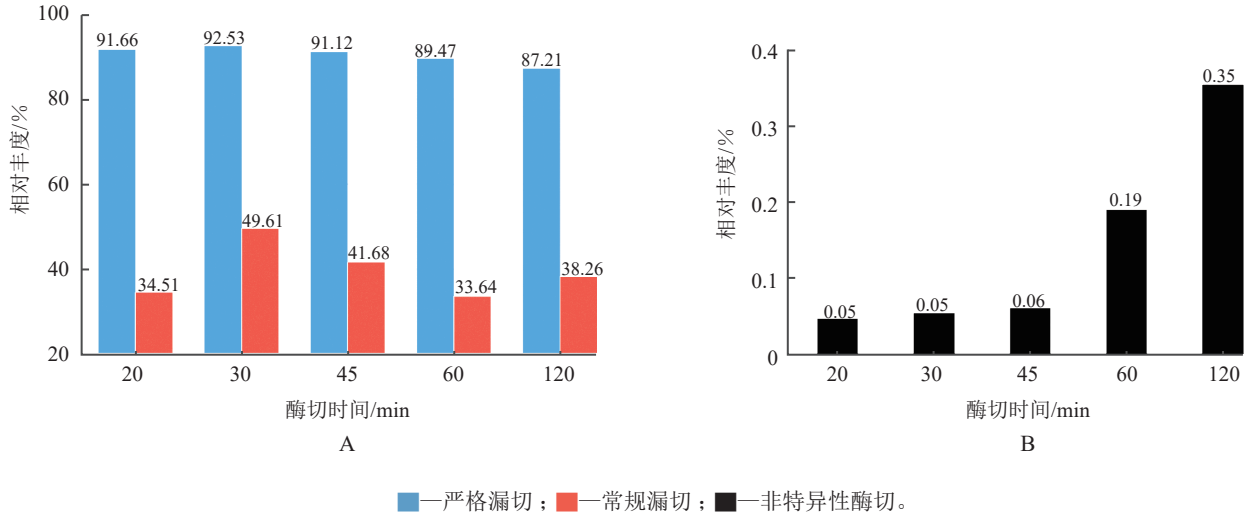


图 1　重组胰蛋白酶酶切处理不同时间后曲妥珠单抗的漏切（A）和非特异性酶切相对丰度（B）

Fig.1　Relative Abundances of Missed Cleavage（A）and Non-specific Cleavage（B）of Trastuzumab Treated with Recombination Trypsin Enzymatic at Different Enzymolysis Time Points

表 2　重组胰蛋白酶处理曲妥珠单抗的非特异性酶切位点及对应丰度

Tab.2　Non-specific Enzymolysis Sites and Corresponding Abundances of Trastuzumab Treated with Recombinant Trypsin

酶切时间 /min	酶切位点（总丰度）							
	轻链				重链			
	A25(S)	L47(I)	I75(S)	L4(V)	Y60(A)	D273(P)	L331(P)	G344(Q)
20	—	—	—	—	—	—	2.62×10^{5}	—
30	—	—	—	—	—	1.04×10^{6}	3.91×10^{5}	—
45	—	—	3.15×10^{5}	—	—	1.76×10^{5}	—	—
60	—	—	—	2.30×10^{5}	1.89×10^{5}	1.59×10^{5}	1.43×10^{6}	—
120	3.67×10^{5}	2.86×10^{5}	7.77×10^{5}	—	—	3.28×10^{5}	1.14×10^{6}	3.42×10^{6}

注：括号中为酶切位点的羧基端氨基酸，S 表示丝氨酸，I 表示异亮氨酸，V 表示缬氨酸，A 表示丙氨酸，P 表示脯氨酸，Q 表示谷氨酰胺；“—”表示未鉴定到该酶切位点。

表 3　2 种不同胰蛋白酶快速酶切曲妥珠单抗的轻重链序列覆盖度和总丰度

Tab.3　Light and Heavy Chain Sequence Coverage and Total Abundances of Trastuzumab after Rapid Enzymatic Hydrolysis by Two Different Trypsins

酶切时间 /min	组别	重组胰蛋白酶			TPCK 胰蛋白酶		
		轻链 /%	重链 /%	总丰度	轻链 /%	重链 /%	总丰度
45	1	100	97.1	9.79×10^{8}	100	50.7	3.64×10^{7}
	2	100	98.0	1.32×10^{9}	100	52.2	4.26×10^{7}
	3	100	92.2	1.16×10^{9}	100	47.6	4.28×10^{7}
60	1	100	81.2	8.46×10^{8}	100	60.7	5.23×10^{7}
	2	100	100	1.21×10^{9}	100	57.6	4.72×10^{7}
	3	100	77.1	1.32×10^{9}	100	72.2	1.09×10^{8}

曲妥珠单抗由 2 种胰蛋白酶处理后肽图匹配丢失的肽段如表 4 所示。在较短酶切时间下，从重链序列覆盖度和总丰度可见，TPCK 胰蛋白酶的酶切能力弱于重组胰蛋白酶。重组胰蛋白酶酶切 60 min 的重链序列覆盖度与酶切 45 min 组存在差异。这种差异主要归因于长肽段 D151-K221 是否丢失。在数据分析 Best ASR 评分≤ 2.0 的条件下，长肽段经质谱碎裂产生的离子碎片数目不稳定，离子碎片匹配度不达标的肽段未通过筛选，从而导致序列覆盖度产生差异。总结丢失肽段的结果显示，有部分肽段在 2 种胰蛋白酶处理下均会丢失，推测可能是胰蛋白酶中存在具有优先酶切倾向的类似位点。如胰蛋白酶优先酶切 R 残基，对于 R 残基的酶切常数低于对 K 残基的酶切 [12—13]。同时，酶切效能还与 R 残基与 K 残基周围的氨基酸残留有关。例如 K150-D151，酸性氨基酸 D151 的 D 残基羧基的负电荷会掩盖 K 残基侧链氨基的正电荷，导致该 K 残基酶切困难；K291-T292 中，T292 为羟基氨基酸，与 K291 之间存在氢键相互作用，也会导致酶切困难。相对而言，由于 TPCK 胰蛋白酶的稳定性差，采用 TPCK 胰蛋白酶处理会导致更多肽段丢失。

2.5.3　2 种胰蛋白酶快速酶切的漏切位点分析

曲妥珠单抗重链中一共有 13 个 R 残基位点和 32 个 K 残基位点。重组胰蛋白酶和 TPCK 胰蛋白酶快速酶切试验的肽图结果表明，单抗酶切会先发生在重链的 N 端和 C 端，同时沿重链序列顺序进行酶切，肽链的丢失集中在链的中后半段；且在易丢失肽段序列 D151-K450 中表现出位点优先酶切的倾向。这与单抗高级结构的破坏程度有关。而易丢失肽段序列 D151-K450 表现出的位点优先酶切倾向，与 K 残基、R 残基相邻的残基是否会中和其氨基的电荷导致胰蛋白酶对其识别困难有关。

对于 R 残基位点的酶切情况，2 种胰蛋白酶处理时，重链序列 D151 之前的 7 个 R 残基位点均被酶切。表 5 汇总了 D151 之后的 6 个 R 残基位点酶切情况。结果显示，重组胰蛋白酶对 R304 位点有更好的酶切效能，其他位点没有差异，重链中部的 R 残基位点在酶切时间较短时都容易漏切。对于 K 残基位点的酶切情况，在重链 D151 之前的 7 个 K 残基位点中，K30、K65 和 K76 位点都存在漏切可能性，重组胰蛋白酶对这 3 个位点的酶切效能比 TPCK 胰蛋白酶更好（表 5）。

重链 D151 之后的序列除最后 1 个 K 残基外还有 24 个 K 残基位点。其中，K208、K249 和 K293 的羧基端连接脯氨酸 (P)，不能被水解 [14]；剩余的 21 个 K 残基位点的酶切情况如图 2 所示。重组胰蛋白酶处理时，有 11 个位点可能发生漏切，位于重链中部的 K 残基位点漏切可能性更大，有 10 个位点没有发生漏切；TPCK 胰蛋白酶在较短酶切时间内，重链中后部分除 3 个 K 残基位点外，其他位点都有漏切的可能性。结合肽图序列覆盖度的表现，可得出结论：重组胰蛋白酶

表 4　经重组胰蛋白酶或 TPCK 胰蛋白酶快速酶切处理后曲妥珠单抗丢失的肽段 [1)]

Tab.4　Lost Peptide Fragments of Trastuzumab Rapidly Digested by Recombinant Trypsin or TPCK Trypsin

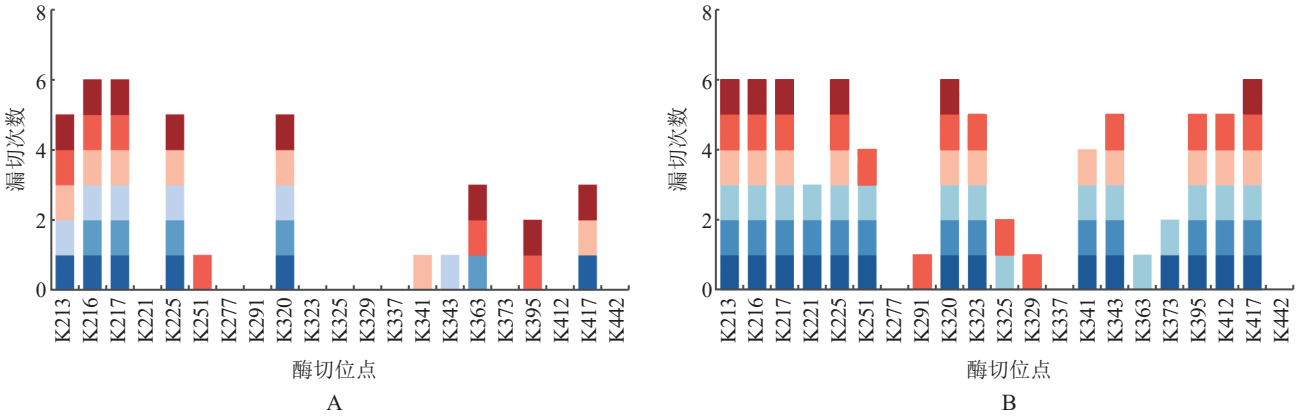
酶切时间 /min	重组胰蛋白酶处理丢失肽段	TPCK 胰蛋白酶处理丢失肽段
45	**T292**-R304、E296-R304、G374-K395	D151-R258、**T292**-K325、**T292**-K329、T338-K363、T338-R419、G374-R419、S443-G450
60	**D151-K221**、**T292**-R304、**T292-K323**	**D151-K221**、F278-K329、**T292-K323**、**T292**-K325、T338-K363、A342-K363、G374-K395、G374-R419

注：[1)] 加粗表示 2 种胰蛋白酶处理后丢失肽段对应的氨基酸位点一致。

表 5　曲妥珠单抗时重链序列 D151 之后 R 残基位点和 D151 之前 K 残基位点的漏切情况

Tab.5　The Missed Cleavage of the R Site after D151 and K Site before D151 in the Heavy Chain Sequence of Trastuzumab

胰蛋白酶种类	R 残基位点（漏切次数）						K 残基位点（漏切次数）						
	R258	R295	R304	R347	R358	R419	K30	K43	K65	K76	K124	K136	K150
重组胰蛋白酶	0	5	1	6	6	0	1	0	0	0	0	0	0
TPCK 胰蛋白酶	0	5	6	6	6	0	6	0	3	4	0	0	0



A—经重组胰蛋白酶酶切处理；B—经 TPCK 胰蛋白酶酶切处理。

—酶切 60 min，组 3；—酶切 60 min，组 2；—酶切 60 min，组 1；—酶切 45 min，组 3；—酶切 45 min，组 2；—酶切 45 min，组 1.

图 2 曲妥珠单抗重链序列 D151 后 K 残基位点的漏切情况

Fig.2 Omission Cleavage at Position K after D151 in the Heavy Chain Sequence of Trastuzumab

的快速酶切效能优于 TPCK 胰蛋白酶。

综合 2 种胰蛋白酶处理的肽图结果，曲妥珠单抗序列中 D151 之后的 2 个 R 位点 R258、R419 与 8 个 K 位点 K227、K291、K325、K329、K337、K363、K373 和 K442 容易与胰蛋白酶产生反应。随酶切时间增加，K221、K251、K323、K341、K343、K395 和 K412 这 7 个位点也相对容易发生反应。剩余 4 个 R 位点 R295、R304、R347、R358 和 6 个 K 位点 K213、K216、K217、K225、K320 和 K417 是较难与胰蛋白酶发生反应的位点。这是由于这些位点的位置都分布在单抗重链中后部，且与单抗的高级结构相关，短时间内难以和胰蛋白酶充分接触。

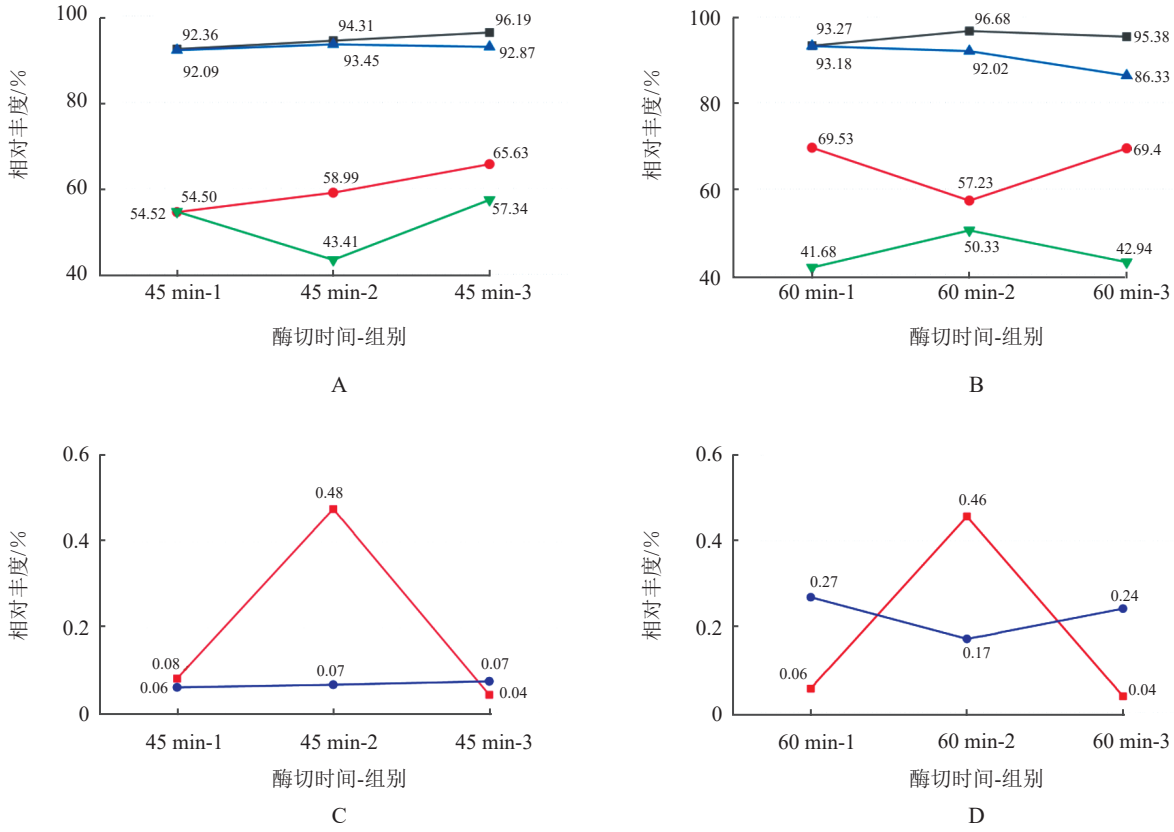
曲妥珠单抗的重链序列 D151 之前存在相同数目的 K 残基和 R 残基位点。对比 2 种胰蛋白酶处理曲妥珠单抗的结果可见，重组胰蛋白酶处理时仅有 1 个 K 残基位点存在漏切现象，TPCK 胰蛋白酶处理有 3 个 K 残基位点都存在漏切现象，序列 D151 之后 TPCK 胰蛋白酶处理的 K 残基位点漏切情况也更多，说明重组胰蛋白酶对 K 残基位点的酶切效能比 TPCK 胰蛋白酶更强。

2.5.4 2 种胰蛋白酶快速酶切的漏切相对丰度和非特异性酶切相对丰度对比

曲妥珠单抗被重组胰蛋白酶和 TPCK 胰蛋白酶酶切 45 或 60 min 后的漏切和非特异性酶切相对丰度如图 3 所示，轻重链出现的各非特异性酶切位点及对应丰度如表 6 所示。2 种胰蛋白酶的严格漏切相对丰度接近，均大于 85%，而重组胰蛋白酶的常规漏切相对丰度高于 TPCK 胰蛋白酶。重组胰蛋白酶酶切曲妥珠单抗的肽段总丰度比 TPCK 胰蛋白酶的处理结果高 1 个数量级，且漏切位点的肽段信号更强，因此漏切相对丰度更高。

2 种胰蛋白酶的非特异性酶切相对丰度均＜0.5%，呈现较低水平，说明 2 种胰蛋白酶应用于快速酶切都具有良好的酶切位点识别特异性。酶切时间为 45 min 时，TPCK 胰蛋白酶处理的肽段总丰度低，存在较多未酶切的特异性位点，因此其非特异性酶切相对丰度低于重组胰蛋白酶。酶切时间延长至 60 min 时，特异性酶切位点数目减少，肽段总丰度提高的同时出现更多非特异性酶切现象。

糜蛋白酶优先水解芳香族氨基酸［苯丙氨酸（F）、色氨酸（W）和酪氨酸（Y）］与疏水性氨基［酸亮氨酸（L）、缬氨酸（V）、异亮氨酸（I）］之间的肽键；当 C 端连接脯氨酸（P）时糜蛋白酶无法发挥酶切作用，且存在其他氨基酸如亮氨酸（L）、甲硫氨酸（M）时酶切性能也会受到影响[14—15]。结果显示，重组胰蛋白酶处理曲妥珠单抗产生的非特异性酶切位点没有与糜蛋白酶重合，可排除糜蛋白酶的影响。TPCK 胰蛋白酶的非特异性酶切结果中 C 端连接亮氨酸（L）



A—酶切 45 min 曲妥珠单抗的漏切相对丰度；B—酶切 60 min 曲妥珠单抗的漏切相对丰度；C—酶切 45 min 曲妥珠单抗的非特异性酶切相对丰度；D—酶切 60 min 曲妥珠单抗的非特异性酶切相对丰度。

■—重组胰蛋白酶，严格漏切；●—重组胰蛋白酶，常规漏切；▲—TPCK 胰蛋白酶，严格漏切；▼—TPCK 胰蛋白酶，常规漏切；■—重组胰蛋白酶，非特异性酶切；●—TPCK 胰蛋白酶，非特异性酶切。

图 3　快速酶切后曲妥珠单抗的漏切相对丰度和非特异性酶切相对丰度

Fig.3　The Relative Abundances of Missed Cleavage and Non-Specific Cleavage of Trastuzumab after Rapid Enzymatic Digestion

表 6　快速酶切后曲妥珠单抗轻链和重链的非特异性酶切位点及对应丰度

Tab.6　The Non-specific Enzymolysis Sites and Corresponding Abundances of Light Chain and Heavy Chain of Trastuzumab after Rapid Enzymatic Digestion

酶种类	酶切时间 / min	轻链酶切位点（总丰度）						重链酶切位点（总丰度）				
		Q6 (S)	S7 (P)	L11 (S)	F53 (L)	F116 (I)	N152 (A)	E6 (S)	Q13 (P)	L45 (E)	L331 (P)	L444 (S)
重组胰蛋白酶	45	5.33×10^{6}	—	—	—	—	3.58×10^{4}	—	—	—	1.74×10^{6}	—
	60	—	5.18×10^{6}	—	—	—	—	—	—	—	1.34×10^{6}	—
TPCK 胰蛋白酶	45	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8.19×10^{4}	—
	60	—	—	1.13×10^{4}	4.39×10^{4}	3.41×10^{4}	—	3.33×10^{4}	9.72×10^{4}	1.65×10^{4}	3.89×10^{5}	1.96×10^{4}

注：括号中为酶切位点的羧基端氨基酸，S 表示丝氨酸，P 表示脯氨酸，L 表示亮氨酸，I 表示异亮氨酸，A 表示丙氨酸，E 表示谷氨酸；“—”表示未鉴定到该酶切位点。

或异亮氨酸 (I) 的苯丙氨酸 (F) 为糜蛋白酶水解位点，说明经 TPCK 纯化后的提取胰蛋白酶也存在微量糜蛋白酶对酶切产生影响。

2.6　稀释法低酶量过夜酶切

2.6.1　酶与单抗的比例考察

取“**2.2**”项下低酶量过夜酶切反应液，按“**2.4**”

项下 LC-MS/MS 法分析曲妥珠单抗的序列覆盖度和肽段总丰度，结果如表 7 所示。4 种酶用量条件下，轻链序列覆盖度均为 100%，重链存在肽段丢失现象。从序列覆盖度和丢失肽段情况来看，胰蛋白酶和单抗质量比为 1 ∶ 100 和 1 ∶ 125 时的酶切效果较好；当质量比为 1 ∶ 150 和 1 ∶ 200 时，重链中后部分肽链存在较多漏切，总丰度明显降低，难以达到覆盖度要求。

过夜酶切的酶用量对漏切相对丰度和非特异性酶切的影响如图 4 所示。m_E ∶ m_P=1 ∶ 100 时，重链部分未鉴定到长肽段 D151-K221，导致 m_E ∶ m_P 为 1 ∶ 100 时相较 1 ∶ 125 时的严格漏切相对丰度明显降低。常规漏切相对丰度部分，前 3 组比例都在 35%以下，而 m_E ∶ m_P=1 ∶ 200 时达到了 60.27%，表明在该条件下即使延长酶切时间也不能达到肽图分析要求。4 种酶用量的非特异性酶切结果都低于 0.2%，在长时间酶切条件下依旧保持低水平。

综合肽段总丰度、序列覆盖度、漏切相对丰度和特异性酶切相对丰度结果，选择酶与蛋白质量比为 1 ∶ 100 和 1 ∶ 125 对比 2 种胰蛋白酶酶切曲妥珠单抗的效果。

表 7　重组胰蛋白酶用量对曲妥珠单抗轻重链序列覆盖度和总丰度的影响

Tab.7　Effect of Amount of Recombinant Trypsin on the Light and Heavy Chain Sequence Coverage and Total Abundances of Trastuzumab

m_E ∶ m_P	轻链 /%	重链 /%	总丰度
1 ∶ 100	100	81.3	1.09×10^9
1 ∶ 125	100	92.2	6.07×10^8
1 ∶ 150	100	69.1	4.97×10^8
1 ∶ 200	100	31.8	1.29×10^8

2.6.2　2 种胰蛋白酶稀释法过夜酶切肽图分析结果对比

取重组胰蛋白酶和 TPCK 胰蛋白酶，分别按“**2.2**”项下方法过夜酶切曲妥珠单抗，按“**2.4**”项下方法进行肽图分析，每组重复 3 次。

2 种酶在 1 ∶ 100 和 1 ∶ 125 条件下，酶切曲妥珠单抗样品的序列覆盖度和肽段总丰度如表 8 所示。重组胰蛋白酶在 2 种酶用量下轻重链的覆盖度结果一致，均高于 95%，重链丢失肽段为 T292-R304。TPCK 胰蛋白酶处理的重链覆盖度结果除 1 次试验外均低于 95%，肽段总丰度也低于重组胰蛋白酶的酶切结果，表明重组胰蛋白酶在低酶量过夜酶切条件下具有更好的酶切性能。

采用 2 种胰蛋白酶以 m_E ∶ m_P 为 1 ∶ 100 和

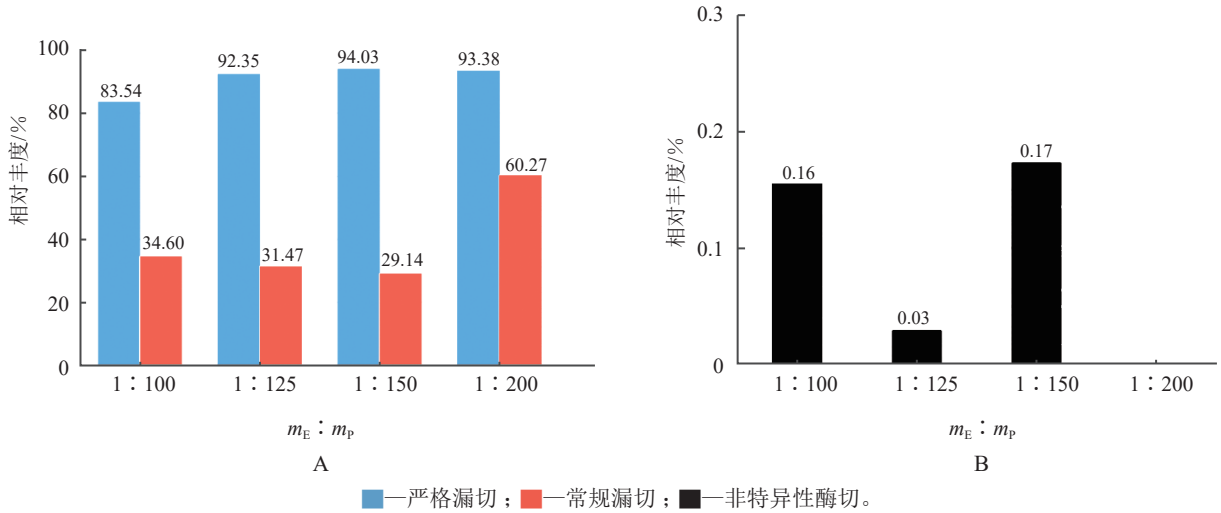


图 4　不同用量重组胰蛋白酶对曲妥珠单抗的漏切相对丰度（A）和非特异性酶切相对丰度（B）的影响

Fig.4　Effect of Recombinant Trypsin Amount on the Relative Abundances of Missed Cleavage (A) and Non-specific Cleavage (B) of Trastuzumab

1 ∶ 125 分别酶切曲妥珠单抗，所得漏切相对丰度和非特异性酶切相对丰度结果如图 5 所示。在 m_E ∶ m_P 为 1 ∶ 100 时，重组胰蛋白酶处理的漏切相对丰度均更低；m_E ∶ m_P=1 ∶ 125 时，2 种酶的漏切相对丰度均有波动，整体来看仍是重组胰蛋白酶的结果更低、更稳定。重组胰蛋白酶在 2 种条件下处理曲妥珠单抗的非特异性酶切相对丰度都低于 0.3%，结果较稳定；TPCK 胰蛋白酶对单抗进行过夜酶切时，存在更多未反应的特异性酶切位点，非特异性酶切相对丰度低于重组胰蛋白酶处理结果。2 种胰蛋白酶处理的非特异性酶切位点及对应总丰度如表 9 所示，重组胰蛋白酶的非特异性酶切位点发生于疏水性氨基酸较多，如亮氨酸（L）和丙氨酸（A），未检测到芳香氨基酸位点；TPCK 胰蛋白酶酶切结果中观察到了苯丙氨酸（F）被水解，与糜蛋白酶水解位点相符。

2.7　2 种胰蛋白酶的酶活性测试

模拟样品酶切时的溶液体系，测定 2 种胰蛋白酶在反应体系中的活性变化情况。胰蛋白酶的酶活性测定方法参照 ChP 2020 年版四部通则 3606《重组胰蛋白酶》和二部正文“胰蛋白酶”，使用 *N*- 苯甲酰 -L- 精氨酸乙酯为底物进行活性测定。配制含 2 mol/L GuHCl、10 mmol/L DTT 和 20 mmol/L IAM 的酶反应体系，酶用量见表 10，在 37 ℃分别反应 1 和 14 h。2 种胰蛋白酶在模拟反应体系中的活性变化结果如表 10 所示。

反应 1 h 时，除 TPCK 胰蛋白 1 ∶ 125 组，其他组活性保留结果均 >90%；反应 14 h 时，重组胰蛋白酶活性保留结果仍 >50%，高于 TPCK 胰蛋白酶。3 种酶用量和 2 种酶切时间条件下，重组胰蛋白酶活性保留和稳定性均高于 TPCK 胰蛋白酶。基于稀释法酶切反应体系的活性保留数据，结合前文肽图

表 10　重组胰蛋白酶和 TPCK 胰蛋白酶在反应体系中的活性 /%

Tab.10　The Activities of Recombinant Trypsin or TPCK Trypsin in Reaction Buffer/%

m_E ∶ m_P	重组胰蛋白酶			TPCK 胰蛋白酶		
	0 h	1 h	14 h	0 h	1 h	14 h
1 ∶ 20	100.0	98.0	54.0	100.0	90.8	40.9
1 ∶ 100	100.0	109.4	54.5	100.0	91.0	27.5
1 ∶ 125	100.0	91.0	73.0	100.0	63.5	54.5

表 8　不同酶用量下 2 种胰蛋白酶处理曲妥珠单抗的轻重链序列覆盖度和总丰度

Tab.8　The Coverage and Total Abundances of the Light and Heavy Chain Sequences of Trastuzumab after Digestion by 2 Trypsins at Different Enzyme Amounts

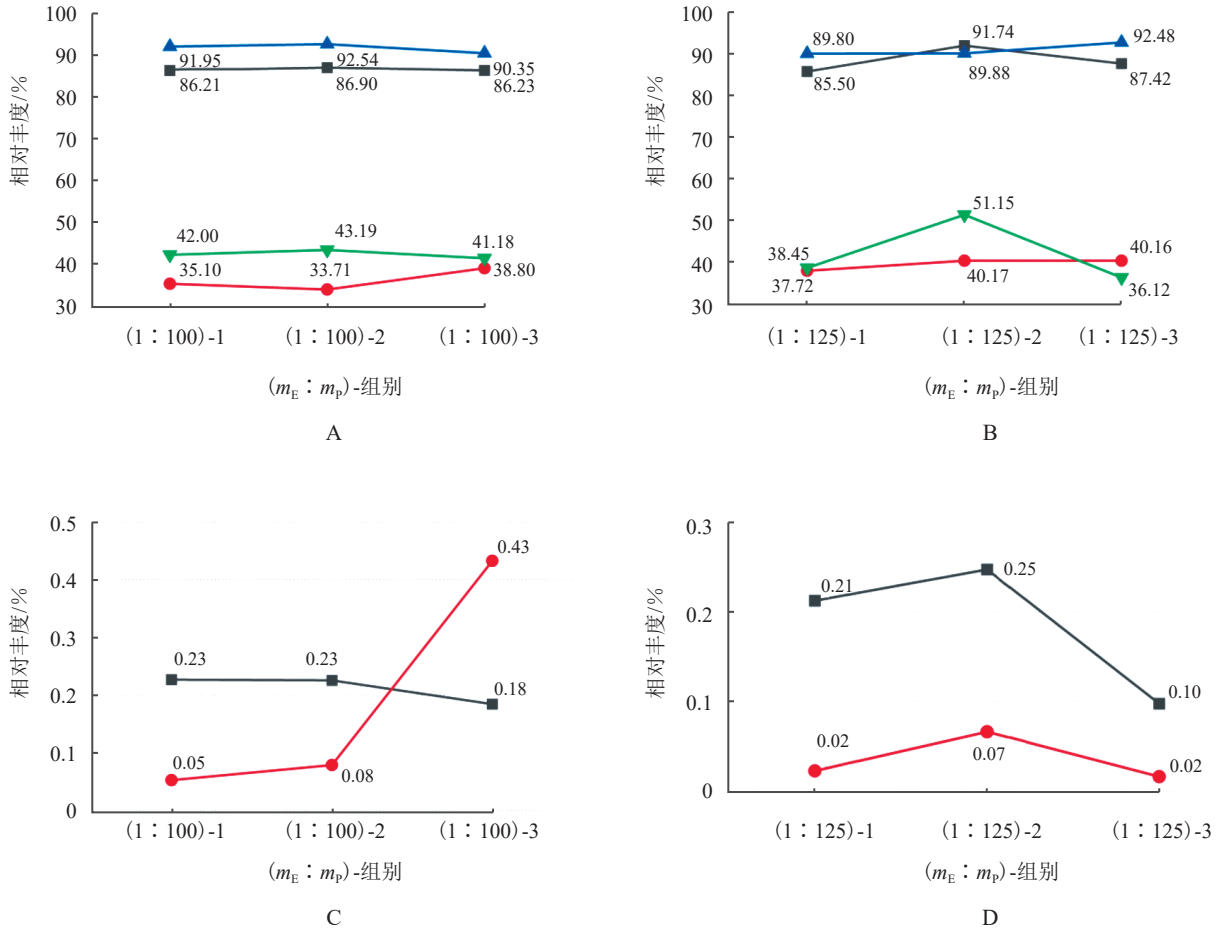
m_E ∶ m_P	组别	重组胰蛋白酶			TPCK 胰蛋白酶		
		轻链 /%	重链 /%	总丰度	轻链 /%	重链 /%	总丰度
1 ∶ 100	1	100	97.1	1.46×10^9	100	77.1	4.85×10^8
	2	100	97.1	1.37×10^9	100	97.1	5.23×10^8
	3	100	97.1	1.20×10^9	100	77.1	4.37×10^8
1 ∶ 125	1	100	97.1	1.01×10^9	100	72.2	2.99×10^8
	2	100	97.1	5.52×10^8	100	77.1	3.67×10^8
	3	100	97.1	6.50×10^8	100	71.8	3.23×10^8

表 9　低酶量过夜酶切曲妥珠单抗轻重链的非特异性酶切位点及对应丰度

Tab.9　The Non-specific Enzymolysis Sites and Corresponding Abundances of Light and Heavy Chains of Trastuzumab by Overnight Digestion with Low Enzyme Amounts

酶种类	m_E ∶ m_P	酶切位点（总丰度）								
		轻链						重链		
		L11(S)	A13(S)	A25(S)	F53(L)	I75(S)	F116(I)	Q13(P)	A234(P)	L331(P)
重组	1 ∶ 100	6.84×10^5	3.12×10^5	1.33×10^5	—	3.62×10^5	—	—	2.89×10^5	6.75×10^6
	1 ∶ 125	2.43×10^5	1.16×10^5	—	—	—	—	1.04×10^6	6.37×10^5	2.12×10^6
TPCK	1 ∶ 100	—	—	—	1.39×10^5	2.03×10^5	2.03×10^5	1.54×10^6	—	8.20×10^5
	1 ∶ 125	—	—	—	—	—	—	—	—	3.66×10^5

注：括号中为酶切位点的下一个氨基酸；“—”表示未鉴定到该酶切位点。



A—m_E ∶ m_P=1 ∶ 100 酶切的漏切相对丰度；B—m_E ∶ m_P= 1 ∶ 125 酶切的漏切相对丰度；C—m_E ∶ m_P=1 ∶ 100 酶切的非特异性酶切相对丰度；D—m_E ∶ m_P= 1 ∶ 125 比例酶切的非特异性酶切相对丰度。

■—重组胰蛋白酶，严格漏切；●—重组胰蛋白酶，常规漏切；▲—TPCK 胰蛋白酶，严格漏切；▼—TPCK 胰蛋白酶，常规漏切；■—重组胰蛋白酶，非特异性酶切；●—TPCK 胰蛋白酶，非特异性酶切。

图 5　低酶量过夜酶切曲妥珠单抗的漏切相对丰度和非特异性酶切相对丰度

Fig.5　The Relative Abundances of Missed Cleavage and Non-Specific Cleavage of Trastuzumab by Overnight Digestion with Low Enzyme Amounts

分析结果，验证了稀释法在胰蛋白酶酶切单抗肽图分析中的应用良好。

3　讨论

在酶切体系中含有 2 mol/L GuHCl 时，2 种质谱级胰蛋白酶的非特异性酶切相对丰度都保持较低水平。重组胰蛋白酶处理单抗的序列覆盖度、肽段有效丰度、漏切情况均优于 TPCK 胰蛋白酶，肽图分析结果更好。2 种质谱级胰蛋白酶都可应用于常规酶切时间（4 ～ 16 h）和酶切比例（1 ∶ 20 ～ 1 ∶ 100）的肽图分析。重组胰蛋白酶在含盐溶液体系中的高活性保留和稳定肽图分析结果证明，该酶可应用于节约前处理时间的快速酶切以及节约耗材成本的低酶量过夜酶切，可成为肽图分析中更好的选择。

此外，研究结果表明，2 种胰蛋白酶在特异性酶切位点 K 残基的酶切性能上存在差异。相较于 TPCK 胰蛋白酶，重组胰蛋白酶在短时间内对 K 残基位点表现出更好的酶切活性。分析具体的非特异性酶切位点，重组胰蛋白酶的酶切结果不包括糜蛋白酶对应酶切位点，后续可进一步探究非酶水解导致非特异性酶切位点产生的原因。

参考文献：

[1] 白　露, 叶日平, 刘蒙蒙, 等. 抗 CD33 单克隆抗体肽图分析方法的建立与验证 [J]. 中国药学杂志, 2024, **59**(16): 1495-1503.

[2] 杨湘芬, 张　珂, 王世聪, 等. 基于直接注射 - 多级质谱全扫描技术的人血红蛋白快速肽图分析 [J]. 分析化学, 2023, **51**(3): 383-395.

[3] 李国星, 魏　星, 陈明丽, 等. 基于质谱的单细胞蛋白质组学分析策略与应用 [J]. 分析测试学报, 2025, **44**(1): 99-105.

[4] 李锐东, 汪　敏, 王璐璐, 等. 胰蛋白酶与赖氨酸 C 端内切酶不同顺序酶切对蛋白质组样本制备的影响 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2024, **40**(11): 1618-1626.

[5] SUN W, WU S Z, WANG X R, *et al*. A systematical analysis of tryptic peptide identification with reverse phase liquid chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry [J]. *Genomics Proteomics Bioinf*, 2016, **2**(3): 174-183.

[6] VANDERMARLIERE E, MUELLER M, MARTENS L. Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2013, **32**(6): 453-465.

[7] STEEN H, MANN M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, **5**(9): 699-711.

[8] MENNETEAU T, SAVELIEV S, BUTRÉ C I, *et al*. Addressing common challenges of biotherapeutic protein peptide mapping using recombinant trypsin [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2024, **243**: 116124.

[9] F H CARPENTER. Treatment of trypsin with TPCK [J]. *Methods Enzymol*, 1967, **11**: 237.

[10] 赵　致, 王之可, 刘　晓. 一种无自切的胰蛋白酶及其制备方法: 中国, 110093336A [P]. 2019-08-06.

[11] 朱文文. 基于质谱技术曲妥珠单抗等三种药物结构表征与杂质分析新方法研究 [D]. 北京: 北京协和医学院硕士学位论文, 2021.

[12] GLATTER T, LUDWIG C, AHRNE E, *et al*. Large-scale quantitative assessment of different in-solution protein digestion protocols reveals superior cleavage efficiency of tandem Lys-C/trypsin proteolysis over trypsin digestion [J]. *J Proteome Res*, 2012, **11**: 5145-5156.

[13] HUESGEN P F,LANGE P F,ROGERS L D, *et al*. LysargiNase mirrors trypsin for protein C-terminal and methylation-site identification [J]. *Nat Methods*, 2015, **12**(1):55-58.

[14] 修志龙, 李晓辉, 李　春. 生物化学 [M]. 第二版. 北京: 化学工业出版社, 2017: 46.

[15] 吴飞林, 赵明治, 张　瑶, 等. 蛋白质水解酶和样品预处理优化技术在蛋白质组学研究中的应用 [J]. 生物工程学报, 2016, **32**(3): 306-316.