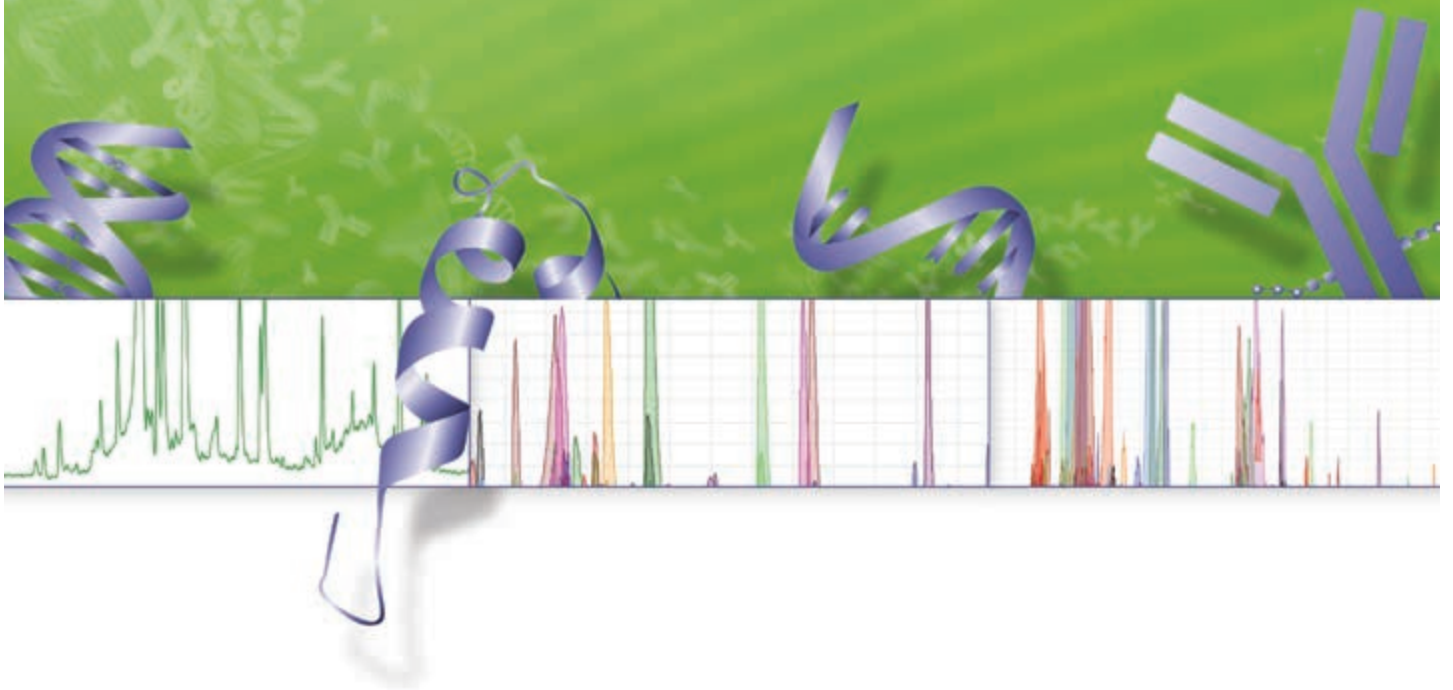


最优化肽段表征的要点：

肽谱分析指南

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

前言

肽谱分析（生物制药中的一项重要工具）是一款非常强大的方法，广泛用于蛋白质的鉴定测试，尤其适用于重组方式生成的蛋白。分析中常需通过酶解（常使用胰蛋白酶）蛋白质生成肽段碎片，然后进行可重现的碎片分离和鉴定，从而检测并监测单一氨基酸变化、氧化、脱氨基及其他的降解产物。肽谱分析还可以直接检测常见的单克隆抗体变体，例如 N 端环化、C 端赖氨酸处理和 N 端糖基化，以及其它的翻译后修饰。

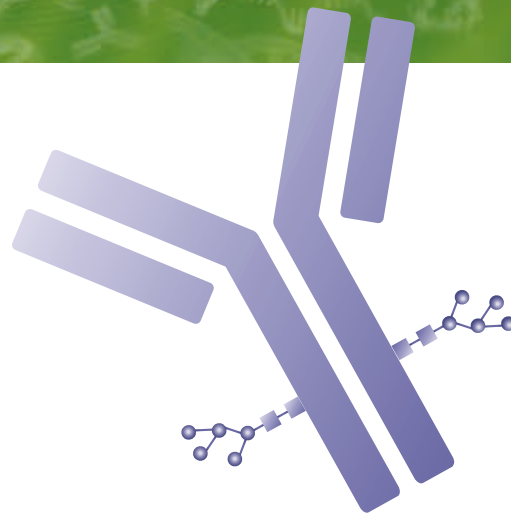
肽谱是一个蛋白及其多次处理后所得最终产物的指纹图谱，可为所分析的蛋白提供一个全面深入的认识。它包括四个主要步骤：蛋白质分离和纯化；肽键的选择性裂解；肽段的色谱分离以及肽段的验证分析。

肽谱被认为是一个对比流程，它可以确定蛋白的一级结构，并检测结构的改变。此外，它还可用于证实处理一致性和遗传稳定性。肽谱中应包含蛋白质的阳性鉴定、完整肽段序列的最大覆盖率，并提供除酶解蛋白水平处所得信息之外的其他信息和序列鉴定。

选择适合的色谱技术用于分离肽段并生成肽谱时，需考虑蛋白质本身、实验目的及预期结果。但是，反相色谱 (RPC) 卓越的分离能力使其成为了肽谱分离中最主要的 HPLC 技术。由于此技术可使用挥发性的流动相洗脱液，因此也是分析和制备分离的理想选择。需要重点注意的是：肽谱分离的首选色谱柱与用于小分子分离的色谱柱类似，但是由于大多数肽谱分离均在低 pH 和加热条件下进行，所以常使用具有出色 pH 稳定性和受硅醇影响最小的色谱柱。

要成功生成肽谱，需仔细检查完整的表征策略。一张谱图可能包含 100 多个色谱峰，代表不同的肽段及其衍生物，所以需要分析人员具备样品前处理方法、强大分离技术和验证方案方面的知识。拥有成功开发肽谱的技能和信息将有助于您获得最佳的蛋白水解消化物分离，并成功进行肽段的可靠表征。

本肽谱分析指南的目的是：强调利用反相色谱进行肽谱分析时的一些重要事项；分享一些用于肽谱分析流程的基本技术；以及强调进行肽谱分离优化时的注意事项，尽可能获得最佳结果。





蛋白质酶解： 处理蛋白质以增强肽谱分离

在分析前，需要很好地了解蛋白质酶解的步骤，这有助于确保酶解过程完整、成功地进行，以及帮助您更自信地选择策略。通常情况下，酶解方法需要一套独立的开发方案，以提供充足稳定的样品进行 LC 进样。虽然酶解过程的优化有许多选择可以考虑，但还是需要遵循一些

常用方法。蛋白质酶解可分为五个步骤，如表 1 中总结：(1) 样品前处理，(2) 选择裂解试剂，(3) 烷基化/还原，(4) 酶解过程，(5) 富集/纯化。

表 1

蛋白质酶解的五个步骤

步骤	预期效果	常规实验
1. 样品前处理	对样品进行前处理，用于酶解	去除、富集、透析、脱盐
2. 选择裂解试剂	特定的裂解要求	无
3. 还原和烷基化	还原反应可还原二硫键 烷基化反应涵盖 SH 基团	还原：DTT，45 min，60 °C 烷基化：IAM，1 h，暗光下进行
4. 酶解过程	蛋白质裂解	酶解：pH 8，37 °C，过夜 淬灭：加入 TFA
5. 富集/纯化	制备样品用于 LC 或 LC/MS 分析	C18 枪头、浓缩、透析、亲和色谱柱

如需了解更多用于肽谱分析的安捷伦色谱柱信息，请访问 agilent.com/chem/advancebio

第一步：样品前处理

根据蛋白质的大小或结构，样品的前处理方法不尽相同。在特定的条件下，可能需要进行样品富集，或从所添加的物质和稳定剂（用于产品剂型中）中分离蛋白质，尤其是在这些添加剂会干扰肽谱分析过程时。针对这些流程，现已开发有许多方法，每种蛋白质均具有一套对应的纯化措施或处理方法。但是，酶解前通常会使用一些更常用的方法进行样品纯化，包括去除/富集、透析和凝胶过滤脱盐。

去除和富集策略分别被开发用于去除样品中的高丰度蛋白质或分离目标蛋白质。更多的时候，去除策略用于蛋白质组学应用，用以降低生物样品（例如，血清）的复杂性，此类样品中含有高浓度的白蛋白和免疫球蛋白。利用安捷伦的多重亲和去除系统 (MARS) HPLC 色谱柱以及离心小柱，可以对血清、血浆和其它生物体液中高价值、低丰度蛋白质和生物标志物进行鉴定和表征。通过 MARS 去除 14 种高丰度蛋白质，可去除总蛋白量的约 94%。该去除过程稳定、易于自动化操作，且效率很高。



MARS 可以使用各种液相柱规格和离心小柱。可去除的蛋白质包括白蛋白、IgG、抗胰蛋白酶、IgA、转铁蛋白、结合珠蛋白、纤维蛋白原、 α 2-巨球蛋白、 α 1-酸性糖蛋白、IgM、载脂蛋白 AI、载脂蛋白 AII、补体 C3 及甲状腺素运载蛋白。

去除策略利用了免疫亲和技术（例如，免疫沉淀、免疫共沉淀及免疫亲和色谱法）。另一方面，富集技术会根据独特的生化活性、翻译后修饰 (PTM) 或胞内的空间定位分离细胞蛋白的亚类。翻译后修饰（例如，磷酸化和糖基化）可使用亲和配体（例如，金属离子亲和色谱 (IMAC) 或固定化凝集素）进行富集。为引入独特的蛋白质化学，其它技术需使用代谢或酶促结合修饰后的氨基酸或 PTM。

不论是简单的样品还是复杂的样品，常需要通过透析或脱盐对样品进行优化处理，以确保它们酶解过程的兼容性。例如，由于质谱法 (MS) 将测定带电离子，因此必须在 MS 前进行除盐（特别是钠盐和磷酸盐），最大程度减少它们对检测的干扰。透析和脱盐产物可进行缓冲液交换、脱盐或小分子去除处理，以防止对后续过程的干扰。

透析是降低样品中盐浓度的常规流程，具体步骤是先将样品装入透析袋（袋膜具有特定的孔隙）中，袋口打结，然后将其置入水浴或缓冲液中，通过扩散使盐浓度达到平衡。大分子无法扩散出透析袋，从而会留在袋内。如果使用水浴，袋内小分子的浓度会缓慢降低，直到透析袋内外浓度相同。达到平衡后，即可撕破透析袋，将其中的溶液倒入收集容器中。虽然透析体积可达几升，但对于大量样品却并不实际，因为会需要几天时间才能将盐完全去除。

凝胶过滤 (GF) 是最实用的实验室流程，可在酶解前对样品进行除盐。该方法是一种非吸附的色谱技术，可根据分子大小进行分子分离。除盐可被用于完全去除或降低样品中的盐浓度或其它小分子量成分，而缓冲液的更换则会使用一种新的缓冲液替换样品中的缓冲液。



Agilent Bio SEC 色谱柱可在肽谱分析应用前对蛋白质混合物进行有效分类（按大小）和除盐。

凝胶过滤法是最简单的色谱操作法之一，因为样品均在等度洗脱条件下处理。在其分析形式中，凝胶过滤法（也称为体积排阻色谱）可分离分子量差异小于两倍的分子（例如，蛋白质）。在这些应用中，目标分离物质的体积差异非常大（即，蛋白质与盐相比）。通过选择凝胶过滤介质，可完全排除较大的分子，同时允许较小的分子自由扩散至所有的孔隙中。色谱柱使用一种缓冲液进行平衡，与样品的缓冲液可能相同，也可能不同。将样品加载至色谱柱后，再添加更多的色谱

柱缓冲液（洗脱缓冲液），携带样品分子自上而下地流过色谱柱。较大的分子（不能进入介质的孔隙中）首先从色谱柱中洗脱出来，然后是扩散入孔隙的较小分子，相对于较大的分子，小分子的洗脱时间更长。如果洗脱缓冲液与样品使用的缓冲液不同，则较大的分子会从原始盐中替换出来，并被这种新的缓冲液洗脱，从而从最初的样品缓冲液中完全分离出来。

Captiva 低蛋白结合过滤器

无论您使用何种样品前处理方法，采用一种低蛋白结合过滤器对样品进行过滤都是一项不错的选择。

Agilent PES 过滤器可在蛋白质相关的过滤中提供优越和一致的低蛋白质结合力。在大多数液相色谱分析中，PES 滤膜相对 PVDF 滤膜而言是一种更好的选择。对于常见的液相色谱溶剂，Agilent PES 具有与 PVDF 过滤器相似的兼容性，而在蛋白质结合力和清洁度方面比 PVDF 更胜一筹。如需了解更多信息，请访问 agilent.com/chem/filtration

Captiva PES 过滤器

直径 (mm)	孔径 (μm)	认证	外壳	部件号
15	0.2	LC/MS	聚丙烯	5190-5096
4	0.45	LC	聚丙烯	5190-5095
4	0.2	LC/MS	聚丙烯	5190-5094
15	0.45	LC	聚丙烯	5190-5097
25	0.2	LC/MS	聚丙烯	5190-5098
25	0.45	LC	聚丙烯	5190-5099



如需了解更多用于肽谱分析的安捷伦色谱柱信息，请访问 agilent.com/chem/advancebio

第二步：选择裂解试剂

有两种方法可实现肽键的裂解——化学方法和酶促方法。化学裂解包括使用亲核的非酶促试剂（例如，溴化氰 (CNBr)）在特定区域以化学形式裂解肽键，经证实蛋白水解酶（例如，胰蛋白酶）在各种位点特异性裂解中都非常有效。裂解方法和试剂的选择取决于分析中所测试的蛋白质和特定的结果预期。此外，选择过程需要仔细考察整个肽谱分析过程，并考虑相关的表征。肽谱分析最常用的裂解试剂为胰蛋白酶，因为其具有良好的特异性。胰蛋白酶仅水解羧基连接有精氨酸 (Arg) 或赖氨酸 (Lys) 的肽键。表 2 中列出了一些常见的裂解试剂及它们的特异性。

表 2

裂解类型		
裂解类型	裂解试剂	特异性
酶促型	胰蛋白酶	Arg 和 Lys 的羧基端
	胃蛋白酶	非特异性
	糜蛋白酶	疏水性残基的羧基端
	谷酰基肽链内切酶	Glu 及 Asp 的羧基端
化学型	溴化氰	Met 的羧基端
	稀酸	Asp 与 Pro
	BNPS 粪臭素	Trp

第三步：变性、还原和烷基化

为使蛋白水解酶有效地裂解肽链，需要利用各种试剂对样品进行变性、还原和烷基化。变性和还原常可同时进行，即在使用试剂（例如，1,4-二硫苏糖醇 (DTT)、巯基乙醇、或三羧甲基磷酸）的同时进行加热。大多数情况下使用 DTT，这是一种强还原剂，可还原二硫键，从而保护蛋白质中半胱氨酸之间的分子间和分子内二硫键。通过同时进行变性和还原，可避免因二硫键被还原而导致的蛋白复性（单独使用加热作为变性剂时常存在的问题）。蛋白变性及还原后，还需要对

半胱氨酸进行烷基化，以进一步减少潜在的复性。酶解前对蛋白质样品进行烷基化的最常用试剂为碘乙酰胺 (IAM) 和碘乙酸 (IAA)。

图 1 中的例子很好的展示了使用反相色谱分离方法验证单克隆抗体水解前的还原和烷基化反应的完全性。

图 1 — 反相色谱法所得的还原/烷基化谱图

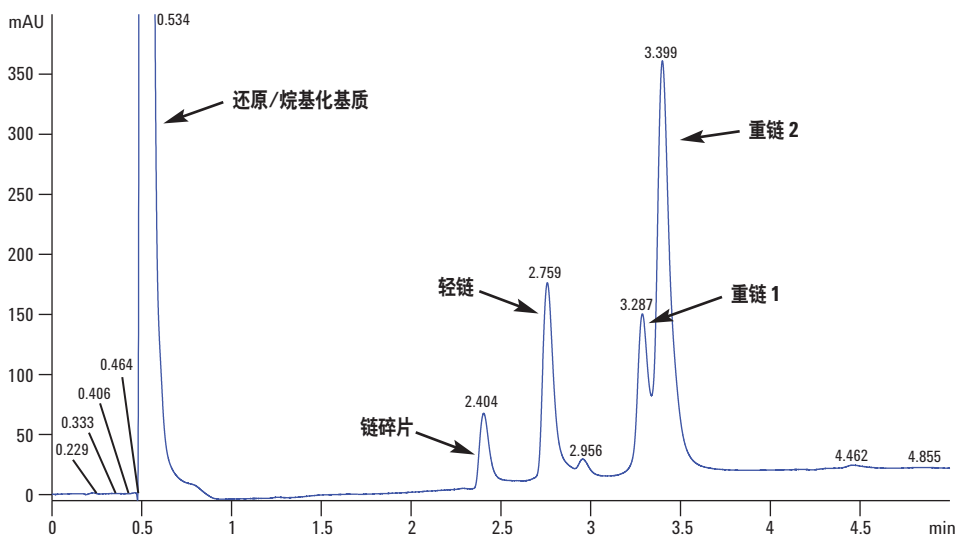


图 1 — 在进行水解方案前，使用安捷伦超高压快速高分离度 (RRHD) 300SB-C8, 2.1 x 50 mm 色谱柱 (安捷伦部件号 857750-906) 通过反相色谱分离还原、烷基化的单克隆抗体分离的条件：安捷伦 1290 Infinity LC, 流速 0.5 mL/min, 75 °C, 流动相为水 (0.1% TFA)/乙腈 (0.08%) 多段条件

第四步：酶解

如前所述，因为胰蛋白酶具有良好的特异性，所以是最常用的消化蛋白酶。由于胰蛋白酶也是一种蛋白质，它自身可能会发生水解（即，自溶）。但是，Ca⁺⁺（天然存在于多数样品中）可与胰蛋白酶中的Ca⁺⁺ 键合环相结合，从而阻止胰蛋白酶的自溶。现今，大多数实验室中均使用修饰型胰蛋白酶，因此自溶大大减少，不需要特别考虑。

胰蛋白酶的最佳酶解 pH 值范围为 7.5 至 8.5，通常在 37 °C 条件下进行。为使酶裂解能在最佳 pH 下进行，需要在添加胰蛋白酶前加入缓冲液（通常为 50 mM 三乙基碳酸氢铵 (tABC)，或 12.5 mM 碳酸氢铵 (ABC)）。2-氨基-2-羟甲基丙烷-1,3-二醇 (Tris) 缓冲液也可实现此作用，但需要仔细考虑，因为 Tris 缓冲液与质谱分析（例如 MALDI 及 ESI-MS）并不兼容，需通过固相萃取法 (SPE) 或 Zip Tips 将其去除。为确保有足够（但不过多）量的酶用于酶解，正确的酶/蛋白比值非常关键。

蛋白质在不同的环境下酶解表现也可能不同，在对混合物中的示范蛋白质进行酶解时，其酶解效率相比单独酶解会出现降低。其中一个原因可能是当多种蛋白质共同进行酶解时，胰蛋白酶裂解位点的竞争性增加。此外，还有许多因素和条件参数可能会影响蛋白质酶解的完全性和有效性，从而导致生成各种预期结果。如果对这些因素具备充分的认知或控制，则可以大大改善酶解结果。反应的 pH 值、酶解时间和温度以及使用的裂解试剂量均是酶解效率的关键影响因素。

- **酶解 pH。**一般情况下，对于给定的裂解试剂，为确保获得最佳效果，可按经验确定酶解混合物的 pH 值。例如，如果使用溴化氰作为裂解试剂，则必须保持强酸环境（例如，pH 2，甲酸）；但如果使用胰蛋白酶作为裂解试剂，那么最佳条件则为弱碱 (pH 8) 环境。一般情况下，反应环境的 pH 值不可改变酶解过程中蛋白质的化学完整性或碎裂反应过程
- **酶解时间及温度。**时间和温度是酶解优化过程中的重要因素。为最大程度减少化学反应，大多数蛋白质酶解的温度建议控制在 25 °C 至 37 °C 之间为宜，例如，胰蛋白酶酶解常在 37 °C 下进行。但是，蛋白质的类型和大小会最终决定反应的温度，因为随着反应温度的提高，蛋白质会发生变性。反应时间也是优化酶解方案时的一个考虑因素。如果样品量充足，需考虑进行实验性研究，确定能够获得可重现肽谱（且可避免酶解不完全）的最佳时间。酶解时间从 2 h 到 30 h 不等，取决于样品大小和类型，可加酸停止反应，这对肽谱不会产生干扰，也可通过冷冻停止反应
- **裂解酶的浓度。**裂解试剂的浓度应尽量降低，以避免其干扰肽谱分析。实验中通常会使用过量的裂解试剂以获得合理的快速酶解时间（即，6 至 20 h）；但需充分考虑增加的试剂量。常用的蛋白质/蛋白酶比值介于 10:1 至 200:1 之间，建议裂解试剂分两步或多步添加，以实现裂解的最优化。在许多标准胰蛋白酶的酶解流程中，胰蛋白酶即以上述方式加入。尽管如此，最终的反应体积仍可小到足以促进分离（肽谱分析中的下一步）。为确定出可能影响后续分析的酶解因素，实验将使用一个含有所有溶剂（无测试蛋白质）的酶解对照执行一次空白检测

如需了解更多用于肽谱分析的安捷伦色谱柱信息，请访问 agilent.com/chem/advancebio

下文的图 2 及图 3 对胰蛋白酶酶解方法进行了概述，这是一个通用流程，常用于还原、烷基化、溶液内酶解及蛋白质纯化 (0.5 mg)。此流程可针对少量蛋白质的酶解进行调节，此外我们还提供有一张实用清单，其中列有安捷伦试剂和部件号。

图 2 - 胰蛋白酶消化流程 (第 I-V 部分)

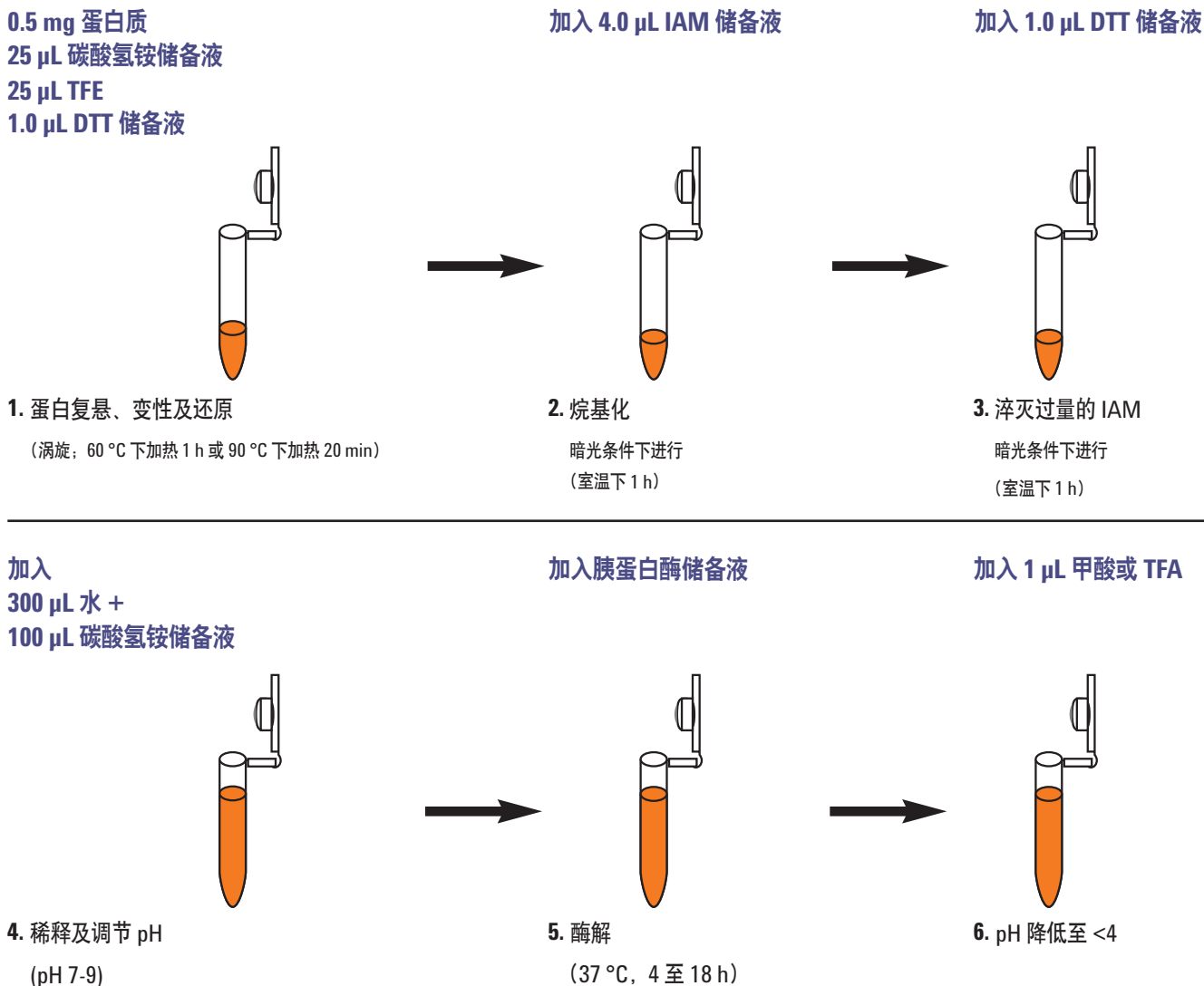
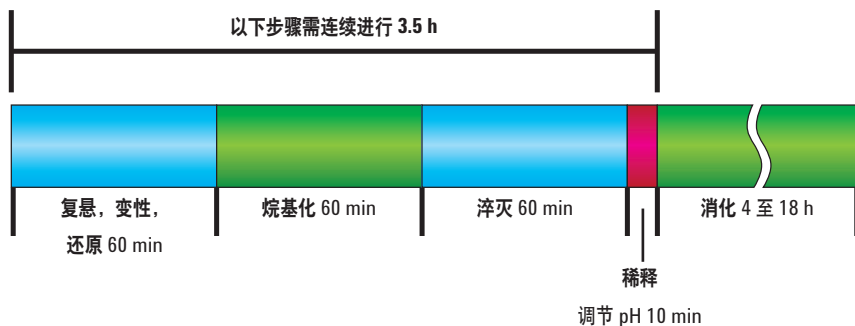


图 3 - 消化流程的预期时间轴



还原、烷基化、酶解溶液前处理：总结

100 mM 碳酸氢铵：取 0.7906 g 碳酸氢铵，加入 100 mL 水。保存于 4 °C 冰箱中，最长可使用 2 个月。

胰蛋白酶储备液：修饰胰蛋白酶可通过购买安捷伦蛋白质组学级胰蛋白酶（部件号 204310，见下页“试剂和设备”）得到。此酶为冻干形式，可在 -20 °C 条件下保存一年以上，活性无明显降低。需要时，可使用 100 μ L 50 mM 的乙酸溶解冻干的胰蛋白酶，制备终浓度为 1 μ g/mL 的胰蛋白酶储备液。为最大程度减少冻融循环，增加储备液稳定性，实验将溶解后的胰蛋白酶分为四管，每管约 10 μ L。将每份溶液保存在 -20 °C 的非无霜冰箱中。此 1 μ g/ μ L 的溶液可根据需要用于制备胰蛋白酶中间溶液（见下文）。注意，安捷伦蛋白质组学级胰蛋白酶随附有技术文献，提供了替代的胰蛋白酶裂解方法。我们采用了下述方法，结果表明该方法简单可靠。

200 mM DTT：取 0.031 g DTT 加入 1.5 mL Eppendorf 管中，再加入 1 mL 水。涡旋。将所得 DTT 溶液分成适宜等分（例如，每管 100 μ L），置于微量离心管中。将每份溶液保存在 -20 °C 的非无霜冰箱中，最长可保存 1 个月。请勿冻融。

200 mM IAM（使用前新鲜配置）：取 0.037 g IAM 加入 1.5 mL Eppendorf 管中，再加入 1 mL 水。涡旋。

胰蛋白酶酶解方案

蛋白质的复悬、变性及还原

1. 在 0.5 mL 离心管中加入 0.5 mg 总蛋白
2. 加入 25 μ L 碳酸氢铵储备液
3. 加入 25 μ L TFE 变性剂
4. 加入 1.0 μ L DTT 储备液
5. 涡旋混合
6. 在以下任一条件下加热以变性：
 - 60 °C，45 min 至 1 h
 - 90 °C，20 min（亲水性蛋白质）至 1 h（疏水性蛋白质）
7. 冷却至室温

烷基化

1. 加入 4.0 μ L IAM 储备液
2. 短暂涡旋
3. 在暗光（箔纸覆盖）、室温下孵育样品 1 h

淬灭过量的 IAM

1. 加入 1.0 μ L DTT 储备液，破坏多余的 IAM
2. 在暗光（箔纸覆盖）、室温下放置 1 h

稀释及 pH 调节

1. 添加 300 μ L 的水，稀释变性剂
2. 加入 100 μ L 碳酸氢铵储备液以增加 pH
3. 或者，也可以取 0.5 至 1 μ L 溶液滴在 pH 试纸上进行检测。典型值为 7.5 至 8.0。更重要的是，当起始样品的 pH 未知时，需要检查 pH 值
4. 如果 pH 不在 7 到 9 的范围内，则需加入更多碱（碳酸氢铵）

酶解

1. 使用胰蛋白酶储存溶液配制新鲜的胰蛋白酶储备液。完全复悬需要 15 min
2. 如果您计划酶解的总蛋白少于 20 μ g，需添加 45 μ L 的超纯水将储备液稀释十倍，制备胰蛋白酶中间溶液。此 100 ng/ μ L 溶液可保存在 -20 °C 条件下，2 个月内活性不会明显下降
注意：如果 IAM 未被破坏，则会减缓赖氨酸的烷基化
3. 加入胰蛋白酶储备液，其中酶与底物的质量比为 1:20 至 1:50。例如，对于 500 μ g 蛋白质，可添加 10 μ g 和 25 μ g 的胰蛋白酶（10 至 25 μ L 胰蛋白酶储备液）
4. 短暂涡旋
5. 将试管置于加热器中，在 37 °C 下孵育 4 至 18 h
6. 冷却溶液

降低 pH，终止胰蛋白酶活性

1. 加入 1 μ L 纯甲酸或 TFA，降低 pH 值，终止胰蛋白酶活性
如果您打算脱盐，可选用 TFA，有助于纯化过程中肽段与树脂的结合
2. 短暂涡旋
3. 如果您担心原始样品的 pH，可检查其 pH 值（典型值为 3.0 至 3.3）。
如果 pH 值大于 4，可添加更多的酸

酶解物纯化

1. 根据样品的来源，可能需要在质谱分析前进行脱盐
2. 如果不需要脱盐，但是样品呈现不透明状，可在质谱分析前进行样品过滤。可使用安捷伦离心过滤器，部件号 5185-5990
不透明状可能是由于样品中的细胞碎屑所导致
3. 必要时，可稀释一份样品用于分析
如果蛋白质分子量为 50 kDa，且酶解充分，溶液浓度约为 20 pmol/ μ L
如果您的样品并不复杂，可稀释为 50 fmol/ μ L 的溶液

如需了解更多用于肽谱分析的安捷伦色谱柱信息，请访问 agilent.com/chem/advancebio

第五步：酶解产物的纯化和富集

进行肽谱分析之前，通常需要进行纯化和/或富集以便成功进行肽谱分析。根据样品类型和靶向目标，有多种方法可完成纯化和富集过程。例如，特定 PTM（例如，磷酸化、泛素化和糖基化）的富集可采用 PTM 特异性抗体或配体进行亲和纯化，而磷酸化肽可使用抗磷酸化特异性抗体通过 IP 进行富集，或通过 Pull-down 实验使用 TiO₂（可特异性结合磷酸化的丝氨酸、酪氨酸或苏氨酸）进行富集。

肽段富集后，可使用石墨或 C-18 枪头或小柱去除盐类和缓冲液，而去垢剂则可通过亲和柱或去垢剂沉淀剂进行去除。稀释的样品可采用各种截留分子量 (MWCO) 范围的浓缩仪进行浓缩。纯化后，多肽样品可进行最终制备，用于质谱分析。根据分子类型的不同，制备方式会发生变化。对于 LC/MS 或 LC-MS/MS 分析，为获得良好的 LC 分离度和分析结果，需正确选择流动相和离子对试剂。MALDI-MS 需要将多肽样品与特定的基质（结晶的能量吸收染料分子）结合，然后在 MALDI 板上干燥后再进行分析。

试剂和设备

所需项

碳酸氢铵，试剂级

二硫代苏糖醇 (DTT), >99+%

碘乙酰胺 (IAM), 97%

三氟乙醇 (TFE), 99+%

胰蛋白酶（修饰型）

水，18 兆欧或等效

甲酸（分析纯）或三氟乙酸（测序级）

Eppendorf Safe-Lock 微量离心管，无色，非硅化

微量移液器及枪头：1-1000 μ L 范围

试管加热器/振荡器

pH 试纸，pH 范围为 2.5-4.5 及 7.0-9.0

分析天平

Bond Elut OMIX 枪头，10 μ L（洗脱体积 2-10 μ L）

Bond Elut OMIX 枪头，100 μ L（洗脱体积 10-100 μ L）

示例

西格玛产品目录号 A-6141

西格玛产品目录号 D-5545

西格玛奥德里奇产品目录号 I-670-9

西格玛奥德里奇产品目录号 T63002-100G

安捷伦蛋白质组学级胰蛋白酶（部件号 204310）

安捷伦部件号 8500-2236

安捷伦部件号 G2453-85060

Eppendorf 部件号 022363611（0.5 mL，每盒 500 个），或部件号 022363204（1.5 mL，每盒 500 个）

Eppendorf Thermomixer

EM Science ColorpHast 试纸，产品目录号 700181-2

1x96 枪头（安捷伦部件号 A5700310）；6x96 枪头（安捷伦部件号 A5700310K）

1x96 枪头（安捷伦部件号 A57003100）；6x96 枪头（安捷伦部件号 A57003100K）



用于小体积多肽纯化： Bond Elut OMIX 枪头

Bond Elut OMIX (10 μ L 体积) 方法用于多肽酶解物纯化

样品预处理	使用 2.5% 三氟乙酸 (TFA) 溶液调节样品, 使 TFA 终浓度为 0.5%-1.0%
调节及平衡	吸取 10 μ L 的 50% 乙腈 (ACN): 水, 然后排出溶剂。重复上述操作。吸取 10 μ L 的 1.0% TFA 溶液, 然后排出溶剂。重复上述操作
样品应用	吸取最多 10 μ L 预处理的样品至 OMIX 吸头。排出和吸入样品 3 至 5 个循环, 获取最大效率。为提高结合率, 最高可用 10 个循环
清洗	吸取 10 μ L 的 0.1% TFA 缓冲液, 然后弃掉溶剂。重复上述操作
洗脱	LC/MS 或 LC/MS/MS 分析: 吸取 2-10 μ L 的 0.1% 甲酸或 0.1% 乙酸 (溶于 50-75% 的乙腈或 50-75% 的甲醇溶液), 排入自动采样瓶或孔板

为获得最佳结果, 可针对平衡、样品应用和清洗步骤设置移液器, 使其与吸头体积 (10 μ L) 匹配。对于洗脱, 可将洗脱溶液精确等分至单独的容器中, 并保持移液器在最大设置体积处, 以匹配吸头体积 (10 μ L)。

高通量多肽应用： 可用于肽谱分析的自动化样品前处理解决方案

“通过 AssayMAP 可联合进行一致的平行样品酶解以及自动化反相纯化, 有利于我们考虑进行前所未有的规模和通量的合作研究。”

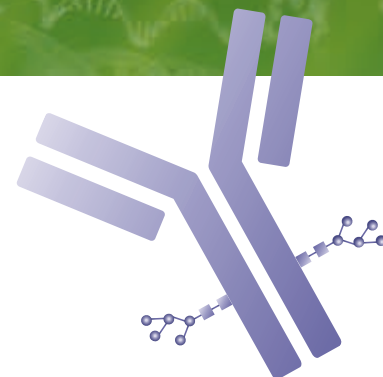
Jacob D. Jaffe 博士
助理主任 — 蛋白组学平台

更多有关肽谱分析的自动化样品前处理信息请见第 22 页



如需了解更多用于肽谱分析的安捷伦色谱柱信息, 请访问 agilent.com/chem/advancebio

反相色谱法 — 肽谱分析的绝佳选择



在选择肽谱分析色谱柱和方法时，最终依据所分析蛋白质和工作流程的目的确定最常用的肽谱分析色谱方法（特别是在生物制药领域）为反相色谱法 (RPC)。优秀的分离能力及挥发性流动相（与质谱仪兼容）的使用，使得这种技术成为大多数多肽分离中的主要 HPLC 方法。其分离速度和效率均优于其他的 HPLC 分离模式。图 4 所示为一张分离度良好的牛血清白蛋白多肽分离图，并证实了利用 RPC 进行肽谱分析时，大多数多肽峰碎片可以实现分离。

图 4 — 反相肽谱分离图

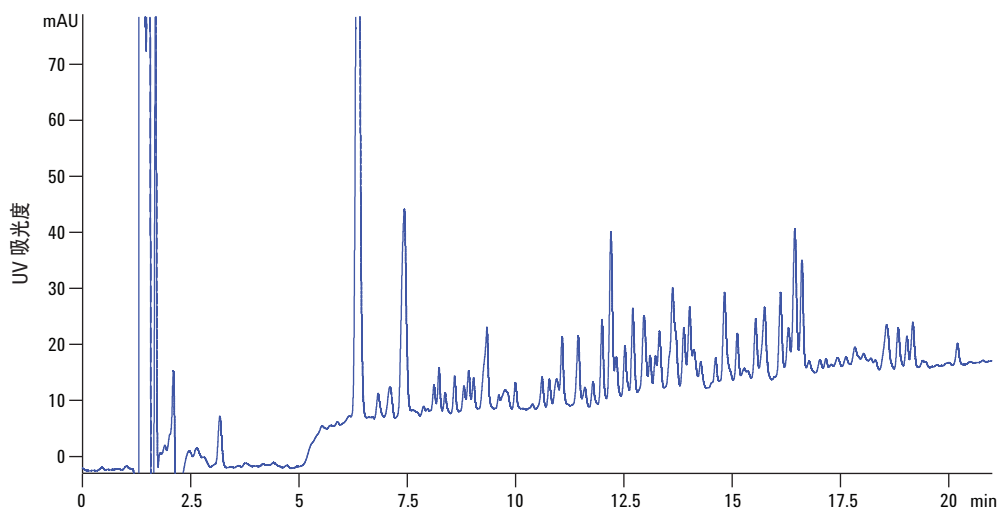
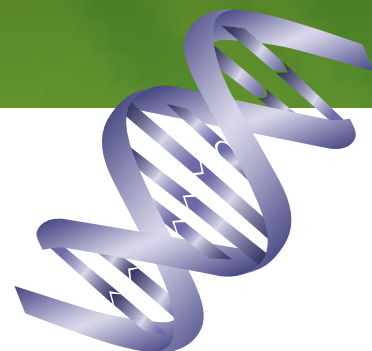


图 4 — BSA 的反相分离图，采用 Agilent Polaris C18-A, 2.0 x 150 mm 色谱柱（安捷伦部件号 A2001150X020）

成功进行肽谱分离的必备条件



一般情况，需要很好地了解多肽特定的色谱柱要求，以及色谱方法开发过程来开发实用性 RPC 肽谱分析方法。虽然很多相同的色谱原则同时适用于多肽和小分子分离，但在优化多肽方法、获取可重现的稳定

分离中，还是有许多条件特异性变量。色谱柱选择、色谱柱质量、流动相选择及检测要求均是肽谱分离的重要因素，可大大改善肽谱的质量。

色谱柱选择

为获取可靠、分离度良好的肽谱分离，最重要的因素是选择合适的色谱柱。色谱柱孔径、填料类型和粒径、键合相化学性质和稳定性（化学床和填充床）在改善肽谱分离、优化策略和光谱分析中有着重要作用。对于多肽分离，首选的色谱柱孔径范围为 100Å 至 120Å，而优化的固定相选择通常为 C18。虽然一些商业化色谱柱可针对多肽分离提供低至 60Å 的孔径，但是这些色谱柱常用于较小肽段碎片或标准品的分析。同样地，一些较小的键合相碳链长度也在使用中，但这与特定的方法相关，在获取宽范围的疏水性多肽保留时，实用性较为有限。

由于多肽的扩散系数较高，因此其分离的塔板数较小，适合于在较低流速下，使用更小直径、完全多孔的色谱柱材料。由此衍生出亚 2 μm 的填料，用以获取更有效的肽谱。但是，最近，表面多孔色谱柱越来越多地使用于生物分离（尤其是在生物制药行业），因为这种材料解决了蛋白质和多肽的质量扩散问题。这些色谱柱的扩散路径更短，可在较高的线性速度下分离较大的分子，不会由于粒径的减少而出现系统反压增加的问题。图 5 所示为使用表面多孔色谱柱所得的快速高分离度肽谱示例。



如需了解更多用于肽谱分析的安捷伦色谱柱信息，请访问 agilent.com/chem/advancebio

图 5 — 牛血清白蛋白 (BSA) 快速、有效的高分离度肽谱序列

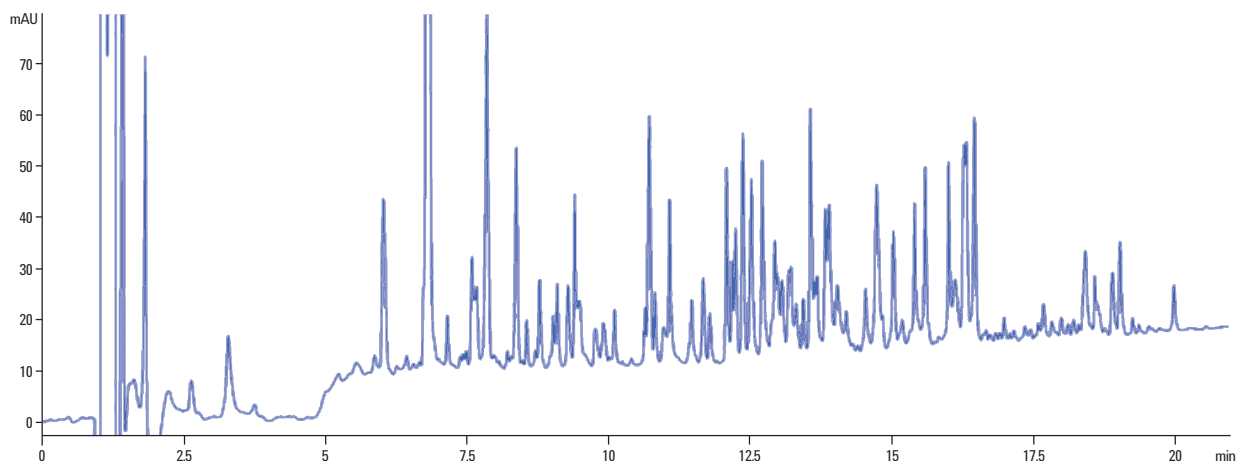


图 5 — BSA 的反相分离图, 采用 Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 2.1 x 150 mm 色谱柱 (安捷伦部件号 653750-902) 肽谱分析条件为 0.3 mL/min, 40 °C, 流动相为水 (含 0.1% TFA) / 乙腈 (0.08%), 线性梯度

色谱柱质量 (多次运行间的重现性和稳定性) 是维持肽谱分离可重复性和稳定性的关键因素, 有时会被忽略。反相多肽分离常在低 pH ($\text{pH} < 3$)、高温下 ($> 40\text{ }^\circ\text{C}$) 进行。肽谱分析依赖于色谱柱的可重复操作, 获取精确的指纹图谱和重复验证的方案。在为肽谱分析选择一种色谱柱时, 整个决策流程中, 应优先考虑色谱柱质量。图 6 所示为具有卓越可重现性的单克隆抗体胰蛋白酶水解物肽谱, 在低 pH 和高温条件下分离, 并进行了 LC/MS 分析。

图 6 — 肽谱的 LC/MS 分析重现性

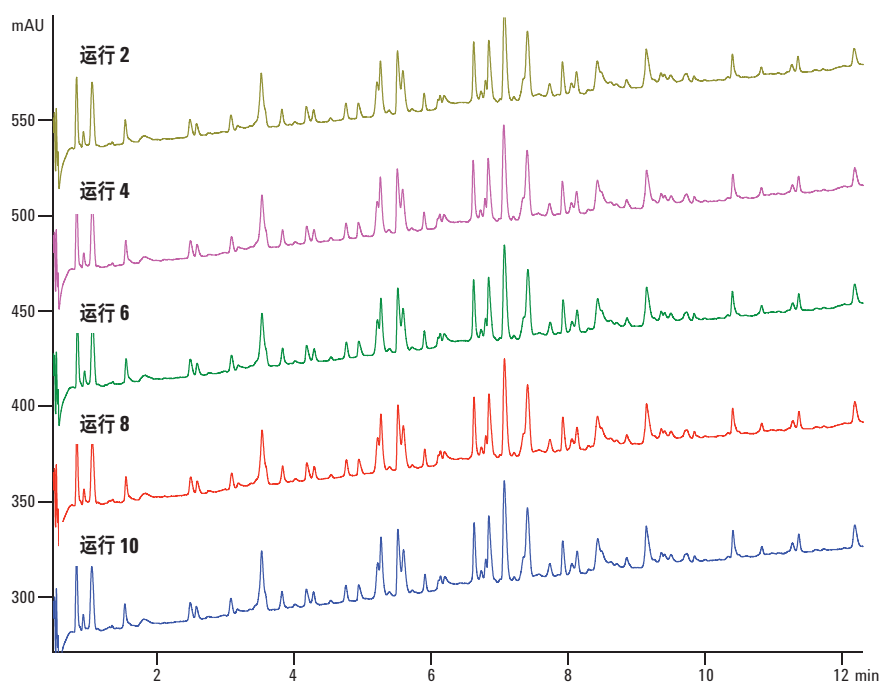


图 6 — 一个单克隆抗体胰蛋白酶水解物的五次重复进样, 使用 3.0 x 150 mm 的 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 (安捷伦部件号 653950-302), Agilent 1200 液相系统联用 6520 Q-TOF 分离条件为 0.3 mL/min, 40 °C, 流动相为水 (含 0.1% FA) / 乙腈 (含 0.1% FA), 梯度洗脱

流动相选择

肽谱分析中最常用的溶剂为水和乙腈（用作有机改性剂），离子对试剂浓度建议不超过 0.1%。某些情况下，会加入丙醇或异丙醇用以溶解酶解成分，前提条件是加入后不会过度增加这些成分的粘性。使用含磷酸盐的缓冲流动相可为 pH 条件的选择提供一定的灵活性，因为 pH 在 3.0-5.0 范围内的变化可改善含酸性基团（例如，谷氨酸和天冬氨酸）多肽的分离。pH 在 2 与 7 之间（或更高，根据聚合物的支持）的磷酸钠或磷酸钾、乙酸铵、磷酸也可用于乙腈梯度中。通常，乙腈中会加入三氟乙酸。

蛋白质和多肽 RPC 分析的流动相中含有用作离子对试剂的添加剂。这种成分可与多肽的带电基团形成离子对，增加多肽的疏水性。因此，多肽可能与疏水性固定相发生相互作用，从而增加保留、改善分离。常用的添加剂（例如，三氟乙酸 (TFA)、甲酸 (FA) 以及乙酸 (AcOH)）可产生非常低的 pH，促进蛋白质去折叠和变性。因此，诸如多肽的分子，可洗脱得到更尖更对称的色谱峰。蛋白质和多肽分离中最常用的离子对试剂为 TFA，因其与质谱具有良好的兼容性（高挥发性），且与带电多肽具有良好的亲和性。

检测

多肽的检测波长通常为 210 nm 至 220 nm 和/或 280 nm（图 7）。肽谱分析时，常同时使用 280 nm 和 210 nm 进行检测。色氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸在 280 nm 下非常灵敏，而 210 nm 检测对样品基质中其它的大量生物制剂相对选择性较差。但是，210 nm 和 220 nm 下的灵敏度是 280 nm 下的 2 到 4 倍。此外，对肽谱检测谱而言，重要的是需要

在水（A 溶剂）中加入 0.1% TFA，在乙腈（B 溶剂）中加入 0.08% TFA，可最小化梯度洗脱过程中吸光度变化导致的基线漂移。图 7 比较了 220 nm 和 280 nm 波长下的肽谱分离，并详细说明了吸光灵敏度和 UV 峰轮廓的差别。

图 7 — 不同波长下的肽谱

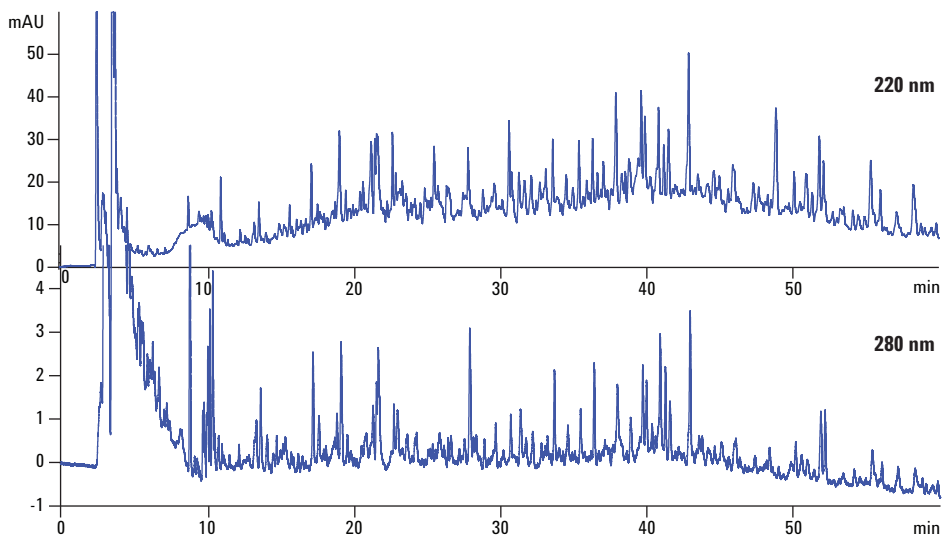
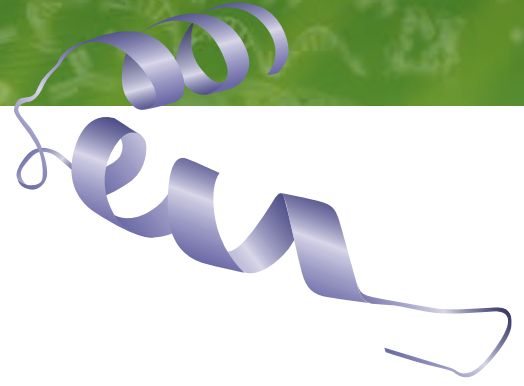


图 7 — 利用 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（安捷伦部件号 651750-902），2.1 x 250 mm，所得的大肠杆菌酶解物谱图，220 nm（上图），280 nm（下图），采用 Agilent 1290 Infinity LC 进行分析

如需了解更多用于肽谱分析的安捷伦色谱柱信息，请访问 agilent.com/chem/advancebio

开发一种有效的肽谱分析方法



开发用于肽谱分离的 RPC 方法的常规方案与典型的 RP 方法开发实践相同，但有一些专门针对肽谱分析开发的特殊需求。本部分将提供一种推荐的基本方法，用于获取分离度良好的肽谱，通过 (1) 优化保留的

梯度条件，(2) 选择性改变的变量，(3) 进一步优化色谱柱条件以更好地平衡分析时间和分离度要求。在方法开发过程的每一步中，肽谱分析实验中的样品类型和预期目标均需认真对待。

(1) 优化梯度条件

对于多肽分离，强烈建议使用低 pH 值的乙腈缓冲梯度，因为其可以：

- 促进大多数类型和结构的多肽分离
- 抑制硅醇离子化，其与分子中的碱性氨基酸链有不良的相互作用，会导致峰形变差
- 有助于多肽碎片的变性，改善保留和分离度
- 可使用低 UV 检测波长 (<210 nm)，最大程度提高检测灵敏度
- 因为流动相的粘度较低，可获得更窄的色谱峰
- 通过离子对与自由氨基端和碱性氨基酸相互作用（在缓冲液中使用 TFA 时），增加较小且保留性较差的多肽的保留性。

丙醇或异丙醇 (IPA) 可替代乙腈作为有机改性剂，提高疏水性多肽的回收率。但是，这些溶剂粘性较大，会导致色谱柱反压增加，且在某些情况下会产生较宽的色谱峰。这些溶剂也需使用更高的检测波长 (>220 nm)，从而降低了检测灵敏度。

大多数多肽在 60% 乙腈下均被洗脱，但有时也需用到更高的乙腈浓度。最初进行肽谱分析开发时，在 45 min (2%/min) 内由 0% 增加到 60% 是较好的起始梯度。但在最终方法中通常需要更平稳的梯度以获得所需的分离度。梯度陡度（或 %B/min）决定了样品谱带在色谱柱中迁移时的平均保留性 (k')。 k' 值取决于色谱柱尺寸、流速、样品量和梯度陡度。

色谱工作者分析生物样品时，通常会在谱带间隔 (α) 改善后再对色谱柱条件 (N) 进行更改。温度和梯度陡度的改变易于操作（不需要改变流动相或色谱柱），应先进行开发以改善谱带间隔 (α)，从而优化肽谱分离。

温度变化是改变选择性的有力方法，会使特定多肽残基的保留性发生变化。增加肽谱分离时的温度可获得较窄的色谱峰、降低系统反压，且可改变选择性。推荐的初始温度为 30-50 °C；但是，特定肽谱分离的最优温度取决于许多因素，与酶解类型和成分有关。一些疏水性很强的多肽需要在 60-80 °C 才能获取最优回收率，而给定样品通常在 30-60 °C 范围内的特定温度下具有最佳选择性。

图 8 详细比较了肌红蛋白胰蛋白酶消化物在两个相同梯度区域间的色谱图，温度分别为 30 °C（上图），60 °C（下图）。温度增加到 60 °C 时，分离谱图的谱带形状和峰位置均发生变化，可见突出标识的色谱峰 1-7。这个区域色谱峰的显著变化显示出：色谱峰 1、2 和 3 分离度得到改善，谱峰 4 和 5 的位置发生改变（选择性）。

图 8 — 温度对肌红蛋白胰蛋白酶消化物选择性的影响

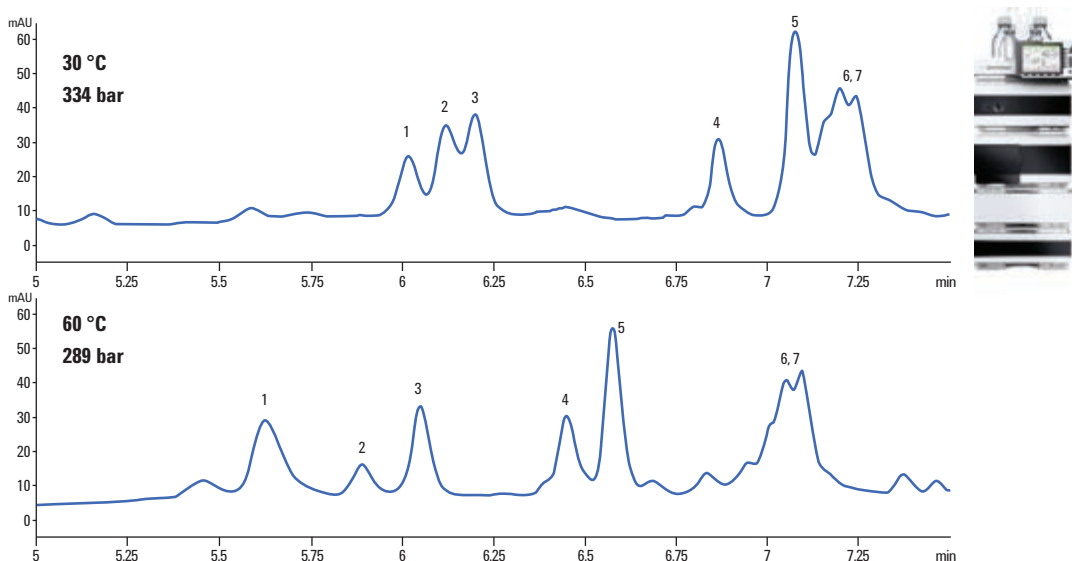


图 8 — 肌红蛋白胰蛋白酶消化物的梯度分离，5.0-8.0 min（完整梯度为 20 min），其中使用了 2.1 x 150 mm AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（安捷伦部件号 653950-302）两种分离均采用水（含 1.0% TFA）/乙腈（含 0.08% TFA），线性梯度，0.3 mL/min，215 nm，使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统。顶部色谱图为在 30 °C 温度下分析所得，底部色谱图为在 60 °C 温度下分析所得



如需了解更多用于肽谱分析的安捷伦色谱柱信息，请访问 agilent.com/chem/advancebio

梯度陡度的变化也可大大改善谱带间隔，并改变肽谱分离的选择性。梯度陡度可通过两种方式改变：保持流速不变，缩短（增加陡度）或延长（降低陡度）洗脱时间；或保持分析时间不变，改变流速。

图 9 证实了选择性随着梯度陡度的改变而改变。采用肌红蛋白胰蛋白酶多肽酶解物，梯度梯度运行时间为 15 min（上图），与更长的梯度运行时间（40 min，下图）进行比较，两种分离均保持流速为 0.6 mL/min，温度为 50 °C。色谱图的比较（及各分离中相同色谱峰（星号标出）的鉴定）提示两者在谱带间隔、色谱峰数目和峰形上有许多的变化。

图 9 — 梯度陡度对肌红蛋白胰蛋白酶消化物分离的影响

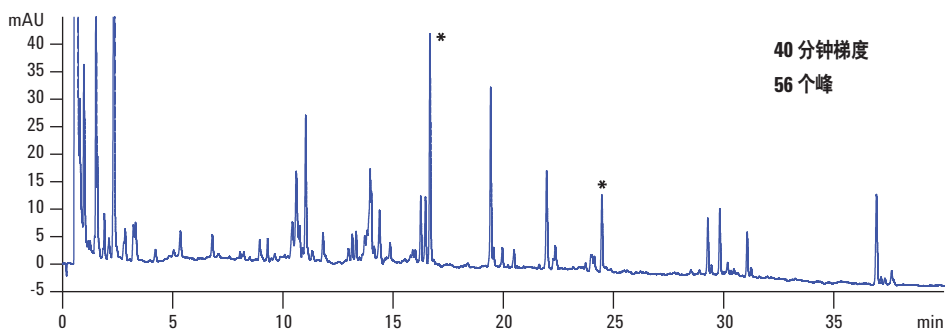
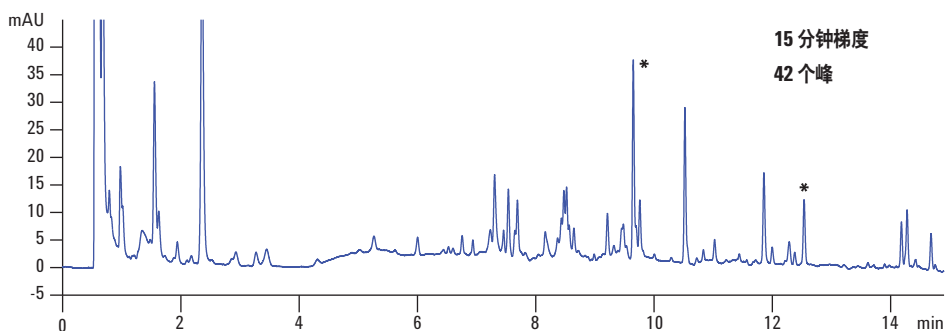


图 9 — 肌红蛋白胰蛋白酶消化物的梯度分离，采用 2.1 x 150 mm AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（安捷伦部件号 653950-302），利用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相系统，条件为水（含 1.0% TFA）/乙腈（含 0.08% TFA），线性梯度，0.6 mL/min，50 °C。顶部色谱图在 15 min 内完成，而底部色谱图在 40 min 内完成。两张色谱图中标星号代表相同色谱峰



(3) 调节色谱柱条件以进一步优化

当根据保留性 (k') 及选择性 (α) 完成梯度优化后, 可通过改变色谱柱长度和流速进一步改善分离。梯度洗脱中, 选择何种色谱柱条件进行改变, 基本与等度洗脱时相同。在两种情况下, 通过延长分析时间均能增加分离效率 (N)。只需略微增加分离度时, 分析时间的增加是次要的, 简单的做法是降低流速。但是, 如需大大增加分离度, 通常的方法是增加柱长。如果在优化选择性后, 分离度大于所需分离度, 此时可通过增加流速和/或减小柱长稍微降低分离度, 换取更短的分析时间。图 10 展示了当柱长从 150 mm 增加至 250 mm 时, 所提高的肌红蛋白胰蛋白酶消化物的肽谱分离度。在此对比中, 条件和梯度时间不变, 而柱长从 150 mm 增加至 250 mm。图中在两种分离的相同区域增加了一个红框, 突出 250 mm 柱长下分离度的增加, 强调出每单位时间内峰容量的增加。

上文 (1)、(2) 和 (3) 中所讨论的与选择性优化有关的基本策略如梯度洗脱及后续变量, 以及色谱柱条件优化。经证实可改善包括肽谱分析在内的任何分离策略。上述方法可通过下述步骤进行概括:

肽谱分析方法开发步骤

1. 选择初始梯度条件: 柱长、流动相组成、流速、温度及检测条件。初始分离应针对保留性 (k') 进行优化。这要求梯度的陡度不能太大
2. 调节梯度范围。通过消除色谱图开始和结束的浪费空间最小化运行时间
3. 不同选择性。如果观察到重叠的谱带或运行时间太长时, 可尝试选择性调节的方法
4. 考虑梯度形状。在使用非线性梯度形状作为进一步改善分离的方法时, 可能会增加谱带间隔
5. 调节色谱柱条件。在优化了谱带间隔和选择性后, 需考虑改变运行时间和/或柱长以改善分离度和/或分析速度

图 10 — 柱长对分离度的影响

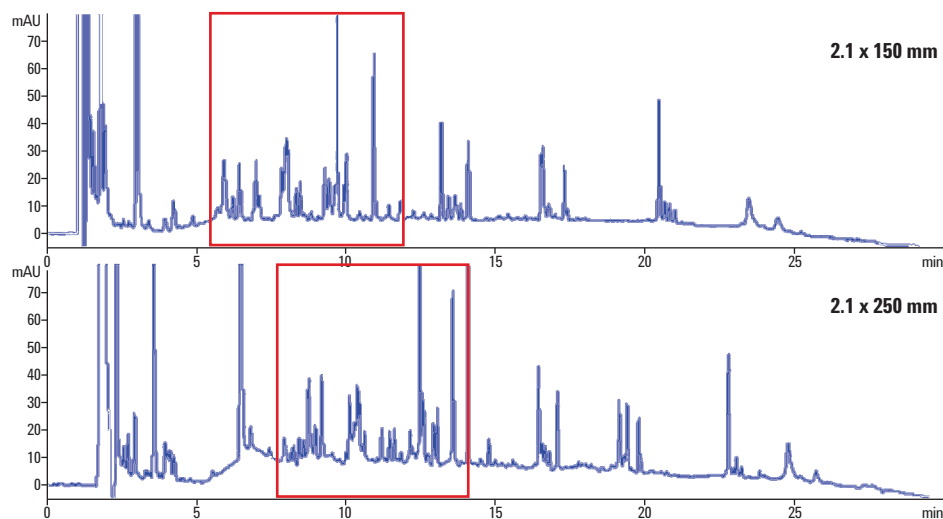


图 10 — 柱长对分离度的影响。采用肌红蛋白胰蛋白酶消化物 (安捷伦部件号 651750-902) 进行肽谱对比红色高亮区域为等效的分离区域, 用来强调分离度和峰形。分离采用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 x 150 mm (安捷伦部件号 651750-902), 利用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统, 条件为水 (含 1.0% TFA) / 乙腈 (含 0.08% TFA), 线性梯度, 30 min 内 B 由 10% 增加至 60%, 流速 0.3 mL/min, 45 °C

如需了解更多用于肽谱分析的安捷伦色谱柱信息, 请访问 [agilent.com/chem/advancebio](https://www.agilent.com/chem/advancebio)

利用质谱仪进行肽谱表征



使用 RPC 联合质谱仪使得此组合技术成为表征多肽和肽谱的优异选择。例如，在生物制药行业，建立和监控治疗性靶标的序列一致性非常关键，蛋白质的生物稳定性是治疗剂开发的重要方面，用于监测修饰（例如，氧化、还原、糖基化和截短）。质谱可用作一种非强制性纯度测试，用以建立产品在其生命周期中的遗传稳定性。

多肽的质谱分析可通过直接注入分离的多肽（或使用在线 LC/MS 以进行结构分析），然后与蛋白质的氨基酸序列相关联来完成。鉴定的多肽可确证肽谱中覆盖的特定氨基酸序列，以及进行蛋白质鉴定。肽谱的质谱分析适用于：

- 确认特定蛋白质的种类
- 对蛋白质进行具体表征，例如，确证 N 端和 C 端多肽、高序列覆盖率肽谱、氨基酸取代等
- 筛选和鉴定翻译后修饰（例如，糖基化、二硫键、N 端焦谷氨酸、甲硫氨酸和色氨酸氧化等）

一般情况下，质谱分析类型包括电喷雾和 MALDI-TOF-MS，以及快速原子轰击 (FAB)。串联质谱也可用于对修饰后蛋白进行测序，并确定所发生的氨基酸修饰类型。使用电喷雾电离 (ESI) 或 MALDI-MS 时，蛋白水解多肽可完整电离为气相，并可测量它们的精确质量。因为易于与液相色谱连接并且可以获得更高质量的串联质谱图用于确证的蛋白质鉴定，所以大多数多肽分离在电喷雾电离 (ESI) LC/MS 仪器上进行。例如，四极杆飞行时间 (QTOF) 质谱仪因其具有高分辨率和质量准确性，常可提供更多的结构信息，特别是对于较大的多肽。

基于质谱信息，通过将测定的质量与预期值（来自完整蛋白质或蛋白质数据库）进行比较，阐明质量和序列覆盖率信息，蛋白质的鉴定可轻松完成。通过肽谱表征蛋白的目标是对于蛋白结构的理论组成，获得一致、至少 95% 的序列覆盖率。图 11 展示了经过高度优化后，所得的红细胞生成素蛋白质 (EPO) 酶解的 ESI-MS 肽谱。优化色谱条件和质谱参数后，可获得 100% 的序列覆盖率以及良好表征的肽谱分离。

图 11 — 优化的 EPO 蛋白质肽谱，序列覆盖率 100%

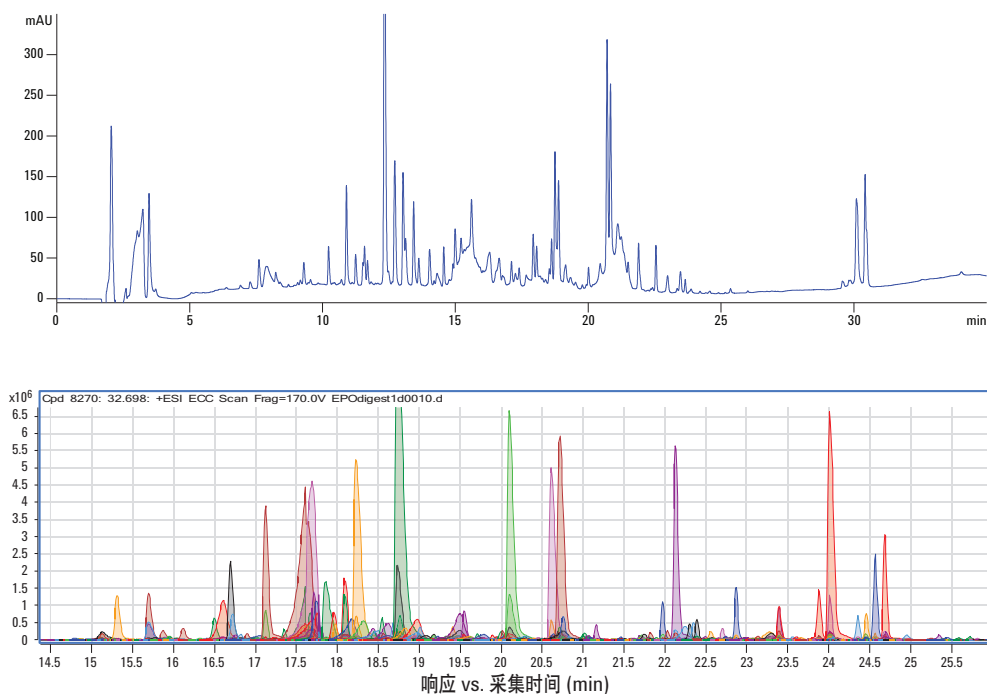


图 11 — 顶部色谱图展示了使用 2.1 x 150 mm AdvanceBio 肽谱分析色谱柱对完全优化的 EPO 消化物进行分析所得到的肽谱分离图。底部色谱图展示了针对 Agilent Q-TOF 生成的序列覆盖率所进行的定性分析（使用分子特征提取器）

订购信息

对于肽谱分析，安捷伦建议：

AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 — 大多数应用的第一选择

说明	部件号	快速保护柱 部件号
4.6 x 150 mm, 2.7 μ m	653950-902	850750-911
3.0 x 150 mm, 2.7 μ m	653950-302	853750-911
2.1 x 250 mm, 2.7 μ m	651750-902	851725-911
2.1 x 150 mm, 2.7 μ m	653750-902	
2.1 x 100 mm, 2.7 μ m	655750-902	

* 快速保护柱可在不影响分离速率或分离度的情况下有效延长色谱柱寿命。

ZORBAX RRHD 300-C18 用于未完全消化或含有疏水核的样品

说明	部件号
2.1 x 50 mm, 1.8 μ m	857750-902
2.1 x 100 mm, 1.8 μ m	858750-902



ZORBAX RRHD 300-HILIC

可为亲水性和糖肽物质提供更多数据

说明	部件号
2.1 x 50 mm, 1.8 μ m	857750-901
2.1 x 100 mm, 1.8 μ m	858750-901

多肽质量控制标样

使用安捷伦的十肽质量控制标样（与安捷伦用于色谱柱质量控制的标样相同）在色谱柱的寿命内评估其性能。此标样可用于 HPLC 或 LC/MS，每瓶可用于 20 次进样左右。

说明	部件号
多肽质量控制标样, 71 μ g 于 2 mL 样品瓶	5190-0583

如需了解更多用于肽谱分析的安捷伦色谱柱信息，请访问 agilent.com/chem/advancebio

用于质谱分析的智能自动化多肽样品前处理

人工进行多肽样品前处理是一个非常耗费时间的过程。如果您正在应用质谱进行肽谱分析，您一定渴望能够提高通量。并且您需要一个具有高度重现性的端对端工作流程，以确保结果的一致性。

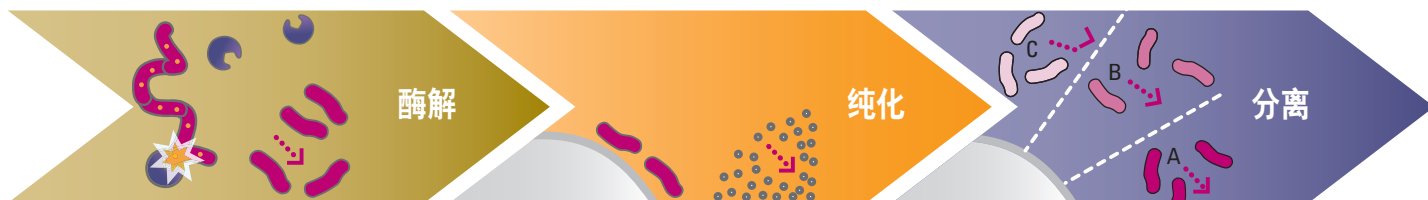
AssayMAP 变换了酶解、纯化及分离工作流程，可实现前所未有的精度和通量：

- 因减少了人工误差，改善重现性 — <5% CV
- 增加通量 — 每天最多可处理 384 个样品
- 显著减少手动操作时间 — 使科学家们能够专注于分析工作
- 快速方法开发 — 自动化平台将帮助您快速优化方法



AssayMAP 多肽样品前处理解决方案基于强大的组合：小型填充床色谱、最先进的 Bravo 液体处理平台，以及简单实用的用户界面（可为初学者和有经验的用户提供开放易用的操作环境），简化了最具挑战性的样品前处理工作流程。

AssayMAP 多肽样品前处理解决方案 针对质谱分析



酶解：

- 溶液内酶解，利用用户提供的试剂
- 可同时处理最多 4 块 96 孔板
- 1 次手动移液步骤

优点：

- 减少用户差异性，增加通量和重现性

纯化：

- 使用反相小柱的定量分离方法
- 可同时处理 1 块 96 孔板

优点：

- 10 μ L 洗脱液意味着可缩短干燥次数或“稀释 — 注射”方法
- 流程控制 — 所有样品的处理方式完全一致

分离：

- 强阳离子交换 (SCX) 小柱可通过 pH 或盐的分布洗脱生成最多 6 个组分，以简化样品
- 可同时处理 1 块 96 孔板

优点：

- 增加 LC/MS 通量（通过离线分离），缩短较长的液相色谱梯度时间
- 强大的富集工具（用以简化样品），可在分析前分离目标多肽

工作流程总体优势：

- 标准化的工作流程用户界面，易于操作，并可链接以整合工作流程
- AssayMAP 降低了样品重复需求，只需要更少的重复样品

质谱分析前，利用 Agilent AssayMAP 解决方案进行样品前处理，可获取具有良好重现性的总体工作流程

AssayMAP 多肽样品前处理解决方案用于酶解两种样品类型（各重复 64 次）：BSA - 尿素和 BSA - 盐酸胍。样品纯化采用 AssayMAP 反相小柱，分析采用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱、Agilent 1290 Infinity 液相色谱以及 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 质谱仪。第二天重复实验以

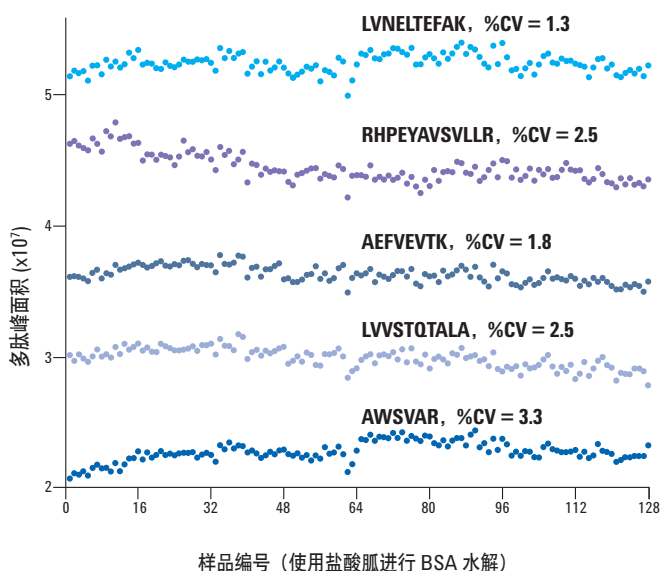


图 12 — 4 个多肽在 2 天分析中的峰面积散点图

每天需要 4 h 对 AssayMAP 进行样品处理，其中只有 2 h 需要手动操作。使用相同的工作流程，每天需要约 8 h 进行手工样品前处理，其中 4 h 需要手动操作。

检测重现性。针对每个样品中的 25 种多肽均计算了 %CV，结果如表 1 所示。其中显示了不同的 %CV 区间，阐述了总平均 %CV 的影响。为进一步展示重现性，图 12 中显示了代表性多肽的峰面积。

25 个多肽	尿素 (n=64, 62)		盐酸胍 (n=64, 64)	
	第一天	第二天	第一天	第二天
平均峰面积 %CV	3.3	3.7	2.3	2.6
%CV<5 的多肽	23	21	25	23
5>%CV<10 的多肽	2	3		1
%CV>10 的多肽		1		1

表 1 — 不同天的 %CV (不同的 %CV 区间)

总工作流程的 CV <4%。完整的工作流程包括 AssayMAP 多肽样品前处理系统、Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱，1290 Infinity 液相色谱以及 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 质谱仪。

如欲了解更多有关此应用的详情，请参阅安捷伦出版物 4991-2474EN。

如需了解更多用于肽谱分析的安捷伦色谱柱信息，请访问 agilent.com/chem/advancebio

与您合作共同获得出色结果

不断出现的挑战需要更优异的解决方案。我们的解决方案将帮助生物制药科学家在疾病研究领域实现开拓创新、加速药物发现，且在整个开发和生产阶段更具信心。广泛的安捷伦解决方案，包括基因组研究、自动化、分离和检测技术，以及工作流程驱动的软件解决方案，有助于提供所需的答案，将有效的治疗产品引入市场。

如需了解更多有关生物制药的安捷伦解决方案，请访问

agilent.com/chem/togetherbiopharma



为您的成功之路指引方向

agilent.com/chem/navigator

除众多的生物色谱柱和小分子色谱柱外，安捷伦还引入了液相色谱柱和样品前处理 NAVIGATOR，帮助您针对应用选择正确的色谱柱。

NAVIGATOR 提供四种简单的搜索选项：

- 按部件号 — 交叉引用液相和样品前处理产品，以便寻找最佳的安捷伦替代品
- 按色谱柱 — 根据方法提供建议
- 按化合物 — 下拉式列表
- 按 USP 方法

此外，此工具还可提供用于优化色谱分析的色谱柱支持、样品前处理产品建议，以及对技术支持资源和其它工具的快速访问。

本资料中的信息如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
2013年8月1日，中国印刷
5991-2348CHCN



Agilent Technologies