

毛细管电泳法用于重组人血清白蛋白分子大小变异体和等电点分析

Analysis of size variants and isoelectric point of recombinant human serum albumin by capillary electrophoresis

王文涛, 唐红梅, 罗继, 陈泓序, 郭立海

Wang Wentao, Tang Hongmei, Luo Ji, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX, 中国;

SCIEX, China;

Keywords: Recombinant human serum albumin, capillary electrophoresis, size variants, isoelectric point

1. 前言

人血清白蛋白是人血浆中最丰富的蛋白质, 占血浆总蛋白的50%~60%, 能够维持机体营养与渗透压, 在机体中具有重要的生理功能, 被称为血液里的“黄金救命药”。在生物医药领域, 人血清白蛋白不仅可以作为药物直接经静脉注射使用, 而且还可以作为优良的药物载体, 延长药物的体内半衰期。此外, 也可作为疫苗等生物制剂的稳定剂, 或作为CHO等细胞的培养基使用。

目前临床上应用的人血清白蛋白主要来自于血液提取, 然而人类血液中可能存在传染性病原体因子, 且即使经过纯化也难以保证不会带入产品中。此外, 人类血液供应有限, 极大程度上限制了人血清白蛋白的生产。利用基因重组技术生产重组人血清白蛋白可以使白蛋白的生产摆脱原料的限制, 同时也可以避免血浆原料引入的病原微生物的污染。为了确保产品进入临床研究的安全性、有效性和稳定性, 必须采用适当的方法对重组人血清白蛋白样品进行严格的质量控制。

毛细管电泳法(CE)以其自动化程度高、定量准确和分离效率高等特点, 广泛应用于蛋白药物的质量监控。本文采用毛细管凝胶电泳(CE-SDS)方法和毛细管等电聚焦(cIEF)方法对重组人血清白蛋白样品的分子大小变异体和等电点进行了分析, 并对其批次一致性进行了评估。

2. 仪器和试剂

2.1 实验仪器及方法设置

采用SCIEX公司PA 800 Plus药物分析系统, 分子大小变异体分析采用二极管阵列(PDA)检测器, 检测波长220 nm; 等电点分析采用紫外(UV)检测器, 配备280 nm滤光片。缓冲液托盘的放置及毛细管预冲洗、分离方法、关机方法请参考IgG和cIEF试剂盒说明书。

2.2 实验试剂及样品

分子大小变异体分析: IgG 分子大小变异体分析试剂盒(SCIEX, A10663); 等电点分析: cIEF等电点分析试剂盒(SCIEX, A80976)。其他试剂请参照试剂盒说明书推荐厂家购买并进行配制。

不同批次的重组人血清白蛋白样品(HSA-Lot 1、HSA-Lot 2), 浓度均为1.0 mg/mL, 样品基质为10.0 mM PBS溶液, 理论等电点约为4~6之间。

2.2 样品制备及前处理

样品制备: 取400 μ L置于10 K超滤管中进行超滤浓缩至体积约为40 μ L, 配成初始浓度约为10.0 mg/mL的溶液, 并且保证盐浓度低于50 mM。

CE-SDS分子大小变异体分析样品前处理: 取初始浓度为10.0 mg/ml的重组人血清白蛋白溶液样品10 μ L, 加入85 μ L的样

品缓冲溶液，再加入250 mM 碘乙酰胺5 μ L，涡旋混匀；70 $^{\circ}$ C孵育 10 min；冷却至室温后6000 rpm离心1 min。全部转移至样品瓶中，立即进行分析。

cIEF等电点分析样品前处理：先将下列试剂混合到0.5 mL离心管中得到样品预混液：200 μ L 3.75 M 尿素-cIEF胶、12 μ L两性电解质 (Pharmalyte 3~10)、20 μ L 阴极稳定剂、2 μ L阳极稳定剂和各2 μ L的pI 标准品(pI 10.0, 9.5, 4.1)。将预混液完全涡旋混匀后，取240 μ L预混液与10 μ L 样品涡旋混匀，然后将200 μ L液体转移至毛细管电泳仪的样品瓶中，立即进行分析。

3 结果与讨论

3.1 CE-SDS分子大小变异体分析

在生物制药生产领域，CE-SDS毛细管凝胶电泳方法已经广泛应用蛋白纯度分析，主要是按照蛋白的分子量大小进行分析。在还原型CE-SDS实验分析中，重组人血白蛋白样品的碎片峰较多，并且有部分杂质峰会与系统峰重合，影响分子大小变异体的计算，所以对于重组人血白蛋白样品分子大小变异体的计算选用非还原型CE-SDS实验。如图1所示，重组人血白蛋白样品在非还原型CE-SDS实验分析中共检测到5个峰，其中3号峰为主峰，主峰迁移时间为20.72 min，主峰分子大小变异体为89.62%。

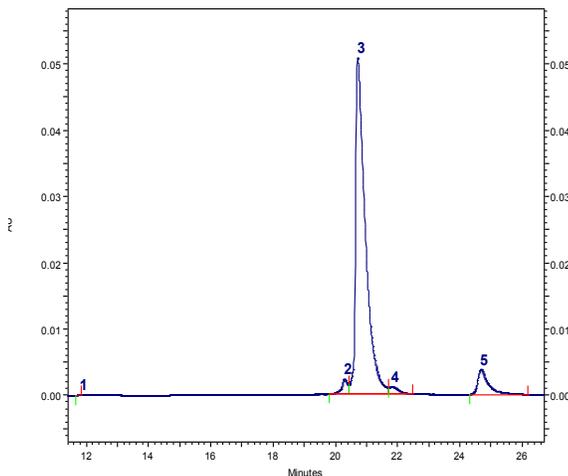


图1. 重组人血清白蛋白样品CE-SDS分子大小变异体分析谱图。1,2,4,5为杂质峰；3为主峰。

本文对重组人血白蛋白CE-SDS分子大小变异体分析的重复性进行了考察，同一个样品重复进样6针，重复性结果如表1所示。

同一个样品连续6针进样，峰型一致，主峰的迁移时间RSD值以及校正峰面积百分比的RSD值均在0.1%以内。实验结果表明：CE-SDS方法重复性良好，可有效应用于重组人血白蛋白样品的分子大小变异体分析。

表1. 重组人血清白蛋白样品重复进样6针CE-SDS分析重复性结果

名称	主峰迁移时间 (min)	主峰校正峰面积 (%)
Run-1	20.76	91.54
Run-2	20.79	91.44
Run-3	20.79	91.48
Run-4	20.77	91.49
Run-5	20.80	91.35
Run-6	20.79	91.42
RSD%	0.07	0.07

本文利用非还原型CE-SDS方法对两个批次的重组人血清白蛋白样品 (HSA-Lot 1、HSA-Lot 2) 进行了分子大小变异体分析，结果如图2所示，HSA-Lot 1和HSA-Lot 2主峰的迁移时间分别为20.72 min、20.74 min；主峰校正峰面积百分比分别为89.62%、91.72%。实验结果证明：CE-SDS方法可有效应用于重组人血清白蛋白样品的批次一致性分析。

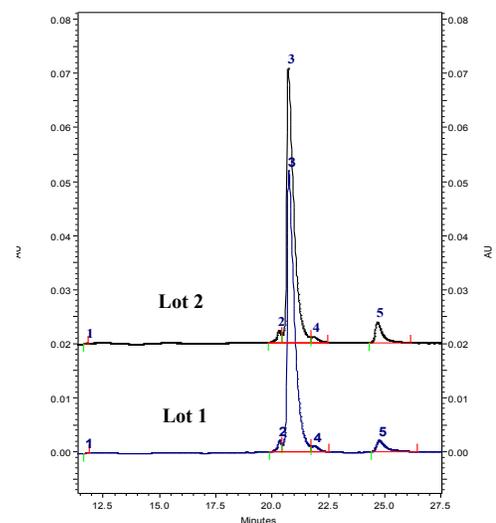


图2. 不同批次重组人血清白蛋白样品CE-SDS分子大小变异体分析谱图。1,2,4,5为杂质峰；3为主峰。

3.2 cIEF等电点分析

本文采用cIEF方法对重组人血清白蛋白样品进行了等电点分析。如图所示：重组人血清白蛋白样品异构体数目较少，可见明显主峰，2号峰为主峰，pI值为6.08（图2A）HSA-Lot 1的等电点范围为5.47~6.16。cIEF方法基于蛋白等电点大小差异进行分析，分离度高可有效应用于重组人血清白蛋白样品的等电点分析和批次一致性分析。

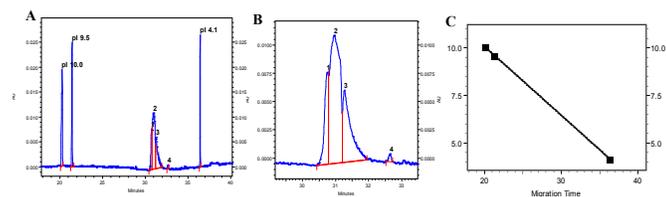


图3. 重组人血清白蛋白样品cIEF等电点分析结果。

图A为cIEF分析谱图；图B为样品峰放大图；图C为pI marker与迁移时间之间的线性曲线。其中，1号峰为碱性异构体，3和4号峰为酸性异构体

本文对cIEF等电点分析的重复性进行了考察，同一个样品重复进样5针，重复性结果如下表2所示。同一个样品重复进样5针主峰的迁移时间RSD值以及pI值的RSD值均在0.1%以内。实验结果表明：cIEF方法重复性良好，可有效应用于重组人血清白蛋白样品的等电点分析。

此外，本文也可采用cIEF方法，对不同批次的重组人血清白蛋白样品进行了等电点分析。HSA-Lot 1的等电点范围为5.47~6.16；重组人血清白蛋白样品异构体数目较少，可见明显主峰，2号峰为主峰，pI值为6.08；HSA-Lot 2的等电点范围为5.46~6.17；与HSA-Lot 1相似，2号峰为主峰，pI值为6.07。

表2. 重组人血清白蛋白样品重复进样6针cIEF分析重复性结果

编号	PI范围	不同峰的pI值重复性			
		1	2	3	4
1	5.46~6.15	6.15	6.08	5.98	5.46
2	5.47~6.16	6.16	6.08	5.98	5.47
3	5.46~6.15	6.15	6.07	5.97	5.46
4	5.47~6.16	6.16	6.08	5.97	5.47
5	5.47~6.16	6.16	6.08	5.97	5.47
RSD		0.09%	0.07%	0.09%	0.10%

备注：2号峰为主峰，1号峰为酸性异构体，3和4号峰为碱性异构体

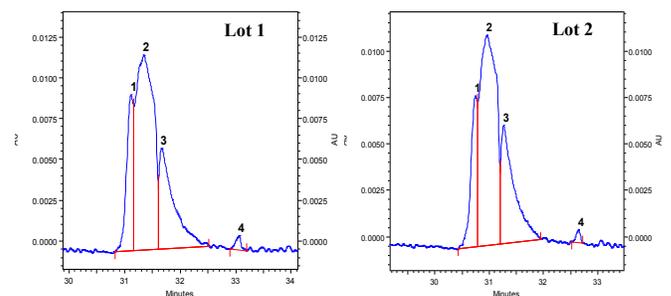


图4. 不同批次重组人血清白蛋白样品cIEF等电点分析结果。1号峰为酸性异构体，3和4号峰为碱性异构体

4、结论

本文基于SCIEX成熟稳定的IgG分子大小变异体分析试剂盒和cIEF分析试剂盒方法，可以实现对重组人血清白蛋白样品分子大小变异体和等电点的质量控制，并可用于重组人血清白蛋白样品的批次一致性分析。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15359-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：SCIEX-China