

CE-SDS方法对“KiH”融合蛋白的结构及纯度分析

Analysis of Structure and Purity of "KiH" Fusion Proteins by CE-SDS

刘冬科, 高铁, 陈泓序, 刘冰洁

Liu Dongke, Gao Tie, Chen Hongxu, Liu Bingjie

SCIEX, 中国

SCIEX, China

Key words: CE-SDS; PA 800 Plus; Fusion protein; Knob-into-Hole

1. 前言

融合蛋白是通过DNA重组技术将不同来源的基因编码区连接表达而产生的人工多肽链, 可创造出兼具多种功能的全新分子。

“杵臼 (Knob-into-Hole, KiH)” 技术, 是一项在融合蛋白上通过精妙的分子设计来保证异源亚基正确组装、减少错配的基因工程技术, 其设计灵感与“杵” (凸起结构, Knob) 和“臼” (凹陷结构, Hole) 的嵌合逻辑高度一致——通过对融合蛋白重链特定结构域进行定点突变, 人为构建出互补匹配的“杵”与“臼”结构, 当两条重链共表达时, 这种空间互补的“杵臼”结构会因立体互补的偏好性而优先驱动正确配对的异源二聚体精准结合, 同时抑制同源二聚体等错配的形成, 大幅提升融合蛋白的纯度、稳定性与生物活性, 有效解决了传统方法中因重链随机配对而产生大量无功能同源二聚体的难题, 是目前双抗、Fc融合蛋白工业化生产中最常用的组装调控技术之一。

SCIEX的 PA 800 Plus 药物分析系统凭借优异的分离能力和数据可靠性, 在生物大分子分析中应用广泛。本研究以两个“KiH”技术设计的融合蛋白为研究对象 (图1), 采用 SCIEX PA 800 Plus 的 CE-SDS方法进行结构确认及纯度分析, 为融合蛋白的质量控制提供可靠的数据支撑。

2. 仪器、试剂及样品前处理

PA 800 Plus毛细管电泳仪, 检测器: PDA, 220 nm; 采集频率: 4 Hz; 样品室温度: 25 °C; 毛细管温度: 25 °C; 窗口狭缝: 2号 (200 μm × 100 μm); 毛细管: 熔融石英毛细管, 内径50 μm,

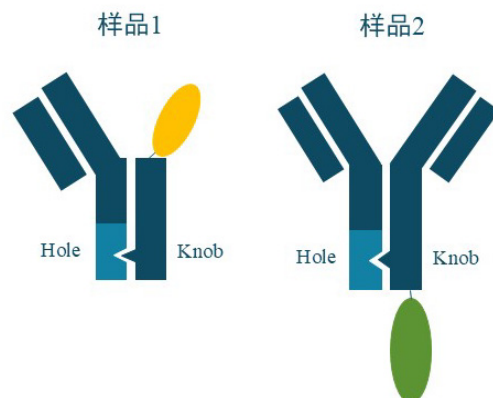


图1. “KiH”融合蛋白分子结构

20/30.2 cm 有效/总长。SCIEX IgG Purity/Heterogeneity Assay Kit (A10663), Low pH Phosphate SDS Sample Buffer (C57805)。

毛细管的预处理、针与针间冲洗程序: 使用碱性冲洗液在70 psi压力下冲洗3 min, 酸性冲洗液70 psi冲洗1 min, 去离子水70 psi冲洗1 min, 背景电解质70 psi冲洗5 min。进样条件: -5kV, 20 sec; 分离电压: -15 kV, 30 min;

本实验所用样品分别命名为样品1、样品2, 浓度均为10 mg/mL, 所含盐的终浓度小于50 mmol/L (如超出, 需进行超滤)。对于每个样品, 准备两个1.5 mL离心管, 分别依次加入10 μL样品溶液、90 μL样品缓冲液, 其中一个离心管加入5 μL 2-巯基乙醇作为还原法制备样品 (命名1-R/2-R), 另一个离心管加入5 μL碘乙酰胺溶液作为非还原法制备样品 (命名1-NR/2-NR)。盖上瓶盖, 充分混合后离心1 min。然后置于70 °C金属浴10 min。取出后冷却即可上机实验。

3. 实验结果

3.1 样品1 CE-SDS分析

样品1 分子结构中含一条23.4 KD的轻链(LC)，一条45.8 KDa的较短重链(HC-Knob)，一条48.8 KDa的重链(HC-Hole)，如图1所示。

CE-SDS结果显示(图2)，还原条件下(1-R)，样品1被还原为3种片段：LC、HC-Knob、HC-Hole，三者可良好分离，其中HC-Knob、HC-Hole分离度为1.15。LC、HC-Knob、HC-Hole峰纯度分别为23.29%、30.75%、40.01%。总纯度计算为94.05%。还原条件下出峰个数、分离度及各峰占比符合样品1由一条轻链，两条分子量差异较小的重链组成的分子结构。非还原条件下(1-NR)，仅看到一个样品主峰，纯度达98.23%，杂峰占比极低，表明样品完整蛋白纯度较高。

3.2 样品2 CE-SDS分析

样品2分子结构中含两条23.4 KD的轻链链(LC)，一条48.7 KDa的较短重链链(HC-Hole)，一条69.1 KDa的重链链(HC-Knob)，如图1所示。

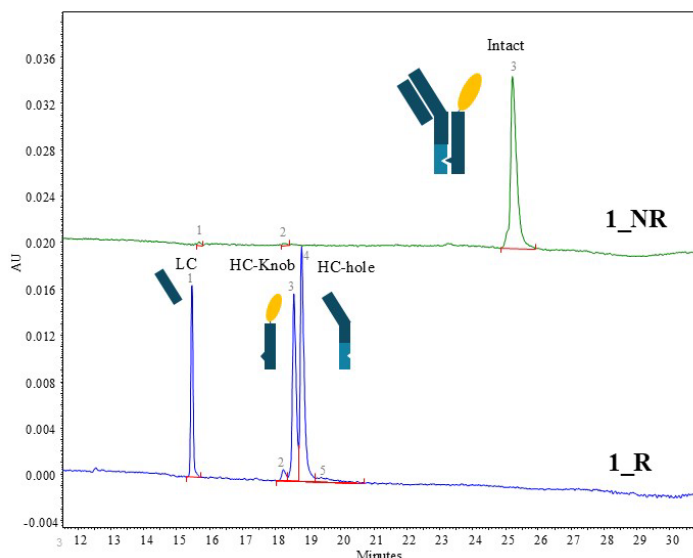


图2. 样品1的CE-SDS分析图谱

CE-SDS结果显示(图3)，在还原条件下(2-R)，样品2被还原为3种片段：LC、HC-Knob、HC-Hole，三者可有效分离，其中HC-Knob与HC-Hole分离度为3.63。三个组分纯度分别为40.12%、28.89%、30.59%，总纯度计算为99.60%。还原条件下出峰个数、分离度及各峰占比符合样品2由两条分子量相同的轻链，两条分子量差异较大的重链组成的分子结构。非还原条件下(2-NR)检测到一个主峰，纯度为90.25%。

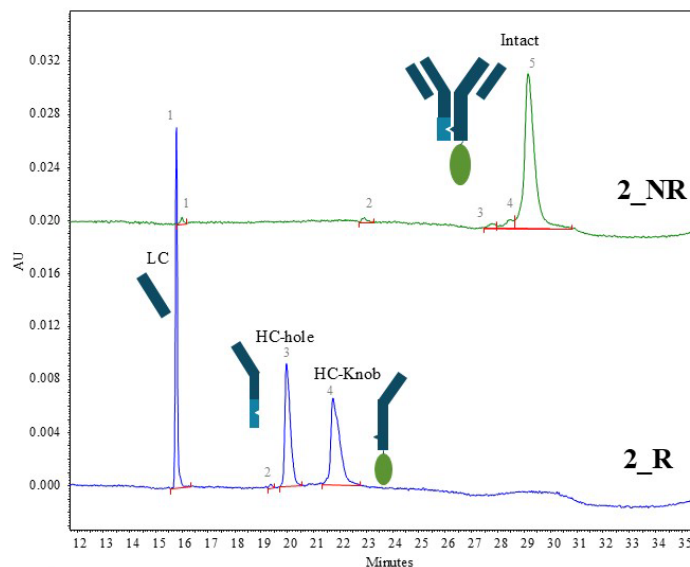


图3. 样品2的CE-SDS分析图谱

4. 结论

SCIEX PA 800 Plus的 CE-SDS 方法展现出优异的分析性能：

1. 还原条件下，可实现“KiH”融合蛋白的轻链、重链(HC-Knob/HC-Hole)不同分子量亚基的高效分离，满足异源二聚体融合蛋白的亚基分辨需求。
2. 还原与非还原两种模式结合，既能明确亚基组分分布，也能准确评估各亚基及完整蛋白的纯度，全面反映蛋白结构及纯度信息，为融合蛋白质量控制提供可靠技术支撑。

SCIEX临床诊断产品仅用于体外诊断。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。

© 2026 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-37659-ZH-A