

毛细管凝胶电泳法用于多抗纯度分析

Capillary gel electrophoresis is used for purity analysis of polyclonal antibody samples

唐红梅，陈泓序，罗继，刘冰洁

Hongmei Tang，Hongxu Chen, Ji Luo, Bingjie Liu

SCIEX, 中国;

SCIEX, China;

Key Words : Capillary Gel Electrophoresis, polyclonal antibody samples, Purity analysis

1、前言

多克隆抗体是由多个B细胞克隆产生，识别抗原上多个不同表位，因此具有多表位识别能力，由于多个抗体协同结合，整体亲和力较高，在低浓度抗原检测中表现更好。多抗药物由于其组成复杂、杂质多、批次差异大，而传统方法(如SDS-PAGE、ELISA)难以准确评估其纯度和一致性，因此急需一种高分辨率，可定量以及重复性好的分析方法来评估其纯度，而毛细管凝胶电泳(CGE)正是目前最符合这些要求的分析技术。自十二烷基磺酸钠-毛细管凝胶电泳(CE-SDS)从2015年进入中国药典以来，被广泛用于分析治疗性蛋白制品的纯度，并且CE-SDS法已被证明是单抗纯度分析的主流方法，可在非还原或还原条件下将完整抗体、重链、轻链及片段按分子量高效分离，因此也适用于多抗的纯度分析。

毛细管凝胶电泳法基于分子片段大小进行分离，定量准确度高适用于多抗的纯度测定。本文以不对称双抗，三抗，四抗，五抗样品为例，使用平台化CE-SDS 方法用于多抗纯度分析。

2、试剂及方法

2.1 试剂及样品

IgG Purity Kit试剂盒包括：熔融石英毛细管：50 μm ID×67 cm (SCIEX，338451)、 pH 9.0样品缓冲液(SCIEX，5314719)、 0.1 mol/L氢氧化钠(SCIEX，338424)、0.1 mol/L盐酸(SCIEX，5312349)、SDS凝胶缓冲液(SCIEX，PN A30341)、10 kDa 内标(SCIEX，A26487)；巯基乙醇(Sigma，PN 97622)；碘乙酰胺(Sigma，PN 11149)；去离子水(Millipore)；

样品：某企业提供的样品原液，包括不对称双抗，三抗，四抗，五抗，浓度分别为10.0 mg/mL、2.5 mg/mL、2.5 mg/mL、2.0 mg/mL(样品初始盐浓度均低于50 mM)；样品分子量分别约为150 kDa，190 kDa，290 kDa，350 kDa。

2.2 样品前处理

非还原样品制备：取不对称双抗样品10 μL(其它样品取约40 μL)，加入85 μL(其它样品取约55 μL)的样品缓冲溶液，加入2 μL的10 kDa marker，再加入250 mM的碘乙酰胺5 μL，涡旋混匀后6000 rpm离心1 min；然后 70 ℃孵育 10 min，冷却至室温后6000 rpm离心1 min ，制备成蛋白终浓度约1 mg/ml的溶液。取95 μL转移至样品瓶中，作为待测样品溶液。

还原样品制备：取不对称双抗样品10 μL(其它样品取约40 μL)，加入85 μL(其它样品取约55 μL)的样品缓冲溶液，加入2 μL的10 kDa marker，再加入2-巯基乙醇5 μL，涡旋混匀后6000 rpm离心1 min；然后 70 ℃孵育 10 min，冷却至室温后6000 rpm离心1 min，制备成蛋白终浓度约1 mg/ml的溶液。取95 μL转移至样品瓶中，作为待测样品溶液。

2.3 仪器及方法设置

采用SCIEX PA 800 Plus药物分析系统，匹配PDA检测器，采集频率：4 Hz，检测波长：220 nm；毛细管：熔融石英毛细管，50 μm内径，20/30.2 cm(有效/总长度)；窗口狭缝：100×200 μm；毛细管温度：25 ℃；样品室温度：25 ℃；进样条件：电压进样，-5 kV，20 s；分离条件：-15 kV，40 min。

毛细管针间冲洗和胶填充：0.1 mol/L氢氧化钠溶液在70 psi压力下冲洗3 min，然后用0.1 mol/L盐酸溶液在70 psi压力下冲洗1min，再用去离子水在70 psi压力下冲洗1 min，最后用SDS凝胶分离缓冲液在70 psi压力下冲洗10 min。

3、实验及结果

3.1、多抗样品纯度分析结果

下图中从下到上依次是不对称双抗，三抗，四抗，五抗样品的CE-SDS分离谱图；图1是抗体结构图，其中可以看到不对称双抗以及三抗分别有两条分子量不一样的重链，因此在还原结果中都能够清晰的看到HC有两个峰，不对称双抗还原结果中LC+HC的校正峰面积比例为99.33%；三抗还原结果中LC+HC的校正峰面积比例为75.45%；对于非还原结果：不对称双抗非还原中主峰校正峰面积比例为87.08%；三抗样品不是终产品原液所以纯度较低，非还原主峰校正峰面积比例仅45.81%。四抗及五抗样品轻重链结构对称但是在Fc端接入ScFV形成抗原结合位点，而且五抗样品在FC端接入的ScFV有一个失活，所以四抗五抗的还原结果均只有一条重链，一条轻链，由于五抗样品分子量更大所以迁移时间更滞后一些，四抗以及五抗样品其还原纯度校正峰面积比例分别为88.76%，94.43%；非还原主峰校正峰面积百分比分别为94.13%，98.35%。

3.2 CE-SDS方法重复性考察

本文以不对称双抗为例进行CE-SDS方法的重复性考察：在同一天内由同一个实验员对不对称双抗样品进行还原及非还原实验各连续运行6针，重复性结果如下图2及表2，表3所示。非还原结果中主峰迁移时间的6针RSD值为0.08%，校正峰面积百分比6针RSD值为0.28%；还原结果中LC的迁移时间6针RSD值为0.53%，HC1的迁移时间6针RSD值为0.53%，HC2的迁移时间6针RSD值为0.53%，LC+HC1+HC2的校正峰面积比例和作为还原纯度，其RSD值为0.13%，表明CE-SDS方法重复性很好。

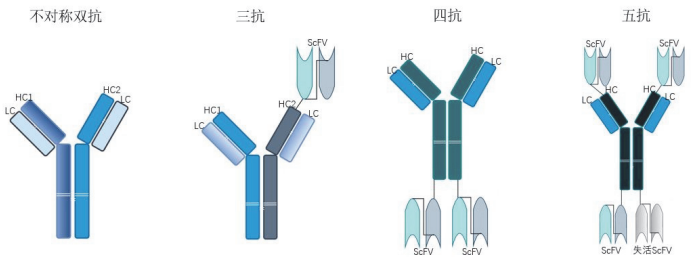


图1. 不对称双抗，三抗，四抗，五抗样品的结构图

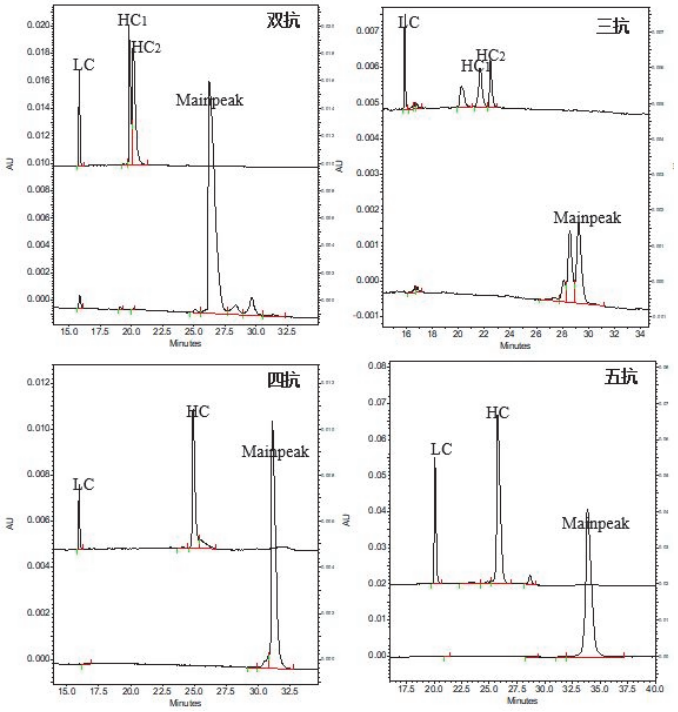


图2. 不对称双抗，三抗，四抗，五抗样品的CE-SDS分离结果谱图

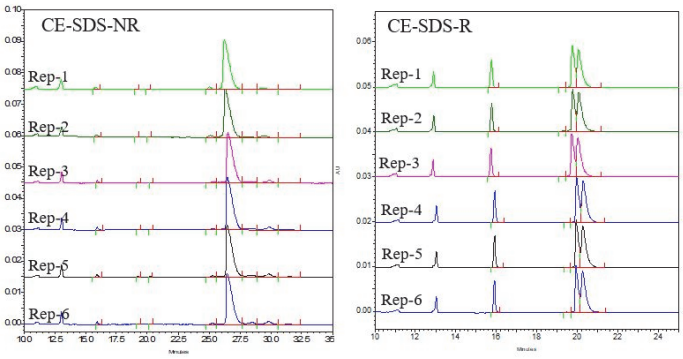


图3. 不对称双抗样品纯度的重复性结果[左：CE-SDS-NR；右：CE-SDS-R]

表1. 不对称双抗样品 CE-SDS-NR实验重复6次进样结果[n=6]

	MP主峰	
编号	MT[min]	CAP[%]
Rep-1	26.47	87.08
Rep-2	26.47	87.02
Rep-3	26.48	87.37
Rep-4	26.52	87.45
Rep-5	26.30	87.66
Rep-6	26.23	87.62
RSD%	0.41	0.28

表2. 不对称双抗样品 CE-SDS-R实验重复6次进样结果(n=6)

	LC		HC1		HC2	
编号	MT(min)	CAP(%)	MT1(min)	CAP1(%)	MT2(min)	CAP2(%)
Rep-1	15.91	18.65	19.96	35.02	20.25	46.13
Rep-2	15.92	18.82	19.94	34.80	20.26	46.14
Rep-3	15.93	18.90	19.95	34.91	20.28	45.95
Rep-4	15.73	18.98	19.72	34.98	20.03	45.79
Rep-5	15.77	19.23	19.76	34.57	20.07	46.01
Rep-6	15.76	19.27	19.74	34.34	20.06	46.20
RSD%	0.53	1.15	0.53	0.70	0.53	0.30

4、结论

本文通过CE-SDS方法能够有效的对不对称双抗，三抗，四抗，五抗样品进行纯度分析，同时考察了方法的重复性，主要结论如下：

1. **平台化CE-SDS方法：**这几个多克隆抗体样品均采用相同的CE-SDS分离方法，平台化方法不需要额外的方法开发，操作简单方便。同时对于不对称双抗以及三抗样品，还原结果中两条分子量不同的重链都能够明显的分离；对于四抗五抗样品也能做到主峰与片段峰的分离，使得纯度结果更准确。

2. **CE-SDS实验结果重复性好：**以双抗为例，非还原结果中主峰迁移时间及校正峰面积百分比的6针RSD值均小于1.0%；还原结果中LC，HC的迁移时间及校正峰面积百分比的6针RSD值也均小于1.50%。

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。

© 2026 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-39943-A

SCIEX中国

北京分公司
北京市昌平区生命科学园科学园路
18号院A座一层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390

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

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

全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897
官网：**sciex.com.cn**
官方微信：**SCIEX-China**