

使用MaxPeak Premier SEC蛋白分析专用柱 测定流体动力学半径

Hua Yang, Stephan M. Koza, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

体积排阻色谱(SEC)已广泛用于基于体积排阻的分析。本研究表明,在Waters ACQUITY™ Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 1.7 μm)或XBridge™ Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)上分离具有已知流体动力学半径(Rh)值的蛋白质并生成相应的校准曲线,可提供一种简单有效的方法来确定生物分子的Rh。由于在考察溶液中蛋白质的构象和相互作用特性时,Rh是一个有用的参数,因此它可以在制剂开发中提供信息或用于监测蛋白质构象变化。

Log(Rh)与保留时间之间良好的线性关系表明,蛋白质与ACQUITY或XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱之间的次级相互作用非常小,这些色谱柱有效结合了Waters MaxPeak™ Premier高性能表面(HPS)与BEH™ SEC聚乙烯颗粒技术。

优势

- 利用Waters XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)和Waters ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 1.7 μm)测定Rh
- 蛋白质与MaxPeak Premier SEC蛋白分析专用柱颗粒和色谱柱硬件之间的不良离子或疏水次级相互作用非常小

简介

SEC基于分析物在溶液中的大小或流体动力学体积进行分离。Rh定义为与被测分子以相同速率扩散的等效硬球的半径，可通过SEC确定。Rh不仅受分子大小影响，还会受溶剂效应影响。由于蛋白质不以硬球形式存在，因此测得的Rh更能反映溶剂化生物分子的表观大小。已有研究表明，通过NMR测得的天然和变性蛋白质的Rh有所不同，这可能是由于构象差异所致¹。SEC已用于通过Rh测量来检测和监测引起蛋白质构象变化的蛋白质-小分子相互作用²。此外，如果靶蛋白的构象受到同一溶液中其他分子与之相互作用的影响，可以使用比较性Rh数据开发稳定的蛋白质生物治疗药物的最终制剂。因此，Rh可以是一个生物学相关参数，因为它考虑了蛋白质在周围环境中的大小。

本应用纪要展示了在Waters XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm, 7.8 × 300 mm)和ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 1.7 µm, 4.6 × 300 mm)上分离几种Rh已知蛋白质的结果。我们通过生成校准曲线测定了单克隆抗体(mAb)曲妥珠单抗的Rh。此外，还比较了在不同流动相条件下以不同离子强度生成的校准曲线。Log (Rh)与保留时间之间良好的线性关系表明，蛋白质与MaxPeak Premier SEC蛋白分析专用柱颗粒和色谱柱硬件之间的任何不良离子或疏水次级相互作用非常小。

实验

样品描述

凝胶过滤标志物试剂盒(MWGF1000)和卵清蛋白(A5503)购自Sigma。为每种蛋白质制备10~20 mg/mL的储备液。合并所有蛋白质，使每种蛋白质的浓度为1 mg/mL。将曲妥珠单抗(21 mg/mL)直接进样至液相色谱(LC)系统。

方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统： ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统（平均系统
扩散：4 σ < 22 mL）

检测： 配备5 mm钛合金流通池的ACQUITY UPLC™ TUV

	检测器，波长：280 nm
样品瓶：	聚丙烯12 × 32 mm螺纹颈口样品瓶，带瓶盖和预切割PTFE/硅胶隔垫，容积300 μL，100个/包（部件号：186002639）
色谱柱：	XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 2.5 μm, 7.8 × 300, 配有mAb大小异构体标准品（部件号：176005070） ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 1.7 μm, 4.6 × 300 mm（部件号：186009964）
柱温：	室温
样品温度：	10 °C
进样体积：	10 μL（蛋白质混标），1 μL（曲妥珠单抗）— 7.8 mm内径色谱柱 3.5 μL（蛋白质混标），0.4 μL（曲妥珠单抗）— 4.6 mm内径色谱柱
流速：	0.75 mL/min — 7.8 mm内径色谱柱 0.38 mL/min — 4.6 mm内径色谱柱
流动相：	Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS) 10X (Alfa Aesar, J61917)，经0.1 μm无菌过滤，稀释至1X、1.5X和2X
数据管理	
色谱软件：	Empower 3 (FR 4)

结果与讨论

在XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm, 7.8 × 300 mm)上分离具有各种Rh的蛋白质混合物。表1显示了用于生成校准曲线的蛋白质的Rh。在三种不同离子强度的流动相条件下进行分离：1X DPBS (Dulbecco 磷酸盐缓冲盐水)、1.5X DPBS和2X DPBS (图1a)。1X DPBS含有8 mM磷酸氢二钠、2.7 mM氯化钾和0.137 M氯化钠。以Rh的常用对数对各蛋白质的保留时间作图，构建校准曲线。从图1b可以看出，在校准曲线中获得了有效的线性相关性，趋势线的R²证明了这一点(R²>0.995)。此外，改变离子强度对校准曲线无显著影响，因为在这些条件下，趋势线的斜率、y轴截距和R²相似。在1X DPBS流动相条件下，使用ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 1.7 µm, 4.6 × 300 mm)获得了相似的结果(R²=0.9954) (图1c)。这些结果表明，对于两者所用的MaxPeak Premier高性能表面(HPS)技术，蛋白质与SEC颗粒或色谱柱硬件之间的次级相互作用非常小。

峰编号	蛋白质	流体动力学半径, Rh (Å)	Log Rh	分子量, MW (kDa)	Log MW
1	甲状腺球蛋白	86	1.93	669	2.83
2	去铁铁蛋白	61	1.79	443	2.65
3	β-淀粉酶	54	1.73	200	2.30
4	乙醇脱氢酶	46	1.66	150	2.18
5	BSA	36	1.56	66	1.82
6	卵清蛋白	28	1.45	43	1.63
7	碳酸酐酶	21	1.32	29	1.46
8	肌红蛋白	19	1.28	17.6	1.25
9	细胞色素C	17	1.23	12.4	1.09

表1.在MaxPeak Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱上分离的具有已知流体动力学半径和分子量的蛋白质列表

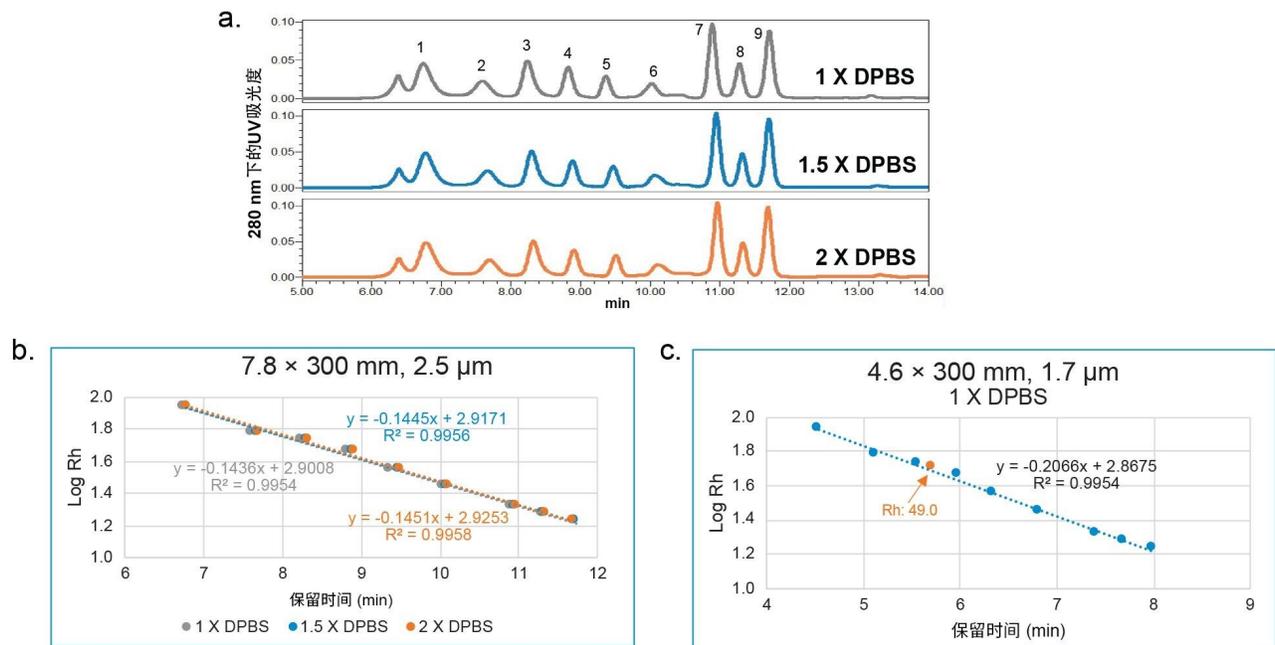


图1.a)在三种流动相条件 (1X DPBS、1.5X DPBS和2X DPBS) 下利用XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)分离九种蛋白质的结果。峰旁边的编号对应于表1中峰鉴定结果的编号。b-c)绘制Log (Rh)与SEC分离所得保留时间的关系图以构建校准曲线。c图中橙色圆点表示由DLS测量得到的曲妥珠单抗的Log (Rh) (参考文献3) 与SEC分离所得保留时间的关系。根据校准曲线计算所得曲妥珠单抗的Rh为49.0 Å。

使用校准曲线, 根据曲妥珠单抗的保留时间确定其Rh (表2)。对于所有流动相条件, 与从文献中获得的DLS (动态光散射) 值(5.2 nm)相比, 差异小于6%³。对于ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 1.7 μm, 4.6 × 300 mm), 在1X DPBS流动相条件下获得的百分比差异为5.84%。本文报告的SEC测定的Rh值与文献中报告的值之间的差异可能与测量Rh的方法有关。

曲妥珠单抗	Rh计算值 (Å)	*DLS Rh (Å)	% 差异
1 X DPBS	49.1		-5.65%
1.5 X DPBS	49.8	52	-4.21%
2 X DPBS	50.1		-3.68%

表2.使用图1b中的校准曲线确定曲妥珠单抗的Rh值。百分比差异 = (计算出的Rh - DLS Rh) / DLS Rh × 100%。*DLS Rh得自参考文献3。

使用表1所列相同蛋白质生成的校准曲线确定曲妥珠单抗的MW。如图2所示，XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm, 7.8 × 300 mm)在不同离子强度条件下的校准曲线也高度相似。但是，线性相关性(R²>0.988)不如使用Rh时高。与理论MW相比，百分比差异(>22%)也大于使用Rh时的结果(表3)。对于ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 1.7 μm, 4.6 × 300 mm)，在1X DPBS流动相条件下获得的R²为0.9882，百分比差异为22.15%。这些结果不足为奇，因为SEC根据分析物的大小而不是它们的MW来进行分离。MW不考虑分子在溶剂中的形状和构象。另一方面，流体动力学半径衡量的是溶剂中分子的大小，可能更好地反映了分子在SEC流动相中的行为。因此，当使用SEC色谱柱时，蛋白质与固定相或色谱柱硬件之间表现出非常小的相互作用，可以获得比MW更出色的Rh估计值。

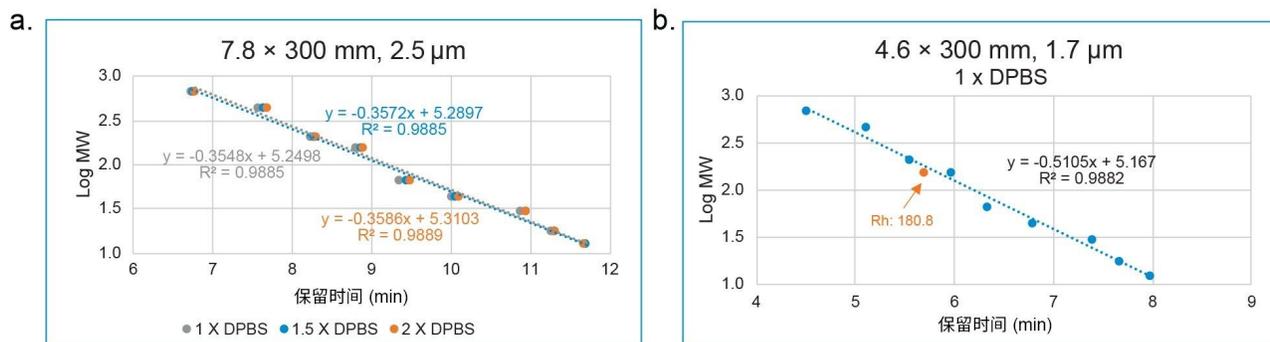


图2.绘制Log (MW)与SEC分离所得蛋白质保留时间的关系图以构建校准曲线。b图中橙色圆点表示曲妥珠单抗的理论Log (MW)与SEC分离的保留时间。根据校准曲线计算所得曲妥珠单抗的MW为180.8 kDa。

曲妥珠单抗	MW 计算值 (kDa)	理论 MW (kDa)	% 差异
1 X DPBS	182.0		22.97%
1.5 X DPBS	188.1	148	27.10%
2 X DPBS	191.2		29.16%

表3.使用图2a中的校准曲线确定曲妥珠单抗的MW值。百分比差异 = (计算出的MW - 理论MW)/理论MW × 100%。

结论

Rh被视为一个重要的生物学参数，因为它考虑了生物分子的溶剂效应，并且Rh可以在药物的制剂开发过程中提供有用的信息，Rh变化也可能表明蛋白质构象发生变化。

本应用纪要展示了一种利用SEC测定蛋白质Rh简单有效的方法。在MaxPeak Premier蛋白分析专用柱上分离具有已知Rh的蛋白质，并绘制Log (Rh)与保留时间的关系图以生成校准曲线。较高的线性相关性表明蛋白质与Premier色谱柱固定相和色谱柱硬件之间的次级相互作用非常小，根据SEC校准曲线确定的单克隆抗体曲妥珠单抗的Rh与文献报道的DLS Rh值相差不超过6%。研究还表明，通过SEC法进行评估时，曲妥珠单抗等mAb在Rh与MW之间未表现出典型的相关性，这一结果符合预期，因为SEC根据分子在溶液中的大小而不是它们的MW来进行分离。

还应注意的是，本研究中蛋白质和mAb的SEC结果是使用生理相关pH (7.4)和离子强度（约150 mM）的流动相(DPBS)生成的，与使用更极端的pH或离子强度所进行的SEC测量相比，提供了可能更相关的蛋白质构象的量度。

参考资料

1. Wilkins D. K. Grimshaw S. B. Receveur V. Dobson C. M. Jones J. A. Smith L. J. Hydrodynamic Radii of Native and Denatured Proteins Measured by Pulse Field Gradient NMR Techniques. *Biochemistry* 1999; 38 (50):16424–16431.

2. Verde V. L. Dominici P. Astegno A. Determination of Hydrodynamic Radius of Proteins by Size Exclusion Chromatography. *Bio-protocol*. 2017; Vol 7, Issue 08.
3. Ramos J. Vega J. F. Cruz V. Sanchez-Sanchez E. Cortes J. Martinez-Salazar J. Hydrodynamic and Electrophoretic Properties of Trastuzumab/HER2 Extracellular Domain Complexes as Revealed by Experimental Techniques and Computational Simulations. *Int.J. Mol.Sci.* 2019; 20: 1076.

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007625ZH, 2022年5月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号