

安捷伦科技

生物大分子药物色谱表征入门指南

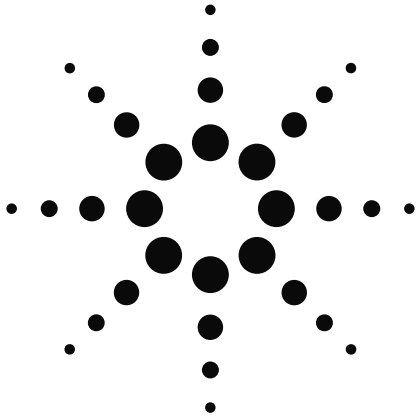
The Measure of Confidence



Agilent Technologies

目录

生物大分子药物表征概述.....	04
肽图分析指南.....	08
糖谱分析.....	20
亲和色谱测定抗体滴度.....	28
体积排阻色谱分析蛋白质聚集体和降解产物.....	36
采用反相色谱进行蛋白鉴定与杂质分析.....	42
离子交换色谱表征蛋白质电荷异构体.....	50



生物大分子药物表征概述

一、生物大分子药物表征与质量控制

过去，大多数药物都是化学合成的小分子。如今，随着越来越多的小分子药物专利过期以及来自非专利仿制药物的强大竞争，特别是生物药物的靶向治疗优势日益凸显，生物药物逐渐占据了重要的市场份额，并显现出巨大的增长潜力。生物药物可以是RNA（如microRNA）、寡聚核苷酸、多肽或者蛋白质。凭借细胞特异的作用方式和相对低的化合物特异毒性，这类药物取得了巨大的成功。其中蛋白治疗药物的发现和开发正在快速增长，不久将会赶上甚至超过化学药物。在下面的讨论中，主要关注蛋白类生物大分子药物。

小分子药物一般通过化学合成得到，其结构非常清楚，但是治疗用蛋白质药物的生产和表征都很困难。这些蛋白质是从各种生物基质中分离得到，一般是由紧密相关的不同分子量和不同电荷的异构体组成的不均一混合物。它们从活细胞中得到且往往包含多种与产品和工艺相关的杂质。此外，重组蛋白还常常出现复杂的翻译后修饰，具有部分依赖二硫键的高度特异的三维结构，并且可能发生聚集、吸附和截短。因此，全面的化学、物理和构像表征对于了解重组蛋白药物的异质性、杂质谱和有效性是非常必要的。准确的氨基酸序列、分子量、价态变化、糖基化、聚集水平以及氧化水平都是蛋白质药物表征的关键要素。对于杂质，尤其是那些可能诱导发热反应或免疫反应的化合物必须进行鉴定、表征并尽可能减少其在最终产品中的含量。为了减少氧化和水解等化学变化导致的药物降解，延长药效持续时间，合适的剂型设计也非常重要。因此，准确并且可重复的表征方法对于支持和指导药物生产以及制剂决策不可或缺。和所有其他药品一样，生物药品的原料药和终产品也必须进行严格的质量控制。必须对产品的成份、杂质、含量（如蛋白质含量）和稳定性进行检测，保证生物药品的安全性和有效性。全面的质量控制也是所有GMP法规的要求，是监管检查的重点。传统小分子药品与生物药品表征和质量控制（QC）的最根本区别在于两者用于测定产品特性（同一性、效价、纯度和杂质谱）的方法不同。这是因为两者的产品性质截然不同。由于其高度的复杂性，生物技术产品的分析过程更为复杂。蛋白质分子的分子量比传统药物大2~3个数量级。原料药来源于活体细胞，通常含有一系列复杂的产品和工艺相关杂质。另外，蛋白质还经过复杂的翻译后修饰，有高特异性的三维或四维结构，可能发生聚集和/或吸附作用。

尽管分析仪器已经有了很大的进步，仍然无法对所有生物技术药品进行完全的表征。因此，监管部门和生物制药行业没有使用“完全表征的生物药物（Fully Characterized Biological Drugs）”这样的术语，而是代之以“良好表征的生物药品（Well Characterized Biological Drugs, WCBD）”。国际人用药注册技术协调会议（ICH Q6B，测试方法和接受标准：生物技术和生物药品，SPECIFICATIONS: TEST PROCEDURES AND ACCEPTANCE CRITERIA FOR BIOTECHNOLOGICAL/ BIOLOGICAL PRODUCTS）建议通过理化性质、生物活性、免疫化学活性、纯度和含量来表征产品。

1、理化参数

理化参数包括一级结构、组成和理化性质的测定。一级结构的信息可以结合肽图、C-端和N-端序列、氨基酸组成和序列等一系列结果来确定。蛋白质的高级结构也很重要，因为它们对药品的活性有显著影响。高级结构的数据可以通过光谱方法获得，如圆二色光谱（CD）和核磁共振（NMR）。还应采集其他理化特性数据，如分子量或分子大小、异构类型、消光系数和电泳图谱。鉴别、同质性和纯度的数据也可以通过多种液相色谱法、质谱或液质联用等技术进行采集。

2、生物活性

生物活性的测定很重要，因为它决定了药物的治疗效果。生物活性的数据给出了功能信息，同时还间接地给出正确的蛋白质折叠信息。用于测定生物活性的方法包括基于动物的生物测定法、细胞培养测定法和生物化学测定法。生物测定的结果应当表达成活力单位，并用商品化或自制标准物质为对照进行校正。特殊情况下，也可以用理化试验代替生物测定法进行生物活性的检测。这种情况下，结果应表达为质量单位。

3、免疫化学性质

如果预期产品为抗体，则应完整地表征其免疫化学性质。应通过与纯抗原和特定种类抗原的抗体结合试验来测定抗体的亲和力、活力和免疫活性。蛋白质的免疫化学性质可用于确定其身份、同质性或纯度。

4、含量与杂质

产品中蛋白质的含量通常用紫外分光光度法测定。紫外吸收法最适用于纯度极高的蛋白质，因为其他蛋白质的存在可能干扰检测结果。测定最大吸收波长处的吸收值，再根据经验的消光系数计算蛋白质含量。蛋白质类药品中的杂质可以分为两类：产品相关的杂质和工艺相关的杂质。工艺相关杂质由细胞、细胞培养基或纯化过程产生。这类杂质有宿主细胞的DNA、蛋白质、细胞培养基组分（如生长激素），以及下游工艺或是纯化工艺本身可能用到的物质等（如酶、化学和生化过程中使用的试剂、无机盐、配

体和其他浸出物）。产品相关杂质为氧化、异构化等修饰产生的杂质，以及脱酰胺基、聚合和截断等翻译后修饰产生的杂质。

表1是生物药品检验项目示例，从列出的检测方法可以看到，现代仪器分析方法，包括液相色谱法、核磁共振法、质谱法等已经逐渐成为生物大分子药物表征的不可或缺的手段，特别是在理化参数以及含量与杂质检测方面具有不可替代的作用。作为全球领先的分析测量专业公司，安捷伦提供的测量工具可让您对于了解生物分子在整个开发过程中的确切状态满怀信心。我们的解决方案提供稳定可靠的分析方法，能确保对生物药物的透彻表征以及向质量控制的顺利转移。在这本小手册中，我们专注于各种色谱分离模式在生物药物表征中的应用。如您需要有一个整体的了解，请参考生物药物开发和 QA/QC 领域的安捷伦应用（5991-1504CHCN）。

表1生物药品检验项目示例

	技术指标	检测方法
一般实验	pH	校正过的pH计
	溶解物的浓度	渗透压摩尔浓度
	外观	颜色、澄清度和可见异物，目测
身份和 异质性	液相色谱法	HPLC, UHPLC, LC/MS, SEC
	电荷分布	离子交换色谱 (IEC), 等电聚焦 (IEF)
	分子量	SEC, MS, SDS-PAGE
	一级结构	通过Edman 化学降解和HPLC测定肽图
	高级结构	NMR, 圆二色性
	糖基化的异质性	用GC-MS或HPAEC-PAD和寡糖进行单糖组成分析
	蛋白质氨基酸的异质性	用自动Edman化学降解和HPLC测定N-端序列
纯度和 杂质	通过c-端和截断型的鉴定进行异质性分析	结合肽图分析和ES-MS/MS进行C-端序列
	降解物、截断型、亚型	SDS-PAGE (还原性和非还原性) HPLC, UHPLC, LC/MS
	脱酰胺基产物	等电聚焦、IEC、肽图分析
	二聚体和多聚体	SEC、分析型超速离心、SDS PAGE
	翻译后修饰	基于肽图的二硫键分析，用合适的酶消化并用LC-EC/MS分析c-端序列分析
	宿主细胞蛋白质	SDS-PAGE、免疫分析
	相关蛋白质	SDS-PAGE、免疫分析、HPLC、LC/MS
工艺相关杂质示例	残留溶剂用GC顶空和GC-MS顶空测定；痕量金属用ICP-MS和ICP-DES测定	
效价	充分验证的生物效价测定	效价
	蛋白质含量	UV 扫描

二、色谱技术在生物大分子药物表征中的应用

由于生物大分子药物的复杂性，在表征上综合使用生物学、物理学和物理化学以及化学等多种表征手段。以表1所列常见生物药品检验项目为例，这些检测项目包含了目前经常使用的主流方法。对于同一个技术指标，通常会有多种分析方法可供选择，比如电荷异质性可以使用离子交换色谱或/和等电聚焦毛细管电泳进行检测，不同的方法数据可以相互验证和补充。作为最广为使用的分离分析技术，色谱分析是生物大分子药物表征不可或缺的方法。在蛋白类药物理化性质表征以及含量和杂质检查方面具有显著的优势，综合使用反相、离子交换、体积排阻、亲和等多种色谱模式从不同层面对生物大分子药物进行表征。进行信息整合，将“良好表征”的层次推向更高。

在表征方法上，将还原法和整体法相结合。还原法的思路是将生物大分子分解为组成单元，如氨基酸、肽段、片段、糖等各种不同层次的组成部分，降低复杂程度，从而能精确地测定蛋白质的氨基酸组成、一级序列、翻译后修饰、二硫键连接以及糖基化等信息。整体法则是在保持蛋白分子完整性的前提下，通过蛋白分子在各种色谱模式下的保留和分离情况来表征蛋白分子的异质性和杂质。表2是以蛋白类药物为例，列出的常用色谱表征方法。

表2 常用表征方法以及色谱柱选择

表征方法	分离模式	分析目的	色谱柱	特点
氨基酸分析	反相	蛋白药物氨基酸组成以及培养基氨基酸含量	氨基酸分析专用柱 AAA column	24种氨基酸基线分离，自动化
肽图分析	反相	蛋白质鉴定以及蛋白修饰分析	肽图分析专用柱 Peptide Mapping columns	专用柱，快速，高柱效，批次重现性
糖谱分析	亲水相互作用	糖基化异质性	糖谱分析专用柱 Glycan Mapping	专用柱，快速，高分离度
完整蛋白与片段表征	反相	杂质、分子量、轻链与重链	zorbax 300SB, RP-Mab	大孔径，耐酸，耐高温
电荷异构体分析	离子交换	电荷异质性	Bio IEX, Bio Mab	生物惰性，高柱效，高柱容量
聚集分析	体积排阻	多聚体以及碎片	Bio SEC-3,-5	生物惰性，柱效高，稳定性
单抗滴度分析	亲和色谱	抗体滴度	Bio-Monolith Protein A	快速分离，定量准确，寿命长

与小分子药物色谱表征相比，生物药物表征采用的色谱分离模式更为广泛，小分子药物基本上以反相分离模式为主，而在生物药物表征除反相分离这种常用模式外还广泛使用离子交换、体积排阻以及亲水相互作用色谱模式。即使在反相分离这种模式中，生物药物分析也与小分子药物分析面临完全不同的挑战，采用了不一样的分析策略。在生物药物表征中，倾向于使用针对生物药物特点设计的专用柱，通常称之为生物色谱柱或简称生物柱。

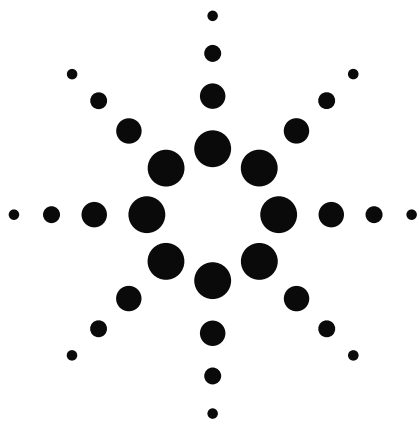
生物色谱柱是用于分离生物化合物，如多肽和蛋白质、寡核苷酸和多聚核苷酸，以及其他生物分子和复合物的液相色谱柱。生物柱是为生物分子分析而特别设计的。概括而言：

- 1、生物药物分子量较大，色谱传质慢，需要具有适合大分子分析的大孔径和有利于传质的小粒径或核壳型填料。
- 2、生物惰性填料，设计上尽量减少填料与分析物之间的非特异性结合，以提高回收率。
- 3、氨基酸分析、肽图分析和糖谱分析均为多组分复杂体系分析，对分离度、重现性和通量有较高要求。

针对特定的分析项目，对色谱柱性能还会有更为具体的要求，这在各论相关章节再做详细论述。在生物药物表征方面，‘完整解决方案’越来越受到重视，样品制备环节开始成为重要的制约因素之一，在氨基酸分析、肽图分析以及糖谱分析等项目上，往往都需要比较繁琐的衍生化和酶切过程。安捷伦注意到这一点，并努力开发样品前处理流程和试剂盒，确保方法的重现性和易操作性。

三、如何使用本手册

本手册不是一个产品手册或应用文集，也不是一个艰深的理论书籍。本手册更像一个以实用性为导向的标准操作程序（SOP），将一个分析流程按功能分成若干个模块，以肽图分析为例，整个流程被分为样品前处理、选择裂解试剂、变性还原和烷基化、酶解、酶解产物的纯化和富集、色谱柱选择、流动相选择、检测等多个模块，在各个模块中有常用起始条件和优化方法，以便操作者可以根据样品和分析目的进行裁剪寻求最佳条件。在各个模块中还会穿插一些经验技巧以及基础理论。本手册中不同的章节之间是相互独立的，读者可直接阅读感兴趣的章节。



肽谱分析指南

一、肽谱分析

肽谱分析是一种信息量非常丰富的蛋白质鉴定测试方法，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，以及其它翻译后修饰。

肽谱是一个蛋白经酶解处理后所得最终产物通过色谱分离的指纹图谱，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。

选择适合的色谱技术用于分离肽段并生成肽谱时，需考虑蛋白质本身结构、实验目的及预期结果。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。此技术可使用挥发性的流动相洗脱液，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 稳定性和受硅醇基影响最小的色谱柱。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熟练的蛋白样品前处理经验、强大的分离技术和验证方案的知识。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。需要指出的是反相色谱是完成肽谱分析的一种技术和手段，为增加肽图肽段覆盖率和检测糖肽时也常常会使用与反相在分离机理上能互补的亲水相互作用色谱 (HILIC)。

二、样品制备

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液相色谱进样。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

1 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分离。酶解前通常会使用一些方法进行样品纯化，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，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（MARS Human），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。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）。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。

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)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。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。凝胶过滤法是最简单的色谱操作法之一，样品均在等度洗脱条件下处理，可分离分子量差异大于两倍的分子（例如，蛋白质）。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。对于一些可以复性的小蛋白而言，反相也是一种值得考虑的脱盐手段。

2 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。化学裂解主要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。酶促方法使用的更为广泛，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，选择过程需要仔细观察整个肽谱分析过程，并考虑相关的表征。肽谱分析最常使用的裂解试剂为胰蛋白酶，因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。

3 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。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)。还原和烷基化的完全性可通过反相色谱法监测。

4 酶解

胰蛋白酶具有良好的特异性，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（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。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，从而导致酶解差异。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）；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 缓冲液与质谱分析不兼容，需通过固相萃取法(SPE) 将其去除。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2h到30h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20h）。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。为确定出可能影响后续分析的酶解因素，实验应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。

5 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，特定翻译后修饰（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。肽段富集后，可使用石墨或C18 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。

6 推荐方法（表2和图1）

需要用到的试剂如下：

100 mM碳酸氢铵：取0.79g 碳酸氢铵，加入100 mL 水。保存于4 °C 冰箱中。

胰蛋白酶储备液：安捷伦公司提供修饰胰蛋白酶。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 50mM 的乙酸溶解冻干的胰蛋白酶，制备成浓度为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，建议实验前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。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。

表2 推荐样品制备方法

蛋白质的复悬、变性及还原	酶解
<ol style="list-style-type: none"> 1. 在0.5 mL 离心管中加入0.5 mg 总蛋白 2. 加入25 μL 碳酸氢铵储备液 3. 加入25 μL TFE 变性剂 4. 加入1.0 μL DTT 储备液 5. 涡旋混合 6. 在以下任一条件下加热以变性： <ul style="list-style-type: none"> · 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 	<ol style="list-style-type: none"> 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 μg, 需添加45 μL 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/μL 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, 则使得赖氨酸的烷基化 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 μg 蛋白质, 可添加10 μg 和25 μg 的胰蛋白酶 (10 至25 μL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
烷基化	
<ol style="list-style-type: none"> 1. 加入4.0 μL 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 	降低pH, 终止胰蛋白酶活性
淬灭过量的IAM	<ol style="list-style-type: none"> 1. 加入1 μL 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, 可添加更多的甲酸
<ol style="list-style-type: none"> 1. 加入1.0 μL 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 	酶解物纯化
稀释及pH 调节	<ol style="list-style-type: none"> 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/μL 如果您的样品并不复杂, 可稀释为50 fmol/μL 的溶液

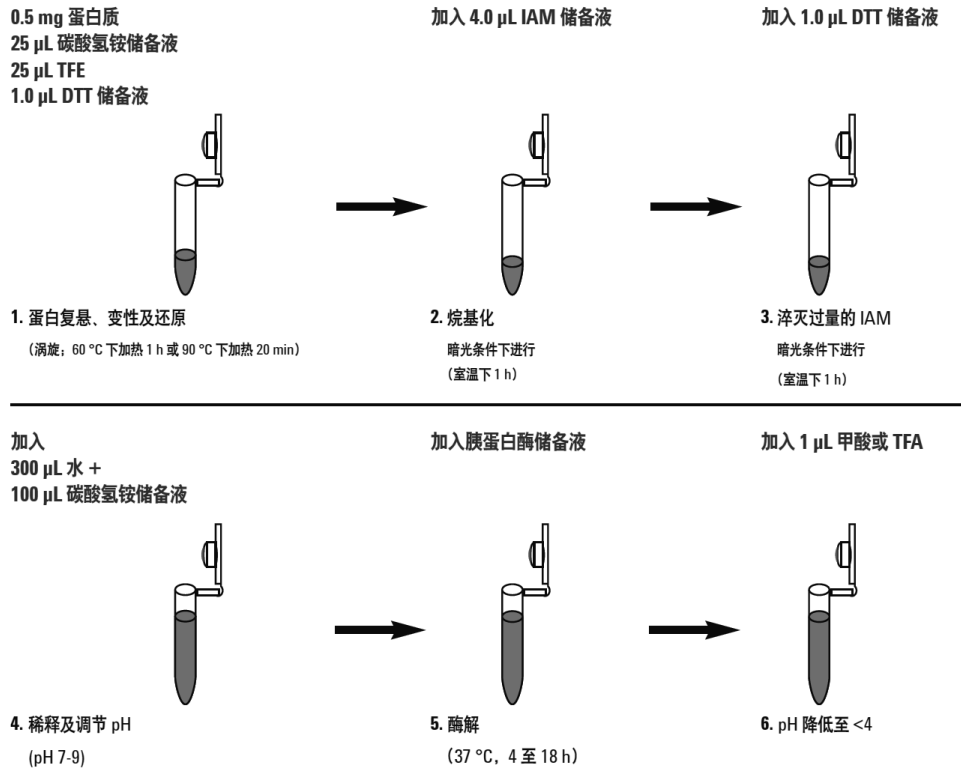


图1 胰蛋白酶消化流程

三. 色谱分离

在选择肽谱分析色谱柱和方法时，通常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2 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。在研究亲水性肽段、糖肽以及进一步提高肽段序列覆盖率时建议组合使用与 RPC 分离机理互补的亲水相互作用色谱 (HILIC) 获得更多信息。

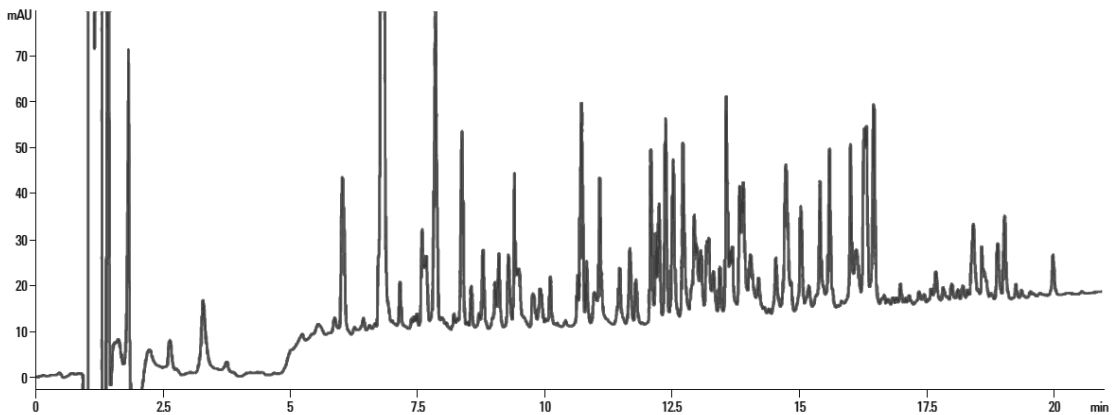


图2 BSA 的反相分离图。采用Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 2.1 x 150 mm 色谱柱（安捷伦部件号653750-902）肽谱分析条件为0.3 mL/min, 40 $^{\circ}$ C, 流动相为水（含0.1% TFA）/乙腈(0.08%TFA), 线性梯度

1 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在改善肽谱分离、优化策略中有着重要作用。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，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。高效分离色谱柱，特别是表面多孔色谱柱越来越多地用于生物分离（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，可在较高的线速度下分离较大的分子，同时，这类填料的粒径适中（2~5 μm），不会出现系统反压过高的问题。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。反相多肽分离常在低 pH (pH<3)、高温下(>40 °C) 进行。肽谱分析依赖于色谱柱的可重复操作，精确的指纹图谱和可重复验证的方案。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3所示为 Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 色谱柱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。

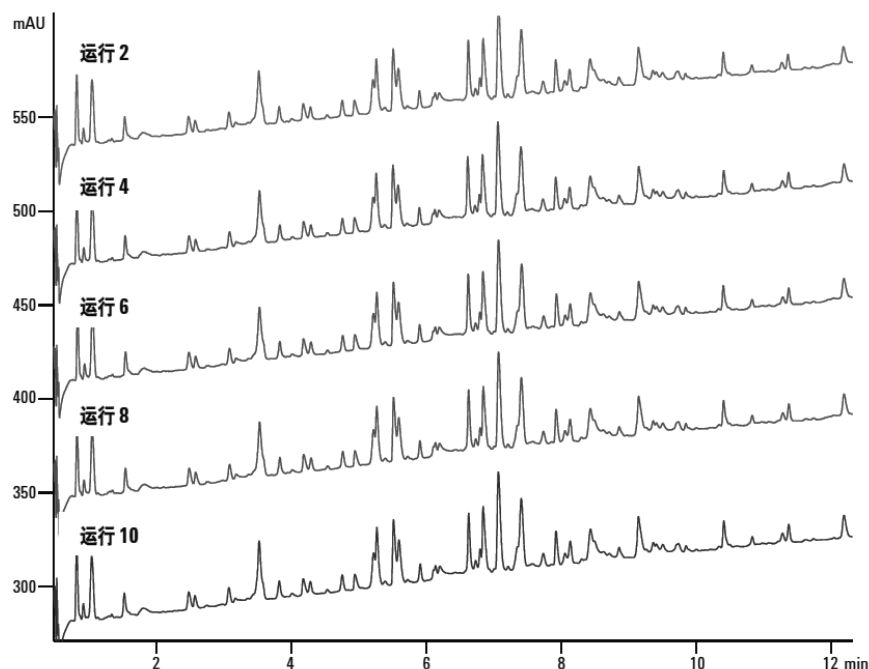


图3——一个单克隆抗体胰蛋白酶水解物的五次重复进样，使用3.0x150mm的Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（安捷伦部件号653950-302），Agilent 1200 液相系统联用6520 Q-TOF 分离条件为0.3 mL/min，40 °C，流动相为水（含0.1% FA）/乙腈（含0.1%FA），梯度洗脱

2 流动相选择

肽谱分析中最常用的流动相为水和乙腈（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之间的磷酸钠或磷酸钾、乙酸铵、磷酸也可用于乙腈梯度中。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，多肽可洗脱得到更尖更对称的色谱峰。通常，乙腈中会加入三氟乙酸。在与质谱连接时，由于三氟乙酸会引起离子抑制，通常会使用甲酸、乙酸等挥发性有机酸。

3 检测

多肽的紫外检测波长通常为210 nm 至220 nm 和/或280 nm。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 检测对样品基质中干扰物质的选择性较差。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4 比较了220 nm 和280 nm 波长下的肽谱分离，并详细说明了吸收灵敏度和UV 峰轮廓的差别。

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）

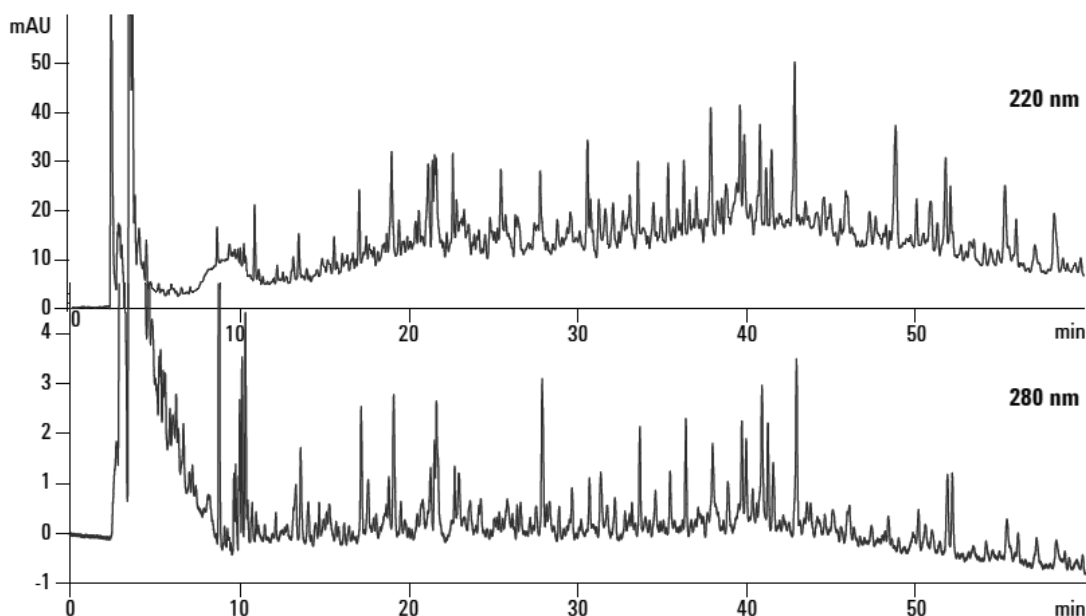


图4 利用AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（安捷伦部件号651750-902）不同吸收波长灵敏度比较，2.1 x 250 mm，所得的大肠杆菌酶解物谱图，220 nm（上图），280 nm（下图），采用Agilent 1290Infinity LC 进行分析

4 优化

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)改变选择性，(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：

- 促进大多数类型和不同结构的多肽分离
- 抑制硅醇离子化，避免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，在相同有机相比例下可获得更窄的色谱峰
- 通过离子对与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。最初进行肽谱分析优化方法时，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。梯度坡度（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' 值同时取决于色谱柱尺寸、固定相、流动相、流速、温度等参数。

(2) 改变选择性

分析样品时，通常会在选择性参数(α) 改善后再对色谱柱柱效(N) 进行更改。温度和梯度坡度的改变易于操作（不需要改变流动相或色谱柱），应先进行开发以改善选择性参数(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5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）。

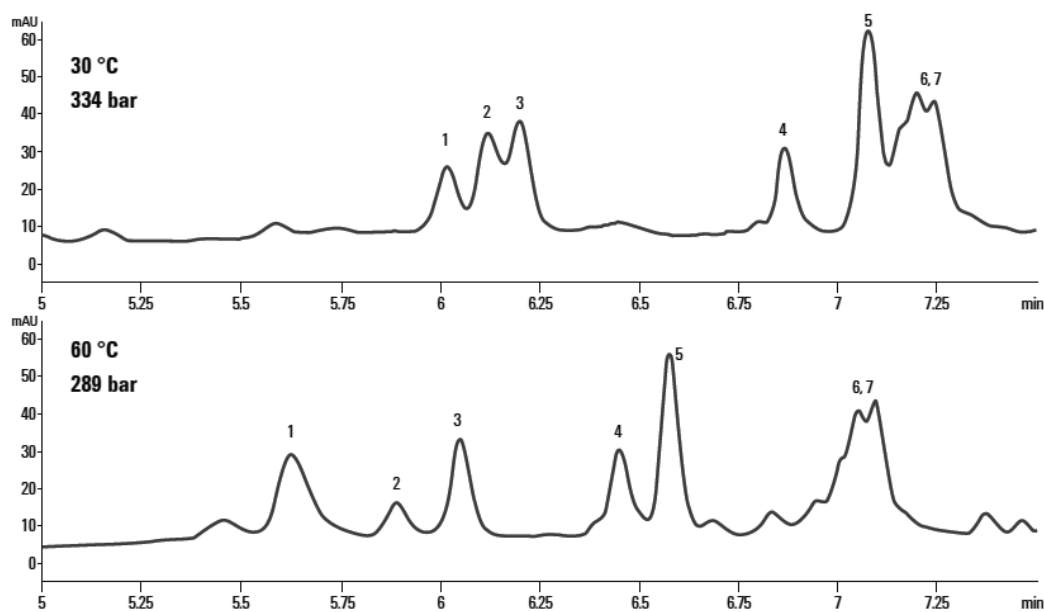


图5 肌红蛋白胰蛋白酶酶解物的梯度分离，不同温度下的分离结果比较。5.0-8.0 min（完整梯度为20 min），其中使用了2.1 x 150 mm AdvanceBio肽谱分析色谱柱（安捷伦部件号653950-302）两种分离均采用水（含1.0% TFA）/乙腈（含0.08% TFA），线性梯度，0.3 mL/min，215 nm，使用Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统。上图为在30 °C 温度下分析所得，下图为在60 °C 温度下结果

梯度坡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6 证实了选择性随着梯度坡度的改变而改变。采用肌红蛋白胰蛋白酶多肽酶解物，梯度运行时间为15min（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。

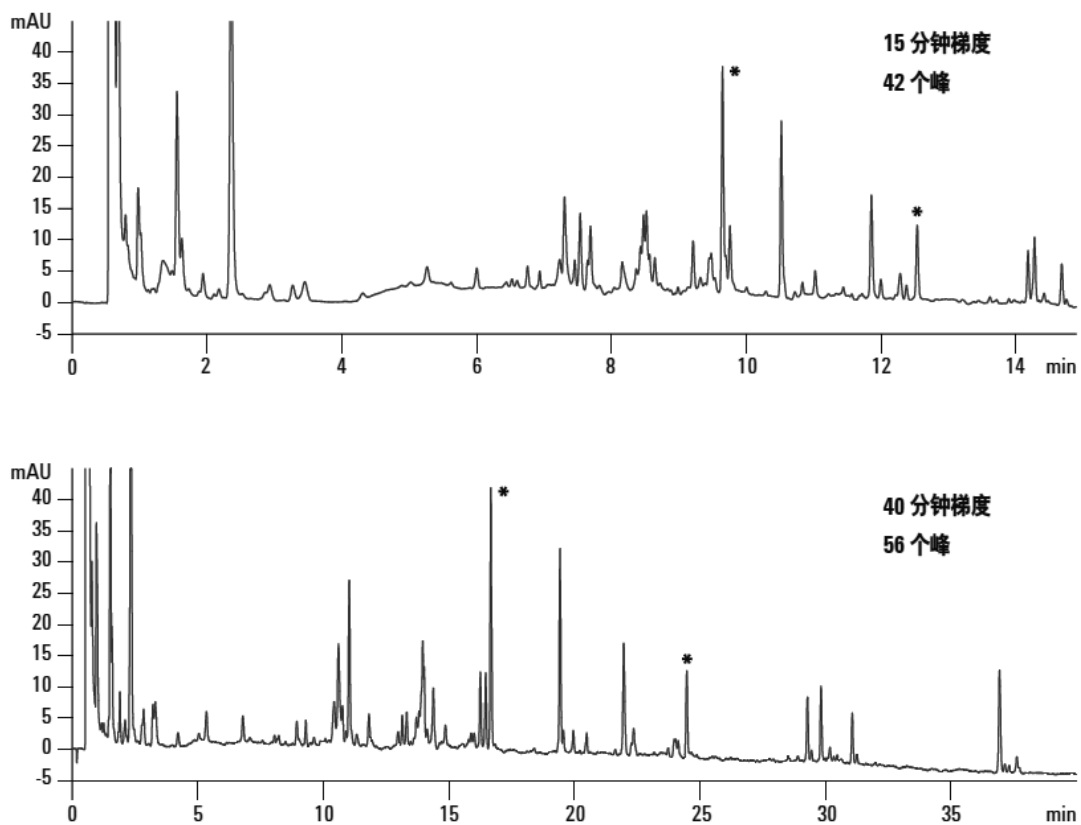


图6 肌红蛋白胰蛋白酶消化物的梯度分离，不同梯度的比较。采用2.1 x 150 mm AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（安捷伦部件号653950-302），利用Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相系统，条件为水（含1.0% TFA）/乙腈（含0.08% TFA），线性梯度，0.6 mL/min，50 °C。上图在15 min 内完成，而下图在40 min内完成。两张色谱图中标星号代表相同色谱峰

(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)。如果只希望略微增加分离度,而不在乎分析时间的增加,简单的做法就是降低流速。但是,如需大大增加分离度,通常的方法是增加柱长。图7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。

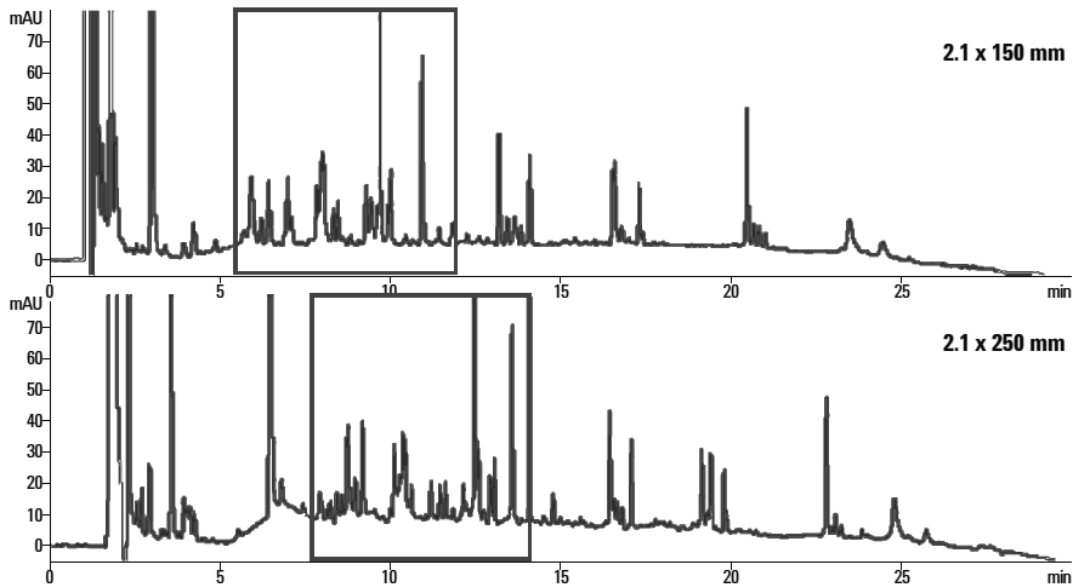


图7 柱长对分离度的影响,采用肌红蛋白胰蛋白酶消化物(安捷伦部件号651750-902)进行肽谱对比红色高亮区域为等效的分离区域,用来强调分离度和峰形。分离采用Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱,2.1 x 150 mm(安捷伦部件号651750-902),利用Agilent 1260 Infinity生物惰性四元液相色谱系统,条件为水(含1.0% TFA)/乙腈(含0.08% TFA),线性梯度,30 min内B由10%增加至60%,流速0.3 mL/min,45 °C

四 其他注意事项

1 低蛋白过滤器

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。

2 试剂和设备

所需项	示例
碳酸氢铵，试剂级	西格玛产品目录号A-6141
二硫代苏糖醇(DTT)，>99+%	西格玛产品目录号D-5545
碘乙酰胺(IAM)，97%	西格玛奥德里奇产品目录号I-670-9
三氟乙醇(TFE)，99+%	西格玛奥德里奇产品目录号T63002-100G
胰蛋白酶（修饰型）	安捷伦蛋白质组学级胰蛋白酶（部件号204310）
水，18兆欧或等效	安捷伦部件号8500-2236
甲酸（分析纯）或三氟乙酸（测序级）	安捷伦部件号G2453-85060
Eppendorf Safe-Lock 微量离心管，无色，非硅化	Eppendorf 部件号022363611（0.5 mL，每盒500个），或部件号022363204（1.5 mL，每盒500个）
微量移液器及枪头：1-1000 µL 范围	
试管加热器/振荡器	Eppendorf Thermomixer
pH 试纸，pH 范围为2.5-4.5 及7.0-9.0	EM Science ColorpHast 试纸，产品目录号700181-2
分析天平	
Bond Elut OMIX 枪头，10 µL（洗脱体积2-10 µL）	1x96 枪头（安捷伦部件号A5700310）；6x96 枪头（安捷伦部件号A5700310K）
Bond Elut OMIX 枪头，100 µL（洗脱体积10-100 µL）	1x96 枪头（安捷伦部件号A57003100）；6x96 枪头（安捷伦部件号A57003100K）

3 小体积多肽纯化

Bond Elut OMIX（10 µL 体积）方法用于多肽酶解物纯化

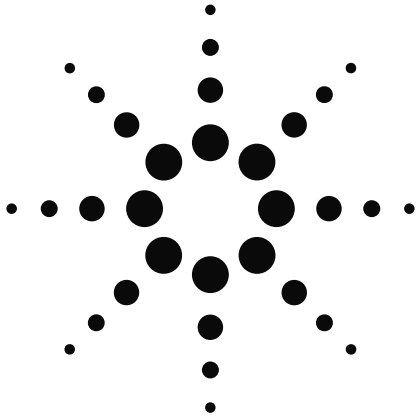
样品预处理	使用2.5% 三氟乙酸(TFA) 溶液调节样品，使TFA 终浓度为0.5%-1.0%
调节及平衡	吸取10 µL 的50% 乙腈(ACN)：水，然后排出溶剂。重复上述操作。吸取10 µL 的1.0% TFA 溶液，然后排出溶剂。重复上述操作
样品应用	吸取最多10 µL 预处理的样品至OMIX 吸头。排出和吸入样品3 至5 个循环，获取最大效率。为提高结合率，最高可用10 个循环
清洗	吸取10 µL 的0.1% TFA 缓冲液，然后弃掉溶剂。重复上述操作
洗脱	LC/MS 或LC/MS/MS 分析：吸取2-10 µL 的0.1% 甲酸或0.1% 乙酸（溶于50-75% 的乙腈或50-75%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

4 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到端工作流程，以确保结果的一致性。

AssayMAP 处理软件变换了酶解、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



糖谱分析

一、糖谱分析

糖蛋白可以参与免疫防御、细胞生长以及细胞与细胞间的粘附，而帮助介导这些功能的糖链具有无数种复杂的结构，因此需要有效的分析技术进行解析。目前存在的蛋白质类药物中90%以上是糖蛋白。例如，许多不同形式的重组免疫球蛋白（如单克隆抗体）被用于多种危险疾病的治疗，如转移性乳腺癌和非霍奇金淋巴瘤。这些糖蛋白药物中含有复杂的寡糖基团，它们的存在与否和分布类型能显著影响生物药物的疗效、药代动力学特性、免疫原性、折叠方式以及稳定性。已经知道某些糖基结构可以导致药物分子聚集从而降低药物的疗效。糖基化的程度和类型与用于抗体生产的表达系统和细胞培养条件密切相关。因此，在整个发酵、纯化和制剂过程中，需要监测蛋白生物制剂中包含的N-连接糖基化结构的类型和相对数量，以确保药物产品的一致和稳定。依据分析目的，可以采用包括核磁共振和气相色谱等多种方法来对糖基化进行表征，具体介绍可参加安捷伦《重组蛋白表征》（5990-8561CHCN）。蛋白质上糖链的分析一般方法是通过酶解去糖基化和衍生化的方法（图1）。该方法使用N-糖苷酶F(PNGase F)，一种酰化酶，将糖蛋白中与天冬酰胺连接(N-linked)的寡糖链的剪切游离出来，随后剪切的糖链衍生化(2-氨基苯甲酰, 2-AB)标记。经衍生化的寡糖可采用液相色谱/荧光检测(HPLC/FLD)、液相色谱-质谱等多种方法分离和鉴定。液相色谱法经常使用亲水作用(HILIC)色谱柱分离糖链。在这一流程中，需要注意的是整个流程的质量控制以及色谱柱的选择。糖谱分析的样品前处理过程比较繁琐和费时，虽然已有商品化的试剂盒可供使用，使用混合糖标作为对照来监控前处理过程还是值得推荐的。在色谱柱的选择方面，由于寡糖组成的复杂性，需要在保证分离度、重现性的前提下尽量缩短分析时间。基于以上需求，安捷伦将高柱效填料技术(亚二微米与壳核技术)与高选择性的HILIC糖谱专用固定相结合在一起，开发出了糖谱分析专用柱。

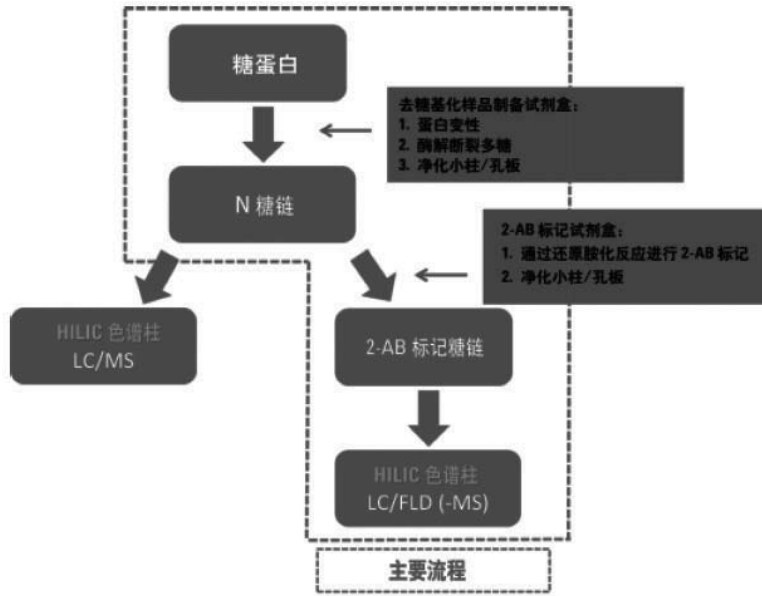


图1. 采用Agilent AdvanceBio 糖谱分析HILIC 色谱柱及荧光检测进行2-AB 标记糖蛋白糖基化分析的工作流程解决方案

二、糖结构以及其异构体

依照美国功能性糖组学协会 (CFG) 的规定使用符号式糖链结构，如图 2 所示。归属的糖链也采用 Oxford 糖链命名法和另一种风格的命名法来描述，后者对于 mAb 糖链更常见。图 2A 中展示了用于描述蛋白质不同糖链结构的糖残基的一般命名法。图 2B 中展示了出现在人 IgG Asn-297 位点上的一些主要糖链结构。

通常 N-糖链有一个核心结构，包括两个 β -D-N-乙酰氨基葡萄糖 (N-acetyl-D-glucosamine, GlcNac) 及三个甘露糖 (Mannose, Man) 单元。IgG Fc N-糖链主要为二分支复合型结构，部分经核心岩藻糖糖基化（例如 FA2 或 G0F）。

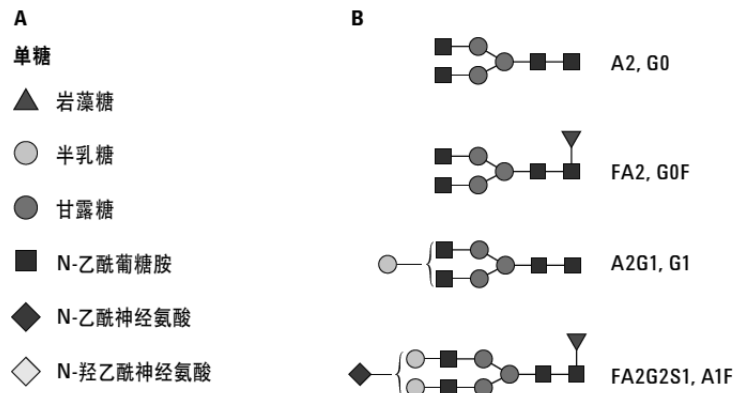


图 2. 糖链结构及异构体。A) 基于功能性糖组学协会的单糖描述，B) 人 IgG 的主要糖链结构

三、样品前处理

3.1 去糖基化步骤

使用 PNGase F 将 N-糖链从单克隆抗体、胎球蛋白和卵清蛋白上裂解下来。此酶可用于从糖蛋白上分离天冬酰胺连接的高甘露糖和复杂的混合型低聚糖，并且保持糖链的完整性。胎球蛋白上有三个 N-糖基化位点（Asn 81、Asn 138 和 Asn-158）以及四个 O-连接位点（Ser-253、Thr-262、Ser-264 和 Ser-323）¹¹。卵清蛋白只有一个糖基化位点，而 mAb 有两个糖基化位点。需根据 N-糖基化位点的数量调整 PNGase F 的用量。蛋白的去糖基化过程依据说明书，在 37 °C 下反应 3 小时。然后停止反应，对样品真空干燥以便进一步处理。

3.2 利用 2-AB 标记进行荧光检测及样品纯化

根据实验步骤使用 2-氨基苯酰胺对干燥的糖链样品进行标记，在 65 °C 下反应 3 小时。标记过程完成后，根据说明书使用 HILIC 纯化小柱对样品进行纯化。纯化步骤完成后，对样品进行真空干燥，并采用超纯水:乙腈30:70 (v/v) 复溶以便分析。

3.3 样品与前处理试剂盒

单克隆抗体为大鼠抗 DYKDDDDK 标记抗体。胎球蛋白和卵清蛋白均为市售商品。去糖基化试剂盒以及 2-AB 标记试剂盒安捷伦均已商品化。

四、色谱柱选择以及色谱条件

4.1 色谱柱选择

如同反相色谱一样，亲水相互作用色谱指的是一种分离机理或分离模式，从裸硅胶到硅胶键合两性离子都可以用作 HILIC 的分离模式，在长期的实践中酰胺键合硅胶已经成为糖谱分析公认的固定相。近年来，主要的改进和提高是将亚 2 微米和壳核技术用于改进传质和提高柱效，提高色谱分辨率和缩短分析时间。此外，优化固定相键合工艺，提高选择性，增加关键物质对的分离也引起了厂商的关注。安捷伦 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，这是一种亚 2 μm HPLC 色谱柱，耐压达到 1200 bar，具有新型 HILIC 酰胺化学技术，用于高通量糖基化分析。与常规的 HPLC 色谱柱技术相比，该色谱柱及相应方法可增强多糖的分离，且减少了 40% 的洗脱时间，是 UHPLC 分析的首选，能提供最高的分离度和最高效的分离。对于常规 HPLC 仪器，由于压力限制，可使用安捷伦 2.7 μm 表面多孔层高效分离色谱柱，能够在常规仪器的情况下，达到尽可能的快速和高效分离。

4.2 流动相条件

色谱柱：Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，2.1 × 150 mm，1.8 μm（部件号 859700-913）

仪器：Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统，配备荧光检测器

流动相：缓冲液 A 为 100 mM 甲酸铵水溶液，pH 为 4.5，缓冲液 B 为乙腈。所有试剂均为液相色谱级。新制超纯水产自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

表 1 色谱条件

	抗体	胎球蛋白	卵清蛋白
初始流速	0.5 mL/min	0.5 mL/min	0.5 mL/min
梯度	0 min 85% B 5 min 75% B 35 min 64% B 40 min 50% B 42 min 50%B, 流速 0.5 mL/min 42.01 min 50%B, 流速 0.25 mL/min 43 min 0% B 48 min 0% B 50 min 85% B 50.01 min, 流速 0.25 mL/min 51 min, 流速 0.5 mL/min	0 min 75% B 45 min 50% B 47 min 40% B, 流速 0.5 mL/min 47.01 min, 流速 0.25 mL/min 49 min 0% B 51 min 0% B 51.01 min 75% B, 流速 0.25 mL/min 52.00 min, 流速 0.5 mL/min	0 - 6 min 85% B 10 min 80% B 60 min 70% B 65 min 50% B, 流速 0.5 mL/min 65.01 min 50%B, 流速 0.25 mL/min 68 min 0% B 73 min 0% B 74 min 85% B, 流速 0.25 mL/min 75.00 min, 流速 0.5 mL/min
停止时间	51 min	52 min	75 min
后运行时间	20 min	20 min	20 min
进样量	5 μL	1 μL	1 μL
温控自动进样器	5 °C		
柱温	60 °C		
FLD	激发波长 260 nm, 发射波长 430 nm		
峰宽	> 0.013 min (响应时间为 0.25 s) (37.04 Hz)		

五、典型糖谱及其解析

5.1 分析源自单克隆抗体的 N-糖链

图 3 中显示了 mAb N-糖链的分离情况。mAb糖链模式实现了最佳分离，所有主要的 N-糖链均得到分离并可积分。根据峰面积百分比的计算结果进行了相对定量分析。通过设置 1260 Infinity 荧光检测器的最佳糖链检测波长，可实现标记后糖链的高强度响应，其中激发波长为 260 nm，发射波长为 430 nm。根据观察到的母离子质量和相关的 MS/MS谱图，可将得到的 HILIC 糖链图谱归属至相应的糖链结构。将母离子质量输入 Expsy(<http://web.expasy.org/glycomod/>)的 GlycoMod 工具中以查找相关糖链结构。根据实验测得的质量，GlycoMod 可预测已标记或未标记的可能糖链结构。用于糖链归属和糖链结构设计的另一款有用的工具是 GlycoWorkbench，本实验中将其用于制作糖链结构动画。作为该工作流程的一个实例，我们选择了母离子质量为 1026.88 [z = 2] (峰 7 和 8) 的 N-糖链 FA2G1Sg1。针对此质量，糖链数据库中

存在两种最可能的糖链结构 (图 4)

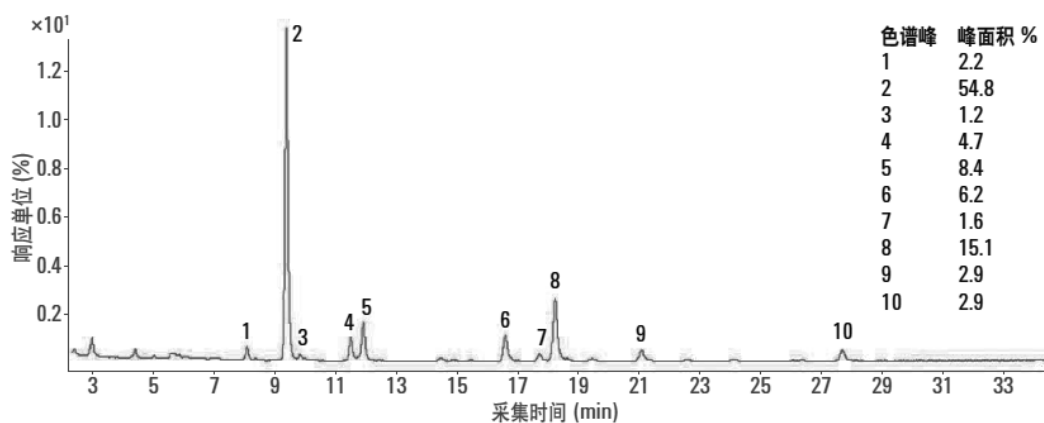


图 3. 以 260 nm 为激发波长进行 mAb N-糖链分离的荧光检测

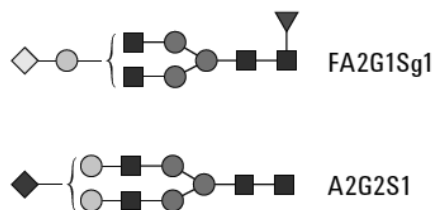


图 4. 对于 1026.88 [z = 2] 的母离子质量，两个最可能的糖链结构 FA2G1Sg1 和 A2G2S1

随后利用 MS/MS 数据来区分这两种潜在的结构。图 5 展示了 N-糖链 FA2G1Sg1 的碰撞诱导解离 (CID) MS/MS 谱图。这个 MS/MS 数据确定了一种唾液酸, 即 N-羟乙酰神经氨酸 (NeuGc) 的存在, 它在 m/z308 (NeuGc) 和 m/z 673 (与半乳糖和 N-乙酰氨基葡萄糖连接的 NeuGc) 处的碎片离子有强信号。同时, 在 m/z 292 或 m/z657 处未产生信号, 这表明不存在 N-乙酰神经氨酸 (NeuAc)。因此, 这些结果有力地证明了此糖链结构为含有 NeuGc 的 FA2G1Sg1, 而不是含有 NeuAc 的 A2G2S1。支持将一个结构归属为含有核心岩藻糖的原因是 MS/MS 数据在 m/z

512 或 m/z 350 处没有强碎片离子信号, 而如果岩藻糖位于外臂区, 则这两处应存在信号。所有其他峰都通过分析其 MS 和 MS/MS谱图, 以类似的方式进行归属。归属结构列于表 1 中。结果表明, mAb 主要含有核心岩藻糖基化的复杂糖链, 包括一些带有 NeuGc 的结构。这些发现一般适用于由大鼠细胞产生的 IgG 抗体。正常情况下人糖蛋白中不含 NeuGc, 并且这一结构不适合用于治疗性蛋白。人糖蛋白中的唾液酸通常是 N-乙酰神经氨酸。

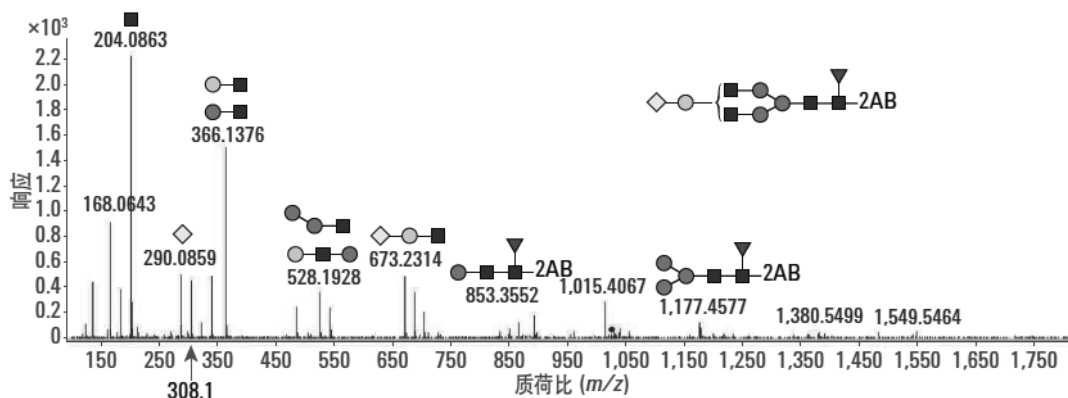


图5. FA2G1Sg1 的 MS/MS 谱图 - 1026.88 [z = 2] - 1931.6876 Da

表2大鼠单克隆抗体质量和 2-AB 糖链结构归属概述

色谱峰	Oxford	生物制药 mAb 风格	检测到的质量 (Da)	结构
1	FA1	GO - GlcNAc	1,380.537 [z=1]	
2	FA2	GOF	792,3130 [z=2]	
3	M5	Man5	1,355.5 [z=1]	
4,5	FA2G1	G1F	873.34 [z=2]	
6	FA1G1Sg1	G1FSg1-GlcNAc	925.34 [z=2]	
7,8	FA2G1Sg1	G1FSg1	1,026.88 [z=2]	
9	FA2G2Sg1	Ag1F	1,107.9135 [z=2]	
10	FA2G2Sg2	Ag2F	1,261.446 [z=2]	

5.2 胎球蛋白和卵清蛋白中的抗体分析

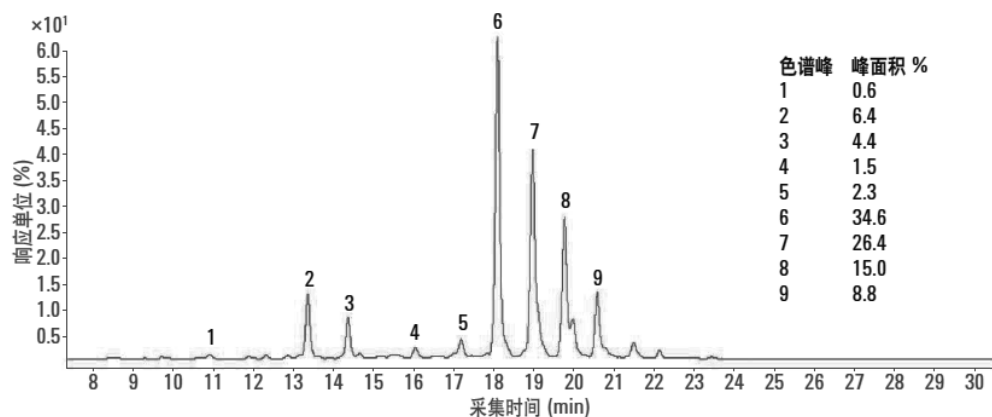


图 6. 2-AB 标记胎球蛋白的分离

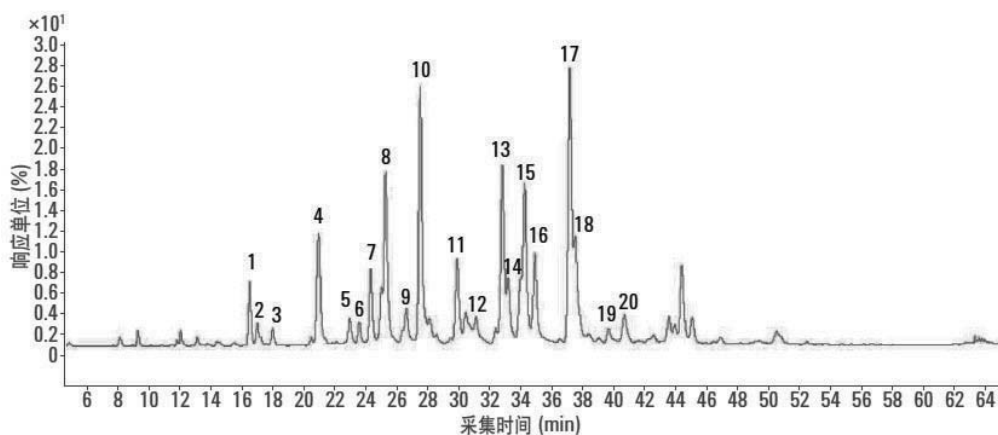


图 7. 卵清蛋白释放的 N-糖链的分离情况

实验通过 PNGase F 将胎球蛋白和卵清蛋白这两种蛋白质中的 N-糖链裂解下来，以 2-AB 进行衍生化反应并采用配有在线 MS 的 HILIC/UHPLC 进行分析。图 6 展示了牛胎球蛋白 N-糖链的分离情况。此糖基化谱图主要展示了含 NeuAc 的复杂非岩藻糖基化二分支或三分支糖链。图 7 展示了卵清蛋白糖链的分离情况。卵清蛋白仅在一个位点 (Asn-292) 上发生 N-糖基化，但是与该位点相关的糖基化模式非常复杂。由于该糖链谱图的复杂性，需要调整梯

度并延长分离时间，以实现更高的分离度。AdvanceBio 糖谱分析色谱柱的高性能可以实现对 50 多个峰的分离，同时具有良好的信噪 (S/N) 比。与相对简单的 mAb 糖链模式相比，其他两种糖蛋白存在更多种类的糖链结构。与 mAb 糖链相反，在卵清蛋白中没有检测到岩藻糖基化糖链，与先前报道的鸟类卵糖蛋白未经岩藻糖基化的结果吻合。

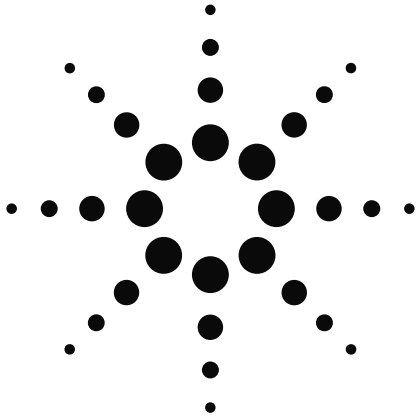
六 注意事项

6.1 柱平衡在HILIC 模式中非常重要，确保分析重现性每针之间最少需要2-5分钟的平衡时间（约4-10倍柱体积），如出现保留时间不稳定，需要相应增加平衡时间。

6.2 在HILIC 模式中，水是强洗脱溶剂，样品溶液中水的比例过高时会导致峰拖尾。通常用水溶解后，还要用尽可能多的乙腈稀释。

6.3 柱外体积和延迟体积对分离有影响，特别细内径柱。如出现分离度问题时，可尝试减少柱外体积和优化延迟体积。

6.4 建议使用参考物质对分析质量进行控制，阶梯糖标样（Dextran ladder standards）用于校正洗脱时间和计算当量GU值；IgG N-linked glycan标样可用于检查系统适用性和样品前处理和标记的效率。



亲和色谱测定抗体滴度

一、单克隆抗体（MAb）滴度测定

在生物制药行业，单克隆抗体生产的下游加工过程通常包括三步色谱纯化：捕获、中间纯化和精制纯化。Protein A 是金黄色葡萄球菌的免疫球蛋白-Fc (IgG)受体，对多克隆和单克隆IgG 有强亲和性，由于具有高选择性和高回收率，可以一步完成从复杂混合物中分离IgG，嵌合Protein A 受体的色谱介质常被用于IgG 的制备和生产规模的纯化。Protein A 色谱柱也可以开发为分析型，在投入高成本进行制备以及使用大量Protein A 柱之前，若想要对细胞培养上清液中的单克隆抗体滴度和产量进行监测，就需要通过小型（分析型）的处理工序来确定单克隆抗体的滴度，以便确定单克隆抗体产品的最佳采集时间。采用预填充的Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱可以进行快速捕获细胞上清液中的单克隆抗体测定滴度。

二、滴度测定方法

1、原理

在近中性缓冲液条件下，Protein A与单抗选择性结合，细胞上清液中的其他成分在死时间流出后，改变流动相条件至酸性将与Protein A 结合的单抗洗脱出来。 Agilent Bio-Monolith Protein A 生物整体柱是一种高效整体柱，该色谱柱由一个整体的短棒状圆盘组成，其中有连续通道，无孔隙，无死体积。这种棒状结构消除了扩散，可快速传质，尤其适用于生物大分子的分析。其经过特殊设计，具备连续短聚合床的所有优点。色谱柱预装于专用的不锈钢外壳中，能够方便快速地与HPLC 仪相连接。

2、样品以及细胞上清液

单抗样品：CHO 细胞衍生的人源单克隆抗体(IgG1) 购自Bio Creative Labs。

细胞上清液：按照制造商推荐的方案制备大肠杆菌上清液。简而言之，该试剂盒包含Cellytic B 细菌细胞裂解试剂(500 mL)、溶菌酶溶液(10 ×1 mL)、核酸酶（25000 个单位）和蛋白酶抑制剂混合物(5 mL)。称取1.0 g 细胞浆，然后与10 mL Cellytic B 试剂、0.2 mL 溶菌酶、0.1 mL 蛋白酶抑制剂和500 个单位的核酸酶进行混合。对该混合物短暂涡旋混合10 min（手动或使用振荡器），以确保有效提取可溶性蛋白。然后5000 g 离心10 min，使所有不溶物沉淀。小心地将细胞碎片（管底的沉淀物）上方的可溶性蛋白

组分（上清液）移出。使用Bradford 蛋白检测法估算上清液的蛋白浓度。所测得蛋白浓度为40 mg/mL。

单抗+细胞上清液：40mg/mL 大肠杆菌上清液中加入2.5mg/mL 纯化的人源化IgG1。混合后，使用流动相A（20 mM 磷酸钠缓冲液，pH 7.4）按1:1比例进一步稀释此混合物，最终浓度为1.25 mg/mL IgG1 和20 mg/mL 大肠杆菌上清液。

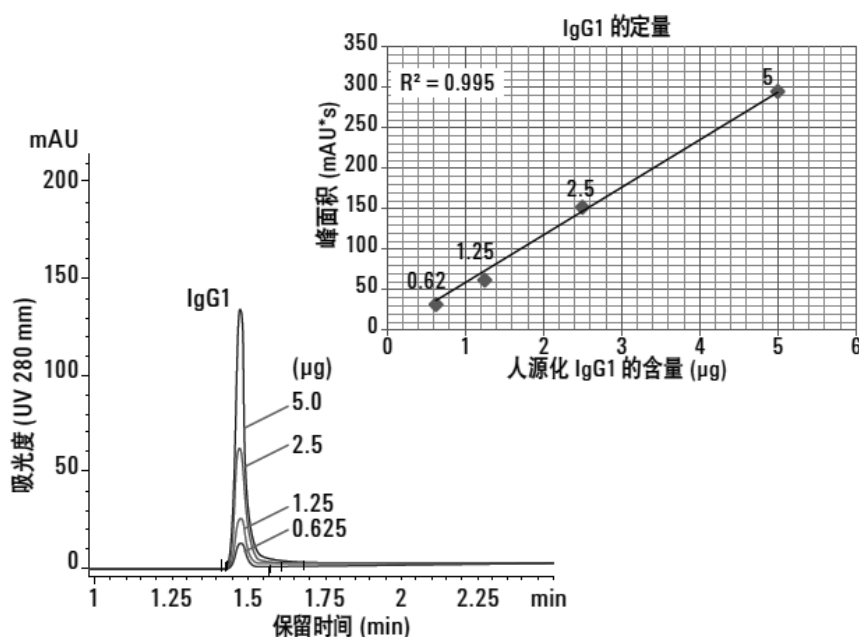


图1. Agilent Bio-Monolith 蛋白质A 色谱柱定量分析单克隆抗体

3、流动相以及梯度

洗脱液A：用于平衡、结合、再平衡。此缓冲液含20 mM 磷酸钠缓冲液(pH 7.4)。制备1 L 的20 mM 磷酸钠缓冲液(pH 7.4)，配制过程如下：称取3.1 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和10.9 g Na_2HPO_4 （无水）溶解于蒸馏水，定容至1 L，即可获得0.1 M (100 mM) 磷酸钠缓冲液（pH 7.4，25 °C）储备液，此缓冲液可在4 °C 下存放长达1 个月。使用去离子水按1:5 比例稀释此储备液（取200 mL 储备液并加入800 mL 去离子水），即可获得20 mM 磷酸钠缓冲液（pH 7.4）。

洗脱液B：用于蛋白质洗脱，为pH 2.8 的0.1 M 柠檬酸。要制备1 L 柠檬酸缓冲液，称取21 g 一水合柠檬酸溶解于大约600 mL 的水中，稍微搅拌，然后使用1 M HCl 将pH 值调节至2.8。最后，使用去离子水稀释并转入1 L 容量瓶，定容至刻度。

梯度条件

色谱柱: Agilent Bio-Monolith Protein A (部件号5069-3639)

样品: 人源化IgG1 和大肠杆菌裂解液

洗脱液: A) 20 mM 磷酸钠, pH 7.4
B) 0.1 M 柠檬酸, pH 2.8

进样: 参见色谱图

流速: 1.0 mL/min (除非另有说明)

梯度:

时间(min)	% B
0	0
0.5	0
0.6	100
1.7	100
1.8	0
3.5	0

柱温: 25 °C

检测器: 紫外, 280 nm

系统: Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统

三、方法验证以及注意事项

1、标准曲线-定量单克隆抗体滴度

准确定量单克隆抗体的滴度和产量有助于确定细胞裂解液(上清液)中的单克隆抗体含量并确定采集时间。这是生产抗体非常关键的步骤。为了考察Bio Monolith Protein A 色谱柱在定量IgG1方面的能力,将不同含量(μg)的纯化IgG1 进样至色谱柱。图1所示为峰面积与人源化IgG1 的进样量(介于0.625-5 μg)绘制的IgG1 线性曲线。该线性校准曲线为标准曲线。相关系数表明, Bio Monolith Protein A 色谱柱能够用于定量分析所收集的细胞培养基中不同浓度范围的单克隆抗体。同时还在该色谱柱上上样0.312 μg 人源化IgG1, 进样量为0.312 μg 时的信噪比(S/N) 大于1:1。最大上样量大约为400-500 μg IgG。

2、专属性

单克隆抗体纯化的第一步是确定该抗体是否存在于细胞裂解液(上清液)中。这要求色谱柱必须对单克隆抗体具有极强的特异性亲和作用,并且只保留和定量分析单克隆抗体。图2 可明显看出 Bio-Monolith Protein A 色谱柱的特异性。当上清液(大肠杆菌裂解液的蛋白质)不含单克隆抗体(IgG1) 时,图A中的色谱图显示所有蛋白质在色谱柱上无保留。上清液的所有蛋白质均从色谱柱流出。图A 中的基线延长进一步证明了这一点。

图B 显示色谱柱仅捕获和分离单克隆抗体(添加IgG1 的大肠杆菌上清液)。利用以上的标准曲线(图1)预先测定和再确认IgG1 的含量,约为1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。Bio Monolith Protein A 色谱柱仅捕获单克隆抗体,该抗体在约1.4 min 时被洗脱。

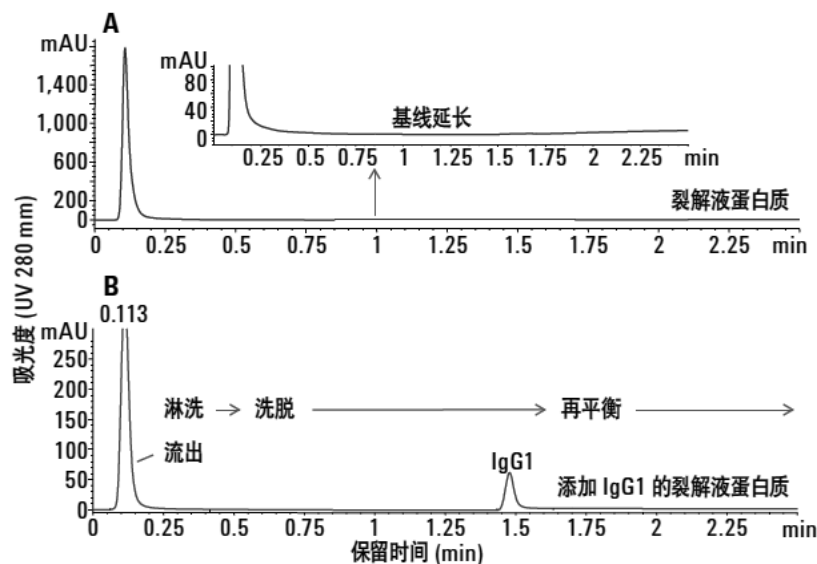


图2. Agilent Bio-Monolith 蛋白质A 色谱柱仅快速捕获所收集的添加IgG1 细胞培养液中的IgG1。图A, 大肠杆菌细胞裂解上清液; 图B, 加IgG1 的大肠杆菌细胞裂解上清液。进样: 2 μL (含1.25 mg/mL IgG1 的20 mg/mL 大肠杆菌上清液)

3、流速对IgG1 结合、峰面积和柱反压的影响

采用三种不同的流速（1.0、1.5 和2.0 mL/min）考察流速对IgG1 结合以及色谱柱性能的影响（图3）。在本研究中，IgG1 和大肠杆菌蛋白的进样浓度为原来的两倍，以便于观察变化。提高流速对IgG1 与色谱柱结合的影响微乎其微（表1）。在不同流速下，未结合蛋白（大肠杆菌蛋白）的百分比、相对峰面积以及结合的IgG1 相对峰面积保持不变（表1）。

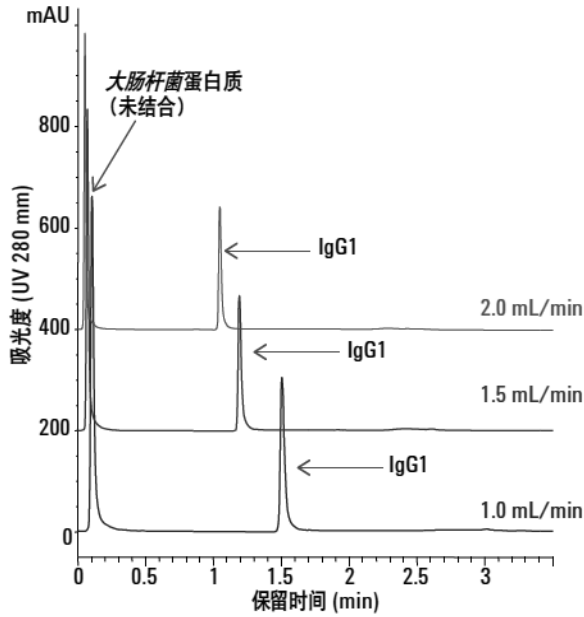


图3. 考察IgG1 在几种不同流速下与Agilent Bio-Monolith 蛋白质A 色谱柱的结合能力。本研究加大进样量以便于观察色谱图变化以及信号积分

表1 的数据也表明提高流速会使色谱柱反压呈线性增长（图4）。通常来说，Bio-Monolith Protein A 色谱柱的推荐操作流速为1.0 mL/min，而此色谱柱的最大反压为72 bar。在这种特殊的仪器上，当流速为1.0 mL/min 时，色谱柱反压为32 bar。当流速提高到2.0 mL/min 时，色谱柱反压增加到68 bar。如上所示，最大反压值对IgG1 与色谱柱的结合的影响极小。整体柱的贯通孔的特殊结构有助于降低柱压和提高传质，因此可以在更高的流速下运行，以提高分析速度。

表1. 流速与未结合蛋白和IgG1 相对峰面积的关系

流速 (mL/min)	未结合蛋白峰面积 (mAU*s)	IgG1 峰面积 (mAU*s)	未结合蛋白相对峰面积 (%)	IgG1 相对峰面积 (%)	压力 (bar)
1.0	1230	738	63	37	32
2.0	840	492	63	37	47
3.0	636	363	64	36	68

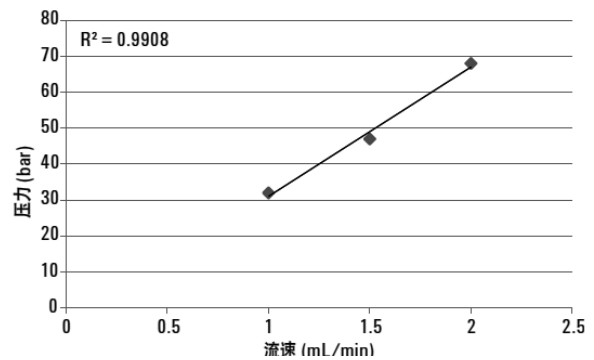


图4. 流速与反压的关系图。当色谱柱流速呈线性增加时（1.0、1.5 和2.0 mL/min），色谱柱反压也随之线性增加

4、耐盐性—含有不同盐浓度的细胞培养上清液与IgG1的混合物

细胞培养上清液往往含有用于保持蛋白稳定的氯化钠(NaCl) 和氯化钾(KCl) 等中性盐。通常所使用的盐浓度介于100-200 mM 之间。然而，在许多纯化过程（包括亲和与离子交换方法）中，盐是一种强洗脱溶剂。在一些方法中，仅仅50 mM 的NaCl 也能将结合的蛋白质从色谱柱上洗脱下来，从而阻止色谱柱保留待分离的蛋白质。因此，讨论Bio-monolith Protein A 亲和色谱柱对一定含量的盐具有耐受性很重要。本实验通过将已加入IgG1 的上清液溶解到0-200 mM 的NaCl 中来说明该色谱柱的耐盐性。图5 所示

为加入到0、150 和200 mM NaCl 中的样品的分析数据。结果表明，Bio Monolith Protein A 色谱柱可耐受盐浓度较高的样品，且不影响峰形。此外，在这三种盐浓度下，峰面积的变化不明显，可忽略不计（表2）。

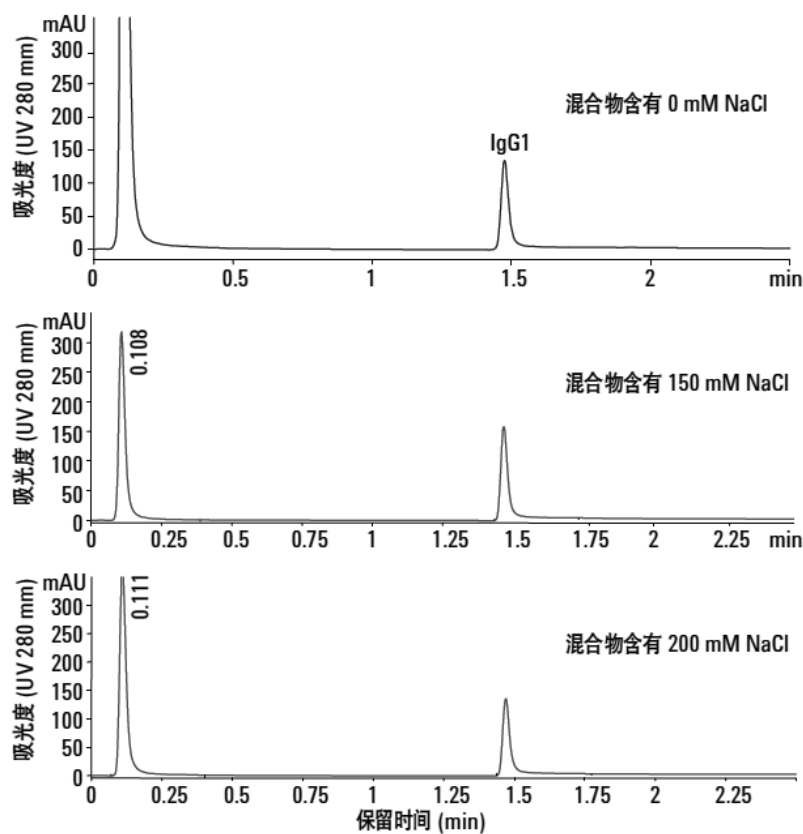


图5. 含不同盐浓度的IgG1 和大肠杆菌上清液样品，将其进样至 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱中以考察此柱分析含盐样品的性能。进样：2 μ L（含1.25 mg/mL IgG1 的20 mg/mL 大肠杆菌蛋白质溶液）

表2. 含盐样品对色谱柱性能的影响极低

NaCl (mM)	IgG1 的峰面积(mAU*s)
0	293
150	312
200	296

5、不同洗脱缓冲液的影响

图6 的数据显示了洗脱缓冲液对Bio-Monolith 蛋白质A 色谱柱的影响。从数据可以清楚看出，使用不同的酸性缓冲液均能洗脱出IgG1 峰。观察IgG1 峰的峰高和保留时间。使用的盐酸、甘氨酸、柠檬酸和乙酸的pH 值均为2.8，浓度也均为100 mM。尽管利用这些洗脱缓冲液得到的保留时间不同，但却能获得非常一致的IgG1 色谱峰高。除100 mM乙酸以外，采用其它洗脱缓冲液得到的峰形和峰宽也非常相似。当乙酸缓冲液浓度增加至500 mM

时，得到的峰高和峰形足以与其它洗脱缓冲液得到的结果相媲美。因此，如果要使用乙酸缓冲液，则需要先确定该缓冲液的浓度。亲和作用力从微观作用力的角度来看是静电、氢键、疏水相互作用、配位等作用力的组合，酸性条件是将抗体从Protein A 上洗脱的必要条件，此外离子强度和所用盐的类型也对洗脱的峰形和保留有一定影响。

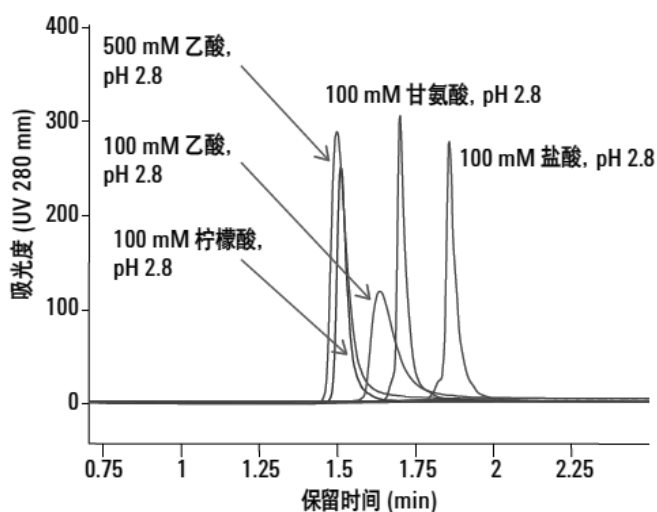


图6. 不同洗脱缓冲液对IgG1 峰高和峰形的影响。进样：4 μ L (含 1.25 mg/mL IgG1 的20 mg/mL 大肠杆菌蛋白质溶液)

6、重现性—原位清洗之前进样300 次

图7的数据显示了连续300次进样的结果，以此检验色谱柱的重现性。结果表明，原位清洗之前进样300 次后，保留时间、峰面积和峰宽均保持不变，而且也不影响色谱柱与IgG1 的结合能力以及分离性能。注：每20 次进样后，利用三次进样（不带样品）作为冲洗步骤，以便尽可能多地将残留物从色谱柱上洗脱（无样品注入时使用上述运行条件）。冲洗数据（未示出）表明，20 次进样后色谱柱上的残留物数量可忽略不计。

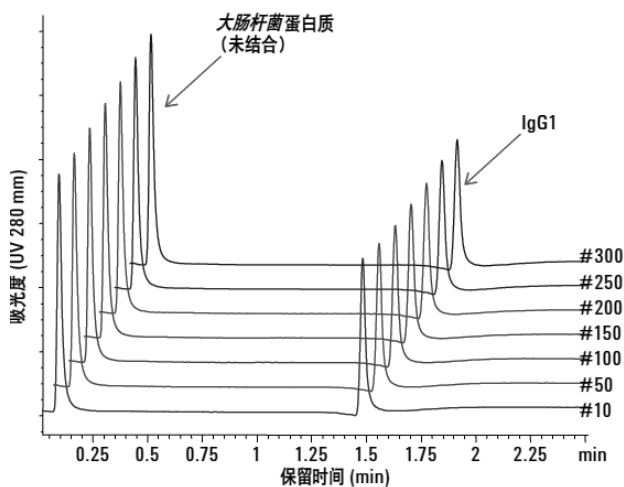


图7. Agilent Bio-Monolith 蛋白质A 色谱柱在原位清洗之前进样300 次的重现性

注：每20 次进样后，利用三次进样（不带样品）作为冲洗步骤

7、再生和原位清洗

图8A 显示未结合的蛋白与IgG1 的峰均有所变差。峰的保留时间也发生漂移。这表明需要对色谱柱进行再生处理。图8B 显示根据推荐的程序进行清洗后色谱柱的性能得到了恢复。简单来说，可使用20 倍柱体积的缓冲液以0.5 mL/min 的流速冲洗色谱柱以实现再生，例如含1.0 M NaCl 的磷酸钠缓冲液（pH 7.0 至8.0）。该色谱柱应当使用低pH 溶液（例如1.0 mM 盐酸或1.0 M 甘氨酸-盐酸，pH 2.5）以0.5 mL/min 的流速进行冲洗。然后再使用10 倍柱体积的去离子水冲洗并使用20 倍柱体积的缓冲液A（20 mM磷酸钠缓冲液，pH 7.4）重新平衡，之后才能开始下一次进样。有些情况下，仅仅对整体柱进行简单的再生是不够的。样品分子可能不能完全从色谱柱上洗脱，或者甚至有可能沉淀在色谱柱上。这类污染物沉积在整体柱上，可能导致分离度和键合能力的降低、反压升高，或使色谱柱完全堵塞。因此，必须根据样品中存在的污染物类型设计特殊的原位清洗程序。表3 给出了适当的清洗程序。

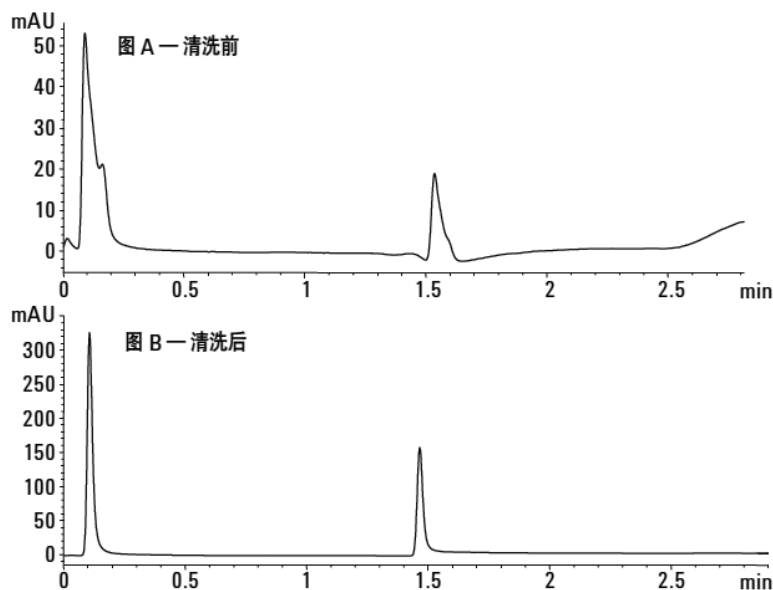
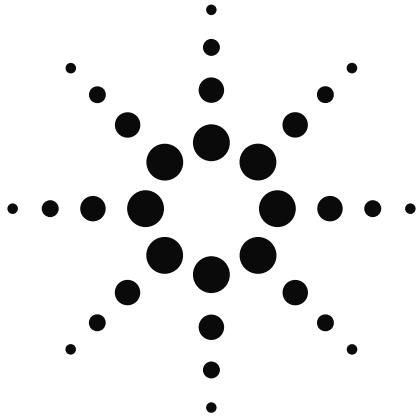


图8. A 图所示为Bio Monolith 蛋白质色谱柱清洗前的色谱图；B 图显示清洗后色谱性能得到恢复

表3. 推荐的原位清洗程序。注：清洗程序的第一步应当以0.2-0.5 mL/min 的流速反向冲洗色谱柱，从而防止污染物进一步进入色谱柱的其它部位

步骤	溶液	柱体积倍数
1	0.1 M NaOH	10 到20
2	去离子水	10 到20
3	0.5 M磷酸钠缓冲液（浓缩的结合缓冲液）	10 到20
4	使用结合缓冲液重新平衡色谱	50



体积排阻色谱分析蛋白质聚集体和降解产物

一. 关于体积排阻色谱

体积排阻色谱 (Size Exclusion Chromatography, SEC) 是采用多孔固定相, 根据固定相孔隙的大小与待测物样品分子的尺寸大小间的相对关系而进行分离的分析的方法。

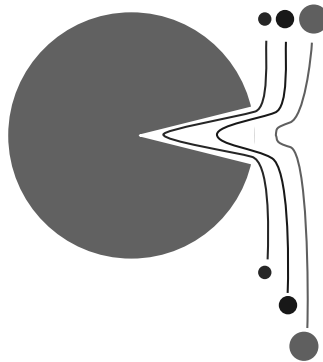


图1 不同大小的分子的排阻过程

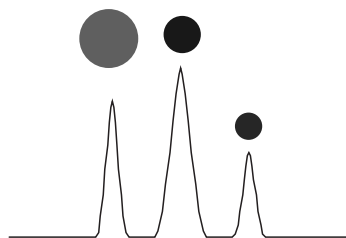


图2 不同大小的分子的洗脱顺序

体积排阻色谱具有以下特点:

1. 分离主要取决于固定相的孔径大小与被分离组分分子尺寸之间的关系, 与流动相的性质没有直接的关系。图1显示了不同大小的分子的排阻过程。
2. SEC中采用的色谱固定相是多孔性填料, 仅允许直径小于孔径的组分进入。这些孔对于溶剂分子来说是相当大的, 以致溶剂分子可以自由的扩散出入。样品中的大分子不能进入孔洞而完全被排阻, 只能沿固定相颗粒之间的空隙通过色谱柱, 首先从柱中被流动相洗脱出来; 中等大小的分子能进入填料中一些适当的孔洞中, 但不能进入更小的微孔, 在柱中受到滞留, 较慢地从色谱柱洗脱出来; 小分子可进入填料中绝大部分孔洞, 在柱中受到更强的滞留, 会更慢的被洗脱出; 溶解样品的溶剂分子, 其分子量最小, 可进入几乎所有孔洞, 因此最后从柱中流出, 从而实现具有不同分子大小样品的完全分离。在分子排阻色谱法中, 溶剂分子最后从柱中流出, 这一点明显不同于其他液相色谱法。如图2所示。
3. 在SEC中, 不同尺寸样品分子的分配系数K总保持在0~1之间。K=0 说明溶质完全被排除在填料孔外, 称为全排斥, 即填料的排斥极限; K=1 说明溶质可完全进入填料孔内, 称为全渗透, 即填料的渗透极限。

目前体积排阻色谱已经被广泛的应用于蛋白质的聚集体和降解产物分析中。

二. 关于蛋白质的聚集体和降解产物分析

重组蛋白质, 包括单克隆抗体, 是相对不稳定的, 并且不总是以

原始构型存在, 或者说会形成聚集体并伴随着相关生物活性的降低。折叠和聚集是受到物理和环境因素的影响的, 所以蛋白表达后, 有存在进一步的构象变化以及聚集水平增加的风险。在生产过程中具有许多处理步骤, 可能使蛋白质发生“变化”, 从而潜在地增加了聚集体的水平。在工艺开发, 制造和质量保证/控制(QA/QC)中, 能够量化的监测聚集水平是必需的。聚集体不仅对于工艺的经济性和产量存在不利的影响, 并且也对药效和毒性存在负面的作用。因此, 以百分比表示的二聚体/多聚体的含量水平是一个关键的指标, 并需要精确、稳定的方法来监测和量化。

对于聚合物的分析, 非常重要的一点是该色谱法不应改变聚合物已经存在于样品中的水平。这意味着一个温和色谱技术是必需的。尺寸排阻色谱采用水溶液作为洗脱剂, 所以是用于聚集体研究的理想的选择, 因为该蛋白不能被变性或通过暴露于有机溶剂中发生聚合。在开发SEC的方法时, 必须小心以确保聚集水平不会被样品制备或色谱的方法所改变。

三. Agilent 用于SEC分析的色谱柱

Agilent的Bio SEC色谱柱能够为生物制药分析提供快速、可靠、准确的性能。这类色谱柱可以很轻松地融入您的工作流程中, 并且为您提供各种孔径和规格选择, 确保能够实现完美分离。

您可以基于分析物和方法参数, 从安捷伦范围广泛的体积排阻色谱柱中, 做出实现完美分离所需要的选择。图3为您提供了常见分子类型实现最佳分离结果的孔径范围的概览。我们建议使用Agilent Bio SEC-3 和 Agilent Bio SEC-5 色谱柱进行初次方法开发。

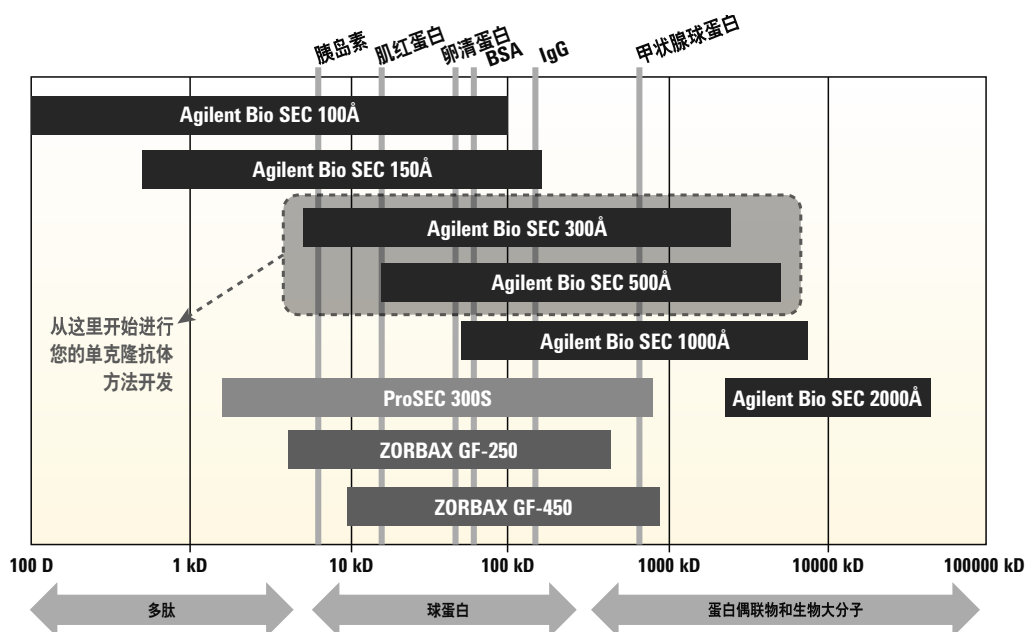


图3 依据分子量范围选择合适的Agilent Bio SEC色谱柱

四. 采用Agilent Bio SEC色谱柱进行聚集体及降解产物分析

聚集体及降解产物分析主要用于工艺开发, 生产以及QA/QC中。

1. 当前客户进行SEC分析, 主要可能遇到以下的难点:

1) 如何获得准确且重现的定量结果-----在SEC分析中, 由于分离度及重现性等方面的因素, 往往不能够获得稳定可靠的结果。因此客户迫切需要一个足够稳定的方法, 以保证准确且重现的定量结果从而可以减少重复分析的次数。

2) 色谱柱寿命不理想——由于色谱柱稳定性不好以及样品带来的污染, 导致色谱柱寿命缩短, 并由此带来分析成本的上升。由于SEC分析通常采用pH近中性(如pH=7)的缓冲溶液进行, 接近某些色谱柱的pH耐受上限, 因此造成色谱柱的硅胶载体发生溶解, 从而柱效下降较快, 寿命较短。

3) 非特异性相互作用——非特异性相互作用的存在通常会导致峰形及分离度变差, 进而影响到准确的定量。通常来说, 非特异性相互作用指的是待测物质分子与色谱柱固定相填料表面发生的一些基于极性, 电荷或者疏水性的相互作用, 这些相互作用并不是我们所希望发生的, 他们会使得峰形变差, 拖尾, 分离度下降。

2. Agilent Bio SEC色谱柱的独特优势

1) Agilent Bio SEC-3色谱柱拥有小粒径的3微米填料颗粒, 能够提供很高的柱效, 300Å的孔径设计匹配大多数蛋白的分子量范围, 从而能够提供对于单体, 二聚体及多聚体的有效分离。小颗粒填料的使用使得客户能够使用相对较短的色谱柱完成分离, 从而大幅度提升时间效率。

2) Agilent Bio SEC-5色谱柱拥有更为广泛的孔径选择, 提供500Å, 1000Å, 2000Å的更大孔径, 以适合分子量更大的多聚体以及结合蛋白的分析。

3) 分析分子量相对较小的蛋白片段或降解产物时, 100Å以及150Å的孔径能够提供更好的分离度。

4) 更为宽广的pH耐受范围, 能够保证更长久的色谱柱寿命。

5) Agilent Bio SEC色谱柱采用了亲水的填料颗粒表面层, 能够有效减少与待测物的非特异性相互作用。

五. SEC分析的要点

在SEC分析中, 所使用的色谱柱与通常我们在其他分离模式如反相色谱中使用的色谱柱不同。一方面, SEC色谱柱通常尺寸较大, 一般常用规格是7.8 x 300 mm, 并伴随相对较低的流速(7.8mm内径色谱柱推荐流量为0.1-1.25 mL/min); 另一方面, 所需要的进样量(进样体积及浓度)也相对较大, 通常样品浓度为1-10 mg/mL, 最大进样量可达柱体积的5%。

1. 色谱柱孔径

色谱柱孔径的选择取决于样品的分子量大小, 这里的分子量大小应当包括样品中含有的所有组分的分子量大小。需要参考色谱柱的说明书以了解色谱柱的分子量适用范围, 并且在所需要的分离区间尽可能地选择孔径较大的色谱柱。图4显示了不同的色谱柱孔径大小对于同一个样品分离结果的影响。从图中可以看出, 对于特定大小的分子, 只有选择合适的色谱柱孔径, 才能够获得满意的分离度。如对于IgG(分子量约150KD), 孔径过小会使得蛋白流出较早, 二聚体与单体之间的分离度较差。

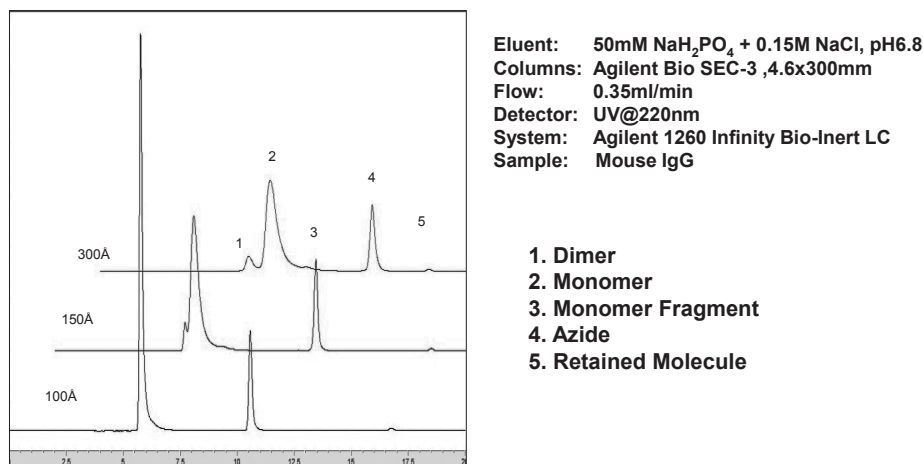


图4 不同色谱柱孔径对分离结果的影响

2. 色谱柱填料粒径

一般来说，色谱柱的柱效与填料的粒径之间存在反比关系，也就是说填料粒径越小，同样规格的色谱柱的柱效就越高。因此，采用小粒径的填料能够获得单位长度更高的柱效，从而使得缩短色谱柱长度成为可能，以此来提升分析速度以及增加样品通量。当采用小粒径填料的色谱柱的时候，需要注意色谱柱的压力。缓慢

升高流速以保护色谱柱。

图5展示了小粒径填料的Bio SEC-3与稍大粒径的Bio SEC-5的分离效果的对比。两者的保留时间类似，但可以明显看到Bio SEC-3色谱柱所给予的更高的分离塔板数以及更多的出峰信息。

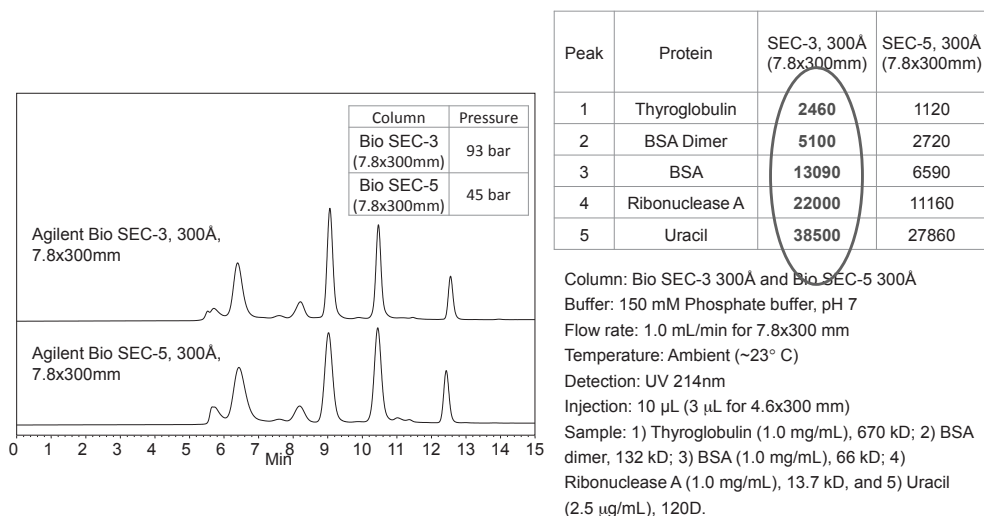


图5 不同填料粒径对于分离结果的影响

3. 流动相组成

在SEC实验中，需要考虑流动相的何种组成能够给出最佳的分离结果，并能够减少非特异性的相互作用。

我们推荐的流动相为0.15mol/L的磷酸钠缓冲溶液，调节pH至7.0。该流动相能够提供合适的pH及离子强度，与生物体液的生理条件比较接近，能够最大限度保持被分析蛋白的正常构象，经过我们的测试，能够在绝大多数应用场合给出出色的分离结果。安捷伦Bio SEC柱填料采用的独特的亲水性膜工艺，能在很大程度上降低由于解离硅羟基而引起的离子交换次级相互作用力，0.15mol/L的缓冲盐浓度已足够抑制离子交换作用力，当然对于碱性蛋白如出现峰形拖尾等问题时，也可以在流动相中使用如氯化钠或硫酸钠等其他盐类，但是需要注意离子强度，高浓度的盐往往会致蛋白与填料的疏水相互作用。此外，分析PEG化蛋白和膜蛋白等强疏水性蛋白时，可以在流动相中添加小分子醇类或者DMSO等以减少疏水非特异性相互作用并改善分离。一般有机相的比例控制在20%以下。需要注意的是，对流动相条件作出调整和改变时，有可能会对二聚体和多聚体的含量造成影响，在方法开发阶段选择生物惰性色谱柱（安捷伦Bio SEC）柱会降低次级

相互作用的影响，通常不需要加入额外的盐类和有机溶液，能够得到真实的数据。

4. 流速

对于不同内径的SEC色谱柱，所使用的适宜流速也不相同。对于Agilent Bio SEC色谱柱，我们建议使用以下的流速：

内径为7.8mm的Agilent Bio SEC色谱柱，建议流速为1mL/min；

内径为4.6mm的Agilent Bio SEC色谱柱，建议流速为0.35mL/min。

在这样的最佳建议流速下，用户可以获得分离度与效率的平衡。

通常来说，在SEC分离中，适当降低流速会获得更好的分离度，但是相应的会花费更多的分离时间。流速降低到一定程度后柱效提高不明显，如需进一步提高分离度，需要采用双柱或多柱串联的方式。

5. 柱温

一般来说，SEC分离会在室温附近进行，如20~30，适当升高温度有时候会有利于分离。Agilent Bio SEC色谱柱能够耐受的最高温度为80。

6. 色谱柱内径

如果样品量比较有限，那么可以考虑选择内径较小的SEC色谱柱，如4.6mm内径的色谱柱。但是请注意尽可能的减少系统体积，以避免低流速下的扩散对分离度的影响。

7. 检测条件

通常紫外 (UV) 检测手段被广泛用于聚集体及降解产物的分离分析，对于绝大多数的蛋白以及多肽，220nm都具有较为明显的吸收。如果所采用的流动相在低波长有吸收干扰，可以考虑采用254nm或者280nm。

UV检测的一个缺点是，有的待测物并不具备紫外的发色团，因此无法采用UV进行检测。示差折光检测器 (RID) 与光散射检测器 (LSD) 是可替代检测手段。特别是光散射检测技术，能够大幅度提升检测灵敏度。能够检测到低浓度的多聚体。图6展示了不同的检测手段在灵敏度上的差异。从图中可以看出，光散射手段 (LS) 对于分子量较大的聚集体的响应更为灵敏，便于检查样品中较低含量的聚集体。

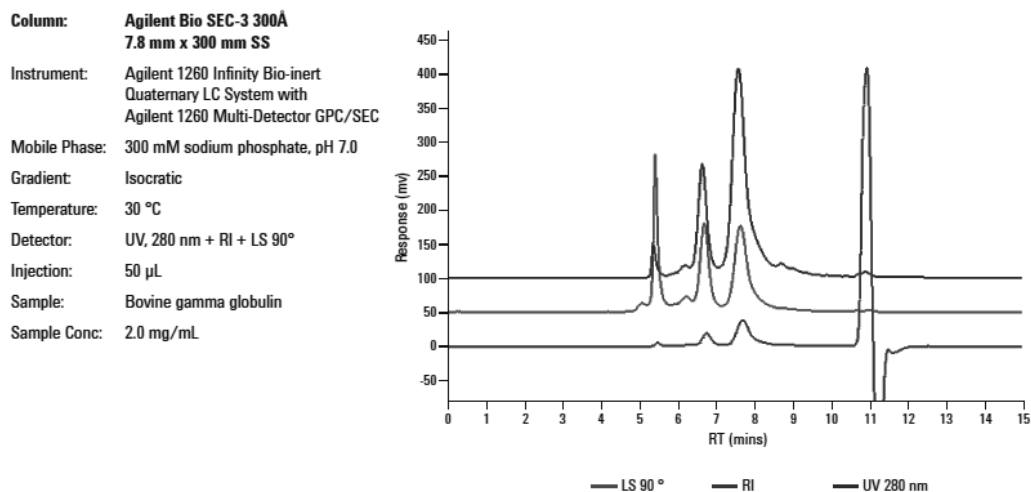


图6 多种检测手段用于SEC分析

8. 液相色谱仪器

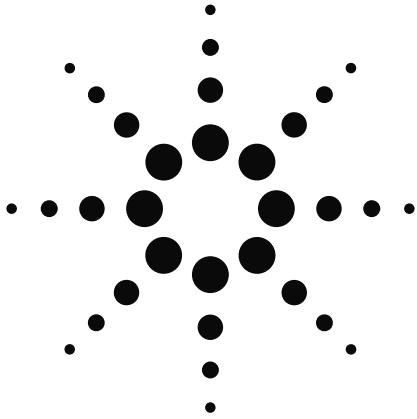
我们建议使用生物惰性的液相色谱仪器，例如Agilent 1260 Bio Inert 生物惰性四元泵液相色谱系统。该系统的特点如下：

- 1) 该系统采用了特殊的材质，以避免生物大分子与流路管壁产生不必要的相互作用，从而保证良好的分离效果。
- 2) 系统耐压600bar，能够进行UHPLC分析。
- 3) 四元泵设计，拥有足够的流动相组合灵活性。
- 4) 能够耐受高浓度盐分（如2mol/L的NaCl）以及极端pH（1~13）

六. 常见问题与解决方案

在SEC分析中，常见的问题以及解决方案列举如下：

1. 回收率不理想或峰形较胖—这通常是来源于样品分子与色谱柱的疏水相互作用。可以在流动相中添加10%~20%的有机溶剂，如甲醇、乙腈或乙醇等。
2. 峰拖尾或峰形不佳—样品分子通常能够具有较明显的碱性或者存在其他可能的次级相互作用。这时候可以适当增加流动相离子强度，例如在磷酸盐缓冲液中加入氯化钠。当然也可以考虑使用生物惰性的液相色谱系统。
3. 色谱保留或分离度不够—有可能你选择的色谱柱孔径不合适。请参考样品的分子类型以及分子量大小选择合适孔径的色谱柱。
4. 色谱柱的平衡—保持较低流速长时间冲洗色谱柱，一般需要至少10倍柱体积以达到充分的平衡。对于 7.8 x 300 mm 色谱柱来说，其柱体积为 13 mL。使用液相色谱软件以监控基线与色谱柱的柱压，直到两者都达到平稳。
5. 色谱柱硬件及耐受压力—请严格参考说明书上的色谱柱耐压指标进行操作。在较高压力下长时间使用可能会损坏色谱柱并影响其寿命。
6. 色谱柱清洗—清洗色谱柱时，可以使用缓冲溶液，反向冲洗色谱柱至少15倍柱体积，注意压力控制在色谱柱最大耐受压力的 50% 以下。然后采用 3-5 柱体积的去离子水（Milli-Q或Nanopure）冲洗色谱柱。推荐采用两种缓冲溶液进行色谱柱清洗的工作：1. 高浓度的中性盐类，例如 0.5 M Na₂SO₄, pH 3.0；2. 水相缓冲溶液加入少量的有机溶剂，例如50 mM 磷酸盐, pH 7.0 加入 10%~20% 甲醇，乙醇或者乙腈。
7. 色谱柱保存—SEC色谱柱可以短期保存在流动相中。如果需要长期保存，采用 0.05% NaN₃ 或者含 20% 乙醇 pH 7.0的缓冲溶液冲洗至少10倍柱体积，然后采用随柱的色谱柱堵头封住色谱柱的两端。



采用反相色谱进行蛋白鉴定与杂质分析

一. 反相色谱在蛋白分析中的应用

反相色谱 (Reverse Phase High Performance Chromatography, RP-HPLC) 是基于各物质疏水性的差异并运用变性条件来实现样品分离的色谱模式。反相色谱通过蛋白的疏水部位与色谱填料的非极性表面的相互作用来达到分离的目的。反相色谱被广泛地用于蛋白质鉴定确认、杂质谱图分析以及翻译后修饰定量。目前的主要应用方向包括以下几个方面：

主要序列的完整性鉴定 — 使用肽图与标准品肽图做比较；

蛋白化学修饰（去酰胺和氧化）的测定 — 采用完整蛋白作为样品，比较原始及经修饰蛋白的肽图；

蛋白杂质分析 — 测定蛋白样品的主成分含量及杂质含量；

蛋白片段分析 — 分析蛋白的轻链与重链以及其他片段如Fab, Fc等；

根据反相色谱具体的应用目的不同，可以用下图来表示。

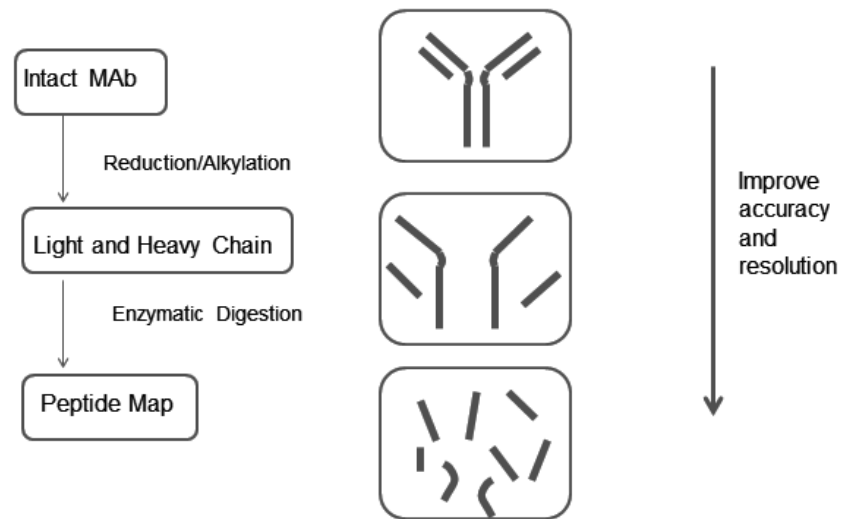


图1 反相色谱在不同层面蛋白分析中的应用

肽图分析已有专门章节讨论，本节以单克隆抗体为例，介绍大分子蛋白的完整蛋白以及片段反相色谱分析。

二. 关于反相色谱分析单克隆抗体完整蛋白及片段

对于单克隆抗体完整蛋白及还原后片段的分析，是表征治疗型蛋白类药物并了解其有效性和稳定性的重要手段。出色的分离能够保证表征结果的准确与可靠。单克隆抗体及其片段的分子量通常是在20KD到170KD，传质速率比小分子要慢，会导致峰形展宽，分离度降低，所谓的出色分离或好的生物大分子反相色谱柱，主要包括以下几点：

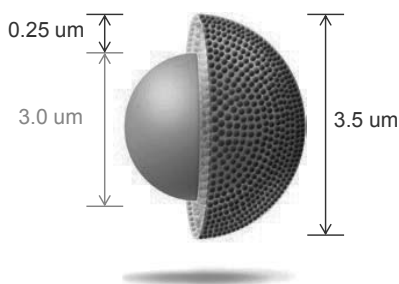
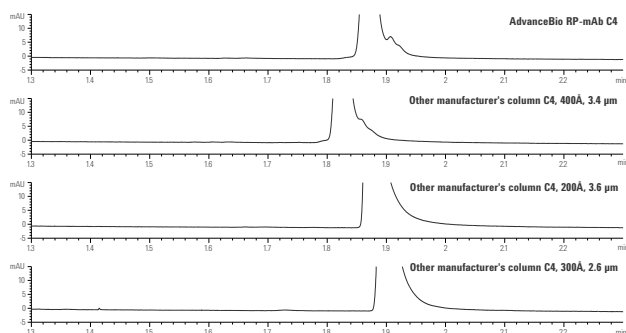


图2 Agilent AdvanceBio RP-mAb的填料颗粒结构示意图

1) 高柱效以及大孔径：高的柱效和大孔径是保证得到优良分离度的前提，如安捷伦AdvanceBio RP mAb色谱柱，其填料粒径为3.5 μm ，结构为表面多孔层填料，配合专门为单克隆抗体设计的450 \AA 大孔径（见图2），能够为单克隆抗体完整蛋白及蛋白片段分析提供足够高的柱效及分离度。图3是分析Herceptin的结果与其他色谱柱的对比。从该图可以看出，填料粒径并不是决定分离度的唯一因素，填料的孔径对于蛋白色谱峰形的影响更为显著。由于采用了450 \AA 的大孔径设计，完整蛋白的传质过程不再受到阻碍，Agilent AdvanceBio mAb色谱柱能够比其他市售蛋白分析色谱柱给出更为出色的蛋白峰形，能够改善常见的色谱峰拖尾的现象。较低的柱压使其能够被用于常规的液相色谱仪器。



Method Parameters

Column dimensions: 2.1 x 100 mm, 3.5 μm
Mobile phase A: 0.1% TFA in water:IPA (98:2)
Mobile phase B: IPA:ACN:Mobile phase A (70:20:10)
Flow rate: 1.0 mL/min
Gradient: 10-58% B in 4 min, 1 min wash at 95% B, 1 min re-equilibration at 10% B
Sample: 5 μL injection of humanized recombinant Herceptin Variant IgG1 intact from Creative Biolabs (1 mg/mL)
Temperature: 80 $^{\circ}\text{C}$
Detection: UV @ 254 nm

图3 AdvanceBio RP-mAb的独有设计能够给出更为出色的峰形

表面多孔层填料有更短的传质距离及更快的传质速度，因此该色谱柱的整个分析时间明显优于同样规格的全多孔填料色谱柱。图4是采用C4键合相的AdvanceBio RP-mAb色谱柱快速分析Herceptin的结果。整个分离能够在2分钟之内完成。该色谱柱同时有多种规格，包括适合常规液相色谱分析的4.6mm内径色谱柱以及适合液质联用分析的2.1mm内径色谱柱，并提供从50mm到150mm的不同柱长，以满足用户对于分析速度或分离度的需求。

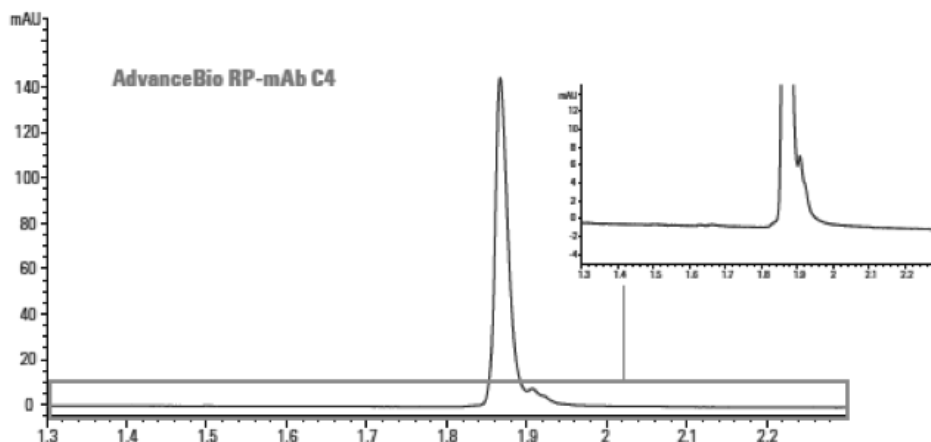


图4 AdvanceBio RP-mAb快速分析Herceptin

2) 色谱柱更为耐用：硅胶基质的色谱柱被广泛应用于大分子蛋白的反相分离中。完整蛋白分析的色谱条件比较苛刻，常常需要在高温和低pH值（0.1% 三氟乙酸）条件下运行，温度一般可达70-80。在高温和低pH值条件下，色谱填料键合相不流失是保证结果可靠重现的前提。这需要色谱填料采用基于空间位阻技术的耐酸和耐高温的键合技术。由于完整蛋白分析的色谱柱，孔径一般大于300Å，相对于一般的100Å孔径的色谱柱而言，对于机械稳定性和耐压的要求要高，需要成熟的良好生产工艺。除了填料本身的稳定性之外，在硬件上有稳定的反压也同样保证了方法的稳定性。如AdvanceBio RP Bio的柱头配备了2μm孔径的筛板，在分析大分子蛋白时，能够有效的防止颗粒状杂质堵塞色谱柱对色谱柱性能的影响。

3) 选择性多样：与小分子化合物分离分析一样，完整蛋白以及片段分析采用不同键合相会有不同的选择性，可以得到不同的分离结果，从而获取更多的信息；或者适于不同极性强弱的生物大分子蛋白。与小分子化合物分析不同，在完整蛋白分析中，C18固定相由于保留太强，通常不是首选固定相。C4和C8固定相由于保留适中，更多地用于完整蛋白分析。Agilent AdvanceBio RP-mAb提供三种不同的键合相：SB-C8适合完整蛋白及蛋白片段的分析；C4适合分子量较大的或者疏水性较强的蛋白（包括单克隆抗体）的分析；而DiPhenyl键合相对蛋白中的芳香族氨基酸的组成比较敏感，能够给出独特的分离选择性（如图5），经常作为与C4和C8分离性能互补的一种固定相。事实上，在有些条件下，DP-Phenyl键合相能够给出关于分离的更多细节（如图6）。

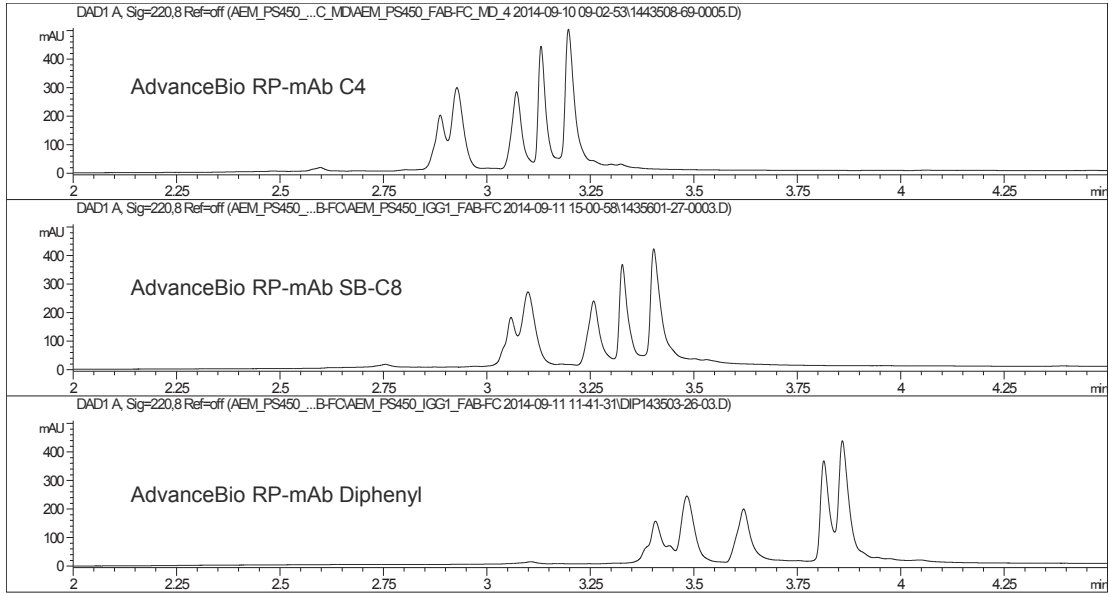


图5几种不同键合相的RP-mAb色谱柱分析单抗片段的结果比较

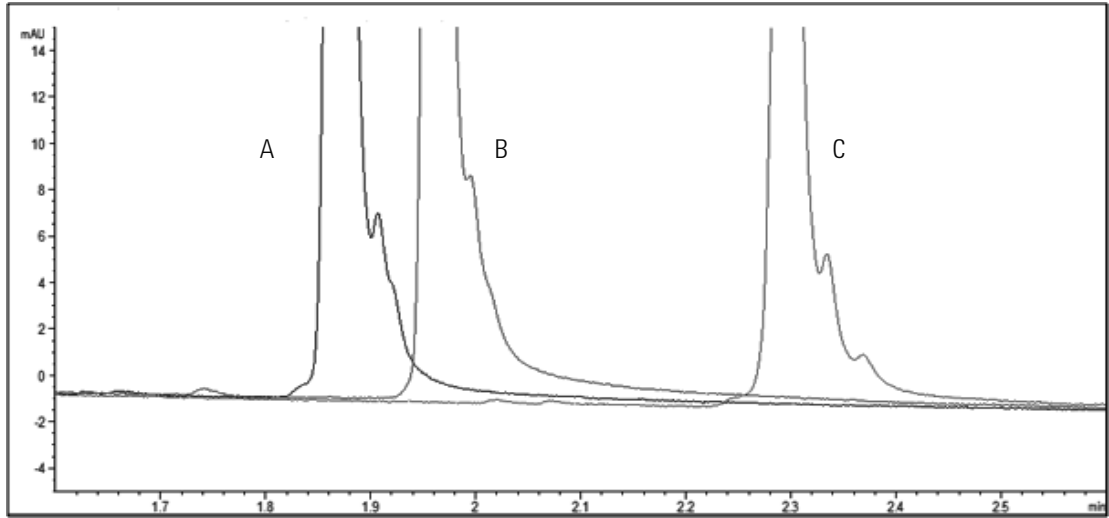


图6 几种不同键合相分析Herceptin的结果对比：A—C4；B—SB-C8；C—DiPhenyl

三. 采用反相色谱分离完整蛋白及蛋白片段的要点

在大分子的反相色谱分析中目标蛋白的准确定量非常重要，色谱柱的分离度或柱效受多种因素的影响，主要有以下几点：

1. 色谱柱填料

通常来说，在反相色谱中，较大的孔径能够适合分析较大的蛋白。例如Agilent AdvanceBio mAb色谱柱，即拥有450Å的大孔径，从图4 的实例中很清楚地表明大孔径的独特设计为分离带来的好处。与小分子的反相分离相似，填料粒径越小，同样规格的色谱柱柱效越高，采用小粒径的填料就可以获得单位长度更高的柱效，使缩短柱长提高分析速度成为可能。同时，表面多孔层填料可以减少大分子的扩散路径并提高其传质效率，这也是提高分离效率的关键点。

2. 流动相

在反相色谱分析蛋白的应用中，三氟乙酸（Trifluoroacetic acid, TFA）被广泛地使用。在低pH条件下，多数蛋白都带有负电荷，TFA则会与之结合形成离子对，从而在反相色谱柱上获得足够的保留，并依据疏水相互作用的强弱进行分离。

我们推荐的流动相为：水相：0.1% TFA；有机相：乙腈（Acetonitrile, ACN）含0.08%TFA。这是分析完整蛋白及蛋白片

段的常用条件。某些时候可以在流动相中加入一些有机添加剂，如异丙醇（Isopropanol, IPA）或者正丙醇（n-propanol, NPA）等，以获得不同的分离选择性。需要说明的是，并没有给定的规律说明某种添加剂一定会提供更好的分离。具体的分离视样品性质及分离条件而有所不同。

当采用液相色谱与质谱联用的手段时，必须考虑流动相的质谱兼容性。在液相条件下常用的TFA等流动相添加剂，由于影响离子化效率，因此并不能被大量地用于LCMS分析中。通常，在LCMS分析中，会使用甲酸，乙酸等小分子有机酸来替代TFA，并可以加入铵盐等挥发性盐类来配制缓冲溶液。一般来说，采用质谱兼容的流动相可能获得相对较低的分离度（与TFA流动相比），但由于质谱本身能基于质量数差异进行分离，对于前端色谱分离度的要求较低，因此仍然能够满足应用需求。

4. 柱温

一般来说，适当升高温度会有利于改善色谱的峰形及提高回收率，因为较高温度可以获得更快的传质速度，图7显示的是在不同温度条件下同一样本的色谱图，随着温度的升高，色谱峰峰形逐渐变得对称和尖锐，峰面积也不断增高，这表明蛋白在柱上的吸附降低，回收增高。

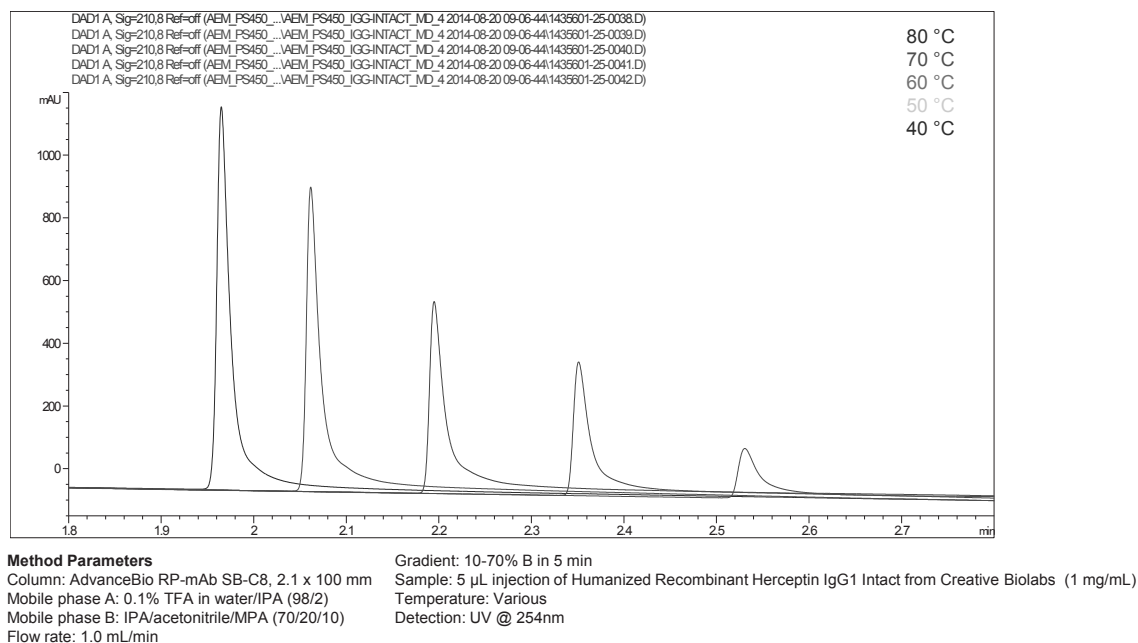


图7 温度对于完整蛋白分离的影响

四. 常见问题与解决方案

在蛋白的反相分析中，常见的问题以及解决方案列举如下：

1. 峰形较胖，拖尾，回收率不理想——排除色谱柱柱效下降的因素后，这通常是由于色谱柱的填料孔径与目标蛋白分子大小不匹配，蛋白的传质过程有明显的阻力造成的。可以考虑选择较大孔径的色谱柱。对于单克隆抗体或更大分子量的蛋白（150kD以上），Agilent AdvanceBio RP-mAb 450Å的孔径是合适的选择。同时，也可以先尝试适当升高色谱柱温度来优化峰形。

2. 分离度不够——对于分离度不够的情况，很多时候可以通过调整梯度来加以优化。也可以通过改变温度，调节流动相pH，以

及使用流动相添加剂（如之前提到的异丙醇）等方式加以优化。

3. 色谱柱连接及系统死体积——在某些快速分析的应用中，会使用内径较小，长度较短的色谱柱，此时系统的死体积会对分离结果产生明显的影响。系统死体积的来源有很多方面，主要有管线与色谱柱的连接处（图8）以及管线与进样阀和检测器连接处等位置。采用不同品牌的仪器与色谱柱连接时也有可能存在死体积的问题。Agilent提供专利设计的A-line手拧接头（图9）能够很好的解决管线与色谱柱连接的匹配问题。

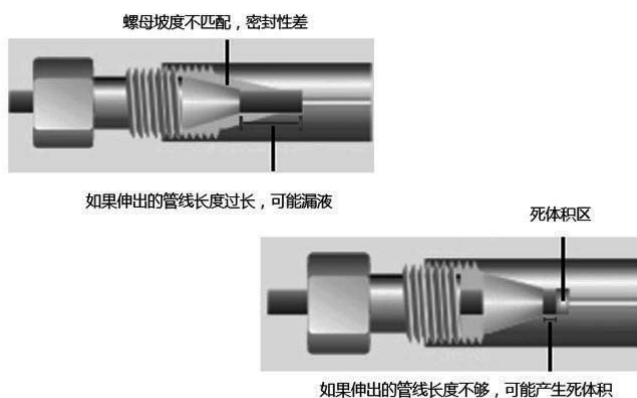


图8 由于接头与色谱柱不匹配造成的死体积或者漏液现象

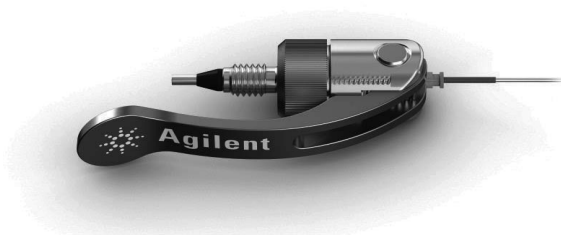


图9 Agilent A-line 1300bar手拧接头

4. 色谱柱的平衡—同小分子分析使用的色谱柱类似，色谱柱使用梯度起始比例的流动相进行平衡。使用液相色谱软件以监控基线与色谱柱的柱压，直到两者都达到平稳。通常平衡所需的溶剂体积是10~20倍的柱体积。

5. 色谱柱硬件及耐受压力及温度—请严格参考说明书上的色谱柱指标进行操作。在较高压力下或较高温度下长时间使用可能会损坏色谱柱并影响其寿命。对于Agilent AdvanceBio RP-mAb色谱柱，其耐压上限为600bar，其温度上限为90℃。

6. 色谱柱清洗—我们推荐的反相色谱柱清洗方法为：采用梯度起始比例的去离子水及有机相的混合溶剂，冲洗10倍左右柱体积；然后采用纯有机相冲洗10倍左右柱体积。有机溶剂一般选择与方法中相同的有机溶剂。如果仍然存在强保留的物质，可以考虑采用异丙醇甚至DMSO或DMF在低流速下冲洗。同时，对于蛋白样品，更多的是采用在两相中加入0.1~1%TFA，从低高水相走到低水相的梯度再生方法来清洗附着在色谱柱上的蛋白。如，0 min 起始95% 0.1% TFA水溶液和5%0.1% TFA乙腈溶液，30 min 至 5% 0.1% TFA水溶液和95% TFA 乙腈溶液，依据冲洗效果可反复走梯度。在极端情况下，可使用6M盐酸胍/50mM tris HCL,pH 7.5的溶液冲洗。

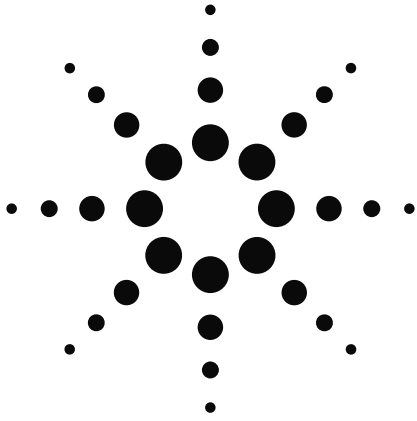
7. 色谱柱保存—反相色谱柱可以短期保存在流动相中。如果需要长期保存，建议在清洗后保存在纯有机溶剂中，然后采用随柱的色谱柱堵头封住色谱柱的两端。

8. Agilent 用于反相分析的色谱柱

安捷伦提供了业内最全面的大孔径反相 Bio HPLC 色谱柱，并由遍布全球的技术支持专家和应用化学家提供支持。色谱柱系列包括压力范围 400 至 1200 bar 的 1.8、3.5 和 5 μm 多孔填料柱、用于UHPLC 但反压较低的表面多孔层填料色谱柱，以及适用于最极端 pH条件下分析的聚合物基质色谱柱。

依据以下的表格，除了450Å的AdvanceBio RP Bio外，还在其他孔径的反相柱可以很方便的选择，适合你的应用的反相Bio HPLC或者UHPLC色谱柱。

Agilent 色谱柱	目标应用
AdvanceBio RP-mAb	专为单克隆抗体分析设计 对于单抗的完整蛋白及片断的快速、高效分离，适合HPLC及UHPLC
ZORBAX RRHD 300SB	对于完整蛋白（包括单抗）快速分离，适合HPLC
ZORBAX 300SB	对于完整蛋白（包括单抗）及片断的常规分离，适合HPLC



离子交换色谱表征蛋白质电荷异构体

一. 关于离子交换色谱

离子交换色谱 (Ion Exchange Chromatography, IEX) 是一项重要技术, 现在被广泛的用于分离蛋白质和生物治疗药物。和 SEC 一样, IEX 可以分离天然状态的蛋白质; 并且, 作为一项制备技术, 它对纯化和分离蛋白质也大有用途。

蛋白质分析中, 在给定 pH 下发生电荷变异, 说明蛋白质分子一级结构发生了改变, 从而导致额外的蛋白构象产生。这些称为异构体 (或电荷异构体)。以抗体为例, 由于抗体在生产和纯化过程中发生了氨基酸取代、糖基化、磷酸化和其他翻译后修饰或化学修饰等化学反应, 因此很有可能会导致其电荷异质性发生改变 (见图1)。由于这类变化可能影响稳定性和活性 (或引发免疫反应), 因此, 电荷异构体的分析对生物药物非常重要。对于电荷异构体可以用 IEX 色谱对其进行分离。对于生物大分子来说 (例如单克隆抗体, 分子量约150kD), 特别要考虑其分子大小和分子结构, 这是因为在IEX中, 色谱相互作用主要发生在键合相和分子表面的电荷基团之间。

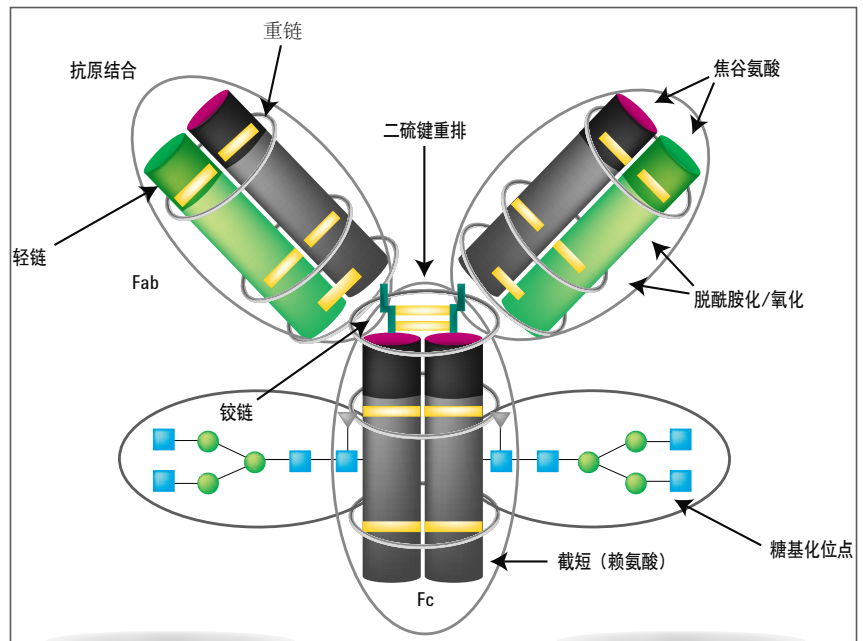


图1 通过不同程度的氨基酸糖基化, 脱酰胺化和氧化作用, 以及重链的赖氨酸截短, 生成的单克隆抗体的电荷构型体

在生物大分子的离子交换色谱分析中，通常需要一个梯度来实现目标蛋白的洗脱。这个梯度可以是离子强度梯度（盐梯度）或者pH梯度。蛋白与键合相的保留或洗脱主要依靠电荷的相互作用，分离是基于不同的分子带电荷状态的不同所导致的不同离子间

的作用力差异。在盐梯度中，通常流动相pH是固定的，随着盐浓度的增加，蛋白按带电荷的多少被依次洗脱下来。在pH梯度中，不同的蛋白由于带有不同的表面电荷状态而得到分离。以盐梯度为例，IEX分离的整个过程可以用图2来表示。

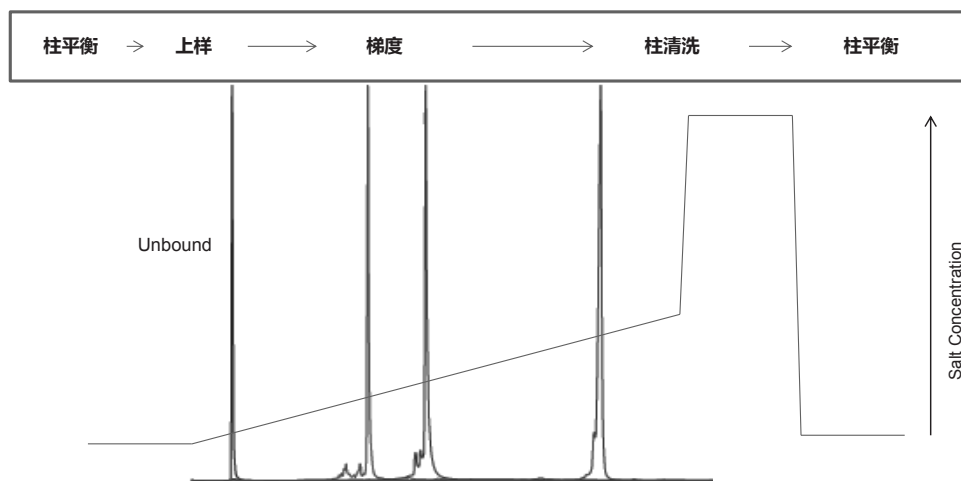


图2 IEX色谱分离的过程示意图

二. 生物大分子的离子交换分析要点

首先必须明确的是，生物大分子（例如单克隆抗体），都是非常复杂的。一个典型的单克隆抗体分子具有超过1300个氨基酸单元。在这些氨基酸单元中，可能一部分带有酸性侧链，另一部分带有碱性侧链。整个抗体分子可能带有特定的电荷，但是并不能预测其pI，因此开发一个有效的离子交换方法就很有必要。通常开发一个合适的离子交换方法有以下步骤：

1. 样品制备

在离子交换色谱分析中，样品的准备与其他的蛋白分析类似。很重要的一点是样品应当在流动相中有足够好的溶解性，最好是能够溶解在流动相（一般为流动相A）中进样。为了保护色谱柱，我们推荐在进样前对样品进行必要的过滤，以除去其中的颗粒杂质。但是对于溶解性较差的样品，不应当采用过滤手段，而应当寻求另外的溶剂或流动相。此外，样品的准备过程不应当改变样品的性质。样品应当新鲜配制，尽快分析。冷藏保存可以适当延长样品的有效期。

在样品准备中，可以采用如 Agilent Captiva Premium PES（polyethersulfone）针头式过滤器，其对于蛋白几乎没有吸附，非常适合用于蛋白的分离分析。同时全自动的AssayMAP解决方案，帮助客户快速、高通量，全自动的完成样品准备过程以获得准确且重现的分析结果。AssayMAP配备多种枪头式微填充床固相萃取柱，使用软件控制正向位移探针式注射器灵活准确完成上样、淋洗、洗脱等多种操作模式（www.agilent.com/lifesciences/assaymap）。

需要强调的一点是，样品必须溶解在盐浓度较低的流动相中，以使得蛋白能够与固定相存在足够的相互作用而不会随着进样被立即洗脱。

2. 色谱柱选择

Agilent 提供多种不同的离子交换色谱柱。如何选择一款合适的色谱柱，需要考虑以下几个方面：

2.1 色谱柱键合相

对于离子交换色谱来说，选择键合相需要考虑：阴离子交换还是阳离子交换？强离子交换还是弱离子交换？在多数方法开发的情况下，可以先从强离子交换开始，如果有必要，可以选择弱离子交换以获得不同的选择性。

对于强阳离子交换柱来说，其功能团是磺酸基，除了在强酸性环境中，其键合相均带有负电荷。相反的，对于强阴离子交换柱，其功能团为季铵基，其键合相均带有正电荷。因此，强离子交换色谱柱具有很广泛的操作pH范围。而弱离子交换柱（对于弱阳

离子交换为羧基，对于弱阴离子交换为氨基）更多的受到流动相条件的影响。其电荷功能团与蛋白的电荷功能团类似，都受到溶液pH和离子强度的影响。这就使得优化分离度需要通过精细调节流动相条件来实现。

Agilent 提供多种不同的离子交换键合相供用户选择。这些键合相有着各自的特点和优势，我们将这部分内容归纳为以下的表格（表1）以供选择时参考。

表1 键合相选择简表

分析目标物	键合相名称	键合相特点
单克隆抗体	Bio mAb	专为单克隆抗体的电荷异质性分析而设计与优化，进行单克隆抗体分析的首选
多肽与蛋白	Bio IEX	1) 采用高度交联的非多孔球形聚（苯乙烯-二乙烯基苯）硬质填料 2) 表面结合亲水聚合物层以消除非特异性相互作用，并键合高度均一的离子交换基团 3) 提供不同的粒径与规格以满足分离度及分析速度的要求
多肽，蛋白及寡核苷酸	PL-SAX 1000Å /4000Å	1) 长色谱柱寿命：强阴离子交换功能团确保其具有出色的化学稳定性和热稳定性。即使是用氢氧化钠洗脱液也是如此。
球形蛋白及多肽	PL-SAX 1000Å	2) 优异的色谱性能：可以通过小粒径填料实现更高的柱效。
较大的蛋白	PL-SAX 4000Å	3) 不同填料粒径用于不同的用途：如5µm填料用于分析而10µm和30µm用于纯化。 4) 灵活的方法开发：强阴离子交换功能团共价键合到稳定的全多孔聚合物表面，使得方法开发能够在较宽的pH范围进行。
多肽及蛋白	PL-SCX 1000Å /4000Å	1) 5µm填料能够提供更高的分离度而30µm填料可用于中低压色谱分析。
球形蛋白	PL-SCX 1000Å	2) 有1000Å及4000Å两种孔径，能够为较大的生物分子提供良好的传质。
较大的蛋白	PL-SCX 4000Å	3) 出色的稳定性。
抗体(IgG, IgM)，质粒DNA，病毒，噬菌体及其他的较大的生物大分子	Bio Monolith	1) 更高的准确性。装载复杂样品时不易发生污染和堵塞。Monolith盘的规格为5.2x4.95mm，100µL柱容量。其内部带有连续多孔的通道，消除了传质扩散。 2) 快速分离及高效的方法开发。Monolith固定相不存在扩散，空隙和死体积，可以允许样品在流动相和固定相之间快速传质。能够实现快速的分离和从而降低方法开发的时间和成本。 3) 多种选择助您优化分离结果。并且与HPLC系统和制备型液相系统兼容。

2.2 孔径

待测蛋白必须能够无阻碍的通过色谱柱。在离子交换分析中通常使用实心无孔填料、全多孔填料以及整体填料。实心球型填料有利于大分子的传质，能够提供较高的分离效率，是蛋白类药物电荷异质性分析中广泛使用的填料，安捷伦Bio IEX色谱柱所具有的刚性，球形，非多孔的填料颗粒能够给出更出色的结果。全多孔填料，如PL-SCX或PL-SAX，具有1000Å或4000Å的全多孔设计，

既允许蛋白完全无阻碍的通过，也提供了更大的表面积，以及更大的柱容量，从而更适合于制备分离。对于特别大的生物分子进行分析时，由于Bio-Monolith整体柱具有大的贯穿孔结构，可以确保传质和防止堵塞，可以提供最佳的结果。此外Bio-Monolith柱的柱床很短，在追求分析速度的时候，可考虑使用。表1有不同填料以及孔径与分析目标物的对应关系。

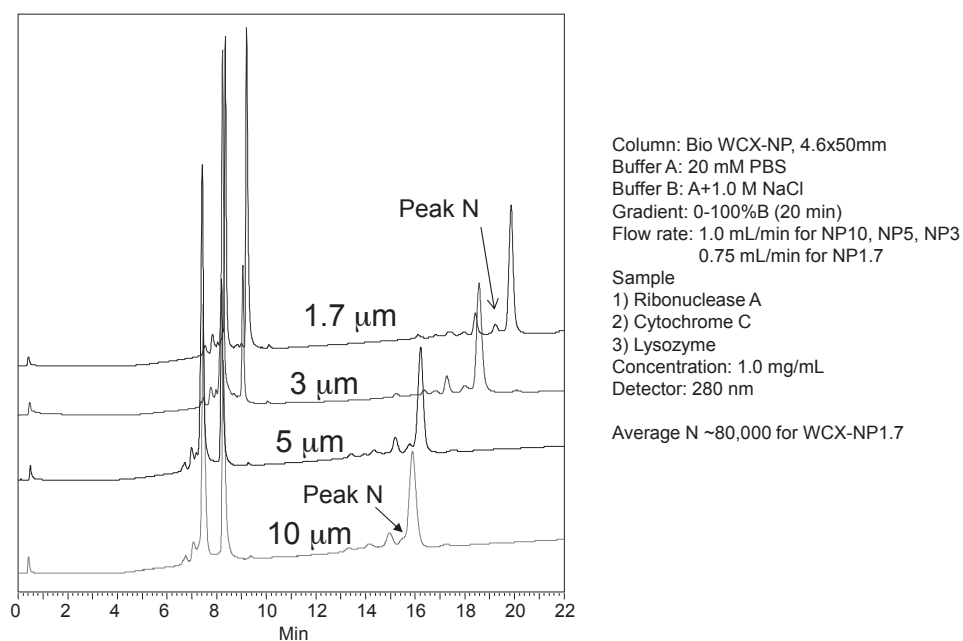


图3 使用较小粒径的色谱柱能够提供更高的分离度

2.3 填料粒径

填料的粒径也是选择色谱柱的重要参数。通常较小的粒径能够提供更高的柱效，但是也会引起更高的柱压。对于生物大分子来说，由于其传质速率较慢，因此减小填料粒径对于分离度的提升并不如小分子来的那么明显。并且由于在离子交换色谱中使用的通常是水相流动相，相对粘度较大，在使用过程中尤其要注意色谱柱的压力不要超过耐压上限。在图3的实例中，主峰与前面的小峰可以采用1.7 μm 的色谱柱得到分离。

2.4 色谱柱硬件材质

色谱柱柱套有PEEK材质，及不锈钢材质，里面填充了不同粒径大小的填料。在离子交换色谱中，并不一定非要使用25cm长度的色谱柱，的确有一些应用场合，使用更长的色谱柱能够得到更好的分离度，然而同时也会造成柱压的增加。使用较小的填料粒径

匹配较短的色谱柱，有可能获得更好的分离度以及更快的分析速度。图4给出的就是利用较小填料粒径的更短的离子交换色谱柱更快的完成分析的例子。在这个实例中，与采用5 μm ,250mm规格的色谱柱比较，采用3 μm ，50mm规格的色谱柱，分析时间由17min缩短为12min。

对于不锈钢柱套的色谱柱来说。长时间使用高盐梯度会腐蚀柱套，而PEEK材质的柱套就不存在这样的问题。并且PEEK材质的柱套能够很好的分析一些容易与金属发生相互作用的生物大分子。需要注意的是，PEEK材质的柱套通常耐压要相对低一些。为了有效地避免生物大分子与流路的相互作用，可以使用PEEK材质柱套的色谱柱以及惰性流路设计的色谱仪例如Agilent 1260 Bio Inert HPLC系统。

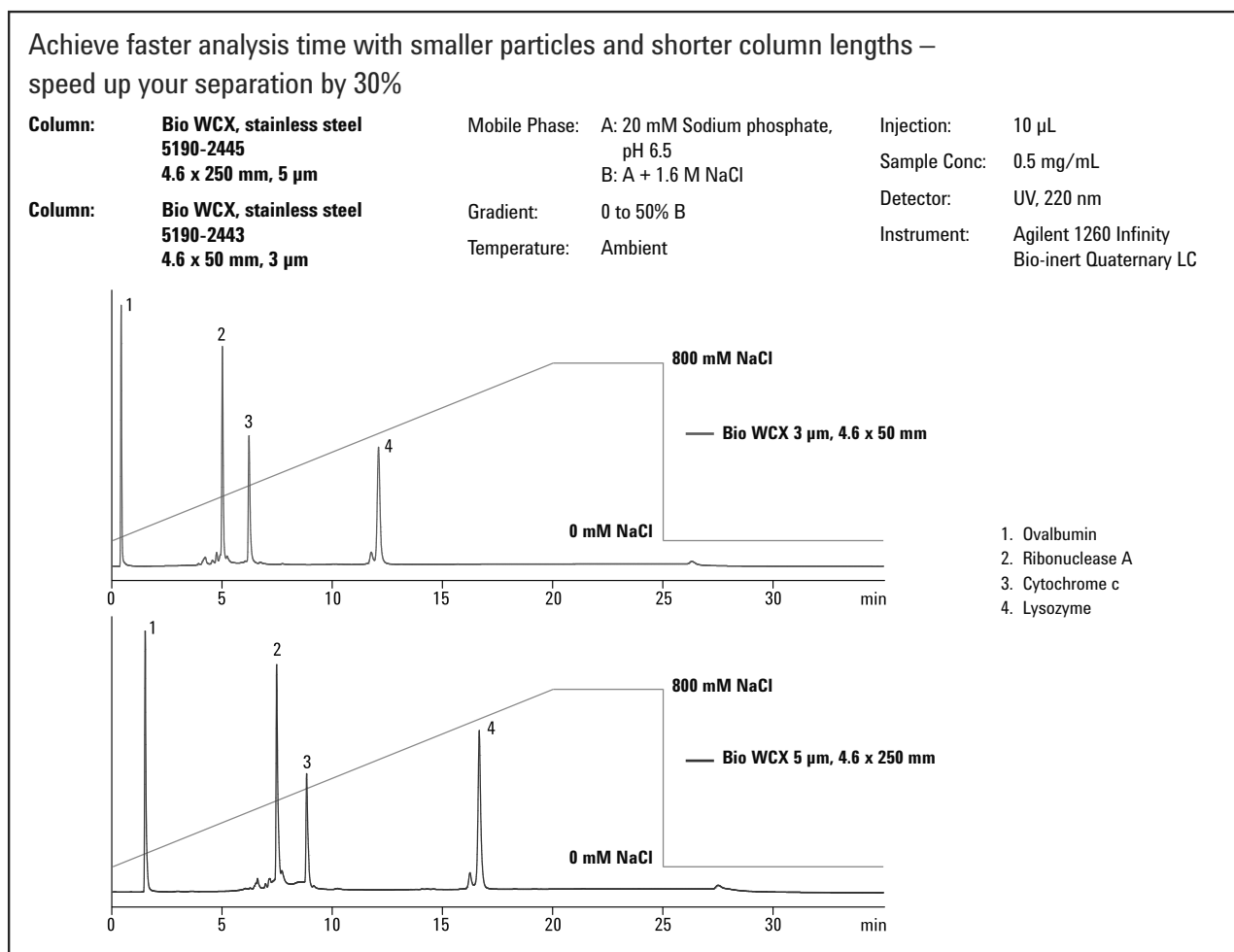


图4 采用不同规格的离子交换色谱柱分析蛋白标样

2.5 色谱柱内径与流速

根据样品量的多少来选择合适的色谱柱内径非常重要。如果样品量十分有限，可以考虑采用较小内径的色谱柱（如2.1mm内径的），但是需要注意减少系统柱外体积，以减少扩散带来的影响，获得较好的分离度。

通常对于4.6mm内径的色谱柱，适宜的流速为0.5~1.0mL/min。使用较短的色谱柱（例如用50mm长度的色谱柱替代150mm或者250mm的色谱柱）或者适当提高流速，都可以缩短分析时间，但是需要注意分离度的变化以及柱压耐受上限。

3. 流动相选择与梯度优化

流动相缓冲溶液的作用是控制分离过程的pH，从而使得待测物能够保持特定的电荷状态。很重要的一点是，缓冲溶液只有在其pKa附近1个pH单位内才能够有效地起到pH缓冲作用。磷酸盐是常用的缓冲试剂，因为其具有3个pKa。pH6~7范围的磷

酸盐缓冲溶液非常适合用于离子交换色谱，通常配制的浓度在20~30mM，并且在210nm的低波长具有较低的背景吸收。

准确且系统的配制缓冲溶液非常重要，因为即使是pH或者离子强度的一点微小变化都会对蛋白的保留时间产生不同程度的影响，从而造成分离度的下降或者分离结果重现性变差。此外，与强离子交换色谱柱不同，弱离子交换色谱柱的离子化程度会受到流动相pH以及离子强度的影响。为了精确的配制所需pH及离子强度的缓冲溶液，我们推荐使用Agilent Buffer Advisor缓冲顾问软件。最初的流动相是由蛋白的pI以及分析方法所决定的，即：阳离子交换模式还是阴离子交换模式。图5显示了不同pH的流动相条件下三种蛋白的分离结果的变化。在不同的pH条件下，蛋白带有电荷的状态不同，从而保留时间不同。通过调节流动相的pH可以获得最优化的分离结果。具体而言，流动相的配制和优化需要注意以下几点：

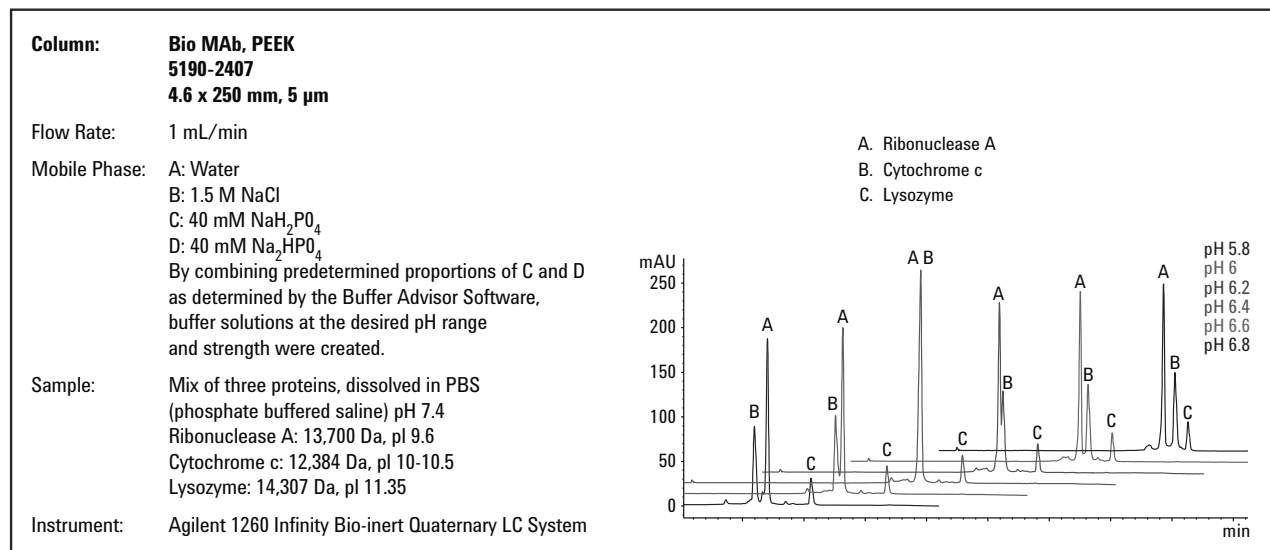


图5 不同流动相pH对于三种蛋白分离结果的影响

3.1 流动相的离子强度

流动相中应含有缓冲盐，以维持体系的pH稳定，通常起始缓冲盐浓度应当至少有10~20mM。大于30mM的起始盐浓度有可能会影响蛋白在色谱柱上的保留。图6显示了不同的起始盐浓度对于分离结果的影响。当采用相对较高的起始盐浓度时，蛋白不能够在色谱柱上得到有效保留。

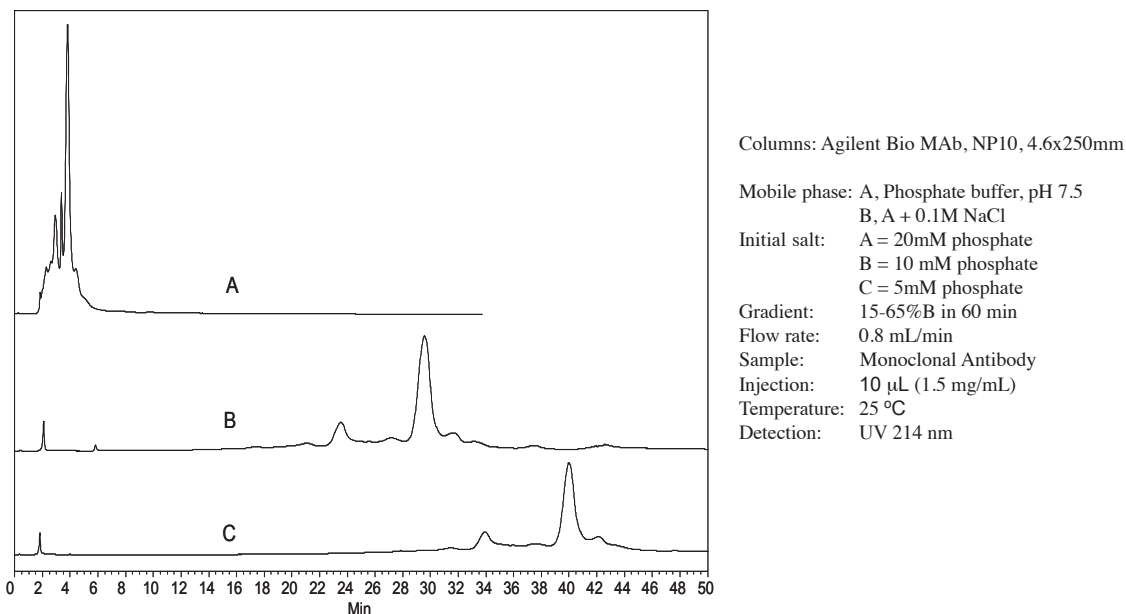


图6 不同起始盐浓度对于IEX分离的影响

如果蛋白的溶解性存在问题，可以适当在流动相中加入尿素来帮助溶解。

3.2 流动相的pH

流动相的pH对于分离结果的影响非常明显。图7是采用不同pH的流动相分离同一个单抗样品的结果比较。更低的pH导致了更长的分离时间和不同的分离度结果。特别是缓冲溶液的pH靠近蛋白等电点时，这种影响更为明显，微小的pH变化可能引起保留时间的显著差异。因此，精确的控制流动相的pH至关重要。需要有别注意的是，流动相中加入氯化钠会改变溶液的pH，因此其pH需要重新调节。

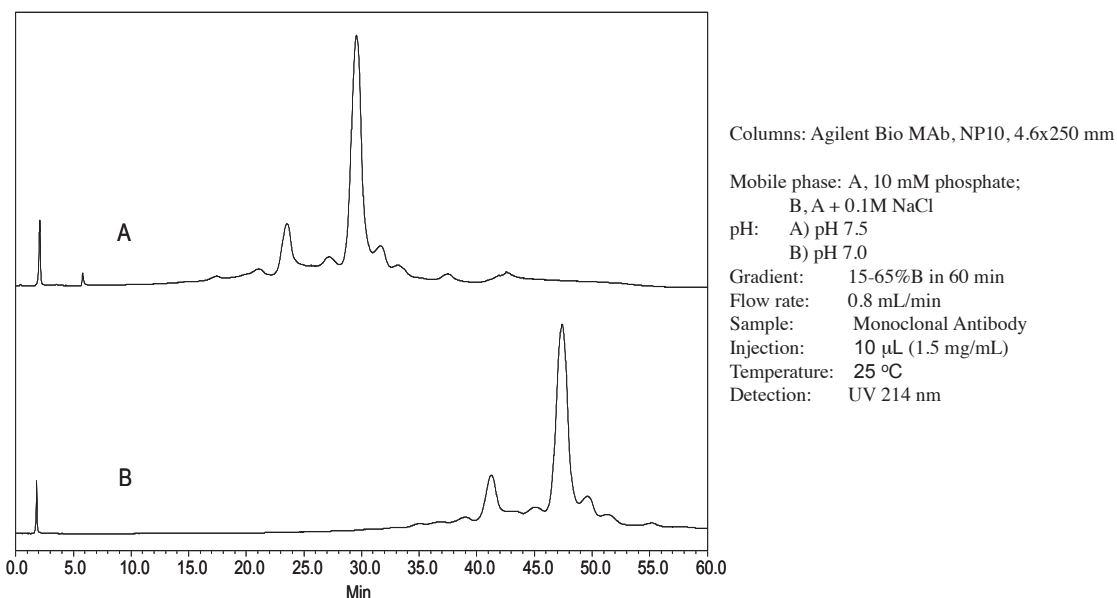


图7 流动相pH对单克隆抗体IEX分离结果的影响

3.3 流动相溶液应当新鲜配制，尽快使用，以避免细菌的生长。缓冲液应当至少7天内就重新配制，除非冷藏保存。

3.4 使用前对流动相进行过滤以去除颗粒杂质对色谱柱的影响。

3.5 梯度的优化与软件

可以通过调整梯度运行时间或者调整离子强度（或pH）变化范围来优化IEX的分离度。图8是一个采用不同的离子强度变化范围来优化分离度的实例。通常，采用一个较缓的梯度或者缩小变化范围，会增加分离度，但是也会相应的延长分析时间。

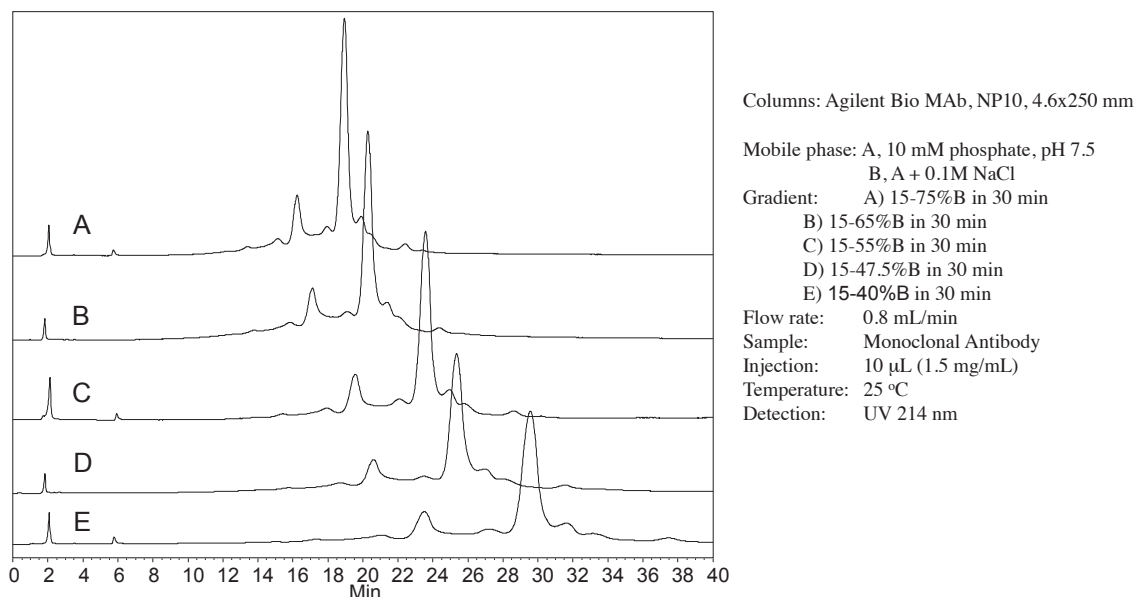


图8 不同的离子强度梯度对IEX分离结果的影响

Agilent Buffer Advisor 软件消除了繁琐的缓冲液配制，混合及pH过程以及出错的概率，能够帮助你快速简单的实现离子强度梯度（盐梯度，见图9）或pH梯度（见图10）。匹配Agilent 1260 Bio Inert生物惰性四元泵液相色谱系统，能够动态混合四种不同的储备流动相溶剂，显著减少了配制缓冲溶液的时间与精力，大幅度提升了整个生物大分子分析的效率。并且，缓冲溶液的配制更为精确，使得方法更为稳定可靠，能够在其他的仪器或实验室获得重复的分析结果。

在设计一个盐梯度时，通道D中的盐溶液的比例逐渐升高，而通道A与通道B中分别放置酸性与碱性的缓冲成分以控制流动相

pH，通道C中的水用来稀释以控制整体流动相的离子强度。在设计一个pH梯度时，只需要3种不同的流动相溶剂，即：通过通道A与通道B的缓冲成分来控制流动相pH，通道C中的水用来稀释控制整体流动相的离子强度。

在离子交换色谱分析单克隆抗体的电荷构型体的实验中（如图11），如果需要初筛20种实验条件，需要配制40种不同的流动相溶剂，而采用Agilent Buffer Advisor缓冲顾问软件，只需要4种储备的流动相溶剂即可实现。通过软件控制来实现自动，准确的在线混合，以获得所需的流动相pH与离子强度。软件优化的结果可以很方便的导入液相色谱的梯度表里。

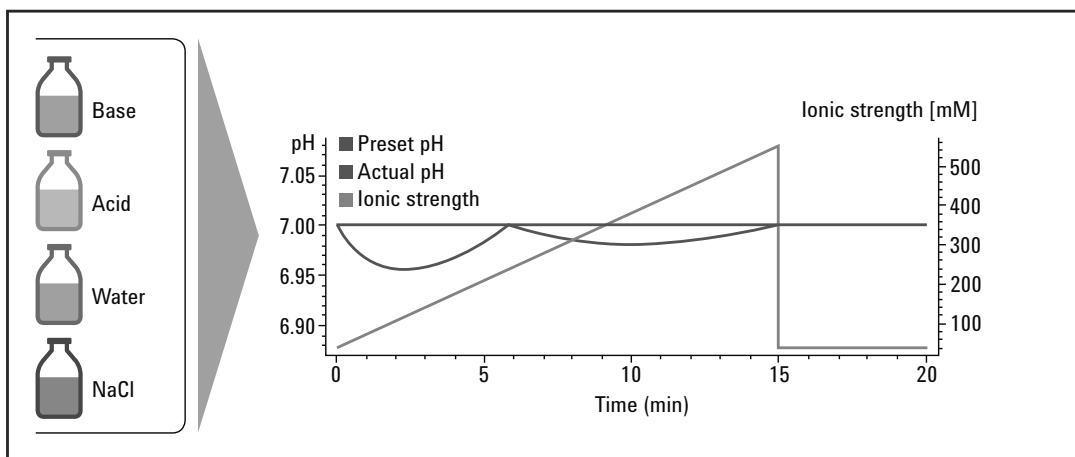


图9 采用 Agilent Buffer Advisor 缓冲顾问软件可以很容易使用贮备溶剂实现准确的盐梯度

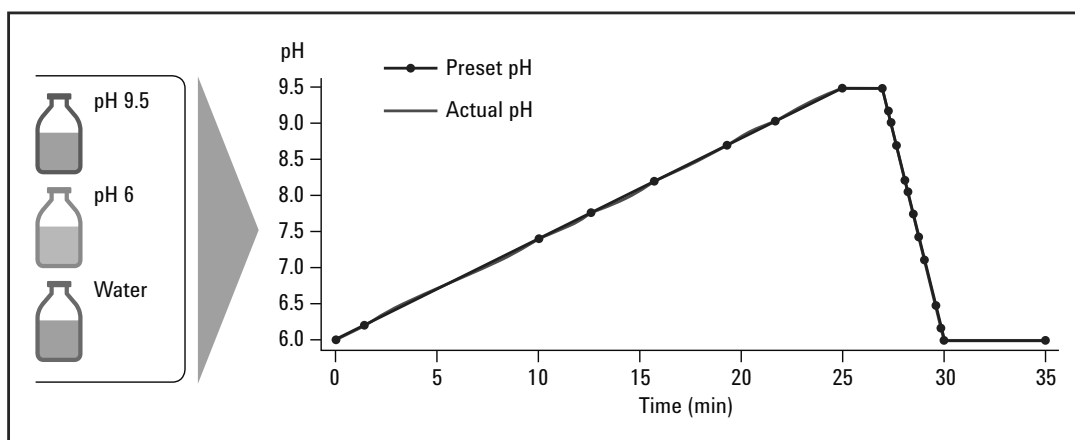


图10 采用 Agilent Buffer Advisor 缓冲顾问软件实现准确的pH梯度

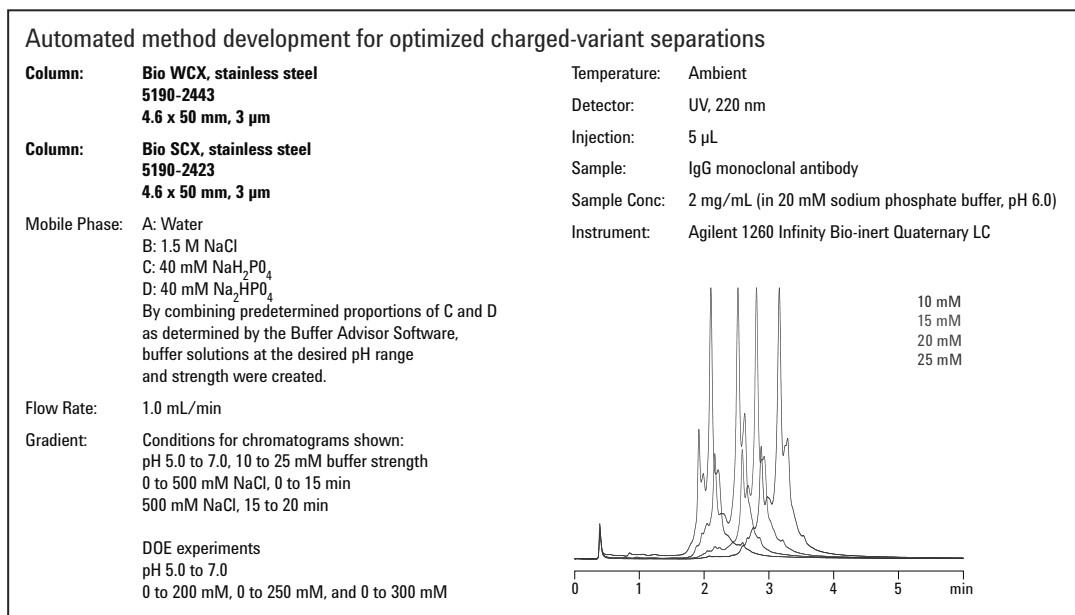


图11 采用 Agilent Buffer Advisor 缓冲顾问软件大大缩短单抗分析方法开发的时间

三. IEX分析的难点与 Agilent 解决方案

在IEX分析中，经常存在的问题及列Agilent解决方案列举如下：

1. 方法开发过程漫长，需要尝试太多不同的实验条件—使用 Agilent Buffer Advisor 缓冲顾问软件，能够大大的简化缓冲溶液配制的流程。只需要准备最多4种储备的缓冲溶液，就能够在线混合形成所需要的盐梯度或pH梯度，并且准确、重现性好。

2. 分离方法时间太久，使用较长的色谱柱导致梯度时间很长，并且需要较长的平衡时间—Agilent提供小粒径填料的IEX色谱柱。可以使用较短柱长及较小粒径的色谱柱，在保持柱效和分离度的前提下，提升分析速度，缩短分析时间。

3. 分离度不够，存在共流出，导致不能够准确定量或定量结果不重现—Agilent提供的1.7 μ m, 3 μ m填料的色谱柱，能够提供更高的色谱柱柱效，结合专利的亲水层设计，以及优化后的离子交换官能团密度，能够给予用户更高的分离度，进而保证定量结果的准确性与重现性。

4. 色谱柱寿命不好—建议严格遵循使用说明上的操作进行。注意柱压，柱温，流速，pH等条件不要超过色谱柱的耐受范围。在进行IEX分析时，建议在分离结束后加入适当的盐梯度以清洗色谱柱，并在下一次进样前给予足够的平衡。色谱柱的长期保存，应当加入0.1%NaNO₃以防止细菌生长。

5. 色谱柱的冲洗与平衡，为了获得重现的色谱结果，离子交换柱的冲洗与平衡非常重要。冲洗的目的是为了去除在色谱柱上保留较强的蛋白，以避免对后面的分析产生干扰。一般通过在分离过程结束后增加一个高盐浓度的冲洗步骤来实现。另外，每次分析结束后，色谱柱需要回到初始的状态，离子强度，pH。如果不这样做，下一次分析就会得到完全不同的结果。

6. 样品吸附—Agilent 1260 Bio Inert生物惰性四元泵系统，是用于生物大分子离子交换色谱柱的理想选择。该系统能够耐受1-13的极端pH区间，以及高盐的流动相。

7. 基线不好—对于蛋白等生物大分子来说，含有很多氨基酸单元，因此在210nm或220nm能够得到很好的信号响应以及灵敏度。在离子交换色谱中，流动相中的某些成分在较低波长会有明显的背景吸收，因此采用254nm或280nm作为检测波长有时更为合适。但是这些波长只有结构中含有芳基的或者共轭侧链的才能有明显的响应。

更多信息

如需了解更多信息，请访问：

www.agilent.com

在线购买：

www.agilent.com/chem/store

查找安捷伦客户服务中心：

www.agilent.com/chem/contactus

安捷伦科技公司生命科学与化学分析部用户服务中心免费专线：

800-820-3278

如您有关于生物色谱技术问题的咨询或投稿请发邮件至：

jian-qiu_mi@agilent.com

色谱柱与消耗品直销电话：

010-64397370

010-64397504

010-64397385

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。
本资料中涉及的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。



Agilent Technologies