

# 采用岛津 Nexera Bio 生物液相系统进行 Fc 融合蛋白的多聚体分析

LC-175

**摘要：** 本文采用岛津生物液相系统 Nexera Bio 以体积排阻色谱法建立了 Fc 融合蛋白多聚体的分析方法。本实验采用岛津 Shim-Sen SEC-H 300 体积排阻色谱柱，考察了流动相盐浓度及流速对 Fc 融合蛋白样品多聚体分析的影响。结果表明在 150 mM 磷酸钠缓冲液 +500 mM 氯化钠 (pH=7.0) 的流动相、0.5 mL/min 的流速条件下，待测样品中的多聚体与单体分离效果良好。另外，样品经 6 次重复测定，Fc 融合蛋白单体保留时间 RSD 为 0.021%，单体和多聚体含量的 RSD 分别为 0.019% 和 1.908%，重复性良好。本方法对 Fc 融合蛋白的质量控制具有较好的参考意义。

**关键词：** 体积排阻色谱 生物液相 Fc 融合蛋白 多聚体

Fc 融合蛋白是利用基因工程等技术将某种具有生物学活性的功能蛋白分子与 Fc 片段融合而产生的新型蛋白，功能蛋白可以是能结合内源性受体（或配体）的可溶性配体（或受体）分子或其他需要延长半衰期的活性物质。该类融合蛋白不仅保留了功能蛋白分子的生物学活性，并且还具有一些抗体的性质，如长效半衰期。

融合蛋白容易在细胞培养和纯化生产工艺流程中聚集产生多聚体，另外，药物的存储条件及自身的稳定性对多聚体的产生也有着不同程度的影响。由于多聚体具有免疫源性，所以蛋白的纯度及多聚体含量的检测显得尤为重要。目前检测蛋白类药物的纯度主要有两种方法，非还原蛋白质电泳和体积排阻色谱法。非还原蛋白质电泳需要在变性条件下进行，一般会影响到多聚体的检测，而体积排阻色谱法条件温和，不会

对蛋白的形态产生较大的影响。因此，体积排阻色谱法能较准确的检出蛋白中多聚体的含量。

体积排阻色谱法（SEC）是利用多孔凝胶固定相的独特特性产生的一种主要依据分子尺寸大小的差异来进行分离的方法。本实验采用岛津生物液相系统 Nexera Bio 以体积排阻色谱法对 Fc 融合蛋白中的多聚体分析条件进行了摸索和优化。Nexera Bio 采用了耐高压的 Peek 管路和惰性进样针，不仅耐腐蚀且能降低生物大分子的吸附有效地保障了良好的分析重复性。用于清洗柱塞的蠕动泵可以定时地对附着在柱塞表面的盐和缓冲液进行清洗，能有效降低盐析现象，实现高盐流动相体系下输液泵的稳定送液。本实验经色谱条件的优化，建立了 Fc 融合蛋白多聚体的分析方法，为该行业的用户进行多聚体分析提供参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

#### 1.1.1 试剂

水：超纯水

磷酸二氢钠：ACROS

磷酸氢二钠：ACROS

氯化钠：Alfa Aesar

蛋白质分子量标准品：碳酸酐酶 29 kDa、牛血清白蛋白 66 kDa、 $\beta$ -淀粉酶 200 kDa、脱铁蛋白 443 kDa、甲状腺球蛋白 669 kDa，均为粉末，购自 Sigma Aldrich。

#### 1.1.2 仪器

本实验采用岛津 Nexera Bio 生物液相系统，包括 CBM-20A 系统控制器，Nexera Bio LC-20AD<sub>XR</sub> 输送泵，

Nexera Bio SIL-20AC<sub>XR</sub> 自动进样器, Nexera Bio CTO-20AC 柱温箱, SPD-M20A 检测器, LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

色谱柱: Shim-Sen SEC-H 300 (7.8 mm i.d.×300 mm L, 3 μm, 300 Å)

流动相: 150 mM 磷酸缓冲液 -500 mM 氯化钠 (pH=7.0)

流速: 0.5 mL/min

柱温: 30°C

检测波长: 280 nm

进样体积: 10 μL

### 1.3 样品处理

取 80 mg/mL 的 Fc 融合蛋白样品溶液适量, 用水稀释至 5 mg/mL。

## ■ 结果讨论

为确定 Fc 融合蛋白样品多聚体分析的最佳流动相组成, 本实验考察了不同磷酸盐缓冲液浓度、氯化钠浓度及流速变化对分析的影响。

### 2.1 磷酸缓冲盐浓度的选择

离子强度是影响 SEC 方法开发过程中提供色谱柱分离效果的一个重要因素, 为最大限度地降低蛋白质与固定相填料的离子相互作用及二者之间可能存在的吸附作用, 通常需要加入高浓度的盐溶液作为流动相以降低这种作用。本实验考察了 pH 7.0 条件下, 25 mM、50 mM、100 mM 及 150 mM 磷酸缓冲盐与 150 mM 氯化钠组成的流动相对融合蛋白样品中多聚体分析的影响, 以面积归一化法计算多聚体的含量, 分析结果如图 1 和表 1 所示。

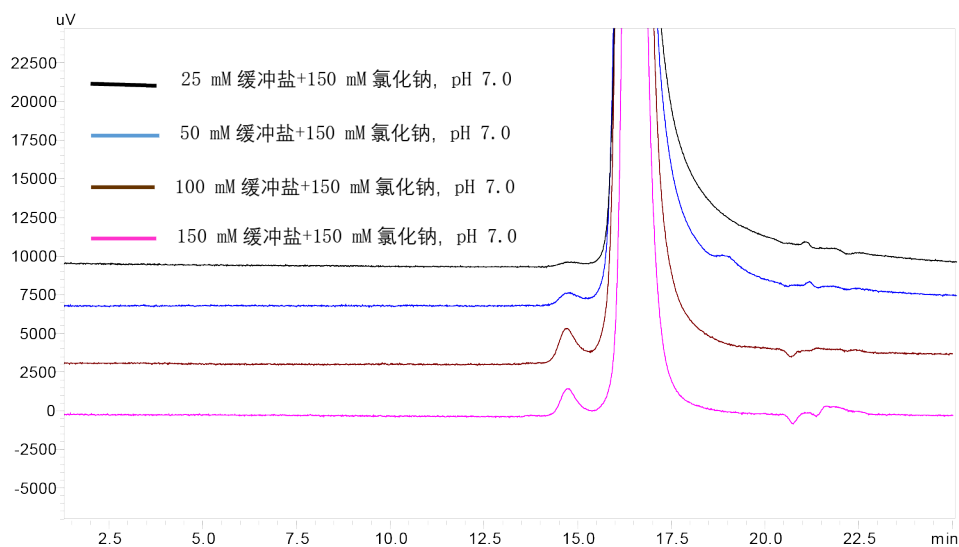


图 1 不同浓度磷酸缓冲盐条件下样品溶液色谱图

表 1 不同浓度磷酸缓冲盐条件样品分析结果

缓冲盐浓度 (mM)	主峰保留时间 (min)	主峰面积 (%)	多聚体峰面积 (%)	主峰理论塔板数	主峰分离度	主峰拖尾因子
25	16.398	100.000	--	4068	--	1.873
50	16.378	99.702	0.298	4453	1.807	1.585
100	16.396	99.102	0.898	4908	1.930	1.369
150	16.470	98.541	1.459	5050	2.027	1.329

从上述实验结果可知，在不同磷酸缓冲盐体系下，Fc 融合蛋白单体峰保留时间基本一致。在 25 mM 的磷酸缓冲盐浓度下，Fc 融合蛋白单体峰拖尾明显，单体峰之前的多聚体未被检出。随着磷酸缓冲盐浓度的增加，单体和多聚体的峰形更加尖锐，单体峰拖尾因子逐渐减小，多聚体的含量逐渐增加，主峰与多聚体峰的分选效果越来越好，故本实验选择 150 mM 作为磷酸缓冲盐的实验浓度。

## 2.2 氯化钠浓度的选择

为降低蛋白样品和固定相之间的非特异性相互作用，通常在流动相体系中加入合适的添加剂如 NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 等。本实验考察了 pH 7.0 条件下，150 mM、300 mM 及 500 mM 氯化钠与 150 mM 磷酸缓冲盐组成的流动相对融合蛋白样品中多聚体分析的影响，分析结果如图 2 和表 2 所示。

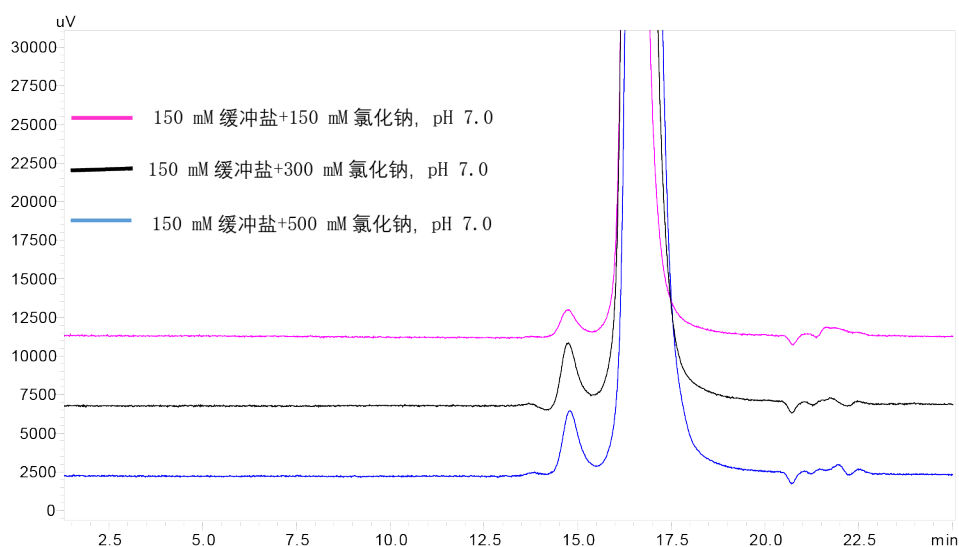


图 2 不同浓度氯化钠条件下样品溶液色谱图

表 2 不同浓度氯化钠条件下样品分析结果

氯化钠浓度 (mM)	主峰保留时 (min)	主峰面积 (%)	多聚体峰面积 (%)	主峰理论塔板数	主峰分离度	主峰拖尾因子
150	16.470	98.541	1.459	5,050	2.027	1.329
300	16.527	98.244	1.756	4,717	2.060	1.382
500	16.649	98.225	1.775	4,488	2.097	1.369

从上述实验结果可知，在不同氯化钠浓度下，Fc 融合蛋白单体主峰保留时间无明显变化。随着氯化钠盐浓度的提高，单体与多聚体的分离度有所提高，故本实验选择 500 mM 氯化钠作为实验浓度。

### 2.3 流速选择

线速度会影响基于蛋白质尺寸分离的分离度。本实验考察了 0.3 mL/min、0.5 mL/min 和 0.8 mL/min 的流速对多聚体分析的影响，分析结果如图 3 和表 3 所示。

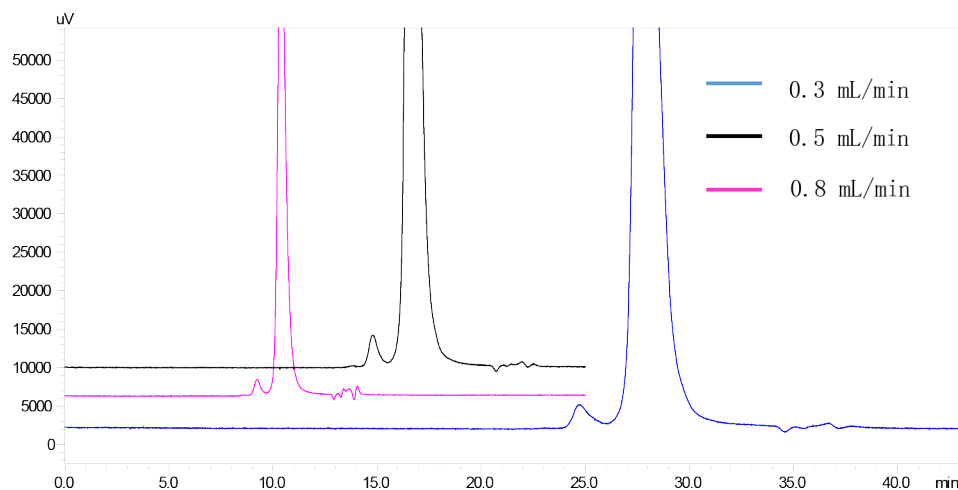


图 3 不同流速条件下样品溶液色谱图

表 3 不同流速条件下样品分析结果

流速 (mL/min)	主峰保留时 (min)	主峰面积 (%)	多聚体面积 (%)	主峰理论塔板数	主峰分离度	主峰拖尾因子
0.3	27.821	98.640	1.360	4851	2.120	1.400
0.5	16.649	98.225	1.775	4488	2.097	1.369
0.8	10.388	98.194	1.806	4031	1.980	1.353

由上述结果可知，随着流速的增加，Fc 融合蛋白单体和多聚体的保留时间提前，多聚体与单体之间的分离度随之下降。低流速有利于多聚体的分离，但色谱峰峰宽增加明显。综合分析效果，本实验选择 0.5 mL/min 的流速作为实验条件。

### 2.4 色谱柱孔径的选择

本实验选择岛津 Shim-Sen SEC-H 系列的色谱柱作为蛋白多聚体分析的体积排阻色谱柱，由于本实验的目的为测定 Fc 融合蛋白样品（约 80kDa）中的多聚体，根据 SEC-H 系列色谱柱的蛋白分离范围（表 4）及待测蛋白的分子量，孔径为 300 的色谱柱为首选色谱柱。在上述选择的色谱条件下，以 Shim-Sen SEC-H 300 分析 5 种不同分子量的标准蛋白（图 4），结果表明，各标准蛋白之间的分离度良好，说明该色谱柱适用于待测样品中多聚体的分析。

表 4 岛津 Shim-Sen SEC-H 化合物分离范围

孔径	蛋白分离范围	水溶性聚合物分离范围
80	<10000	-----
100	100-100000	500-10000
150	500-150000	500-25000
300	5000-1250000	1000-100000

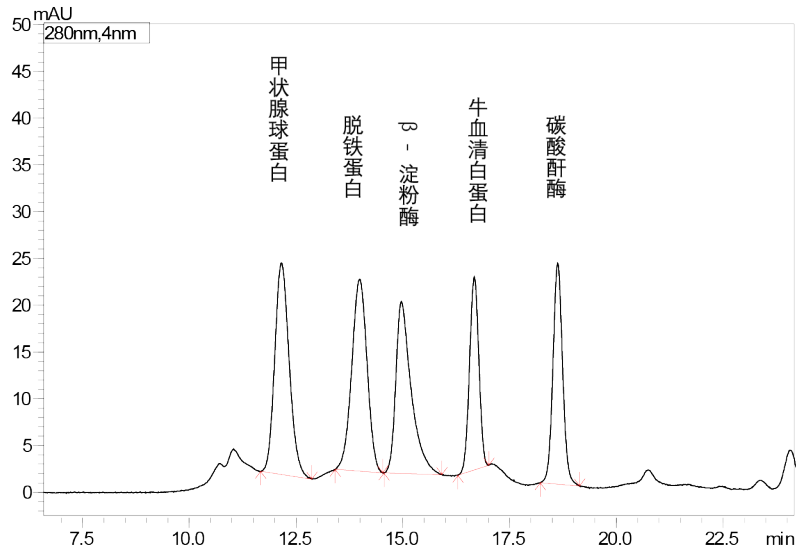


图 4. 标准蛋白 SEC 色谱图

### 2.5 重复性试验

在 150 mM 磷酸钠缓冲液 +500 mM 氯化钠 (pH=7.0) 的流动相、0.5 ml/min 的流速条件, 对 5 mg/mL 的样品溶液重复测定 6 次, 重复性样品典型色谱图及结果如图 5 和表 5 所示。重复测定 6 次, 主峰与多聚体色谱峰分离度无明显变化, Fc 融合蛋白单体保留时间 RSD 为 0.021%, 单体和杂质含量的 RSD 分别为 0.019% 和 1.908%, 重复性良好。

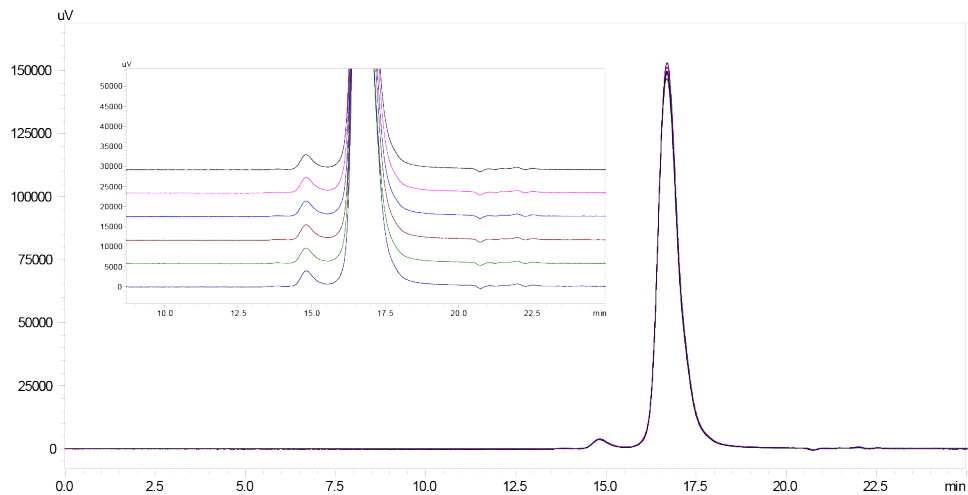


图 5 重复性典型样品色谱图

表 5 重复性实验结果 (n=6)

No.	主峰保留时 (min)	主峰面积 (%)	多聚体面积 (%)	主峰分离度	主峰拖尾因子
1	16.683	98.336	1.664	2.088	1.383
2	16.689	98.346	1.654	2.095	1.359
3	16.687	98.325	1.675	2.090	1.380
4	16.689	98.332	1.668	2.103	1.386
5	16.683	98.295	1.705	2.088	1.382
6	16.692	98.341	1.659	2.119	1.385
RSD (%)	0.021	0.019	1.098	---	---

## ■ 结论

为本实验采用岛津生物液相系统 Nexera Bio 以体积排阻色谱法建立了 Fc 融合蛋白多聚体的分析方法。采用岛津 Shim-Sen SEC-H 300 体积排阻色谱柱, 考察了流动相盐浓度和流速对 Fc 融合蛋白样品多聚体分析的影响。结果表明在 150 mM 磷酸钠缓冲液 +500 mM 氯化钠 (pH=7.0) 的流动相、0.5 ml/min 的流速条件下, 待测样品中的多聚体与单体分离效果良好。另外, 本文分析了待测样品中多聚体分析色谱柱的选择依据, 以 Shim-Sen SEC-H 300 为色谱柱, 样品经 6 次重复测定, Fc 融合蛋白单体保留时间 RSD 为 0.021%, 单体和多聚体含量的 RSD 分别为 0.019% 和 1.908%, 重复性良好。本方法对 Fc 融合蛋白的质量控制具有较好的参考意义。