

# 生物兼容液相色谱仪测定腺相关病毒空壳率

LC-393

**摘要：** 本文采用生物兼容液相色谱仪建立了腺相关病毒空壳率的测定方法。在该测定方法研究中，重点和难点就是优化空衣壳和满衣壳的分离度问题，本实验通过优化色谱条件，可使满衣壳病毒和空衣壳病毒实现了基线分离。重复性实验中，将腺相关病毒样品重复分析 6 次，保留时间 RSD 小于 0.60%，峰面积 RSD 小于 2.00%。实验结果表明，此方法适用于腺相关病毒空壳率分析。

**关键词：** 腺相关病毒 满衣壳病毒 空衣壳病毒 空壳率

## 技术特点：

- ❖ 通过方法流动相梯度优化，实现满衣壳病毒和空衣壳病毒色谱峰基线分离；
- ❖ 本方法重复性良好，可以用于腺相关病毒空壳率的测定。

腺相关病毒 (Adeno-associated virus, 简称 AAV) 因其安全性高，免疫原性低，宿主范围广，表达稳定等特点，被视为最有前途和最受欢迎的基因载体之一。

在腺相关病毒制备过程中，除了含有全长 DNA 基因组的完整 AAV 载体 (满衣壳病毒) 外，有一定比例的 AAV 颗粒不含任何 DNA 基因组，被称为空衣壳病毒。大量空病毒颗粒的存在可能会增加 AAV

载体的免疫原性，增加免疫毒性的风险，或竞争细胞表面受体结合位点、内吞作用及胞内过程，影响 AAV 载体的有效性和安全性。所以在生产质控中，对空壳率 (空衣壳病毒 / 全病毒) 进行快速准确的测定非常重要。

本文以某种 AAV 为例，使用岛津生物兼容液相色谱仪开发了对应 HPLC 分析方法，可用于 AAV 空壳率的测定。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

生物兼容液相色谱仪 Nexera Bio，配置信息如下：

系统控制器：CBM-20A

自动进样器：SIL-20AC XR

脱气机：DGU-20A3R

柱温箱：CTO-20AC

输液泵：LC-20AD XR×2

检测器：RF-20A XS

色谱工作站：Labsolutions Ver. 5.114

### 1.2 分析条件

色谱柱：CIMac™ AAV Empty/Full 0.1 Analytical Column 腺相关完整衣壳分析柱

流动相：A 相：20 mM bis-tris propane (BTP, pH 9.0)

B 相：20 mM bis-tris propane (BTP, pH 9.0) with 1M NaCl

流速：1.0 mL/min

进样体积：1 μL

检测波长：激发波长 280 nm  
发射波长 348 nm

柱温：20°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 0%，时间程序见表 1。

表 1 梯度时间程序

| 时间    | 单元  | 处理命令   | 值  |
|-------|-----|--------|----|
| 1.00  | 泵   | B.conc | 0  |
| 3.00  | 泵   | B.conc | 8  |
| 6.00  | 泵   | B.conc | 8  |
| 7.00  | 泵   | B.conc | 18 |
| 9.00  | 泵   | B.conc | 18 |
| 10.00 | 泵   | B.conc | 40 |
| 12.00 | 泵   | B.conc | 95 |
| 16.00 | 泵   | B.conc | 95 |
| 16.01 | 泵   | B.conc | 0  |
| 18.00 | 控制器 | Stop   |    |

## ■ 结果讨论

### 2.1 方法优化

为了测定 AAV 病毒的准确空壳率，需将满衣壳和空衣壳病毒完全分离。参考文献中流动相梯度条件，如表 2 所示，采集得到了 AAV 病毒色谱图，如图 1 所示。其中峰 1 和峰 2 分别为空衣壳和满衣壳，其分离度为 0.82，未实现基线分离。

表 2 梯度时间程序

| 时间    | 单元  | 处理命令   | 值  |
|-------|-----|--------|----|
| 0.01  | 泵   | B.conc | 0  |
| 1.00  | 泵   | B.conc | 0  |
| 3.00  | 泵   | B.conc | 8  |
| 4.00  | 泵   | B.conc | 20 |
| 7.00  | 泵   | B.conc | 20 |
| 10.00 | 泵   | B.conc | 30 |
| 12.00 | 泵   | B.conc | 95 |
| 16.00 | 泵   | B.conc | 95 |
| 16.01 | 泵   | B.conc | 0  |
| 18.00 | 控制器 | Stop   |    |

为了提高分离度，关键就是找到空衣壳病毒与满衣壳病毒在色谱柱上保留的临界点。在这个临界点浓度下，空衣壳病毒已洗脱，而满衣壳病毒还被保留在色谱柱上。经过计算，空衣壳病毒洗脱时的流动相 B 的比例约为 8%，所以将比例 8% 的保持时间增长至 6 分钟，等空衣壳完全洗脱后，再提高流动相 B 的比例至 18%，满衣壳从色谱柱中洗脱，得到色谱图如图 4 所示。此时两个色谱峰之间分离度为 4.94，实现基线分离。

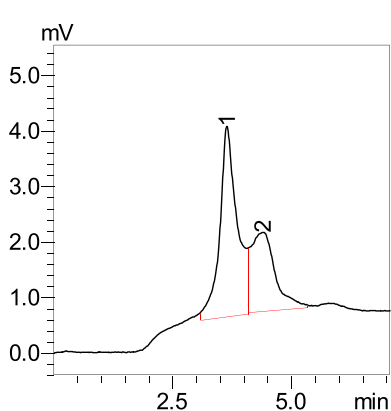


图 1 初始条件下色谱图

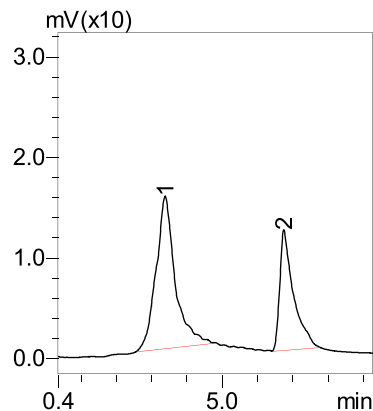


图 2 优化梯度后色谱图

## 2.2 重复性实验

按照 1.2 中条件分析 AAV 病毒，重复进样 6 次，考察方法的重复性。结果显示：空衣壳和满衣壳病毒保留时间 RSD 分别为 0.54%、0.20%，峰面积 RSD 分别为 1.90%、0.87%，重复性良好。同时测得此 AAV 样品平均空壳率为 58.85%。

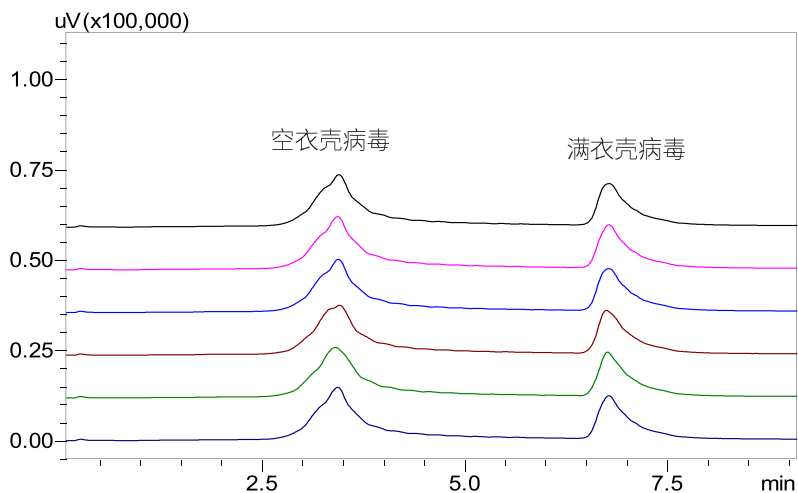


图 3 重复性实验色谱图

表 3 某 AAV 样品空壳率分析结果

| 编号     | 空衣壳病毒      |         | 满衣壳病毒      |         | 空壳率  |
|--------|------------|---------|------------|---------|------|
|        | 保留时间 (min) | 峰面积     | 保留时间 (min) | 峰面积     |      |
| 1      | 3.442      | 451,291 | 6.781      | 319,175 | 58.6 |
| 2      | 3.435      | 447,982 | 6.782      | 315,197 | 58.7 |
| 3      | 3.450      | 448,258 | 6.783      | 312,230 | 58.9 |
| 4      | 3.437      | 448,731 | 6.782      | 317,122 | 58.6 |
| 5      | 3.406      | 467,722 | 6.765      | 317,865 | 59.5 |
| 6      | 3.460      | 463,047 | 6.750      | 319,530 | 59.2 |
| 平均     | 3.438      | 454505  | 6.774      | 316853  | 58.9 |
| RSD(%) | 0.54       | 1.90    | 0.20       | 0.87    | 0.64 |

## ■ 结论

本文采用生物兼相液相色谱仪建立了腺相关病毒空壳率的测定方法。通过优化流动相梯度，满衣壳病毒和空衣壳病毒实现基线分离，测得了准确空壳率，且重复性良好。此方法适用于 AAV 病毒空壳率测定。

岛津应用云

