

生物分子分离

蛋白质分离

蛋白质是复杂的分子，对其进行全面表征需要采用多种技术。蛋白质以三维结构存在，并且这些结构决定了其生物活性。

氨基酸链的序列决定了蛋白质的一级结构。一级结构氨基酸之间形成的氢键使蛋白质形成了二级结构，一般为 α 螺旋和 β 折叠。二级结构区域之间进一步发生一系列氢键、离子、疏水和二硫键相互作用，即形成三级蛋白质结构或三维构象。如果蛋白质由许多氨基酸链组成，那么这些链之间的相互作用形成四级结构。

因此，从图1可以清楚地看出，要表征天然状态的蛋白质，需要不破坏其三级结构和四级结构。而测定一级氨基酸序列时，需要破坏其三维结构，在蛋白质完全变性状态下进行分析。

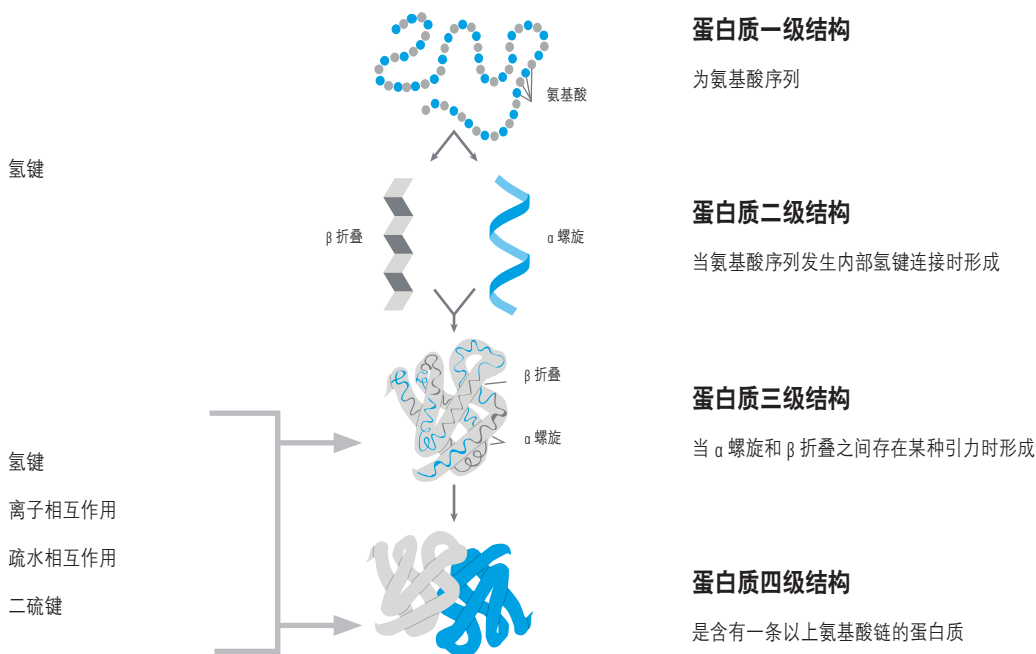


图 1. 蛋白质多级结构示意图

蛋白质的环境可能影响、稳定或破坏其结构。需要考虑的因素包括 pH、温度、盐浓度、水或有机溶剂的含量。对某些蛋白质来说，还存在起稳定作用的小分子或金属离子。蛋白质结构还可能因使用破坏二硫键的巯基还原剂或者尿素或盐酸胍等变性剂而被破坏。除内在的复杂性以及决定其三维结构的分子内相互作用以外，蛋白质分子与其他分子以及它们所接触的表面之间还存在分子间缔合。这些相互作用可能导致蛋白质络合、聚集（可能发生沉淀）以及在表面（包括 HPLC 色谱柱和系统的表面）上沉积。因此，应考虑蛋白质的处理和保存环境。

蛋白质分析色谱柱选择指南

应用	技术	安捷伦色谱柱	备注
一级结构分析	UHPLC/HPLC 反相分离	AdvanceBio RP-mAb PLRP-S ZORBAX RRHD 300 Å Poroshell 300 Å ZORBAX 300 Å AdvanceBio 肽谱分析专用柱 AdvanceBio Peptide Plus分析柱	反相分离需要（或引起）蛋白质变性，以获得关于氨基酸序列和氨基酸修饰（包括翻译后修饰）的详细信息。
电荷异构体分析	离子交换分离	Agilent Bio IEX Agilent Bio MAb PL-SAX PL-SCX	各氨基酸的比例决定了蛋白质分子的静电荷。静电荷为零的 pH 值称为等电点 (pI)。当溶液 pH 低于 pI 时，蛋白质带正电荷（酸性）；当溶液 pH 高于 pI 时，蛋白质带负电荷（碱性）。对于离子交换分析，我们建议洗脱剂 pH 至少高于或低于其 pI 一个 pH 单位。使用离子交换柱分析蛋白质，需要使用缓冲流动相，以及进行盐梯度洗脱或者 pH 梯度洗脱。
聚集体与片段分析	体积排阻分离	AdvanceBio SEC Bio SEC-3 Bio SEC-5	蛋白质生物药物的聚集体形成是一个重要问题，因为其可能引发免疫原性反应，并影响最终制剂的组成。
糖基化表征	亲水相互作用色谱	AdvanceBio 糖谱分析柱 ZORBAX RRHD 300 HILIC	由于免疫原性和生物治疗药物的安全性的影响，了解蛋白质和 mAb 的糖基化和多聚糖结构越来越重要。HILIC 色谱可保留样品的亲水性部分，从而为反相色谱柱提供正交信息。
滴度测定	亲和分离	Bio-Monolith rProtein A Bio-Monolith Protein A Bio-Monolith Protein G	在投入高成本进行前处理以及使用大量 Protein A 色谱柱之前，若想要对细胞培养上清液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。

曲妥珠单抗 IgG1 变异体的快速高分离度分离

色谱柱: AdvanceBio RP-mAb C4
795775-904
2.1 × 100 mm, 3.5 μm

流动相: A: 含 0.1% TFA 的水:异丙醇 (98:2)
B: IPA:ACN:流动相 A (70:20:10)

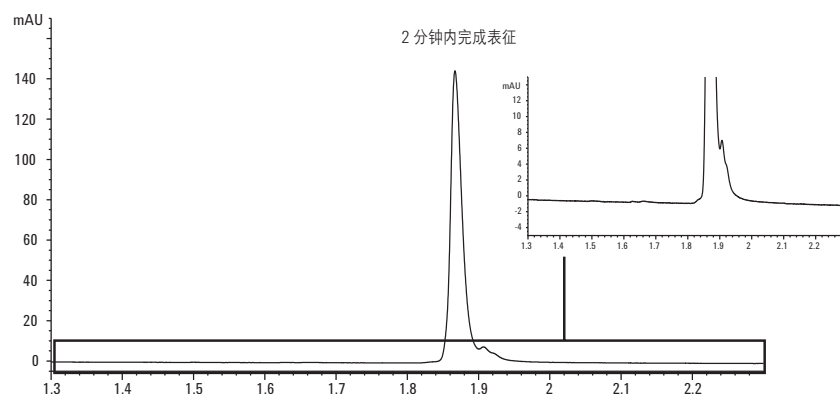
流速: 1.0 mL/min

梯度: 4 min 内 B 由 10% 升至 58%, 以 95% B 淋洗 1 min, 并以 10% B 再平衡 1 min

柱温: 80 °C

检测器: UV, 254 nm

样品: 5 μL 完整人源化重组曲妥珠单抗变异体 IgG1 (1 mg/mL), 购自 Creative Biolabs



AdvanceBio RP-mAb C4 柱提供尖锐的峰形, 可在 2 分钟内使分析物实现完美分离。

更高分离度的氧化

色谱柱: ZORBAX RRHD 300SB-C18
857750-902
2.1 × 50 mm, 1.8 μm

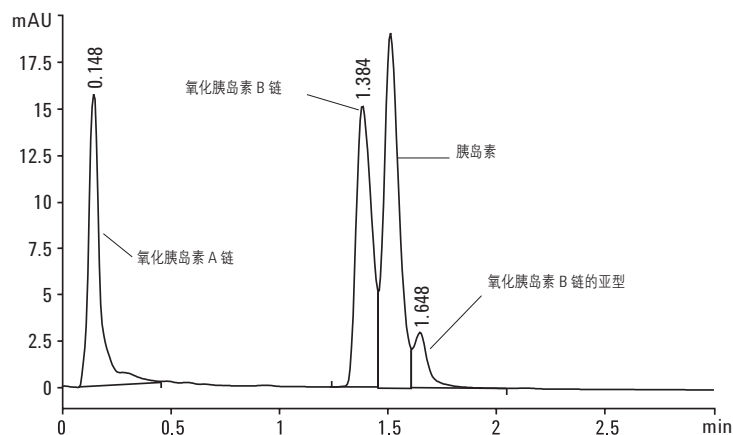
流动相: A: 0.1% TFA
B: 0.01% TFA + 80% ACN

流速: 1.0 mL/min

梯度: 0 至 4 min, B 由 33% 升至 50%

检测器: 1290 Infinity 液相色谱系统, 配备二极管阵列检测器, 检测波长 280 nm

样品: 胰岛素、胰岛素 A 链和 B 链、氧化型 (BSA, Sigma-Aldrich, Corp., 1 mg/mL)



使用 ZORBAX RRHD 300SB-C18 (2.1 × 50 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 可在两分钟内从胰岛素中分离出氧化胰岛素链。

完整 mAb 单体和二聚体的分离

色谱柱: **Bio SEC-3, 300 Å**
5190-2511
7.8 × 300 mm, 3 μm

流速: 1.0 mL/min

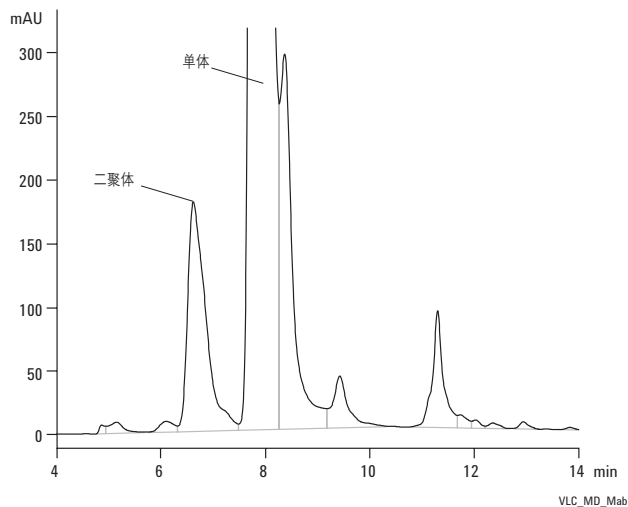
进样量: 5 μL

柱温: 室温

检测器: UV, 220 nm

缓冲液: 磷酸钠缓冲液, 150 mmol/L, pH 7.0

等度: 0 至 30 min, 缓冲液由 0 升至 100%



技巧和工具

安捷伦完全了解您所做的极其复杂且费力的工作。我们可以为您提供帮助。更多信息可参见[生物制药工作流程解决方案: 安捷伦如何有效解决复杂的分析挑战](#) (出版号 5991-5235CHCN)。

用盐梯度分离人 IgG1 电荷异构体

色谱柱: **Bio MAb, PEEK**
5190-2407
4.6 × 250 mm, 5 μm

流动相: A: 10 mmol/L Na₂HPO₄, pH 5.5
 B: A + 0.5 mol/L NaCl

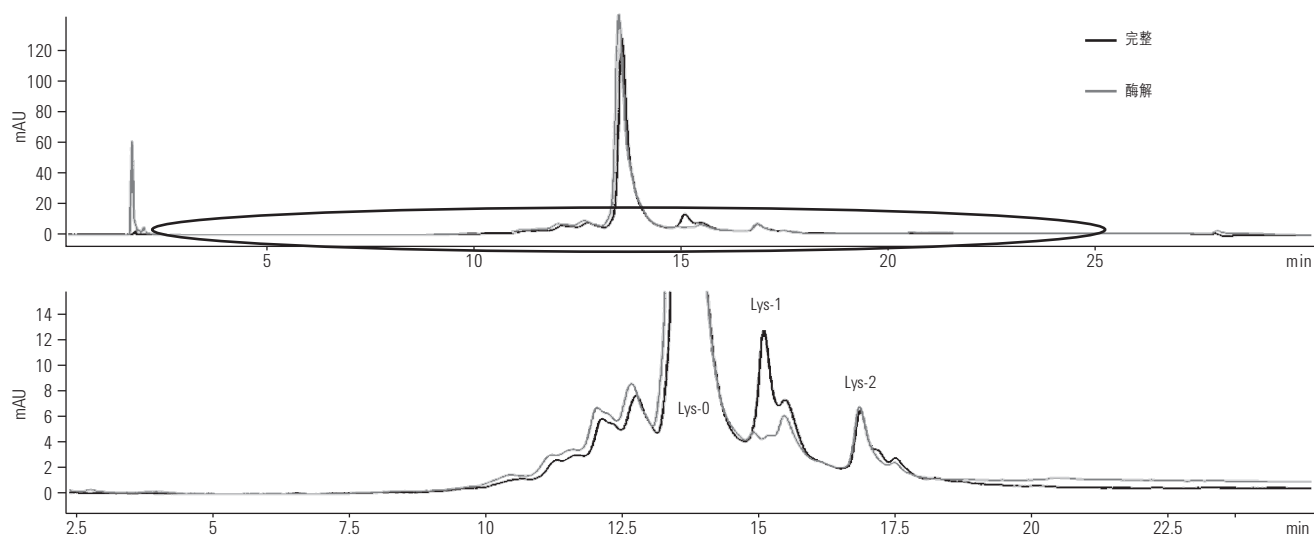
流速: 0.85 mL/min

梯度: 0 至 25 min, B 由 10% 升至 35%

检测器: UV, 225 nm

仪器: 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱或 1100 系列液相色谱系统

样品: 5 μL 1 mg/mL 完整或 C 端酶解的 IgG1



使用 Agilent Bio MAb 5 μm 色谱柱分离完整和 C 端酶解的 IgG1。

对 CHO 细胞上清液中的 IgG1 进行滴度测定

色谱柱: **Bio-monolith Protein A**
5069-3639
5.2 × 4.95 mm

流动相: A: 50 mmol/L 磷酸盐, pH 7.4
 B: 100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.8

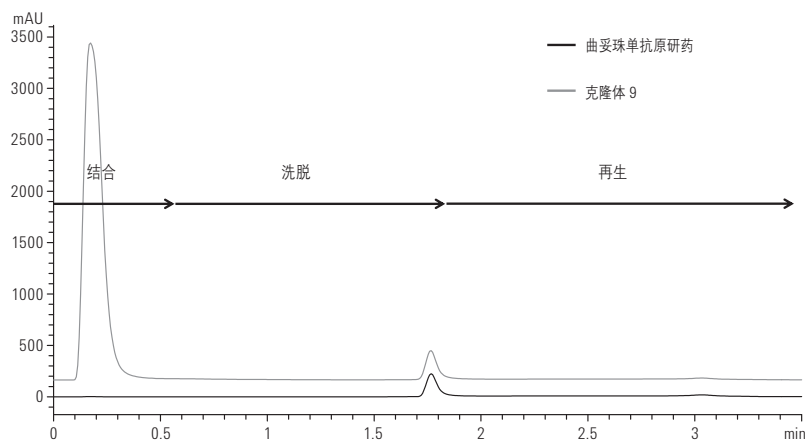
流速: 1 mL/min

梯度: **时间 (min) % B**
 0-0.5 0 (结合)
 0.6-1.7 100 (洗脱)
 1.8-3.5 0 (再生)

进样量: 50 μ L

检测器: UV, 280 nm

馏分收集: 基于时间



采用 AdvanceBio Bio-Monolith Protein A 得到的由曲妥珠单抗产生的 CHO 克隆体 (克隆体 9) 以及用 50 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.4) 稀释至 0.2 mg/mL 的曲妥珠单抗原研药的色谱图。请注意, 用磷酸盐缓冲液按 1:1 的比例对上清液进行稀释。