

CE-SDS-LIF方法对单抗药物的纯度分析（5-TAMRA标记）

Purity Analysis of Monoclonal Antibodies (5-TAMRA Labeling) by CE-SDS-LIF

王文涛, 高铁, 张晓霞, 陈泓序

Wang Wentao, Gao Tie, Zhang Xiaoxia, Chen Hongxu

SCIEX, 中国

SCIEX, China

Keywords: Monoclonal antibodies; 5-TAMRA; CE-SDS-LIF;

前言

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（CE-SDS）从2015年写入中国药典以来，被各大生物制药公司广泛用于治疗性单抗产品的分析表征、过程开发和质量控制¹。在常规的CE-SDS实验中，依据蛋白本身的紫外吸收而分析的紫外/二极管阵列检测器（检测波长为214 nm或220 nm）被广泛应用于蛋白药的纯度分析。为了满足用户对低含量杂质的分析，通过对蛋白进行荧光标记，借助于激光诱导荧光检测器（LIF）可以有效提高检测灵敏度，改善基线的平整度，有利于积分，保证获得更加真实的纯度信息。本文详细介绍了使用荧光染料5-羧基四甲基罗丹明-琥珀酰亚胺酯（5-TAMRA）对单克隆抗体进行标记的过程，并结合LIF检测器对标记后的单抗样品进行了纯度分析。

2. 仪器及试剂

2.1. 仪器

SCIEX PA 800 Plus，配备LIF检测器（激发波长488 nm，发射波长560 nm），32 Karat™软件10.1（SCIEX）；离心机（Biofuge，Thermo）；分析天平、pH计（型号660，Beckman Coulter®）；

2.2. 试剂及耗材

SDS-MW Gel Buffer（SCIEX, PN A30341），荧光素校准溶液（SCIEX, PN726022），通用瓶（SCIEX, PN A62251），通用瓶盖（SCIEX, PN A62250），0.2 mL微量样品瓶（SCIEX, PN 144709）。其他试剂和耗材参考附录1。

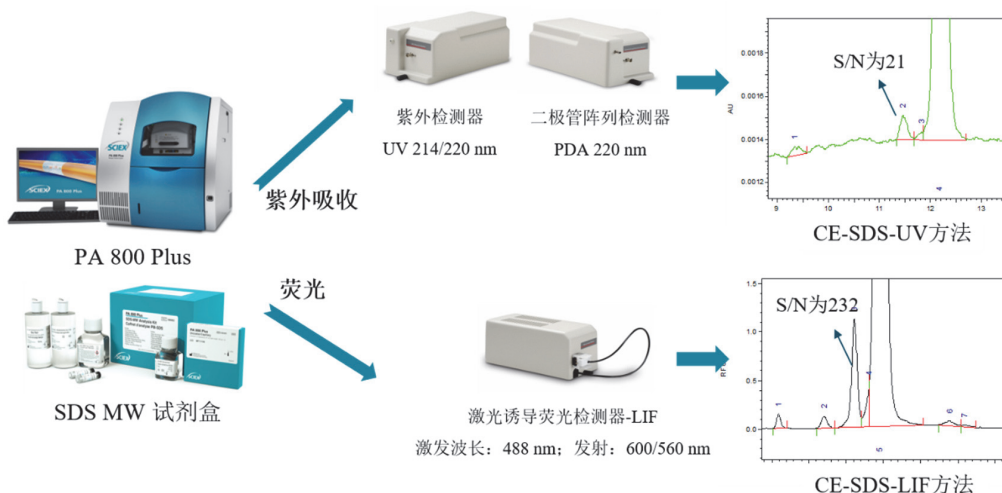


图1. 生物药纯度分析的CE-SDS方法。

3. 样品准备(~2.5小时)

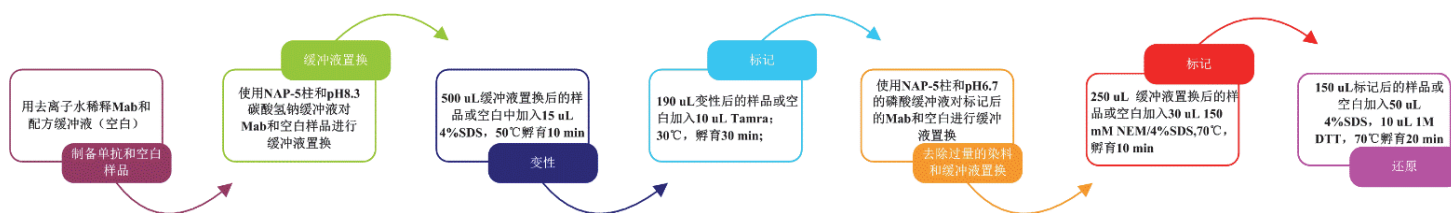


图2. 单抗样品CE-SDS-LIF纯度分析的前处理流程。

3.1. 试剂准备

(注: 可根据实验样品数目调整以下步骤, 但必须保持浓度不变。)

3.1.1. 标记反应缓冲液 (0.1 M碳酸氢钠, pH 8.3)

- 称取4.2 g碳酸氢钠转移到500 mL容量瓶中;
- 加入250 mL 双蒸水 (DDI) 水并用磁力搅拌棒搅拌至完全溶解;
- 取出搅拌棒, 加水定容至500 mL, 确认pH值为 8.3 ± 0.2 ;
- 使用0.2 μm 尼龙过滤器过滤;
- 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存, 保质期1周;

注: 如果pH超出范围, 请勿调节pH值, 请重新配置溶液;

3.1.2. 0.1 M磷酸缓冲液, pH 6.7

3.1.2.1 制备0.2 M磷酸二氢钠

- 称取2.76 g磷酸二氢钠倒入含有50 mL DDI水的100 mL容量瓶中;
- 搅拌至溶解;
- 用DDI水定容至100 mL;
- 用0.2 μm 过滤器过滤;
- 注明制备日期, 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存;

3.1.2.2 准备0.2 M磷酸氢二钠

- 称取2.84 g倒入含有50 mL DDI水的100 mL容量瓶中;
- 搅拌至溶解;
- 用DDI定容至100 mL;

d. 通过0.2 μm 过滤器过滤;

e. 注明制备日期, 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存;

3.1.2.3 在250 mL带刻度的玻璃烧杯中, 将38.25 mL的0.2 M磷酸二氢钠溶液与36.75 mL的0.2 M磷酸氢二钠混合。使用1 mL枪头用DDI水定容至150 mL。

3.1.2.4 验证pH为6.7 +/- 0.1。

3.1.2.5 使用0.22 μm 过滤器过滤, 注明制备日期, 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存, 保质期2个月。

注意pH的测量, 不要滴定调节pH值, 如果pH值超出指定范围, 请重新制备缓冲液各组分。

3.1.3. 4% SDS溶液

- 将60 mL DDI水加入到250 mL烧杯中;
- 放入磁力搅拌棒;
- 称取4 g SDS, 倒入装有水的烧杯中;
- 搅拌直至完全溶解;
- 用DDI水定容至100 mL;
- 用0.22 μm 过滤器过滤, 注明制备日期, 室温保存, 保质期3个月。

3.1.4. TAMRA标记染料储备液

- 在含有冻干5-TAMRA的小瓶中, 加入3.6 mL二甲亚砜 (DMSO);
- 涡旋溶解;
- 每50 μL 分装到棕色瓶中, 盖上盖子;

- d. 做好标记；
- e. 保存在-15~-35 °C范围的冷冻箱中；
- f. 标注制备日期，保质期1年；

注意：使用前，立即制备并始终避光；

- a. 取一瓶50 μ L 5-TAMARA 标记染料储备液；
- b. 加入366 μ L DMSO；
- c. 混匀后立即使用，丢弃未使用的溶液；

3.1.6. 1 M二硫苏糖醇 (DTT) (需新鲜制备)

- a. 将1.5 mg DTT加入到1.5 mL微量离心管中；
- b. 用DDI水定容至1 mL；
- c. 涡旋溶解；
- d. 立即使用，丢弃剩余溶液。

3.1.7. 150 mM N-乙基马来酰亚胺 (NEM, 溶在4% SDS溶液)

- a. 称取0.185 g NEM；
- b. 溶于约1.2 mL 4% SDS溶液中；
- c. 室温储存，保质期1周。

3.2. 样品制备

1 mg/mL NIST样品制备：取50 μ L 10 mg/mL 的NIST标准品，加入450 mL DDI水。对于其他抗体样品，需保证样品终浓度约为1.0 mg/mL，最终样品体积至少为500 μ L。

空白样品制备：用DDI水稀释配方缓冲液，稀释倍数与抗体样品相同，现配现用。

3.3. 样品缓冲液置换

当配方缓冲液中含有胺时，如Tris、组氨酸，需对样品进行脱盐处理。

3.3.1. NAP-5柱平衡 (~30分钟) :

- a. 取2个NAP-5柱，分别对应NIST抗体和空白样品（用配方缓冲液代替）；
- b. 将2个NAP-5柱放在支架上，并各对应一个烧杯用于收集洗脱液；

- c. 将NAP-5柱的顶盖和底盖取下；
- d. 丢弃NAP-5柱中的保护液；
- e. 从NAP-5柱的顶部加入2 mL pH 8.3的碳酸氢盐缓冲液；
- f. 让缓冲液透过NAP-5柱，丢弃洗脱液；
- g. 重复步骤e~f 各5次。

注：并非所有NAP-5柱都有相同的流速，有时流速不同，是正常的。

3.3.2. NIST抗体和空白样品脱盐 (10分钟) :

- a. 标注每个NAP-5柱，分别为NIST抗体和空白样品；
- b. 分别向2个NAP-5柱中各加入500 μ L NIST抗体样品和500 μ L空白样品；
- c. 让溶液透过脱盐柱，丢弃洗脱液；
- d. 在NAP-5柱下放置一个新的小瓶（1.5 mL离心管）；
- e. 加入1.0 mL pH 8.3碳酸氢盐缓冲液，立即将洗脱液收集到一个样品瓶中；
- f. 标注好每个小瓶，样品必须立即使用。

3.4. 样品变性

- a. 取出脱盐后的抗体或空白样品各500 μ L，分别加入15 μ L的4% SDS，使最终的SDS浓度达到0.1%。
 - b. 轻轻混合并在50 °C下加热10分钟；
- 重要提示：将水浴加热至50 \pm 3 °C，并在加热样品和空白前至少30分钟检查温度稳定性。

3.5. 样品标记

3.5.1. 样品标记

- a. 将190 μ L缓冲液置换后的样品转移到1.5 mL微量离心管中；
- b. 加入10 μ L 5-TAMRA荧光染料工作溶液；
- c. 短暂涡旋；
- d. 旋转下来；
- e. 对于空白样品，重复步骤a~d；
- f. 将样品和空白在30 °C +/- 3 °C，孵育30分钟；

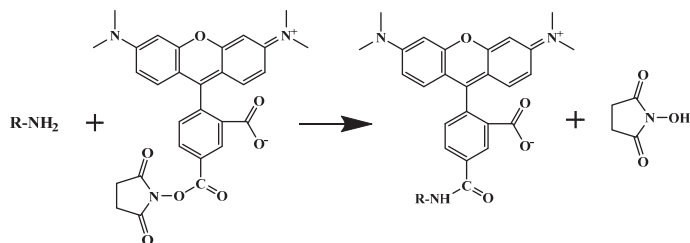


图3.5-TAMRA标记反应原理。

3.5.2. 去除染料 (样品在30 °C处标记时执行此步骤)

3.5.2.1. NAP-5柱平衡 (~30分钟) :

- 取2个NAP-5柱, 分别对应样品和空白样品 (用配方缓冲液代替);
- 将每个NAP-5柱放在支架上, 并各对应一个烧杯用于收集洗脱液;
- 每个NAP-5柱取下顶盖和底盖;
- 丢弃NAP-5柱中的保护液;
- 在每个NAP-5柱的顶部加入2 mL pH 6.7的磷酸盐缓冲液;
- 让缓冲液渗透NAP-5柱, 丢弃洗脱液;
- 重复e和f各5次。

3.5.2.2. NIST抗体和空白样品染料去除以及缓冲液置换 (~10分钟) :

- 标注2个NAP-5柱分别为NIST抗体和空白样品;
- 分别向2个NAP-5柱中各加入190 μ L的NIST抗体样品和空白样品;
- 让样品透过NAP-5柱, 丢弃洗脱液;
- 加入400 μ L pH 6.7的磷酸盐缓冲液, 丢弃洗脱液;
- 在每个NAP-5柱下放置1.5 mL微量离心管;
- 加入700 μ L pH 6.7磷酸盐缓冲液, 每一滴洗脱液收集一瓶;
- 做好标记, 样品需立即使用;

3.6. 样品制备

3.6.1. 非还原样品制备

非还原样品的制备步骤:

- 将250 μ L缓冲液置换后的样品和空白样品分别加入到1.5 mL Eppendorf管中。
- 加入30 μ L 4% SDS/150 mM NEM溶液并短暂涡旋。
- 在70 \pm 2 °C水浴中孵育5 \pm 1分钟。
- 冷却至室温并将120 μ L样品和空白转移至PA 800 Plus样品瓶中。
- 准备好的样品可进行非还原CE-SDS-LIF分析。

3.6.2. 还原样品制备

样品/SDS络合物和二硫键还原步骤:

- 转移150 μ L标记后单抗样品和空白样品;
- 加入50 μ L的4% SDS溶液;
- 添加10 μ L的1 M DTT溶液;
- 涡旋短暂混合并旋转;
- 在70 °C下孵育20分钟;
- 冷却至室温并转移至PA 800 Plus样品瓶中;
- 准备好的样品可进行还原CE-SDS-LIF分析;

4. 仪器准备、分离和分析方法

4.1. 仪器准备

- LIF检测器和激光光源安装: 按照PA 800 Plus和系统维护指南中的步骤进行操作;
- LIF检测器校准: 按照PA 800 Plus和系统维护指南中的步骤进行操作;
- 创建项目: IgG-LIF项目, 按照PA 800 Plus和系统管理指南中的步骤进行操作;
- 创建IgG-LIF仪器: 按照PA 800 Plus系统维护指南中的步骤进行操作;
- 准备缓冲液托盘: 按照IgG纯度和异质性分析指南的程序, 了解运行的样品数;

4.2. PA 800 Plus的CE-SDS-LIF分离方法

毛细管电泳初始化条件设置: 最大电压为30 kV, 最大电流为300 μ A, 毛细管温度为40 °C, 样品保存温度为20 °C。

Initial Conditions * LIF Detector Initial Conditions Time Program								
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments	
1	Rinse - Pressure	20.0 psi	10.00 min	BI:D1	BO:D1	reverse	0.1 N NaOH rinse to clean capillary surface	
2	Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:E1	BO:E1	reverse	0.1 N HCl rinse to neutralize capillary surface silanol group	
3	Rinse - Pressure	20.0 psi	2.00 min	BI:F1	BO:F1	reverse	Water rinse to remove the acid residue	
4	Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	reverse	SDS -MW Gel Buffer rinse to fill the capillary	
5	Separate - Voltage	15.0 KV	10.00 min	BI:C1	BO:C1	5.00 Min ramp, normal polarity, both	SDS-MW Gel buffer voltage equilibration	
6								

图4. 毛细管平衡方法

Initial Conditions * LIF Detector Initial Conditions Time Program								
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments	
1	Rinse - Pressure	70.0 psi	3.00 min	BI:D1	BO:D1	reverse, In / Out vial inc 16	0.1 N NaOH rinse to clean capillary surface - Automatic incr	
2	Rinse - Pressure	70.0 psi	1.00 min	BI:E1	BO:E1	reverse, In / Out vial inc 16	0.1 N HCl rinse to neutralize capillary surface silanol group -	
3	Rinse - Pressure	70.0 psi	1.00 min	BI:F1	BO:F1	reverse, In / Out vial inc 16	Water rinse to remove the acid residue - Automatic increme	
4	Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	reverse, In / Out vial inc 16	SDS Gel rinse to fill the capillary with SDS gel - Automatic in	
5	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 16	ddH2O, use for dipping to clean capillary tip - Automatic incr	
6	Wait		0.00 min	BI:A4	BO:A4	In / Out vial inc 16	ddH2O, use for dipping to clean capillary tip - Automatic incr	
7	Inject - Voltage	5.0 KV	20.0 sec	BI:C1	SO:A1	Overide, normal polarity	Sample injection	
8	Wait		0.00 min	BI:B4	BO:B4	In / Out vial inc 16	ddH2O, use for dipping to avoid sample carry over - Automa	
9	Separate - Voltage	15.0 KV	40.00 min	BI:C1	BO:C1	1.00 Min ramp, normal polarity, both, I	SDS Gel for separation - Automatic increment every 16 runs	
10	Autozero							
11								

图5. 分离方法

Initial Conditions * LIF Detector Initial Conditions Time Program								
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments	
1	Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:D1	BO:D1	reverse	0.1 N NaOH rinse to clean capillary surface	
2	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:E1	BO:E1	reverse	0.1 N HCl rinse to neutralize capillary surface silanol group	
3	Rinse - Pressure	50.0 psi	2.00 min	BI:F1	BO:F1	reverse	Water rinse to remove the acid residue	
4	Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	reverse	SDS Gel rinse to fill the capillary	
5	Separate - Voltage	15.0 KV	10.00 min	BI:C1	BO:C1	5.00 Min ramp, normal polarity, both	SDS Gel for separation	
6	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1		Water used for capillary dip to prevent capillary from drying	
7	Laser - Off							
8								
9	End							

图6. 关机方法

LIF检测器条件设置：LIF动态范围为100 RFU，激发波长为488 nm，发射波长为560 nm，采集频率为0.5 Hz。过滤器设置为“Normal”，峰宽采集点设置为16-25。使用直接吸收进行检测。

5. 实验结果

如图7上和下分别为5-TAMRA标记的NIST标准品在还原和非还原条件下的电泳谱图。在还原状态下，CE-SDS-LIF的方法非糖基化重链和糖基化重链分离度分别为1.86，还原状态下的纯度分析为96.90%。在非还原状态下，CE-SDS-LIF的方法纯度分别为96.76%。CE-SDS-LIF方法对于碎片、LC、HC、HL、HH以及HHL的响应更高；基线更加平整，便于更好的自动积分，有助于纯度的准确分析，便于得到更加真实的纯度信息。

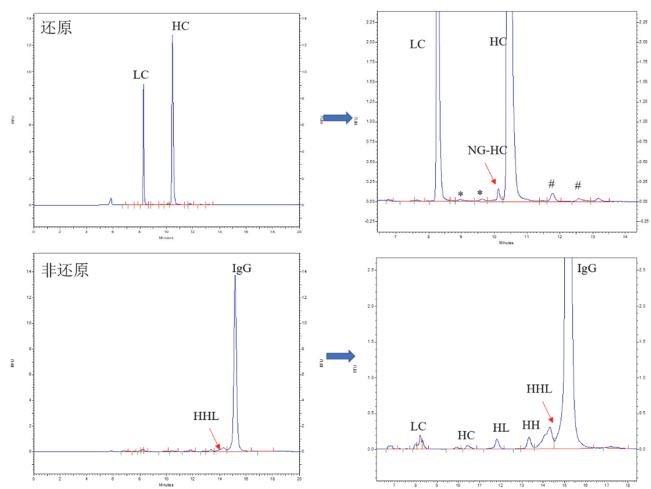


图7. NIST抗体的还原和非还原型CE-SDS-LIF分析电泳图；激发波长488 nm，发射波长560 nm，NIST终浓度为0.2 mg/mL。

6. 结论:

CE-SDS-LIF方法进行单抗的纯度分析, 具有如下优点:

- 检测灵敏度高, 有助于对低含量杂质的检测和纯度的准确分析;
- 基线更加平整, 便于自动积分和定量;
- 有效帮助生物药企业提升检测标准和产品的质量控制;

参考文献

1. Optimization and Validation of a Quantitative Capillary electrophoresis Sodium dodecyl Sulfate Method for Quality Control and Stability monitoring of Monoclonal Antibodies; O. Salas-Solano, B. Tomlinson, S. Du, M. Parker, A. Strahan, S. Ma; Anal. Chem. 2006, 78, 6583-6594.

附录 1 CE-SDS-LIF (5-TAMRA标记) 实验其他试剂和耗材。

试剂	制造商	货号
十二烷基硫酸钠 (SDS)	JT Baker	PN 4095-04
磷酸二氢钠 (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich	PN S9638-25 g
磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich	PN S0876-500g
碳酸氢钠 (NaHCO ₃) ACS级别	Sigma-Aldrich	PN S-6014
NIST抗体参考物质	NIST	PN RM8671
二甲基亚砜 (DMSO)	Sigma-Aldrich	PN 154938 或同等产品
5-TAMRA, SE, 单一异构体	Invitrogen	PN C2211
pH校准标准品	VWR	PN BK566575
D,L-二硫苏糖醇, ≥98% HPLC	Sigma-Aldrich	PN 43815-1G
N-乙基马来酰亚胺 (NEM)	Sigma-Aldrich	PN E3876-25G或同等产品
Illustra NAP-5色谱柱, <0.5 mL	GE Life Sciences	PN 17085302
光敏低温储存盒	VWR	PN 80081-597或同等产品
精密级刻度量筒, 250 mL	VWR	S13746或同等产品
精密级刻度量筒, 250 mL	VWR	10545-960或同等产品
250 mL过滤器, 0.22 mm过滤器	VWR	PN#10040-464
1.25 mL棕色玻璃瓶, 带盖	VWR	PN 10798-846

注: 以上列出的大多数项目均为建议的供应商, 同等条件下, 可选用其它替代产品。除非另有说明, 请遵循储存条件和有效使用期。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息, 请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标的所有权, 归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。AB SCIEX™ 商标经许可使用。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-11342-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)