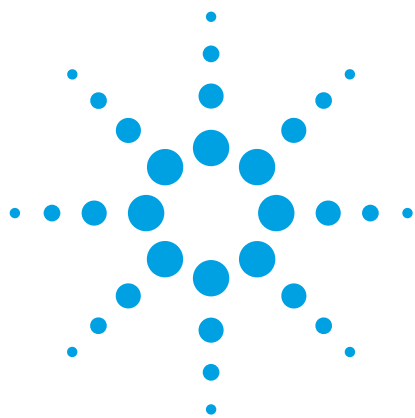




Agilent Bio SEC 柱用于生物分子表征的孔径优化

应用简报

生物制药

作者

Keeley Mapp
安捷伦科技公司

前言

尺寸排阻色谱 (SEC) 是一项使用水相洗脱液基于分子天然形态尺寸来分离蛋白质、寡核苷酸和其它复杂生物聚合物的技术。对于离散分子量的分子，例如蛋白质，可以用 SEC 对其单体、二聚体、聚集体和片段进行检测和定量。

孔径选择

填料孔径的选择将影响 SEC 的分离度。由于分离是基于溶液中分子大小的差异，所以样品必须能够进入到填料的多孔结构中。如果孔径太小，样品组分都被排阻在孔隙之外，将在死体积内被洗脱，而如果孔径太大，各组分都能完全渗透到填料孔隙中，将很难实现分离。本应用简报利用 Agilent Bio SEC-3 HPLC 色谱柱，展示了孔径对分离蛋白质和抗体的影响。该型色谱柱有 100Å、150Å 和 300Å 孔径可供选择，适用于大多数多肽和蛋白质的尺寸排阻分离。

蛋白质分离

本实验中，我们使用了涵盖重组生物药物典型特性范围的标准蛋白质混合物。

条件

色谱柱	Agilent BioSEC-3 100Å, 4.6 x 300 mm, 3 μm (部件号 5190-2503) Agilent BioSEC-3 150Å, 4.6 x 300 mm, 3 μm (部件号 5190-2508) Agilent BioSEC-3 300Å, 4.6 x 300 mm, 3 μm (部件号 5190-2513)
样品	Bio-Rad 蛋白质混合标样
洗脱液	100 mM 磷酸钠缓冲液 + 0.15 M NaCl, pH 6.8
流速	0.35 mL/min
检测器	紫外检测器, 220 nm
系统	Agilent 1260 生物惰性四元液相色谱系统

表 1 列出了蛋白质测试混合物的组分。图 1 中所示为三种不同孔径色谱柱获得的分离结果。100Å 色谱柱排阻了较大的球状蛋白质（甲状腺球蛋白及其聚集体和丙种球蛋白），因此只适合分析分子量小于 100000 的蛋白质。

表 1. 峰识别和标准蛋白质混合物的分子量

峰号	名称	分子量
1	甲状腺球蛋白聚集体	
2	甲状腺球蛋白	670000
3	IgA	320000
4	IgG（丙种球蛋白）	158000
5	卵清蛋白	44000
6	肌红蛋白	17000
7	维生素 B12	1355

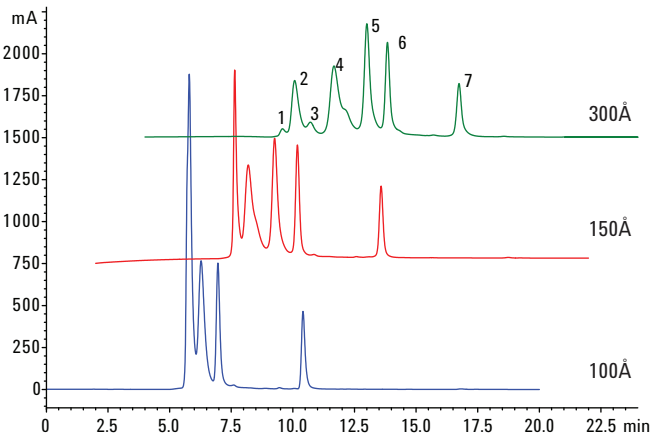


图 1. 使用三种不同孔径 Agilent BioSEC-3 色谱柱分离标准蛋白质混合物的分离结果对比。100Å 和 150Å 色谱柱显示了对较大蛋白质的排阻。注意观察 300Å 孔径色谱柱给出的甲状腺球蛋白及其聚合物的分离度，以及 IgA 和 IgG 的峰间分离度

150Å 色谱柱对位于卵清蛋白和肌红蛋白分子量间的蛋白质具有非常好的分离度（表 2），唯一排阻在外的是高分子量甲状腺球蛋白。300Å 色谱柱能分离样品内所有的蛋白质。

表 2 中所示为不同孔径下各蛋白质间的分离度因子。通过此表，您可以在选择最适合具体应用的色谱柱的过程中做出明智的决定。

表 2. 蛋白质混合物分离所得的分离度因子

填料	分离度因子		分离度因子		分离度因子	
	甲状腺球蛋白/ 甲状腺球蛋白 聚集物	分离度因子 IgA/甲状腺球 蛋白	分离度因子 IgG/IgA	分离度因子 卵清蛋白/IgG	分离度因子 肌红蛋白/ 卵清蛋白	分离度因子 维生素 B12/ 肌红蛋白
100Å	*	*	*	1.17	1.87	12.94
150Å	*	*	1.28	2.02	2.59	11.66
300Å	0.93	1.06	1.38	2.32	2.19	8.24

* 无分离度，被排阻
斜体数字是通过排阻峰的保留时间获得

抗体的分离

在本实验中，我们使用了小鼠 IgG 样品来评估各孔径对分析单体及其二聚体组分的适用性。蛋白质生物药物中存在的聚集体的尺寸、类型和数量，可能对药效和制剂产生影响，更坏情况下，将引起免疫反应。聚集体的形成有各种机制，包括形成二硫键和发生非共价相互作用。

条件

色谱柱 Agilent BioSEC-3 100Å, 4.6 x 300 mm, 3 μm (部件号 5190-2503)
Agilent BioSEC-3 150Å, 4.6 x 300 mm, 3 μm (部件号 5190-2508)
Agilent BioSEC-3 300Å, 4.6 x 300 mm, 3 μm (部件号 5190-2513)

样品 小鼠 IgG

洗脱液 100 mM 磷酸钠缓冲液 + 0.15 M NaCl, pH 6.8

流速 0.35 mL/min

检测器 紫外检测器, 220 nm

系统 Agilent 1260 生物惰性四元液相色谱系统

图 2 中所示为使用不同孔径的 Agilent BioSEC 3 μm 色谱柱所取得的分离效果，显示出 100Å 孔径色谱柱排阻了小鼠 IgG，因此没有获得其分离。但 150Å 和 300Å 色谱柱均能分离出单体和二聚物。图 3 中所示为 300Å 色谱柱所得分离的放大图，显示了 300Å 色谱柱所得结果的细节，说明它是分析单克隆抗体及其聚集体的合适选择。

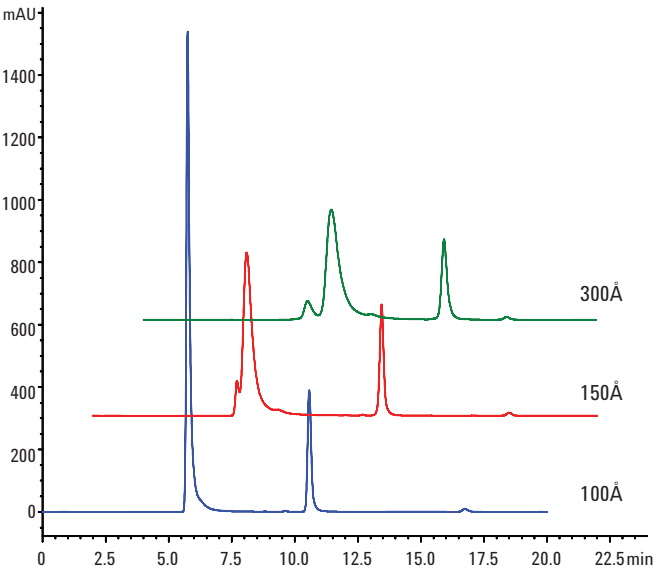


图 2. 使用三种不同孔径 Agilent BioSEC-3 色谱柱分离小鼠 IgG 的分离结果对比。同样的，分离度随孔径增大

结论

由于蛋白聚集体，包括二聚体的尺寸与蛋白质单体有很大区别，所以，可用 SEC 分离这些不同形式的蛋白质。实际上，SEC 结合 UV 或光散射检测是定量检测蛋白质聚集体和测定分子量的标准技术。然而，因为填料孔径的选择会影响使用 SEC 所取得的分离度，所以对一系列孔径的色谱柱进行测试，找到与分析物匹配的孔径是很有意义的。该方案能够在开展深入研究前确定最优选择，同时降低因选择不适合孔径的填料而造成有价值信息丢失的风险。

Agilent Bio SEC-3 HPLC 柱有 100Å、150Å 和 300Å 孔径可供选择，适用于大多数多肽和蛋白质的尺寸排阻分离。

更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn

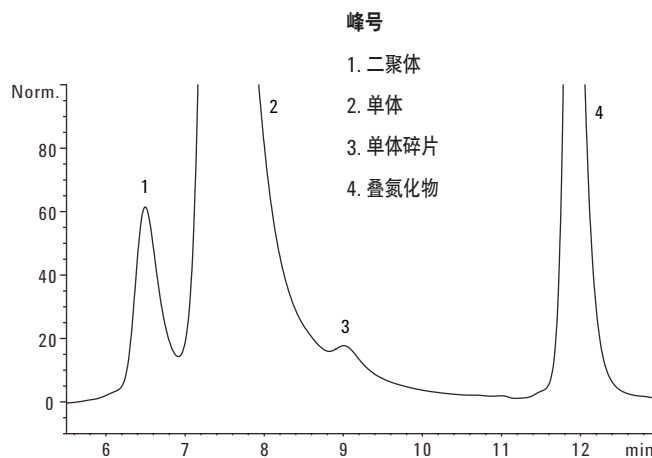


图 3. 使用 Agilent BioSEC-3 300Å 色谱柱分离小鼠 IgG 的放大图，该孔径色谱柱是分析小鼠 IgG 的最佳选择

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
中国印制
2012 年 2 月 24 日
5990-9894CHCN



Agilent Technologies