

使用 LC/MS 分析完整腺相关病毒衣壳蛋白实现快速产品确认

作者

Brian Liao
安捷伦科技有限公司

前言

腺相关病毒 (AAVs) 是一类非常有应用前景的新型生物疗法，能够治疗许多罕见、棘手的遗传病，例如脊髓性肌肉萎缩症和遗传性视网膜变性^[1]。AAVs 是由蛋白质衣壳和包裹 DNA 组成的大分子复合物，分别需要使用专用分析技术以确保整体产品的质量和安全性。AAV 衣壳由三种不同的衣壳蛋白组成，通常以 VP1-3 表示，其化学计量比约为 1:1:10，每个衣壳共含 60 个蛋白质拷贝^[2]。

美国食品药品监督管理局建议，在产品放行前需明确鉴定所有 AAV 治疗药物的病毒衣壳和包裹 DNA，特别是生产多种血清型或基因工程变异体的生产设施^[3]。迄今为止，基于抗体的方法（例如 ELISA 和免疫印迹法）已成为最常用的病毒衣壳分析技术。这些方法存在几个弊端：基于抗体的方法不仅繁琐且易于出错，还要求针对分析的每种 AAV 类型生成高度特异性的抗体。这极具挑战性，因为来自不同产品的 AAV 衣壳可能高度同源，例如，AAV 血清型 1 和 6 仅相差 6 个氨基酸（99% 同源），这使得它们很难通过抗体结合进行区分^[4]。

原则上，由于 LC/MS 直接测量蛋白质质量数，无需针对每种类型的 AAV 生成抗体，因此可完美实现快速且高特异性的病毒衣壳蛋白分析。然而，在以往的研究中，病毒衣壳蛋白的色谱分离结果相对较差^[5]。这很成问题，因为共洗脱不仅会妨碍衣壳化学计量（AAV 感染性的重要决定因素）的准确定量，还会影响信号强度和质量数准确度^[6]。

本应用简报介绍了一种优化的 LC/FLD-MS 方法，用于快速分析 AAV 衣壳蛋白，确认 7 种不同血清型的一级结构。该方法具有简单的样品前处理要求，并可稳定用于高盐条件以及常用的非离子型清洁剂添加剂 Pluronic F-68。

实验部分

AAV 样品

AAV 血清型 2、7、9、7m8、DJ、rh10 和 Anc80 均购自 Vector Core @ GIS (A*STAR, Singapore)。AAV 样品经三次转染在 HEK-293 细胞中表达，并通过分析型超速离心法进行了纯化处理。在含有 0.001% Pluronic F-68 的磷酸盐缓冲液中，样品浓度约为 1.2×10^{10} 个病毒基因组/ μL ，收到样品后即可使用，无需更换缓冲液。

样品前处理

每次分析都新鲜配制含有 12 mol/L 盐酸胍 + 40 mmol/L DTT 的 200 mmol/L 碳酸氢铵 (pH 值约为 8.0) 的变性缓冲液。将变性缓冲液以 1:3 的比例加入 AAV 样品中，使最终盐酸胍的浓度达到 3 mol/L。然后将样品加热到 70 °C 并保持 15 分钟，确保其完全变性。每次分析进样 1.5×10^{11} 个病毒基因组。

LC/FLD-MS 用于完整衣壳蛋白分析

使用以下仪器对样品进行了分析：

- Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统，包括：
 - Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
 - Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
 - Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)

- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)，配有 8 μL 流通池
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 使用 Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond C18 (SB-C18) 和 SB-Diphenyl, $2.1 \times 100 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱 (部件号 858750-902 和 858750-944) 进行分离。还使用 ZORBAX RRHD 300Å SB-C3 色谱柱 (部件号 858750-909) 进行了方法开发，但不是优化方法。

选择了由 0.1% TFA + 0.1% FA 的去离子水溶液 (mp A) 和 90% 异丙醇 + 9.8% 水 + 0.1% TFA + 0.1% FA (mp B) 组成的高洗脱强度流动相。结合高温，类似的流动相条件在 ZORBAX StableBond 色谱柱上实现了单克隆抗体分析的出色分离能力^[7]。



图 1. 本应用简报中所用的设备和消耗品

由于芳香族残留物的发射光谱可能会因溶剂暴露量和暴露程度的不同而有所差别，因此使用具有单激发 (280 nm)/多发射 (315、330、345 和 360 nm) 模式的 8 µL 流通池进行荧光检测。结果显示，360 nm 处的发射强度最高，因此使用该波长进行所有分析。所有数据分析均在 Agilent BioConfirm 10.0 中进行。表 1、表 2 和表 3 列出了仪器和软件设置。

LC/MS 肽谱分析

将 10 µL 含有 6.0×10^{11} 个病毒基因组的 AAV 2 (约 3.6 µg 蛋白质) 样品变性，并在 30 µL 含有 760 mg/mL 盐酸胍 + 3.8 mg/mL TCEP 的 150 mmol/L Tris-HCl (pH 8) 中进行还原，并在 60 °C 下温育 60 分钟。冷却至室温后，加入 10 µL 133 mmol/L 碘乙酰胺进行烷基化，并在室温下避光温育 30 min。然后使用 210 µL Tris-HCl 稀释样品，并加入 0.2 µg Promega 测序级修饰型胰蛋白酶 (部件号 V5117)。在 37 °C 下酶解 2 小时，然后再加入 0.2 µg 胰蛋白酶，在 37 °C 下酶解过夜。第二天，加入 30 µL 10% 甲酸终止反应，然后使用 Agilent AssayMAP Bravo 系统 (G5542A) 进行 C-18 净化。

表 1. 完整衣壳蛋白色谱参数

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统						
条件	测试	优化后	测试	优化后	测试	优化后
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm (部件号 858750-902)		Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond Diphenyl, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm (部件号 858750-944)		Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond C3, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm (部件号 858750-909)	
溶剂 A	0.1% FA + 0.1% TFA 的去离子水溶液	0.1% FA + 0.1% TFA 的去离子水溶液	0.1% FA + 0.1% TFA 的去离子水溶液	0.1% FA + 0.1% TFA 的去离子水溶液	0.1% FA + 0.1% TFA 的去离子水溶液	—
溶剂 B	80% IPA + 10% ACN + 9.8% 去离子水 + 0.1% FA + 0.1% TFA	90% IPA + 9.8% 去离子水 + 0.1% FA + 0.1% TFA	80% IPA + 10% ACN + 9.8% 去离子水 + 0.1% FA + 0.1% TFA	90% IPA + 9.8% 去离子水 + 0.1% FA + 0.1% TFA	80% IPA + 10% ACN + 9.8% 去离子水 + 0.1% FA + 0.1% TFA	—
梯度	0–2 min, 20% B 42 min, 35% B 42.5 min, 80% B 45 min, 80% B	0–5 min, 28% B 23 min, 32.5% B 23.5 min, 80% B 26 min, 80% B	0–2 min, 28% B 42 min, 43% B 42.5 min, 80% B 45 min, 80% B	0–5 min, 33% B 21 min, 37% B 21.5 min, 80% B 23 min, 80% B	0–2 min, 20% B 42 min, 35% B 42.5 min, 80% B 45 min, 80% B	—
柱温	75 °C	80 °C	75 °C	80 °C	75 °C	—
流速	0.4 mL/min					
样品量	每次进样 1.5×10^{11} 个病毒基因组					

表 2. 完整衣壳蛋白质谱参数

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统	
离子源	安捷伦双喷射流离子源
气体温度	350 °C
气体流速	12 L/min
雾化器	35 psig
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	4 kV
喷嘴电压	2 kV
碎裂电压	180 V
锥孔电压	65 V
质量数范围	900–3200 <i>m/z</i>
采集速率	1 质谱图/秒
参比质量	922.0098
采集模式	正离子，质量数范围 3200 <i>m/z</i> ，扩展动态范围 (2 Ghz)

在配备 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的 1290 Infinity II 液相色谱仪上进行肽谱分析。使用 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 (部件号 653750-902)，2.1 × 150 mm, 2.7 µm 进行分离。表 4 和表 5 列出了仪器设置。

表 3. 完整衣壳蛋白解卷积设置

Agilent MassHunter BioConfirm B10.0 设置	
规定的色谱检测	FLD
提取色谱图时积分	是
调整延迟时间	0.1 min (MS 检测器)
解卷积	最大熵
解卷积 <i>m/z</i> 范围	1000–3200
解卷积质量数范围	55–85 kDa
质谱精度	0.5 Da
解卷积扣除基线	7.0
匹配容差	32 ppm

表 4. 肽谱分析色谱参数

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统	
溶剂 A	含 0.1% FA 的去离子水溶液
溶剂 B	含 0.1% FA 的乙腈溶液
梯度	0–15 min, B 由 5% 升至 40% 15–18 min, B 由 40% 升至 90% 18–20 min, 保持 90%
柱温	60 °C
流速	0.4 mL/min
进样量	20 µL

结果与讨论

LC/MS 方法开发

由于 AAV-2 的研究最为充分，因此使用该血清型进行了方法开发。衣壳蛋白 VP1-3 的序列如图 2 所示。所有衣壳蛋白均由 Cap 基因中的相同 DNA 序列转录得到，通过 mRNA 剪接和渗漏核糖体扫描机制形成三种高度同源的蛋白质^[6]。其中，这三种蛋白质的 VP3 序列均相同，而 VP1 和 VP2 仅 N 端序列有所不同。

表 5. 肽谱分析质谱参数

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统		母离子/循环	前 10
离子源	安捷伦双喷射流离子源	碰撞能量	3.6 * (m/z)/100-4.8
气体温度	290 °C	MS/MS 阈值	开启；重复 3 次，然后排除 0.2 min
气体流速	13 L/min	基于母离子丰度的扫描速度	是
雾化器	35 psig	目标值	25000
鞘气温度	275 °C	使用 MS/MS 累积时间限	是
鞘气流速	12 L/min	纯度	严格性 100%，截留率 30%
毛细管电压	4 kV	同位素模型	肽
喷嘴电压	2 kV	母离子排序	仅按丰度；+2、+3、> +3
碎裂电压	175 V	参比质量	922.0098
锥孔电压	65 V	采集模式	正离子，质量数范围 3200 m/z
质量数范围	100-1700 m/z		
采集速率	5 质谱图/秒		
自动 MS/MS 范围	50-1700 m/z		
MS/MS 最小采集速率	3 质谱图/秒		
分离峰宽	中等（约 4 m/z）		

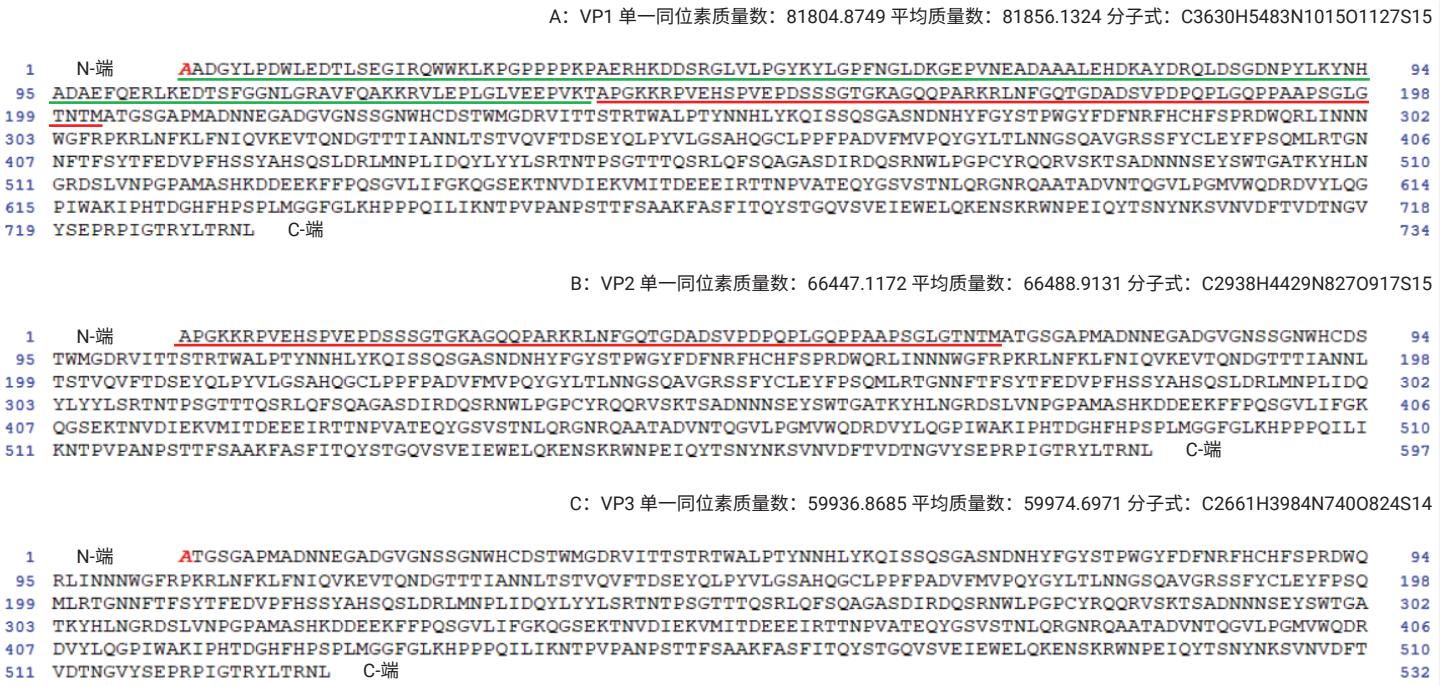


图 2. AAV-2 衣壳蛋白的一级氨基酸序列。显示于 Agilent MassHunter 序列管理器软件中，VP1-3 仅 N 端序列有所不同：每个都包含 VP3 序列，其余 N 端序列用红色下划线 (VP2) 或红色和绿色 (VP1) 下划线突出显示。上方显示了每种蛋白质的单同位素质量数、平均质量数和分子式

如其他文献所述^[5]，这些翻译后修饰预计为：(i) 去除 VP1 和 VP3 上的起始氨基酸，以及 (ii) 去除蛋氨酸后立即使氨基酸乙酰化。乙酰化的氨基酸在 Agilent MassHunter 序列管理器软件中以红色斜体字母表示，VP1-3 的理论平均质量数分别为 81856.13、66488.91 和 59974.70 Da（图 2）。

采用表 1 中所示的测试梯度，在 ZORBAX RRHD 300Å SB-C3、SB-Diphenyl 和 SB-C18 色谱柱（图 3A-3C）上分离变性 AAV-2 样品。VP1-3 在 SB-C3 和 SB-Diphenyl 色谱柱上分离为两个峰，其中 VP1 和 VP3 共洗脱为单峰。只有 SB-C18 色谱柱具有分离每种衣壳蛋白所需的选择性。

VP1 + VP3 峰的解卷积质谱图（图 3D-3E）表明，与 VP1 相比，在 59975.52 Da 处的 VP3 信号强度更高，体现其丰度高出至少一个数量级。VP3 的共洗脱可能构成基质效应，可能通过离子抑制作用影响 VP1 的检测和质量数准确度^[8]。相反，SB-C18 色谱柱上 VP1 的出色分离（图 3F）则大大降低了 VP3 的干扰，从而实现了 VP1 可靠、准确的质谱分析。

然后，如图 4 所示，在表 1 的优化梯度条件下使用 SB-C18 色谱柱分离 AAV-2 样品，改善了峰分离度和峰形，并缩短了分析时间。请注意，总离子流中轻微的背景波动可能由残留 Pluronic F-68 引起，它未对分析产生明显干扰。

重要的是，VP1 的解卷积质量数观测值为 81885.72 Da（图 4E），比理论值 81856.13 Da 大 +29.6 Da。不同的是，VP2 和 VP3 的观测质量数与其理论值高度一致。推测其原因，可能是 VP1 的 N 端区域发生了单氨基酸取代（图 2 中绿色下划线标记的序列）。

AAV-2 中单氨基酸取代的确认

通过对 AAV-2 进行胰蛋白酶酶解和肽谱分析来验证这一推测。我们对一个三电荷 1102.1864 m/z 肽段进行了鉴定，其 MS/MS 谱图确证了 VP1 序列的第 77 位氨基酸发生了丙氨酸对苏氨酸的取代，而该氨基酸确实位于 N 端区域（图 5）。

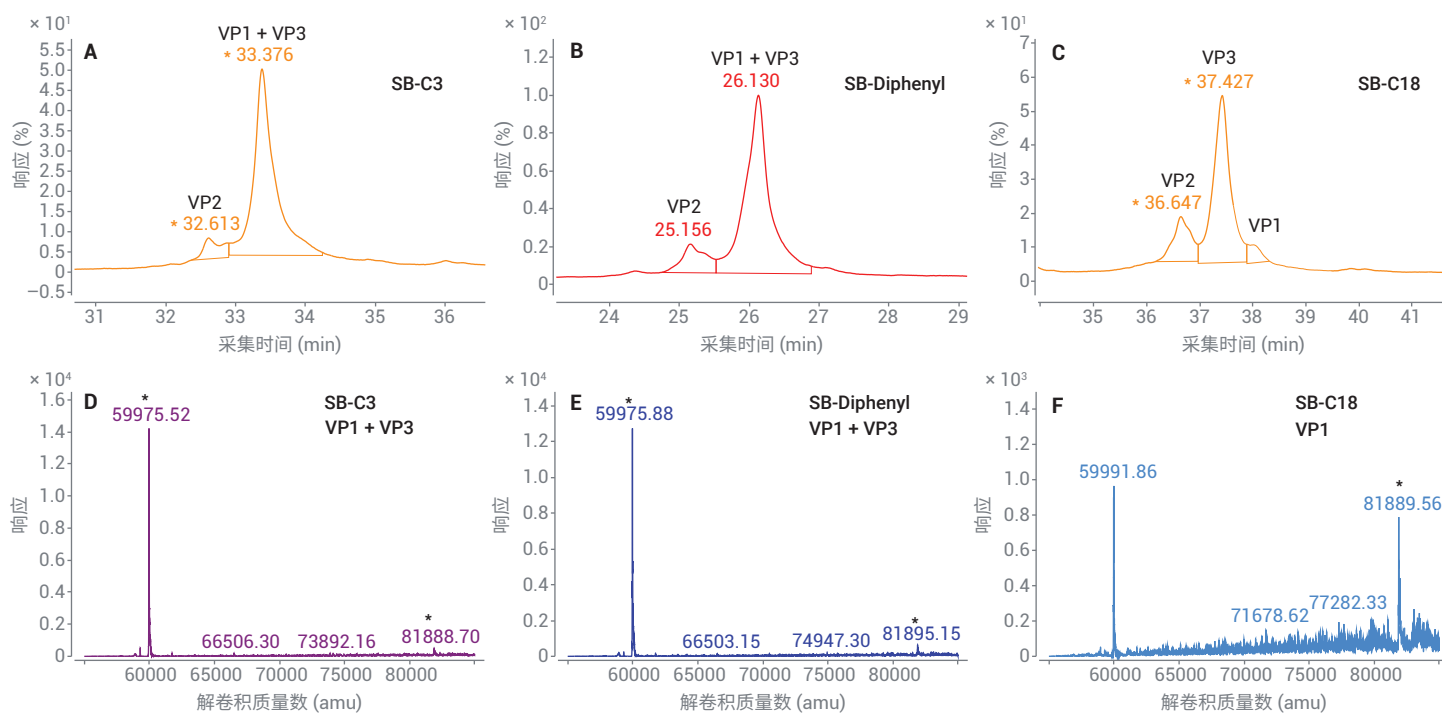


图 3. 采用 AAV-2 进行方法开发。使用 (A) Agilent ZORBAX RRHD 300Å SB-C3、(B) SB-Diphenyl 和 (C) SB-C18 色谱柱进行分离得到的荧光色谱图。其中，SB-C18 实现了出色的色谱分离度。(D-F) 色谱峰的解卷积质谱图，表明 VP1 和 VP3 共洗脱

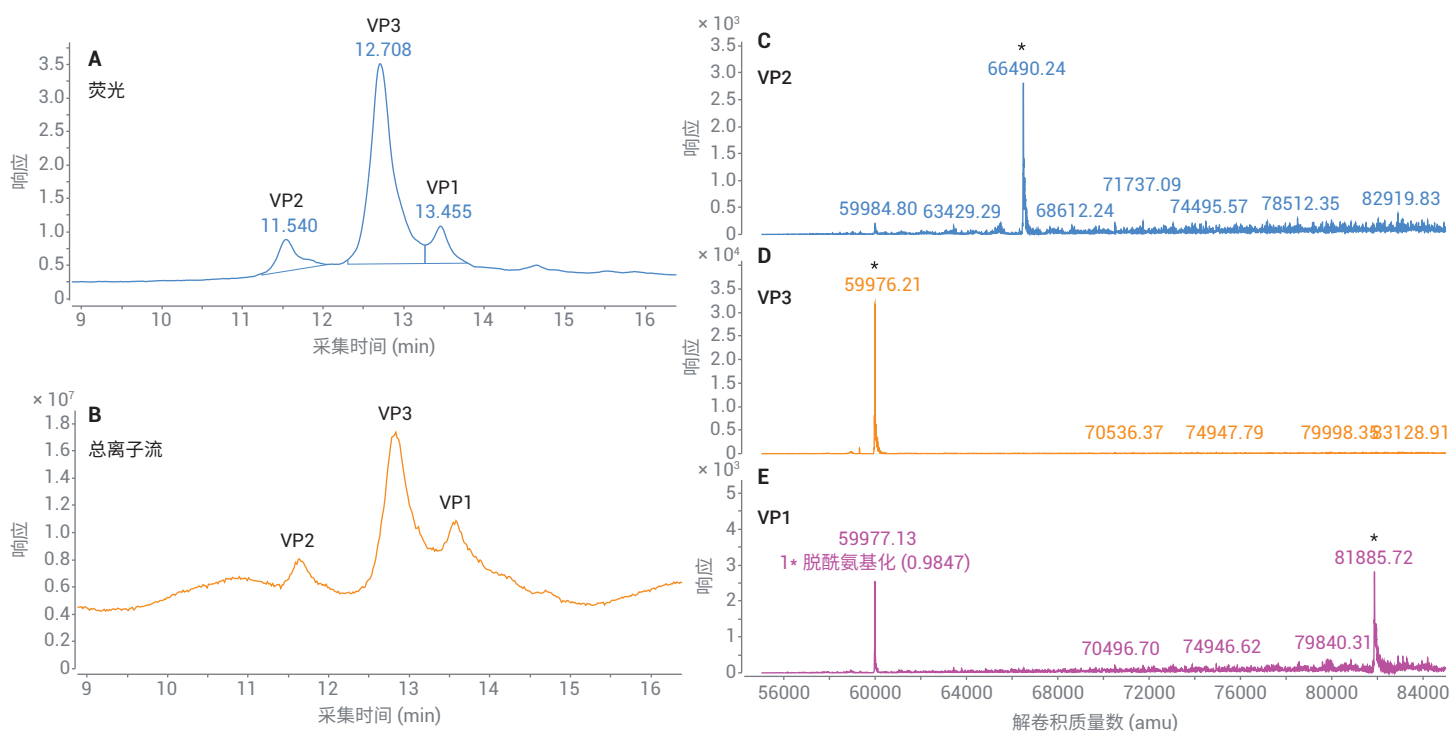


图 4. 使用 Agilent ZORBAX RRHD 300Å SB-C18 色谱柱，采用优化的方法对变性 AAV-2 衣壳蛋白进行的 LC/MS 分析。(A) 三种衣壳蛋白的荧光色谱图。(B) 总离子流。(C-E) 三种衣壳蛋白的解卷积质谱图，相关质量峰用星号标出

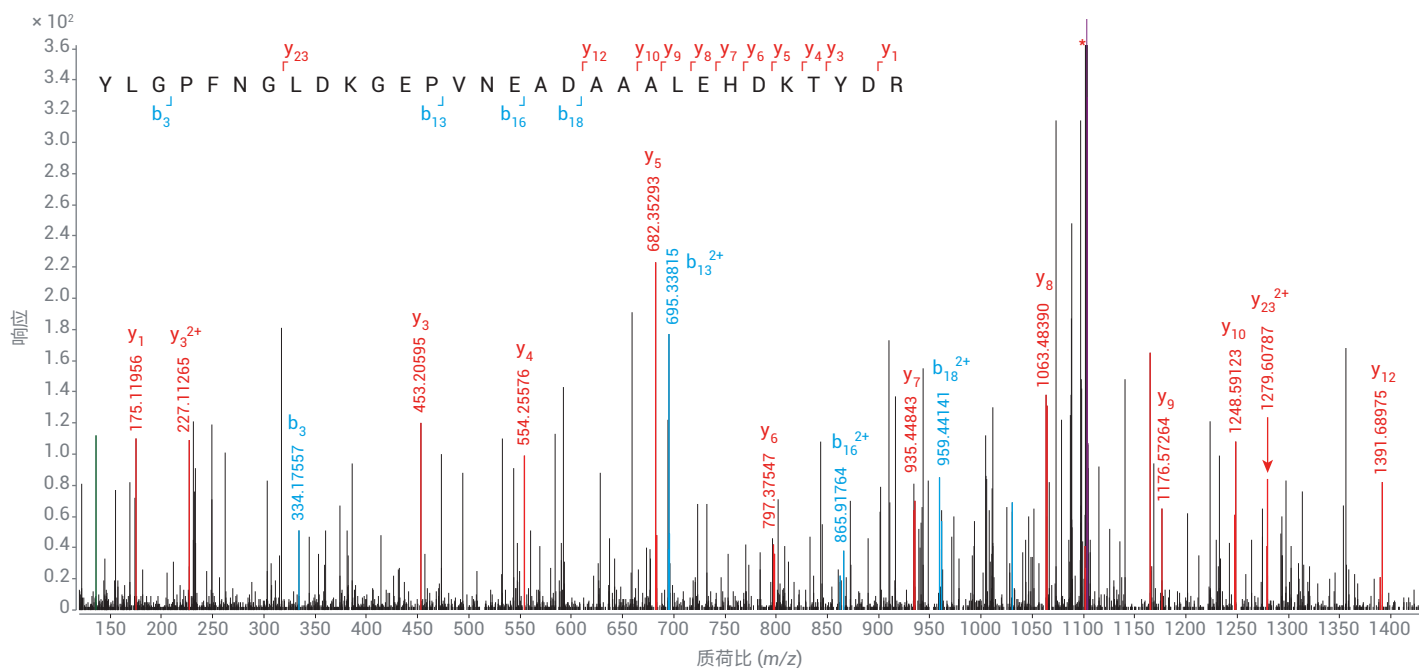


图 5. 通过 MS/MS 确认 VP1 中丙氨酸对苏氨酸的取代。被取代的氨基酸以红色字体显示，并用红色星号标记母离子

通过对用于 AAV-2 表达的质粒进行 Sanger 测序，实现了对该突变的正交确认，表明 G → A 取代已将 GCC 密码子变为 ACC（数据未显示）。

另外六种 AAV 血清型的分析

为了评估该 LC/MS 方法对于其他 AAV 血清型分析的通用性，我们采用上述优化的 SB-C18 方法对 AAV-7、7m8、DJ、

9、rh10 和 Anc80 进行了分析。采用这种方法，AAV-7、7m8 和 DJ 得到了良好的分离（图 6A–6C），但 AAV-9、rh10 和 Anc80 仅分离为两个峰，其中 VP1 和 VP3 共洗脱为单峰。

与烷基链固定相（例如 C3、C8 和 C18）相比，安捷伦二苯基固定相的选择性有所改变。苯基官能团能够基于 π - π 相互作用

进行分离，并对芳香族氨基酸和双键具有额外的亲和力^[9]。优化的 SB-Diphenyl 方法（表 1）的开发目的在于成功分离 AAV-9、rh10 和 Anc80（图 6D–6F）。BioConfirm 软件利用各峰的解卷积质谱图自动匹配各衣壳蛋白的身份，结果表明相邻峰产生的干扰极小（图 7 和图 8）。

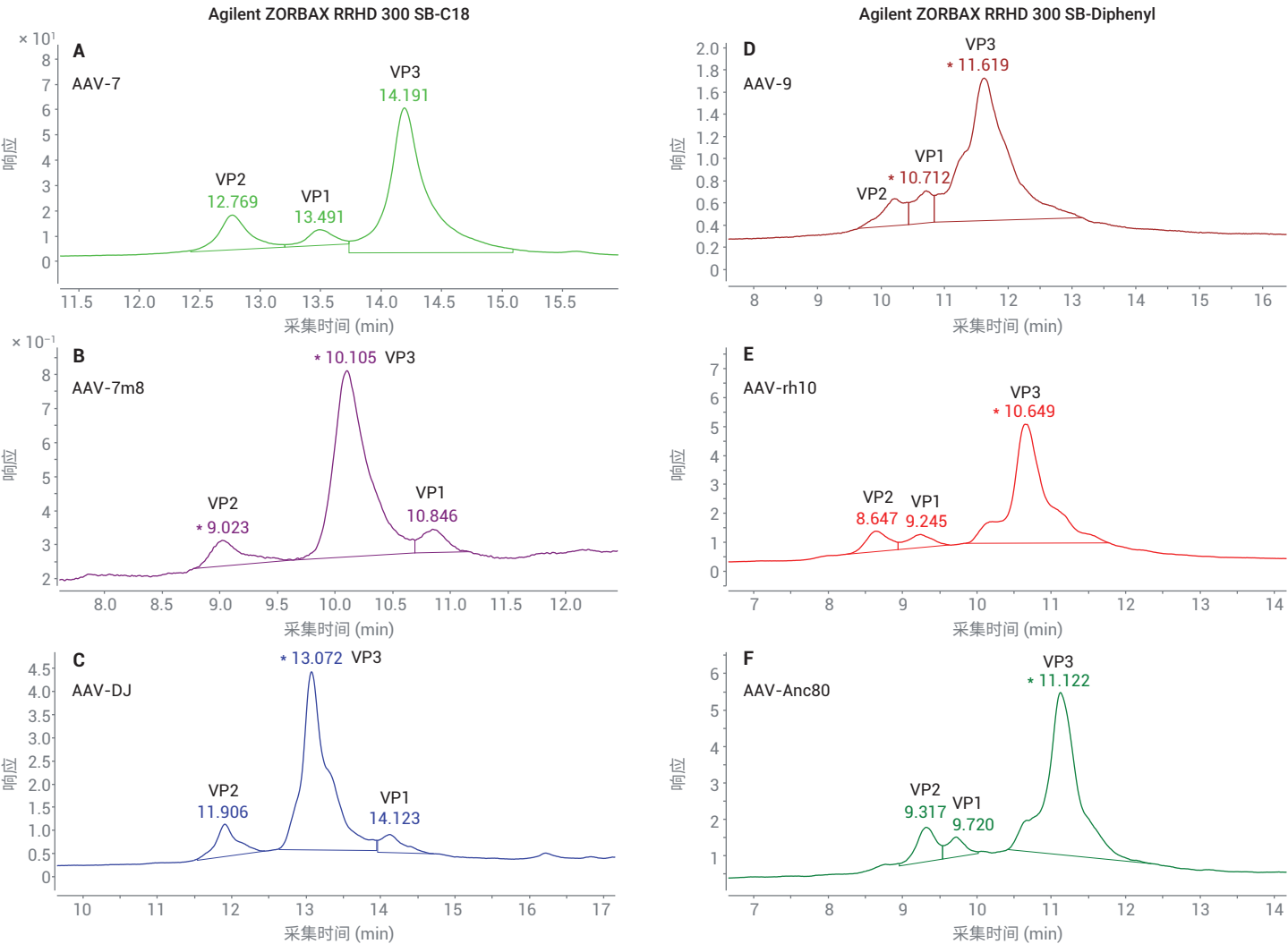


图 6. 使用 (A–C) Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18 和 (D–F) Agilent SB-Diphenyl 色谱柱对六种不同血清型变性 AAV 衣壳蛋白进行的 LC/MS 分析

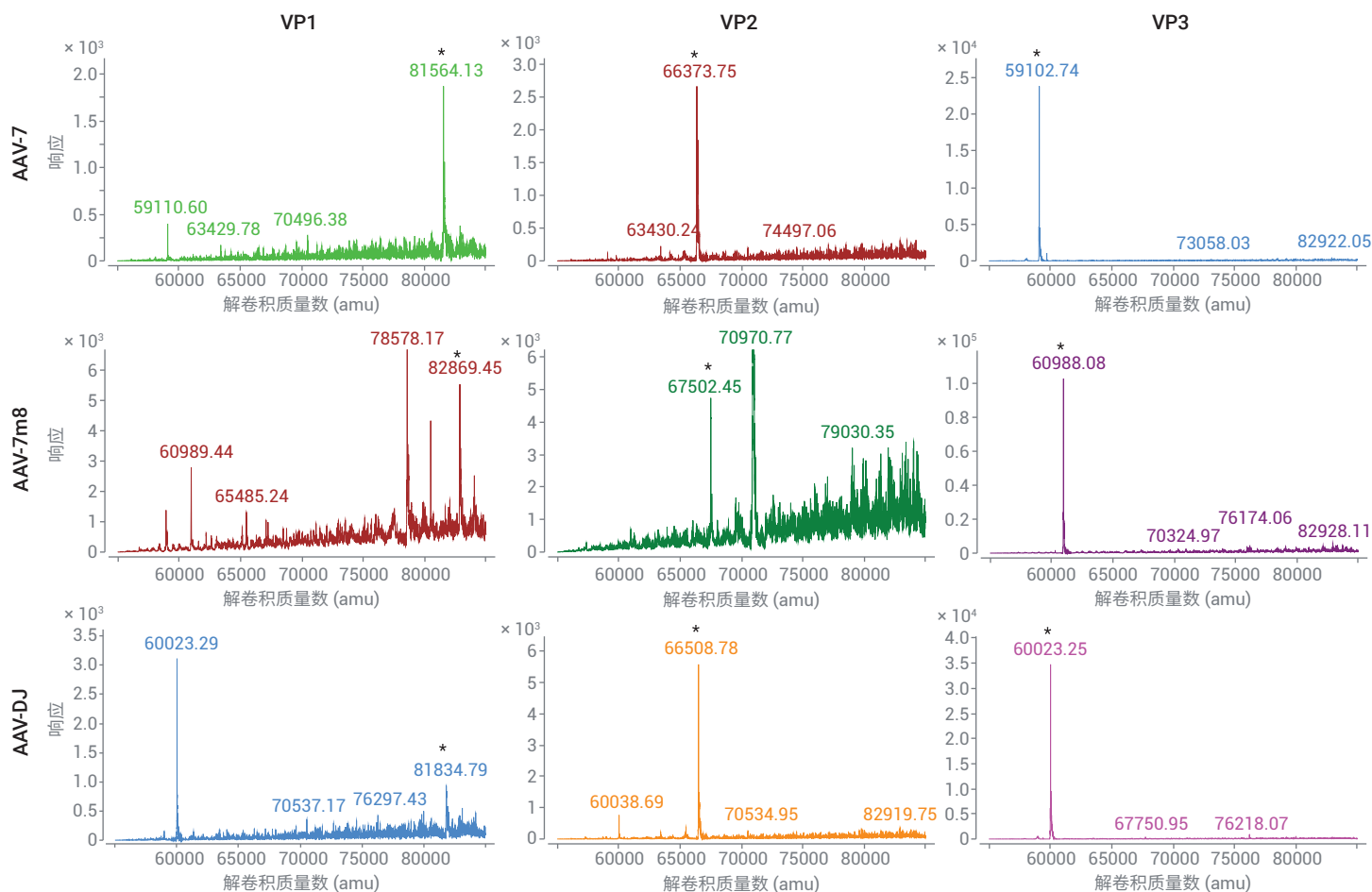


图 7. Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18 色谱柱分离的 AAV 衣壳蛋白的解卷积质谱图。AAV-7m8 (70971.71、78578.01 和 80495.10 Da) 受到共洗脱宿主细胞蛋白的干扰

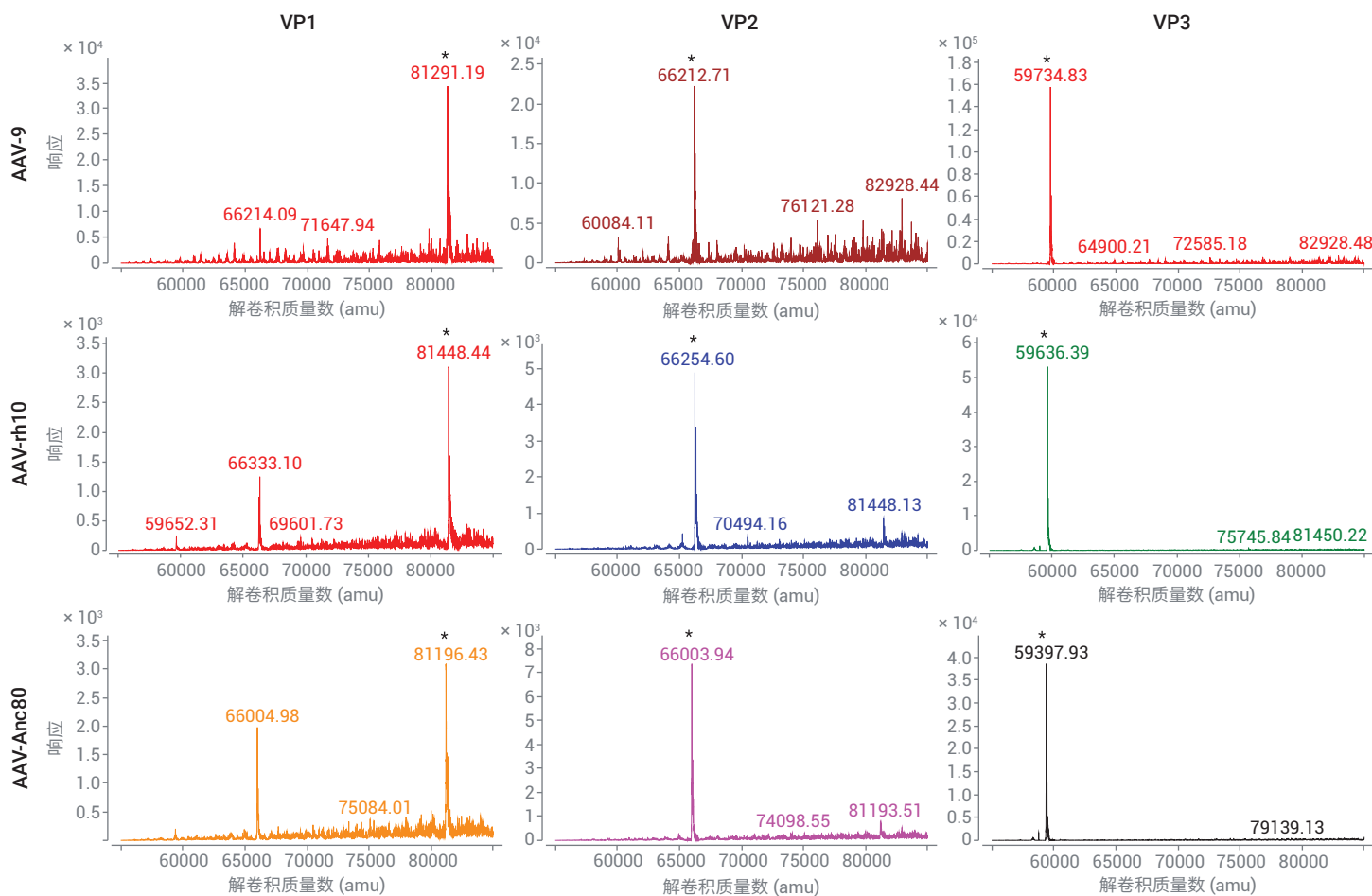


图 8. Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-Diphenyl 色谱柱分离的 AAV 衣壳蛋白的解卷积质谱图

推测 AAV-DJ 和 rh10 的 VP1 蛋白发生了脱酰胺基化作用，这可能是由细胞培养条件或样品前处理过程中通过加热生成的人工产物。除 AAV-2 外，各衣壳蛋白的理论和实测质量数（表 6）相差 ≤ 3 Da，相当于 ≤ 32 ppm。

通过对 VP1-3 各衣壳蛋白的相应荧光色谱峰（图 6）进行积分，测量得到表 7 中的相对定量结果。虽然这些结果大体上符合 VP1:2:3 的预期化学计量比 1:1:10，但在测试的不同样品中，VP1 的丰度比 VP2 的丰度变化更大。众所周知，VP1 是一种关键的核定位因子^[10]，一些样品中 VP1 的丰度较低在一定程度上说明了感染性的差异。

表 6. 衣壳蛋白的解卷积质量数

AAV 衣壳蛋白质量数									
血清型	VP1			VP2			VP3		
	理论值	实测值	质量数准确度 (ppm)	理论值	实测值	质量数准确度 (ppm)	理论值	实测值	质量数准确度 (ppm)
2	81886.16	81885.72	5.37	66488.91	66490.24	20.00	59974.70	59976.21	25.18
7	81564.08	81564.13	0.61	66372.17	66373.75	23.81	59101.05	59102.74	28.60
9	81291.57	81291.19	4.67	66210.77	66212.71	29.30	59733.54	59734.83	21.60
7m8	82868.27	82869.45	14.24	67501.05	67502.45	20.74	60986.83	60988.08	20.50
DJ	81835.21	81834.79	5.13	66508.06	66508.78	10.83	60021.86	60023.25	23.16
rh10	81445.85	81448.44	31.80	66252.96	66254.60	24.75	59634.58	59636.39	30.35
Anc80	81195.42	81196.68	15.52	66002.53	66003.80	19.24	59396.22	59397.97	29.46

表 7. 衣壳蛋白的相对定量结果

衣壳蛋白定量 (FLD%)			
血清型	VP1	VP2	VP3
2	10.67	10.61	78.72
7	7.16	9.81	83.03
9	8.75	8.04	83.21
7m8	7.62	9.70	82.68
DJ	8.62	11.72	79.66
rh10	6.58	9.18	84.24
Anc80	5.64	10.62	83.74

结论

本应用简报展示了使用配备 ZORBAX RRHD 300Å SB-C18 或 SB-Diphenyl 色谱柱的 1290 Infinity II 液相色谱仪有效分离完整 AAV 衣壳蛋白，随后使用 1260 Infinity II 荧光检测器与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的串联系统进行检测和分析的方法开发。本应用简报采用 7 种不同的 AAV 血清型展示了这一方法的性能。由于该方法可稳定用于高盐条件以及常用的清洁剂添加剂 Pluronic F-68，因此样品前处理仅需进行相对较短的变性步骤，并且无需更换缓冲液。

该方法在色谱分离方面显著优于最近发表的研究成果^[5]，是一种有效分离 AAV 衣壳蛋白的更通用方法，这些蛋白质在一种色谱柱固定相中会发生共洗脱，但在另一种色谱柱固定相中可实现良好分离。与最近发表的使用 ZipChip CE/MS 系统进行类似分析的研究成果^[11]相比，本研究方法的质量数准确度为 ≤ 32 ppm，而 ZipChip 的质量数准确度为 ≤ 60 ppm。此外，液相色谱法相对较长的保留时间差异有利于实现准确且可重现的质谱解卷积，结合使用荧光检测器可实现灵敏且准确的衣壳蛋白丰度相对定量。相比之下，在 ZipChip 上，衣壳蛋白在 0.1 分钟的窄时间窗口内洗脱，并且实验中使用的质谱仪扫描速度相对较慢，因而无法实现准确定量。

可以预见，该方法对产品放行前快速确认 AAV 产品的身份，以及发现/开发实验室中筛选 AAV 突变体文库非常有用。

参考文献

1. Keeler, A. M.; Flotte, T. R. Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Therapy in Light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where Are We, and How Did We Get Here? *Annu. Rev. Virol.* **2019**, 6, 601–621
2. Backovic, A. et al. Capsid Protein Expression and Adeno-Associated Virus like Particles Assembly in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microb. Cell Fact* **2012**, 11, 124
3. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) - Guidance for Industry. *US Food and Drug Administration* **2020**
4. Kuck, D.; Kern, A.; Kleinschmidt, J. A. Development of AAV Serotype-Specific ELISAs Using Novel Monoclonal Antibodies. *Journal of Virological Methods* **2007**, 140, 17–24
5. Jin, X. et al. Direct Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis for Complete Characterization of Recombinant Adeno-Associated Virus Capsid Proteins. *Human Gene Therapy Methods* **2017**, 28, 255–267
6. Bosma, B. et al. Optimization of Viral Protein Ratios for Production of RAAV Serotype 5 in the Baculovirus System. *Gene Therapy* **2018**, 25(6), 415–424
7. Rehder, D. S. et al. Reversed-Phase Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Reduced Monoclonal Antibodies in Pharmaceuticals. *J. Chromatog. A* **2006**, 1102(1–2), 164–175
8. Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* **2003**, 75(13), 3019–3030
9. Long, W. J.; Mack, A. E. Comparison of Selectivity Differences Among Different Agilent ZORBAX Phenyl Columns Using Acetonitrile or Methanol (对比使用乙腈或甲醇时不同 Agilent ZORBAX Phenyl 色谱柱在选择性方面的差异)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5990-4711EN，**2009**
10. Popa-Wagner, R. et al. Impact of VP1-Specific Protein Sequence Motifs on Adeno-Associated Virus Type 2 Intracellular Trafficking and Nuclear Entry. *Journal of Virology* **2012**, 86, 9163–9174
11. Zhang, Y. et al. Identification of Adeno-Associated Virus Capsid Proteins Using ZipChip CE/MS. *Analytical Biochemistry* **2018**, 555, 22–25

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

RA.5878472222

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2021
2021 年 4 月 7 日, 中国出版
5994-2434ZHCN