

利用 Agilent 2100 生物分析仪 系统进行蛋白质分析

蛋白质试剂盒产品系列概述

技术简报



前言

Agilent 2100 生物分析仪系统是一种用于生物分子电泳分析的微流体系统。近年来，该系统已发展成为蛋白质样品常规 QA/QC 的重要平台，可支持三种不同的蛋白质分析试剂盒¹：

- Protein 80 试剂盒 — 适用于低分子量范围的蛋白质分析
- Protein 230 试剂盒 — 适用于常规蛋白质分析（最高分子量 230 kDa）
- 高灵敏度 Protein 250 试剂盒 — 适用于皮克级灵敏度和极低浓度的杂质检测

除了有预先验证试剂简便易用的特点外，这一蛋白质试剂盒产品系列相比其他技术（如平板凝胶电泳或标准 CE-SDS 方法）具有以下优点：

- 分子量范围广（从 5 kDa 到 250 kDa）
- 载样量范围广（从 pg/ μ L 到 μ g/ μ L）



Agilent Technologies

- 蛋白质检测的线性动态范围多达四个数量级
- 样品消耗量极少
- 可生成电子数据
- 符合 21 CFR Part 11 标准认证

本技术简报对比了三种蛋白质分析试剂盒的常规性能特征，并为选择最适合手中样品类型的试剂盒提供指南。

实验部分

选择人骨髓瘤 IgG2 (Ab) 作为本性能研究的模型蛋白质。IgG2 样品 (1 µg/µL) 和肌红蛋白均购自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。Protein 80 (P80)、Protein 230 (P230) 和高灵敏度 Protein 250 (HSP-250) 试剂盒来自安捷伦科技公司 (Waldbronn, Germany)。还原和非还原 IgG2 的所有分离操作均结合对应的蛋白质分析方法，在 Agilent 2100 生物分析仪系统上进行。除非另有说明，否则所有化学品均为分析纯级。根据对应的试剂盒方案^{2,3,4} 制备蛋白质芯片：

• P80 和 P230 分析

将 4 µL 抗体样品与 2 µL 样品缓冲液混合（分别加入或不加作为还原剂的 DDT）。将抗体溶液和分子量标准品置于 95 °C 下保温 5 min，然后用 84 µL 水稀释。取 6 µL 置于蛋白质芯片中进行分析。

• HSP-250 分析

首先，根据高灵敏度 Protein 250 试剂盒指南中所述，使用荧光染料对分子量标准品和抗体样品进行共价修饰。用蒸馏水以 1:200 稀释后，分别将 4 µL 样品或分子量标准品与 2 µL 样品缓冲液混合（分别加入或不加作为还原剂的 DDT）。将该溶液置于 95 °C 下保温 5 min，然后进行芯片分析。

通过将肌红蛋白加入 IgG2 样品后在还原条件下进行芯片分析，进行杂质浓度检测实验。使用试剂盒随附的对应蛋白质分子量标准品研究在分析方法允许分子量范围内的分辨率。采用 Agilent 2100 Expert 软件 (B.02.07 版本) 进行运行控制和数据分析。

结果与讨论

以上三种生物分析仪蛋白质试剂盒的规格以及样品前处理工作流程各不相同。P80、P230 和 HSP-250 试剂盒覆盖的蛋白质分子量范围分别为 5–80 kDa、14–230 kDa 和 10–250 kDa。P80 和 P230 试剂盒使用芯片染色技术，可使荧光染料与 SDS 胶束中的蛋白质相缔合⁵。因此样品前处理具

有直接和便捷的优势，但由于系统中染料无处不在，会产生背景荧光。相反，若使用新型 HSP-250 试剂盒，则首先由染料对样品进行共价标记，然后将其稀释并加载到芯片上进行分析。这种直接标记方法完全消除了背景荧光，使 HSP-250 分析试剂盒可检测 pg/µL 级浓度的蛋白质。

本研究使用以上三种蛋白质试剂盒分析完全相同的样品组。图 1 和图 2 展示了 IgG2 制剂的还原和非还原电泳图谱。

在非还原条件下（图 2），使用 HSP-250 分析检测到完整抗体 (Ab) 的分子量为 156.6 kDa，这与其理论分子量（约 150 kDa）高度一致。P230 和 HSP-250 试剂盒清晰地分辨出了轻链 (LC)、重链 (HC) 以及 LC 与 HC 混合物峰，包括非糖基化形式的 IgG2 (P230: 144.5 kDa 峰和 HSP-250: 143.3 kDa 峰)。HSP-250 分析的独特之处在于其可测量的分子量和浓度超出了分子量标准品的分子量范围，即 250 kDa。因此，还可用于分析高分子量聚合物或杂质的分子量和含量。

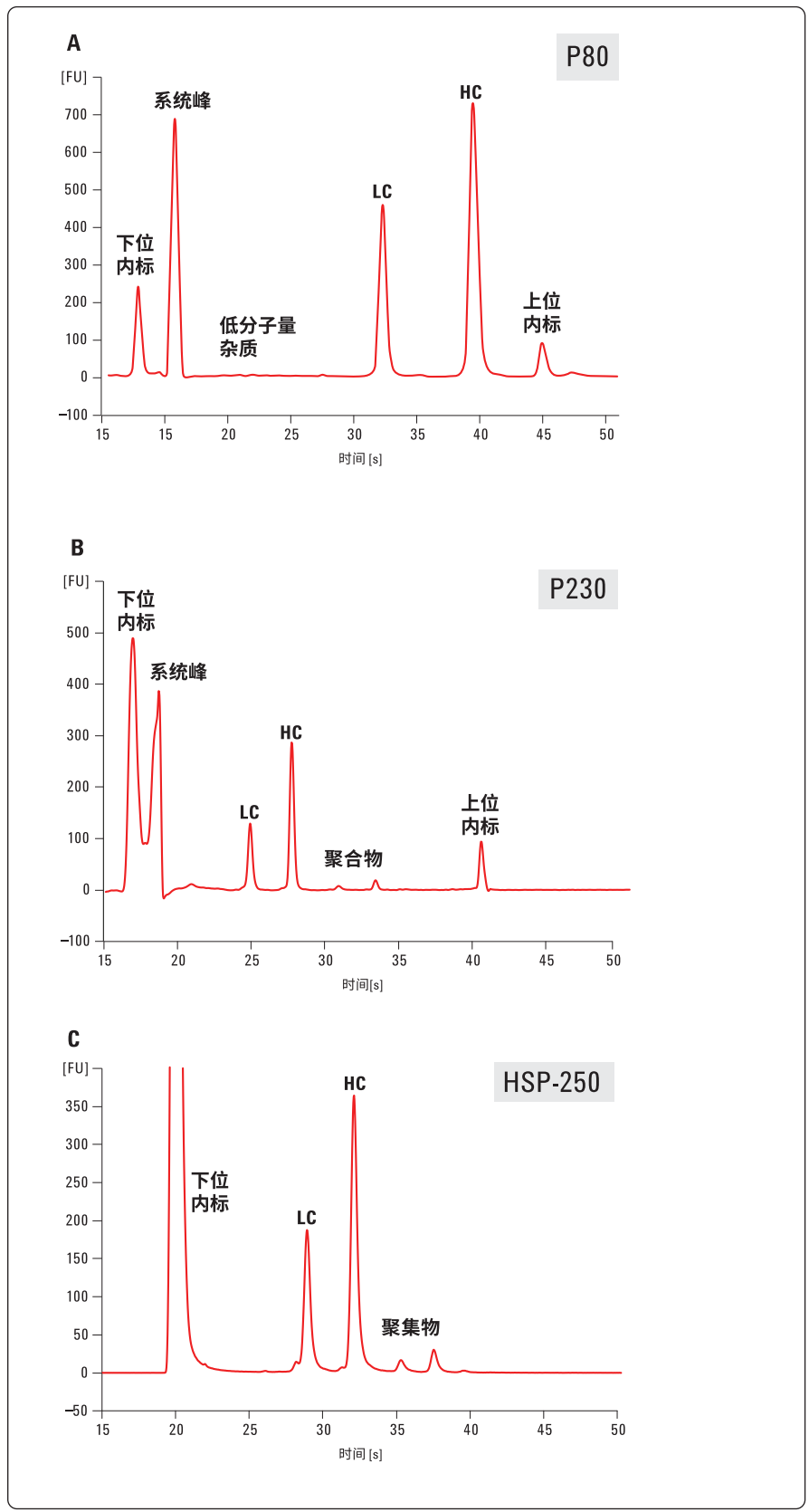


图 1
 还原条件下的 IgG2 制剂分析。图中所示为使用 Agilent 2100 生物分析仪系统为每项分析方法生成的一个代表性电泳图。缩写：LC：轻链；HC：重链。
 (A) 使用 Protein 80 分析方法进行分析
 (B) 使用 Protein 230 分析方法进行分析
 (C) 使用高灵敏度 Protein 250 分析方法进行分析

在还原条件下（图 1），三种分析都可以很好地分辨出 LC 和 HC。P230 和 HSP-250 分析中均可观察到高分子量聚合物，而 P80 分析则分辨出与 IgG2 样品相关的低分子量杂质。

本研究通过在多个芯片 ($n = 5$) 上重复分析样品，评估了分子量、纯度和相对浓度结果的重现性。三种分析方法均获得了精确的分子量和纯度信息，最大变异系数 (CV) 经测定分别为 2.3% 和 6.0% (表 1)。相对蛋白质浓度的重现性处于规定限值 (20% CV) 范围内 (数据未示出)。通过将蛋白质峰面积与试剂盒标准品 (P80 和 P230 分析中的上位内标和 HSP-250 分析中的分子量标准品) 进行对比，确定相对蛋白质浓度。因此，定量重现性受移液和混合操作不一致的影响。

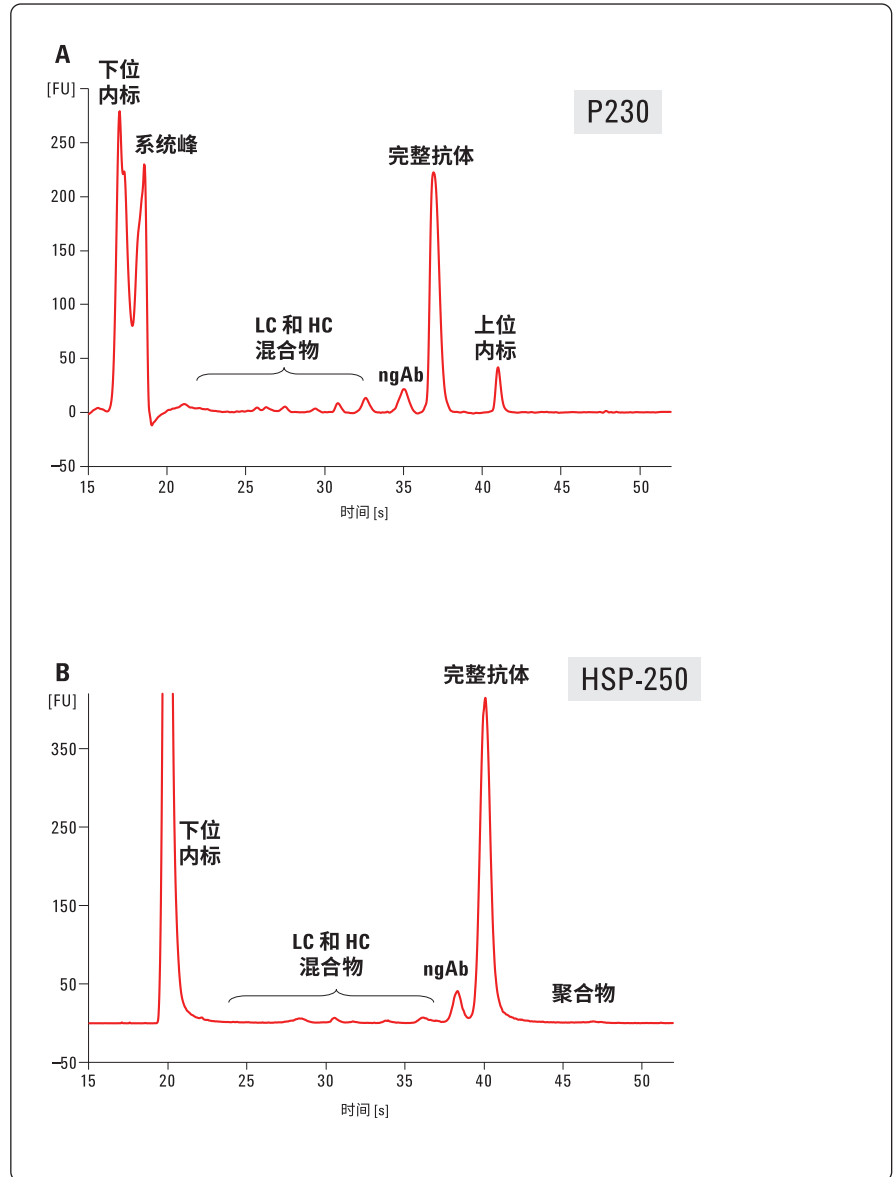


图 2
非还原条件下的 IgG2 制剂分析。图中所示为使用 Agilent 2100 生物分析仪系统为每项分析方法生成的一个代表性电泳图。缩写：LC：轻链；HC：重链；ngAb：非糖基化抗体。
(A) 使用 Protein 230 分析方法进行分析
(B) 使用高灵敏度 Protein 250 分析方法进行分析

在第二项研究中，我们评估了低浓度杂质检测方面的分析性能：将不同浓度的肌红蛋白 (17 kDa) 加入到 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 IgG2 制剂中，然后用 Agilent 2100 生物分析仪的三种蛋白质分析方法对样品进行了分析 (图 3)。HSP-250 分析中，肌红蛋白加标样品的检测限经测定为 0.03% (信噪比 > 3)。因此，HSP-250 分析符合美国食品药品监督管理局 (FDA) 所规定的杂质检测限 (0.05%)^{6,7}。正如预料，标准蛋白分析 P80 和 P230 的检测限明显较高，经测定分别为 0.8% 和 1.6%。数据重现性处于试剂盒规格所描述的范围内，%CV 值约为 1.5% (图 3)。

最后，使用每种试剂盒的相应蛋白质分子量标准品，比较三种蛋白质分析方法在其分子量范围内的蛋白质分辨率。计算每对蛋白质分子量标准品峰的分子量分辨率 (R_s 0.8)，以百分比表示 (图 4)。总体上，除了 10 至 30 kDa 的最低分子量区域之外，其他区域均实现了低于 10% 的分子量分辨率。专为最高 80 kDa 的低分子量蛋白质分析而设计的 P80 试剂盒获得了最高的蛋白质分辨能力。相比之下，P230 和 HSP-250 试剂盒在低分子量范围内牺牲了一定程度的分辨能力，但可分辨的分子量范围更大 (高达 230 kDa 甚至更高)。

峰	轻链			重链		
	Protein 80	Protein 230	HSP-250	Protein 80	Protein 230	HSP-250
总量占比平均值	28.9	27.1	31.5	60.3	63.3	59.1
%CV	3.8	5.9	4.4	1.8	1.6	1.5

表 1

蛋白质纯度测定的分析精度：如图 1 所示，使用三种生物分析仪蛋白质分析方法对 IgG2 制剂进行重复分析。表中列出了使用每种分析方法检测到的轻链和重链在全部蛋白质中的占比 (总量的 %) 的平均和相对标准偏差 (%CV)。三种分析试剂盒均获得了相似且重现性高 (%CV < 6%) 的结果。

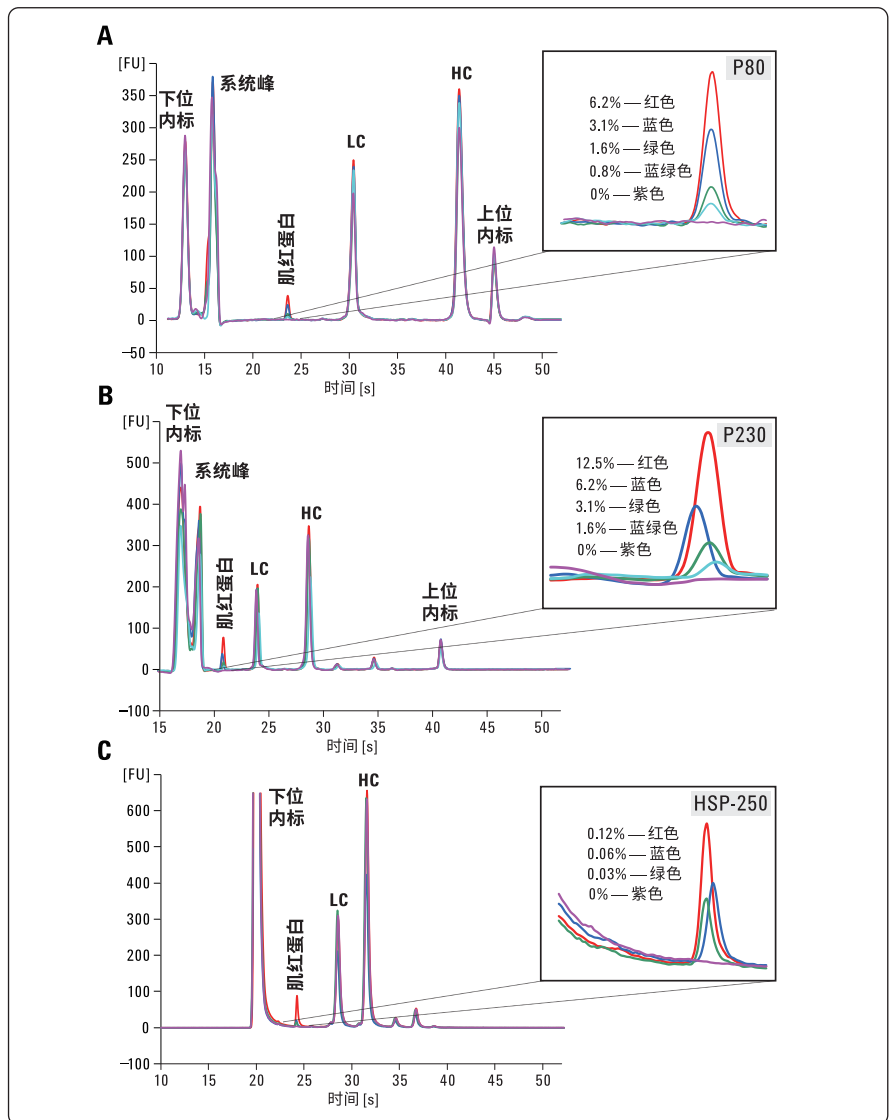


图 3

使用生物分析仪蛋白质试剂盒产品系列进行的杂质检测：将肌红蛋白 (17 kDa) 以指定百分比加入 IgG2 制剂中，并在还原条件下使用三种生物分析仪蛋白质分析方法进行分析。插图分别为检测到的肌红蛋白峰的放大图，并列出了相应的加标浓度。

(A) 使用 Protein 80 分析方法进行分析。

(B) 使用 Protein 230 分析方法进行分析。

(C) 使用高灵敏度 Protein 250 分析方法进行分析。

结论

Agilent 2100 生物分析仪与其蛋白质试剂盒产品系列相结合，可作为蛋白质制剂验证的通用工具。本文中所展示的一组实验的结果汇总于表 2 中，可帮助大家选择试剂盒。

参考文献

1. <http://www.chem.agilent.com/en-us/products/instruments/lab-on-a-chip/2100bioanalyzer/proteinkits>
2. “Agilent Protein 80 Kit Guide (Agilent Protein 80 试剂盒指南)”，安捷伦科技有限公司手册，文献编号 G2938-90063
3. “Agilent Protein 230 Kit Guide (Agilent Protein 230 试剂盒指南)”，安捷伦科技有限公司手册，文献编号 G2938-90052
4. “Agilent High Sensitivity Protein 250 Kit Guide (Agilent 高灵敏度 Protein 250 试剂盒指南)”，安捷伦科技有限公司手册，文献编号 G2938-90310
5. Bousse, L., et. al.; Anal. Chem. 2001, Mar 15; 73(6):1207-12
6. <http://fda.gov/cder/guidance/index.htm>
7. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration, 1994

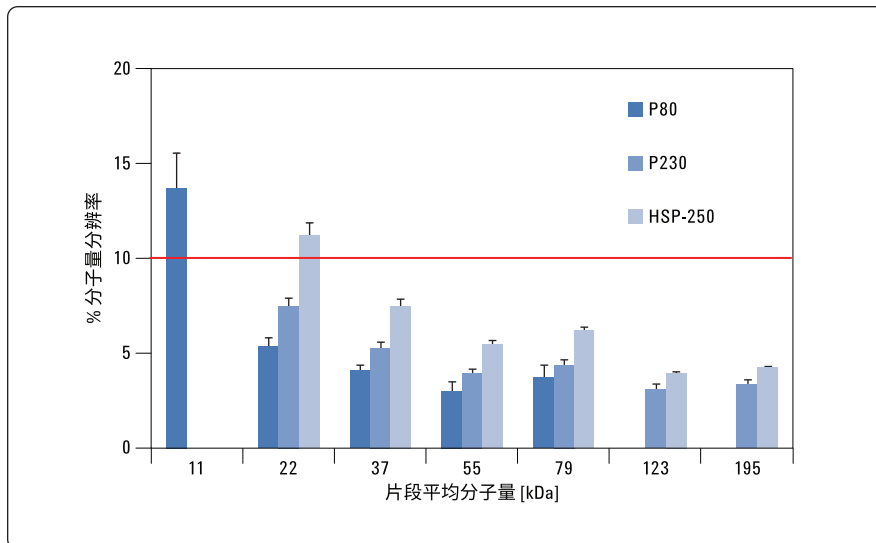


图 4 三种蛋白质分析方法在各自分子量范围内的分子量分辨率：对相应试剂盒的蛋白质分子量标准品进行分析，并计算相邻每对分子量标准品峰的分子量分辨率百分比。

	P80 分析	P230 分析	HSP-250 分析
分子量范围	5-80 kDa	14-230 kDa	10-250 kDa
应用领域	低分子量杂质的常规评估	不同分子量范围内的蛋白质杂质和分子量常规评估	高灵敏度杂质检测
分子量测量的精密度 ⁺	< 3%		< 3%
相对浓度 % 纯度	< 20% < 6%		< 20% < 5%
杂质检测 [*]	≤ 1.5%		0.03%
蛋白质染色/标记	芯片法		非芯片法
样品前处理时间	~ 10 min/10 个样品		~ 45 min/10 个样品
运行时间	~ 30 min		
分子量分辨率 (Rs = 0.8)	蛋白质分子量较高时 < 10%		

⁺ %CV (n = 5 个芯片)

^{*} 针对 IgG2

表 2 本研究的汇总表：列出了三种生物分析仪蛋白质分析方法的关键特征。

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/chem/2100 bioanalyzer](http://www.agilent.com/chem/2100_bioanalyzer)

仅限研究使用。
不可用于诊断目的。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2016
2016年2月1日，中国出版
出版号 5990-5283CHCN



Agilent Technologies