

# 大肠杆菌重组 L-天冬酰胺酶的聚集体分析

## 作者

Andrew Coffey 和  
Andrea Angelo P. Tripodi,  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

生物治疗性蛋白质聚集体的定量分析是确保质量和安全性的重要环节。重组蛋白质会遇到一系列可能导致聚集的条件，包括 pH、浓度、温度的变化以及暴露于表面和剪切力的情况。L-天冬酰胺酶的聚集体定量分析存在一定的挑战，因为它的结构容易形成不常见的高分子量聚集体。

本应用简报探讨了使用两种类型的体积排阻色谱柱 (SEC) 对聚集体进行定量：硅胶基-二醇类固定相 (Agilent ProSEC 300S) 和带亲水性聚合物涂层的硅胶固定相 (Agilent AdvanceBio SEC)。该研究还通过比较长期测试性能验证了方法的稳定性。

## 前言

研究人员在多年前就已发现 L-天冬酰胺酶具有抗癌特性<sup>[1,2]</sup>。这种酶可以将天冬酰胺转化为天冬氨酸和氨。某些癌细胞缺乏天冬酰胺合成酶，因此无法将天冬氨酸转化为天冬酰胺。当这些细胞缺少天冬酰胺供应时，它们就会凋亡。因此，L-天冬酰胺酶成为了一种重要的生物治疗药物，并开发了多种重组酶产品。

与许多重组生物治疗药物一样，L-天冬酰胺酶的聚集是一种关键质量属性，在生产和质量控制过程中必须对其进行定量。然而，天冬酰胺酶 (ASNase) 的活性形式是一种 148 kDa 的酶，包含四个相同的 37 kDa 亚基。因此，它可能形成的聚集体不仅包括低分子量物质，还包括八聚体和高阶聚集体。

之前已经报道了重组天冬酰胺酶聚集体定量分析面临的挑战<sup>[3]</sup>。来自不同供应商的各种体积排阻色谱柱在定量高阶聚集体方面存在差异，包括批次间差异。

## 实验部分

### 试剂与化学品

- 所有试剂和化学品均为 HPLC 级或更高等级
- 大肠杆菌 L-天冬酰胺酶购自 Sigma-Aldrich

### 仪器

分析采用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统进行，该系统包括以下模块：

- 1260 Infinity II 生物惰性四元泵 (G5654A)
- 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)
- 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)
- 1260 Infinity II 多波长检测器，配备生物惰性流通池 (G7165A)

使用 Agilent OpenLab CDS 2.6 软件采集数据。

使用新增的 Agilent 1260 Infinity Bio-SEC 多检测器系统 (G7805A) 进行光散射分析。

使用安捷伦 GPC/SEC 软件进行光散射数据分析。

### 样品前处理

用流动相制备牛血清白蛋白 (BSA) (20.0 mg/mL) 和肌红蛋白 (MYO) (10.0 mg/mL) 的储备液。等体积混合，制备 BSA-MYO 系统适用性标准品。

用 1.0 mL 流动相溶解样品瓶内容物，制备 L-天冬酰胺酶。

用 5.0 mL 流动相溶解样品瓶内容物，制备 BioRad 凝胶过滤标准品 (GFS) 蛋白质标准品。

### 流动相配制

将  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液与 NaCl 混合，并调节 pH 至 7.2，制备含 100 mmol/L 磷酸钠和 100 mmol/L NaCl 的流动相。然后通过 0.2  $\mu\text{m}$  滤膜过滤该溶液。

对于光散射分析，将流动相使用 0.1  $\mu\text{m}$  滤膜过滤三次。

表 1. 方法条件

HPLC 条件	
色谱柱	Agilent ProSEC 300S 5 $\mu\text{m}$ , 300 $\text{\AA}$ , 7.5 $\times$ 300 mm (货号 PL1147-6501), 或 Agilent AdvanceBio SEC 2.7 $\mu\text{m}$ , 300 $\text{\AA}$ , 7.8 $\times$ 300 mm (货号 PL1180-5301)
流动相	100 mmol/L 磷酸钠 + 100 mmol/L 氯化钠, pH 7.2
流速	0.5 mL/min
柱温	25°C
进样量	20 $\mu\text{L}$
总运行时间	30.0 分钟
检测	UV, 280 nm (除非另有说明)
序列	流速上升阶段 (包括冲洗) 0.1 mL/min, 5 min 0.2 mL/min, 5 min 0.3 mL/min, 5 min 0.4 mL/min, 5 min 0.5 mL/min, 120 min (冲洗) 分析阶段 0.5 mL/min, 30 min

## 结果与讨论

如上一节所述，每根色谱柱都经历了相同的一系列步骤。

初始阶段包括以 0.1 mL/min 的增量提高流速，直至达到 0.5 mL/min 的预期运行流速。然后冲洗各色谱柱 120 min (约 8-9 倍色谱柱体积)。进样序列包括空白 (流动相)、BioRad GFS 蛋白质标准品和 BSA-MYO 系统适用性标准品。在完成重组天冬酰胺酶进样后，再次进样 BSA-MYO 和 BioRad GFS 标准品。

图 1A 和 1B 比较了所研究的两根色谱柱的色谱图。ProSEC 300S 色谱柱为 7.5 × 300 mm，色谱柱体积为 13.3 mL。AdvanceBio SEC 色谱柱为 7.8 × 300 mm，色谱柱体积为 14.3 mL。

在 0.5 mL/min 的流速下，体积较大的 AdvanceBio SEC 色谱柱的保留时间可延长 2.2 min。然而，图 1A 和 1B 清楚显示了较大的蛋白质在 AdvanceBio SEC 色谱柱中较早洗脱。该结果表明，AdvanceBio SEC 色谱柱具有更大的孔隙体积 (6.4 mL 与 5.0 mL)，分离能力提高约 30%。

色谱图显示了 BioRad GFS 蛋白质标准品和 BSA-MYO 系统适用性标准品在两种色谱柱上的分离情况。根据色谱图中的最高峰进行了归一化处理。峰 7 (肌红蛋白) 为两种样品所共有，显示出优异的保留时间重现性。次峰对应于样品中存在的几种蛋白质的二聚体，这些峰得到了良好的分离并在图例中标明了峰归属。

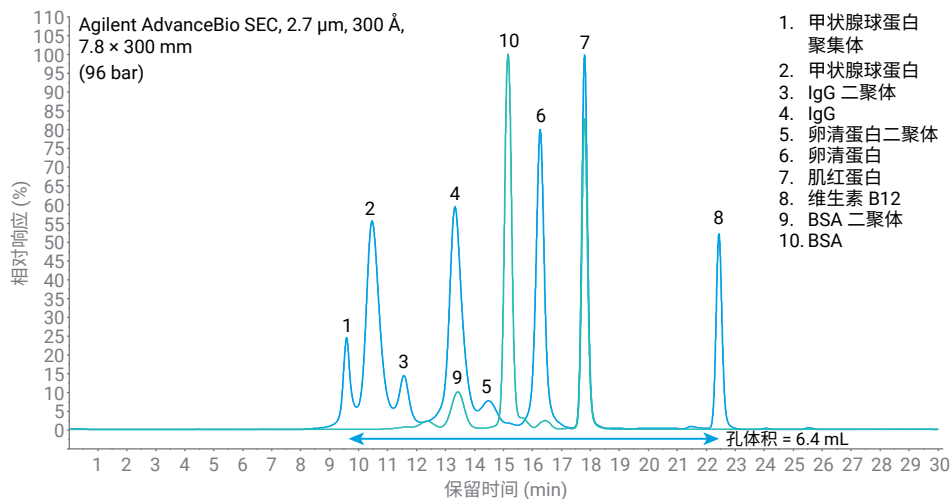


图 1A. BioRad GFS 蛋白质标准品 (峰 1-8) 和 BSA-MYO 系统适用性标准品 (峰 9 和 10) 的 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱叠加色谱图

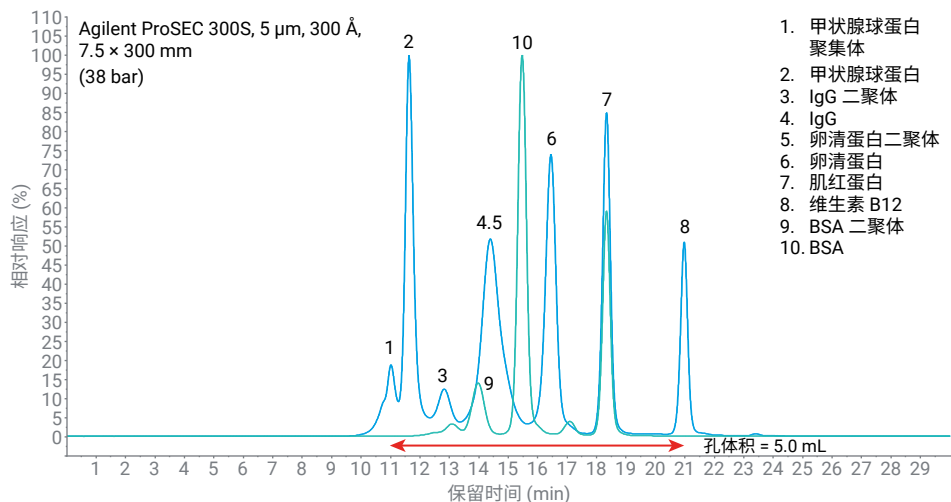


图 1B. BioRad GFS 蛋白质标准品 (峰 1-8) 和 BSA-MYO 系统适用性标准品 (峰 9 和 10) 的 Agilent ProSEC 300S 色谱柱叠加色谱图

表 2 列出了系统适用性混标的分离度值，包括 BSA 二聚体与单体峰以及 BSA 单体与肌红蛋白单体峰之间的分离度。

与 ProSEC 300S 色谱柱相比，AdvanceBio SEC 色谱柱具有更大的孔体积和更小的粒径（柱效更高），因此分离度显著提高。

图 2 显示了以分子量的对数为 Y 轴并以保留时间为 X 轴绘制的校准曲线。曲线清晰显示了孔体积的差异。因此，我们进行了进一步的测试。

使用来自不同固定相批次的第二根 AdvanceBio SEC 色谱柱来监测性能随时间的变化。我们设计了一个由 25 次连续进样组成的序列，包括：

- 空白 (mp)
- BioRad GFS 蛋白质标准品
- BSA-MYO 标准品

在 6 天内重复该序列 12 次，共 300 次进样，并对不同序列的色谱柱性能进行了比较。

图 3 显示了 300 次进样实验期间 BSA-MYO 分离度的一致性。

表 2. BSA-MYO 分离度的比较

	Agilent AdvanceBio SEC (2.7 $\mu\text{m}$ , 300 $\text{\AA}$ , 7.8 $\times$ 300 mm)	Agilent ProSEC 300S (5 $\mu\text{m}$ , 300 $\text{\AA}$ , 7.5 $\times$ 300 mm)
BSA 二聚体 - BSA 分离度	2.64	2.16
BSA-MYO 分离度	6.28	5.49

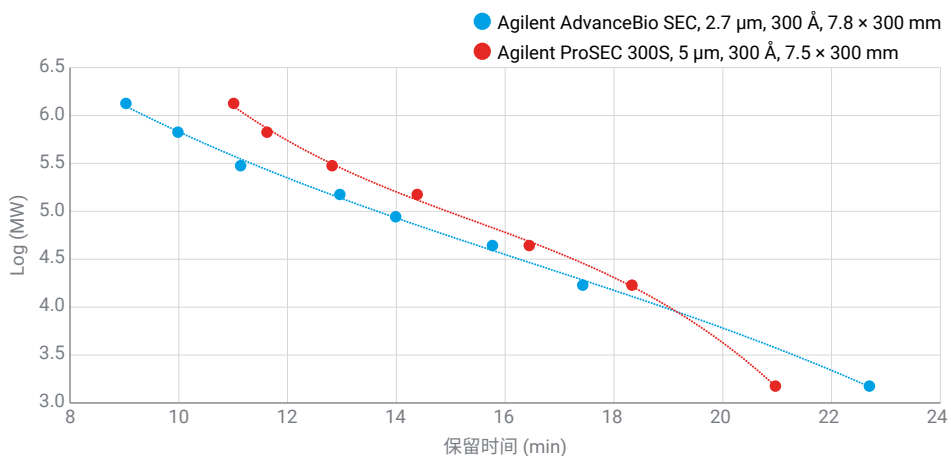


图 2. 基于蛋白质保留时间的校准曲线

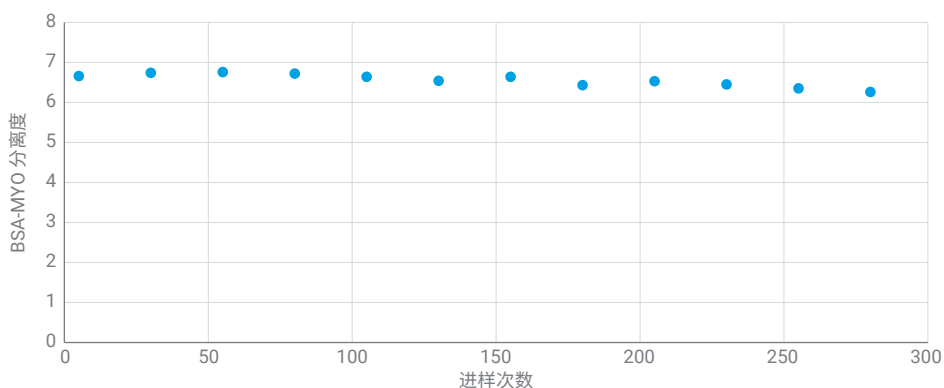


图 3. 300 次进样序列期间的 BSA-MYO 分离度

图 4A 和 4B 显示了序列开始和结束时的色谱图，证明了分析的稳定性。

这些结果与第一根 AdvanceBio SEC 色谱柱的结果相当，表现出良好的批次间一致性。

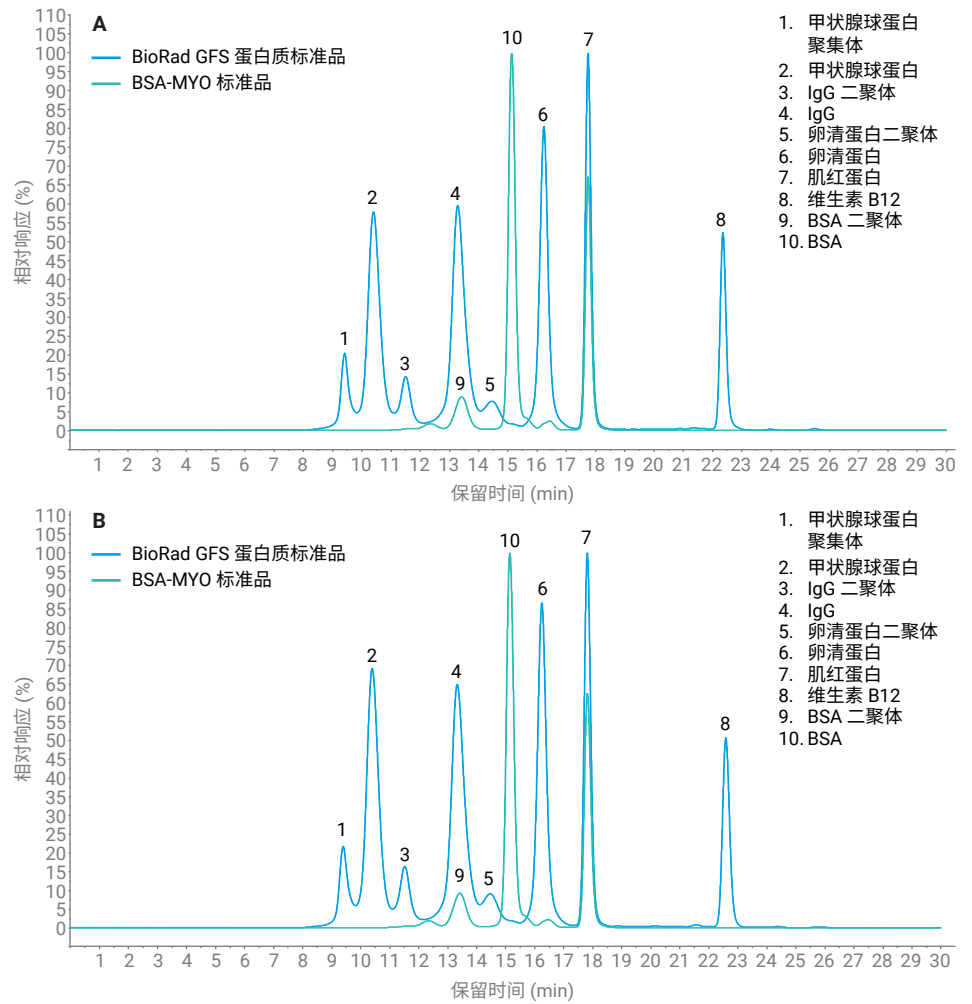


图 4. BioRad GFS 蛋白质标准品（峰 1-8）和 BSA-MYO 系统适用性标准品（峰 9 和 10）在长时间的 300 次进样序列开始 (A) 和结束 (B) 时的 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱叠加色谱图

图 5A 和 5B 显示了天冬酰胺酶的色谱图，与预期相符。主峰 2 对应于 ASNase 酶的四聚体形式。预计峰 4 为单体形式，峰 1 为聚集体，峰 3 未知，可能为二聚体形式。

为了证实这些假设，将这些数据点绘制到之前通过蛋白质标准品获得的校准曲线上（图 6）。

令人意外的是，与测试标准品中包含的其他球蛋白相比，天冬酰胺酶峰的洗脱时间晚于预期（即分子的流体力学半径似乎更小）。因此，我们决定使用光散射检测器以及 UV 检测器进行进一步的分析。

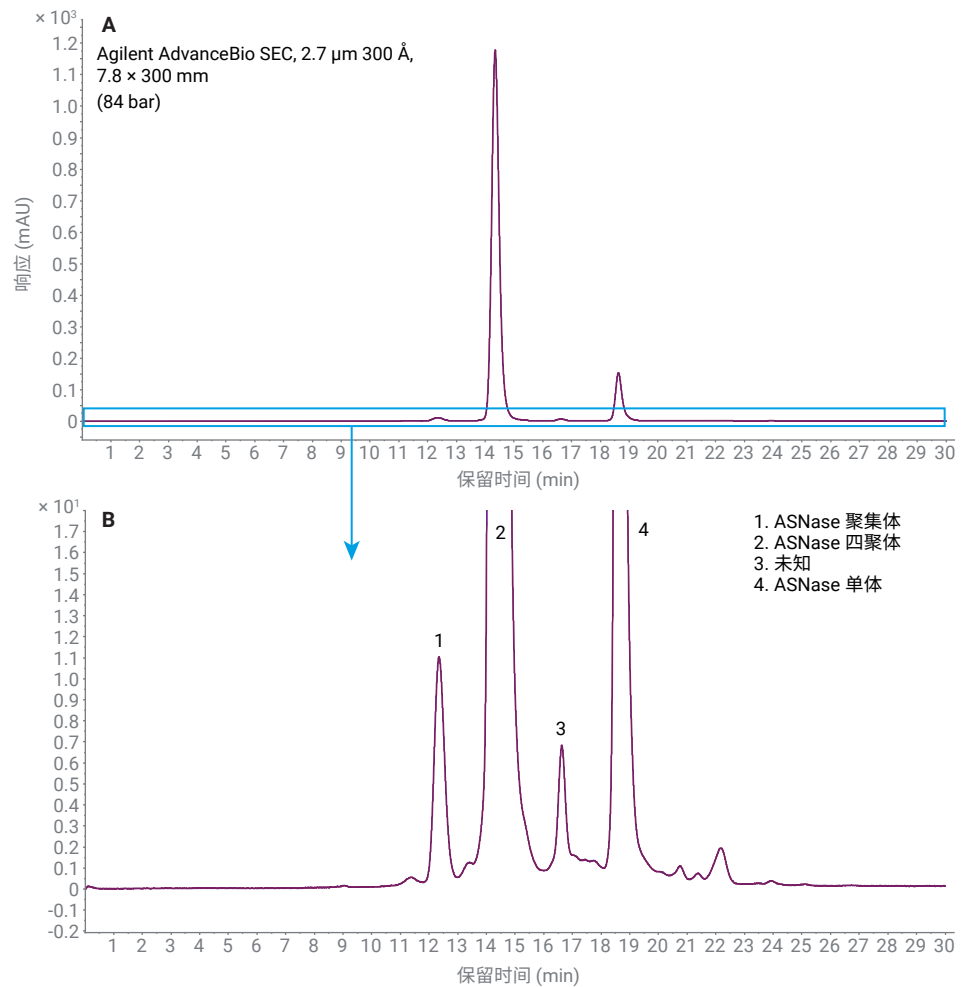


图 5. (A) 使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱获得的天冬酰胺酶色谱图。(B) 放大区域

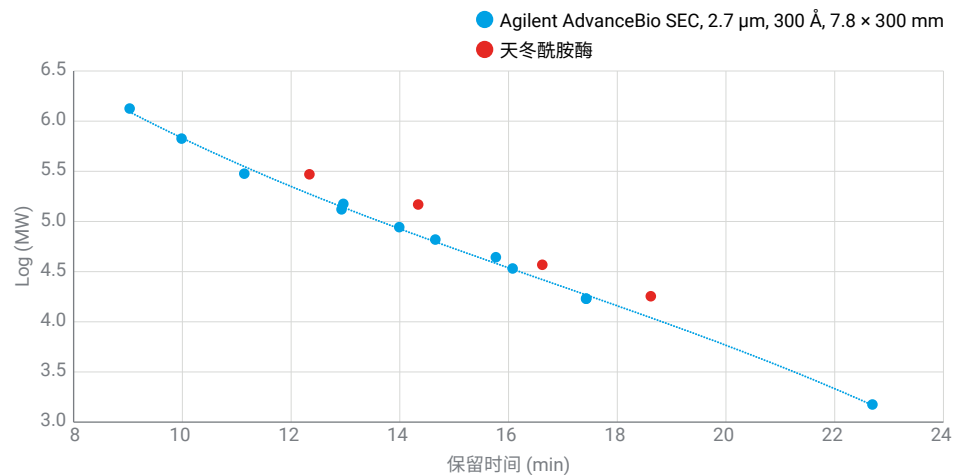


图 6. 基于蛋白质标准品的校准曲线（与图 2 相同），叠加显示天冬酰胺酶数据点

图 7 显示了光散射分析的结果，将 AdvanceBio SEC 色谱柱与 ProSEC 300S 色谱柱进行了比较。

利用 AdvanceBio SEC 色谱柱的响应，可以结合使用光散射检测器信号和 UV 检测器信号进行分子量分析。遗憾的是，ProSEC 300S 的光散射信号噪音太大，无法进行可比性分析。

使用 GPC/SEC 软件测得主峰的分子量为 139 kDa。这一结果是使用比折射率增量 (dn/dc) 值 0.186 和理论紫外消光系数 ( $\epsilon^{0.1\%}$  280 nm) 0.64 计算得到的。该分子量与含有 4 个 37 kDa 亚基的分子的预期值高度一致。

## 结论

本应用简报证明了 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱作为 Agilent ProSEC 300S 色谱柱的高效改进型替代品，适用于生物治疗酶 L-天冬酰胺酶的聚集体分析。

更小的填料粒径和更大的孔体积使分离度显著提高，色谱柱运行压力仅略微增加。此外，还证明了该色谱柱在长时间使用（6 天 300 次进样）的情况下具有出色、稳定的性能，并且与光散射检测相结合时性能进一步提升。

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE50599102

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，2023  
2023 年 7 月 28 日，中国出版  
5994-6587ZHCN

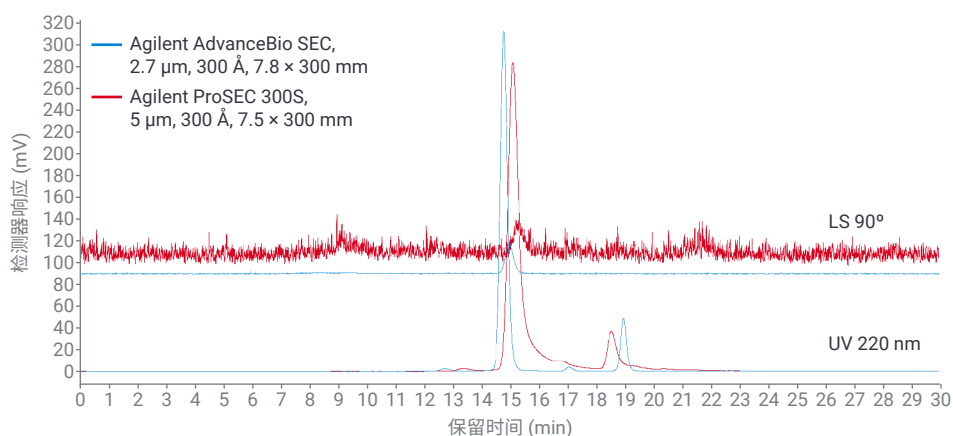


图 7. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱对天冬酰胺酶进行光散射 (LS) 检测器分析

## 参考文献

1. Kidd, J. G. Regression of Transplanted Lymphomas Induced *In Vivo* by Means of Normal Guinea Pig Serum: I. Course of Transplanted Cancers of Various Kinds in Mice and Rats Given Guinea Pig Serum, Horse Serum, or Rabbit Serum. *J. Exp. Med.* **1953**, *98*(6), 565–582
2. Broome, J. D. Evidence That the L-asparaginase of Guinea Pig Serum Is Responsible for Its Antilymphoma Effects. I. Properties of the L-Asparaginase of Guinea Pig Serum in Relation to Those of the Antilymphoma Substance. *J. Exp. Med.* **1963**, *118*(1), 99–120
3. Gervais, D. *et al.* Robust Quantitation of Basic-Protein Higher-Order Aggregates Using Size-Exclusion Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *139*, 215–220