



使用 FPLC 结合 LenS3 MALS 检测器表征生物大分子

简介

尺寸排阻色谱法 (SEC)，特别是凝胶过滤色谱法 (GFC)，是分离生物材料和生物制药产品 (如单克隆抗体 (mAb)) 的重要工具。为深入探究材料的物理特性，在通用色谱系统中配备多角度光散射 (MALS) 检测器已经成为了行业的普遍需求。

ÅKTA pure® 是一种用于纯化蛋白质、肽和核酸的常见 FPLC 系统。本文是就 ÅKTA pure 与 LenS3 MALS 检测器的兼容性展开讨论。使用该组合不仅能够定性检测 ÅKTA 系统所连色谱柱分离的各个片段，还能够定量测定每种物质 (包括靶向分子、杂质、聚集体和片段) 的绝对分子量和尺寸。

材料与方法

设备: ÅKTA pure 25 串联 UV 检测器 (@280 nm) 和 LenS3 MALS 检测器
 色谱柱: 1×Superdex® 200 Increase 10/300 GL, 8.6 μm, 10 mm ID × 30 cm
 流动相: 100 mmol/L 磷酸钠、100 mmol/L 硫酸钠、0.01% 叠氮化钠, pH 6.8
 流速: 0.60 mL/min
 温度: 室温
 进样量: 35 μL

结果和讨论

单克隆抗体 (mAb)

样品和条件

- NIST mAb (0.48 mg/mL); 曲妥珠单抗 (0.79 mg/mL, Herceptin® 生物仿制药); 阿达木单抗 (0.45 mg/mL, Humira® 生物仿制药)
- $dn/dc = 0.187 \text{ mL/g}$; dA/dc (NIST mAb) = 1.42 mL/g; dA/dc (曲妥珠单抗) = 1.48; dA/dc (阿达木单抗) = 1.4

图 1. 分子量分布与 NIST mAb (红色)、曲妥珠单抗 (蓝色) 和阿达木单抗 (绿色) 的 UV 信号叠加图

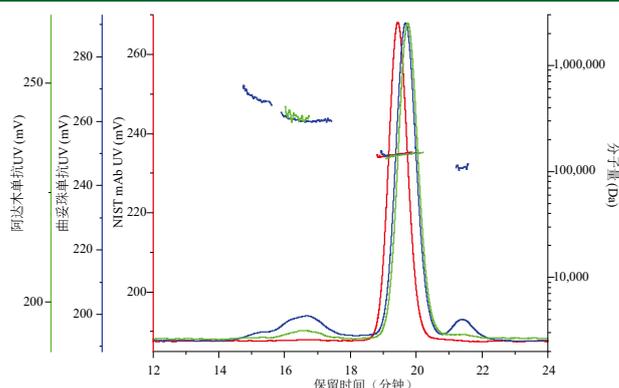


表 1. LenS3 对 mAb 的分子量表征

峰	片段	单体	二聚体	三聚体
NIST mAb	N/A	147,198	N/A	N/A
曲妥珠单抗	116,081 (1.40%)	147,118 (79.62%)	306,051 (12.40%)	487,714 (0.64%)
阿达木单抗	97,930 (2.72%)	146,059 (96.53%)	329,747 (0.75%)	N/A

结论

- 不同 mAb 的片段、单体、二聚体和三聚体的计算分子量表明其分子量与文献记录的分子量基本一致，同时也佐证了 LenS3 可以精确测定 mAb 的分子量。
- LenS3 能够不受保留时间偏移 (长期使用色谱柱引起) 的影响，精确计算出绝对分子量。

牛血清白蛋白 (BSA)

样品和条件

- 来自 Sigma Aldrich 的 BSA (琼脂糖凝胶电泳纯度为 98%)
- 浓度 = 4.68 mg/mL
- $dn/dc = 0.185 \text{ mL/g}$; $dA/dc = 0.667 \text{ mL/g}$

图 2. BSA 的 LALS (红色)、RALS (蓝色) 和 UV (黄色) 信号及其分子量分布 (绿色) 图。

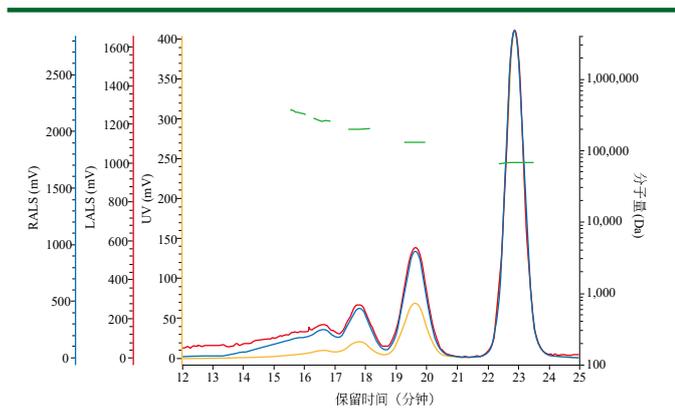


表 2. LenS₃ 对 BSA 的分子量表征

峰	表征对象	保留时间 (mL)	MW (Da)	%
1	单体	22.890	66,753	74.39
2	二聚体	19.625	130,473	15.56
3	三聚体	17.786	197,473	4.94
4	四聚体	16.611	263,962	3.53
5	五聚体	16.056	338,954	1.14

表 3. LenS₃ 对 BSA 分子量表征的重复性

进样#	单体	二聚体	三聚体	四聚体	五聚体
1	66,753	130,473	197,473	263,962	338,954
2	66,902	130,207	196,442	261,635	339,866
3	66,979	130,927	196,226	265,314	341,306
平均	66,878	130,536	196,714	264,637	340,042
%RSD	0.172	0.279	0.339	0.706	0.349

结论

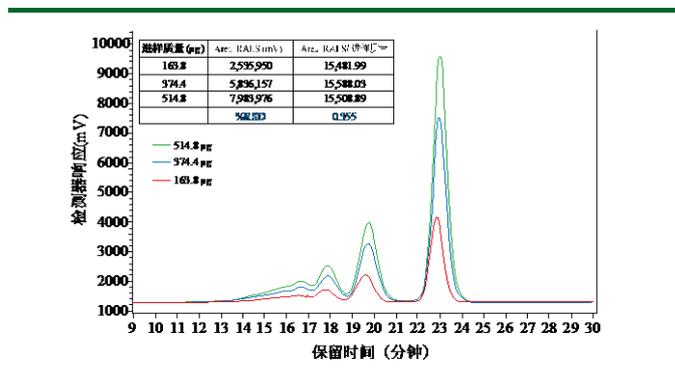
- LenS₃ 的灵敏度极高, 不仅可以检测和计算蛋白质单体, 还可以检测和计算微量聚集体 (如, 含量仅为 1.14% 的五聚体)!
- LenS₃ 拥有出色的灵敏度和可靠的性能, 即使是五聚体也能实现 %RSD < 1%。

检测线性度

样品和条件

- 来自 Sigma Aldrich 的 BSA (琼脂糖凝胶电泳纯度为 98%), 进样量不同。

图 3. 不同进样量下 BSA 的 RALS 信号叠加图。



结论

- LenS₃ 在不同的样品进样量下均展现出了卓越的检测线性度 (偏差低于 0.5%)。

总结

与 ÄKTA pure FPLC 系统结合, LenS₃ MALS 检测器可实现:

- 对表征蛋白质单体和聚集体具有无与伦比的灵敏度。
- 拥有出色的重复性和精密度。
- 能够精确可靠地计算分子量 (不受保留时间偏移的影响!)
- 不同进样量下线性优异。

LenS₃ MALS 检测器与 ÄKTA pure FPLC 系统的组合使用方式未获得 Cytiva 的批准或赞助。Tosoh Bioscience 与 Cytiva 无任何合作关系。

TSKgel 和 Tosoh Bioscience 是 Tosoh Corporation 的注册商标。

LenS 是 Tosoh Bioscience LLC 在美国、印度和日本的注册商标。

SECview 是 Tosoh Bioscience LLC 在美国、欧盟和印度及东曹公司在日本的注册商标

ÄKTA 和 Superdex 是 Cytiva 的注册商标。

Herceptin 是 Genentech, Inc. 的注册商标。

Humira 是 AbbVie Biotechnology Ltd. 的注册商标。