



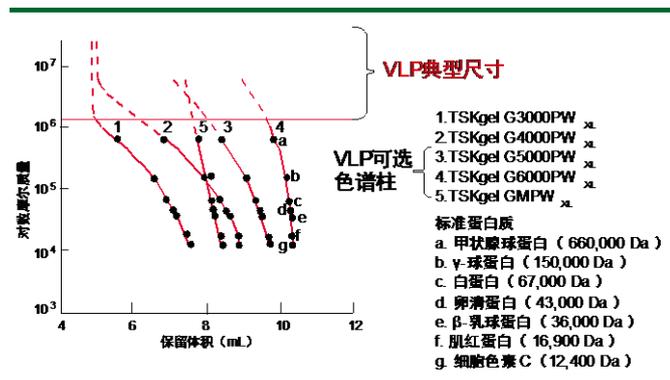
使用 LenS₃ 多角度光散射检测器测定 VLPs 的分子量

病毒和病毒样颗粒 (VLPs) 是一种多聚蛋白质结构, 与天然病毒相似, 但不具有传染性。VLPs 在研制新型疫苗和基因治疗产品方面的潜力越来越大, 已成为了广受关注的研究课题。例如, 商用的 VLP 疫苗已经可用于防治乙型肝炎和人乳头瘤病毒。因此, 为了确保最终产品的质量, 以及向开发过程中的知情决策提供数据支持, 我们需要切实可靠的分析技术。

尺寸排阻色谱法 (SEC) 分析技术能够分析出大分子的尺寸和纯度, 与多角度光散射 (MALS) 检测器结合使用时, 不仅能够测定分子量 (MW), 还能够计算出回转半径 (R_g 或尺寸)。关键是, AU₂₈₀ 检测仪基于浓度, 而 MALS 同时对应浓度和分子量。因此, 对于分子量较大的 VLPs, MALS 检测器散射光响应信号强, 这使得即使在远低于 AU₂₈₀ 检测限的稀溶液中 VLP 检测成为可能。

SEC 分析超大分子时遇到的首要挑战是如何选择使用合适的分析柱。本文探讨了 TSKgel® PW_{XL} 系列 SEC 色谱柱在分析 VLPs 这样的大分子的应用, 该系列色谱柱固定相基质为不同孔径的聚甲基丙烯酸酯。图 1 的蛋白质校准曲线显示了 TSKgel PW_{XL} 色谱柱的分离范围。大多数 VLP 的分子量均在 1 兆道尔顿以上, 因此 TSKgel G5000PW_{XL} (孔径 100 nm)、TSKgel G6000PW_{XL} (孔径 >100 nm) 和 TSKgel GMPW_{XL} (混合床) 三款色谱柱都是分析 VLPs 的理想选择。

图 1. TSKgel PW_{XL} 色谱柱上的蛋白质校准曲线



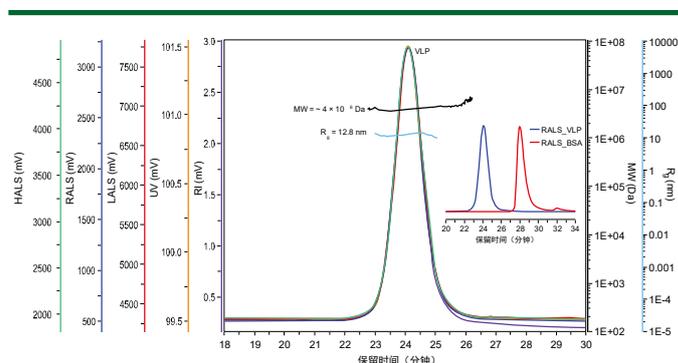
材料与方法

色谱柱: TSKgel GMPW_{XL} (13 μm, 7.8 mm ID × 30 cm)
TSKgel G5000PW_{XL} (10 μm, 7.8 mm ID × 30 cm)
设备: Thermo Scientific UltiMate® 3000
流动相: 0.145 mol/L NaCl + 0.01 mol/L HEPES + 0.05% NaN₃ (pH 7.4) (折射率 1.333)
流速: 0.3 mL/min 或参照标示
检测器: UV: UltiMate 3000 多波长检测器
RI: Shodex RI-504 半微型 RI 检测器
MALS: LenS₃ MALS 检测器
样品: 细小病毒 VLP (MVM-MVP) (Cygnus Technologies), 包装 1 × 10¹² 颗粒/mL (10-15 μL 进样), (dn/dc = 0.19, dA/dc = N/A)
MALS 校准物: BSA, 5 mg/mL (dn/dc = 0.185, dA/dc 0.66)

本应用中, 我们使用了 TSKgel GMPW_{XL} 和 TSKgel G5000PW_{XL} 色谱柱分别与 LenS₃ MALS 检测器联用分析了细小病毒 VLP。RI 或 UV 都可以用作浓度检测器。RI 配合直角光散射信号 (RALS) 用于测量 MW。极小角度 (LALS)、直角和极大角度 (HALS) 信号用于角不对称性图的绘制以及测定 R_g 。分析样品之前, 先用 BSA 校准 MALS 检测器, 然后使用 SECview® 软件处理和分析数据。

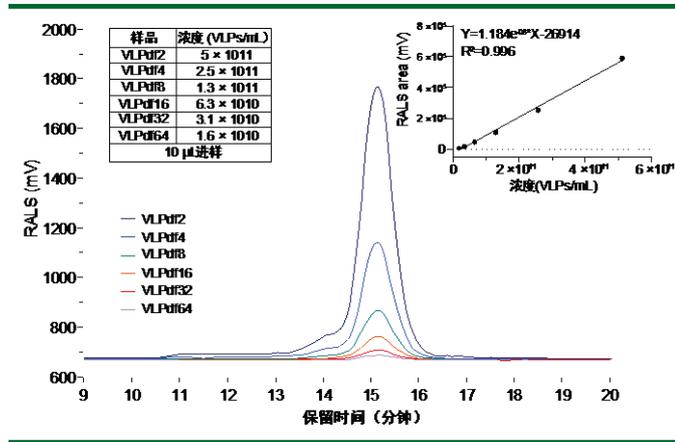
使用 TSKgel GMPW_{XL} 色谱柱进行细小病毒 VLP 的 SEC-MALS 分析, 揭示其 MW 约为 4 兆道尔顿, R_g 为 12.8 nm (图 2)。这些结果与该 VLP 的报告值非常吻合 (Biotech. Prog. 34, 1213-1220, 2018)。

图 2. 使用 TSKgel GMPW_{XL} (混合床) SEC 色谱柱分析细小病毒 VLP 和 BSA



如图 3 所示，将细小病毒 VLP 稀释至 64 倍，然后注射 10 μ L 到 TSKgel G5000PW_{XL} 色谱柱中。使用 LenS₃ MALS 检测器的 RALS 信号，仍可以检测到每毫升约 3×10^{10} 个颗粒，由此可见该信号可用于分析低浓度的物质或分析处理微量样品。

图 3. 使用 TSKgel G5000PW_{XL} 在 0.5 mL/min 下通过 RALS 的检测限



结论

此前，质谱分析是测定 VLP 尺寸最常用的方法，但是该技术成本高昂，且对于高频分析是不切实际的。更好的替代方案是，使用 SEC-MALS 分析技术来测定 MW 和 R_g ，该技术不仅能够进行常规分析，还可以执行过程监控。TSKgel PW_{XL} SEC 色谱柱的孔径和分离范围均比较宽，可以有效应对 SEC 分析中面临的挑战，如分离超大分子时需要更大孔径的固定相。而且，此类 SEC 色谱柱配合东曹超高灵敏度 LenS₃ MALS 检测器，可以快速、简便地进行 MW 和 R_g 的高水平 (LOD) 分析。

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

UltiMate 是 Dionex Corporation 的注册商标。

LenS₃ 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 Tosoh Corporation 在日本的注册商标。