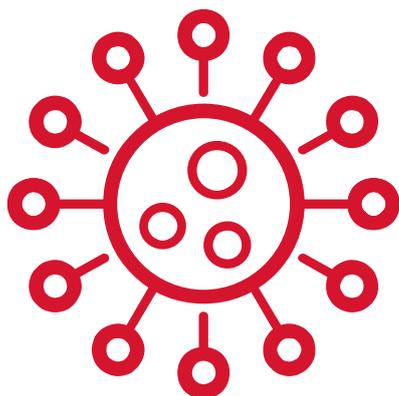




使用 SEC-MALS 分析 SARS-CoV-2 三聚体 刺突蛋白



分析复合蛋白

客户面临的挑战

- ▶ 处理用于生物治疗或诊断的复合蛋白及蛋白质聚集体。
- ▶ 实现其关键质量属性的高级表征。

东曹的解决方案

LenS3 MALS 检测器

- ▶ 一种高灵敏度光散射检测器

做了什么？

- ▶ 使用 SEC-MALS 表征了三聚体刺突蛋白的几种变体和修饰版本。

结果如何？

- ▶ 分子量和尺寸测定显示其结构存在显著差异

SEC 与 LenS3 MALS 检测器联用，能够以无与伦比的灵敏度测定分子量和绘制尺寸曲线，从而对复合蛋白进行深度表征。

客户权益

表征并区分复合蛋白的关键质量属性。

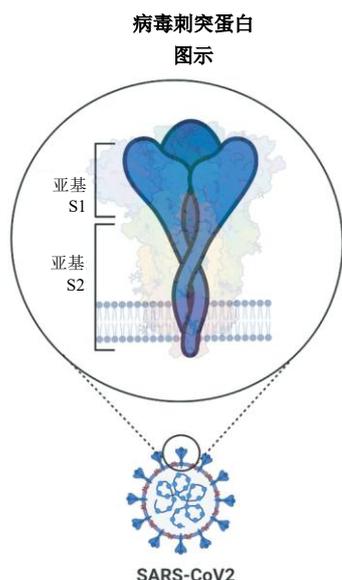


尺寸排阻色谱法与 MALS 联用分析

SARS-CoV-2 三聚体刺突蛋白

科学界最近的研究焦点是如何克服由严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 引起的新冠肺炎 (COVID-19) 大流行。该 RNA 病毒有四种主要的结构蛋白 (刺突蛋白 (S)、包膜蛋白 (E)、膜蛋白 (M) 和核衣壳蛋白 (N))。刺突蛋白指向外侧, 如图 1 所示。该类糖蛋白会协助病毒依附于各种表面并介导进入宿主细胞。因此, 纯刺突蛋白可用于检测 SARS-CoV-2 抗体的抗原, 开发疫苗及其他治疗和诊断应用。

图 1. SARS-CoV-2 表面的三聚体刺突蛋白



SARS-CoV-2 三聚体刺突复合物(图1)是免疫系统的主要靶点。因此, 稳定的三聚体刺突蛋白是 RNA 和病毒载体候选疫苗的首选抗原, 而且诊断应用中, 其优异的灵敏度和特异性也使之成为检测 SARS-CoV-2 抗体的最优选择。ExcellGene SA 在 CHO 细胞中制造出了可溶性 SARS-CoV-2 三聚体刺突蛋白^[1]。

糖基化目前已成为影响刺突蛋白活性的一个重要参数, 使用不同生产平台生产的刺突蛋白的糖基化已在先前的工作中得到了充分评估。不同平台上均保留了糖基化图谱。这可与聚糖特异性位点相关联成为一个高度敏感的蛋白质结构预告。

完全糖基化的刺突蛋白的分子动力学模拟支持空间限制模型, 该模型塑造了聚糖的酶促加工过程^[2]。但是, 表达所需糖基化图谱的刺突蛋白仍具有一定的挑战性。HexaPro 修饰锁定了三聚体在病毒上的融合前状态, 这与疫苗和诊断工具有关。此外, HexaPro 变体导致了更高的表达和稳定性的提高^[3]。

因此, 需要合适的分析技术验证刺突蛋白的结构, 确保其质量。寡聚蛋白的三个关键质量参数为纯度、分子量 (MW) 和尺寸 (回转半径或 R_g)。

尺寸排阻色谱法 (SEC) 常用于测定蛋白质的尺寸和纯度, 与多角度光散射 (MALS) 法联用时, 能够同时测定 MW 和 R_g, 是一种更为先进的分析方法。通过光散射测得的真正分子量揭示了蛋白质的聚集状态, 阐明了其寡聚结构。目前来说, 刺突蛋白由于其 R_g 太小, 无法使用 MALS 进行表征。但是最近的技术发展已能够测定低于 10 nm 的 R_g。对比 MALS 计算所得的 R_g 与理论模拟或结构研究的结果, 可获取蛋白质可能构象的全面信息。

本研究中, 我们使用 SEC-MALS 的最新研究成果, 表征了 ExcellGene 生产的三聚体刺突蛋白的几种变体和修饰版本。

实验条件

仪器:	UHPLC 系统
检测器:	示差折光检测器 东曹 LenS ₃ MALS 检测器
色谱柱:	1x TSKgel UP-SW Aggregate (0023524) 4.6 mm ID × 30 cm; 3 μm; 30 nm
流动相:	100 mM 磷酸盐, 100 mM 硫酸钠, 150 mM 氯化钠, pH 6.7
流速:	0.35 mL/min
温度:	室温
进样量:	10 μL

结果和讨论

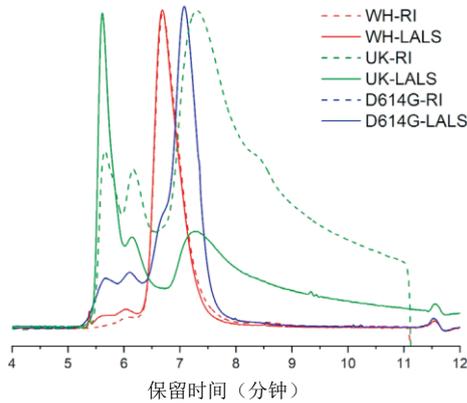
刺突蛋白变体小角度光散射 (LALS) 和示差折光 (RI) 色谱图对比

对比 RI 和 LALS 色谱图 (图 2)，可以发现由于光散射的响应更依赖于分子量，LALS 明显更容易检测到微量聚集体。其更高的灵敏度使得能够更好地表征刺突蛋白的纯度。

表 1. 样品信息

样品 ID	浓度 (mg/mL)
WH1	1.087
WH1	1.083
Beta	1.088
D614G-2Pro	1.135
D614G-6Pro	0.885

图 2. SARS-CoV-2 刺突蛋白变体的 LALS (实线) 和 RI (虚线) 洗脱曲线



LALS 测定的三聚体刺突蛋白变体的分子量分布

无论蛋白质聚集体、三聚体和片段 / 杂质的占比如何，图 3 中重叠的分子量分布曲线显示这些变体的结构曲线非常接近。主峰的平均分子量约为 500 kDa (表 2)，高于预测值 420 kDa (从不含聚糖的三聚体 S 蛋白的氨基酸序列计算而来)，但与 SDS-PAGE 结果 (单体为 150~170 kDa) 极为匹配。其他文献也报道了类似发现^[4]。

三聚体刺突蛋白变体的尺寸分布

虽然其分子量分布曲线几乎一致 (图 3)，但其 Rg 值稍有不同 (图 4)。该结果显示三聚体刺突蛋白变体的构象稍有不同。但是，在其聚集状态下，其尺寸趋于收敛。所测三聚体蛋白的 Rg 值为 ~6 和 ~9 nm，也与文献值一致^[5,6] (长度为 18~23 nm，不超过 30 nm，或宽度为 5 nm。如果类比圆柱体形状: Rg = 6.3~9.4 nm)。

图 3. 三种 S 蛋白变体的分子量分布和 RI 色谱重叠图

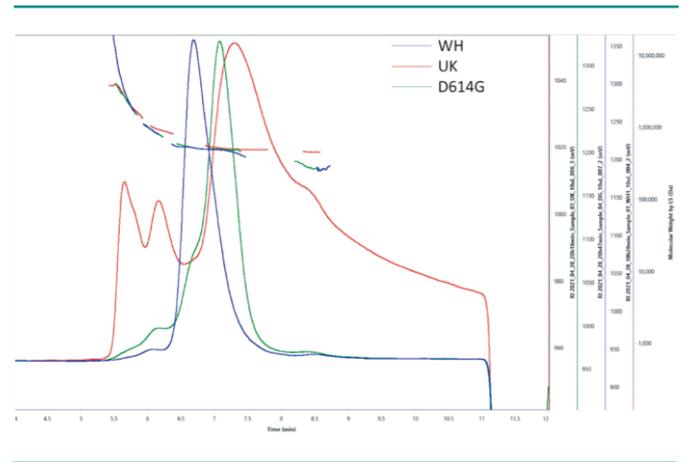
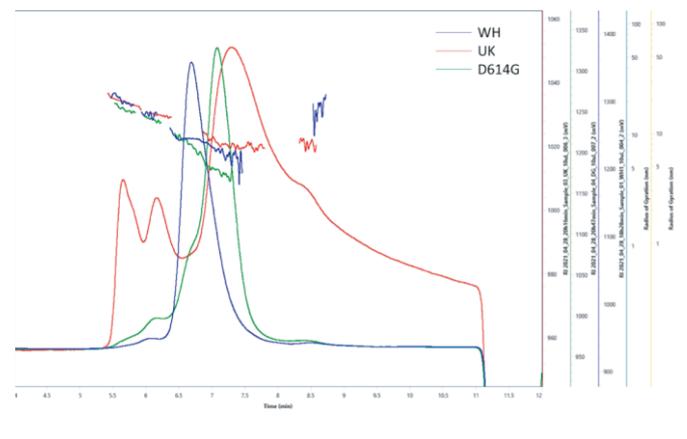


图 4. Rg 分布和 RI 色谱重叠图

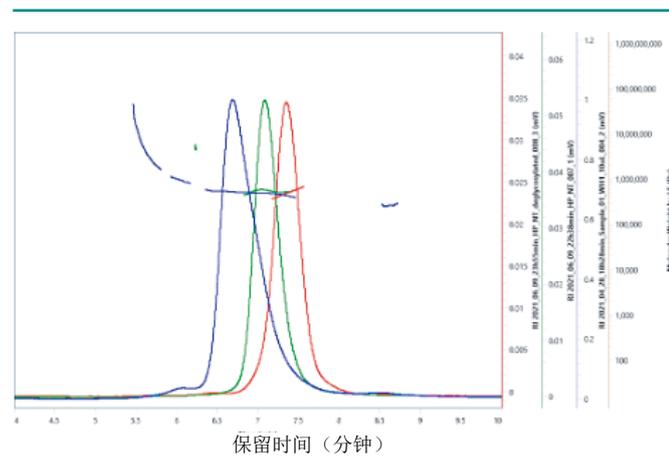


刺突蛋白修饰对其分子量、尺寸和形状的影响

我们比较了野生型 WH 三聚体刺突蛋白和两个修饰样品之间的色谱图和分子量分布 (图 5)。RI 色谱图显示经 HexaPro 修饰的三聚体刺突蛋白中聚集体较少。

MALS 计算也表明，经 HexaPro 修饰的样品其分子量略高（535.8 kDa vs. 498.9 kDa），但尺寸更小（洗脱较晚，Rg 值为 7.7 nm vs. 8.6 nm），与预期的 HexaPro 修饰效果相关性较高。HexaPro 三聚体蛋白去糖基化后，分子量无变化。但是，表现尺寸更小（6.3 nm），可能是由于蛋白质除糖后构象发生了轻微调整。

图 5. 野生型（蓝色）和两种修饰的 WH 刺突蛋白（HexaPro: 绿色，HexaPro 去糖基化: 红色）的 RI 色谱和分子量分布重叠图



结论

SEC-MALS 可从多种变体及其 Hexapro 稳定版和去糖基化版测定 SARS-CoV-2 三聚体刺突蛋白的分子量（MW）和尺寸（Rg）。不同变体、修饰或糖基化曲线之间检测到了轻微的分量和尺寸变化。

此类 SEC-MALS 表征只有通过 LenS₃ MALS 检测器配合 TSKgel UP-SW Aggregate 色谱柱才能够实现，因其优异的分离性能和灵敏度，使三聚体刺突蛋白的结构及其显著差异的确认成为可能。

LenS₃ MALS 检测器是唯一能够测量 10 nm 以下 Rg 的 MALS 检测器，借此我们可测定 6 nm 到 9 nm 之间的尺寸变化，与文献中的尺寸信息一致。

表 2. 三聚体刺突蛋白样品的分析

样品 ID	分子量 (kDa)				Rg (nm)			
	片段	主峰	聚集体 1	聚集体 2	片段	主峰	聚集体 1	聚集体 2
WH	260.1	498.9	924.2	3,108.7	8.6	15.2	20.5	
UK	446.7	494.6	899.8	2,370.8	8.4	8.3	15.2	20.0
D614G	286.8	493.9	857.6	2,247.4	6.2	14.0	17.2	
HexaPro		535.8			7.7			
HexaPro 去糖基化		497.4			6.3			

在研发及质量控制中使用 SEC-MALS 技术表征刺突蛋白和其他复杂生物分子时，LenS₃ MALS 检测器和 TSKgel UP-SW Aggregate 色谱柱是非常理想的选择。

参考文献:

- Pino, P et al. (2020) Trimeric SARS-CoV-2 Spike Proteins Produced from CHO Cells in Bioreactors Are High-Quality Antigens. *Processes* 2020, 8(12), 1539; doi: <https://doi.org/10.3390/pr8121539>
- Allen, JD et al. (2021) Site-Specific Steric Control of SARS-CoV-2 Spike Glycosylation. *Biochemistry* 2021, 60, 27, 2153–2169. doi: [10.1021/acs.biochem.1c00279](https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00279)
- Hsieh, CL et al. (2020) Structure-based Design of Prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spikes. *bioRxiv [Preprint]*. 2020 5 月 30:2020.05.30.125484. doi:[10.1101/2020.05.30.125484](https://doi.org/10.1101/2020.05.30.125484).
- Herrera, NG., et al.(2020) Characterization of the SARS-CoV-2 S protein: biophysical, biochemical, structural, and antigenic analysis.2020.6(1): 第 85~102 页. doi:[10.1101/2020.06.14.150607](https://doi.org/10.1101/2020.06.14.150607)
- Estes, MK and Cohen, J (1989) Rotavirus gene structure and function.1989.53(4): 第 410~449 页. doi: [10.1128/mr.53.4.410-449.1989](https://doi.org/10.1128/mr.53.4.410-449.1989)
- Li, X and Luk, HKH (2019) Human Coronaviruses: General Features, in Reference Module in Biomedical Sciences.2019, Elsevier. doi: [10.1016/B978-0-12-801238-3.95704-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.95704-0)

精选产品

货号	产品描述	尺寸
0023524	TSKgel UP-SW Aggregate	4.6 mm ID × 30 cm L
0040000	LenS ₃ 多角度光散射检测仪	
0040001	UHPLC 转换服务套件 (LenS ₃ MALS 检测仪用)	