

重组单抗药物的非还原电泳纯度分析

程立均 魏敬双 张世雄 李耿 贾茜

【摘要】目的 对重组单抗药物的非还原电泳纯度进行分析,排除样品制备过程中形成的一些假象。方法 结合重组单抗的分子结构特征,改变常规 SDS-PAGE 条件,将抗体样品在不同的缓冲液及电泳条件下进行比较。结果 抗体在非还原 SDS-PAGE 纯度检测中出现的次带,可通过在供试品缓冲液中加入烷基化试剂封闭自由巯基而几乎全部消除,通过降低电泳过程的环境温度,可有效降低主带上方高相对分子质量带的出现。结论 单抗药物中由于含有多对二硫键引起的一些因电泳样品制备而形成的假象带,可以通过试验方法的修正而去除。

【关键词】重组单抗;非还原 SDS-PAGE;纯度;二硫键

Analysis of Non-reduced SDS-PAGE Purity of Recombinant Monoclonal Antibody

CHENG Li-jun, WEI Jing-shuang, ZHANG Shi-xiong, et al (New Drug R&D Center, North China Pharmaceutical Corporation, Shijiazhuang 050015, China)

【Abstract】Objective To analyze the non-reduced SDS-PAGE purity of recombinant monoclonal antibody (McAb) and exclude the artifacts formed during preparation of test samples. Methods The condition for routine SDS-PAGE was modified based on the structural characters of recombinant McAb molecules. The recombinant McAb samples were treated with various loading buffers under various conditions for SDS-PAGE, and the results were compared. Results Almost all the minor bands appeared during determination of purity of McAb by non-reduced SDS-PAGE were eliminated by addition of alkylation reagent into test sample buffer to block the free sulfhydryl groups. The minor bands with high relative molecular mass could be diminished effectively by decreasing the ambient temperature during non-reduced SDS-PAGE. Conclusion The artifacts formed during preparation of test samples due to the disulfide bonds in McAb may be eliminated by modification of condition for non-reduced SDS-PAGE.

【Key words】Recombinant monoclonal antibody; Non-reduced SDS-PAGE; Purity; Disulfide bond

在重组蛋白质药物质量控制过程中,SDS-PAGE 是蛋白质药物纯度分析的常用手段。重组人源抗狂犬病毒单抗(Recombinant human anti-rabies virus monoclonal antibody, rhRMcAb)是采用基因工程技术,用 CHO 细胞表达的全人源抗体,属于 IgG1 亚型,用于狂犬病暴露后的预防^[1,2]。在 rhRMcAb 药物研发过程中发现,在非还原电泳条件下,除抗体主带外,在高相对分子质量及低相对分子质量处,分别存在一些次带。本文对单抗在非还原电泳检测时的这些特殊表现进行了分析,为单克隆抗体或 Fc 融合蛋白的电泳结果分析提供参考。

1. 材料与方法

1.1 药物

rhRMcAb 原液(批号 20060501、20060701、2006-

0801)及理化测定对照品(批号 20051101,浓度 2 mg/ml)均由本公司制备;Enbrel(TNFr-Fc 融合蛋白,Amgen 公司产品)和 Avastin(抗血管内皮生长因子单抗,Genentech 公司产品)均由杭州安瑞普生物公司惠赠。

1.2 主要试剂及仪器

HRP 标记的羊抗人 IgG Fc 抗体、羊抗人 IgG Fab 抗体及 HRP 标记的兔抗羊 IgG 抗体均购自 Sigma 公司;PVDF 电转膜为 Millipore 公司产品;SDS-PAGE 及电印迹装置为 Bio-Rad 公司产品;扫描仪 ImageScanner 为 GE Healthcare 公司产品。

1.3 缓冲液的配制

还原 SDS-PAGE 供试品缓冲液(2×)含 0.12 mol/L Tris-HCl 20%甘油 0.1%溴酚蓝 4% SDS 200 mmol/L DTT;非还原 SDS-PAGE 供试品缓冲液(2×):含 0.12 mol/L Tris-HCl 20%甘油 0.1%溴酚蓝 4% SDS;天然供试品缓冲液(2×):含 0.12 mol/L Tris-HCl 20%甘油 0.1%溴酚蓝;加碘乙酰胺的非还原 SDS-PAGE 供试品缓冲液(2×):向上述非还原 SDS-

基金项目:“十一五”863 计划生物和医药技术领域重大项目(2006AA02A247)。

作者单位:华北制药集团新药研究开发有限责任公司生物技术研究室(石家庄 050015)。

通讯作者:魏敬双 E-mail: weijsh@hotmail.com

PAGE 供试品缓冲液中加入新鲜配制的 1 mol/L 碘乙酰胺母液,至终浓度 200 mmol/L。

1.4 非还原 SDS-PAGE 分析

rhRMcAb、Enbrel 和 Avastin 样品均稀释至 2 mg/ml,分别加入 2 × 非还原 SDS-PAGE 供试品缓冲液或加碘乙酰胺的 2 × 非还原 SDS-PAGE 供试品缓冲液,混匀后,70℃水浴 3 min。分离胶浓度 7.5%,上样量 10 μl,150 V 恒压电泳,在室温条件下进行。电泳结束后,凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色。

1.5 Western blot 分析

rhRMcAb 样品(20060501)进行非还原 SDS-PAGE 后,将目的蛋白带电转移至 PVDF 膜上,分别用 HRP 标记的羊抗人 IgG Fc 或羊抗人 IgG Fab 抗体、HRP 标记的兔抗羊 IgG 抗体进行免疫显色。

1.6 冰水浴条件下的非还原 SDS-PAGE 分析

分离胶浓度 7.5%。rhRMcAb 样品与 2 × 非还原 SDS-PAGE 供试品缓冲液等体积混合,70℃水浴 3 min,立即转入冰浴。10 μl/孔上样,将电泳槽置冰水浴中,100 V 开始电泳,待指示剂前沿进入分离胶后,电压改为 150 V。另取样品加入天然供试品缓冲液后不加热,直接进行电泳。电泳结束后,凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色。

1.7 还原 SDS-PAGE 分析

rhRMcAb 样品分别加入 2 × 还原 SDS-PAGE 供试品缓冲液,混匀,70℃水浴 3 min。分离胶浓度 12.5%,上样量 10 μl,150 V 恒压电泳。电泳结束后,考马斯亮蓝 R250 染色。光密度扫描,计算免疫球蛋白重链、轻链之和的纯度。

1.8 分子筛 HPLC 分析

采用 Superdex 200 10/300GL 色谱柱(购自 GE Healthcare 公司),流动相为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液,pH 7.0,流速 0.5 ml/min rhRMcAb 样品(20060501)上样量 15 μl,检测波长 280 nm。按面积归一化法计算主峰面积占总面积的百分比。

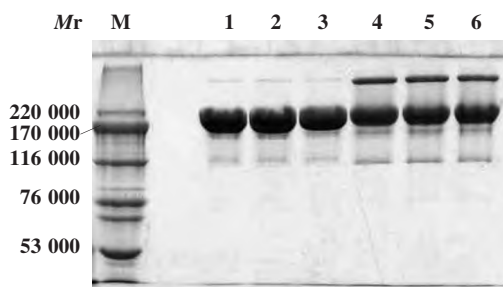
2. 结果

2.1 非还原 SDS-PAGE 分析

使用非还原 SDS-PAGE 供试品缓冲液,在 rhRMcAb 分子主带的上方与下方均有明显的次带存在。供试品缓冲液中加入碘乙酰胺后,主带迁移位置不变,高相对分子质量处的条带基本消失,低相对分子质量处的条带明显减少,见图 1。rhRMcAb、Enbrel 和 Avastin 样品的非还原 SDS-PAGE 图谱均有明显的次带出现,见图 2,表明重组单抗类药物非还原 SDS-PAGE 中出现次带的现象非常普遍。

2.2 Western blot 分析

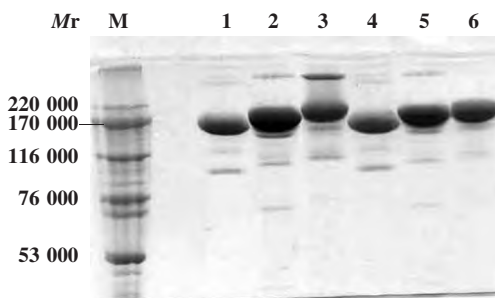
抗体分子主带与抗人 IgG Fc 及抗人 IgG Fab 抗体均显色,高相对分子质量带与抗人 IgG Fc 以及抗人 IgG Fab 抗体均显色,在加大上样量的情况下,低相对分子质量带可与抗人 IgG Fab 抗体显色。见图 3。



M 蛋白质 marker 1 4 rhRMcAb(20060501) 2 5 rhRMcAb(20060701) 3,6 rhRMcAb(20060801) 1~3:使用加碘乙酰胺的非还原 SDS-PAGE 供试品缓冲液 4~6:使用普通非还原 SDS-PAGE 供试品缓冲液

图 1 rhRMcAb 的非还原 SDS-PAGE 图谱

Fig 1. Non-reduced SDS-PAGE profile of rhRMcAb



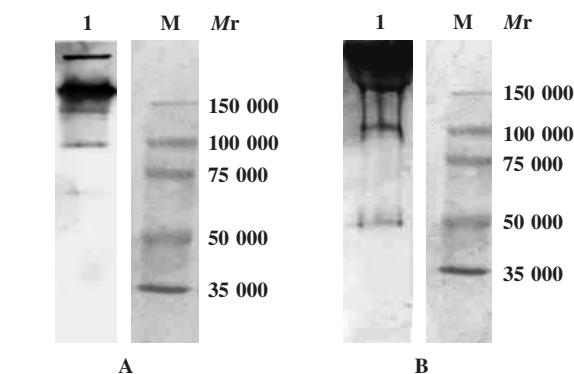
M 蛋白质 marker 1 4 Enbrel 2 5 Avastin 3 6 rhRMcAb(20060501) 1~3:使用普通非还原 SDS-PAGE 供试品缓冲液 4~6:使用加碘乙酰胺的非还原 SDS-PAGE 供试品缓冲液

图 2 3 种单抗类药物的非还原 SDS-PAGE 图谱

Fig 2. Non-reduced SDS-PAGE profile of 3 kinds of McAbs

2.3 冰水浴条件下的非还原 SDS-PAGE 分析

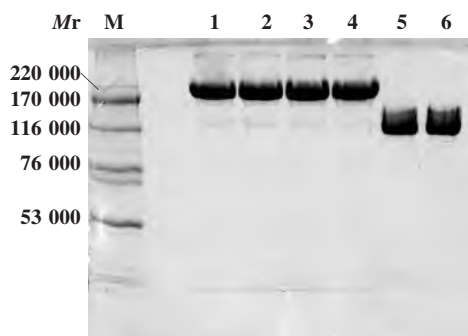
样品中加入非还原 SDS-PAGE 供试品缓冲液 70℃水浴 3 min 后,在冰水浴条件下电泳,低相对分子质量次带仍存在,但高相对分子质量次带显著减少,样品加入天然供试品缓冲液后不加热,直接进行电泳,结果只呈现一条主带,无其他次带出现,但主带的迁移率较加热样品条带迁移率大。见图 4。



A :上样量 1 μ g ,用 HRP 标记的羊抗人 IgG Fc 抗体显色 ;B :上样量 30 μ g ,用羊抗人 IgG Fab 抗体和 HRP 标记的兔抗羊 IgG 抗体显色 ;1 rhRMcAb (20060501) ;M :蛋白质 marker

图 3 rhRMcAb 的 Western blot 分析

Fig 3. Western blotting of rhRMcAb



M :蛋白质 marker ;1 5 :理化测定对照品 ;2 6 rhRMcAb(20060501) ;3 rhRMcAb(20060701) ;4 rhRMcAb(2006-0801) ;1 ~ 4 :非还原变性 SDS-PAGE(样品中加入非还原供试品缓冲液) ;5 6 :非还原非变性 SDS-PAGE(样品中加入天然供试品缓冲液)

图 4 冰水浴条件下 rhRMcAb 的非还原变性、非还原非变性 SDS-PAGE 图谱

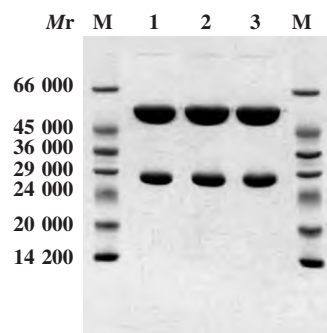
Fig 4. Non-reduced denaturing and non-denaturing SDS-PAGE profile of rhRMcAb in ice bath

2.4 还原 SDS-PAGE 分析

经光密度扫描 ,rhRMcAb 重链、轻链之和的纯度分别为 99. 6%(20060501)、99. 0%(20060701)和 99. 3%(20060801) ,见图 5。

2.5 分子筛 HPLC 分析

经积分计算 ,rhRMcAb 样品(20060501)纯度为 99. 5% ,见图 6。



M :蛋白质 marker ;1 rhRMcAb (20060501) ;2 rhRMcAb (20060701) ;3 rhRMcAb (20060801)

图 5 rhRMcAb 的还原 SDS-PAGE 图谱

Fig 5. Reduced SDS-PAGE profile of rhRMcAb

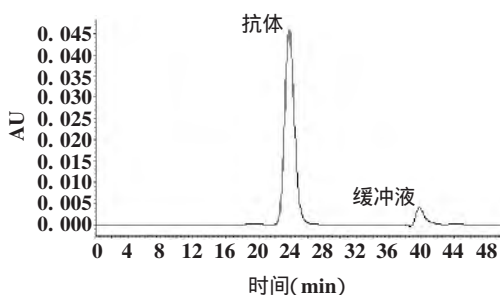


图 6 rhRMcAb(20060501) SEC-HPLC 图谱

Fig 6. SEC-HPLC profile of rhRMcAb (20060501)

3. 讨论

重组单抗在非还原 SDS-PAGE 中显示的次带 ,包括主带上方的聚体带和主带下方的低相对分子量带 ,均为在电泳样品变性处理过程中产生的 ,根本原因是抗体分子中存在少量未形成二硫键的自由巯基 ,在电泳样品变性处理过程中引发二硫键重排 ,而造成电泳假象 [3-5]。

低相对分子量带的产生有两个原因 :一是在细胞培养表达过程中 ,少量抗体分子存在自由巯基 ,未形成完整的二硫键 [46] ,轻重链间仅由非共价键联接 ,在电泳样品变性处理过程中 ,链间非共价键断裂 ,产生了个别游离亚基 ,从而出现低相对分子量带 ;另外 ,在变性条件下 ,抗体分子的自由巯基还会引发二硫键重排 ,造成部分链间二硫键断裂 ,从而增加低相对分子量带出现的几率。聚体带产生的原因是在变性处理过程中 ,抗体分子的自由巯基通过形成分子间二硫键将单体分子连接成聚体 ,从而出现聚体带。

碘乙酰胺可以对蛋白质分子中的自由巯基进行封闭 ,以阻止二硫键重排反应以及自由巯基重新形成二硫键 ,从而抑制电泳次带的产生 [57]。封闭自由

巯基后的非还原 SDS-PAGE 结果显示,聚体带基本消失,低相对分子质量带显著减少,证明非还原 SDS-PAGE 结果中显示的次带是在电泳样品变性处理过程中因自由巯基存在而产生的。抗人 Fc 和抗人 Fab 的 Western blot 结果显示,聚体带和低相对分子质量带均呈阳性,证明二者包含人 IgG Fc 段及 Fab 段,均为抗体相关组分;同时,抗人 Fab 的 Western blot 检测到抗体变性处理过程中脱离的轻链,证明样品结构完整,非还原 SDS-PAGE 出现的次带只是抗体样品在变性处理过程中因部分亚基脱离而产生的。在这方面,国外研究者也有类似结果发表^[34]。

除了对抗体分子中少量自由巯基进行封闭外,在冰水浴条件下进行电泳也获得了消除聚体带的效果,原因可能是低温条件抑制了自由巯基重新交联,形成分子间二硫键的过程,从而避免了聚体带的产生。对于室温条件制备的电泳样品,天然供试品缓冲液与抗体混合后立即进行电泳,蛋白质分子没有经过高温变性处理,即使分子中存在少量链间自由巯基,整个抗体分子仍然能依靠非共价键保持 4 条链的完整结构,未出现非还原电泳显示的低相对分子质量带,同样由于没有机会进行二硫键重新联结,因此也未出现聚体带,电泳显示只有一条主带。

综上所述, rhMcAb 样品在天然状态下的结构高度均一,完全符合国内外注射类药物的纯度标准。鉴于重组单克隆抗体分子的结构特殊性,对其电泳

结果必须进行认真分析,才能得出正确的纯度判定结果。

参考文献

- [1] 贾茜,徐葛林,赵伟,等. 重组人抗狂犬病病毒单抗 SO57、SOJB 对不同狂犬病病毒毒株中和作用的研究. 病毒学报, 2006, 22 (4): 256-261.
- [2] 程立均,贾茜. 重组人源抗狂犬病病毒单克隆抗体 SO57、SOJB 对狂犬病病毒 G 蛋白亲和力的比较研究. 病毒学报, 2006, 22 (3): 230-232.
- [3] Liu H, Gaza-Bulseco G, Chumsae C, et al. Characterization of lower molecular weight artifact bands of recombinant monoclonal IgG1 antibodies on non-reducing SDS-PAGE. Biotechnol Lett, 2007, 29 (11): 1611-1622.
- [4] Zhang W, Czupryn MJ. Free sulfhydryl in recombinant monoclonal antibodies. Biotechnol Progress, 2002, 18 (3): 509-513.
- [5] Taylor FR, Prentice HL, Garber EA, et al. Suppression of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis sample preparation artifacts for analysis of IgG4 half-antibody. Anal Biochem, 2006, 353 (2): 204-208.
- [6] Harris RJ. Heterogeneity of recombinant antibodies: linking structure to function. Dev Biol (Basel), 2005, 122 (221): 117-127.
- [7] Vasilyeva E, Woodard J, Taylor FR, et al. Development of a chip-based capillary gel electrophoresis method for quantification of a half-antibody in immunoglobulin G4 samples. Electrophoresis, 2004, 25 (21-22): 3890-3896.

(收稿日期 2009-04-28)

(上接第 78 页)

参考文献

- [1] Masters JR, Bedford P, Kearney A, et al. Bladder cancer cell-line cross-contamination: identification using a locus-specific minisatellite probe. Br J Cancer, 1988, 57 (3): 284-286.
- [2] Satoh M, Takeuchi M. Cross-contamination of cell lines as revealed by DNA fingerprinting in the IFO animal cell bank. Res Commun Inst Ferment, 1993, 16: 18-23.
- [3] Nims RW, Shoemaker AP, Bauernschub MA, et al. Sensitivity of isoenzyme analysis for the detection of interspecies cell line cross-contamination. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1998, 34 (1): 35-39.
- [4] Milanesi E, Ajmone-Marsan P, Bignotti E, et al. Molecular detection of cell line cross-contaminations using amplified fragment length polymorphism DNA fingerprinting technology. In Vitro Cell Div Biol Anim, 2003, 39 (3-4): 124-130.
- [5] Cabrera CM, Cobo F, Nieto A, et al. Identity tests: determination of cell line cross-contamination. Cytotechnology, 2006, 51 (2): 45-50.
- [6] Azari S, Ahmadi N, Tehrani MJ, et al. Profiling and authentication

of human cell lines using short tandem repeat (STR) loci: report from the National Cell Bank of Iran. Biologicals, 2007, 35 (3): 195-202.

- [7] Masters JR, Thomson JA, Daly-Burns B, et al. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98 (14): 8012-8017.
- [8] 郑秀芬,纪贵金,刘超,等. 二组分混合 DNA 样品 STR 图谱解释. 中国法医学杂志, 2000, 15 (4): 203-207.
- [9] Lacroix M. Persistent use of "false" cell lines. Int J Cancer, 2008, 122 (1): 1-4.
- [10] Drexler HG, Dirks WG, Matsuo Y, et al. False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines. Leukemia, 2003, 17 (2): 416-426.
- [11] Parson W, Kirchbner R, Mühlmann R, et al. Cancer cell line identification by short tandem repeat profiling: power and limitations. FASEB J, 2005, 19 (3): 434-436.

(收稿日期 2009-04-09)