

重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的生物质谱和毛细管电泳法

周国华, 罗国安*, 张晓丹¹, 曹亚澄², 孙国庆²(清华大学化学系, 北京 100084; ¹ 南京军区药品检验所, 南京 210002; ² 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210016)

摘要 目的: 为准确分析重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rHuGM-CSF)半成品及其制剂的纯度和表达的正确性。方法: 用毛细管区带电泳测定了2批 rHuGM-CSF 半成品和3批 rHuGM-CSF 注射液的纯度。用基体辅助激光解吸飞行时间质谱和电喷雾质谱测定了2批 rHuGM-CSF 半成品的分子量。用毛细管等电聚焦法测定了 rHuGM-CSF 半成品的等电点。结果: 2批半成品中1批含有少量二聚体, 且含有4个不同等电点的组分, 另1批表达不正确; 2批成品均存在大量杂质。结论: 发现有些 rHuGM-CSF 样品有生物学活性, 但表达不正确, 纯度也不高; 各分析方法是互补的, 不能相互替代。

关键词 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子; 高效毛细管电泳; 基体辅助激光解吸飞行时间质谱; 电喷雾质谱; 毛细管等电聚焦

重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rHuGM-CSF)为含有127个氨基酸的非糖蛋白, 能刺激粒细胞和巨噬细胞的繁殖和分化, 临床主要用于治疗因造血系统异常所致的白细胞减少症^[1]。目前已成功地在真核细胞(如CHO细胞)和大肠杆菌中表达, 在其开发研制过程中需要采用多种分析手段, 用以确证最终产品的纯度、氨基酸序列和均一性等指标。常规使用的方法有高效液相色谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦等。毛细管区带电泳(CZE)^[2]、毛细管等电聚焦(CIEF)^[2]、激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)^[3]和电喷雾质谱(ESI-MS)法^[4]是新近发展的仪器分析技术, 并首先用于生物大分子的测定中, 实践证明, 这些技术的使用, 推动了分子生物学的发展。本文采用CZE, CIEF, MALDI-TOF-MS和ESI-MS法测定了rHuGM-CSF的纯度、等电点(pI)、均一性和最终产品的正确性, 以此为例阐述了现代仪器分析法在基因工程产品开发过程中和成品质控中的应用前景。

材 料 和 方 法

药品 rHuGM-CSF半成品1, 由中国药品生物制品检定所提供; 半成品2, 实验室研制, 即使用

PCR方法克隆了人GM-CSF的cDNA, 然后在大肠杆菌中表达, 表达产物经超声波破碎、离心清洗、色谱分离得到纯品。rHuGM-CSF对照品(rHuGM-CSF注射液, 冻干粉)为Leucomax(生白能), 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, SANDOZ Schering-Plough, 批号7-SFMC-301; rHuGM-CSF制剂1为健白, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 北京某医院产, 批号961006; rHuGM-CSF制剂2为惠血能, 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 哈尔滨某制药企业产。以上产品均具有生物效价, 其中3批制剂均已用于临床。

试剂 核糖核酸酶A、碳酸酐酶II、 β -乳球蛋白A、CCK肽片段、Tricine和1,4-二氨基丁烷, Sigma公司; CIEF凝胶, Beckman公司; 两性电解质(pI 2.75~10), Pharmacia公司; 氯化钠, 优级纯, 北京化工厂, 水, Millir-Q plus纯水器制得。

样品前处理 取样品适量(约含蛋白200 μg)至500 μL Amicon微量浓缩管中, 加纯水至500 μL , 于10 000 $\times g$ 离心15 min, 加纯水至500 μL , 继续于10 000 $\times g$ 离心15 min, 使样品体积约为100 μL , 此过程可使样品脱去约90%的盐, 并能将样品浓缩2~3倍。

毛细管电泳测定法 在Waters Quanta 4000E毛细管电泳仪上, 用未涂层毛细管柱, 52.5 cm \times 50 μm ID(Ld=45 cm), 压差进样, 入口端为正极, 分离电压20 kV, 毛细管柱温20 $^{\circ}\text{C}$ 。分离缓冲液为10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ tricine—10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl—2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 1,4-二氨基丁烷, pH 8.0。用前经0.25 μm 除菌膜过滤并超声脱气。每次分离结束后分别用0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH和水冲洗5 min, 进样前用分离介质

收稿日期: 1999-02-26

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(692350220); 国家新药博士基金资助项目(96-901-06-07)

* 联系人 Tel: (010)62781688, Fax: (010)62784764,

E-mail: galuo@sam.chem.tsinghua.edu.cn

周国华 男, 25岁, 博士研究生

罗国安 男, 52岁, 教授, 博士生导师

冲洗 5 min。检测波长 214 nm。

毛细管等电聚焦测定法 Beckman P/ACE5000 高效毛细管电泳仪, 采用 Beckman 中性涂层毛细管柱, 27 cm × 75 μm ID (Ld= 20 cm); 阳极电解液为含 91 mmol·L⁻¹ H₃PO₄ 的 CIEF 凝胶溶液; 阴极电解液为 20 mmol·L⁻¹ NaOH 溶液; 冲洗溶液为 10 mmol·L⁻¹ H₃PO₄ 溶液; 核糖核酸酶 A、碳酸酐酶 II β-乳球蛋白 A 和 CCK 肽片段的贮备液浓度分别为 24, 4, 4 和 2 mg·mL⁻¹; 将 40 μL 两性电解质加到 2 mL CIEF 凝胶溶液中, 作为两性电解质凝胶溶液, 取 204 μL 加入 3.0, 1.5, 3.0 和 1.5 μL 核糖核酸酶 A、碳酸酐酶 II β-乳球蛋白 A 和 CCK 肽片段的贮备液, 作为 pI 测定标准溶液; 另取 204 μL 两性电解质凝胶溶液若干份, 分别加入 5~ 10 μL 待测未知样品溶液, 作为测定溶液。分离条件: 电压 13.5 kV, 检测波长 280 nm, 在室温下分离; 先纯水高压 (13 790 Pa) 冲洗 1 min; 用高压将样品溶液填入毛细管柱 (冲 1 min); 在 13.5 kV 电压下聚焦 2 min; 保持 13.5 kV 的聚焦电压, 用低压 (3 448 Pa) 将聚焦的蛋白区带冲出检测器。

基体辅助激光解吸飞行时间质谱测定法 在 Finnigan Laser MAT 2 000 飞行时间质谱分析仪 (Finnigan MAT, Hemel Hempstead, Herts, UK) 上, 用 N₂ 激光 (337 nm, 2 ns 脉冲) 分析 rHuGM-CSF, 用正离子方式检测, 不锈钢靶 (Finnigan MAT) 的靶芯直径为 2 mm, 以肌红蛋白作外部校准。将基体芥子酸用乙腈—乙醇—水 (60: 4: 36) 的混合溶剂溶解, 使浓度为 20 mg·mL⁻¹。测定时取样品 5 μL 基体溶液 5 μL 与 0.5% 三氟醋酸溶液 1 μL 混合, 取 1 μL 滴于靶片, 空气中室温吹干后测试。

电喷雾离子化 (ESI) 质谱测定法 在 Finnigan MAT SSQ-710 单级四极质谱仪 (Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) 上, 用电喷雾离子源, 样品通过石英毛细管 (50 μm ID) 导入 ESI 接口中, 用无死体积的不锈钢管将该毛细管耦合到 HPLC 泵上。正离子方式检测, 喷雾电压 + 4.5 kV, 金属毛细管温度 200 °C, 以 N₂ 为包层气, 压力 345 kPa。样品导入溶液为 甲醇—水—乙酸 (50: 49: 1), 流速 0.2 mL·min⁻¹。

结果和讨论

1 毛细管区带电泳分析 rHuGM-CSF 半成品及其

制剂

CE 分离是基于分析物的电荷质量之比, 适合于带电物质的分离。由于 CE 是开管分析, 所以分离效率大大超过高效液相色谱, 该项技术是对平板电泳的改进, 对能在平板电泳上分析的蛋白质, 原则上都能用 CE 分离。pH > 4 时 CE 毛细管的管壁带负电荷, 若被测物的表面带正电荷, 则会产生吸附。为了减少吸附, 采取了以下措施: (1) 加入 2, 4-二氨基丁烷使毛细管表面动态涂层, 负电荷减少; (2) 因 GM-CSF 的等电点为 5.4 左右, 所以将分离缓冲液的 pH 值控制在 5.4 以上, 使蛋白质带上负电荷, 减少吸附。Jorgenson^[5] 认为电渗流与溶质电泳速度相等, 方向相反时, 分辨达到最佳。在 pH 值大于 GM-CSF 等电点的缓冲液中, 电渗流与电泳速度相反, 经试验, 以 pH 8.0 的 50 mmol·L⁻¹ tricine—20 mmol·L⁻¹ NaCl—2.5 mmol·L⁻¹ 1, 4-二氨基丁烷为分离介质, 可得到理想的分辨率。

本文用该条件, 对 2 种不同来源的 rHuGM-CSF 半成品和 3 种不同来源的 rHuGM-CSF 制剂进行了分析, 测定结果见图 1。

由图可知: 进口生白能的 CE 图谱中 (曲线 a) 除保护剂白蛋白峰外, 仅出现 rHuGM-CSF 的 1 个主峰 1, 无其他杂质峰; 半成品 1 中含有 1 个杂质峰 2 (曲线 b), 主峰 1 的保留时间与曲线 a 相同; 半成品 2 除含少量杂质外, 主峰 3 的保留时间 (曲线 c) 与进口 GM-CSF 制剂的峰 1 不同; 制剂 1 除含有与半成品 2 相同的杂质 2 外, 还含有一些其它微量杂质 (曲线 d); 制剂 2 中的主成分 rHuGM-CSF (峰 1) 比杂质 4 和 5 的含量还要低, 杂质 4 是制剂 2 中的主要成分 (曲线 e)。

由 rHuGM-CSF 制成的制剂必须加入保护剂才能保持生物学活性。生白能和 rHuGM-CSF 制剂 1 和 2 均以甘露醇、无水枸橼酸、磷酸盐、聚乙二醇和人血白蛋白为保护剂。其中 3 种制剂含 rHuGM-CSF 分别为 50, 100 和 1 0 μg·mL⁻¹。由于样品中含有大量的盐和人血白蛋白 (1 mg·mL⁻¹), 所以要使 CE 能准确表征制剂中微量的活性成分, 必须在测定前对样品进行脱盐浓缩处理。本文对制剂 1 和 2 分别进行脱盐和浓缩, 图 1 中曲线 d 是制剂 1 经脱盐和浓缩 2.5 倍的结果; 曲线 e 是制剂 2 经脱盐和浓缩 5 倍的结果。图 2 是制剂 2 在预处理前后的 CE 测定图谱, 从图 2 中可看出样品预处理的重要性。

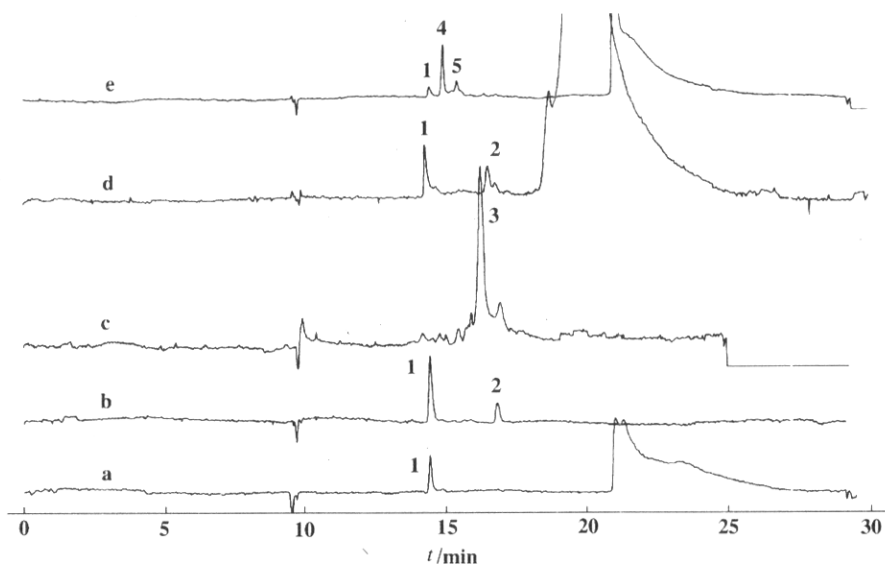


Fig 1 Electropherograms of (a) recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factors (rHuGM-CSF) standard, Leucomax injection; (b) rHuGM-CSF bulk sample 1; (c) rHuGM-CSF bulk sample 2; (d) rHuGM-CSF preparation 1, Jiangbai; (e) rHuGM-CSF preparation 2, Huixue Nen. Separation conditions: $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tricine, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,4-diaminobutane, capillary, 45 cm (to the detection point) \times $50 \mu\text{m}$ ID; Voltage: 20 kV; Solutes: 1. rHuGM-CSF; 2, 3, 4, 5-impurities.

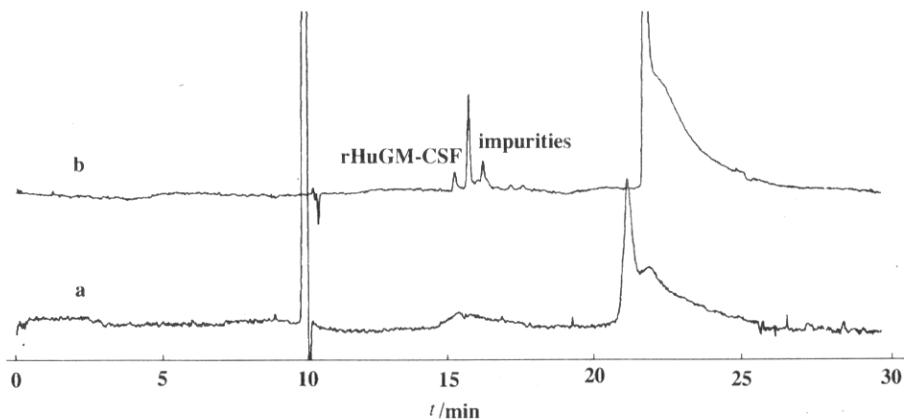


Fig 2 Electropherograms of rHuGM-CSF preparation 2 by no pre-treatment (a), and by desalting and concentration (b). Separation conditions are the same as in Fig 1.

在图 1 中,半成品 1 所含杂质 2 是另一个杂质还是 rHuGM-CSF 的二聚体? 半成品 2 与半成品 1 保留时间不一致是因 rHuGM-CSF 降解还是因表达不正确? 这些问题均不能从 CE 图中得到答案,必须做生物质谱分析。

2 生物质谱法分析 rHuGM-CSF 半成品及其制剂

用于蛋白质类生物大分子分子量测定的手段目前主要有基体辅助激光解吸飞行时间质谱法 (MALDI-TOF/MS) 和电喷雾质谱法 (ESI/MS), 其中 MALDI-TOF/MS 法对样品的基体要求低, 允许有少许盐和其他杂质存在, 且质量测定范围大, 样品消耗少, 是蛋白质分子量测定的首选工具。本文以

国产两种半成品为研究对象, 测得半成品 1 和 2 的分子量分别为 14 485 和 15 451 u, 并且未见明显的杂质峰。根据 rHuGM-CSF 的氨基酸序列, rHuGM-CSF 的理论分子量为 14 473.6 u, 因此半成品 1 和 2 的分子量测定误差分别为 0.078% 和 6.8%, 由 MALDI-TOF/MS 的测定精度可知, 半成品 1 的分子量与理论值相符, 并且无其他杂质峰出现, 说明图 1b 中的峰 2 分子量与峰 1 相同; 半成品 2 的分子量与理论值相差 977.4 u, 说明其氨基酸序列不对或被修饰过了, 这与图 1c 中峰 3 的保留时间与峰 1 不同的结果相符, 其测定图谱如图 3 所示。

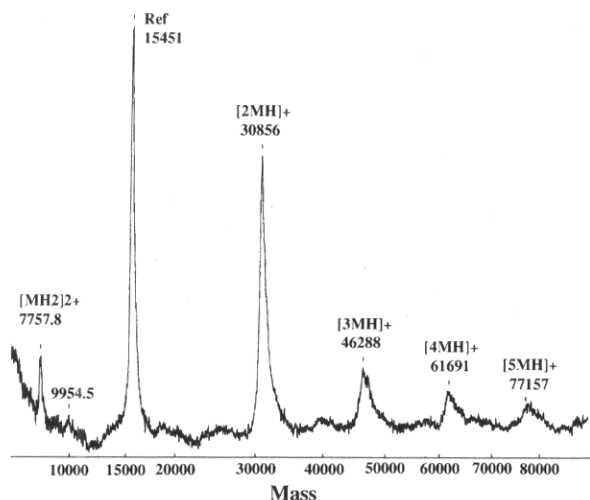


Fig 3 Matrix assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrum of rHuGM-CSF bulk sample 2.

由于 MALDI-TOF/MS 测定蛋白分子量的精确度不如 ESI/MS, 本文进一步采用 ESI/MS 测定两者的分子量, 测定结果见图 4 和 5, 由图可知: 半成品 1 和 2 的分子量分别为 14 473.0 和 15 423.0 u, 与

理论值分别相差 0.6 和 949.4 u, 并且图 4 和 5 中均未出现其他杂质峰, 这一结果说明半成品 1 的分子量与理论值相一致, 图 1 中的峰 2 有可能是 rHuGM-CSF 的二聚体, 因为 rHuGM-CSF 在无保护剂存在下易形成多聚体, 而多聚体在 ESI/MS 中仅出现单体的质谱峰, 结合图 1(b) 和图 4 的结果可以认为半成品 1 的氨基酸序列与理论值一致, 进一步提纯去掉峰 2 即可; 半成品 2 的氨基酸序列与理论值不符, 为此作了 Edman 测序, 发现该表达产物在 N 端多了 8 个氨基酸 MMKSDNSH, 如将这 8 个氨基酸加入已知的 rHuGM-CSF 氨基酸序列中, 与 ESI-MS 的测定结果一致 (测定误差为 0.09%), 所以半成品 2 虽然有生物学活性, 但其结构已不是 rHuGM-CSF。由此可以表明: 质谱法可用于确定表达产物氨基酸序列的正确性, 但不能区别分子量相同的同分异构体。如果被测物的 CE 保留时间与对照品一致, 且质谱法测得的分子量也与理论值一致, 能否判断样品结构与对照品一致呢? 本文以半成品 1 为例进行了深入研究。

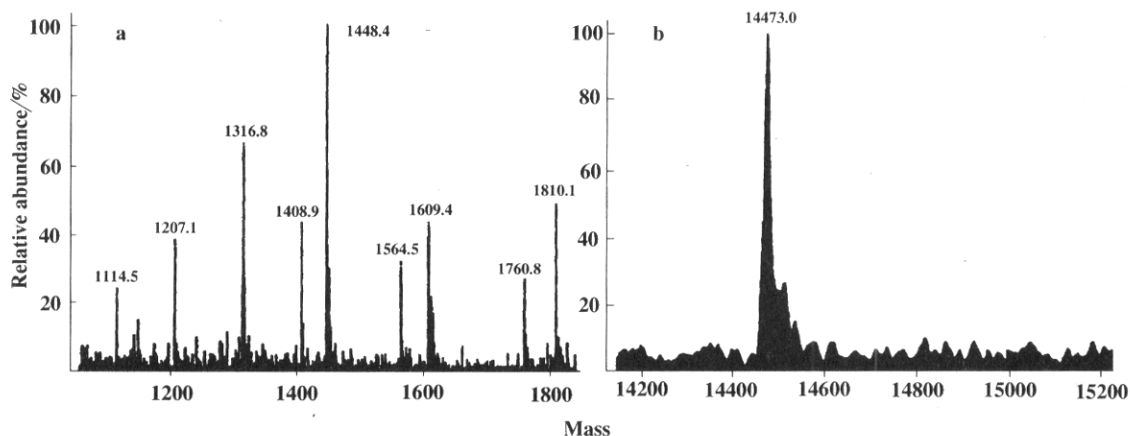


Fig 4 Electrospray ionization (ESI) mass spectrum (a) and deconvoluted mass spectrum (b) of rHuGM-CSF bulk sample 1.

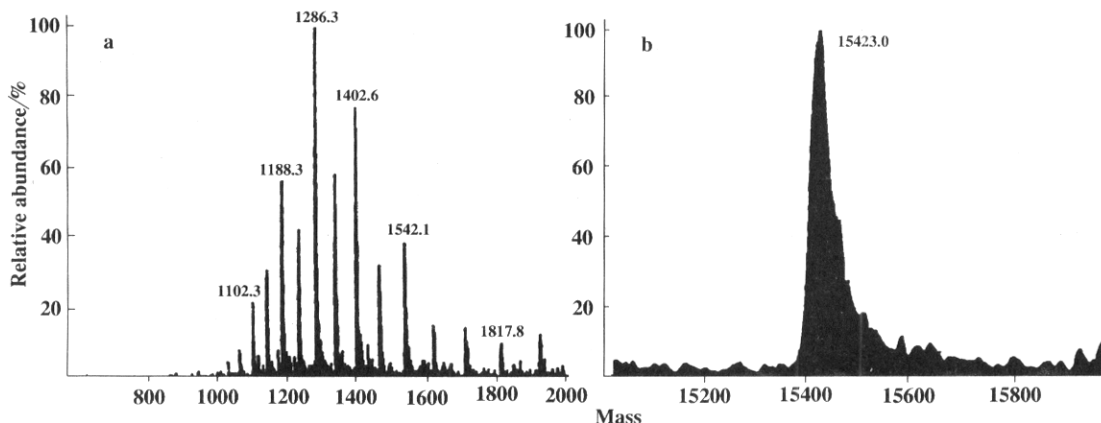


Fig 5 ESI mass spectrum (a) and deconvoluted mass spectrum (b) of rHuGM-CSF bulk sample 2.

3 毛细管等电聚焦法(CIEF)测定 rHuGM-CSF 的等电点

蛋白质与氨基酸一样是两性电解质,不同的氨基酸序列和不同的结构具有不同的等电点,因此 pI 值是蛋白质分子的重要理化常数,对它的测定具有实际意义。rHuGM-CSF 的理论 pI 值约 5.4。本文以毛细管电泳法测定了 rHuGM-CSF 半成品 1 的 pI 值。其 CIEF 图谱如图 6 所示,由图可知本品存在 4 个不同等电点的组分,其等电点分别为 6.14, 5.92, 5.73 和 5.32,说明本品的纯度不高,是一个混合物,但由图 1 和图 4 可知,本品仅存在少量的二聚体,分子量也正确,MS 图中无其它不同分子量的杂质峰,Edman 测序也正确。鉴于这种情况目前在该品的国家质控标准中未对其等电点作出明确规定,仅要求用同一工艺生产的 rHuGM-CSF,其等电点必须

一致,因为引起该品不同等电点的原因尚不清楚^[6]。

用于纯化产品的缓冲液含有大量的盐,对 CIEF 测定有干扰,所以必须进行脱盐处理,图 6 是 rHuGM-CSF 经滤膜脱盐浓缩后的 CIEF 图谱。图 7 (a) 为未经脱盐的 rHuGM-CSF CIEF 图谱,即 13.5 kV 的电压聚焦 2 min,保持该电压,用低气压(3 448 Pa)将聚焦的蛋白区带冲出检测器,说明样品如不经脱盐处理,则基线漂移;采用柱上脱盐技术可使样品中的盐在大分子蛋白聚焦前快速地流出毛细管柱。图 7(b) 为在线脱盐的 rHuGM-CSF CIEF 图谱,即先在 5.4 kV 下柱上脱盐,再以 10.8 kV 聚焦 1 min,保持 10.8 kV 聚焦电压,用低气压(3 448 Pa)将聚焦的蛋白区带冲出检测器,结果表明,在线脱盐后基线平稳,可替代样品脱盐预处理。

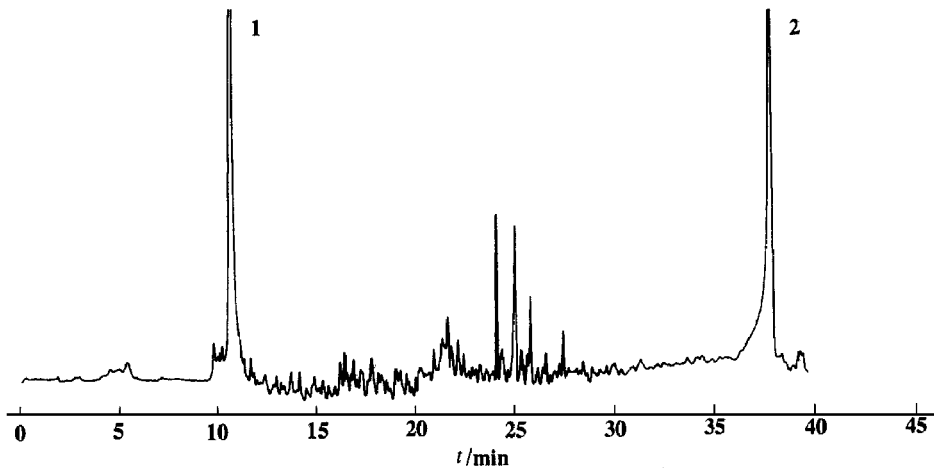


Fig 6 High performance capillary isoelectric focusing electropherogram of rHuGM-CSF with the concentration of $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. 1. Ribonuclease A (pI 9.45); 2. CCK peptide (pI 2.75).

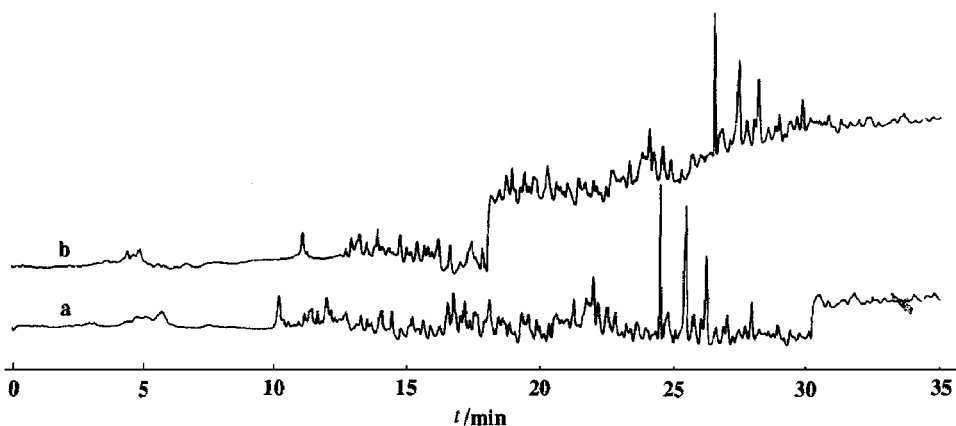


Fig 7 High performance capillary isoelectric focusing electropherograms of rHuGM-CSF by on-column desalting (a) and by no desalting (b).

讨 论

经过对 rHuGM-CSF 半成品和制剂的 CE, MALDI-TOF/MS, ESI/MS 和 CIEF 分析, 表明在生物大分子测定中, 各仪器分析方法是互补的, 不能相互替代, 但结果是相互印证的。由于各方法的测定原理不同, 所以每种方法的测定结果只能反映被分析物某一方面的理化特性。样品在 CE 中仅出现与标准品一样的单峰是保证纯度的必要条件, CE 分出几个峰不一定表明样品存在其它杂质, 有可能是多聚体; MS 法未测出杂质, 纯度不一定很好, 有可能含有同分异构体或多聚体; CIEF 除可测出样品的等电点外, 还可从样品的等电点上反映样品的纯度, 是表征基因工程产品纯度的重要补充方法。本文所研究的 5 种 rHuGM-CSF 产品均具有生物学活性, 而这 5 种产品的结构和纯度各不相同, 因此不能仅从生物学活性的角度判断产品的优劣。目前 rHuGM-CSF 制剂的质控标准中仅用体外生物学活性来测定效价是不全面的, 因为它不能有效地防止 rHuGM-CSF 样活性的假劣药品流向市场, 故对制剂中的微量 rHuGM-CSF 进行定性鉴定和纯度测定非常必

要。随着科学技术的进步, 如能以 CE 和 MS 联用技术检测制剂中的微量活性成分, 则可事半功倍, 并且 CIEF-ESI/MS 联用还可用于寻找 rHuGM-CSF 多个等电点产生的原因。

References

- 1 Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte macrophage colony-stimulating factors. *Blood*, 1986, **67**: 257
- 2 Wiktorowicz JE, Colburn JC. *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*. New York: Academic Press, 1992. 287~ 289
- 3 Russell DH, Edmondson RD. High-resolution mass spectrometry and accurate mass measurements with emphasis on the characterization of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 1997, **32**: 263
- 4 Fenn JB, Mann M, Meng CK, *et al.* Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989, **246**: 64
- 5 Jorgenson JW, Lukacs KD. Capillary zone electrophoresis. *Science*, 1983, **222**: 266
- 6 Wu WT (吴梧桐), Ding XZ (丁锡中), Liu JJ (刘景晶). *Genetic Engineering Drugs-Basic and Clinic*. Beijing: People Health Publishing House, 1996. 25

CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTORS (rHuGM-CSF) BY BIOCHEMICAL MASS SPECTROMETRY AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Zhou Guohua (Zhou GH), Luo Guoan (Luo GA)^{*}, Zhang Xiaodan (Zhang XD)¹,
Cao Yacheng (Cao YC)² and Sun Guoqing (Sun GQ)²

(*Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084; ¹Nanjing Military Area Institute for Drug Control, Nanjing 210002; ²Institute of Soil Science Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210016*)

ABSTRACT AIM: To accurately determine the purity and correctness of expression for the bulk samples and preparations of rHuGM-CSF with biological activity. **METHODS:** The purities of two bulk samples and three preparations of rHuGM-CSF were determined by capillary zone electrophoresis (CZE), molecular weights of two rHuGM-CSF bulk samples by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI/MS), and isoelectric points of rHuGM-CSF bulk sample by capillary isoelectric focusing (CIEF). **RESULTS:** One of the two bulk samples was expressed incorrectly, and the other contained a small amount of dimer, which composed of four components with different isoelectric points. There were large amounts of impurities in the two rHuGM-CSF preparations. **CONCLUSION:** The sample of rHuGM-CSF with biologic activity may be expressed incorrectly or contained impurities. The instrumental methods applied in this paper are complementary and we can not use one to replace the other.

KEY WORDS high performance capillary electrophoresis; matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; electrospray ionization mass spectrometry; recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; capillary isoelectric focusing