

# 重组Ⅲ型人源化胶原蛋白关键质量参数分析方法建立

崔新玲<sup>1</sup>, 孟晓光<sup>2</sup>, 曹俊霞<sup>3</sup>, 阚莹<sup>1</sup>, 李红梅<sup>1\*</sup>, 赵丙春<sup>4</sup>, 李萍<sup>4</sup>, 周伟<sup>4</sup> (1. 中国计量科学研究院, 国家市场监督管理总局营养与健康化学计量及应用重点实验室, 北京 100029; 2. 蛋白质药物国家工程研究中心, 北京 102206; 3. 安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032; 4. 华熙生物科技股份有限公司, 济南 250101)

**摘要:** **目的** 针对重组Ⅲ型人源化胶原蛋白的关键质量参数进行检测研究方法研究。 **方法** 采用基质辅助激光解吸/飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)及尺寸排阻色谱与多角度光散射联用(size exclusion chromatography with multi-angle light scattering, SEC-MALS)法测定相对分子质量及其分布;采用毛细管凝胶电泳(capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate, CE-SDS)和分子排阻高效液相色谱(size exclusion high performance liquid chromatography, SE-HPLC)分析纯度;采用离子交换法和毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis, CZE)分离分析电荷异构体;采用“双”酶切肽图法进行一级结构鉴别试验和序列覆盖率分析。 **结果** MALDI-TOF MS测得相对分子质量 $45.01 \times 10^3$ ; SEC-MALS得到其单体相对分子质量为 $45.17 \times 10^3 (\pm 0.226\%)$ ;两种相对分子质量测定方法结果一致。CE-SDS(非还原)纯度为98.77%,其他成分1.23%;SE-HPLC纯度为98.07%,其他成分1.93%;两种纯度测定方法结果一致。强阳离子交换共鉴定到14种电荷异构体组分,其中酸性峰占比52.08%,主峰占比26.22%,碱性峰占比21.70%;CZE鉴定到8种电荷异构体组分,其中酸性峰占比52.10%,主峰占比25.27%,碱性峰占比22.63%;两种电荷异构体鉴别方法,酸性组分、主峰与碱性组分,分布规律一致。“双”酶切肽图法实现重组Ⅲ型人源化胶原蛋白的序列100%覆盖,实测序列与预期序列一致。 **结论** 建立了重组Ⅲ型人源化胶原蛋白关键质量参数分析方法,该方法具有保证产品安全、有效、质量可控的特点,为我国重组Ⅲ型人源化胶原蛋白的质量控制提供了参考依据。

**关键词:** 重组Ⅲ型人源化胶原蛋白;相对分子质量分布;电荷异构体;序列覆盖率;质量控制

doi:10.11669/cpj.2024.10.011 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)10-0938-07

## Establishment of Critical Quality Attributes Analysis Method for Recombinant Human Collagen III

CUI Xinling<sup>1</sup>, MENG Xiaoguang<sup>2</sup>, CAO Junxia<sup>3</sup>, KAN Ying<sup>1</sup>, LI Hongmei<sup>1\*</sup>, ZHAO Bingchun<sup>4</sup>, LI Ping<sup>4</sup>, ZHOU Wei<sup>4</sup> (1. Key Laboratory of Chemical Metrology and Applications on Nutrition and Health for State Administration for Market Regulation, National Institute of Metrology, Beijing 100029, China; 2. National Engineering Research Center for Protein Drugs, Beijing 102206, China; 3. School of Basic Medical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 4. Bloomage Biotechnology Corporation Limited, Jinan 250101, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish critical quality attributes analysis method for recombinant human collagen III. **METHODS**

The recombinant human collagen III molecular weight (MW) distribution was determined by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and size exclusion chromatography with multi-angle light scattering (SEC-MALS). Capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate (CE-SDS) and size exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC) were used for purity analysis. Ion exchange chromatography and capillary zone electrophoresis (CZE) were used to separate and analyze charge isomers. The “double” enzyme digestion peptide mapping method was used for identification and sequence coverage analysis. **RESULTS** The recombinant human collagen III MW distribution measured by MALDI-TOF was  $45.01 \times 10^3$ . The MW of monomer recombinant human collagen III determined by SEC-MALS was  $45.17 \times 10^3 (\pm 0.226\%)$ . CE-SDS analysis showed that the purity of recombinant human collagen III was 98.77% and that of other ingredients was 1.23%. The SE-HPLC purity was 98.07%, and that of other component was 1.93% (dimer). A total of 14 charge isomers were identified through strong cation exchange, and the acidic peak was 52.08%, the main peak was 26.22%, and the basic peak was 21.70%. Eight charge isomers were identified by CZE, including 52.10% acidic peak, 25.27% main peak, and 22.63% basic peak. Two identification methods for charge isomers have consistent distribution patterns. The “double” enzyme digestion peptide mapping method was used for identification and sequence coverage analysis, achieving 100% coverage of the recombinant human collagen III sequence. **CONCLUSION** A series of critical

**基金项目:** 国家科技基础平台国家标准物质资源库项目资助(APT2302)

**作者简介:** 崔新玲,女,博士研究生 研究方向:生物大分子结构解析及蛋白质组研究 \* **通讯作者:** 李红梅,女,研究员 研究方向:化学计量和标准物质研究 Tel:(010)64524701

quality attributes analysis methods for recombinant human collagen III have been established. These methods provide a reference basis for the quality control of recombinant human collagen III in China.

**KEY WORDS:** recombinant human collagen III; molecular weight distribution; charge isomer; sequence coverage; quality control

Ⅲ型胶原蛋白由位于染色体2q31上的COL3A1基因编码<sup>[1]</sup>,Ⅲ型胶原蛋白属于纤维状胶原蛋白超家族。它是一种同源三聚体,包含3个 $\alpha 1$ (Ⅲ)链,这些链以右手三螺旋形式相互超螺旋,具有特征性的1 000个残基Gly-Xaa-Yaa重复序列,其中Xaa和Yaa主要分别由脯氨酸和羟脯氨酸表示。甘氨酸面向中心,而具有较长侧链的氨基酸面向外,允许沿着三螺旋的中心轴紧密包装<sup>[2]</sup>。Ⅲ型胶原蛋白广泛存在于结缔组织中,如皮肤、肺、肝脏、肠和血管系统,并且通常与I型胶原蛋白相关,但骨中除外<sup>[3-5]</sup>。其具有支撑作用以保持组织和器官的正常形态,使其能够行使正常的生理功能<sup>[6-7]</sup>。胶原蛋白是无脊椎动物和脊椎动物中含量最丰富、分布最广的功能性结构蛋白,约占总蛋白的30%<sup>[8]</sup>。对COL3A1基因突变小鼠组织的超微结构分析表明,Ⅲ型胶原蛋白对于心血管系统、肠道和皮肤中正常的I型胶原纤维生成至关重要<sup>[9]</sup>。

重组胶原蛋白是通过将胶原蛋白的天然基因序列或重新优化设计的基因序列,导入选定的宿主细胞中(如大肠杆菌和酵母菌),经培养、发酵、分离纯化等工艺,获得的具有一定天然胶原蛋白特征和主要功能的蛋白质。与天然胶原蛋白相比,利用该技术生产的胶原蛋白解决了传统提取法存在的病毒隐患缺陷,同时显著提高了胶原蛋白的稳定性、亲水性和生物相容性<sup>[10-11]</sup>。由于重组胶原蛋白分子单一、结构清晰、易于控制,因此在生物医学及组织工程领域具有很好的潜在应用价值<sup>[12]</sup>。

2023年7月20日,国家药品监督管理局正式实施重组人源化胶原蛋白最新版行业标准(YY/T 1888-2023)<sup>[13]</sup>。文件规定了重组人源化胶原蛋白的质量控制、技术要求、实验方法、稳定性、生物学评价以及包装、运输和存储等。目前,针对重组Ⅲ型人源化胶原蛋白的研究并未对其关键质量参数方法进行报道,本研究建立了重组Ⅲ型人源化胶原蛋白关键质量参数检测与分析方法,旨在为我国重组Ⅲ型人源化胶原蛋白的质量检测提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试品

重组Ⅲ型人源化胶原蛋白(华熙生物科技股份

有限公司)。

### 1.2 主要试剂及仪器

2,5-二羟基苯乙酮(2,5-DHAP)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、氯化钠(NaCl)、苯酚、甲酸、碳酸氢铵、赖氨酰内切酶(Lys-C,美国Sigma公司);磷酸二氢钠磷酸氢二钠(比利时ACROS公司);Beckman PA 800 Plus SDS-MW电泳分析试剂盒及毛细管色谱柱(美国SCIEX公司);磷酸盐缓冲液(PBS,美国Cytiva公司);多角度激光散射(MALS)仪检测器DAWN HELEOS-II、尺寸排阻色谱(SEC)WTC-015S5型色谱柱(7.8 mm×300 mm,5  $\mu\text{m}$ ,美国Wyatt公司);强阳离子交换色谱柱(Proteomix SCX-NP5P,4.6 mm×250 mm,5  $\mu\text{m}$ ,美国SEPAX公司);C<sub>18</sub>毛细管色谱柱(150 mm×150  $\mu\text{m}$ ,1.9  $\mu\text{m}$ ,实验室自制);胰蛋白酶(Trypsin,美国Promega公司);基质辅助激光解吸/飞行时间质谱(MALDI-TOF MS,德国Bruker公司);Vanquish-UHPLC、金属浴、Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ Mass Spectrometer、nano LC1200、高速离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司);质谱级乙腈(ACN)及纯水。

### 1.3 重组Ⅲ型人源化胶原蛋白相对分子质量分析

**1.3.1 MALDI-TOF MS相对分子质量分析** 对重组Ⅲ型人源化胶原蛋白纯化后冻干品进行MALDI-TOF/TOF MS检测其相对分子质量<sup>[6]</sup>。先将基质2,5-DHAP配制好后点1  $\mu\text{L}$ 到MTP BigAnchor 384靶板上晾干,点1  $\mu\text{L}$ 重组Ⅲ型人源化胶原蛋白(1 mg·mL<sup>-1</sup>)到靶上晾干,再将1  $\mu\text{L}$ 2,5-DHAP基质覆盖到样本上晾干。MALDI-TOF MS采用线性扫描方法,扫描范围为(30~80)×10<sup>3</sup>,选择能量值75%进行数据采集。

**1.3.2 尺寸排阻色谱与多角度光散射联用(SEC-MALS)法相对分子质量分析**<sup>[14]</sup> 采用非对称场流分离系统进行样本分离,依次串联着多角度光散射(MALS)检测器DAWN HELEOS-II及紫外(UV)检测器,MALS检测器Concentration Source参数设为RI,激光发射波长658 nm,dn/dc值设定为0.185,Fused Silica样品池。UV检测器波长设为214 nm。使用SEC色谱柱(WTC-015S5,7.8 mm×300 mm,5  $\mu\text{m}$ )进行样本分离。将含有50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris,200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl,体积分数10%苯酚溶液(pH

7.2)作为流动相,流速为 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,样本上样量为 $10\text{ }\mu\text{L}(1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ ,等度洗脱。利用 WYATT Astra 数据处理软件进行数据分析。

#### 1.4 纯度分析

**1.4.1 毛细管凝胶电泳(CE-SDS)** 取重组Ⅲ型人源化胶原蛋白 $10\text{ mg}$ ,溶于 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ 水中,充分溶解,蛋白浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

$10\times 10^3$ 内标蛋白制备:取 $2\text{ }\mu\text{L}10\times 10^3$ 内标蛋白标准品于 $85\text{ }\mu\text{L}$ 样本缓冲液中(试剂盒中包含),并于 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 加热 $5\text{ min}$ ,室温冷却。

重组Ⅲ型人源化胶原蛋白的制备:取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 样本及 $2\text{ }\mu\text{L}10\times 10^3$ 内标蛋白于 $85\text{ }\mu\text{L}$ 样本缓冲液中,并于 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 加热 $5\text{ min}$ ,室温冷却。先在 $482.65\text{ kPa}$ 压力下用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaOH}$ 冲洗毛细管 $3\text{ min}$ ;用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{HCl}$ 冲洗毛细管 $1\text{ min}$ ;再用 $\text{H}_2\text{O}$ 冲洗毛细管 $1\text{ min}$ ,并在 $482.65\text{ kPa}$ 下用凝胶缓冲液平衡毛细管柱 $10\text{ min}$ 。在 $5\text{ kV}$ 电压下进样 $20\text{ s}$ ,采用 $15\text{ kV}$ 电压分离 $40\text{ min}$ 。紫外检测器波长为 $205\text{ nm}$ 。

**1.4.2 分子排阻高效液相色谱(SE-HPLC)分析**用 $\text{PBS}(\text{pH } 7.4)$ 做流动相,流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,柱温保持 $25\text{ }^\circ\text{C}$ , $30\text{ min}$ 等度洗脱,检测波长为 $205\text{ nm}$ 。取重组Ⅲ型人源化胶原蛋白样本 $1\text{ mg}$ ,充分溶解于 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$  PBS 中,取处理好的样本适量, $10\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $10\text{ min}$ 后取 $10\text{ }\mu\text{L}$ ( $1\text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}$ )进行 SE-HPLC 检测。

#### 1.5 强阳离子交换超高效液相色谱(SCX-UHPLC)电荷异构体分析

用 $95\%$ 流动相 A( $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ PB}$ , $\text{pH } 6.0$ )及 $5\%$ 流动相 B( $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ PB}$ , $500\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaCl}$ , $\text{pH } 6.0$ )流速 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 来平衡 SCX 色谱柱。梯度设置: $0\sim 5\text{ min}$ ,B 相 $5\%\rightarrow 8\%$ ;  $5\sim 45\text{ min}$ ,B 相 $8\%\rightarrow 45\%$ ;  $45\sim 49\text{ min}$ ,B 相 $48\%\rightarrow 100\%$ 并维持 $5\text{ min}$ ;  $55\sim 60\text{ min}$ ,B 相维持 $5\%$ 。上样量为 $10\text{ }\mu\text{g}$ ( $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),检测波长为 $214\text{ nm}$ 。

#### 1.6 毛细管区带电泳(CZE)电荷异质性分析

分离缓冲液为包含质量分数 $0.05\%$ 羟丙基甲基纤维素(HPMC), $600\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-氨基己酸(EACA), $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠, $\text{pH } 5.4$ (乙酸调节 $\text{pH}$ )的溶液。质量分数 $1\%$  HPMC 溶液的配制:将 $1\text{ g}$  HPMC 加入到含有 $100\text{ mL}$ 去离子水的烧杯中,室温过夜使其充分溶解。EACA 用 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠溶解。取重组Ⅲ型人源化胶原蛋白样本 $10\text{ mg}$ ,溶于 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ 纯水中,充分溶解备用。先在 $137.90\text{ kPa}$ 压力下用水冲洗毛细管 $5\text{ min}$ ;用分离缓冲

液平衡毛细管 $5\text{ min}$ 。在 $10.34\text{ kPa}$ 气压下进样 $10\text{ s}$ ,采用 $25\text{ kV}$ 电压分离 $100\text{ min}$ ,检测波长为 $205\text{ nm}$ 。

#### 1.7 鉴别分析与翻译后修饰分析

Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪采用正离子模式,采集范围为 $m/z$   $350\sim 1\text{ }550$ ,质谱一级分辨率为 $120\text{ }000$ ,最大离子注入时间为 $50\text{ ms}$ ,质谱二级分辨率为 $15\text{ }000$ ,隔离窗口为 $1.6$ ,AGC Target 为 $50\text{ }000$ 。纳升液相采用 $\text{C}_{18}$ 毛细管色谱柱( $150\text{ mm}\times 150\text{ }\mu\text{m}$ , $1.9\text{ }\mu\text{m}$ ),流动相 A 为含体积分数 $0.1\%$ 甲酸的水,流动相 B 为含体积分数 $0.1\%$ 甲酸的乙腈,流速为 $600\text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。Trypsin 酶切后梯度为: $0\sim 8\text{ min}$ ,B 相 $5\%\rightarrow 8\%$ ;  $8\sim 58\text{ min}$ ,B 相 $8\%\rightarrow 22\%$ ;  $58\sim 70\text{ min}$ ,B 相 $22\%\rightarrow 32\%$ ;  $70\sim 71\text{ min}$ ,B 相 $32\%\rightarrow 90\%$ ,并维持 $7\text{ min}$ 。Lys\_C 酶切后洗脱梯度: $0\sim 13\text{ min}$ ,B 相 $7\%\rightarrow 15\%$ ;  $13\sim 59\text{ min}$ ,B 相 $15\%\rightarrow 28\%$ ;  $59\sim 83\text{ min}$ ,B 相 $28\%\rightarrow 42\%$ ;  $83\sim 84\text{ min}$ ,B 相 $42\%\rightarrow 95\%$ ,并维持 $6\text{ min}$ 。

称取 $10\text{ mg}$ 重组Ⅲ型人源化胶原蛋白样品于 $1.5\text{ mL}$  EP 管,加入水 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ ,室温震荡涡旋后至样品充分溶解( $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 样品溶液加入 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵溶液稀释至 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,备用。

Trypsin 及 Lys\_C 酶解:取上述稀释后样品 $30\text{ }\mu\text{L}$ ( $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),按酶与蛋白质量比 $1:30$ 加入 Trypsin 溶液( $2\text{ }\mu\text{L}$ , $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ),充分混匀, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 酶解 $16\text{ h}$ ,反应结束后加入终浓度为体积分数 $0.1\%$ 的甲酸进行终止。再取重组Ⅲ型人源化胶原蛋白样品 $20\text{ }\mu\text{L}$ ( $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),按酶与蛋白质量比 $1:20$ 加入 Lys\_C 酶( $2\text{ }\mu\text{L}$ , $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ),充分混匀后 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 酶解 $16\text{ h}$ ,反应结束后加入终浓度为体积分数 $0.1\%$ 的甲酸进行终止。取 Trypsin 及 Lys\_C 酶解后肽段 $1\text{ }\mu\text{g}$ 进行纳升液相串联质谱(nano LC-MS/MS)检测。

数据处理软件为 Thermo Biopharma Finder™ 4.1。可变修饰<sup>[15]</sup>为天冬酰胺(Asn)/谷氨酰胺(Gln)脱酰胺、羟脯氨酸(Hyp)化、羟赖氨酸(Hyl)化、蛋氨酸(Met)氧化,以及丝氨酸(Ser)/苏氨酸(Thr)/酪氨酸(Tyr)磷酸化修饰。偏差设置为一级母离子 $10\times 10^{-6}$ ,二级碎片离子 $20\times 10^{-6}$ 。序列信息由客户提供,并负责其真实性。

## 2 结果

### 2.1 重组Ⅲ型人源化胶原蛋白相对分子质量分析

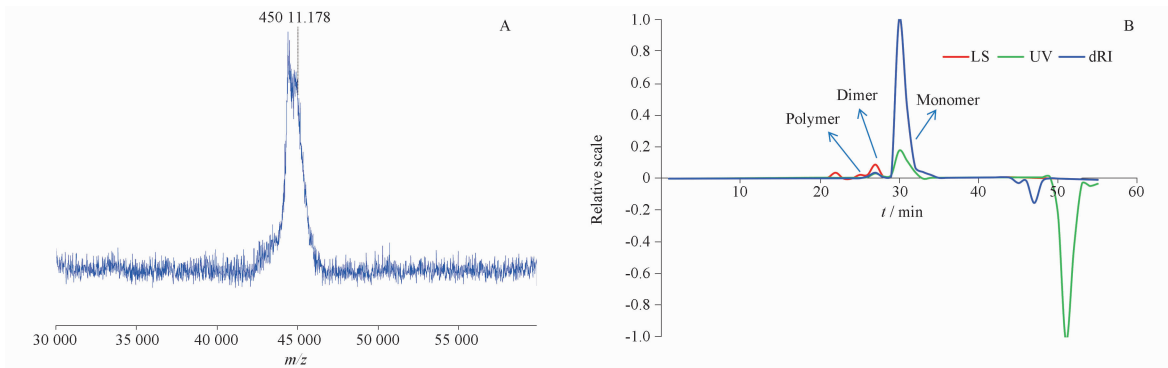
由于重组Ⅲ型人源化胶原蛋白在电喷雾电离

(ESI)体系下较难电离,导致 ESI-MS 无法测定其精确相对分子质量。因此,本研究通过建立 MALDI-TOF MS 与 SEC-MALS 法测定其平均相对分子质量及其相对分子质量分布。相对分子质量作为蛋白质样品的主要特征参数之一,重组 III 型人源化胶原蛋白经 MALDI-TOF MS 分析后相对分子质量为  $45.01 \times 10^3$ ,见图 1A,相对分子质量实测值与理论相对分子质量一致(预期相对分子质量  $45.01 \times 10^3$ ,按照其氨基酸序列计算)。重组 III 型人源化胶原蛋白 MALS 检测结果见图 1B 及表 1,其平均相对分子质量  $45.17 \times 10^3$  ( $\pm 0.226\%$ )(两次技术重复均值),理论相对分子质量为  $45.01 \times 10^3$ ,实测值与理论值极为接近[相对标准偏差(RSD)0.36%],提示完整分子水平,重组 III 型人源化胶原蛋白无较大的序列突变体(如,信号肽残余或末端氨基酸不

均一等情况)与氨基酸修饰(如,N-糖链等)等情况存在。二聚体相对分子质量约  $97.01 \times 10^3$  ( $\pm 0.226\%$ )(两次重复均值),多聚体相对分子质量为  $215.05 \times 10^3$  (两次重复均值),其中多聚体含量较低(接近基线)。

## 2.2 重组 III 型人源化胶原蛋白纯度分析

建立 CE-SDS(非还原体系)及 SE-HPLC 两种方法进行重组 III 型人源化胶原蛋白纯度检测,结果见图 2 及表 2。CE-SDS 结果表明,重组 III 型人源化胶原蛋白主峰相对峰面积为 98.77%。另外,还检出相关物质峰(相对峰面积为 1.23%),其来源待后续深入研究。SE-HPLC 结果表明,重组 III 型人源化胶原蛋白纯度为 98.07%,并检测出 1.93% 的二聚体成分。CE-SDS(非还原体系)纯度分析结果与 SEC-MALS 纯度分析结果基本一致。



LS - 静态光散射检测器;UV - 紫外检测器;dRI - 示差检测器。

LS - static light scattering detector; UV - UV detector; dRI - differential refractive index detector.

图 1 重组 III 型人源化胶原蛋白基质辅助激光解吸/飞行时间质谱(MALDI-TOF MS) (A) 及多角度激光散射(MALS) (B) 检测结果

Fig. 1 MALDI-TOF MS(A) and MALS (B) detection result of recombinant human collagen III

表 1 重组 III 型人源化胶原蛋白 MALS 相对分子质量结果分析表

Tab. 1 MALS molecular weight analysis results of recombinant human collagen III

Recombinant human collagen III	$M_r$ (Peak1)	$M_r$ (Peak2)	$M_r$ (Peak3)
Technical repeats 1	$4.51 \times 10^4$ ( $\pm 0.304\%$ )	$9.75 \times 10^4$ ( $\pm 0.358\%$ )	$2.20 \times 10^5$ ( $\pm 1.652\%$ )
Technical repeats 2	$4.53 \times 10^4$ ( $\pm 0.226\%$ )	$9.65 \times 10^4$ ( $\pm 0.366\%$ )	$2.11 \times 10^5$ ( $\pm 1.721\%$ )

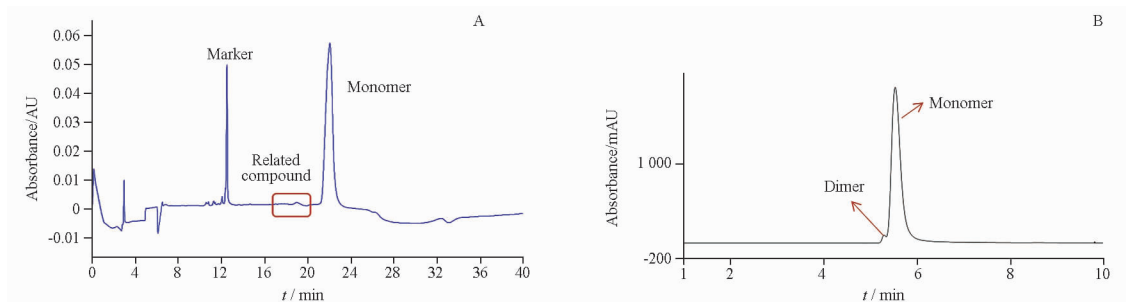


图 2 重组 III 型人源化胶原蛋白毛细管凝胶电泳(A) 及尺寸排阻高效液相色谱(B) 纯度分析图

Fig. 2 CE-SDS (A) and SE-HPLC (B) purity analysis of recombinant human collagen III

表2 重组Ⅲ型人源化胶原蛋白纯度分析表

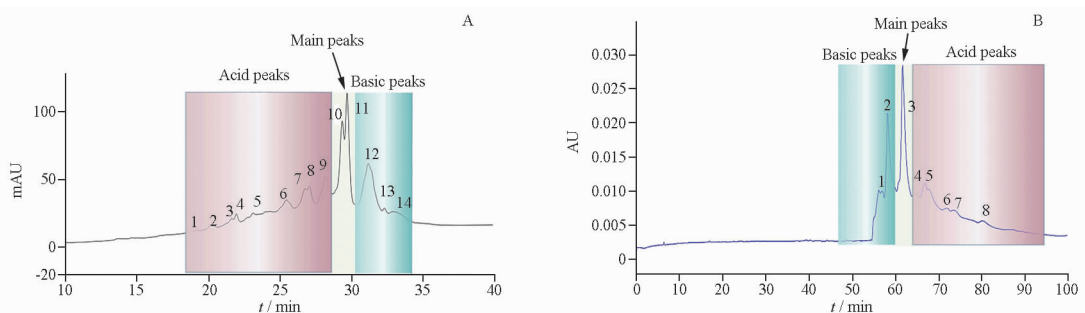
Tab. 2 Purity analysis results of recombinant human collagen Ⅲ

Detection methods	Compounds	t/min	Area	Area/%
CE-SDS	Monomer	21.99	2 554 299	98.77
	Realtive Compound	18.95	31 897	1.23
SE-HPLC	Monomer	5.29	8.745	98.07
	Dimer	5.53	444.867	1.93

### 2.3 重组Ⅲ型人源化胶原蛋白电荷异构体分布规律分析

重组Ⅲ型人源化胶原蛋白经 SCX-UHPLC 检测,结果见图 3A 及表 3。该重组Ⅲ型人源化胶原蛋白共检测出 14 种电荷异构体组分,空间结构导致的电荷异质性极大,应与该样品复杂的翻译后修饰或其他异构化情况有关。将 Peak10 及 Peak11 视为中

性主成分,则主成分占比为 26.22%。Peak 1~9 为酸性峰,占比为 52.08%。Peak 12~14 为碱性峰,占比为 21.70%。重组Ⅲ型人源化胶原蛋白样本经 CZE 检测,结果见图 3B 及表 3。CZE 鉴定到 8 种电荷异构体组分,其中碱性峰 22.63%,主峰 25.27%,酸性峰 52.10%。两种电荷异构体鉴别方法,酸性组分、主峰与碱性组分,分布规律一致。



粉色区域 - 酸性峰(峰 1~9);蓝色区域 - 碱性峰(峰 12~14);浅黄色区域 - 主峰(峰 10~11)。

Pink area - acid peak (peak 1-9); Blue area - basic peak (peak12-14); Light yellow area - main peak (peak10-11).

图3 重组Ⅲ型人源化胶原蛋白经强阳离子交换超高效液相色谱(SCX-UHPLC,A)及毛细管区带电泳(CZE,B)检测的电荷异构体分布图

Fig. 3 SCX-UHPLC(A) and CZE(B) charge isomers distribution results of recombinant human collagen Ⅲ

表3 重组Ⅲ型人源化胶原蛋白电荷异构体分布表

Tab. 3 Charge isomers distribution results of recombinant human collagen Ⅲ

Detection methods	Basic peaks/%	Main peaks/%	Acid peaks/%
SCX-UHPLC	21.70	26.22	52.08
CZE	22.63	25.27	52.10

### 2.4 重组Ⅲ型人源化胶原蛋白鉴别分析与序列覆盖率分析

重组Ⅲ型人源化胶原蛋白经 Trypsin 酶解后采用 nano LC-MS/MS 检测,串联质谱 raw 文件经 Thermo Biopharma Finder™ 4.1 分析,其所有的质谱基峰得到归属,序列覆盖率为 93.00%,解析结果见图 4。单 Trypsin 酶切后没有实现 100% 覆盖,需结合 Lys\_C 酶解统一分析,Lys\_C 酶切体系其序列覆盖率为 98.20%,综合 Trypsin 及 Lys\_C 酶的肽图结果,最

终蛋白序列覆盖率为 100%,实测序列与理论序列一致。

## 3 讨论

胶原蛋白在人体内起着重要的作用,参与了许多重要的生理活动,对器官和细胞起到支撑作用<sup>[16]</sup>。由于其良好的生物相容性,生物降解性和生物活性,被广泛应用于各个领域,例如作为食品添加剂改善食物风味,作为可降解薄膜包装食品;在医疗领域作为水凝胶<sup>[17]</sup>,胶原蛋白填料,蛋白膜,蛋白管,蛋白敷料<sup>[18-20]</sup>;在许多化妆品和保健品中都有添加,起到抗老化、抗氧化、保湿等作用<sup>[21]</sup>。胶原蛋白在各行业中所占的比重及医疗领域中发挥的作用均越来越大,因此,对其质控方法进行研究具有重要的意义。

首先,相对分子质量的质控为蛋白类生物制品

的重中之重。由于重组Ⅲ型人源化胶原蛋白存在较复杂的翻译后修饰或本品自身特性,传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法局限于复杂的样品处理以及分辨率的限制,无法对重组Ⅲ型人源化胶原蛋白的相对分子质量进行准确标定。其次,在高分辨质谱(Orbitrap)上检测不出多电荷峰,进而无法检测其准确相对分子质量。本研究通过MALDI-TOF

MS测定了本品较为精确的相对分子质量,且实测值与预期值一致。另外,针对药厂的质谱普及率低,还建立了SEC-MALS的相对分子质量分布分析方法,并同时分析了重组Ⅲ型人源化胶原蛋白聚集体的相对分子质量。该方法既可检测单体相对分子质量分布的同时也可监测蛋白在自然状态下的聚集状态,增加了企业内部质量标准的提升。

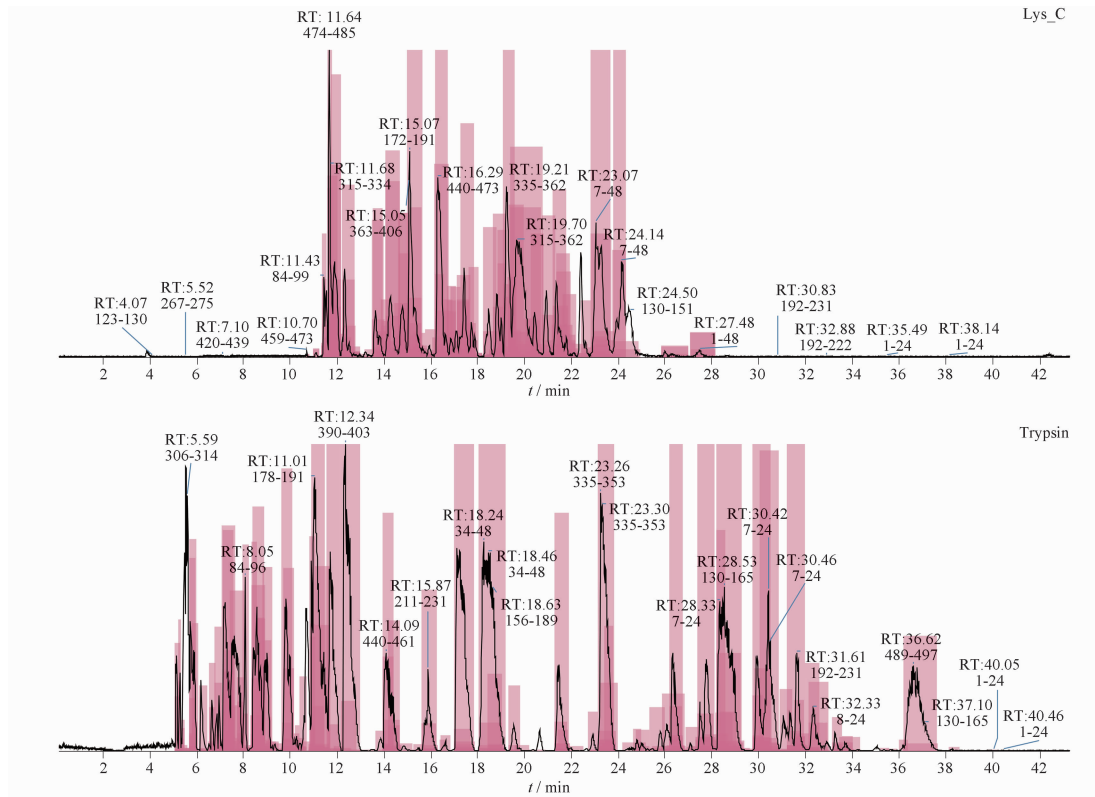


图4 重组Ⅲ型人源化胶原蛋白肽谱图

Fig. 4 The peptide mapping spectra of recombinant human collagen III

传统研究蛋白类分子异质性的方法,包括SDS-PAGE和SE-HPLC。需指出的是,传统的SDS-PAGE并不适用于空间结构复杂或样品稳定性稍弱的样品。近年来CE-SDS由于其高分辨率、自动化、重复性好的优点而得到广泛应用<sup>[22]</sup>,并已加入了药典方法。本实验建立了重组Ⅲ型人源化胶原蛋白的SEC-HPLC及CE-SDS质控方法。CE-SDS主峰相对峰面积为98.77%,SEC-HPLC检测纯度为98.07%。两种纯度检测方法结果一致。且本研究的两种方法操作简单,样品处理过程条件温和,便于企业内部建立相应的质量标准以提升产品质量。

电荷异质性在生物创新药的开发和生物类似药的相似性评价过程中被视为关键质量属性,在重组

Ⅲ型人源化胶原蛋白的质控中也是关键点。毛细管区带电泳<sup>[23]</sup>、等电聚焦<sup>[24]</sup>、阳离子交换色谱和阴离子交换色谱等都可以实现电荷异构体的分离<sup>[25]</sup>。本实验建立了毛细管区带电泳及阳离子交换色谱两种方法来进行重组Ⅲ型人源化胶原蛋白的电荷异构体检测。需指出的是,本法仅对电荷异构体的各成分进行了初步定量,暂未对电荷异构体的形成原因深入研究。后续应结合离子交换的方法制备相应的电荷异构体成分,通过质谱法、色谱法等多手段联合应用,解析电荷异构体的形成原因,该部分研究正在进行中。

蛋白质的肽图分析是鉴定蛋白质一级结构完整性和准确性的重要方法。通过对重组Ⅲ型人源化胶原蛋白酶解后肽段的全序列确认,可对其翻

译后修饰以及可能的错误氨基酸序列进行解析。本实验建立了重组Ⅲ型人源化胶原蛋白的“双”酶切肽谱方法,实现了序列100%归属。考虑到企业的操作可连续性及重复性,后续需继续将“双”酶切综合肽谱过渡为“双顺序”酶切肽谱,并验证其可行性。

总之,本实验初步建立了我国重组Ⅲ型人源化胶原蛋白的质控方法,该方法具有保证产品安全、有效、质量可控的特点,为我国重组Ⅲ型人源化胶原蛋白的质量检测提供了参考依据。

## REFERENCES

- [ 1 ] ABAYAZEED A, HAYMAN E, MOGHADAMFALAH M, *et al.* Vascular type Ehlers-Danlos Syndrome with fatal spontaneous rupture of a right common iliac artery dissection: case report and review of literature [J]. *J Radiol Case Rep*, 2014,8(2):63-69.
- [ 2 ] EXPOSITO J Y, VALCOURT U, CLUZEL C, *et al.* The fibrillar collagen family [J]. *Int J Mol Sci*, 2010,11(2):407-426.
- [ 3 ] GELSE K, PÖSCHL E, AIGNER T, AIGNER T. Collagens--structure, function, and biosynthesis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003,55(12):1531-1546.
- [ 4 ] BAO X, ZENG Y, WEI S, *et al.* Developmental changes of *Col3a1* mRNA expression in muscle and their association with intramuscular collagen in pigs [J]. *J Genet Genom*, 2007,34(3):223-228.
- [ 5 ] JENSEN L T, HØST N B. Collagen: scaffold for repair or execution [J]. *Cardiovasc Res*, 1997,33(3):535-539.
- [ 6 ] HOU Z M, LI X Y, LI M, *et al.* Preparation and characterization of recombinant human-source collagen [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2019, 35(2): 319-326.
- [ 7 ] KUIVANIEMI H, TROMP G. Type III collagen (*COL3A1*): gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases [J]. *Gene*, 2019,707:151-171.
- [ 8 ] YE T, XIANG Q, YANG Y, *et al.* Research, development and application of collagen: a review [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2023, 39(3): 942-960.
- [ 9 ] LIU X, WU H, BYRNE M, *et al.* Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997,94(5):1852-1856.
- [ 10 ] TANG Y P, ZHENG Q, HU B, *et al.* Research progress on preparation and application of recombinant collagens [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2016, 37(18): 384-386.
- [ 11 ] LO S, FAUZI M B. Current update of collagen nanomaterials—fabrication, characterisation and its applications: a review [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(3):316. DOI: 10.3390/pharmaceutics13030316.
- [ 12 ] SUN L, LI B, JIANG D, *et al.* Nile tilapia skin collagen sponge modified with chemical cross-linkers as a biomedical hemostatic material [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 159:89-96.
- [ 13 ] YY/T 1888-2023. Recombinant human collagen(重组人源化胶原蛋白)[S]. 2023: 1-20.
- [ 14 ] SOME D, AMARTELY H, TSADOK A, *et al.* Characterization of proteins by size-exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering (SEC-MALS) [J]. *J Vis Exp*, 2019,(148). DOI:10.3791/59615.
- [ 15 ] PERDIVARA I, YAMAUCHI M, TOMER K B. Molecular characterization of collagen hydroxylysine *O*-glycosylation by mass spectrometry: current status [J]. *Aust J Chem*, 2013,66(7):760-769.
- [ 16 ] LIU X, ZHENG C, LUO X, *et al.* Recent advances of collagen-based biomaterials: multi-hierarchical structure, modification and biomedical applications [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019,99:1509-1522.
- [ 17 ] ZHU C, LEI H, FAN D, *et al.* Novel enzymatic crosslinked hydrogels that mimic extracellular matrix for skin wound healing [J]. *J Mater Sci*, 2018, 53(8):5909-5928.
- [ 18 ] SONG X, ZHU C, FAN D, *et al.* A novel human-like collagen hydrogel scaffold with porous structure and sponge-like properties [J]. *Polymers (Basel)*, 2017, 9(12):638. DOI: 10.3390/polym9120638.
- [ 19 ] FAN H, MI Y, HUI J H, *et al.* Cytocompatibility of Human-like Collagen/nano-hydroxyapatite Porous Scaffolds Using Cartilages [J]. *Biotechnology*, 2013, 12(2):99-103.
- [ 20 ] XIE J H, FAN D D. A high-toughness and high cell adhesion polyvinyl alcohol PVA-hyaluronic acid (HA)-human-like collagen (HLC) composite hydrogel for cartilage repair [J]. *Int J Polym Mater*, 2020, 69(14):928-937.
- [ 21 ] ZHANG H. Expression and purification of recombinant human collagen-like and its application in cosmetics [D]. Jinan: Jinan University, 2017.
- [ 22 ] ESPINOSA-de la GARZA C E, PERDOMO-ABUNDEZ F C, PADILLA-CALDERÓN J, *et al.* Analysis of recombinant monoclonal antibodies by capillary zone electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2013,34(8):1133-1140.
- [ 23 ] CAO J, SUN W, GONG F, *et al.* Charge profiling and stability testing of biosimilar by capillary isoelectric focusing [J]. *Electrophoresis*, 2014,35(10):1461-1468.
- [ 24 ] ANDERSON C L, WANG Y, RUSTANDI R R. Applications of imaged capillary isoelectric focussing technique in development of biopharmaceutical glycoprotein-based products [J]. *Electrophoresis*, 2012,33(11):1538-1544.
- [ 25 ] CUI X, MI W, HU Z, *et al.* Global characterization of modifications to the charge isomers of IgG antibody [J]. *J Pharm Anal*, 2022,12(1):156-163.

(收稿日期:2023-10-20)