AAV 衣壳亚基纯度分析中 VP3 变体峰的鉴定与机制研究

陶翠平，夷　佳，任浩然，周怡琳，孙浩行 *
（上海信致医药科技有限公司，上海 201100）

摘要：该研究旨在探究采用十二烷基硫酸钠 - 毛细管凝胶电泳（CE-SDS）技术分析腺相关病毒（AAV）衣壳亚基纯度时，VP3 亚基峰前端产生未知信号峰的原因。先采用 PCR 法对重组腺相关病毒（rAAV）衣壳蛋白 VP3 亚基碱基序列的第 2 位起始密码子进行位点突变，获得突变后的 rAAV，再通过 CE-SDS 技术鉴定该位点突变与该未知信号峰的关联性，结合 LC-MS 对未知峰的相对分子质量进行检测和肽段分析。结果表明，VP3 亚基碱基序列中如含有 2 个起始密码子（ATG），则可能从第 2 个起始密码子开始翻译，表达产物为亚基 VP3 变体（VP3'），即对应 CE-SDS 技术检测到的未知信号峰。在对 AAV 衣壳蛋白进行亚基纯度分析时应将其作为 AAV 衣壳亚基峰。

关键词：十二烷基硫酸钠 - 毛细管凝胶电泳技术；重组腺相关病毒；纯度；衣壳；亚基 VP3 变体峰
中图分类号：TQ937；R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)08-1148-08
引用：陶翠平，夷　佳，任浩然，等．AAV 衣壳亚基纯度分析中 VP3 变体峰的鉴定与机制研究 [J]．中国医药工业杂志，2024, 55(8): 1148-1155．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.08.017

Characterization and Mechanism of VP3 Variant Peak in AAV Capsid Subunit Purity Analysis

TAO Cuiping, YI Jia, REN Haoran, ZHOU Yilin, SUN Haohang*
(*Shanghai Belief-Delivery BioMed Co., Ltd., Shanghai 201100*)

ABSTRACT: This study aimed to investigate the cause of an unidentified peak that appeared ahead of the VP3 subunit peak during the purity analysis of adeno-associated virus (AAV) capsid subunits by capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate (CE-SDS) technique. Initially, a point mutation was introduced to the second start codon within the base sequence of the recombinant adeno-associated virus (rAAV) capsid protein's VP3 subunit via PCR to generate a mutant rAAV. Subsequently, the relationship between this mutation and the unidentified signal peak was elucidated using CE-SDS technique. Additionally, the relative molecular weight and peptide analysis of the unknown peak was detected by LC-MS. The results indicated that if the VP3 subunit's base sequence contain two initiation codons (ATG), the translation might start from the second initiation codon. And the expression product was a variant of the VP3 subunit (VP3'), which aligned with the unidentified signal peak observed in CE-SDS analysis. Consequently, this unidentified peak should be regarded as a AAV capsid subunit peak during the purity assessment of AAV capsid proteins.

Key Words: capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate technique; recombinant adeno-associated virus; purity; capsid; subunit VP3 variant peak

腺相关病毒（adeno-associated virus，AAV）被视为基因治疗的明星载体之一 [1]。AAV 载体因具有宿主范围广、免疫原性低、非致病性、血清型种类多样、表达的外源基因长期稳定、扩散性能良好和物理性质稳定等优点，在临床研究中被广泛应用 [2]。AAV

收稿日期：2024-04-14
作者简介：陶翠平（1989—），女，副研究员，从事重组腺相关病毒的研究。
通信作者：孙浩行（1989—），男，研究员，从事重组腺相关病毒的研究。
E-mail：sunhaohang@beliefbiomed.com

载体可应用于眼科、血友病、神经、肌肉骨骼和代谢障碍等多个领域的罕见病、遗传性疾病和后天获得性疾病的治疗[3]。目前，全球已有7款基于重组腺相关病毒（recombinant adeno-associated virus，rAAV）的基因治疗药物获批上市，包括Elevidys（美国FDA，2023）、Hemgenix（欧盟EMA，2023；美国FDA，2022）、Roctavian（欧盟EMA，2022）、Upstaza（欧盟EMA，2022）、Zolgensma（美国FDA，2019）等[4]。同时，国内已有30多款rAAV基因治疗药物获得临床试验申请默许，其中3款进入Ⅲ期临床阶段，包括信念医药的BBM-H901、纽福斯的NR082和诺华的OAV101。

AAV是一种直径约22 nm的微小且无包膜的病毒，基因组由线性单链DNA组成，长度约4.7 kb[5]，由2个反向末端重复序列（inverted terminal repeat，ITR）和2个开放读码框*rep*和*cap*组成。其中，*rep*基因翻译成Rep78、Rep68、Rep52和Rep40 4种蛋白，是AAV的复制和包装调控蛋白，具有ATP酶、解旋酶和核酸内切酶的功能[6]；*cap*基因编码AAV的衣壳蛋白VP1、VP2、VP3（即3个衣壳亚基）以及可促进病毒包装的组装活化蛋白（assembly-activating protein，AAP）。Cap蛋白与细胞表面的受体结合，通过胞吞进入细胞。AAV进入细胞后被转入细胞核中，衣壳蛋白逐步降解并释放出单链DNA基因组。

rAAV载体是通过非致病的野生型AAV改造而成，基因组保留了野生型AAV的ITR，并最大化了包装能力。一般通过三质粒系统（表达Cap和Rep蛋白的包装质粒，包含目的基因和ITR的表达质粒以及辅助质粒）共转染人胚肾细胞（HEK 293细胞）以生产rAAV[7]。为确保rAAV产品安全、有效，必须监测多种关键质量属性，包括但不限于衣壳滴度、基因组滴度、空/完整衣壳比、生物学活性、衣壳蛋白亚基比例和纯度等。

其中，rAAV衣壳蛋白的纯度［包括亚基（VP1、VP2、VP3）的比例和纯度］分析是非常重要的检测项目，会影响药物的效能和效价[8]。十二烷基硫酸钠-毛细管凝胶电泳（capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate，CE-SDS）技术结合了连续电泳和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）的优点，相较于传统平板电泳具有更高的灵敏度及特异性。CE-SDS技术用于rAAV衣壳蛋白亚基比例和纯度的分析时，能很好地分离VP1、VP2、VP3的构型，更适用于质控和质量研究[9]。此外，毛细管电泳技术还可以检测病毒载体的基因组结构及其完整性、蛋白质成分与含量，为基因治疗的研究及应用提供更全面的信息。

有研究[10]采用CE-SDS法检测AAV843衣壳蛋白的纯度，结果显示CE图谱中除VP1、VP2和VP3亚基的主峰外，在VP3亚基峰的前端存在未知的信号峰。文献[11]推测该未知峰为VP3变体（VP3'）的特征峰，产生原因可能是VP3亚基的碱基序列含有2个起始密码子ATG，若从第2个起始密码子开始翻译，所得蛋白产物即为VP3'。为保证衣壳亚基纯度检测结果的准确性，本研究深入探究了该未知峰的产生原因。研究中采用PCR法使VP3亚基的第2个起始密码子突变，通过CE-SDS分析突变前后未知峰是否消失，同时结合LC-MS技术[12]，分别测定VP3和VP3'的相对分子质量，以确定VP3'的形成原因。

1 仪器与试药

SimpliAmp™型PCR热循环仪、Sorvall™ WX+型超速离心机、Nano Drop™ One型微量UV-Vis分光光度计、BB 150型二氧化碳培养箱，均购自美国Thermo Fisher公司；PA800 Plus型毛细管电泳仪（配有荧光检测器和32 Karat数据处理工作站，加拿大SCIEX公司）；MS-100型金属浴（杭州奥盛仪器有限公司）；Acquity UPLC Ⅰ-Class PLUS型系统（配备Acquity荧光检测器、Acquity RDa飞行时间质谱检测器和Waters_connect 3.3.0分析软件，美国Waters公司）；FluorChem E型凝胶成像仪（美国ProteinSimple公司）。

SDS-MW Analysis Kit试剂盒、非涂层毛细管（规格50 μm×30.2 cm），均购于加拿大SCIEX公司；二氟乙酸（批号W18112126，LC-MS级）均购自美国Waters公司；异丙醇（批号207073）、二硫苏糖醇［dithiothreitol（DTT），批号91286985］、TOP10化学感受态大肠埃希菌和FreeStyle™ F17

培养基，均购自美国 Thermo Fisher 公司；荧光染料 P503（上海艾跃生物科技有限公司，批号 09522023）；甲醇（≥99.7%）、乙腈（≥99.92%）、水（MS 级）、Trtion X-100、PEG 8000 和碘克沙醇均购于美国 Sigma 公司；Amicon® Ultra 超滤离心管（美国 Millipore 公司，截留分子量 10 000）；盐酸胍（上海泰坦科技股份有限公司，批号 P1654272）；氯化铯（BR 级，批号 J811BA0014）、胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠均购自生工生物工程（上海）股份有限公司；One-Step Lumitein UV Protein Gel Stain（美国 Biotium 公司）；PEI（美国 Polyscience 公司）；AAV843 衣壳质粒、AAV5 衣壳质粒、AAV9 衣壳质粒、病毒包装辅助质粒和 rAAV 病毒颗粒数定量参比品，均来自上海信致医药科技有限公司。

2　方法与结果

2.1　质粒的设计与构建

研究[11,13]表明，在采用 CE-SDS 法分析 AAV1、AAV2、AAV6 和 AAV8 的衣壳蛋白亚基纯度时，除 3 个亚基主峰（分别对应 VP1、VP2 和 VP3）外，VP3 峰之前还均存在 1 个小峰；而在分析 AAV5 和 AAV9 的亚基纯度时，只存在 3 个亚基主峰。可能的原因是 AAV5 和 AAV9 的 VP3 *N* 端只有 1 个起始 ATG 起始密码子，而 AAV2 的 VP3 *N* 端碱基序列有 2 个潜在的 ATG 起始密码子。AAV2 的 VP3 有 2 个可能的 *N* 端，从第 1 个起始密码子位开始翻译，所得的产物为 VP3 亚基，从第 2 个起始密码子位开始翻译，所得的产物为 VP3'。AAV843 的 VP3 *N* 端的 DNA 序列也存在 2 个潜在的 ATG 起始密码子，因此推测 VP3' 产生的原因同 AAV2。为了确定这个假设，本研究通过 PCR 重组法将 AAV843 的 VP3 *N* 端第 2 个密码子从 ATG（翻译为 M）改造为 GTG（翻译为 V）；将 AAV5 的 VP3 *N* 端第 1 个起始密码子间隔 8 个顺位（*cap* 基因第 200 位密码子）密码子 TTG（翻译为 L）突变为第 2 个起始密码子 ATG（翻译为 M）；将 AAV9 的 VP3 *N* 端第 1 个起始密码子间隔 8 个顺位（*cap* 基因第 210 位密码子）的密码子 GTG（翻译为 V）突变为第 2 个起始密码子 ATG（翻译为 M）。具体的碱基序列和氨基酸序列如表 1、2 所示。

质粒构建：通过 PCR 法分别对 AAV843、AAV5 和 AAV9 衣壳质粒 *cap* 基因上的位点进行突变。其中，AAV843 的 VP3 亚基蛋白 *N* 端第 212 位甲硫氨酸（methionine，M）突变为缬氨酸（valine，V），质粒命名为 N72；AAV5 的 VP3 亚基蛋白 *N* 端第 201 位亮氨酸（leucine，L）突变为 M，质粒命名为 N73；AAV9 的 VP3 亚基蛋白 *N* 端第 211 位 V 突变为 M，质粒命名为 N74，详细序列如表 1 和 2 所示。构建完成的质粒经 Sanger 测序（苏州金唯智生物科技有限公司）鉴定，结果如图 1 所示。将鉴定过的质粒转化至 TOP10 化学感受态大肠埃希菌中，配制成 50%甘油菌，于 －80 ℃冻存。

质粒样品制备：复苏 N72、N73、和 N74 质粒菌种，采用 LB 培养基（含胰蛋白胨 10 g、酵母提取

表 1　突变前后 VP3 *N* 端的碱基序列

Tab.1　*N*-Terminal Base Sequence of VP3 before and after Mutation

血清型	序列[1)]
AAV2	…**ATG** GCT ACA GGC AGT GGC GCA CCA **ATG** GCA…
AAV843	…**ATG** GCT TCA GGC GGT GGC GCA CCA **ATG** GCA…
AAV5	…**ATG** TCT GCG GGA GGT GGC GGC CCA **TTG** GGC…
AAV9	…**ATG** GCT TCA GGT GGT GGC GCA CCA **GTG** GCA…
突变 AAV843	…**ATG** GCT TCA GGC GGT GGC GCA CCA **GTG** GCA…
突变 AAV5	…**ATG** TCT GCG GGA GGT GGC GGC CCA **ATG** GGC…
突变 AAV9	…**ATG** GCT TCA GGT GGT GGC GCA CCA **ATG** GCA…

注：[1)] 黑色粗体表示第 1 个起始密码子；红色粗体表示第 2 个起始密码子；绿色粗体表示与第 1 个起始密码子间隔 8 个顺位的密码子。

表 2　突变前后 VP3 *N* 端的氨基酸序列

Tab.2　Amino Acid Sequence of the *N*-Terminus of VP3 before and after Mutation

血清型	序列[1)]
AAV2	M A T G S G A P **M** A 203　211
AAV843	M A S G G G A P **M** A 204　212
AAV5	M S A G G G G P **L** G 193　201
AAV9	M A S G G G A P **V** A 203　211
突变 AAV843	M A S G G G A P **V** A 204　212
突变 AAV5	M S A G G G G P **M** G 193　201
突变 AAV9	M A S G G G A P **M** A 203　211

注：[1)] 黄色高亮为突变前序列；蓝色高亮为突变后序列。

物 5 g 和 NaCl 10 g)，37 ℃、250 r/min，于 500 mL 摇瓶中培养。使用碱裂解方法裂解菌体后，离心 (8 000×*g*) 去除沉淀，收集上清液，加入异丙醇沉淀质粒。然后离心 (8 000×*g*)，去除上清，沉淀加水溶解。向上述水溶液中加入氯化铯，配制终质量浓度为 1 g/mL 的氯化铯溶液，转移溶液至超速离心管中，离心（大于 200 000×*g*) 16 h 以上，离心结束后抽取质粒条带，加入异丙醇沉淀质粒，再加入 75% 乙醇漂洗 2 次后用 TE 缓冲液（含 10 mmol/L 的 Tris 和 1 mmol/L 的 EDTA）溶解并保存质粒。制备的质粒经 NanoDrop One 检测质粒浓度、琼脂糖凝胶电泳检测质粒纯度后分装，于 －20 ℃保存。

2.2 病毒包装

参考三质粒系统，将表达质粒、包装质粒和辅助质粒（质量比 1 ∶ 1 ∶ 2）转染至 HEK 293 细胞中，于 FreeStyle™ F17 表达培养基中进行培养。向转染试剂 PEI 中加入质粒（质量比 2 ∶ 1），然后以每 1 mL 细胞 3 mg 质粒总量的转染量将其加至 HEK 293 细胞中，在 37 ℃、5% CO_2、振摇速度 135 r/min 的条件下，以 200 mL 病毒包装体积的规模，制备衣壳改造后的 rAAV。收获后使用终浓度为 1% 的 Trtion X-100 化学裂解细胞。取裂解细胞液，加入 PEG 8000（终浓度为 8%），于 2 ～ 8 ℃过夜后，离心 (10 000 ×*g*) 45 min，取沉淀。使用碘克沙醇进行离心管密度梯度铺层，从下到上为 60% 5 mL、40% 5 mL、25% 7 mL、15% 5 mL 的碘克沙醇，样品铺在最上层，用 PBS 补满至没有气泡，超速离心 (250 000×*g*) 24 h 后，使用注射器在 40% 和 60% 层交界处向上抽取溶液 5 mL，得到 *cap* 基因位点突变的病毒样品，分别命名为 B07N72（AAV843 突变）、B07N73（AAV5 突变）和 B07N74（AAV9 突变）。使用 SDS-PAGE 法 [14]（Lumitein 染色）对衣壳颗粒数进行定量，结果显示上述三者的衣壳滴度分别为 3.04×10^{13}、3.73×10^{13} 和 1.57×10^{13} vp/mL。检测结果如图 2 所示，各基因型 AAV 突变后衣壳蛋白 VP1、VP2、VP3 条带清晰、无杂带，纯度较好。

2.3 CE-SDS 鉴别 VP3'

基于上述理论，改造后的 AA5 和 AAV9 的 VP3 *N* 端氨基酸序列变为了含有 2 个 ATG 起始密码子的序列，在 CE 图谱中会出现 VP3' 峰；而改造后的 AAV843 的 VP3 *N* 端氨基酸序列变为了含有 1 个 ATG 起始密码子的序列，在 CE 图谱中 VP3' 峰消失。下面采用 CE-SDS 法鉴别 VP3'。

样品处理：分别取改造前后的 rAAV 样品 (3×10^{12} vp/mL) 10 μL，加至 SDS-MW 样品缓冲液中，加入 1 mol/L 的 DTT 水溶液 2 μL，再加入 1 mg/mL 的荧光染料 P503 甲醇溶液 1 μL，100 ℃孵育 10 min，室温冷却 3 min。

CE-SDS 检测进样前仪器的预运行方法：0.1 mol/L 氢氧化钠溶液，483 kPa (70 psi) 清洗 3 min；0.1 mol/L 盐酸，483 kPa (70 psi) 清洗 3 min；水 483 kPa (70 psi) 冲洗 2 min；运行凝胶缓冲液，483 kPa (70 psi) 冲洗 10 min。

CE-SDS 条件：非涂层毛细管 50 μm×30.2 cm；

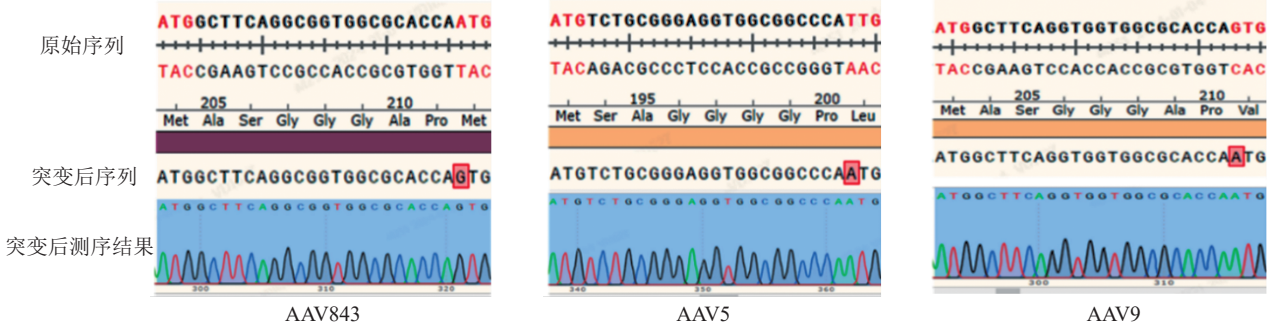
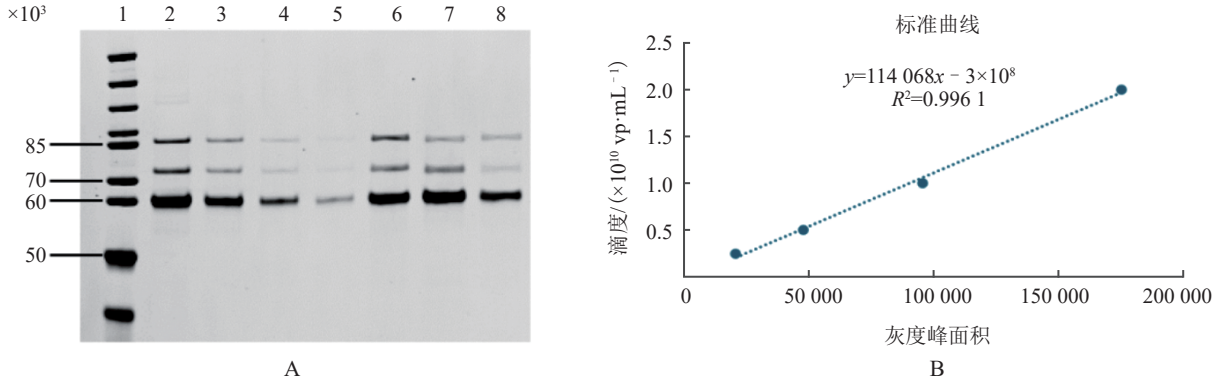


图 1 突变后 Sanger 测序结果

Fig.1 Sanger Sequencing Results after Mutation



A—SDS-PAGE 图谱（条带 1 ～ 8 分别为：标准蛋白、AAV2 衣壳、AAV843 衣壳、AAV5 衣壳、AAV9 衣壳、B07N72 衣壳、B07N73 衣壳和 B07N74 衣壳）；B—由条带 2 ～ 5 显示的灰度峰面积与衣壳滴度拟合所得的标准曲线。

图 2　rAAV 颗粒数的测试结果

Fig.2　Determination Results of rAAV Particles

进样电压 5 kV；进样时间 20 s；分离电压 15 kV；分离时间 30 min；毛细管温度 25 ℃；荧光检测器激发波长 488 nm，发射波长 600 nm。

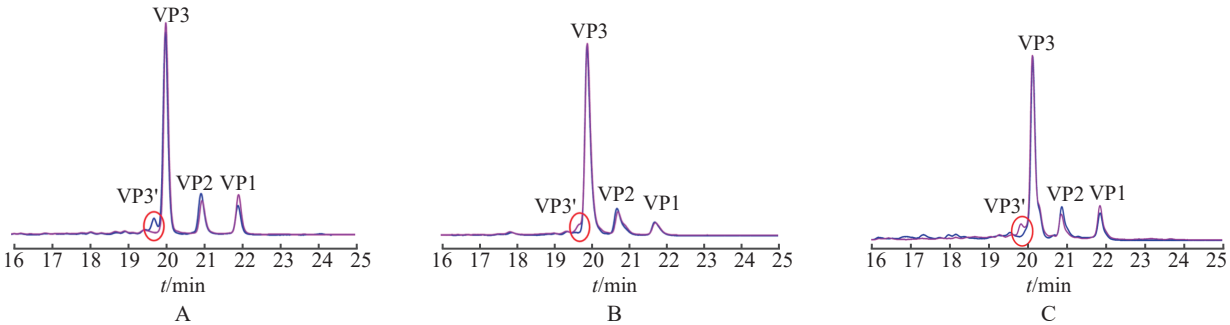
结果如图 3A 所示：改造前，AAV843 外壳亚基由 VP1、VP2、VP3 和 VP3' 4 个主峰组成；改造后，AAV843 外壳亚基由 VP1、VP2 和 VP3 3 个主峰组成，VP3' 峰消失。该结果与理论猜想一致。如图 3B、3C 所示：改造前 AAV5 和 AAV9 衣壳亚基由 VP1、VP2 和 VP3 3 个主峰组成；改造后，AAV5 和 AAV9 衣壳亚基出现 VP3' 峰。该结果与理论推测一致。

2.4　LC-MS 检测 VP3'

为进一步证明 VP3' 的产生是由于第 2 个密码子 ATG 开始翻译形成的，本研究采用 LC-MS 对 AAV843 衣壳蛋白亚基 VP1、VP2、VP3 和 VP3' 的相对分子质量分布和 VP3' *N* 端肽段进行测定。

2.4.1　LC-MS 检测 VP3' 峰的相对分子质量

色谱条件：色谱柱 Acquity BEH C_4 柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm，30 nm）；流动相 A 为 0.1%的二氟乙酸水溶液，B 为 0.1%的二氟乙酸乙腈溶液，梯度洗脱（0—1 min，B 20%—32%；1—17 min，B 32%；17—18 min，B 32%—36%；18—20 min，B 36%；20—21 min，B 36%—80%；21.5 min，B 80%；22—30 min，B 20%）；流速 0.2 mL/min；柱温 80 ℃。



蓝色曲线—突变前；紫红色曲线—突变后。

图 3　AAV843（A）、**AAV5**（B）、**AAV9**（C）**突变前后的 CE-SDS 结果**

Fig.3　CE-SDS Results of AAV843（A）, AAV5（B）, and AAV9（C）before and after Mutation

质谱条件：电离模式电喷雾电离（ESI）正离子模式；检测器 RDa 质量检测器；毛细管电压 1.5 kV；锥形电压 65 V；去溶剂化温度 550 ℃；扫描范围 *m/z* 400 ～ *m/z* 7 000；扫描速率 2 Hz。

利用 Waters_connect 3.3.0 软件中的 MaxEnt1 算法对原始质谱数据进行处理，得到解卷积质量。结果如图 4 所示，检测到相对分子质量为 58 904.11 的 VP3' 峰，比相对分子质量为 59 533.12 的 VP3 峰小 629.01。该相对分子质量差值与 VP3' 和 VP3 的 *N* 端之间相差的“MASGGGAP”8 个氨基酸的相对分子质量之和一致。

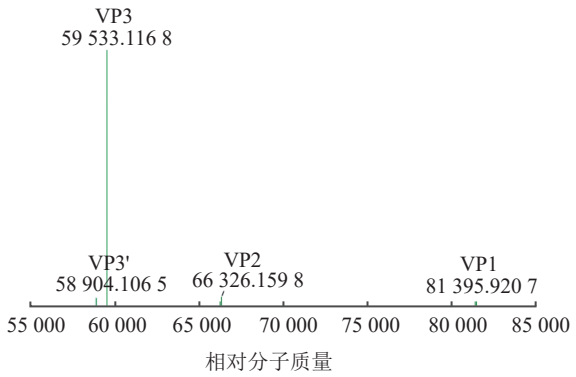


图 4 AAV843 衣壳蛋白亚基的相对分子质量图谱

Fig.4 Molecular Weight Mass Spectrum of AAV843 Capsid Protein Subunits

2.4.2 LC-MS 检测 VP3' *N* 端肽段

色谱条件：色谱柱 Acquity BEH C_4 柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm，30 nm）；流动相 A 为 0.1％的甲酸水溶液，B 为乙腈，梯度洗脱（0—3 min，B 1％；4—47 min，B 15 ％；48—49 min，B 15 ％ —30 ％；50—51 min，B 30 ％ —55 ％；52—64 min，B 55 ％；65—66 min，B 55%—95%；67 min，B 95%；68—70 min，B 95%—1%；71—85 min，B 1%；流速 0.2 mL/min；柱温 80 ℃。

质谱条件：电离模式电喷雾电离（ESI）正离子模式；检测器 RDa 质量检测器；毛细管电压 1.2 kV；锥形电压 20 V；去溶剂化温度 350 ℃；扫描范围 *m/z* 50 ～ *m/z* 2 000；扫描速率 2 Hz。

rAAV 样品经盐酸胍变性、DTT 还原、碘乙酰胺烷基化等处理后，用胰蛋白酶酶解，经色谱柱分离肽段，对 VP3' *N* 端肽段的一级母离子和二级碎片离子进行匹配。结果如图 5 所示，在总离子流色谱图（TIC）中，可观察到 3 个亚基峰。对各峰进行解卷积分析，按出峰顺序依次为 VP1、VP2 和 VP3。

在 VP3 *N* 端肽段二级碎片匹配分析中，检测到 VP3' *N* 端肽段序列为“ADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR”（如图 6A 所示），比 VP3 *N* 端肽段［序列为“ASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR”（如图 6B 所示）］少“ASGGGAPM”8 个氨基酸。以上检测结果均证明在 AAV843 衣壳蛋白表达中产生了由 VP3 *N* 端第 2 个起始密码子编码的 VP3'。

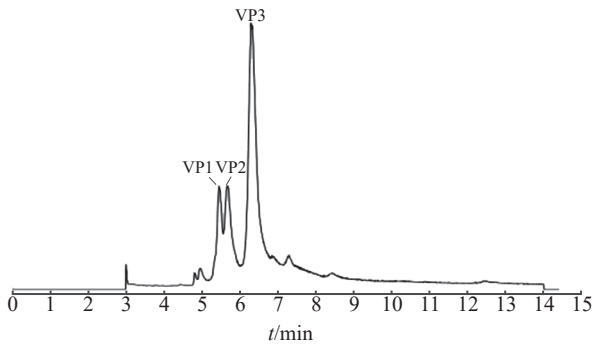


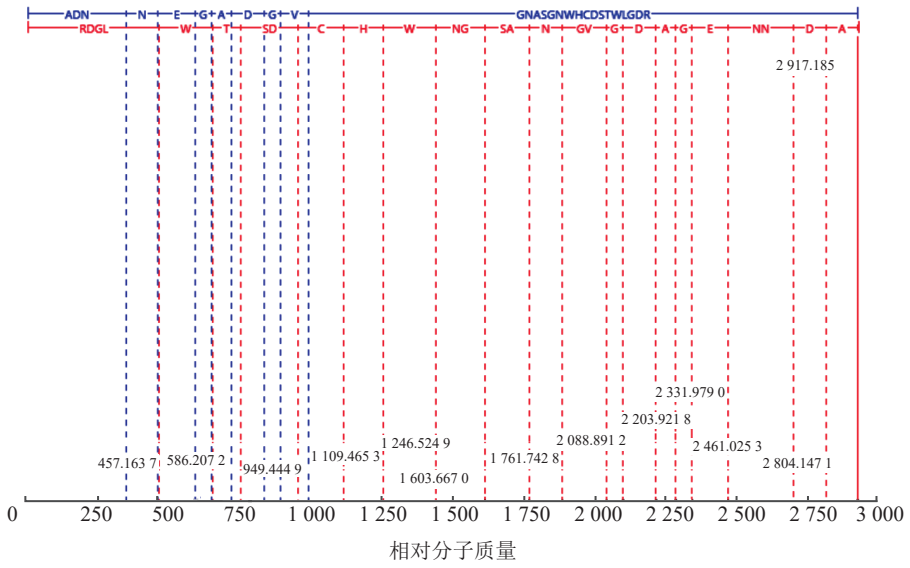
图 5 AAV843 亚基 TIC 色谱图

Fig.5 TIC Chromatogram of AAV843 Subunits

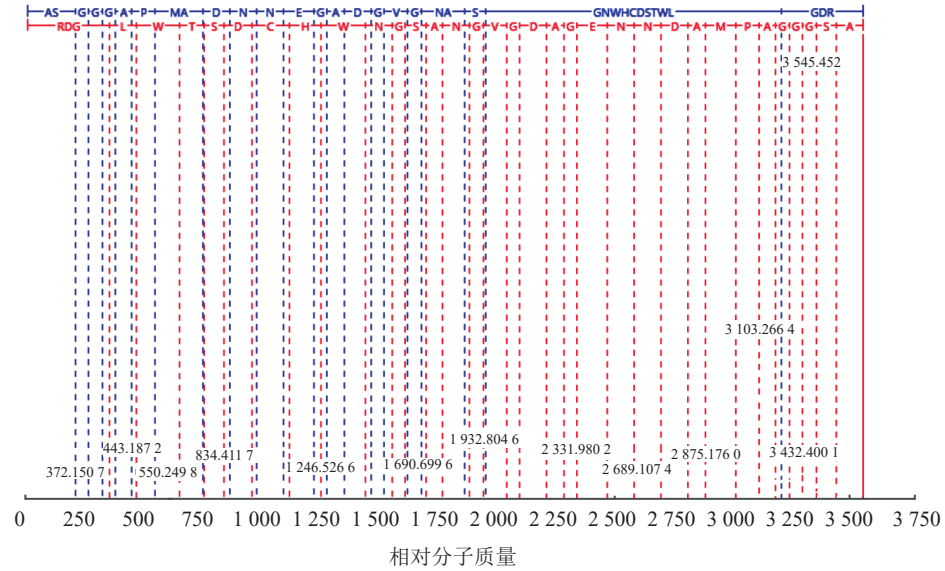
3 结果和讨论

本研究结果表明，AAV843 衣壳蛋白 VP3 亚基的 *N* 端碱基序列中存在 2 个潜在的 ATG 起始密码子，若从第 1 个密码子开始翻译，可形成 VP3，若从第 2 个密码子开始翻译，可形成 VP3'。通过 CE-SDS 技术分析其亚基纯度，所得谱图中显示 4 个亚基峰，按出峰顺序分别为 VP3'、VP3、VP2、VP1。LC-MS 结果验证了 VP3' 的存在且证实 VP3' 比 VP3 减少的相对分子质量与从第 1 个密码子开始翻译和从第 2 个密码子开始翻译之间缺少的 8 个氨基酸的相对分子质量总和保持一致。因此 VP3' 属于衣壳蛋白 VP3 亚基的变体，不是产品的相关杂质。

AAV5 和 AAV9 的 VP3 *N* 端只有 1 个始密码子 ATG（编码氨基酸 M），CE-SDS 图谱中未观察



A



B

图 6　VP3'（A）**和 VP3**（B）**的 *N* 端肽段二级碎片离子匹配图**（蓝色为 *N* 端碎片；红色为 *C* 端碎片）

Fig.6　Ion Matching of Secondary Fragments of *N*-Terminal Peptides of the VP3'（A）and VP3（B）(Blue Represents Fragments of the *N*-Terminal Peptides; Red Represents Fragments of the *C*-Terminal Peptides)

到 VP3' 峰。通过对 AAV5、AAV9 衣壳亚基 VP3 的 *cap* 基因第 1 位 ATG 起始密码子后的第 8 个密码子突变为 ATG 起始密码子，CE 图谱中出现了 VP3' 峰，从而证实了 VP3' 的形成原因。

综上所述，在应用 CE-SDS 法对 VP3 *N* 端氨基酸序列中含有 2 个起始密码子 ATG 的 AVV 进行衣壳蛋白纯度检测时，VP3' 峰属于 VP3 相关峰，而非其他蛋白杂质，亚基纯度分析时应将其作为 AAV 衣壳蛋白的亚基峰来处理。

参考文献：

[1]　DAYA S, BERNS K I. Gene therapy using adeno-associated

virus vectors [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2008, **21**(4): 583-593.

[2] LI C, SAMULSKI R J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy [J]. *Nat Rev Genet*, 2020, **21**(4): 255-272.

[3] 邓洪新, 田 聆, 魏于全. 基因治疗的发展现状、问题和展望 [J]. 生命科学, 2005, **17**(3): 196-199.

[4] 于 雷, 史新昌, 秦 玺, 等. 基因治疗产品质量控制策略及面临挑战 [J]. 中国新药杂志, 2022, **31**(21): 2090-2100.

[5] BALAKRISHNAN B, JAYANDHARAN G R. Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy [J]. *Curr Gene Ther*, 2014, **14**(2): 86-100.

[6] NASO M F, TOMKOWICZ B, PERRY WL 3rd, *et al*. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy [J]. *BioDrugs*, 2017, **31**(4): 317-334.

[7] FU Q, POLANCO A, LEE Y S, *et al*. Critical challenges and advances in recombinant adeno-associated virus (rAAV) biomanufacturing [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2023, **120**(9): 2601-2621.

[8] WRIGHT J F. Quality control testing, characterization and critical quality attributes of adeno-associated virus vectors used for human gene therapy [J]. *Biotechnol J*, 2021, **16**(1): e2000022.

[9] ZHANG Z C, PARK J, BARRETT H, *et al*. Capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate with laser-induced fluorescence detection as a highly sensitive and quality control-friendly method for monitoring adeno-associated virus capsid protein purity [J]. *Hum Gene Ther*, 2021, **32**(11/12): 628-637.

[10] XUE F, LI H Y, WU X, *et al*. Safety and activity of an engineered, liver-tropic adeno-associated virus vector expressing a hyperactive Padua factor Ⅸ administered with prophylactic glucocorticoids in patients with haemophilia B: a single-centre, single-arm, phase 1, pilot trial [J]. *Lancet Haematol*, 2022, **9**(7): e504-e513.

[11] OYAMA H, ISHII K, MARUNO T, *et al*. Characterization of adeno-associated virus capsid proteins with two types of VP3-related components by capillary gel electrophoresis and mass spectrometry [J]. *Hum Gene Ther*, 2021, **32**(21/22): 1403-1416.

[12] ZHANG X M, JIN X Y, LIU L, *et al*. Optimized reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry methods for intact protein analysis and peptide mapping of adeno-associated virus proteins [J]. *Hum Gene Ther*, 2021, **32**(23/24): 1501-1511.

[13] JIN X Y, LIU L, NASS S, *et al*. Direct liquid chromatography/mass spectrometry analysis for complete characterization of recombinant adeno-associated virus capsid proteins [J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2017, **28**(5): 255-267.

[14] SU Q, SENA-ESTEVES M, GAO G P. Analysis of recombinant adeno-associated virus (rAAV) purity using silver-stained SDS-PAG [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020, **2020**(8): 095679.