

使用配备荧光和紫外双重检测器的体积排阻色谱快速测定AAV浓度

Stephan M. Koza, Weibin Chen

Waters Corporation

摘要

研究证明，使用SEC保护柱作为在线装置进行缓冲液交换后再执行内在蛋白荧光检测的方法，能够对AAV8样品中的衣壳含量(Cp/mL)进行有效的快速测定(2 min)，测定范围： 2.6×10^{11} Cp/mL~ 2.0×10^{12} Cp/mL。该方法每次仅使用1 μ L样品作为重复样，且样品前处理工作非常少。利用监测内在蛋白荧光信号的检测器进行浓度测量。根据衣壳DNA含量（空衣壳/完整衣壳(Empty/Full)比）调整FLR响应，该含量使用布置在FLR检测器(SEC-UV-FLR)之前的UV/VIS PDA检测器获得的SEC-A280和SEC-A260峰面积之比估算得出。

优势

- 快速、高通量测定AAV衣壳浓度
 - 测量浓度低至 2×10^{11} 或更低的衣壳
 - 估算AAV ssDNA E/F比的近似值
-

简介

测定基因治疗药腺相关病毒(AAV)制剂中的衣壳浓度在工艺开发和产品质量分析中至关重要。目前通常使用ELISA

方法进行衣壳定量。这些方法非常可靠，但是与色谱法相比，它们可能要花数小时才能得出结果、需要采用经过充分表征的试剂，并且精密度通常较低（定量限水平的CV约20%）^{1,2}。业界还曾提出，在变性条件下使用差示紫外吸收法测定AAV的衣壳蛋白和ssDNA³。该方法通常适用于在短时间内进行高通量检测，但可能需要大量样品（100 μL），并且容易受到干扰发色团的影响。另外，配备紫外吸收检测器的非变性体积排阻色谱法(SEC-UV)也有报道⁴。该方法虽然已被证明能够获得线性校准曲线，但仅适用于ssDNA含量变化很小的样品。

在近期发表的一篇文章中，研究人员使用配备内在蛋白荧光(FLR)检测的阴离子交换色谱法评估了AAV衣壳（不含ssDNA，空衣壳）的相对定量结果⁵。本研究表明，空衣壳的内在蛋白荧光强度与包含必需ssDNA的AAV的相对变化，比280 nm (A280)或260 nm (A260)下观察到的UV吸光度低几倍。这可能使FLR比A280更适合用于AAV定量，因为样品中衣壳的ssDNA含量估算误差对最终浓度测定的影响明显更小。FLR的其他优势包括：对蛋白质组分的选择性比其他样品组分（包括表面活性剂和DNA）高，并且具有更高的灵敏度，能够检测低浓度样品。

AAV作为分析物给UV吸收法和FLR光学检测法带来的两项挑战是，由AAV粒径引起的光散射效应，以及可能对UV吸光度和FLR量子产率产生的影响。因此，当AAV样品中的其他溶液成分保持恒定时，即可有效测定完整AAV的经验UV吸光度和FLR响应。此外，应尽量减少样品中粒径接近或超过所用紫外线波长的颗粒物含量。传统的光学方法通常使用0.2 μm及更小的过滤器，在执行光谱分析之前进一步纯化样品来实现这一目的⁶。

本文介绍一种快速的SEC方法(2 min)，该方法采用FLR检测器测定AAV衣壳浓度(Cp/mL)。SEC方法提供了一种稳定一致的解决方案，可以对分析物进行光学测量，并且可以除去样品中的其他干扰组分。该方法可根据由单独分析（例如阴离子交换色谱法）测得的样品中衣壳的ssDNA含量对FLR信号响应进行校正([720006825ZH](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006825ZH) <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006825en.pdf>>)。或者，如本研究所示，可根据布置在FLR检测器之前的串联UV/VIS PDA检测器(SEC-UV-FLR)在260 nm和280 nm下测得的峰面积，用紫外吸光度之比(A260/A280)估算ssDNA含量。

实验

样品前处理

将不含ssDNA (AAV8-Empty)或带有绿色荧光蛋白基因(AAV8-CMV-GFP)的AAV8衣壳直接注入SEC色谱柱。估计AAV8-Null和AAV8-CMV-GFP样品的浓度分别为大约 1.67×10^{12} 和 2.48×10^{12} 衣壳/mL (Cp/mL)。

液相色谱条件

系统:	ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio
检测条件:	荧光检测器: 激发波长: 280 nm, 发射波长: 350 nm (10个数据点/秒); 配备5 mm钛合金流通池的ACQUITY UPLC PDA检测器, 280 nm和260 nm (10个数据点/秒)
样品瓶:	聚丙烯12 × 32 mm螺纹口样品瓶, 带瓶盖和预切割PTFE/硅胶隔垫, 容积300 μL, 100个/包 (部件号: 186002639)
保护柱:	ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱, 125 Å, 1.7 μm, 4.6 × 30 mm (部件号: 186006504)
柱温:	25 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	1.0 μL
流速:	0.20 mL/min
流动相:	10 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 6.6 (HCl), 200 mM KCl, pH 6.6 (HCl), 经0.1 μm无菌过滤

数据管理

色谱软件:	Empower 3
-------	-----------

结果与讨论

本研究旨在开发一种能够快速测定AAV样品中衣壳含量的色谱方法，该方法只需进行简单的样品前处理，消耗少量样品，并能提供符合实际的定量下限。本文所述的SEC-UV-FLR方法采用BEH SEC蛋白分析专用保护柱进行分离。这款短柱床色谱柱(30 mm)填充有直径1.7 μm 、平均孔径125 \AA 的二醇基键合的BEH颗粒。利用SEC色谱柱进行缓冲液交换，使AAV衣壳交换到流动相中，选择柱长较短的色谱柱，使AAV从大部分孔体积中排除，尽量降低AAV的分散度。但是，如果AAV样品还包含大量可能与AAV共流出的干扰物质（例如，蛋白质、DNA），则可能需要采用具有更大孔径且更长的色谱柱。本研究将紫外吸收检测器(UV)与荧光检测器(FLR)串联使用。由于FLR的反压限值更低，因此将其布置在UV之后。

根据供应商报告的ELISA测量结果，将AAV8-Null（不含ssDNA）对照样品（以下称为“AAV-Empty”）的浓度指定为 1.67×10^{12} 衣壳/mL (Cp/mL)，通过电子显微镜测得的包含DNA的衣壳含量为约0.5%，通过电荷检测质谱法(CDMS)测得的含量为1.5%。使用50:50等体积AAV-Empty和AAV-Full样品混合物测得CDMS谱图，根据二者的相对峰面积，估计AAV8-CMV-GFP样品(AAV-Full)的浓度为 2.48×10^{12} Cp/mL。CDMS分析结果表明，AAV-Full样品包含2.2%的空衣壳。使用AAV-Empty样品对AAV-Full样品进行连续稀释，生成一组混合物，其中AAV-Full的摩尔分数(X_{Full})和衣壳浓度如表1所示。混合物的预测 X_{Full} 值也优于通过CDMS观察到的结果，采用强制通过原点的线性拟合（数据未显示）所得到的相关系数为0.996，斜率为1.008。请注意，虽然使用这些相对浓度值足以证明该方法的原理，但在需要更高的方法准确度时，应考虑对AAV-Empty和AAV-Full标准品的衣壳浓度进行更严格的评估。

稀释比例 (完整衣壳:空衣壳)	预测 X_{Full}	衣壳浓度 (Cp/mL)	相对衣壳浓度
100:0	0.9788	2.40E+12	1.00
87.5:12.5	0.8916	2.31E+12	0.963
75:25	0.7972	2.22E+12	0.925
50:50	0.5832	2.04E+12	0.850
25:75	0.327	1.85E+12	0.771
0:100	0.0148	1.67E+12	0.696

利用一组AAV-Full和AAV-Empty样品系列稀释液，一式两份，测定SEC FLR以及260 nm和280 nm波长下的SEC-UV（SEC-A260和SEC-A280）峰面积。从代表性色谱图的叠加图可以看出（图1），随着AAV8的 X_{Full} 从1变为0，

FLR信号响应的变化明显小于UV吸光度变化。这种差异主要是由于完整衣壳内的DNA在260 nm下具有强烈的UV吸收。然后将峰面积除以各自的相对浓度，将混合物的SEC-FLR和SEC-UV峰面积根据浓度进行归一化（表1）。将归一化后的峰面积对 X_{Full} 作图（图2）。根据图2所示的拟合线性方程式，推断 X_{Full} 值为1和0时（ $Area_{X_{Full}=1}$ 和 $Area_{X_{Full}=0}$ ）的预测峰面积，并使用下面的公式1计算AAV8-Full与AAV8-Empty的响应因子($R_{F/E}$): A260 ($R_{F/E, 260}$)为6.81, A280 ($R_{F/E, 280}$)为2.98, FLR ($R_{F/E, FLR}$)为0.875。预期 $R_{F/E, 260}$ 、 $R_{F/E, 280}$ 和 $R_{F/E, FLR}$ 的值会随ssDNA的组成而变化，随AAV血清型的变化较小。

公式1.

$$R_{F/E} = \frac{Area_{X_{Full}=1}}{Area_{X_{Full}=0}}$$

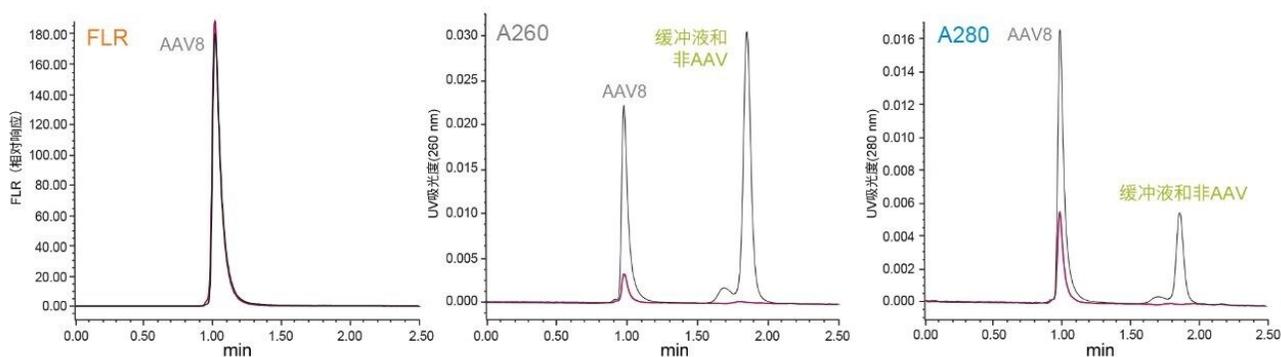


图1.一系列AAV8样品的SEC荧光和UV吸光度响应比较，其中AAV8-Full的摩尔分数在大约1.0（黑色）至0.0（红色）的范围内。实验步骤见正文。

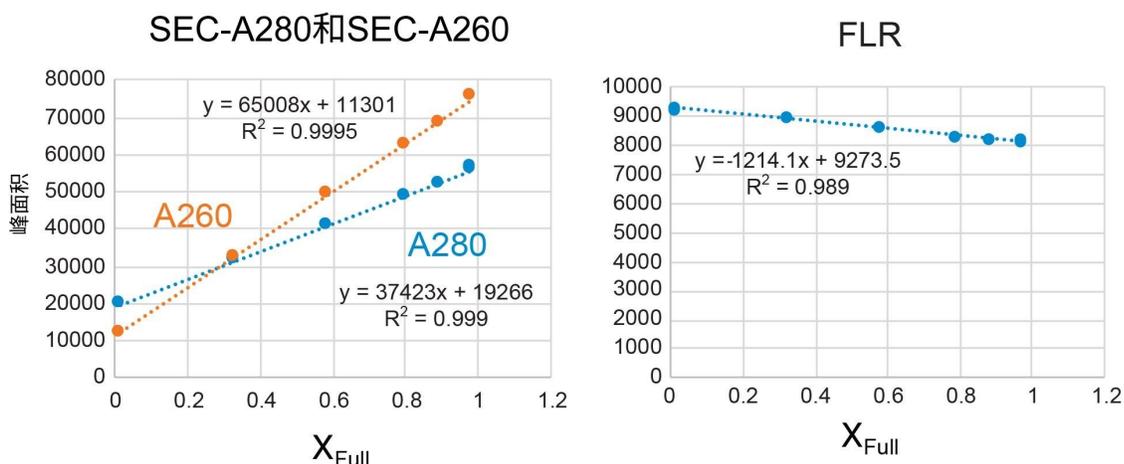


图2.一系列AAV8样品($n = 2$)的SEC-UV (280 nm和260 nm) 和SEC-FLR峰面积变化, 其中AAV8-Full的摩尔分数(X_{Full})在大约1.0至0.0的范围内。峰面积根据样品浓度(C_p/mL)进行归一化。实验步骤见正文。

在常规应用中, 可以使用两个AAV-Full和AAV-Empty对照样品 (已经测得 C_p/mL 和 X_{Full} 值) 的峰面积直接计算 $Area_{X_{Full} = 1}$ 和 $Area_{X_{Full} = 0}$ 的值。另外, 由于 $R_{F/E, FLR}$ 的值相对于 $R_{F/E, 280}$ 和 $R_{F/E, 260}$ 更接近1, 因此在SEC-FLR衣壳浓度估算 (其中样品的 X_{Full} 变化不大或可接受精密度不太高的衣壳浓度测定结果) 中, 可能不必校正FLR响应。

为应用 $R_{F/E}$, 我们需要知道样品的 X_{Full} 值($X_{Full, Sample}$)。 $X_{Full, Sample}$ 可以通过电子显微镜或阴离子交换色谱等方法进行测定⁵, 也可以在SEC-UV-FLR或SEC-UV实验中使用SEC-A260和SEC-A280峰面积之比($Area_{A260}/Area_{A280}$)得到所评估样品的 X_{Full} 近似值。基于紫外吸光度的 $X_{Full, Sample}$ 估算值取决于所使用的标准品, 由于吸光度值可能随缓冲液组成的变化而发生明显偏离, 因此需要确保在严格控制的实验条件下进行测定。

本研究将光电二极管阵列(PDA) UV-VIS检测器与FLR检测器串联使用。FLR检测器流通池通常无法承受较高的反压, 一般布置在UV检测器之后。通过这种方式测定A260/A280 UV吸光度比值的优势在于, 无需使用额外的样品, 并且样品中任何潜在的干扰发色团或荧光团, 只要与AAV衣壳存在尺寸差异, 都可以通过SEC色谱柱得到分离。在该SEC-UV-FLR方法中, PDA检测器的性能表现优于双波长可变UV-VIS检测器(TUV), 因为在观察到的给定峰宽 (约12 s) 下, 其采样速率明显更高。如果使用更长的SEC色谱柱或降低流速, 则可以使用TUV检测器, 前提是在峰上采集大约40个或更多数据点。

样品混合物的实测峰面积比与AAV8的 X_{Full} 之间的关系表现为非线性响应曲线 (图3)。样品混合物的预测峰面积比在图3中用虚线表示, 并且可用以下关系式计算:

公式2.

$$\frac{\text{Area}_{A260, \text{Sample}}}{\text{Area}_{A280, \text{Sample}}} = \frac{X_{\text{Empty, Sample}} * \text{Area}_{A260, X_{\text{Full}}=0} + X_{\text{Full, Sample}} * \text{Area}_{A260, X_{\text{Full}}=1}}{X_{\text{Empty, Sample}} * \text{Area}_{A280, X_{\text{Full}}=0} + X_{\text{Full, Sample}} * \text{Area}_{A280, X_{\text{Full}}=1}}$$

其中： $X_{\text{Empty, Sample}}$ 和 $X_{\text{Full, Sample}}$ 分别为样品中AAV-Empty和AAV-Full的摩尔分数。 $\text{Area}_{A260, X_{\text{Full}}=0}$ 、 $\text{Area}_{A260, X_{\text{Full}}=1}$ 、 $\text{Area}_{A280, X_{\text{Full}}=0}$ 和 $\text{Area}_{A280, X_{\text{Full}}=1}$ 根据图2所示SEC-A280和SEC-A260的拟合线性方程式外推得到，如前所述。

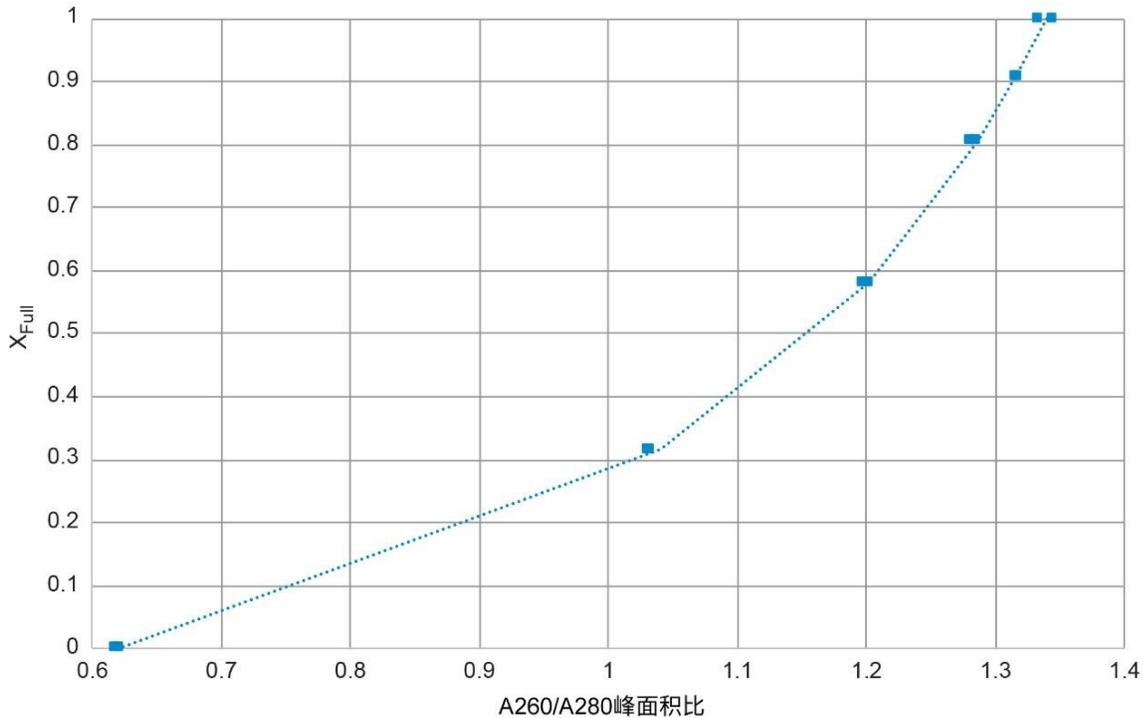


图3.一系列AAV8样品的SEC 260 nm和280 nm UV吸光度峰面积之比($n = 2$)的变化，其中AAV8-Full的摩尔分数(X_{Full})在大约1.0至0.0的范围内。虚线突出显示了预测的A260/A280比率。实验步骤见正文。

。为使用试样的实测SEC-UV峰面积比($\text{Area}_{A260, \text{Sample}}/\text{Area}_{A280, \text{Sample}}$)测定样品的 X_{Full} ，可以将公式2中的关系重

新排列，得到公式3。对于那些对数学细节感兴趣的读者，简化形式的公式3是 $X_{Full, Sample}$ 与 $(Area_{A260, Sample} / Area_{A280, Sample})$ 之间的形式为 $y = a/x + bx + c$ 方程的渐近非线性回归结果。

公式3.

$$X_{Full, Sample} = \frac{Area_{A260, X_{Full}=0} - \left(\frac{Area_{A260, Sample}}{Area_{A280, Sample}} \right) * Area_{A280, X_{Full}=0}}{Area_{A260, X_{Full}=0} - Area_{A260, X_{Full}=1} - \left(\frac{Area_{A260, Sample}}{Area_{A280, Sample}} \right) * Area_{A280, X_{Full}=0} + \left(\frac{Area_{A260, Sample}}{Area_{A280, Sample}} \right) * Area_{A280, X_{Full}=1}}$$

公式3与所测AAV样品的浓度无关。此外，利用液相色谱系统测得 $Area_{A260, X_{Full}=0}$ 、 $Area_{A260, X_{Full}=1}$ 、 $Area_{A280, X_{Full}=0}$ 且 $Area_{A280, X_{Full}=1}$ 后，可以在更多测量中将其视为常数。根据 $Area_{A260, Sample} / Area_{A280, Sample}$ 的实测值和公式3计算得出的 $X_{Full, Sample}$ 值与预测值高度相关 ($R^2 = 0.9995$ ，斜率 = 0.991，截距 = 0.000，未显示相关关系图)。对该方法进行额外评估，还发现实测值与通过CDMS测得的值之间存在良好的相关性 (图4)。这些结果表明，该方法测量 $X_{Full, Sample}$ 的精密度和准确度对于估算FLR和UV响应因子是可接受的，甚至足以估算空衣壳丰度相对较高的的工艺中间样品的 $X_{Full, Sample}$ 。但是，由于 X_{Full} 接近1时响应曲线的斜率较大 (图3)，因此该方法在测定高纯度样品的 $X_{Full, Sample}$ 时，精密度和准确度可能会下降。

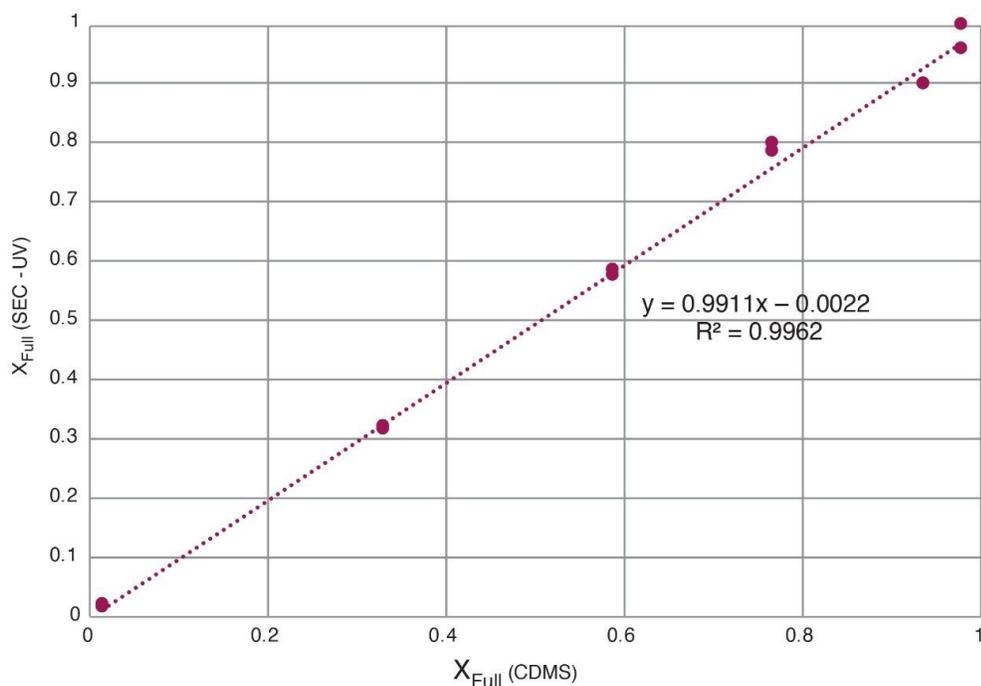


图4. SEC 260 nm和280 nm UV吸光度峰面积比($n = 2$)方法和CDMS方法测定一系列AAV8样品的AAV8-Full摩尔分数(X_{Full})的相关性。实验步骤见正文。

测得 $X_{Full, Sample}$ 后，即可将其与 $R_{F/E}$ （公式1）一起使用，对样品或标准品的SEC-FLR或SEC-UV峰面积进行归一化($Area_{Sample, Norm}$)，以解决空衣壳与完整衣壳之间的响应差异。同样，该峰面积归一化也可以用于浓度校准标样。在本例中，任意选择将峰面积归一化至 $X_{Full, Sample}$ 为1时的预测值。为导出归一化公式，可以将试样（或标准品）峰面积($Area_{Sample, Meas}$)定义为完整衣壳和空衣壳（ $Area_{Sample, X_{Full} = 1}$ ， $Area_{Sample, X_{Full} = 0}$ ）的最大峰面积与各自摩尔分数乘积的总和。

公式4.

$$Area_{Sample, Meas} = Area_{Sample, X_{Full} = 1} * X_{Full, Sample} + Area_{X_{Full, Sample} = 0} * X_{Empty, Sample}$$

通过代入公式1和关系式 $X_{Full, Sample} + X_{Empty, Sample} = 1$ ，公式4可以重新排列得到公式5，用于根据 X_{Full} 的实测值

对样品或标准品的响应进行归一化。

公式5.

$$Area_{Sample, Norm} = \frac{Area_{Sample, Meas}}{\left(X_{Full, Sample} + \frac{(1 - X_{Full, Sample})}{R_{F/E}} \right)}$$

在对上述方法的初步测试中，评估了表1所述的样品数据集。本例中评估了系列稀释样品的A280 UV吸光度和FLR峰面积数据，但未针对已知的浓度差异进行归一化，其目的在于确定该方法是否能够预测系列稀释样品的Cp/mL值。本研究使用 X_{Full} 值分别为0.0148和0.9788，浓度分别为 1.67×10^{12} Cp/mL和2.48 Cp/mL的两个未稀释样品（表1），通过公式3和5校正响应因子，并采用SEC-A280和SEC-FLR定义浓度校准曲线。

然后将测得的样品浓度与预测值进行比较（图5）。与采用SEC-A280观察到的结果相比，SEC-FLR数据结果的相关性更高，曲线斜率更接近1。此外，尽管实际的SEC-A280峰面积变异（平均差异0.43%）低于SEC-FLR峰面积变异（平均差异0.63%），但SEC-FLR方法的浓度重复测定结果变异（平均差异0.67%）低于SEC-A280浓度测定结果之间的变异（平均差异1.27%）。由于SEC-FLR和SEC-A280计算中使用的 X_{Full} 值相同，因此，SEC-FLR方法的结果精密度更高主要是因为 $R_{F/E, FLR}$ 值(0.898)比 $R_{F/E, A280}$ 值(2.98)更接近1，响应因子更接近1则意味着对 X_{Full} 测定结果变异的影响更小。如前所述，在这些结果中还可以观察到，测定空衣壳含量较低的样品的 X_{Full} 时，较大的变异还会带来额外影响。

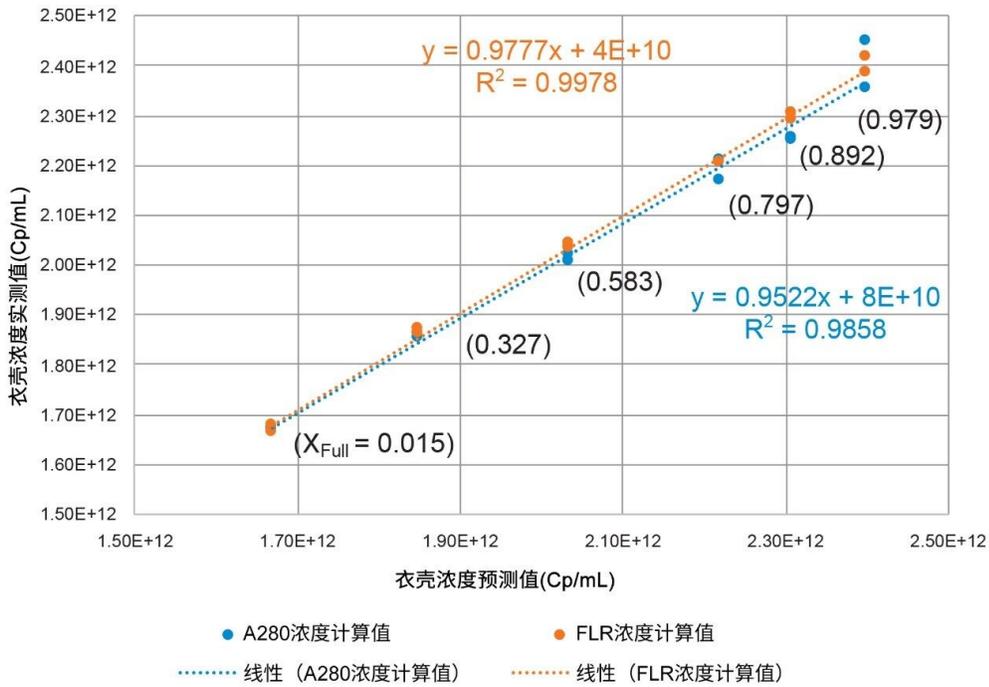


图5.衣壳浓度测定结果比较：SEC-FLR-UV和SEC-UV。两种方法均根据由在线UV A260和A280测量值计算得出的 X_{Full} ，通过响应因子对测定的浓度进行校正，如正文所述。衣壳浓度的范围大约在 1.7×10^{12} Cp/mL~ 2.4×10^{12} Cp/mL之间，样品的 X_{Full} 值（见括号内）大约在0~1的范围内。实验步骤见正文。

为评估扩展浓度响应曲线，将 X_{Full} 值为约0.55且估计浓度为 2.07×10^{12} Cp/mL的样品连续稀释，得到浓度分别为 1.04×10^{12} 、 5.19×10^{11} 和 2.59×10^{11} Cp/mL的样品。利用同时搭载在线FLR和UV检测器的液相色谱系统(SEC-UV-FLR)分析这些样品。最低浓度样品(2.59×10^{11} Cp/mL)的UV吸光度(260 nm和280 nm)和FLR色谱图比较见图6。从图中可以看出，与UV吸收通道相比，采用FLR检测器的所有三个光学通道都观察到强烈的信号，信噪比明显更高(约10倍)，表明FLR的定量限可能更低。

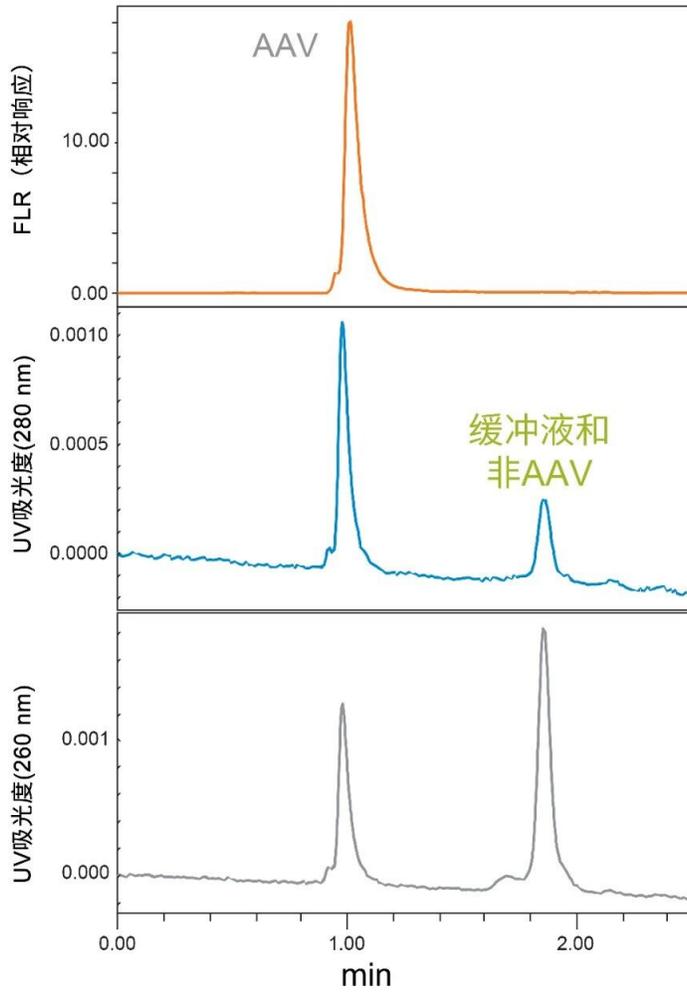


图6.衣壳浓度近似 2.59×10^{11} Cp/mL的一系列AAV8样品的SEC UV吸光度响应比较。实验步骤见正文。

图7为SEC-FLR和SEC-A280峰面积的FLR响应曲线，这些曲线已经过各自的响应因子（ $R_{E/F, FLR}$ 和 $R_{E/F, A280}$ ）完成归一化。虽然预期稀释后的样品会具有等效的 X_{Full} 值，但仍进行了校正，以考察SEC-UV-FLR和SEC-UV方法的重现性。在SEC-FLR和SEC-A280校准曲线中均观察到有用的线性拟合，相关系数分别为0.9985和0.9989。这些结果表明，当AAV样品中的空衣壳含量较高且更一致时，SEC-A280方法结合 X_{Full} 响应校正可提供与SEC-FLR方法相当的分析性能。

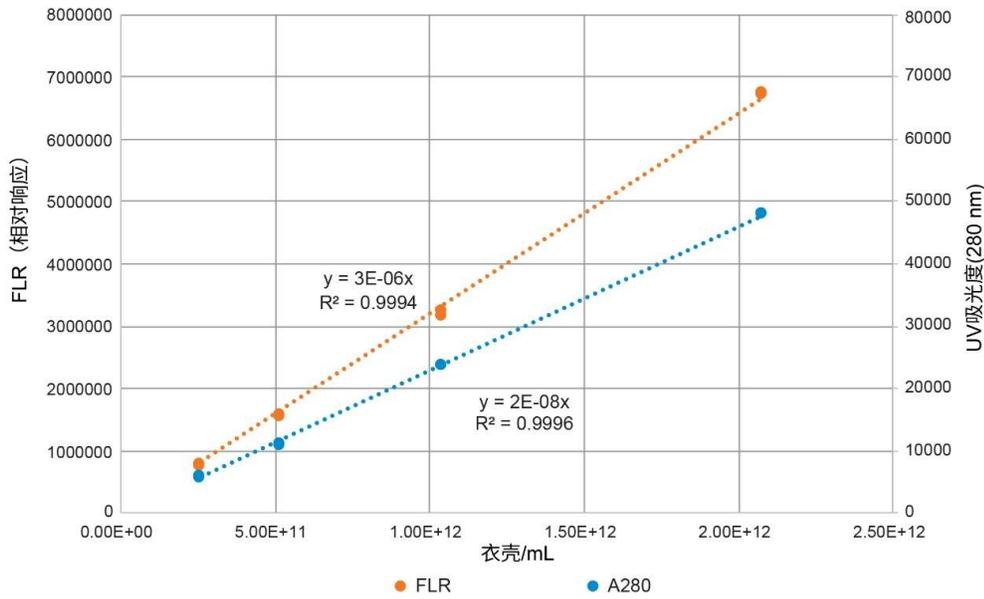


图7.根据由在线UV A260和A280测量值计算得出的 X_{Full} ，通过响应因子校正的SEC-FLR-UV和SEC-UV峰面积变化，如正文所述。衣壳浓度的范围大约在 2×10^{11} Cp/mL~ 1.6×10^{12} Cp/mL之间。实验步骤见正文。

结论

研究证明，使用高效填充的SEC保护柱作为在线装置进行缓冲液交换后再执行内在蛋白荧光检测，能够对AAV8样品中的衣壳含量(Cp/mL)进行有效的快速测定，测定范围： 2.6×10^{11} Cp/mL~ 2.0×10^{12} Cp/mL。本研究提出的方法每次仅使用1 μ L样品作为重复样，且样品前处理工作非常少。不过，如果样品中具有较高含量的可见或不可见颗粒，建议采用离心步骤。

监测内在蛋白荧光（色氨酸）的FLR检测器相对于UV吸收检测器具有优势。比如，对于AAV8样品，与UV吸收检测器在280 nm ($R_{F/E, A280} = 2.98$)和260 nm ($R_{F/E, A260} = 6.81$)下测得的响应因子相比，FLR检测器的空衣壳/完整衣壳响应因子更接近1。因此，FLR检测较少依赖精密且准确地测定含DNA的衣壳的摩尔分数(X_{Full})。此外，内在蛋白荧光检测的信噪比约为UV方法的10倍，是一种选择性更高的蛋白检测方法，对样品中的游离DNA或RNA不敏感。

含DNA的衣壳含量 X_{Full} 可通过其他分析（例如，阴离子交换色谱法）测定，也可以使用布置在FLR检测器之前的UV/VIS PDA检测器(SEC-UV-FLR)，根据SEC-A280和SEC-A260峰面积之比进行经验估算。另外，如果所用SEC方法产生的峰宽较大，可使用TUV检测器代替UV/VIS PDA检测器，本研究未展示。

利用经纯化的样品证明该方法的一般原理。不过，如果所分析的样品包含与AAV共流出的大分子干扰荧光团（例如蛋白质），可能有必要使用更大孔径的SEC颗粒以及更长的SEC色谱柱，或者降低流速，以获得更出色的分离度。另外，当采用SEC-A260和SEC-A280峰面积测定 X_{Full} 时，如果干扰发色团（例如蛋白质、RNA或DNA）的含量高至足以显著影响衣壳ssDNA含量测定，也可能需要将这些发色团与AAV分离。另外，还可以将填充有大粒径颗粒（2.5 μm 或3.5 μm ）的大直径（内径7.8 mm）色谱柱用于HPLC系统，本文未展示。大粒径色谱柱不易被样品颗粒物污染，不过，为获得相似的灵敏度，需要按比例增加样品量(3 μL)，可能导致样品通量下降。

致谢

本文作者诚挚感谢Megadalton Solutions的Benjamin Draper为本研究提供CDMS分析。

参考资料

1. Werling, N. J.; Satkunanathan, S.; Thorpe, R.; Zhao, Y. Systematic Comparison and Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for the Quantitation of Adeno-Associated Viral Products. *Human Gene Therapy Methods* 2015, 26 (3), 82–92.
2. Andreasson, U.; Perret-Liaudet, A.; van Waalwijk van Doorn, L. J.; Blennow, K.; Chiasserini, D.; Engelborghs, S.; Fladby, T.; Genc, S.; Kruse, N.; Kuiperij, H. B.; Kulic, L.; Lewczuk, P.; Mollenhauer, B.; Mroczko, B.; Parnetti, L.; Vanmechelen, E.; Verbeek, M. M.; Winblad, B.; Zetterberg, H.; Koel-Simmelink, M.; Teunissen, C. E., A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Frontiers in Neurology* 2015, 6, 179.
3. Sommer, J. M.; Smith, P. H.; Parthasarathy, S.; Isaacs, J.; Vijay, S.; Kieran, J.; Powell, S. K.; McClelland, A.; Wright, J. F. Quantification of Adeno-Associated Virus Particles and Empty Capsids by Optical Density Measurement. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 2003, 7 (1), 122–8.

4. Runnels, H. Gene Therapy and AAV: Advancing Analytical Characterization to Improve Product Understanding, Control and Comparability Exercises.CMC Strategy Forum 2017.
5. Wang, C.; Mulagapati, S. H. R.; Chen, Z.; Du, J.; Zhao, X.; Xi, G.; Chen, L.; Linke, T.; Gao, C.; Schmelzer, A. E.; Liu, D. Developing an Anion Exchange Chromatography Assay for Determining Empty and Full Capsid Contents in AAV6.2. *Molecular Therapy.Methods & Clinical Development* 2019, 15, 257–263.
6. Noble, J. E. Quantification of Protein Concentration Using UV Absorbance and Coomassie Dyes. *Methods in Enzymology* 2014, 536, 17–26.

特色产品

[ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <https://www.waters.com/10166246>](https://www.waters.com/10166246)

[ACQUITY UPLC FLR检测器 <https://www.waters.com/514222>](https://www.waters.com/514222)

[ACQUITY UPLC PDA检测器 <https://www.waters.com/514225>](https://www.waters.com/514225)

[Empower色谱数据系统 <https://www.waters.com/513188>](https://www.waters.com/513188)

720006867ZH, 2021年1月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)