

# 毛细管电泳法对宫颈癌疫苗HPV纯度和等电点的分析

## Analysis of purity and isoelectric points of HPV by capillary electrophoresis

王文涛, 陈泓序, 高铁, 任挺钧, 徐玲丽

Wang Wentao, Chen Hongxu, Gao Tie, Ren Tingjun, Xu Lingli

SCIEX, 中国

SCIEX, China

**Keywords:** HPV; purity; isoelectric points; capillary electrophoresis;

### 1. 前言

宫颈癌疫苗 (HPV) 由称为类病毒颗粒 (VLP) 的空蛋白质壳制备而成, HPV双价疫苗和四价疫苗已广泛使用, 最近在几个国家已经批准使用九价HPV疫苗。随着HPV疫苗的市场化, 其性能鉴定对于患者的健康至关重要。一般来说, 一批新疫苗在推向市场之前, 其异质性、杂质含量和活性等都应该进行彻底的探讨。目前用于HPV疫苗分析的技术有十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、蛋白质印迹法 (Western blot)、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 等方法, 但这些方法都是半定量的, 比较费时。毛细管电泳 (CE) 以其自动化程度高、定量准确和高速高效等特点, 有效地取代了传统的SDS-PAGE方法, 被广泛应用于生物制药领域进行生物制品的质量控制。

SCIEX依托强大的研发实力和其高效的毛细管电泳平台, 创新研发了基于分子量差异分析的SDS-MW分子量分析的试剂盒 (SCIEX, PN.390953) 以及基于等电点差异分析的cIEF试剂盒 (SCIEX, PN. A80976), 在单一平台上可以实现对疫苗的纯度和等电点分析。本文展示了采用SDS-MW分析试剂盒和cIEF分析试剂盒方法对HPV纯度和等电点的分析。

### 2. 试剂和耗材

#### 2.1 实验仪器

本实验采用的仪器为PA 800 Plus药物分析系统 (SCIEX, PN. A66527), HPV疫苗纯度分析需用PDA检测器, 检测波长220 nm,

数据采集频率为4 Hz, 样品储藏温度和毛细管温度分别为20 °C和25 °C; HPV等电点的分析需用UV检测器 (PN. 144733), 配备280 nm滤光片 (PN. 144439), 数据采集频率为2 Hz, 样品储藏温度和毛细管温度分别为10 °C和20 °C。

#### 2.2 实验试剂

##### 2.2.1 HPV纯度鉴定所需试剂及耗材

SCIEX SDS-MW试剂盒包含内容详见表1。

表1. SDS-MW试剂盒包含的内容。

货号	项目
338451	50 µm ID Capillary
A30341	SDS Gel Buffer
A26487	10 kD Marker
A22196	MW Marker
	SDS Sample Buffer
	0.1 N NaOH
	0.1 N HCl

其他试剂和耗材: 2-巯基乙醇 (Sigma-Aldrich, PN. M7154)、水浴锅 (37 °C-100 °C) 或加热模块、Centricon YM-10超滤管 (Millipore, PN. 4205)、封口膜、超声震荡器、涡旋仪、移液器和枪头、微量离心管、离心管、通用瓶及瓶盖、200 µL样品管、去离子水 (Millipore)。

##### 2.2.2 等电点测定所需试剂及耗材

SCIEX cIEF试剂盒 (PN. A80976) 包含内容详见表2。

表2. cIEF试剂盒包含的内容。

货号	成分
477441	中性涂层毛细管, 50 μm ID × 45 cm
477497	cIEF Gel (Polymer solution)
A58481 <sup>a</sup>	cIEF Peptide Marker, pI 10.0
A58481 <sup>a</sup>	cIEF Peptide Marker, pI 9.5
A58481 <sup>a</sup>	cIEF Peptide Marker, pI 7.0
A58481 <sup>a</sup>	cIEF Peptide Marker, pI 5.5
A58481 <sup>a</sup>	cIEF Peptide Marker, pI 4.1
477427	eCap 50 mM Tris buffer at pH 8.0

其他试剂和耗材：精氨酸（Sigma-Aldrich, PN. A5006）、尿素（Sigma-Aldrich, PN. U0631）、亚氨基二乙酸（Sigma-Aldrich, PN. 220000）、Pharmalyte 3-10 carrier ampholytes（CE Healthcare,

PN. 17-0456-01）、冰醋酸（Sigma-Aldrich, PN. 537020）、磷酸（85%）（Sigma-Aldrich, PN. 345245）、氢氧化钠（1 M）（Sigma-Aldrich, PN. 72082），移液器和枪头、涡旋混合器、微量离心机、去离子水、分析天平、5 μm孔径滤膜、0.25 μm孔径滤膜、一次性注射器、一次性10 mL和50 mL塑料管、10 mL和50 mL容量瓶、0.5 mL离心管、通用瓶（PN. A62251）、瓶盖（PN. A62250）、微量样品管（PN. 144709）

## 2.3 样品处理方法

### 2.3.1 HPV纯度分析样品处理方法

用样品缓冲液溶解稀释样品，使HPV样品的终浓度在0.2-2 mg/mL之间，总体积为95 μL。加入2 μL内标，5 μL巯基乙醇溶液，盖好瓶盖，用封口膜封好，并充分混合，100 °C水浴中加热3 min，室温冷却5 min，准备进样。

缓冲液托盘的放置按照图1所示，分析方法包括毛细管预平衡、分离以及关机，具体参数设置详见图2-4。

H <sub>2</sub> O (Cycle 17-24)	H <sub>2</sub> O (Cycle 17-24)				
H <sub>2</sub> O (Cycle 9-16)	H <sub>2</sub> O (Cycle 9-16)				
H <sub>2</sub> O (Cycle 1-8)	H <sub>2</sub> O (Cycle 1-8)				
H <sub>2</sub> O (Cycle 17-24)	Gel-R (Cycle 17-24)	Gel-S (Cycle 17-24)	NaOH (Cycle 17-24)	HCl (Cycle 17-24)	H <sub>2</sub> O (Cycle 17-24)
H <sub>2</sub> O (Cycle 9-16)	Gel-R (Cycle 9-16)	Gel-S (Cycle 9-16)	NaOH (Cycle 9-16)	HCl (Cycle 9-16)	H <sub>2</sub> O (Cycle 9-16)
H <sub>2</sub> O (Cycle 1-8)	Gel-R (Cycle 1-8)	Gel-S (Cycle 1-8)	NaOH (Cycle 1-8)	HCl (Cycle 1-8)	H <sub>2</sub> O (Cycle 1-8)
A	B	C	D	E	F

入口托盘

H <sub>2</sub> O (Cycle 17-24)	H <sub>2</sub> O (Cycle 17-24)				
H <sub>2</sub> O (Cycle 9-16)	H <sub>2</sub> O (Cycle 9-16)				
H <sub>2</sub> O (Cycle 1-8)	H <sub>2</sub> O (Cycle 1-8)				
H <sub>2</sub> O (Cycle 17-24)	Waste (Cycle 17-24)	Gel-S (Cycle 17-24)	Waste (Cycle 17-24)	Waste (Cycle 17-24)	Waste (Cycle 17-24)
H <sub>2</sub> O (Cycle 9-16)	Waste (Cycle 9-16)	Gel-S (Cycle 9-16)	Waste (Cycle 9-16)	Waste (Cycle 9-16)	Waste (Cycle 9-16)
H <sub>2</sub> O (Cycle 1-8)	Waste (Cycle 1-8)	Gel-S (Cycle 1-8)	Waste (Cycle 1-8)	Waste (Cycle 1-8)	Waste (Cycle 1-8)
A	B	C	D	E	F

出口托盘

图1. CE-SDS缓冲液托盘的放置。

Initial Conditions   PDA Detector Initial Conditions   Time Program								
	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	
1		Rinse - Pressure	20.0 psi	10.00 min	BI:D1	BO:D1	forward	0.1 N NaOH rinse to clean capillary surface
2		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:E1	BO:E1	forward	0.1 N HCl rinse to neutralize capillary surface silanol group
3		Rinse - Pressure	20.0 psi	2.00 min	BI:F1	BO:F1	forward	ddH2O rinse to remove the acid residue
4		Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	SDS Gel rise to fill the capillary
5	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	10.00 min	BI:C1	BO:C1	5.00 Min ramp, reverse polarity, both	SDS Gel for voltage equilibration
6								

图2. CE-SDS预平衡的时间程序表。

Initial Conditions   PDA Detector Initial Conditions   Time Program								
	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	
1		Rinse - Pressure	70.0 psi	3.00 min	BI:D1	BO:D1	forward, In / Out vial inc 8	0.1 N NaOH rinse to clean capillary surface - Automatic increment every
2		Rinse - Pressure	70.0 psi	1.00 min	BI:E1	BO:E1	forward, In / Out vial inc 8	0.1 N HCl rinse to neutralize capillary surface silanol group - Automatic ir
3		Rinse - Pressure	70.0 psi	1.00 min	BI:F1	BO:F1	forward, In / Out vial inc 8	Water rinse to remove the acid residue - Automatic increment every 8 ru
4		Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	forward, In / Out vial inc 8	SDS Gel rinse to fill the capillary with SDS gel - Automatic increment eve
5		Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to clean capillary tip - Automatic increment every
6		Wait		0.00 min	BI:A4	BO:A4	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to clean capillary tip - Automatic increment every
7		Inject - Voltage	5.0 KV	20.0 sec	SI:A1	BO:C1	Override, reverse polarity	Sample injection
8		Wait		0.00 min	BI:B4	BO:B4	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to avoid sample carry over - Automatic incremen
9	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	30.00 min	BI:C1	BO:C1	1.00 Min ramp, reverse polarity, both, In / Out vial inc 8	SDS Gel for separation - Automatic increment every 8 runs
10	5.00	Autozero						
11								

图3. CE-SDS分离的时间程序表。

Initial Conditions   PDA Detector Initial Conditions   Time Program								
	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	
1		Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:D1	BO:D1	forward	0.1 N NaOH rinse to clean capillary surface
2		Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:E1	BO:E1	forward	0.1 N HCl rinse to neutralize capillary surface silanol group
3		Rinse - Pressure	50.0 psi	2.00 min	BI:F1	BO:F1	forward	Water rinse to remove the acid residue
4		Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	SDS Gel rinse to fill the capillary with SDS gel
5	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	10.00 min	BI:C1	BO:C1	5.00 Min ramp, reverse polarity, both	SDS Gel for separation
6	10.00	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1		ddH2O use for capillary dip to prevent capillary from drying
7	10.00	Lamp - Off						
8								

图4. CE-SDS关机的时间程序表。

### 2.3.2 HPV等电点分析样品处理方法

缓冲液配置：阳极液（200 mM 磷酸）、阴极液（300 mM 氢氧化钠）、化学迁移液（350 mM 醋酸）、阴极稳定液（500 mM 精氨酸）、阳极稳定液（200 mM 亚氨基二乙酸）、尿素溶液（4.3 M 尿素）、3 M Urea-cIEF Gel等；

样品配置：当分析一个样品是，先将下列试剂混合到0.5 mL 离心管中：200 μL 3 M 尿素-cIEF胶、12.0 μL 3-10两性电解质、20.0 μL 阴极稳定剂、2.0 μL 阳极稳定剂和2.0 μL 每个pI标准品。当分析很多样品的时候，SCIEX推荐预先配置样品预混液（master mix）。

master mix可简化样品配置并且使误差最小化。当准备用于cIEF分析的蛋白样品时，取240 μL master mix与10 μL 蛋白样品混合，蛋白样品的浓度在5 mg/mL-10 mg/mL之间，并且蛋白样品的盐浓度要低于50 mM，充分涡旋cIEF样品，将200 μL 样品转移至内插管中，低速离心除去气泡后，将内插管放入样品瓶中并用蓝色盖子盖好，放入样品托盘中，最后将样品托盘放入仪器。

HPV等电点测定实验缓冲液托盘按照图5放置，分析方法包括预平衡、分离以及关机，具体参数设置详见图6-8。

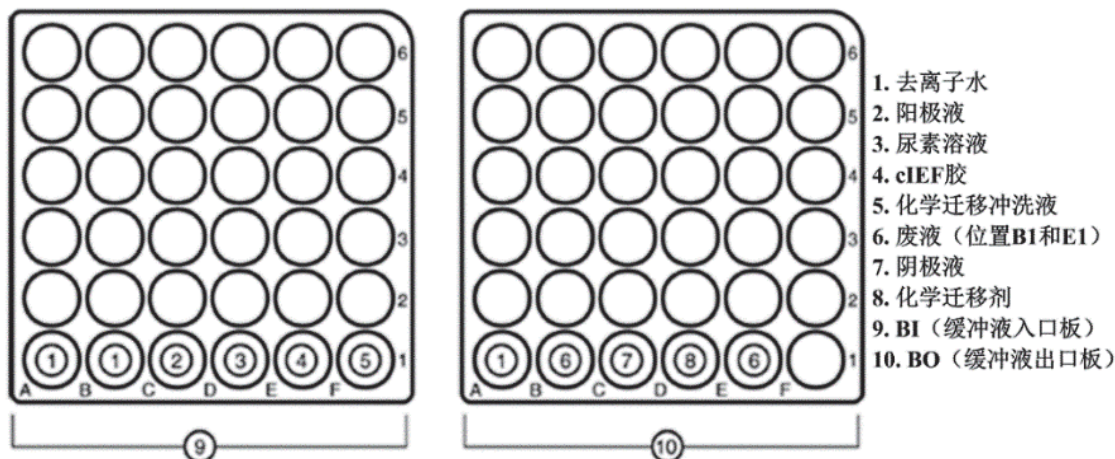


图5. cIEF缓冲液托盘的放置。

Initial Conditions		UV Detector Initial Conditions		Time Program					
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary			
1	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:F1	BO:B1	forward	Chemical Mobilizer rinse		
2	Rinse - Pressure	50.0 psi	2.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	ddH2O rinse		
3	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:E1	BO:B1	forward	cIEF Conditioning Gel		
4	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1		Idle Position		
5									

图6. cIEF毛细管预平衡的时间程序表。

Initial Conditions		UV Detector Initial Conditions		Time Program						
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary				
1	Rinse - Pressure	50.0 psi	3.00 min	BI:D1	BO:B1	forward, In / Out vial inc 12	Urea Solution rinse			
2	Rinse - Pressure	50.0 psi	2.00 min	BI:B1	BO:B1	forward, In / Out vial inc 12	Water rinse			
3	Inject - Pressure	25.0 psi	99.9 sec	SI:A1	BO:B1	Override, forward	Sample Injection			
4	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 12	Water Dip			
5	0.00	Separate - Voltage	25.0 KV	15.00 min	BI:C1	BO:C1	0.17 Min ramp, normal polarity, In / Out vial inc 12	Focusing Step		
6	15.00	Separate - Voltage	30.0 KV	30.00 min	BI:C1	BO:D1	0.17 Min ramp, normal polarity, In / Out vial inc 12	Chemical Mobilization Step		
7	45.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	2.00 min	BI:B1	BO:B1	forward, In / Out vial inc 12	Water rinse		
8	45.00	Stop data					Stop cIEF separation			
9	47.00	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 12	Water Dip		
10	47.10	End					Method End			
11										

图7. cIEF分离的时间程序表。

Initial Conditions		UV Detector Initial Conditions		Time Program					
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary			
1	Rinse - Pressure	50.0 psi	2.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	ddH2O rinse		
2	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:E1	BO:B1	forward	Gel Rinse		
3	Lamp - Off						Turn off lamp		
4	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1		Idle Position		
5									

图8. cIEF关机的时间程序表。

### 3. 分析与讨论

HPV疫苗经巯基乙醇处理后，得到纯度分析结果如图9所示。使用SDS-MW分子量检测试剂盒可以有效地实现HPV疫苗与其他杂质之间的分离，进而准确实现对HPV疫苗纯度的分析，该方法具有非常好的重复性。此外，通过cIEF实验，可以实现对HPV疫苗电荷异质性的分析和等电点的测定，此方法也显示出了良好的重现性，如图10所示。

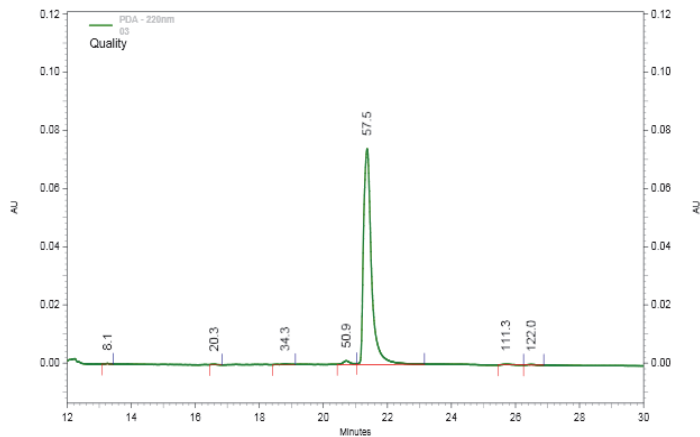


图9. HPV疫苗的CE-SDS纯度分析谱图及校正峰面积。

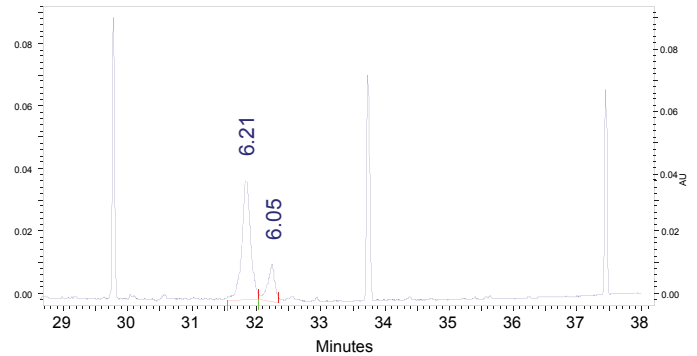


图10. HPV疫苗cIEF的检测结果图。

### 4. 结论

基于SCIEX稳定的毛细管电泳平台，结合其性能优良的SDS-MW纯度分析试剂盒和cIEF分析试剂盒，可以实现对HPV疫苗纯度和电荷异质性的有效分析和质量监控。cIEF方法是当前能够对宫颈癌疫苗HPV完整颗粒等电点分析的极佳方法。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。AB SCIEX™ 商标经许可使用。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-7647-ZH-B



#### SCIEX中国

北京分公司  
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话：010-5808-1388  
传真：010-5808-1390  
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话：021-2419-7200  
传真：021-2419-7333  
官网：[sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州分公司  
广州市天河区珠江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-8510-0200  
传真：020-3876-0835  
官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)