

# cIEF方法对重组蛋白类新冠疫苗的等电点分析

## Isoelectric point analysis of recombinant protein vaccine for coronavirus by cIEF method

王文涛, 唐红梅, 罗继, 陈泓序, 郭立海

Wang Wentao, Tang Hongmei, Luo Ji, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX, 中国;

SCIEX, China;

**Keywords:** cIEF, Coronavirus, recombinant protein vaccine, isoelectric point

### 1. 引言

作为预防和控制传染病最有效、最经济的手段, 新冠疫苗的研发一直倍受关注。新冠疫苗的开发应用了多种不同技术路线, 如灭活病毒疫苗、病毒载体疫苗、重组蛋白疫苗、mRNA疫苗等。其中, 重组蛋白疫苗因其产量高、安全性高、易于存储和运输等优势在众多疫苗技术中正展现出良好的应用前景, 受到了越来越多的关注。重组蛋白类新冠疫苗的技术原理是表达生产出新冠病毒感染人体细胞的关键“部件”——刺突蛋白(又称S蛋白), 将其注射到人体后可刺激免疫系统产生阻止新冠病毒感染人体细胞的中和性抗体。据报道, S蛋白有22个N-糖基化位点, 17个O-糖基化位点<sup>1</sup>。每个糖基化位点可能连有不同糖型, 从而对其理化性质分析造成很大影响。

出于对疫苗安全性的考虑, 重组蛋白类新冠疫苗的理化特性研究至关重要, 其中重组蛋白的等电点分析是一个十分重要的方面。毛细管等电聚焦电泳方法(cIEF)目前已经广泛应用于重组蛋白的等电点分析, 是中国药典收录方法, 具有分辨率高、准确度高优点。

本文采用cIEF方法对重组蛋白类新冠疫苗等电点进行了分析, 并对重组蛋白类新冠疫苗的批次一致性进行了考察。

### 2. 试剂及方法

#### 2.1 试剂及样品

**试剂:** cIEF Gel (SCIEX, 477497) 和cIEF Peptide Marker Kit

(SCIEX, A58481) 均购置于SCIEX。两性电解质(Pharmalyte 3-10) 购置于Cytiva。磷酸、氢氧化钠、醋酸、亚氨基二乙酸、精氨酸、尿素均购置于Sigma-Aldrich。

**样品:** 不同批次的重组蛋白类新冠疫苗原液标记为Lot 1、Lot 2 和Lot 3, 其初始浓度分别为2.20 mg/mL、2.40 mg/mL、1.70 mg/mL。

#### 2.2 溶液配制及样品前处理

**试剂制备:** 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)、阴极稳定剂(500 mM精氨酸)、阳极稳定剂(200 mM亚氨基二乙酸)、4.3 M尿素溶液以及3.75 M尿素-cIEF胶, 配置方法请参照《cIEF等电聚焦试剂盒说明书》。

**样品超滤浓缩:** 分别取样品1、2和3初始体积各100  $\mu$ L, 分别用10 kDa超滤管进行离心超滤浓缩, 浓缩至3个样品终体积均为15  $\mu$ L, 通过样品的初始浓度及浓缩体积计算得到样品1、2和3理论终浓度分别约为14.75 mg/mL、16.08 mg/mL、11.39 mg/mL; 需保证蛋白样品的盐浓度低于50 mM。

**样品预混液制备:** 将50  $\mu$ L 3.75 M 尿素-cIEF胶、3  $\mu$ L 3-10两性电解质、5.0  $\mu$ L 阴极稳定剂、0.5  $\mu$ L 阳极稳定剂和各0.5  $\mu$ L的pI marker (pI 10.0, 9.5, 4.1) 完全混匀后放到0.5 mL的样品管中, 得到样品预混液。3个样品各取10  $\mu$ L 分别与60  $\mu$ L 样品预混液混合, 涡旋混匀。转移到PA800 Plus样品管, 等待分析。

#### 2.3 实验仪器及方法

**仪器:** PA 800 Plus药物分析系统, 匹配紫外检测器; **软件:** 32 Karat™ 软件10.3版本; **检测波长:** 280 nm; **采集频率:** 4 Hz; **中性涂层毛细管 (SCIEX, 477441):** 20/30.2 cm (有效/总长度),

Initial Conditions   UV Detector Initial Conditions   Time Program							
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
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1. cIEF实验冲洗方法

Initial Conditions   UV Detector Initial Conditions   Time Program								
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments	
1	Rinse - Pressure	50.0 psi	3.00 min	BI:D1	BO:E1	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	Stop data					Stop cIEF separation	
8	45.10	Rinse - Pressure	50.0 psi	2.00 min	BI:B1	BO:B1	forward, In / Out vial inc 12	Water rinse
9	47.20	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 12	Water Dip
10	47.30	End					Method End	
11								

图2. cIEF实验分离方法

Initial Conditions   UV Detector Initial Conditions   Time Program							
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
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3. cIEF实验关机方法

50 μm 内径；窗口狭缝：100 × 200 μm；毛细管温度：20 °C；样品室温度：10 °C；进样条件：25 psi，99.9 s；聚焦：25 kV，15 min；分离：30 kV，30 min。

cIEF分析方法包括毛细管冲洗方法、样品分离方法和关机方法，时间程序见图1、图2和图3。

### 3. 结果与分析

#### 3.1 cIEF方法对重组蛋白类新冠疫苗的等电点分析

本文采用cIEF方法对重组蛋白类新冠疫苗进行了等电点分析，分析结果如下图4所示。利用pI marker的迁移时间和pI值构建线性方程，然后将未知峰的迁移时间代入线性方程计算得到未知样品的等电点。线性方程如下： $y = -2.434x + 41.713$ ， $R^2 = 0.9995$ 。通过线性方程计算得到该重组蛋白类新冠疫苗的等电点范围为3.32-7.03之间；样品的电荷异质性比较强，无明确主峰。

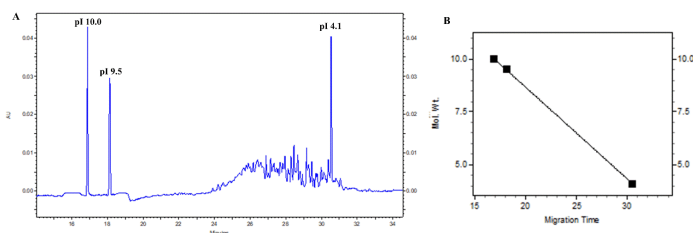


图4. 重组蛋白类新冠疫苗的cIEF分析结果，图A为cIEF分析谱图；图B为3个pI marker的线性曲线。

#### 3.2 重组蛋白类新冠疫苗批次一致性考察

选取3个不同批次的重组蛋白类新冠疫苗样品进行cIEF分析，电泳谱图如下图5所示。每一批次样品会单独利用pI marker的迁移时间和pI值构建线性方程，然后将未知峰的迁移时间代入线性方程计算得到未知样品的等电点。样品Lot 1、Lot 2和Lot 3的线性方程分别如下： $y = -2.434x + 41.713$ ， $R^2 = 0.9995$ ； $y = -2.400x + 41.276$ ， $R^2 = 0.9995$ ； $y = -2.308x + 40.099$ ， $R^2 = 0.9997$ ；由线性方程分别计算得到3个批次的重组蛋白类新冠疫苗的等电点如下表1所示。

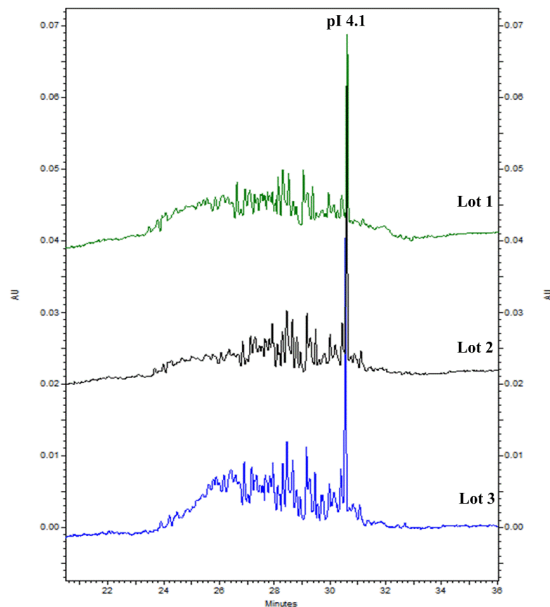


图5. 不同批次重组蛋白类新冠疫苗的cIEF分析结果

表1. 不同批次重组蛋白类新冠疫苗的等电点分析结果

编号	pI范围
Lot 1	3.32-7.03
Lot 2	3.17-6.98
Lot 3	3.30-6.98

## 4. 结论

本文借助于cIEF方法对重组蛋白类新冠疫苗的等电点进行了分析，该方法操作简便、分辨率高，可以有效测定重组蛋白类新冠疫苗的等电点。同时可以利用cIEF方法对重组蛋白类新冠疫苗的批次一致性进行分析，为重组蛋白类新冠疫苗的工艺优化及质量控制提供了一种有效的分析手段。

## 参考文献：

1. Tian, W., Li, D., Zhang, N. et al. O-glycosylation pattern of the SARS-CoV-2 spike protein reveals an “O-Follow-N” rule. Cell Res 31, 1123–1125 (2021).

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，也包括相关的标识、标志的所有权，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。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15129-ZH-A



### 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：021-2419-7201  
传真：021-2419-7333  
官网：[sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州办公室  
广州国际生物岛星岛环北路1号  
B2栋501、502单元  
电话：020-8842-4017

官方微信：SCIEX-China