毛细管胶束电动色谱法对多糖蛋白结合疫苗中游离载体蛋白的检测

Determination of free carrier proteins in polysaccharide-protein conjugate vaccines by capillary micellar electrokinetic chromatography

高铁[1]、陈泓序[1]、王文涛[1]、黄欢[1]、 Prashant .Dour[1]
Tie Gao[1]、Hongxu Chen[1]、Wentao Wang[1]、Huan Huang[1]、Prashant Dour[1]

[1] CE & Biopharma, Sciex, China; [1] CE & Biopharma, Sciex, India

Key words: Polysaccharide-protein conjugate vaccine; Free carrier proteins; Capillary micellar electrokinetic chromatography; Quantitative determination;

1、前言

多糖蛋白结合疫苗是一类以细菌多糖与蛋白质偶联的疫苗，其优点主要表现在：能激发2岁以下儿童、老年人和免疫缺陷者体内产生有效的免疫应答，并产生记忆性B细胞；诱生的保护性抗体主要为IgG，较多糖疫苗诱生的IgM抗体（在人体内可激起IgG2）更有效，且能维持较长时间；采用其他病原微生物的蛋白成分作为载体蛋白时，能起到联合免疫的效果。

在多糖蛋白结合疫苗中，蛋白作为载体，增强了多糖的免疫原性。多糖蛋白结合疫苗中常用的载体蛋白包括：破伤风类毒素（Tt）、白喉类毒素（Dt）、白喉类毒素无毒变异蛋白（CRM197）、B群脑膜炎球菌外膜蛋白（MenB-OMP）、流感嗜血杆菌 D 蛋白、绿脓杆菌外毒素 A（PEA）等[1]。游离载体蛋白的含量是疫苗质量控制的重要指标，也是反映疫苗质量的主要参数之一[2]。多糖蛋白结合疫苗中的游离载体蛋白含量超过规定的限度，会影响疫苗的免疫原性，并增加副反应发生率，因此 WHO 推荐在细菌多糖蛋白结合疫苗中游离载体蛋白含量应小于总蛋白（游离载体蛋白及多糖蛋白结合物中蛋白之和）的 5%[3]。游离载体蛋白检测的现有方法有层析柱法、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）法和分子排阻色谱法，其中层析柱法耗时、分辨率低、灵敏度低，不适合企业大批量样品的检测需求；SDS-PAGE法分辨率低，定量准确度差；分子排阻色谱法背压高、分辨率差、色谱柱寿命短。相比而言，毛细管电泳法分辨率高、定量准确、简单快速、毛细管寿命长是多糖蛋白结合疫苗中游离载体蛋白定量的最佳方法。

目前，已有多种多糖蛋白结合疫苗获准上市，如13价肺炎链球菌多糖蛋白结合疫苗（PCV13）、b型流行性感冒嗜血杆菌（Hib）多糖蛋白结合疫苗、单/2/4价脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗等。本文以13价肺炎链球菌多糖蛋白结合疫苗原液中两种常用的载体蛋白CRM197和Tt为例，开发了毛细管胶束电动色谱法（MEKC）对这两种载体蛋白及其结合物的分离，并考察了对这两种载体蛋白进行定量分析的线性和灵敏度。

2、仪器和试剂

2.1、仪器

毛细管电泳仪（PA800 Plus生物制药分析系统，匹配UV检测器，Sciex）；离心机（Biofuge，Thermo）。

2.2、试剂

四硼酸钠（229946-100G，Sigma-Aldrich）；十二烷基硫酸钠（74255-250G，Sigma-Aldrich）；氢氧化钠（795429-500G，Sigma-Aldrich）；二次去离子水（Millipore）。

背景电解质（BGE）：15 mL 50 mmol/L四硼酸钠，2.5 mL 200 mmol/L SDS，2.5 mL二次去离子水新鲜混合配置。

2.3、样品

CRM197、单价多糖蛋白（CRM197）结合疫苗原液（样品1）、Tt、单价多糖蛋白（Tt）结合疫苗原液（样品2）均由某疫苗生产厂家提供。其浓度分别为2.0 mg/mL、0.8 mg/mL、4.5 mg/mL、0.5 mg/mL。

3、CE方法

毛细管：熔融石英毛细管，50/60 cm（有效/总长度），75 μm内径；进样：0.5 psi，10 s；分离电压：30 kV；分离时间：30 分钟；毛细管温度：20 ℃；样品室温度：20 ℃；检测波长：200 nm。

新毛细管的预平衡： 0.1 mol/L NaOH，20 psi冲洗10 分钟；二次去离子水20 psi冲洗10分钟；背景电解质20 psi冲洗10 分钟；30 kV电压分离10 分钟。

每针之间的冲洗：0.1 mol/L NaOH ，20 psi冲洗5 分钟；二次去离子水，20 psi冲洗5分钟；背景电解质，20 psi冲洗5 分钟。

4、结果与分析

4.1、MEKC方法对载体蛋白CRM197的分离与定量

4.1.1、MEKC方法对CRM197与多糖蛋白结合疫苗的分离

使用MEKC方法对多糖蛋白结合疫苗样品1中的游离载体蛋白进行分离（图1a）。电泳图显示在7分钟（峰1）和11.6分钟（峰2）获得两个可基线分离的主峰。通过添加载体蛋白CRM197标准品（图1b），可判断峰2为载体蛋白CRM197，而峰1为多糖蛋白结合疫苗。

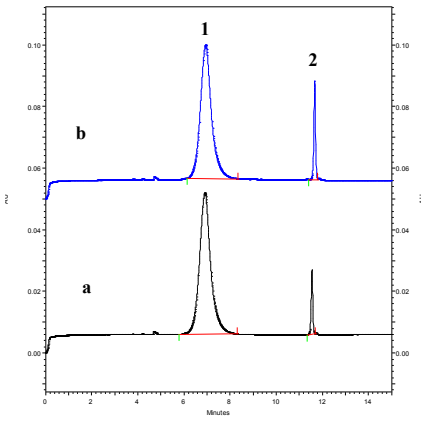

图1. MEKC法对载体蛋白CRM197和多糖蛋白结合疫苗分离的电泳图。a：疫苗样品1，b：疫苗样品1添加2 μL 2.0 mg/mL的CRM197。电泳条件：见第3节。

4.1.2、CRM197检测的线性、定量限 (LOQ) 及检出限 (LOD)

将2.0 mg/mL CRM197梯度稀释至250.0、125.0、62.5、32.2、15.6、7.8 μg/mL。使用MEKC法分离不同浓度的CRM197标准品（电泳图见2a），根据校准峰面积与浓度制定标准曲线，线性相关系数为0.999（图2b）。继续稀释CRM197至4.0 μg/mL，可达到CRM197的检出限（如图3）。根据LOQ=3×LOD，可得CRM197的定量限LOQ为12.0 μg/mL。

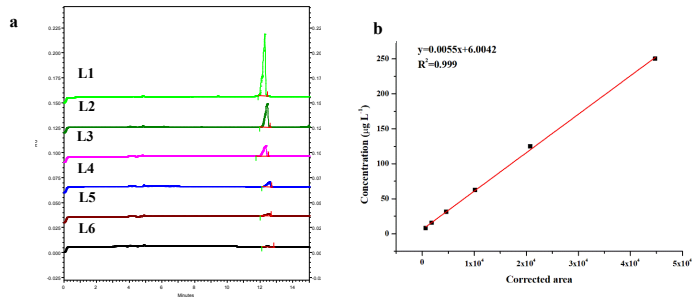

图2a. MEKC法分析不同浓度CRM197的电泳图。样品：CRM197，浓度由L1-L6为250.0、125.0、62.5、32.2、15.6、7.8 μg/mL；电泳方法：见第3节；b.根据校准峰面积及浓度制定的校准曲线。

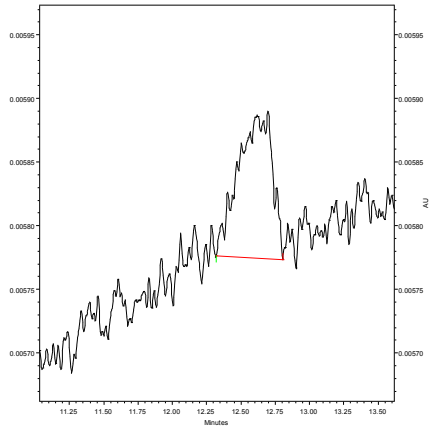

图3. MEKC法分析CRM197的电泳图。样品：CRM197；浓度：4.0 μg/mL；电泳方法：见第3节。

4.2、MEKC方法对载体蛋白Tt的分离与定量

4.2.1、MEKC方法对Tt与多糖蛋白结合疫苗的分离

使用MEKC方法对多糖蛋白结合疫苗样品2中的游离载体蛋白进行分离（图4a）。电泳图显示在6.2分钟（峰1）和11.7 分钟（峰2）获得两个可基线分离的主峰。通过添加载体蛋白Tt标准品（图4b），可判断峰2为载体蛋白Tt，而峰1为多糖蛋白结合疫苗。

4.2.2、Tt检测的线性、定量限 (LOQ)及检出限 (LOD)

将4.5 mg/mL Tt梯度稀释至281.2、140.6、70.3、35.2、17.6、8.8 μg/mL。使用MEKC法分离不同浓度的Tt标准品（电泳图见5a），根据校准峰面积与浓度制定标准曲线，线性相关系数为

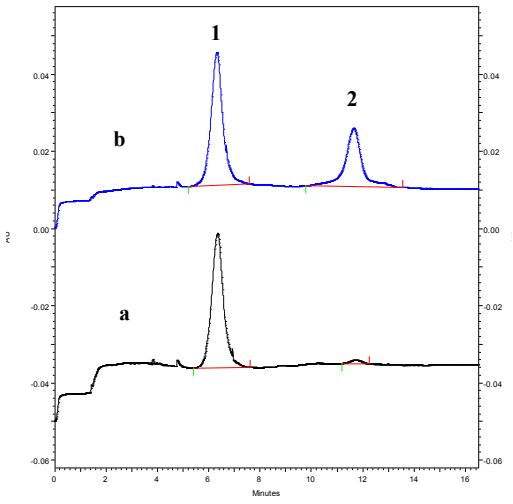

图4. MEKC法对载体蛋白Tt和多糖蛋白结合疫苗分离的电泳图。
a：疫苗样品2， b：疫苗样品2添加5 µL 4.5 mg/mL的Tt；方法详见第3节。

0.999（图5b）。继续稀释Tt至5.0 µg/mL，可达到Tt的检出限（如图6）。根据LOQ=3×LOD，可得Tt的定量限LOQ为15.0 µg/mL。

5、结论

本文成功地建立了MEKC方法用于肺炎多糖蛋白结合疫苗中两种游离载体蛋白CRM197和Tt的检测。载体蛋白及其对应多糖蛋白结合疫苗可以实现很好的分离。载体蛋白CRM197线性范围为7.8-250.0 µg/mL，线性指数R^2为0.999，LOD为4.0 µg/mL，LOQ为12.0 µg/mL。载体蛋白Tt的线性范围 为8.8-281.2 µg/mL，线性指数R^2为0.993，LOD为 5.0 µg/mL，LOQ为15 µg/mL。MEKC方法对肺炎多糖蛋白结合疫苗中这两种游离载体蛋白的检出限低，可满足多糖蛋白结合疫苗原液中游离载体蛋白含量低于总蛋白5%的标准（以原液浓度为100 µg/mL计算）。本实验结果表明，MEKC法测定多糖蛋白结合疫苗原液中游离载体蛋白分离度高、简单、快速，可适用于单价多糖蛋白结合疫苗原液中游离载体蛋白的检测。

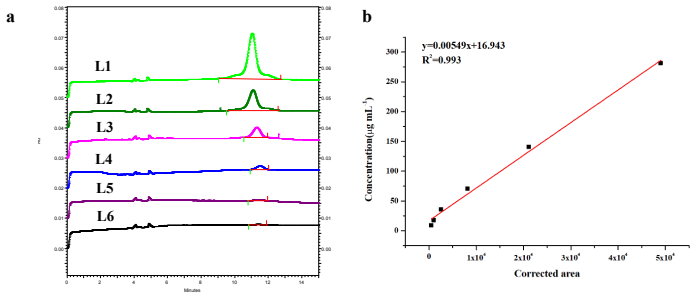

图5a. MEKC法分析不同浓度Tt的电泳图。样品：Tt，浓度由L1-L6为281.2、140.6、70.3、35.2、17.6、8.8 µg/mL；电泳方法：见第3节；b.根据校准峰面积及浓度制定的校准曲线。

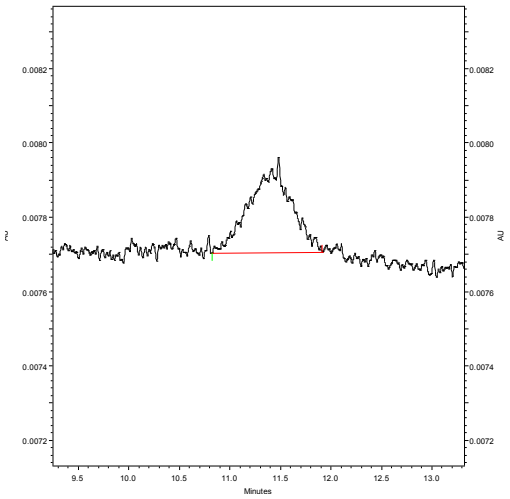

图6. MEKC法分析Tt的电泳图。样品：Tt；浓度：5.0 ug/mL；电泳方法：见第3节。

参考文献

[1] 谭亚军，多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白的研究与应用. 中国疫苗和免疫. 2013-19-4.

[2] 国家食品药品监督管理. 结合疫苗质量控制和临床研究技术指导原则. 2005-10-14.

[3] 世界卫生组织. C 群脑膜炎球菌结合疫苗生产和控制规程. 世界卫生组织技术报告. 2004, 924: 17.

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.
© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.
ROU-MKT-02-9990-ZH-A

SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院 1号楼5层
电话：010-58081388
传真：010-58081390

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号 1座502室
电话：021-24197200
传真：021-24197333

广州分公司
地址：广州市天河区珠江西路15号 珠江城1907室
电话：020-85100200
传真：020-38760835

全国免费垂询电话：800 820 3488，400 821 3897　网址：www.sciex.com.cn　微博：@SCIEX