

BioPhase™ 8800 系统进行EPO电荷变异体的高通量分析

High-throughput analysis of EPO charge variants on BioPhase™ 8800 system

刘冬科, 高铁, 陈泓序, 郭立海

Liu Dongke, Gao Tie, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX, 中国

SCIEX, China

关键词: BioPhase™ 8800系统; cIEF; 促红细胞生成素; 等电点; 电荷变异体;

1. 前言

促红细胞生成素 (Erythropoietin, EPO) 是一种高度糖基化的糖蛋白, 携带不同的电荷变异体, 分子具有微观不均一性。糖基化对稳定EPO的体内生物活性具有重要作用, 因此电荷变异体的种类和含量是EPO产品质量控制的重要参数。cIEF的方法可实现EPO电荷变异体的分离, 变异体数目、峰面积百分比与欧洲药典CZE方法较一致^[1]。同时, cIEF方法可获得每个变异体的精确等电点, 在不同来源或不同批次EPO样品的比较中, 等电点数据是不同变异体匹配和指认的重要信息。

作为高通量的毛细管电泳分析系统, BioPhase™ 8800系统通过8根平行的毛细管同时进行检测分析, 以8倍的通量获得与PA 800 Plus同质量的数据, 在保证分析效果和准确性的前提下, 提高大量样本的分析检测效率。方法具有以下特点:

1. 同一样品电荷变异体的等电点、峰面积百分比、分离度在BioPhase™ 8800与PA 800 Plus上结果一致;
2. 方法通量高, 速度快, 平均每个样品仅用时4.5 min, 显著提高了大量样本的分析检测效率。
3. 同一样品8通道间一致性高, 各变异体pI值RSD < 0.2%, 峰面积百分比RSD < 6.5%, 分离度RSD < 5.5%。
4. 单通道连续6针进样重复性好, 各变异体pI值RSD < 0.9%, 峰面积百分比RSD < 5.5%, 分离度RSD < 3.5%。

2. 仪器及方法

BioPhase™ 8800系统, 配备紫外检测器 (UV, 波长280 nm), BioPhase软件1.2.20 (SCIEX)。用于BioPhase™ 8800系统的中性涂层毛细管卡盒8 × 30 cm (SCIEX PN 5080119); BioPhase™ 8800系统启动盘套装 (SCIEX PN 5080311), 包含4块96孔样品盘、4块缓冲液盘、8块出口盘。

BioPhase™ 8800 系统进行EPO电荷变异体分析的cIEF分离方法: 进样: 25 psi, 99 s; 聚焦: -25 kV, 6 分钟; 化学迁移: 用100 mM氨水来代替阳极液, -30 kV, 30 分钟。数据采集频率: 4 Hz; 样品室温度: 10 °C; 毛细管温度: 25 °C; 检测波长: 280 nm;

新卡盒预冲洗方法: CE 级水, 70 psi 压力冲洗10 分钟; CE 级水, 70 psi 压力冲洗10 分钟; 中性毛细管冲洗液, 70 psi 压力冲洗20 分钟。

预冲洗及关机冲洗方法: 中性毛细管冲洗液, 70 psi 压力冲洗5 分钟。

3. 试剂及样品

用于BioPhase™ 8800系统的毛细管等电聚焦 (cIEF) 试剂盒 (SCIEX PN C30101), 包含cIEF 胶, 阳极液, 阴极液, 阳极稳定剂, 阴极稳定剂, 化学迁移剂, 中性毛细管冲洗液, 甲酰胺, 尿素和CE 级水, 按照试剂盒说明书制备相应浓度的试剂。pI 3.21 Marker、pI 5.91 Marker、pI 6.61 Marker (AES)。两性电解质 (GE Healthcare)。Ultracel YM-10 滤膜 (Millipore)。

欧洲药典EPO标准品 (Eur, 购自EDQM), 用Ultracel YM-10 滤膜对其进行超滤浓缩处理, 最终浓度为4 mg/mL。

Master Mix的配制：每份样品需要：90 μL 6 M 尿素-cIEF 胶、6.0 μL of 3-10 两性电解质、15.0 μL 阳极稳定剂、各0.5 μL 的pI Marker (3.21、5.91、6.61)。

最后，以20 μL 样品与110 μL Master Mix比例进行混合，涡旋混匀。取100 μL 加入样品盘一系列的8个样品孔中，样品摆放见图1。

此时8个样品孔中的样品相同，使用 BioPhase™ 8800仪器及BioPhase软件采集分析，考察单次进样8通道一致性，单通道连续进样6次的重复性。

另取100 μL 样品，使用PA 800 Plus仪器及32Karat软件采集分析，比较同一样品在BioPhase™ 8800及PA 800 Plus两个仪器上的电泳结果。

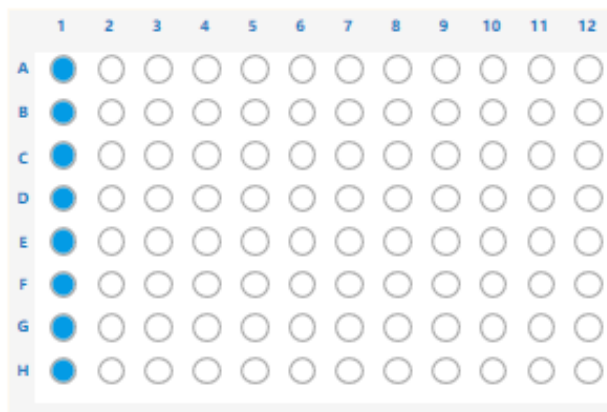


图1. BioPhase™ 8800样品盘摆放

4. 结果与讨论

4.1 同一样品使用 BioPhase™ 8800与PA 800 Plus采集结果分析

对于同一EPO样品，使用BioPhase™ 8800进行CIEF分析的电泳图见图2a，使用PA 800 Plus进行CIEF分析电泳图见图2b，两个仪器上均检测到EPO的8个电荷变体，各变体的pI值、峰面积百分比 (Area%)、分离度 (R) 结果对比见表1，同一样品在两个仪器上的结果较一致。

4.2 BioPhase™ 8800多通道重复性结果分析

对8通道的样品同时连续进样6次，考察单次进样8通道间的一致性，以及单通道连续进样6针的重复性。

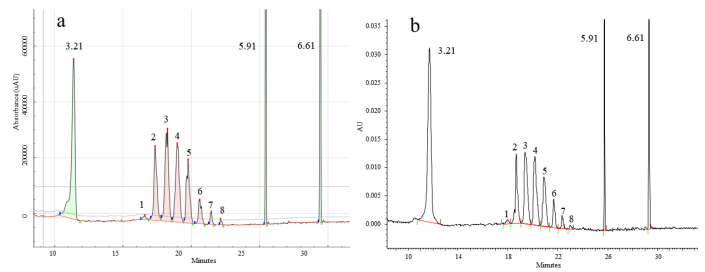


图2. 同一样品在不同仪器及软件中进行电荷变体分析的CIEF电泳图 (a: BioPhase™ 8800仪器, BioPhase软件, b: PA 800 Plus仪器, 32Karat软件)

表1. 同一EPO样品在BioPhase™ 8800 与PA 800 Plus上电荷变体分析结果的平均值 (n=3)

Peak	pI		Area%		R	
	Biophase™ 8800	PA 800 Plus	Biophase™ 8800	PA 800 Plus	Biophase™ 8800	PA 800 Plus
1	4.25	4.25	1.37	1.41	14.77	15.39
2	4.39	4.39	19.14	19.51	1.81	1.80
3	4.57	4.57	28.36	28.51	2.12	2.06
4	4.71	4.70	25.75	25.51	1.57	1.46
5	4.85	4.85	16.86	16.96	1.51	1.66
6	5.01	5.01	6.07	5.76	1.87	1.98
7	5.17	5.17	1.87	1.79	2.62	2.71
8	5.29	5.29	0.59	0.56	2.72	2.76

单次进样8通道间表现出良好的一致性，电泳图见图3a，统计结果见表2。各变体pI值RSD < 0.2%，峰面积百分比RSD < 6.5%，分离度RSD < 5.5%。

单通道6针进样重复性好，电泳图见图3b，统计结果见表3。各变体pI值RSD < 0.9%，峰面积百分比RSD < 5.5%，分离度RSD < 3.5%。

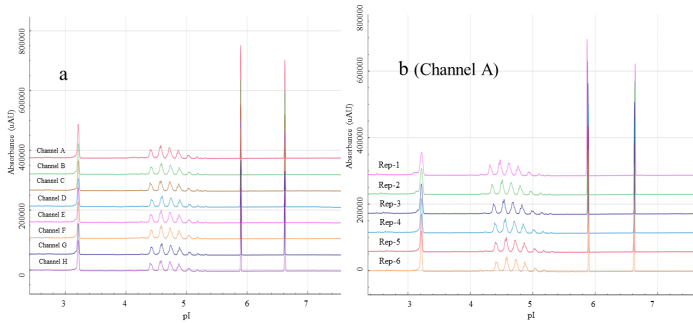


图3. Biophase™ 8800系统中使用CIEF方法进行EPO电荷变异体分析的电泳图
(a) 8通道A-H; (b) A通道重复6针

5. 结论

本文使用Biophase™ 8800 系统进行EPO电荷变异体分析，结论如下：

1. 同一样品各电荷变异体的等电点、峰面积百分比、分离度在Biophase™ 8800与PA 800 Plus上结果一致；
2. 同一样品8通道间一致性高；
3. 单通道连续6针进样重复性好；
4. 方法通量高，速度快，显著提高了大量样本的分析检测效率，当面对不同批次、来源等大量EPO样品检测时，Biophase™ 8800系统可在保证分析效果和准确性的前提下，实现大量样品的快速分析，提高检测分析效率。

6. 参考文献

- [1]. SCIEX Tech Note: cIEF方法对EPO变异体的分析 (RUO-MKT-02-9621-ZH-A)

表2. Biophase™ 8800 EPO电荷变异体分析的单次进样8通道一致性结果 (n=8)

Peak	pI		Area%		R	
	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
1	4.26	0.17%	1.64	4.26%	/	/
2	4.41	0.19%	20.60	1.32%	1.86	2.33%
3	4.59	0.18%	28.89	0.86%	2.08	1.91%
4	4.73	0.20%	25.16	0.73%	1.62	4.44%
5	4.87	0.14%	16.18	1.00%	1.57	5.19%
6	5.03	0.16%	5.32	1.98%	1.94	4.95%
7	5.18	0.12%	1.64	1.69%	2.65	3.80%
8	5.31	0.16%	0.57	6.05%	2.96	4.49%

表3. Biophase™ 8800 EPO电荷变异体分析的单(A)通道6针重复性结果 (n=6)

Peak	pI		Area%		R	
	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
1	4.23	0.63%	1.63	5.11%	/	/
2	4.37	0.77%	19.85	2.26%	1.89	1.09%
3	4.54	0.85%	28.90	0.59%	2.10	0.86%
4	4.69	0.81%	25.31	0.98%	1.67	1.03%
5	4.83	0.79%	16.44	1.92%	1.50	1.88%
6	4.99	0.70%	5.55	1.61%	1.89	2.01%
7	5.15	0.52%	1.71	3.30%	2.60	1.86%
8	5.28	0.52%	0.61	4.59%	2.88	3.31%

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。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15713-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

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](https://www.sciex.com.cn)