

毛细管电泳法对体外诊断试剂原料的质控分析

Quality control of raw materials of diagnostic reagent in vitro by capillary electrophoresis

王文涛, 罗继, 陈泓序, 郭立海

Wang Wentao, Luo Ji, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX, 中国

SCIEX, China

Keywords: Diagnostic reagent, raw materials, capillary electrophoresis

1. 引言

随着新冠疫情的爆发, 体外诊断 (In Vitro Diagnosis, 简称为 IVD) 行业受到了越来越多的关注。IVD是指将样本 (血液、体液、组织等) 从人体中取出后进行检测, 通过与正常人的分布水平相比较, 来确定病人相应的功能状态和异常情况, 以此来作为诊断和治疗的依据。目前在临床上IVD使用率极高, 被认为是“医生的眼睛”。

IVD 试剂原料是整个 IVD 产业链中关键的一环, 在诊断试剂盒中有着至关重要的作用。抗体是体外诊断试剂中常用原料之一, 广泛应用于酶联免疫分析、化学发光免疫分析等各类免疫诊断中。各种重组抗原及重组酶在 IVD 原料中也占据着举足轻重的地位。这些原料的纯度和等电点直接关系到诊断试剂的质量及稳定性。IVD试剂原料的一致性对于下游终产品的稳定性至关重要, 因此IVD原料质量控制关键的是对每批纯化后的原料采用适当的检测方法进行分析, 保证最终的IVD试剂原料应该是高纯度、高活性且状态均一的成品。

毛细管电泳 (CE) 以其自动化程度高、定量准确和分离效率高等特点, 广泛应用于蛋白的质量监控。本文采用毛细管凝胶电泳 (CE-SDS) 方法和毛细管等电聚焦电泳 (cIEF) 方法, 在单一平台上实现了对IVD试剂原料——抗体/抗原的纯度和等电点的分析, 并对IVD试剂原料进行了批次一致性分析。

2. 实验部分

2.1. 实验仪器及方法

采用SCIEX PA 800 Plus药物分析系统, 纯度分析需用二极管阵列 (PDA) 检测器, 检测波长220 nm; 等电点分析需用紫外检测器 (UV), 配备280 nm滤光片。缓冲液托盘的放置及毛细管预冲洗、分离方法、关机方法请参考SDS-MW和cIEF试剂盒说明书。

2.2. 实验试剂及样品信息

纯度分析: SCIEX IgG 纯度分析试剂盒 (PN.390953); 等电点分析: SCIEX cIEF等电点分析试剂盒 (PN. A80976)。其他试剂请参照试剂盒说明书推荐厂家购买并进行配制。

不同批次的抗体 (抗体A-Lot 1、抗体A-Lot 2)、抗原 (抗原B-Lot 1、抗原B-Lot 2) 样品由国内某IVD生产企业提供, 抗体浓度分别为10.11 mg/mL、12.10 mg/mL, 抗原浓度分别为2.27 mg/mL、2.40 mg/mL。实验前, 使抗体/抗原样品的初始浓度在5~10 mg/mL之间, 并保证蛋白样品的盐浓度低于50 mM, 必要时需要进行样品超滤浓缩或换液。

2.3. 样品处理

2.3.1 纯度分析样品处理方法

取10 μ L上述样品, 加入85 μ L样品缓冲液, 总体积为95 μ L。加入2 μ L10 kDa内标, 5 μ L巯基乙醇或者250 mM碘乙酰胺溶液, 盖好瓶盖, 用封口膜封好, 并充分混合, 70 $^{\circ}$ C水浴中加热10 min, 室温冷却5 min, 3000 rpm 离心5 min, 转移100 μ L样品加入到200 μ L PCR进样管中, 准备进样。

2.3.2 等电点分析样品处理方法

分别取200 μL 3.75 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，置于1.5 mL离心管中，涡旋混匀。分析多个样品时，SCIEX推荐预先配置master mix，master mix可简化样品配置并且使误差最小化。取240 μL master mix与10 μL 蛋白样品混合，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PCR样品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。

3. 结果与讨论

3.1. 抗体/抗原纯度分析

本文利用CE-SDS方法，对抗体和抗原类IVD原料的纯度进行了分析。如图1A所示，抗体A类原料还原性CE-SDS纯度为96.96%，3、5号峰分别对应单抗的轻链和重链，1、2、4、6为样品中的杂质。如图1B所示，抗原B类原料还原性CE-SDS纯度为80.74%，其中7号峰为该抗原还原后的主峰，1~6和8~9号峰分别对应该抗原的杂质。该方法基于分子量大小差异进行分析，分离度高、重复性好、定量结果准确，可有效应用于抗体、抗原等原料的纯度分析和批次一致性分析。

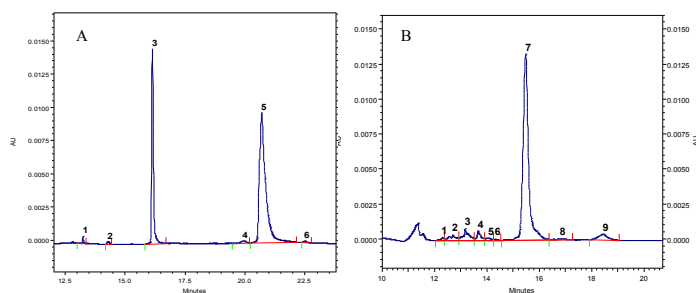


图1. IVD原料抗体A和抗原B还原性CE-SDS分析结果。图1A为抗体A-Lot 1；图1B为抗原B-Lot 1。

3.2. 抗体/抗原等电点分析

抗体、抗原等蛋白质在等电点时，由于没有相同电荷而互相排斥的影响，所以蛋白最不稳定，溶解度最小，极易结合成较大的聚集体，析出沉淀。在IVD试剂生产过程中，明确IVD试剂原料的等电点，对于试剂开发中缓冲体系的选择，以及物料的稳定性和一致性等具有非常重要的意义。本文采用cIEF方法，对抗体

/抗原类IVD原料进行了等电点分析。抗体类IVD试剂原料的等电点为5.79~5.86，异构体数目较少，可见明显主峰，主峰等电点为5.86（图2A）；抗原的等电点为4.16~5.74，电荷异质性较为复杂，无明显主峰(图2C)。该方法分辨率高，测定结果准确。

3.3. 批次一致性分析

本文采用cIEF方法对不同批次的IVD试剂原料进行了分析，对于抗体类原料，如图2A和2B所示，批次1和批次2的等电点范围分别为5.79~5.86和5.80~5.86，主峰等电点同为5.86，结果证明不同批次的抗体类物料稳定性良好。对于抗原类原料，如图2C和D所示，批次1和批次2的等电点范围分别为4.16~5.74和4.67~6.22，电荷异质性复杂，无明确主峰。相比于抗体类原料，抗原类原料的稳定性受到储存条件的影响更大。

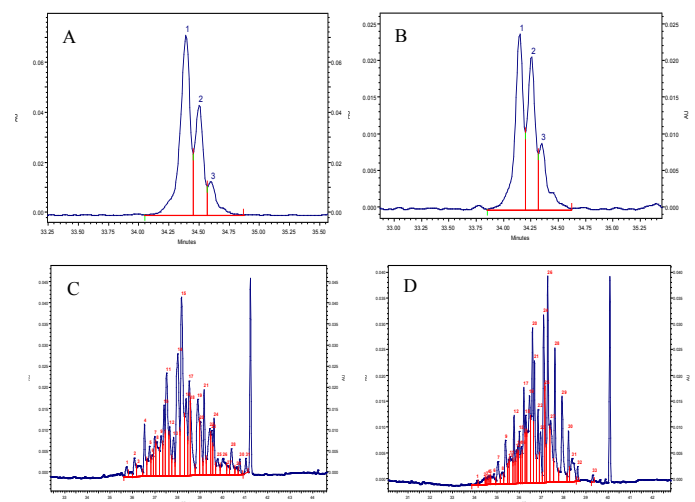


图2. 不同批次IVD原料抗体A和抗原B的cIEF分析结果。图2A、2B分别为抗体A-Lot 1和Lot 2；图2C、2D分别为抗原B-Lot 1和Lot 2。

表1. 不同批次抗体和抗原类IVD试剂原料的等电点测定结果

名称	pI 范围	主峰pI
抗体 A-Lot1	5.79~5.86	5.86
抗体 A-Lot2	5.80~5.86	5.86
抗原 B-Lot1	4.16~5.74	N/A
抗原 B-Lot2	4.67~6.22	N/A

4. 结论

基于SCIEX成熟稳定的PA 800 Plus药物分析系统，结合性能优良的IgG纯度分析试剂盒和cIEF等电点分析试剂盒，可以实现对IVD试剂原料—抗体和抗原的纯度及等电点的质量监控，并用于抗体和抗原的批次一致性分析，有效帮助IVD企业对抗体抗原物料更好地进行质量控制。

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-02-14671-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：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：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：[SCIEX-China](#)