

紫外-高效液相色谱法检测 EV71-CA16 二价手足口病灭活疫苗中间品蛋白质含量的方法建立与评价

曹明翔[#], 张浩然[#], 毛正睿, 郑振, 徐华, 杨二霞^{*}

(艾美行动生物制药有限公司, 泰州 225300)

摘要:目的 建立一种定量检测 EV71-CA16 二价手足口病灭活疫苗中间品(纯化液、原液、浓缩液)的蛋白质含量的紫外高效液相色谱(UV-HPLC)方法。**方法** 采用 UV-HPLC 法并且使用体积排阻色谱柱对肠道病毒 71 型(EV71)、柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16)、牛血清白蛋白(BSA)等不同来源的蛋白质含量的进行检测。对该方法的检测范围、标准曲线通用性、重复性进行验证。**结果** EV71 病毒、CA16 病毒和 BSA 原液这三种蛋白样品的线性回归方程的回归系数在 0~20 $\mu\text{g/mL}$ 均大于 0.975, 0~100 $\mu\text{g/mL}$ 均大于 0.985。BSA 蛋白系列标准液的相对标准偏差(RSD)在 2~20 $\mu\text{g/mL}$ 含量范围内 $\leq 7.3\%$, 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 含量范围内 $\leq 1.5\%$ 。同一批次的 EV71 蛋白样品的 3 条不同标准曲线计算值之间的 RSD 在 0~20 $\mu\text{g/mL}$ 含量范围内 $\leq 11\%$, 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 含量范围内 $\leq 3\%$ 。3 个批次的 EV71 或者 CA16 蛋白样品的标准曲线计算值之间的 RSD 在 0~20 $\mu\text{g/mL}$ 含量范围内均 $\leq 12.5\%$, 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 含量范围内均 $\leq 3\%$ 。EV71 和 CA16 蛋白含量计算值的 RSD 在 2~10 $\mu\text{g/mL}$ 范围内 $\leq 16.5\%$, 10~20 $\mu\text{g/mL}$ 范围内 $\leq 9.5\%$, 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内 $\leq 4\%$ 。将同一 BSA 的峰面积代入 EV71 或 CA16 标准曲线计算出蛋白含量值,该计算值与 BSA 理论值的比值在 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内约为 1.63, 4~20 $\mu\text{g/mL}$ 约为 1, 0~4 $\mu\text{g/mL}$ 约为 0.5。**结论** 该方法要求具有较大的线性范围,可检测不同浓度范围的原液(0~100 $\mu\text{g/mL}$)和纯化液(0~20 $\mu\text{g/mL}$)及浓缩液($>100 \mu\text{g/mL}$);具有标准曲线通用性、简便性,同一标曲适用于 EV71、CA16、BSA 等不同来源的蛋白质含量的检测;并且具有较好的重复性。

关键词: 紫外-高效液相色谱法; 肠道病毒 71 型; 柯萨奇病毒 A 组 16 型; 牛血清白蛋白; 蛋白质含量检测

0 引言

手足口病(HFMD)由多种肠道病毒引起,其主要致病病原体包括肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(Coxsackievirus A16, CA16)等,这两种病毒亚型是引起 HFMD 重症和死亡的主要病因^[1-2]。有关于灭活疫苗中蛋白质含量测定方法的研究指出了灭活疫苗中成分复杂^[3],纯化不完全的疫苗中可能含有细胞碎片、血清、病毒非结构蛋白等杂蛋白。有研究者对疫苗中宿主细胞蛋白进行进一步地研究,既包括宿主细胞的结构蛋白,也包括宿主细胞(传代细胞)分泌的促生长因子,不仅能引起机体的过敏反应,还可能引起机体对蛋白质药物

产生抗体^[4-5]。本研究的 EV71-CA16 二价手足口病灭活疫苗制备工艺繁多,过程中会产生 0~200 $\mu\text{g/mL}$ 不同浓度范围的纯化液、原液、浓缩液等中间品,因此生产过程中需要采用线性范围广、可靠并且简便的方法进行检测。

随着检测技术的发展,蛋白质含量的检测方法也在不断更新,如凯氏定氮法、考马斯亮蓝法、双缩脲法、Folin 酚法(Lowry 法)、BCA(Bicinchoninic Acid)法等^[6-9]。凯氏定氮法的实验含有煮沸、滴定等操作步骤,较为繁琐^[9],双缩脲法的检测限目前为 50 $\mu\text{g/mL}$,不能满足更低含量的样品检测^[7]。已有研究表明,如下蛋白质含量检测法中赛默飞 BCA 法在 2.5~20 $\mu\text{g/mL}$,艾美 Lowry 法和康为 BCA 法在 5~20 $\mu\text{g/mL}$ 范围内符合精密度可接受范围

基金项目: 大健康产业创新能力提升项目(项目编号: TS202302)。

[#] 共同第一作者: 曹明翔, 硕士, 中级工程师, 研究方向为疫苗开发; 张浩然, 硕士, 中级工程师, 研究方向为疫苗开发。

^{*} 通信作者: 杨二霞, 博士, 高级工程师, 研究方向为疫苗开发。E-mail: yangerxialily@163.com

(RSD \leq 6%), 表现出较好的重复性和准确性^[10], 但是不能如本研究中 UV-HPLC 法中 EV71 与 CA16 的 2 种病毒颗粒对有一定专属性^[11-12], 并且以上几种化学方法对蛋白质结构的改变是不可逆的。

本研究中的 EV71 与 CA16 的 2 种病毒颗粒, 主要蛋白组分为 20~30 nm 的全病毒颗粒^[9], 其他杂质蛋白已于前期工艺过程中基本去除, 且病毒颗粒与其他可能存在的蛋白相比体积较大, 因此考虑到待检测样品中蛋白分子大小的差异, 选择体积排阻色谱(SEC)柱进行 EV71 与 CA16 病毒样品的分离^[12], 进一步地用 UV-HPLC 法进行蛋白质含量的检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

HPLC 仪器: SPD-20A 紫外检测器、LC-20AD 泵、CT0-20AC 柱温箱、SIL-20AC HT 自动进样器(SHIMADZU 公司)。色谱柱: 体积排阻色谱(SEC, Ultrahydrogel™ 250 7.8 mm×300 mm, 6 μ m 1~80 K (Waters 公司)。紫外分光光度计 UV-1780 型(SHIMADZU 公司); 电子天平 ME104(酶特勒-托利多仪器上海有限公司); 恒温水浴锅 JY-SY-12II 型(上海成顺仪器仪表有限公司); 恒温箱(Thermo 公司)。

1.2 材料与试剂

BSA 标准品: 100 μ g/mL, 批号 230501(Solarbio 公司); 福林酚试剂(1 mol/L)、酒石酸钾、硫酸铜、无水碳酸钠、氢氧化钠(均来自上海国药沪试公司)。CA16 病毒原液: 批号 Y-GX202001-1v、GX202005-1v、GX202001。EV71 病毒原液: 批号 Y-TZ2020001-1v、TZ202202-1v-01、TZ202201-1v-01(均来自艾美行动生物制药有限公司)。

1.3 蛋白原液样品检测

蛋白质测定法(Lowry 法): 配制碱性铜试液, 取氢氧化钠 2 g, 无水碳酸钠 10 g, 酒石酸钾 0.1 g, 硫酸铜 0.05 g, 用纯化水 100 mL 充分溶解。福林酚试剂用纯化水稀释使其终浓度为 0.125 mol/L。精密量取 BSA 标准品配制浓度分别为 0、20、60、100、140、180 μ g/mL 的标准品溶液。分别加入碱性铜试液摇匀, 25 $^{\circ}$ C 静置 10 min, 各加入福林酚试剂立即混匀, 25 $^{\circ}$ C 静置 30 min, 按紫外-可见分光光度法操作, 在波长 650 nm 处测定吸光度, 标准品溶液 0.0 mL 管作为空白。以标准品的蛋白质浓度对其相应吸光度作直线回归, 求得直线回归方程($r^2 \geq 0.950$)。另精密取供试品溶液, 同法测定。以线性回归方程计算供试品溶液中的蛋白质浓度。

1.4 色谱条件

Waters 体积排阻色谱柱(SEC, Ultrahydrogel™ 250

7.8 mm×300 mm, 6 μ m, 1~80 K)。流动相: 称取氯化钾(KCl) 0.2 g、磷酸二氢钾(KH₂PO₄) 0.27 g、十二水合磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O) 1.42 g、氯化钠(NaCl) 13.84 g 溶解于 1 L 纯化水中, 调节 pH 7.40。流速 0.3 mL/min; 柱温箱温度 25 $^{\circ}$ C; 进样器温度 6 $^{\circ}$ C; 紫外检测器波长 280 nm; 进样体积 50 μ L。

1.5 方法学考察

1.5.1 线性范围

将蛋白样品分别对倍梯度系列稀释: 1、2、4、8、16、32、64 倍配制成系列标准浓度工作液, 经 HPLC 检测, 统计各样品峰面积。以不同稀释度样品的蛋白质含量(为原倍样品蛋白质含量值依次对倍所得)为纵坐标, 样品色谱峰面积为横坐标进行线性拟合作标准曲线, 分别求得 0~100、0~20 μ g/mL 两个范围内线性回归方程式和回归系数 r^2 , 考察本法的线性范围。

1.5.2 标准曲线通用性

(1)同批次蛋白样品的不同标准曲线通用性。将同一峰面积数值分别代入样品在不同时间制作的标准曲线, 计算并比较各套标准曲线所得蛋白含量的差异, 以考察同一套标准曲线是否适用于本检测系统其他时间的同批次蛋白样品的含量检测。

(2)同种病毒的不同批次蛋白样品标准曲线通用性。将同一峰面积数值分别代入不同批次样品制作的标准曲线, 计算并比较各标准曲线所得蛋白含量的差异, 以考察同一套标准曲线是否适用于本检测系统不同批次样品的蛋白含量检测。

(3)不同种病毒蛋白样品的标准曲线通用性。将其中一种病毒蛋白样品经 HPLC 检测所得的峰面积, 分别代入该病毒蛋白样品制作的标准曲线和另一种病毒蛋白样品制作的标准曲线中计算所得蛋白质含量值, 比较两检测值的差异, 以考察不同种病毒蛋白之间含量检测通用性。

1.5.3 数据软件分析

使用 Graph Pad Prism 5.0 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 病毒原液样品蛋白质含量

首先采用 Lowry 法检测各病毒原液样品的蛋白质含量结果为 Y-TZ202001-1V 78 μ g/mL、TZ202202-1V-01 115 μ g/mL、TZ202201-1V-01 118 μ g/mL、Y-GX202001-1V 92 μ g/mL、GX202005-1V 63 μ g/mL、GX202201-1V-01 113 μ g/mL, 确保所选样品中含有初始蛋白质浓度含量 100 μ g/mL。而下文蛋白样品分别对倍梯度系列稀释: 2、4、8、16、32、64 倍所得系列标准浓度工作液蛋白含量为原液检测值依次除以 2、4、8、16、32、64 所得。

2.2 不同蛋白样品线性范围

分别将不同批次的 EV71 病毒、CA16 病毒和 BSA 原液的系列标准浓度工作液经 HPLC 检测, 以蛋白质含量为纵坐标, 样品色谱峰面积为横坐标, 进行线性拟合作标准

曲线, 分别求得 0~100、0~20 $\mu\text{g/mL}$ 两个范围内线性回归方程式和回归系数 r^2 。批号 3 TZ202201-1v-01 的 EV71 原液的 3 次标准曲线统计结果, 如表 1, 可见 0~20 $\mu\text{g/mL}$ 的 r^2 均大于 0.975, 0~100 $\mu\text{g/mL}$ 的 r^2 均大于 0.985。

表 1 不同线性范围内回归系数 r^2 统计($n=6$)

蛋白样品 线性范围 /($\mu\text{g/mL}$) r^2	EV71		CA16		BSA	
	0~20	0~100	0~20	0~100	0~20	0~100
	0.9762 \pm 0.0014	0.9893 \pm 0.00389	0.9804 \pm 0.0073	0.99 \pm 0.0073	0.9852 \pm 0.0032	0.9985 \pm 0.00085

结果表明, 三种蛋白样品的蛋白质含量与色谱峰面积在 0~100、0~20 $\mu\text{g/mL}$ 两个范围内线性关系均良好。

2.3 同批次蛋白样品的不同标准曲线通用性

BSA 蛋白样品标准工作液经 HPLC 检测的峰面积如表 2, 2~20 $\mu\text{g/mL}$ 含量范围内其相对标准偏差(RSD) $\leq 7.3\%$, 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 含量范围内 RSD $\leq 1.5\%$, 表明本检测方法具有良好的重复性, 准确可靠。

分别用 EV71(批号 TZ202201-1v-01)的标准曲线计算得到 BSA 峰面积对应的蛋白质含量值(表 3), 可见 0~20 $\mu\text{g/mL}$ 含量范围内 3 次标曲计算值之间的 RSD $\leq 11\%$, 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 含量范围内 RSD $\leq 3\%$, 表明不同标准曲线计算值之间偏差较小, 同一套标准曲线适用于本检测系统其他时间的同批次蛋白样品的含量检测。

表 2 UV-HPLC 法检测 BSA 样品所得峰面积

蛋白含量 /($\mu\text{g/mL}$)	100	80	40	20	15	10	8	4	2
峰面积 1	566313	430090	195429	81524	62491	43633	25333	8765	1626
峰面积 2	561781	434927	198907	82421	63480	44654	26420	9048	1779
峰面积 3	570945	427358	194950	80533	61502	42612	24446	8285	1544
平均值 /($\mu\text{g/mL}$)	566346	430792	196429	81493	62491	43633	25400	8699	1650
RSD/%	0.81	0.89	1.10	1.16	1.58	2.34	3.89	4.43	7.23

表 3 BSA 与 EV71(批号 TZ202201-1v-01)蛋白质含量换算值

BSA 峰面积	566346	430792	196429	81493	62491	43633	25400	8699	1650
EV71 曲线 1	61.45	47.83	24.36	12.97	11.07	9.18	7.35	5.69	4.98
EV71 曲线 2	61.89	48.24	25.52	13.24	12.11	10.38	8.29	5.04	4.32
EV71 曲线 3	62.35	49.26	25.42	14.03	12.13	10.21	8.13	5.65	4.04
平均值 /($\mu\text{g/mL}$)	61.89	48.44	25.10	13.41	11.77	9.92	7.93	5.46	4.45
RSD/%	0.73	1.52	2.57	4.12	5.17	6.54	6.37	6.72	10.80

2.4 同种病毒的不同批次蛋白样品标准曲线通用性

将 BSA 蛋白样品的峰面积分别用不同批次 EV71 或 CA16 蛋白溶液制作的标准曲线计算, 得到相应的蛋白质含量值如表 4, 可见 0~20 $\mu\text{g/mL}$ 范围内 3 条标曲计算值

之间的 RSD 不大于 12.5%, 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内不大于 3% 表明不同标准曲线计算值之间偏差较小, 不同批次 EV71 或 CA16 蛋白溶液制作标准曲线可用于任意一批各自病毒蛋白含量的检测。

表 4 BSA 与 EV71、CA16 蛋白质含量($\mu\text{g/mL}$)换算值($n=6$)

蛋白样品	BSA 峰面积	566346	426245	195429	81559	62491	43633	25333	8766	1626
EV71	平均值	62.25	48.63	25.16	13.77	11.87	9.98	8.15	6.50	5.78
	RSD	1.14	1.46	2.82	5.15	5.97	7.10	8.70	10.92	12.27
CA16	平均值	61.31	47.69	24.23	12.84	10.93	9.05	7.22	5.56	4.80
	RSD	1.09	1.40	2.76	5.21	6.12	7.40	9.27	12.03	12.19

2.5 不同种病毒蛋白样品的标准曲线通用性

将 BSA 蛋白样品的峰面积分别用 EV71 和 CA16 蛋白溶液制作的标准曲线计算所得蛋白质含量计算相对偏差(表 5), 可见 2~10 $\mu\text{g/mL}$ 范围内不大于 16.5%, 10~20 $\mu\text{g/mL}$ 范围内不大于 9.5%, 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内不大于 4%, 表明不同标准曲线计算值之间偏差较小, 两种手足口病病

毒亚型蛋白样品的标准曲线可用于任意该两种病毒亚型蛋白含量的检测。

由表 6 可见同一峰面积 CA16 标准曲线的蛋白质含量计算值与 BSA 理论值偏差过大, 不可共用标准曲线; 但可用比值换算, 即 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内 BSA/CA16 比值比较接近约为 1.63, 4~20 $\mu\text{g/mL}$ 比值约为 1, 0~4 $\mu\text{g/mL}$

比值约为 0.5。

表 5 CA16 和 EV71 两组蛋白含量($n=6$)平均值比较

EV71(A)	CA16(B)	$(A-B)/A \times 100\%$
62.25	61.31	1.50
48.63	47.69	1.92
25.16	24.23	3.72
13.77	12.84	6.79
11.87	10.93	7.88
9.98	9.05	9.37
8.15	7.22	11.47
6.50	5.56	14.40
5.78	4.85	16.18

表 6 CA16 与 BSA 蛋白含量平均值($n=6$)换算比

CA16	BSA	BSA/CA16
61.31	100.00	1.63
47.69	80.00	1.68
24.23	40.00	1.65
12.84	20.00	1.56
10.93	15.00	1.37
9.05	10.00	1.11
7.22	8.00	1.11
5.56	4.00	0.72
4.85	2.00	0.41

3 讨论与结论

依据杨婷等对 CA16 病毒颗粒, 李国顺等对 EV71 病毒颗粒的 HPLC 纯度检测参数^[13-14], 结合本团队已有的相关研究^[12]确定了本检测方法的色谱条件, 本法操作简便, 不需任何化学反应步骤, 干扰因素少, 只需将样品注入仪器, 将峰面积值代入已绘制好的标曲即可计算所得。由于本研究检测条件稳定, 同属于二价手足口病的 EV71 或 CA16 两种亚型的蛋白样品, 其中某一种某一批的蛋白样品制备出的某一标准曲线可用于这两种亚型任意一批蛋白样品的计算, 不需要每次检测都要制作新的标准曲线。

本检测方法线性范围广, 准确度高, 本法绘制的标准曲线的范围可以覆盖原液(常量 0~100 $\mu\text{g/mL}$)和纯化液(微量 0~20 $\mu\text{g/mL}$)及浓缩液(> 100 $\mu\text{g/mL}$)等 EV71-CA16 二价手足口病(HFMD)灭活疫苗的各类中间品的蛋白质含量检测。

本检测方法相较于 Lowry 法和 BCA 法, 蛋白样品没有经过化学反应, 蛋白颗粒保持原有的结构, 样品的活性不受影响, 经 UV-HPLC 法检测后的样品依然可以收集出分离液, 经简单超滤浓缩离心管浓缩得到原蛋白样品, 这对于量少稀有的样品来说是一大优势。

本研究中使用的 UV-HPLC 法除适用于 EV71-CA16 二价手足口病(HFMD)灭活疫苗的各类中间品蛋白样品的定量检测外, 也可间接用于 BSA 样品的检测。我们猜想本法也可用于其它蛋白样品的检测, 仍可用一些其它种类的蛋白质样品进一步确定本法的适用范围。

参考文献

- [1] CABRAL LA, ALMEID J D, MEZA A C, *et al.* Hand, foot, and mouth disease: a case report [J]. Quintessence International, 1998, 29(3): 194.
- [2] YAN J J, SU I J, CHEN P F, *et al.* Complete genome analysis of enterovirus 71 isolated from an outbreak in Taiwan and rapid identification of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 by RT-PCR [J]. Journal of Medical Virology, 2001, 65(2): 331.
- [3] 马丽, 邹兴启. 口蹄疫灭活疫苗中蛋白质含量测定方法的比较 [J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(12): 41-45.
- [4] WHO. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. WHO Technical Report Series, No. 878 [R]. Geneva: WHO, 1998.
- [5] 王辉, 张月兰, 过琴媛, 等. 疫苗制品中 Vero 细胞残余蛋白含量检测方法的建立 [J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(12): 937-940.
- [6] 刘军. 食品中蛋白质凯氏定氮法测定比较 [J]. 中国食品安全, 2021(4): 145-147.
- [7] 姜黎, 蔡金燕. 双缩脲法与考马斯亮蓝染色法在乳制品饮料蛋白质含量测定中的应用 [J]. 粮油与饲料科技, 2023, (2): 201-203.
- [8] 卫辰, 骆鹏. 两种 Lowry 法检测百日咳疫苗原液蛋白含量的比较 [J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(5): 519-524.
- [9] 王丽, 王吟. BCA 法检测组分百日咳疫苗中间品蛋白含量的可行性评价 [J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33(9): 1048-1053.
- [10] 曹明翔. 三种蛋白含量测定试剂盒检测微量蛋白的性能比较 [J]. 实验室检测, 2024, 2(7): 126-130.
- [11] 张潇. 抗 EV71 病毒单克隆抗体及柯萨奇病毒病毒样颗粒的制备研究 [D]. 北京: 北京工业大学, 2015.
- [12] 曹明翔. HPLC-UV 法检测 EV71-CA16 二价手足口病灭活疫苗原液相关抗原纯度的方法建立与评价 [J]. 质量安全与检验检测, 2024, 34(2): 21-26.
- [13] 杨婷, 李华, 谢天宏, 等. 柯萨奇病毒 A 组 16 型不同纯化方法的比较研究 [J]. 中国病毒病杂志, 2015, 7(4): 293.
- [14] 李国顺, 郭林, 方玉松, 等. 肠道病毒 71 型类毒颗粒在汉逊酵母中的表达及其免疫原性 [J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(9): 906.