

重组带状疱疹gE抗原等电点(毛细管电泳法)检测方法的建立及初步应用

宋杰¹, 林明¹, 王魁¹, 杨利昂¹, 潘若文²

¹华兰生物疫苗股份有限公司分析部, 河南 新乡

²河南省生物医药产业研究院, 河南 新乡

收稿日期: 2024年12月4日; 录用日期: 2025年3月20日; 发布日期: 2025年3月28日

摘要

目的: 建立重组带状疱疹gE抗原等电点(isoelectric point, pI)的全柱成像毛细管等电聚焦电泳(capillary isoelectric focusing, cIEF)检测方法。方法: 通过优化重组带状疱疹gE抗原等电点检测过程中的两性电解质比例、蛋白质浓度、稳定剂比例参数, 建立重组带状疱疹gE抗原的等电点检测方法(cIEF法)。在此基础上, 对重组带状疱疹gE抗原进行脱糖酶处理后, 采用cIEF法检测等电点。结果: 优化后的检测条件为2 M尿素、0.35%甲基纤维素(methylcellulose, MC)、4%两性电解质、1%等电点标记物混合溶液作为样品缓冲液, 聚焦条件为1500 V 1 min, 3000 V 8 min。重组带状疱疹gE抗原经PNGase F酶脱糖后, 采用该方法分析等电点, 可得到峰型清楚且分离度高的图谱。结论: 本研究建立的cIEF方法适用于重组带状疱疹gE抗原的pI检测及分析, 可为重组带状疱疹gE抗原的表征以及相关疫苗研发和生产过程中的质量控制提供依据和参考。

关键词

VZV, 等电点, 毛细管等电聚焦电泳, 脱糖酶

Establishment and Preliminary Application of Isoelectric Point (Capillary Electrophoresis) Detection Method for Recombinant Herpes Zoster gE Antigen

Jie Song¹, Ming Lin¹, Kui Wang¹, Li'ang Yang¹, Ruowen Pan²

¹Analysis Department of Hualan Biological Vaccine Co., Ltd., Xinxiang Henan

²Henan Research Institute of Biomedical Industry, Xinxiang Henan

Received: Dec. 4th, 2024; accepted: Mar. 20th, 2025; published: Mar. 28th, 2025

文章引用: 宋杰, 林明, 王魁, 杨利昂, 潘若文. 重组带状疱疹 gE 抗原等电点(毛细管电泳法)检测方法的建立及初步应用[J]. 生物医学, 2025, 15(2): 443-451. DOI: 10.12677/hjbm.2025.152051

Abstract

Objective: To establish a full column imaging capillary isoelectric focusing (cIEF) detection method for recombinant herpes zoster gE antigen isoelectric point (pI). **Method:** By optimizing the parameters such as reagent ratio, final sample concentration, and sample stabilizer in the process of detecting recombinant herpes zoster gE antigen, a cIEF method for determining recombinant herpes zoster gE antigen was established. Based on this, the recombinant herpes zoster gE antigen was subjected to enzymatic digestion before cIEF detection. **Results:** The optimized method uses a mixed solution of 2 M urea, 0.35% methylcellulose (MC), 4% zwitterionic electrolyte, and 1% isoelectric point marker as the sample buffer, with focusing conditions of 1500 V for 1 min and 3000 V for 8 min. After PNGase F enzyme deglycosylation, this method can be used to analyze the isoelectric point of recombinant herpes zoster gE antigen, and a clear peak pattern and high separation degree can be obtained. **Conclusion:** The established cIEF method is suitable for pI detection and analysis of recombinant herpes zoster gE antigen, which can provide a basis for the characterization of recombinant herpes zoster gE antigen and a reference for quality control in the development and production of related vaccines.

Keywords

VZV, Isoelectric Point, Capillary Isoelectric Focusing Electrophoresis, Enzyme

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

带状疱疹(herpes zoster)是由水痘-带状疱疹病毒(Varicella-zoster virus, VZV)引起的严重危害人体安全的感染性疾病[1]-[3], 最常见的并发症是带状疱疹后神经痛(post-herpetic neuralgia, phn), 即在疱疹急性期后仍持续存在的疼痛, 可持续数月甚至数年, 严重影响患者生活质量, 主要对年龄超过 50 岁或免疫系统出现问题的人群带来极大威胁[4] [5]。

目前针对 VZV 最理想的防治手段是接种疫苗, 相较于一般药物, 疫苗主要用于预防疾病; 正因为疫苗受众的广泛性, 因此疫苗必须被证明其安全、有效和质量可控[6] [7]。gE 抗原是 VZV 病毒感染细胞表面表达最丰富的糖蛋白[8], 负责介导病毒在细胞间的传播, 是 VZV 病毒复制和组装的关键蛋白, 因此越来越多的疫苗研制机构与生产企业将 gE 抗原作为制备重组带状疱疹疫苗的重要抗原组分[9] [10]。

等电点检测是重组蛋白药物质量控制的关键项目, 反映了蛋白药物电荷与空间构象的均一性[11]。毛细管等电聚焦技术(capillary isoelectric focusing, cIEF)可将带不同电荷的异质体根据其等电点的不同进行聚焦分离, 是检测蛋白质等电点的最佳方法之一, 其具备分析耗时短、灵敏度及精密度较好的优点, 已广泛应用于生物制品的研发和质量控制[12], 其原理是具有涂覆聚合物内壁的毛细管在装载电解液运行时会产生电渗流, 电渗流会推动整个毛细管内的液体定向移动, 且各溶质在毛细管中在迁移到各自的 pI 时会变为中性形成聚焦的区带。本研究采用 cIEF 技术对两性电解质比例、样品稳定剂(尿素浓度)、蛋白浓度[13]-[15]等参数进行优化, 建立测定 gE 抗原等电点的方法并进行验证, 为 gE 抗原等电点的表征提供依据。

2. 材料与方法

2.1. 样品

重组带状疱疹 gE 抗原(批号: 202401、202402、202403)由华兰生物疫苗股份有限公司制备。

2.2. 主要试剂及仪器

尿素和亚氨基二乙酸(IDA)购自美国 Sigma 公司; Maurice cIEF 毛细管卡盒、pI marker (3.21、8.40)、1%和 0.5%甲基纤维素(Methylcellulose, MC)、iCE 电极液及 Maurice cIEF Fluorescence Calibration Standard 均购自美国 Protein simple 公司; 两性电解质 pharmalyte (3-10 和 5-8)购自 Cytiva 公司; PNGase F 酶购自 New England Biolabs 公司; Maurice 毛细管等电聚焦电泳仪(ICE280)购自美国 Protein simple 公司; TG16 台式高速冷冻离心机购自上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

2.3. 等电点检测方法(cIEF 法)

样品处理: 将重组带状疱疹 gE 抗原用 10 kd 超滤管置换除盐, 4℃, $12,000 \times g$ 离心 5 min, 用水置换 3 次后紫外法定量, 将蛋白稀释成 1.0 mg/mL。反应体系配制: 取两性电解质 pharmalyte 3-10 4 μL , 1% MC 溶液 35 μL , 等电点标记物 pI 3.21 和 pI 8.40 各 1 μL , 混匀后加入 34 μL 样品, 补加水至终体积为 100 μL 。同法制备空白试剂(用等体积缓冲液代替样品)。混匀后, 4℃, $10,000 \times g$ 离心 3 min, 取上清 80 μL 置于样品瓶中等待进样。等电点检测参数: 预聚焦电压 1500 V, 聚焦时间 1 min; 聚焦电压 3000 V, 聚焦时间 8 min。

2.4. cIEF 法检测条件优化

检测条件优化体现在: 两性电解质比例的优化, 配制不同反应体系, 使样品中两性电解质 pharmalyte 3-10 和 pharmalyte 5-8 的体积比分别为 4:0、2:2、1:3, 采用 2.3 项方法进行分析; 蛋白浓度的优化, 配制不同反应体系, 使样品蛋白终浓度分别为 1、2、4 mg/mL, 采用 2.3 项方法进行分析; 尿素浓度的优化, 配置不同反应体系, 使尿素终浓度分别为 0、2、4 M, 采用 2.3 项方法进行分析。

2.5. 方法验证

重复性: 取重组带状疱疹 gE 抗原, 按 2.4 项优化的条件进行等电点检测, 重复测定 6 次, 验证方法的重复性。

专属性: 将样品缓冲液作为空白对照, 以重组带状疱疹 gE 抗原作为待测样品, 按 2.4 项优化的条件进行等电点检测, 验证方法的专属性。

2.6. 方法的初步应用

重组带状疱疹 gE 抗原的检测: 取 3 批重组带状疱疹 gE 抗原, 按 2.4 项优化后的方法进行等电点检测。

重组带状疱疹 gE 抗原脱糖处理后检测: 对重组带状疱疹 gE 抗原进行脱糖处理后, 按 2.4 项优化后的方法进行检测。脱糖处理方法: 取 400 μL 的重组带状疱疹 gE 抗原用 10 k 超滤离心管进行超滤($13,000 \text{ rpm}$, 10 min, 4℃), 重复 2 次。收集膜上样品至离心管中, 加入 625 U 脱糖酶 PNGase F, 总体积为 100 μL , 混匀后 37℃ 孵育 20 小时, 即为脱糖处理样品。

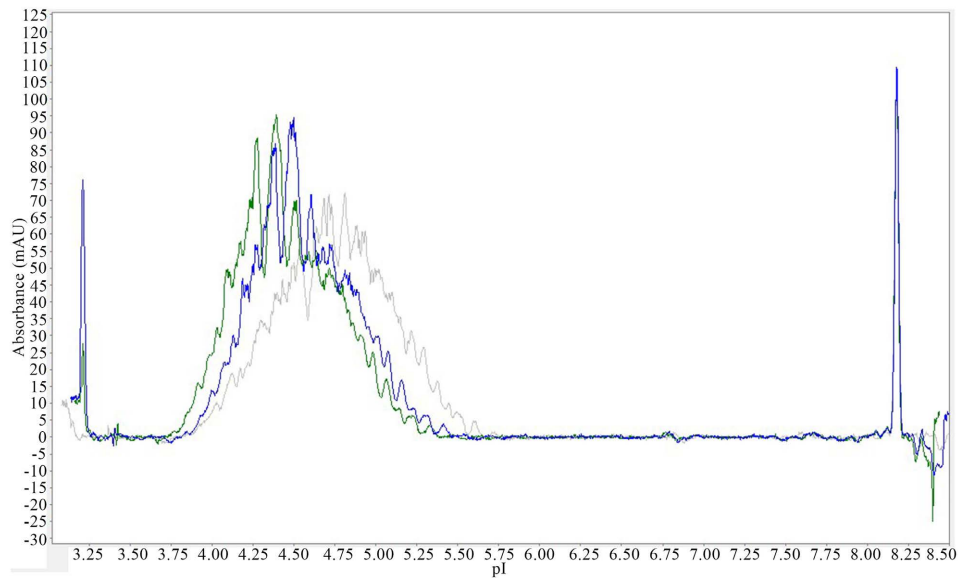
2.7. 数据分析

采用 Compass 软件采集并处理数据。

3. 结果

3.1. 方法的建立

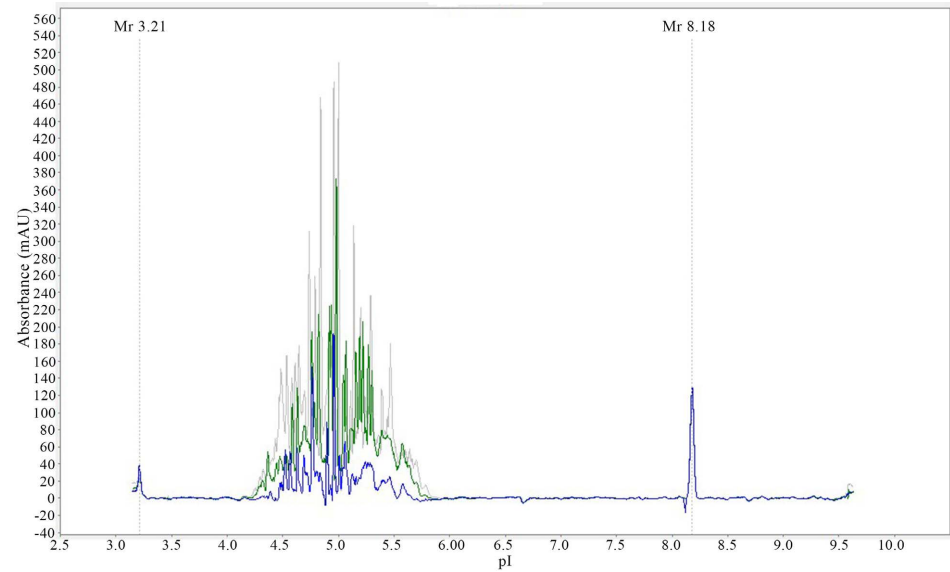
在两性电解质比例的选择:在两性电解质 pharmalyte 3-10:pharmalyte 5-8 体积比分别为 4:0、2:2、1:3 条件下,等电聚焦图谱峰型基本一致,各峰分离度并未发生明显改变,见图 1。因此选择两性电解质 pharmalyte 3-10:pharmalyte 5-8 体积比 4:0 作为最终条件,即只使用两性电解质 pharmalyte 3-10。



注: 1-蓝色谱图, 2-绿色谱图, 3-灰色谱图, 1、2、3 表示两性电解质 pharmalyte 3-10: pharmalyte 5-8 为体积比分别为 4:0、2:2、1:3。

Figure 1. cIEF graph of different amphoteric electrolyte ratio

图 1. 不同两性电解质比例的 cIEF 图谱



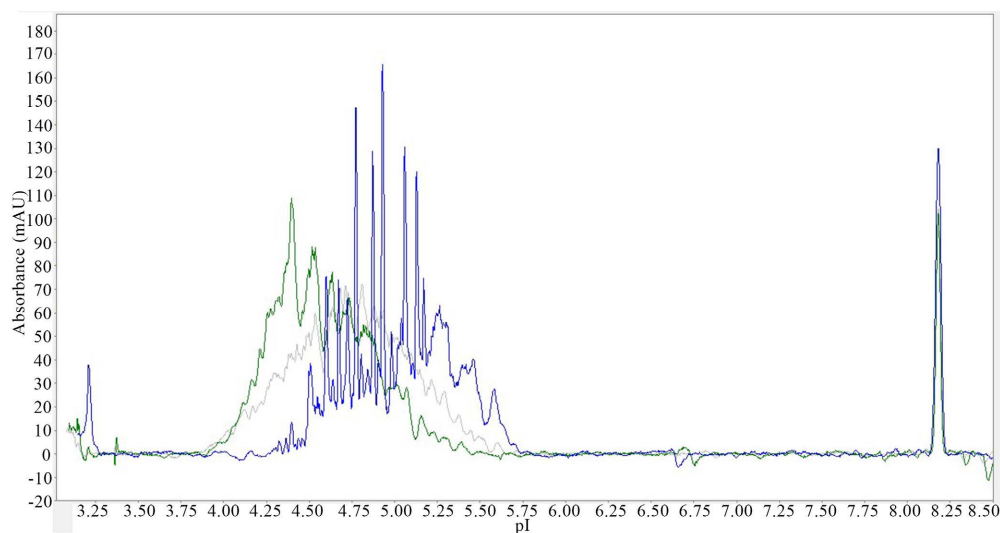
注: 1-蓝色谱图, 2-绿色谱图, 3-灰色谱图, 1、2、3 分别为蛋白浓度为 1、2、4 mg/mL。

Figure 2. cIEF spectra of samples with different protein concentrations

图 2. 不同蛋白浓度样品的 cIEF 图谱

蛋白浓度的选择：随着蛋白浓度的增加，样品会出现不同程度的凝集；等电点峰也会随蛋白浓度的增加而升高。见图 2，通过对比不同浓度的样品等电图谱，发现当样品浓度为 4 mg/mL 时，信号会超过毛细管电泳仪的紫外检测阈值(600 mAu)，同时考虑到蛋白在聚焦过程中易出现凝集造成峰分离不彻底，重复性差，综合考虑优先选择蛋白终浓度为 1 mg/mL 进行试验。

尿素浓度的选择：尿素可以有效地消除蛋白的凝集现象，因此在样品中添加尿素可以使等电点峰型可重复，而随着尿素浓度增加样品等电点峰的分离度降低。通过对比 0、2、4 M 尿素浓度结果，发现 2 M 时峰型较好，见图 3。因此选择尿素浓度为 2 M。

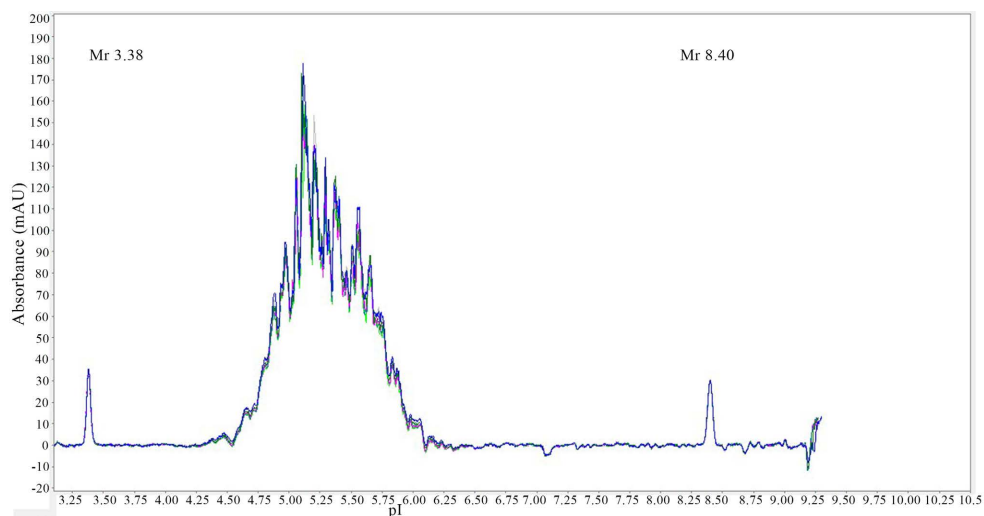


注：1-蓝色谱图，2-绿色谱图，3-灰色谱图，1、2、3 分别为尿素浓度为 0、2、4 M。

Figure 3. cIEF spectra of different urea concentrations

图 3. 不同尿素浓度的 cIEF 图谱

3.2. 方法验证



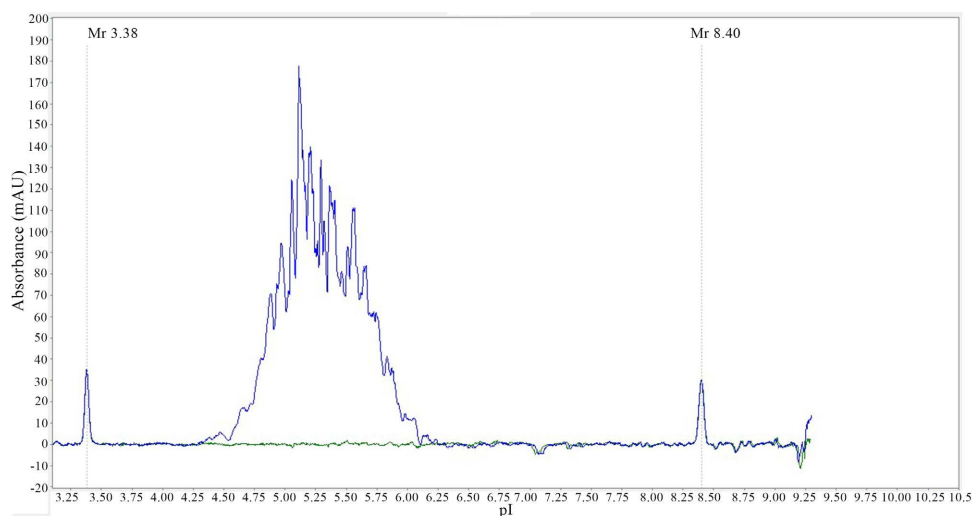
注：上图为同一样品进样 6 次。

Figure 4. cIEF graph for verification of repeatability

图 4. 重复性验证的 cIEF 图谱

重复性：取重组带状疱疹 gE 抗原(批号：202401)重复检测 6 次，pI 均在 4.5~6.2 范围内，且等电聚焦电泳图谱无明显变化，见图 4。表明方法重复性良好。

专属性：取重组带状疱疹 gE 抗原(批号：202401)和样品缓冲液进行专属性验证，样品缓冲液在 pI 3.38 和 pI 8.40 之间无紫外吸收峰，而重组带状疱疹 gE 抗原具备特征峰，表明样品缓冲液对重组带状疱疹 gE 抗原 pI 的测定无干扰，表明方法的专属性良好，见图 5。



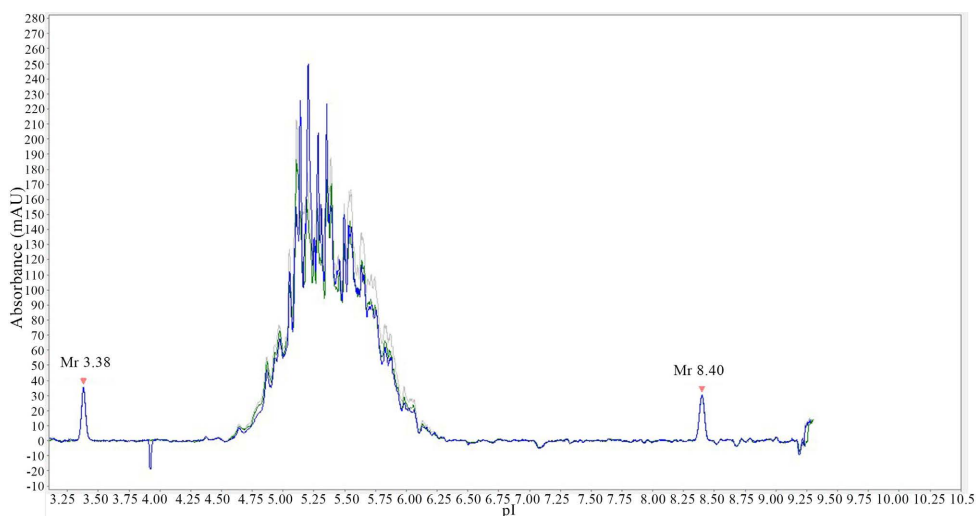
注：1-蓝色谱图，2-绿色谱图，1、2 分别为重组带状疱疹 gE 抗原和空白缓冲液。

Figure 5. cIEF graph for specific attribute verification

图 5. 专属性验证的 cIEF 图谱

3.3. 方法的初步应用

重组带状疱疹 gE 抗原的检测：取重组带状疱疹 gE 抗原(批号：202401、202402、202403) 3 批样品检测，等电点均在 4.5~6.2 之间，且等电聚焦图谱一致，见图 6。



注：1-蓝色谱图，2-绿色谱图，3-灰色谱图，1、2、3 分别为 202401、202402、202403 批重组带状疱疹 gE 抗原。

Figure 6. cIEF profile for pI detection of recombinant herpes zoster (gE antigen) samples

图 6. 重组带状疱疹(gE 抗原)样品 pI 检测的 cIEF 图谱

重组带状疱疹 gE 抗原脱糖处理后检测：考虑到 gE 抗原是一个糖基化的重组蛋白，糖基化可能会影响蛋白的等电点的检测，因此考虑在现有的方法上增加样品的脱糖处理，与未脱糖处理样品相比，脱糖处理后峰型以及分离度得到改善，可以检测到明显的主峰，其中主峰占比为 15.91%，分离度为 0.76。因此选用此方法分析有利于对样品进行质量控制，见图 7。

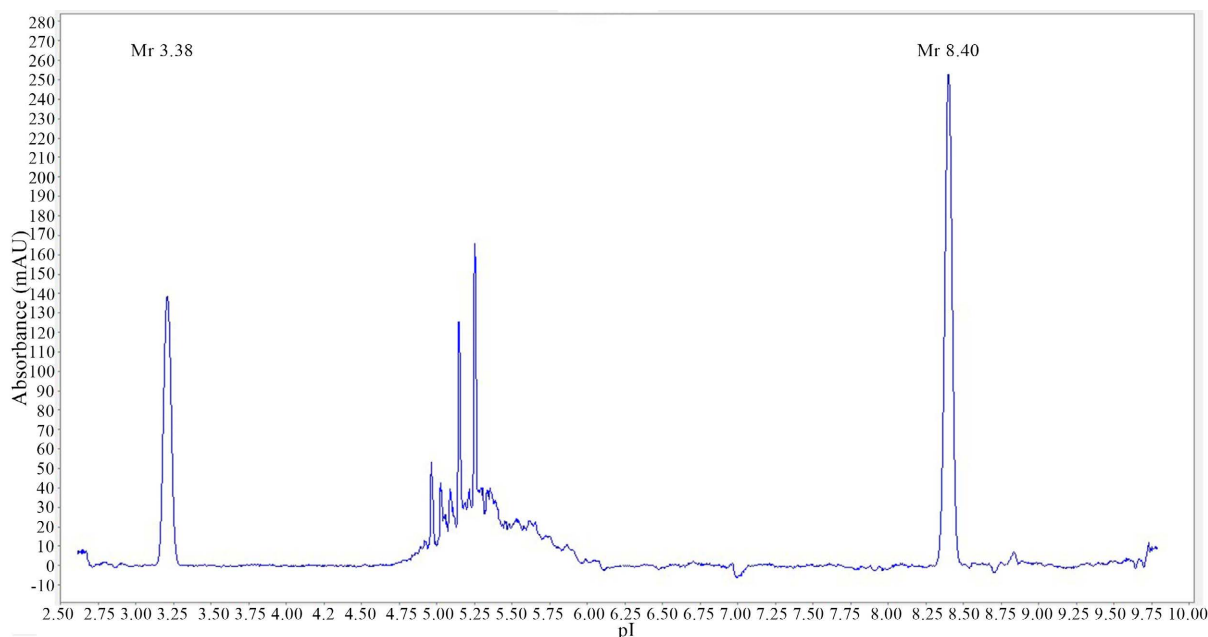


Figure 7. cIEF profile of pI detection after deglycosylation treatment of recombinant herpes zoster (gE antigen) samples
图 7. 重组带状疱疹(gE 抗原)样品脱糖处理后 pI 检测的 cIEF 图谱

4. 讨论与结论

本研究通过对蛋白浓度、两性电解质、样品稳定剂(尿素)等条件的探索，获得了 cIEF 法的主要参数及检测条件，建立了重组带状疱疹 gE 抗原 pI 的分析方法。

pI 是蛋白质重要的理化性质，对蛋白质药物的研究及开发有着重要意义，每种蛋白均有其特定的 pI。毛细管等电聚焦电泳法是一种根据蛋白质 pI 不同而在毛细管内分离的技术，相较于现有技术具有快速准确、高通量的优势，为国内外生物制药行业在蛋白类药物质量控制提供准确真实、快速高效的新途径[11][16][17]。

重组蛋白的糖基化修饰是一种重要的蛋白质翻译后修饰过程[18]，影响免疫细胞和免疫分子的结构与功能，从而影响机体对抗原的应答反应。发酵过程中细胞培养基的成分及含量变化、培养条件等因素的调整均可能引起糖基化修饰的差异，产生具有不同 pI 的电荷异质体[3][19]，极大影响重组蛋白的检测。cIEF 具有试剂用量小、分析速度快、结果准确等优点，已广泛用于蛋白质的分析，但将 cIEF 用于糖蛋白的分析较少[20]-[23]，本研究建立一种检测糖蛋白的等电点的方法并经过验证；同时发现对样品进行脱 N-糖苷键处理后各等电点峰分离度增加，峰型具有代表性，有利于 gE 抗原 pI 的检测，为后续重组类蛋白质质量标准的建立提供了参考。

综上所述，本研究建立了一种检测重组带状疱疹 gE 抗原等电点的方法，可以作为重组带状疱疹 gE 抗原等电点的检测标准。同时又提出一种新的思路，采用脱糖酶处理重组蛋白后使用 cIEF 法进行等电点的检测，为其他重组蛋白类制品等电点的检测提供了参考，对于生物技术药物质量控制及质量标准的提

升均具有重要意义。

参考文献

- [1] Schmader, K. (2018) Herpes Zoster [Published Correction Appears in Ann Intern Med. 2018 Oct 2;169(7): 516. doi: 10.7326/L18-0483]. *Annals of Internal Medicine*, **169**, ITC19-ITC31.
- [2] Pan, C.X., Lee, M.S. and Nambudiri, V.E. (2022) Global Herpes Zoster Incidence, Burden of Disease, and Vaccine Availability: A Narrative Review. *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy*, **10**.
<https://doi.org/10.1177/25151355221084535>
- [3] Patil, A., Goldust, M. and Wollina, U. (2022) Herpes Zoster: A Review of Clinical Manifestations and Management. *Viruses*, **14**, Article 192. <https://doi.org/10.3390/v14020192>
- [4] Rosamilia, L.L. (2019) Herpes Zoster Presentation, Management, and Prevention: A Modern Case-Based Review. *American Journal of Clinical Dermatology*, **21**, 97-107. <https://doi.org/10.1007/s40257-019-00483-1>
- [5] de Oliveira Gomes, J., Gagliardi, A.M., Andriolo, B.N., Torloni, M.R., Andriolo, R.B., Puga, M.E.D.S., et al. (2023) Vaccines for Preventing Herpes Zoster in Older Adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, No. 10, CD008858. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd008858.pub5>
- [6] Vetter, V., Denizer, G., Friedland, L.R., Krishnan, J. and Shapiro, M. (2017) Understanding Modern-Day Vaccines: What You Need to Know. *Annals of Medicine*, **50**, 110-120. <https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1407035>
- [7] Dubé, È., Ward, J.K., Verger, P. and MacDonald, N.E. (2021) Vaccine Hesitancy, Acceptance, and Anti-Vaccination: Trends and Future Prospects for Public Health. *Annual Review of Public Health*, **42**, 175-191. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-090419-102240>
- [8] Levin, M.J. and Weinberg, A. (2019) Immune responses to zoster vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, **15**, 772-777. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1560918>
- [9] Monslow, M.A., Elbashir, S., Sullivan, N.L., Thiriot, D.S., Ahl, P., Smith, J., et al. (2020) Immunogenicity Generated by mRNA Vaccine Encoding VZV Ge Antigen Is Comparable to Adjuvanted Subunit Vaccine and Better than Live Attenuated Vaccine in Nonhuman Primates. *Vaccine*, **38**, 5793-5802. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.062>
- [10] Kennedy, P., Mogensen, T. and Cohrs, R. (2021) Recent Issues in Varicella-Zoster Virus Latency. *Viruses*, **13**, Article 2018. <https://doi.org/10.3390/v13102018>
- [11] Stutz, H. (2023) Advances and Applications of Capillary Electromigration Methods in the Analysis of Therapeutic and Diagnostic Recombinant Proteins—A Review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **222**, Article ID: 115089. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115089>
- [12] 周朝明, 张高峡. 全柱成像毛细管等电聚焦电泳法测定 4 种生物制品等电点[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(4): 718-723.
- [13] Mack, S., Cruzado-Park, I., Chapman, J., Ratnayake, C. and Vigh, G. (2009) A Systematic Study in CIEF: Defining and Optimizing Experimental Parameters Critical to Method Reproducibility and Robustness. *Electrophoresis*, **30**, 4049-4058. <https://doi.org/10.1002/elps.200800690>
- [14] 武刚, 于传飞, 王文波, 等. 成像毛细管等电聚焦电泳测定单抗等电点的若干影响因素[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(10): 1727-1732.
- [15] Pergande, M. and Cologna, S. (2017) Isoelectric Point Separations of Peptides and Proteins. *Proteomes*, **5**, Article 4. <https://doi.org/10.3390/proteomes5010004>
- [16] 刘振东, 韩国华, 杨勇, 等. 全柱成像毛细管等电聚焦(iCIEF)技术分析重组人 IgG VEGFR: Fc-融合蛋白电荷异质性[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(3): 539-544.
- [17] Xu, T. and Sun, L. (2021) A Mini Review on Capillary Isoelectric Focusing-Mass Spectrometry for Top-Down Proteomics. *Frontiers in Chemistry*, **9**, Article 651757. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.651757>
- [18] Cumming, D.A. (1991) Glycosylation of Recombinant Protein Therapeutics: Control and Functional Implications. *Glycobiology*, **1**, 115-130. <https://doi.org/10.1093/glycob/1.2.115>
- [19] Parikh, R., Widenmaier, R. and Lecrenier, N. (2021) A Practitioner's Guide to the Recombinant Zoster Vaccine: Review of National Vaccination Recommendations. *Expert Review of Vaccines*, **20**, 1065-1075. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1956906>
- [20] Geurink, L., van Tricht, E., van der Burg, D., Scheppink, G., Pajic, B., Dudink, J., et al. (2021) Sixteen Capillary Electrophoresis Applications for Viral Vaccine Analysis. *Electrophoresis*, **43**, 1068-1090. <https://doi.org/10.1002/elps.202100269>

-
- [21] Liang, Y., Zhang, L. and Zhang, Y. (2020) Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry and Its Application to Proteomic Analysis. *Se Pu*, **38**, 1117-1124.
 - [22] Niu, D., Wu, Y. and Lian, J. (2023) Circular RNA Vaccine in Disease Prevention and Treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **8**, Article No. 341. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01561-x>
 - [23] Mack, S., Arnold, D., Bogdan, G., Bousse, L., Danan, L., Dolnik, V., *et al.* (2019) A Novel Microchip-Based Imaged CIEF-MS System for Comprehensive Characterization and Identification of Biopharmaceutical Charge Variants. *Electrophoresis*, **40**, 3084-3091. <https://doi.org/10.1002/elps.201900325>