



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101571549 B

(45) 授权公告日 2013. 08. 14

(21) 申请号 200810043318. 2

审查员 刘文瀚

(22) 申请日 2008. 04. 30

(73) 专利权人 上海泽润生物科技有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园  
区张衡路 1399 号

(72) 发明人 崔志英 史晋 刘伟旭 姚越

(74) 专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限  
公司 31224

代理人 王裕 吕伴

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2008006780 A1, 2008. 01. 17,

CN 101142233 A, 2008. 03. 12,

CN 1610831 A, 2005. 04. 27,

CN 1945335 A, 2007. 04. 11,

田博等. 酶标法相对定量检测 Vero 细胞疫苗  
中宿主细胞蛋白. 《中国生物制品学杂志》. 2005,  
第 18 卷 (第 2 期),

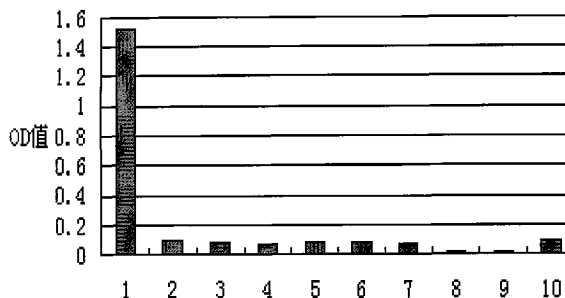
权利要求书3页 说明书14页 附图2页

(54) 发明名称

Vero 细胞 HCP 检测试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及 Vero 细  
胞 HCP 检测试剂盒及其应用。本发明所提供了  
Vero 细胞 HCP 检测试剂盒特异性强、灵敏度高,重  
复性好,不仅可以应用于甲肝病毒等非分泌型病  
毒疫苗,还可以用于其它 Vero 细胞生产疫苗制备  
过程中的质量控制与分析。



1. 一种 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,包括固相、位于固相中的抗体、标记物偶联抗体、蛋白标准品,其特征在于所述抗体为以 Vero 细胞裂解蛋白为抗原制备的抗体,所述蛋白标准品为 Vero 细胞裂解蛋白,所述 Vero 细胞裂解蛋白通过以下步骤制备:

a) 细胞培养收获:Vero 细胞接种到细胞培养瓶中,加入含 10% 小牛血清的 M199 培养液后置  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  培养,待细胞生长成致密单层后用胰蛋白酶消化 Vero 细胞进行传代扩增,置  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  培养 25 天收获;用胰蛋白酶进行消化,以 3500rpm、 $4^\circ\text{C}$  离心 30 分钟,收集细胞沉淀;

b) 细胞破碎:收获的 Vero 细胞用超声方法进行破碎,以 1400W 输出功率,细胞破碎;

c) 氯仿抽提蛋白:在破碎后的细胞液中加入等体积的氯仿,在往复式振荡器上以 300rpm 的速率振荡 20min,使氯仿与细胞液充分接触,待蛋白沉淀后,用 4000rpm、 $4^\circ\text{C}$ 、20min 离心,抽取上层的蛋白水相,向离心杯中补充等量的 0.01mol/L PBS pH7.8 反复提取 4 次;

d) 浓缩:合并所有的抽提液,用 MWC0100KD 的超滤膜进行浓缩;将超滤浓缩液加入到 1.0mol/L PB pH6.8 缓冲盐并使缓冲盐充分溶解;

e) 纯化:以 50cm/h 的流速经 Phenyl Sepharose6Fast Flow 型疏水凝胶吸附,吸附完毕用 1.0mol/L PB pH6.8 溶液淋洗 3CV 后,开始用 0.02mol/L PB pH6.8 溶液进行线性洗脱 5CV,收集电导值低于 48mS/cm 的洗脱液;收集的洗脱液用 MWC0100KD 的超滤膜进行浓缩,后上样于 Sepharose4Fast Flow 型分子筛凝胶,用 0.01mol/L PBS pH7.4 溶液以 45cm/h 的流速进行洗脱,收集第二洗脱峰;

f) 甲醛灭活:在收集峰中加入甲醛至终浓度为 1:4000,经  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12 天处理;

g) 再次浓缩:将灭活后处理液先经用 MWC0100KD 的超滤膜浓缩至 200ml,再用 50ml 离心管浓缩至 30ml,即可获得特异性 Vero 细胞裂解蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述抗 Vero 细胞裂解蛋白抗体为豚鼠抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 或兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG。

3. 根据权利要求 1 所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述标记物偶联抗体中标记物为酶、核素或荧光素中之一。

4. 根据权利要求 3 所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述酶选自过氧化物酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶、碱性磷酸酶或 6-磷酸葡萄糖脱氢酶中之一。

5. 根据权利要求 3 所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述核素选自  $^3\text{H}$ 、 $^{188}\text{Re}$  或  $^{131}\text{I}$  中之一。

6. 根据权利要求 3 所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述荧光素选自异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明或 3 价镧系螯合物中之一。

7. 一种 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,包括固相、位于固相中的抗体、生物素修饰的抗体以及标记物偶联的抗生物素蛋白,其特征在于所述抗体为以 Vero 细胞裂解蛋白为抗原制备的抗体,所述蛋白标准品为 Vero 细胞裂解蛋白,所述 Vero 细胞裂解蛋白通过以下步骤制备:

a) 细胞培养收获:Vero 细胞接种到细胞培养瓶中,加入含 10% 小牛血清的 M199 培养液后置  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  培养,待细胞生长成致密单层后用胰蛋白酶消化 Vero 细胞进行传代扩增,置  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  培养 25 天收获;用胰蛋白酶进行消化,以 3500rpm、 $4^\circ\text{C}$  离心 30 分钟,收集细胞沉

淀；

b) 细胞破碎:收获的 Vero 细胞用超声方法进行破碎,以 1400W 输出功率,细胞破碎；

c) 氯仿抽提蛋白:在破碎后的细胞液中加入等体积的氯仿,在往复式振荡器上以 300rpm 的速率振荡 20min,使氯仿与细胞液充分接触,待蛋白沉淀后,用 4000rpm、4℃、20min 离心,抽取上层的蛋白水相,向离心杯中补充等量的 0.01mol/L PBS pH7.8 反复提取 4 次；

d) 浓缩:合并所有的抽提液,用 MWC0100KD 的超滤膜进行浓缩;将超滤浓缩液加入到 1.0mol/L PB pH6.8 缓冲盐并使缓冲盐充分溶解；

e) 纯化:以 50cm/h 的流速经 Phenyl Sepharose6Fast Flow 型疏水凝胶吸附,吸附完毕用 1.0mol/L PB pH6.8 溶液淋洗 3CV 后,开始用 0.02mol/L PB pH6.8 溶液进行线性洗脱 5CV,收集电导值低于 48mS/cm 的洗脱液;收集的洗脱液用 MWC0100KD 的超滤膜进行浓缩,后上样于 Sepharose4Fast Flow 型分子筛凝胶,用 0.01mol/L PBS pH7.4 溶液以 45cm/h 的流速进行洗脱,收集第二洗脱峰；

f) 甲醛灭活:在收集峰中加入甲醛至终浓度为 1:4000,经  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12 天处理；

g) 再次浓缩:将灭活后处理液先经用 MWC0100KD 的超滤膜浓缩至 200ml,再用 50ml 离心管浓缩至 30ml,即可获得特异性 Vero 细胞裂解蛋白。

8. 根据权利要求 7 所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述抗 Vero 细胞裂解蛋白抗体为豚鼠抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 或兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG。

9. 根据权利要求 7 所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述标记物偶联的抗生物素蛋白中标记物为酶、核素或荧光素中之一。

10. 根据权利要求 7 所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述酶选自过氧化物酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶、碱性磷酸酶或 6-磷酸葡萄糖脱氢酶中之一。

11. 根据权利要求 7 所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述核素选自  $^3\text{H}$ 、 $^{188}\text{Re}$  或  $^{131}\text{I}$  中之一。

12. 根据权利要求 7 所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述荧光素选自异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明或 3 价镧系螯合物中之一。

13. 一种 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,包括固相、位于固相中的抗体、2,4-二硝基苯酚修饰的抗体以及标记物偶联的抗 2,4-二硝基苯酚抗体,所述抗体为以 Vero 细胞裂解蛋白为抗原制备的抗体,所述蛋白标准品为 Vero 细胞裂解蛋白,所述 Vero 细胞裂解蛋白通过以下步骤制备:

a) 细胞培养收获:Vero 细胞接种到细胞培养瓶中,加入含 10% 小牛血清的 M199 培养液后置  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  培养,待细胞生长成致密单层后用胰蛋白酶消化 Vero 细胞进行传代扩增,置  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  培养 25 天收获;用胰蛋白酶进行消化,以 3500rpm、4℃ 离心 30 分钟,收集细胞沉淀；

b) 细胞破碎:收获的 Vero 细胞用超声方法进行破碎,以 1400W 输出功率,细胞破碎；

c) 氯仿抽提蛋白:在破碎后的细胞液中加入等体积的氯仿,在往复式振荡器上以 300rpm 的速率振荡 20min,使氯仿与细胞液充分接触,待蛋白沉淀后,用 4000rpm、4℃、20min 离心,抽取上层的蛋白水相,向离心杯中补充等量的 0.01mol/L PBS pH7.8 反复提取 4 次；

d) 浓缩 :合并所有的抽提液,用 MWC0100KD 的超滤膜进行浓缩 ;将超滤浓缩液加入到 1.0mol/L PB pH6.8 缓冲盐并使缓冲盐充分溶解 ;

e) 纯化 :以 50cm/h 的流速经 Phenyl Sepharose6Fast Flow 型疏水凝胶吸附,吸附完毕用 1.0mol/L PB pH6.8 溶液淋洗 3CV 后,开始用 0.02mol/L PB pH6.8 溶液进行线性洗脱 5CV,收集电导值低于 48mS/cm 的洗脱液 ;收集的洗脱液用 MWC0100KD 的超滤膜进行浓缩,后上样于 Sepharose4Fast Flow 型分子筛凝胶,用 0.01mol/L PBS pH7.4 溶液以 45cm/h 的流速进行洗脱,收集第二洗脱峰 ;

f) 甲醛灭活 :在收集峰中加入甲醛至终浓度为 1 :4000,经  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、12 天处理 ;

g) 再次浓缩 :将灭活后处理液先经用 MWC0100KD 的超滤膜浓缩至 200ml,再用 50ml 离心管浓缩至 30ml,即可获得特异性 Vero 细胞裂解蛋白。

14. 根据权利要求 13 所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述抗 Vero 细胞裂解蛋白抗体为豚鼠抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 或兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG。

15. 根据权利要求 13 所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述标记物偶联的抗生物素蛋白中标记物为酶、核素或荧光素中之一。

16. 根据权利要求 15 所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述酶选自过氧化物酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶、碱性磷酸酶或 6-磷酸葡萄糖脱氢酶中之一。

17. 根据权利要求 15 所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述核素选自  $^3\text{H}$ 、 $^{188}\text{Re}$  或  $^{131}\text{I}$  中之一。

18. 根据权利要求 15 所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述荧光素选自异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明或 3 价镧系螯合物中之一。

19. 根据权利要求 1-18 中任一项所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,其特征在于所述固相可为 ELISA 试验平板或蛋白芯片载体。

20. 权利要求 1、7 或 13 中任一项所述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒在 Vero 细胞 HCP 检测中的应用。

## Vero 细胞 HCP 检测试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒及其应用。

### 背景技术

[0002] Vero 细胞(非洲绿猴肾细胞)是一种理想的疫苗生产基质,其遗传背景清楚,核型稳定,无外源因子污染,适合大规模培养,可用生物反应器生产,保证了疫苗大批量生产的均质性和安全性。多年来,国内外已成功的研制了多种采用 Vero 细胞生产的疫苗并获准上市,包括人用狂犬病纯化疫苗、脊髓灰质炎灭活(纯化)疫苗(IPV)、乙型脑炎灭活疫苗(JE)。采用 Vero 细胞生产的疫苗有两种生产方式:其一为分泌型病毒培养方式(病毒复制完成后,分泌到细胞外的培养液中);在分泌型病毒培养过程中,其病毒为利用细胞环境进行病毒复制,造成宿主细胞结构受损,导致细胞死亡,致使细胞破裂后释放大量的宿主细胞结构蛋白于培养液中;同时由于细胞生长增殖需要,在 Vero 细胞生长增殖的过程中会向培养液中释放大量的促细胞生长因子。其二为非分泌型病毒培养方式,即病毒在宿主细胞内培养(病毒复制完成后,病毒存在于宿主细胞内),非分泌型病毒如甲肝病毒等在宿主细胞内的培养过程中,病毒的复制不会对宿主细胞产生病变,因此,此类病毒的释放需要采取物理或化学的方法破碎细胞;在收获的病毒液中,除了含有细胞生长增殖过程中释放的促细胞生长因子外,还存在大量的由于细胞破碎而产生的成份更为复杂的细胞裂解蛋白。

[0003] 经过多年的临床应用,证明 Vero 细胞作为疫苗生产基质是安全、有效的。但与此同时,不能排除 Vero 细胞生产疫苗在理论上的潜在致肿瘤性风险。控制该风险的措施有两个:其一为控制 Vero 细胞的代次在 130 ~ 150 代,其二为降低 Vero 细胞残余 DNA 含量、Vero 细胞残余蛋白含量。鉴于目前国际上尚无特异性 Vero 细胞蛋白的检测手段,现仍以疫苗蛋白总量进行间接质量控制。(高恩明 et al. 国家食品药品监督管理局药品评审中心《关于 Vero 细胞疫苗残余物质的考虑》,20070112)。而这种情况下,残余宿主细胞蛋白(Host Cell Protein, HCP)中的某些组分有可能成为疫苗中的过敏原,WHO 于 1998 年组织制定了《使用动物细胞作为细胞基质生产生物制品规程》,要求将传代细胞 HCP 含量降低至可接受水平。这一举动表明 WHO 已开始关注 HCP 的含量及其对于疫苗安全性的影响。

[0004] 田博和丁志芬报道了定量检测疫苗中 Vero 细胞 HCP 的方法(田博、丁志芬,中国生物制品杂志. 2005, 18(2):159-161, 164);王辉等也报道了疫苗制品中 Vero 细胞残余蛋白的检测(王辉、张月兰、过琴媛等. 中国生物制品杂志. 2007, 20(2):937-939, 947)。但上述文章中所述 Vero 细胞残余蛋白检测方法仅针对分泌型病毒培养所制备的疫苗中残余宿主蛋白的检测,并不适用于非分泌型病毒培养所制备的疫苗中残余宿主蛋白的检测。因此,上述文献中所述在疫苗中 Vero 细胞 HCP 的检测方法尚存在不足。

[0005] 目前,国内外尚无检测 Vero 细胞 HCP 残余量的试剂盒出售。

### 发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题之在于提供了一种 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒及其应

用,以解决现有 Vero 细胞 HCP 的检测方法存在不足。

[0007] 为了解决上述技术问题,

[0008] 一方面,本发明公开了一种 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,包括固相、位于固相中的抗体、标记物偶联抗体、蛋白标准品,其特征在于所述抗体为抗 Vero 细胞裂解蛋白抗体,所述蛋白标准品为 Vero 细胞裂解蛋白。

[0009] 另一方面,本发明还公开了一种 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,包括固相、位于固相中的抗体、生物素修饰的抗体以及标记物偶联的抗生物素蛋白,其特征在于所述抗体为抗 Vero 细胞裂解蛋白抗体,所述蛋白标准品为 Vero 细胞裂解蛋白。

[0010] 另一方面,本发明还公开了一种 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒,包括固相、位于固相中的抗体、2,4-二硝基苯酚修饰的抗体以及标记物偶联的抗 2,4-二硝基苯酚蛋白,其特征在于所述抗体为抗 Vero 细胞裂解蛋白抗体,所述蛋白标准品为 Vero 细胞裂解蛋白。

[0011] 在一些实施方案里,所述标记物偶联抗体中标记物为酶、核素、荧光素。

[0012] 所述酶选自过氧化物酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶、碱性磷酸酶及 6-磷酸葡萄糖脱氢酶。

[0013] 所述核素选自  $^3\text{H}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{131}\text{I}$ 。

[0014] 所述荧光素选自异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明、3 价镧系螯合物如铕 ( $\text{Eu}^{3+}$ )、铽 ( $\text{Tb}^{3+}$ )、铈 ( $\text{Ce}^{3+}$ ) 等。

[0015] 本发明所述试剂盒,根据需要也可包含用于检测上述标记物偶联的(或标记的)抗生物素蛋白或标记物偶联的(或标记的)抗 2,4-二硝基苯酚蛋白的试剂。

[0016] 在实施方式里,在所述标记物为酶时,本发明试剂盒还包括辅助试剂,包括酶联反应底物溶液、显色液、反应终止液和清洗缓冲液。

[0017] 一种辅助试剂配制方法如下:

[0018] 1. 底物溶液:磷酸-柠檬酸缓冲液 (pH5.0) 配制的 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;

[0019] 2. 显色液:0.1mg/ml TMB 甲醇溶液. 或 0.0013mol/L TMB 盐酸盐溶液;

[0020] 3. 反应终止液:2mol/L 硫酸;

[0021] 4. 清洗缓冲液:PBS 溶液。

[0022] 另一方面,本发明还提供所述 Vero 细胞 HCP 检测盒在检测 Vero 细胞 HCP 残余量中的应用。

[0023] 其应用步骤如下:

[0024] 提取样本;

[0025] 采用上述 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒检测;

[0026] 分析结果。

[0027] 本发明所提供了 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒特异性强、灵敏度高,重复性好,不仅可以应用于甲肝病毒等非分泌型病毒疫苗,还可以用于其它 Vero 细胞生产疫苗制备过程中的质量控制与分析。

## 附图说明

[0028] 图 1. Vero 细胞裂解蛋白 SDS-PAGE 银染图

[0029] 图 2. 本发明检测试剂盒的 Vero 细胞裂解蛋白标准曲线。

[0030] 图 3. 本发明检测试剂盒的特异性试验。

## 具体实施方式

[0031] 目前, Vero 细胞是被接受并被批准用于生产适用于疫苗制造的传代猴肾细胞系, 其中所述涉及人用疫苗包括人用狂犬病纯化疫苗、脊髓灰质炎灭活疫苗 (IPV)、乙型脑炎灭活疫苗 (JE)、甲型肝炎灭活疫苗 (HAV), 上述疫苗的生产工艺均为本技术领域人员所公知, 如甲型肝炎灭活疫苗 (HAV) 的 Vero 细胞生产工艺可参考中国专利号 ZL 0210685.9 中的描述。

[0032] 本发明中, Vero 细胞, 保藏号为 ATCC CCL-81, 如 Kistner 等人 (疫苗 (Vaccine). 1998, 16 :960-968) 或 W096/15231 中所描述的, 细胞适应于生长在有血清、无血清或无血清和蛋白质的培养基中。Vero 细胞培养和所涉及试剂均为本技术领域人员所公知, 可参考美国专利号 4, 783, 407 和 W02003/049767 中的描述。对于在无血清培养基中的生长, 使用补充有无机盐、氨基酸、碳酸氢钠 (2g/L) 和酵母或大豆提取物 (1-10g/L) 的 DMEM HAM' sF12 基本培养基或其它培养液。

[0033] 本发明中所述 Vero 细胞裂解蛋白标准品产物亦经由化学的 (例如有机溶剂)、酶促的 (例如溶菌酶以及 EDTA)、机械的、或是物理细胞破碎方法 (例如菌化作用、超音波振荡、高压均化、摩擦搅动)。

[0034] 本发明中所述 Vero 细胞裂解蛋白标准品产物的纯化可用多种方法进行, 以有利于产物纯化或是去除非需要的污染物。一种方法为固-液相分离 (例如离心/沉淀、萃取、过滤)。另一种方法是浓缩 (例如蒸发、超滤、吸附、沉淀)。再一种方法为层析法 (例如分子筛层析法、离子交换色层分析法、色层聚集法、疏水交互层析法、亲和层析法、金属离子螯合层析法、共价层析法)。本领域技术人员容易实施这些技术。若有需要, 也可以应用杀菌技术, 例如过滤或加热或照射 (有关蛋白质纯化的更多资讯请参见 RatledgeC, KristlansenB (2001) Basic biotechnology, 2nd ed. Cambridge University press, Cambridge, U. K.)。

[0035] 本发明中所述 Vero 细胞裂解蛋白标准品或抗原, 包括但不限于下列一种制备工艺:

[0036] 1. 细胞培养收获: 取工作细胞库中的 1 支 Vero 细胞株细胞管, 将细胞接种到细胞培养瓶中, 加入含 10% 小牛血清的 199 培养基适宜的培养液后置  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养。待复苏细胞生长成致密单层后用胰酶消化 Vero 细胞进行传代扩增, 置  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 25 天收获。用胰酶进行消化, 以 3500rpm、 $4^{\circ}\text{C}$  离心 30 分钟, 收集细胞沉淀。作为裂解蛋白制备样品源备用。

[0037] 2. 细胞破碎: 收获的 Vero 细胞用超声方法进行破碎, 以 1400W 输出功率, 细胞破碎至无完整细胞结构。

[0038] 3. 氯仿抽提蛋白: 在破碎后的细胞液中加入等体积的氯仿, 在往复式振荡器上以 300rpm 的速率振荡 20min, 使氯仿与细胞液充分接触, 待细胞碎片沉淀后, 用 4000rpm、 $4^{\circ}\text{C}$ 、20min 离心, 抽取上层的蛋白水相, 向离心杯中补充等量的 0.01mol/L PBS (pH7.8) 反复提取 4 次。

[0039] 4. 浓缩: 合并所有的抽提液, 用 MWCO 100KD 的超滤膜进行浓缩; 超滤浓缩液中加入 PB 缓冲盐, 并使缓冲盐充分溶解, PB 终浓度为 1.0mol/L、pH6.8。

[0040] 5. 纯化: 以 50cm/h 的流速经 Phenyl Sepharose 6Fast Flow 型疏水凝胶吸附,

吸附完毕用 1.0mol/L PB(pH6.8) 溶液淋洗 3 管柱体积 (column volume, CV) 后,开始用 0.02mol/L PB(pH6.8) 溶液进行线性洗脱 5 管柱体积 (column volume, CV),收集电导值低于 48ms/cm 的洗脱液;收集的洗脱液用 MWCO 100KD 的超滤膜进行浓缩,然后上样于 Sepharose 4 Fast Flow 型分子筛凝胶,用 0.01mol/L PBS(pH7.4) 溶液以 45cm/h 的流速进行洗脱,收集第二洗脱峰。

[0041] 6. 再次浓缩:将收集液先经用 MWCO 100KD 的超滤膜浓缩至 200ml,再用 50ml、MWCO100KD 超滤离心管浓缩至 30ml,即可获得特异性 Vero 细胞裂解蛋白 (Vero 细胞裂解蛋白标准品或抗原)。其含多种蛋白组分,分子量范围在 55KD、11KD 处及 170KD ~ 72KD、34 ~ 17KD 之间。

[0042] 抗体

[0043] 如本文所用,所说“抗 Vero 细胞裂解蛋白抗体”是指将上述 Vero 细胞裂解蛋白作为抗原制备得到的抗体。该抗体与 Vero 细胞裂解蛋白具有特异性结合能力,本抗体为多克隆抗体。

[0044] 抗 Vero 细胞裂解蛋白抗体的制备可通过以 Vero 细胞裂解蛋白为抗原,可以通过以下方法获得相应的各种抗体,但不只限于下列方法。

[0045] 如兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 和豚鼠抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG,其制备方法如下:

[0046] 1) 免疫三只家兔,初次免疫每只家兔用 0.5mg 实施例 1 制备的 Vero 细胞裂解蛋白加入等体积福氏完全佐剂,乳化充分后,背部皮下注射 6 ~ 8 点。4 周后第二次免疫:用 0.5mg 纯化 Vero 细胞裂解蛋白加入等体积福氏不完全佐剂,乳化充分后,皮下、肌肉多点注射。第二次免疫 10 天后同法进行第三次免疫。最后于第三次免疫 2 周后进行第四次免疫,一周后采血;

[0047] 免疫三只豚鼠,初次免疫每只豚鼠用 0.2mg 实施例 1 制备的 Vero 细胞裂解蛋白加入等体积福氏完全佐剂,乳化充分后,在背部皮下注射 5 ~ 6 点,每点 0.1ml。2 周后第二次免疫:每只豚鼠用 0.4mg 纯化 Vero 细胞裂解蛋白加入等体积福氏不完全佐剂,乳化充分后,皮下多点注射。第二次免疫 10 天后同法进行第三次免疫。最后于第三次免疫 2 周后进行第四次免疫,一周后采血;

[0048] 2) 分别选择两种动物效价较高的抗血清进行纯化;

[0049] 3) 纯化后效价检测。

[0050] IgG 纯化可采用硫酸铵盐析、辛酸 - 硫酸铵法、Protein-A 亲和柱层析等方法。

[0051] 在本发明中,“效价”采用终末效价,即是能检测到阳性抗体的血清最大稀释度来表示。

[0052] “标记物偶联抗体”(或又称“标记的抗体”)

[0053] 正如本领域技术人员所公知的,采用过氧化物酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶、碱性磷酸酶及 6-磷酸葡萄糖脱氢酶等酶标记(或偶联)、荧光标记(或偶联)或用放射性同位素标记(或偶联),可以使纯化的抗体定量化,将这样的抗体称其为“标记物偶联抗体”或“标记的抗体”。如采用酶标记抗体时,该酶在合适的底物存在下进行反应时,将酶联反应生成物作为标记物,可定量或定性检测与抗体特异性结合的抗原。另外,应用荧光标记和放射性同位素标记抗体时,将荧光和放射活性作为标记物时,也可定量或定性检测与抗体特异性结合

的抗原。

[0054] 在“标记物偶联抗体”或“标记的抗体”中进一步包含通过生物素、2,4-二硝基苯酚等修饰的抗体。生物素与抗生物素蛋白特异地结合,而2,4-二硝基苯酚与抗2,4-二硝基苯酚蛋白特异地结合。进而,上述标记的抗体可通过酶、核素或荧光素标记的抗生物素蛋白和抗2,4-二硝基苯酚蛋白进行定量或定性测定。

[0055] 上述标记的抗体可通过生物素标记的试剂(NHS-LC-Biotin,Pierce公司)和/或如带有偶联剂的过氧化物酶(Maleimide activated HRP,Pierce公司)与抗体反应制得。

[0056] 如本文所用,“固相”是指能用本发明的方法在其上对多个液体样品进行分别检验的任何固体基质,如ELISA试验平板、蛋白芯片载体如薄膜、玻璃片等。如本文所用,固相的“反应孔”是指固相上作为平板样品接受区的范围。典型的固相的反应孔,是通过在平板表面形成凹陷来得到的,该凹陷足够接收并容纳样品体积和检测过程中任一步中所加入的缓冲液或洗涤液的体积。如本文所用,对于靶分子的“测量”,是指检测、定量或者测定某一分析物或靶分子的量。

[0057] 检测方式

[0058] 抗体是许多应用于医学、兽医学和其它领域的检测技术中的关键试剂。这类测定包括许多常规使用的免疫测定技术,例如蛋白芯片、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫组织化学(IHC)和免疫荧光(IF)测定。这些技术的一般指导,参见Ausubel等(1987)的“Current Protocols in Molecular Biology”John Wiley and Sons, New York, N. Y. 另外,免疫测定也可是一种用来观测组织样品中的免疫组织化学(IHC)染色或免疫荧光(IF)方法。参见“Principles and Practice of Immunoassay”(1991) Christopher P. Price 和 David J. Neoman, Stockton Press, New York, N. Y.

[0059] 以下是对本发明的分析方法(免疫酶分析法)的详细说明,所述分析方法通过使用针对待测的特定分子形式的Vero细胞裂解蛋白多克隆抗体,来测定如疫苗样品等中总的(非复合的加上与抗体复合的)或游离的(非复合的)Vero细胞裂解蛋白量。

[0060] 1. 平板包被:用抗Vero细胞裂解蛋白抗体,以最佳浓度包被于试验平板的反应孔的表面。最佳抗体浓度是通过用已知浓度的Vero细胞裂解蛋白绘制一条标准曲线来确定的,该曲线在所要求的有效浓度范围中具有所要求的灵敏度和精确度。对于Vero细胞裂解蛋白,本试剂盒可以检测的有效Vero细胞裂解蛋白浓度范围为62.5ng/ml到4000ng/ml。本领域的普通技术人员,可以方便地确定在所要求范围内是否具有合适灵敏度和精确度,而无须进行多余的实验。

[0061] 2. 平板洗涤:将包被溶液倒去,加入洗涤缓冲液(每孔大约400微升)然后倒去。按要求将这个洗涤循环重复多次。洗涤缓冲液可选为0.01mol/L磷酸缓冲液(0.0027mol/L氯化钾,0.137mol/L氯化钠,pH7.4,含有0.01% w/v TritonX-100)。

[0062] 3. 平板封闭:将含有蛋白质和去垢剂封闭缓冲液(含1% BSA/0.1% Triton X-100的包被缓冲溶液)加入反应孔。平板可以此形式储存。

[0063] 4. 样品和标准品的加入:平板按上述方式进行洗涤。

[0064] 向平板反应孔内分别加入标准品与待测样本各100 $\mu$ l,然后每孔分别加入偶联物试剂50 $\mu$ l,轻轻混合15秒后置37 $^{\circ}$ C孵育60分钟,丢弃反应液,用缓冲液清洗反应板5次,吸干多于水分,向反应孔内加入50 $\mu$ l显色液,置于37 $^{\circ}$ C孵育15分钟,终止反应。将反应板

置于酶标仪上读取光密度值。每一孔内成色反应不同,光密度值也不同。

[0065] 5. 用于定量复合物显色的合适酶底物的例子有:用于碱性磷酸酶的硝基-苯磷酸,或用于辣根过氧化物的四甲基联苯胺磺酸盐(TMBS)。显色的程度可通过吸光度单位(AU,如果是对硝基酚,读取405nm的吸光度;如果是TMBS,读取450nm的吸光度)读出,可以作为测试样品中HCP的含量的指标,其确切浓度可以通过读取测试样品的吸光度、再参考由HCP标准品所作出的标准曲线来换算得出。

[0066] 6. 读数当得到足够检测信号时,使用如全波长酶标仪或荧光酶标仪等仪器对信号进行测量。

[0067] 7. 数据处理用已知浓度的Vero细胞裂解蛋白标准溶液所获得的检测信号,来建立一条校正曲线。该校正曲线用于换算出试验样品中Vero细胞裂解蛋白的浓度。

[0068] 以下结合具体实施例,进一步阐明本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。比例和百分比基于重量或体积,除非特别说明。

[0069] 材料来源:

[0070] Vero细胞工作种子细胞:ATCC系列号为No:CCL-81

[0071] 试验动物

[0072] 家兔(普通级)来源于上海普欣生物公司

[0073] 豚鼠(清洁级)来源于中国科学院上海实验动物中心

[0074] 主要仪器试剂:

[0075] 细胞超声破碎仪:SONICS VCF1500,最大输出功率为1500W;超滤器:Pellicon2 Cassette Filter;Biomax-100A(MWCO=100KD)(Millipore公司);超滤浓缩器,(MWCO=100KD)(Millipore公司);色谱纯化仪:ÄKTA Pilot(GE Healthcare公司);色谱柱:BPG 140/950;INdEX 140/500(GE Healthcare公司);纯化介质:Phenyl Sepharose 6 Fast Flow型疏水凝胶(GE Healthcare公司);Sepharose 4 Fast Flow型分子筛凝胶(GE Healthcare公司);Protein-A亲和层析柱、辣根过氧化物酶(HRP)(Sigma公司);酶标板(Costar公司);酶标仪,Thermo Multiskan MK3型;小牛血清购自兰州民海生物技术有限公司,批号:051203;细胞培养液为199培养基(GIBCO);牛血清白蛋白(BSA,Fraction V),Calbiochem公司制造,怡成生物科技有限公司分装;羊抗兔-HRP、羊抗豚鼠-HRP均购自KPL公司;卵清蛋白(Albumin from chicken egg white),sigma公司制造;甲型肝炎病毒(HAV),Hepatitis A Virus Strain pHM175,10.81ug/ml购自BIODESIGN International;抗HAV-IgG标准品,75IU/ml,购自中国药品生物制品检定所;胰酶,BD公司制造;水解乳蛋白,GIBCO公司制造;Proclin 300;Supelco公司制造;TMB盐酸盐,购自苏州新区贝克精细化学品有限公司;

[0076] 实施例1:Vero细胞裂解蛋白的制备

[0077] 制备方法:

[0078] 1. 细胞培养收获:取工作细胞库中的1支Vero细胞株细胞管,将细胞接种到细胞培养瓶中,加入含10%小牛血清的199培养液后置 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养。待复苏细胞生长成致密单层后用胰酶消化Vero细胞进行传代扩增,置 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养25天收获。用胰酶进行消化,以3500rpm、 $4^\circ\text{C}$ 离心30分钟,收集细胞沉淀。作为裂解蛋白制备样品源备用。

[0079] 2. 细胞破碎裂解:收获的 Vero 细胞用超声方法进行破碎裂解,以 1400W 输出功率,细胞破碎至无完整细胞结构。

[0080] 3. 氯仿抽提蛋白:在破碎后的细胞液中加入等体积的氯仿,在往复式振荡器上以 300rpm 的速率振荡 20min,使氯仿与细胞液充分接触,待细胞碎片沉淀后,用 4000rpm、4℃、20min 离心,抽取上层的蛋白水相,向离心杯中补充等量的 0.01mol/L PBS (pH7.8) 反复提取 4 次。

[0081] 4. 浓缩:合并所有的抽提液,用 MWC0 100KD 的超滤膜进行浓缩;超滤浓缩液中加入 PB 缓冲盐,并使缓冲盐充分溶解,PB 终浓度为 1.0mol/L、pH6.8。

[0082] 5. 纯化:以 50cm/h 的流速经 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 型疏水凝胶吸附,吸附完毕用 1.0mol/L PB (pH6.8) 溶液淋洗 3CV 后,开始用 0.02mol/L PB (pH6.8) 溶液进行线性洗脱 5CV,收集电导值低于 48mS/cm 的洗脱液;收集的洗脱液用 MWC0 100KD 的超滤膜进行浓缩,后上样于 Sepharose 4 FastFlow 型分子筛凝胶,用 0.01mol/L PBS (pH7.4) 溶液以 45cm/h 的流速进行洗脱,收集第二洗脱峰。

[0083] 6. 再次浓缩:将收集液先经用 MWC0 = 100KD 的超滤膜浓缩至 200ml,再用 50ml (MWC0 = 100KD) 超滤离心管浓缩至 30ml,即可获得特异性 Vero 细胞裂解蛋白 (Vero 细胞裂解蛋白标准品或 Vero 细胞 HCP)。

[0084] 实验结果:用 Lowry 法测得 Vero 细胞裂解蛋白浓度为 540  $\mu$ g/ml,本发明的相关实验数据见以下列表。

[0085] 表 1 各纯化工艺阶段样品蛋白含量变化表

[0086]

| 工艺阶段               | Vero 细胞破碎 | 蛋白抽提  | 浓缩    | 疏水纯化  | 分子筛层析 |
|--------------------|-----------|-------|-------|-------|-------|
| 体积 (ml)            | 2300      | 10600 | 2250  | 12286 | 2543  |
| 蛋白含量 ( $\mu$ g/ml) | 17690     | 2137  | 3779  | 192   | 16    |
| Vero 细胞蛋白去除率       | -         | 44.3% | 79.1% | 94.2% | 99.9% |

[0087] SDS-PAGE 电泳、银染,结果参见图 1,1:标准分子量蛋白;2:步骤 4 的未纯化 Vero 细胞裂解蛋白;3:Vero 细胞裂解蛋白,结果表明经过纯化得到的 Vero 细胞裂解蛋白,含多种蛋白组分,分子量范围为 55KD、11KD 处及 170KD ~ 72KD、34 ~ 17KD 之间。

[0088] 实施例 2Vero 细胞裂解蛋白抗体制备

[0089] 1. 免疫家兔:

[0090] 免疫三只家兔,初次免疫每只家兔用 0.5mg 实施例 1 制备的 Vero 细胞裂解蛋白加入等体积福氏完全佐剂,乳化充分后,背部皮下注射 6 ~ 8 点。4 周后第二次免疫:用 0.5mg 实施例 1 制备的 Vero 细胞裂解蛋白加入等体积福氏不完全佐剂,乳化充分后,皮下、肌肉多点注射。第二次免疫 10 天后同法进行第三次免疫。最后于第三次免疫 2 周后进行第四次免疫,一周后采血,并测定效价。

[0091] 表 2 免疫兔血清效价

[0092]

| 家兔 | 血清体积 (ml) | 效价                |
|----|-----------|-------------------|
| 1  | 35        | 1:10 <sup>6</sup> |
| 2  | 40        | 1:10 <sup>6</sup> |
| 3  | 41        | 1:10 <sup>6</sup> |

[0093] 2. 免疫豚鼠：

[0094] 免疫三只豚鼠，初次免疫每只豚鼠用 0.2mg 实施例 1 制备的 Vero 细胞裂解蛋白加入等体积福氏完全佐剂，乳化充分后，在背部皮下注射 5 ~ 6 点，每点 0.1ml。2 周后第二次免疫：每只豚鼠用 0.4mg 实施例 1 制备的 Vero 细胞裂解蛋白加入等体积福氏不完全佐剂，乳化充分后，皮下多点注射。第二次免疫 10 天后同法进行第三次免疫。最后于第三次免疫 2 周后进行第四次免疫，一周后采血，并测定效价。

[0095] 表 3 免疫豚鼠血清效价

[0096]

| 豚鼠 | 血清体积 (ml) | 效价                |
|----|-----------|-------------------|
| 1  | 5         | 1:10 <sup>5</sup> |
| 2  | 4         | 1:10 <sup>5</sup> |
| 3  | 5.5       | 1:10 <sup>5</sup> |

[0097] 3. 抗血清纯化：

[0098] 分别选择上述步骤中两种动物效价较高的抗血清进行纯化。用市售预装 Protein-A Sepharose affinity column 进行亲和层析，得到抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG，测定 280nm 和 260nm 吸光度。计算蛋白含量： $C(\text{mg/ml}) = 1.45 \times \text{OD}_{280\text{nm}} - 0.74 \times \text{OD}_{260\text{nm}}$ 。

[0099] 表 4 纯化后抗体蛋白含量

[0100]

|       | OD <sub>280nm</sub> | OD <sub>260nm</sub> | 稀释倍数 | 蛋白含量 mg/ml |
|-------|---------------------|---------------------|------|------------|
| 1#豚鼠抗 | 0.226               | 0.163               | 20   | 4.109      |
| 2#豚鼠抗 | 0.208               | 0.154               | 20   | 3.722      |
| 3#豚鼠抗 | 0.196               | 0.149               | 20   | 3.449      |
| 1#兔抗  | 0.204               | 0.148               | 20   | 3.696      |
| 2#兔抗  | 0.215               | 0.156               | 20   | 3.895      |
| 3#兔抗  | 0.182               | 0.141               | 20   | 3.163      |

[0101] 4. 纯化后抗体效价检测：

[0102] 采用间接 ELISA 法检测，用碳酸缓冲液 (0.05mol/L CB, pH9.6) 将实施例 1 制备的 Vero 细胞裂解蛋白稀释至 10 μg/ml，100 μl/孔 包被，4℃ 过夜。次日用 PBS 洗涤 2 次，加入 2% BSA 封闭，125 μl/孔，室温 2h，PBS 洗涤二次。将步骤 3 中抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 分别稀释至 1mg/ml 后再按 10 倍系列稀释，加入微孔板，100 μl/孔，37℃ 孵育 60 分钟后，洗涤拍干，各孔分别加入 100 μl 酶标二抗（羊抗兔-HRP 或羊抗豚鼠-HRP）37℃ 孵育 30 分钟后，洗涤拍干。各孔加入显色液 A 液、B 液 37℃ 孵育 15 分钟。2mol/L 硫酸终止反应，在酶标仪上比色。计算抗体效价。

[0103] 表 5 纯化后抗体效价

[0104]

|    | 1#豚鼠抗             | 2#豚鼠抗             | 3#豚鼠抗             | 1#兔抗              | 2#兔抗              | 3#兔抗              |
|----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 效价 | 1:10 <sup>6</sup> | 1:10 <sup>5</sup> | 1:10 <sup>5</sup> | 1:10 <sup>5</sup> | 1:10 <sup>6</sup> | 1:10 <sup>5</sup> |

[0105] 实施例 3 酶标抗体制备

[0106] 选用高碘酸钠法（骆加里等, 生物化学与生物物理学报, 1981, 13 :1), 分别选取步骤 3 中抗体效价最高的抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG (1# 豚鼠抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG、2# 兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG) 标记辣根过氧化物酶 (HRP)。

[0107] 表 6 HRP- 抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG

[0108]

| 酶标抗体                | OD <sub>403nm</sub> | OD <sub>280nm</sub> | HRP 量<br>(mg/ml) | IgG 量<br>(mg/ml) | 标记率<br>(LR) | 克分子<br>比 |
|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|-------------|----------|
| <b>HRP-兔抗</b>       |                     |                     |                  |                  |             |          |
| Vero 细胞裂解<br>蛋白 IgG | 1.39                | 2.60                | 0.56             | 1.35             | 0.53        | 1.66     |
| <b>HRP-豚鼠抗</b>      |                     |                     |                  |                  |             |          |
| Vero 细胞裂解<br>蛋白 IgG | 1.20                | 2.80                | 0.48             | 1.51             | 0.42        | 1.27     |

[0109] 实施例 4 豚鼠抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 最佳包被浓度的确定。

[0110] 将实施例 2 制备的豚鼠抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 用 0.05mol/L CB (pH 9.6) 稀释成 5 ~ 20 μg/ml, 包被微孔板, 100 μl/孔, 4℃ 过夜。次日, 用 0.01mol/L PBS (pH 7.4) 洗涤 2 次, 每孔加 2% BSA-PBS 150 μl, 置室温封闭 2h。PBS 洗涤 2 次, 风干。加入系列稀释的 Vero 细胞裂解蛋白标准品 (实施例 1 制备, 浓度参见表 7), 37℃ 反应 60min, 洗涤 4 次, 拍干。用 PBS-T (含 10% 小牛血清及 0.03% proclin300) 将酶标抗体 HRP- 兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG (1 : 500 ~ 1 : 1000) 每孔 100 μl, 37℃ 反应 60min, 用 PBS-T 洗涤 4 次, 拍干。显色 37℃ 反应 10min。终止, 比色。根据结果分析: 反应板条最佳包被浓度范围在 5 ~ 20 μg/ml。

[0111] 表 7 豚鼠抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 抗体包被浓度优化实验

[0112]

| OD 值 (消零) | 包被浓度                                     |   |   |
|-----------|--|---|---|
|           | 5 $\mu$ g                                | 10 $\mu$ g                              | 20 $\mu$ g                              |
| 标准品       |  |   |   |
| 4000ng    | 2.495                                    | 2.753                                   | 3.011                                   |
| 2000ng    | 1.267                                    | 1.382                                   | 1.690                                   |
| 1000ng    | 0.480                                    | 0.599                                   | 0.718                                   |
| 500ng     | 0.320                                    | 0.373                                   | 0.387                                   |
| 250ng     | 0.152                                    | 0.178                                   | 0.225                                   |
| 125ng     | 0.065                                    | 0.087                                   | 0.105                                   |
| 62.5ng    | 0.030                                    | 0.027                                   | 0.037                                   |
| 回归方程      | $y = 1.5852x + 44.474$<br>$R^2 = 0.9963$ | $y = 1.449x + 15.935$<br>$R^2 = 0.9985$ | $y = 1.3054x - 17.45$<br>$R^2 = 0.9958$ |

[0113] 实施例 5HRP-兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 最佳稀释比例确定。

[0114] 用实施例 2 中纯化豚鼠抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG (10  $\mu$ g/ml) 包被的微孔板, 加入系列稀释的 Vero 细胞裂解蛋白标准品 (实施例 1 制备, 浓度参见表 8), 37 $^{\circ}$ C 反应 60min, 洗涤 4 次, 拍干。用 PBS-T (含 10% 小牛血清及 0.03% proclin300) 将酶标抗体 HRP-兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 稀释成适当比例 (1 : 500 ~ 1 : 1000)。每孔加入 100  $\mu$ l 已稀释的酶标抗体, 振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 反应 60min, 用 PBS-T 洗涤 4 次, 拍干。显色 37 $^{\circ}$ C 反应 10min。终止, 比色。根据结果分析: HRP-兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 最佳稀释浓度在 1 : 500 ~ 1 : 1000 之间。

[0115] 表 8 HRP-兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 稀释浓度

[0116]

| OD 值 (消零) | HRP-兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 稀释浓度           |  |  |
|-----------|---------------------------------------|--|--|
|           | 1:500                                 | 1:750                                    | 1:1000                                 |
| 标准品       |                                       |  |  |
| 4000ng    | 3.182                                 | 2.913                                    | 2.884                                  |
| 2000ng    | 1.635                                 | 1.481                                    | 1.411                                  |
| 1000ng    | 0.728                                 | 0.693                                    | 0.567                                  |
| 500ng     | 0.441                                 | 0.408                                    | 0.349                                  |
| 250ng     | 0.203                                 | 0.194                                    | 0.183                                  |
| 125ng     | 0.100                                 | 0.094                                    | 0.079                                  |
| 62.5ng    | 0.064                                 | 0.031                                    | 0.037                                  |
| 回归方程      | $y = 1.2556x - 5.9$<br>$R^2 = 0.9989$ | $y = 1.3723x - 6.4208$<br>$R^2 = 0.9994$ | $y = 1.38x + 47.379$<br>$R^2 = 0.9971$ |

[0117] 实施例 6 ELISA 双抗体夹心法的建立:

[0118] 包板: 将纯化豚鼠抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 用 0.05mol/L CB (pH 9.6) 稀释成 5 ~ 20  $\mu$ g/ml, 包被微孔板, 100  $\mu$ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日, 用 0.01mol/L PBS (pH7.4) 洗涤 2 次, 每孔加 2% BSA-PBS 150  $\mu$ l, 置室温封闭 2h。PBS 洗涤 2 次, 风干, 用自封袋密封, 每袋放一小包干燥剂。4 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

[0119] 加样品: 用 PBS-T 将实施例 1 制备的 Vero 细胞裂解蛋白标准品稀释成 4000ng/ml、2000ng/ml、1000ng/ml、500ng/ml、250ng/ml、125ng/ml、62.5ng/ml。各孔分别加入 100  $\mu$ l 上述标准品、0.01mol/L PBS-T 和待测样品。37 $^{\circ}$ C 反应 60min, 用 PBS-T 洗涤 4 次, 拍干。

[0120] 加 HRP-兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG:用 PBS-T(含 10% 小牛血清及 0.03% proclin300) 将实施例 2 制备的 HRP-兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 稀释成适当比例 (1:500 ~ 1:1000)。每孔加入 100  $\mu$ l 已稀释的 HRP-兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG,振荡混匀,37 $^{\circ}$ C 反应 60min,用 PBS-T 洗涤 4 次,拍干。

[0121] 显色:每孔加入底物显色剂 A(0.1mol/L 乙酸钠-柠檬酸缓冲液,含 0.0038mol/L 过氧化氢,2 万单位/L 庆大霉素, pH5.0), 显色剂 B(0.02mol/L Tris 盐酸缓冲液,含 0.0005mol/L 二水合乙二胺四乙酸二钠,0.0013mol/L TMB 盐酸盐), 37 $^{\circ}$ C 反应 10min。

[0122] 比色:每孔加入终止液 (2mol/L  $H_2SO_4$ ) 50  $\mu$ l, 振荡混匀。于酶标仪 450nm 波长读取各孔 OD 值。

[0123] 计算:将各浓度标准品及样品 OD 值减去 0ng/ml 标准品 (即样品稀释液:0.01mol/L PBS-T) 的 OD 值 (清零), 绘制标准曲线。显示直线回归方程及 R<sup>2</sup> 值。参照标准曲线计算样品 Vero 细胞 HCP 含量。

[0124] 实施例 7 标准曲线的相关性

[0125] 用实施例 1 制备的 Vero 细胞裂解蛋白标准品,自 4000ng/ml 倍比稀释至 62.5ng/ml 的不同浓度,按照实施例 6 所述进行检测,以 Vero 细胞裂解蛋白标准品浓度为纵坐标,将各浓度标准品 OD 值减去 0ng/ml 标准品 (即样品稀释液:0.01mol/L PBS-T) 的 OD 值 (清零)  $\times$  1000 为横坐标,绘制其曲线图为一近似的直线,参见图 2。标准品浓度在 62.5 ~ 4000ng/ml 之间时,相关性成立 ( $R^2 \geq 0.99$ )。

[0126] 表 9 Vero 细胞裂解蛋白标准品测定结果

[0127]

|                         |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Vero 细胞标准品含量<br>(ng/ml) | 62.5  | 125   | 250   | 500   | 1000  | 2000  | 4000  |
| OD <sub>450nm</sub>     | 0.057 | 0.100 | 0.217 | 0.396 | 0.880 | 1.623 | 3.135 |

[0128] 实施例 8 一种 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒

[0129] 包被豚鼠抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 的反应板 96 孔  $\times$  1 块

[0130] 标准品 (实施例 1 制备的纯化 Vero 细胞裂解蛋白,8000ng/ml) 500  $\mu$ l  $\times$  1 瓶

[0131] HRP-兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 50  $\mu$ l  $\times$  1 瓶

[0132] 酶稀释液 20ml  $\times$  1 瓶

[0133] 20 $\times$ PBS 洗涤液 50ml  $\times$  1 瓶

[0134] 显色剂 A 7ml  $\times$  1 瓶

[0135] 显色剂 B 7ml  $\times$  1 瓶

[0136] 终止液 (2mol/L  $H_2SO_4$ ) 7ml  $\times$  1 瓶

[0137] 实施例 9 一种 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒

[0138] 包被兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 的反应板 96 孔  $\times$  1 块

[0139] 标准品 (实施例 1 制备的纯化 Vero 细胞裂解蛋白,8000ng/ml) 500  $\mu$ l  $\times$  1 瓶

[0140] HRP-兔抗 Vero 细胞裂解蛋白 IgG 50  $\mu$ l  $\times$  1 瓶

[0141] 酶稀释液 20ml  $\times$  1 瓶

[0142] 20 $\times$ PBS 洗涤液 50ml  $\times$  1 瓶

- [0143] 显色剂 A 7ml×1 瓶  
 [0144] 显色剂 B 7ml×1 瓶  
 [0145] 终止液 (2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 7ml×1 瓶

[0146] 实施例 10 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒特异性试验

[0147] 实施例 8 所述试剂盒主要用来检测 Vero 细胞疫苗生产中的中间产品中宿主细胞蛋白含量,这些中间产品可能含有的除宿主细胞蛋白外的其他成分不应产生对本检测的干扰,这些成分主要有:小牛血清、细胞培养液、BSA、卵清蛋白、甲型肝炎病毒 (HAV)、抗 HAV-IgG、胰酶、水解乳蛋白。因此,以小牛血清、细胞培养液、2% BSA、2% 卵清蛋白、HAV(1 : 4 稀释,2.7ug/ml)、抗 HAV-IgG(2IU/mL)、0.25%胰酶、2%水解乳蛋白作为样品,采用实施例 8 所述试剂盒,按照实施例 6 所述进行检测,判断该检测方法的特异性。

[0148] 结果参见图 3,图中 1)Vero 细胞裂解蛋白标准品 ;2)PBS-T ;3) 细胞培养液 ;4) 小牛血清 ;5)BSA ;6) 卵清蛋白 ;7)HAV ;8)HAV-IgG ;9) 胰酶 ;10) 水解乳蛋白。结果表明本发明的检测试剂盒与小牛血清、细胞培养液、BSA、卵清蛋白、HAV、抗 HAV-IgG、胰酶、水解乳蛋白无交叉反应,具有很高的特异性。

[0149] 实施例 11 Vero 细胞 HCP 检测试剂盒精密性试验

[0150] 采用实施例 8 所述试剂盒,按照实施例 6 所述的方法在同一块板条上测定 1000ng/ml 标准品 10 孔的 OD<sub>450nm</sub> 值,重复试验三次,计算批内变异系数 (CV%) 平均为 6.0%。

[0151] 表 10 测定 1000ng/ml 标准品 OD<sub>450nm</sub> 值

[0152]

| 测定次数                | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 变异系数 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| OD <sub>450nm</sub> | 0.730 | 0.671 | 0.662 | 0.625 | 0.631 | 0.610 | 0.619 | 0.653 | 0.719 | 0.652 | 6.2% |
|                     | 0.735 | 0.711 | 0.660 | 0.637 | 0.635 | 0.622 | 0.620 | 0.647 | 0.722 | 0.664 | 6.4% |
|                     | 0.834 | 0.774 | 0.758 | 0.713 | 0.693 | 0.773 | 0.710 | 0.737 | 0.782 | 0.768 | 5.5% |

[0153] 实施例 12 疫苗样品检测及重复性试验 :

[0154] 参考中国专利号 ZL 0210685.9 中的描述中的描述生产甲型肝炎灭活疫苗样品 4 批,采用实施例 8 所述试剂盒,按照实施例 6 所述方法进行检测 6 次,Vero 细胞 HCP 含量结果如表 11 所示。平均 CV = 6.2%,重复性良好。

[0155] 表 11 疫苗样品 Vero 细胞 HCP 含量

[0156]

|             | 标准品回归方程:                                 | Vero 细胞 HCP 含量 (ng/ml) |                |                |                |
|-------------|--|------------------------|----------------|----------------|----------------|
|             |  | NO.1 批<br>疫苗样品         | NO.2 批<br>疫苗样品 | NO.3 批<br>疫苗样品 | NO.4 批<br>疫苗样品 |
| 实验一         | $y = 1.063x + 10.497$<br>$R^2 = 0.999$   | 384                    | 401            | 328            | 223            |
| 实验二         | $y = 1.0665x + 9.0876$<br>$R^2 = 0.9986$ | 380                    | 342            | 292            | 242            |
| 实验三         | $y = 1.2742x - 32.471$<br>$R^2 = 0.999$  | 364                    | 371            | 262            | 221            |
| 实验四         | $y = 1.6439x - 5.9769$<br>$R^2 = 0.9976$ | 376                    | 415            | 284            | 224            |
| 实验五         | $y = 1.3581x - 38.712$<br>$R^2 = 0.9951$ | 389                    | 427            | 292            | 250            |
| 实验六         | $y = 1.299x - 11.772$<br>$R^2 = 0.9988$  | 403                    | 419            | 277            | 246            |
| 平均值 (ng/ml) |  | 382                    | 395            | 289            | 234            |
| CV (%)      |  | 3.4                    | 8.3            | 7.7            | 5.5            |

[0157] 实施例 13 回收率试验

[0158] 采用实施例 8 所述试剂盒,按照实施例 6 所述步骤,以 NO.3 批疫苗样品(对倍稀释后)稀释 HCP 标准品,与用 PBS-T 稀释的标准品同时检测,HCP 在疫苗样品中的回收率平均为 96%(参见表 12、13)。表明疫苗样品基质对本方法测定 HCP 的特异性无任何干扰。

[0159] 表 12 Vero 细胞裂解蛋白(HCP)标准品及疫苗样品(对倍稀释)测定结果

[0160]

|                       |       |       |       |       |       |       |       |                             |       |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------------|-------|
| HCP 标准品<br>含量 (ng/ml) | 62.5  | 125   | 250   | 500   | 1000  | 2000  | 4000  | 疫苗样品<br>(ng/ml)             | 133   |
| OD <sub>450nm</sub>   | 0.057 | 0.100 | 0.217 | 0.396 | 0.880 | 1.623 | 3.135 | 疫苗样品<br>OD <sub>450nm</sub> | 0.130 |

[0161] 表 13 :回收率检测

[0162]

|                       | 疫苗样品(133ng/ml)稀释标准品 |       |       |       |       |       |       |
|-----------------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| OD 值                  | 0.261               | 0.311 | 0.401 | 0.578 | 0.940 | 1.664 | 3.214 |
| HCP 含量检测结果<br>(ng/ml) | 183                 | 246   | 361   | 586   | 1048  | 2088  | 3946  |
| 理论 HCP 含量<br>(ng/ml)  | 194                 | 255   | 378   | 624   | 1116  | 2099  | 4066  |
| 回收率 (%)               | 94.3                | 96.7  | 95.6  | 93.9  | 93.9  | 99.5  | 97.0  |

[0163] 本发明的范围不受所述具体实施方案的限制,所述实施方案只欲作为阐明本发明各个方面的单个例子,本发明范围内还包括功能等同的方法和组分。实际上,除了本文所述的内容外,本领域技术人员参照上文的描述和附图可以容易地掌握对本发明的多种改进。

所述改进也落入所附权利要求书的范围之内。上文提及的每篇参考文献皆全文列入本文作为参考。

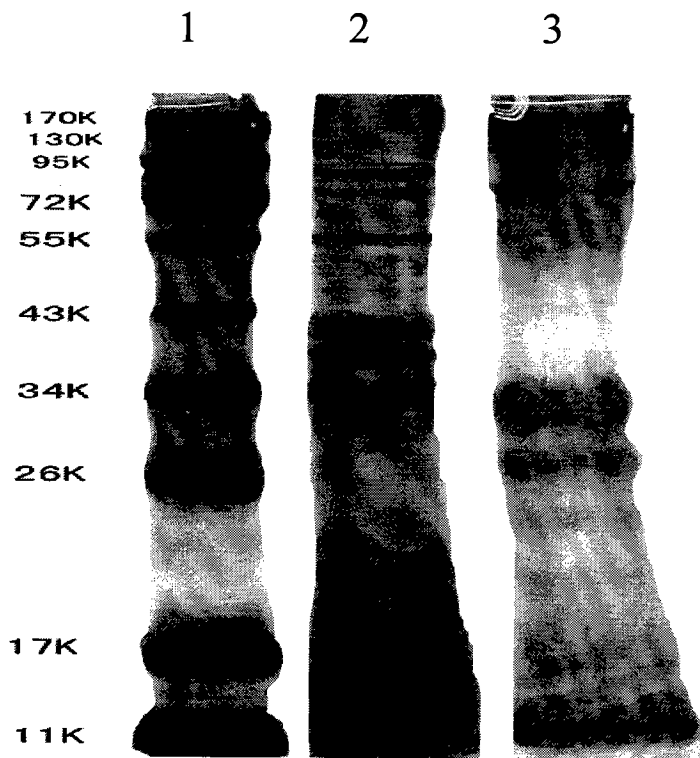


图 1

$$y = 1.2742x - 32.471$$
$$R^2 = 0.999$$

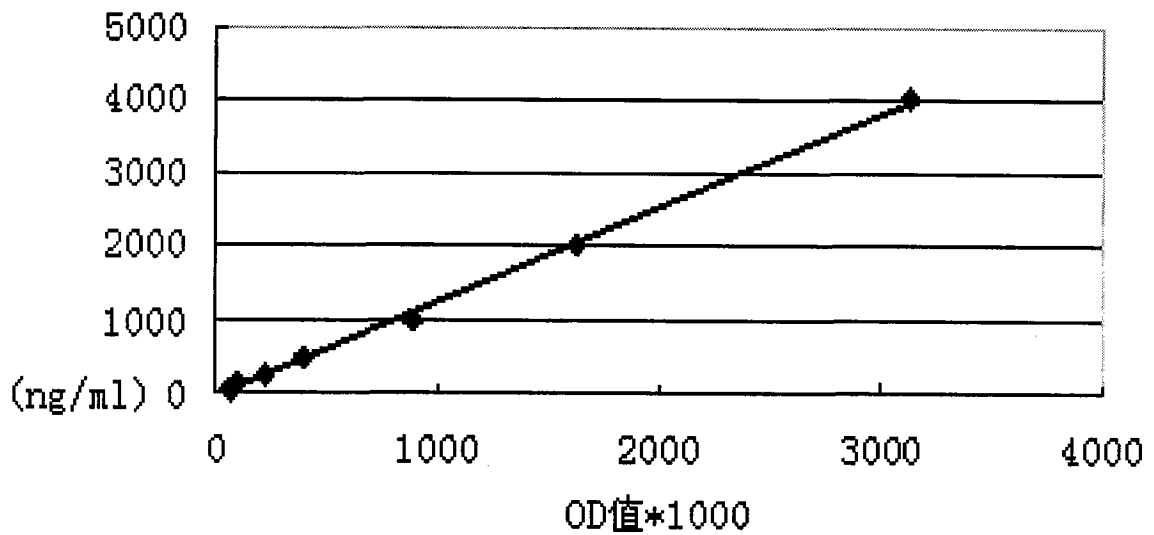


图 2

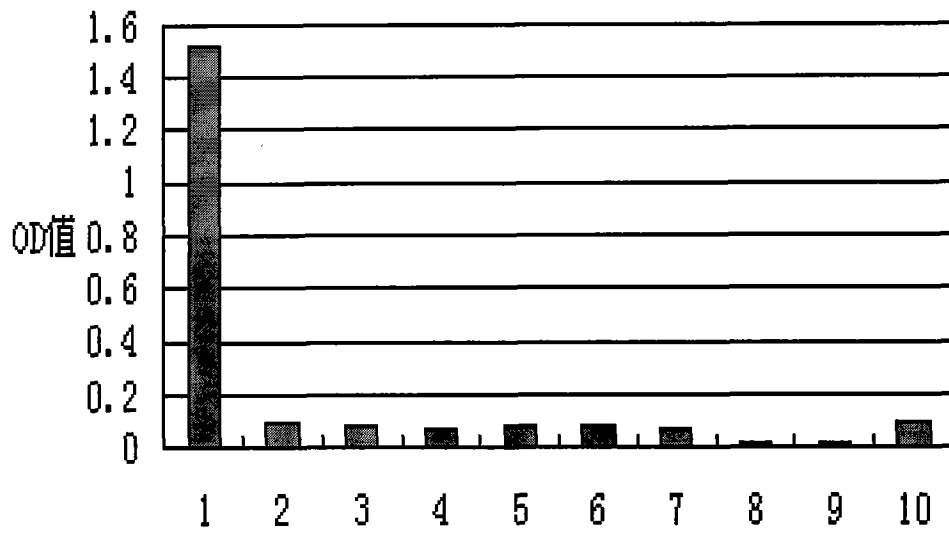


图 3

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | Vero细胞HCP检测试剂盒及其应用                             |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101571549B</a>                   | 公开(公告)日 | 2013-08-14 |
| 申请号            | CN200810043318.2                               | 申请日     | 2008-04-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 上海泽润生物科技有限公司                                   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 上海泽润生物科技有限公司                                   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 上海泽润生物科技有限公司                                   |         |            |
| [标]发明人         | 崔志英<br>史晋<br>刘伟旭<br>姚越                         |         |            |
| 发明人            | 崔志英<br>史晋<br>刘伟旭<br>姚越                         |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/68 G01N33/53                            |         |            |
| 代理人(译)         | 王裕   |         |            |
| 审查员(译)         | 刘文瀚  |         |            |
| 其他公开文献         | CN101571549A                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，具体涉及Vero细胞HCP检测试剂盒及其应用。本发明所提供了Vero细胞HCP检测试剂盒特异性强、灵敏度高，重复性好，不仅可以应用于甲肝病毒等非分泌型病毒疫苗，还可以用于其它Vero细胞生产疫苗制备过程中的质量控制与分析。

