



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109799335 A

(43)申请公布日 2019.05.24

(21)申请号 201910094712.7

(22)申请日 2019.01.31

(71)申请人 陕西慧康生物科技有限责任公司

地址 710054 陕西省西安市雁塔区雁翔路
西安交通大学科技园保赛大厦四楼

(72)发明人 李晓颖 高恩 史瑾 侯增淼
陈沛 王鑫 杨小琳 赵金礼

(74)专利代理机构 西安永生专利代理有限责任
公司 61201

代理人 申忠才

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/561(2006.01)

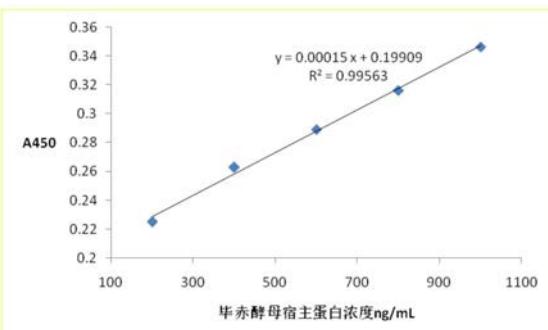
权利要求书3页 说明书9页 附图5页

(54)发明名称

重组人溶菌酶中毕赤酵母宿主蛋白残留量
的检测方法

(57)摘要

一种重组人溶菌酶原料中毕赤酵母宿主蛋白
残留量的检测方法,由制备重组人溶菌酶、制
备毕赤酵母宿主蛋白、检测毕赤酵母宿主蛋白
的总蛋白含量、制备毕赤酵母宿主蛋白抗血清、消
除重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血
清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应、
毕赤酵母宿主蛋白双向电泳、检测毕赤酵母宿主
蛋白的抗体覆盖率、酶联免疫检测步骤组成。采
用本发明检测方法对重组人溶菌酶中的毕赤酵
母宿主蛋白进行连续3批次检测,毕赤酵母宿主
蛋白含量均<0.05%,符合《中华人民共和国药
典》规定的<0.1%的标准。本发明检测方法具有
特异性强、抗体覆盖率全、无交叉反应等优点,可
用于毕赤酵母宿主蛋白的含量检测。



1. 一种重组人溶菌酶原料中毕赤酵母宿主蛋白残留量的检测方法, 其特征在于由下述步骤组成:

(1) 制备重组人溶菌酶

pPIC9K-hLYZ重组质粒电击转化毕赤酵母GS115菌株, 筛选获得表达菌株, 发酵诱导并纯化获得重组人溶菌酶;

(2) 制备毕赤酵母宿主蛋白

pPIC9K空载体电击转化GS115菌株, 筛选获得阳性菌株, 发酵表达并按照步骤(1)中重组人溶菌酶的制备方法制备毕赤酵母宿主蛋白;

(3) 检测毕赤酵母宿主蛋白的总蛋白含量

采用双缩脲法检测步骤(2)的毕赤酵母宿主蛋白的总蛋白含量;

(4) 制备毕赤酵母宿主蛋白抗血清

采集兔血清和羊血清分别作为对照, 以毕赤酵母宿主蛋白为抗原分别免疫新西兰大白兔和山羊, 免疫一个月后采血, 获取毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清、毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清;

(5) 消除重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应

1) 制备多克隆抗体

取兔血清与 $0.06\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH4.8的醋酸钠缓冲液、正辛酸按体积比为1:2:0.02~0.05混合, 离心10000转/分钟离心, 取上清; 用 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH溶液调pH至7.4, 加入质量浓度为40%的硫酸铵溶液至蛋白析出, 离心取沉淀, 加入磷酸盐缓冲液至沉淀溶解, 用 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH为7.4的磷酸盐缓冲液透析, 制备成透析兔血清;

配制A缓冲液: 取十二水合磷酸氢二钠与二水合磷酸二氢钠、氯化钠按摩尔比为1:1:2混合, 加双蒸水至溶解, 磷酸调pH至7.0, 加蒸馏水定容;

配制B缓冲液: 按照常规方法配制成为pH为3.7的 $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸-乙酸钠缓冲液;

取透析兔血清与 $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液按照体积比为1:4混合, $0.22\mu\text{m}$ 过滤, 上HiTrapTMrProtein A FF, HiTrapTMrProtein G HP抗体亲和层析柱, 用A缓冲液平衡20个柱体积, 上样, 再用A缓冲液平衡20个柱体积, 用B缓冲液洗脱, 收集洗脱峰, 制备成兔多克隆抗体;

按照制备兔抗多克隆抗体的方法制备羊多克隆抗体;

2) 预处理重组人溶菌酶

配制质量浓度为 $1\text{mg}/\text{mL}$ 的重组人溶菌酶水溶液, 甲基绿、 α -丙氨酸或 β -丙氨酸、甘油加入容量瓶, 加入去离子水溶解, 甲基绿与 α -丙氨酸或 β -丙氨酸、甘油的质量比为1:8~12:200, 用醋酸调pH至4.5~5.0, 加入去离子水定容, 制备成缓冲液, 取缓冲液与重组人溶菌酶水溶液以1:3~5的体积比混合, 8000~10000转/离心, 取上清上样;

3) 检测重组人溶菌酶与多克隆抗体交叉反应

配制 $25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钾溶液, 用醋酸调pH至4.0~4.5, 制备成 $5\times$ 分离胶缓冲液; 配制 $20\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钾溶液, 用醋酸调pH至6.6~6.8, 制备成 $5\times$ 浓缩胶缓冲液; 配制 $80\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -丙氨酸或 β -丙氨酸溶液, 用醋酸调pH至4.5~5.0, 制备成 $1\times$ 电泳缓冲液;

取N,N,N',N'-四甲基乙二胺与质量浓度为10%的过硫酸铵、 $5\times$ 分离胶缓冲液、质量浓

度为30%丙烯酰胺溶液、双蒸水按体积比为1:30:80:132:184混合,配制质量浓度为10%的分离胶,灌胶聚合30min;取N,N,N',N'-四甲基乙二胺与质量浓度为10%的过硫酸铵、5×分离胶缓冲液、质量浓度为30%丙烯酰胺溶液、双蒸水按体积比为1:30:80:67:249混合,配制成质量浓度为5%的浓缩胶,灌胶聚合30min;

将预处理的重组人溶菌酶溶液上样电泳,电转移聚偏氟乙烯膜,多克隆抗体与Tris-盐酸缓冲液按照体积比1:2000~100000稀释为一抗,室温孵育2h,用带有辣根过氧化物酶标记的二抗与Tris-盐酸缓冲液按照体积比1:10000~40000稀释,室温孵育1h,化学发光显色并上机成像,消除了重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应;

(6) 毕赤酵母宿主蛋白双向电泳

配制质量浓度为10mg/mL的毕赤酵母宿主蛋白水溶液,进行第一向等电聚焦电泳,再进行第二向丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后,取下凝胶上化学发光成像仪成像,PDQuest软件计算蛋白点数,即为毕赤酵母宿主蛋白点数;

(7) 检测毕赤酵母宿主蛋白的抗体覆盖率

取毕赤酵母宿主蛋白双向电泳凝胶进行免疫印迹检测,电转移聚偏氟乙烯膜,多克隆抗体做为一抗孵育聚偏氟乙烯膜,再用带有辣根过氧化物酶标记的二抗孵育聚偏氟乙烯膜,化学发光显色并上机成像,PDQuest软件计算显色的蛋白点数,即为抗体覆盖率显色点数,用抗体覆盖率显色点数除以毕赤酵母宿主蛋白点数,结果为抗体覆盖率;

(8) 酶联免疫检测

包被羊多克隆抗体于96孔板中4℃冰箱过夜,37℃孵育箱封闭2小时,加毕赤酵母宿主蛋白37℃孵育箱孵育1小时,加兔多克隆抗体37℃孵育箱孵育1小时,加入辣根过氧化物酶标记的二抗37℃孵育箱孵育1小时,用3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色,用2mol·L⁻¹的硫酸溶液终止反应,检测450nm吸光度值;设定毕赤酵母宿主蛋白的浓度梯度为100ng·mL⁻¹、200ng·mL⁻¹、400ng·mL⁻¹、600ng·mL⁻¹、800ng·mL⁻¹、1000ng·mL⁻¹,用吸光度值对毕赤酵母宿主蛋白浓度做标准曲线,采用酶联免疫法检测重组人溶菌酶冻干粉原料中的毕赤酵母宿主蛋白含量。

2. 根据权利要求1所述的重组人溶菌酶原料中毕赤酵母宿主蛋白残留量的检测方法,其特征在于在消除重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应步骤(5)中,所述的制备多克隆抗体步骤1)为:取兔血清与0.06mol·L⁻¹pH4.8的醋酸钠缓冲液、正辛酸按体积比为1:2:0.035混合,离心10000转/分钟离心,取上清;用1mol·L⁻¹NaOH溶液调pH至7.4,加入质量浓度为40%的硫酸铵溶液至蛋白析出,离心取沉淀,加入磷酸盐缓冲液至沉淀溶解,用0.1mol·L⁻¹pH为7.4的磷酸盐缓冲液透析,制备成透析兔血清。

3. 根据权利要求1所述的重组人溶菌酶原料中毕赤酵母宿主蛋白残留量的检测方法,其特征在于在消除重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应步骤(5)中,所述的预处理重组人溶菌酶步骤2)为:配制质量浓度为1mg/mL的重组人溶菌酶水溶液,甲基绿、 α -丙氨酸或 β -丙氨酸、甘油加入容量瓶,加入去离子水溶解,甲基绿与 α -丙氨酸或 β -丙氨酸、甘油的质量比为1:10:200,用醋酸调pH至4.5~5.0,加入去离子水定容,制备成缓冲液,取缓冲液与重组人溶菌酶水溶液以1:4的体积比混

合,8000~10000转/离心,取上清上样。

4. 根据权利要求1所述的重组人溶菌酶原料中毕赤酵母宿主蛋白残留量的检测方法,其特征在于在消除重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应步骤(5)中,所述的检测重组人溶菌酶与多克隆抗体交叉反应步骤3)为:配制 $25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钾溶液,用醋酸调pH至4.4,制备成5×分离胶缓冲液;配制 $20\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钾溶液,用醋酸调pH至6.8,制备成5×浓缩胶缓冲液;配制 $80\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -丙氨酸或 β -丙氨酸溶液,用醋酸调pH至4.7,制备成1×电泳缓冲液;

取N,N,N',N'-四甲基乙二胺与质量浓度为10%的过硫酸铵、5×分离胶缓冲液、质量浓度为30%丙烯酰胺溶液、双蒸水按体积比为1:30:80:132:184混合,配制质量浓度为10%的分离胶,灌胶聚合30min;取N,N,N',N'-四甲基乙二胺与质量浓度为10%的过硫酸铵、5×分离胶缓冲液、质量浓度为30%丙烯酰胺溶液、双蒸水按体积比为1:30:80:67:249混合,配制质量浓度为5%的浓缩胶,灌胶聚合30min;

将预处理的重组人溶菌酶溶液上样电泳,电转移聚偏氟乙烯膜,多克隆抗体与Tris-盐酸缓冲液按照体积比1:2000~100000稀释为一抗,室温孵育2h,用带有辣根过氧化物酶标记的二抗与Tris-盐酸缓冲液按照体积比1:10000~40000稀释,室温孵育1h,化学发光显色并上机成像,消除了重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应。

重组人溶菌酶中毕赤酵母宿主蛋白残留量的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及到检测重组人溶菌酶原料中毕赤酵母宿主蛋白残留量的检测方法。

背景技术

[0002] 干眼症是指任何原因造成的泪液质或量异常或动力学异常,导致泪膜稳定性下降,并伴有眼部不适或眼表组织病变特征的多种疾病的总称。随着视频终端产品的普及,中青年人群罹患干眼症的比例大幅增加。近年来,城市中干眼病人正以每年10%~20%的速度快速增加。

[0003] 毕赤酵母表达系统自上世纪80年代开发以来,距今已有40年历史,是一套完善的外源基因表达系统,具有易于高密度发酵、能使产物有效分泌并适当糖基化、培养方便经济等特点。该系统利用强效可调控启动子AOX1,已高效表达多种外源基因,高效、实用、简便,非常适合于大规模工业生产。

[0004] 本发明的课题组针对干眼症群体开发了重组人溶菌酶人工泪液,其原料为毕赤酵母发酵生产并纯化制备的重组人溶菌酶,由毕赤酵母GS115发酵生产并纯化获得。根据《中华人民共和国药典》2015版,第4部,通则3414中的有关规定,由基因工程技术所制备的蛋白质或肽类药物,因为残余菌体蛋白的过量残留,会导致其在人体内产生免疫应答,当该抗体在人体内达到100ppm时,能诱发免疫反应,使其生物学效应改变,并形成免疫复合物而导致毒性反应。重组人溶菌酶作为一种重组生物制品,宿主蛋白残留的检测也是评价该生物制品生产工艺降低或去除非目的成分的指标之一。药典中明确规定,酵母菌体蛋白残留测定方法为酶联免疫检测法,而找遍市场,并未找到商业化的酶联免疫试剂盒用于毕赤酵母宿主蛋白残留的检测。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题在于克服上述现有技术的缺点,提供一种特异性强、抗体覆盖率全、方法简单、操作简便、无交叉反应的重组人溶菌酶中毕赤酵母宿主蛋白残留量的检测方法。

[0006] 解决上述技术问题所采用的技术方案由下述步骤组成:

[0007] (1)制备重组人溶菌酶

[0008] pPIC9K-hLYZ重组质粒电击转化毕赤酵母GS115菌株,筛选获得表达菌株,发酵诱导并纯化获得重组人溶菌酶。

[0009] (2)制备毕赤酵母宿主蛋白

[0010] pPIC9K空载体电击转化GS115菌株,筛选获得阳性菌株,发酵表达并按照步骤(1)中重组人溶菌酶的制备方法制备毕赤酵母宿主蛋白。

[0011] (3)检测毕赤酵母宿主蛋白的总蛋白含量

[0012] 采用双缩脲法检测步骤(2)的毕赤酵母宿主蛋白的总蛋白含量。

[0013] (4) 制备毕赤酵母宿主蛋白抗血清

[0014] 采集兔血清和羊血清分别作为对照,以毕赤酵母宿主蛋白为抗原分别免疫新西兰大白兔和山羊,免疫一个月后采血,获取毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清、毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清。

[0015] (5) 消除重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应

[0016] 1) 制备多克隆抗体

[0017] 取兔血清与 $0.06\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH4.8的醋酸钠缓冲液、正辛酸按体积比为 $1:2:0.02\sim0.05$ 混合,离心10000转/分钟离心,取上清;用 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH溶液调pH至7.4,加入质量浓度为40%的硫酸铵溶液至蛋白析出,离心取沉淀,加入磷酸盐缓冲液至沉淀溶解,用 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH为7.4的磷酸盐缓冲液透析,制备成透析兔血清。

[0018] 配制A缓冲液:取十二水合磷酸氢二钠与二水合磷酸二氢钠、氯化钠按摩尔比为 $1:1.2$ 混合,加双蒸水至溶解,磷酸调pH至7.0,加蒸馏水定容。

[0019] 配制B缓冲液:按照常规方法配制pH为3.7的 $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸-乙酸钠缓冲液。

[0020] 取透析兔血清与 $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液按照体积比为 $1:4$ 混合,0.22μm过滤,上HiTrapTMrProtein A FF,HiTrapTMrProtein G HP抗体亲和层析柱,用A缓冲液平衡20个柱体积,上样,再用A缓冲液平衡20个柱体积,用B缓冲液洗脱,收集洗脱峰,制备成兔多克隆抗体。

[0021] 按照制备兔抗多克隆抗体的方法制备羊多克隆抗体。

[0022] 2) 预处理重组人溶菌酶

[0023] 配制质量浓度为 $1\text{mg}/\text{mL}$ 的重组人溶菌酶水溶液,甲基绿、 α -丙氨酸或 β -丙氨酸、甘油加入容量瓶,加入去离子水溶解,甲基绿与 α -丙氨酸或 β -丙氨酸、甘油的质量比为 $1:8\sim12:200$,用醋酸调pH至 $4.5\sim5.0$,加入去离子水定容,制备成缓冲液,取缓冲液与重组人溶菌酶水溶液以 $1:3\sim5$ 的体积比混合,8000~10000转/离心,取上清上样。

[0024] 3) 检测重组人溶菌酶与多克隆抗体交叉反应

[0025] 配制 $25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钾溶液,用醋酸调pH至 $4.0\sim4.5$,制备成 $5\times$ 分离胶缓冲液;配制 $20\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钾溶液,用醋酸调pH至 $6.6\sim6.8$,制备成 $5\times$ 浓缩胶缓冲液;配制 $80\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -丙氨酸或 β -丙氨酸溶液,用醋酸调pH至 $4.5\sim5.0$,制备成 $1\times$ 电泳缓冲液。

[0026] 取N,N,N,N'-四甲基乙二胺与质量浓度为10%的过硫酸铵、 $5\times$ 分离胶缓冲液、质量浓度为30%丙烯酰胺溶液、双蒸水按体积比为 $1:30:80:132:184$ 混合,配制质量浓度为10%的分离胶,灌胶聚合30min;取N,N,N,N'-四甲基乙二胺与质量浓度为10%的过硫酸铵、 $5\times$ 分离胶缓冲液、质量浓度为30%丙烯酰胺溶液、双蒸水按体积比为 $1:30:80:67:249$ 混合,配制质量浓度为5%的浓缩胶,灌胶聚合30min。

[0027] 将预处理的重组人溶菌酶溶液上样电泳,电转移聚偏氟乙烯膜,多克隆抗体与Tris-盐酸缓冲液按照体积比 $1:2000\sim100000$ 稀释为一抗,室温孵育2h,用带有辣根过氧化物酶标记的二抗与Tris-盐酸缓冲液按照体积比 $1:10000\sim40000$ 稀释,室温孵育1h,化学发光显色并上机成像,消除了重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应。

[0028] (6) 毕赤酵母宿主蛋白双向电泳

[0029] 配制质量浓度为10mg/mL的毕赤酵母宿主蛋白水溶液,进行第一向等电聚焦电泳,再进行第二向丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后,取下凝胶上化学发光成像仪成像,PDQuest软件计算蛋白点数,即为毕赤酵母宿主蛋白点数。

[0030] (7) 检测毕赤酵母宿主蛋白的抗体覆盖率

[0031] 取毕赤酵母宿主蛋白双向电泳凝胶进行免疫印迹检测,电转移聚偏氟乙烯膜,多克隆抗体做为一抗孵育聚偏氟乙烯膜,再用带有辣根过氧化物酶标记的二抗孵育聚偏氟乙烯膜,化学发光显色并上机成像,PDQuest软件计算显色的蛋白点数,即为抗体覆盖率显色点数,用抗体覆盖率显色点数除以毕赤酵母宿主蛋白点数,结果为抗体覆盖率。

[0032] (8) 酶联免疫检测

[0033] 包被羊多克隆抗体于96孔板中4℃冰箱过夜,37℃孵育箱封闭2小时,加毕赤酵母宿主蛋白37℃孵育箱孵育1小时,加兔多克隆抗体37℃孵育箱孵育1小时,加入辣根过氧化物酶标记的二抗37℃孵育箱孵育1小时,用3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色,用2mol·L⁻¹的硫酸溶液终止反应,检测450nm吸光度值;设定毕赤酵母宿主蛋白的浓度梯度为100ng·mL⁻¹、200ng·mL⁻¹、400ng·mL⁻¹、600ng·mL⁻¹、800ng·mL⁻¹、1000ng·mL⁻¹,用吸光度值对毕赤酵母宿主蛋白浓度做标准曲线,采用酶联免疫法检测重组人溶菌酶冻干粉原料中的毕赤酵母宿主蛋白含量。

[0034] 在本发明的消除重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应步骤(5)中,本发明的制备多克隆抗体步骤1)为:取兔血清与0.06mol·L⁻¹pH4.8的醋酸钠缓冲液、正辛酸按最佳体积比为1:2:0.035混合,离心10000转/分钟离心,取上清;用1mol·L⁻¹NaOH溶液调pH至7.4,加入质量浓度为40%的硫酸铵溶液至蛋白析出,离心取沉淀,加入磷酸盐缓冲液至沉淀溶解,用0.1mol·L⁻¹pH为7.4的磷酸盐缓冲液透析,制备成透析兔血清。

[0035] 在本发明的消除重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应步骤(5)中,本发明的预处理重组人溶菌酶步骤2)为:配制质量浓度为1mg/mL的重组人溶菌酶水溶液,甲基绿、 α -丙氨酸或 β -丙氨酸、甘油加入容量瓶,加入去离子水溶解,甲基绿与 α -丙氨酸或 β -丙氨酸、甘油的最佳质量比为1:10:200,用醋酸调pH至4.5~5.0,加入去离子水定容,制备成缓冲液,取缓冲液与重组人溶菌酶水溶液以1:4的最佳体积比混合,8000~10000转/离心,取上清上样。

[0036] 在本发明的消除重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应步骤(5)中,本发明的检测重组人溶菌酶与多克隆抗体交叉反应步骤3)为:配制25mmol·L⁻¹氢氧化钾溶液,用醋酸调pH最佳至4.4,制备成5×分离胶缓冲液;配制20mmol·L⁻¹氢氧化钾溶液,用醋酸调pH最佳至6.8,制备成5×浓缩胶缓冲液;配制80mmol·L⁻¹ α -丙氨酸或 β -丙氨酸溶液,用醋酸调pH最佳至4.7,制备成1×电泳缓冲液。

[0037] 取N,N,N,N'-四甲基乙二胺与质量浓度为10%的过硫酸铵、5×分离胶缓冲液、质量浓度为30%丙烯酰胺溶液、双蒸水按最佳体积比为1:30:80:132:184混合,配制质量浓度为10%的分离胶,灌胶聚合30min;取N,N,N,N'-四甲基乙二胺与质量浓度为10%的过硫酸铵、5×分离胶缓冲液、质量浓度为30%丙烯酰胺溶液、双蒸水按最佳体积比为1:30:80:67:249混合,配制质量浓度为5%的浓缩胶,灌胶聚合30min。

[0038] 将预处理的重组人溶菌酶溶液上样电泳,电转移聚偏氟乙烯膜,多克隆抗体与

Tris-盐酸缓冲液按照体积比1:2000~100000稀释为一抗,室温孵育2h,用带有辣根过氧化物酶标记的二抗与Tris-盐酸缓冲液按照体积比1:10000~40000稀释,室温孵育1h,化学发光显色并上机成像,消除了重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应。

[0039] 由于本发明采用了正辛酸处理了毕赤酵母宿主蛋白免疫血清,使得制备得多克隆抗体效价达到1:64000,采用 α -丙氨酸预处理重组人溶菌酶,采用氢氧化钾-醋酸缓冲体系进行丙烯酰胺凝胶电泳以及免疫印迹检测,消除了重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫血清和制备的多克隆抗体之间的交叉反应。采用本发明检测方法对重组人溶菌酶中的毕赤酵母宿主蛋白进行连续3批次检测,毕赤酵母宿主蛋白含量均<0.05%,符合《中华人民共和国药典》规定的<0.1%的标准。本发明检测方法具有特异性强、抗体覆盖率全、方法简单、操作简便、无交叉反应等优点,可用于重组人溶菌酶原料的毕赤酵母宿主蛋白的含量检测。

附图说明

- [0040] 图1是实施例1的重组人溶菌酶和毕赤酵母宿主蛋白的丙烯酰胺凝胶电泳图。
- [0041] 图2是实施例1的重组人溶菌酶和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清交叉反应图。
- [0042] 图3是实施例1的重组人溶菌酶和毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清交叉反应图。
- [0043] 图4是实施例1的 α -丙氨酸处理的重组人溶菌酶丙烯酰胺凝胶电泳图。
- [0044] 图5是实施例1的预处理重组人溶菌酶与多克隆抗体交叉反应结果图。
- [0045] 图6是实施例1的毕赤酵母宿主蛋白的双向电泳图。
- [0046] 图7是实施例1的毕赤酵母宿主蛋白的抗体覆盖率鉴定图。
- [0047] 图8是实施例1的酶联免疫检测的标准曲线。
- [0048] 图9是常规方法处理重组人溶菌酶与多克隆抗体交叉反应结果图。

具体实施方式

[0049] 下面结合附图和实施例对本发明做进一步详细说明,但本发明不限于该这些实施例。

实施例1

[0051] 本实施例的重组人溶菌酶原料中毕赤酵母宿主蛋白残留量的检测方法步骤如下:

(1) 制备重组人溶菌酶

[0053] 采用电击转化仪将10ng的pPIC9K-hLYZ重组质粒按仪器的操作方法电击转化至100uL毕赤酵母GS115感受态中,采用组氨酸缺陷筛选方法和抗性筛选方法获得表达菌株,发酵诱导并纯化获得重组人溶菌酶。

(2) 制备毕赤酵母宿主蛋白

[0055] 采用电击转化仪将10ng的pPIC9K空质粒按仪器的操作方法电击转化至100uL毕赤酵母GS115感受态中,采用组氨酸缺陷筛选方法和抗性筛选方法获得阳性菌株,发酵诱导并纯化获得毕赤酵母宿主蛋白。对纯化后的毕赤酵母宿主蛋白和重组人溶菌酶进行丙烯酰胺凝胶电泳检测,结果如图1所示。

(3) 检测毕赤酵母宿主蛋白的总蛋白含量

[0057] 按照《中华人民共和国药典》(2015年版四部)通则0731中蛋白含量测定,采用双缩

脲法,测定毕赤酵母宿主蛋白的总蛋白含量。

[0058] (4) 制备毕赤酵母宿主蛋白抗血清

[0059] 采集兔血清和羊血清分别作为对照,以毕赤酵母宿主蛋白为抗原分别免疫新西兰大白兔和山羊,免疫一个月后采血,获取毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清、毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清。用免疫印迹法检测免疫兔血清和免疫羊血清与重组人溶菌酶交叉反应,结果如图2和图3所示。

[0060] (5) 消除重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应

[0061] 1) 制备多克隆抗体

[0062] 取兔血清1mL,加入2ml 0.06mol·L⁻¹pH为4.8醋酸钠缓冲液,再加入35ul正辛酸混合,兔血清与0.06mol·L⁻¹pH为4.8的醋酸钠缓冲液、正辛酸按体积比为1:2:0.035,离心10000转/分钟离心,取上清;用1mol·L⁻¹NaOH溶液调pH至7.4,加入质量浓度为40%的硫酸铵溶液至蛋白析出,10000rpm离心20min取沉淀,加入1ml 0.1mol·L⁻¹pH为7.4的磷酸盐缓冲液至沉淀溶解,用0.1mol·L⁻¹pH为7.4的磷酸盐缓冲液透析,制备成透析兔血清。

[0063] 配制A缓冲液:50mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲液加入0.1mol·L⁻¹氯化钠,十二水合磷酸氢二钠与二水合磷酸二氢钠、氯化钠按摩尔比为1:1:2,加双蒸水至溶解,磷酸调pH至7.0,加蒸馏水定容至1L。

[0064] 配制B缓冲液:按照常规方法配制成pH为3.7的50mmol·L⁻¹乙酸-乙酸钠缓冲液。

[0065] 取透析兔血清与50mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲液按照体积比为1:4混合,0.22μm过滤,上HiTrapTMrProtein A FF抗体亲和层析柱,也可上HiTrapTM rProtein G HP抗体亲和层析柱,用A缓冲液平衡20个柱体积,上样,再用A缓冲液平衡20个柱体积,用B缓冲液洗脱,收集洗脱峰,制备成兔多克隆抗体。

[0066] 按照制备兔抗多克隆抗体的方法制备羊多克隆抗体。

[0067] 2) 预处理重组人溶菌酶

[0068] 配制质量浓度为1mg/mL的重组人溶菌酶水溶液,取α-丙氨酸7.38g,甘油3.2g,甲基绿10mg,去离子水溶解,甲基绿与α-丙氨酸、甘油的质量比为1:10:200,用醋酸调pH至4.5~5.0,加入去离子水定容至5mL,制备成缓冲液,取缓冲液与重组人溶菌酶水溶液以1:4的体积比混合,8000~10000转/离心,取上清上样。

[0069] 3) 检测重组人溶菌酶与多克隆抗体交叉反应

[0070] 配制25mmol·L⁻¹氢氧化钾溶液,用醋酸调pH至4.4,制备成5×分离胶缓冲液;配制20mmol·L⁻¹氢氧化钾溶液,用醋酸调pH至6.8,制备成5×浓缩胶缓冲液;配制80mmol·L⁻¹α-丙氨酸溶液,用醋酸调pH至4.7,制备成1×电泳缓冲液。

[0071] 取二次蒸馏水4.6mL、30%的丙烯酰胺母液3.3mL、5×分离胶缓冲液2.0mL、10%的过硫酸铵75uL、N,N,N,N,N'-四甲基乙二胺25uL,配制质量浓度为10%的分离胶10mL,N,N,N,N',N'-四甲基乙二胺与质量浓度为10%的过硫酸铵、5×分离胶缓冲液、质量浓度为30%丙烯酰胺溶液、双蒸水按体积比为1:30:80:132:184,取质量浓度为10%的分离胶溶液6.5mL灌胶聚合30min。取二次蒸馏水6.23mL、30%的丙烯酰胺母液1.67mL、5×浓缩胶缓冲液2.0mL、10%的过硫酸铵75uL、N,N,N,N,N'-四甲基乙二胺25uL,配制质量浓度为5%的浓缩胶10mL,N,N,N,N',N'-四甲基乙二胺与质量浓度为10%的过硫酸铵、5×分离胶缓冲液、质量浓

度为30%丙烯酰胺溶液、双蒸水按体积比为1:30:80:67:249,配制成质量浓度为5%的浓缩胶,取质量浓度为5%的浓缩胶溶液2.0mL灌胶聚合30min。

[0072] 将预处理的重组人溶菌酶溶液上样电泳,结果如图4所示,电泳结束后取凝胶电转移聚偏氟乙烯膜,300mA电转移1小时10分钟,多克隆抗体与Tris-盐酸缓冲液按照体积比1:10000稀释为一抗,室温孵育2小时,用带有辣根过氧化物酶标记的二抗与Tris-盐酸缓冲液按照体积比1:20000稀释,室温孵育1小时,化学发光显色并上机成像,消除了重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应,结果如图5所示。

[0073] (6) 毕赤酵母宿主蛋白双向电泳

[0074] 取质量浓度为10mg/mL的毕赤酵母宿主蛋白溶液400uL上样进行第一向等电聚焦电泳,聚焦20000V·小时,再进行第二向丙烯酰胺凝胶电泳,300V电泳30分钟,电泳结束后,取下凝胶上化学发光成像仪成像,PDQuest软件计算蛋白点数,为毕赤酵母宿主蛋白点数,结果如图6所示。

[0075] (7) 检测毕赤酵母宿主蛋白的抗体覆盖率

[0076] 取毕赤酵母宿主蛋白双向电泳凝胶进行免疫印迹检测,电转移聚偏氟乙烯膜,多克隆抗体做为一抗孵育聚偏氟乙烯膜,多克隆抗体的稀释与步骤(5)中的3)步骤相同。再用带有辣根过氧化物酶标记的二抗孵育聚偏氟乙烯膜,二抗孵育的稀释与步骤(5)中的3)步骤相同。化学发光显色并上机成像,用PDQuest软件计算显色的蛋白点数,为抗体覆盖率显色点数,用抗体覆盖率显色点数除以毕赤酵母宿主蛋白点数,结果为抗体覆盖率,≥60%,结果如图7所示。

[0077] (8) 酶联免疫检测

[0078] 包被羊多克隆抗体于96孔板中4℃冰箱过夜,37℃孵育箱封闭2小时,加毕赤酵母宿主蛋白37℃孵育箱孵育1小时,加兔多克隆抗体37℃孵育箱孵育1小时,加入辣根过氧化物酶标记的二抗37℃孵育箱孵育1小时,用3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色,用2mol·L⁻¹的硫酸溶液终止反应,检测450nm吸光度值;设定毕赤酵母宿主蛋白的浓度梯度为100ng·mL⁻¹、200ng·mL⁻¹、400ng·mL⁻¹、600ng·mL⁻¹、800ng·mL⁻¹、1000ng·mL⁻¹,用吸光度值对毕赤酵母宿主蛋白浓度做标准曲线y,如图8所示:

[0079] $y=0.00015x+0.19909$

[0080] $R^2=0.9956$

[0081] 采用酶联免疫法检测连续3批次重组人溶菌酶冻干粉原料中的毕赤酵母宿主蛋白含量,酶联免疫法为常规检测方法,具体操作如下:

[0082] 重组人溶菌酶批号分别为201706008,201706009,201706010,每批次用pH值为4.5~5.0的醋酸水溶液溶解,做3次重复检测,取平均值为结果,设定阴性对照和空白对照,用牛血清白蛋白替换羊多克隆抗体和兔多克隆抗体进行检测做为阴性对照,用洗涤缓冲液替换羊多克隆抗体和兔多克隆抗体做为空白对照,结果如表1所示。

[0083] 表1重组人溶菌酶原料中毕赤酵母宿主蛋白酶联免疫检测结果

[0084]

	201706008 批	201706009 批	201706010 批	阴性对照	空白对照
1 次	0.2494	0.2391	0.2488	0.0570	0.0581
2 次	0.2513	0.2571	0.2574	0.0598	0.0567
3 次	0.2394	0.2241	0.2472	0.0617	0.0570
平均值	0.2467	0.2401	0.2511	0.0595	0.0573
毕赤酵母宿主蛋白浓度 (ng/mL)	326.2	282.2	355.5		
毕赤酵母宿主蛋白含量 (%)	0.033	0.028	0.035		

[0085] 由表1可见,连续3批次重组人溶菌酶中的毕赤酵母宿主蛋白含量均<0.05%,符合《中华人民共和国药典》规定的<0.1%的标准。

[0086] 实施例2

[0087] 本实施例的重组人溶菌酶原料中毕赤酵母宿主蛋白残留量的检测方法步骤如下:

[0088] 步骤(1)~步骤(4)与实施例1相同。

[0089] (4)消除重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应

[0090] 1)制备多克隆抗体

[0091] 取兔血清1mL,加入2ml 0.06mol·L⁻¹pH4.8醋酸钠缓冲液,再加入20ul正辛酸混合,兔血清与0.06mol·L⁻¹pH4.8的醋酸钠缓冲液、正辛酸按体积比为1:2:0.02,离心10000转/分钟离心,取上清;用1mol·L⁻¹NaOH溶液调pH至7.4,加入质量浓度为40%的硫酸铵溶液至蛋白析出,10000rpm离心20min取沉淀,加入1ml 0.1mol·L⁻¹pH为7.4的磷酸盐缓冲液至沉淀溶解,用0.1mol·L⁻¹pH为7.4的磷酸盐缓冲液透析,制备成透析兔血清。

[0092] 配制A缓冲液和制B缓冲液与实施例1相同。

[0093] 其他步骤与实施例1相同。制备成兔多克隆抗体和羊多克隆抗体。

[0094] 2)预处理重组人溶菌酶

[0095] 配制质量浓度为1mg/mL的重组人溶菌酶水溶液,取甲基绿与α-丙氨酸、甘油的质量比为1:8:200混合,用醋酸调pH至4.5~5.0,加入去离子水定容至5mL,制备成缓冲液,取缓冲液与重组人溶菌酶水溶液以1:3的体积比混合,8000~10000转/离心,取上清上样。

[0096] 3)检测重组人溶菌酶与多克隆抗体交叉反应

[0097] 配制25mmol·L⁻¹氢氧化钾溶液,用醋酸调pH至4.0,制备成5×分离胶缓冲液;配制20mmol·L⁻¹氢氧化钾溶液,用醋酸调pH至6.6,制备成5×浓缩胶缓冲液;配制80mmol·L⁻¹α-丙氨酸溶液,用醋酸调pH至4.5,制备成1×电泳缓冲液。

[0098] 其他步骤与实施例1相同。

[0099] 步骤(6)~步骤(8)与实施例1相同。

[0100] 实施例3

[0101] 本实施例的重组人溶菌酶原料中毕赤酵母宿主蛋白残留量的检测方法步骤如下:

[0102] 步骤(1)~步骤(4)与实施例1相同。

[0103] (5) 消除重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应

[0104] 1) 制备多克隆抗体

[0105] 取兔血清1mL,加入2ml 0.06mol·L⁻¹pH4.8醋酸钠缓冲液,再加入50ul正辛酸混合,兔血清与0.06mol·L⁻¹pH4.8的醋酸钠缓冲液、正辛酸按体积比为1:2:0.05,离心10000转/分钟离心,取上清;用1mol·L⁻¹NaOH溶液调pH至7.4,加入质量浓度为40%的硫酸铵溶液至蛋白析出,10000rpm离心20min取沉淀,加入1ml 0.1mol·L⁻¹pH为7.4的磷酸盐缓冲液至沉淀溶解,用0.1mol·L⁻¹pH为7.4的磷酸盐缓冲液透析,制备成透析兔血清。

[0106] 配制A缓冲液和制B缓冲液与实施例1相同。

[0107] 其他步骤与实施例1相同。制备成兔多克隆抗体和羊多克隆抗体。

[0108] 2) 预处理重组人溶菌酶

[0109] 配制质量浓度为1mg/mL的重组人溶菌酶水溶液,取甲基绿与α-丙氨酸、甘油的质量比为1:12:200混合,用醋酸调pH至4.5~5.0,加入去离子水定容至5mL,制备成缓冲液,取缓冲液与重组人溶菌酶水溶液以1:5的体积比混合,8000~10000转/离心,取上清上样。

[0110] 3) 检测重组人溶菌酶与多克隆抗体交叉反应

[0111] 配制25mmol·L⁻¹氢氧化钾溶液,用醋酸调pH至4.5,制备成5×分离胶缓冲液;配制20mmol·L⁻¹氢氧化钾溶液,用醋酸调pH至6.8,制备成5×浓缩胶缓冲液;配制80mmol·L⁻¹α-丙氨酸溶液,用醋酸调pH至5.0,制备成1×电泳缓冲液。

[0112] 其它步骤与实施例1相同。

[0113] 步骤(6)~步骤(8)与实施例1相同。

[0114] 实施例4

[0115] 在以上的实施例1~3的步骤(5)的预处理重组人溶菌酶步骤2)中,所用α-丙氨酸用等质量的β-丙氨酸替换,其它原料及其配比与相应的实施例相同。步骤(5)中的其它步骤与相应的实施例相同。

[0116] 其它步骤与实施例1相同。完成重组人溶菌酶中毕赤酵母宿主蛋白残留量的检测。

[0117] 为了验证本发明的有益效果,发明人进行了实验室大量的研究实验,各种试验情况如下:

[0118] 1、正辛酸对制备的多克隆抗体的影响

[0119] 用包被液配制5ug/mL的毕赤酵母宿主蛋白溶液,包被于96孔板上,加入多克隆抗体与洗涤缓冲液的体积比为1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000、1:128000稀释的多克隆抗体,加入抗血清与正辛酸体积比为1:0.02、1:0.03、1:0.035、1:0.04、1:0.05制备的多克隆抗体,采用酶联免疫法检测制备的多克隆抗体效价,制备的多克隆抗体效价差异如表2所示。

[0120] 表2正辛酸加入比例对多克隆抗体效价的影响

[0121]

血清与正辛酸比例	1: 0.02	1: 0.03	1: 0.035	1: 0.04	1: 0.05
兔多抗效价	1:4000	1:32000	1:64000	1:32000	1:16000
羊多抗效价	1:8000	1:32000	1:64000	1:32000	1:32000

[0122] 2、 α -丙氨酸处理重组人溶菌酶对检测重组人溶菌酶与多克隆抗体交叉反应的影响

[0123] 用常规电泳方法处理重组人溶菌酶,并检测重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫抗血清交叉反应,结果显示,重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫抗血清有交叉反应,结果见图3所示。

[0124] 用常规电泳方法处理重组人溶菌酶,并检测重组人溶菌酶与多克隆抗体交叉反应,结果见附图9。由图9可见,常规电泳方法处理重组人溶菌酶与多克隆抗体有交叉反应。

[0125] 用 α -丙氨酸处理重组人溶菌酶后检测重组人溶菌酶以多克隆抗体交叉反应,实验方法与实施例1步骤(5)中的3)检测重组人溶菌酶与多克隆抗体交叉反应相同,实验结果见附图5。

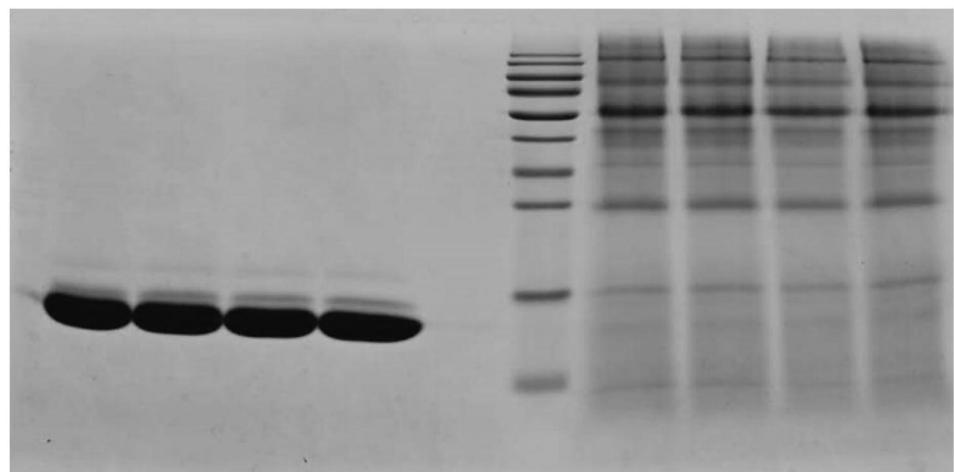


图1

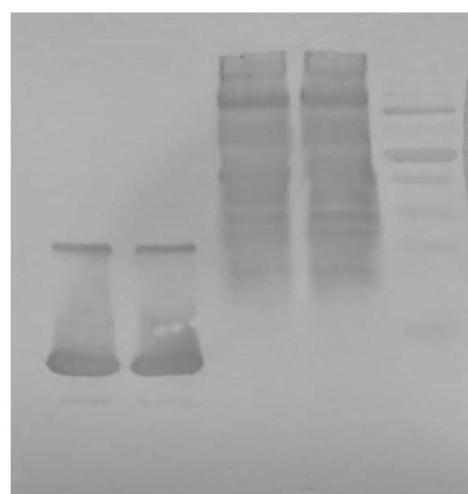


图2

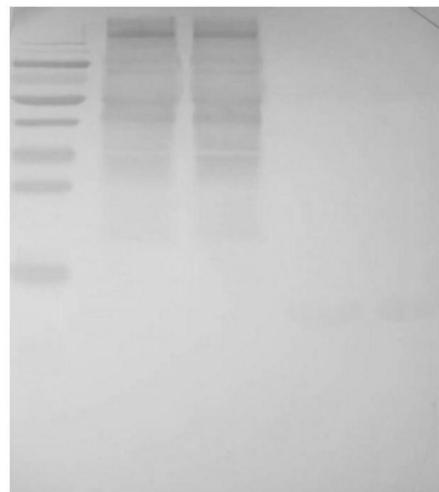


图3

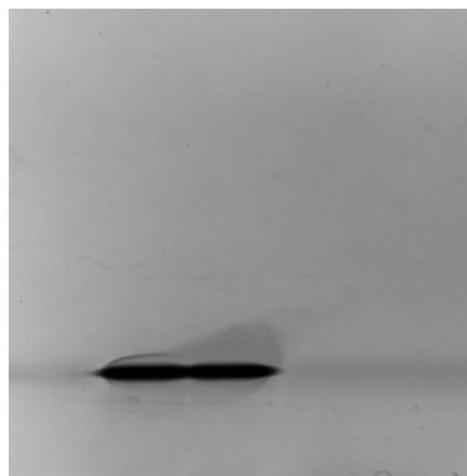


图4



图5

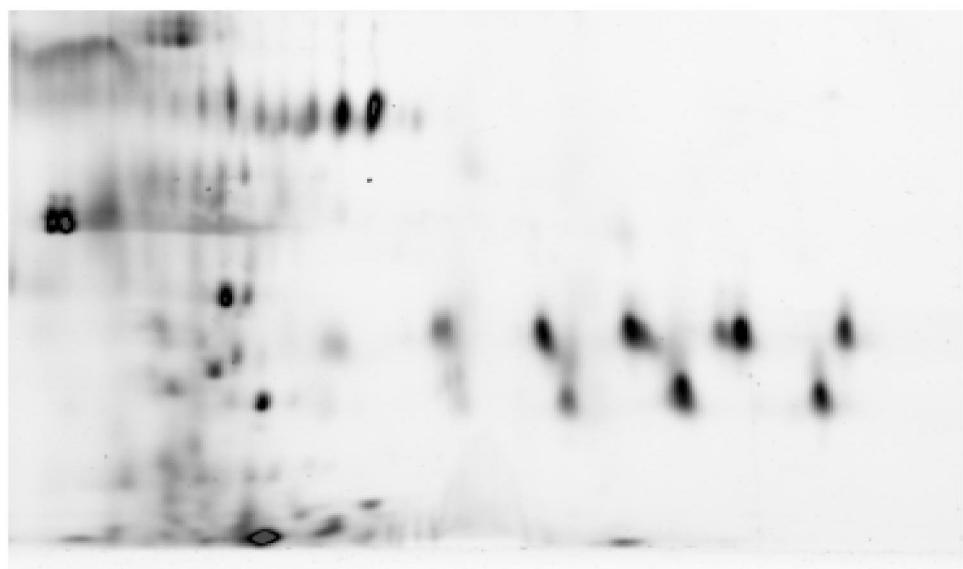


图6

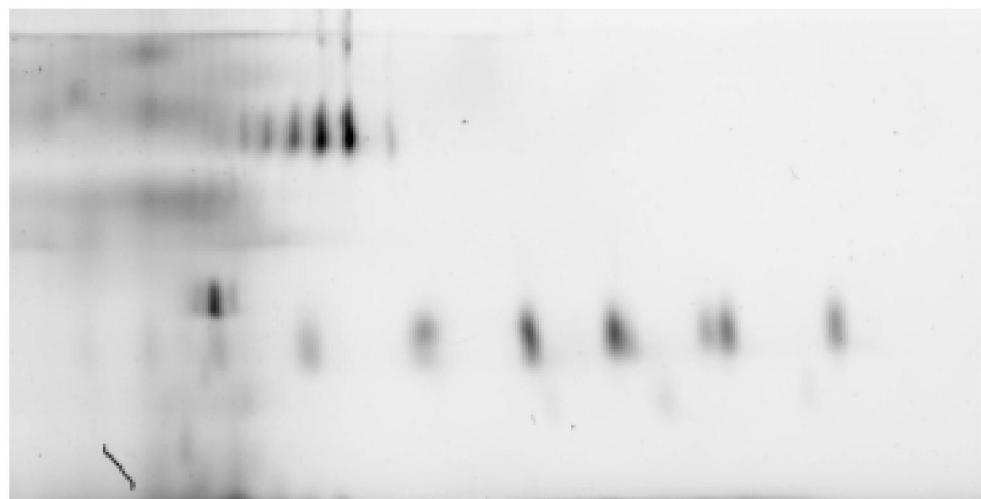


图7

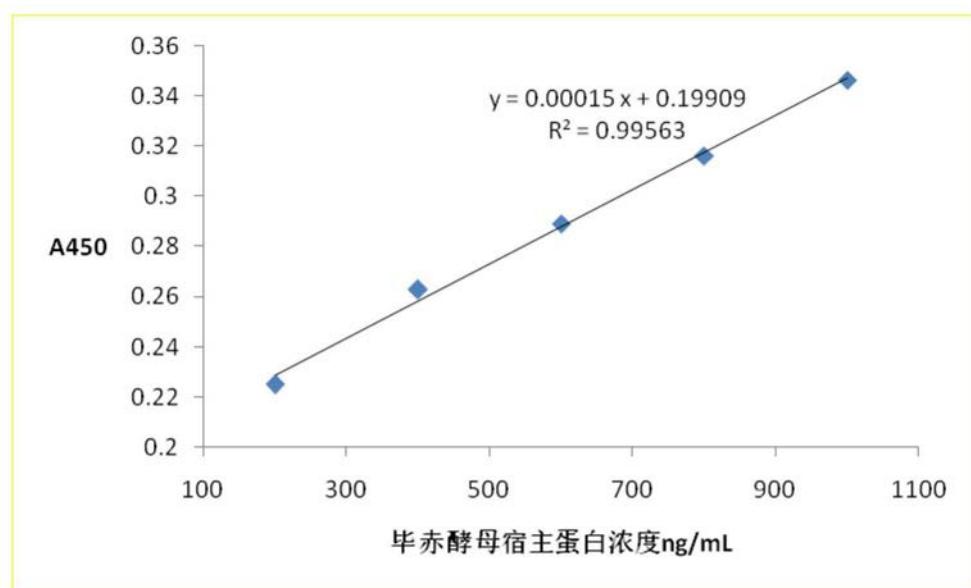


图8

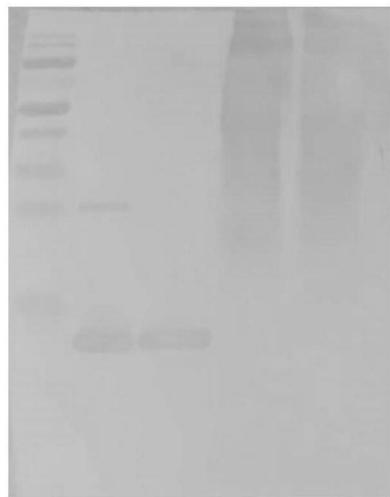


图9

专利名称(译)	重组人溶菌酶中毕赤酵母宿主蛋白残留量的检测方法		
公开(公告)号	CN109799335A	公开(公告)日	2019-05-24
申请号	CN201910094712.7	申请日	2019-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	陕西慧康生物科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	陕西慧康生物科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	陕西慧康生物科技有限责任公司		
[标]发明人	李晓颖 高恩 史瑾 侯增森 陈沛 王鑫 杨小琳 赵金礼		
发明人	李晓颖 高恩 史瑾 侯增森 陈沛 王鑫 杨小琳 赵金礼		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/561		
外部链接	Espacenet Sipo		
摘要(译)	<p>一种重组人溶菌酶原料中毕赤酵母宿主蛋白残留量的检测方法，由制备重组人溶菌酶、制备毕赤酵母宿主蛋白、检测毕赤酵母宿主蛋白的总蛋白含量、制备毕赤酵母宿主蛋白抗血清、消除重组人溶菌酶与毕赤酵母宿主蛋白免疫兔血清和毕赤酵母宿主蛋白免疫羊血清的交叉反应、毕赤酵母宿主蛋白双向电泳、检测毕赤酵母宿主蛋白的抗体覆盖率、酶联免疫检测步骤组成。采用本发明检测方法对重组人溶菌酶中的毕赤酵母宿主蛋白进行连续3批次检测，毕赤酵母宿主蛋白含量均<0.05%，符合《中华人民共和国药典》规定的<0.1%的标准。本发明检测方法具有特异性强、抗体覆盖率全、无交叉反应等优点，可用于毕赤酵母宿主蛋白的含量检测。</p>		

