



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103641913 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 19

(21) 申请号 201310664352. 2

(22) 申请日 2013. 12. 10

(71) 申请人 上海博唯生物科技有限公司

地址 201318 上海市浦东新区康新公路
3377 号 2 号楼 306、307 室

(72) 发明人 张高峡

(51) Int. Cl.

C07K 16/14 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

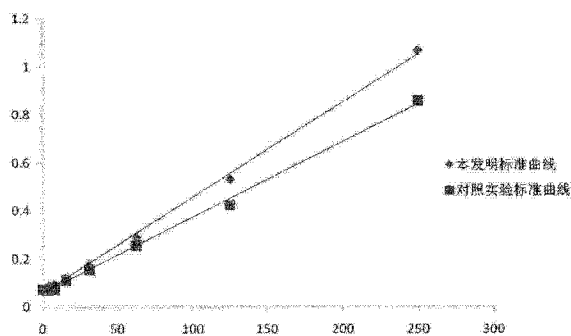
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种汉逊酵母 HCP 抗体制备方法, 制得抗体
及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抗汉逊酵母宿主蛋白 (HCP) 抗体, 所述抗汉逊酵母宿主蛋白抗体为多克隆抗体, 以汉逊酵母菌株制得汉逊酵母宿主蛋白后经动物免疫再经抗体纯化后制得。本发明还提供了该抗体的制备方法, 该方法包括制备汉逊酵母宿主细胞全蛋白, 通过在常规免疫动物的方法中加入抗原纯化步骤, 使得动物在对汉逊酵母全部宿主细胞产生免疫反应后, 加强对于部分较弱免疫原性宿主蛋白的免疫反应性, 从而制得低免加强型宿主残余蛋白抗体; 实验结果表明, 本发明提供的抗体可应用于 ELISA 检测宿主残余蛋白中, 不仅能提高灵敏度, 而且对于大部分由汉逊酵母表达的生物制品的宿主残余蛋白检测都通用, 因此具有十分广阔的应用前景。



1. 一种制备汉逊酵母宿主蛋白 (HCP) 抗体的方法, 其特征在于通过在常规免疫动物的方法中加入抗原纯化步骤, 使得动物在对汉逊酵母全部宿主细胞产生免疫反应后, 加强对于部分较弱免疫原性宿主蛋白的免疫反应性, 从而制得低免加强型 HCP 抗体。

2. 如权利要求 1 所述的一种制备汉逊酵母 HCP 抗体的方法, 具体步骤如下:

a) 选取几种常用汉逊酵母菌种分别进行种子培养和诱导表达, 收集菌体;

b) 将上述分别诱导表达的菌体, 各取相等的重量, 进行混合, 细胞破碎, 固液分离, 收集破菌上清, 过滤除菌, 制得汉逊酵母 HCP 全蛋白;

c) 使用汉逊酵母 HCP 全蛋白加上合适的佐剂免疫动物, 数次免疫后, 获得中间抗体;

d) 使用中间抗体制备亲和层析胶, 亲和纯化汉逊酵母 HCP 全蛋白, 获得汉逊酵母 HCP 低免蛋白;

e) 使用汉逊酵母 HCP 低免蛋白在步骤 c) 的基础上继续免疫动物, 数次后, 获得汉逊酵母 HCP 低免加强型抗体。

3. 如权利要求 2 所述的一种制备汉逊酵母 HCP 抗体的方法, 其特征在于, 步骤 a) 所述的常用汉逊酵母菌种均为野生型, 优选为 3 种, 分别为 ATCC14754、ATCC34438 和 ATCC66057。

4. 如权利要求 2 所述的一种制备汉逊酵母 HCP 抗体的方法, 其特征在于, 步骤 c) 中所述的免疫动物程序, 优选为三次, 分别为在第 0, 14, 28 天进行。

5. 如权利要求 2 所述的一种制备汉逊酵母 HCP 抗体的方法, 其特征在于, 步骤 e) 中所述的免疫动物程序, 以步骤 c) 制得的汉逊酵母低免蛋白为抗原与佐剂共免疫动物, 优选为三次, 分别为在第 42, 49, 56 天进行。

6. 一种汉逊酵母 HCP 低免加强型抗体, 所述汉逊酵母 HCP 低免加强型抗体为多克隆抗体, 以汉逊酵母菌株制得汉逊酵母宿主蛋白后经动物免疫再经抗体纯化后制得。

7. 如权利要求 8 所述的一种汉逊酵母 HCP 低免加强型抗体, 其特征在于, 所述动物免疫中还包括将抗原纯化步骤, 使得免疫动物在对全部宿主细胞产生免疫反应后, 加强对于较弱免疫原性宿主蛋白的免疫反应性, 所述抗原纯化步骤为采用动物免疫中抗汉逊酵母宿主蛋白抗体的中间抗体纯化汉逊酵母宿主细胞全蛋白, 获得汉逊酵母宿主细胞低免蛋白。

8. 一种汉逊酵母 HCP 低免加强型抗体的应用, 主要是作为活性成分用于制备检测通过汉逊酵母表达系统制备的生物制品宿主蛋白残留量的试剂或试剂盒。

一种汉逊酵母 HCP 抗体制备方法, 制得抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药及检测技术领域, 具体地说, 涉及一种检测用抗体的制备方法, 更具体地说, 涉及一种汉逊酵母 HCP (Host cell protein, HCP, 宿主蛋白) 抗体的制备方法, 该方法制备所得抗体, 以及该抗体在相关检测技术中的应用。

背景技术

[0002] 酵母菌作为单细胞真核生物, 既具有原核生物生长快, 遗传操作简单的特点, 又具有与高等真核生物相似的基因表达调控和翻译后修饰机制, 因此是生产具有真核生物活性蛋白理想的表达系统。其中多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*) 是国际上公认的一种理想的外源基因表达系统, 优于大肠杆菌和其他酵母菌的外源基因表达系统, 近年来已有大量难以高效表达的外源蛋白在汉逊酵母表达系统中都得以成功表达; 其在生物制品产业化应用价值如下: 1) 外源基因整合于染色体上, 重组菌株遗传稳定性高; 2) 非同源重组的频率高, 易获得高拷贝整合的转化子; 3) 可利用甲醇氧化酶 (MOX) 启动子等强启动子高效的启动外源基因的表达; 4) 外源蛋白的表达在过氧化物酶体内进行, 可使其免受细胞内蛋白酶的降解, 并降低了对细胞的毒害作用; 5) 耐高温, 最适生长温度为 37-43℃, 生长速率快, 大规模发酵的培养时间短。当前采用多形汉逊酵母作为表达系统已上市的生物制品有重组乙型肝炎病毒疫苗、水蛭素等; 另外还有多种外源蛋白在多形汉逊酵母中成功表达的报道。

[0003] 宿主细胞中含有大量的宿主蛋白 (Host cell protein, HCP)、DNA 和内毒素等, 均可能给生物制品造成污染。其中宿主蛋白潜在的免疫原性有可能诱导机体产生相应抗体, 发生免疫反应; 而且其潜在的“佐剂效应”也可能引起机体对药物产生抗体, 进而影响药物的疗效。灵敏度高、重复性好的宿主蛋白检测方法不仅是保证生物制品安全有效的关键, 也是生产过程控制和工艺优化的重要参数。

[0004] 目前, 酵母宿主蛋白检测方法主要有酶联免疫法 (ELISA)、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、毛细管电泳 (CE)、反相 HPLC、离子色谱等。《中国药典》三部 (2010 版) 中宿主蛋白残留量检测方法采用酶联免疫法 (ELISA)。ELISA 检测方法中所用的抗宿主蛋白抗体通常是将宿主细胞破碎后, 经过初步处理得到宿主蛋白, 免疫动物后获得。宿主细胞破碎方法包括: 有机试剂裂解; 溶菌酶等酶类的酶促反应; 超声、高压匀浆等物理破碎。初步处理方式包括: 固液分离; 超滤浓缩等。

[0005] 常规的酵母 HCP 抗体制备方法, 由于 HCP 分子量大小不一, 成分复杂, 各成分之间免疫原性差异大, 而不容易得到合适的 HCP 抗体。这是因为, 常规方法将酵母 HCP 全部成分免疫动物之后, 获得抗体主要结合分子量大且免疫原性强的 HCP 成分, 对于低分子量且免疫原性弱的 HCP 成分无结合能力。使用这种制备方法产生的抗体, 会导致在通过 ELISA (酶联免疫法) 检测生物制品中 HCP 残留时灵敏度大大降低, 并且由于部分低免疫原性的 HCP 成分无法检测而造成实际测定值偏低。

[0006] 综合上述, 目前尚无一种合适的用于汉逊酵母宿主蛋白残留量检测的汉逊酵母 HCP 抗体及使用该抗体进行检测的方法, 更没有相关的配套试剂及试剂盒。

发明内容

[0007] 针对现有检测技术存在的上述不足,为了给汉逊酵母发酵生物制品中残留宿主蛋白检测提供一种快速有效、简单可靠、适用大规模推广应用的检测方法,本发明通过对现有汉逊酵母宿主蛋白制备免疫抗体的方法进行改良,所制备得到的抗体具有免疫原性强,检测灵敏度高的特点。

[0008] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:一种新型制备汉逊酵母 HCP 抗体的方法,通过在常规免疫动物的方法中加入抗原纯化步骤,使得动物在对汉逊酵母全部宿主细胞产生免疫反应后,加强对于部分较弱免疫原性宿主蛋白的免疫反应性,从而制得低免加强型 HCP 抗体;

[0009] 作为一种优选方案,所述新型制备汉逊酵母 HCP 抗体的方法,具体步骤如下:

[0010] a) 取 2~4 种常用汉逊酵母菌种分别进行种子培养和诱导表达,诱导表达 48~90 小时之后,收集菌体;

[0011] b) 将上述分别诱导表达的菌体,各取相等的重量进行混合,细胞破碎,固液分离,收集破菌上清,过滤除菌,制得混合汉逊酵母 HCP 全蛋白;

[0012] c) 使用混合汉逊酵母 HCP 全蛋白加上合适的佐剂免疫动物,共三次免疫,获得中间抗体;

[0013] d) 使用中间抗体制备亲和层析胶,亲和纯化汉逊酵母 HCP 全蛋白,获得汉逊酵母 HCP 低免蛋白;

[0014] e) 使用汉逊酵母 HCP 低免蛋白在步骤 c) 的基础上继续免疫动物,共三次,获得汉逊酵母 HCP 低免加强型抗体;

[0015] 其中,步骤 a) 中所述的 2~4 种常用汉逊酵母菌种均为野生型,,优选为 3 种,分别为 ATCC14754、ATCC34438 和 ATCC66057;

[0016] 步骤 c) 中所述的免疫动物,共三次,分别为在第 0,14,28 天进行;

[0017] 步骤 d) 中所述的使用中间抗体纯化汉逊酵母 HCP 全蛋白获得 HCP 低免蛋白的步骤为将汉逊酵母 HCP 全蛋白适量,加入中间抗体亲和层析胶内,收集流穿蛋白样品,即为汉逊酵母宿主细胞低免蛋白,用于后续的第四、五、六次免疫;

[0018] 步骤 e) 中所述的免疫动物程序,以步骤 c) 制得的汉逊酵母低免蛋白为抗原与佐剂共免疫动物三次,分别为在第 42,49,56 天进行;所述动物可为小鼠、大鼠、豚鼠、兔、羊、马,优选为兔和豚鼠;

[0019] 所述佐剂选自弗氏佐剂、氢氧化铝佐剂、磷酸铝佐剂、脂质体佐剂、CpG 佐剂,优选为弗氏佐剂,最佳为弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂;

[0020] 本发明的另一个目的是提供一种汉逊酵母 HCP 低免加强型抗体,所述汉逊酵母 HCP 低免加强型抗体为多克隆抗体,以汉逊酵母菌株制得汉逊酵母宿主蛋白后经动物免疫再经抗体纯化后制得;

[0021] 作为一种优选方案,所述动物免疫中还包括将抗原纯化步骤,使得免疫动物在对全部宿主细胞产生免疫反应后,加强对于较弱免疫原性宿主蛋白的免疫反应性;

[0022] 作为更进一步优选方案,所述抗原纯化步骤为采用动物免疫中抗汉逊酵母宿主蛋白抗体的中间抗体纯化汉逊酵母宿主细胞全蛋白,获得汉逊酵母宿主细胞低免蛋白;

[0023] 本发明的另一种目的是提供汉逊酵母 HCP 低免加强型抗体的应用,主要是作为活性成分用于制备检测汉逊酵母表达系统制备的生物制品宿主蛋白残留量的试剂或试剂盒;作为一种优选方案,所述检测汉逊酵母宿主蛋白的产品为检测试剂或检测试剂盒;

[0024] 本发明中所称汉逊酵母宿主蛋白,即为汉逊酵母 HCP,也是汉逊酵母宿主全蛋白,或称汉逊酵母全蛋白,指的是将培养好的汉逊酵母菌体经收集,破碎,离心分离,收集上清,过滤除菌后制得的产物,可直接选取一定剂量,用于免疫动物;

[0025] 本发明中所称汉逊酵母宿主低免蛋白,指的是汉逊酵母全蛋白中那部分分子量较小,免疫原性较低,混合在汉逊酵母全蛋白中用常规方法免疫动物不容易得到抗体的成分;

[0026] 与现有技术相比,本发明针对现有技术中汉逊酵母宿主蛋白检测手段的不足,提供了一种检测灵敏度高的抗汉逊酵母宿主蛋白抗体及其制备方法,在免疫动物中加入抗原纯化步骤,使得动物在对全部宿主细胞产生免疫反应后,加强对于较弱免疫原性宿主蛋白的免疫反应性。实验结果表明,本发明提供的抗体可应用于 ELISA 检测 HCP 中,不仅能提高灵敏度,而且由于本发明在制备酵母宿主全蛋白时,采用了常用的几种野生型汉逊酵母菌株按一定比例混合制成,对于大多数由汉逊酵母表达的生物制品 HCP 检测都通用,适用面广。

附图说明

[0027] 图 1 为本发明与现有技术标准曲线对照图。

具体实施方式

[0028] 下面结合实施例及对比例对本发明作进一步详细、完整地说明。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,例如 Smabrook 等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。比例和百分比基于重量,除非特别说明。

[0029] 以下实施例的实验中所用到的动物、仪器设备、试剂及其配制等均是来自市售。

[0030] 多形汉逊酵母菌株: ATCC14754, ATCC34438, ATCC66057

[0031] YPD 培养基: 自配, 1% 酵母粉、2% 蛋白胨、2% 葡萄糖。

[0032] BMMY 培养基: 自配, 1% 酵母粉、2% 蛋白胨、100mM 磷酸钾缓冲液 (pH6.0)、 $4 \times 10^{-5}\%$ Biotin (生物素, Sigma 公司)、1.34% YNB (酵母氮源碱, BD 公司), 使用前加入 3% 甲醇。

[0033] 高压均质机: ATS AH-100B

[0034] 高速冷冻离心机: Thermo Fisher lynx4000

[0035] 弗氏完全佐剂: Sigma 公司

[0036] 弗氏不完全佐剂: Sigma 公司

[0037] Sephadex G25 层析柱: GE 公司

[0038] 亲和层析柱 UNOSPHERE: Bio-rad 公司

[0039] 本发明中所使用的其它生物试剂和化学试剂, 如无特别说明, 均为分析纯或分析纯以上级别。

[0040] 实施例 1 汉逊酵母 HCP 抗体的制备

[0041] 1. 汉逊酵母宿主全蛋白的制备

[0042] 采用来源于美国模式菌种收集中心 (ATCC) 的多形汉逊酵母菌株, 选取应用较为广泛的三株野生型标准菌株, 编号为 ATCC14754, ATCC34438, ATCC66057。将上述三株菌株分别接种至 YPD 培养基, 37℃ 培养, 24 小时后换成 BMMY 培养基诱导基因表达, 每 24 小时添加 0.5% 甲醇, 表达 72 小时后, 10000rpm 离心 10min 收集菌体。上述菌体培养诱导过程完全模拟含有外源基因的汉逊酵母工程菌株生产时的培养诱导条件。

[0043] 将上述制得三株菌株的菌体各取 50g 混合, 加入 4℃ 预冷的缓冲溶液 A (50mM PB, 0.2M NaCl, 0.5% Tween-80, pH7.0) 600mL, 于磁力搅拌器上搅拌至完全混匀。采用高压均质机 (ATS AH-100B) 高压破碎以上菌体混悬液, 调节均质阀, 控制破菌压力为 1200bar。重复以上高压破碎过程 3-4 遍。高速冷冻离心机 (Thermo Fisher lynx4000) 离心澄清破菌液, 设定条件 10000rpm, 30min, 8℃, 离心分离, 收集离心后的上清液。用缓冲溶液 A 将上清液稀释至蛋白浓度 500ug/mL, 用 0.22um 滤膜过滤除菌, 分装后 -80℃ 保存; 制得汉逊酵母宿主细胞全蛋白。

[0044] 2. 动物免疫程序

[0045] 取三只兔和两只豚鼠进行动物免疫, 分别进行六次免疫, 采用抗原与佐剂等体积混合, 乳化采用注射器混合法: 将等量的弗氏佐剂和抗原溶液分别吸入两个注射器内, 两注射器之间以一细胶管相连, 注意排净空气, 然后交替推动针管, 直至形成粘稠的乳剂为止, 即为乳化充分。乳化充分后, 免疫动物。初免采用弗氏完全佐剂, 随后的免疫都采用弗氏不完全佐剂。免疫剂量为 0.5mg/ 兔子, 0.25mg/ 豚鼠, 采用背部皮下多点注射。

[0046] 具体免疫程序为: 初免 (0 天, 弗氏完全佐剂), 抗原为汉逊酵母宿主细胞全蛋白; 二免 (14 天, 弗氏不完全佐剂), 抗原为汉逊酵母宿主细胞全蛋白; 三免 (28 天, 弗氏不完全佐剂), 抗原为汉逊酵母宿主细胞全蛋白。

[0047] 三免后, 将一只兔子处死, 采血, 获得中间抗体; 用中间抗体纯化汉逊酵母宿主细胞全蛋白, 获得汉逊酵母宿主细胞低免蛋白, 其中汉逊酵母宿主细胞低免蛋白具体制备方法为: 在第三次免疫后, 处死一只兔子, 取 20mL 兔血清, 加生理盐水稀释一倍, 滴加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液至终浓度为 50%, 充分混合后, 静置 5-6 小时, 12000rpm 离心 20min, 弃上清。沉淀用 20mL 的生理盐水溶解, 滴加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液至终浓度为 33%, 充分混合后, 静置 5-6 小时, 12000rpm 离心 20min, 弃上清; 沉淀用 10mL 生理盐水溶解, 离心的上清液通过 Sephadex G25 层析柱 (GE 公司) 脱盐, 换液至 PBS 溶液中 (pH7.4)。过亲和层析柱 UNOSPHERE (Bio-rad 公司), 用 0.1M pH3.0 的柠檬酸缓冲液洗脱获得兔 IgG 抗体; 该抗体主要结合汉逊酵母宿主细胞全蛋白中大分子量、免疫原性高的抗原蛋白。使用 Affi-Gel Hz immunoaffinity kit (Bio-rad) 试剂盒, 将所得兔 IgG 抗体换液至 Coupling Buffer, 使用 NaIO₄ 氧化抗体, 再次换液 Coupling Buffer, 并偶联至 Affi-Gel Hz Gel, 制得兔 IgG 抗体的亲和胶。使用上述兔 IgG 抗体亲和胶, 纯化步骤 1) 制得的汉逊酵母宿主细胞全蛋白; 将汉逊酵母宿主细胞全蛋白样品 10mL, 加入兔 IgG 抗体亲和层析柱 (亲和胶 20mL), 收集流穿蛋白样品, 即为汉逊酵母宿主细胞低免蛋白, 用于后续的四、五、六次免疫。

[0048] 剩下的两只兔子和两只豚鼠再进行后续三次免疫; 四免 (42 天, 弗氏不完全佐剂), 抗原为汉逊酵母宿主细胞低免蛋白; 五免 (49 天, 弗氏不完全佐剂), 抗原为汉逊酵母

宿主细胞低免蛋白；六免（56 天，弗氏不完全佐剂），抗原为汉逊酵母宿主细胞低免蛋白。63 天处死、采血，血清纯化，具体步骤为将血清加生理盐水稀释一倍，滴加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液至终浓度为 50%，充分混合后，静置 5-6 小时，12000rpm 离心 20min，弃上清。沉淀用 20mL 的生理盐水溶解，滴加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液至终浓度为 33%，充分混合后，静置 5-6 小时，12000rpm 离心 20min，弃上清；沉淀用 10mL 生理盐水溶解，离心的上清液通过 Sephadex G25 层析柱（GE 公司）脱盐，换液至 PBS 溶液中（pH7.4）。过亲和层析柱 UNOSPHERE（Bio-rad 公司），用 0.1M pH3.0 的柠檬酸缓冲液洗脱获得。后分别得到兔子与豚鼠抗汉逊酵母宿主蛋白多克隆抗体。

[0049] 实施例 2 抗汉逊酵母宿主蛋白抗体效价测定

[0050] 采用 ELISA 法检测抗体效价，具体为：采用包被液（0.05M NaHCO_3 ，pH9.6）将汉逊酵母宿主细胞全蛋白稀释至 10ug/mL，100uL/孔，4℃包被过夜。除去包被液，用 PBS 溶液洗涤两次。每孔加入 0.3mL 封闭液（5%脱脂奶粉+PBS）于 37℃保温 2 小时；再除去包被液，PBS 溶液洗涤两次。将上述纯化获得的兔抗/豚鼠抗汉逊酵母宿主蛋白抗体分别稀释至 1mg/mL，再系列 10 倍稀释，稀释缓冲液为 2%脱脂奶粉+PBS。每孔加入 100uL，于 37℃保温 1 小时，除去抗体溶液，PBS 溶液洗涤两次。然后向每孔加入用稀释缓冲液以 1:5000 稀释的酶标二抗（HRP 标记的羊抗兔及 HR 标记的羊抗豚鼠）各 100uL，37℃保温 0.5 小时后除去酶标液，PBS 溶液洗涤两次。然后向每孔中加入 100uL DAB 显色液，室温避光作用 10 分钟后加 2M H_2SO_4 0.05mL 终止液终止反应，并用酶标比色仪测定 OD_{450} 值，并计算抗体效价，抗体效价值如表 1 所示。

[0051] 表 1 动物抗体效价值

[0052]

	兔抗-1	兔抗-2	豚鼠抗-1	豚鼠抗-2
效价	1×10^7	1×10^7	1×10^7	1×10^6

[0053] 由表 1 可知，本发明方法的抗原纯化方式及免疫步骤能获得高效价的抗体。

[0054] 实施例 3 双抗体夹心法测定汉逊酵母宿主蛋白含量

[0055] 包被：用包被液（0.05M NaHCO_3 ，pH9.6）将豚鼠抗汉逊酵母宿主细胞抗体稀释至 10ug/mL，100uL/孔，4℃包被过夜。除去包被液，用 PBS 溶液洗涤两次。每孔加入 0.3mL 封闭液（5%脱脂奶粉+PBS）于 37℃保温 2 小时。除去包被液，PBS 溶液洗涤两次。

[0056] 加样：将上述获得的汉逊酵母宿主细胞全蛋白样品稀释至 250ng/mL、125ng/mL、62.5ng/mL、31.25ng/mL、15.63ng/mL、7.81ng/mL、3.9ng/mL，稀释缓冲液为含 2%脱脂奶粉的 PBS，各孔加入 100uL 稀释样品，单加稀释缓冲液的孔作为阴性对照。于 37℃保温 1 小时，除去抗体溶液，PBS 溶液洗涤两次。

[0057] 比色及结果计算：然后向每孔加入用稀释缓冲液以 1:5000 稀释的酶标二抗（HRP 标记的羊抗兔 IgG）100uL，37℃保温 0.5 小时后除去酶标液，PBS 溶液洗涤两次。然后向每孔中加入 100uL DAB 显色液，室温避光作用 10 分钟后加 2M H_2SO_4 0.05mL 终止液终止反应，并用酶标比色仪测定 OD_{450} 值。用线性拟合法绘制标准曲线，如图 1 所示。由图 1 可知，标准曲线 R^2 为 0.998，应用该方法检测汉逊酵母宿主蛋白的灵敏度达到 4ng/mL。

[0058] 实施例 4 现有技术对照实验

[0059] 汉逊酵母宿主细胞全蛋白的制备和免疫程序如上述实施例 1 所述,一免至六免都使用汉逊酵母宿主细胞全蛋白,抗体纯化及双夹心法测定步骤如上述实施例 3 所述。用线性拟合法绘制标准曲线,如图 1 所示,标准曲线 R^2 为 0.997,检测汉逊酵母宿主蛋白的灵敏度为 15.6ng/mL。本发明检测结果与原有技术对比结果见图 1,本发明的检测结果灵敏度更高,线性更佳。

[0060] 实施例 5 汉逊酵母重组表达乙肝表面抗原蛋白(HBsAg)的宿主细胞残留量检测应用

[0061] 1. 重组 HBsAg 的表达

[0062] 编码 HBsAg 蛋白的 DNA 参照 GenBank :AF479684 的序列,密码子采用汉逊酵母中使用频率较高的密码子进行优化,全基因合成。

[0063] 采用 BstBI 酶和 KpnI 酶的混合酶处理上述合成的基因与 pMOX 质粒,酶切后的片段由 T4DNA 连接酶连接,获得的重组质粒转化大肠杆菌 DH5 菌株,37℃过夜倒置培养。挑取部分克隆抽提质粒,以 BstBI 和 KpnI 酶切鉴定,获得 HBsAg 汉逊酵母表达质粒。

[0064] 汉逊酵母菌株来源于中国普通微生物菌种保藏管理中心,CGMCC 编号 2,2497。将重组 HBsAg 汉逊酵母表达质粒用 ScaI 酶切线性化,电转汉逊酵母。电转后菌液涂布 YPD 平板(2000g/ml Zeocin)37℃过夜倒置培养 2 天,挑取生长情况较好的一株作为重组 HBsAg 表达菌株。

[0065] 将重组 HBsAg 表达菌株接入 500ml 种子培养基(YPD 培养基),37℃培养过夜,按 1:15 接种发酵罐。

[0066] 使用 BIOENGINEERINGRALF Basic 发酵罐,发酵采用基础盐培养基 BSM。检测菌体湿重增加到 100 ~ 200g/L 时,开始加入甲醇诱导,诱导 48 小时发酵结束。

[0067] 采用冷冻离心机对发酵液进行固液分离,离心转速 8000rpm,离心 10 分钟。离心结束后弃上清,收集菌体。

[0068] 菌体用高压匀浆机破碎后,经过系列微滤、超滤、疏水层析、阴离子层析、分子筛层析,获得纯化的 HBsAg 蛋白。

[0069] 2. 汉逊酵母宿主蛋白残留量的检测

[0070] 包被:用包被液(0.05MNaHCO₃, pH9.6)将豚鼠抗汉逊酵母宿主细胞抗体稀释至 10ug/mL,100uL/孔,4℃包被过夜。除去包被液,用 PBS 溶液洗涤两次。每孔加入 0.3mL 封闭液(5%脱脂奶粉+PBS)于 37℃保温 2 小时。除去包被液,PBS 溶液洗涤两次。

[0071] 加样:将汉逊酵母宿主细胞全蛋白(抗原 1)样品为阳性参考品(作标准曲线用),稀释至 250ng/mL、125ng/mL、62.5ng/mL、31.25ng/mL、15.63ng/mL、7.81ng/mL、3.9ng/mL。重组 HBsAg 蛋白稀释至 10ug/mL 加样,复孔测定。稀释缓冲液为含 2%脱脂奶粉的 PBS,各孔加入 100uL 稀释样品,单加稀释缓冲液的孔作为阴性对照,于 37℃保温 1 小时,PBS 溶液洗涤两次。每孔加入用稀释缓冲液以 1:5000 稀释的兔抗汉逊酵母宿主细胞抗体,于 37℃保温 1 小时,PBS 溶液洗涤两次,除去抗体溶液。

[0072] 比色及结果计算:然后向每孔加入用稀释缓冲液以 1:5000 稀释的酶标二抗(HRP 标记的羊抗兔 IgG)100uL,37℃保温 0.5 小时后除去酶标液,PBS 溶液洗涤两次。然后向每孔中加入 100uL DAB 显色液,室温避光作用 10 分钟后加 2MH₂SO₄0.05mL 终止液终止反应,并用酶标比色仪测定 OD₄₅₀ 值。

[0073] 以上述实施例 5(本发明)及实施例 4(对照实验)所得抗体分别测定同一重组 HBsAg

[0074] 蛋白样品中的汉逊酵母宿主细胞残留量,结果如表 2 所示:表 2

[0075]

	使用本发明抗体检测结果	使用对照实验抗体检测结果
OD450	0.767	0.380
ELISA 检测结果	177.5 ng	107.7 ng
重组 HBsAg 蛋白宿 主细胞残留量	1.78%	1.08%

[0076] 最后有必要在此说明的是:以上实施例只用于对本发明的技术方案作进一步详细地说明,不能理解为对本发明保护范围的限制,本领域的技术人员根据本发明的上述内容作出的一些非本质的改进和调整均属于本发明的保护范围。

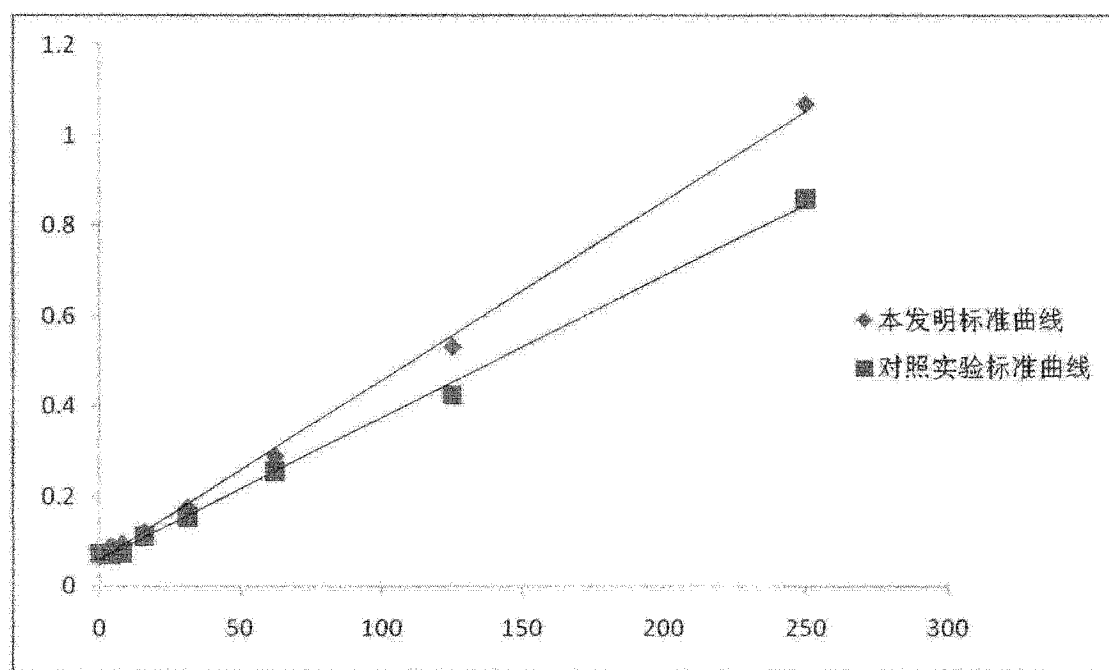


图 1

专利名称(译)	一种汉逊酵母HCP抗体制备方法,制得抗体及其应用		
公开(公告)号	CN103641913A	公开(公告)日	2014-03-19
申请号	CN201310664352.2	申请日	2013-12-10
[标]申请(专利权)人(译)	上海博唯生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海博唯生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海博唯生物科技有限公司		
[标]发明人	张高峡		
发明人	张高峡		
IPC分类号	C07K16/14 G01N33/68 G01N33/53		
其他公开文献	CN103641913B		
外部链接	SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗汉逊酵母宿主蛋白(HCP)抗体,所述抗汉逊酵母宿主蛋白抗体为多克隆抗体,以汉逊酵母菌株制得汉逊酵母宿主蛋白后经动物免疫再经抗体纯化后制得。本发明还提供了该抗体的制备方法,该方法包括制备汉逊酵母宿主细胞全蛋白,通过在常规免疫动物的方法中加入抗原纯化步骤,使得动物在对汉逊酵母全部宿主细胞产生免疫反应后,加强对于部分较弱免疫原性宿主蛋白的免疫反应性,从而制得低免加强型宿主残余蛋白抗体;实验结果表明,本发明提供的抗体可应用于ELISA检测宿主残余蛋白中,不仅能提高灵敏度,而且对于大部分由汉逊酵母表达的生物制品的宿主残余蛋白检测都通用,因此具有十分广阔的应用前景。

