

通用型Protein A残留检测试剂盒说明书

【背景资料】

Protein A是A型金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的细胞壁成分,分子量大约为42 kD,由五个高度同源的结构域组成,且每个结构域均可与IgG结合。结合结构域由三个反平行 α 螺旋组成,其中螺旋I和II与Fc结合。在中性条件下Protein A与IgG Fc紧密结合,在酸性条件下解离。工业中利用Protein A与IgG Fc的结合解离特性,将Protein A偶连到固相载体上制备成不同款式的亲和填料广泛应用抗体类药物的纯化生产。

Protein A在纯化应用中,不可避免会产生脱落,导致抗体药物中出现Protein A的残留。有研究证明,Protein A可以和体内免疫球蛋白结合封闭Fc、交联部分B细胞模型抗体Fab,也可以和TNFR、C1qR等相互作用而引起机体的副反应。ICH Q6B及中国药典三部中“人用重组单克隆抗体制品总论”均对其Protein A残留的检测进行了要求。

【检测原理】

样品进行稀释后加入酸处理液并煮沸,使结合抗体的Protein A解离。

将处理后样品/标准品加入预先包被捕获抗体的板中,与HRP标记的Protein A单抗经孵育后特异性结合。

洗板,去除非特异性结合的成分后加入TMB底物溶液。当被催化时底物变蓝色。

加入终止液终止反应。在450 nm处读取吸光值。信号值与样品/标准品中Protein A浓度成正比。

【试剂盒特点】

试剂盒包被和检测抗体均为单克隆抗体,可保证批间一致性。

应用范围广。可用于多款国产填料及进口填料的Protein A残留检测。

操作简便。样品前处理后一步洗板,可节省操作步骤。

性能合规。可通过准确度、精密度、线性、定量限、专属性等验证。

【试剂盒组成】

编 号	名 称	规 格	货 号	描 述
A	预包被酶标板	96孔*1板	P101-A	预先包被Protein A捕获抗体的96孔板
B	标准品稀释液	50mL*1瓶	P101-B	用于标准品稀释及样品稀释
C	酸处理液	25 mL*1瓶	P101-C	用于标准品及样品前处理,可使Protein A与抗体解离
D	测试缓冲液	6 mL*1瓶	P101-D	HRP标记抗体的稀释液
E	10×洗涤液	15 mL*1瓶	P101-E	稀释至1×后用于洗板
F	HRP标记抗体	1.2 mL*1管	P101-F	偶联HRP的Protein A单抗
G	TMB溶液	15 mL*1瓶	P101-G	HRP显色反应底物
H	终止液	6 mL*1瓶	P101-H	终止显色反应
I	Protein A标准品	100 μ L*1管	P101-I	用于配制标曲

【保存条件】

所有组分应于2~8℃环境下储存,并于有效期内使用。

【实验所需自备器材】

1. 用于稀释样品/标准品的精密移液器及匹配吸头, 体积在10 μ L到100 μ L之间
2. 用于配制1 $\times$ 洗涤液的去离子水或蒸馏水
3. 用于洗板后拍干的吸水纸
4. 用于加热的金属浴或水浴锅
5. 用于离心样本的离心机
6. 用于孵育的摇床或振荡孵育器
7. 用于读取OD450的酶标仪

【使用方法】

▪ 试剂准备

1. 使用前所有试剂组分及待测样本需恢复室温(15~25 $^{\circ}$ C)。回温完全后试剂应澄清无结晶。
2. 洗涤液配制: 将10 $\times$ 洗涤液(组分E)平衡至室温(15~25 $^{\circ}$ C)。根据所需的量用纯化水或蒸馏水按1:10的比例, 制成1 $\times$ 洗涤液。

▪ 工作标准品的配置

将ProteinA标准品(2 μ g/mL)(组分I)恢复至室温(15~25 $^{\circ}$ C)。取8个1.5ml离心管, 参照下表, 分别加入对应体积的标准品稀释液(组分B)。随后参照下表稀释步骤依次制备工作标准品10ng/mL、5 ng/mL、2.5 ng/mL、1.25 ng/mL、0.625 ng/mL、0.312 ng/mL、0.156ng/mL、0 ng/mL。

ProteinA工作标准品配制体系			
管号	标准品稀释液体积(μ L)	加入的标准品和体积(μ L)	工作标准品终浓度(ng/mL)
A	995	5(2 μ g/mL)	10
B	500	500A	5
C	500	500B	2.5
D	500	500C	1.25
E	500	500D	0.625
F	500	500E	0.312
G	500	500F	0.156
H	500	/	0

▪ 工作标准品及待测样品的前处理

1. 将待测样品用标准品稀释液(组分B)稀释至1 mg/mL以下, 并使ProteinA含量低于最高检测限10ng/mL。
2. 取400 μ L稀释后的待测样品以及各浓度的工作标准品分别置于新的离心管中, 分别加200 μ L酸处理液(组分C), 置于沸水浴或金属浴中100 $^{\circ}$ C中保持10min。
3. 室温静置冷却5min后, 12000rpm离心5min, 上清待用。

■ 加样及检测

1. 用测试缓冲液(组分D)按1:4.5比例稀释HRP标记抗体(组分F)。
2. 取稀释后的HRP标记抗体以50 μ L/孔加入预包被酶标板(组分A), 再取前处理后的样品离心上清100 μ L/孔加入预包被酶标板(组分A)。置于室温(15~25°C)摇床240 rpm孵育2小时。
3. 弃孔内液体, 每孔加入200 μ L 1 $\times$ 洗涤液, 重复洗板3次, 每次弃液后需在无尘纸上拍干酶标板, 至无液体残留。
4. 显色: 每孔加入100 μ L TMB溶液(组分G), 室温(15~25°C)摇床240 rpm反应10min。
5. 终止: 每孔加入50 μ L终止液(组分H)。在10min内用酶标仪在450nm波长下读取吸光度值。

■ 数据处理

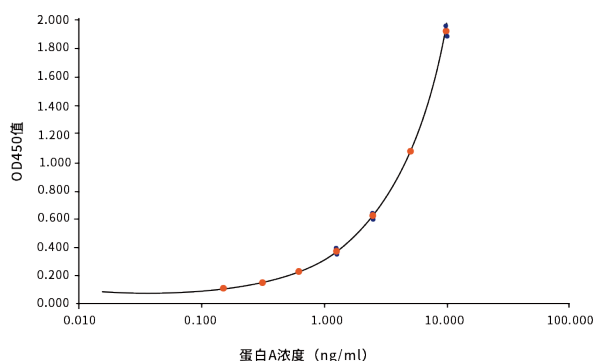
以工作标准品浓度为横坐标, 工作标准品450nm的吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。多种绘图和统计学软件均可辅助绘制标准曲线。一般用四参数拟合法绘制标准曲线效果较好。根据标准曲线和样本的稀释倍数计算样本中的Protein A浓度。

【 注意事项 】

1. 样品的稀释浓度应根据具体项目摸索得出。推荐浓度为1 mg/ml以下。稀释后Protein A残留量应低于10 ng/ml。
2. 组分H终止液中含强酸性溶液, 使用过程应注意防护。
3. 若实验只用到部分预包被板条, 则剩余部分板条应及时放回铝塑袋密封, 并于2~8°C保存。
4. 实验对温度较敏感, 操作所处环境应控制温度在15~25°C之间。
5. 实验用移液器应经过计量校准, 加液时避免吸头松动引起数据波动。

【 验证数据 】

标准曲线典型图谱



典型标准曲线数据

序号	孔	标准品理论浓度 (ng/ml)	平均OD值	回算蛋白A浓度 (ng/ml)	CV	回收率
S1	A1	10.00	1.833	10.2	2.7%	102%
	A2	10.00	1.796	9.79		98%
S2	B1	5.000	1.166	5.03	1.1%	101%
	B2	5.000	1.179	5.10		102%
S3	C1	2.500	0.653	2.44	0.5%	98%
	C2	2.500	0.649	2.43		97%
S4	D1	1.250	0.370	1.26	1.4%	101%
	D2	1.250	0.364	1.24		99%
S5	E1	0.625	0.221	0.669	2.6%	107%
	E2	0.625	0.215	0.645		103%
S6	F1	0.313	0.140	0.335	1.0%	107%
	F2	0.313	0.141	0.339		108%
S7	G1	0.156	0.101	0.166	0.6%	106%
	G2	0.156	0.102	0.168		108%
S8	H1	0.000	0.058	0	2.4%	N/A
	H2	0.000	0.060	0		N/A

某单抗方法验证主要数据：

验证项目	可接受标准	结果				是否通过	
线性	标准品 0 ng/ml (背景) OD450 平均值≤0.3。标准曲线 R ² ≥0.98。除标准品 0.156ng/ml 不作规定外, 0.312 ng/ml 的复孔 CV 应≤15%, 回收率应在 70~130%其余标准品各点回收率应为 80~125%。CV (%) 应 ≤10%	0 ng/ml OD450		0.072		通过	
		标曲 R ²		1			
		回收率 (10~0.625ng/ml)		95~103%			
		回收率 (0.312ng/ml)		100%			
		CV (10~0.625ng/ml)		≤6.1			
		CV (0.312ng/ml)		10.2%			
专属性	样品缓冲液检出值 < 0.15 ng/ml, 缓冲液加标回收率应在 70~130%范围内。	缓冲液检出值		0 ng/ml		通过	
		加标回收率		116%			
		是否满足标曲适用性要求		☑ 是 ☐ 否			
重复性	6 份 LQC 样品的 Pro.A 检测结果 RSD≤20%	6 份 MQC 样品的 RSD		2.7%		通过	
中间精密度	不同天不同人共 6 份平行制备不同加标浓度样品的 RSD≤30%。		HQC	MQC	LQC	通过	
		RSD	3.3%	1.9%	5.5%		
准确度	HQC, MQC, LQC 的回收率均在 70%~130%范围内。	HQC 回收率		MQC 回收率		LQC 回收率	通过
		97%~105%		95%~101%		92~110%	
定量限	最低加标浓度的回收率在 70%~130%	LQC (对应的加标浓度为 1 ng/ml) 回收率				通过	
		92%~110%					
范围	引用定量限和线性验证的数据确定。	1 ng/ml ~8.5 ng/ml					
耐用性	2~8℃存放 3、5、7 天 HRP 抗体的 OD450 同 0 天 对比 变化 应在 90%~110%以内	变化值在 97%~105%之内。				通过	