

低丰度宿主残留蛋白富集试剂盒 (磁珠法) 说明书

货号：1302100

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点和常见问题！

版本：A/2

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 规格

5 mL (10 mg/mL)

■ 预期用途

低丰度宿主残留蛋白 (Host Cell Protein, HCP) 富集试剂盒, 专为生物制品 (如单抗、融合蛋白等) 中低丰度 HCP 的富集而设计。该试剂盒处理富集后的 HCP 样品可用于电泳分析和液相质谱表征分析等。

该试剂盒仅供研究使用, 不可用于诊断。

■ 试剂盒简介

在生物制品的生产过程中, 通常会生成和残留一些宿主细胞蛋白 (Host Cell Proteins, HCPs) 等杂质。这些蛋白质具有潜在的风险, 可能会影响药物的安全性和有效性。因此, 对 HCP 监测是生物药物生产中一个关键质量属性, 它要求在药物的开发和生产阶段对 HCP 的存在进行严格的监控、管理和记录。

随着生产流程, 生物制品的纯度逐渐提高, 相应地, HCP 的含量也在持续降低。这使得对 HCP 的分析和监测工作变得更加具有挑战性。因此, 开发高效的 HCP 富集材料和技术变得尤为关键。

本试剂盒利用磁珠法构建了一个多样化且复杂的亲和配体库, 旨在高效地结合蛋白。由于磁性纳米颗粒的独特性质, 本试剂盒能够快速捕获样品中的低丰度 HCP, 从而极大地提高了检测的灵敏度。同时, 由于亲和配体库的广泛适用性, 使得该试剂盒在处理多种生物制品样本时都能表现良好的 HCP 富集效率。此外, 本试剂盒采用了质谱兼容的试剂, 为后续使用质谱进行样本中低丰度 HCP 表征分析的用户提供了方便。本试剂盒的设计和应用不仅提高了低丰度 HCP 检测的准确性和可靠性, 还为生物制品生产中的质量控制提供了有力工具。

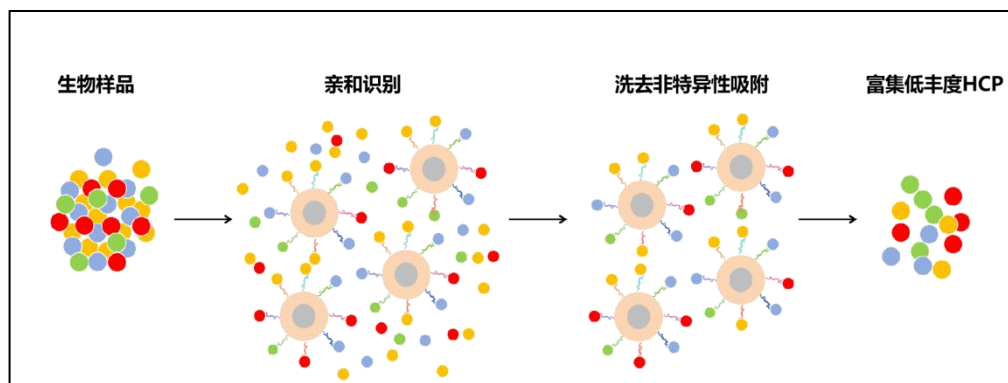


图 1 试剂盒原理示意图

■ 试剂盒组分

表 1 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
低丰度蛋白富集磁珠	PNR004	1 mL × 5 管	2-8 °C
10×洗涤液	PNJ002	8 mL × 1 瓶	2-8 °C
洗脱液 A	PNR012	500 μL × 4 管	-18 °C及以下
洗脱液 B	PNR006	500 μL × 4 管	-18 °C及以下
洗脱液 C	PNR007	200 μL × 2 管	2-8 °C, 避光
100 mM Tris (pH 8.0)	PNR008	10 mL × 2 瓶	2-8 °C
10 mM Tris (pH 7.0)	PNR009	12 mL × 3 瓶	2-8 °C

■ 有效期

规定存储条件下有效期为 12 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 超纯水
- 低吸附离心管
- 移液器配套用低吸附带滤芯枪头
- 超滤管（若不使用超滤法，则非必需）
- 蛋白、肽段定量试剂盒
- 后续分析试剂等

■ 相关设备

- 磁力架
- 单道或多道的微量移液器
- 实验室超声波清洗仪
- 垂直混匀仪
- 漩涡振荡器
- 离心机
- 恒温金属浴或水浴锅

■ 实验操作流程示意图

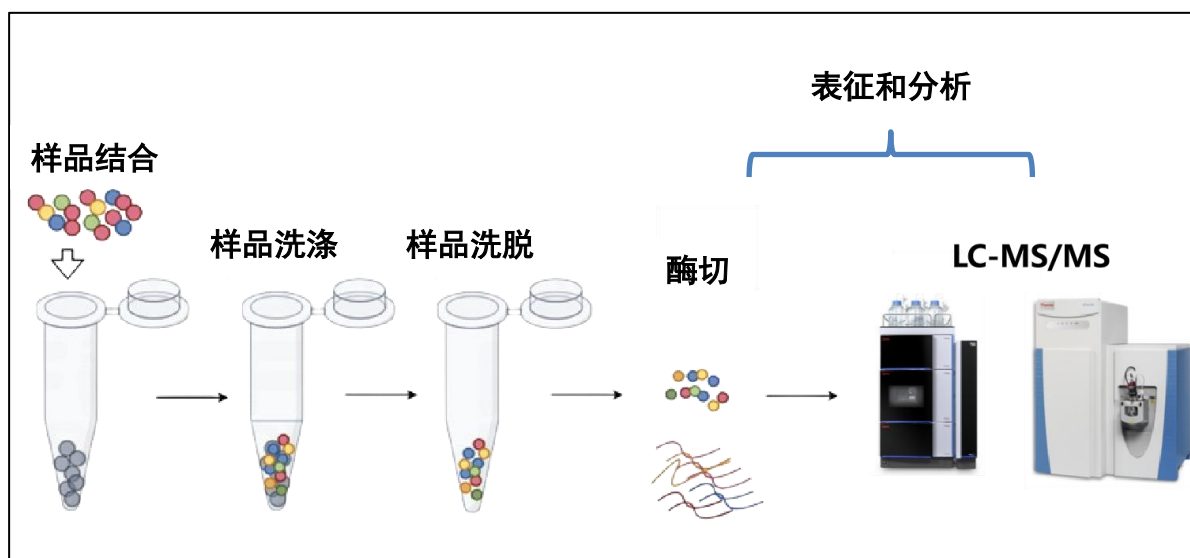


图 2 操作流程示意图

■ 操作步骤

此操作步骤富集后的样品适用于用户后续进行凝胶电泳、液相质谱等分析操作。若富集后使用质谱进行表征，可参考后续章节中**质谱表征和分析的操作步骤**。

（一）样品前处理

由于样品中的表面活性剂、盐（NaCl、KCl 等）会影响 HCP 的提取效果，因此若样品基质中存在以上干扰物，则建议在使用试剂盒先将样品通过超滤、盐析或透析等方式将以上干扰物去除，将样品基质置换成 10 mM Tris（pH 7.0）。

以下以超滤法进行样品前处理示例，供参考：

1. 取 500 μL 20 mg/mL 样品加入到 500 μL 超滤管中（超滤管规格建议选择 3 kDa，且已润洗，若样品浓度较低，可选择更大体积的超滤管），在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10,000 \times g 条件下（离心力请参考所用超滤管的要求）超滤离心 30 分钟，使溶液体积减少至原始体积 1/5 左右。
2. 加入 300 μL 10 mM Tris（pH7.0），在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10,000 \times g 条件下超滤 30 分钟，使溶液体积减少至原始体积 1/5 左右。
3. 重复步骤 2，一至二次。
4. 收集超滤管内的样品到新的离心管中。
5. 在已移除样品的超滤管中加入 50 μL 10 mM Tris（pH7.0）润洗管壁，将润洗液合并到步骤 4 中的离心管中，以减少样品损失。

6. 重复步骤 5, 一次。
7. 得到经由超滤处理后的样品。

(二) 磁珠清洗

建议: 每 10 mg 样品与 100 μ L 的低丰度蛋白富集磁珠反应以达到较佳的富集效率, 以下以 10 mg 样品为例说明。

1. 从试剂盒中取出磁珠, 超声或涡旋使磁珠均匀分散, 取 100 μ L 低丰度蛋白富集磁珠于 2 mL 低吸附离心管底部, 置于磁力架上进行磁分离, 去除上清, 至无液体残留。
2. 加入 500 μ L 超纯水, 水浴超声分散并快速洗涤磁珠 (超声频率为 40 kHz, 每超声 3 秒拿起试管晃动 2 秒, 观察磁珠分散情况直至磁珠完全分散至无肉眼可见的聚沉现象)。
3. 置于磁力架上进行磁分离, 尽量使磁珠集中于离心管底部, 磁分离后去除上清, 至离心管底部无液体残留。
4. 重复步骤 2、3, 两次。

(三) 样品结合

1. 向磁分离后去除溶液的磁珠离心管中, 加入 10 mg 已通过超滤等前处理的样品, 涡旋或超声使磁珠分散, 至无肉眼可见的磁珠聚沉现象。
2. 在室温下, 使用垂直混匀仪 (30 转/分钟) 孵育 2-4 小时。

(四) 样品洗涤

1. 孵育后, 尽量使磁珠集中于离心管底部, 再使用磁力架将磁珠分离, 去除上清。
2. 加入 500 μ L 1 \times 洗涤液 (10 \times 洗涤液用超纯水稀释成 1 \times 洗涤液) 水浴超声分散磁珠, 并使用垂直混匀仪 (30 转/分钟) 在室温下孵育 5 分钟, 然后尽量使磁珠集中于离心管底部, 磁分离后去除上清。
3. 重复步骤 2, 两次。

(五) 样品洗脱

配制 400 μ L 洗脱液: 40 μ L 洗脱液 A + 360 μ L 100 mM Tris (pH 8.0)

1. 去除洗涤液后, 加入 200 μ L 洗脱液, 水浴超声使磁珠均匀分散于洗脱液中。
2. 使用垂直混匀仪 (30 转/分钟) 在室温下孵育 15 分钟。
3. 尽量使磁珠集中于离心管底部, 磁分离后收集上清液至 1.5 mL 低吸附离心管

中。

4. 向磁珠中再次加入 200 μL 洗脱液，重复步骤 1、2，一次。
5. 合并两次收集到的上清液（共计 400 μL ），此即为 **HCP 富集液**。
6. 使用蛋白定量试剂盒测定 HCP 富集液中的蛋白质含量。
7. 若富集后的 HCP 总量不足以满足后续实验需求，可考虑增加样品量和磁珠的使用量（建议比例为样品与磁珠质量比 10:1 至 5:1），以达到后续分析所需的 HCP 总量。

（六）表征和分析

将 **HCP 富集液** 进行下游分析，或保存在 -18°C 及以下。

备注：以上操作步骤仅供参考，具体可根据实际情况进行调整并验证。

■ 质谱表征和分析（仅供参考）

- 根据 HCP 富集液的体积，添加洗脱液 B 和洗脱液 C，使 HCP 富集液：洗脱液 B：洗脱液 C 的体积比为 50：5：1，（例：400 μL 的富集液，则添加 40 μL 洗脱液 B 和 8 μL 洗脱液 C），混匀后放置于金属浴或水浴锅中， 95°C 加热 7 分钟，使蛋白完成变性、还原、烷基化。
- 待溶液恢复室温后，加入 Trypsin（胰蛋白酶：蛋白=1:50）， 37°C 酶切 17 h 以上。
- 酶切结束后向溶液中加入终浓度为 1% 的甲酸，振荡混匀，出现白色沉淀物。
- 在 4°C 、 $15,000 \times g$ 条件下离心 15 分钟，吸取上清液，上清液即为 HCP 肽段。
- HCP 肽段通过脱盐柱进行脱盐处理（根据所用液相选择此步骤，下同）。
- 挥干后，加入 0.1% 甲酸复溶。
- 使用肽段定量试剂盒对肽段进行定量。
- 根据用户所使用的液相质谱，选择合适的肽段量和液相质谱条件进行上机，完成质谱表征分析。

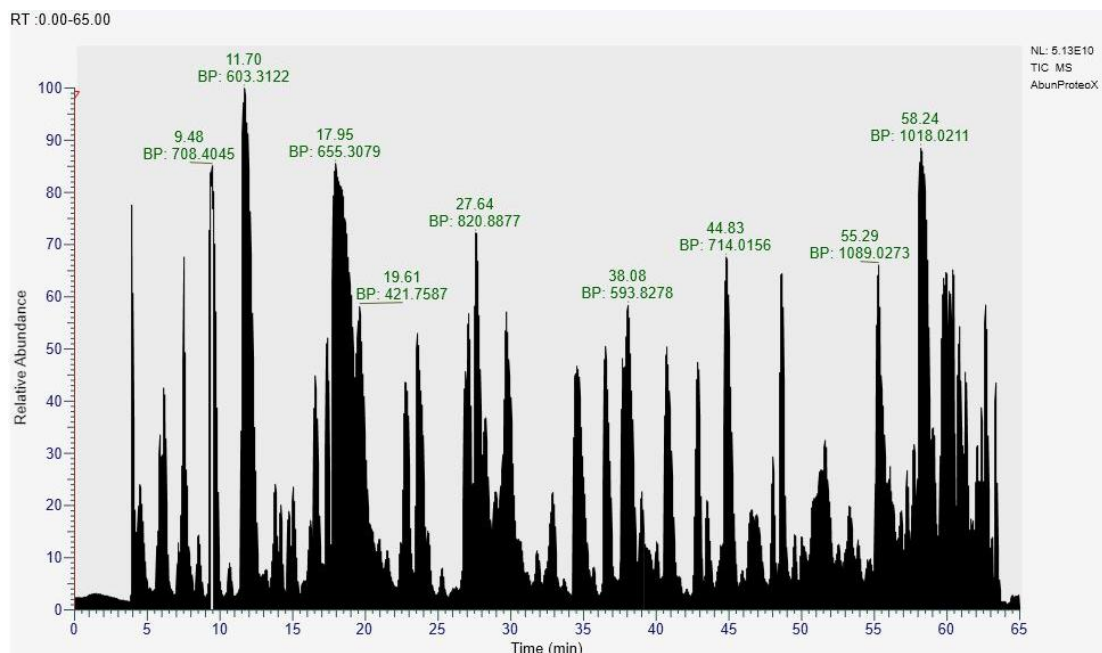


图 3 单抗样品中的HCP质谱总离子流 (TIC) 示例图

■ 重要事项提醒

试剂盒使用人员需经过培训，合格后方可使用。为了获得满意的检测结果，请您务必事先留意如下几点事项：

- ◇ 所有的试剂配制务必使用无菌一次性的吸头、试管和加样槽等，切勿混用。避免微量移液器吸头连接部分的污染，建议每次实验前后用 75%酒精擦拭。规范移液操作，严禁液体倒吸到移液器，或未去掉吸头时横放在桌上。
- ◇ 不同批次试剂盒不建议混用。
- ◇ 磁珠与样品孵育前，建议使用超滤等方法去除样品中的干扰物，并将溶液置换成 10 mM Tris (pH 7.0)，以利于 HCP 的富集。
- ◇ 通常样品浓度越高，HCP 富集效果越好，建议样品浓度范围 10 mg/mL-100 mg/mL。
- ◇ 样品与磁珠的质量最优比是 10:1 至 5:1，可随实验需求增加或降低磁珠用量。
- ◇ 在每一步加入溶液时，要将磁珠分散均匀，以达到最佳纯化效果。
- ◇ 在进行任何下游分析之前，需要对样品中的蛋白质含量进行定量。
- ◇ 在磁分离去除上清时，勿让磁珠过于干燥，以免磁珠聚沉不利于后续分散。

■ 常见问题分析

问题描述	可能原因	解决方法
富集效率低	样品中可能含表面活性剂（如吐温、曲拉通或聚山梨酯等）或高浓度的盐离子等，从而影响磁珠与蛋白的结合。	将样品通过超滤、稀释、透析或盐析等方式，去除可能存在的干扰物。
	磁珠分散不完全、结块等，从而影响HCP富集。	在进行磁分离时避免磁珠长时间暴露在空气中，造成磁珠过于干燥；另可使用超声清洗仪使磁珠分散。
	洗涤过程中磁珠有损失。	注意在移除上清时不要碰到磁珠；增加磁分离时间，减少磁珠损失。
	磁珠附着于管壁上。	使用低吸附离心管，并借助超声清洗仪的使用使磁珠在溶液中良好分散。
分析效果不佳	可能在分析前未将蛋白或肽段进行准确定量，上样量过多或过少导致表征效果不佳。	富集后的蛋白建议使用总蛋白定量法（如BCA法）进行准确定量；酶切后的肽段建议使用肽段定量法进行准确定量。

修订日期：2026年01月22日

生效日期：2026年01月28日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址：浙江省湖州市红丰路1366号6号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话：400-878-2189