

重组人促卵泡激素 (rhFSH) 制剂的 SDS-PAGE / Western blot 鉴别方法研究*

梁成罡, 毛歆, 沈舒, 李晶, 杨化新

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 目的: 建立可用于不同剂型重组人促卵泡激素 (rhFSH) 产品质量控制的特异性 SDS-PAGE / Western blot 鉴别方法。方法: 用 SDS-PAGE 电泳分离由不同生产企业生产的不同剂型 rhFSH 产品, 通过半干电泳将凝胶上的待测蛋白转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜), 采用特异性抗体在 NC 膜上进行免疫杂交。通过检测灵敏度、线性和专属性试验, 进行方法学考察。结果: 对 rhFSH 特异性检测灵敏度可达 5 ng, 对 3 个厂家生产的 3 种注射液、1 种注射用冻干制剂检测, 均可得到阳性结果, 且试验结果不受不同剂型中的防腐剂、稳定剂和其他辅料干扰; 用本法对等量的其他重组糖蛋白激素如重组人促黄体激素 (hLH)、重组人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 测定结果均为阴性。结论: 本方法灵敏度高、专属性强, 可作为 rhFSH 的特异性鉴别方法, 用于不同剂型 rhFSH 产品的质量控制。

关键词: Western blot; 重组人促卵泡激素 (rhFSH); 免疫鉴别; 质量控制

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)10-1611-04

Study on identification of the preparations of the recombinant human follicle stimulating (rhFSH) by SDS-PAGE / Western Blot*

LIANG Cheng-gang MAO Xin SHEN Shu LI Jing YANG Hua-xin

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products Beijing 100050 China)

Abstract Objective To establish the method of specific identification by SDS-PAGE / Western blot for the different dosage forms of the recombinant human follicle stimulating (rhFSH). **Methods** The samples of different dosage forms of the rhFSH preparations produced by different manufactures were subjected to SDS-PAGE under non-reducing conditions. After transferring the proteins in lanes from the gel to the nitrocellulose filter (NC) by half-dry electrophoresis, the specific antibody to FSH was used to immunodetect the rhFSH on the NC. The method was evaluated by sensitivity determination, linear study and specificity test. **Results** A minimum of 5 ng of the rhFSH could be detected in the sensitivity test. All the results obtained from the samples of three kinds of injection solution and one kind of power for injection which produced by three different manufactures were positive. Furthermore, these results would not be influenced by preservatives, stabilizers and other excipients formulated in different dosage forms. All the results were negative when the other glycoprotein hormones such as the recombinant human luteum stimulating (hLH) and the recombinant human chorionic gonadotrophin (hCG) were tested by the method described above. **Conclusion** The method developed here has high sensitivity and high specificity. It may be served as the routine method of specific identification in quality control for different dosage forms of the rhFSH products.

Key words Western blot; recombinant human follicle stimulating (rhFSH); immunoidentification; quality control

重组人促卵泡激素 (rhFSH) 临床主要用于不孕症治疗, 在我国有很大的市场空间。迄今为止, 在我国已上市销售的有雪兰诺公司的果纳芬注射液和注

射用冻干制剂, 以及欧加农公司的普利康注射液。此外, 其他国内外企业生产和研发的此类产品也已进入进口注册申报或临床研究阶段。

* 国家“863”“十五”科技攻关课题基金资助项目 (2007AA021601)

第一作者 Tel: (010) 67095310 E-mail: liangchenggang@sina.com

根据 ICH 及我国相关法规和技术指导原则要求,重组制品应建立针对制剂特有分子结构和其他特性的定性鉴别试验方法^[1,2]。目前我国已上市的 rhFSH 制剂质量标准中通常有基于与对照品一致的液相色谱鉴别方法,但没有针对 rhFSH 分子结构的特异性鉴别试验。因此,有必要研究建立特异性强,可用于不同剂型的免疫鉴别方法,以更好地控制 rhFSH 产品质量,同时提高我国研发企业生产此类产品的质量控制水平。

目前可应用于人体治疗的糖蛋白激素主要有 4 种,分别是促甲状腺素(thyroid stimulating hormone, TSH)、促黄体生成素(LH)、促卵泡激素(FSH)、以及绒毛膜促性腺激素(CG)。4 种糖蛋白激素分子结构相似,有相同的(亚基)^[3,4]。因此,特异性的 rhFSH 免疫鉴别方法不仅需要排除制剂辅料和蛋白类稳定剂的干扰,还必须具有能够与其他糖蛋白激素区分的 rhFSH 专属性。本文研究建立的 SDS-AGE Western blot 免疫鉴别方法,检测灵敏度高,耐用性和专属性好,可用于不同剂型的 rhFSH 制剂鉴别。

1 材料与试剂

1.1 材料 rhFSH 对照品溶液为企业提供(0.47 mg·mL⁻¹); 含人血清白蛋白(HSA)作稳定剂的 rhFSH 注射液(75 IU·mL⁻¹, 3 个批号: 004 005 006 150 IU·mL⁻¹, 3 个批号: 904 905 906)由进口企业 1 生产, rhFSH 注射液(300 IU/22 μg/0.5 mL)、rhFSH 冻干制剂(5.5 μg/75 IU/支)、rhLH 冻干制剂(75 IU·支⁻¹)、rhCG 注射液(250 IU: 0.5 mL)由进口企业 2 生产, rhFSH 注射液(100 IU·mL⁻¹)由进口企业 3 生产; rhFSH 冻干制剂(5.5 μg/75 IU/支)由国内企业提供; 鼠抗人促卵泡激素抗体由 USBiological 生产; A 标记兔抗鼠抗体、兔抗人血清白蛋白多克隆抗体、HSA 由 Signa 生产; A 标记羊抗兔抗体由 Calbiochem 生产; 预染蛋白电泳相对分子质量标准为 Fementas 生产; 硝酸纤维素膜为 Schleicher & Schuell 生产; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器和设备 hamacia E S-3500 电源、半干电泳转移装置, Bio-rad 垂直板电泳槽, 恒温加热块, 凝胶成像仪。

1.3 溶液配制

SDS-AGE 凝胶、电极缓冲液、染色和脱色液、2×非还原上样缓冲液的制备参见中国药典 2005 年版二部附录^[5]

BS 缓冲液(0.01 mol·L⁻¹, pH 7.4)、转移缓冲液(pH 8.4)、底物缓冲液(pH 9.8)、显色液的制备参见中国药典 2005 年版三部附录^[6]。

封闭液: 称取脱脂奶粉 2.5 g 用 BS 缓冲液制成 1.25% 的溶液。

制剂辅料缓冲液: 称取 HSA 10 mg, D-甘露糖 300 mg, 氯化钠 20 mg, 磷酸钠 15 mg 加水 10 mL 溶解。

2 方法

2.1 SDS-AGE/Western blot 试验方法

2.1.1 SDS-AGE 电泳 取供试品溶液、对照品溶液各 20 μL, 预染蛋白电泳相对分子质量标准 5 μL, 点样电泳 1.5 h。

2.1.2 Western blot 电转移 将凝胶在转移缓冲液中浸泡 15 min, 与 NC 膜一同置于石墨电极上, 恒流 50 mA 转移 2 h。

2.1.3 免疫杂交 将膜取下置于封闭液中室温封闭 2 h, 用 BS 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入用 BS 缓冲液 1:1000 稀释的一抗溶液, 室温 2 h 或 4℃ 过夜; 用 BS 溶液洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入用 BS 缓冲液 1:2000 稀释的二抗溶液, 室温 1 h, 用 BS 溶液洗膜 4 次, 每次 10 min, 将膜置显色液中, 室温显色 30 min, 用 BS 溶液洗膜 10 min, 干燥; 凝胶成像仪扫描或用数码相机记录结果。

2.2 检测灵敏度 取 rhFSH 对照品溶液(0.47 mg·mL⁻¹)适量, 加水稀释成 128 μg·mL⁻¹ 的溶液, 用水 4 倍梯度稀释成 32, 8, 2, 0.5 μg·mL⁻¹; 各取 20 μL, 加入 20 μL 的 2×非还原上样缓冲液, 混匀。照“2.1”项下方法试验。

2.3 系统适用性考察

2.3.1 蛋白稳定剂干扰试验 称取 HSA 适量, 用水溶解并制成 1.0 mg·mL⁻¹, 作为 HSA 对照品溶液; 取浓度为 75 IU·mL⁻¹ 的 rhFSH 供试品溶液各 50 μL, 加入 50 μL 的 2×非还原上样缓冲液。照“2.1”项下方法试验, 平行制备 2 块电泳凝胶; 电泳后 A 胶用于转移, 用 rhFSH 特异性抗体检测; B 胶用考马氏亮蓝染色, 对比考染和免疫杂交显色结果。

2.3.2 混合抗体杂交试验 同“2.5.1”项下方法制备各种溶液, 照“2.1”项下方法试验, 免疫杂交时同时加入 rhFSH 特异性抗体和 HSA 特异性抗体。

2.4 方法专属性试验 取 rhLH 冻干制剂(75 IU·支⁻¹)1 支, 加水 0.5 mL 溶解; 取 rhCG 注射液(250 IU: 0.5 mL)1 支备用; 各取 50 μL, 加入 50 μL 的 2×非还原上样缓冲液。以 rhFSH 供试品溶液为对

照,照“2.1”项下方法试验。

2.5 供试品检测

2.5.1 rhFSH 鉴别用对照品溶液 取对照品溶液 20 μL ,加水稀释制成 $23 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,取 50 μL ,加入 HSA 制剂辅料缓冲液 50 μL ,混匀后取 50 μL ,加入 50 μL 的 $2 \times$ 非还原上样缓冲液。

2.5.2 供试品溶液 将上述 4 个企业生产的 3 种 rhFSH 注射液和 2 种 rhFSH 冻干制剂共 10 批样品,分别用制剂辅料缓冲液制成 $75 \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,各取 50 μL ,加入 50 μL 的 $2 \times$ 非还原上样缓冲液。

2.5.3 检测 照“2.1”项下方法试验。

3 结果

3.1 检测灵敏度 结果表明(图 1-B),rhFSH 对照品各浓度显色呈梯度,根据 rhFSH 点样量计算,检测灵敏度可达 5 ng 相当于单位数为 0.05 U 的 rhFSH。

3.2 系统适用性考察 在 SDS-AGE 考马氏亮蓝染色图上有明显的 HSA 条带(图 1-A 第 2 泳道),但用 rhFSH 抗体杂交所得的免疫印迹图,在相应位置上没有阳性杂交反应条带(图 1-B 第 2 泳道)。结果表明,供试品中的 HSA 稳定剂不会干扰特异性免疫反应。采用 2 种抗体同时检测 rhFSH 和 HSA 时,无法得到良好的 rhFSH 显色条带。

3.3 方法专属性试验 结果表明(图 2-A 第 3 泳道;图 2-B 第 8 泳道),在相同试验条件下,本方法所用的 rhFSH 抗体不与其他糖蛋白激素反应。

3.4 供试品检测 结果表明(图 2-A 第 2、4、5、6 泳道;图 2-B 第 3、4、5、6、7、10 泳道),在相同的试验条件下,本研究所用不同企业生产的 10 批不同剂型 rhFSH 制剂,免疫印迹鉴别结果均为阳性。

4 讨论

4.1 激素是内分泌系统的微量调节分子,药物临床施用剂量较小, rhFSH 的单一剂量制剂通常每支中仅含有 75~200 U(约 7~20 μg)主药成分,浓度通常为 $50 \sim 150 \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,因此要求鉴别试验有较高的灵敏度。本方法的检测灵敏度可达 5 ng(约 0.05 U),根据取样体积倍数计算,此灵敏度可用于检测 rhFSH 浓度为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (约 $5 \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)的样品溶液,完全能够满足此类产品的检定要求。

4.2 Western blot 免疫鉴别的基本原理是针对蛋白质结构特异性的抗原抗体反应。糖蛋白激素家族的 4 种激素分子结构均由 α 、 β 2 个亚基组成,其 β 亚基分子均相同,因此, rhFSH 鉴别试验所用的抗体不仅要能将 rhFSH 与其他类型蛋白相区分,还必须

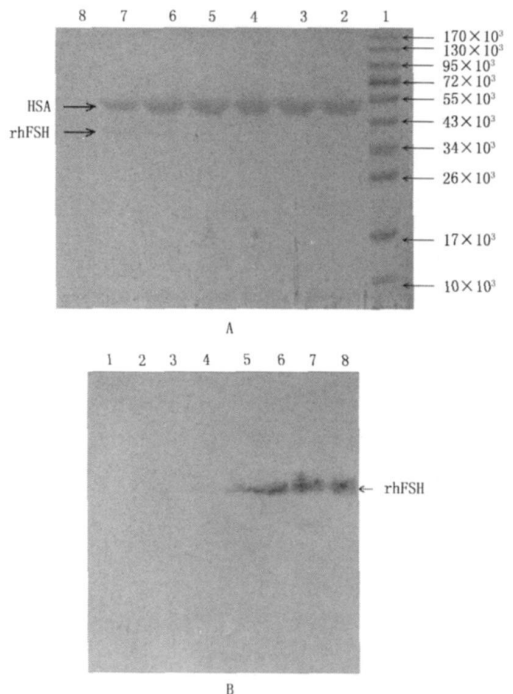


图 1 灵敏度试验

Fig 1 Sensitivity testing

A. SDS-AGE 图 (pattern of the SDS-AGE stained by comassie brilliant blue) B 免疫印迹图 (pattern of the western-blot)

第 1 泳道: 预染蛋白相对分子质量标准 (Lane 1: prestained marker)

第 2 泳道: HSA 制剂辅料缓冲液 (Lane 2 HSA formulated buffer)

第 3~7 泳道: rhFSH 梯度, 3~7 泳道含 rhFSH 的量分别为 5、20、80、320、1280 ng (Lane 3~7 gradient reference standards which contained 5、20、80、320、1280 ng of rhFSH respectively)

第 8 泳道: 国内某企业生产的 1 μg rhFSH 原液 (Lane 8 1 μg of rhFSH bulk solution produced by a native manufacturer)

针对 rhFSH 特有的抗原决定簇,使其能与其他糖蛋白激素相区分。研究结果表明,本研究选用的抗体应为特异性针对 β 亚基的抗体,不与其他糖蛋白激素如 rhLH 和 rhCG 反应,是理想的 rhFSH 鉴别用抗体,本方法具有良好的专属性。

4.3 不同生产企业生产的不同 rhFSH 产品剂型,处方组成各不相同,使用不同的稳定剂、防腐剂和其他辅料成分。国际上已上市的产品包括用 HSA 做稳定剂的注射液,用间甲酚作防腐剂的注射液和用蔗糖作稳定剂的冻干制剂。本文选用上述各种剂型的 rhFSH 产品作为供试品,证明 HSA、间甲酚、蔗糖和甘露糖等辅料成分均不干扰试验结果。此外,对于采用 HSA 做稳定剂的产品,质量标准中还要求有对 HSA 的免疫鉴别试验,本文通过混合抗体杂交试验发现,由于制剂中 HSA 浓度 ($1 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 远大于 rhFSH 浓度(约 $7 \sim 15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),在相同的反应体系中,当 rhFSH 显色时, HSA 的显色过强,由于两者

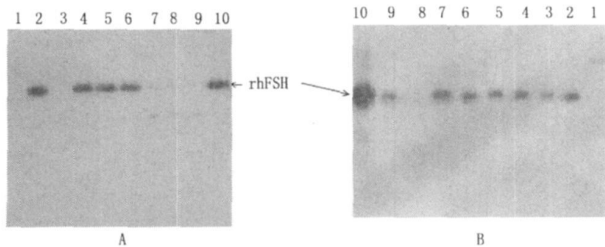


图 2 rhFSH 制剂 Western-blot 检测

Fig 2 Results of the Western-blot testing on the preparations of rhFSH

A. 第 1 泳道: 预染蛋白相对分子质量标准 (Lane 1: prestained marker); 第 2 泳道: rhFSH 冻干制剂, 进口企业 2 (Lane 2: powder for injection of rhFSH, from foreign manufacturer 2); 第 3 泳道: hLH 冻干制剂, 进口企业 2 (Lane 3: powder for injection of hLH, from foreign manufacturer 2); 第 4~6 泳道: rhFSH 注射液, 进口企业 2 批号: 906, 905, 904 (Lane 4~6: injection solution of rhFSH from foreign manufacturer 1, batch number was 906, 905 and 904 respectively); 第 10 泳道: rhFSH 对照品 (Lane 10: reference standard of the rhFSH)

B. 第 1 泳道: 预染蛋白相对分子质量标准 (Lane 1: prestained marker); 第 2 泳道: rhFSH 对照品 (Lane 2: reference standard of the rhFSH); 第 3~5 泳道: rhFSH 注射液, 进口企业 2 批号分别为: 004, 005, 006 (Lane 3~5: injection solution of rhFSH from foreign manufacturer 1, batch number was 004, 005 and 006 respectively); 第 6 泳道: rhFSH 注射液, 进口企业 2 (Lane 6: injection solution of rhFSH, from foreign manufacturer 2); 第 7 泳道: rhFSH 注射液, 进口企业 3 (Lane 7: injection solution of rhFSH, from foreign manufacturer 3); 第 8 泳道: hCG 注射液, 进口企业 2 (Lane 8: injection solution of hCG, from foreign manufacturer 2); 第 9 泳道: hLH 冻干制剂, 进口企业 2 (Lane 9: powder for injection of hLH, from foreign manufacturer 2); 第 10 泳道: 国内某企业的 rhFSH 冻干制剂 (Lane 10: powder for injection of rhFSH, from a native manufacturer)

相对分子质量差别不是很大, HSA 的显色条带将干扰 rhFSH 条带, 使之无法观察, 因此这 2 个鉴别不能在同一试验中完成, 必须分别独立进行。

4.4 上述研究结果表明, 本研究建立的 rhFSH 免疫鉴别方法, 可用于各种已上市和即将上市的 rhFSH 产品剂型的质量控制, 对于此类药物的进口复核以及国内生产企业的研发和申报有良好的支持作用。

参考文献

- 1 ZHOU Hai-jun (周海钧). Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (药品注册的国际技术要求). Beijing (北京): People's Medical Publishing House (人民卫生出版社), 2007: 289
- 2 WANG Jun-zhi (王军志). Research Development and Quality Control for Biopharmaceuticals (生物技术药物研究开发和质量控制). 2nd Ed (第二版). Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 2007
- 3 FA Fares Nachman G, Kraim Z *et al*. The role of the asparagine-linked oligosaccharides of the α -subunit in human thyrotropin bioactivity. *Endocrinology*, 1996, 137(2): 555
- 4 Wiebe O, Willem de B, John WM, *et al*. Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (α -uregon). *Mol Hum Reprod*, 1996, 2(5): 371
- 5 Ch (中国药典). 2005 Vol III (二部): Appendix (附录) 33
- 6 Ch (中国药典). 2005 Vol III (三部): Appendix (附录) 46

(本文于 2009 年 5 月 18 日收到)