

产品名称

CHO 宿主蛋白残留检测试剂盒 (酶联免疫吸附法·一步法)

包装规格

- ❖ 32 T/盒
- ❖ 96 T/盒

预期用途

CHO 宿主蛋白残留检测试剂盒 (酶联免疫吸附法·一步法) 适用于中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 进行表达的生物制品中宿主细胞蛋白 (Host Cell Protein, HCP) 定量检测, 如重组蛋白、抗体药物、疫苗等生物制品。本试剂盒可对纯化中间品、原液及制剂中 HCP 残留进行定量检测, 可用于工艺优化、过程监测与产品放行。本产品属于通用型试剂盒, 不限定具体纯化工艺, 可广泛识别和检测产品中 CHO-K1、CHO-DG44、CHOZN 等细胞株来源的 HCP。

本试剂盒仅供研究使用, 不可用于医学诊断。

检验原理

本试剂盒基于酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) 检测原理, 采用双抗体夹心法测定样品中的 CHO HCP 含量。该检测体系用针对 CHO HCP 的多克隆抗体作为捕获抗体, 预先包被于 96 微孔板表面, 加入校准品或待测样品和辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 标记的酶标检测抗体, 形成“捕获抗体-HCP 抗原-酶标检测抗体”的夹心免疫复合物。经洗涤后, 加入显色液 (3,3',5,5'-四甲基联苯胺, TMB) 显色, TMB 在 HRP 的催化下由无色转化成蓝色并在酸的作用下最终转化成黄色, 产生的吸光度信号 (检测主波长: 450 nm; 参比波长 620 nm~650 nm) 与 HCP 含量在一定范围内呈正相关, 通过建立 HCP 校准品浓度与吸光度之间的标准曲线, 采用四参数拟合模型 (4-Parameter Logistic, 4PL) 计算待测样品中宿主蛋白残留水平。

该方法利用抗体和抗原之间的高度特异性识别特性, 实现对 CHO 来源复杂 HCP 的高灵敏度检测。本试剂盒所用多克隆抗体经过质谱覆盖率验证 (Antibody Affinity Extraction-Mass Spectrometry, AAE-MS), 结果表明该抗体可识别绝大多数 HCP。首次使用本试剂盒时建议先做样品的适用性验证, 确定合适的样本稀释方案, 同时确认样品基质不会对试剂盒体系造成检测干扰。

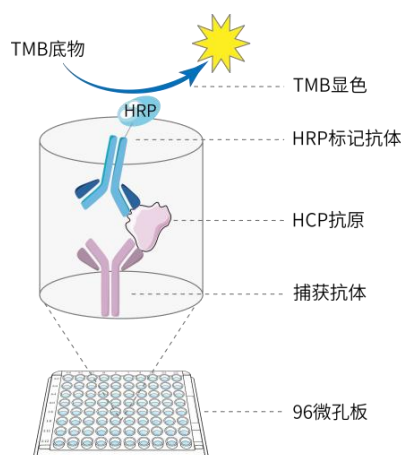


图 1 检测原理示意图

产品性能

1. 本试剂盒经充分评估，标曲范围为 1.56-100 ng/mL。
2. 检测限为零校准品均值加上三倍标准偏差所对应的浓度，本试剂盒检测限约为 0.5 ng/mL。
3. 定量限为零校准品均值加上十倍标准偏差所对应的浓度，本试剂盒定量限约为 1.0 ng/mL。
4. 板内精密度 $\leq 10\%$ ，板间精密度 $\leq 15\%$ 。
5. 专属性：与毕赤酵母、MDCK、Sf9、293、E.coli HCP 均无交叉反应。

主要组成成分

表 1 ELISA 试剂盒主要组成成分

组分	32T 规格	96T 规格	产品号	说明	储存温度
CHO HCP 校准品	500 μL /管 $\times 8$	1000 μL /管 $\times 8$	BPA-003	产品为 玫红色液体 溶液，一共 8 管，浓度分别为：0, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ng/mL，产品信息详见标签。	2-8°C
抗 CHO HCP 预包被酶标板	32 孔	96 孔	BPB-003	已包被适量的 CHO HCP 捕获抗体，放置于抽真空的铝箔袋中，含两枚干燥片。使用后若有剩余的酶标板条，及时封口并放置 2-8°C 冰箱保存。 请勿长时间放置室温。	
CHO HCP 检测抗体 (100 $\times$)	40 μL $\times 1$ 管	120 μL $\times 1$ 管	BPC-003	产品为 青色液体 溶液，是 HRP 标记后的多克隆抗体，需稀释 100 倍使用，应避光保存。	
显色液	4 mL $\times 1$ 瓶	12 mL $\times 1$ 瓶	BPD-001	产品为无色液体溶液，如发现溶液变蓝色，请勿使用。使用前需在室温平衡 20 分钟以上，应避光保存。	
终止液	3 mL $\times 1$ 瓶	6 mL $\times 1$ 瓶	BPE-001	产品为酸性溶液，操作过程做好通风，避免接触皮肤、眼睛及衣物。	
试剂稀释液	25 mL $\times 1$ 瓶	50 mL $\times 1$ 瓶	BPF-002	产品为 玫红色液体 溶液，用于 检测抗体和样本 的稀释，初次检测的样本需摸索确认最佳稀释倍数。	
浓缩洗液 (20 $\times$)	25 mL $\times 1$ 瓶	50 mL $\times 1$ 瓶	BPG-001	产品为 蓝色液体 溶液，低温时容易结晶析出，使用前可放置 37°C 直至结晶完全溶解。用 新鲜制备 的超纯水稀释 20 倍使用， 用于酶标板样品孵育后洗涤。	
封板膜	1 张	2 张	BPI-001	用于样品孵育反应时密封覆盖酶标板条，防止污染和溶液挥发。	
说明书	1 份	1 份	/	用于指导客户进行实验室操作	

未提供但需准备

- ❖ 涡旋振荡器
- ❖ 洗板机
- ❖ 微孔板振荡器
- ❖ 酶标仪
- ❖ 去离子水
- ❖ 微量移液器与配套灭菌枪头
- ❖ 吸水纸等耗材

储存条件及有效期

1. 未拆封产品放置 2-8℃保存，有效期为 12 个月。拆封后酶标板放置 2-8℃保存，有效期为 1 个月。
2. 酶标板拆封使用后，剩余部分应放于铝箔袋中密封保存。
3. 试剂盒中物料使用结束后需及时放回 2-8℃储存条件下保存。
4. 产品批号及有效期见产品包装标签。

实验流程

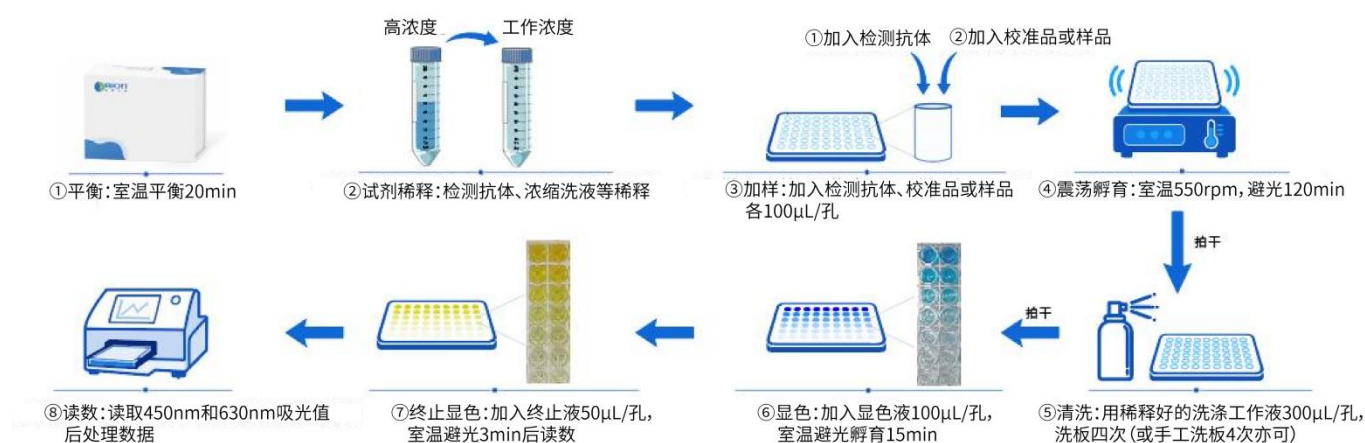


图 2 操作流程示意图

检测方法

一、实验前准备

1. 将试剂盒放至室温（25±3℃）至少平衡 20 min。
2. 若浓缩洗液（20×）出现结晶，37℃温育直至结晶全部溶解。
3. 取出实验所需酶标板条，剩余酶标板条放置铝箔袋中封口，立即放置 2-8℃保存。

二、试剂配制

1. 洗涤工作液配制

确认浓缩洗液（20×）无结晶，按浓缩洗液（20×）：超纯水=1：19 体积比进行稀释配制，例如 15 mL 浓缩洗液（20×）加入 285 mL 新鲜配制的超纯水混匀，**必须精确量取配制**。稀释后的溶液即为洗涤工作液，用于酶标板洗板。

2. 检测抗体工作液配制

将 CHO HCP 检测抗体（100×）用试剂稀释液稀释 100 倍，例如 25μL CHO HCP 检测抗体（100×）加入 2475μL 稀释液中，轻柔混匀，即得到配制好的检测抗体工作液。根据实验操作，建议实际配制体积比理论用量多 5-20%，检测抗体工作液需现配现用。

3. 样本稀释

- ❖ 初次测试的样本需进行梯度稀释摸索, 确定最小稀释倍数。若您的样本为过程工艺样本, 其浓度高于本检测方法的分析范围, 可高于最小稀释倍数进行稀释, 但应评估其稀释线性, 以确保检测方法准确。建议对样本进行加标回收研究, 以确定无样品基质的干扰, 确保 HCP 残留检测结果的准确性和可靠性。如原液样本有轻微基质干扰, 可通过适当稀释去除基质干扰。
- ❖ 若不是初次使用本试剂盒, 可按照验证过的稀释方案和加标方案对样本进行 HCP 残留检测。

三、检测步骤

1. 酶标板孔排列

根据实验量从铝箔袋中取出抗 CHO HCP 抗体包被酶标板相应数量板条。

2. 加入检测抗体工作液

将稀释好的检测抗体工作液轻微混匀, 倒入加样槽中, 用多通道移液器加入 100 μ L/孔检测抗体工作液, 注意勿引入气泡。注意多通道移液器加液精度, 如多通道移液器枪头中液面出现肉眼可见不齐, 需重新吸取或者更换多通道移液器。

3. 加入校准品/样本

加入 100 μ L STD1-STD8 CHO HCP 校准品、稀释好的样本 (包括加标样本)。封板膜封板, 保持室温 (25 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C) 在微孔板振荡器上孵育 120min, 微孔板振荡器速度保持在 550 rpm。

- ❖ 请务必保证校准品、阴性对照、样本和检测抗体的加样在 10 分钟内连续进行。
- ❖ 不同品牌振荡器可能在同一转速下震荡频率不一致, 可根据不同振荡器调节转速, 保证每孔溶液充分混匀且不洒出即可。

4. 洗涤

孵育完成后, 弃去各孔内液体, 每孔分别加入 300 μ L 洗涤工作液, 静置 10 秒后弃去孔内液体; 继续重复以上操作 4 次, 洗板结束在吸水纸上轻轻拍干。

5. 显色

将适量显色液倒入加样槽中, 立即用多通道移液器每孔分别加入 100 μ L 显色液, 保持室温 (25 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C) 避光静置显色 15 min。注意显色步骤请勿振荡, 否则会造成本底升高, 检测精密密度变差。

6. 终止

将适量终止液倒入加样槽中, 每孔加入 50 μ L 终止液, 静置 3min 后用酶标仪进行读数。

- ❖ 请注意终止液加样顺序需和显色液加样顺序保持一致, 以保证孔间显色时间的一致性。

7. 数据读取

选择酶标仪主波长 450 nm, 参考波长 630 nm, 测定各孔 450 nm 及 630 nm 吸光值。

- ❖ 请在反应终止后 15 min 内进行数据读取, 否则会影响结果的准确性。

四、结果分析

1. 各孔 OD 值=450 nm 吸光值-630 nm 吸光值, 若酶标仪没有配备参考波长 (630 nm), 只测 OD 值=450 nm 吸光值, 则每个校准品和样本的 OD 值应减去空白孔的 OD 值。若待测样品浓度的 OD 值超出标准曲线最高值, 宜对样品做进一步稀释后再检测。

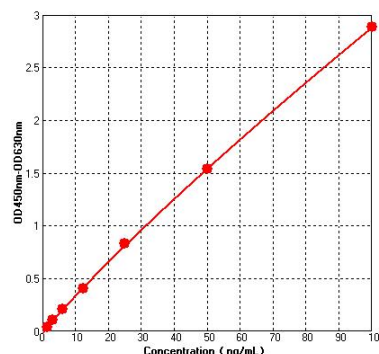
2. 本试剂盒建议以校准品浓度作为横坐标, OD 值为纵坐标, 采用四参数方式进行曲线拟合, 标曲的拟合软件可以用酶标仪自带的软件, 若无, 则建议采用专业的标曲制作软件, 如 Curve Expert, ELISACalc 等。标准曲线相关系数 $R^2 \geq 0.99$, 否则实验无效。

3. 校准曲线建议设置 2-3 复孔, 应先计算其平均值再进行曲线拟合。

4. 将待测样品测定的 OD 值代入校准曲线的拟合方程中, 计算出样品浓度, 即为待测样品中 CHO HCP 浓度。如待测样品有被稀释, 计算结果时应乘以稀释倍数。若有对样品进行加标测试, 则加标回收率应符合相应法规的方法学验证要求。

5. 一种典型的校准曲线如下, 数据仅作参考, 具体以实际测试为准:

STD (ng/mL)	Mean-OD _{450-630nm}
100	2.981
50	1.636
25	0.928
12.5	0.506
6.25	0.311
3.125	0.202
1.56	0.141
0	0.099
R ²	0.9999



注意事项

1. 本试剂盒仅供研究使用。
2. 所有的样本和试剂理被认为具有潜在危害。为了您的安全和健康，请穿戴实验服与一次性手套等防护措施。避免试剂直接接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。
3. 使用本试剂盒前，请详细阅读产品说明书。
4. 请在试剂盒标识的有效期内使用产品，各组分按标签条件储存。不同批号的试剂组分不可混用。本试剂盒不可与其他商品化试剂盒混用。
5. 为避免微生物的污染，以及试剂与样本间的交叉污染，请使用一次性枪头，请使用干净的容器、加样槽配制和暂存试剂，封板膜不可重复使用。
6. 所有组分在使用前需平衡至室温，液体试剂充分混匀后再取样。预制酶标板为可拆卸板条，可根据实验需求拆取。剩余未用部分请及时放回含干燥剂的铝箔袋中，密封低温保存。宜避免对酶标板底部刮花或其他影响光密度测量的操作。
7. 洗板推荐使用洗板机，洗板过程中避免串流或气泡，以防影响实验结果准确性。最后一次洗板后，应将板孔中残留的液体轻轻拍干。
8. 每次测定时，需生成新的标准曲线。
9. 不同批次的试剂盒不建议混用。
10. 酶标板洗板完成后请立即加显色液，勿让酶标板长时间处于干燥状态。

常见异常排查

异常现象	可能原因	解决思路
实验 OD 值整体偏低	试剂盒未平衡完全	实验前将试剂盒从冰箱拿出，室温平衡至少 30 min 再使用
	试剂混用或保存不当	不同批次试剂不可混用；各试剂请按说明书指导温度存放
	孵育时间/温度和说明书不一致	请严格按照说明书要求进行孵育。冬天室温较低时，如显色较浅，可适当延长显色时间或注意调整室温至 25°C 左右。
	样本制备不合适	重新制备标曲和样本
实验 OD 值整体偏高	孵育时间/温度和说明书不一致	请严格按照说明书要求进行孵育反应
	样本制备不合适	重新制备标曲和样本
标曲正常，样本显色异常	样本稀释倍数不合适	建议对初测样品做 4-5 个稀释梯度，确保至少有一个值可以落在检测范围

	钩状效应	在确保检测浓度落在检测范围内的前提下， 提高稀释倍数
	样本保存不当或反复冻融次数过多	尽量使用分装冻存不超过 3 个月的样本；分装使用，减少反复冻融次数
	样本原液中存在干扰因素	在确保检测浓度落在检测范围内的前提下， 提高稀释倍数，减轻干扰影响；无法解决时， 联系我司技术人员进行专项调整
	样本中待测物含量过低	降低稀释倍数或浓缩样本后再加样
背景值高	孵育时间/温度和说明书不一致	请严格按照说明书要求进行孵育反应
	微孔板反应前未覆盖封板膜	孵育时应覆盖封板膜，防止液体蒸发和杂物污染
	洗涤或加样操作过程异常，不慎带入污染	使用试剂盒自带洗液，确保洗涤次数和洗液体积充分，洗涤后孔内干净无残留；确保实验操作区域的环境洁净
	显色未避光/时间长	显色时应避光，显色时间参考说明书
变异系数（CV）较大	移液器不准	使用校准后的移液器并正确操作
	边缘效应	确保所有试剂和酶标板均为同一温度
	试剂混用	不同批次试剂不可混用
加标回收率超出限定范围	基质干扰	通过线性稀释和回收率实验评估基质效应。 在确保检测浓度落在检测范围内的前提下， 提高稀释倍数，减轻干扰影响；无法解决时， 联系我司技术人员进行专项调整
	加标浓度选取不合适	加标浓度的设定最好大于实际样品中目标分析物的浓度；低浓度下加标浓度的选择，不宜小于定量限