

ExCell Bio

ResiQuant[®] *E. coli* HCP 残留检测试剂盒-Plasmid (ELISA 法) 说明书

本品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗

货 号

CRH00-3041S

CRH00-3041

CRH00-3042



| 产品概述

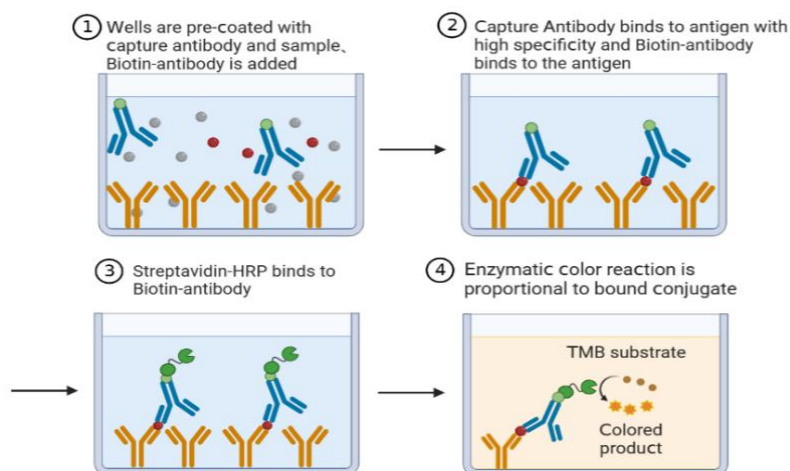
质粒是一种闭合环状的双链超螺旋 DNA 分子，广泛应用于疫苗制备及细胞基因治疗（CGT）领域，如 DNA 疫苗、裸质粒基因载体、腺相关病毒（AAV）和慢病毒载体等。通常质粒是以大肠杆菌（*E. coli*）为宿主进行生产，最有代表性的宿主菌是由大肠杆菌 K-12 所衍生出的 DH5 α 、Stbl3、Top10 等菌株。在质粒的生产及纯化过程可能会存在 *E. coli* 宿主细胞蛋白（*E. coli* HCP）残留的污染，这些残留 HCP 会给质粒后续应用带来风险，如在体内产生免疫反应，因此要对 *E. coli* HCP 的残留量进行控制。不同于常规的使用 *E. coli* 表达重组蛋白的工艺过程，质粒的生产纯化最常用工艺是碱裂解工艺。本试剂盒所采用的抗原是基于 *E. coli* 碱裂解工艺过程制备的变性 *E. coli* HCP，同时采用碱裂解工艺 *E. coli* HCP 免疫动物获得专属抗体。本产品适用于采用碱裂解工艺提取的质粒中间品、原液及终产品的 *E. coli* HCP 定量检测。

首次使用本试剂盒前建议先完成产品的适用性研究，确认样本基质是否存在干扰以及合适的样本检测稀释条件。

| 产品原理

本实验采用双抗体夹心 ELISA 法。抗 *E. coli* HCP 抗体已包被于酶标板上，向酶标板中同时加入校准品（或待测样品）和生物素化的抗 *E. coli* HCP 抗体，样本和校准品中的 *E. coli* HCP 会与加入于孔中的生物素化的抗 *E. coli* HCP 抗体及包被于酶标板上的抗体结合，形成免疫复合物，通过洗板，游离的成分被洗去；加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素，链霉亲和素与生物素特异性结合，通过洗板，游离的成分被洗去。加入 TMB（3,3',5,5'-四甲基联苯胺）底物反应，HRP 催化 H₂O₂ 氧化 TMB 生成蓝色产物（最大吸收峰 655 nm），随后加入终止液终止酶催化反应，生成黄色产物（最大吸收峰 450 nm）。通过酶标仪测定 OD₄₅₀ 值，*E. coli* HCP 浓度与 OD₄₅₀ 值之间呈正相关，可通过试剂盒内的校准品生成的校准曲线计算出标本中 *E. coli* HCP 浓度。

检测原理示意图：



产品性能

1. 灵敏度： *E. coli* HCP检测下限（LOD）不高于0.5 ng/mL，定量下限：1.0 ng/mL；
2. 精密度：定量限范围内板内、板间样本浓度变异系数均<20%；
3. 专属性：CHO，Vero，293 HCP检测值均低于检测下限。

产品应用

本产品是通用型检测试剂盒，适用采用碱裂解工艺提取的质粒中间品、原液及终产品的 *E. coli* HCP 定量检测。

产品规格

货号	品名	规格
CRH00-3041S	ResiQuant® <i>E. coli</i> HCP 残留检测试剂盒-Plasmid（ELISA 法）	48T
CRH00-3041	ResiQuant® <i>E. coli</i> HCP 残留检测试剂盒-Plasmid（ELISA 法）	48T
CRH00-3042	ResiQuant® <i>E. coli</i> HCP 残留检测试剂盒-Plasmid（ELISA 法）	96T

名称	96 Tests	48 Tests	保存条件
<i>E. coli</i> HCP Standard	3	2	2-8℃
<i>E. coli</i> HCP Microplate	8× 12	8× 6	2-8℃
<i>E. coli</i> HCP 100× Biotin-Antibody	60 µL	30 µL	2-8℃
100× Streptavidin-HRP	120 µL	60 µL	2-8℃
<i>E. coli</i> HCP Assay Diluent	2× 25 mL	25 mL	2-8℃
20× Wash Buffer Concentrate	30 mL	30 mL	2-8℃
Substrate Solution	12 mL	6 mL	2-8℃ (Light-Sensitive)
Stop Solution	12 mL	12 mL	2-8℃
Plate Sealer	3	2	/

| 实验流程

一、试验所需自备试验器材

1. 酶标仪（检测波长450 nm，参考波长570 nm或630 nm）；
2. 高精度加液器及一次性吸头：0.5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL；
3. 微孔板振荡器；
4. 去离子水。

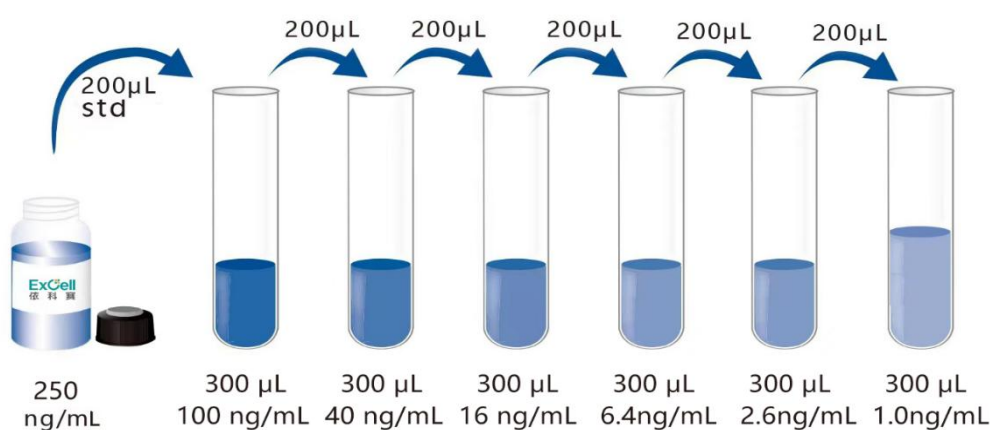
二、样本收集

1. 样本应澄清，沉淀应离心去除；
2. 可根据样本的实际情况，用*E. coli* HCP Assay Diluent做适当稀释（建议首次使用先行完成适用性研究，确定样本稀释倍数）。

三、检测前准备工作

1. 建议提前20分钟从冰箱中取出试剂盒，以平衡至室温；
2. 将20× Wash Buffer Concentrate用去离子水稀释成洗涤工作液，未用完的保存在2-8℃冰箱；
3. 校准品：根据*E. coli* HCP Standard标识含量加入合适*E. coli* HCP Assay Diluent将校准品稀释至250 ng/mL，振荡混匀，静置15分钟，待其充分溶解后，再进行2.5倍稀释，形成如下浓度的校准点：250、100、40、16、6.4、2.6、1.0、0 ng/mL；

校准品稀释图例：



【注意事项】：复溶校准品原液（250.0 ng/mL）若未用完应放入-18℃及以下冰箱内保存，可保存两个月，已稀释的校准品请废弃。

4. 生物素化抗体工作液：按当试验所需用量，用*E. coli* HCP Assay Diluent将*E. coli* HCP 100× Biotin-Antibody稀释100倍，配制成生物素化抗体工作液，使用前30分钟准备，仅供当日使用；
5. 酶结合物工作液：按当次试验所需用量，用*E. coli* HCP Assay Diluent将100× Streptavidin-HRP稀释100倍，配制成酶结合物工作液，使用前30分钟准备，仅供当日使用。

四、洗涤方法

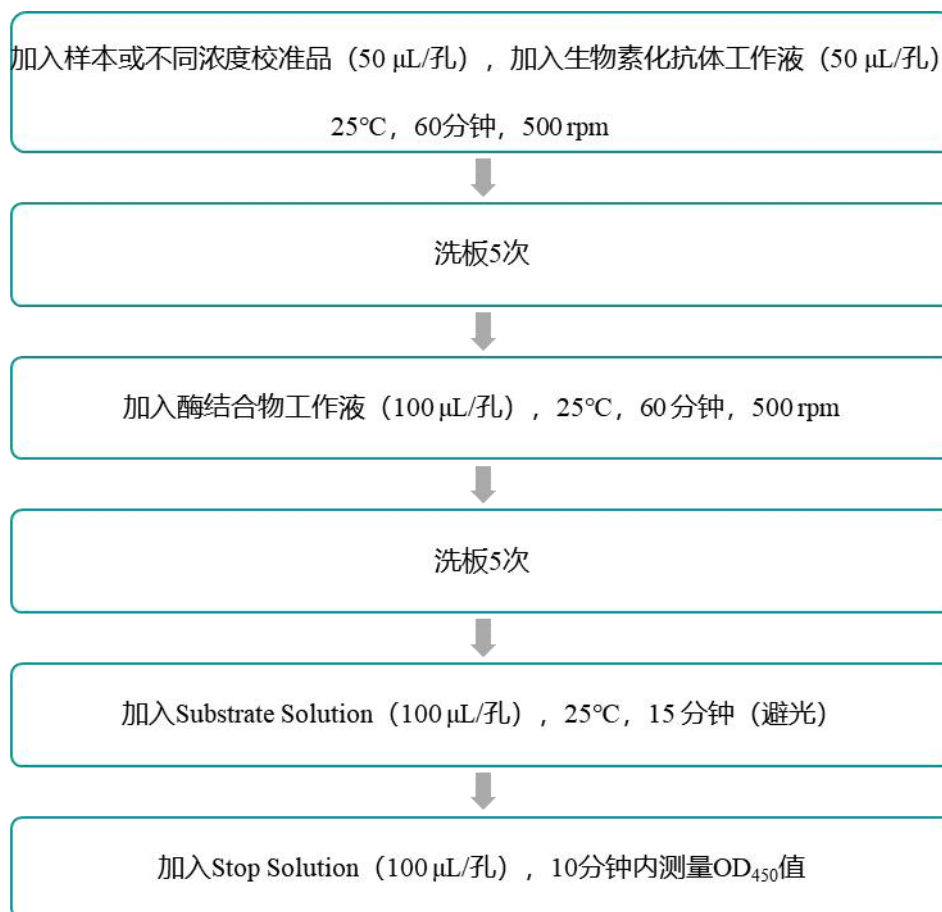
1. 手动洗板：每孔加洗涤工作液300 µL，静置10秒后甩尽孔内液体，在吸水纸上拍干，洗板5次；
2. 自动洗板机：要求注入的洗涤液为300 µL，注入与吸出间隔10秒，洗板5次。

五、操作步骤

1. 从已平衡至室温的密封袋中取出试验所需板条，未用的板条和干燥剂放回铝箔袋内封存于2-8℃冰箱；

2. 留空白孔（若使用双波长读板，空白孔可以不设）；
3. 提前准备好样本、校准品、生物素化抗体工作液；
4. 将不同浓度校准品（0 ng/mL孔加*E. coli* HCP Assay Diluent）或样本分别加入相应孔中，**50 μ L/孔**，随后将生物素化抗体工作液加入相应孔中，**50 μ L/孔**，用封板胶纸封住反应孔。**25℃振荡孵育60分钟**，使用微孔板振荡器（500 rpm）；
5. 提前准备好酶结合物工作液；
6. 甩尽孔内液体，洗板5次；
7. 除空白孔外，加入酶结合物工作液**100 μ L/孔**，用封板胶纸封住反应孔。**25℃振荡孵育60分钟**，使用微孔板振荡器（500 rpm）；
8. 甩尽孔内液体，洗板5次；
9. 加入Substrate Solution（包括空白孔）**100 μ L/孔**，**25℃**，避光孵育**15分钟**；
10. 加入Stop Solution（包括空白孔）**100 μ L/孔**，混匀后立即用酶标仪测量OD₄₅₀值（酶标仪设置双波长，检测波长450 nm，参考波长570 nm或630 nm；若酶标仪只能设置单波长读数，则每个校准品和样本的OD值应减去空白孔的OD值）。

六、操作流程图

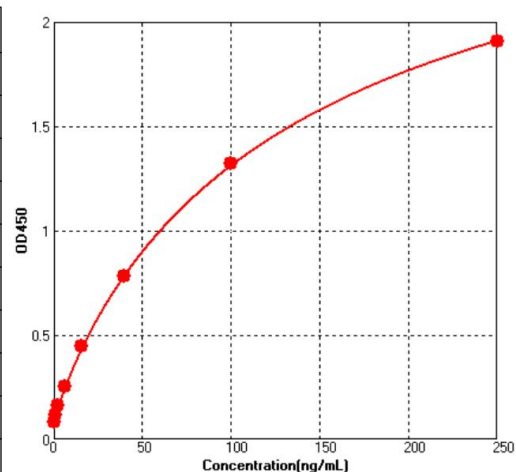


| 结果分析

1. 校准曲线制作：以校准品浓度作横坐标，OD值作纵坐标，通过软件拟合选取最佳标准曲线（推荐使用四参数拟合方程），根据样本OD值计算样品浓度；
2. 校准曲线的 $R^2 \geq 0.99$ ，去除异常值之后，定量范围内的校准曲线各点的回算浓度与理论浓度的偏差应在 $\pm 20\%$ 以内，定量上限和下限两点的偏差在 $\pm 25\%$ 以内；
3. 若样本OD值高于校准曲线上限，应适当稀释后重新检测，最后计算浓度时应乘以稀释倍数；
4. 样本浓度的计算应使用当次实验校准曲线。

示例数据：

Standard (ng/mL)	OD ₄₅₀₋₆₃₀			浓度 (ng/mL)		
	1	2	3	1	2	3
250	1.918	1.958	1.851	253.2	270.3	227.5
100	1.283	1.394	1.278	95.2	113.1	94.5
40	0.784	0.811	0.754	39.6	41.8	37.1
16	0.444	0.462	0.429	16.2	17.2	15.3
6.4	0.241	0.263	0.247	5.9	6.9	6.2
2.6	0.162	0.163	0.155	2.7	2.7	2.4
1.0	0.116	0.121	0.117	1.0	1.2	1.0
0	0.075	0.089	0.075	-----	-----	-----
r^2	0.99982					



【注意事项】：示例数据仅供参考，数据分析使用ELISACalc软件进行四参数拟合。

| 备注

1. 试剂盒使用前请保存在2-8℃，复溶校准品原液若未用完应放入-18℃及以下冰箱内保存；
2. 浓缩生物素化抗体，浓缩酶结合物体积小，运输中颠簸和可能的倒置，会使液体沾到管壁或瓶盖，因此使用前请瞬时离心，以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底；
3. 从冰箱取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属正常现象，加热至37℃使结晶完全溶解后再配制洗涤工作液；
4. 不同批号的试剂盒组份避免混用；
5. 溶液配制需注意充分混匀，以保证加入到孔内的液体是均一的；
6. 酶免试验中校准品和样本建议至少做两重复。

| 免责声明

1. 产品应按照说明书指导使用，实验者未按说明书指导操作，本公司不对由此导致的产品性能偏离承担责任；
2. 产品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。