

ExCell Bio

ResiQuant[®] CHO HCP 残留检测试剂盒 2G (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

User Manual

Catalog Number CRH00-3021S
CRH00-3021
CRH00-3022



产品概述

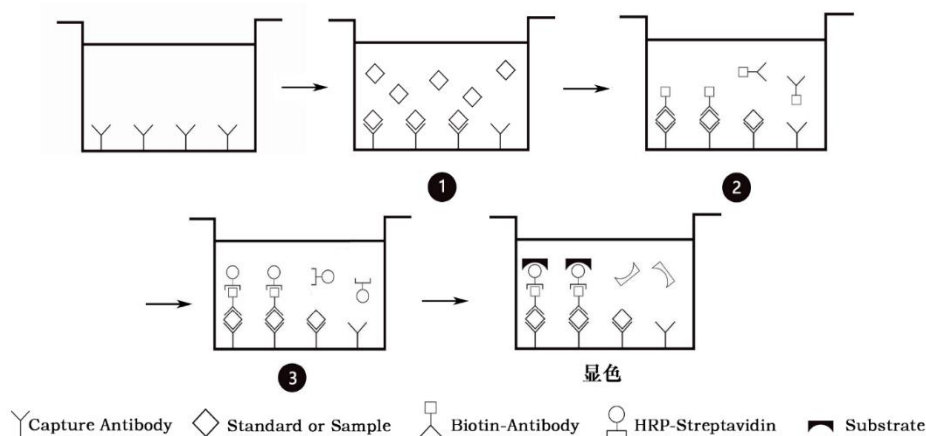
与原核细胞、酵母细胞以及昆虫细胞相比，中国仓鼠卵巢细胞（CHO）作为宿主细胞表达的外源蛋白最接近其天然构象，因而 CHO 细胞表达系统是生物工程制药最为理想的表达系统。在 CHO 细胞中表达治疗性蛋白对于商业化的药物生产十分经济方便，但是这类产品的生产以及纯化过程有可能会带来 CHO 宿主细胞蛋白（CHO HCP）残留的污染，这些残留的蛋白污染会降低药物治疗效果，造成副作用或者免疫反应，因此要对 CHO HCP 的残留量进行控制。《中华人民共和国药典》2020 年版三部建议 HCP 采用酶联免疫吸附测定（ELISA）方法检测。本产品是一种双抗夹心 ELISA 试剂盒，所使用的抗体来自兔和羊的混合抗体，抗原为 CHO 细胞的发酵上清收集液（细胞培养基不含蛋白），本产品用于多种 CHO 宿主细胞表达产物的纯化工艺开发、过程控制、成品放行等。

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 CHO HCP 抗体已包被于酶标板上，加入校准品和待测样本，校准品和样本中的 CHO HCP 会与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；加入生物素标记的抗 CHO HCP 抗体，生物素标记的抗 CHO HCP 抗体与酶标板上结合的校准品或样本中的 CHO HCP 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。加入显色底物（显色剂），若反应孔中有 CHO HCP，辣根过氧化物酶会使无色的显色剂变蓝，加终止液变黄。在 450 nm 处测 OD 值，CHO 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 CHO HCP 浓度。

检测原理示意图：



| 产品性能

1. 灵敏度: CHO HCP 检测下限 (LOD) 不高于 0.5ng/mL, 定量下限: 0.8 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: E.coli, 293T, Vero 等细胞上清以及非 CHO 表达的人源 IgG 样本中测定的 CHO HCP 浓度均低于检测下限。

| 产品应用

本产品是通用型检测试剂盒, 用于定量检测样本中 CHO HCP 浓度。

| 产品规格

| 货号 | 品名 | 规格 |
|-------------|---|-----|
| CRH00-3021S | ResiQuant® CHO HCP 残留检测试剂盒 2G (ELISA 法) | 48T |
| CRH00-3021 | ResiQuant® CHO HCP 残留检测试剂盒 2G (ELISA 法) | 48T |
| CRH00-3022 | ResiQuant® CHO HCP 残留检测试剂盒 2G (ELISA 法) | 96T |

| 产品组分及储存条件

| 名称 | 96 Tests | 48 Tests | 保存条件 |
|------------------------------|----------|----------|-----------|
| CHO HCP Microplate | 8× 12 | 8× 6 | 2-8℃ |
| CHO HCP Standard | 3 支 | 2 支 | 2-8℃ |
| CHO HCP 100× Biotin-Antibody | 2× 30 μL | 30 μL | 2-8℃ |
| 100× HRP-Streptavidin | 2× 60 μL | 60 μL | 2-8℃ |
| 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℃ (避光) |
| Stop Solution | 12 mL | 12 mL | 2-8℃ |
| 封板胶纸 | 3 | 2 | / |
| 说明书 | 1 | 1 | / |

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，校正波长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，去离子水。

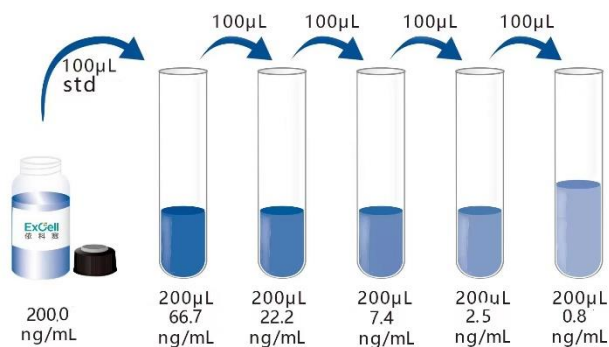
二、样本收集

1. 样本应澄清，沉淀应离心去除；
2. 可根据样本的实际情况，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 \times Wash Buffer Concentrate 用去离子水稀释成洗涤工作液，未用完的放回冰箱；
3. 校准品：冻干CHO HCP Standard中加入Assay Diluent稀释至200.0 ng/mL，静置15分钟，待其充分溶解后，轻轻混匀。然后进行1:3稀释，校准曲线浓度：200.0、66.7、22.2、7.4、2.5、0.8、0 ng/mL；

校准品稀释方法图例：



注：复溶校准品原液（200.0 ng/mL）若未用完请分装后放入-18 $^{\circ}\text{C}$ 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：按当次试验所需用量，用 Assay Diluent 将 CHO HCP 100 \times 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 Assay Diluent 将 100 \times HRP-Streptavidin 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。

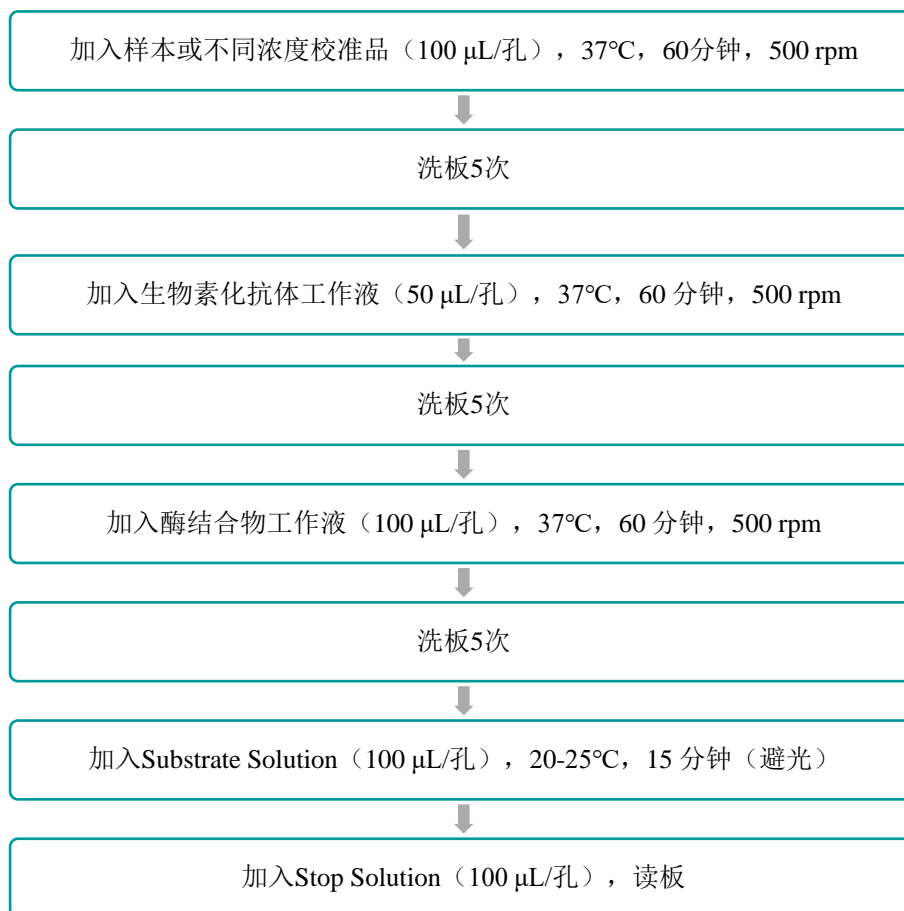
四、洗涤方法

每孔加洗涤工作液300 μ L，静置10秒后甩尽孔内液体，在吸水纸上拍干，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°C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；
4. 将不同浓度校准品（0 ng/mL孔加Assay Diluent）或样本分别加入相应孔中，100 μ L/孔，用封板胶纸封住反应孔。37°C振荡孵育60分钟，使用微量振荡器（500 rpm）；
5. 提前准备好生物素化抗体工作液；
6. 甩尽孔内液体，洗板5次；
7. 除空白孔外，加入生物素化抗体工作液50 μ L/孔，用封板胶纸封住反应孔。37°C振荡孵育60分钟，使用微量振荡器（500 rpm）；
8. 提前准备好酶结合物工作液；
9. 甩尽孔内液体，洗板5次；
10. 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。37°C振荡孵育60分钟，使用微量振荡器（500 rpm）；
11. 甩尽孔内液体，洗板5次；
12. 加入Substrate Solution（包括空白孔）100 μ L/孔，20-25°C，避光孵育15分钟；
13. 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 450nm，参考波长 570 nm 或 630nm；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

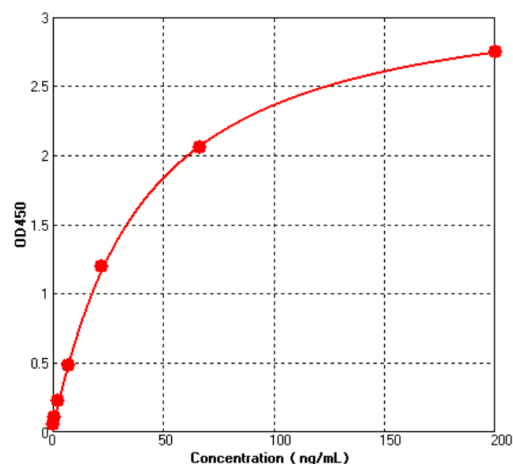


结果分析

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 $R^2 \geq 0.99$ ，去除明显异常值之后，校准曲线各点的回算浓度与理论浓度的偏差应在 20% 以内，定量上、下限的偏差在 25% 以内；
3. 样本浓度的计算应使用当次实验校准曲线；
4. 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。

示例数据：

| Standard (ng/mL) | OD ₄₅₀₋₆₃₀ | | | | 浓度 (ng/mL) | | | |
|---------------------|-----------------------|-------|-------|---------|------------|-------|-------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | Average | 1 | 2 | 3 | Average |
| 200.0 | 2.606 | 2.636 | 2.562 | 2.601 | 202.4 | 220.9 | 179.9 | 201.1 |
| 66.7 | 2.052 | 1.980 | 2.043 | 2.025 | 69.5 | 62.7 | 68.6 | 66.9 |
| 22.2 | 1.171 | 1.197 | 1.197 | 1.188 | 21.5 | 22.3 | 22.3 | 22.0 |
| 7.4 | 0.553 | 0.546 | 0.565 | 0.555 | 7.6 | 7.5 | 7.8 | 7.6 |
| 2.5 | 0.207 | 0.212 | 0.218 | 0.212 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.2 |
| 0.8 | 0.116 | 0.122 | 0.124 | 0.121 | 0.8 | 0.9 | 1.0 | 0.9 |
| 0.0 | 0.062 | 0.058 | 0.066 | 0.062 | 0.0 | ----- | 0.1 | ----- |
| r ² | ----- | | | 0.99991 | ----- | | | |



注意：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℃。除复溶后的校准品，其他成分不可冻结；
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液；
4. 若需分次使用校准品，在其复溶后应按每次用量分装，将其放在-18℃及以下储存，避免反复冻融；
5. 不同批号的试剂盒组份避免混用；
6. 溶液配置需注意充分混匀，以保证加入到孔内的液体是均一的；
7. 酶免试验中校准品和样本建议至少做两重复。

| 免责声明

1. 试剂盒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试剂盒性能偏离承担责任；
2. 本试剂盒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。