

ExCell Bio

耐碱性 Protein A 残留检测试剂盒说明书 (ELISA 法)

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 CRP00-3021S
CRP00-3021
CRP00-3022



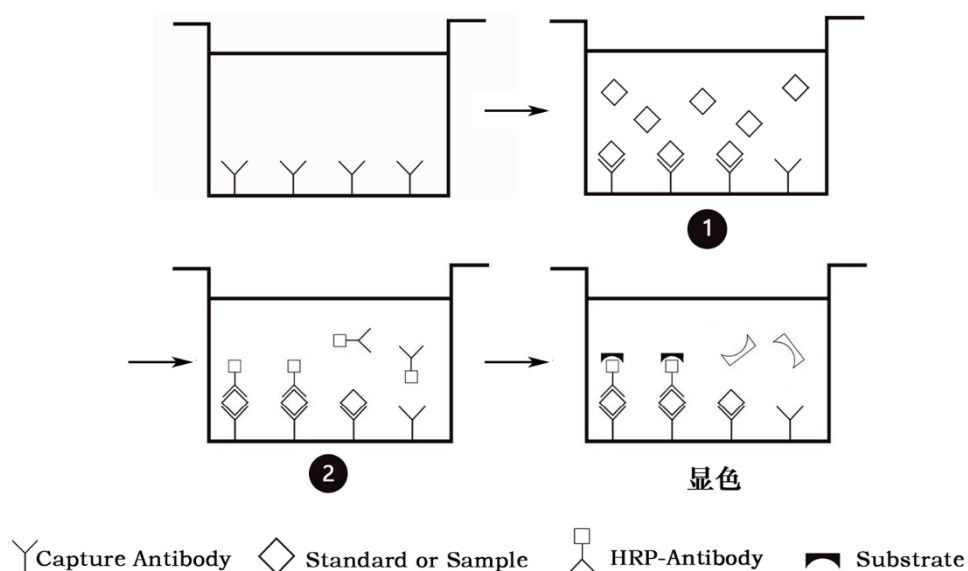
产品概述

在抗体类产品的生产纯化过程中，Protein A 亲和层析树脂是分离和纯化抗体常用的工具。但在抗体纯化过程中 Protein A 会脱落致使抗体类产品中含有 Protein A，从而影响产品的纯度和效价，给制药业带来重大问题，例如《中国药典》2020 年版规定尼妥珠单抗注射液用酶联免疫法检测出的 Protein A 的残留量应不高于蛋白总量的 0.001%，故必须对生物制品中的 Protein A 残留进行检测。Protein A 包括天然 Protein A、重组 Protein A 以及结构与天然 Protein A 有显著区别的耐碱性重组 Protein A，如 GE 公司的 MabSelect SuRe™ Protein A。依科赛的 CRP00-302*系列试剂盒可对 MabSelect SuRe™ Protein A 进行定量检测。如果您需要检测天然 Protein A、重组 Protein A，请选择我们的 CRP00-301*系列试剂盒。

产品原理

本实验采用双抗体夹心 ELISA 法。抗 Protein A 抗体已包被于酶标板上。加入样本、校准品，样本、校准品中的 Protein A 与包被于酶标板上的抗 Protein A 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 HRP 标记的抗 Protein A 抗体，标记了 HRP 的抗 Protein A 抗体会与结合于酶标板上的校准品或样本中 Protein A 结合，形成免疫复合物，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 Protein A，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，Protein A 浓度与 OD450 值之间呈正相关，可通过绘制标准曲线求出标本中 Protein A 浓度。

检测原理示意图：



| 产品性能

1. 灵敏度: MabSelect SuRe™ Protein A 检测限为 6.6 pg/mL, 定量下限为 13.7 pg/mL;
2. 重复性: 板内、板间变异系数均<10%;
3. 特异性: 本产品适用于 MabSelect SuRe™ Protein A 的残留定量检测。

| 产品应用

本产品是通用型检测试剂盒, 用于定量检测生物药样本中残留的 MabSelect SuRe™ Protein A 浓度。

| 产品规格

货号	品名	规格
CRP00-3021S	耐碱性 Protein A 残留检测试剂盒 (ELISA 法)	48T
CRP00-3021	耐碱性 Protein A 残留检测试剂盒 (ELISA 法)	48T
CRP00-3022	耐碱性 Protein A 残留检测试剂盒 (ELISA 法)	96T

| 产品组分及储存条件

名称	96 Tests	48 Tests	保存条件
Protein A Microwell Plate	8× 12	8× 6	2-8℃
耐碱性 Protein A Standard	3	2	2-8℃
Protein A 100× HRP-Antibody	2× 30 μL	30 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	2	2	室温
说明书	1	1	室温

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。

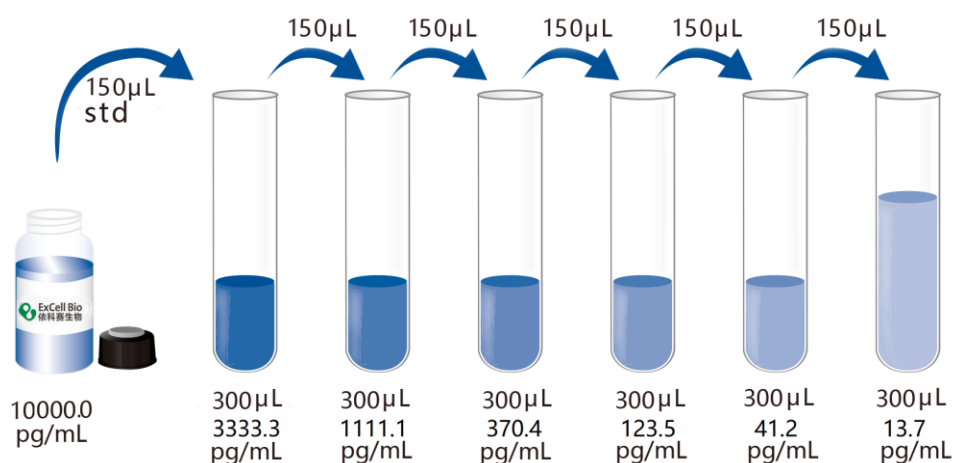
二、样本收集

1. 样本应澄清，不溶性沉淀应离心去除；
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：冻干耐碱性Protein A Standard中加入Assay Diluent稀释至10000.0 pg/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：10000.0、3333.3、1111.1、370.4、123.5、41.2、13.7和0 pg/mL）；

校准品稀释方法图例：



注：复溶校准品原液（10000.0 pg/mL）若未用完请分装后放入-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下冰箱内保存，可保存两个月，已稀释的校准品请废弃。

4. 酶标记抗体工作液：按当次试验所需用量，用 Assay Diluent 将 Protein A 100× HRP-Antibody 稀释 100 倍，配制成酶标记抗体工作液，使用前 30 分钟准备，仅供当日使用；
5. 校准品和样本预处理：样品中残留的 Protein A 一般会与抗体结合在一起，干扰检测结果，因此要把样本中的 Protein A 与抗体完全解离才可以精准检测。加热处理可以有效的分离 Protein A 和抗体，抗体经加热变性沉淀，再经离心除去，Protein A 则留于上清液中。样本中较高的抗体浓度会干扰检测的准确度，需要将抗体稀释至 10 mg/mL 以下。

预处理方法：

- (1) 根据需要量稀释 8 个校准品（10000.0、3333.3、1111.1、370.4、123.5、41.2、13.7 和 0 pg/mL），建议每个浓度至少准备 300 μ L，放在 1mL 离心管中备用；
- (2) 根据需要量将样本用 Assay Diluent 稀释到蛋白浓度 10 mg/mL 以下，建议每个检测样本至少准备 300 μ L，放在 1 mL 离心管中备用；
- (3) 将准备好的校准品和样本放在沸水浴中或在 100°C 金属浴中孵育 10 分钟；
- (4) 将处理后的校准品和样本在 20-25°C 下静置 5-10 分钟（使其回复至室温）；
- (5) 将回复至室温的校准品和样本 13000rpm 离心 5 分钟；
- (6) 转移含有 Protein A 的上清液至新的离心管中，备用。

四、洗涤方法

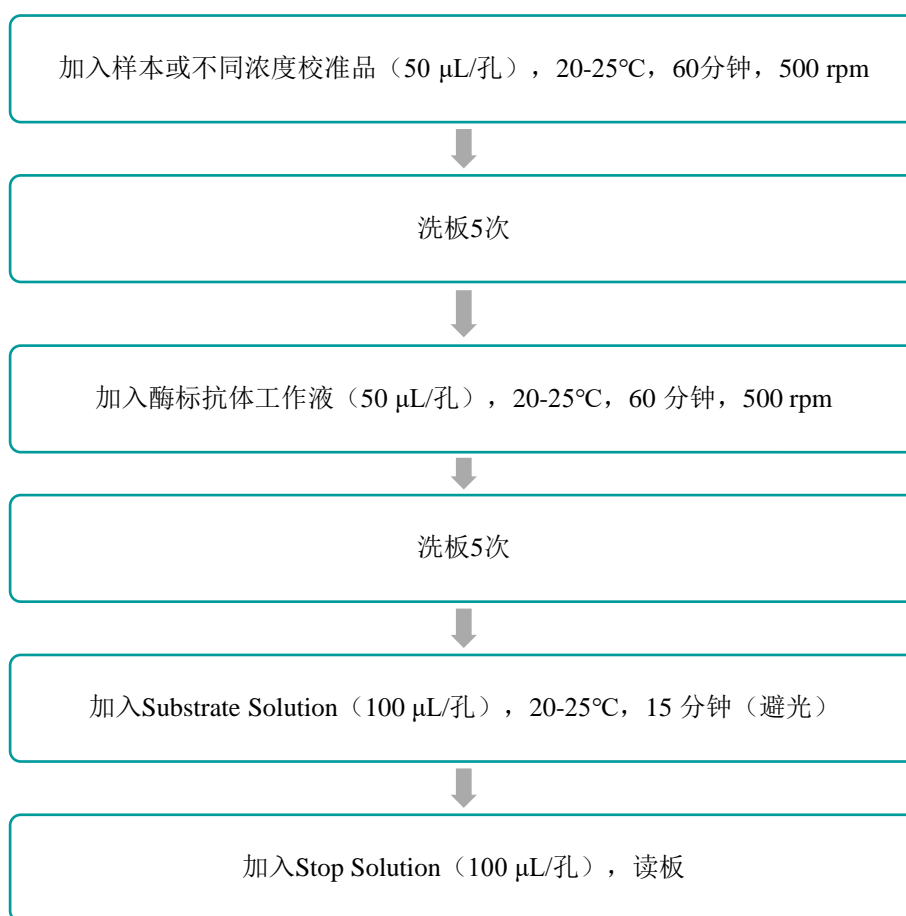
每孔加洗涤工作液 350 μ L，静置 30 秒后甩尽孔内液体，在吸水纸上拍干，洗板 5 次。

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. 将予处理后的不同浓度校准品（0 pg/mL 孔加 Assay Diluent）或样本分别加入相应孔中，50 μ L/孔，用封板胶纸封住反应孔。20-25°C 振荡孵育 60 分钟，使用微量振荡器（500 rpm）；
5. 提前准备好酶标抗体工作液；

6. 甩尽孔内液体，洗板5次；
7. 除空白孔外，加入酶标抗体工作液50 μL /孔，用封板胶纸封住反应孔。20-25 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育60分钟，使用微量振荡器（500 rpm）；
8. 甩尽孔内液体，洗板5次；
9. 加入Substrate Solution（包括空白孔）100 μL /孔，20-25 $^{\circ}\text{C}$ ，避光孵育15分钟；
10. 加入 Stop Solution（包括空白孔）100 μL /孔，混匀后即刻测量 OD₄₅₀ 值（10 分钟内）。

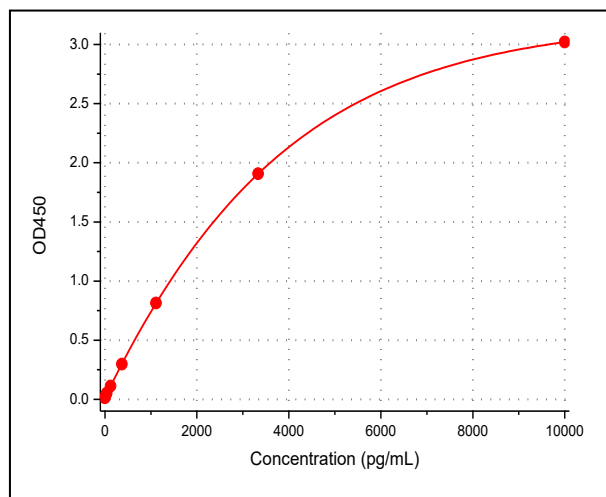
六、操作流程图



I 结果分析

1. 单波长读数时，每个校准品和样本的OD值应减去空白孔的OD值；
2. 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值查找相应浓度；
3. 若样本OD值高于校准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

Standard (pg/mL)	OD ₄₅₀
10000.0	3.021
3333.3	1.907
1111.1	0.814
370.4	0.297
123.5	0.111
41.2	0.051
13.7	0.029
0	0.013



注意：本图仅供参考，应以同次试验校准品所绘校准曲线计算样本含量。

| 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. 酶标抗体体积小，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℃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做复孔。

| 免责声明

1. 试剂盒应严格按照说明书使用，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担；
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。