

ExCell Bio

ResiQuant[®] 耐碱性 Protein A 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 CRP00-3031S
CRP00-3031
CRP00-3032



产品概述

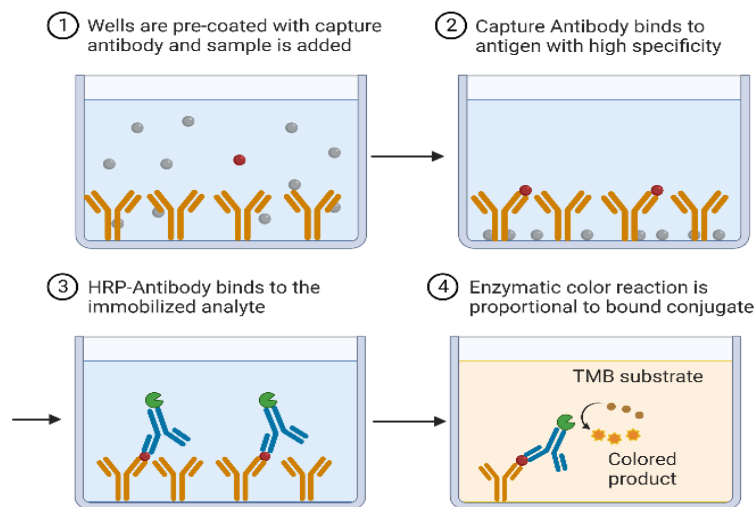
在抗体类产品的生产纯化过程中，Protein A 亲和层析树脂是分离和纯化抗体常用的工具。抗体纯化过程中 Protein A 脱落造成工艺残留，影响药品的纯度和效价，给药品带来副作用及其他风险，因此药典针对不同的药品给出了限度要求，采用类似生产工艺药物须对 Protein A 的残留进行定量报告，例如《中国药典》2020 年版规定尼妥珠单抗注射液用酶联免疫法检测出的 Protein A 的残留量应不高于蛋白总量的 0.001%。Protein A 包括天然 Protein A、重组 Protein A 以及结构与天然 Protein A 有显著区别的耐碱性重组 Protein A，如 Cytiva 公司的 MabSelect SuRe™ Protein A。本产品是高灵敏度耐碱性 Protein A 定量检测试剂盒，无干扰情况下，定量下限可达 4.9 pg/mL。

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 Protein A 抗体已包被于酶标板上。加入样本或校准品，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，被酶标板俘获，通过洗板，洗去未结合组分；加入 HRP 标记的抗 Protein A 抗体，标记抗体会与结合于酶标板上的校准品或样本中 Protein A 结合，形成夹心式的免疫复合物，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，可通过绘制校准曲线求出样本中 Protein A 浓度。

检测原理示意图：



| 产品性能

1. 灵敏度：耐碱性 Protein A 检测限为 2.5 pg/mL，定量下限为 4.9 pg/mL；
2. 重复性：定量限范围内板内、板间样本浓度 CV 值均≤20%。

| 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耐碱性 Protein A 浓度。

| 产品规格

货号	品名	规格
CRP00-3031S	ResiQuant® 耐碱性 Protein A 残留检测试剂盒 2G (ELISA 法)	48T
CRP00-3031	ResiQuant® 耐碱性 Protein A 残留检测试剂盒 2G (ELISA 法)	48T
CRP00-3032	ResiQuant® 耐碱性 Protein A 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
Protein A MicroPlate	8× 12	8× 6	2-8°C
Alkali-Resistant Protein A Standard	2	1	2-8°C
Protein A 100× HRP-Antibody	60 µL	30 µL	2-8°C
Protein A Assay Diluent	2× 25 mL	25 mL	2-8°C
20× Wash Buffer Concentrate	30 mL	30 mL	2-8°C
Substrate Solution	12 mL	6 mL	2-8°C (Light-Sensitive)
Stop Solution	12 mL	12 mL	2-8°C
Plate Sealer	3	2	/
User Manual	1	1	/

I 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。

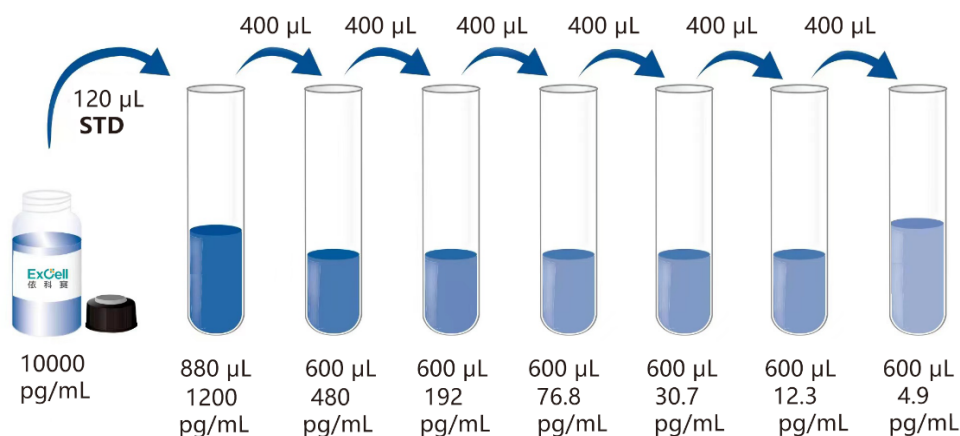
二、样本收集

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，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Protein A Assay Diluent稀释至10000.0 pg/mL，振荡混匀，静置15分钟，待其溶解完全后，先稀释至1200.0 pg/mL，再进行2.5倍稀释形成如下浓度校准点：1200.0、480.0、192.0、76.8、30.7、12.3、4.9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，其他未用完的校准品请废弃。

4. 酶标记抗体工作液：按当次试验所需用量，用Protein A Assay Diluent将Protein A 100 \times 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准确检测。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，需要将抗体稀释到最小稀释倍数（MRD）或更大倍数进行报告。

预处理方法：

- （1）根据需要量稀释 8 个校准品（1200.0、480.0、192.0、76.8、30.7、12.3、4.9 和 0 pg/mL），建议每个浓度至少准备 400 μ L，放在 1mL 离心管中备用；
- （2）根据需要量将样本用 Protein A Assay Diluent 稀释到蛋白浓度 1 mg/mL 以下，建议每个检测样本至少准备 400 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金属浴中热变性 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 13000 rpm 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

1. 手动洗板：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；
2. 自动洗板机：要求注入的洗涤液为300 μ L，注入与吸出间隔20-30秒。

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. 将预处理的的不同浓度校准品（0 pg/mL孔加Protein A 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。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）。

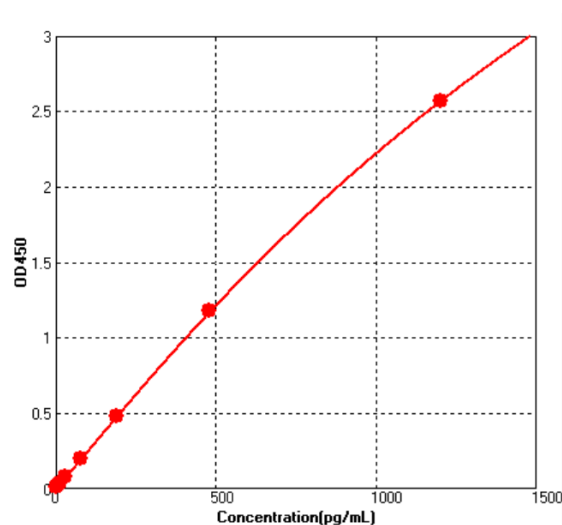
六、操作流程



I 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校准曲线（推荐使用四参数或五参数拟合方程），根据样本OD值计算样品浓度；
2. 校准曲线的 $R^2 \geq 0.99$ ，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20%以内，定量上限和下限两点的偏差在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试验校准曲线。

Standard (pg/mL)	OD ₄₅₀₋₆₃₀			浓度 (pg/mL)		
	1	2	3	1	2	3
1200	2.647	2.515	2.552	1246.4	1165.9	1188.2
480	1.203	1.148	1.179	492.3	468.0	481.7
192	0.470	0.476	0.496	186.0	188.4	196.3
76.8	0.198	0.192	0.206	78.1	75.7	81.3
30.7	0.089	0.076	0.081	34.1	28.8	30.8
12.3	0.039	0.039	0.034	13.0	13.0	10.9
4.9	0.020	0.021	0.021	4.5	5.0	5.0
0	0.008	0.012	0.009	----	----	----
r ²	0.99999					



注意：本图仅供参考，数据分析使用 ELISA Calc 软件进行四参数拟合。

| 备注

1. 试剂盒使用前请保存在2-8°C。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°C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°C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. 溶液配制需注意充分混匀，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。