



金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 酶联免疫吸附检测试剂盒

应用：定量检测生物医药生产纯化过程中 SPA 残留检测（如纯化发酵液，细胞培养上清液等）

产品编号：NEGES0890

本试剂盒仅供科研使用，不得用于临床及诊断使用！

目录

一、 背景介绍.....	2
二、 实验原理.....	2
三、 试剂盒改进.....	3
四、 提供的试剂及材料.....	3
五、 实验需要但试剂盒未提供的材料.....	4
六、 样本收集和保存.....	4
七、 实验前的准备.....	5
八、 试剂的准备.....	6
九、 操作步骤.....	6
十、 注意事项.....	7
十一、 数据处理.....	8
十二、 质量控制.....	9
十三、 安全注意事项.....	10
十四、 联系我们.....	10



一、背景介绍

金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA 或者蛋白 A) 是一种 42kDa 的 MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) 表面蛋白, 其最初发现于 *Staphylococcus aureus* 细胞壁中。它由五个同源的免疫球蛋白结合亚基组成, 五个亚基进一步折叠形成 3 个螺旋束。每一个亚基可以结合来源于不同哺乳动物的蛋白, 主要是 IgGs。蛋白 A 能够以高亲和力与人 IgG1, 人 IgG2, 以及小鼠 IgG2a 和 IgG2b 结合。蛋白 A 能够以中等亲和力和人 IgM, IgA 和 IgE, 及小鼠 IgG3 和 IgG1 结合。蛋白 A 不会和人的 IgG3 和 IgD 结合, 也不会和 IgM, IgA 和 IgE 反应。

蛋白 A 对抗体高亲和力使得生物医药界广泛将蛋白 A 用于工业生产。生物医药上使用的用于生产抗体的蛋白 A 大部分都是结合到固定相层析树脂的蛋白 A。

亲和层析中使用的蛋白 A 可能会有少量从层析柱上脱落, 进入到洗脱池中。这种生产过程中的蛋白 A 的泄漏可能会污染纯化抗体的制备。蛋白 A 具有与多种宿主相互作用的能力, 这表明它有可能在金黄色葡萄球菌感染中是一种毒力因子。为了保证利用蛋白 A 亲和层析纯化的抗体的质量我们研发了 Protein A ELISA 试剂盒。本试剂盒在抗体浓度很高的情况下比如纯化的抗体终产品中也可以检测蛋白 A 的浓度。

该蛋白 A 检测试剂盒能在确保操作简单, 灵敏度高的前提下提供准确的检测结果。专门适用于治疗性蛋白及抗体纯化过程中残留的蛋白 A 检测。

二、实验原理

本试剂盒采用酶联免疫吸附实验双抗夹心法检测样本中蛋白 A 的浓度。首先将样本或者标准品加入预包被有鸡抗蛋白 A 抗体的微孔中, 利用抗原抗体特异性结合的特点在特定条件下孵育, 使样本及标准品中的蛋白 A 被捕获于聚丙烯微孔板上。然后洗板, 洗去其它未结合的物质, 加入辣根过氧化物酶标记的兔抗蛋白 A 抗体, 37°C 条件下孵育, 使包被抗体、蛋白 A 及检测抗体形成双抗夹心复合物。洗板, 加入显色底物溶液。显色结束后, 加入硫酸溶液终止反应, 颜色由蓝色变成黄色。样本或者标准品中蛋白 A 的含量与显色颜色深浅成正比, 据此可以计算待检样本中蛋白 A 的含量。



三、试剂盒改进

- (1) 特异性高：包被抗体与检测抗体分别识别同一抗原的不同特异性表位，增加了反应的特异性。同类细胞因子之间没有交叉反应。
- (2) 敏感性高：检测抗体偶联生物素，与亲和素之间多价高亲和力，级联放大效应使得实验敏感度增加。
- (3) 稳定性高：实验采用的是优质的包被抗体和抗原，并使用了特定的广谱蛋白稳定剂，和微孔板处理工艺，增加微孔板热稳定性和结果的可重复性。
- (4) 样本稀释液优化：使用针对人血清样本优化后的特异性的缓冲液，排除样本基质干扰，适用于血清，血浆等常规样本的细胞因子定量检测。

四、提供的试剂及材料

请将按照试剂标签提示的贮存条件存放试剂，并在保质期前使用。

	名称	规格	数量	保存
1	已包被平底微孔板	96 孔	1 板（可拆卸）	2-8℃ 密封冷藏
2	标准品S1	500pg/ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
3	标准品S2	250pg/ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
4	标准品S3	125pg/ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
5	标准品S4	62.5pg/ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
6	标准品S5	31.25pg/ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
7	标准品S6	15.63pg/ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
8	标准品S7	7.813pg/ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
9	标准品S8	0pg/ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
10	HRP标记抗体浓缩液（200×）	100ul	1 瓶	2-8℃ 冷藏



11	检测抗体稀释液	11ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
12	TMB	11ml	1 瓶	2-8℃ 避光冷藏
13	终止液	6ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
14	洗液 (100×)	10ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
15	样本稀释液	10ml	2 瓶	2-8℃ 冷藏
16	封口膜		4 张	
17	使用说明书		1 份	

五、实验需要但试剂盒未提供的材料

- 1) 10-1000 μ l 移液器及一次性灭菌吸头
- 2) 多道移液器
- 3) 灭菌的去离子水或超纯水 1L
- 4) 灭菌 EP 管
- 5) 吸水纸
- 6) 酶标仪
- 7) 高速离心机
- 8) 洗板机或者洗瓶
- 9) 恒温箱或水浴锅 (37℃ /80℃)
- 10) 数据分析及绘图软件
- 11) PBS(pH 7.4)的配制比例: NaH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 8g, KCl 0.2g, 用蒸馏水稀释至 1000mL。
- 12) PBST 配制方法: PBS+0.05%Tween-20。

六、样本收集和保存

- 1) 血清: 血液采集时不加抗凝剂, 室温静置 1-2 小时, $1000 \times g$ (或 3000rpm) 离心 15 分钟, 取上清, -20℃ 或 -80℃ 分装保存备用。
- 2) 血浆: 血液采集时要加入总体积 1% 的抗凝剂 (EDTA、肝素等), 采集后先室温或 4℃ 静



- 置半小时后， $1000\times g$ （或 3000rpm）离心 15 分钟，取上清， -20°C 或 -80°C 分装保存备用。
- 3) 组织裂解液：组织裂解的方式取决于组织的类型，一般来讲，先用预冷的 PBS 清洗组织后称重。一般 0.3g-0.5g 组织加入 500 μL 预冷的 PBS，在冰上的玻璃容器内研碎。用超声或者反复冻融的方法裂解细胞膜， $1500\times g$ （或 5000rpm）离心 15 分钟分钟后取上清， -20°C 或 -80°C 分装保存备用。
 - 4) 细胞裂解液：悬浮细胞直接离心取细胞沉淀。贴壁细胞需用胰酶消化后离心取细胞沉淀。检测某些指标时不能用胰酶消化。用 PBS 洗 3 遍。用少量 PBS 重悬细胞，超声或者反复冻融的方法裂解细胞膜， $1500\times g$ （或 5000rpm）离心 15 分钟分钟后取上清， -20°C 或 -80°C 分装保存备用。
 - 5) 细胞上清液：收集培养的细胞， $1000\times g$ （或 3000rpm）离心 15 分钟，取上清， -20°C 或 -80°C 分装保存备用。

样本准备注意事项：

- ◆ 样本收集完毕后，要分装保存在 -20°C （少于 3 个月）或 -80°C （少于 6 个月）以保持蛋白活性和避免污染。避免反复冻融 如果要在 24 小时内分析样本，可以保存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。
- ◆ 某些化学裂解液可能会对本实验造成干扰，比如 SDS，Triton。谨慎使用。
- ◆ 样本液中含有沉淀物会对 ELISA 有干扰，务必离心去除。
- ◆ 不要使用高脂血或溶血的样本，对 ELISA 有干扰，导致检测结果不准确。
- ◆ 不能加热来融化样本。

七、实验前的准备

- 1) 请仔细阅读试剂盒说明书，将水浴锅或恒温箱温度设置为 37°C 。
- 2) 样本的准备：将化冻后的冻存样本，混匀后，12000rpm 离心 1min，取上清作为待检样本备用。
- 3) 样本的稀释倍数：如果您的样本预测浓度高于本试剂盒最高检测限度，建议使用 PBS 对样本进行稀释。

注意：

- ◆ 若您使用说明书中未列举的样本，请进行预实验看本试剂盒是否适合您的实验。



- ◆ 由于在细胞稳定性，细胞数目，及采样时间上存在差异，细胞培养上清样本可能无法被本试剂盒检测。
- ◆ 建议您使用新鲜的或者储存时间不长的样本用于分析测试。否则，样本中蛋白质的降解及变性会导致错误的实验结果。
- ◆ 实验样本的最佳 PH 值在 7.0-7.4 之间。

八、试剂的准备

- 1) 实验前请将所有试剂及样本恢复到室温(20-25℃)。
- 2) 洗液的稀释：量取 10ml 100×洗液母液，加入 990ml 去离子水或超纯水，混匀备用。如果浓缩液中有少许结晶，请将其置于室温，并轻轻震荡至晶体完全溶解。1×洗液在 2-8℃中可以稳定保存 2 周。
- 3) 样本的准备：待水浴锅上升到 80℃且温度稳定时，将样本（纯化的 IgG 或者未完全纯化的 IgG 溶液）水浴 2min，恢复到室温混匀后，12000rpm 离心 1min，取上清作为待检样本备用。

九、实验步骤

- 1) 撕开包装袋，取出包被有抗体的酶标板，拆下不需要使用的板条，并用封口膜封好，放回铝箔袋，重新放回4℃保存。（板架可重复使用）
- 2) 向微孔板中加入8个标准品各100ul，向其余微孔中加入100ul的准备好的分析样本溶液。贴上封口膜，37℃孵育1.5h。
- 3) 洗板机洗板：

- 取出稀释好的洗液放置于洗板机的洗瓶中备用。
- 取出上步中的微孔，甩去微孔中的液体，洗板机洗板5次。
- 洗板完成后，将微孔板倒扣在吸水纸上拍打，充分拍干至无明显水膜为止。

或手动洗板：

- 取出稀释好的洗液放置于洗瓶中备用。
- 取出上步中的微孔，甩掉微孔中的液体，在吸水纸上轻轻拍打至无明显液滴。
- 用多道移液枪向每个微孔中加300ul洗液，静置20s，倒去洗液，将微孔板倒扣在吸



水纸上轻轻拍打。重复5次。注：第五次洗板时，充分拍干至无明显水膜为止。

4) 加检测抗体：取55ul检测HRP标记抗体浓缩液（200×）加入对应的稀释液瓶中，轻轻震荡混匀，使其充分稀释至工作浓度后（1×），各孔加100ul溶液，贴上封口膜，37℃孵育1h。然后洗板，按步骤3操作。

5) 显色：向每个孔中加入100ul底物TMB，轻轻震荡30s混匀，贴上封口膜，置于避光的37℃恒温培养箱中显色10-30min。

注：震荡速度要低于100rpm，液体溅出会影响后续OD值。显色时间因实验室条件（温度、湿度等）会有一定差异，显色时间10-30min。

6) 显色终止及读板：直接向含有底物的微孔中加入50ul的终止液，终止反应，轻轻震荡混匀，立即转移到酶标仪上，在450nm下读取吸光度值。

十、注意事项

（一）样本收集注意事项

1、样本收集完毕后，要分装保存在-20℃（少于3个月）或-80℃（少于6个月）以保持蛋白活性，避免污染和反复冻融。如果要在24小时内分析样本，可以保存在2-8℃。

2、采集样本后如果短期内不使用，请将样本分装后冷冻保存，避免反复冻融。冷冻样本使用前请保证充分化冻，使用前用移液器或者Vortex混匀，可离心除去絮状不溶物。

3、若母液（标准品，检测抗体及酶液）出现浑浊，轻轻振荡或吹打即可。

4、建议所有标准品及样本都设置复孔。向微孔中加入试剂或样本后，请轻轻震荡使液体混匀，并尽量保证不要有气泡。

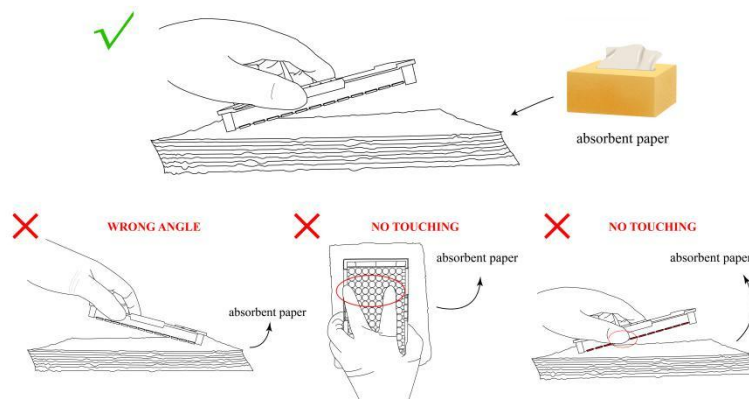
5、高脂血或溶血的样本含有丰富的过氧化物酶，对ELISA有干扰，导致检测结果非特异性升高，不建议使用。

（二）实验操作注意事项

1、请不要将本试剂盒的试剂与其他试剂盒试剂交叉使用。

- 2、实验操作使用一次性吸头，避免交叉污染。
- 3、加样：加样时要控制时间和速度，一般加样时间控制在10分钟内。如果样本数量过多，可使用多道移液器。
- 4、洗涤：洗涤时微孔中残留的洗涤液应在吸水纸上充分拍干，并要消除板底残留的液体和手指痕迹，避免影响最后的酶标仪读数。
- 5、由于底物TMB溶液是光感性的试剂，使用前请勿长时间暴露于可见光下。同时要避免TMB与金属接触。
- 6、反应时间的控制：加入底物后请定时观察反应孔的颜色变化（比如，10分钟左右），如果颜色较深，请提前加入终止液终止反应。
- 7、本试剂盒中使用了稀硫酸作为终止液，其具有轻微腐蚀性，使用时应避免接触衣物或眼、手等皮肤暴露部位。
- 8、标准曲线的 $R^2 \geq 0.95$ 。

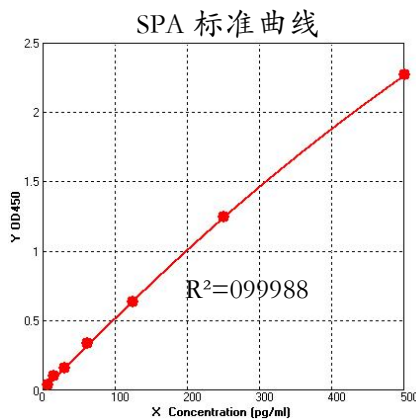
9、拍板示意图：



十一、数据处理

- 1) 对样本及标准品各自对应的复孔 OD 值取平均值。减去空白孔（即 S8）OD 值后带入标曲。
- 2) 以标准品的 OD 作为 Y 值，标准品的浓度作为 X 值，推荐选择四参数 logistic (4-PL) 曲线拟合。
- 3) 将样本 OD 代入到标准曲线方程中计算样本中待检 SPA 的浓度
- 4) 以下曲线仅供参考。

附件一、标准曲线实例



pg/ml	OD450
500	2.266
250	1.247
125	0.639
62.5	0.336
31.25	0.158
15.625	0.102
7.813	0.042

十二、质量控制

- 1) 批内差 CV%: 4-8
- 2) 批间差 CV%: 8-10
- 3) 回收率%: 67.36-115.92
- 4) 线性:

稀释倍数	Range %	Average Linearity %
4	98.25-105.77	102.01
40	100.68-109.74	105.21

- 5) 灵敏度: 1.4 pg/ml
- 6) 特异性/交叉反应性:

Sample	Cross reactivity (%)
Bovine IgG	---
Goat IgG	---
Human IgG	---

- 7) 钩状效应 (Hook Capacity)

本试剂盒是一个三步法的夹心 ELISA 试剂盒，样本在高含量蛋白 A 的情况下会受到钩状效应的影响，请用试剂盒稀释液稀释样本，使其蛋白 A 浓度在本试剂盒的检测范围以内。

- 8) 局限性

本试剂盒不适用于含有叠氮化钠(NaN_3)的样本，因为叠氮化钠是 HRP 的强抑制剂，会降低检



测到的蛋白 A 浓度。

十三、安全注意事项

- 1) 本试剂盒显色底物 TMB 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), 有一定的致病风险。如果接触到 TMB, 请用大量的水冲洗。
- 2) 终止液是硫酸溶液, 请勿让眼睛皮肤及衣物接触终止液。操作时带上手套, 实验服及面罩。

十四、联系我们

生产基地及研发部: 上海市浦东新区天雄路166弄2号楼401-408、413、414室

国际贸易部: 上海市浦东新区盛荣路88弄1号楼601室

网址: www.bluegene.cc 或 www.elisakit.cc

联系电话: 400-882-6373/021--61106433/021--61106434/021-61106435/021--61106436

国内市场部	
售前一	QQ: 2247355151 或邮箱: sale_bluegene@163.com
售前二	QQ: 3247299548 或邮箱: joan@bluegene.cc
技术部售后	tech@bluegene.cc
其他咨询	sales@bluegene.cc