



毕赤酵母 (Pichia Yeast) 宿主蛋白 (HCP) ,G2 残留检测试剂盒说明书

应用：定量检测培养上清、蛋白纯化过程及终产物中宿主细胞蛋白残留

产品编号：PH-E0021-1

本试剂盒仅供科研和生产使用，不得用于临床及诊断！

目录

一、 背景介绍.....	2
二、 实验原理.....	2
三、 试剂盒优势.....	2
四、 实验材料及仪器准备.....	3
五、 实验需要但试剂盒未提供的材料.....	3
六、 样本收集.....	4
七、 实验前的准备.....	4
八、 试剂的准备.....	4
九、 操作步骤.....	4
十、 注意事项.....	6
十一、 数据处理.....	8
十二、 试剂盒的质控.....	8
十三、 联系我们.....	9



一、背景介绍

本试剂盒是用来定量分析以毕赤酵母（Pichia Yeast）为表达系统时，蛋白药物中宿主细胞残留蛋白。

毕赤酵母作为常用的表达系统在表达目的蛋白的同时，会伴随着表达细胞自身凋亡，资料显示细胞破碎后释放到培养基中的宿主蛋白达上千种之多，其中很大一部分具有很强的免疫原性，导致不良的毒性或免疫反应而危及产品安全和质量，造成潜在的生物污染，生物医药产品生产下游过程的目的之一就是移除这些潜在危害。

因此，非常有必要将宿主细胞蛋白（HCP）残留量降低到最低水平，在研发下游纯化的工艺时，必须具有一种科学合理的测定成品或者半成品中 HCP 浓度的方法，而酶联免疫法具有极高灵敏度，因而被监管机构定为 HCP 检测的金标准。

二、实验原理

本试剂盒采用了固相夹心法的酶联免疫吸附实验（ELISA）。先将捕获抗体包被微孔板，制成固相抗体。检测时在包被抗体的微孔板中先加入待测抗原孵育，洗涤后加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体，形成包被抗体-抗原-检测抗体复合物。经洗涤后去除未参与反应的结合物，最后加入底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 的氧化作用下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。氧化后的 TMB 颜色和因子的总含量呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值），与浓度拟合成标准曲线，通过样本 OD 值，代入标准曲线方程，计算样品中因子浓度。

三、试剂盒优势

- (1) 覆盖度广：包被抗体及检测抗体均为种属兔来源，有较强的识别 HCP 能力，且该种属个体间差异小，具有高度可比性，工艺稳定。



- (2) 抗体滴度高：试剂盒中使用的抗体，间接法 Elisa 检测抗血清至少在 10^6 以上。
- (3) 灵敏度高：血清抗体纯化采用亲和纯化，最大限度去除非特异性抗体。
- (4) 稳定性高：生产过程采用广谱蛋白稳定剂，和微孔板处理工艺，增加标准品及微孔板热稳定性和结果的可重复性。
- (5) 稀释液优化：使用优化稀释液，可降低样本检测过程中非特异性吸附，本底显色极低利于观察待测样本浓度。

四、实验材料及仪器准备

1. 试剂盒内容 (2-8℃ 冷藏)

	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	标准品母液 (500 μ g/mL)	50 μ L	1 管	2-8℃ 冷藏
3	检测抗体母液(100 \times)	150 μ L	1 管	2-8℃ 冷藏
4	TMB	10mL	1 瓶	2-8℃ 避光冷藏
5	终止液	10mL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
6	洗液 (100 \times)	10mL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
7	稀释液 (10 \times)	10mL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
8	封板膜		4 张	
9	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) 迷你离心机
- 9) 洗板机或者洗瓶
- 10) 数据分析及绘图软件

六、样本收集

培养基上清液：1000×g（或 3000rpm）离心 15 分钟，取上清，-20℃ 或 -80℃ 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° 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。
- ◆ 不能加热来融化样本。

七、实验前的准备

请仔细阅读试剂盒说明书，反应在室温下进行。

八、试剂的准备

- 1) 试剂盒内所有试剂及包被板，请在使用前的 30min 拿出，使其恢复室温。
- 2) 洗液的稀释：将 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。
- 3) 稀释液的准备：将 10mL 10×稀释液母液，加入 90mL 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，用作标准品，样品，检测抗体的稀释液。

九、操作步骤

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，并用封板膜封好，放回

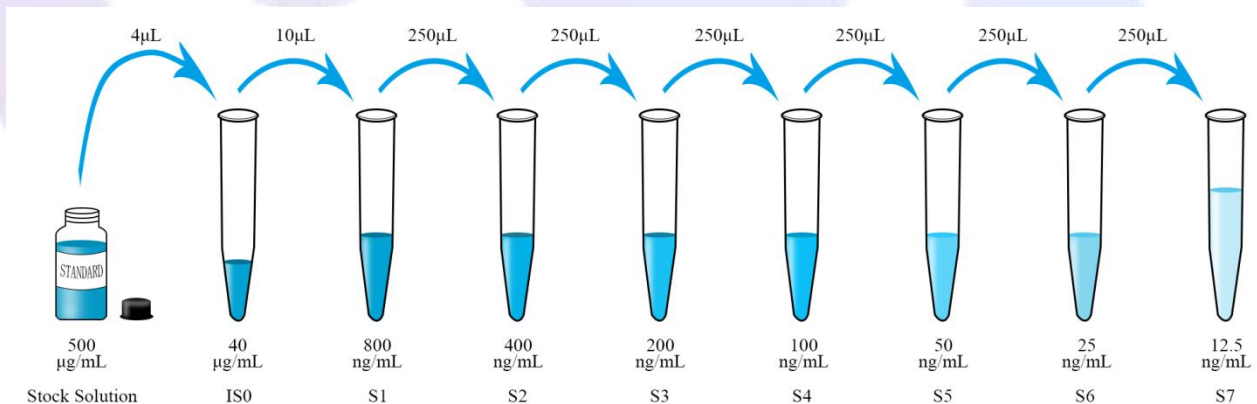
铝箔袋，重新放回4℃保存（板架可重复使用）。标准品由于运输颠簸可能会粘在管壁上，使用前稍微甩匀，或在离心机上离心2秒左右。

2. 标准品的稀释：

配置标准品时提前标记8只样品稀释管，预加入一定体积的稀释液，其中ISO（46μL），S1(490μL),S2至S7(各250μL)

取标准品母液（浓度为500μg/mL）4μL加入到标记为ISO的管，轻轻吹打2次并颠倒混匀后，接着吸取10μL浓度为40μg/mL的ISO到S1管，混匀后，取250μL浓度为800ng/mL的标准品S1到下一管，之后以2倍梯度稀释至S7（稀释过程如下图）。从稀释好后的标准曲线各浓度点分别取100μL加入空白微孔中，样本（原液或稀释液）取100μL加入空白微孔中。空白对照(Blank Control)加入100μL的样本稀释液即可。

注：标准曲线有7个点，分别命名为S1、S2、S3……S7。其中S1即标准曲线的最高浓度点（800ng/mL）。



3. 将酶标板用封板膜密封后室温振荡孵育1.5h。

4. 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300 μ L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。

5. 检测抗体：取检测抗体母液(100 \times)100 μ L 到 9.9mL 稀释液中稀释至工作浓度(1 \times)，取 100 μ L 加入到各微孔中，将酶标板用封板膜密封后室温振荡孵育 1.5h。
6. 洗板：重复步骤 4。
7. 显色：各微孔板加入 100 μ L TMB 溶液，室温反应 15min 左右。若颜色浅可适当延长反应时间，勿超过 30min。
8. 终止：各微孔中加入 50 μ L 终止液，终止反应。
9. 读取 OD 值：在波长 450nm 下读取 OD 值。
10. 数据分析：推荐使用四参数回归拟合。

十、注意事项

(一) 样本收集注意事项

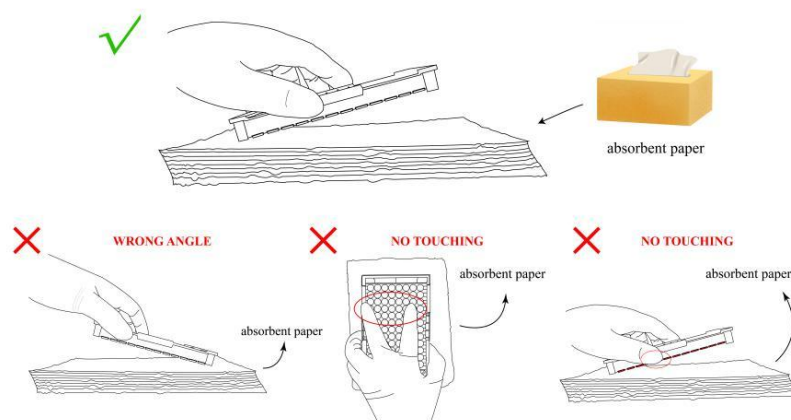
- 1、样本收集完毕后，要分装保存在-20 $^{\circ}$ C（少于3个月）或-80 $^{\circ}$ C（少于6个月）以保持蛋白活性，避免污染和反复冻融。如果要在24小时内分析样本，可以保存在2-8 $^{\circ}$ C。
- 2、采集样本后如果短期内不使用，请将样本分装后冷冻保存，避免反复冻融。冷冻样本使用前请保证充分化冻，使用前用移液器或者 Vortex 混匀，可离心除去絮状不溶物。
- 3、建议所有标准品及样本都设置复孔。向微孔中加入样本，保证不要有气泡。
- 4、目标蛋白纯化过程通常伴随成分复杂的缓冲液，建议首次使用不同缓冲液时进行加标回收，

以排除基质干扰效应。通常，高盐、低pH、多糖、有机溶剂及去污剂会导致较低回收率。

通常做法是，将稀释后的标准品 S1 (800ng/mL) 与待测试溶液基质按照 1: 4 体积混合 (如 20 μ L 含/不含浓度为 800ng/mL 的标准品 S1 加入 80 μ L 待测溶液)，计算时用加标后浓度减去加标前本底浓度，再除以理论浓度即为加标回收率。

(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：

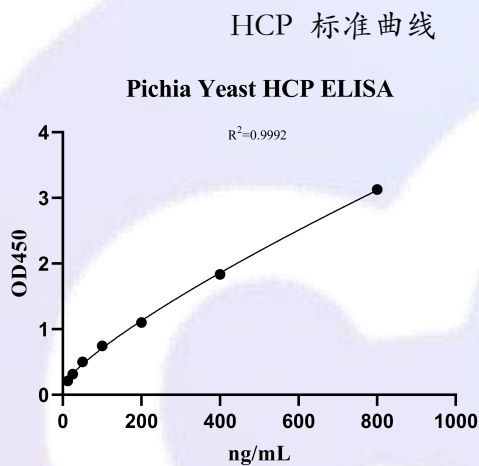




十一、数据处理

- 1) 对样本及标准品各自对应的复孔 OD 值取平均值。
- 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样本的浓度。
- 4) 以下曲线仅供参考。

附件一、标准曲线实例



ng/mL	OD450
800	2.927
400	2.136
200	1.302
100	0.845
50	0.501
25	0.315
12.5	0.212

十二、试剂盒质量控制

- 1) 批内差CV%: 7-11
- 2) 批间差CV%: 1.1-5.8
- 3) 线性:

稀释倍数	Range %
1:2	98.2-103.5
1:4	95.2-102.6
1:8	98.2-105.3
1:16	95.3-104.1
1:32	97.3-103.4
1:64	88.8-103.2



4) 灵敏度:

最低检测限(LOD): 1.56ng/mL

最低定量限(LOQ): 12.5ng/mL

十三、联系我们

地址: 上海市浦东新区周浦镇紫萍路889弄6号楼

网址: www.cellgenebio.com 或 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: 3980196069 或邮箱: sale_cellgene@163.com
技术部售后	tech@bluegene.cc
其他咨询	sales@bluegene.cc