



金黄色葡萄球菌蛋白 A (Protein A) 酶联免疫吸附检测试剂盒

应用：定量检测蛋白纯化过程及终产物中蛋白 A 残留 (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.....	3
六、 样本收集和保存.....	4
七、 实验前的准备.....	4
八、 试剂的准备.....	5
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 (Protein A 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。

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, 室温 (20-25 度) 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) 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。

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	标准品母液 (2μg/mL)	10μL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
3	HRP 标记抗体浓缩液 (200×)	80μL	1 瓶	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×)	10mL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
7	稀释液 (10×)	10mL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
8	稀释液组分	0.5g	1 管	2-8℃ 冷藏
9	封板膜		4 张	
10	使用说明书		1 份	

五、实验需要但试剂盒未提供的材料

- 1) 10-1000μL 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 (80 度)
- 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。

六、样本收集和保存

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。
- 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。



- ◆ 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。

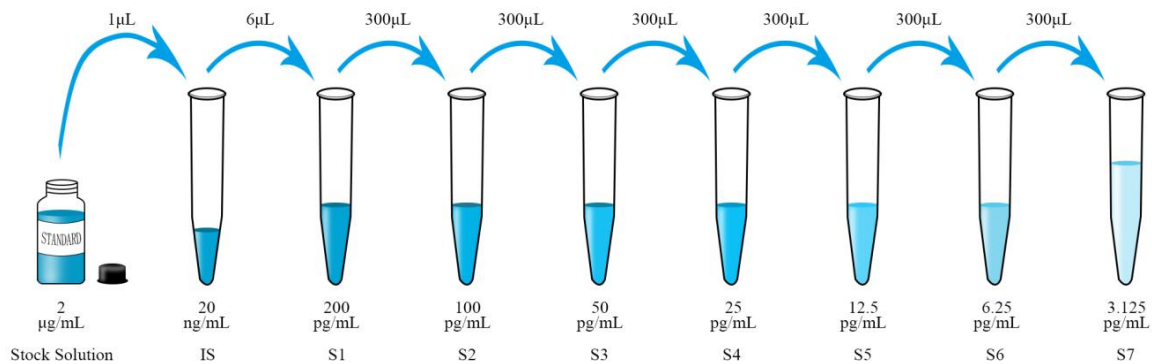
八、试剂的准备

- 1) 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：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) 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。将含量为 0.5g 的稀释液组分全部加入到 100mL 的 1X 稀释液中，溶解并混匀，用作标准品，样品，检测抗体的稀释液。
- 4) 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。
- 5) 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 IS (99μL) , S1(594μL),S2 至 S7(各 300μL)。

取标准品母液（浓度为 2μg/mL）1μL 加入到标记为 IS 的管，吹打混匀后，接着吸取 6μL 浓度为 20ng/mL 的 IS 到 S1 管，混匀后，取 300μL 浓度为 200pg/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）。

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（200pg/mL）。



- 6) HRP 标记抗体工作液(1X):取 50µL 检测抗体母液 (200×) 加入到 10mL 样品稀释液中, 混匀即可。

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, 并用封板膜封好, 放回铝箔袋, 重新放回4°C 保存。(板架可重复使用)
- 2) 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。
- 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300µL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) 在各孔中加入100µL HRP 标记抗体工作液(1X)贴上封板膜, 室温孵育1.5h。然后洗板, 按步骤4操作。



6) 显色：向每个孔中加入100 μ L底物TMB，贴上封板膜，置于室温显色10-30min。。

注：显色时间因实验室条件（温度、湿度等）会有一定差异。

7) 显色终止及读板：直接向含有底物的微孔中加入50 μ L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 $^{\circ}$ 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、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

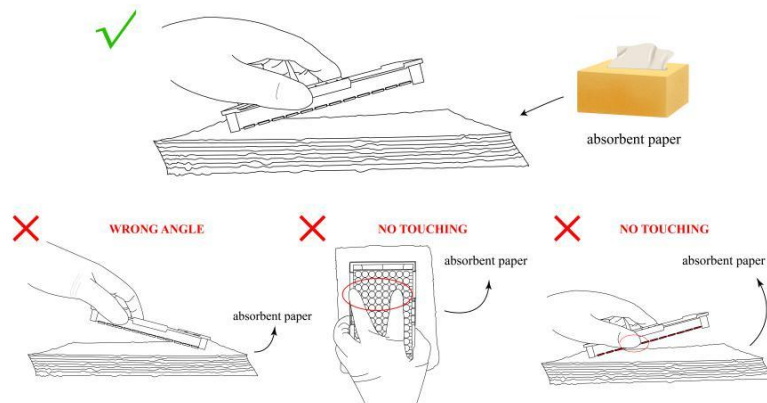
与金属接触。

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：

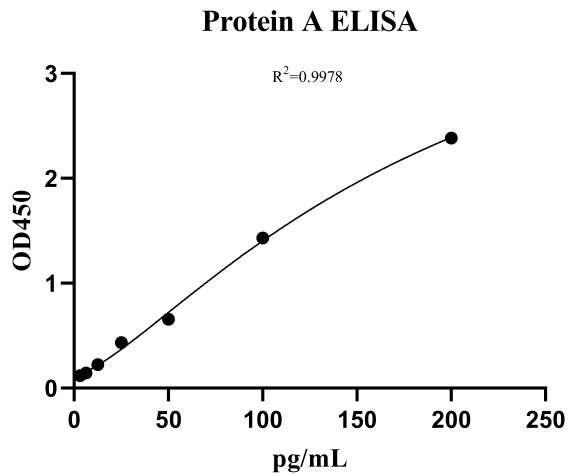


十一、数据处理

- 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 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样本的浓度。
- 4) 以下曲线仅供参考。



附件一、标准曲线实例



pg/mL	OD450
200	2.385
100	1.43
50	0.655
25	0.433
12.5	0.223
6.25	0.143
3.125	0.118

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。操作时戴上手套, 实验服及面罩。

十四、联系我们

公司地址: 上海市浦东新区紫萍路889弄6号楼(张江基因岛6号楼赛唐生物)

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