



毕赤酵母 (Pichia Pastoris) 宿主细胞蛋白 (HCP) ,G3 残留检测试剂盒说明书

(适用菌株 X-33)

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-E0021-3

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、 试剂盒组分.....	3
五、 实验需要但未提供的耗材及设备.....	3
六、 实验前的准备.....	4
七、 试剂的准备.....	4
八、 操作步骤.....	4
九、 注意事项.....	5
十、 数据处理.....	7
十一、 试剂盒质量控制.....	7
十二、 联系我们.....	8



一、背景介绍

本试剂盒是用来定量分析以毕赤酵母（*Pichia Pastoris*，适用菌株 X-33）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性和质量，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 FDA,EMA,CFDA 及 ICH 等国内外监管机构定为 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：抗体有较强的识别 HCP 能力，覆盖度 80%以上，工艺稳定。
2. 抗体滴度高：试剂盒中使用的抗体，经 Elisa 检测抗血清效价在 10^6 。
3. 灵敏度高：独特的血清纯化工艺，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：针对抗体纯化各个阶段使用的缓冲液不同优化样本稀释液，可显著降低样本检测过程中非特异性吸附，提高样本稀释线性及回收率，本底显色极低利于观察待测样本浓度。

四、试剂盒组分

	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（500μg/mL）	50μL	1 管	2-8℃ 冷藏
3	检测抗体母液（100×）	150μL	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×）	10mL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
7	稀释液（10×）	10mL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
8	封板膜		4 张	
9	使用说明书		1 份	

五、实验需要但未提供的耗材及设备

1. 移液器：10μL-1000μL
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、实验前的准备

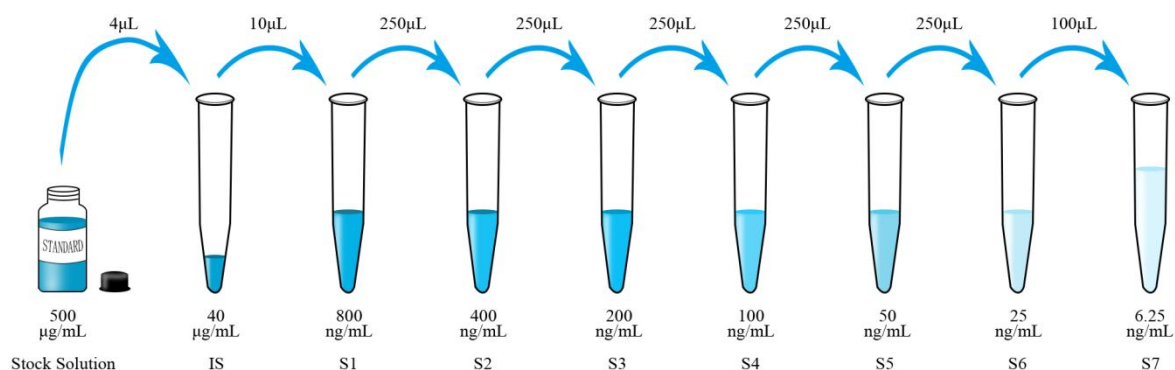
请仔细阅读试剂盒说明书，反应在室温下进行。

七、试剂的准备

1. 试剂盒内所有试剂及包被板，请在使用前 30 分钟拿出，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。

八、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，使用前轻微甩匀，或在离心机上离心 2 秒左右。
2. 标准品的稀释：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 (46μL)，S1 (490μL)，S2 至 S6 (各 250μL)，S7 (300μL)。取标准品母液（浓度为 500μg/mL）4μL 加入到标记为 IS 的管，轻轻吹打 2 次并颠倒混匀即可（后续操作相同，切勿涡旋等剧烈混匀），接着吸取 10μL 浓度为 40μg/mL 的 IS 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 S6，最后从 S6 中吸取 100μL 加入 S7 中混匀即可（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（800ng/mL）。





3. 将酶标板用封板膜密封后室温振荡孵育 1.5 小时。
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20秒，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 10mL 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 1.5 小时。
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 15 分钟左右。若颜色浅可适当延长反应时间，勿超过 30 分钟。
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。

九、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. 冷冻样本使用前请保证充分化冻（请勿加热融化样本），使用前用移液器或者 Vortex 混匀，样本液中含有沉淀物会对 ELISA 有干扰，可离心去除。

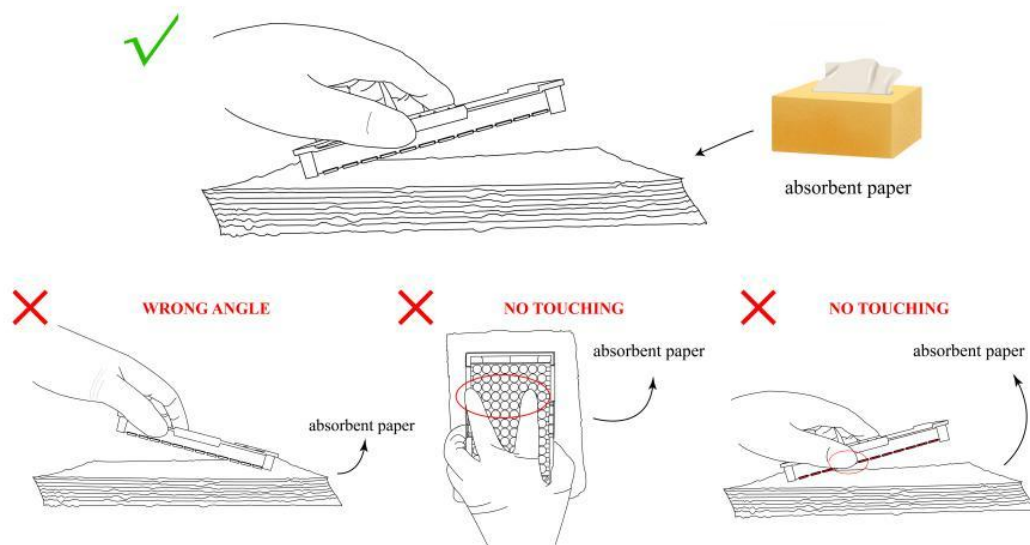


3. 某些化学裂解液（如 SDS, Triton 等）可能会对本实验造成干扰，谨慎使用。
4. 建议所有标准品及样本都设置复孔。向微孔中加入样本，保证不要有气泡。
5. 目标蛋白纯化过程通常伴随成分复杂的缓冲液，建议首次使用不同缓冲液时进行加标回收，以排除基质干扰效应，可接受的加标回收率为 80-120%。通常，高盐、低 pH、多糖、有机溶剂及去污剂会导致较低回收率。通常做法是，将稀释后的标准品 S1（800ng/mL）与待测试溶液基质按照 1: 3 体积混合（如 25 μ L 含/不含浓度为 800ng/mL 的标准品 S1 加入 75 μ L 待测溶液），计算时用加标后浓度减去加标前本底浓度，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 $R^2 \geq 0.95$ 。

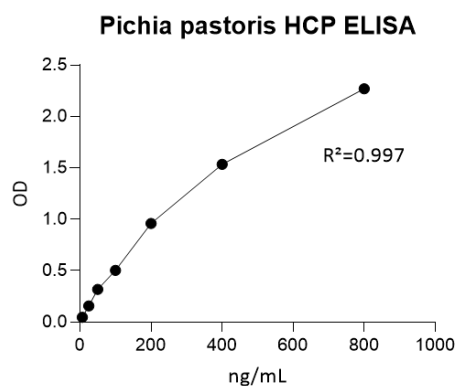
9. 拍板示意图:



十、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	2.270
400	1.534
200	0.959
100	0.504
50	0.317
25	0.158
6.25	0.046

十一、试剂盒质量控制

1. 灵敏度:

最低检测限 (LOD) : 1.56ng/mL

最低定量限 (LOQ) : 6.25ng/mL



2. 精密度

批内差CV%: 7-11

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

十二、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: 3247299548 或邮箱: sale_cellgene@163.com
技术部售后	tech@bluegene.cc
其他咨询	sales@bluegene.cc