



酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 宿主细胞蛋白 (HCP) ,G3

残留检测试剂盒说明书 (一步法)

应用：定量检测蛋白纯化过程及终产物中宿主细胞蛋白残留

产品编号：SC-H0024-3C1

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.....	6
十、 数据处理.....	7
十一、 试剂盒质量控制.....	8
十二、 常见问题及分析.....	8
十三、 联系我们.....	10



一、背景介绍

本试剂盒是用来定量分析以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 为表达系统时, 蛋白药物中宿主细胞残留蛋白。

酿酒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同时加入待测抗原和辣根过氧化物酶 (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: 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 检测抗血清效价达 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. 适用性：试剂盒适经不同反应温度（20-30 度）和不同反应时间（±10 分钟）测试，检测结果重现性较好。
6. 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（20×）	10mL	5 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
6. 酶标仪
7. 高速离心机
8. 迷你离心机



4. 灭菌 EP 管
5. 吸水纸
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（20-25 度，下同）进行。

七、试剂的准备

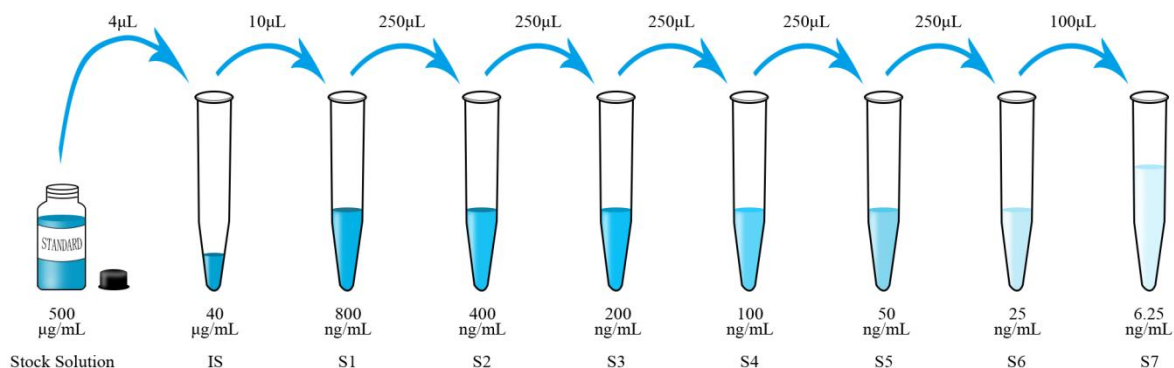
1. 试剂盒内所有试剂及包被板，请在使用前 30 分钟拿出，使其恢复室温。
2. 洗液的稀释：将 5 瓶 10mL 20×洗液母液，加入 950mL 去离子水或超纯水，混匀备用。
如果浓缩液中有少许结晶，请将其置于室温，并轻轻震荡至晶体完全溶解。
3. 稀释液的准备：将 10mL 10×稀释液母液，加入 90mL 去离子水或超纯水，混匀备用。如果浓缩液中有少许结晶，请将其置于室温，并轻轻震荡至晶体完全溶解，用作标准品，样品，检测抗体的稀释液。

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：
配置标曲时提前标记 8 只样品稀释管，预加入一定体积的稀释液，其中 IS0（46μL），S1（490μL），S2 至 S6（各 250μL），S7（300μL）。
(1) 取 4μL 标准品母液（浓度为 500μg/mL）加入到标记为 IS0 的管，轻轻吹打 2 次并颠倒混匀（后续操作相同，切勿涡旋等剧烈混匀）。
(2) 取 10μL 浓度为 40μg/mL 的 IS0 到 S1 管，轻轻吹打 2 次并颠倒混匀。
(3) 取 250μL 浓度为 800ng/mL 的标准品 S1 到 S2，之后以 2 倍梯度稀释至 S6。
(4) 取 100μL S6 到 S7，轻轻吹打 2 次并颠倒混匀。

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. 检测抗体 (1X)：取 100µL 检测抗体母液 (100×) 加入 9.9mL 稀释液中稀释至工作浓度。
4. 加样：取 50µL 标准品/待测样本，100µL 检测抗体 (1X) 加入微孔板中。空白对照 (Blank Control) 加入 50µL 样本稀释，100µL 检测抗体 (1X) 即可。
5. 将酶标板用封板膜密封后室温振荡孵育 2 小时。
6. 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。
7. 显色：各微孔板加入 100µL TMB 溶液，室温避光反应 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 50µL 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

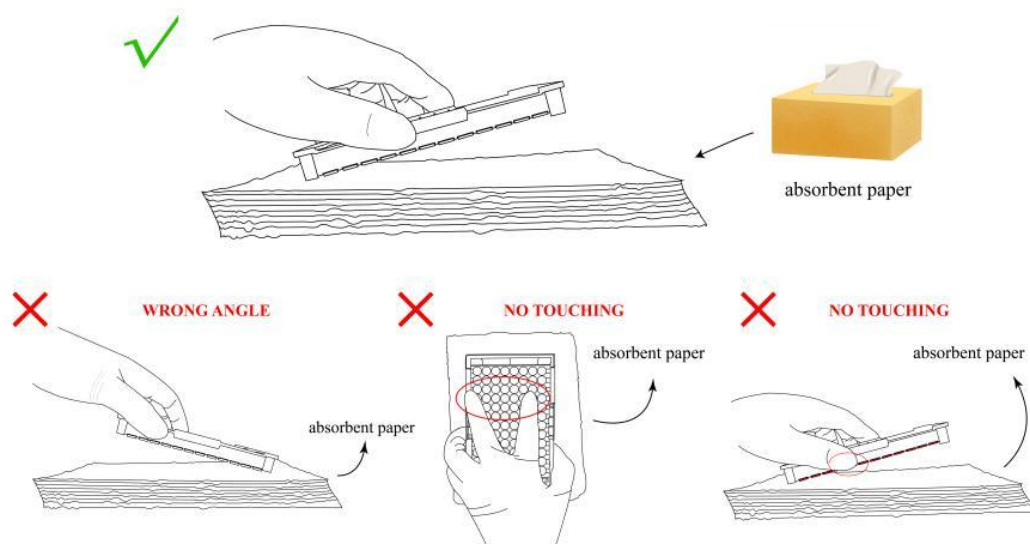
1. 样本收集完毕后，要分装保存在 -20°C （少于3个月）或 -80°C （少于6个月）以保持蛋白活性，避免污染和反复冻融。如果要在24小时内分析样本，可以保存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。
2. 冷冻样本使用前请保证充分化冻（请勿加热融化样本），使用前用移液器或者 Vortex 混匀，样本液中含有沉淀物会对 ELISA 有干扰，可离心去除。
3. 某些化学裂解液（如 SDS，Triton 等）可能会对本实验造成干扰，谨慎使用。
4. 建议所有标准品及样本都设置复孔。向微孔中加入样本，保证不要有气泡。
5. 目标蛋白纯化过程通常伴随成分复杂的缓冲液，建议首次使用不同缓冲液时进行加标回收，以排除基质干扰效应。通常，高盐、低 pH、多糖、有机溶剂及去污剂会导致较低回收率。具体做法是，将稀释后的标准品 S1 (800ng/mL) 与待测试溶液基质按照 1:1 体积混合（如 $50\mu\text{L}$ 含/不含浓度为 800ng/mL 的标准品 S1 加入 $50\mu\text{L}$ 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：

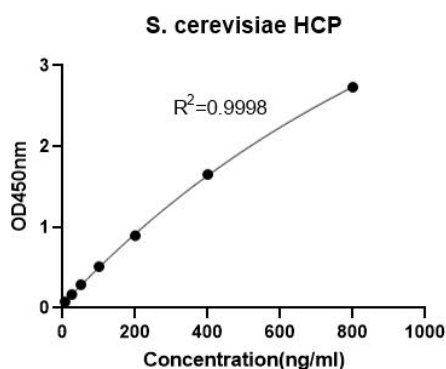


十、数据处理

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



编号	Con ng/mL	OD450
S1	800	2.734
S2	400	1.653
S3	200	0.896
S4	100	0.513
S5	50	0.292
S6	25	0.169
S7	6.25	0.078

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%: 2-8 批间差CV%: 2.07-5.44

3. 特异性

名称	交叉反应率
汉逊酵母 (Ogataea polymorpha)	<1%
毕赤酵母 (Pichia Pastoris,X-33)	<0.5%
毕赤酵母 (Pichia Pastoris,GS115)	<0.5%

十二、常见问题及分析

若实验结果显示异常，请及时对显色结果进行拍照记录，并完整保存未使用的板条及试剂，同时联系技术支持。此外，亦可参考后续提供的排查信息以确定问题根源。

问题描述	可能原因	相应对策
标准曲线	稀释错误	按照相应比例稀释标准曲线
梯度差	吸液或加液不准	检查移液器及吸头



	酶标板洗涤不完全	保证洗板次数及每孔的洗液用量
显色很弱或 无色	温育时间太短	保证足够的温育时间
	实验温度不正确	使用推荐的温育温度
	试剂体积不够或漏加	检查吸液及加液过程,保证所有试剂按顺序足量添加
	显色液没有恢复室温	显色前将 TMB 放置室温半小时以上
OD 值读数 低	酶标仪设置不正确	在酶标仪上检查波长和滤光片装置
		读数前应提前打开酶标仪进行预热
变异系数 (CV 值) 大	加液不正确	检查加液情况
	酶标板底部有污染	检查酶标板底部是否有残留的液体和手印
	板孔内有异物或气泡	加样前确认板孔内无异物, 加样后确认无气泡
	温育过程中未封板或 封板不完全	用封板膜封板
背景值高	酶标板洗涤不完全	按说明书推荐的方法进行洗板
		如果用自动洗板机,请检查所有的加液口和排废液口是 否有堵塞
		如果是手洗板,可适当增加洗板次数
		洗涤不充分漏洗都会导致高背景
	温育时间、温度不正确	按照说明书严格要求操作
	耗材污染	使用的管子、枪头等耗材不干净
	洗液有污染	配制新鲜洗液
	显色液被污染	显色溶液自身是没有颜色的,确保底物在使用之前没



		有被金属离子或氧化试剂污染，而且避光保存
灵敏度低	试剂盒保存不当	按说明书要求保存相关试剂

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