



## 汉逊酵母 (Ogataea polymorpha) 宿主细胞蛋白 (HCP) ,G3

### 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：HP-H0023-3B1

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汉逊酵母（*Ogataea polymorpha*）为表达系统时，蛋白药物中宿主细胞残留蛋白。

汉逊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,NMPA 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. 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
4. 灭菌 EP 管
5. 酶标仪
6. 酶标仪
7. 高速离心机
8. 迷你离心机
9. 洗板机或者洗瓶



5. 吸水纸

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）下进行。

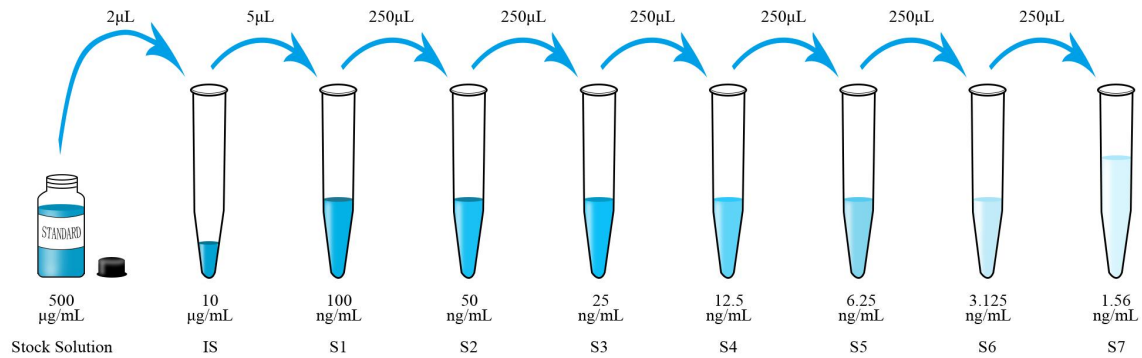
## 七、试剂的准备

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 5 瓶体积为 10mL 的 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：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 (98μL)，S1 (495μL)，S2 至 S7(各 250μL)。
  - (1) 取 2μL 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 5μL 浓度为 10μg/mL 的 IS0 到 S1 管，轻轻吹打 2 次并颠倒混匀。
  - (3) 取 250μL 浓度为 100ng/mL 的标准品 S1 到 S2，之后以 2 倍梯度稀释至 S7。

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（100ng/mL）。



3. 加样：取 100µL 标准品及待测样本加入微孔板中。空白对照 (Blank Control) 加入 100µL 样本稀释液即可。
4. 将酶标板用封板膜密封后室温振荡孵育 1.5 小时。
5. 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。
6. 检测抗体：取检测抗体母液 (100×) 100µL 到 10mL 稀释液中稀释至工作浓度 (1×)，取 100µL 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。
7. 洗板：重复步骤 5。
8. 显色：各微孔板加入 100µL 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。
9. 终止：各微孔中加入 50µL 终止液，终止反应。
10. 读取 OD 值：在波长 450nm 下读取 OD 值。



11. 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 $-20^{\circ}\text{C}$ （少于3个月）或 $-80^{\circ}\text{C}$ （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，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。

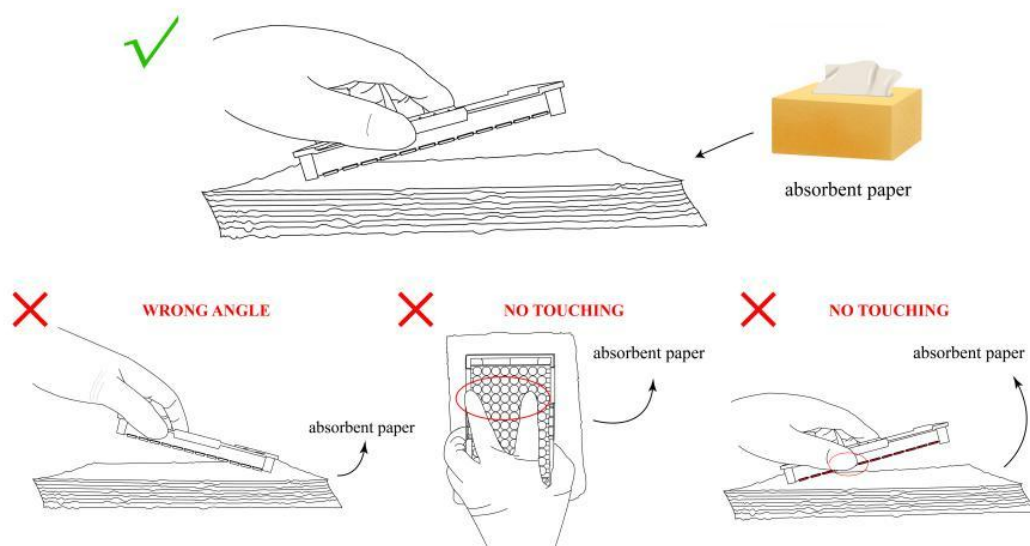
具体做法是，将稀释后的标准品 S1 (100ng/mL) 与待测试溶液基质按照 1: 1 体积混合（如 50 $\mu\text{L}$  含/不含浓度为 100ng/mL 的标准品 S1 加入 50 $\mu\text{L}$  待测溶液），计算时用加标后浓度减去加标前本底浓度，再除以理论浓度即为加标回收率。

### （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：

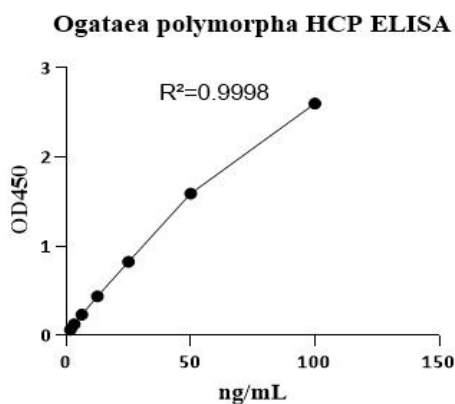


## 十、数据处理

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 | 100       | 2.601 |
| S2 | 50        | 1.592 |
| S3 | 25        | 0.826 |
| S4 | 12.5      | 0.439 |
| S5 | 6.25      | 0.235 |
| S6 | 3.125     | 0.126 |
| S7 | 1.56      | 0.064 |

## 十一、试剂盒质量控制

## 1. 灵敏度

最低检测限 (LOD) : 0.1ng/mL

最低定量限 (LOQ) : 1.56ng/mL

## 2. 精密度

批内差CV%: 3-5

批间差CV%: 0.37-3.01

## 3. 特异性

| 名称                           | 交叉反应率 |
|------------------------------|-------|
| 酿酒酵母 (S.cerevisiae)          | <2%   |
| 毕赤酵母 (Pichia Pastoris,X-33)  | <0.5% |
| 毕赤酵母 (Pichia Pastoris,GS115) | <2%   |

## 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<br>梯度差      | 稀释错误               | 按照相应比例稀释标准曲线                     |
|                  | 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<br>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<br>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<br>(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<br>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<br>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](http://www.cellgenebio.com) 或 [www.bluegene.cc](http://www.bluegene.cc) 或 [www.elisakit.cc](http://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: <a href="mailto:sale_bluegene@163.com">sale_bluegene@163.com</a> |
| 售前二   | QQ: 3247299548 或邮箱: <a href="mailto:sale_cellgene@163.com">sale_cellgene@163.com</a> |
| 技术部售后 | <a href="mailto:tech@bluegene.cc">tech@bluegene.cc</a>                               |
| 其他咨询  | <a href="mailto:sales@bluegene.cc">sales@bluegene.cc</a>                             |