



HEK293 宿主细胞蛋白 (HCP) ,G3 残留检测试剂盒说明书

(上清, 一步法)

(适用范围: 与 HEK293 相关的细胞系, 如 293T, 293F 等)

应用: 定量检测细胞裂解液、蛋白纯化过程及终产物中宿主细胞蛋白残留

产品编号: HH-H0019-3C1

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.....	9
十三、 联系我们.....	10



一、背景介绍

本试剂盒是用来定量分析以 293 细胞（如 HEK293，293T）为表达系统时，蛋白药物中宿主细胞残留蛋白。

293 细胞系被广泛用来表达治疗性蛋白，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
6. 酶标仪
7. 高速离心机
8. 迷你离心机



4. 灭菌 EP 管

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）进行。

七、试剂的准备

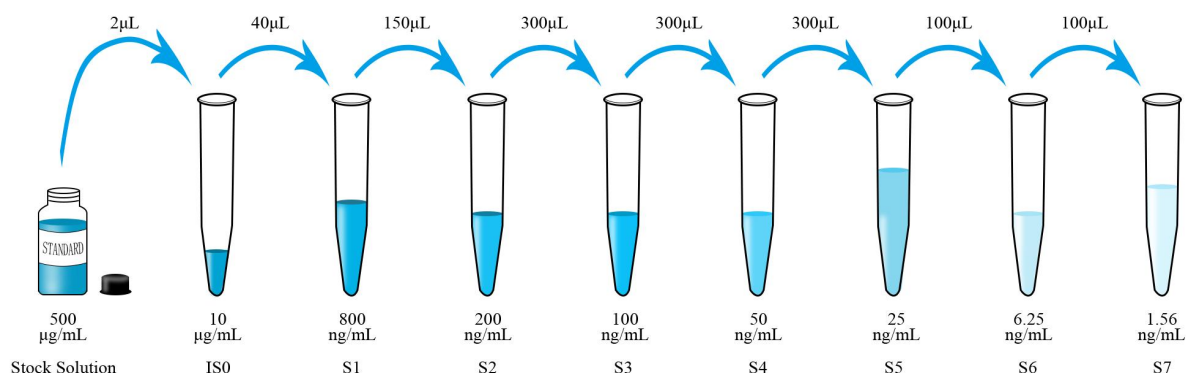
1. 试剂盒内所有试剂及包被板，请在使用前 30 分钟拿出，使其恢复室温。
2. 洗液的稀释：将 5 瓶体积为 10mL 的 20×洗液母液，加入 950mL 去离子水或超纯水，混匀备用。如果浓缩液中有少许结晶，请将其置于室温，并轻轻震荡至晶体完全溶解。
3. 稀释液的准备：将 10mL 10×稀释液母液，加入 90mL 去离子水或超纯水，混匀备用。如果浓缩液中有少许结晶，请将其置于室温，并轻轻震荡至晶体完全溶解，**用作标准品，样品，检测抗体的稀释液。**

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（98 μL），S1（460μL），S2（450μL），S3 至 S7（各 300μL）。
 - (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 40μL 浓度为 10μg/mL 的 IS0 到 S1 管，轻轻吹打 2 次并颠倒混匀。
 - (3) 取 150μL 浓度为 800ng/mL 的标准品 S1 到 S2，轻轻吹打 2 次并颠倒混匀。
 - (4) 取 300μL 浓度为 200ng/mL 的标准品 S2 到 S3，轻轻吹打 2 次并颠倒混匀，之后以 2 倍梯度稀释至 S5。
 - (5) 取 100μL 浓度为 25ng/mL 的标准品 S5 到 S6，轻轻吹打 2 次并颠倒混匀。

(6) 取 100 μ L 浓度为 6.25ng/mL 的标准品 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……S7。其中 S1 即标准曲线的最高浓度点（800ng/mL）。



3. 检测抗体 (1X)：取 100 μ L 检测抗体母液 (100 $\times$) 加入 10mL 稀释液中稀释至工作浓度。

4. 加样：取 50 μ L 标准品/待测样本，100 μ L 检测抗体 (1X) 加入微孔板中。

空白对照 (Blank Control) 加入 50 μ L 样本稀释，100 μ L 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。

7. 显色：各微孔板加入 100 μ L 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 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。

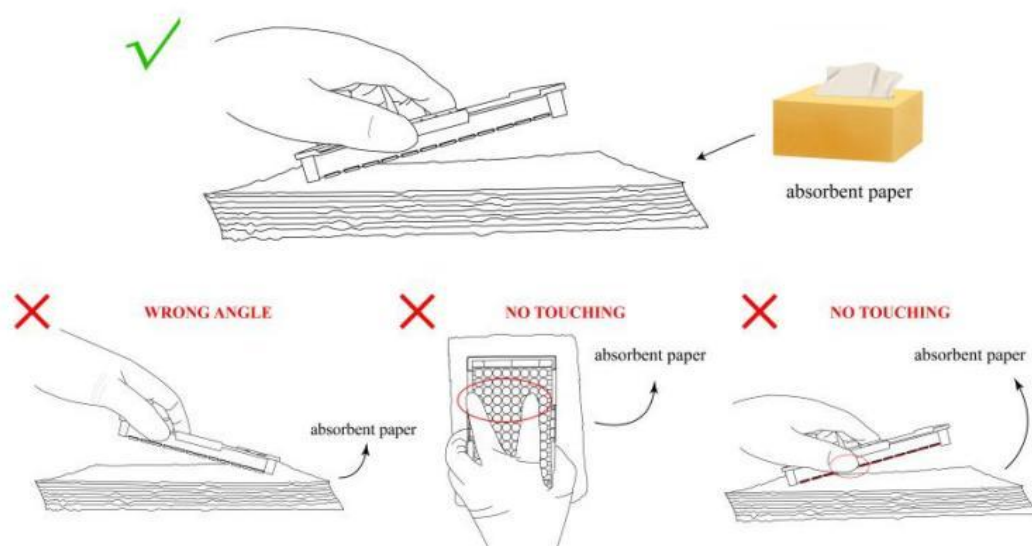
具体做法是，在酶标板的微孔中将稀释后的标准品 S1（800ng/mL）与待测溶液基质按照 1: 1 体积混合（如 25 μ L 含/不含浓度为 800ng/mL 的标准品 S1 加入 25 μ L 待测溶液），计算时用加标后浓度减去加标前本底浓度，再除以理论浓度即为加标回收率。

（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:

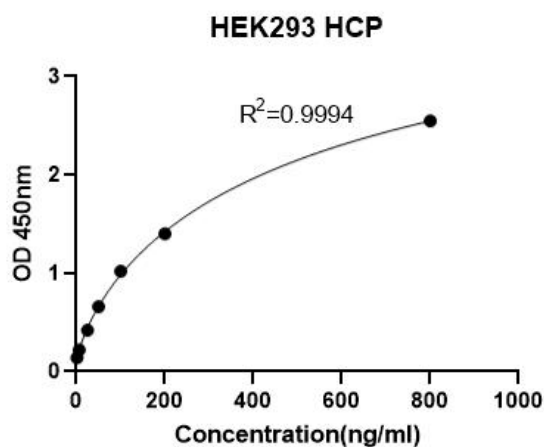


十、数据处理

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



编号	Con ng/mL	OD450
S1	800	2.55
S2	200	1.40
S3	100	1.02
S4	50	0.66
S5	25	0.42
S6	6.25	0.22
S7	1.56	0.14

十一、试剂盒质量控制

1. 灵敏度

最低检测限 (LOD) : 0.78ng/mL 最低定量限 (LOQ) : 1.56ng/mL

2. 精密度

批内差CV%: 6.57-8.51 批间差CV%: 6.65-9.54

3. 特异性

指标名称	交叉反应率 (%)
核酸酶	ND
胰蛋白酶	ND
BSA	ND
HSA	ND
Human IgG	ND
Human IgM	ND
毕赤酵母	ND
汉逊酵母	ND
酿酒酵母	ND



SF9	ND
-----	----

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 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 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