



## 中华仓鼠卵巢细胞 (CHO) 宿主蛋白 (HCP) ,G2 残留检测试剂盒说明书

应用：定量检测细胞裂解液中宿主细胞蛋白残留

产品编号：CH-K0018-2

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、 实验材料及仪器准备.....	3
五、 实验需要但试剂盒未提供的材料.....	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、 试剂盒的质控.....	8
十二、 联系我们.....	9



## 一、背景介绍

本试剂盒是用来定量分析以中国仓鼠卵巢细胞（Chinese Hamster Ovary cells, CHO）为表达系统时，蛋白药物中宿主细胞残留蛋白。

CHO 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：包被抗体及检测抗体均为种属兔来源，有较强的识别 HCP 能力，且该种属个体间差异小，具有高度可比性，工艺稳定。



- (2) 抗体滴度高：试剂盒中使用的抗体，间接法 Elisa 检测抗血清至少在  $10^6$  以上。
- (3) 灵敏度高：血清抗体纯化采用亲和纯化，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：使用优化稀释液，可降低样本检测过程中非特异性吸附，本底显色极低利于观察待测样本浓度。

#### 四、实验材料及仪器准备

##### 1. 试剂盒内容 (2-8°C 冷藏)

	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°C 密封冷藏
2	标准品母液 (500 $\mu$ g/mL)	50 $\mu$ L	1 管	2-8°C 冷藏
3	检测抗体母液(100 $\times$ )	150 $\mu$ L	1 管	2-8°C 冷藏
4	TMB	10mL	1 瓶	2-8°C 避光冷藏
5	终止液	10mL	1 瓶	2-8°C 冷藏
6	洗液 (100 $\times$ )	10mL	1 瓶	2-8°C 冷藏
7	稀释液 (10 $\times$ )	10mL	1 瓶	2-8°C 冷藏
8	封板膜		4 张	
9	使用说明书		1 份	

##### 五、实验需要但试剂盒未提供的材料

- 1) 10-1000 $\mu$ L 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) 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，请在使用前的 30min 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。

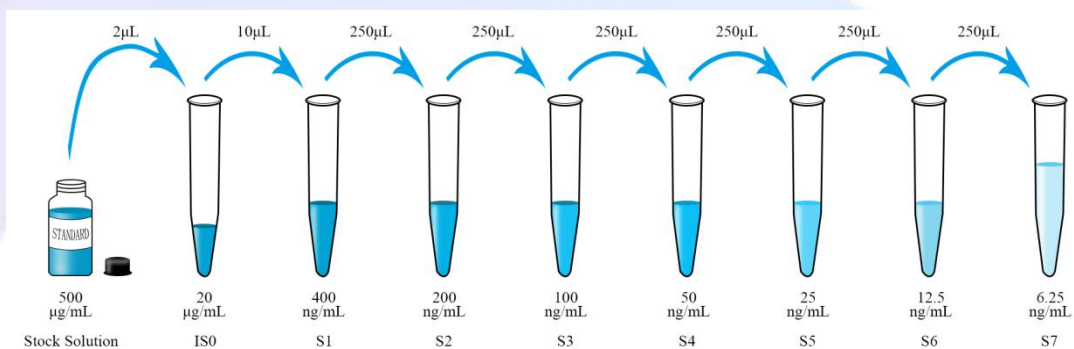
2. 标准品的稀释：

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 IS0 (48 $\mu$ L)，S1(490 $\mu$ L),S2 至 S7(各 250 $\mu$ L)。

取标准品母液（浓度为 500 $\mu$ g/mL）2 $\mu$ L 加入到标记为 IS0 的管，轻轻吹打 2 次并颠倒混

匀后,接着吸取  $10\mu\text{L}$  浓度为  $20\mu\text{g}/\text{mL}$  的 ISO 到 S1 管,混匀后,取  $250\mu\text{L}$  浓度为  $400\text{ng}/\text{mL}$  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)。从稀释好后的标准曲线各浓度点分别取  $100\mu\text{L}$  加入空白微孔中,样本(原液或稀释液)取  $100\mu\text{L}$  加入空白微孔中。空白对照(Blank Control)加入  $100\mu\text{L}$  的样本稀释液即可。

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 ( $400\text{ng}/\text{mL}$ )。



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  $300\mu\text{L}$  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. 检测抗体:取检测抗体母液( $100\times$ )  $100\mu\text{L}$  到 9.9mL 稀释液中稀释至工作浓度( $1\times$ ),取  $100\mu\text{L}$  加入到各微孔中,将酶标板用封板膜密封后室温振荡孵育 1.5h。



6. 洗板：重复步骤4。
7. 显色：各微孔板加入 100 $\mu$ L TMB 溶液，室温反应 15min 左右。若颜色浅可适当延长反应时间，勿超过 30min。
8. 终止：各微孔中加入 50 $\mu$ 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、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、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。
- 4、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。通常做法是，将稀释后的标准品 S1（400ng/mL）与待测试溶液基质按照 1:4 体积混合（如 20 $\mu$ L 含/不含浓度为 400ng/mL 的标准品 S1 加入 80 $\mu$ 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。

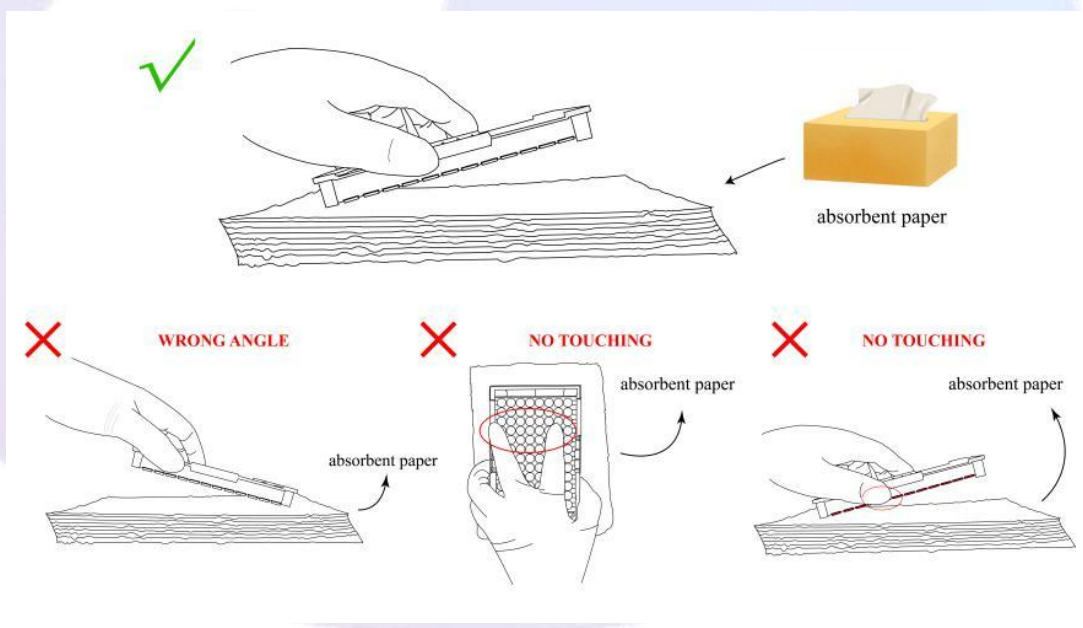
5、由于底物TMB溶液是光感性的试剂，使用前请勿长时间暴露于可见光下。同时要避免TMB与金属接触。

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

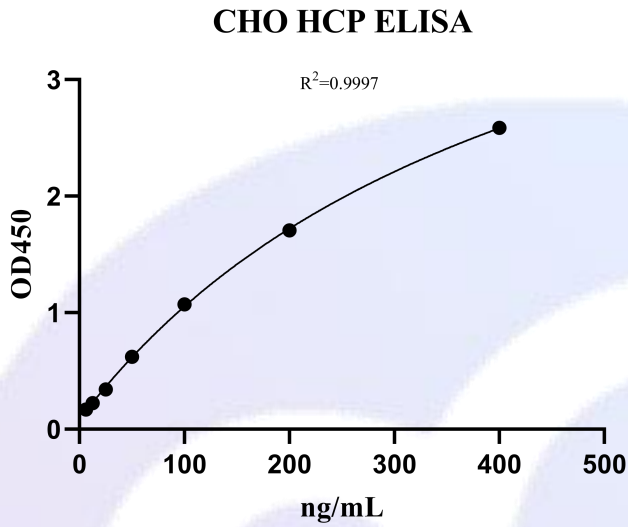
- 1) 对样本及标准品各自对应的复孔 OD 值取平均值。
- 2) 以标准品的 OD 作为 Y 值，标准品的浓度作为 X 值，推荐选择四参数 logistic (4-PL) 曲线拟合。
- 3) 将样本 OD 代入到标准曲线方程中计算样本中待检样本的浓度。



4) 以下曲线仅供参考。

附件一、标准曲线实例

HCP 标准曲线



ng/mL	OD450
400	2.586
200	1.706
100	1.072
50	0.622
25	0.340
12.5	0.224
6.25	0.169

十一、试剂盒质量控制

- 1) 批内差CV%: 6-10
- 2) 批间差CV%: 6.9-10.4
- 3) 线性:

稀释倍数	Range %
1:2	98.0-102.9
1:4	98.5-110.2
1:8	84.0-105.5
1:16	88.4-108.9
1:32	87.2-110.5
1:64	89.5-110.4

4) 灵敏度:

最低检测限(LOD): 3.1ng/mL

最低定量限(LOQ): 6.25ng/mL





## 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](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: 3980196069 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>