

Protein A ELISA Kit

Protein A ELISA 检测试剂盒

产品简介

Protein A 纯化介质由于与大多数抗体有特异性吸附，因此被广泛地用于抗体药物生产过程中，其中 Protein A 通过共价键与纯化介质结合，但在纯化过程中 Protein A 有一定脱落几率而残留下来。Protein A ELISA Kit 是一款能够准确定量样品中残留 Protein A 的 ELISA 试剂盒，可用于抗体纯化过程中的工艺优化、关键质量参数评价以及中间产品和终产品中的 Protein A 残留量检测。

本试剂盒应用双抗夹心酶联免疫检测（ELISA）的实验原理进行 Protein A 残留量检测，将 Protein A 标准品（36716-B）和待测样品加入预包被抗 Protein A 抗体的 Protein A 捕获微孔板条（36716-A），然后加入稀释后的生物素标记的 Protein A 检测抗体（36716-C），最后加入 Streptavidin-HRP（SA-HRP）（36716-D），形成抗体+抗原+抗体 - Biotin+ SA - HRP 复合物，洗板后加入 TMB 显色液（36716-F）显色。TMB 在 HRP 酶的催化下由无色转化成蓝色并在终止液（36716-G）的作用下最终转换成黄色。黄色的深浅与样品中被检测到的 Protein A 的量呈正相关。

产品信息

货号	36716ES48 / 36716ES96
规格	48 T / 96 T

组分信息

组分编号	组分名称	36716ES48	36716ES96
36716-A	Anti-Protein A coated microtiter strips	48T	96 T
36716-B	Protein A Standards (1 µg/mL)	50 µL	100 µL
36716-C	Detection Antibody: Biotin-conjugated Antibodies (120×)	50 µL	100 µL
36716-D	Streptavidin-HRP (500×)	30 µL	60 µL
36716-E	Dilution Buffer (5×)	25 mL	50 mL
36716-F	Wash Buffer Concentrate (20×)	25 mL	50 mL
36716-G	TMB Substrate	6 mL	12 mL
36716-H	Stop Solution	5 mL	10 mL
36716-I	Plate Sealer	3 each	5 each

储存条件

2~8°C保存，有效期 1 年*。

*收到货后，请检查各组分是否齐全，并立即放入对应的保存温度中储存。

使用说明

1. 实验前准备

1) 本试剂盒未提供但实验所需的实验材料：

- a. 量筒、1000mL 烧杯、不同规格的 EP 管
- b. 无尘纸（用于洗板后拍板）
- c. 无菌吸头
- d. 样本前处理板
- e. 去离子水或双蒸馏水

2) 本试剂盒未提供但实验所需的实验设备和仪器：

- a. 金属浴/水浴锅
- b. 37°C 恒温箱
- c. 全自动洗板机
- d. 旋涡混匀仪、离心机
- e. 不同规格的精密微量移液器、多通道微量移液器
- f. 计时器、4°C 冰箱
- g. 酶标仪（如：Molecular Devices：M 和 i 系列）在 450 nm 测量吸光度(参比波长 630 nm)

2. 实验方法

1) 试剂、抗体准备

使用前所有试剂组分以及待测样本需要恢复室温。所有试剂现配现用。

a. 1× Wash Buffer 配制：

浓缩液平衡至室温，充分溶解，不要有结晶*。混匀后根据所需的量，用去离子水或双蒸馏水按 1:20 的比例，将浓缩洗液（20×）稀释 20 倍，最终得到 1× 洗液。如：取 50 mL 的浓缩洗液（20×）加入 950 mL 的去离子水中配成 1000 mL 1× 洗液。

*如果浓缩洗液（20×）中出现结晶，在 50°C 的水浴锅中温浴，直至结晶完全消失。

b. 1× Dilution Buffer 配制：

浓缩液平衡至室温，充分溶解，不要有浑浊或沉淀（可用 0.22μm 滤膜滤过）。混匀后根据所需的量，用双蒸馏水或去离子水按 1:5 的比例，将浓缩稀释液（5×）稀释 5 倍，最终得到 1× Dilution Buffer。如：取 20 mL 的浓缩稀释液（5×）加入 80 mL 的双蒸馏水或去离子水中配成 100 mL 1× Dilution Buffer。

c. Detection Antibody 配制：

根据检测所需的量用 1× Dilution Buffer 按照 1:120 的比例，将 Protein A 检测抗体（120×）稀释至 1×。

d. Streptavidin-HRP 配制：

根据所需的量，用 1× Dilution Buffer 按照 1: 500 的比例，将 HRP 浓缩液（500×）稀释至 1×。

2) 标准品溶液制备

提前准备 9 个 1.5mL 离心管，参照下表，分别加入对应体积的 1× Dilution Buffer。随后参照下表稀释步骤依次制备标准品 1000 pg/mL、500 pg/mL、250 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.25 pg/mL、15.625 pg/mL 和 0 pg/mL。注意各浓度标准品需要设置复孔。

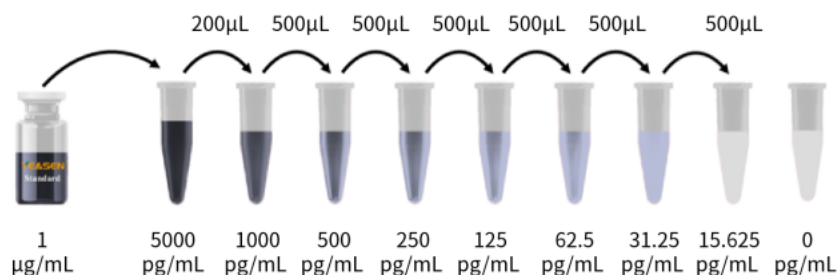


图 1 Protein A 标准品制备流程图

管号	Dilution Buffer 体积 (μL)	加入的标准品和体积 (μL)	标准品终浓度 (pg/mL)
A	995	5 (1 μg/mL)	5000
B	800	200 A	1000
C	500	500 B	500
D	500	500 C	250
E	500	500 D	125
F	500	500 E	62.5
G	500	500 F	31.25
H	500	500 G	15.625
I	500	/	0

表 1 Protein A 标准品配制体系

3) 样本和标准品处理

由于脱落的 Protein A 可以结合抗体的 Fc 区, 抗体-Protein A 复合体会影响对 Protein A 的检出, 所以实验前需要先将 Protein A 和抗体分开, 本产品使用加热方式进行 Protein A 和抗体分离。加热变性以后, 抗体经过离心后沉淀, Protein A 留于上清液中。具体实验步骤如下:

- a. 向离心管中加入不低于 500 μL 的待测样本;
- b. 将离心管置于金属浴 100°C 或者沸水中保持 20 分钟;
- c. 室温冷却, 11,000 rpm 离心 5 分钟;
- d. 将含有 Protein A 的上清液转移至新的离心管中并做好标记。

*本步骤中, 标准品无需加热处理。如需加热处理标准品, 不影响使用。

4) 待测样本制备

将预处理过的样本按照一定的稀释倍数进行稀释。样本具体的稀释倍数, 需要通过样本加标, 评估加标回收率和稀释线性后, 确定合适的稀释倍数。

5) 实验步骤

使用前所有试剂组分以及待测样本需要恢复室温。强烈建议所有的标准品和待检样本进行**双复孔测定**。

- a. 试剂准备: 提前准备好各种试剂、稀释好的标准品和待测样本。
 - b. 酶标板条确定: 计算待测样本和标准品所需酶标板条, 将酶标条从铝箔袋取出, 剩余的酶标条放回铝箔袋中并封好袋口, 低温保存。
 - c. 清洗酶标板: 用 1×Wash Buffer (300 μL/孔) 洗板三次, 每次倒液需拍干酶标板。洗板对试验结果有重要影响, 确保最后一次拍板没有洗液残留。
 - d. 孵育样本: 加入标准品和待测样本, 100 μL/孔, 确保快速完成加样, 使每孔孵育时间一致, 37°C 孵育 1 h。
 - e. 清洗酶标板: 弃去孔中液体, 加入 1×Wash Buffer (250 μL/孔), 浸泡 30 秒, 洗板 4 次, 拍干酶标板。
- *本步骤可以在洗板机上完成。如用洗板机, 请设置润洗, 洗液体积不少于 250 μL, 吸液时间不少于 0.8 秒, 浸泡时间不少于 10 秒, 重复洗涤 4 次。
- f. Biotin-conjugated Antibodies 孵育: 将预先配制至工作浓度的检测抗体加入酶标板中, 100 μL/孔, 37°C 孵育 1 h。
 - g. 清洗酶标板: 同步骤 e。
 - h. Streptavidin-HRP 孵育: 将预先配制至工作浓度的 Streptavidin-HRP 加入酶标板中, 100 μL/孔, 37°C 孵育 40 min。
 - i. 清洗酶标板: 同步骤 e。
 - j. 显色: 使用前 10 min 将底物液恢复至室温, 将底物液 TMB 加入酶标板中, 100 μL/孔, 37°C 避光孵育 15 min。
 - k. 终止: 加入 50 μL/孔终止液至酶标板中, 轻轻震动酶标板至显色均匀。

l. 读数：10 min 内读取 450nm/630nm 波长处的吸光度值（450nm 作为检测波长，630nm 作为参比波长）。

6) 结果分析

- a. 如果待测样本 OD 值超出标准曲线最高点 OD 值，需将样本进行稀释后重新测定。
- b. 曲线制定：以标准品浓度为横坐标，校准后的标准品吸光度值（OD_{450nm-630nm}）为纵坐标绘制标准曲线。多种绘图和统计学软件可以用于辅助绘制标准曲线并进行未知样本浓度的计算。四参数拟合法往往曲线拟合效果较好，其它方法如线性，双对数法也可能获得较好拟合结果，需要根据具体实验数据进行分析。最终依据标准曲线和样本的稀释倍数计算样本中 Protein A 的浓度。
- c. 典型的参考标准曲线如下（以下标准曲线图仅供参考，应以同次实验标准品所绘标准曲线计算样本含量）：

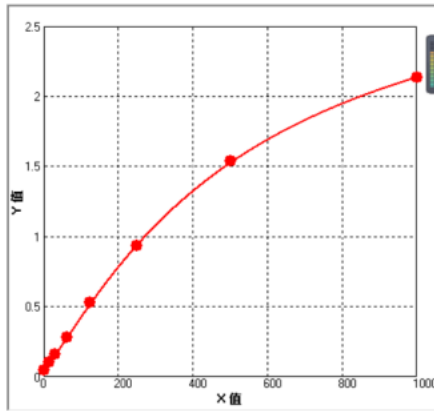


图 2：典型标准曲线图

标曲 (pg/mL)	OD	平均 OD
1000	2.1279	2.1404
500	1.5455	1.526
250	0.9509	0.9197
125	0.5501	0.5032
62.5	0.2813	0.2759
31.25	0.1608	0.1631
15.625	0.1039	0.1069
0	0.0477	0.0486

表 2 典型标准曲线数据

7) 实验流程图

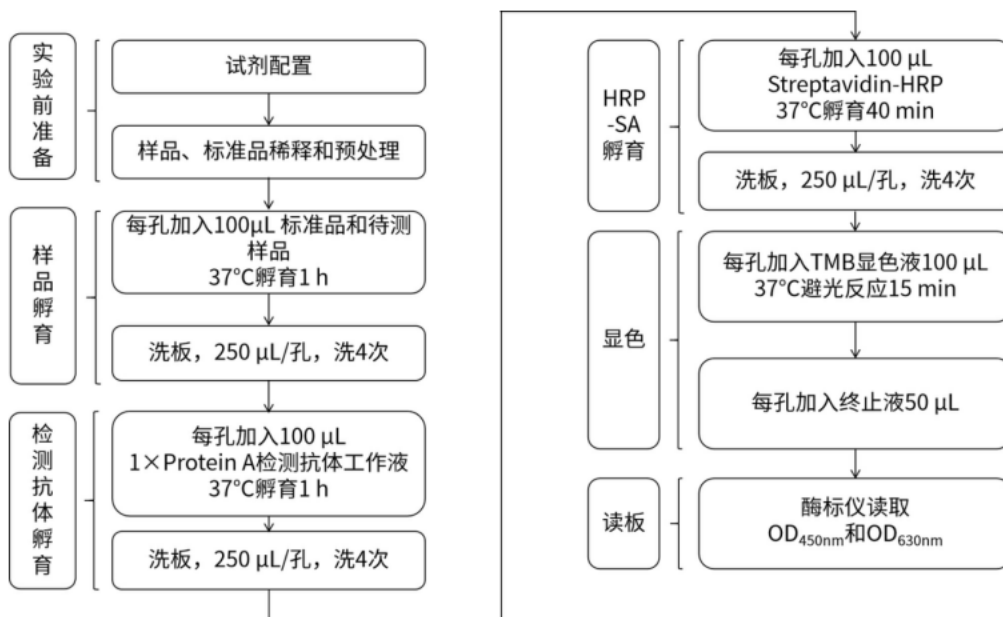


图 3：实验步骤流程简图

产品性能

本试剂盒性能经过充分评估，标曲范围为 0 pg/mL-1000 pg/mL，板内精密度小于 10%，板间精密度小于 15%，准确度满足 90%-110%范围，检测限为 7.8125 pg/mL。

注意事项

- 1) 使用本试剂盒前请仔细阅读本说明书；
- 2) 请在有效期内使用该产品，禁止不同批次的相关试剂进行混用；
- 3) 所有试剂在使用之前，均需要恢复至室温；
- 4) 本产品仅能够应用于检测说明书中标注的靶点抗原与样本。其它应用需经使用者设计验证后，根据结果评估使用的可靠性与准确性；
- 5) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 6) 本产品仅用作科研用途。

常见问题分析

如果实验结果出现异常，请及时保留剩余样品、试剂并拍照，保留实验原始数据，以便后续开展调查实验。以下常见问题分析供您参考，如需要，您可以联系我司销售和技术支持为您解决问题。

问题	原因	解决方法
标准曲线不好	移液量不准确导致个别浓度不准确	1. 对移液器进行校正；2. 保持加样速度，避免吸打过快造成吸头内壁残留；3. 保持不同管间加样一致；4. 润洗吸头
	稀释方法不恰当导致浓度不准	1. 提前将稀释液加入各管内；2. 注意每一步充分混匀；3. 保持不同管间加样一致
	试剂未完全恢复至室温导致 OD 偏低	1. 使用前，保证试剂都恢复室温
	漏加或误用其他试剂导致没有梯度出现	1. 使用前再将对应试剂拿出（但需确保已恢复室温）；2. 将不同试剂进行标记或分开放置，避免拿错试剂
重复性差	复孔中只有 1 个孔加了样品	1. 建议使用样品前处理板，提前将样品加好，再使用多通道移液器将液体转移到微孔板条中
	孔中有异物	1. 每次加样和读板前检查板底，确保孔内无异物
	加样不准	1. 润洗吸头；2. 使用多通道移液器加样；3. 沿孔壁匀速加入液体
	洗板操作不当	1. 确保各孔都被添加了足够的洗液；2. 如果使用洗板机，检查出液孔是否堵塞
OD 值偏低	孵育时间太短	1. 使用计时器，随时注意实验时间
	移液量不足或稀释不当	1. 注意移液器是否在校准有效期内，是否有故障；2. 提前记录好稀释体积，按照记录操作，保证移液一致性
	漏加或误用其他试剂	1. 使用前再将对应试剂拿出（但需确保已恢复室温）；2. 将不同试剂进行标记或分开放置，避免拿错试剂
	TMB 显色液光下暴露时间过长已显浅蓝色	1. 更换显色液
	没有立即读板	1. 加入终止液后需要立即读板，尽量在 10min 内读完
本底偏高	洗板操作不当导致洗板不彻底	1. 确保各孔都被添加了足够的洗液；2. 如果使用洗板机，检查出液孔是否堵塞
	TMB 显色液污染	1. 更换新的 TMB 显色液
	TMB 孵育时间过长	1. 使用计时器，随时注意实验时间