

E.coli HCP ELISA Kit (Plasmid)

E.coli HCP ELISA 检测试剂盒（质粒）

产品简介

重组蛋白和质粒 DNA 生产过程中使用大肠杆菌(E.coli)进行表达和扩增是生物制品制备中相对简单而且经济有效的方式。然而，使用大肠杆菌的工艺过程不可避免会引入宿主细胞蛋白(HCP)杂质，从而降低产品的疗效，并可能导致不良的毒性或免疫反应，因此需要保证生物制品终产品中 HCP 残留水平尽可能的低。

ELISA 法是一种使用简单、灵敏度高且客观有效的 HCP 检测方法。本试剂盒应用双抗夹心酶联免疫检测(ELISA)的实验原理进行质粒用 E.coli HCP 残留量的检测，将质粒用 E.coli HCP 标准品(36721-B)和待测样本加入预包被抗质粒用 E.coli HCP 抗体的酶标板(36721-A)，然后加入稀释后的生物素标记的质粒用 E.coli HCP 检测抗体(36721-C)，最后加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 (Streptavidin-HRP, 即 SA-HRP) (36721-D)，形成抗体+抗原+抗体-Biotin + SA-HRP 复合物，洗板后加入 TMB 显色液(36721-H)显色。TMB 在 HRP 酶的催化下由无色转化成蓝色并在终止液(36721-I)的作用下最终转化成黄色。黄色的深浅与样本中被检测到的 E.coli HCP 的量呈正相关。本试剂盒可以用于质粒相关生物制品纯化工艺过程的优化、中间工艺过程的杂质控制以及终产品的放行检测。

产品信息

货号	36721ES48 / 36721ES96
规格	48 T / 96 T

组分信息

组分编号	组分名称	36721ES48	36721ES96
36721-A	Anti-E.coli coated microtiter strips	48 T	96 T
36721-B	Standard: E.coli HCP (10 µg/mL)	50 µL	100 µL
36721-C	Detection Antibody: Biotin-conjugated Antibodies (50×)	150 µL	300 µL
36721-D	Streptavidin-HRP (100×)	150 µL	300 µL
36721-E	Dilution Buffer 1	25 mL	50 mL
36721-F	Wash Buffer Concentrate (20×)	25 mL	50 mL
36721-G	Dilution Buffer 2	15 mL	30 mL
36721-H	TMB Substrate	6 mL	12 mL
36721-I	Stop Solution	5 mL	10 mL
36721-J	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. 37°C恒温箱
- b. 全自动洗板机
- c. 旋涡混匀仪、离心机
- d. 不同规格的精密微量移液器、多通道微量移液器
- e. 计时器、4°C冰箱
- f. 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，用蒸馏水按 1:20 的比例，将 Wash Buffer Concentrate (20×)即浓缩洗液(20×)稀释 20 倍，最终得到 1×Wash Buffer。如：取 50 mL 的 Wash Buffer Concentrate (20×)加入 950 mL 的蒸馏水中，配成 1000 mL 1×Wash Buffer。

*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. Detection Antibody 配制：

使用前进行 10000 rpm 离心 20 sec,然后用 Dilution Buffer 2 将 Detection Antibody 即 Biotin-conjugated Antibodies (50 ×)以 1:50 的比例稀释 50 倍，最终得到 1×Detection Antibody（检测抗体）。

c. Streptavidin-HRP 配制：

使用前进行 10000 rpm 离心 20 sec,然后用 Dilution Buffer 2 将 Streptavidin-HRP (100×)以 1:100 的比例稀释 100 倍，最终得到 1×Streptavidin-HRP。

2) 标准品溶液制备

准备 8 个 1.5 mL 离心管，按照标准品浓度依次进行标记。第一个离心管中加入 588 μL Dilution Buffer 1，其余各离心管分别加入 300μL Dilution Buffer 1，先取 12 μL 混匀分离的 10 μg/mL 标准品，加至第一个离心管中充分混匀后即标记其为 100 ng/mL，再取 300μL 至下一个标记浓度的离心管中，充分混匀，进行一系列 2 倍梯度稀释标准品，起始最高浓度标记为 100 ng/mL，最低浓度为 3.125 ng/mL，可按照下面的配制方法来进行。每次试验均需制备相应的标准曲线，不同试剂盒以及不同时间的标准曲线不能混用。样本测试时，每个孔所需标准品的体积为 100 μL，注意配制体积要高于所需体积，避免体积使用量不足。

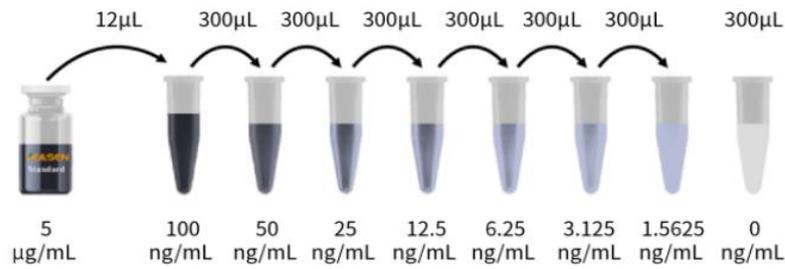


图 1 E.coli HCP 标准品制备流程图

管号	Dilution Buffer 体积(µL)	加入的标准品和体积(µL)	标准品终浓度(ng/mL)
A	588	12 (10 µg/mL)	200
B	300	300 A	100
C	300	300 B	50
D	300	300 C	25
E	300	300 D	12.5
F	300	300 E	6.25
G	300	300 F	3.125
H	300	0	0

表 1 CHO HCP 标准品配制体系

3) 待测样本制备

a. 使用 Dilution Buffer 1 将待测样本按照一定的稀释倍数进行稀释。待测样本的合适稀释倍数，需要进行摸索，样本中 HCP 浓度未知时，一般建议对样本进行 10 倍、100 倍、1000 倍等梯度稀释，通过 ELISA 检测，分析样本中 HCP 含量情况，从而确定待测样本的合适稀释倍数。

b. 确定待测样本的合适稀释倍数和样本中 HCP 含量后，再向待测样本中加入合适含量的标准品，评估样本加标回收率。

4) 实验步骤

a. 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。

b. 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。

c. 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。注意将酶标板条从 2~8°C 条件拿出后，取出待用数量的板条后，需要尽快把剩余板条放回铝箔袋中并确保袋口封闭完全。

d. 清洗酶标板：用 1×Wash Buffer (300 µL/孔) 洗板三次，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。

e. 孵育样本：加入标准品和待测样本，100 µL/孔，确保 15 min 内完成加样，37°C 孵育 1 h。

f. 清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 1×Wash Buffer (300 µL/孔) 洗板五次，拍干酶标板。

f. Biotin-conjugated Antibodies 孵育：将预先配制至 1×Detection Antibody 加入酶标板中，100 µL/孔，37°C 孵育 1 h。

g. 清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 1×Wash Buffer (300 µL/孔) 洗板五次，拍干酶标板。

h. Streptavidin-HRP 孵育：将预先配制至 1×Streptavidin-HRP (即 SA-HRP) 加入酶标板中，100 µL/孔，37°C 孵育 40 min。

i. 清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 1×Wash Buffer (300 µL/孔) 洗板五次，拍干酶标板。

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

5) 结果分析

- 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。
- 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 450 nm-630 nm）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宿主蛋白浓度。
- 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）：

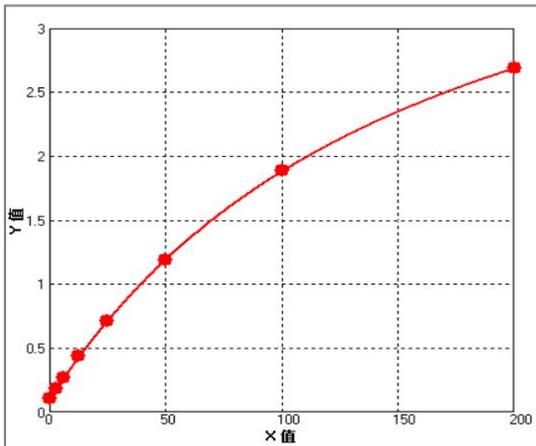


图 2: 典型标准曲线图

标曲 (ng/mL)	OD		平均 OD
200	2.6768	2.6979	2.687
100	1.895	1.8877	1.891
50	1.178	1.1985	1.188
25	0.7181	0.7122	0.715
12.5	0.4319	0.4412	0.437
6.25	0.2744	0.2705	0.272
3.125	0.1811	0.1862	0.184
0	0.1083	0.1083	0.108

表 2 典型标准曲线数据

6) 检测流程图

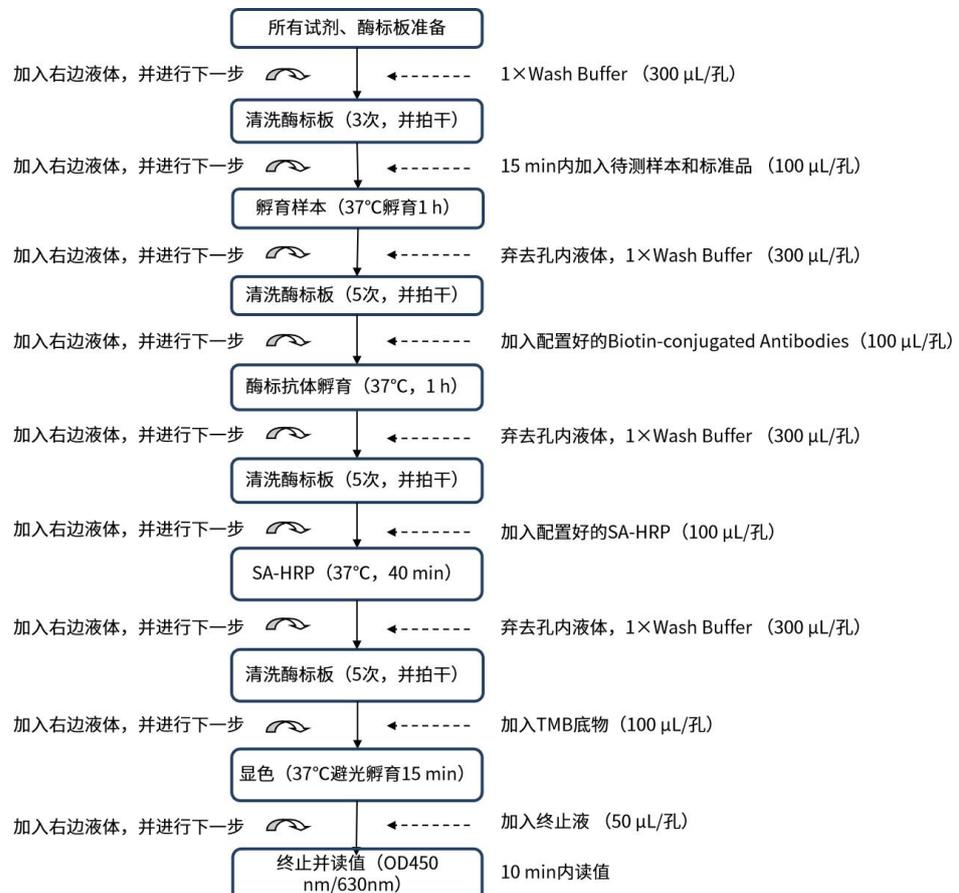


图 3: 实验步骤流程简图

产品性能

本试剂盒性能经过充分评估，具体可联系翊圣技术人员获得相应的性能验证报告。

本试剂盒性能经过充分评估，标曲范围为 3.125~200 ng/mL，板内精密度小于 10%，板间精密度小于 15%，准确度满足 75%~125%范围，检测限为 1.5 ng/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。