产品名称

E.coli 克隆菌宿主蛋白残留检测试剂盒（酶联免疫吸附法·一步法）

包装规格

- 32 T/盒
- 96 T/盒

预期用途

E.coli 克隆菌宿主蛋白残留检测试剂盒（酶联免疫吸附法·一步法）适用于碱裂解法质粒制备工艺所得到的工艺中间品及质粒原液中克隆菌宿主细胞蛋白（Host Cell Protein，HCP）的定量检测，如 mRNA 疫苗、病毒载体类基因治疗、CAR-T 等生物制品中克隆菌 HCP 的残留检测。本试剂盒可用于工艺优化、过程监测与产品放行。本产品属于通用型试剂盒，可广泛识别和检测克隆菌株 DH5α、Top10、JM109、Stb13 来源产品中的 HCP，对其它克隆菌株来源的 HCP，需验证样本适用性。
本试剂盒仅供研究使用，不能用于医学诊断。

检验原理

本试剂盒基于酶联免疫吸附法（Enzyme-linked Immunosorbent Aassy, ELISA）检测原理，采用双抗体夹心法测定样品中的 E.coli 克隆菌 HCP 含量。该检测体系用针对克隆菌 HCP 的多克隆抗体作为捕获抗体，预先包被于 96 微孔板表面，加入校准品或待测样品和辣根过氧化物酶（HorseradishPeroxidase, HRP）标记的酶标检测抗体，形成“捕获抗体-HCP 抗原-酶标检测抗体”的夹心免疫复合物。经洗涤后，加入显色液（3,3',5,5'-四甲基联苯胺, TMB）显色，TMB 在 HRP 的催化下由无色转化成蓝色并在酸的作用下最终转化成黄色，产生的吸光度信号（检测主波长：450 nm；参比波长 620 nm～650 nm）与 HCP 含量在一定范围内呈正相关，通过建立 HCP 校准品浓度与吸光度之间的标准曲线，采用四参数拟合模型（4-Parameter Logistic , 4PL)计算待测样品中宿主蛋白残留水平。
该方法利用抗体和抗原之间的高度特异性识别特性，实现对克隆菌来源复杂 HCP 的高灵敏度检测。本试剂盒所用多克隆抗体经过质谱覆盖率验证（Antibody Affinity Extraction-Mass Spectrometry，AAE-MS），结果表明该抗体可识别绝大多数 HCP。首次使用本试剂盒时建议先做样品的适用性验证，确定合适的样本稀释方案，同时确认样品基质不会对试剂盒体系造成检测干扰。

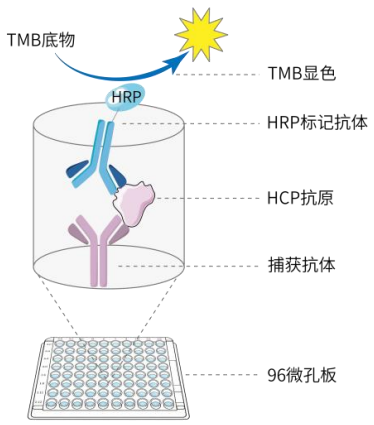


图 1 检测原理示意图

产品性能

1. 本试剂盒经充分评估，标曲范围为 1-243 ng/mL。
2. 检测限为零校准品均值加上三倍标准偏差所对应的浓度，本试剂盒检测限约为 0.25 ng/mL。
3. 定量限为零校准品均值加上十倍标准偏差所对应的浓度，本试剂盒定量限约为 0.82 ng/mL。
4. 板内精密度小于 10%，板间精密度小于 15%。
5. 专属性：与毕赤酵母、MDCK、Sf9、CHO HCP 均无交叉反应。

主要组成成分

表 1 ELISA 试剂盒主要组成成分

组分	32T 规格	96T 规格	产品号	说明	储存温度
E.coli 克隆菌 HCP 校准品	1 瓶	2 瓶	BPA-002	产品为冻干粉，精确量取 500μL 超纯水复溶，静置约 5 分钟直至无肉眼可见不溶物。产品信息详见标签。	2-8°C
抗 E.coli 克隆菌 HCP 预包被酶标板	32 孔	96 孔	BPB-002	已包被适量的克隆菌 HCP 捕获抗体，放置于抽真空的铝箔袋中，含两枚干燥片。使用后若有剩余的酶标板条，及时封口并放置 2-8°C冰箱保存。**请勿长时间放置室温**。	
E.coli 克隆菌 HCP 检测抗体（100×）	40μL×1 管	120μL×1 管	BPC-002	产品为无色液体溶液，是 HRP 标记后的多克隆抗体，需稀释 100 倍使用，应避光保存。	
显色液	4 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	BPD-001	产品为无色液体溶液，如发现溶液变蓝色，请勿使用。使用前需在室温平衡 20 分钟以上，应避光保存。	
终止液	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	BPE-001	产品为酸性溶液，操作过程做好通风，避免接触皮肤、眼睛及衣物。	
稀释液	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	BPF-001	产品为**玫红色液体**溶液，用于**校准品、检测抗体和样本**的稀释，初次检测的样本需摸索确认最佳稀释倍数。	
浓缩洗液（20×）	25 mL×1 瓶	50 mL ×1 瓶	BPG-001	产品为**蓝色液体**溶液，低温时容易结晶析出，使用前可放置 37°C直至结晶完全溶解。用**新鲜制备**的超纯水稀释 20 倍使用，**用于酶标板样品孵育后洗涤**。	
封板膜	1 张	2 张	BPI-001	用于样品孵育反应时密封覆盖酶标板条，防止污染和溶液挥发。	
说明书	1 份	1 份	/	用于指导客户进行实验室操作	

未提供但需准备

- ❖ 涡旋振荡器
- ❖ 洗板机
- ❖ 微孔板振荡器
- ❖ 酶标仪
- ❖ 加液槽
- ❖ 微量移液器与配套灭菌枪头
- ❖ 吸水纸等耗材

储存条件及有效期

1. 未拆封产品放置 2-8℃保存，有效期为 12 个月。拆封后酶标板放置 2-8℃保存，有效期为 1 个月。校准品复溶后放置 2-8℃保存，有效期为 7 天。
2. 酶标板拆封使用后，剩余部分应放于铝箔袋中密封保存。
3. 试剂盒中物料使用结束后需及时放回 2-8℃储存条件下保存。
4. 产品批号及有效期见产品包装标签。

实验流程

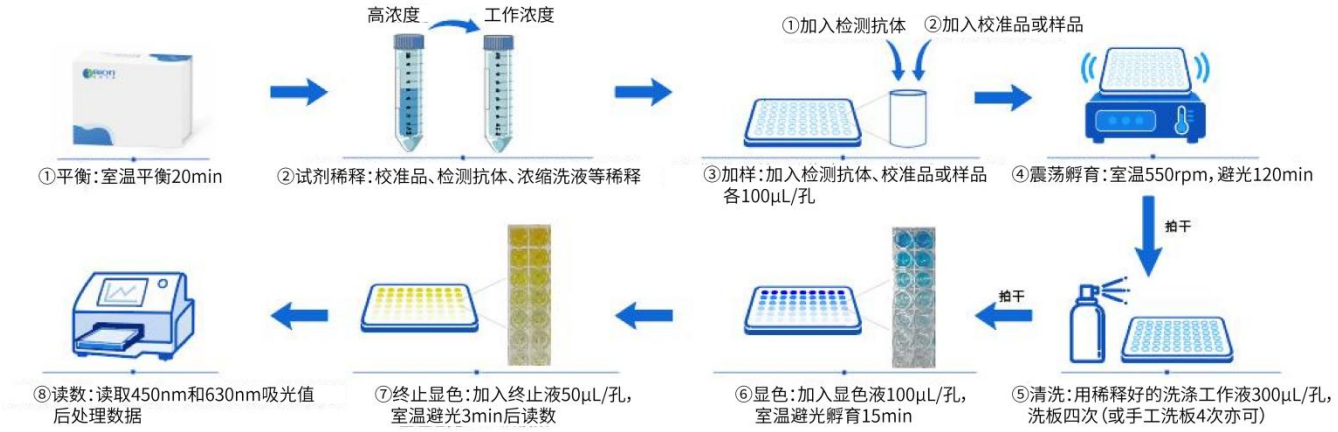


图 2 操作流程示意图

一、实验前准备

1. 将试剂盒放至室温（25±3℃）至少平衡 20 min。
2. 若浓缩洗液（20×）出现结晶，37℃温育直至结晶全部溶解。
3. 取出实验所需酶标板条，剩余酶标板条放置铝箔袋中封口，立即放置 2-8℃保存。

二、试剂配制

1. 洗涤工作液配制

确认浓缩洗液（20×）无结晶，按浓缩洗液（20×）：超纯水=1：19 体积比进行稀释配制，例如 15 mL 浓缩洗液（20×）加入 285 mL 新鲜配制的超纯水混匀，**必须精确量取配制**。稀释后的溶液即为洗涤工作液，用于酶标板洗板。

2. 校准品复溶

精确量取 500μL 超纯水于西林瓶中，轻柔颠倒混匀，室温静置约 5min，确认无肉眼可见不溶物，得到校准品复溶液。根据标签校准品含量计算浓度，例如标签标识值为 1.5μg，加入 500μL 超纯水复溶，则复溶后校准品浓度为 3.0μg/mL。

注：不可使用其它体积复溶，所用移液器需经过校准，有较好的精密度，否则会出现较大稀释误差，影响实验结果。

3. 检测抗体工作液配制

将 E.coli 克隆菌 HCP 检测抗体（100×）用稀释液稀释 100 倍，例如 25μL E.coli 克隆菌 HCP 检测抗体（100×）加入 2475 μL 稀释液中，轻柔混匀，即得到配制好的检测抗体工作液。检测抗体工作液需现配现用。

4. 校准曲线配制

校准曲线参考稀释方案见表 2，校准品稀释所用移液器需经过校准，有较好的精密度，否则会出现较大稀释误差，影响实验结果。

表 2 校准品梯度稀释参考方案

校准曲线	稀释方案	浓度（ng/mL）
ST1	复溶后校准品用稀释液稀释至 ST1 （例如：3.0μg/mL 复溶后校准品 243 μL+稀释液 2757 μL）	243
ST2	300μL ST1 + 600μL 稀释液	81
ST3	300μL ST2 + 600μL 稀释液	27
ST4	300μL ST3 + 600μL 稀释液	9
ST5	300μL ST4 + 600μL 稀释液	3
ST6	300μL ST5 + 600μL 稀释液	1
ST7 (Blank)	稀释液	0

5. 样本稀释

- 初次测试的样本需进行梯度稀释摸索，确定最小稀释倍数。若您的样本为过程工艺样本，其浓度高于本检测方法的分析范围，可高于最小稀释倍数进行稀释，但应评估其稀释线性，以确保检测方法准确。建议对样本进行加标回收研究，以确定无样品基质的干扰，确保 HCP 残留检测结果的准确性和可靠性。如原液样本有轻微基质干扰，可通过适当稀释去除基质干扰。
- 若不是初次使用本试剂盒，可按照验证过的稀释方案和加标方案对样本进行 HCP 残留检测。

三、检测步骤

1. 加入检测抗体工作液

将稀释好的检测抗体工作液轻微混匀，倒入加样槽中，用多通道移液器加入 100μL/孔检测抗体工作液，注意勿引入气泡。注意多通道移液器加液精度，如多通道移液器枪头中液面出现肉眼可见不齐，需重新吸取或者更换多通道移液器。

2. 加入标准品/样本

加入 100μL 稀释后的 ST1-ST6 E.coli 克隆菌 HCP 校准品、ST7（阴性对照）、稀释好的样本（包括加标样本）。封板膜封板，保持室温（25±3℃）在微孔板振荡器上孵育 120min，微孔板振荡器速度保持在 550 rpm。

- **请务必保证校准品、阴性对照、样本和检测抗体的加样在 10 分钟内连续进行。**
- **不同品牌振荡器可能在同一转速下震荡频率不一致，可根据不同振荡器调节转速，保证每孔溶液充分混匀且不洒出即可。**

3. 洗涤

孵育完成后，弃去各孔内液体，每孔分别加入 300 μL 洗涤工作液，静置 10 秒后弃去孔内液体；继续重复以上操作 4 次，洗板结束在吸水纸上轻轻拍干。

4. 显色

将适量显色液倒入加样槽中，立即用多通道移液器每孔分别加入 100 μL 显色液，保持室温（25±3℃）避光静置显色 15 min。注意显色步骤请勿振荡，否则会造成本底升高，检测精密度变差。

5. 终止

将适量终止液倒入加样槽中，每孔加入 50 μL 终止液，**静置 3min 后用酶标仪进行读数。**

❖ **请注意终止液加样顺序需和显色液加样顺序保持一致，以保证孔间显色时间的一致性。**

6. 数据读取

选择酶标仪主波长 450 nm，参考波长 630 nm，测定各孔 450 nm 及 630 nm 吸光值。

❖ **请在反应终止后 15 min 内进行数据读取，否则会影响结果的准确性。**

四、结果分析

1. 各孔 OD 值=450 nm 吸光值-630 nm 吸光值，若酶标仪没有配备参考波长（630 nm），只测 OD 值=450 nm 吸光值，则每个校准品和样本的 OD 值应减去空白孔的 OD 值。若待测样品浓度的 OD 值超出标准曲线最高值，宜对样品做进一步稀释后再检测。

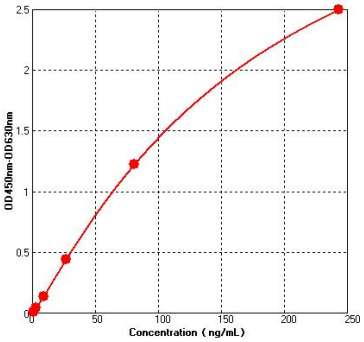
2. 本试剂盒建议以标准品浓度作为横坐标，OD 值为纵坐标，采用四参数方式进行曲线拟合，标曲的拟合软件可以用酶标仪自带的软件，若无，则建议采用专业的标曲制作软件，如 Curve Expert，ELISACalc 等。标准曲线相关系数 $R^2 \geqslant 0.99$，否则实验无效。

3. 建议设置 2-3 复孔，应先计算其平均值再进行曲线拟合。

4. 将待测样品测定的 OD 值代入标准曲线的拟合方程中，计算出样品浓度，即为待测样品中 E.coli 宿主蛋白 HCP 浓度。如待测样品有被稀释，计算结果时应乘以稀释倍数。若有对样品进行加标测试，则加标回收率应符合相应法规的方法学验证要求。

5. 一种典型的标准曲线如下，数据仅作参考，具体以实际测试为准：

STD（ng/mL）	Mean-$OD_{450-630nm}$
243	2.529
81	1.259
27	0.479
9	0.172
3	0.078
1	0.045
0	0.033
R^2	1.00000



注意事项

1. 本试剂盒仅供研究使用。

2. 所有的样本和试剂理被认为具有潜在危害。为了您的安全和健康，请穿戴实验服与一次性手套等防护措施。避免试剂直接接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。

3. 使用本试剂盒前，请详细阅读产品说明书。

4. 请在试剂盒标识的有效期内使用产品，各组分按标签条件储存。不同批号的试剂组分不可混用。本试剂盒不可与其他商品化试剂盒混用。

5. 为避免微生物的污染，以及试剂与样本间的交叉污染，请使用一次性枪头，请使用干净的容器、加样槽配制和暂存试剂，封板膜不可重复使用。

6. 所有组分在使用前需平衡至室温，液体试剂充分混匀后再取样。预制酶标板为可拆卸板条，可根据实验需求拆取。剩余未用部分请及时放回含干燥剂的铝箔袋中，密封低温保存。宜避免对酶标板底部刮花或其他影响光密度测量的操作。

7. 洗板推荐使用洗板机，洗板过程中避免串流或气泡，以防影响实验结果准确性。最后一次洗板后，应将板孔中残留的液体

轻轻拍干。

8. 每次测定时，需生成新的标准曲线。

9. 不同批次的试剂盒不建议混用。

10. 酶标板洗板完成后请立即加显色液，勿让酶标板长时间处于干燥状态。

常见异常排查

异常现象	可能原因	解决思路
实验 OD 值整体偏低	试剂盒未平衡完全	实验前将试剂盒从冰箱拿出，室温平衡至少 20 min 再使用
	试剂混用或保存不当	不同批次试剂不可混用；各试剂请按说明书指导温度存放
	孵育时间/温度和说明书不一致	请严格按照说明书要求进行孵育。冬天室温较低时，如显色较浅，可适当延长显色时间或注意调整室温至 25℃左右。
	样本制备不合适	重新制备标曲和样本
实验 OD 值整体偏高	孵育时间/温度和说明书不一致	请严格按照说明书要求进行孵育反应
	样本制备不合适	重新制备标曲和样本
标曲正常，样本显色异常	样本稀释倍数不合适	建议对初测样品做 4-5 个稀释梯度，确保至少有一个值可以落在检测范围
	钩状效应	在确保检测浓度落在检测范围内的前提下，提高稀释倍数
	样本保存不当或反复冻融次数过多	尽量使用分装冻存不超过 3 个月的样本；分装使用，减少反复冻融次数
	样本原液中存在干扰因素	在确保检测浓度落在检测范围内的前提下，提高稀释倍数，减轻干扰影响；无法解决时，联系我司技术人员进行专项调整
	样本中待测物含量过低	降低稀释倍数或浓缩样本后再加样
背景值高	孵育时间/温度和说明书不一致	请严格按照说明书要求进行孵育反应
	微孔板反应前未覆盖封板膜	孵育时应覆盖封板膜，防止液体蒸发和杂物污染
	洗涤或加样操作过程异常，不慎带入污染	使用试剂盒自带洗液，确保洗涤次数和洗液体积充分，洗涤后孔内干净无残留；确保实验操作区域的环境洁净
	显色未避光/时间长	显色时应避光，显色时间参考说明书
变异系数（CV）较大	移液器不准	使用校准后的移液器并正确操作
	边缘效应	确保所有试剂和酶标板均为同一温度
	试剂混用	不同批次试剂不可混用
加标回收率超出限定范围	基质干扰	通过线性稀释和回收率实验评估基质效应。在确保检测浓度落在检测范围内的前提下，提高稀释倍数，减轻干扰影响；无法解决时，联系我司技术人员进行专项调整
	加标浓度选取不合适	加标浓度的设定最好大于实际样品中目标分析物的浓度；低浓度下加标浓度的选择，不宜小于定量限