

HEK 293 HCP 残留检测试剂盒

（一步酶联免疫吸附法）

说明书

货号：1301311

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点和常见问题！

版本：A/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 产品名称

通用名: HEK 293 HCP 残留检测试剂盒 (一步酶联免疫吸附法)。

■ 包装规格

96 测试/盒。

■ 预期用途

HEK 293 HCP 残留检测试剂盒 (一步酶联免疫吸附法) 适用于 HEK 293 和 HEK 293T 来源的生物制品 (重组蛋白类、细胞和基因治疗类等) 中宿主细胞蛋白的定量检测。

该试剂盒仅供研究使用, 不可用于临床。

■ 检测原理

本试剂盒基于固相酶联免疫吸附分析法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA), 采用双抗体夹心的方式检测样品中 HEK 293 来源的 HCP 残留量。该分析方法通过包被针对 HEK 293T HCP 的多克隆抗体来捕获样品中的 HCPs, 同时在 96 孔板中加入校准品或待测样品, 和 HRP (Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶) 标记的抗 HEK 293T HCPs 抗体, 温育后洗涤; 加入 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 反应; HRP 催化 H_2O_2 氧化 TMB 生成蓝色产物 (最大吸收峰 655 nm), 随后加入终止液终止酶催化反应, 生成黄色产物 (最大吸收峰 450 nm)。酶标仪 450 nm 波长下测读吸光度值, 其吸光度与校准品和样品中的 HCPs 浓度成正相关。通过剂量-反应曲线可计算得出样品中 HCPs 的浓度。

对实际样品无需特殊处理, 可通过合适的稀释比例进行适用性验证, 以确定本试剂盒是否适用。本试剂盒检测步骤少, 快速, 专一性强, 性能稳定可靠。

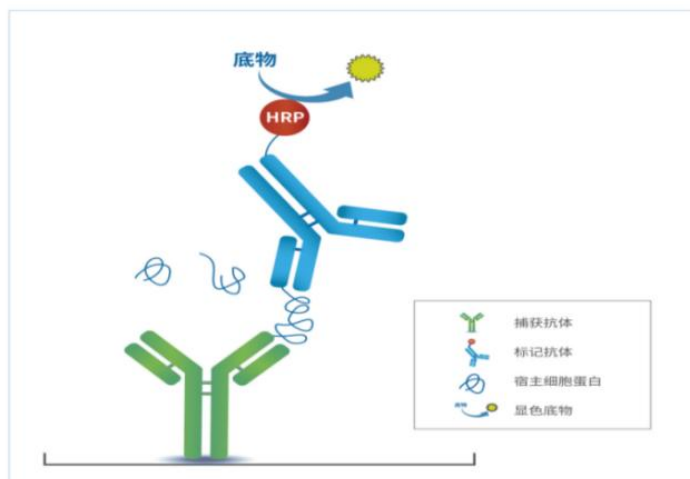


图 1 检测原理示意图

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	规格	说明
HEK 293T HCP 校准品	PNB008	3 瓶	冻干粉, 精确量取复溶液 500 μ L 溶解, 静置约 5 分钟, 溶液应该澄清透明, 无肉眼可见不溶物。 具体浓度见瓶身标注。
抗 HEK 293T HCP 预包被酶标板	PNA011	8 孔 \times 12 条	已包被适量的绵羊抗 HEK 293T HCP 抗体, 铝箔袋密封包装, 含干燥剂。用完及时密封保存。
校准品复溶液	PNC002	1.5 mL \times 2 管	澄清透明溶液, 专用于溶解 HEK 293T HCP 校准品。
稀释液	PNE004	25 mL \times 2 瓶	用于校准品、待检样品和酶标抗体的 稀释 。初次检测的样品, 需进行样品适用性验证, 确定最佳稀释倍数。
浓缩缓冲液 (10 \times)	PNF001	25 mL \times 1 瓶	低温时易产生结晶, 使用前可在 37 $^{\circ}$ C 水浴中溶解后用 新鲜制备的超纯水 稀释 10 倍, 即为 1 \times 缓冲液, 用于 洗板 。
HEK 293T HCP 酶标抗体 (100 \times)	PNN005	120 μ L \times 1 管	经 HRP 标记的抗 HEK 293T HCP 的绵羊多抗, 使用前用稀释液稀释 100 倍。
TMB 显色液	PND004	12 mL \times 1 瓶	使用前平衡于室温 20 分钟以上, 应避光并密封保存。
终止液	PNI002	6 mL \times 1 瓶	为盐酸溶液, 操作时戴好护目镜并避免接触皮肤。
封板膜	PNK001	3 片	用于检测过程中温育时间超过 30 分钟时密封覆盖酶标板条, 防止污染和液体蒸发。

■ 储存条件及有效期

未开封试剂盒置 2-8 °C 保存, 有效期为 12 个月。

开封组分的保存要求如下:

表 2. 开封组分有效期

名称	效期
开封预包被酶标板	开封后的酶标板条连同干燥剂于自封袋中密封保存, 在 2-8 °C 条件经验证可以稳定保存 60 天。
复溶校准品	溶解后的校准品请在 -20 °C 保存, 反复冻融不超过 3 次。

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 稀释用的无菌离心管
- 拍干酶标板用吸水纸
- 加样槽
- 无菌滤芯吸头

■ 相关设备

- 酶标仪 (能够检测 450 nm 和 620-650 nm 区间内单一波长的吸光度值)
- 单道或多道的微量移液器
- 微孔板恒温振荡器
- 恒温箱 (可选)
- 洗板机 (可选)

■ 实验操作流程

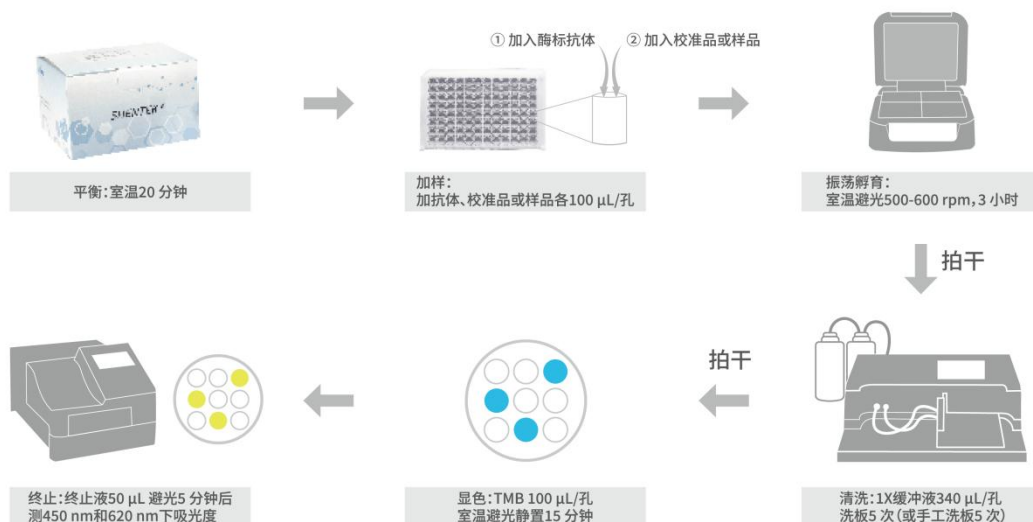


图 2 操作流程示意图

一、试剂、仪器准备

(一) 实验前准备:

1. 将试剂盒取出, 在使用前于室温平衡约 20 分钟。
2. 试剂均需在下步使用前 20 分钟取出于室温平衡, 使用后需立即放回 2-8 °C 保存。
3. 根据检测样品数量计算所需孔数, 取出相应数量的预包被酶标板条, 剩余板条连同干燥剂置于自封袋中密封, 放回试剂盒中, 保存在 2-8 °C 冰箱, 请于效期内使用完。

备注: 室温指 25 °C ± 3 °C。

(二) 试剂配制:

1. HEK 293T HCP 溶解: 根据 HEK 293T HCP 校准品西林瓶标签上的含量标识, 务必精确量取校准品复溶液 500 μL 于西林瓶中, 轻柔颠倒混匀, 静置 5 分钟。复溶后的校准品 HCP 浓度即为标识浓度, 复溶后溶液可在 -20 °C 保存, 反复冻融不超过 3 次。

备注: 不可用其他体积的复溶液溶解该校准品。

2. 1×缓冲液配制: 浓缩缓冲液 (10×) 用超纯水稀释 10 倍, 例如取 25 mL 浓缩缓冲液 (10×) 加入 225 mL 超纯水混匀, 即为 1×缓冲液, 用于洗板。建

议现配现用。若采用洗板机洗涤, 可能发生试剂量不够, 可单独采购相同产品号的缓冲液。

备注: 取出浓缩缓冲液 (10×) 和稀释液, 观察如有结晶属正常现象, 于 37 °C 温育直至完全溶解。

3. 检测抗体配制: 用稀释液于无菌离心管中将其稀释 100 倍, 轻轻颠倒混匀, 即为 1×HEK 293T HCP 酶标抗体。配制合适体积, 以保证加液时有充足的余量。现配现用。

备注: HEK 293T HCP 酶标抗体 (100×) 提前 20 分钟 2-8 °C 取出于室温平衡。

4. 校准曲线配制: 参照图 3 和表 3 对校准品进行梯度稀释。

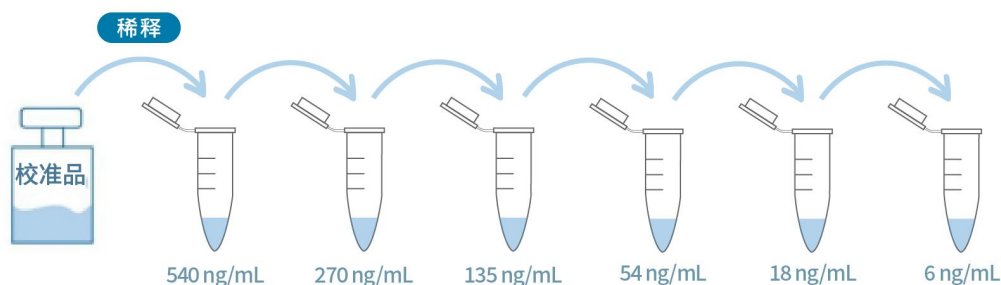


图 3 校准品稀释操作示例

表 3. 系列校准品梯度稀释

校准曲线样品	加样	浓度(ng/mL)
ST1	将校准品原液用稀释液稀释到 ST1 浓度	540
ST2	500 μ L ST1 溶液 + 500 μ L 稀释液	270
ST3	500 μ L ST2 溶液 + 500 μ L 稀释液	135
ST4	360 μ L ST3 溶液 + 540 μ L 稀释液	54
ST5	300 μ L ST4 溶液 + 600 μ L 稀释液	18
ST6	300 μ L ST5 溶液 + 600 μ L 稀释液	6
NCS (阴性对照)	稀释液	0

二、样品准备

- 样品: 表达纯化工艺过程样品, 原液等。应清澈透明, 经离心或过滤等方式去除不溶物。

- 存放: 样品务必事先有稳定性的研究, 明确最佳的保存条件; 一般建议样品长期储存应放置于-65 °C及以下环境中, 且不宜反复冻融。
- 处理: 待测样品根据其预估所含的 HCPs 浓度, 用稀释液稀释适当倍数, 使其检测值落入校准曲线定量范围之内。
- 对初次使用或样品 HCPs 含量未知的情况, 强烈建议进行样品适用性验证, 确定适宜的样品稀释倍数, 以便更好进行后续常规检测。

备注: 相关验证方案可咨询我司技术支持。

三、操作步骤

(一) 加样孵育

1. 加入检测抗体: 取 1×HEK 293T HCP 酶标抗体溶液到加样槽中, 用多通道移液器快速将抗体溶液 100 μL/孔加入微孔板孔底部, 勿引入气泡。实际检测时可根据样品数量加样(可参考表 4 示例进行 96 孔板排版)。
2. 加入校准品和待测样品: 准确移取 100 μL 系列校准品溶液、稀释液(0 值)、待测样品加入相应微孔板中。操作时避免产生气泡, 每个浓度建议做 2-3 个平行复孔, 并记录各浓度孔所在位置。
3. 加样完毕后将微孔板用封板膜密封, 放置于微孔板恒温振荡器上, 室温条件下 500-600 rpm, 避光振荡孵育 3 小时。

表 4. 96 孔酶标板加样排版示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NCS	NCS	NCS		S1	S1	S1					
B					S2	S2	S2					
C	ST6	ST6	ST6		S3	S3	S3					
D	ST5	ST5	ST5		S1+SR C	S1+SR C	S1+SR C					
E	ST4	ST4	ST4		S2+SR C	S2+SR C	S2+SR C					
F	ST3	ST3	ST3		S3+SR C	S3+SR C	S3+SR C					
G	ST2	ST2	ST2									
H	ST1	ST1	ST1									

✧ 该示例表示的是检测 6 个浓度梯度的校准曲线 (ST1-ST6)、1 个阴性对照 NCS、3 个待测样品 (S1-S3) 和每个样品加标回收 SRC (S1 SRC-S3 SRC)。

✧ 实际检测时可根据样品多少, 参照此示例进行 96 孔板排版加样。

◇ 客户可根据方法验证结果确定日常检测复孔数及是否设置加标回收。

(二) 显色:

1. 提前 20 分钟将 TMB 显色液置于室温条件下平衡。
2. 将上述板子用 1×缓冲液洗板, 340 μL /孔, 迅速甩掉液体, 于纸巾上拍干如此重复洗板 5 次。洗板后的微孔板应立即进行后续操作, 不可放置。
3. 取合适体积的 TMB 显色液于加样槽中, 用多通道移液器迅速将 TMB 显色液 100 μL /孔加入上述微孔板中, 于室温避光温育 15 分钟。此步骤勿用封板膜密封。

(三) 终止

1. 取合适体积的终止液于加样槽中, 用多通道移液器迅速将终止液 50 μL /孔加入上述微孔板中。
备注: 加入顺序需同显色液加入顺序一致, 加样时吸头应悬空, 避免接触微孔板中溶液, 切勿产生气泡。
2. 终止后的微孔板于室温放置 5 分钟。

(四) 测读

1. 设定酶标仪波长 450 nm 和 620-650 nm (620-650 nm 区间内单一波长均可), 测定各孔 OD 值。测定时不可覆盖封板膜或盖子。
备注: 若酶标仪没有配备长波长时, 可以仅设定 450 nm 波长, 但是需确保微孔板孔底干净, 无指纹或刮痕。

四、结果计算与判断

(一) 结果计算:

1. 各孔 OD450 nm 数值需减去各自孔的长波长 OD 值。若酶标仪没有配备长波长时, 可以省去此步骤。
2. 各校准点和样品的 OD 值分别减去阴性对照的 OD 值后, 重复孔取均值。
3. 以校准点浓度值和 OD 值进行四参数拟合, 获得校准曲线方程。将样品的平均 OD 值带入方程计算得到样品浓度, 该浓度需乘以稀释倍数得到样品的实际浓度。
4. 标曲的拟合软件可以用酶标仪自带的软件。如无, 则建议采用专业的标曲制作软件, 如 Curve Expert, ELISA Calc 等。

(二) 结果判断:

1. 对于吸光度值超出校准品 ST1 的样品, 可用稀释液稀释适宜倍数后再行测定, 样品中 HCPs 抗原浓度值为稀释后测定值 \times 稀释倍数。若同时设置在该稀释度下的适宜加标样品, 回收率符合相应法规的方法学验证要求。

(三) 检测方法的局限性:

1. 本品仅适用于研究用途, 不用于临床诊断。
2. 本品仅适用于 HEK 293 和 HEK 293T 来源宿主细胞蛋白含量的检测。其他类型的 HEK 293 细胞系需要做适用性验证。
3. 样品 pH 值应在 6.0~8.5 间, 过低或过高的 pH 值可能会造成测量值异常。

(四) 性能参数:

1. 线性与校准范围: 6-540 ng/mL, 线性相关系数 $R^2 > 0.990$ 。
2. 最低定量限 LLOQ: 6 ng/mL。
3. 典型校准曲线如下图:

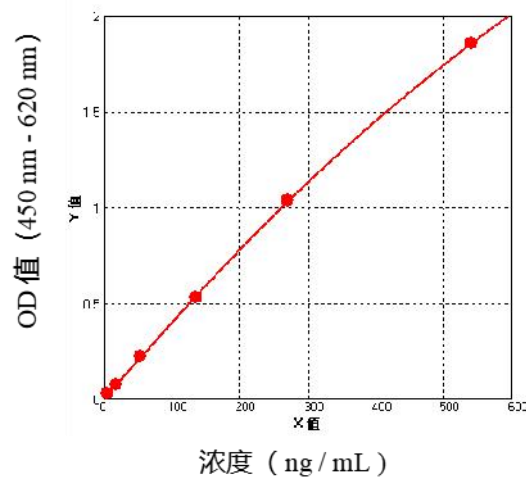


图 4 典型校准曲线

4. 特异性: 与 *E.coli*、毕赤酵母、Sf9、CHO、Vero 细胞蛋白无交叉反应。

■ 重要事项提醒

试剂盒使用人员需经过培训，合格后方可使用。为了获得满意的检测结果，请您务必事先留意如下几点事项：

- ◇ 所有的试剂配制务必使用无菌一次性的吸头、试管和加样槽等，切勿混用。避免微量移液器吸头连接部分的污染，建议每次实验前后用 75 %酒精擦拭。规范移液操作，严禁液体倒吸到移液器，或未去掉吸头时横放在桌上。
- ◇ 校准品和样品的稀释混匀要轻柔充分，勿产生大量泡沫。
- ◇ 终止液为酸性溶液，在使用中注意眼睛、面部、手和衣服的防护。
- ◇ 不同批次试剂盒不建议混用。
- ◇ 配制缓冲液所用水需为无菌水或新鲜制备的超纯水，水温不得超过 37 °C。
- ◇ 加样时将样品加于酶标板底部，尽量不接触孔壁。注意不要有气泡，可轻轻晃动混匀。在上机检测前若有气泡存在，需用干净的 10 μ L 吸头或针头等戳破，注意不要吸走孔内液体，导致结果误差大。
- ◇ 在孵育反应时需给酶标板覆膜，防止样品蒸发。
- ◇ 倒去缓冲液后应马上加后续溶液，勿让酶标孔处于干燥状态，以防影响试剂盒检测性能。
- ◇ 不用的酶标板条需用试剂盒附带的自封铝箔袋避光保存，以免被其他样品污染，导致试剂盒报废。
- ◇ 校准品配制、样品稀释等务必精确，配制时最小的取样量不要小于 5 μ L，防止结果出现较大的误差。
- ◇ HEK 293T HCP 酶标抗体（100 \times ）请在使用前快速离心，将管盖中残留的试剂甩到管底，防止试剂的污染和损失。
- ◇ 已稀释到工作浓度的校准品、酶标抗体等因无法保证其稳定性，不建议再次重复使用。
- ◇ 显色液应是无色透明液体。吸取时务必更换干净的吸头，防止 HRP 污染。如发现已有淡蓝色，请弃用。
- ◇ 确保加入终止液后 5-10 分钟再上机检测，结果更稳定，时间不超过 30 分钟。
- ◇ 由于叠氮钠能抑制 HRP 活性，对检测结果有很大影响，因此样品中不能添加叠氮钠。

■ 常见问题分析

若实验结果出现异常,请及时对未使用的酶标板和试剂进行妥善保管,对显色的酶标板实验结果拍照,保留实验原始数据。联系我司技术支持为您解决问题。以下常见的异常现象及解决方法供您参考:

问题描述	可能原因	解决方法
背景信号高	<ol style="list-style-type: none"> 1. 稀释所用的水污染了 HEK 293 HCPs; 2. 配液所用移液器、吸头、离心管等耗材污染了 HEK 293 HCPs; 3. 操作环境不洁净, ELISA 试验操作区域与 HEK 293 细胞培养、破碎区域混用; 4. 校准品复溶、稀释过程中造成污染; 5. 洗板操作不规范; 6. 洗板次数不够,加液量不足,浸泡时间不足; 7. 试剂错配。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 使用无菌或新制备的超纯水稀释; 2. 移液器应专用,并使用无菌带滤芯吸头; 3. 试验操作分区, ELISA 操作实验室应无 HEK 293 细胞培养、破碎等高浓度 HCPs 暴露的试验; 4. 校准品复溶、稀释应规范,瓶(管)口切勿触碰移液器外壁,造成管间交叉污染; 5. 手动洗板时移液器吸头应悬空,切勿触及管内液面; 6. 严格按照说明书推荐的加液量、洗板次数和浸泡时间,切勿随意更改; 7. HEK 293T HCP 酶标抗体(100×)使用时未稀释 100 倍或稀释错误。
读数后某些孔 OD 值异常偏高	<ol style="list-style-type: none"> 1. 手动洗板过程中,甩液不迅速,或反复多次甩板,造成孔间液体飞溅交叉污染; 2. 手动洗板后,纸巾上拍干时操作不当或未更换新纸巾; 3. 加样操作不当; 4. 温育时未覆盖封板膜; 5. 揭开封板膜时操作不当,导致孔内液体飞溅。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 手动洗板时,甩液应一次完成,快速彻底; 2. 板子拍干用的纸巾是一次性用品,不得重复使用。在纸巾上拍干时,每拍一次更换一个新位置或新纸张,勿使拍痕重叠;若残留液体造成纸巾湿透,应弃去旧纸巾,重新铺就多层纸巾,每洗板一次拍干 4-5 次为宜; 3. 加样应匀速加于微孔底部,防止加在孔壁上缘,飞溅造成邻近孔污染; 4. 微孔板孵育时应覆盖封板膜防止液体蒸发和污染杂物; 5. 揭开封板膜时,将微孔板平放在水平桌面上,用一只手的拇指和食指紧紧压在板子两侧防止移动,另一只手从一个角匀速揭开封板膜,过程中要始终保持板子不离开桌面,防止孔内液体飞溅。

■ 参考文献

- 《美国药典》<1132> 章节, “Residual Host Cell Protein Measurement in Biopharmaceuticals”。
- 《欧洲药典》2.6.34 章节, “HOST-CELL PROTEIN ASSAYS”。
- YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂 (盒)。

生效日期: 2023 年 06 月 30 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 0572-2165910