牛血清白蛋白（BSA）残留检测试剂盒

（酶联免疫吸附法）

说明书

货号：1401401

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/3

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 产品名称

牛血清白蛋白（BSA）残留检测试剂盒（酶联免疫吸附法）

■ 包装规格

96 测试/盒

■ 预期用途

本试剂盒适用于生物制品生产工艺流程中牛血清白蛋白（BSA）的残留检测。

该试剂盒仅供研究使用，不可用于诊断。

■ 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），采用双抗体夹心的技术原理检测样品中牛血清白蛋白（Bovine Serum Albumin, BSA）的残留量。该分析方法通过包被针对牛血清白蛋白抗体来捕获样品中的残留牛血清白蛋白，接着加入生物素标记的抗牛血清白蛋白抗体进一步孵育结合，随后加入 HRP（Horseradish Peroxidase，辣根过氧化物酶）标记的链霉亲和素，温育后洗涤；加入 TMB（3,3',5,5'-四甲基联苯胺）底物反应，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）。利用酶标仪在 450 nm 和 620-650 nm（620-650 nm 区间内单一波长均可）波长下测读吸光度，其吸光度与校准品和样品中的 BSA 浓度成正相关。通过剂量－反应曲线可计算得出样品中 BSA 的浓度。

该方法对样品无需特殊处理，通过实际样品的适用性验证，在合适的稀释比例进行检测。本试剂盒检测快速，专一性强，性能稳定可靠。

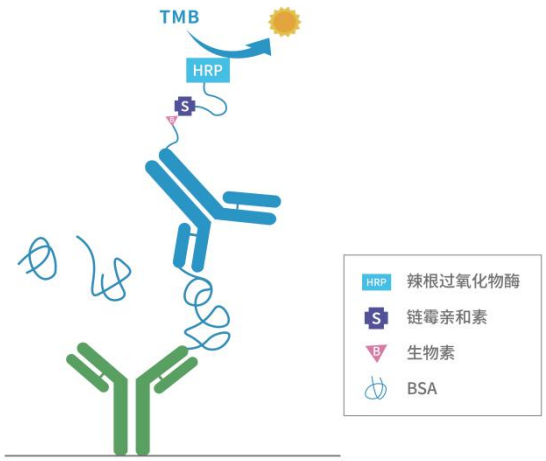


图 1. 检测原理示意图

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	规格	说明
BSA 校准品	PNB007	500 μL × 1 管	液体制剂，含已赋值的牛血清白蛋。具体信息见瓶身标注。
抗 BSA 预包被酶标板	PNA007	8 孔 × 12 条	已包被适量的绵羊抗牛血清白蛋白抗体，铝箔袋密封包装，含干燥
浓缩缓冲液（10×）	PNF001	25 mL × 2 瓶	低温时易产生结晶，使用前可在 37 ℃水浴中溶解后用新鲜制备的超纯水稀释 10 倍，即为 1×缓冲液，用于校准品、待检样品、检测抗体和 HRP 复合物的稀释以及洗板。
生物素偶联抗 BSA 抗体（100×）	PNG007	120 μL × 1 管	经生物素偶联的抗牛血清白蛋白的绵羊抗体，使用前用 1×缓冲液稀释 100 倍。应密封避光保存。
链霉亲和素 HRP 复合物（100×）	PNH002	140 μL × 1 管	HRP 偶联的链霉亲和素，使用前用 1×缓冲液稀释 100 倍。应密封避光保存。
TMB 显色液	PND005	12 mL × 1 瓶	使用前于室温平衡 20 分钟以上，应密封避光保存。
终止液	PNI002	6 mL × 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 ℃保存，有效期为 12 个月，具体详见试剂盒标签。

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 ℃条件经验证可以稳定保存 30 天。
BSA 校准品	校准品经验证在 2-8 ℃条件下可以稳定保存 1 年。

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 稀释用的无菌离心管
- 拍干酶标板的吸水纸
- 加样槽
- 移液器配套用枪头

■ 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）
- 单道和多道的微量移液器
- 漩涡振荡器
- 洗板机（可选）
- 恒温培养箱（可选）

■ 实验操作流程

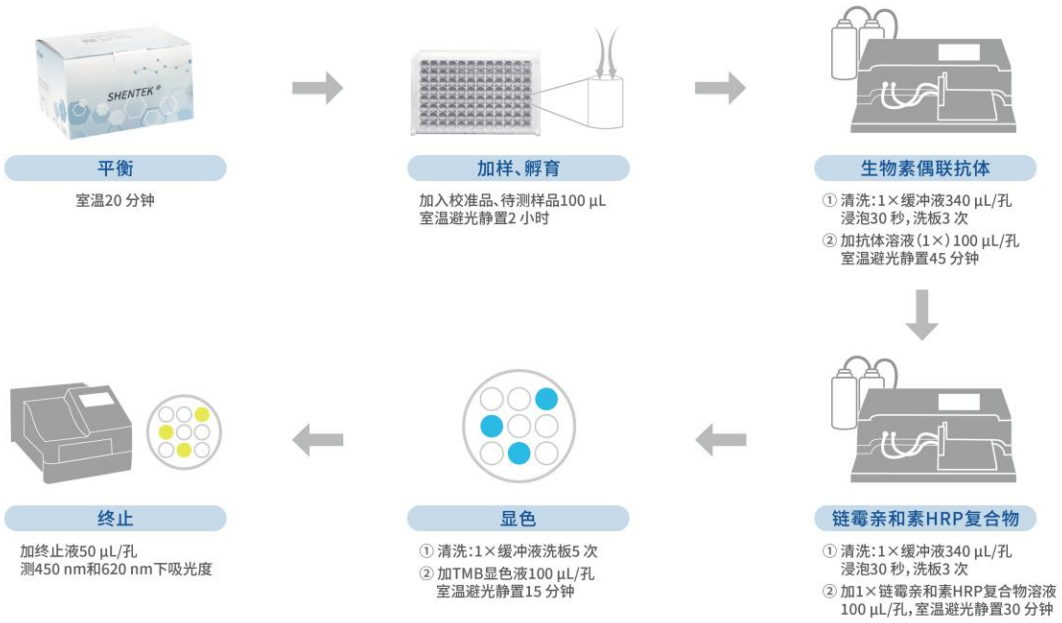


图 2. 操作流程示意图

一、试剂、仪器准备

（一）实验前准备

1. 将 BSA 校准品、抗 BSA 预包被酶标板取出，室温平衡 20 分钟。
2. 根据实验检测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铝箔袋中密封，放回试剂盒中，保存在 2-8 ℃冰箱，并于 30 天内使用完。
3. 其余试剂在使用前 20 分钟取出于室温平衡，使用后立即放回 2-8 ℃保存。

备注：室温指 25 ℃±3 ℃。

（二）试剂配制

1. 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。

   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 ℃温育直至完全溶解。
2. 1×生物素偶联抗 BSA 抗体配制：用 1×缓冲液于无菌离心管中将生物素偶联抗 BSA 抗体（100×）稀释 100 倍，用漩涡振荡器震荡混匀，即为 1×生物素偶联抗 BSA 抗体。配制合适体积，以保证加液时有充足的余量。

备注：将生物素偶联抗 BSA 抗体（100×）提前 20 分钟从 2-8 ℃取出，于室温平衡。

3. 链霉亲和素 HRP 复合物溶液配制：用 1×缓冲液将链霉亲和素 HRP 复合物（100×）稀释 100 倍，用漩涡振荡器震荡混匀，即为 1×链霉亲和素 HRP 复合物溶液。配制合适体积，以保证加液时有充足的余量。
4. 校准品标曲稀释：用 1×缓冲液稀释 BSA 校准品，建议现配现用。

图 3. 校准品稀释操作示例

表 3. 系列校准品梯度稀释

校准曲样品	加样	浓度(ng/mL)
ST1	将校准品原液用 1×缓冲液稀释到 ST1 浓度	32
ST2	500 μL ST1 溶液 ＋500 μL 1×缓冲液	16
ST3	500 μL ST2 溶液 ＋500 μL 1×缓冲液	8
ST4	500 μL ST3 溶液 ＋500 μL 1×缓冲液	4
ST5	500 μL ST4 溶液 ＋500 μL 1×缓冲液	2
ST6	500 μL ST5 溶液 ＋500 μL1×缓冲液	1
NCS (阴性对照)	1×缓冲液	0

二、样品准备

- 样品：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 ℃以下环境中，且不宜反复冻融。
- 处理：预估待测样品中所含的牛血清白蛋白浓度，用 1×缓冲液稀释适当倍数，使其检测值落入标曲定量范围之中。
- 对初次使用或 BSA 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. 单通道移液器配合无菌滤芯吸头准确移取 100 μL 系列校准品溶液及 BSA 样品稀释液（NCS）加入相应微孔板中，溶液加入孔底部，操作时避免产生气泡，每个浓度做 3 个平行复孔，并记录各浓度孔所在位置。
2. 将处理好的待测样品按同样操作加入相应微孔板中。加样后将微孔板用封板膜密封，于室温水平静置，孵育 2 小时。
3. 实际检测时可根据样品数量，参照表 4 示例进行 96 孔板排版加样。

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									
E	ST4	ST4	ST4		S1+SRC	S1+SRC	S1+SRC					
F	ST3	ST3	ST3		S2+SRC	S2+SRC	S2+SRC					
G	ST2	ST2	ST2		S3+SRC	S3+SRC	S3+SRC					
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）。每个检测做 3 个重复孔。

✧ 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。

（二）生物素偶联抗体孵育

1. 倒去反应液，用 1×缓冲液洗板，340 μL/孔，浸泡 30 秒，迅速甩掉液体，于纸巾上拍干。如此洗板 3 次。洗板后的微孔板应立即进行后续操作，不可放置，期间避免微孔板干燥。
2. 取 1×生物素偶联抗 BSA 抗体溶液倒入加样槽中，用多通道移液器配合无菌滤芯吸头快速将抗体溶液 100 μL/孔加入上述微孔板孔底部，勿引入气泡。封板膜密封后，于室温避光反应 45 分钟。

（三）链霉亲和素 HRP 复合物孵育

1. 将上述微孔板用 1×缓冲液，340 μL/孔，浸泡 30 秒，洗板 3 次，于纸巾上拍干后，立即进行以下操作，避免干燥。
2. 取 1×链霉亲和素 HRP 复合物溶液倒入加样槽中，用多通道移液器配合无菌滤芯吸头快速将溶液 100 μL/孔加入上述微孔板孔底部，勿引入气泡。封板膜密封后，于室温避光温育 30 分钟。

（四）显色

1. 提前 20 分钟将 TMB 显色液置于室温避光条件下平衡。
2. 将上述板子用 1×缓冲液，340 μL/孔，浸泡 30 秒，洗板 5 次，于纸巾上拍干后，立即进行以下操作，避免干燥。
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。

（五）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，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。

（六）测读

1. 设定酶标仪波长 450 nm 和 620-650 nm（620-650 nm 区间内单一长波长均可），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，可以省去此步骤。

四、结果计算与判断

（一）结果计算

1. 各孔 $OD_{450\,nm}$ 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，但是需确保孔底干净，无指纹或刮痕。
2. 各校准点的 $OD_{450\,nm}$ 值减去 NCS（BSA 样品稀释液对应的 $OD_{450\,nm}$ 均值）后，将 3 个重复孔取均值，以浓度值和 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中 BSA 的浓度。该浓度需乘以稀释倍数得到样品中 BSA 的实际浓度。

3. 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

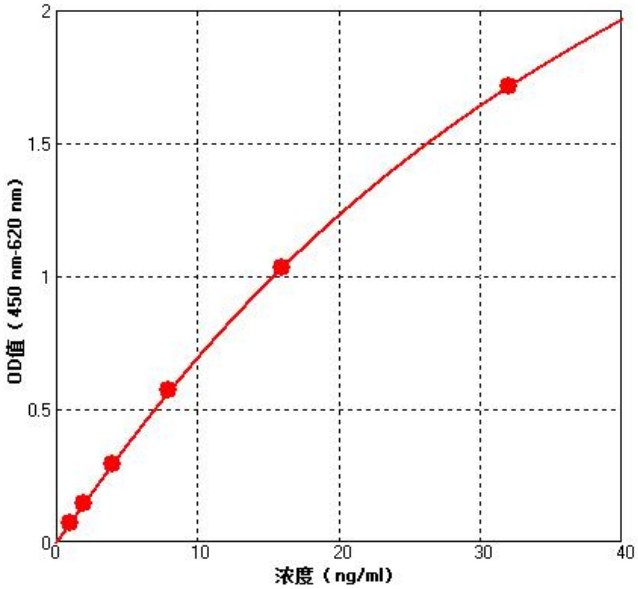
1. 对于吸光度值超出校准品 ST1 的样品，可用 1×缓冲液稀释适宜倍数后再测定，样品中牛血清白蛋白浓度值为稀释后测定值×稀释倍数。该稀释度下设置的适宜加标样品，其回收率符合相应法规的方法学验证要求。

（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. 样品 pH 应保证在 6.0-8.0 之间，过低或过高的 pH 可能会造成测量值异常。

（四）性能参数

1. 线性范围：1-32 ng/mL，线性相关系数 $R^2 \geq 0.990$。
2. QL：1 ng/mL。
3. 典型校准曲线如下图：



4. 精密性：批内变异系数不高于 15%，批间变异系数不高于 20%。
5. 专属性：与 293T、MDCK、CHO、BL21、Vero 等宿主蛋白交叉反应率小于 0.1%。

■ 重要事项提醒

试剂盒的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滤芯吸头、试管和加样槽等，切勿重复使用。避免微量移液器与吸头连接部分的污染，建议每次实验前后用 75%酒精擦拭移液器。规范移液操作，严禁液体倒吸至移液器中，或未去掉吸头时横放在试验台上。
- ✧ 确保整个操作过程在无外源 BSA 污染的环境中进行。
- ✧ 加样（包括标曲）时建议遵守先低后高的原则，先加低浓度样品，后加高浓度样品。标曲加完后，建议更换手套后再进行样品的添加。
- ✧ 所有洗涤加液步骤都必须悬空加液，严禁加液过程中吸头和微孔板接触。
- ✧ 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。
- ✧ 不建议混用其他试剂盒内的试剂。同批次的除外。
- ✧ 配制缓冲液所用水需为无菌水或新制备的超纯水，水温不得超过 37 ℃。
- ✧ 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 μL 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。
- ✧ 未使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 μL，防止结果出现较大的误差。
- ✧ 生物素偶联抗 BSA 抗体（100×）和链霉亲和素 HRP 复合物（100×）试剂请在用前进行快速离心，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、生物素偶联抗 BSA 抗体、链霉亲和素 HRP 复合物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。
- ✧ 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。
- ✧ 若采用洗板机洗板，则建议加入标曲样品后第一次洗板仍手洗，防止孔中的 BSA 污染洗板机吸头。

■ 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	1. 稀释所用的水污染； 2. 配液所用移液器、吸头、离心管等耗材污染； 3. 操作环境不洁净； 4. 牛血清白蛋白校准品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。	1. 使用无菌或新制备的超纯水稀释缓冲液； 2. 移液器应专用，并使用无菌带滤芯吸头； 3. 试验操作分区； 4. 校准品稀释操作应规范，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. 生物素偶联抗 BSA 抗体（100×）或者链霉亲和素 HRP 复合物（100×）使用时正确稀释 100 倍。
读数后某些孔 OD 值异常偏高	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。	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板孔底部，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，另一只手从一个角开始匀速揭开封板膜，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

- 《中国药典》 0232 生物制品生产用原材料及辅料质量控制

修订日期：2025 年 09 月 25 日

生效日期：2025 年 10 月 09 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：400-878-2189