

ExCell Bio

ResiQuant[®] CHO HCP 残留检测试剂盒 2G (ELISA 法) 说明书

本品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗

货 号

CRH00-3021S

CRH00-3021

CRH00-3022



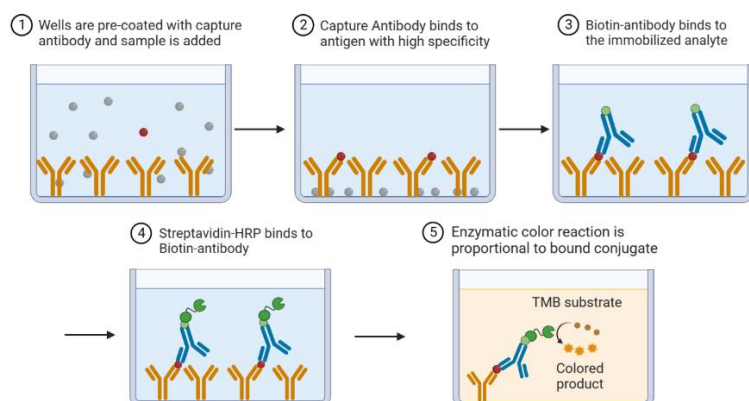
| 产品概述

与原核细胞、酵母细胞以及昆虫细胞相比，中国仓鼠卵巢细胞（CHO）作为宿主细胞表达的外源蛋白最接近其天然构象，因而 CHO 细胞表达系统是生物工程制药最为理想的表达系统。在 CHO 细胞中表达治疗性蛋白对于商业化的药物生产十分经济方便，但是这类产品的生产以及纯化过程有可能会带来宿主细胞蛋白（CHO HCP）残留的污染，这些残留的蛋白污染会降低药物治疗效果，造成副作用或者免疫反应，因此要对 CHO HCP 的残留量进行控制。本产品是一种双抗夹心 ELISA 试剂盒，所使用的抗体来自兔和羊的混合抗体，抗原为 CHO 细胞的发酵上清收集液（细胞培养基不含蛋白）。本产品可用于多种 CHO 宿主细胞表达产物的纯化工艺开发、过程控制、成品放行等。

首次使用本试剂盒前建议先完成产品的适用性研究，确认样本基质是否存在干扰以及合适的样本检测稀释条件。

| 产品原理

本实验采用双抗体夹心 ELISA 法。抗 CHO HCP 抗体已包被于酶标板上，加入校准品和待测样本，校准品和样本中的 CHO HCP 会与包被于酶标板上的抗体结合，形成免疫复合物，通过洗板，游离的成分被洗去；加入生物素标记的抗 CHO HCP 抗体，生物素标记的抗 CHO HCP 抗体与酶标板上结合的校准品或样本中的 CHO HCP 结合形成免疫复合物，通过洗板，游离的成分被洗去；加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素，链霉亲和素与生物素特异性结合，通过洗板，游离的成分被洗去。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）。通过酶标仪测定与 OD_{450} 值，CHO HCP 浓度与 OD_{450} 值之间呈正相关，可通过试剂盒内的校准品生成的校准曲线计算出样本中 CHO HCP 浓度。



产品性能

1. 灵敏度：CHO HCP检测下限（LOD）为0.5 ng/mL，定量下限：0.8 ng/mL；
2. 精密性：定量限范围内板内、板间样本浓度变异系数均<20%；
3. 专属性：*E. coli*, 293T, Vero等细胞上清以及非CHO表达的IgG测定CHO HCP浓度均低于检测下限。

产品应用

本产品是通用型检测试剂盒，用于定量检测样本中 CHO HCP 浓度。

产品规格

货号	品名	规格
CRH00-3021S	ResiQuant [®] CHO HCP 残留检测试剂盒 2G（ELISA 法）	48T
CRH00-3021	ResiQuant [®] CHO HCP 残留检测试剂盒 2G（ELISA 法）	48T
CRH00-3022	ResiQuant [®] CHO HCP 残留检测试剂盒 2G（ELISA 法）	96T

名称	96 Tests	48 Tests	保存条件
CHO HCP Standard	3	2	2-8℃
CHO HCP 2G Microplate	8× 12	8× 6	2-8℃
CHO HCP 2G 100× Biotin-Antibody	60 µL	30 µL	2-8℃
100× Streptavidin-HRP	120 µL	60 µL	2-8℃
CHO HCP Assay Diluent	2× 25 mL	25 mL	2-8℃
20× Wash Buffer Concentrate	30 mL	30 mL	2-8℃
Substrate Solution	12 mL	6 mL	2-8℃ (Light-Sensitive)
Stop Solution	12 mL	12 mL	2-8℃
Plate Sealer	3	2	/

| 实验流程

一、试验所需自备试验器材

1. 酶标仪（检测波长450 nm，参考波长570 nm或630 nm）；
2. 高精度加液器及一次性吸头：0.5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL；
3. 微孔板振荡器；
4. 去离子水。

二、样本收集

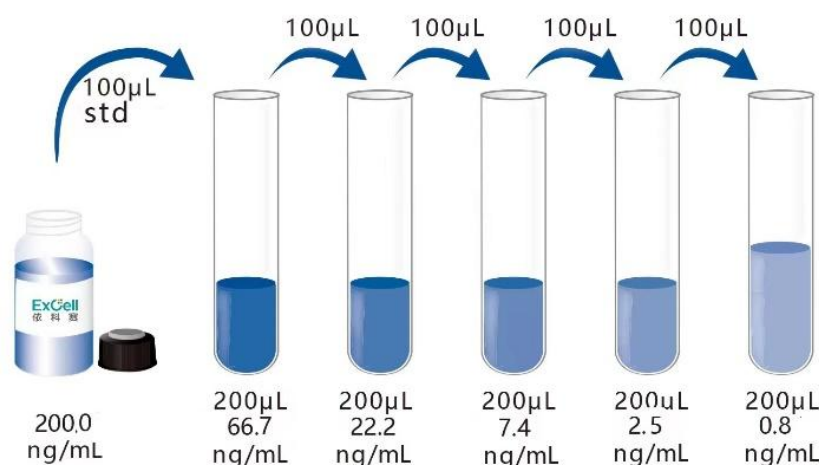
1. 样本应澄清，沉淀应离心去除；
2. 可根据样本的实际情况，用CHO HCP Assay Diluent做适当稀释（建议首次使用先行完成适用性研究，确定样本稀释倍数）。

三、检测前准备工作

1. 建议提前20分钟从冰箱中取出试剂盒，以平衡至室温；
2. 将20× Wash Buffer Concentrate用去离子水稀释成洗涤工作液，未用完的保存在2-8℃冰箱；

- 校准品：根据CHO HCP Standard标识含量加入合适CHO HCP Assay Diluent将校准品稀释至200.0 ng/mL，振荡混匀，静置15分钟，待其充分溶解后，再进行3倍稀释，形成如下浓度的校准点：200.0、66.7、22.2、7.4、2.5、0.8、0 ng/mL；

校准品稀释图例：



【注意事项】：复溶校准品原液（200.0 ng/mL）若未用完应放入-18℃及以下冰箱内保存，可保存两个月，已稀释的校准品请废弃。

- 生物素化抗体工作液：按当次试验所需用量，用CHO HCP Assay Diluent将CHO HCP 2G 100× Biotin-Antibody稀释100倍，配制成生物素化抗体工作液，使用前30分钟准备，仅供当日使用；
- 酶结合物工作液：按当次试验所需用量，用CHO HCP Assay Diluent将100× Streptavidin-HRP稀释100倍，配制成酶结合物工作液，使用前30分钟准备，仅供当日使用。

四、洗涤方法

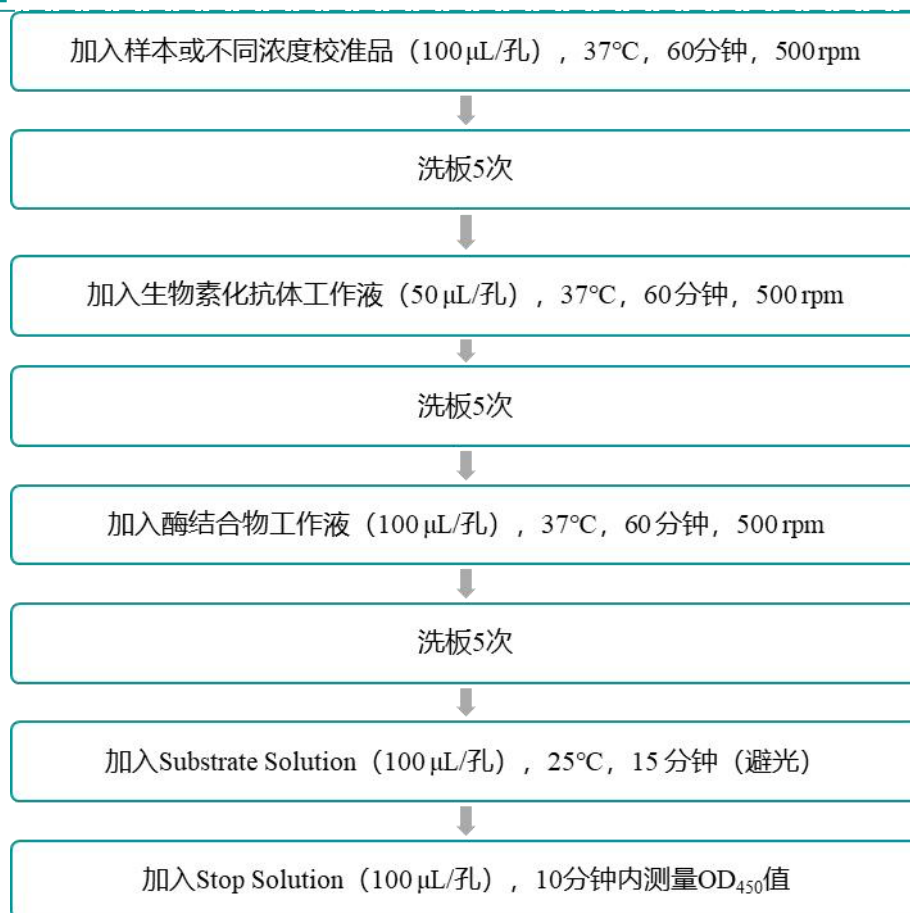
- 手动洗板：每孔加洗涤工作液300 μL，静置10秒后甩尽孔内液体，在吸水纸上拍干，洗板5次；
- 自动洗板机：要求注入的洗涤液为300 μL，注入与吸出间隔10秒，洗板5次。

五、操作步骤

- 从已平衡至室温的密封袋中取出试验所需板条，未用的板条和干燥剂放回铝箔袋内封存于2-8℃冰箱；
- 留空白孔（若使用双波长读板，空白孔可以不设）；
- 提前准备好样本、校准品；

4. 将不同浓度校准品或样本分别加入相应孔中，**100 μ L/孔**，用封板胶纸封住反应孔。**37℃振荡孵育60分钟**，使用微孔振荡器（500 rpm）；
5. 提前准备好生物素化抗体工作液；
6. 甩尽孔内液体，洗板5次；
7. 除空白孔外，加入生物素化抗体工作液**50 μ L/孔**，用封板胶纸封住反应孔。**37℃振荡孵育60分钟**，使用微孔振荡器（500 rpm）；
8. 提前准备好酶结合物工作液；
9. 甩尽孔内液体，洗板5次；
10. 除空白孔外，加入酶结合物工作液**100 μ L/孔**，用封板胶纸封住反应孔。**37℃振荡孵育60分钟**，使用微孔振荡器（500 rpm）；
11. 甩尽孔内液体，洗板5次；
12. 加入Substrate Solution（包括空白孔）**100 μ L/孔**，**25℃**，避光孵育**15分钟**；
13. 加入Stop Solution（包括空白孔）**100 μ L/孔**，混匀后立即用酶标仪测量OD₄₅₀值（酶标仪设置双波长，检测波长450 nm，参考波长570 nm或630 nm；若酶标仪只能设置单波长读数，则每个校准品和样本的OD值应减去空白孔的OD值）。

六、操作流程图

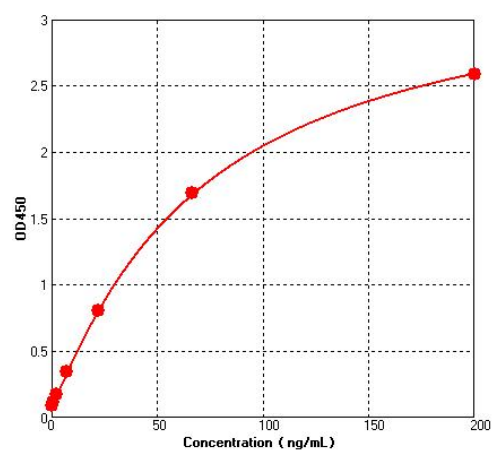


| 结果分析

1. 校准曲线制作：以校准品浓度作横坐标，OD值作纵坐标，通过软件拟合选取最佳标准曲线（推荐使用四参数拟合方程），根据样本OD值计算样品浓度；
2. 校准曲线的 $R^2 \geq 0.99$ ，去除明显异常值之后，定量范围内的校准曲线各点的回算浓度与理论浓度的偏差应在 $\pm 20\%$ 以内，定量上限和下限两点的偏差在 $\pm 25\%$ 以内；
3. 若样本OD值高于校准曲线上限，应适当稀释后重新检测，最后计算浓度时应乘以稀释倍数；
4. 样本浓度的计算应使用当次实验校准曲线。

示例数据：

Standard (ng/mL)	OD ₄₅₀₋₆₃₀			浓度 (ng/mL)		
	1	2	3	1	2	3
200.0	2.670	2.473	2.628	226.5	168.7	211.8
66.7	1.834	1.683	1.552	78.4	66.4	57.5
22.2	0.839	0.823	0.745	23.3	22.7	20.0
7.4	0.380	0.326	0.338	8.5	6.9	7.3
2.5	0.172	0.176	0.173	2.5	2.7	2.6
0.8	0.109	0.119	0.112	0.6	0.9	0.7
0.0	0.089	0.086	0.085	/	/	/
r^2	0.99998					



【注意事项】：示例数据仅供参考，数据分析使用 ELISACalc 软件进行四参数拟合。

| 备注

1. 试剂盒使用前请保存在2-8℃，复溶校准品原液若未用完应放入-18℃及以下冰箱内保存；
2. 浓缩生物素化抗体，浓缩酶结合物体积小，运输中颠簸和可能的倒置，会使液体沾到管壁或瓶盖，因此使用前请瞬时离心，以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底；
3. 从冰箱取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属正常现象，加热至37℃使结晶完全溶解后再配制洗涤工作液；
4. 不同批号的试剂盒组份避免混用；
5. 溶液配制需注意充分混匀，以保证加入到孔内的液体是均一的；
6. 酶免试验中校准品和样本建议至少做两重复。

| 免责声明

1. 产品应按照说明书指导使用，实验者未按说明书指导操作，本公司不对由此导致的产品性能偏离承担责任；
2. 产品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。