

ExCell Bio

ResiQuant[®] CHO HCP 残留检测试剂盒- FAST (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

User Manual

Catalog Number CRH00-3051S
CRH00-3051
CRH00-3052



产品概述

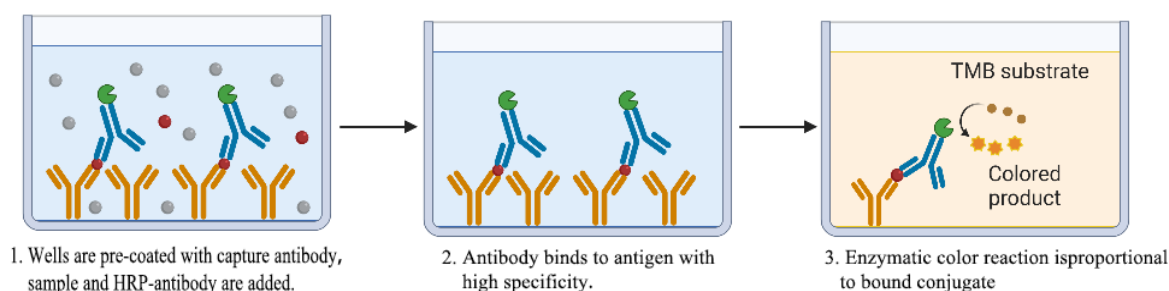
与原核细胞、酵母细胞以及昆虫细胞相比，中国仓鼠卵巢细胞（CHO）作为宿主细胞表达的外源蛋白最接近其天然构象，因而 CHO 细胞表达系统是生物工程制药最为理想的表达系统。在 CHO 细胞中表达治疗性蛋白对于商业化的药物生产十分经济方便，但是这类产品的生产以及纯化过程有可能会带来 CHO 宿主细胞蛋白（CHO HCP）残留的污染，这些残留的蛋白污染会降低药物治疗效果，造成副作用或者免疫反应，因此要对 CHO HCP 的残留量进行控制。《中华人民共和国药典》2020 年版三部建议 HCP 采用酶联免疫吸附测定（ELISA）方法检测。本产品是一种双抗夹心 ELISA 试剂盒，所使用的抗体来自兔和羊的混合抗体，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，向酶标板中同时加入校准品（或待测样品）和 HRP（Horseradish Peroxidase，辣根过氧化物酶）标记的抗 CHO HCP 抗体，孵育过程中，校准品和样本中的 CHO HCP 会与包被于酶标板上的抗体以及 HRP 标记的抗 CHO HCP 抗体形成免疫复合物，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 450 nm OD 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标本中 CHO HCP 浓度。

检测原理示意图：



I 产品性能

1. 灵敏度: CHO HCP 检测下限 (LOD) 不高于 0.5 ng/mL, 定量下限: 1.0 ng/mL;
2. 精密度: 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 表达的人源 IgG 样本中测定的 CHO HCP 浓度均低于检测下限。

I 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。

I 产品规格

货号	品名	规格
CRH00-3051S	ResiQuant® CHO HCP 残留检测试剂盒-FAST (ELISA 法)	48T
CRH00-3051	ResiQuant® CHO HCP 残留检测试剂盒-FAST (ELISA 法)	48T
CRH00-3052	ResiQuant® CHO HCP 残留检测试剂盒-FAST (ELISA 法)	96T

I 产品组分及储存条件

名称	96 Tests	48 Tests	保存条件
CHO HCP Standard Standards at 250, 100, 40, 16, 6.4, 2.6, 1 and 0 ng/mL, 1 mL/vial	8 支	8 支	2-8℃
CHO HCP 2G Microplate	8× 12	8× 6	2-8℃
100× CHO HCP HRP-Antibody	60 µL	30 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 (H)	12 mL	6 mL	2-8℃ (Light-Sensitive)
Stop Solution	12 mL	12 mL	2-8℃
Plate Sealer	2	1	/
User Manual	1	1	/

I 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，校正波长630 nm或570 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，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，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 \times Wash Buffer Concentrate 用去离子水稀释成洗涤工作液，未用完的放回冰箱；
3. CHO HCP HRP-Antibody 工作液：按当次试验所需用量，用 CHO HCP Assay Diluent 将 100 \times CHO HCP HRP-Antibody 稀释 100 倍，配制成 CHO HCP HRP-Antibody 工作液，使用前 30 分钟准备，仅供当日使用。

四、洗涤方法

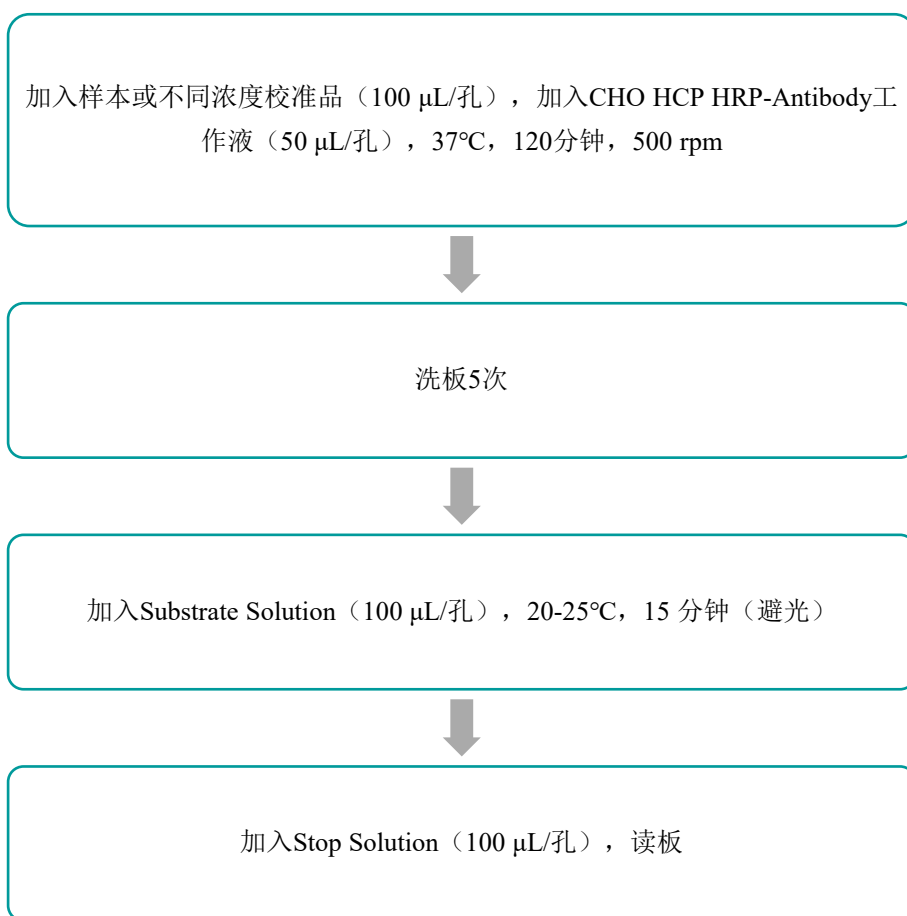
1. 手动洗板：每孔加洗涤工作液300 μL ，静置10秒后甩尽孔内液体，在吸水纸上拍干，洗板5次；
2. 自动洗板机：要求注入的洗涤液为300 μL ，注入与吸出间隔20-30秒。

五、操作步骤

1. 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 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱；
2. 留空白孔（若使用双波长读板，空白孔可以不设）；
3. 提前准备好样本及样本加标；
4. 向CHO HCP 2G Microplate中分别加入不同浓度校准品或样本，**100 μL /孔**，随后加入CHO HCP HRP-Antibody工作液，**50 μL /孔**，用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育**120分钟**，使用微量振荡器（500 rpm）；

5. 甩尽孔内液体，洗板5次；
6. 加入Substrate Solution（包括空白孔）100 μ L/孔，20-25 $^{\circ}$ C，避光孵育15分钟；
7. 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 630 nm 或 570 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

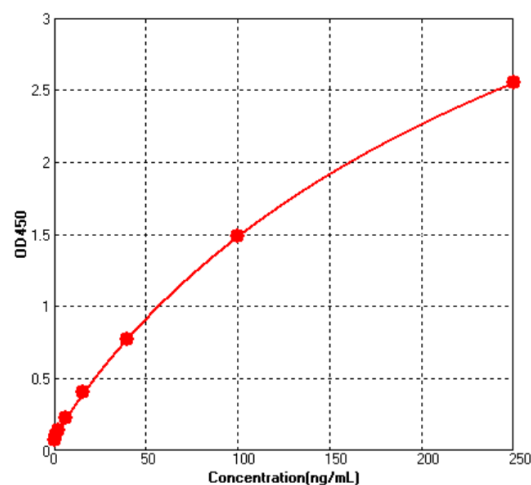


I 结果分析

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，校准曲线各点的回算浓度与理论浓度的偏差应在 20%以内，定量上、下限的偏差在 25%以内；
3. 样本浓度的计算应使用当次实验校准曲线；
4. 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。

示例数据：

Standard (ng/mL)	OD ₄₅₀₋₆₃₀		浓度 (ng/mL)		
	1	2	1	2	Average
250	2.606	2.493	261.0	239.2	250.1
100	1.515	1.465	102.9	97.8	100.3
40	0.780	0.770	40.0	39.3	39.6
16	0.407	0.399	16.3	15.9	16.1
6.4	0.217	0.231	6.2	6.9	6.6
2.6	0.140	0.143	2.6	2.7	2.6
1.0	0.104	0.104	1.0	1.0	1.0
0	0.076	0.074	-----	-----	-----
r^2	0.99999				



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

I 备注

1. 试剂盒使用前请保存在2-8℃。除复溶后的校准品，其他成分不可冻结；
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液；
4. 若需分次使用校准品，在其复溶后应按每次用量分装，将其放在-18℃及以下储存，避免反复冻融；
5. 不同批号的试剂盒组份避免混用；
6. 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；
7. 酶免试验中校准品和样本建议至少做两重复。

I 免责声明

1. 试剂盒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试剂盒性能偏离承担责任；
2. 本试剂盒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。