

蛋白 A (Protein A) ELISA 检测试剂盒说明书
Cat.No. HG-PA001

目录

1. 产品简介.....	3
2. 应用.....	3
3. 试剂盒规格.....	3
4. 试剂盒组分.....	4
5. 储存条件及有效期.....	5
6. 定义或术语.....	5
7. 需要准备的试剂、耗材与设备.....	5
8. 操作步骤.....	6
9. 结果分析.....	9
10. 注意事项.....	11
11. 故障排除.....	12
12. 参考文献.....	16
13. 联系方式.....	16
14. 买方须知.....	16

1. 产品简介

本试剂盒采用双抗夹心法，用捕获抗体包被 96 孔酶标板，制成固相抗体，随后加入标准品和检测样品，再加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的酶标抗体，形成一个固相抗体 - 蛋白 A- 酶标抗体的三明治结合物，反应结束后洗涤，然后加入底物进行显色反应，底物在 HRP 的催化下由无色转变成蓝色，并在终止液的作用下转变成最终的黄色。在 450nm 和 630nm 波长下测定其吸光度值（OD 值），其中 630nm 为校正波长。OD 值与样品中的蛋白 A 含量呈正相关。

检测范围：5.12 pg/mL- 500 pg/mL

定量限：5.12 pg/mL

准确度：80% - 120%

2. 应用

适用于生物制品纯化工艺过程的优化、中间工艺过程的杂质控制以及终产品的放行检测。

3. 试剂盒规格

产品名称	产品货号	产品规格	有效期
蛋白 A (Protein A) ELISA 检测试剂盒	HG-PA001	96T	12 个月

4. 试剂盒组分

组分	规格	配制	存储条件
包被酶标板 Coated Plate	8 孔 × 12 条	即用型	2~8°C
标准品 1 Standard 1 (50 ng/mL) -适用于 MabSelect SuRe 配基	300 μL × 1 管	适用于 MabSelect SuRe 配基	
标准品 2 Standard 2 (50 ng/mL) -适用于 MabSelect Prisma 配基	300 μL × 1 管	适用于 MabSelect Prisma 配基	
标准品 3 Standard 3 (50 ng/mL) -重组 Protein A (楚 天微球)	300 μL × 1 管	重组 Protein A (楚天微球)	
标准品 4 Standard 4 (50 ng/mL) -MaXtar® ARPA ligand Protein A (百林科 Bio-Link)	300 μL × 1 管	MaXtar® ARPA ligand ProteinA (百林科 Bio- Link)	
酶标抗体 Enzyme-labelled Antibody	15 mL×1 瓶	即用型	

组分	规格	配制	存储条件
样品稀释液 Dilution Buffer (20×)	30 mL×1 瓶	用去离子水进行 20 倍稀释	
洗液 Wash Buffer (20×)	30 mL×1 瓶	用去离子水进行 20 倍稀释	
显色液 A TMB Substrate A	8 mL×1 瓶	即用型	
显色液 B TMB Substrate B	8 mL×1 瓶	即用型	
终止液 Stop Solution	15 mL×1 瓶	即用型	
封板膜	5 张	/	
说明书	1 份	/	

5. 储存条件及有效期

未开封试剂盒于 2~8°C 下保存，有效期为 12 个月；开封后，建议在 1 个月内使用。

6. 定义或术语

- OD：吸光度。
- CV (Coefficient of Variation)：变异系数，定义为标准差与平均系数的比值。
- ERC：加标质控。

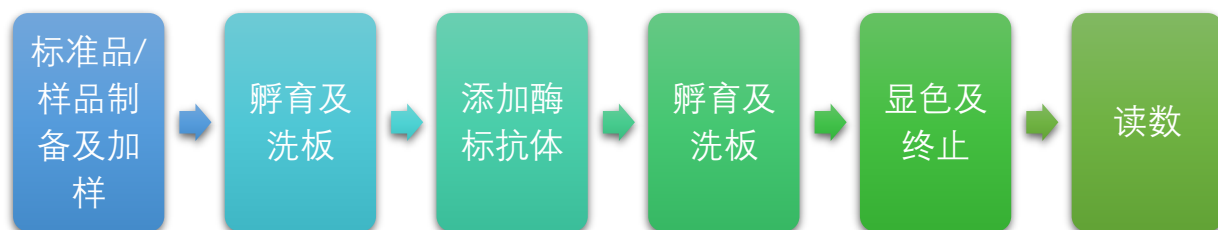
7. 需要准备的试剂、耗材与设备

- 酶标仪
- 微孔板恒温振荡器
- 涡旋振荡器
- 去离子水

- 吸水纸
- 微量移液器及吸头

8. 操作步骤

8.1. 检测流程图



总时长约 2 小时 50 分钟

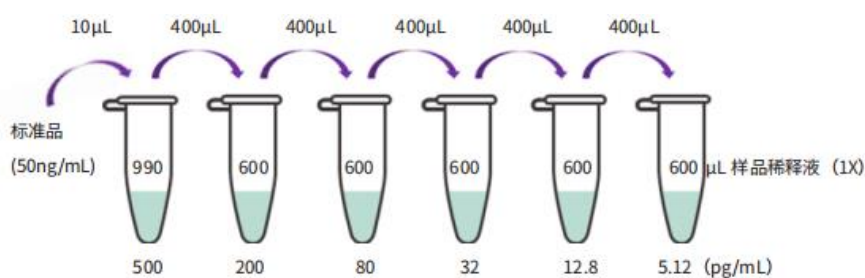
8.2. 准备工作

8.2.1. 使用前所有试剂组分以及待测样本需要恢复室温（18~25°C）。试剂盒开启时要标注开启日期，优先使用先开启的试剂盒，同一批号试剂盒可以混用，不同批号试剂盒不可混用。准备本次实验所需要的检测板条，试剂盒中其它的板条，放回密封袋密封，于 2~8°C 保存，以备下次使用。

8.2.2. 1×样品稀释液配制：将 20×样品稀释液平衡至室温（18~25°C）。混匀后根据用量，取适量用去离子水按 1:19 的比例，将 20×样品稀释液稀释 20 倍，最终得到 1×样品稀释液。

8.2.3. 1×洗液配制：将 20×Wash Buffer 平衡至室温（18~25°C），不要有结晶。混匀后根据用量，取适量用去离子水按 1:19 的比例，将 20×Wash Buffer 稀释 20 倍，最终得到 1×洗液。如果 20×Wash Buffer 中出现结晶，在 37°C 的水浴锅中温浴，直至结晶完全消失。

8.3. 标准曲线的准备：试剂盒中放置不同类型的 Protein A 标准品，请根据所使用的 Protein A 亲和树脂类型选择对应的标准品建立标准曲线。若无法获得对应的 Protein A 配基，对于重组型树脂，可使用本试剂盒中的重组 Protein A（楚天微球）建立标准曲线；对于耐碱型树脂，可使用本试剂盒中适用于 MabSelect SuRe 配基的标准品建立标准曲线。稀释过程：用样品稀释液（1×）将标准品（50 ng/mL）稀释至 500 pg/mL，然后 2.5 倍倍比稀释配制标准品，如下图。



8.4. 供试品溶液配制：根据预期的实验结果，用样品稀释液（1×）将供试品稀释到标准曲线范围内，混匀。

8.5. 加标质控溶液配制：取供试品溶液 120 µL，加入 120 µL 的 80 pg/mL 标准品，混匀，即得。

8.6. 样品孵育：每孔加入 100 µL 标准品、供试品溶液、加标质控至相应孔中。用封板膜封板后，37°C、500rpm/分钟振荡孵育 1 小时。（注意：孵育过程中，如果不封板或者封板不完全，会导致反应液蒸发，导致实验出现误差）

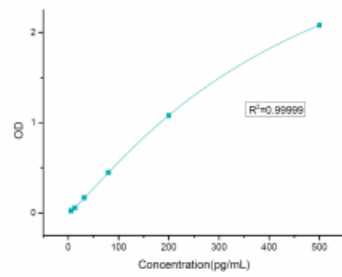
- 8.7. 洗板：孵育完成后，小心揭去封板膜，弃去孔中液体，用洗液（1×）洗板，250 μ L/孔，拍干孔中的残留液体，重复 3 次。（注意：如采用手洗板，加洗液（1×）时需要悬空加液，枪头最好不要碰到孔内壁；每次加入洗液（1×）后静置 1 分钟并轻微震荡；拍干时注意每次换新的吸水纸或在纸上干净的区域拍干。）
- 8.8. 酶标抗体孵育：每孔加入 100 μ L 酶标抗体。用封板膜封板后，37°C、500rpm/分钟振荡孵育 1 小时。
- 8.9. 洗板：孵育完成后，小心揭去封板膜，弃去孔中液体，用洗液（1×）洗板，250 μ L/孔，拍干孔中的残留液体，重复 3 次。
- 8.10. 显色液配制：将显色液 A、显色液 B 等体积混合，混匀后避光放置。（注：不能放置太久，一般使用前 10 分钟配制。如混合后显色液已经变蓝，请勿使用）。
- 8.11. 显色：每孔分别加 100 μ L 显色液，轻微振荡混匀后用封板膜封板，置 37°C 避光孵育 15 分钟。
- 8.12. 终止：加入 100 μ L/孔终止液至酶标板中，轻轻震动酶标板至显色均匀。
- 8.13. 读数：在 20 分钟内，用酶标仪于 450 nm 检测波长、630nm 参比波长下读取吸光度。

9. 结果分析

- 9.1. 以标准品的吸光度为纵坐标，浓度为横坐标，采用四参数拟合方式对标准曲线进行拟合。以下为对应配基的标曲检测值及示意图：

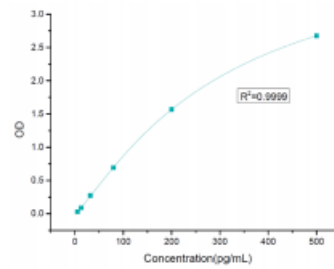
9.1.1. 适用于 MabSelect SuRe 配基标准品的标准曲线

标准品浓度 (pg/mL)	OD 值 (OD450-630)
500	2.1017
200	1.1002
80	0.4673
32	0.1866
12.80	0.076
5.12	0.0418
0	0.0195



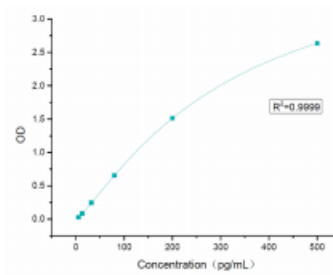
9.1.2. 适用于 MabSelect PrismaA 配基标准品的标准曲线

标准品浓度 (pg/mL)	OD 值 (OD450-630)
500	2.6965
200	1.5900
80	0.7125
32	0.2939
12.80	0.1094
5.12	0.0506
0	0.0186



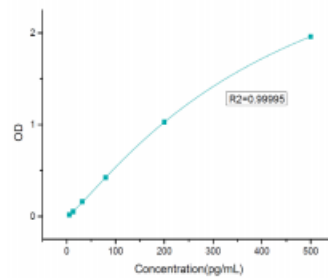
9.1.3. 重组 Protein A (楚天微球) 的标准曲线

标准品浓度 (pg/mL)	OD 值 (OD450-630)
500	2.6550
200	1.5322
80	0.6735
32	0.2652
12.80	0.1043
5.12	0.0455
0	0.0165



9.1.4. MaXtar® ARPA ligand Protein A (百林科 Bio-Link) 的标准曲线

标准品浓度 (pg/mL)	OD 值 (OD450-630)
500	1.9799
200	1.0483
80	0.4406
32	0.1802
12.80	0.0718
5.12	0.0346
0	0.0190



9.2. 结果计算

9.2.1. 供试品最终Protein A残留 (ng/mL) 计算公式

供试品最终 Protein A 残留 (ng/mL) = 稀释倍数 × 四参数拟合供试品 Protein A 结果

江苏省苏州市吴中经济开发区越溪街道吴中大道 1463 号越旺智慧谷 A4 号楼
Building 4, Yuewang Wisdom Valley, 1463 Wuzhong Avenue, Wuzhong District, Suzhou, China

9.2.2. 加标回收率的计算

$$\text{回收率}\% = \frac{(\text{加标检测浓度} \times \text{总体积}) - (\text{供试品检测浓度} \times \text{供试品体积})}{\text{加标理论浓度} \times \text{加标体积}} \times 100\%$$

10. 注意事项

- 10.1. 试剂盒内所有组分都必须恢复至室温（18~25℃）后方可使用。
- 10.2. 所有组分使用前充分混匀，标准品还需短暂离心，将管壁及盖子上的液体全部集中于管底；使用后即将所有试剂放回对应保存温度。
- 10.3. 试剂盒必须在有效期内使用，每次试验均需制备相应的标准曲线，不建议不同批次的相关试剂混批使用。
- 10.4. 酶标板加液时注意不要触碰到微孔板底部，防止破坏包被层。不同样本和步骤间及时更换加样槽和吸头，避免交叉污染。
- 10.5. 板条洗涤后拍干时，注意防止板条脱落，封板膜注意不能重复使用。
- 10.6. 显色时高浓度可能会产生黑色絮状物，属于正常现象，程度轻微不影响最终读数结果。
- 10.7. 读数时注意核对检测波长及拟合方程选择是否正确。
- 10.8. 只有严格遵守说明书的操作方法，全部使用本试剂盒配套的试剂才能保证最佳检测效果。
- 10.9. 检测结果的不同可由多种因素引起，包括实验人员的操作、移液器的使用方式、洗板技术、反应时间或温度、试剂盒的储存等。
- 10.10. 本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

11. 故障排除

序号	问题描述	可能原因	相应对策
1	标准曲线梯度差	吸液或加液不准	检查移液器及吸头
		酶标板洗涤不完全	保证洗板次数及每孔的洗液用量
2	标曲和样本均不显色或显色很弱	温育时间太短	保证足够的温育时间
		实验温度不正确	使用推荐的温育温度
		漏加某个组分，尤其是检测抗体或酶	检查试验记录和剩余试剂。每次加液前均应核对标签
		试剂过期	使用有效期内的产品
		标准品/抗体/酶/显色底物失活或者丢失	正确保存、更换新的标准品/抗体/酶/显色底物
	酶标板洗涤、拍干后，未及时添加下一步反应溶液	在洗板、拍板完成后，立即添加下一步反应溶液	
3	标曲不显色或显色很弱，样本显色	标准品倍比稀释时，未涡旋震荡或不够充分	溶解、稀释时，采用涡旋震荡混匀
4	OD 值读数低	酶标仪设置不正确	在酶标仪上检查波长和滤光片装置
			读数前应提前打开酶标仪进行预热

序号	问题描述	可能原因	相应对策
		酶标板洗涤操作不当：如洗板次数过多、加洗液后停留时间过长等	按说明书推荐的方法进行洗板
5	变异系数大	移液枪与吸头不匹配	更换枪头
		移液枪精度差	对移液设备进行定期校准和测试
		检查酶标板底部情况	检查酶标板底部是否有残留的液体和手印
		移液时操作手法不一致	反复练习移液，保持移液操作的一致性
		板孔内有异常	加样前确认板孔内无异物，加样后确认无气泡
6	背景值高	酶标板洗涤不完全	按说明书推荐的方法进行洗板 如果用自动洗板机，请检查所有的加液口和排废液口是否有堵塞 如果是手洗板，可适当增加洗板次数
		共用试剂污染：如超纯水	更换无污染试剂重新配制
		共用仪器污染：如移液器、离心机	移液器专用，并使用无菌带滤芯吸头

序号	问题描述	可能原因	相应对策
		操作环境不洁净，ELISA 试验操作区域与细胞培 养、破碎区域混用	试验操作分区
		试剂错配：如洗液、检测 抗体稀释倍数不对	按正确稀释倍数重新配制
		反应时间过长	当酶标板显色足够进行吸光度读数时 立即使用终止液终止反应，适当缩短 显色时间
		显色反应没有避光	显色反应应在避光条件下进行
7	实验结果与 参考性能参 数相差较大	试剂盒保存不当	按说明书要求保存相关试剂
		试剂过期	确认试剂盒及其各组分在有效期内
		实验过程未严格按照说明 书进行	实验前需对实验人员进行实操培训， 保证实验顺利 对实验关键步骤，如使用浓度、加样 量、孵育时间等需进行严格控制，不 可以经验值判断替代说明书
8	阴性对照出 现阳性结果	样品、试剂被污染，或加 样时操作不当导致相邻孔	更换试剂，小心操作

序号	问题描述	可能原因	相应对策
		之间溶液溅洒出现交叉污染	
		酶标板洗涤不彻底	洗板前先将抗体溶液倒干净，然后洗液加满板孔，确保能充分洗涤
9	样本经不同梯度稀释，计算得到的样本值差异较大	样本的基质效应较强	选择某 2 个稀释梯度下，计算得到的样本值接近的稀释倍数（针对目的蛋白含量较高的样本）

12. 参考文献

- 《中华人民共和国药典（2020 版）》
- ICH（国际人用药品注册技术协调会）指南-Q6B

13. 联系方式

- 地址：江苏省苏州市吴中经济技术开发区越溪街道吴中大道 1463 号
- 邮编 Postal code: 215104
- 联系电话 Tel: 400-900-1882
- 邮箱 E-Mail: info@hillgene.com
- 售后邮箱: technical@hillgene.com
- 网址 Website: <https://www.hillgene.com>

14. 买方须知

我们的产品仅供研究使用。它们不得用于任何其他目的，包括但不限于用于人体、治疗或诊断或任何商业用途。未经我们同意，不得将我们的产品转让给第三方、转售、为转售而修改或用于制造商业产品或向第三方提供服务。

您在使用本产品时还必须遵守 <https://www.hillgene.com> 上产品网页中描述的任何适用许可要求。您有责任查看、理解并遵守此类声明中规定的任何限制。

更多产品、知识产权和限制使用信息，请访问 <https://www.hillgene.com>。

附件 1：安全注意事项

- 一般说明

江苏省苏州市吴中经济开发区越溪街道吴中大道 1463 号越旺智慧谷 A4 号楼
Building 4, Yuewang Wisdom Valley, 1463 Wuzhong Avenue, Wuzhong District, Suzhou, China

用户未按本说明书说明方式使用本产品可能会导致人身伤害或仪器或设备损坏。确保使用本产品的人员已接受实验室一般安全操作说明和本文档中提供的安全信息。

(1) 在使用仪器或设备之前，请阅读并理解仪器或设备制造商提供的用户文档中的安全信息。

(2) 在处理化学品之前，请阅读并理解所有适用的安全数据表（SDS），并使用适当的个人防护设备（手套、防护服、护目镜等）。

- 生物危险

(1) 生物样品，如人和其他动物的组织、体液、传染性病原体和血液，有传播传染病的可能。在配备适当安全设备（如生物安全柜）的设施中进行所有工作。安全设备还包括个人防护用品，如手套、外套、工作服、鞋套、靴子、呼吸器、面罩、安全眼镜或护目镜。

(2) 在使用可能具有生物危害性的材料之前，个人应根据当地的法规和公司/机构要求接受培训。

- 危险废物（来自仪器）

仪器产生的废物具有潜在危险性。请遵守前述“生物危险”警告中的指导原则。

附件 2：相关产品（更多产品可咨询谱新生物 <https://www.hillgene.com>）

类别	产品名称	产品货号
CHO 细	CHO HCP ELISA 检测试剂盒	HG-HCP003
胞	CHO 残留 DNA 检测试剂盒 (qPCR-荧光探针法)	HG-CH001