Ver202505

毕赤酵母 HCP ELISA 检测试剂盒说明书

Cat.No. HG-HCP005

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

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 3

5. 储存条件及有效期 4

6. 定义或术语 4

7. 需要准备的试剂、耗材与设备 4

8. 操作步骤 5

9. 结果分析 7

10. 注意事项 10

11. 故障排除 11

12. 参考文献 14

13. 联系方式 14

14. 买方须知 14

1. 产品简介

本品采用双抗体夹心法检测样本中的毕赤酵母宿主蛋白残留。使用预先包被有毕赤酵母宿主蛋白捕获抗体的微量滴定板，添加样本及标准品后，毕赤酵母宿主蛋白捕获抗体特异性捕获毕赤酵母宿主蛋白，洗涤除去杂质上清，然后添加酶标记抗体，洗涤除去未结合酶标记抗体后添加显色底物显色，终止后读取吸光度。样本吸光度值与样本中被检测到的毕赤酵母 HCP 的量呈正相关，与标准曲线比较，再乘以其对应的稀释倍数，即可得出样本中毕赤酵母宿主蛋白的残留量。

检测范围：1.5625 ng/mL～100 ng/mL

2. 应用

适用于定量检测各种生物制品及药品的中间品、半成品和成品中残留的毕赤酵母宿主细胞蛋白。

3. 试剂盒规格

产品货号	产品规格	有效期
HG-HCP005	96T	12 个月
HG-HCP005-S	48T	

4. 试剂盒组分

组分	规格	存储条件
Pichia HCP Standard	1 mL×8 管	拆封前 -20℃保存 ，开封

组分	规格	存储条件
100×Anti-Pichia HCP-HRP	200 μL×1 管	后置于 2-8℃ 保存
Sample Diluent Buffer	15 mL×1 瓶	
Antibody Dilution Buffer	15 mL×1 瓶	
20×Wash Buffer	25 mL×2 瓶	
Color Reagent A	6 mL×1 瓶	
Color Reagent B	6 mL×1 瓶	
Stop Solution	10 mL×1 瓶	
Coated Plate	8 孔×12 条	
封板膜	4 张	

5. 储存条件及有效期

未开封试剂盒于-20°C下保存，有效期为 12 个月，开封后试剂盒放置于 2-8°C保存，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（提供孵育温度）

➢ 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. 试剂盒提前从冰箱取出，于室温放置至平衡（30 分钟及以上），保证本次实验检测所需试剂。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℃保存，以备下次使用。

8.2.2. 洗液（1×）配制：取适量 20×Wash Buffer 用去离子水进行 20 倍稀释。20×Wash Buffer 中如果有结晶形成，应置于室温或 37℃水浴轻轻摇晃，待结晶完全溶解后再进行稀释。

8.3. 标准曲线的准备：Pichia HCP 校准品无需稀释，可直接使用。

8.4. 供试品溶液配制：根据预期的实验结果，用 Sample Diluent Buffer 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 25 ng/mL 标准品，混匀，即得。

8.6. 洗板：用洗液（1×）洗板，300 μL/孔，拍干孔中的残留液体，重复 3 次。

8.7. 样品孵育：每孔对应加入 100 μL 标准品、样品及加标质控，用封板膜封板，然后置于 300 转/分钟，37℃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）

8.8. 洗板：孵育完成后，室温放置 3-5 分钟，小心揭去封板膜，弃去孔中液体，用洗液（1×）洗板，300μL/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 30 秒并轻微震荡；拍干时注意每次换新的吸水纸或在纸上干净的区域拍干。）

8.9. 酶标抗体的配制：根据本次实验用量，用 Antibody Dilution Buffer 将 100×Anti-Pichia HCP-HRP 稀释 100 倍，如：100μL 100×Anti-Pichia HCP-HRP 加入 9.9mL Antibody Dilution Buffer。

8.10. 酶标抗体孵育：每孔加入酶标抗体，100 μL/孔，用封板膜封板，然后置于 300 转/分钟，37°C孵育 1 小时。从 4 °C冰箱中取出 Color Reagent A、B，平衡至室温。

8.11. 洗板：孵育完成后，室温放置 3-5 分钟，小心揭去封板膜，弃去孔中液体，用洗液（1×）洗板 5 次（300μL/孔），拍干样品孔中的残留液体。

8.12. 显色：将 Color Reagent A、B 以 1:1 体积比混合，以 100 μL/孔加入酶标板中，用封板膜封板，室温避光静置孵育 20 分钟。

8.13. 终止：加入终止液，50 μL/孔，终止完成后，请尽快读板。（注意：建议在酶标仪读数程序中设置 5-10 秒的震荡）。

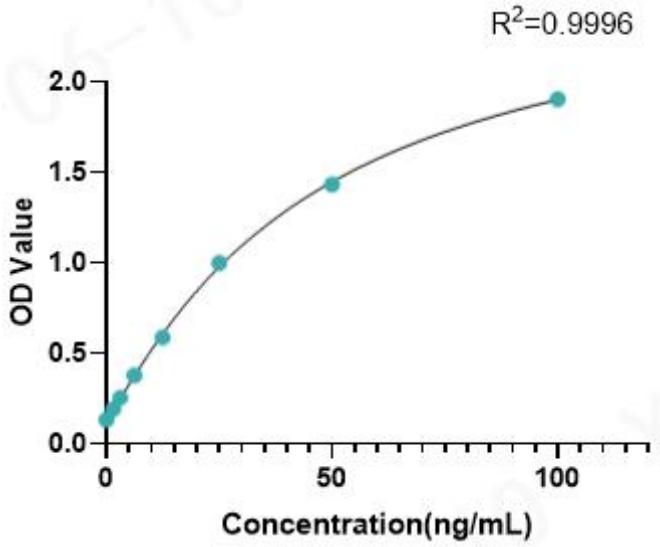
8.14. 读数：在 20 分钟内，用酶标仪于 450 nm 检测波长、630nm 参比波长下读取吸光度。

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。

9.2. 示意图：

标准品浓度 ng/mL		OD 值 1	OD 值 2	CV%	检测值 ng/mL	回收率%
NTC	0	0.12680	0.13760	5.8%	0.00000	/
ST7	1.5625	0.19510	0.19100	1.5%	1.48865	95
ST6	3.125	0.25670	0.25180	1.4%	3.16688	101
ST5	6.25	0.37900	0.37570	0.6%	6.46435	103
ST4	12.5	0.58610	0.58920	0.4%	12.37827	99
ST3	25	0.97200	1.02780	3.9%	26.68734	107
ST2	50	1.42480	1.44140	0.8%	49.53991	99
ST1	100	1.88560	1.92340	1.4%	95.70033	96



9.3. 结果计算

9.3.1. 供试品最终毕赤酵母 HCP 残留（ng/mL）计算公式

$$\text{供试品最终毕赤酵母 HCP 残留}\left(ng/mL\right) = \text{稀释倍数} \times \text{四参数拟合供试品毕赤酵母 HCP 结果}$$

9.3.2. 加标回收率的计算

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

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 5 秒，将管壁及盖子上的液体全部集中于管底；使用后立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
		酶标板洗涤操作不当：如洗板次数过多、加洗液后停留	按说明书推荐的方法进行洗板

序号	问题描述	可能原因	相应对策
		时间过长等	
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
		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	按正确稀释倍数重新配制

序号	问题描述	可能原因	相应对策
		体稀释倍数不对	
		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之间溶液溅洒出现交叉污染	更换试剂，小心操作
		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	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

序号	问题描述	可能原因	相应对策
	算得到的样本值差异较大		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

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
大肠杆菌	E.coli 残留 DNA 检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-ED001
	E.coli 残留 DNA 片段分析检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-EF001
	E.coli 残留总 RNA 样本前处理试剂盒	HG-CL300
	E.coli 残留总 RNA 检测试剂盒 （RT-PCR 荧光探针法）	HG-ER001
	E.coli HCP ELISA 检测试剂盒（2G）	HG-HCP002-2G
293 细胞	293T HCP ELISA 检测试剂盒	HG-HCP001
	HEK293 细胞 残留 DNA 检测试剂盒(qPCR-荧光探针法）	HG-HD003
	HEK293 细胞 残留 DNA 片段分析检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-HF002
	293T 细胞 残留 DNA 检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-HD004
	293T 细胞 残留 DNA 片段分析检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-HF003
毕赤酵母	毕赤酵母残留 DNA 检测试剂盒（PCR 荧光探针法）	HG-PD001
抗生素	卡那霉素 ELISA 检测试剂盒	HG-KA001