E.coli HCP ELISA 检测试剂盒（2G）说明书

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

产品简介

本品采用双抗体夹心法检测样本中的 *E.coli* 宿主蛋白残留。使用预先包被有 *E.coli* 宿主蛋白捕获抗体的微量滴定板，添加样本及标准品后，*E.coli* 宿主蛋白捕获抗体特异性捕获 *E.coli* 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 *E.coli* 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 *E.coli* 宿主蛋白的残留量。

检测范围：3.125 - 200 ng/mL
定 量 限： 1 ng/mL
检 测 限： 0.3 ng/mL
精 密 度： CV% ≤ 10%, RE% ≤ ±15%

货号及规格

货号	规格	有效期
HG-HCP002-2G	96T	12 个月
HG-HCP002-2G-S	48T	

用途

本品可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 *E.coli* 宿主细胞蛋白。该产品经过测试，可以适用于大多数 *E.coli* 工程细胞，如：DH5α 、 BL21 及TOP10等。该检测试剂盒仅供科研及工业使用，不可用于任何临床诊断。

试剂盒组成

组分	规格	配制	储存温度
E.coli HCP Standard	1 mL×8 tubes (ST1-ST7，NTC)	即用型	-20℃
100×Anti-E.coli HCP-HRP	200 µL×1 tube	1：99 用Sample Diluent稀释	
Sample Diluent	15 mL×2 bottles	即用型	未拆封前 -20℃保存，开封后置于 2-8℃保存
20×Wash Buffer	25 mL×2 bottles	1：19 用灭菌注射用水稀释	
Stop Solution	10 mL×1 bottle	即用型	
TMB Substrate A	6 mL×1 bottle	即用型	
TMB Substrate B	6 mL×1 bottle	即用型	
Coated Plate	8 wells x 12 strips	即用型	
Sealer film	5 films	即用型	

储存条件与有效期

未开封试剂盒于指定温度下保存，有效期为 12 个月。

需自行准备的材料：

- 酶标仪
- 离心机
- 微量移液器及吸头
- 恒温培养箱
- 灭菌注射用水
- 涡旋振荡器
- 吸水纸

试剂配置

1. 平衡：将所需试剂移到室温（18~25℃)平衡 30 分钟。

2. 配液：

1× 洗液配制：20×Wash Buffer平衡至室温，不要有结晶。混匀后根据用量，取适量灭菌注射用水按 1：19 的比例，将 20×Wash Buffer稀释 20 倍，最终得到 1×洗液；

注：如 20×Wash Buffer瓶口或瓶中出现少量结晶，属于正常现象，可使用金属浴或水浴等在 37℃条件下加热一段时间，结晶 会消失。

操作步骤

使用前所有试剂组分以及待测样本需要恢复室温（18~25℃）。建议所有的标准品和待检样本进行双复孔测定。

1. 样本溶液配制：根据预估的样本含量，取样本适量，用样品稀释液进行适当的稀释。

2. 加标质控溶液（ERC）配制：取 150 μLST3 标准品（50 ng/mL），加入稀释后的样本 150 μL，混匀即得。

3. 加样：分别依次吸取NTC、ST7（3.125 ng/mL）、ST6（6.25 ng/mL）、ST5（12.5 ng/mL）、ST4（25 ng/ mL）、ST3（50 ng/mL）、ST2（100 ng/mL）、ST1（200 ng/mL）标准品、样本溶液、加标质控各 100 μL/ 孔，加入对应酶标板孔中，均设置复孔。

4. 样本孵育：加样完成后，贴上酶标板封板膜，将酶标板置于 37℃孵育 1 小时。

5. 洗板：孵育完成后，将酶标板取出，室温（18~25℃）放置 3-5 分钟，揭下封板膜，将液体甩出，将 1x 洗液以 300 μL/ 孔加入 酶标板各孔中，静置 30 秒，将所有液体甩出并在干净的吸水纸上彻底拍干，洗涤过程重复 3 次。

注：甩板时请勿造成液体由于回流或溅射污染其它酶标孔位。拍干时，请注意及时更换纸张，请勿在吸水纸同一位置反复拍击酶标板，请确保每次拍击前，吸水纸处于干净干燥状态。

6. 酶标抗体配制：在样本孵育完成前 2 分钟左右，取出酶标抗体。根据本次实验用量，用样本稀释液以 1：99 将100×Anti-E.coli HCP-HRP稀释 100 倍， 现配现用。

7. 加酶标抗体：将稀释好的酶标抗体以 100 μL/ 孔加入对应酶标孔中。

8. 酶标抗体孵育：加完酶标抗体后，贴上酶标板封板膜，将酶标板置于 37℃孵育 1 小时。在孵育完成时，从 4℃冰箱中取出显 色液 A/B，室温（18~25℃）放置，备用。

9. 洗板：孵育完成后，将酶标板取出，室温（18~25℃）放置 3-5 分钟，揭下封板膜，将液体甩出。将 1x 洗涤液以 300 μL/ 孔 加入酶标板各孔中，静置 30 秒，将所有液体甩出并在干净的吸水纸上彻底拍干，洗涤过程重复 6 次。

10. 显色：根据本次实验用量，取出所需TMB Substrate A/B 以 1：1 比例混合，临用新配。使用多通道移液器及干净加样槽，以 100 μL/ 孔加入TMB Substrate A/B 混合液，室温（18~25℃）避光显色 30 分钟（显色时不要振荡）。

11. 终止：显色完成后，使用多通道移液器及干净加样槽，以 50 μL/ 孔加入终止液。

12. 读值：20 分钟 内读取 450nm/630nm 波长处的吸光度值。450nm 作为检测波长，630nm 作为参比波长。

13. 数据处理：以标准品的吸光度为纵坐标，浓度为横坐标，将 OD450-OD630nm 的响应信号差值进行四参数方程拟合。将样本 OD 值代入方程得宿主蛋白残留检测值，再乘以稀释倍数得样本宿主蛋白残留浓度。

流程图

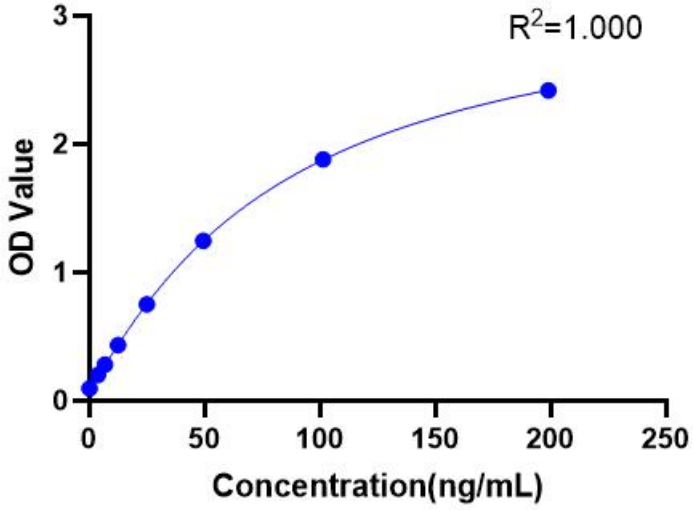


结果处理

1. 标准曲线 OD 处理（见下例，仅为示例，具体以实际测定为准）

标准品浓度（ng/mL）	OD1	OD2	平均值	CV	检测值（ng/mL）	回收率（%）
200	2.39410	2.44480	2.41945	1%	199.00153	100
100	1.88370	1.87950	1.88160	0%	101.28970	101
50	1.23470	1.25560	1.24515	1%	49.43616	99
25	0.74080	0.76200	0.75140	2%	24.96131	100
12.5	0.42850	0.43670	0.43260	1%	12.37254	99
6.25	0.28410	0.27730	0.28070	2%	6.71947	108
3.125	0.20400	0.19980	0.20190	1%	3.71466	119
0	0.09720	0.09500	0.09610	2%	0	/

2. 标准品理论浓度与对应 OD 值以四参数进行拟合，得到标准曲线（如下图所示）



注意事项

使用前所有试剂组分以及待测样本需要恢复室温（18~25℃）。建议所有的标准品和待检样本进行双复孔测定。

1. 样品首次检测，建议进行至少 3 个连续倍数的稀释，以在标曲范围内产生至少一个稀释后样品。
2. 试剂按标签说明书储存，使用前室温（18~25℃） 平衡。
3. 包被酶标板使用前请平衡至室温（18~25℃）再打开外包装袋，实验中不用的板条立即放回包装中密封，4℃可保存一个月。其他不用的试剂应包装好或盖好。
4. 实验中请使用一次性的吸头，避免交叉污染。
5. 使用前检查试剂盒内各种试剂。试剂的稀释、加样和终止反应应充分混匀或摇匀对实验结果尤为重要。
6. 洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在洁净的纸巾上充分拍干，直至看不到水印。勿将纸巾放入反应孔中吸水。
7. 底物显色液对光敏感，避免长时间暴露于光下，避免与金属接触影响结果。
8. 本产品为一次性使用的试剂盒，请在效期内使用。

常见问题及解决方案

问题	可能原因	解决方法
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
酶标板整体背景高	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
	底物孵育过程没有避光	底物孵育应在避光条件下进行
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、稀释混匀时采用涡旋震荡
标曲和样本均不显色	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
标曲和样本都显色，但复孔的 CV 大	移液枪与吸头不匹配	更换枪头
	移液器气密性差	正确规范地使用和维护移液器
	移液时操作手法不一致	反复练习移液，保持移液的一致性
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）

免责声明

在所有情况下， 本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

©2024 谱新生物 Hillgene. All right reserved. Ver.1.2406
江苏谱新生物医药有限公司
A. 苏州市吴中区吴中大道 1463 号越旺智慧谷 4 号楼
T.400 900 1882 W.www.hillgene.com