

# **CHO HCP 残留检测试剂盒**

## **（一步酶联免疫吸附法）**

### **说明书**

**货号：1301304-1**

**在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点和常见问题！**

版本：A/1

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

## ■ 产品名称

通用名：CHO HCP 残留检测试剂盒（一步酶联免疫吸附法）。

## ■ 包装规格

96 测试/盒。

## ■ 预期用途

本试剂盒用于 CHO 细胞系表达的生物制品(单抗，重组蛋白，疫苗等)中宿主细胞蛋白的残留检测。

该试剂盒仅供研究使用，不可用于诊断。

## ■ 检测原理

本试剂盒采用 CHO 细胞（K1&S）补料分批培养工艺制备 HCPs 免疫绵羊，获得专用抗体。试剂盒是基于固相酶联免疫吸附分析法（Enzyme-linked Immunosorbent Assay，ELISA），采用双抗体夹心的技术形式检测样品中 CHO HCPs 的残留量。该分析方法通过包被针对 CHO HCPs 的多克隆抗体来捕获样品中的残留 HCPs，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 HCPs 抗体，温育后进行洗涤；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 655nm），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 450nm）。酶标仪采集 450nm 波长下吸光度值，其吸光度与校准品和样品中的 HCPs 浓度成正相关。通过剂量—反应曲线可计算得出样品中 CHO HCPs 的浓度。

对实际样品无需特殊处理，可通过合适的稀释比例进行适用性验证，以确定本试剂盒是否适用。本试剂盒检测步骤少，快速，专一性强，性能稳定可靠。

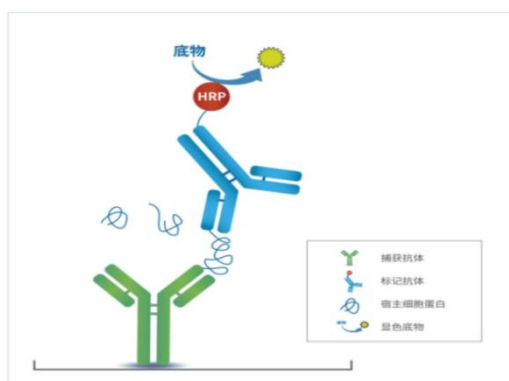


图 1 检测原理示意图

## ■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

| 组分                 | 产品号    | 规格           | 说明                                                          |
|--------------------|--------|--------------|-------------------------------------------------------------|
| CHO HCP 校准品        | PNB005 | 2 瓶          | 冻干粉，精确量取复溶液（0.5 mL）溶解，静置约 5 分钟，溶液应该澄清透明，无肉眼可见不溶物。具体含量见瓶身标注。 |
| 抗 CHO HCP 预包被酶标板   | PNA008 | 8 孔 × 12 条   | 已包被适量的绵羊抗 CHO HCPs 抗体，铝箔袋密封包装，含干燥剂。用完及时 <b>密封避光保存</b> 。     |
| 校准品复溶液             | PNC002 | 1.5 mL × 1 管 | 澄清透明溶液，专用于溶解 CHO HCP 校准品。                                   |
| 稀释液                | PNE004 | 25 mL × 2 瓶  | 用于校准品、待检样品和酶标抗体的稀释。初次检测的样品，需进行样品适用性验证，确定最佳稀释倍数。             |
| 浓缩缓冲液<br>（10×）     | PNF001 | 25 mL × 2 瓶  | 低温时易产生结晶，使用前可在 37 °C 水浴中溶解后用新鲜制备的超纯水稀释 10 倍，即为 1× 缓冲液。用于洗板。 |
| CHO HCP 酶标抗体（100×） | PNN002 | 120 μL × 1 管 | 经 HRP 标记的抗 CHO HCPs 的绵羊多抗，使用前用稀释液稀释 100 倍。应 <b>密封避光保存</b> 。 |
| TMB 显色液            | PND005 | 12 mL × 1 瓶  | 使用前于室温平衡 20 分钟以上，应避光并 <b>密封避光保存</b> 。                       |
| 终止液                | PNI002 | 6 mL × 1 瓶   | 为盐酸溶液，操作时戴好护目镜并避免接触皮肤。                                      |
| 封板膜                | PNK001 | 3 片          | 用于检测过程中温育时间超过 30 分钟时密封覆盖酶标板条，防止污染和液体蒸发。                     |

■ 储存条件及有效期

未开封试剂盒置 2-8 °C 保存，有效期为 12 个月。

开封组分的保存要求如下：

表 2. 开封组分有效期

| 名 称      | 效 期                                                         |
|----------|-------------------------------------------------------------|
| 开封预包被酶标板 | 开封后的酶标板条连同干燥剂于自封袋中密封保存，在 2-8 °C 条件经验证可以稳定保存 60 天。           |
| 复溶校准品    | 溶解后的校准品经验证在 2-8 °C 条件下可以稳定保存 30 天；或者 ≤-18 °C 储存，最大冻融次数 3 次。 |

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 稀释用的无菌离心管
- 拍干酶标板用吸水纸
- 加样槽

■ 相关设备

- 酶标仪（能够检测 450 nm 和 620-650 nm 区间内单一波长的吸光度值）
- 单道或多道的微量移液器
- 微孔板恒温振荡器
- 恒温箱（可选）
- 洗板机（可选）

## ■ 实验操作流程

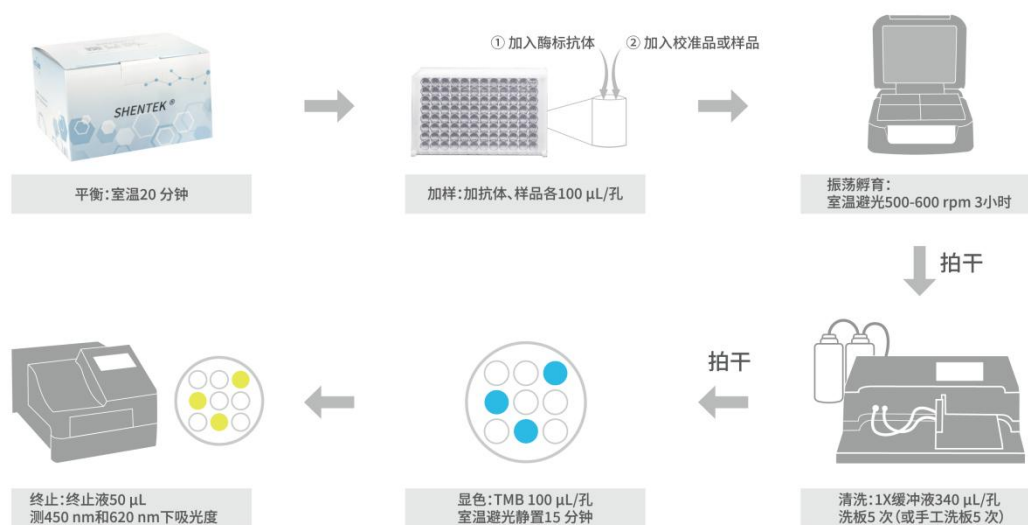


图 2 操作流程示意图

### 一、试剂、仪器准备

#### (一) 实验前准备:

1. 将试剂盒取出, 在使用前于室温平衡约 20 分钟。
2. 试剂均需在下步使用前 20 分钟取出于室温平衡, 使用后即需立即放回 2-8 °C 保存。
3. 根据检测样品数量计算所需孔数, 取出相应数量的预包被酶标板条, 剩余板条连同干燥剂置于自封袋中密封, 放回试剂盒中, 保存在 2-8 °C 冰箱, 请于效期内使用完。

备注: 室温指 25 °C ± 3 °C。

#### (二) 试剂配制:

1. CHO HCP 校准品溶解: 根据 CHO HCP 校准品西林瓶标签上的含量标识, 务必精确量取校准品复溶液 0.5 mL 于西林瓶中, 轻柔颠倒混匀, 静置 5 分钟后使用。复溶后校准品溶液按照推荐保存方法于效期内使用。  
备注: 不可用其他体积的复溶液溶解该校准品。
2. 1×缓冲液配制: 浓缩缓冲液 (10×) 用超纯水稀释 10 倍, 例如取 25 mL 浓缩缓冲液 (10×) 加入 225 mL 超纯水混匀, 即为 1×缓冲液, 专用于洗

板。建议现配现用。若采用洗板机洗涤，可能发生试剂量不够，可单独采购相同产品号的缓冲液。

备注：取出浓缩缓冲液（10×）和稀释液，观察如有结晶属正常现象，于 37 °C温育直至完全溶解。

3. 检测抗体配制：用稀释液于无菌离心管中将其稀释 100 倍，轻轻颠倒混匀，即为 1×CHO HCP 酶标抗体。配制合适体积，以保证加液时有充足的余量。现配现用。
4. 校准曲线配制：参照图 3 和表 3 对校准品进行梯度稀释。

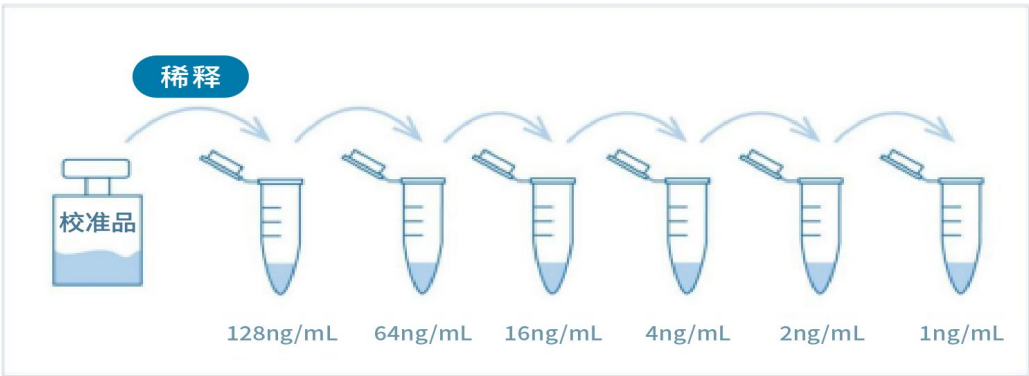


图 3 校准品稀释操作示例

表 3. 系列校准品梯度稀释

| 校准曲线样品        | 加样                       | 浓度(ng/ mL) |
|---------------|--------------------------|------------|
| ST1           | 复溶后校准品原液用稀释液稀释到 ST1 浓度   | 128        |
| ST2           | 500 μL ST1 溶液+500 μL 稀释液 | 64         |
| ST3           | 250 μL ST2 溶液+750 μL 稀释液 | 16         |
| ST4           | 250 μL ST3 溶液+750 μL 稀释液 | 4          |
| ST5           | 500 μL ST4 溶液+500 μL 稀释液 | 2          |
| ST6           | 500 μL ST5 溶液+500 μL 稀释液 | 1          |
| NCS<br>(阴性对照) | 稀释液                      | 0          |

二、样品准备

- 样品：细胞收获液，下游纯化中间样品，原液和成品等。应清澈透明，经离心或过滤等方式去除不溶物。
- 存放：样品务必事先有稳定性的研究，明确最佳的保存条件；一般建议样品长期储存应放置于-65 °C及以下环境中，且不宜反复冻融。

- 处理：待测样品根据其预估所含的 HCPs 浓度，用稀释液稀释适当倍数，使其检测值落入校准曲线定量范围之内。
- 对初次使用或样品 HCPs 含量未知的情况，强烈建议进行样品适用性验证，确定适宜的样品稀释倍数，以便更好进行后续常规检测。
- 实验过程中建议加入贵司内控品或我司质控品保证实验有效性。我司质控品可单独购买。

备注：相关验证方案可咨询我司技术支持。

### 三、操作步骤

#### （一）加样孵育

1. 加入检测抗体：取 1×CHO HCP 酶标抗体溶液到加样槽中，用多通道移液器快速将抗体溶液 100  $\mu$ L/孔加入微孔板孔底部，勿引入气泡。实际检测时可根据样品数量加样（可参考表 4 示例进行 96 孔板排版）。
2. 加入校准品和待测样品：准确移取 100  $\mu$ L 系列校准品溶液、稀释液（0 值）、待测样品加入相应微孔板中。操作时避免产生气泡，每个浓度建议做 2-3 个平行复孔，并记录各浓度孔所在位置。
3. 加样完毕后将微孔板用封板膜密封，放置于微孔板恒温振荡器上，室温条件下 500-600 rpm，避光振荡孵育 3 小时。

表 4. 96 孔酶标板加样排版示例

|   | 1   | 2   | 3   | 4 | 5          | 6          | 7          | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----|-----|-----|---|------------|------------|------------|---|---|----|----|----|
| A | ST1 | ST1 | ST1 |   | S1         | S1         | S1         |   |   |    |    |    |
| B | ST2 | ST2 | ST2 |   | S2         | S2         | S2         |   |   |    |    |    |
| C | ST3 | ST3 | ST3 |   | S3         | S3         | S3         |   |   |    |    |    |
| D | ST4 | ST4 | ST4 |   | S1+SR<br>C | S1+SR<br>C | S1+SR<br>C |   |   |    |    |    |
| E | ST5 | ST5 | ST5 |   | S2+SR<br>C | S2+SR<br>C | S2+SR<br>C |   |   |    |    |    |
| F | ST6 | ST6 | ST6 |   | S3+SR<br>C | S3+SR<br>C | S3+SR<br>C |   |   |    |    |    |
| G |     |     |     |   |            |            |            |   |   |    |    |    |
| H | NCS | NCS | NCS |   |            |            |            |   |   |    |    |    |

✧ 该示例表示的是检测 6 个浓度梯度的校准曲线（ST1-ST6）、1 个阴性对照 NCS、3 个待测样品（S1-S3）和每个样品加标回收 SRC（S1 SRC-S3 SRC）。

✧ 实际检测时可根据样品多少，参照此示例进行 96 孔板排版加样。

✧ 客户可根据方法验证结果确定日常检测复孔数及是否设置加标回收。

## （二）显色：

1. 提前 20 分钟将 TMB 显色液置于室温条件下平衡。
2. 将上述板子用 1×缓冲液洗板，340 μL/孔，迅速甩掉液体，于纸巾上拍干如此重复洗板 5 次。洗板后的微孔板应立即进行后续操作，不可放置。
3. 取合适体积的 TMB 显色液于加样槽中，用多通道移液器迅速将 TMB 显色液 100 μL/孔加入上述微孔板中，于室温避光温育 15 分钟。此步骤勿用封板膜密封。

## （三）终止

1. 取合适体积的终止液于加样槽中，用多通道移液器迅速将终止液 50 μL/孔加入上述微孔板中。  
备注：加入顺序需同显色液加入顺序一致，加样时吸头应悬空，避免接触微孔板中溶液，切勿产生气泡。
2. 终止后立即读数。

## （四）测读

1. 设定酶标仪波长 450 nm 和 620-650 nm（620-650 nm 区间内单一波长均可），测定各孔 OD 值。测定时不可覆盖封板膜或盖子。  
备注：若酶标仪没有配备长波长时，可以仅设定 450 nm 波长，但是需确保微孔板孔底干净，无指纹或刮痕。

# 四、结果计算与判断

## （一）结果计算：

1. 各孔 OD<sub>450 nm</sub> 数值需减去各自孔的长波长 OD 值。若酶标仪没有配备长波长时，可以省去此步骤。
2. 各校准点和样品的 OD 值分别减去阴性对照的 OD 值后，重复孔取均值。
3. 以校准点浓度值和 OD 值进行四参数拟合，获得校准曲线方程。将样品的平均 OD 值带入方程计算得到样品浓度，该浓度需乘以稀释倍数得到样品的实际浓度。
4. 标曲的拟合软件可以用酶标仪自带的软件。如无，则建议采用专业的标曲制作软件，如 Curve Expert，ELISA Calc 等。

## （二）结果判断：



1. 对于吸光度值超出校准品 ST1 的样品，可用稀释液稀释适宜倍数后再行测定，样品中 HCPs 抗原浓度值为稀释后测定值×稀释倍数。若同时设置在该稀释度下的适宜加标样品，回收率符合相应法规的方法学验证要求。

### （三）检测方法的局限性：

1. 本品仅适用于研究用途，不用于临床诊断。
2. 本品仅适用于 CHO 细胞系生产工艺来源的宿主细胞残留蛋白含量检测。
3. 样品 pH 值应在 6.5~8.5 间，过低或过高的 pH 值可能会造成测量值异常。

### （四）性能参数：

1. 线性范围：1-128 ng/ mL，线性相关系数  $R^2>0.990$ 。
2. 最低定量限 LLOQ：1.0 ng/ mL。
3. 典型校准曲线如下图：

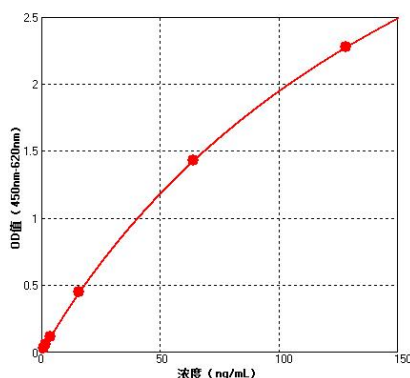


图 4 典型校准曲线

4. 特异性：与 MDCK、Vero、HEK293T、SF9、*E.coli* 宿主蛋白和毕赤酵母宿主蛋白无交叉反应。

## ■ 重要事项提醒

试剂盒使用人员需经过培训，合格后方可使用。为了获得满意的检测结果，请您务必事先留意如下几点事项：

- ✧ 所有的试剂配制务必使用无菌一次性的吸头、试管和加样槽等，切勿混用。避免微量移液器吸头连接部分的污染，建议每次实验前后用 75 %酒精擦拭。规范移液操作，严禁液体倒吸到移液器，或未去掉吸头时横放在桌上。
- ✧ 校准品和样品的稀释混匀要轻柔充分，勿产生大量泡沫。
- ✧ **终止液为酸性溶液，在使用中注意眼睛、面部、手和衣服的防护。**
- ✧ 不同批次试剂盒不建议混用。
- ✧ 配制缓冲液所用水需为无菌水或新鲜制备的超纯水，水温不得超过 37 °C。
- ✧ 加样时注意不要有气泡，可轻轻晃动混匀。在上机检测前若有气泡存在，需用干净的 10  $\mu$ L 吸头或针头等戳破，注意不要吸走孔内液体，导致结果误差大。
- ✧ 在孵育反应时需给酶标板覆膜，防止样品蒸发。
- ✧ 倒去缓冲液后应马上加后续溶液，勿让酶标孔处于干燥状态，以防影响试剂盒检测性能。
- ✧ 不用的酶标板条需用试剂盒附带的自封铝箔袋避光保存，以免被其他样品污染，导致试剂盒报废。
- ✧ 校准品配制、样品稀释等务必精确，配制时最小的取样量不要小于 5  $\mu$ L，防止结果出现较大的误差。
- ✧ CHO HCP 酶标抗体（100 $\times$ ）请在使用前快速离心，将管盖中残留的试剂甩到管底，防止试剂的污染和损失。
- ✧ 已稀释到工作浓度的校准品、CHO HCP 酶标抗体等因无法保证其稳定性，不建议再次重复使用。
- ✧ 显色液应是无色透明液体。吸取时务必更换干净的吸头，防止 HRP 污染。如发现已有淡蓝色，请弃用。
- ✧ 由于叠氮钠能抑制 HRP 活性，对检测结果有很大影响，因此样品中不能添加叠氮钠。

■ 常见问题分析

若实验结果出现异常，请及时对未使用的酶标板和试剂进行妥善保管，对显色的酶标板实验结果拍照，保留实验原始数据。联系我司技术支持为您解决问题。以下常见的异常现象及解决方法供您参考：

| 问题描述            | 可能原因                                                                                                                                                                                                | 解决方法                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 背景信号高           | <div>1. 稀释所用的水污染了 CHO HCPs;</div> <div>2. 配液所用移液器、吸头、离心管等耗材污染了 CHO HCPs;</div> <div>3. CHO HCP 校准品复溶、稀释过程中造成污染;</div> <div>4. 洗板操作不规范;</div> <div>5. 洗板次数不够，加液量不足，浸泡时间不足;</div> <div>6. 试剂错配。</div> | <div>1. 使用无菌或新制备的超纯水稀释;</div> <div>2. 移液器应专用，并使用无菌带滤芯吸头;</div> <div>3. 校准品复溶、稀释应规范，瓶（管）口切勿触碰移液器外壁，造成管间交叉污染;</div> <div>4. 手动洗板时移液器吸头应悬空，切勿触及管内液面;</div> <div>5. 严格按照说明书推荐的加液量、洗板次数和浸泡时间，切勿随意更改;</div> <div>6. CHO HCP 酶标抗体（100×）使用时未稀释 100 倍或稀释错误。</div>                                                                                  |
| 读数后某些孔 OD 值异常偏高 | <div>1. 手动洗板过程中，甩液不迅速，或反复多次甩板，造成孔间液体飞溅交叉污染;</div> <div>2. 手动洗板后，纸巾上拍干时操作不当或未更换新纸巾;</div> <div>3. 加样操作不当;</div> <div>4. 温育时未覆盖封板膜;</div> <div>5. 揭开封板膜时操作不当，导致孔内液体飞溅。</div>                          | <div>1. 手动洗板时，甩液应一次完成，快速彻底;</div> <div>2. 板子拍干用的纸巾是一次性用品，不得重复使用。在纸巾上拍干时，每拍一次更换一个新位置或新纸张，勿使拍痕重叠；若残留液体造成纸巾湿透，应弃去旧纸巾，重新铺就多层纸巾，每洗板一次拍干 4-5 次为宜;</div> <div>3. 加样应匀速加于微孔底部，防止加在孔壁上缘，飞溅造成邻近孔污染;</div> <div>4. 微孔板孵育时应覆盖封板膜防止液体蒸发和污染杂物;</div> <div>5. 揭开封板膜时，将微孔板平放在水平桌面上，用一只手的拇指和食指紧紧压在板子两侧防止移动，另一只手从一个角匀速揭开封板膜，过程中要始终保持板子不离开桌面，防止孔内液体飞溅。</div> |

## ■ 参考文献

- 《中国药典》2020 版三部,通则 3412,“大肠埃希菌菌体蛋白质残留量测定法”。
- 《美国药典》<1132> 章节,“Residual Host Cell Protein Measurement in Biopharmaceuticals”。
- 《欧洲药典》2.6.34 章节,“HOST-CELL PROTEIN ASSAYS”。
- YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)。

修订日期: 2023 年 11 月 30 日

生效日期: 2023 年 12 月 05 日

## 服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

[www.shenkebio.com](http://www.shenkebio.com)

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: [Info@shenkebio.com](mailto:Info@shenkebio.com)

电话: 400-878-2189