ExCell 依科赛

EIV12023

# ExCell Bio

# ResiQuant® *E. coli* HCP 残留检测试剂盒-Plasmid（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 CRH00-3041S
CRH00-3041
CRH00-3042

## 产品概述

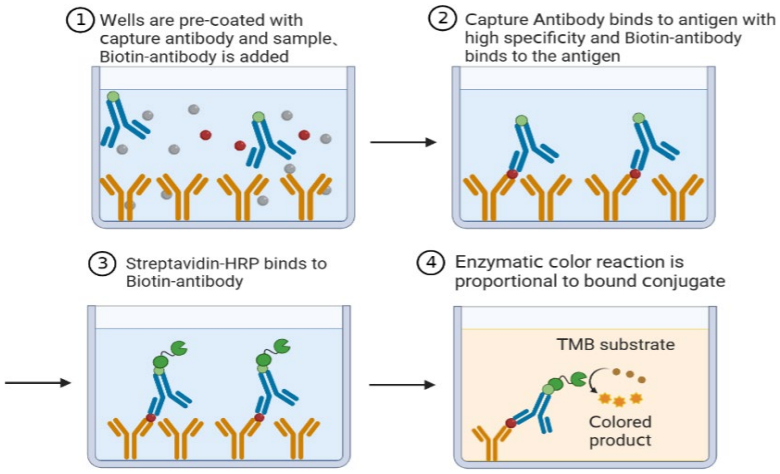
质粒是一种闭合环状的双链超螺旋 DNA 分子，广泛应用于疫苗制备及细胞基因治疗（CGT）领域，如 DNA 疫苗、裸质粒基因载体、腺相关病毒（AAV）和慢病毒载体等。通常质粒是以大肠杆菌（*E. coli*）为宿主进行生产，最有代表性的宿主菌是由大肠杆菌 K-12 所衍生出的 DH5α、Stbl3、Top10 等菌株。在质粒的生产及纯化过程可能会存在 *E. coli* 宿主细胞蛋白（*E. coli* HCP）残留的污染，这些残留 HCP 会给质粒后续应用带来风险，如在体内产生免疫反应，因此要对 *E. coli* HCP 的残留量进行控制。不同于常规的使用 *E. coli* 表达重组蛋白的工艺过程，质粒的生产纯化最常用工艺是碱裂解工艺。本试剂盒所采用的抗原是基于 *E. coli* 碱裂解工艺过程制备的变性 *E. coli* HCP，同时采用碱裂解工艺 *E. coli* HCP 免疫动物获得专属抗体。本产品适用于采用碱裂解工艺提取的质粒中间品、原液及终产品的 *E. coli* HCP 定量检测。

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 *E. coli* 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）和生物素化的抗 *E. coli* HCP 抗体，样本和校准品中的 *E. coli* HCP 会与加入于孔中的生物素化的抗 *E. coli* HCP 抗体及包被于酶标板上的抗体结合，形成免疫复合物，通过洗板，游离的成分被洗去；加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素，链霉亲和素与生物素特异性结合，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，*E. coli* 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样本中 *E. coli* HCP 浓度。

### 检测原理示意图：



## 产品性能

1. 灵敏度：*E. coli* HCP 检测下限（LOD）不高于 0.4 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. 特异性：与 CHO、Vero、HEK293 等宿主蛋白均无交叉反应。

## 产品应用

本产品是通用型检测试剂盒，适用采用碱裂解工艺提取的质粒中间品、原液及终产品的 *E. coli* HCP 定量检测。

## 产品规格

| 货号 | 品名 | 规格 |
|---|---|---|
| **CRH00-3041S** | ResiQuant® *E. coli* HCP 残留检测试剂盒-Plasmid（ELISA 法） | 48T |
| **CRH00-3041** | ResiQuant® *E. coli* HCP 残留检测试剂盒-Plasmid（ELISA 法） | 48T |
| **CRH00-3042** | ResiQuant® *E. coli* HCP 残留检测试剂盒-Plasmid（ELISA 法） | 96T |

## 产品组分及储存条件

| 名称 | 96 Tests | 48 Tests | 保存条件 |
|---|---|---|---|
| ***E. coli* HCP Standard** | 3 | 2 | 2-8℃ |
| ***E. coli* HCP Microplate** | 8× 12 | 8× 6 | 2-8℃ |
| ***E. coli* HCP 100× Biotin-Antibody** | 60 μL | 30 μL | 2-8℃ |
| **100× HRP-Streptavidin** | 120 μL | 60 μL | 2-8℃ |
| ***E. coli* HCP Assay Diluent** | 2× 25 mL | 25 mL | 2-8℃ |
| **20× Wash Buffer Concentrate** | 30 mL | 30 mL | 2-8℃ |
| **Substrate Solution** | 12 mL | 6 mL | 2-8℃（Light-Sensitive） |
| **Stop Solution** | 12 mL | 12 mL | 2-8℃ |
| **Plate sealer** | 3 | 2 | / |
| **User Manual** | 1 | 1 | / |

# 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570 nm或630 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。

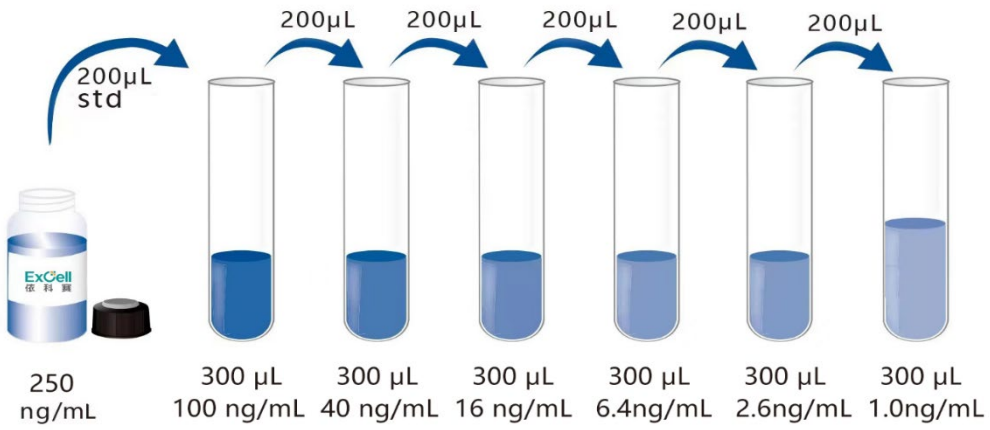
## 二、样本收集

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× 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. 校准品：冻干*E. coli* HCP Standard中加入*E. coli* HCP Assay Diluent稀释至250.0 ng/mL，振荡混匀，静置15分钟，待其充分溶解后，进行**2.5**倍稀释，形成如下浓度的校准点：250.0、100.0、40.0、16.0、6.4、2.6、1.0、0 ng/mL；

### 校准品稀释方法图例：




**注：**复溶校准品原液（250.0 ng/mL）若未用完请分装后放入-18 ℃及以下冰箱内保存，可保存两个月，已稀释的校准品请废弃。

4. 生物素化抗体工作液：按当次试验所需用量，用 *E. coli* HCP Assay Diluent 将 *E. coli* HCP 100× Biotin-Antibody 稀释 100 倍，配制成生物素化抗体工作液，使用前 30 分钟准备，仅供当日使用；
5. 酶结合物工作液：按当次试验所需用量，用 *E. coli* HCP Assay Diluent 将 100× HRP-Streptavidin 稀释 100 倍，配制成酶结合物工作液。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℃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、校准品及生物素化抗体工作液；
4. 将不同浓度校准品或样本分别加入相应孔中（0 ng/mL孔加 *E. coli* HCP Assay Diluent），50 μL/孔，随后将生物素化抗体工作液加入相应孔中，50 μL/孔，用封板胶纸封住反应孔。25℃振荡孵育60分钟，使用微量振荡器（500 rpm）；
5. 提前准备好酶结合物工作液；
6. 孵育结束后，甩尽ELISA板孔内液体，洗板5次；
7. 除空白孔外，加入酶结合物工作液100 μL/孔，用封板胶纸封住反应孔。25℃振荡孵育60分钟，使用微量振荡器（500 rpm）；
8. 甩尽孔内液体，洗板5次；
9. 加入Substrate Solution（包括空白孔）100 μL/孔，20-25℃，避光孵育15分钟；
10. 加入 Stop Solution（包括空白孔）100 μL/孔，混匀后立即用酶标仪测量 $OD_{450}$ 值（酶标仪设置双波长，检测波长 450nm，参考波长 570 nm 或 630 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、操作流程图

加入样本或不同浓度校准品（50 μL/孔），加入生物素化抗体工作液（50 μL/孔）
25℃，60分钟，500 rpm

↓

洗板5次

↓

加入酶结合物工作液（100 μL/孔），25℃，60 分钟，500 rpm

↓

洗板5次

↓

加入Substrate Solution（100 μL/孔），20-25℃，15 分钟（避光）

↓

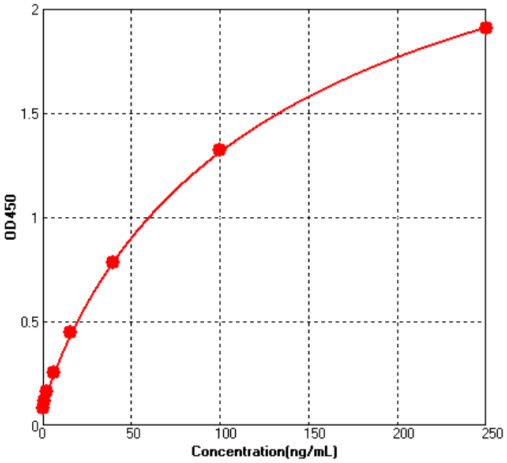
加入Stop Solution（100 μL/孔），读板

## 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，定量范围内的校准曲线各点的回算浓度与理论浓度的偏差应在20%以内，定量上限和下限两点的偏差在25%以内；
3. 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；
4. 样本浓度的计算应使用当次实验校准曲线。

### 示例数据：

| Standard (ng/mL) | $OD_{450-630}$ | | | 浓度（ng/mL） | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 250 | 1.918 | 1.958 | 1.851 | 253.2 | 270.3 | 227.5 |
| 100 | 1.283 | 1.394 | 1.278 | 95.2 | 113.1 | 94.5 |
| 40 | 0.784 | 0.811 | 0.754 | 39.6 | 41.8 | 37.1 |
| 16 | 0.444 | 0.462 | 0.429 | 16.2 | 17.2 | 15.3 |
| 6.4 | 0.241 | 0.263 | 0.247 | 5.9 | 6.9 | 6.2 |
| 2.6 | 0.162 | 0.163 | 0.155 | 2.7 | 2.7 | 2.4 |
| 1.0 | 0.116 | 0.121 | 0.117 | 1.0 | 1.2 | 1.0 |
| 0 | 0.075 | 0.089 | 0.075 | ------ | ------ | ------ |
| $r^2$ | 0.99982 | | | | | |




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。

## 备注

1. 试剂盒使用前请保存在2-8℃。除复溶后的标准品，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. 若需分次使用标准品，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分避免混用；
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. 酶免试验中标准品和样本建议至少做两重复。

## 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。