

Vero 细胞裂解型 HCP 残留检测试剂盒

（一步酶联免疫吸附法）

说明书

货号：1301309

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/3

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 产品名称

Vero 细胞裂解型 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

该试剂盒适用于定量检测细胞裂解工艺的各种生物制品的中间品、半成品和成品中 Vero 宿主细胞蛋白的残留。

该试剂盒仅供研究使用，不可用于诊断。

■ 检测原理

本试剂盒基于固相酶联免疫吸附法（Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA），采用双抗体夹心的方式对待测样品中残留 Vero HCPs 进行定量检测。

该分析方法通过在预包被抗 Vero HCPs 多克隆抗体的酶标板中加入校准品或待测样品、HRP 标记的抗 Vero HCPs 多克隆抗体进行共孵育；洗涤后，利用加入的 TMB 底物进行显色反应，最后使用终止液终止酶催化反应。利用酶标仪在 450 nm 和 620-650 nm（620-650 nm 区间内单一波长均可）波长下测读吸光度，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 HCPs 的浓度。

本试剂盒对实际样品无需进行特殊处理，仅需通过合适的稀释比例进行适用性验证即可直接使用。本试剂盒检测步骤少，快速，专一性强，性能稳定可靠。

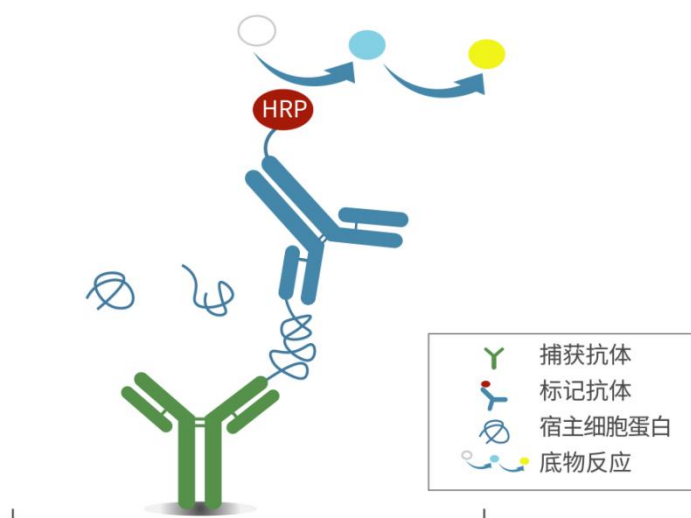


图 1. 检测原理示意图

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	规格	说明
Vero HCP 校准品	PNB012	2 瓶	冻干粉。精确量取 500 μ L 校准品复溶液，溶解，静置约 5 分钟，溶液应该澄清透明，无肉眼可见不溶物。应避光保存，产品信息详见标签。
抗 Vero HCP 预包被酶标板	PNA013	8 孔 $\times$ 12 条	已包被适量的绵羊抗 Vero HCPs 多克隆抗体，铝箔袋密封包装，含干燥剂。用后所余板条及时密封避光保存。酶标板部分孔壁可能会有结晶，属正常现象，无需特殊处理。
校准品复溶液	PNC002	1.5 mL $\times$ 1 管	澄清透明溶液，专用于溶解 Vero 校准品。
稀释液	PNE004	25 mL $\times$ 2 瓶	用于校准品、待检样品和酶标抗体的稀释。对初次检测的样品，需进行样品适用性验证，以确定最佳稀释倍数。
浓缩缓冲液 (10 $\times$)	PNF001	25 mL $\times$ 2 瓶	低温时易产生结晶，使用前可在 37 $^{\circ}$ C 水浴中溶解后用新鲜制备的超纯水稀释 10 倍，即为 1 $\times$ 缓冲液，用于洗板。
Vero HCP 酶标抗体 (100 $\times$)	PNN007	120 μ L $\times$ 1 管	经 HRP 标记的抗 Vero HCPs 绵羊多抗，使用前用稀释液稀释 100 倍。应避光保存。
TMB 显色液	PND005	12 mL $\times$ 1 瓶	使用前平衡于室温 20 分钟以上，应避光保存。
终止液	PNI002	6 mL $\times$ 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，具体详见试剂盒标签。

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 30 天。
复溶校准品	溶解后的校准品请在 -18 °C 及以下保存，反复冻融不超过 3 次。

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 稀释用的无菌离心管
- 移液器配套用枪头
- 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

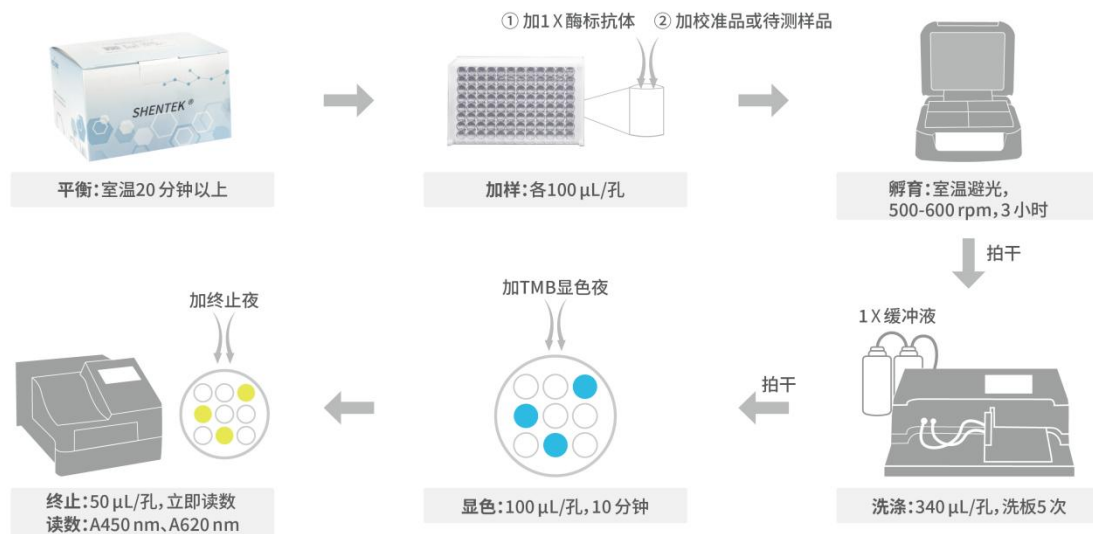


图 2. 操作流程示意图

一、试剂、仪器准备

(一) 实验前准备

1. 取出试剂盒, 于室温平衡约 20 分钟; 使用后立即放回 2-8 °C 保存。
2. 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, 于效期内使用完。

备注: 室温指 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

(二) 试剂配制

1. Vero HCP 校准品溶解: 精确量取 500 µL 校准品复溶液, 溶解校准品, 轻柔颠倒混匀, 静置 5 分钟, 得到复溶校准品。

备注: 根据标签信息计算复溶校准品浓度后再进行梯度稀释。若需同时使用多瓶校准品, 请分别溶解后转移至 1.5 mL 无菌离心管, 振荡混匀后使用; 若每瓶复溶校准品涉及多次冻融, 建议采用 1.5 mL 无菌离心管酌量分装后保存于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下。

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, 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℃温育直至完全溶解。

3. 1×Vero HCP 酶标抗体配制：用稀释液于无菌离心管中将 Vero HCP 酶标抗体（100×）稀释 100 倍，轻轻颠倒混匀，即为 1×Vero 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。

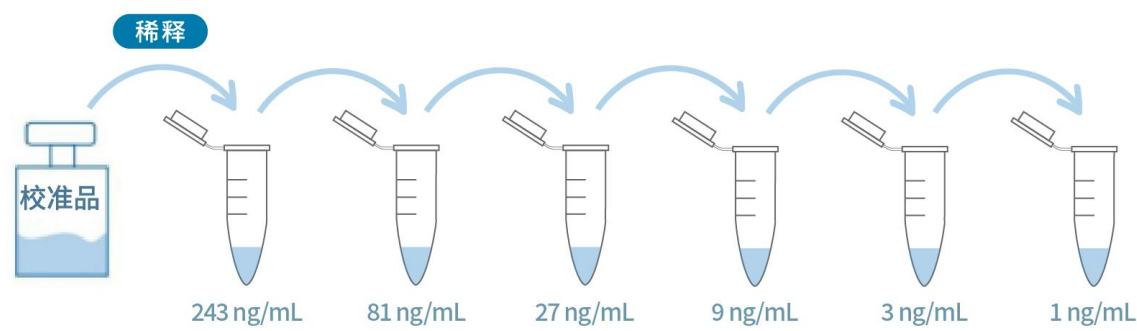


图 3. 校准品稀释操作示例

表 3. 系列校准品梯度稀释

校准曲线样品	加样	浓度(ng/mL)
ST1	复溶校准品用稀释液稀释到 ST1 浓度	243
ST2	300 μL ST1 溶液 + 600 μL 稀释液	81
ST3	300 μL ST2 溶液 + 600 μL 稀释液	27
ST4	300 μL ST3 溶液 + 600 μL 稀释液	9
ST5	300 μL ST4 溶液 + 600 μL 稀释液	3
ST6*	300 μL ST5 溶液 + 600 μL 稀释液	1
NCS（阴性对照）	稀释液	0

*ST6 (1 ng/mL)作为锚定点参与校准曲线的拟合，但在方法学验证中对其浓度 CV 及相对偏差不做要求。

二、样品准备

- 样品：表达纯化工艺过程样品，原液等。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℃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。

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 1× Vero HCP 酶标抗体：取适量 1× Vero 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 μL/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 μL 系列校准品溶液、阴性对照（NCS）、待测样品加入相应微孔板中。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	NCS	NCS	NCS		S1	S1	S1					
B					S2	S2	S2					
C	ST6	ST6	ST6		S3	S3	S3					
D	ST5	ST5	ST5		S1+SRC	S1+SRC	S1+SRC					
E	ST4	ST4	ST4		S2+SRC	S2+SRC	S2+SRC					
F	ST3	ST3	ST3		S3+SRC	S3+SRC	S3+SRC					
G	ST2	ST2	ST2									
H	ST1	ST1	ST1									

- ✧ 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（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) 洗涤、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 μ L/孔加入上述微孔板中，于室温避光温育 10 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 μ L/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_{450 nm} 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（NCS）的 OD 值后，重复孔取均值。
3. 分别以校准点浓度值和经步骤 2 处理后的 OD 均值作为 X 轴和 Y 轴参数进行曲线拟合，获得校准曲线方程。建议优先采用四参数拟合。校准曲线的拟合可以使用酶标仪自带的软件。如无，则建议采用专业的校准曲线拟合软件，如 Curve Expert，ELISA Calc 等。
4. 将样品的 OD 均值作为 Y 值代入步骤 3 获得的方程，回算 X 值计算样品浓度。

（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，则样品中 HCPs 抗原浓度值=稀释后测定值×稀释倍数。若同时设

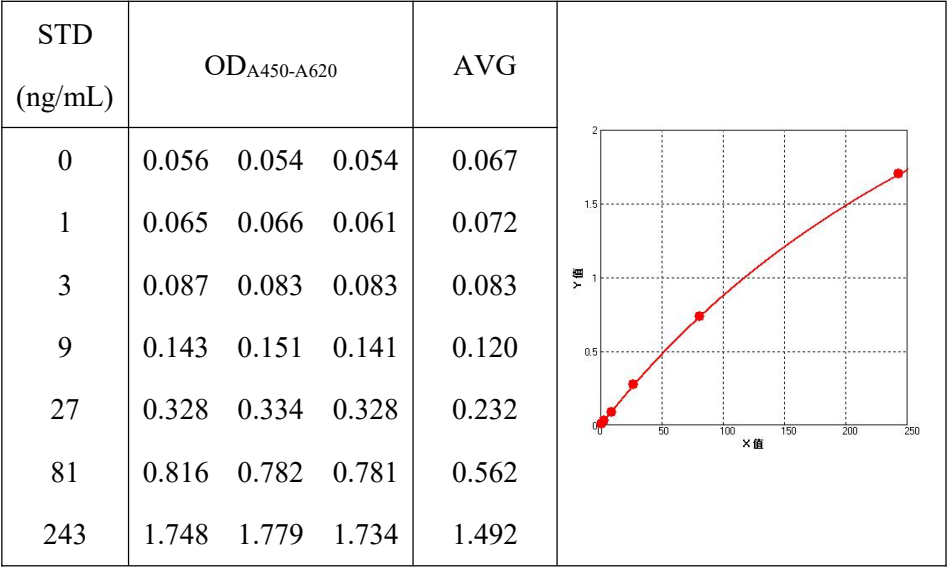
置在该稀释度下的适宜加标样品，回收率符合相应法规的方法学验证要求。

（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. 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：3-243 ng/mL，线性相关系数 $R^2 \geq 0.990$ 。
- 2. QL：3 ng/mL。
- 3. 特异性：与 Sf9、*E.coli*、毕赤酵母等工程细胞基质宿主蛋白无交叉反应。
- 4. 典型校准曲线及其数据如下：



■ 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。
- ✧ 加样时将样品加于酶标板底部，尽量不接触孔壁。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 μ 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 μ L，防止结果出现较大的误差。
- ✧ Vero 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、1 $\times$ Vero 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	1. 共耗污染，如试剂、仪器、环境等； 2. Vero HCP 校准品稀释过程中造成污染； 3. 洗板操作不规范，如洗板次数不够，加液量不足，浸泡时间不足； 4. 试剂错配。	1. 共耗试剂应现用现配，共耗仪器使用前后应及时清洁； 2. 校准品稀释应规范，瓶（管）口切勿触碰移液器外壁，造成管间交叉污染； 3. 手动洗板时移液器吸头应悬空，切勿触及管内液面； 4. 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； 5. Vero HCP 酶标抗体（100×）使用时未稀释或稀释错误。
实验结果与参考性能参数相差较大	1. 试剂过期； 2. 实验过程未严格按照说明书进行。	1. 确认试剂盒及其各组分在有效期内，若已过期，请联系销售/采购部门更换； 2. 实验前需对实验人员进行实操培训，保证实验顺利； 3. 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。
复孔间平行性较差	1. 移液失误； 2. 移液枪精度差； 3. 边缘孔效应引起的不均一性。	1. 进行回顾性审查或进行验证实验，确认各试剂加样量准确、均一； 2. 对移液设备进行定期校准和测试； 3. 更换布局方式，或避免使用边缘孔保证实验的准确性； 4. 强烈建议对各样本做三重复以上。若同一样本出现异常值，可采用适合的异常值剔除方法去除异常值后进行数据处理。

■ 参考文献

- 《中国药典》9101 分析方法验证指导原则
- FDA. Bioanalytical Method Validation
- ICH Q2 (R2) Validation of Analytical Procedures
- USP<1132> Residual Host Cell Protein Measurement in Biopharmaceuticals
- USP<1103> Immunological Test Methods-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)
- Ph.Eur. <2.6.34> Host-Cell Protein Assays
- JP<G3-9-172> Host Cell Protein Assay

修订日期: 2025 年 09 月 25 日

生效日期: 2025 年 10 月 09 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 400-878-2189