

## resDetect™ 通用型 Protein A ELISA 快速检测试剂盒(免煮)

货号: RES-A029

规格: 96 tests

### 产品用途

本通用型 Protein A ELISA 试剂盒是用于定量检测重组 Protein A 和各种非天然 Protein A (如耐碱性重组 Protein A)的即用试剂盒。该试剂盒适用于市面上几乎所有具有不同 Protein A 突变体的 Protein A 层析树脂的残留检测。本通用型 Protein A ELISA 试剂盒提供了一种有效分离 IgG 样本和 Protein A 的方式, 无需煮沸和离心处理, 操作简单, 有效解决了煮沸方式检测某些样本回收率低的问题, 同时将样本处理时间缩短了 1 个多小时。

本试剂盒仅供科研使用, 不能用于人类或动物的临床诊断。

### 试剂盒特点

- 高回收率 - 通过优化样本解离过程, 确保抗体药物与 Protein A 彻底分离, 即使对一些难解离的样本也能获得满意的回收率;
- 普适性 - 适用于检测天然或结构保守的重组 Protein A 和耐碱性 Protein A 突变体, 如 MabSelect SuRe™、MaXtar® ARPA ligand (百林科 Bio-Link)、UniMab® 50 Protein A (苏州纳微科技股份有限公司)、MabSelect PrismA™ 和其他配基;
- 快速 - 2 小时内完成检测。
- 高效的样本处理方式 - 将原先样本煮沸的处理方式改为加变性试剂处理样本, 使样本处理时间缩短了一个多小时。
- 准确性 - Protein A 标准品按照药典方法进行严格定量和溯源, 通过中检院牛血清白蛋白 (BSA) 中国国家标准 (NIFDC 代码:140619) 进行严格定量, 具有可追溯性;
- 高灵敏度 - 重组 Protein A 和耐碱性 Protein A 突变体灵敏度 < 40 pg/mL;
- 高浓度 IgG 耐受性 - 准确定量高达 20 mg/mL 抗体中的 Protein A 水平;
- 良好的缓冲液兼容性 - 可兼容于各类缓冲体系;
- 严格的方法学验证 - 全方位验证了试剂盒的特异性、灵敏度、精密度、准确度、适用性等性能;

### 背景介绍

Protein A 是一种来自于金黄色葡萄球菌的细胞壁蛋白, 具有多种特定的生物学特性。由于它与某些免疫球蛋白 (特别是 IgG) 的 Fc 部分有很高的亲和力, 从而被广泛应用于生物制药 (如抗体、疫苗等) 的纯

化过程中。但是在纯化过程中，Protein A 可能会从纯化柱中脱落，导致制备的抗体药物受到污染，残留的 Protein A 一旦进入人体，很容易激活机体的免疫反应，存在安全隐患，所以对抗体药物制剂中 Protein A 的可接受的残留水平有严格的规定。因此，对从 Protein A 纯化柱中纯化出的抗体制剂中残留的 Protein A 的检测，是抗体药物制剂生产过程中关键的质量控制步骤。

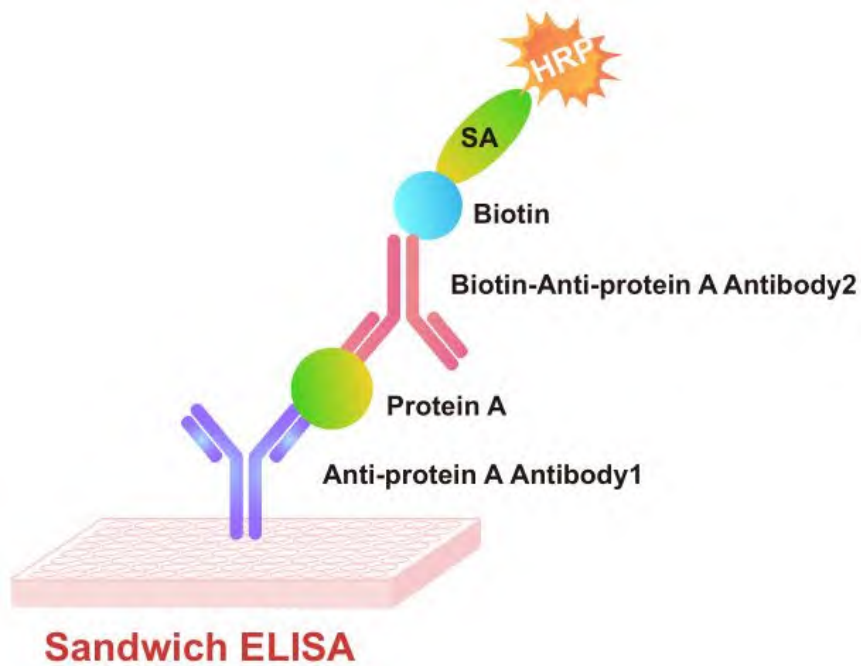
本试剂盒可在 2 小时内完成重组 Protein A 或各种非天然 Protein A 突变体的定量检测，将原先将样本煮沸的处理方式改为加变性试剂处理样本，灵敏度高，且使用方便，样本处理时间缩短了一个多小时。无论在上游的小规模试验还是下游的大规模抗体生产过程中，本试剂盒都可以帮助您准确分析样品，监测 Protein A 的水平，确保产品质量。

## 应用说明

本试剂盒用于检测天然或结构保守的重组 Protein A，以及生物工艺制造应用中的耐碱性重组 Protein A 如 MabSelect SuRe™，MaXtar® ARPA ligand (百林科 Bio-Link)，UniMab® 50 Protein A (苏州纳微科技股份有限公司)，MabSelect Prisma™。本试剂盒被用作一种通用型的重组 Protein A 和非天然 Protein A 突变体的检测工具，可以帮助优化抗体纯化工艺，并可以作为中间产物和终产品的常规质量控制工具。

## 检测原理

本通用型 Protein A ELISA 试剂盒基于 ELISA 夹心法原理检测重组 Protein A 或各种非天然 Protein A 突变体的残留。微孔板预先包被了 Anti-protein A polyclonal antibody。首先，将试剂盒提供的标准样品和待测样品使用试剂盒中提供的变性缓冲液进行变性处理，使蛋白 A 和抗体解离，静置几分钟。在预包板上先加入 Biotin-Anti-protein A antibody，再加入变性处理后的 Protein A 标准品和待测样品，确保二抗缓冲液能中和变性处理后的 Protein A 标准品和待测样品，从而保护预包板上的 Protein A 抗体。孵育后形成抗体+抗原+生物素化抗体的复合物，洗板后接着加入 Streptavidin-HRP，孵育洗板，以去除任何未结合的反应物。最后，加入四甲基联苯胺 (TMB) 底物进行显色反应，板孔内溶液变成蓝色。随后用终止液终止反应，板孔中溶液会由蓝色变为黄色。使用酶标仪在 450 nm 和 630 nm 处测定样品吸光度值 (OD<sub>450 nm</sub>、OD<sub>630 nm</sub>)，OD 值与样本中的 Protein A 含量呈正相关。



### 试剂盒组分

货号	组分名称	规格 (96 tests)	存储条件
RES029-C01	Pre-Coated Anti-Protein A Antibody Microplate	1 plate	2-8°C
RES029-C02A	Alkali-tolerant Recombinant Protein A Standard (1 µg/mL) 耐碱的重组蛋白 A 标准品 (1 µg/mL)	100 µL	2-8°C
RES029-C02B	MaXtar® ARPA ligand Protein A Standard (Bio-Link Co.) (1 µg/mL) MaXtar® ARPA ligand 蛋白 A 标准品 (百林科 Bio-Link) (1 µg/mL)	100 µL	2-8°C
RES029-C02C	Recombinant Prisma Standard (1 µg/mL) 重组 Prisma 标准品 (1 µg/mL)	100 µL	2-8°C
RES029-C03	Recombinant Protein A Standard (1 µg/mL) 重组蛋白 A 标准品 (1 µg/mL)	100 µL	2-8°C
RES029-C04	Biotin-Anti-Protein A Antibody	1.5 mL	2-8°C
RES029-C05	Streptavidin-HRP	10 µg	2-8°C, 避光
RES029-C06	10×Sample Dilution Buffer	15 mL	2-8°C
RES029-C07	Denaturation Buffer	15 mL	2-8°C
RES029-C08	20×Washing Buffer	30 mL	2-8°C

RES029-C09	Antibody Dilution Buffer	15 mL	2-8°C
RES029-C10	Streptavidin-HRP Dilution Buffer	15 mL	2-8°C
RES029-C11	Substrate Solution	12 mL	2-8°C, 避光
RES029-C12	Stop Solution	8 mL	2-8°C

### 未提供的必需物料和设备

物料名称	描述
单道、多道微量移液器	需满足 10 $\mu$ L、300 $\mu$ L、1000 $\mu$ L 加样需求
移液器吸头	应与移液器适配
EP 管	1.5 mL, 10 mL, 用于稀释样品
试剂瓶	用于稀释洗液, 通常建议用 500 mL, 1 L 规格的试剂瓶
蒸馏水或去离子水	用于稀释溶液, 将 20 $\times$ Washing Buffer 稀释为 1 $\times$ Washing Buffer
计时器	用于计时控制实验时间
恒温箱	用于微孔板的孵育反应, 如果室温达不到 20-25°C, 建议将微孔板放在 25°C 恒温箱里进行孵育反应
微孔板振荡器	用于微孔板的振荡孵育反应
微孔板读数仪器 (酶标仪)	含 450 nm / 630 nm 波长的单波长或双波长酶标仪, 450 nm 和 630 nm 过滤器 (如果酶标仪不提供双波长分析, 可以只在 450 nm 波长下测定吸光度)

### 储存条件

1. 未开封: 试剂盒保存于 2-8°C。
2. 已开封: 试剂盒开封后各组分按照“试剂盒组分”表存贮条件保存, 有效期自开封之日起为 30 天, 未使用完的微孔板条需与干燥剂一起密封保存。

**注:** 1) 不要使用过期试剂。

2) 试剂盒有效期见外包装盒标签。

### 注意事项

1. 本试剂盒仅供科研使用, 不可用于体外诊断或治疗应用。
2. 实验时, 穿戴适当的个人防护服, 请小心避免试剂接触皮肤、眼睛和衣物。如不慎接触皮肤, 请立即用水冲洗。如有需要, 请咨询医生。

3. 请在试剂盒有效期内使用。
4. 不同试剂盒及不同批号试剂盒的组分不能混用。
5. HRP 标记物的活性容易受到叠氮化物、氰化物和羟胺等亲核试剂的影响。
6. 如果样品的测值高于标准曲线的最高浓度值，用试剂盒中提供的稀释缓冲液稀释样品并重复测定。
7. 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。

## 实验前准备

### 1. 实验环境准备

为了确保实验的准确性，实验环境要求操作过程不引入额外的抗体或者 protein A，实验操作在洁净实验台上进行，请准备洁净的实验台和所需的工具等。

### 2. 设备和工具准备

- 1) 参考第 2 页的“[未提供的必需物料和设备](#)”表，准备实验所需的设备、工具、试剂瓶以及其他器具。
- 2) 彻底清洗抗体包被板以去除多余的未反应试剂，对于良好的检测重现性和灵敏度至关重要。如果你有一台自动洗板机来清洗板子，这将节省洗涤时间，加快实验速度。如果没有自动洗板机，你可以用多通道移液器手动清洗板子。彻底的洗涤程序通常提供更低的背景，更高的特异性结合信号和更好的精密度。

## 试剂准备

1. 取出试剂盒，在使用前将所有试剂和样品平衡至室温(20°C-25°C)，检查每个缓冲液和标准溶液清澈透明，确保这些溶液混合均匀。

**注：RES029-C07 组分在低温（2-8°C）下不澄清，RES029-C06（2-8°C）在低温下容易结晶，所以必须确保这两个组分完全恢复至室温，直至液体澄清透明。**

2. 按照下表中的建议，用无菌去离子水将试剂盒中的冻干组分重构成储备液，在室温下溶解 15-30 分钟，轻轻混合，不要剧烈摇晃或漩涡，重构后的储备液应储存在-70°C的温度下，避免反复冻融。

**注：链霉亲和素 HRP 储备液要避光。**

货号	组分名称	规格	重构浓度	重构溶液及体积
RES029-C05	Streptavidin-HRP	10 µg	100 µg/mL	100 µL water

## 实验过程

1. 准备 **1×Washing Buffer**: 用蒸馏水或去离子水稀释 20×Washing Buffer 制备 1×Washing Buffer。

计算所需的 1×Washing Buffer 的体积,例如,当需要 1 L 1×Washing Buffer 时,将 50 mL 20×Washing Buffer 加入到 950 mL 蒸馏水或去离子水中。建议按实验用量配制所需的 1×Washing Buffer, 最好当天用完。

2. 准备 **1×Sample Dilution Buffer**: 用蒸馏水或去离子水稀释 10×Sample Dilution Buffer 制备 1×Sample Dilution Buffer。

计算所需的 1×Sample Dilution Buffer 的体积,例如,当需要 100 mL 1×Sample Dilution Buffer 时,将 10 mL 10×Sample Dilution Buffer 加入到 90 mL 蒸馏水或去离子水中。建议按实验用量配制所需的 1×Sample Dilution Buffer, 最好当天用完。

### 3. 准备 protein A 标准品

本 Protein A ELISA 试剂盒可用于重组 Protein A 和非天然 Protein A(如耐碱重组 Protein A 和重组 Prisma) 在中性溶液中的定量检测, 试剂盒里含有一系列不同类型的 Protein A 标准品, 请根据你的纯化过程选用的亲和树脂类型选择对应的标准品建立标准曲线。

对于 Mabselect SuRe™ 或其他类似的耐碱树脂, 例如苏州纳微科技股份有限公司的 UniMab® 50 Protein A, 建议直接使用本试剂盒中耐碱重组 Protein A 标准品(RES029-C02A)建立标准曲线。

对于 MaXtar® ARPA ligand (Bio-Link Co.)树脂, 建议直接使用本试剂盒中 MaXtar® ARPA ligand Protein A 标准品 (RES029-C02B)建立标准曲线。

对于 MabSelect Prisma™ 树脂, 建议直接使用本试剂盒中重组 Prisma 标准品 (RES029-C02C)建立标准曲线。

如果您使用本试剂盒中未包含的其他种类的 Protein A 突变类型的亲和层析树脂用于抗体纯化, 建议从纯化树脂供应商处获取对应的 Protein A 突变体标准品配基蛋白溶液, 作为定量标准品, 并在推荐条件下保存, 使用时按照试剂盒说明书稀释至标准曲线的浓度范围进行定量。如果纯化树脂供应商无法提供对应的 Protein A 配基标准品蛋白溶液, 您可以选择当前试剂盒中与之最接近的 Protein A 标准品用于标准曲线建立和检测。

根据实验方法, 每孔需要 25  $\mu$ L 标准溶液, 用 1×Sample Dilution Buffer 梯度稀释 1  $\mu$ g/mL 的 protein A 标准品储备母液, 制备标准曲线标准品。

#### 注:

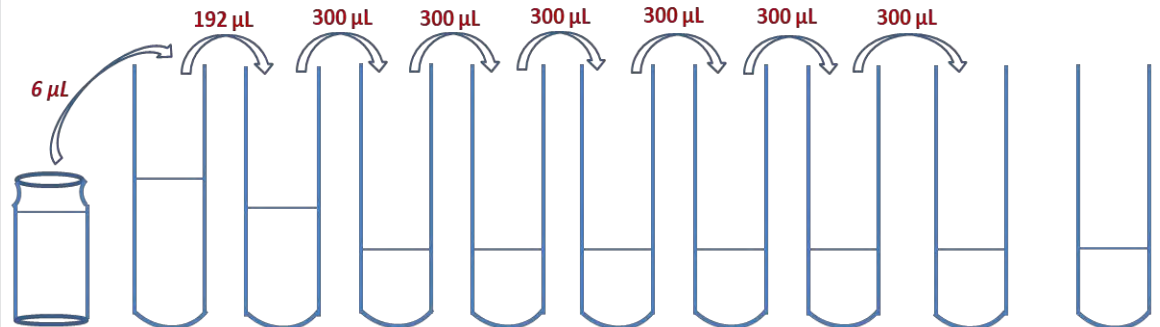
a. 稀释后的标准品应在配制后 30 分钟内使用;

b. 所有稀释的标准品必须使用本试剂盒中的变性试剂（RES029-C07）进行变性解离处理。有关详细处理过程信息，请参见“样品准备”的步骤；

c. 为了防止任何粘壁，我们建议每次稀释到下个梯度时更换枪头。

**建议 protein A 标准品稀释过程如下步骤所示：**

- (1) 根据你的样本类型选择试剂盒中对应的标准品；
  - (2) 将 protein A 标准品平衡至室温，protein A 标准品的初始浓度是 1  $\mu\text{g/mL}$ ；
  - (3) 用 1 $\times$ Sample Dilution Buffer 将 1  $\mu\text{g/mL}$  protein A 标准储备溶液稀释 100 倍至 10  $\text{ng/mL}$  (Stock1)；
  - (4) 用 1 $\times$ Sample Dilution Buffer 将 10  $\text{ng/mL}$  标准储备溶液 (Stock1) 稀释 3.125 倍至 3.2  $\text{ng/mL}$ ，此浓度为重组 Prisma 标准品 (RES029-C02C)标准曲线的最高浓度点 (Std 7: 3.2  $\text{ng/mL}$ )；
  - (5) 用 1 $\times$ Sample Dilution Buffer 将 3.2  $\text{ng/mL}$  (Std 7) 稀释 2 倍至 1.6  $\text{ng/mL}$ ，此浓度为耐碱重组 Protein A 标准品(RES029-C02A)、MaXtar® ARPA ligand Protein A 标准品(RES029-C02B)和重组 Protein A 标准品(RES029-C03)标准曲线的最高浓度点 (Std 6: 1.6  $\text{ng/mL}$ )；
  - (6) 使用 1.6  $\text{ng/mL}$  浓度点 2 倍梯度稀释制备标准曲线，如下所示（以标品每个浓度点稀释体积为 600  $\mu\text{L}$  为例），每一步稀释后，标准品的剩余体积应不小于 0.1  $\text{mL}$ ；
- 在 Std 5 到 Std 1 的管中分别加 300  $\mu\text{L}$  1 $\times$ Sample Dilution Buffer；
  - 加 300  $\mu\text{L}$  Std 6 到 300  $\mu\text{L}$  1 $\times$ Sample Dilution Buffer 中，轻轻混匀并重复连续梯度稀释，得到：Std 5, Std 4, Std 3, Std 2, Std 1，从而制成 7 个 protein A 标准液；
  - Std 0 (阴性对照) 是 1 $\times$ Sample Dilution Buffer。

Tubes/ Solution Code	Protein A Stock Solution	Stock 1	Std7	Std 6	Std 5	Std 4	Std 3	Std 2	Std 1	Std 0 (Blank)
Operating										
Solution Conc.	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\text{ng/mL}$	3.2 $\text{ng/mL}$	1.6 $\text{ng/mL}$	0.8 $\text{ng/mL}$	0.4 $\text{ng/mL}$	0.2 $\text{ng/mL}$	0.1 $\text{ng/mL}$	0.05 $\text{ng/mL}$	0 $\text{ng/mL}$
Dilution Buffer Vol.		594 $\mu\text{L}$	408 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$

标准品 ID	稀释倍数	稀释过程	浓度
Stock solution (Stock1)	100	6 $\mu$ L 1 $\mu$ g/mL Protein A Stock Solution + 594 $\mu$ L 1 $\times$ Sample Dilution Buffer	10 ng/mL
Standard 7	3.125	192 $\mu$ L Stock1 + 408 $\mu$ L 1 $\times$ Sample Dilution Buffer	3.2 ng/mL
Standard 6	2	300 $\mu$ L Standard 7 + 300 $\mu$ L 1 $\times$ Sample Dilution Buffer	1.6 ng/mL
Standard 5	2	300 $\mu$ L Standard 6 + 300 $\mu$ L 1 $\times$ Sample Dilution Buffer	0.8 ng/mL
Standard 4	2	300 $\mu$ L Standard 5 + 300 $\mu$ L 1 $\times$ Sample Dilution Buffer	0.4 ng/mL
Standard 3	2	300 $\mu$ L Standard 4 + 300 $\mu$ L 1 $\times$ Sample Dilution Buffer	0.2 ng/mL
Standard 2	2	300 $\mu$ L Standard 3 + 300 $\mu$ L 1 $\times$ Sample Dilution Buffer	0.1 ng/mL
Standard 1	2	300 $\mu$ L Standard 2 + 300 $\mu$ L 1 $\times$ Sample Dilution Buffer	0.05 ng/mL
Standard 0	-	300 $\mu$ L 1 $\times$ Sample Dilution Buffer	0 ng/mL

#### 4. 准备样品

每种样品和标准品各取至少 100  $\mu$ L 到离心管中，每管加入 50  $\mu$ L 变性缓冲液即 Denaturation Buffer (RES029-C07)，上下吹吸混匀 15 次左右或在漩涡混匀器上混匀，每管混匀都要换新枪头，静置 5-10 分钟。

**注：应测定每个待测样品的回收率。**

- 1) 所有浓度高于最高标准的样品必须稀释，或者添加的 Protein A 和来自样品本身的内源性 Protein A 的总浓度高于标准曲线最高值，也需要将样品稀释到合理的浓度，另外若待测样品中含有干扰成分，也需要稀释以减少干扰；
- 2) 当样品需要被稀释时，用试剂盒提供的 1 $\times$ Sample Dilution Buffer 稀释样品，得到可接受的背景值，而不是引入 Protein A 杂质的信号，样品稀释应在样品变性步骤之前进行，以获得最佳结果；
- 3) 稀释后的样品在加标已知含量的 Protein A 时也应具有可接受的回收率，当回收率在 80%~120% 范围内时，说明稀释后样品的检测值是可靠的；
- 4) 本回收率测试实验可在样品中加入超出线性范围一定浓度的 Protein A，然后将样品稀释到合理范围，进行测试，也可以将本试剂盒提供的浓度在线性范围内的标准品加入到待测样品中，例如，在 1 份 2 mg/mL 的测试样品中加入 1 份 0.8 ng/mL, 0.4 ng/mL, 0.2 ng/mL 标准品，这将产生 0.4 ng/mL, 0.2 ng/mL, 0.1 ng/mL 的附加浓度值，任何来自样品本身的内源性 Protein A 在加标前也应进行测定，并通过该样品的 50% 稀释进行校正，应从加标样品确定的值中减去，并计算 Protein A 的浓度以给出回收率。如果样品本身的 Protein A 浓度超过最高标准，则先将样品稀释至线性范围浓度，再加入标准品进行回收测试。



样品回收测试 ID	样品稀释 倍数	样品和标准品体积	样品 最终浓度	Protein A 最终浓度
Sample 1-R1	2	150 $\mu$ L Standard 5 + 150 $\mu$ L test sample	1 mg/mL	0.4 ng/mL
Sample 1-R2	2	150 $\mu$ L Standard 4 + 150 $\mu$ L test sample	1 mg/mL	0.2 ng/mL
Sample 1-R3	2	150 $\mu$ L Standard 3 + 150 $\mu$ L test sample	1 mg/mL	0.1 ng/mL
Sample 2-R1	4	150 $\mu$ L Standard 5 + 150 $\mu$ L Sample 1	0.5 mg/mL	0.4 ng/mL
Sample 2-R2	4	150 $\mu$ L Standard 4 + 150 $\mu$ L Sample 1	0.5 mg/mL	0.2 ng/mL
Sample 2-R3	4	150 $\mu$ L Standard 3 + 150 $\mu$ L Sample 1	0.5 mg/mL	0.1 ng/mL

### 5. 准备 Biotin-Anti-Protein A Antibody 工作液

每孔需要 100  $\mu$ L Biotin-Anti-Protein A Antibody 工作液。根据实验中的孔数计算 Biotin-Anti-Protein A Antibody 工作液所需的总体积，用抗体稀释液 Antibody Dilution Buffer (RES029-C09)将试剂盒提供的 Biotin-Anti-Protein A Antibody 储液稀释 10 倍。例如，当实验孔数是 96 孔时，则需要 9.6 mL Biotin-Anti-Protein A Antibody 工作液，可以配制 11 mL 工作液以确保有一定的安全余量，将 1100  $\mu$ L Biotin-Anti-Protein A Antibody 储液加入到 9900  $\mu$ L Antibody Dilution Buffer 中。请参考以下表格方法配制溶液：

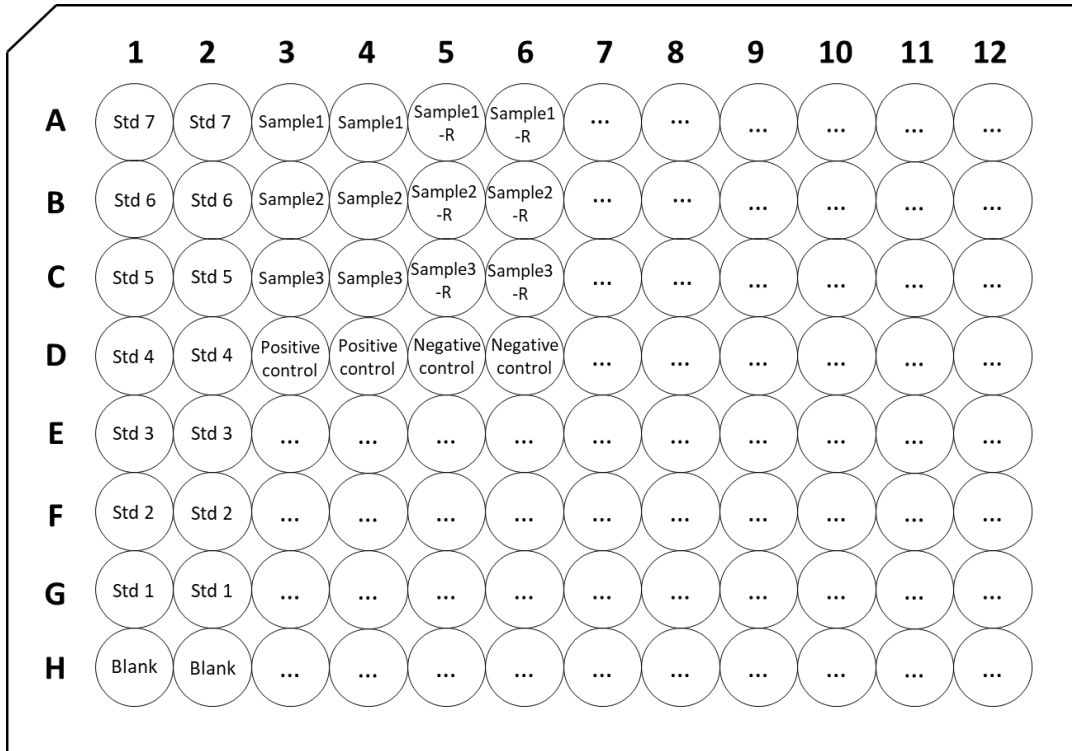
Tests	工作液体积	Biotin-Anti-Protein A Antibody 储液	Antibody Dilution Buffer
96 Tests	11000 $\mu$ L	1100 $\mu$ L	9900 $\mu$ L

### 6. 取出预包被的 Pre-coated Anti-Protein A Antibody 微孔板，平衡板子至室温，按要求将上述制备好的样品、protein A 标准品和 Biotin-Anti-Protein A Antibody 工作液加入板孔中：

向 96 孔板中每孔先加入 100  $\mu$ L 的 Biotin-Anti-Protein A Antibody 工作液，再加 25  $\mu$ L 样品或 protein A 标准品，用封板膜封板，在室温（20°C-25°C）震荡（400-600 rpm）孵育反应 1 小时。

实验中，建议标准曲线每个浓度点和待测样本均做复孔，如果需要加入自己的阳性参考品、阴性参考品，阳性对照的测定孔数应不小于 1 个，阴性参考品的测定孔数应不小于 2 个。

**注：所有标准品、质控品和待测样品，应在同一个板子内，并进行相同的处理。**



**7. 洗板**

彻底的清洗对实验得到正确结果至关重要。根据自己的实验条件选择自动洗板系统或手动洗板程序。

小心揭开封板膜，弃去孔中液体，每孔加入 300  $\mu$ L 1  $\times$  Washing Buffer，轻轻敲击板 1 分钟后，弃去孔中的 1 $\times$  Washing Buffer，每次洗板后，在无绒毛吸水纸上拍干板子，请注意，必须完全去除洗涤缓冲液。

重复上面的清洗步骤共 3 次。

**8. 加入 Streptavidin-HRP Solution**

根据实验中的孔数计算 Streptavidin-HRP 工作液所需的总体积，用 Streptavidin-HRP 稀释液 Streptavidin-HRP Dilution Buffer (RES029-C10)将重构后的 Streptavidin-HRP 储液稀释 500 倍。例如，当实验孔数是 96 孔时，则需要 9.6 mL Streptavidin-HRP 工作液，可以配制 11 mL 工作液以确保有一定的安全余量，将 22  $\mu$ L Streptavidin-HRP 储液加入到 10978  $\mu$ L Streptavidin-HRP Dilution Buffer 中。请参考以下表格方法配制溶液。每孔加入 100  $\mu$ L Streptavidin-HRP 工作液，用封板膜将微孔板封好，在室温 (20 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C) 震荡 (400-600 rpm) 孵育反应 30 分钟。

实验 Tests	工作液体积	Streptavidin-HRP 储液	Streptavidin-HRP Dilution Buffer
96 Tests	11000 $\mu$ L	22 $\mu$ L	10978 $\mu$ L

**9. 洗板**

重复步骤 7 洗板。

## 10. 显色

每孔加入 100  $\mu$ L Substrate Solution。用封板膜封板，需避光，室温(20°C-25°C)孵育 20 分钟，不要震荡。

## 11. 终止

每孔加入 50  $\mu$ L Stop Solution，轻轻震荡酶标板至混合均匀。

**注：**孔中液体的颜色应由蓝色完全变为黄色。

## 12. 读数

用酶标仪测定各孔在 450 nm 和 630 nm 波长的吸光值，请在终止后 10 分钟内读数。

**注：**各孔  $OD_{450\text{ nm}}$  扣除  $OD_{630\text{ nm}}$  读值可降低背景干扰。

## 结果分析

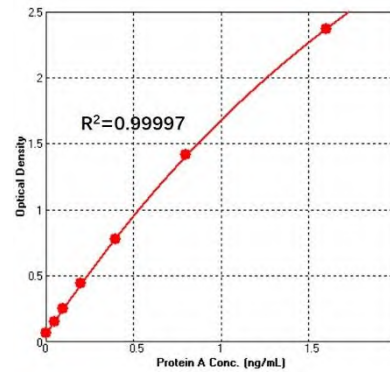
1. 将标准品、质控品和样本的复孔读数求取平均值，然后减去零浓度标准品的 OD 值。
2. 以标准品的浓度作为横坐标，OD 值作为纵坐标，利用四参数拟合绘制标准曲线，进行样本浓度的计算，计算浓度时需乘以相应的稀释倍数。若利用直线回归拟合，需选取合适的绘制区间，从而得到最佳的拟合曲线，保证回归分析的准确性。
3. 标准曲线  $R^2$  应大于 0.9900。
4. 标准曲线范围：0.05 ng/mL-1.6 ng/mL (Protein A) , 0.05 ng/mL-3.2 ng/mL (PrismA)。如果样品的 OD 值大于分析标准曲线范围最高点 (Protein A 最高点为 1.6 ng/mL, PrismA 最高点为 3.2 ng/mL) 的 OD 值，应稀释样品至线性范围内，并重复测定。如果样品的 OD 值小于分析标准曲线范围的样品 0.05 ng/mL 的 OD 值，应报告小于 0.05 ng/mL。

## 典型数据

每次实验，每块酶标板都需要设置标准曲线，具体 OD 值可能因不同实验室、实验员或设备而不同，以下示例数据仅供参考。

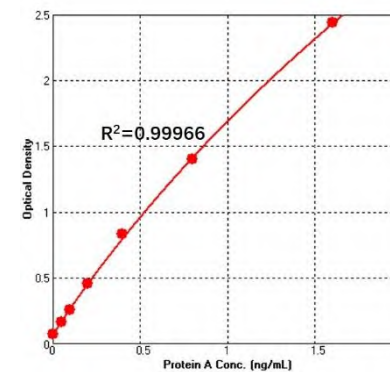
### 重组 Protein A 的标准曲线

Standard Num.	Concentration	O.D.
Standard 6	1.6 ng/mL	2.372
Standard 5	0.8 ng/mL	1.414
Standard 4	0.4 ng/mL	0.781
Standard 3	0.2 ng/mL	0.442
Standard 2	0.1 ng/mL	0.253
Standard 1	0.05 ng/mL	0.155
Standard 0	0 ng/mL	0.065



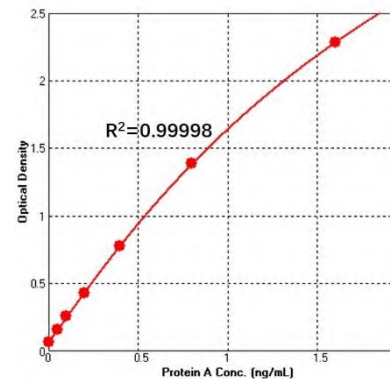
### 耐碱重组 Protein A 的标准曲线

Standard Num.	Concentration	O.D.
Standard 6	1.6 ng/mL	2.437
Standard 5	0.8 ng/mL	1.401
Standard 4	0.4 ng/mL	0.832
Standard 3	0.2 ng/mL	0.455
Standard 2	0.1 ng/mL	0.256
Standard 1	0.05 ng/mL	0.170
Standard 0	0 ng/mL	0.078



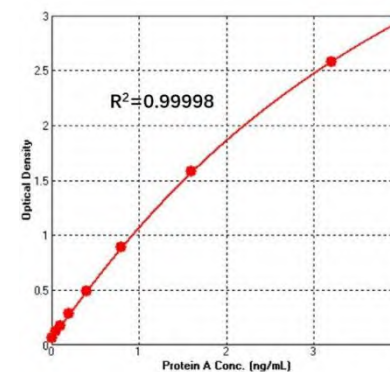
### MaXtar® ARPA ligand Protein A (百林科 Bio-Link) 的标准曲线

Standard Num.	Concentration	O.D.
Standard 6	1.6 ng/mL	2.285
Standard 5	0.8 ng/mL	1.390
Standard 4	0.4 ng/mL	0.778
Standard 3	0.2 ng/mL	0.433
Standard 2	0.1 ng/mL	0.256
Standard 1	0.05 ng/mL	0.161
Standard 0	0 ng/mL	0.069



### 重组 PrismA 的标准曲线

Standard Num.	Concentration	O.D.
Standard 7	3.2 ng/mL	2.582
Standard 6	1.6 ng/mL	1.579
Standard 5	0.8 ng/mL	0.887
Standard 4	0.4 ng/mL	0.486
Standard 3	0.2 ng/mL	0.282
Standard 2	0.1 ng/mL	0.176
Standard 1	0.05 ng/mL	0.120
Standard 0	0 ng/mL	0.067



## 流程概览



## 灵敏度

标准品	检测线性区间(ng/mL)	定量下限 (LoQ*)
重组 Protein A	0.05-1.6 ng/mL	0.05 ng/mL
耐碱重组 Protein A	0.05-1.6 ng/mL	0.05 ng/mL
MaXtar® ARPA ligand Protein A (Bio-Link Co.)	0.05-1.6 ng/mL	0.05 ng/mL
重组 Prisma	0.05-3.2 ng/mL	0.05 ng/mL

## 批内精密度和准确度

Standard	Sample Conc.(ng/mL)	Replicate Times	Mean (ng/mL)	SD	CV (%)	Recovery (%)
Recombinant Protein A	1.6	10	1.65	0.167	10.10%	103%
	1.2	10	1.35	0.122	9.00%	113%
	0.3	10	0.3	0.015	5.10%	100%
	0.12	10	0.13	0.01	7.70%	105%
	0.05	10	0.05	0.007	14.90%	99%
Alkali-Tolerant Recombinant Protein A	1.6	10	1.6	0.075	4.70%	100%
	1.2	10	1.2	0.056	4.60%	100%
	0.3	10	0.29	0.013	4.60%	98%
	0.12	10	0.11	0.005	4.00%	95%
	0.05	10	0.04	0.004	9.50%	87%
MaXtar® ARPA ligand Protein A Standard (Bio-Link Co.)	1.6	10	1.52	0.054	3.60%	95%
	1.2	10	1.16	0.049	4.20%	97%
	0.3	10	0.27	0.014	5.20%	90%
	0.12	10	0.1	0.009	8.90%	83%
	0.05	10	0.04	0.003	7.30%	80%
Recombinant Prisma	3.2	10	0.030	0.055	2.99%	93%
	2.4	10	0.021	0.032	2.14%	95%
	0.5	10	0.023	0.009	2.30%	93%
	0.1	10	0.032	0.005	3.23%	93%
	0.05	10	0.119	0.014	11.92%	115%

注：以上数据仅作为参考。

## 批间精密度和准确度

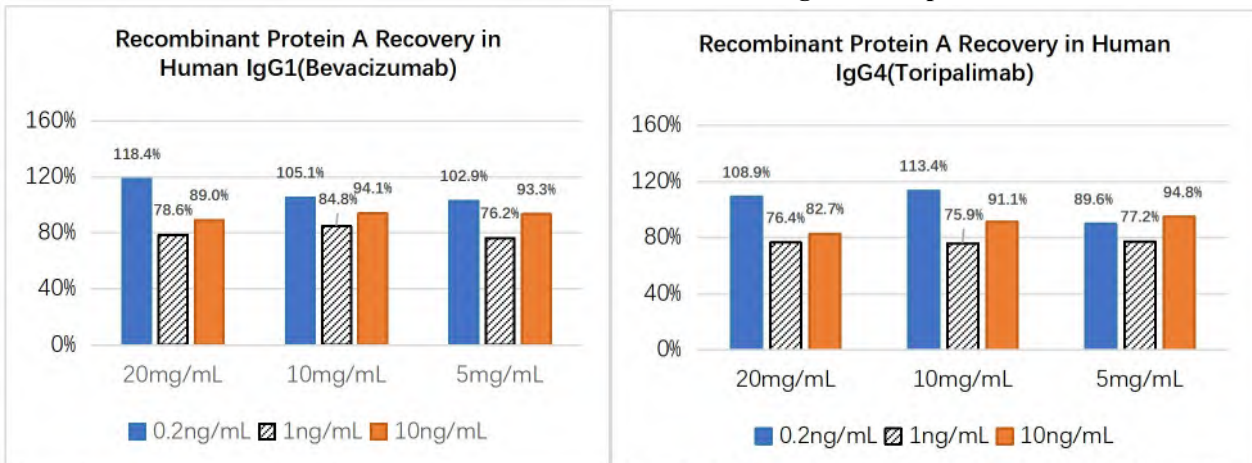
Standard	Sample Conc.(ng/mL)	Replicate Times	Mean (ng/mL)	SD	CV (%)	Recovery (%)
Recombinant Protein A	1.6	10	1.66	0.079	4.70%	104%
	1.2	10	1.23	0.1	8.10%	103%
	0.3	10	0.32	0.018	5.50%	106%
	0.12	10	0.13	0.013	10.20%	105%
	0.05	10	0.05	0.006	12.40%	96%
Alkali-Tolerant Recombinant Protein A	1.6	10	1.69	0.067	3.90%	106%
	1.2	10	1.35	0.054	4.00%	113%
	0.3	10	0.32	0.02	6.30%	107%
	0.12	10	0.13	0.011	8.40%	107%
	0.05	10	0.05	0.009	16.90%	104%
MaXtar® ARPA ligand Protein A Standard (Bio-Link Co.)	1.6	10	1.65	0.069	4.20%	103%
	1.2	10	1.23	0.04	3.20%	103%
	0.3	10	0.31	0.018	5.80%	103%
	0.12	10	0.12	0.011	9.30%	100%
	0.05	10	0.05	0.004	7.80%	91%
Recombinant Prisma	3.2	10	3.11	0.091	2.93%	97%
	2.4	10	2.47	0.113	4.59%	103%
	0.5	10	0.47	0.047	10.00%	94%
	0.1	10	0.11	0.015	13.57%	110%
	0.05	10	0.05	0.008	16.10%	93%

注：以上数据仅作为参考。

## 回收率

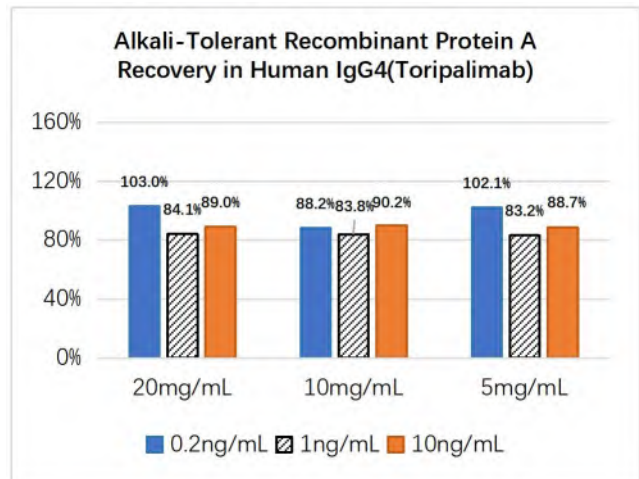
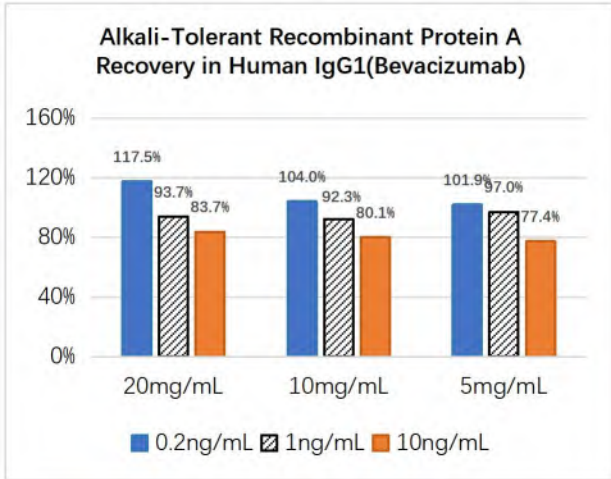
将不同浓度的 Protein A (0.2 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL) 添加到不同浓度的 Human IgG1 (Bevacizumab) (20 mg/mL、10 mg/mL、5 mg/mL) 或 Human IgG4 (Toripalimab) (20 mg/mL、10 mg/mL、5 mg/mL) 中，然后稀释样品到合理的范围，检测并计算 Protein A 的浓度，得到回收率。

添加重组 Protein A 到 Human IgG1 (Bevacizumab) 或 Human IgG4 (Toripalimab) 的回收率：

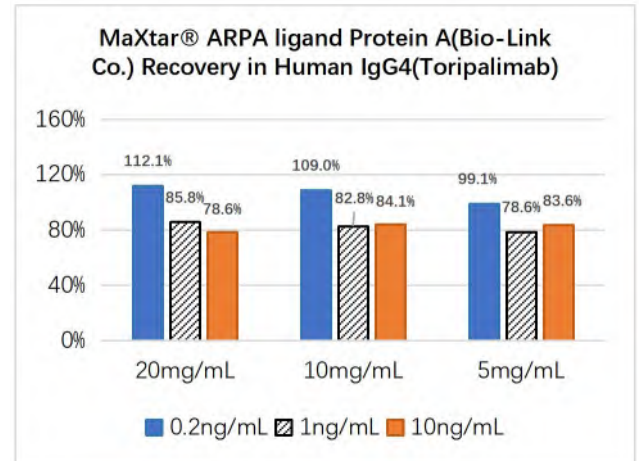
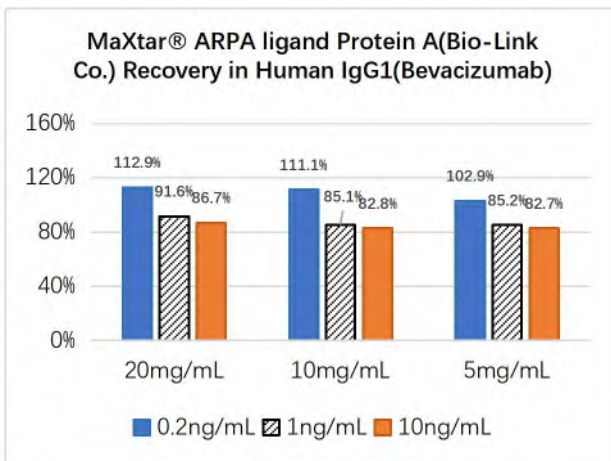


If you have any questions, please contact our technical support team at: [TechSupport@acrobiosystems.com](mailto:TechSupport@acrobiosystems.com)

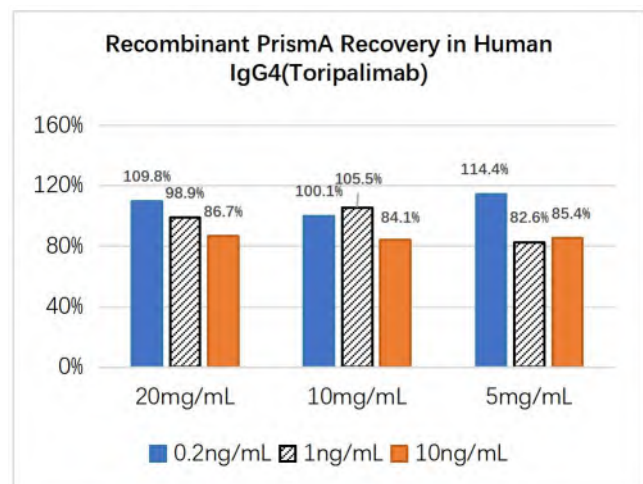
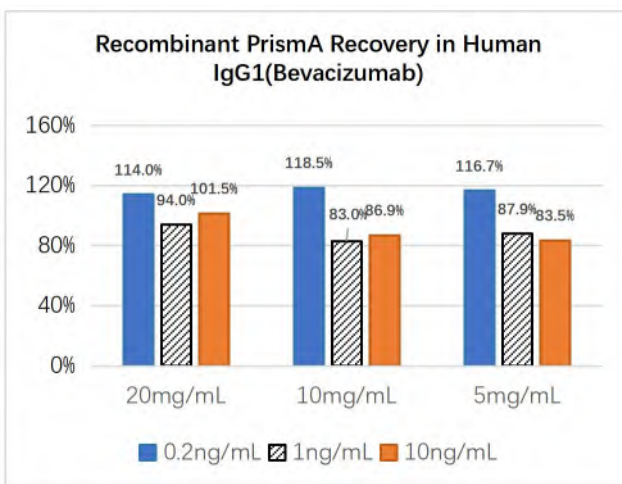
<http://www.acrobiosystems.com>



添加 MaXtar® ARPA ligand Protein A (百林科 Bio-Link) 到 Human IgG1 (Bevacizumab) 或 Human IgG4 (Toripalimab) 的回收率:



添加重组 Prisma 到 Human IgG1 (Bevacizumab) 或 Human IgG4 (Toripalimab) 的回收率:





## 基质干扰

我们做了常用缓冲液的干扰试验，它们具有良好的缓冲器兼容性。对于特定的缓冲液，建议您验证回收率确定最小稀释倍数。

Matrix	Recombinant Protein A		Alkali-Tolerant Recombinant Protein A		MaXtar® ARPA ligand Protein A (Bio-Link Co.)		Recombinant PrismA	
	Recovery	Dilution Factor	Recovery	Dilution Factor	Recovery	Dilution Factor	Recovery	Dilution Factor
20mM L-histidine with 0.1% (w/v) PF68, pH6.0	116%	1	105%	1	116%	1	110%	1
20mM L-histidine with 0.4% (w/v) Tween-80, pH6.0	105%	1	92%	1	105%	1	102%	1
1×PBS, pH7.3	95%	2	96%	1	95%	2	103%	2
1*PBS, pH7.3 with 11% Trehalose	93%	2	96%	2	93%	2	88%	2
20mM L-histidine, pH6.0	100%	2	97%	2	100%	2	97%	2
50mM Tris,100mM Glycine, pH7.5	96%	2	98%	2	96%	2	96%	2
100mM Tris,20mM Sodium citrate, pH7.5	91%	2	105%	1	91%	2	86%	2
20mM L-histidine 10% Trehalose, pH6.0	90%	2	108%	2	90%	2	94%	2
50 mM Na Acetate, pH 3.5	109%	2	88%	1	109%	2	91%	2
25 mM Phosphate, pH 7.5	117%	2	105%	2	117%	2	88%	2
100 mM Glycine, pH 3.5	91%	1	97%	2	91%	1	88%	2
100 mM Triscitrate, pH 7.5	97%	2	107%	2	97%	2	90%	1
100 mM Trisacetate, pH 7.5	113%	2	109%	2	113%	2	92%	1

## 专属性

在不同检测样本 human IgG1 (Bevacizumab, 1mg/mL) 和 human IgG4 (Toripalimab, 1 mg/mL) 中分别加入高于通常质量标准限度的 HEK293、E.coli 或 CHO 三个表达系统的宿主细胞蛋白 (HCP 500 ng/mL) 和宿主细胞 DNA (HCD 0.5 ng/mL), 然后分别加入高、中、低浓度的 Protein A, 加入与未加入 HCP 和 HCD 的 Protein A 加标样品中 Protein A 回收的比值, 作为专属性验证指标, 计算公式为:  $(S3-S1) / (S2-S1) \times 100\%$ , 实验设计如下:

Standard	ID	Sample ID	Antibody Conc.(mg/mL)	Protein A Conc.(ng/mL)	HCP Conc. (ng/mL)	HCD Conc. (ng/mL)
	S1	S1	1	0	0	0
Recombinant Protein A, Alkali-Tolerant Recombinant Protein A or MaXtar® ARPA ligand Protein A (Bio-Link Co.)	S2	S2-1	1	1.6	0	0
		S2-2	1	0.3	0	0
		S2-3	1	0.05	0	0
	S3	S3-1	1	1.6	500	0.5
		S3-2	1	0.3	500	0.5
		S3-3	1	0.05	500	0.5
Recombinant PrismaA	S2	S2-1	1	3.2	0	0
		S2-2	1	0.5	0	0
		S2-3	1	0.05	0	0
	S3	S3-1	1	3.2	500	0.5
		S3-2	1	0.5	500	0.5
		S3-3	1	0.05	500	0.5

结果如下:

Sample	Antibody Conc. (mg/mL)	Protein A Conc. (ng/mL)	HCP Conc. (ng/m L)	HCD Conc. (ng/m L)	Bevacizumab			Toripalimab		
					HEK293	E.coli	CHO	HEK293	E.coli	CHO
Specificity of	1	1.6	500	0.5	97.2%	79.8%	93.7%	87.6%	103.2%	102.1%
(Recombinant	1	0.3	500	0.5	92.3%	97.3%	97.1%	83.5%	106.5%	106.7%

Protein A) Recovery	1	0.05	500	0.5	78.5%	97.0%	115.7%	82.9%	109.2%	113.7%
Specificity of (Alkali-Tolerant Recombinant Protein A) Recovery	1	1.6	500	0.5	101.3%	109.8%	96.1%	103.4%	90.8%	84.8%
	1	0.3	500	0.5	89.7%	105.5%	99.4%	101.2%	87.2%	101.5%
Specificity of (MaXtar® ARPA ligand Protein A (Bio-Link Co.) Recovery	1	1.6	500	0.5	86.0%	98.4%	106.7%	88.8%	106.2%	96.4%
	1	0.3	500	0.5	99.8%	95.1%	105.5%	98.4%	97.7%	98.4%
	1	0.05	500	0.5	110.9%	86.6%	114.4%	103.6%	119.9%	77.6%
Specificity of (Recombinant Prisma) Recovery	1	3.2	500	0.5	88.1%	102.6%	101.1%	85.0%	106.0%	107.5%
	1	0.5	500	0.5	97.6%	100.5%	100.3%	97.5%	100.2%	105.5%
	1	0.05	500	0.5	82.4%	95.7%	118.0%	74.4%	104.1%	109.8%

## 问题解答

问题	可能的原因	解决办法
标准曲线差	* 移液不准确	* 检查移液器
CV 值偏高	* 移液不准确 * 孔中有气泡	* 检查移液器 * 去除孔中的气泡
背景高	* 板子清洗不充分 * 洗涤缓冲液被污染	* 按操作步骤正确清洗 * 制备新的洗涤缓冲液
整板读数偏低	* 波长选择错误 * 孵育时间不足	* 检查波长参数 * 增加孵育时间
标准曲线正常，样品读值高	* 样本中的 Protein A 水平高于检测范围	* 稀释样本再次进行检测
曲线漂移	* 加样时间过长 * 试剂不在室温下	* 在检测开始之前准备好所有的标准品和样品，尽量控制加样时

		间 * 除非抗体等物质有特殊说明， 否则在加样前所有试剂都处于室 温状态
--	--	---

## 常见问题与解答

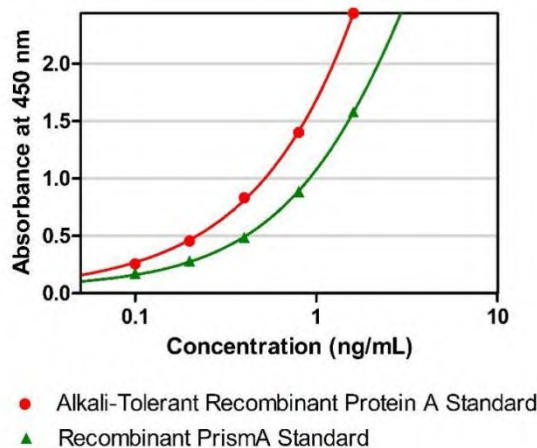
### 1. RES-A029 适用于哪些 Protein A 配基？

本试剂盒适用于检测天然或结构保守的重组 Protein A，以及生物工艺制造应用中的耐碱性重组 Protein A 如 MabSelect SuRe™，MaXtar® ARPA ligand (百林科 Bio-Link)，UniMab® 50 Protein A (苏州纳微科技股份有限公司) 和 MabSelect Prisma™。对于其他种类的 Protein A 突变类型的亲和层析树脂用于抗体纯化，建议从纯化树脂供应商处获取对应的 Protein A 突变体标准品配基蛋白溶液，作为定量标准品，并在推荐条件下保存，使用时按照试剂盒说明书稀释至标准曲线的浓度范围进行定量。如果纯化树脂供应商无法提供对应的 Protein A 配基标准品蛋白溶液，您可以选择当前试剂盒中与之最接近的 Protein A 标准品用于标准曲线建立和检测。

### 2. 为什么要使用与纯化填料相匹配的标准品来进行 Protein A 残留检测？

根据美国药典 USP 1103 关于 ELISA 酶联免疫分析方法的要求“Quantitative assays determine the quantity of the analyte based on the interpolation of a standard calibration curve with known analyte concentration, run simultaneously in the same assay. This standard should be an appropriate, preferably homologous, reference or calibration material that is representative of the analyte(s) of interest.”监管部门推荐使用匹配的标准品。

如下图比较使用通用试剂盒内的 Protein A 和 Prisma 标准品绘制的标曲，吸光值的差异显而易见，如果用耐碱重组 Protein A 的标准曲线去计算含有 Prisma 的样品残留值，则对于使用 Prisma 填料进行亲和层析的样品，脱落配基残留检测的准确性会大打折扣。因此为了获得更准确的结果，推荐使用与填料匹配的标准品来校准样品的测定。



### 3. RES-A029 试剂盒中的标准品的定量方式是什么？

本试剂盒标准品原材料浓度较高，通过紫外 UV 进行准确定量，然后将其准确稀释至 1 $\mu$ g/mL。

### 4. Protein A 残留检测实验中，如何确保加标样本检测的准确度？

对于有 Protein A 残留的样本，由于残留量预先无法预知，建议从低稀释倍数开始稀释样本，每个稀释度下加标某一个中间浓度点的标准品进行加标检测，计算加标回收率。加标量原则上应尽量与待测物含量相等或相近，不能超过待测物含量的 3 倍，加标后的测定值不能超过方法的测定上限的 90%。

例如以下某个样本的 Protein A 残留检测结果，稀释 2 倍的样本检测 Protein A 残留值为 1.559 ng/mL，接近定量上限，当加标量为 0.2ng/mL 时，加标量远远低于残留量，所以回收率不准确。通过加大稀释倍数，稀释后检测值逐渐降低，逐渐接近加标量，从而加标回收率合格。

Sample ID	Dilute factor	Samples			Standard added Samples			Recovery
		OD <sub>450 nm</sub>	Protein A back Calculated Conc. (ng/mL)	Protein A final Conc. (ng/mL)	Added Protein A (ng/mL)	OD <sub>450 nm</sub>	Protein A back Calculated Conc. (ng/ml)	
MAb1	2	1.79	1.559	3.118	0.20	1.879	1.664	52.5%
	4	0.852	0.614	2.456	0.20	1.106	0.844	115.0%
	8	0.489	0.312	2.496	0.20	0.779	0.551	119.4%
	16	0.322	0.182	2.918	0.20	0.578	0.383	100.5%

### 5. 使用相同填料纯化的不同项目是否需要重新验证方法？

需要，纯化时使用的填料决定了标准品的选择，但是不同项目的药物结构与制剂会对加标回收合格率产生影响，因此需要根据项目情况重新验证方法。