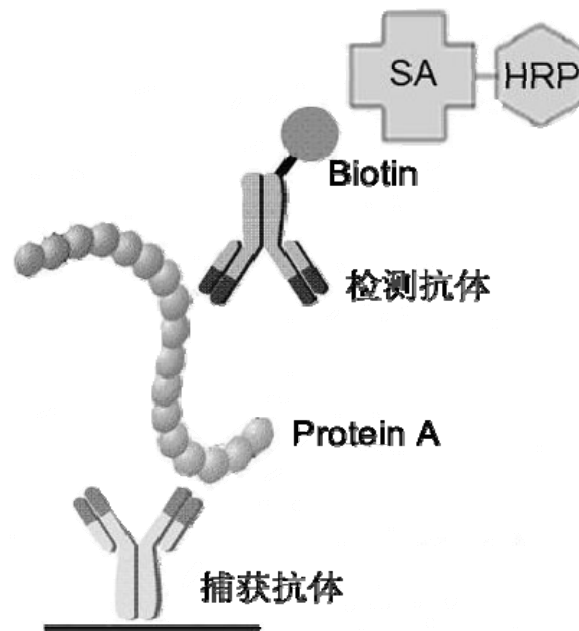


# Protein A ELISA 检测试剂盒

货号： L00430      版本号： 07202014



1

操作者在使用本产品之前必须仔细阅读操作指南

仅供科研使用，不能用于临床诊断

## I. 产品介绍

Protein A 亲和层析广泛应用于抗体的纯化，该方法中 Protein A 是通过共价偶联方式结合于纯化介质之上，纯化时 Protein A 的脱落是药物研究中的一大问题，此外如果抗体产品污染有 Protein A 也可能影响免疫检测的结果。

金斯瑞 Protein A ELISA 检测试剂盒可定量检测天然 Protein A、重组 Protein A 以及 MabSelect SuRe™（耐碱性重组 Protein A）等样品，即使样品中含有抗体也可经有效的处理而准确测定。该试剂盒可以很灵敏地检测出治疗性抗体中微量的 Protein A，抗体供应商可以藉此试剂盒来评价产品中残留 Protein A 的水平，同时也便于 Protein A 纯化介质制造商监测特定条件下 Protein A 的脱落特征。

本试剂盒应用双抗体夹心酶联免疫检测（夹心 ELISA）原理检测 Protein A 的残留，用抗 Protein A 单克隆抗体包被微孔板，形成固相抗体，向固相抗体微孔板中加入 Protein A 标准品和待测样品，然后加入生物素（Biotin）标记的另一株抗 Protein A 的单克隆抗体，最后加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素（SA-HRP），形成抗体+抗原+抗体-Biotin+ SA-HRP 复合物，经过洗涤后加入 TMB 底物显色；TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色并在酸的作用下最终转换成黄色，颜色的深浅与样品中 Protein A 的量呈正相关。

样品处理对于 Protein A 的定量非常重要，脱落的 Protein A 可以结合抗体的 Fc 区，这样就影响了定量的准确度。本试剂盒提供了优化的样品处理方案，使定量结果更准确。

## II. 主要特点

- 灵敏度：可精确定量 20 pg/ml 的重组 Protein A 或 50 pg/ml 的 MabSelect SuRe™
- 可测蛋白种类：天然 Protein A、重组 Protein A、MabSelect SuRe™
- 操作时间：2 小时内完成检测
- 操作简单：快速而简便的样品处理方法
- 品质稳定：高品质的单克隆抗体和严格的生产工艺保证了批次间的稳定性
- 应用广泛：可定量检测 Protein A 污染或脱落

### III. 试剂盒组成

本试剂盒提供 Protein A 检测所需的全部试剂，试剂的量足够一块板的检测。

编号	组份	数量
430-80	Protein A捕获板	1 块 (8 孔 × 12 条)
430-20	Protein A检测抗体	0.5 ml
430-30	HRP标记链霉亲和素	12 ml
430-10	重组Protein A标准品(10 µg/ml)	1 ml
430-11	MabSelect SuRe™ Protein A 标准品(10 µg/ml)	1 ml
430-90	抗体稀释液	15 ml
430-60	5×样品稀释液	30 ml
430-70	20 ×洗液	40 ml
430-A0	10% 吐温-20	1 ml
430-40	显色液	12 ml
430-50	终止液	6 ml
N/A	盖板膜	2 张
N/A	产品说明书	1 份

### IV. 贮存

本试剂盒各组份在 2-8 °C 条件下可稳定保存 12 个月，请在有效期内使用该产品。

### V. 注意事项

- 各试剂中均含有防腐剂，避免吸入、吞入或接触皮肤
- 终止液和显色液避免接触皮肤、眼睛或衣服，如有意外应立即就医

### VI. 所需物品

- 以下为实验需要但试剂盒未提供的材料和仪器：

检测 450 nm 吸光度的酶标仪

全自动洗板机

去离子水或双蒸馏水

量筒

1000 ml 烧杯

不同规格的 EP 管

旋涡混合仪

不同规格的精密微量移液器、多通道微量移液器及吸头

平板纸

计时器

-20℃冰箱、4℃恒温箱、25℃恒温箱（如果室温达不到20-25℃，建议放25℃恒温箱）、37℃恒温箱

离心机

## VII. 实验步骤

- 实验开始前，请将所有试剂平衡至室温。

### i. 样品准备

样品中的抗体结合Protein A可导致检测值偏低，所以从样品中完全解离并除去抗体非常重要。加热处理可以有效分离Protein A和抗体，抗体经加热变性，再经离心除去，Protein A则留于上清液中。较高的抗体浓度可能会干扰检测的准确度，需要稀释至10 mg/ml以下；样品pH值要调整到6.0-7.5的范围，以免影响检测结果的准确度。

1. 在离心管中加入500 μl待测样本。
2. 每个样本中加入5 μl 10%吐温-20至终浓度为0.1%，混匀。  
*注：实际待测样本量可根据需求适当调整，同时调整吐温-20的量保持其工作浓度为0.1%。*
3. 在离心管盖上扎个针孔以便后续加热时能释放压力。
4. 将离心管置于沸水中水浴10分钟以分离Protein A和抗体。
5. 冷却至室温，11,000 rpm离心5分钟。
6. 转移含有Protein A的上清液至新的离心管中。
7. 将处理好的待测样品做好标记，若待测样品中Protein A浓度较高，用1×样品稀释液稀释后至标准曲线范围内再进行检测。

*注：本处理方案适用于所有类型Protein A样本，包含天然Protein A、重组Protein A和MabSelect SuRe™。*

### ii. 试剂准备

#### 1×洗液

用去离子水或双蒸水按1:20稀释20×洗液。例如：取40 ml的20×洗液加入760 ml的去离子水中配成800 ml洗液，经0.22 μm滤膜过滤，2-8℃条件下保存。

*注：如果在20×洗液中出现结晶，在50℃的水浴锅中温浴，直至结晶完全消失。*

#### 1×样品稀释液

用去离子水或双蒸水按1:5稀释5×样品稀释液，经0.22 μm滤膜过滤，2-8℃条件下保存。

*注：如果在5×样品稀释液中出现结晶，在50℃的水浴锅中温浴，直至结晶完全消失。*

#### 检测抗体工作液

检测重组蛋白：根据检测所需的量用抗体稀释液按1:150稀释Protein A检测抗体。

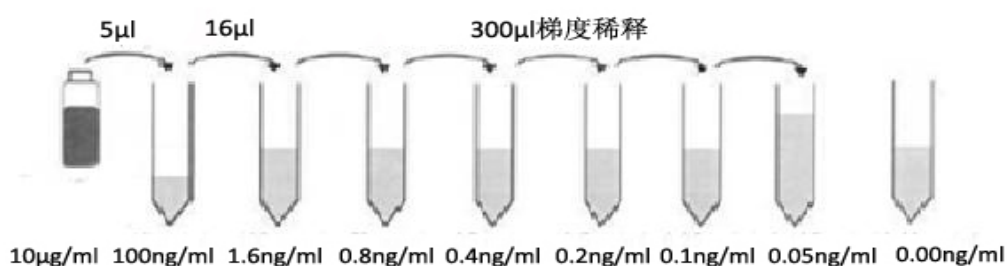
检测MabSelect SuRe™：根据检测所需的量用抗体稀释液按1:50稀释Protein A检测抗体。

#### Protein A 标准品溶液

- ① 检测含有天然或重组Protein A样品时，则制备重组Protein A标准曲线，参照下表稀释步骤配制出标准曲线1.6 ng/ml、0.8 ng/ml、0.4 ng/ml、0.2 ng/ml、0.1 ng/ml、0.05 ng/ml和0 ng/ml。

注：将标准曲线和待测样品同步热处理。

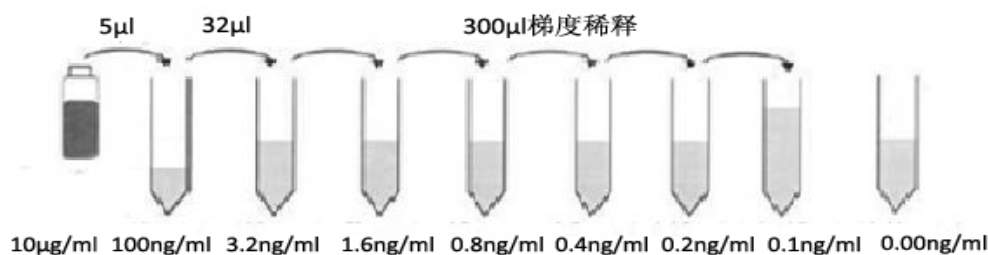
移取	加入至	配成重组 Protein A 浓度
5 $\mu$ l 的 10 $\mu$ g/ml 标准品	495 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液，混匀	100 ng/ml
16 $\mu$ l 的 100 ng/ml 标准品	984 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液，混匀	1.6 ng/ml
300 $\mu$ l 的 1.6 ng/ml 标准	300 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液，混匀	0.8 ng/ml
300 $\mu$ l 的 0.8 ng/ml 标准	300 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液，混匀	0.4 ng/ml
300 $\mu$ l 的 0.4 ng/ml 标准	300 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液，混匀	0.2 ng/ml
300 $\mu$ l 的 0.2 ng/ml 标准	300 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液，混匀	0.1 ng/ml
300 $\mu$ l 的 0.1 ng/ml 标准	300 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液，混匀	0.05 ng/ml
300 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液	空管	0 ng/ml



②检测含有MabSelect SuRe™ Protein A的样品时，则制备MabSelect SuRe™ Protein A标准曲线，参照下表稀释步骤配制出标准曲线3.2 ng/ml、1.6 ng/ml、0.8 ng/ml、0.4 ng/ml、0.2 ng/ml、0.1 ng/ml和0 ng/ml。

注：将标准曲线和待测样品同步热处理。

移取	加入至	配成重组 Protein A 浓度
5 $\mu$ l 的 10 $\mu$ g/ml 标准品	495 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液，混匀	100 ng/ml
32 $\mu$ l 的 100 ng/ml 标准品	968 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液，混匀	3.2 ng/ml
300 $\mu$ l 的 3.2 ng/ml 标准	300 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液，混匀	1.6 ng/ml
300 $\mu$ l 的 1.6 ng/ml 标准	300 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液，混匀	0.8 ng/ml
300 $\mu$ l 的 0.8 ng/ml 标准	300 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液，混匀	0.4 ng/ml
300 $\mu$ l 的 0.4 ng/ml 标准	300 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液，混匀	0.2 ng/ml
300 $\mu$ l 的 0.2 ng/ml 标准	300 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液，混匀	0.1 ng/ml
300 $\mu$ l 的 1 $\times$ 样品稀释液	空管	0 ng/ml



标准品和样品稀释设计如下表：

	标准品 (ng/ml)		稀释样品									
	重复 1	重复 2	重复 1	重复 2	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.6	1.6	1:5	1:5								
B	0.8	0.8	1:10	1:10								
C	0.4	0.4	1:20	1:20								
D	0.2	0.2	1:40	1:40								
E	0.1	0.1										
F	0.05	0.05										
G	0	0										
H	空白孔											

注：为了达到最佳检测效果，需要优化样品的稀释梯度。

### iii. Protein A 捕获板准备

- 建议检测时标准品和检测样品按复孔操作。
- 计算实验所需的板条数量，将不需要的板条拆卸下来，放回铝箔袋中，封好后 2-8℃ 保存。
- 确保板条紧密固定于板架上。

### iv. 检测过程

- 正式检测前须进行预实验以确定样品的稀释条件，请用样品稀释液稀释样品。

#### 标准品/待测样品孵育

1. 将配制好的 Protein A 标准曲线或待测样品各 100 μl 加入对应板孔中（空白孔除外）。
2. 用盖板膜封板，37℃ 孵育 30 分钟。
3. 洗板：移去盖板膜，弃去板孔中液体，每孔加入 1×洗液 260 μl，浸泡 30 秒，弃去洗液，重复洗涤 4 次。

注：本步骤可以在洗板机上完成。

4. 在平板纸上拍板，彻底去除板孔中的残留液体。

#### Protein A 检测抗体孵育

5. 快速混匀后，每孔加入 Protein A 检测抗体 100 μl（空白孔除外）。
6. 用盖板膜封板，37℃ 孵育 30 分钟。
7. 洗板，同第 3 步。
8. 在平板纸上拍板，彻底去除板孔中的残留液体。

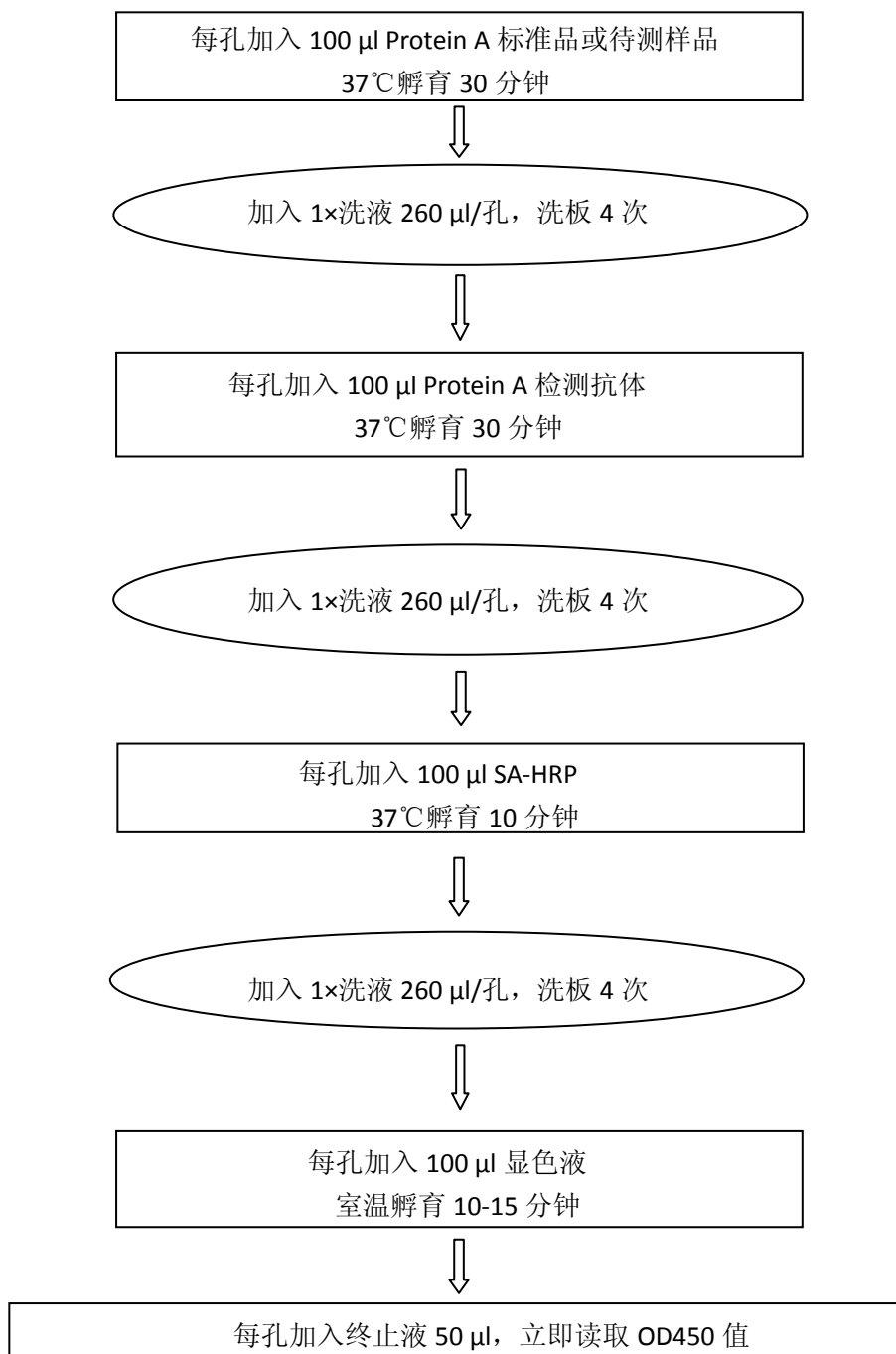
#### HRP 标记链霉亲和素孵育

9. 每孔加入 HRP 标记链霉亲和素 100 μl（空白孔除外）。
10. 用盖板膜封板，37℃ 孵育 10 分钟。
11. 洗板，同第 3 步。
12. 在平板纸上拍板，彻底去除板孔中的残留液体。

### 底物反应和吸光值检测

13. 每孔加入显色液 100  $\mu\text{l}$  (包括空白孔)。
14. 用盖板膜封板, 室温 (20-25 $^{\circ}\text{C}$ ) 避光反应 10-15 分钟 (从加入显色液至第一孔时开始计时)。  
*注: 显色反应时间受温度影响, 理想反应温度为 20-25 $^{\circ}\text{C}$ , 当温度低时, 反应时间要适当延长。*
15. 移去盖板膜, 每孔加入终止液 50  $\mu\text{l}$  (包括空白孔)。
16. 终止后立即用酶标仪在 450 nm 处测量吸光值。
17. 以 OD 值为纵坐标, Protein A 标准蛋白浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 根据标准曲线计算出样品中 Protein A 的含量。

### VIII. 检测流程图

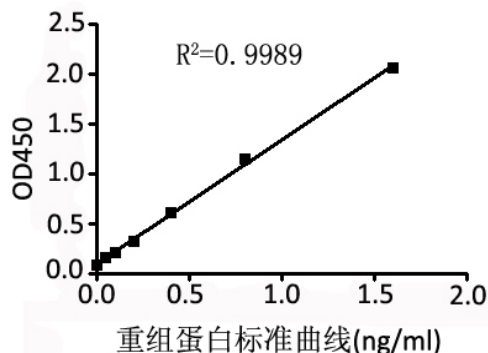




## IX. 参考曲线

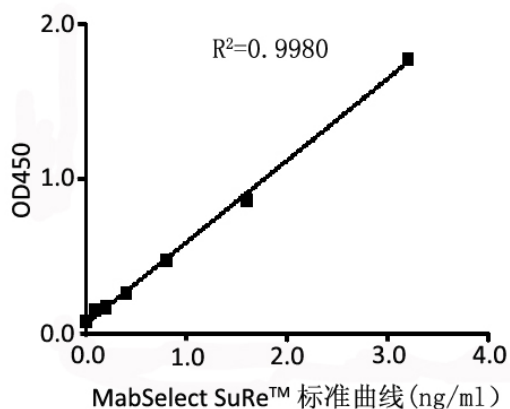
以下曲线仅作为示例展示，每一次检测都必须制备标准曲线。

### ① 重组蛋白标准曲线



Protein A 浓度 (ng/ml)	OD450			
	重复 1	重复 2	均值	校正均值
1.60	2.077	2.034	2.056	2.002
0.80	1.154	1.140	1.147	1.093
0.40	0.591	0.616	0.604	0.550
0.20	0.318	0.329	0.324	0.270
0.10	0.202	0.207	0.205	0.151
0.05	0.161	0.162	0.162	0.108
0.00	0.084	0.090	0.087	0.033
空白值	0.052	0.055	0.054	

### ② MabSelect SuRe™ 标准曲线



Protein A 浓度 (ng/ml)	OD450			
	重复 1	重复 2	均值	校正均值
3.20	1.711	1.829	1.770	1.717
1.60	0.849	0.871	0.860	0.807
0.80	0.461	0.468	0.465	0.412
0.40	0.247	0.257	0.252	0.199
0.20	0.163	0.164	0.164	0.111
0.10	0.140	0.149	0.145	0.092
0.00	0.077	0.076	0.077	0.024
空白值	0.052	0.054	0.053	

## X. 精密度

本试剂盒的批内差小于 5% 和批间差小于 10%。

批内差			批间差		
检测数	均值	变异系数(%)	检测数	均值	变异系数(%)
12	1.60	1.60	8	1.60	3.70
12	0.40	4.05	8	0.40	5.42
12	0.10	4.56	8	0.10	7.59

## XI. 特异性



本试剂盒可特异性检测以下 Protein A:

- 天然 Protein A, 如 GE Healthcare HiTrap™ Protein A HP Columns (Cat. No. 17-0402-03)
- 重组 Protein A, 如 GE Healthcare HiTrap™ rProtein A FF (Cat. No.17-5079-02), 金斯瑞 Protein A Resin (Cat. No. L00210)和 Ultra Protein A Resin (Cat. No. L00400).
- GE MabSelect™纯化介质, 如 GE Healthcare MabSelect SuRe™ (Cat.No. 17-5438-01)

## XII. 灵敏度

本试剂盒的最低检测限(LOD)和最低定量限(LOQ)如下表:

样本类型	LOD	LOQ
重组 Protein A	20 pg/ml	50 pg/ml
MabSelect SuRe™ Protein A	50 pg/ml	100 pg/ml

## XIII. 回收率

向不同类型基质样本中添加一定浓度的 Protein A 并检测其添加回收率, 本试剂盒回收率范围为 85-115%。

样本基质	添加 Protein A (ng/ml)	回收率 (%)
6.20 mg/ml human IgG	1.50	85.01
1.19 mg/ml customer Ab	1.00	98.07
1.13 mg/ml human IgG	1.20	108.96
1.00 mg/ml human IgG	2.50	100.01

用户在正式检测前需验证样本的添加回收情况, 确保回收率范围为 85-115%, 方可正式检测。

**XIV. 常见问题**

问题	原因	解决方法
重复性差	遗漏加样品步骤	按说明书重新操作
	加样不准	对移液器进行校正, 根据操作指南使用移液器
	板孔内表面被移液器枪头刮伤	在加样和洗板中, 避免接触板孔内表面
	样品中存在颗粒物	检测前通过离心去除颗粒物
标准曲线不好	配制标准品溶液有问题	根据说明书重新配制标准品溶液
	洗板不彻底	使用洗板机洗板时, 要注意洗液的量是否充足, 检测是否有堵孔现象发生
	加样不准	对移液器进行校正, 根据操作指南使用移液器
	误用其它试剂盒中的成分	检查实验中使用的试剂, 重新操作
	操作时, 各个成分没有完全恢复至室温	所有的试剂完全恢复至室温后, 重新操作实验
	孵育温度不当	按说明书重新操作
信号弱/没有信号	遗漏加显色液步骤	按说明书重新操作
	遗漏加生物素标记检测抗体步骤或者遗漏加HRP标记链霉亲和素	按说明书重新操作
	误用其它试剂盒中的成分	不同试剂盒组份不能混用, 重新操作
	显色液被污染	使用新的显色液
	加入孔中的液体体积有误	按说明书重新操作
	孵育温度或时间有误	按说明书重新操作
	没有立即读板	加入终止液后立即读板
本底过深	洗板不彻底	使用洗板机洗板时, 要注意洗液的量是否充足, 检测是否有堵孔现象发生
	显色液被污染	使用新的显色液
	孵育过程中的挥发	在孵育过程中, 使用盖板膜
	孵育温度或时间有误	按说明书重新操作
	显色液没有避光保存	使用新的显色液

**XV. 相关产品**

- Ultra Protein A Resin L00400
- Protein A Resin L00210
- Streptavidin-HRP M00091
- Protein A Antibody, mAb, Mouse A01778
- Protein A Antibody [Biotin], mAb, Mouse A01779
- Protein A Antibody, pAb, Chicken A00728
- Protein A Antibody [HRP], pAb, Chicken A00729

**XVI. 实验记录**

运用如下表格记录实验标准曲线以及样品数据

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

实验记录:

南京金斯瑞生物科技有限公司

江苏省南京市江宁科学园雍熙路28号，邮编211100

客服热线：025-58897288-5810

订购邮箱：[product@genscript.com.cn](mailto:product@genscript.com.cn)

公司主页：<http://www.genscript.com.cn>