

CHO PLBL-2 残留检测试剂盒

（酶联免疫吸附法）

说明书

货号：1301315

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/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 产品名称

CHO PLBL-2 残留检测试剂盒（酶联免疫吸附法）

■ 包装规格

96 测试/盒

■ 预期用途

CHO PLBL-2 残留检测试剂盒（酶联免疫吸附法）适用于基于 CHO 表达系统的生物制品中 CHO HCP 高风险蛋白 PLBL-2（phospholipase B-like 2，也称 PLBD-2）的定量检测，例如细胞培养上清样品、PAT 样品、DS/DP 样品等。

■ 检测原理

本试剂盒基于固相酶联免疫吸附分析法（Enzyme-linked Immunosorbent Assay，ELISA），采用双抗体夹心的方式对待测样品中 CHO PLBL-2 的含量进行定量检测。

该分析方法首先通过在预包被抗 CHO PLBL-2 抗体的酶标板中加入校准品或待测样品以捕获溶液中的 CHO PLBL-2，其次加入生物素标记的抗 CHO PLBL-2 抗体以形成夹心检测结构，随后加入链霉亲和素-辣根过氧化物复合物以放大检测信号；洗涤后，加入 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 波长下测读吸光度，其吸光度与校准品或待测样品中的 CHO PLBL-2 的含量成正相关，通过校准品拟合的剂量-反应曲线即可计算得出待测样品中 CHO PLBL-2 的含量。

本试剂盒对待测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。本试剂盒操作简单，快速，检测专一性强，性能稳定可靠。

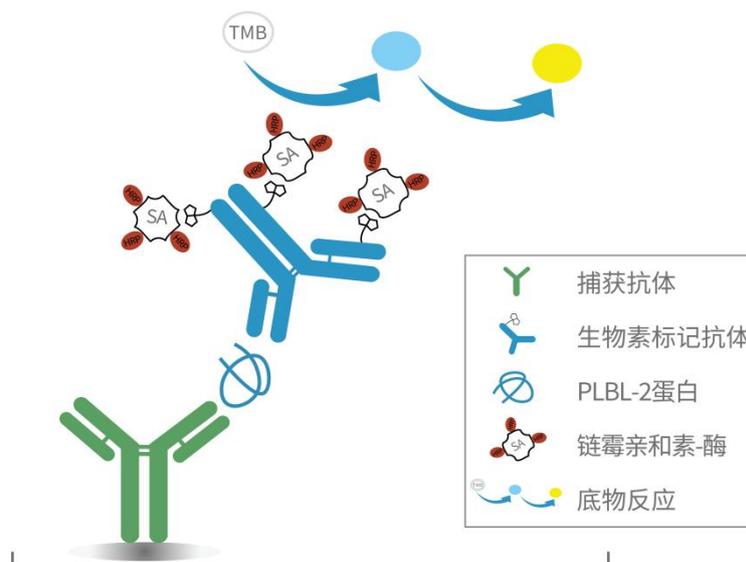


图 1 检测原理示意图

■ 试剂盒组分

表 1 试剂盒组分

组分	产品号	规格	说明
抗 CHO PLBL-2 预包被酶标板	PNA023	8 孔 × 12 条	已包被适量的绵羊抗 CHO PLBL-2 多克隆抗体, 铝箔袋密封包装, 含干燥剂。酶标板部分孔壁可能会有结晶, 属正常现象, 无需特殊处理。
CHO PLBL-2 校准品	PNB022	1 瓶	冻干粉。精确量取 500 μ L 校准品复溶液, 溶解, 静置 5-10 min, 溶液应该澄清透明, 无肉眼可见不溶物。产品信息详见标签。
校准品复溶液	PNC002	1.5 mL × 1 管	澄清透明溶液, 专用于溶解 CHO PLBL-2 校准品。
稀释液	PNE004	25 mL × 2 瓶	用于校准品、待测样品、生物素偶联抗体和链霉亲和素 HRP 复合物的稀释。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 × 2 瓶	用于洗板。低温时易产生结晶, 可在 37 $^{\circ}$ C 水浴溶解, 使用前用新鲜制备的超纯水稀释 10 倍。
生物素偶联抗 CHO PLBL-2 抗 体 (200 \times)	PNG011	60 μ L × 1 管	经生物素标记的抗 CHO PLBL-2 绵羊多抗, 使用前用稀释液稀释 200 倍。
链霉亲和素 HRP 复合物 (100 \times)	PNH002	140 μ L × 1 管	链霉亲和素偶联的辣根过氧化物酶复合物, 使用前用稀释液稀释 100 倍。
TMB 显色液	PND004	12 mL × 1 瓶	使用前平衡于室温 20 min 以上, 应避免光并密封保存。
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

组分名称	有效期
开封预包装酶标板	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 下可以稳定保存 90 天。
复溶校准品	复溶后, 分装、冻存于 -18 °C 及以下, 避免反复冻融。

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 稀释用无菌离心管
- 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

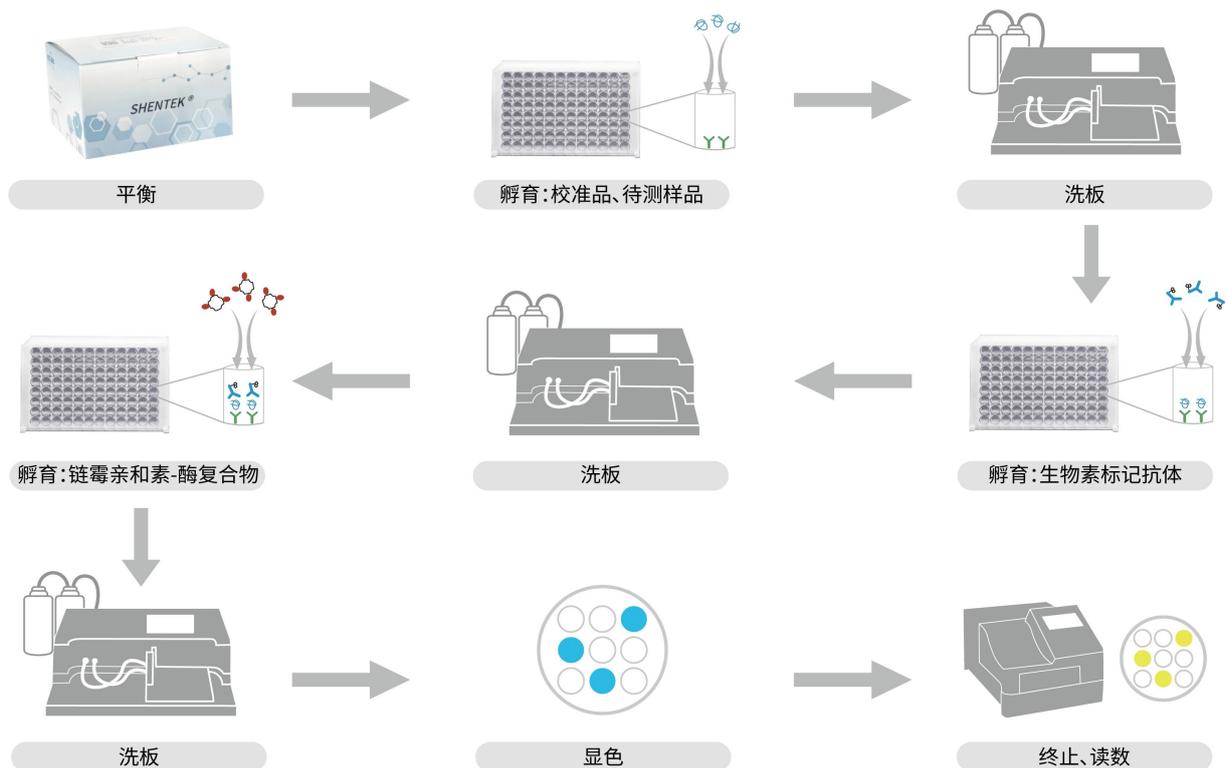


图 2 操作流程示意图

一、试剂、仪器准备

(一) 实验前准备

1. 将试剂盒取出，在使用前于室温平衡约 20 分钟。在使用后立即放回 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 °C ± 3 °C。

(二) 试剂配制

1. CHO PLBL-2 校准品溶解：精确量取校准品复溶液 500 μL ，溶解后轻柔颠倒混匀，静置 5-10 min，得到复溶校准品。根据标签信息计算复溶校准品浓度后进行梯度稀释。

备注：校准品溶解后，酌量分装、保存于 -18 °C 及以下，避免反复冻融。

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。若因采用洗板机洗涤而导致 1×缓冲液试剂量不足, 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. 1×生物素偶联抗 CHO PLBL-2 抗体溶液配制: 用稀释液于无菌离心管中将生物素偶联抗 CHO PLBL-2 抗体 (200×) 稀释 200 倍, 轻轻颠倒混匀, 即为 1×生物素偶联抗 CHO PLBL-2 抗体溶液。配制合适体积, 以保证加液时有充足的余量。配制后当天使用。
4. 1×链霉亲和素 HRP 复合物溶液配制: 用稀释液于无菌离心管中将链霉亲和素 HRP 复合物 (100×) 稀释 100 倍, 轻轻颠倒混匀, 即为 1×链霉亲和素 HRP 复合物溶液。配制合适体积, 以保证加液时有充足的余量。配制后当天使用。
5. 校准曲线配制: 参照图 3 和表 3 对校准品进行梯度稀释。

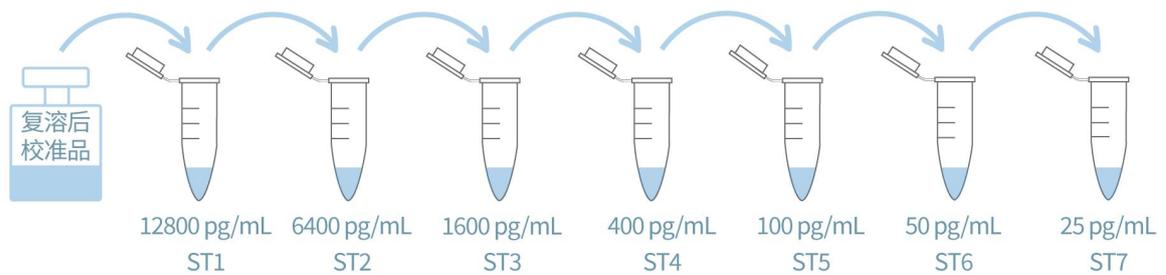


图 3 校准品稀释操作示例

表 3 系列校准品梯度稀释

校准曲线样品	稀释方式	浓度 (pg/mL)
ST1	将复溶校准品用稀释液稀释到 ST1 浓度	12800
ST2	400 μL ST1 溶液 + 400 μL 稀释液	6400
ST3	200 μL ST2 溶液 + 600 μL 稀释液	1600
ST4	200 μL ST3 溶液 + 600 μL 稀释液	400
ST5	200 μL ST4 溶液 + 600 μL 稀释液	100
ST6	400 μL ST5 溶液 + 400 μL 稀释液	50
ST7*	400 μL ST6 溶液 + 400 μL 稀释液	25
NCS (阴性对照)	稀释液	0

*ST7 (25 pg/mL) 为锚定点。

二、样品准备

- 样品: 包括上游表达、下游纯化过程样品及原液、成品制剂等。样品应清澈透明, 经离心或过滤等方式去除不溶物。
- 处理: 待测样品根据其预估所含 CHO PLBL-2 的浓度, 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。建议样品稀释倍数选择 10 倍以上, 保证稀释液发挥正常效应。
- 对初次使用或样品中 CHO PLBL-2 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, 以便更好地进行后续常规检测。

备注: 相关验证方案可咨询我司技术支持。

三、操作步骤

(一) 孵育: 校准品及待测样品

1. 准确移取 100 μL 系列校准品溶液、稀释液 (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。
2. 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 600 rpm, 避光振荡孵育 1 h。

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									
B	ST7	ST7	ST7									
C	ST6	ST6	ST6	S1	S1	S1						
D	ST5	ST5	ST5	S2	S2	S2						
E	ST4	ST4	ST4	S3	S3	S3						
F	ST3	ST3	ST3	S1+SRC	S1+SRC	S1+SRC						
G	ST2	ST2	ST2	S2+SRC	S2+SRC	S2+SRC						
H	ST1	ST1	ST1	S3+SRC	S3+SRC	S3+SRC						

- ◇ 该示例表示的是检测 7 个浓度梯度的校准曲线 (ST1-ST7)、1 个阴性对照 (NCS)、3 个待测样品 (S1-S3) 和每个样品的加标回收 (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) 孵育: 1×生物素偶联抗 CHO PLBL-2 抗体

1. 倒去反应液, 用 1×缓冲液洗板, 300 μL /孔, 浸泡 30 s, 迅速甩掉液体,

于纸巾上拍干。重复 3 次。洗板后的微孔板应立即进行后续操作，不可放置。本步骤也可由自动洗板机完成。

2. 准确移取 100 μL 1 \times 生物素偶联抗 CHO PLBL-2 抗体溶液至上述微孔板孔底部，勿引入气泡。封板膜密封后，于室温静置孵育 45 min。

（三）孵育：1 \times 链霉亲和素 HRP 复合物

1. 倒去反应液，用 1 \times 缓冲液洗板，300 μL /孔，浸泡 30 s，迅速甩掉液体，于纸巾上拍干。重复 3 次。洗板后的微孔板应立即进行后续操作，不可放置。本步骤也可由自动洗板机完成。
2. 准确移取 100 μL 1 \times 链霉亲和素 HRP 复合物溶液至上述微孔板孔底部，勿引入气泡。封板膜密封后，于室温静置孵育 30 min。

（四）显色

1. 提前 20 min 将 TMB 显色液置于室温条件下平衡。
2. 倒去反应液，用 1 \times 缓冲液洗板，300 μL /孔，浸泡 30 s，迅速甩掉液体，于纸巾上拍干。重复 5 次。洗板后的微孔板应立即进行后续操作，不可放置。本步骤也可由自动洗板机完成。
3. 准确移取 100 μL TMB 显色液至上述微孔板孔底部，勿引入气泡。于室温静置、避光孵育 10 min。此步骤勿用封板膜密封。

（五）终止及读数

1. 准确移取 50 μL 终止液加入上述微孔板中，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. 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。读板应于终止完成后 10 min 内完成。

四、结果计算与判断

（一）结果计算

1. 各孔 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 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（共 7 个点），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。

- 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。若样品是经过稀释后进行测试的, 则样品终浓度=稀释后测定值×稀释倍数。

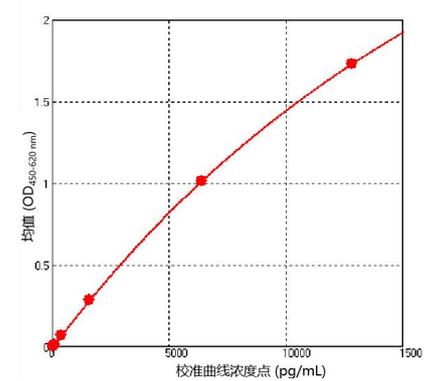
(二) 结果判断

- 校准曲线性能: 典型校准曲线参数见 (三) 所述。校准曲线可能因实验人员的差异和环境的变化而有所差别, 为正常现象。
- 样品适用性: 根据多个稀释倍数下的样品结果及其在对应稀释倍数下的适宜加标样品计算回收率, 并评估其稀释线性, 应符合相应法规的方法学验证要求。
- 样品报告结果: 对同一样品采用多个稀释倍数进行测试, 样品结果采用符合样品适用性的多个稀释倍数下回算的均值。

(三) 性能参数

- 线性范围: 50-12800 pg/mL, 线性相关系数 $R^2 \geq 0.990$
- LLOQ: 50 pg/mL
- 特异性: 与 Sf9 HCP、E. coli BL21 HCP、MDCK HCP 无明显交叉反应
- 典型校准曲线及其参数

表 5 典型校准曲线及数据

浓度 (pg/mL)	OD _{450 nm-A620 nm}	均值	
12800	1.810	1.738	
	1.667		
6400	1.032	1.024	
	1.016		
1600	0.295	0.295	
	0.296		
400	0.078	0.078	
	0.078		
100	0.026	0.026	
	0.025		
50	0.018	0.018	
	0.018		
25	0.014	0.014	
	0.013		
0	0.010	0.009	
	0.009		

$$4\text{-PL: } Y = \frac{A-D}{1+(\frac{X}{C})^B} + D$$

$$A = 5.33548$$

$$B = -1.02792$$

$$C = 26167.08880$$

$$D = -0.00074$$

$$R^2 = 1.00000$$

■ 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。
- ◇ 实验开始后，所有的步骤都应该按顺序进行且不可中断，勿让酶标板处于干燥状态，以防止出现过高的背景值或者错误的结果。
- ◇ 不用的酶标板条需用试剂盒自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。例如，单步稀释倍数不超过 100 倍、样品最少取样量不小于 5 μ L 等，以减少实验误差对结果判断带来的影响。
- ◇ 因生物素偶联抗 CHO PLBL-2 抗体（200 \times ）、链霉亲和素 HRP 复合物（100 \times ）装量较少，请在使用前快速离心，以防止试剂的污染和损失。
- ◇ 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	<ol style="list-style-type: none"> 1. 共耗污染,如试剂、仪器、环境等; 2. CHO PLBL-2 校准品复溶、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。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 共耗试剂应现用现配,共耗仪器使用前应及时清洁; 2. 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; 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. 生物素偶联抗 CHO PLBL-2 抗体(200×)、链霉亲和素 HRP 复合物(100×)等稀释错误。
实验结果与参考性能参数相差较大	<ol style="list-style-type: none"> 1. 试剂过期; 2. 实验过程未严格按照说明书进行。 	<ol style="list-style-type: none"> 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	<ol style="list-style-type: none"> 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。 	<ol style="list-style-type: none"> 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

- YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂（盒）。
- USP <1103> Immunological Test Methods - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)
- ICH. M10 Bioanalytical Method Validation And Study Sample Analysis
- JP <G3-11-171> Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

生效日期：2024 年 12 月 04 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