



## 非格司亭三维构象酶联免疫吸附检测试剂盒（FilBridge）说明书

含 1 个平板 产品目录编号 AB000212

此试剂盒包含检测 Filgrastim（非格司亭商品名）原创药与仿制药间三维构象相似性（comparability）所需要的全部组分。

请在操作之前仔细阅读此说明书。

本试剂盒只能用于科学研究，不能用于医学诊断。

### 背景资料

非格司亭是天然的粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 的相似物，用来刺激粒细胞的增殖和变异，由重组 DNA 技术生产。非格司亭被用来治疗嗜中性白血球减少症，刺激骨髓产生中性粒细胞。嗜中性白血球减少症的治疗领域包括化疗和骨髓移植。非格司亭也用来在造血干细胞移植白细胞分离前增加血液中的造血干细胞的数量。

## 分析测定原理

此检测盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附法进行检测。平板上覆盖着抗人体 GCSF 的全部氨基酸序列的多肽片段产生的抗体。如果单独来分析，每一个抗体都对产品的相应多肽序列产生非常强的抗原性。但是当这个多肽片段位于正确折叠的蛋白质结构中时，它们中的很多抗原点在蛋白质的三维构象中被掩盖，只有基本水平的表面抗原被检测到。这样正确折叠的非格司亭的指纹图谱可以通过柱状图表现出来。对于非格司亭的仿制药，如果蛋白质具有正确的高级结构折叠和糖基化，它的指纹图谱将和非格司亭原创药非常接近。

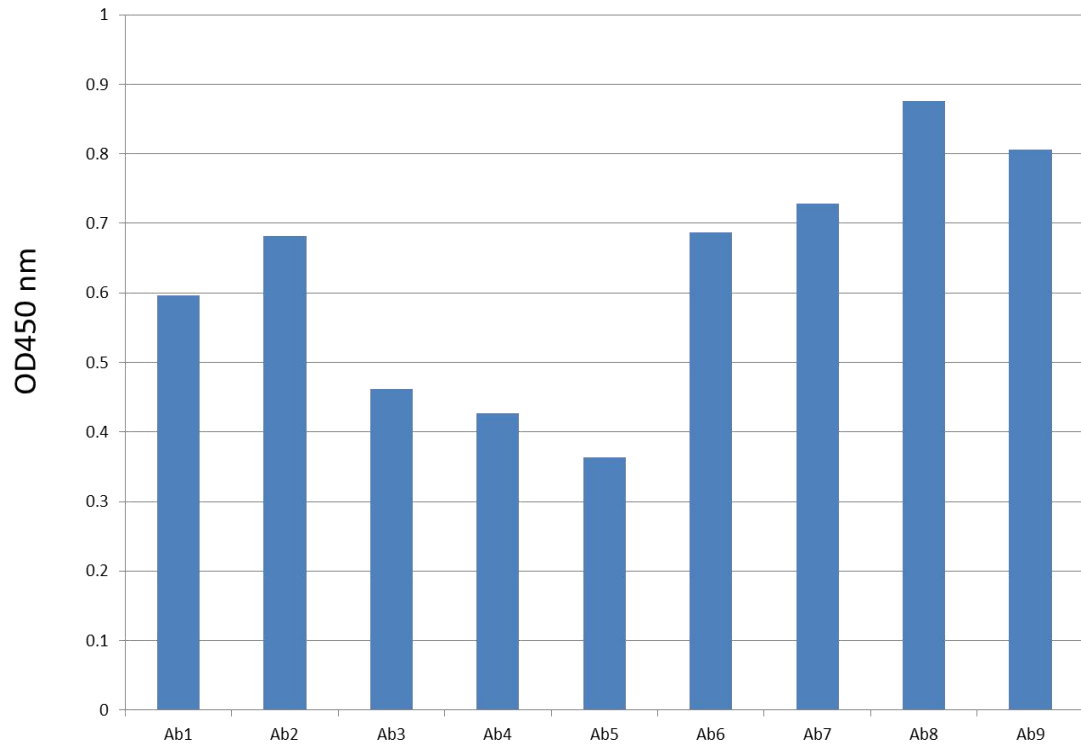
如果蛋白质没有正确的高级结构折叠，不同的多肽序列抗原点被暴露，与之相对应的抗体将可以结合暴露的多肽序列从而产生不同的信号。

用这个方法，通过 ELISA 产生的指纹图谱就可以指出仿制药和非格司亭原创药之间在高级结构上是高度相似的或者存在差异。

在分析前先将非格司亭仿制药和作为参考的非格司亭原创药分别配置为 5 $\mu$ g/ml 的溶液，并添加到 96 孔板上。经过 1 小时反应，仿制药和参照物非格司亭蛋白被平板上的抗体捕获，洗脱后加入通过生物素标记的抗 GCSF 的多克隆抗体并反应 1 小时。反应后，冲洗平板并加入链酶亲和素-HRP（辣根过氧化物酶）保温 45 分钟。辣根过氧化物酶-HRP 将与在平板上的生物素标记的抗体结合。接下来清洗未结合的物质，加入 TMB 底物，结合在平板上 HRP 将转换底物从而产生等比例的颜色反应。经过一定时间的保温使其颜色反应到一定程度，终止反应，生成的颜色用读板机 450nm 波长直接读取。显色反应与被捕获的仿制药或者作为参照的非格司亭蛋白的数量等比例。下一页中有标准的非格司亭参照蛋白的 ELISA 图谱。

## 非格司亭构象的 ELSIA 数据

### Filgrastim Conformational Array ELISA



## 检测盒提供的组分：

### 1、已包被的96孔平板

包被有抗GCSF多肽片段的抗体的塑料透明平板。

Kit AB-000212 (1块)

### 2.五倍浓缩的稀释液（5x Dilution Buffer）

稀释液用来稀释抗体和链霉亲和素-HRP。10ml浓缩液加到40ml无离子水或纯水中配成50ml溶液。

检测盒 AB-000212 (10ml)

### 3. 十倍浓缩的磷酸缓冲液（10x PBS-T）

稀释后，用来冲洗平板。50ml浓缩液加到450ml无离子水或纯水中配成500ml溶液。

检测盒AB-000212 (50ml)

### 4. 报告抗体（Reporting antibody）

生物素标记的抗GCSF的抗体。实验之前将150 $\mu$ l浓缩抗体加到15 ml稀释液中稀释成5 $\mu$ g/ml待用。

检测盒AB-000212 (0.5 mg/ml, 150  $\mu$ l / 管)

### 5.链霉亲合素-辣根过氧化物酶复合物（Streptavidin-HRP Conjugate）

在一种特殊稳定剂中的链霉亲合素-辣根过氧化物酶复合物。实验之前将375 $\mu$ l溶液加到15ml稀释液中稀释成0.1 $\mu$ g/ml待用。

检测盒AB-000212 (4  $\mu$ g/ml, 375 $\mu$ l / 管)

## 6. TMB底物(TMB Substrate)

检测盒AB-000212（15ml），直接使用。

## 7. 终止反应试剂 (Stop Solution)

1 N 浓度的硫酸（腐蚀性！）

检测盒AB-000212（15 ml），直接使用。

## 8. 平板覆盖膜（Plate Sealer）

检测盒AB-000212（1张）。

## 9. 其他需要的材料：

- ①去离子水
- ②可在5-250 $\mu$ l间进行体积调整的单通道或多通道移液枪
- ③塑料试管（如1.5 ml–15 ml离心管），用于稀释样品
- ④添加液体时需要用的加样槽
- ⑤能用于读450 nm光波吸收的酶标仪

## 特别提示

1. 像其他类似的产品一样，本检测盒仅供有实验室安全常识的专业技术人员使用。在使用此产品之前，请需要仔细阅读产品说明书。
2. 本试剂盒是以过氧化物酶反应为基础的系统。如果用其它厂家的洗脱液，要确定溶液中不包含叠氮化合物（Azide），因为叠氮化合物会抑制过氧化物酶的活性。在用我们提供的洗脱液（见第4页PBS-T缓冲液）前，应确保配制洗脱液的所有容器都用去离子水洗过。
3. 终止试剂是酸性的，操作过程中需要格外注意，防止与皮肤和眼睛接触。

## 实验过程中的注意事项

1. 在实验开始之前把稀释过的试剂和缓冲液平衡到室温（18-25°C）。一旦实验开始，所有的步骤都应按顺序进行不可以中断。在各步实验进行之间要确保平板不能干掉，因为这样容易引起过高的基准线或是错误结果。要确保在操作前，所需的材料和试剂都已准备好。试剂加入平板后，需要轻轻摇晃混匀，不能剧烈震动。
2. 为了避免试剂、移液枪头和平板的交叉污染，应使用一次性的移液枪头和试剂容器。未用完的试剂不要重新倒回试剂瓶或试剂管中，注意不要把不同试剂瓶的盖子弄混而造成交叉污染。
3. 不同的反应时间会影响实验结果。在平板上每一步操作中加入试剂的孔的位置都要保持一致，每一步操作都应按照说明书进行。
4. 平板的冲洗十分重要，这一步可以影响到结果的准确性或产生较高的背景信号。建议每孔加入250  $\mu$ l洗脱液来冲洗平板，接下来控干平板也需要快速操作。需要用吸水纸来尽可能的将平板中的液体吸干。冲洗时应避免静置时间太长。

5. 当添加试剂到平板中的时候，要避免破坏已经包被过的孔壁，例如，移液枪头触碰到底部或者一侧的孔壁。有一种操作方式可以避免此类情况的发生，当加样时（右手操作的人员）可以按照从左到右的顺序，让移液器的枪头每次都在孔的右侧边缘加样，这样可以避免触碰到孔的壁和底部。

6. 当反应进行的时候，要尽可能减少平板的蒸发。可以用附带的覆盖膜覆盖平板或用一個空的平板置于反应平板之上。

7. 在完成最后一次洗板操作，加入TMB底物之前，用干净的纸巾轻轻擦拭平板的底部以避免平板底部的灰尘和指痕影响OD值的准确读取。

8. 一旦加入TMB底物，平板中的过氧化酶（HRP）就会催化其转化为蓝色物质。通常情况下，10-15分钟的反应时间就可以让颜色反应达到理想状态，此时反应应当终止。切记，如果反应时间充足，即使是少量的过氧化物酶（HRP）都可以把TMB底物转化成产物。如果这样的话，就很难区分不同样品之间的差异。应设法使450nm的吸光度（OD值）低于2.0，这样可以得出最准确的结果。OD值过高会影响测定的准确性，因为如果OD值是1.0，表明有10%的光被检测到，而OD值是2.0，则表明只有1%的光被检测到。

## 实验步骤

1. 请按后面所附的平板示意图来规划待测样品加入的位置，这有利于在数据分析时确定标准品和待测样品的相应位置。如下一页所示平板分布排列，平板上每一种抗体分布在6个孔中。A到H行由于边缘效应没有包被抗体。我们推荐的设计是实验最好做三次重复以最大限度减少误差。例如，我们已经展示的三次重复的平板分布，高亮部分添加参照的化合物，下方的孔添加待测试的化合物。两次重复则B,C行添加标准参照物，D,E行和F,G行添加待测试样品。

2. 将十倍的磷酸缓冲液(10x PBS-T)和五倍的稀释液(5x Dilution buffer)用水稀释成一倍溶液。在开始之前检查浓缩液组分是否有沉淀，如果有沉淀在用之前用温水浴略微加热。将50ml的10倍的 PBS-T 用450ml纯水稀释成500ml，将10ml5倍的稀释液用40ml纯水稀释成50ml。

3. 稀释你的样品和非格司亭标准品到 $5\mu\text{g}/\text{ml}$  ;如果三次重复则每个测定样品需要准备5ml。在平板的每个孔中加入 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的样品或者非格司亭标准品 $100\mu\text{l}$ 。两次重复，例如非格司亭标准品在2-3排，样品1在4-5排，样品2在6-7排。覆盖平板在室温下反应1小时。

4. 在上面的反应过程中，将 $0.5\text{mg}/\text{ml}$ 的报告抗体 $150\mu\text{l}$ 加入15ml的稀释液稀释成 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

5. 控干平板并用 $250\mu\text{l}$ 的洗脱液清洗每个孔。再次控干平板并将平板倒置在吸水纸上，尽量让吸水纸将孔内液体吸尽。重复两次。

6. 每孔加入 $100\mu\text{l}$   $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的报告抗体。覆盖平板在室温下反应1小时。

7. 在上述反应进行时，用15ml稀释液将 $375\mu\text{l}$   $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 的链霉亲和素-HRP稀释到 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

8. 控干平板，每孔加入 $250\mu\text{l}$ 的洗脱液。再次控干平板并将平板倒置在吸水纸上，重复两次。



9. 每孔加入100 $\mu$ l稀释好的链霉亲合素-辣根过氧化物酶复合物。覆盖平板，室温下反应45分钟。

10. 控干平板，每孔加入250 $\mu$ l的洗脱液。再次控干平板并将平板倒置在吸水纸上，重复两次。

11. 每孔加入100  $\mu$ lTMB底物，待颜色反应15分钟以后，每孔加入终止试剂100 $\mu$ l终止反应。加入终止液以后，反应颜色由蓝色变成黄色。

12. 用酶标仪在450 nm波长下读取平板的数据。用H10-H12作为空白对照。

13. 将结果导入到Excel表格中，计算每个重复的平均数和差异。如果比较原始数据差异很大则表示实验操作有问题。

