



蛋白A(Protein A)酶联检测试剂盒(可拆卸)说明书

产品目录编号# AB000109C

此试剂盒包含检测生物药物内蛋白A (Protein A) 杂质所需要的全部组分。

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

在单克隆抗体药物的纯化过程中，以蛋白A (Protein A) 为基础的亲和层析是广泛应用的纯化方法之一，单克隆抗体可以有效的在此步骤中得到纯化。蛋白A 的最初来源是细菌 (Staphylococcus aureus) 细胞壁中的一个蛋白质，研究表明蛋白A 可能对人体有潜在的危害，它的生物学作用包括刺激人体多种细胞素 (IFN γ , TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4) 的释放。由于在蛋白A 亲和层析柱使用过程中会有微量的蛋白A 从层析柱上脱落下来，因此用精确灵敏的方法来确证单克隆抗体药物中蛋白A 的残留处于一个较低的和稳定的水平是单克隆抗体药物的质量标准之一。

蛋白A (Protein A) 酶联检测试剂盒是用来定量分析生物药物中蛋白A杂质的试剂盒。首先，用不同浓度的蛋白A标准蛋白制作一条标准曲线，然后再根据标准曲线来分析生物药物中残留蛋白A的含量。具体方法为：先将蛋白A标准蛋白或者待测样品适当稀释后加入已包被好抗蛋白A抗体的96孔平板中。经过1.5小时的保温，蛋白A与已经固定在平板上的抗体结合形成抗原-抗体复合物。此复合物被随后加入的生物素标记的抗蛋白A的抗体结合并进一步形成更高级的复合

物，反应45分钟后洗去未结合的物质。再加入链霉亲合素-辣根过氧化物酶复合物（Streptavidin-HRP Conjugate），静置30分钟。因链霉亲合素可以与任何带生物素标记的抗体相结合，从而使链霉亲合素-辣根过氧化物酶复合物连接到平板上。接下来冲洗掉未结合的物质，加入TMB底物。固相上的酶催化底物产生颜色反应，待颜色反应一段时间后，终止反应。用酶标仪在450 nm波长下测定其结果，此结果能间接地反应结合到平板上的蛋白A数量的多少。根据蛋白A标准曲线定量分析生物药物中残留蛋白A的含量。

检测盒提供的组分

1. 已包被的96孔平板（可拆卸）

一个包被了兔抗蛋白A抗体的可拆卸平板。

检测盒 AB-000109C （一个可拆卸平板）

2. 蛋白A标准品（Protein A Standards）

用一种特殊的稀释液将蛋白A标准品稀释为七个浓度，从3.2 ng/ml到0.05 ng/ml（两倍递减），另外包括一个空白对照样品。

检测盒 AB-000109C （1250 μ l /管）

3. 十倍浓缩的磷酸缓冲液（10x PBS-T）

用去离子水将十倍磷酸缓冲液10倍稀释至50ml（1 x PBS-T），再用此溶液洗脱平板以及配置报告抗体、链霉亲合素-辣根过氧化物酶复合物稀释液和样品稀释液。（此磷酸缓冲液含0.1% Tween-20）。

检测盒 AB-000109C (50 ml) 。

4. 稀释液组分（Dilution Buffer Composition）

将稀释液组分全部加到100ml的1 x PBS-T溶液中溶解，混匀，用作报告抗体、链霉亲合素-辣根过氧化物酶复合物稀释液。从稀释好的溶液中取1ml用1 x PBS-T稀释50倍得50ml溶液，作为待测样品和回收率样品的稀释液。

检测盒 AB-000109C (1g) 。

5. 报告抗体（Reporting Antibody）

生物素标记过的抗蛋白A的抗体

检测盒 AB-000109C (150 μ l /管)，用稀释液 (15ml) 将0.5 mg/ml的报告抗体稀释100倍至5 μ g /ml，然后使用。

6. 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。

检测盒 AB-000109C (375 μ l / 管)，用稀释液 (15ml) 将4 μ g/ml的母液稀释40倍至0.1 μ g /ml，然后使用 (注：管底沉淀不影响实验)。

7. TMB底物 (TMB Substrate)

检测盒 AB-000109C (15 ml) ，直接使用。

8. 终止反应试剂 (Stop Solution)

1 当量 (N) 硫酸 (腐蚀性！)

检测盒 AB-000109C (15 ml) ，直接使用。

9. 平板覆盖膜 (Plate Sealer)

检测盒 AB-000109C (一张)

10. 其它需要分析实验室提供的材料:

- ① 去离子水。
- ② 可在5-250 μ 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 – 50 ml离心管)，用于稀释样品或样品加热处理。
- 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。

⑥ 能进行四参数曲线拟合 (four parameter logistic curve fitting) 的软件 (也可用 Microsoft Excel 制图)。

特别提示

1. 像其它类似的产品一样，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，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3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（20-25°C）。注意报告抗体、链霉亲和素-辣根过氧化物酶复合物稀释液和待测样品稀释液的浓度不同。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. 尽管实验的每一步都有一定的时间允许范围，在同时进行多个平板检测或不同分析日期检测时，实验步骤不同的反应时间可能会影响实验结果。为了降低分析间的操作误差，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（从左到右或从上到下），每一步操作都应按照说明书进行。
4. 平板的冲洗十分重要，这一步如果操作不当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 μ 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

空干的平板静置时间太长。

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的完整性，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。可以用本试剂盒提供的覆盖膜覆盖平板或用一个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）都可以把全部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。应设法使平板中最高450 nm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。

待测样品的预处理

通常情况下，蛋白A会与待测样品中的单克隆抗体形成复合体从而影响准确的蛋白A测定。因此在酶联测定蛋白A之前应当用加热法将单克隆抗体沉淀，把蛋白A释放出来进行测定。蛋白A在短暂的加热处理时不会沉淀而单克隆抗体则在处理后形成聚合体，高速离心后可以从溶液中分离出来。

热处理步骤：

1. 准备待测样品：将待测样品用1.5毫升的塑料离心管将蛋白浓度稀释至0.5mg/ml，用样品稀释液进行稀释（详见检测盒提供组分4），每个待测

样品准备 1 毫升。做回收率的单克隆抗体样品先用样品稀释液稀释至 1 mg/ml, 准备 0.5 毫升, 然后加入 3.2ng/ml 的标准蛋白 A 溶液 0.5 毫升, 作为回收率测定样品, 保证体积都为 1 毫升。

2. 使待测样品变性, 除去其中的 IgG: 将样品置于沸水中(约 95°C 到 100°C) 处理三分半到四分半钟 (3.5-4.5 min.), 最好是四分钟 (4 min)。离心管盖可用针扎一小孔, 保证加热时离心管内气压稳定。样品处理的时间很关键, 处理过短或过长都会对蛋白 A 的测定精确性有影响。
3. 将处理过的样品在室温下冷却至少 15 分钟 (15 min.), 最长不超过两个小时 (2 Hrs.)
4. 用台式高速离心机离心, 设定转速在每分钟 12000 转 (12000 rpm), 离心 2-3 分钟 (2-3 min), 使蛋白沉淀, 取上清液进行蛋白 A 检测 (100 μ l/孔, 三个重复)。

实验步骤

1. 请按后面所附的平板示意图来规划蛋白A标准品和待测样品加入的位置, 这有利于在数据分析时确定标准蛋白和待测样品的相应位置。每个样品做三个重复。
2. 分别将**100 μ l** 标准蛋白和加热处理过的待测样品上清液加入到平板小孔中, 覆盖平板并让平板在室温下反应**1.5**小时。
3. 反向控干平板, 然后每孔加入**250 μ l** 的洗脱液。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。此步骤重复两次(共三次)。
4. 每孔加入**100 μ l**报告抗体 (Reporting Antibody)。覆盖平板, 室温下反应**45**分钟。
5. 控干平板, 每孔加入**250 μ 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 (此步骤与3相同)。

6. 每孔加入**100 μl** 稀释好的链霉亲和素-辣根过氧化物酶复合物。覆盖平板，室温下反应**30**分钟。
7. 控干平板，每孔加入**250 μl** 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（此步骤与3相同）。
8. 每孔加入**100 μl** TMB底物，待颜色反应稳定后（约**15**分钟），每孔加入终止试剂**100 μl** 终止反应并保持颜色稳定。
9. 用酶标仪在**450 nm**波长下读取平板的数据。用三个标准蛋白A 空白（H1，H2，H3）作对照读取数据。
10. 用酶标仪的自带软件（通常是四参数曲线拟合，four parameter logistic curve fitting）或坐标纸作出蛋白A的标准样品曲线，并由此计算出待测样品中的蛋白A的含量。

结果分析与计算

标准蛋白、待测样品和空白对照均做三个重复，并取其平均值。从标准蛋白和待测样品的平均值中减去空白对照的平均值得到净值。用对数作图纸或作图软件（4参数校正）制备标准曲线，由此推算出样品中蛋白A的浓度。请注意把样品的稀释倍数考虑在内。

数据分析

样品	测量 OD	[蛋白A]
0 ng/ml	0	0
0.05 ng/ml		0.05
0.1 ng/ml		0.1
0.2 ng/ml		0.2
0.4 ng/ml		0.4
0.8 ng/ml		0.8
1.6 ng/ml		1.6
3.2 ng/ml		3.2
未知 1		
未知 2		
未知 3		

酶标板分布图

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3.2	3.2	3.2	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品
B	1.6	1.6	1.6	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品
C	0.8	0.8	0.8	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品
D	0.4	0.4	0.4	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品
E	0.2	0.2	0.2	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品
F	0.1	0.1	0.1	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品
G	0.05	0.05	0.05	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品
H	空白 对照	空白 对照	空白 对照	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品