Sf9昆虫细胞宿主蛋白酶联检测试剂盒说明书

产品目录编号# AB000115C

此试剂盒包含检测生物药物内Sf9昆虫细胞宿主蛋白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

Sf9昆虫细胞宿主蛋白酶联检测试剂盒是用来定量分析以Sf9昆虫细胞为表达细胞的生物药物中宿主蛋白杂质的试剂盒。首先，用不同浓度的Sf9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宿主细胞残留蛋白的含量。具体方法为：先将Sf9标准蛋白或者待测样品适当稀释后加入已包被好抗Sf9宿主蛋白抗体的96孔平板中。经过1.5小时的保温，宿主细胞蛋白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Sf9宿主蛋白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，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的宿主细胞蛋白数量的多少。根据Sf9宿主蛋白标准曲定量分析生物药物中宿主细胞残留蛋白的含量。

检测盒提供的组分

1. 已包被的96孔平板

一个包被了兔抗Sf9宿主蛋白抗体的平板。

检测盒 AB-000115C（一个平板）

2. Sf9宿主蛋白标准品（Sf9HCP Standards）

600微升浓度为81µg/ml的Sf9宿主蛋白，足够配置从0.037 µg/ml到27µg/ml的标准曲线。需使用稀释液进行稀释。在实验前将提供的七个空白管作标记，分别为27 µg/ml, 9 µg/ml, 3 µg/ml, 1 µg/ml, 0.33 µg/ml, 0.11 µg/ml, 0.037 µg/ml和 0 µg/ml . 在每一管中加入1000 微升稀释液（参见5）。从提供的81µg/ml标准蛋白管中取500 微升， 加到27 µg/ml的标准品管中做1：3稀释，用移液枪混合三次，取500微升转移到9 µg/ml的标准品管中，依次类推直到0.037 µg/ml。 0 ng/ml 不做任何添加。每做一次稀释换一个新的移液枪头。

检测盒 AB-000115C（1个标准品管和8个空白管）

3. 报告抗体（Reporting antibody）

生物素标记过的抗Sf9宿主蛋白的抗体

检测盒 AB-000115C（150 µl /管），用稀释液（15ml）将0.25mg/ml的报告抗体稀释100倍至2.5 µg /ml(检测前提前3小时配置可以降低试剂盒的背景值)，然后使用。

4. 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-000115C（375µl / 管，1管），用稀释液（15ml）将4 µg/ml的母液稀释40倍至0.1 µg /ml，然后使用。

5. 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，用作标准蛋白，样品，报告抗体、链霉亲合素-辣根过氧化物酶复合物稀释液。

检测盒 AB-000115C (1g) 。

6. 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稀释至500 ml (1 **x** PBS-T)，再用此溶液洗脱平板。（此磷酸缓冲液含0.1% Tween-20）。

检测盒 AB-000115C (50ml) 。

7. TMB底物 (TMB Substrate)

检测盒 AB-000115C (15 ml)，直接使用。

8. 终止反应试剂 (Stop Solution)

1 mol/l 硫酸（腐蚀性！）

检测盒 AB-000115C(15 ml)，直接使用。

9. 平板覆盖膜（Plate Sealer）

检测盒 AB-000115C（一张）

9. 其他需要的材料：

① 去离子水

② 可在5-250 µl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

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

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（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 µl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。

实验步骤

1. 请按后面所附的平板示意图来规划宿主蛋白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** µl标准蛋白（标准蛋白配制请参考检测盒提供的组分2）和待测样品加入到平板小孔中。保留几个没加样品的孔作为空白对照。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 µl 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** µl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 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）。

6. 每孔加入**100** µl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30分钟。

7. 控干平板，每孔加入250 µl的洗脱液。静置2分钟，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12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。用三个孔作为空白对照，例如H10-H12。

10. 用酶标仪的自带软件（通常是四参数曲线拟合，four parameter logistic curve）或座标纸作出宿主蛋白的标准样品曲线，并由此计算出待测样品中的宿主细胞蛋白的含量。

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，由此推算出样品中宿主细胞蛋白质的浓度。请注意把样品的稀释倍数考虑在内。

数据分析

Sample	Mean OD	[HCP]
0.0 µg/ml HCP	0.349	
0.037µg/ml HCP	0.369	
0.11µg/ml HCP	0.472	
0.33µg/ml HCP	0.739	
1 µg/ml HCP	1.261	
3 µg/ml HCP	1.932	
9 µg/ml HCP	2.421	
27 µg/ml HCP	2.919	
Unknown 1		
Unknown 2		
Unknown 3		

酶标板分布图

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