



BESTCHROM

博 格 隆

Protein A ELISA Kit

使 用 说 明 书



目 录

1、背景资料	1
2、产品用途	1
3、产品特色	1
4、检测原理	2
5、试剂盒组分	2
6、操作步骤	3
7、数据分析	5
8、产品性能	6
9、注意事项	7
10、储存	8
11、订货信息	8

1、背景资料

蛋白 A 是分离自 A 型金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的一种蛋白质，分子量约为 42kDa, 含有 E、D、A、B、C、共五个可以和抗体 IgG 分子特异性结合的结构域。

利用蛋白 A 和抗体 IgG 的高亲和力，将其通过共价偶联于纯化介质之上，被广泛应用于抗体类产品的生产纯化过程之中。蛋白 A 应用于抗体纯化时，不可避免会产生脱落，导致抗体药物中含有蛋白 A。对于抗体的治疗用途等应用，必须尽量减少含有蛋白 A 的杂质，以避免对患者产生不良影响。2020 年版《中国药典》三部中“人用重组单克隆抗体制品种总论”及两个单抗类产品各论“尼妥珠单抗注射液”和“康柏西普眼用注射液”中，均对蛋白 A 残留检测进行了要求；美国 FDA 及《美国药典》<130> 章节也对蛋白 A 残留检测要求进行了说明。

2、产品用途

本公司生产的蛋白 A 残留检测试剂盒（酶联免疫吸附法）是一款高灵敏度的蛋白 A 残留检测试剂盒。可准确识别多款进口及国产纯化介质的配基蛋白 A，可灵敏准确的检测各生物制品的蛋白 A 残留。同时便于 Protein A 亲和介质制造商监测 Protein A 配基脱落情况。

适用的蛋白 A 的配基包括：1#Standard、2#Standard 等。

- ◆ **1#Standard:** 适用于检测本公司 AT Protein A Diamond、AT Protein A Diamond Plus、AT Protein A Diamond Ultra 亲和介质配基脱落。
- ◆ **2#Standard:** 适用于检测本公司 Novo-A Diamond、Extrem A Diamond 亲和介质配基脱落。

3、产品特色

- 通用性高，适配于多种重组、耐碱性蛋白 A 残留检测。
- 检测灵敏度高，标准曲线上 0ng/mL 与 0.16ng/mL 的 OD 比值约为 2-5 倍。
- 精密度高，批间、批内偏差<10%。
- 样品前处理方式为酸处理，无繁琐的加热、离心等步骤，且捕获抗体、抗原、检测抗体同时孵育反应，无需多次洗板，操作简便。
- 试剂盒的稳定性良好，试剂盒在 37°C 放置 1 个月，性能无明显变化，但仍建议

用户在 2-8°C 条件下存放。

4、检测原理

本试剂盒依据双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术测定样品中的蛋白 A 残留。含有蛋白 A 的样品首先使用试剂盒提供的样品稀释液 (Sample Diluent) 稀释，然后加入变性缓冲液 (Denaturing Buffer) 并混合均匀，使蛋白 A 与样品抗体分离，然后将变性后的样品加入包被有多克隆抗蛋白 A 捕获抗体的酶标板中反应。第二种抗蛋白 A 检测抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 直接交联，形成了固相抗体-蛋白 A-酶联抗体的夹心复合物。经过一个洗涤步骤除去任何未结合的反应物。随后与四甲基联苯胺 (TMB) 反应，颜色由无色转变为蓝色，并在终止液 (Stop Solution) 的作用下最终转变为黄色。在 450nm 和 650nm 处测定其吸光度值 (OD 值)，OD 值与样品中蛋白 A 含量呈正相关。

5、试剂盒组分

编号	组分	规格	描述
1	抗蛋白 A 抗体预包被酶标板	8 孔 x12 条	可拆卸，根据实验需求用量使用
2	1#Standard	8 支 x1mL	0、0.16、0.31、0.63、1.25、2.5、5、10ng/mL
3	2#Standard	8 支 x1mL	0、0.16、0.31、0.63、1.25、2.5、5、10ng/mL
4	Anti-Protein A:HRP (100x)	150μL/支	酶联抗体，使用 Anti-Protein A:HRP Diluent 稀释至 1x 使用
5	Anti-Protein A:HRP Diluent	12mL/瓶	酶联抗体稀释液
6	Denaturing Buffer	12mL/瓶	柠檬酸盐缓冲液，用于样品变性处理
7	Sample Diluent	25mL/瓶	用于样品稀释处理
8	Stop Solution	12mL/瓶	酸溶液，腐蚀性
9	TMB	12mL/瓶	含有 3,3',5,5'-四甲基联苯胺和 H ₂ O ₂ 的溶液
10	Wash Concentrate (10x)	50mL/瓶	用去离子水配置成 1x 使用
11	Sample Treatment Plate	96 孔 PCR 板	用于样品变性处理

6、操作步骤

- 试剂盒准备：试剂盒各组分在使用前需恢复至室温。
- 试剂准备：
 - Wash Concentrate (10x) : 使用去离子水配置成 1x 使用；
 - Anti-Protein A:HRP (100x) : 使用 Anti-Protein A:HRP Diluent 配置成 1x 使用；
- 样品准备：
 - 待测样品：使用 Sample Diluent 稀释后备用，推荐样品稀释 10 倍以上，待测样品稀释后体积不少于 100 μ L。
 - 加标样品：加标样品的回收率检测为实验系统适用性和方法学验证的重要标准，制备的加标样品体积不少于 100 μ L。
- 实验步骤：
 - 试剂盒各组分在使用前请恢复至室温，所有操作均在室温下进行。建议所有加样孔进行复孔测定。
 - 加样：待检测样品、加标样品使用 Sample Diluent 稀释至合适倍数，取 50 μ L/孔加入至 Sample Treatment Plate 中，加入 25 μ L/孔 Denaturing Buffer, 500rpm 振荡孵育 10min，标准品按照相同方法操作。取 100 μ L/孔 Anti-Protein A:HRP (1x) 至预包被多克隆蛋白 A 捕获抗体的酶标板中，变性后的待测样品、加标样品和标准品和分别取 25 μ L/孔 加入至酶标板中，每个样品、标准品两个复孔，500rpm 振荡孵育 2h。
 - 洗涤：用力将酶标板甩干，再加入 300 μ L/孔的 Wash Concentrate (1x)，重复 4 次。
 - 显色：加入 100 μ L/孔的 TMB，室温避光静置孵育，直至最高浓度标准品显色至深蓝色。
 - **1#Standard 及对应的待测样品/加标样品推荐显色时间 10min, 2#Standard 及对应的待测样品/加标样品推荐显色时间 5min。**
 - 终止：加入 100 μ L/孔的 Stop Solution (颜色由蓝色变为黄色)。
 - 用酶标仪检测各孔的 450 nm 和 650 nm 吸光值，计算 450 nm 和 650 nm 吸光度的差值。

- 蛋白 A 泄漏检测操作简图

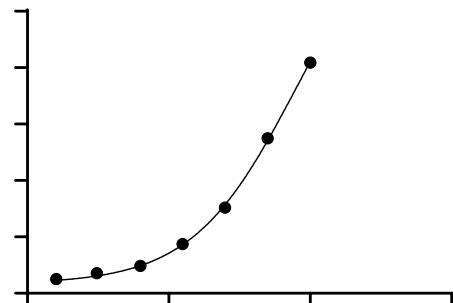


7、数据分析

- 吸光度值的计算：每个标准品或样品的吸光收度值（OD 值）=OD_{450nm}-OD_{650nm}，OD 值取复孔平均值。使用酶标仪自带软件、GraphPad Prism 等软件对结果进行分析，以标准品浓度为横坐标（X），标准品吸光收度值为纵坐标（Y）绘制标准曲线，推荐使用四参数曲线拟合方程。利用拟合的标准曲线计算出待测样品和加标样品中的蛋白 A 含量，注意稀释倍数。

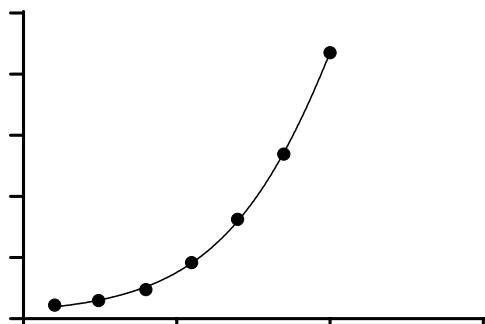
➤ 适用于 1#Standard 的标准曲线

1#Standard 浓度 (ng/mL)	平均 OD 值
10	2.046
5	1.373
2.5	0.759
1.25	0.436
0.63	0.242
0.31	0.178
0.16	0.125
0	0.057



➤ 适用于 2#Standard 的标准曲线

2#Standard 浓度 (ng/mL)	平均 OD 值
10	2.177
5	1.347
2.5	0.814
1.25	0.459
0.63	0.239
0.31	0.149
0.16	0.112
0	0.032



8、产品性能

- 加标实验和回收率验证：存在人 IgG 的情况下评估 1#Standard 和 2#Standard，由于 hIgG 和 Protein A 的高亲和力，将 250ng/mL 的 Protein A 与 25mg/mL 的 hIgG 参照体积比为 1:1 进行混合 (ppm=10)，混合后的样品使用试剂盒中 Sample Diluent 稀释，然后将样品变性处理。从试剂盒标准曲线中得到样品的实测浓度，通过实测浓度除以预期浓度计算预期百分比值 (n=9)。
 - 精密度：分为批内精密度和批间精密度。
- 批内精密度：

通过单次实验对 3 个含 Protein A 的对照品进行 16 次重复分析测定。

#of Tests	1#Standard Concentration (ng/mL)	%CV
16	8	5.4
16	3	4.8
16	0.5	6.2

#of Tests	2#Standard Concentration (ng/mL)	%CV
16	8	6.1
16	3	5.7
16	0.5	7.3

- 批间精密度：

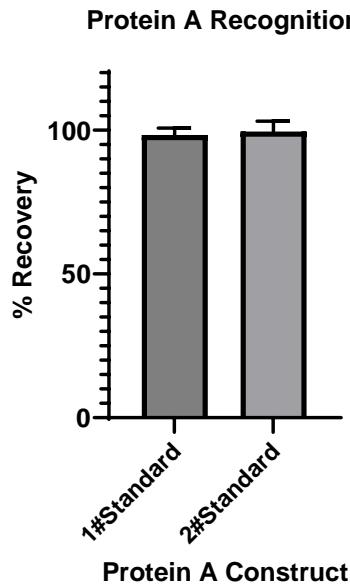
通过在几天内多次检测不同 Protein A 的对照品分析测定。

#of Tests	1#Standard Concentration (ng/mL)	%CV
3	8	6.4
3	3	7.2
3	0.5	5.9

#of Tests	2#Standard Concentration (ng/mL)	%CV
3	8	7.4
3	3	7.8
3	0.5	6.7

- 特异性：Protein A ELISA kit 识别 Protein A 的不同重组形式，下图描述了两种 Protein A 结构体在分析中进行的评估。

从试剂盒标准曲线中得到样品的实测浓度，通过实测浓度除以预期浓度计算预期百分比值 (n=9)。



9、注意事项

- 试剂盒内所有组分在使用前必须恢复至室温使用。
- 推荐样品浓度稀释至 1mg/mL 及以下，避免变性过程中产生沉淀。
- HOOK 效应：在一定的浓度范围内，分析物的浓度与检测信号值呈正比；但是，当超过某一浓度界限后，信号值反而随着浓度的增高而下降的现象。因为浓度与信号值的整条曲线形似钩子，所以称作钩状效应。当蛋白 A 浓度过高时，其表观浓度可能低于 10ng/mL 的标准。这种情况可以通过进一步稀释样品进行解决，因此在检测样品蛋白 A 泄漏时，推荐进行稀释线性评估，确保检测准确不受到“HOOK 效应”影响。
- 通过添加已知量的蛋白 A 进行回收率检测，一般情况可接受的回收率范围为 80%-120%，极端的 pH 值或盐浓度可能会导致回收率异常，在某些情况下，高浓度的产物抗体也会造成负干扰，如遇到相关问题。请联系博格隆技术支持，咨询如何解决。
- 加样时注意枪头不要触碰酶标板底部，防止包被层破坏。

- 酶标板洗涤后拍干，注意防止板条脱落。
- 当反应进行时，为了尽可能的减少板中溶液的蒸发，推荐使用试剂盒中附带的封板膜覆盖在酶标板和 Sample Treatment Plate 上。
- 试剂盒建议在有效期内使用，每次检测样品 Protein A 泄漏时均需使用相关标准品，不建议不同批次的试剂混用。
- 检测结果的不同可能由多种因素引起，包括实验人员的操作，移液器的使用，洗板方式，反应时间或温度等。
- 本试剂盒仅供体外研究实验，不用于临床诊断。
- 其他需要的试剂材料（试剂盒未提供）：去离子水、1.5mL 低吸附离心管、高精度移液器及低吸附枪头、吸水纸、酶标仪、微孔板振荡仪器（200-500rpm）、能进行四参数曲线拟合的软件（如 GraphPad Prism）。

10、储存

需保存在 2-8℃ 条件下。

11、订货信息

产品名称	货号
Protein A ELISA Kit	EK001
抗蛋白 A 抗体预包被酶标板	EK001-01
1#Standard	EK001-02
2#Standard	EK001-03
Anti-Protein A:HRP (100x)	EK001-04
Anti-Protein A:HRP Diluent	EK001-05
Denaturing Buffer	EK001-06
Sample Diluent	EK001-07
Stop Solution	EK001-08
TMB	EK001-09
Wash Concentrate (10x)	EK001-10
Sample Treatment Plate	EK001-11