



**BESTCHROM**

博 格 隆

# Protein L ELISA Kit

## 使用说明书



## 目 录

1、产品介绍 .....	1
2、检测原理 .....	1
3、操作步骤 .....	3
4、数据分析 .....	4
5、产品性能 .....	4
6、注意事项 .....	5
7、储存 .....	6
8、订货信息 .....	6

## 1、产品介绍

Protein L 与抗体 kappa 轻链的可变区结合，不干扰抗原结合位点，可用于层析介质中捕获抗体和抗体片段。由于受溶液、pH 等影响，在层析过程中 Protein L 不可避免会产生微量脱落，导致抗体药物中含有 Protein L 残留。本公司生产的 Protein L ELISA Kit 试剂盒（酶联免疫吸附法）是一款高灵敏度的蛋白 Protein L 残留检测试剂盒，可准确识别本公司生产销售的 Diamond Protein L 亲和层析介质的配基，进而灵敏准确地检测用 Diamond Protein L 进行层析纯化的各生物制品中 Protein L 配基残留。

## 2、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 Protein L 残留。含有 Protein L 的样品首先使用试剂盒提供的样品稀释液（Sample Diluent）稀释，然后通过煮沸，使 Protein L 与样品抗体分离，最后将离心后的样品加入包被有多克隆抗 Protein L 捕获抗体的酶标板中反应。第二种抗 Protein L 检测抗体与辣根过氧化物酶（HRP）直接交联，形成了固相抗体-Protein L-酶联抗体的夹心复合物。经过 2 个洗涤步骤除去所有未结合的反应物，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，颜色的深浅与样品中存在的 Protein L 配基的量成正比。在 450<sub>nm</sub> 和 650<sub>nm</sub> 处测定其吸光度值（OD 值），OD 值与样品中 Protein L 含量呈正相关。

## 3、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。试剂盒组分及对应描述见表一。

表一 试剂盒组分

编号	组分	规格	描述
1	抗 Protein L 抗体预包被酶标板	8 孔×12 条	可拆卸，根据实验需求用量使用
2	6# Standard	8 支×1mL	0 ng/mL、0.16 ng/mL、0.31 ng/mL、0.63 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、5 ng/mL、10ng/mL
3	Anti-Protein L:HRP（100X）	150μL/支	酶联抗体，使用 Anti-Protein L:HRP Diluent 稀释至 1X 使用

编号	组分	规格	描述
4	Sample Diluent	2 瓶×25mL/瓶	样品稀释液
5	Stop Solution	12mL/瓶	酸溶液，具腐蚀性！ ——反应终止液
6	TMB	12mL/瓶	含有 3,3',5,5'-四甲基联苯胺和 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 的溶液
7	Wash Concentrate (10X)	50mL/瓶	用去离子水配置成 1X 使用

● 试剂准备：

- Anti-Protein L:HRP (100X)：使用 Sample Diluent 配制成 1X 使用；
- Wash Concentrate (10X)：使用超纯水配制成 1X 使用；

● 样品准备：

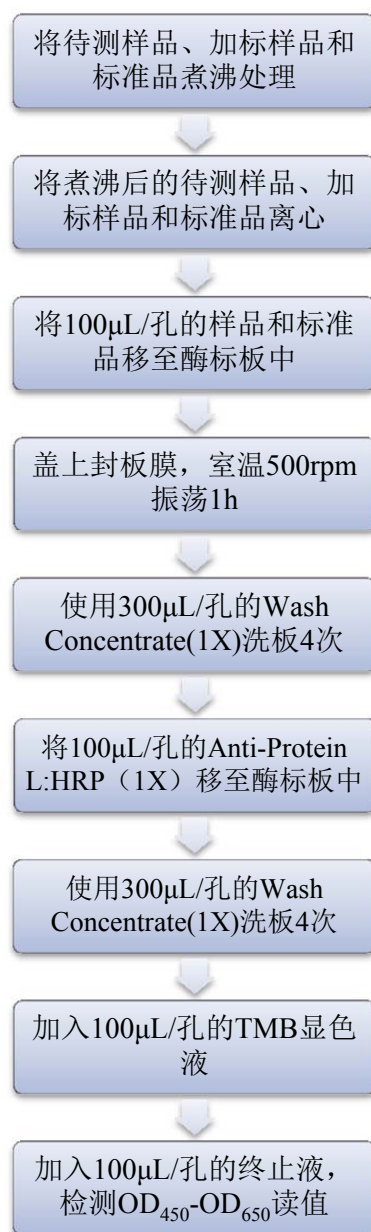
- 标准品：使用前涡旋并离心。
- 待测样品：将所有的待测样品 pH 值调节至 7.4 左右，使用 Sample Diluent 稀释后备用，推荐样品稀释至 1mg/mL 及以下，待测样品稀释后体积不少于 400μL。
- 加标样品：加标样品的回收率检测为实验系统适用性和方法学验证的重要标准，制备的加标样品体积不少于 400μL。
- 含 Ig 的样品推荐煮沸 20min，含 Ig 片段的样品推荐煮沸 1h。
- 煮沸后的待测样品、加标样品和标准品使用离心机进行离心，12000g 离心 5min。
- 注意：针对不同 Ig 片段，可以通过改变煮沸时间和稀释度优化样品的制备方案，通常情况下较小的目标分子需要较长的煮沸时间。

● 实验步骤：

- 试剂盒各组分在使用前恢复至室温，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：
  - 1) 将煮沸处理后的待检测样品、加标样品和标准品取 100μL/孔加入至预包被多克隆 Protein L 捕获抗体的酶标板中，每个样品、标准品两个复孔（平行），500rpm 振荡孵育 1h。
  - 2) 洗涤：将酶标板内液体甩干，再加入 300 μL/孔的 Wash Concentrate (1X)，重复 4 次。
  - 3) 取 100 μL/孔 Anti-Protein L:HRP (1X) 至预包被多克隆 Protein L 捕获抗体的酶标板，500rpm 振荡孵育 1h。

- 4) 洗涤：将酶标板内液体甩干，再加入 300  $\mu\text{L}$ /孔的 Wash Concentrate (1X)，重复 4 次。
- 5) 显色：加入 100  $\mu\text{L}$ /孔的 TMB，室温避光静置孵育 10min，直至最高浓度标准品显色至深蓝色。
- 6) 终止：加入 100  $\mu\text{L}$ /孔的 Stop Solution（颜色由蓝色变为黄色）。
- 7) 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。

● Protein L 泄漏检测操作简图

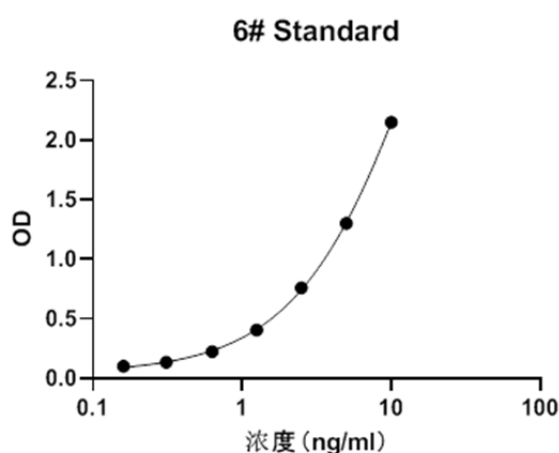


## 4、数据分析

- 吸光度值计算：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 Protein L 含量，注意稀释倍数。

➤ 适用于 6# Standard 的标准曲线

6# Standard (ng/mL)	平均 OD 值
10	2.149
5	1.301
2.5	0.759
1.25	0.4055
0.63	0.224
0.31	0.134
0.16	0.102
0	0.042



## 5、产品性能

- 加标实验和回收率验证：存在 Kappa IgG 的情况下评估 Protein L，由于 Kappa IgG 和 Protein L 的高亲和力，将 1mg/mL 的 Kappa IgG 与不同浓度的 6# Standard 混合，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。
- 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 L 的对照品进行 16 次重复分析测定

#of Tests	6# Standard Concentration(ng/mL)	%CV
16	8	6.4
16	3	5.8
16	0.5	6.2

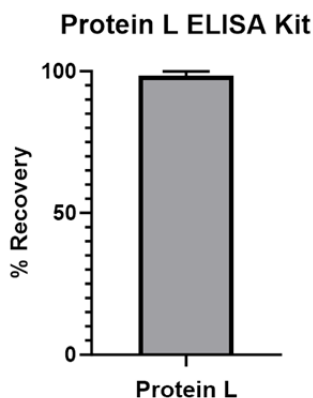
➤ 批间精密度:

使用 3 个批次的试剂盒对含 Protein L 的对照品分析测定

#of Tests	6# Standard Concentration(ng/mL)	%CV
3	8	7.2
3	3	5.1
3	0.5	5.7

- 特异性: Protein L ELISA Kit 特异性识别 Protein L, 下图描述了 Protein L 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)。



## 6、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, 推荐含 Ig 的样品推荐煮沸 20min, 含 Ig 片段的样品推荐煮沸 1h。若收率异常, 请延长煮沸时间, 最长可至 1h。
- 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。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 Protein L 浓度过高时, 其表现浓度可能低于 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 Protein L 泄漏时, 推荐进行稀释线性评估, 确保检测准确不受“HOOK 效应”影响。
- 通过添加已知量的 Protein L 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, 某些样品基质也会造成负干扰, 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。
- 酶标板洗涤后甩干，注意防止板条脱落。
- 当反应进行时，为了尽可能地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。
- 试剂盒建议在有效期内使用，每次检测样品 Protein L 泄漏时均需使用相关标准品，不同批次的试剂不建议混用。
- 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、酶标板底部是否有污渍或温度等。
- 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）。

## 7、储存

需保存在 2-8℃ 条件下。

## 8、订货信息

产品名称	货号
Protein L ELISA Kit	EK004
抗 Protein L 抗体预包被酶标板	EK004-01
6# Standard	EK004-02
Anti-Protein L:HRP (100X)	EK004-03
Sample Diluent	EK004-04
Stop Solution	EK004-05
TMB	EK004-06
Wash Concentrate (10X)	EK004-07