



BESTCHROM

博 格 隆

BVH ELISA Kit

使用说明书



目 录

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

1、产品介绍

BVH ELISA Kit 是一种夹心法 ELISA 检测试剂盒，用于检测使用 BVH Diamond 亲和层析介质纯化的生物药物样品中 BVH 配基的残留量。

该试剂盒具有以下特点：

- 检测灵敏度高，标准曲线上 0pg/mL 与 160pg/mL 的 OD 比值约为 2-3 倍。
- 精度高，批间及批内偏差均<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、抗原及检测抗体可同时孵育反应，无需多次洗板，操作简便。

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 BVH 残留。待检测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）混合均匀，使 BVH 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 BVH 捕获抗体的酶标板中反应。第二种抗 BVH 检测抗体与辣根过氧化物酶（HRP）直接交联，形成了固相抗体-BVH-酶联抗体的夹心复合物。经过一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 BVH 配基的量成正比。在 450_{nm} 和 650_{nm} 处测定其吸光度值（OD 值），OD 值与样品中 BVH 含量呈正相关。

3、试剂盒组分

编号	组分	规格	描述
1	抗 BVH 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	5# 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-BVH:HRP (100x)	150μL/支	酶联抗体，使用 Anti-BVH:HRP Diluent 稀释至 1x 使用
4	Anti-BVH:HRP Diluent	12mL/瓶	酶联抗体稀释液



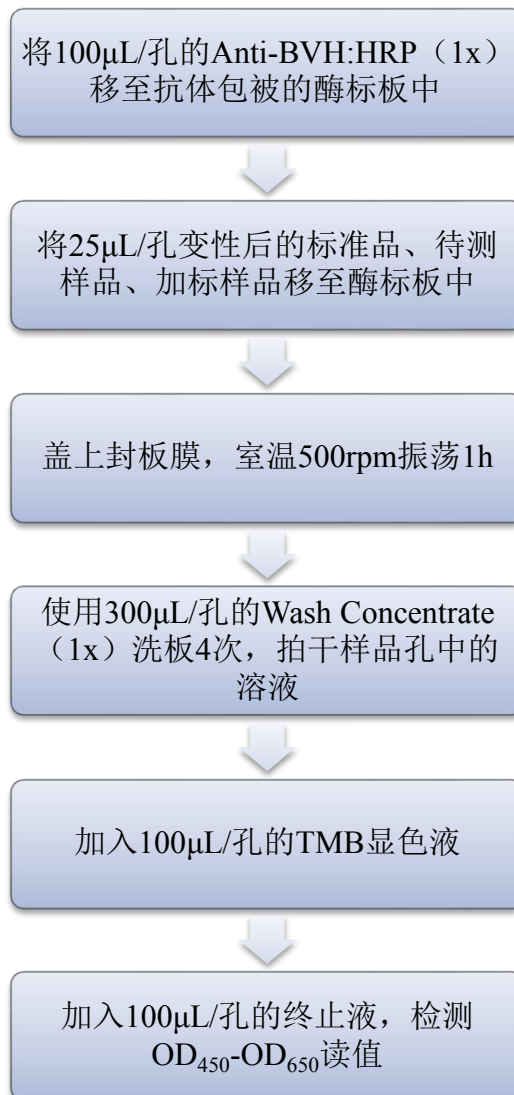
编号	组分	规格	描述
5	Denaturing Buffer	12mL/瓶	变性缓冲液 ——柠檬酸盐缓冲液 用于样品变性处理
6	Sample Diluent	25mL/瓶	样品稀释液
7	Stop Solution	12mL/瓶	酸溶液，具腐蚀性！ ——反应终止液
8	TMB	12mL/瓶	含有 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 和 H ₂ O ₂ 的溶液
9	Wash Concentrate (10x)	50mL/瓶	用去离子水配置成 1x 使用
10	Sample Treatment Plate	96 孔 PCR 板	用于样品变性处理

4、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：
 - Anti-BVH:HRP (100x)：使用 Anti-BVH:HRP Diluent 配置成 1x 使用；
 - Wash Concentrate (10x)：使用去离子水配制成 1x 使用；
- 样品准备：
 - 标准品：使用前涡旋混匀并离心。
 - 待测样品：使用 1x 的 Sample Diluent 稀释后备用，推荐样品稀释 10 倍及以上，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) 将待检测样品和加标样品使用 Sample Diluent 稀释至合适倍数，分别取 50 μ L/孔加入 Sample Treatment Plate 中，然后加入 25 μ L/孔 Denaturing Buffer，使用移液器至少吹吸 10 次混匀（注意控制吹吸速度，避免产生气泡）。
 - 2) 取 100 μ L/孔 Anti-BVH:HRP (1x) 至预包被多克隆 BVH 捕获抗体的酶标板，

然后将变性后的待测样品、加标样品和标准品分别取 25 μ L/孔加入至酶标板中，每个样品、标准品两个复孔（平行），500rpm 振荡孵育 2h。

- 洗涤：将酶标板内液体甩干，再加入 300 μ L/孔的 Wash Concentrate（1x）进行洗板，重复 4 次。
- 显色：加入 100 μ L/孔的 TMB，室温避光静置孵育 15min，直至最高浓度标准品显色至深蓝色。
- 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。
- BVH 检测操作简图

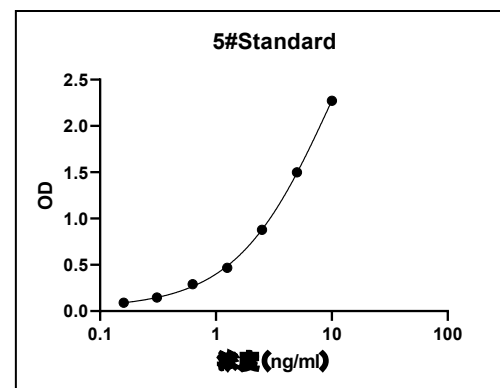


5、数据分析

- 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 BVH 含量，注意乘以稀释倍数。

➤ 适用于 5#Standard 的标准曲线

5#Standard 浓度 (pg/mL)	平均 OD 值
10	2.271
5	1.499
2.5	0.878
1.25	0.468
0.63	0.290
0.31	0.147
0.16	0.091
0	0.027



6、产品性能

- 加标实验和回收率验证：存在与 BVH 高亲和力结合的抗体的情况下评估 BVH Standard，由于抗体和 BVH 的高亲和力，将 250ng/mL 的 BVH Standard 与 25mg/mL 的抗体参照体积比为 1:1 进行混合（ppm=10），混合后的样品使用试剂盒中 Sample Diluent（1x）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。
- 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 BVH 的对照品进行 16 次重复分析测定。

#of Tests	5# Standard Concentration(pg/mL)	%CV
16	8	4.8
16	3	6.7
16	0.5	6.4

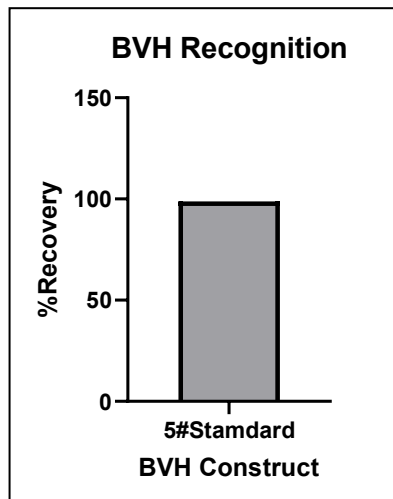
➤ 批间精密度:

使用 3 个批次的试剂盒对含 BVH 的对照品分析测定。

#of Tests	5# Standard Concentration(pg/mL)	%CV
3	8	6.2
3	3	4.7
3	0.5	5.5

- 特异性: BVH ELISA Kit 可特异性识别 BVH Standard, 下图描述了含 BVH 的抗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)。



7、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。
- 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 BVH 浓度过高时, 其表观浓度可能低于 4000pg/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 BVH 时, 推荐进行稀释线性评估, 避免受到“HOOK 效应”影响, 确保检测结果准确。
- 通过添加已知量的 BVH 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 BVH 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）。

8、储存

试剂盒：需保存在 2-8℃ 条件下。

9、订货信息

产品名称	货号
BVH ELISA Kit	EK002
抗 BVH 抗体预包被酶标板	EK002-01
5# Standard	EK002-02
Anti-BVH:HRP (100x)	EK002-03
Anti-BVH:HRP Diluent	EK002-04
Denaturing Buffer	EK002-05
Sample Diluent	EK002-06
Stop Solution	EK002-07
TMB	EK002-08
Wash Concentrate (10x)	EK002-09
Sample Treatment Plate	EK002-10