

## resDetect™ 胰酶残留检测试剂盒(酶联免疫分析法)

### 【产品名称】

resDetect™ 胰酶残留检测试剂盒(酶联免疫分析法)

### 【规格】

96 Tests

### 【货号】

RES-A002

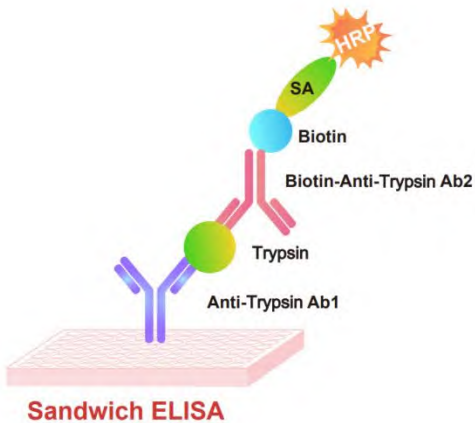
### 【背景介绍】

胰蛋白酶是早期原代细胞获得、贴壁细胞传代消化、大规模细胞工厂或微载体反应器培养的重要原料。在消化细胞时要严格控制胰蛋白酶的用量，胰蛋白酶残基的检测也是保证细胞正常生长的重要环节。由于在培养阶段使用了大量的胰蛋白酶进行消化，因此有必要对下游生产部分的胰蛋白酶进行检测。

注：本试剂盒仅适用检测猪源胰蛋白酶，下文中Trypsin表示猪源胰蛋白酶。

### 【检测原理】

本试剂盒应用ELISA夹心法。微孔板预包被了Anti Trypsin Antibody，样本中的Trypsin与微孔板上固定的Anti Trypsin Antibody结合，然后加入Biotin-Anti-Trypsin Antibody，形成抗体-抗原-生物素标记抗体复合物，最后加入Streptavidin-HRP，用底物显色，随后用终止液终止，板孔中溶液会由蓝色变为黄色，使用酶标仪在450 nm和630 nm处测定样品吸光度（OD<sub>450nm</sub>、OD<sub>630nm</sub>），OD值与样本中Trypsin含量呈正相关。



## 【注意事项】

1. 仅供科研使用，不可用于体外诊断；
2. 实验时,穿戴适当的个人防护服,请小心避免试剂接触皮肤、眼睛和衣物。如不慎接触皮肤，请立即用水冲洗。如有需要，请咨询医生；
3. 请在试剂盒有效期内使用；
4. 不同试剂盒及不同批号试剂盒的组分不能混用；
5. HRP 标记物的活性容易受到叠氮化物、氰化物和羟胺等亲核试剂的影响；
6. 如果样品的测值高于标准曲线的最高浓度值，用试剂盒中提供的稀释缓冲液稀释样品并重复测定；
7. 检测结果的不同可由多种因素引起，包括实验人员的操作、移液器的使用方式、洗板技术、反应时间或温度、试剂盒的储存等；
8. 本试剂盒在设计上去除或降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能的影响因素都已经去除。

## 【产品组份】

表1.产品组份

ID	组份名称	规格 (96 T)	物理状态	存储条件	
				未开启	已开启
RES02-C01	Pre-Coated Anti-Trypsin Antibody Microplate	1 plate(8×12 strips)	固体	2-8°C	2-8°C
RES02-C02	Recombinant Trypsin	200 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RES02-C03	Biotin-Anti-Trypsin Antibody	100 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RES02-C04	Streptavidin-HRP	5 µg	固体	2-8°C, 避光	-70°C, 避光
RES02-C05	1×Dilution Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES02-C06	20×Washing Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES02-C07	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES02-C08	Stop Solution	7 mL	液体	2-8°C	2-8°C

## 【储存条件】

1. 未开封：试剂盒保存于2-8°C，有效期见外包装盒标签。
2. 已开封：试剂盒开封后各组份按照表1存储条件保存，有效期自开封之日起为30天，未使用完的微孔板条需与干燥剂一起密封保存。

注：不要使用过期试剂。

## 【需要但未提供的实验仪器与耗材】

1. 单道、多道微量移液器和移液器吸头：需满足10 µL、300 µL、1000 µL加样需求；
2. 微孔震荡器：用于微孔板孵育反应；
3. 酶标仪：含450 nm / 630 nm波长的单波长或双波长酶标仪，450nm和630nm过滤器(如果酶标仪不提供双波长分析，可以只在450nm波长下测定吸光度)；
4. 离心管：1.5 mL，10 mL；

5. 计时器；
6. 试剂瓶；
7. 超纯水或去离子水；

### 【试剂准备】

1. 使用前将所有试剂恢复至室温（20°C-25°C）。如果溶液中有晶体形成，需平衡溶液至晶体完全溶解，检查每个缓冲液和标准溶液清澈透明，确保这些溶液混合均匀。
2. 按照表 2 建议，用超纯水将所提供的冻干品配制成存储溶液，在室温下溶解 15 至 30 分钟，轻轻吹吸混匀，避免剧烈摇动或涡旋。重构的存储液应在-70°C保存，建议冻融次数不要超过 1 次。

注：Streptavidin-HRP储备液要避光。

表2. 配制方法

ID	组份名称	规格 (96 T)	存储液浓度.	重构水体积 Vol.
RES02 -C04	Streptavidin-HRP	5 µg	50 µg/mL	100 µL

### 【检测流程】

#### 1. 配制工作液

##### 1.1 配制1×Washing Buffer:

取25 mL 20×Washing Buffer（RES02-C06），用超纯水/去离子水稀释并定容至500 mL，轻轻混匀,建议按照实验用量配置，当天用完。

##### 1.2 配制Biotin-Anti- Trypsin Antibody工作液:

根据实验用量(50 µL/well)用1×Dilution Buffer将Biotin-Anti- Trypsin Antibody（RES02-C03）稀释至100倍，该工作液需现用现配。请参考表3配置方法:

表3. 配制方法

Tests	工作液体积	Biotin-Anti- Trypsin Antibody	1×Dilution Buffer
96Tests	6000 µL	60 µL	5940 µL

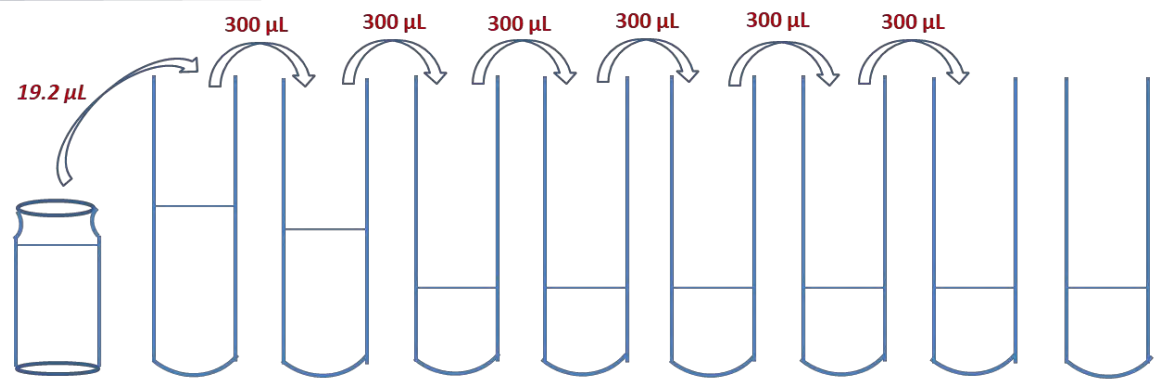
##### 1.3 配制Streptavidin-HRP工作液:

根据实验用量(100  $\mu\text{L}/\text{well}$ ) 用1 $\times$ Dilution Buffer (RES02-C04)将重构后的Streptavidin-HRP存储液稀释至0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 该工作液需避光保存, 现用现配。请参考表4配置方法。

**表4. 配制方法**

Tests	工作液体积	Streptavidin-HRP 存储液	1 $\times$ Dilution Buffer
96Tests	11000 $\mu\text{L}$	22 $\mu\text{L}$	10978 $\mu\text{L}$

## 2. 制备标准曲线

Tubes/ Solution Code	Trypsin Solution	Std 7	Std 6	Std 5	Std 4	Std 3	Std 2	Std 1	Std 0 (Blank)
Operating									
Solution Conc.	100 ng/mL	3.2 ng/mL	1.6 ng/mL	0.8 ng/mL	0.4 ng/mL	0.2 ng/mL	0.1 ng/mL	0.05 ng/mL	0 ng/mL
Dilution Buffer Vol.		580.8 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$

本试剂盒可用于Trypsin的定量检测, 试剂盒里含有重组Trypsin标准品, 用于建立标准曲线。

**注:** 稀释后的标准品应在配制后30min内使用, 为了防止任何粘壁, 我们建议每次稀释到下个梯度时更换枪头。

2.1. 将Trypsin标准品 (RES02-C02) 平衡至室温, Trypsin 标准品的初始浓度是100 ng/mL;

2.2. 用1 $\times$ Dilution Buffer将100 ng/mL Trypsin标准溶液稀释31.25倍至3.2 ng/mL, 此浓度为标准曲线的最高浓度点 (Std 7: 3.2 ng/mL);

2.3. 使用标曲最高浓度点 (Std 7: 3.2 ng/mL) 稀释制备标准曲线, 如下所示 (以标品每个浓度点稀释体积为600 $\mu\text{L}$ 为例), 每一步稀释后, 标准品的剩余体积应不小于0.1 mL;

2.4. 在 Std 6到Std 1的管中分别加300  $\mu\text{L}$  1 $\times$ Dilution Buffer;

2.5. 加300  $\mu\text{L}$  Std 7到300  $\mu\text{L}$  1 $\times$ Dilution Buffer中，轻轻混匀并重复连续梯度稀释，制成6个Trypsin标准液：Std 6， Std 5， Std 4， Std 3， Std 2， Std 1;

2.6. Std 0(阴性对照)是1 $\times$ Dilution Buffer;

### 3. 加入样品及抗体

将待测样品和系列稀释后的标准品加入反应孔内，每孔加入50  $\mu\text{L}$ ，然后立即加入50  $\mu\text{L}$  Biotin-Anti-Trypsin Antibody。

注：待测样品和标准曲线建议设置复孔。

### 4. 孵育

用封板膜封板，需避光，室温（20 $^{\circ}\text{C}$ -25 $^{\circ}\text{C}$ ）400-600 rpm/min震荡反应1小时。

### 5. 洗板

小心揭开封板膜，弃去孔中液体，每孔加入300  $\mu\text{L}$  1 $\times$ Washing Buffer，浸泡30 s，共洗板3次。每次洗板后，需在吸水纸上拍干。

### 6. 加入 Streptavidin-HRP 工作液

每孔加入100 $\mu\text{L}$  Streptavidin-HRP 工作液。

### 7. 孵育

用封板膜封板，需避光，室温（20 $^{\circ}\text{C}$ -25 $^{\circ}\text{C}$ ）400-600 rpm/min震荡反应30 min。

### 8. 洗板

重复步骤5洗板。

### 9. 显色

每孔加入100  $\mu\text{L}$  Substrate Solution。用封板膜封板，需避光，室温（20 $^{\circ}\text{C}$ -25 $^{\circ}\text{C}$ ）孵育20 min。

### 10. 终止

每孔加入 50  $\mu\text{L}$  Stop Solution，轻轻震荡酶标板至混合均匀。

注：孔中液体由蓝色完全变为黄色。

### 11. 读数

用酶标仪测定各孔在450 nm和630 nm波长的吸光值，请在终止5分钟内读数。

注: 各孔 OD<sub>450 nm</sub>扣除OD<sub>630 nm</sub> 读值可降低背景干扰。

## 【结果分析】

1. 将标准品和样品的复孔读数求取平均值。
2. 以标准品的浓度作为横坐标，OD 值作为纵坐标，利用四参数拟合绘制标准曲线，进行样品浓度的计算，计算浓度时需乘以相应的稀释倍数。
3. 标准曲线 R<sup>2</sup> 应大于 0.9900。
4. 标准曲线范围：0.05 ng/mL-3.2 ng/mL。大于标准曲线最高浓度点 OD 值范围的样品应报告为大于 3.2 ng/mL 或稀释样品使其在线性范围内。小于标准曲线最低浓度点 OD 值的样品应报告为小于 0.05 ng/mL。

## 【检测流程简述】

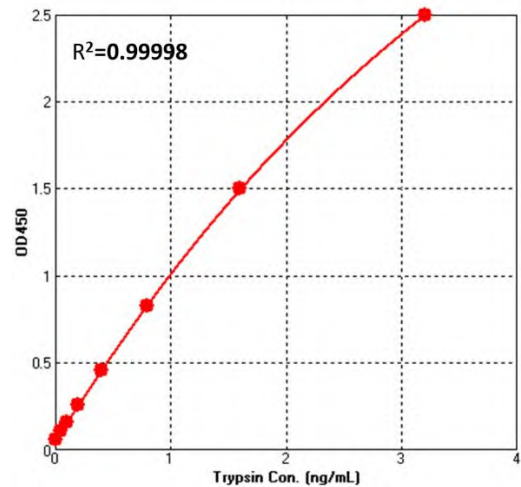




## 【典型数据】

每次实验，每块酶标板都需要设置标准曲线，具体 OD 值可能因不同实验室、实验员或设备而不同，以下 example 数据仅供参考。

Standard Num.	Concentration	OD <sub>450 nm</sub>
Standard 7	3.2 ng/mL	2.280
Standard 6	1.6 ng/mL	1.337
Standard 5	0.8 ng/mL	0.742
Standard 4	0.4 ng/mL	0.431
Standard 3	0.2 ng/mL	0.247
Standard 2	0.1ng/mL	0.156
Standard 1	0.05ng/mL	0.105
Standard 0	0 ng/mL	0.058



## 【定量限】

线性区间为 0.05-3.2 ng/mL， $R^2 > 0.99$ ，浓度回收率在 80%-120%之间且 OD 值  $CV \leq 20\%$  时所对应的最高浓度为 3.2 ng/mL，确认为试剂盒定量上限（ULOQ）。浓度回收率在 80%-120%之间且 OD 值  $CV \leq 20\%$  时所对应的最低浓度为 0.05 ng/mL，确认为试剂盒定量下限（LLOQ）。

	定量上限(ULOQ) (3.2 ng/mL)	定量下限(LLOQ) (0.1 ng/mL)
OD 值 CV(%)	3.98	1.81
回收率(%)	94	113

## 【精密度】

### 1. 批内精密度

3 个已知浓度的样品批内重复测试 10 次，以评估批内的精密度， $CV \leq 15\%$ 。

### 2. 批间精密度

3 个已知浓度的样品批间重复测试 10 次，以评估批间的精密度， $CV \leq 15\%$ 。

	批内精密度			批间精密度		
样品浓度(ng/mL)	3.2	0.5	0.05	3.2	0.5	0.05
n	10	10	10	10	10	10
平均值(ng/mL)	3	0.49	0.06	3.19	0.4	0.05
标准差	0.095	0.019	0.002	0.017	0.008	0.003
变异系数(%)	4	3	2	0.054	1.96	4.95

### 【准确度】

通过对 5 个不同浓度的胰酶样品进行 10 次测试，检测浓度回收率均在 80%-120%。

样品	1	2	3	4	5
样品浓度(ng/mL)	3.2	2.5	0.5	0.1	0.05
n	10	10	10	10	10
平均值(ng/mL)	2.392	2.064	0.541	0.165	0.117
标准差	0.095	0.043	0.019	0.002	0.002
变异系数(%)	3.98	2.09	3.48	1.41	1.81
回收率 (%)	94	97	97	106	113

### 【专属性】

经验证，下表内干扰物在相应浓度下对试剂盒检测体系无明显干扰，检测浓度均值低于定量下限（0.05ng/mL），加标回收率满足 75%-120%。

细胞名称	MDCK			HEK293			CHO			Vero		
细胞密度 cells/mL	2.8×10 <sup>6</sup>			4×10 <sup>6</sup>			2×10 <sup>6</sup>			3.6×10 <sup>6</sup>		
稀释倍数	2			2			2			2		
样品加标浓度 (ng/mL)	3.2	0.5	0	3.2	0.5	0	3.2	0.5	0	3.2	0.5	0
检测浓度均值 (ng/mL)	3.25	0.55	0	2.86	0.47	0	2.82	0.38	0	2.74	0.41	0
回收率 (%)	102	110	/	89	85	/	88	77	/	86	81	/

### 【特异性】

经验证，与牛胰蛋白酶无交叉。

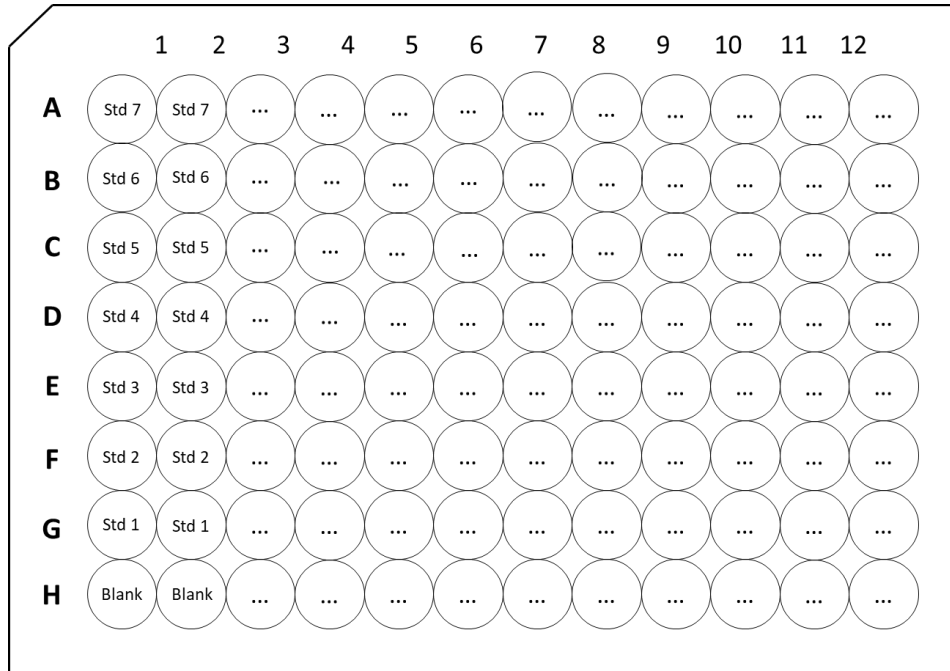
## 【基质干扰】

我们做了常用缓冲液的干扰试验，在缓冲液中添加已知浓度的胰酶标准品，计算回收率在80%-120%，结果表明本试剂盒具有良好的缓冲液兼容性。对于特定的缓冲液，建议您验证回收率确定最佳稀释倍数。

样品	胰酶标准品	
	回收率（%）	稀释倍数
20mM L-histidine with 0.1% (w/v) PF68, pH6.0	101	2
20mM L-histidine with 0.4% (w/v) Tween-80, pH6.0	96	2
1×PBS, pH7.3	81	2
1*PBS, pH7.3 with 11% Trehalose	83	2
20mM L-histidine, pH6.0	96	2
50mM Tris,100mM Glycine, pH7.5	92	2
100mM Tris,20mM Sodium citrate, pH7.5	89	2
20mM L-histidine 10% trehalose,pH6.0	89	2
50 mM Na Acetate, pH 3.5	91	2
25 mM Phosphate, pH 7.5	83	4
100 mM Glycine, pH 3.5	92	2
100 mM Triscitrate, 7.5	95	2

## 【孔板布局】

建议使用此平板布局记录标准品和样品



## 【实验过程中可能遇到的问题及解决方案】

问题	可能的原因	解决办法
1. 结果 OD 值非常低	(1) 孵育的时间或温度不够; (2) 显色反应时间太短; (3) 所用配制缓冲液的蒸馏水有问题; (4) 不正确的试剂储存方式或/和加入抗体/酶的工作液浓度太低; (5) 酶标仪滤光片不正确; (6) 不正确的试剂储存方式; (7) 试剂盒没有充分平衡; (8) 移液器吸液量不足, 吸嘴内壁挂	a. 校正孵育箱温度; b. 校正定时钟准确定时; c. 使用新鲜合格的蒸馏水; d. 按照说明书保存试剂盒和准确配制工作液; e. 校正酶标仪; f. 保证各试剂在推荐储存温度下储存; g. 试剂室温平衡至少 15 分钟, 确保所有试剂已平衡至室温 (20-25°C); h. 校正移液器, 吸嘴要配套, 装吸嘴时要

	<p>水太多或内壁不清洁；</p> <p>(9) 包袋中有湿气；</p> <p>(10) 试剂在使用前未混匀；</p> <p>(11) 洗涤步骤过于剧烈；</p> <p>(12) 实验开始后，微孔变干燥；</p>	<p>紧密，吸嘴内壁要清洁，最好一次性使用；</p> <p>i. 首次开袋标上日期，封好未使用的孔条，放入干燥剂；</p> <p>j. 使用前混匀试剂；</p> <p>k. 降低洗涤系统的压力；</p> <p>l. 实验过程勿中断，应连续完成所有的实验步骤；</p>
<p>2. 标准曲线和测定的重复性差</p>	<p>这是典型的由测定操作引起的问题，包括但不限于：</p> <p>(1) 加样品及试剂量不准；孔间不一致；加错样品；温育时间、洗板、显色时间不一致；</p> <p>(2) 加样品及试剂时，加在孔壁上部非包被区；</p> <p>(3) 加样过快，孔间发生污染；</p> <p>(4) 试剂/样品没有混匀；</p> <p>(5) 样品中有杂质或沉淀物：血清样品未完全凝固即加入，反应孔内出现纤维蛋白凝固或残留血细胞，易出现假阳性反应等；</p> <p>(6) 微孔中有气泡；</p> <p>(7) 倍比稀释标准品时未混匀；</p> <p>(8) 过早稀释</p> <p>(9) 使用用过的封板胶纸</p> <p>(10) 加入的体积不正确</p> <p>(11) 不同批号试剂盒中组分混用；</p>	<p>a. 重复测定样品，操作条件、人员等应尽可能与上次保持一致，以排除这些因素造成的不一致的可能性；</p> <p>b. 尽可能使用同一移液器并装紧吸嘴；</p> <p>c. 加液时小心操作；</p> <p>d. 样品稀释前应充分混匀，确保充分混匀试剂；</p> <p>e. 使用前离心；</p> <p>f. 用针尖挑破气泡；</p> <p>g. 稀释标准品的每一步均需混匀；</p> <p>h. 标准品在快要使用时稀释；</p> <p>i. 每次须使用新的封板胶封住反应；</p> <p>j. 快速、等量的将标准品分配到各个微孔中；</p> <p>k. 不混用不同批号试剂盒中组分；</p>

<p>3.空白背景高</p>	<p>(1) 洗板不干净；          (2) 试剂过期；          (3) 洗涤不充分；          (4) 阴性对照孔被阳性对照或样品污染；          (5) 蒸馏水受酶等污染；          (6) 试剂混用；          (7) 试剂配制浓度有误，如酶的浓度过高；          (8) 孵育温度过高或反应时间过长；          (9) 显色时间过长；          (10) 底物在使用前曝光；          (11) 读板前停留时间过长；</p>	<p>a. 浓缩洗液准确配制：10xWashing Buffer 如有结晶则应让结晶于室温全部溶解后再量取稀释；          b. 使用保质期内试剂；          c. 充分洗涤，彻底拍干；          d. 加样或加酶拍板的滤纸应弃去不用，不要反复使用，否则易造成污染；吸嘴尽可能一次性使用；          e. 使用新鲜蒸馏水；          f. 不同批号试剂勿混用；          g. 请按说明书所示稀释倍数配制；          h. 检查孵育箱的温度是否正确、稳定；          i. 显色反应时间适当缩短；          j. 应保存在暗处，避光；          k. 加终止液后 10 分钟内读数；</p>
<p>4.边缘效应</p>	<p>(1) 蒸发；          (2) 温度不均匀；</p>	<p>a. 各步之间，须使用封版胶密封反应板；          b. 校准孵育箱，勿叠放反应板；</p>
<p>5.标准曲线良好，但样品无检测信号</p>	<p>(1) 样品中无检测物或检测物含量极低；          (2) 样品中其他物质影响/掩盖检测；          (3) 样品中检测物浓度过高，Hook 效应导致假低值。</p>	<p>a. 设置内参，重新实验；          b. 作适当稀释，降低其他物质的干扰，或作系列稀释，检测回收率；          c. 适当倍数稀释样品，检测物浓度尽量在试剂盒检测范围内。</p>