

resDetect™ VH3残留检测试剂盒(酶联免疫分析法)

【产品名称】

resDetect™ VH3残留检测试剂盒(酶联免疫分析法)

【规格】

96 Tests

【货号】

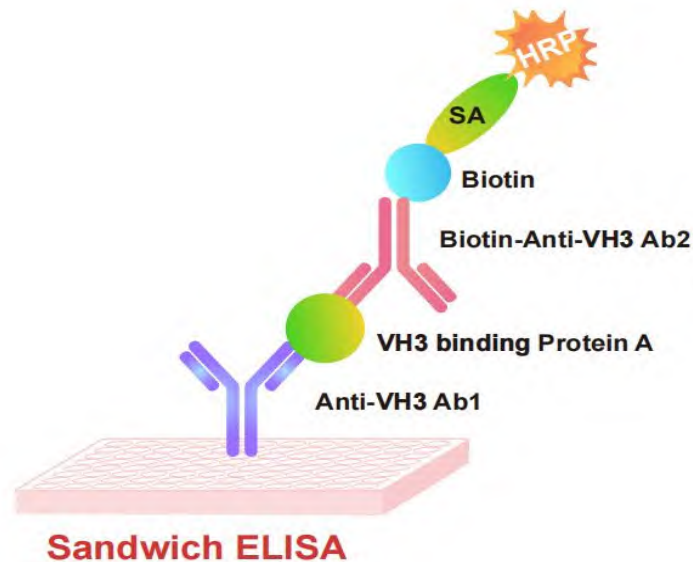
RES-A059

【背景介绍】

传统Protein A对抗体的Fc区和Fab VH3区都有亲和力。但VH3仅与抗体VH3序列家族的可变重链相互作用，可广泛用于相关抗体药物的纯化。然而，在纯化过程中，VH3可能从纯化柱中浸出，导致制备的抗体药物受到污染。因此，VH3纯化柱纯化的抗体药物中残留VH3的检测是抗体药物制剂生产过程中关键的质量控制步骤。

【检测原理】

本试剂盒应用ELISA夹心法。微孔板预包被了Anti-VH3 Antibody，首先，将试剂盒提供的标准样品和待测样品使用试剂盒中提供的变性缓冲液进行变性处理，使VH3和抗体解离，静置几分钟。在预包板中先加入Biotin-Anti-VH3 antibody，再加入变性处理后的VH3标准品和待测样品，确保二抗缓冲液能中和变性处理后的VH3标准品和待测样品，从而保护预包板上的VH3抗体。孵育后形成抗体+抗原+生物素化抗体的复合物，洗板后接着加入Streptavidin-HRP，孵育洗板，以去除任何未结合的反应物。最后，加入四甲基联苯胺（TMB）底物进行显色反应，板孔内溶液变成蓝色。随后用终止液终止反应，板孔中溶液会由蓝色变为黄色。使用酶标仪在450 nm和630 nm处测定样品吸光度值（OD_{450 nm}、OD_{630 nm}），OD值与样本中的VH3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
RES59-C01	Pre-Coated Anti-VH3 Antibody Microplate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
RES59-C02	Recombinant VH3 binding Protein A Standard(1µg/mL)	100 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RES59-C03	Biotin-Anti-VH3 Antibody	1.5 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES59-C04	Streptavidin-HRP	10 µg	冻干	2-8°C, 避光	-70°C, 避光
RES59-C05	10×Sample Dilution Buffer	15 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES59-C06	Denaturation Buffer	15 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES59-C07	20×Washing Buffer	30 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES59-C08	Antibody Dilution Buffer	15 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES59-C09	Streptavidin-HRP Dilution Buffer	15 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES59-C10	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
RES59-C11	Stop Solution	8 mL	液体	2-8°C	2-8°C

注：建议Biotin-Anti-VH3 Antibody使用前短暂离心，以使管壁或管盖的液体沉积到管底。

【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，请在有效期前使用。
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 μ L、300 μ L、1000 μ L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，450 nm和630 nm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】

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。

注： RES059-C06组分在低温（2-8°C）下不澄清，RES059-C05（2-8°C）在低温下容易结晶，所以必须确保这两个组分完全恢复至室温，直至液体澄清透明。

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，分装规格不低于5 μ g。

注： 链霉亲和素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.
RES059 -C04	Streptavidin-HRP	10 μ g	100 μ g/mL	100 μ L

【检测流程】

1. 工作液配制

1.1 配制1×Washing Buffer:

取25 mL 20×Washing Buffer, 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1×Sample Dilution Buffer:

取10 mL 10×Sample Dilution Buffer, 用超纯水/去离子水稀释并定容至100 mL, 轻轻混匀, 建议按照实验用量配置, 当天用完。

1.3 配制Biotin-Anti-VH3 Antibody工作液:

根据实验用量 (100 μ L/well) 用抗体稀释液 Antibody Dilution Buffer (RES059-C08) 将 Biotin-Anti-VH3 Antibody 稀释至10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-VH3 Antibody	Antibody Dilution Buffer
96Tests	11000 μ L	1100 μ L	9900 μ L

1.4 配制Streptavidin-HRP工作液:

根据实验用量 (100 μ L/well) 用 Streptavidin-HRP Dilution Buffer (RES059-C09) 将重构后的 Streptavidin-HRP 存储液稀释至0.15 μ g/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	Streptavidin-HRP Dilution Buffer
96Tests	11 mL	0.0165 mL	10.9835 mL

2. 制作标曲

本试剂盒可用于重组VH3在中性溶液中的定量检测, 试剂盒里含有VH3标准品, 用于建立标

准曲线。









注：稀释后的标准品应在配制后30 min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VH3标准品（RES59-C02）平衡至室温，VH3 标准品的初始浓度是1 $\mu\text{g/mL}$ ；

2.2 用1×Sample Dilution Buffer将1 $\mu\text{g/mL}$ VH3标准溶液稀释123倍至8.1 ng/mL ，此浓度为标准曲线的最高浓度点（Std 6: 8.1 ng/mL ）；

2.3 使用标曲最高浓度点（Std 6: 8.1 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 μL 为例），每一步稀释后，标准品的剩余体积应不小于0.1 mL；

- 1) 在Std 5到Std 2的管中分别加400 μL 1×Sample Dilution Buffer；
- 2) 在Std 1的管中分别加200 μL 1×Sample Dilution Buffer；
- 3) 加200 μL Std 6到400 μL 1×Sample Dilution Buffer中，轻轻混匀并重复连续梯度稀释，配制成5个VH3标准液： Std 5， Std 4， Std 3， Std 2，
- 4) 加200 μL Std 2到400 μL 1×Sample Dilution Buffer中，轻轻混匀并重复连续梯度稀释，制成标准液： Std 1； Std0(阴性对照)是1xSmample Dilution Buffer。

Tubes/ Solution Code	VH3 Stock Solution	Std 6	Std 5	Std 4	Std 3	Std 2	Std 1	Std 0 (Blank)
Operating								
Solution Conc.	1 $\mu\text{g/mL}$	8.1 ng/mL	2.7 ng/mL	0.9 ng/mL	0.3 ng/mL	0.1 ng/mL	0.05 ng/mL	0 ng/mL
Dilution Buffer Vol.		612 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	200 μL	300 μL

17

3. 样品及标准品处理

每种样品和标准品各取 100 μ L 到离心管中，每管加入 50 μ L 变性缓冲液即 Denaturation Buffer (RES059-C06)，上下吹吸混匀 15 次左右，每管混匀都要换新枪头，静置 5-10 分钟，待测。

注：应测定每个待测样品的回收率：

- 1) 所有浓度高于最高标准(Std 6)的样品必须稀释，或者添加的VH3和来自样品本身的内源性VH3的总浓度高于标准曲线最高值 (Std 6)，也需要将样品稀释到合理的浓度，另外若待测样品中含有干扰成分，也需要稀释以减少干扰；
- 2) 当样品需要被稀释时，用试剂盒提供的1×Sample Dilution Buffer稀释样品，得到可接受的背景值，而不是引入VH3杂质的信号，样品稀释应在样品变性步骤之前进行，以获得最佳结果；
- 3) 稀释后的样品在加标已知含量的VH3时也应具有可接受的回收率，当回收率在80%~120%范围内时，说明稀释后样品的检测值是可靠的；
- 4) 本回收率测试实验可在样品中加入超出线性范围一定浓度的VH3，然后将样品稀释到合理范围，进行测试，也可以将本试剂盒提供的浓度在线性范围内的标准品加入到待测样品中，例如，在1份2 mg/mL的测试样品中加入1份0.8 ng/mL, 0.4 ng/mL, 0.2 ng/mL标准品，这将产生0.4 ng/mL, 0.2 ng/mL, 0.1 ng/mL 的附加浓度值，任何来自样品本身的内源性VH3 binding Protein A在加标前也应进行测定，并通过该样品的50%稀释进行校正，应从加标样品确定的值中减去，并计算VH3 binding Protein A的浓度以给出回收率。如果样品本身的VH3浓度超过最高标准(Std6)，则先将样品稀释至线性范围浓度，再加入标准品进行回收测试。参考表5回收测试方法。

表5. 回收测试配制方法

样品回收测试 ID	样品稀释倍数	样品和标准品体积	样品最终浓度	VH3 binding Protein A 最终浓度
Sample 1-R1	2	150 μ L Standard 5 + 150 μ L test sample	1 mg/mL	0.4 ng/mL
Sample 1-R2	2	150 μ L Standard 4 + 150 μ L test sample	1 mg/mL	0.2 ng/mL

Sample 1-R3	2	150 μ L Standard 3+ 150 μ L test sample	1 mg/mL	0.1 ng/mL
Sample 2-R1	2	150 μ L Standard 5 + 150 μ L test sample	0.5 mg/mL	0.4 ng/mL
Sample 2-R2	2	150 μ L Standard 4 + 150 μ L test sample	0.5 mg/mL	0.2 ng/mL
Sample 3-R3	2	150 μ L Standard 3+ 150 μ L test sample	0.5 mg/mL	0.1 ng/mL

4. 加 Biotin-Anti-VH3 Antibody 工作液、标准品及样品

每孔加入 100 μ L Biotin-Anti-VH3 Antibody 工作液，再加入 50 μ L 准备好的标准品和待测样品。

注：所有标准品和待测样品，应在同一个板子内，并进行相同的处理。

5. 孵育

用封板膜封板，在室温（20°C-25°C）400-600 rpm/min 震荡反应 1 小时。

6. 洗板

彻底的清洗对实验得到正确结果至关重要。根据自己的实验条件选择专用自动洗板机系统或手动洗板程序。小心揭开封板膜，弃去孔中液体，每孔加入 300 μ L 1 \times Washing Buffer，弃去孔中的 1 \times Washing Buffer，在无绒毛吸水纸上拍干板子，请注意，必须完全去除洗涤缓冲液。重复上面的清洗步骤共 3 次。

7. 加入 Streptavidin-HRP 工作液

每孔加入 100 μ L Streptavidin-HRP 工作液。

8. 孵育

用封板膜封板，在室温（20°C-25°C）400-600 rpm/min 震荡反应 30 min。

9. 洗板

重复步骤 6 洗板。

10. 显色

每孔加入 100 μ L Substrate Solution。用封板膜封板，需避光，室温静置孵育 20 min，请勿震荡。

11. 终止

每孔加入 50 μ 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。

12. 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_{450 nm}扣除OD_{630 nm}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，然后减去零浓度标准品的 OD 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。若利用直线回归拟合，需选取合适的绘制区间，从而得到最佳的拟合曲线，保证回归分析的准确性。
3. 标准曲线 R^2 应大于 0.9900。
4. 标准曲线范围：0.05 ng/mL-8.1 ng/mL。如果样品的 OD 值大于分析标准曲线范围的样品应报告为大于 8.1 ng/mL，应稀释样品至线性范围内,并重复测定。如果样品的 OD 值小于分析标准曲线的样品应报告为小于 0.05 ng/mL。

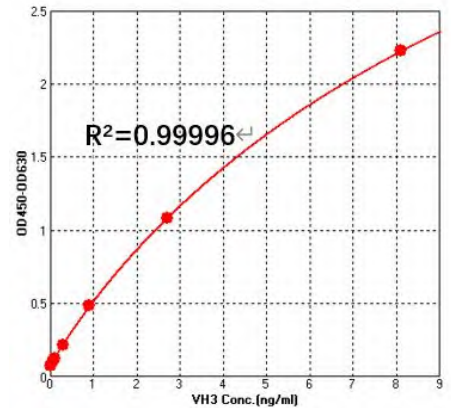
【检测流程简述】



【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 _{450nm-630nm}
Standard 6	8.1 ng/mL	2.23
Standard 5	2.7 ng/mL	1.08
Standard 4	0.9 ng/mL	0.49
Standard 3	0.3 ng/mL	0.22
Standard 2	0.1 ng/mL	0.12
Standard 1	0.05ng/mL	0.10
Standard 0	0 ng/mL	0.08



【灵敏度】

VH3 残留检测试剂盒的最低可检测浓度为 0.04ng/mL

【精密度】

1. 批内精密度

3 个已知浓度的样本批内重复测试 10 次，以评估批内的精密度。

2. 批间精密度

3 个已知浓度的样本批间重复测试 10 次，以评估批间的精密度。

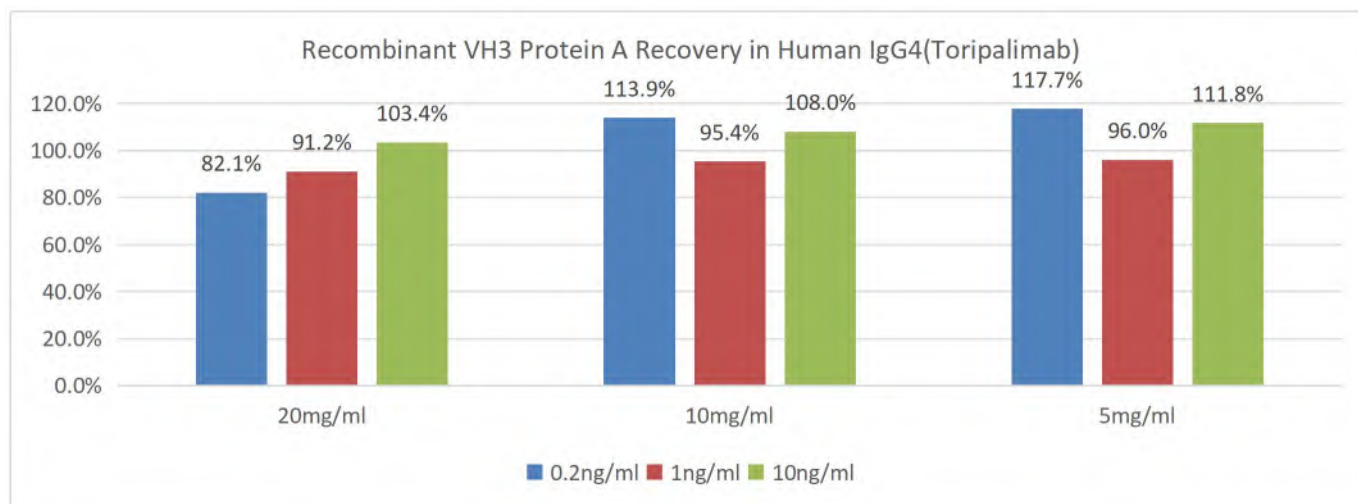
样本	批内精密度			批间精密度		
	1	2	3	1	2	3
n	10	10	10	10	10	10
平均值(ng/mL)	6.87	0.89	0.056	7.75	1.01	0.06
标准差	0.084	0.028	0.004	0.104	0.023	0.004
变异系数(%)	3	4	3	4	4	4

回收率(%)	85	99	114	96	112	120
--------	----	----	-----	----	-----	-----

【回收率】

将不同浓度的 VH3 (0.2 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL) Human IgG4 (Toripalimab) (20 mg/mL、10 mg/mL、5 mg/mL) 中, 然后稀释样品到合理的范围, 检测并计算 VH3 的浓度, 得到回收率。

添加重组 VH3 到 Human IgG4 (Toripalimab) 的回收率:



【基质干扰】

通过常用缓冲液的干扰试验, 试剂盒表现具有良好的缓冲器兼容性。对于特定的缓冲液, 建议验证回收率确定最小稀释倍数。

Matrix	Recombinant VH3 binding Protein A	
	Recovery (%)	Dilution Factor
20mM L-histidine with 0.1% (w/v) PF68, pH6.0	100.9	1
20mM L-histidine with 0.4% (w/v) Tween-80, pH6.0	114	1
1×PBS, pH7.3	86	1
1*PBS, pH7.3 with 11% Trehalose	91	2
20mM L-histidine, pH6.0	85	1
50mM Tris,100mM Glycine, pH7.5	81	1

100mM Tris,20mM Sodium citrate, pH7.5	85	1
20mM L-histidine 10% trehalose,pH6.0	99	2
50 mM Na Acetate, pH 3.5	98	1
25 mM Phosphate, pH 7.5	88	2
100 mM Glycine, pH 3.5	89	1
100 mM Triscitrate, 7.5	95	1
100 mM Trisacetate, 7.5	94	1

【专属性】

在不同检测样本 Human IgG1 (Bevacizumab, 1mg/mL) 和 Human IgG4 (Toripalimab, 1mg/mL) 中分别加入高于通常质量标准限度的 HEK293、E.coli 或 CHO 三个表达系统的宿主细胞蛋白(HCP 500 ng/mL) 和宿主细胞 DNA (HCD 0.5 ng/mL), 然后分别加入高、中、低浓度的 VH3, 加入与未加入 HCP 和 HCD 的 VH3 加标样品中 VH3 回收的比值, 作为专属性验证指标, 计算公式为: $(S3-S1) / (S2-S1) \times 100\%$ 。

实验设计如下:

ID	Sample ID	Antibody Conc.(mg/mL)	VH3 (ng/ml)	HCP Conc.(ng/mL)	HCD Conc.(ng/mL)
S1	S1	1	0	0	0
S2	S2-1	1	2.7	0	0
	S2-2	1	0.8	0	0
	S2-3	1	0.05	0	0
S3	S3-1	1	2.7	500	0.5
	S3-2	1	0.8	500	0.5
	S3-3	1	0.05	500	0.5

结果如下:

Sample	Antibody Conc. (mg/mL)	VH3 Conc. (ng/mL)	HCP Conc. (ng/mL)	HCD Conc. (ng/mL)	Bevacizumab			Toripalimab		
					HEK 293	E.coli	CHO	HEK 293	E.coli	CHO
Specificity of (VH3 binding Protein A) Recovery	1	2.7	500	0.5	98%	97%	98%	95%	93%	110%
	1	0.8	500	0.5	84%	108%	87%	90%	94%	109%
	1	0.05	500	0.5	90%	103%	103%	83%	110%	104%

【PLATE LAYOUT】

建议使用此平板布局记录标准品和样品

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 6	Std 6	Sample1	Sample1	Sample1-R	Sample1-R
B	Std 5	Std 5	Sample2	Sample2	Sample2-R	Sample2-R
C	Std 4	Std 4	Sample3	Sample3	Sample3-R	Sample3-R
D	Std 3	Std 3	Positive control	Positive control
E	Std 2	Std 2
F	Std 1	Std 1
G	Blank	Blank
H	Negative control	Negative control

【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，吸嘴内壁挂水太多或内壁不清洁； (9) 包袋中有湿气； (10) 试剂在使用前未混匀； (11) 洗涤步骤过于剧烈； (12) 实验开始后，微孔变干燥；	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℃）； h. 校正移液器，吸嘴要配套，装吸嘴时要紧密，吸嘴内壁要清洁，最好一次性使用； i. 首次开袋标上日期，封好未使用的孔条，放入干燥剂； j. 使用前混匀试剂； k. 降低洗涤系统的压力； l. 实验过程勿中断，应连续完成所有的实验步骤；
2. 标准曲线和测定的重复性差	这是典型的由测定操作引起的问题，包括但不限于： (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； (2) 加样品及试剂时，加在孔壁上部非包被区； (3) 加样过快，孔间发生污染； (4) 试剂/样品没有混匀； (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； (6) 微孔中有气泡； (7) 倍比稀释标准品时未混匀； (8) 过早稀释	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； b. 尽可能使用同一移液器并装紧吸嘴； c. 加液时小心操作； d. 样品稀释前应充分混匀，确保充分混匀试剂； e. 使用前离心； f. 用针尖挑破气泡； g. 稀释标准品的每一步均需混匀； h. 标准品在快要使用时稀释； i. 每次须使用新的封板胶封住反应； j. 快速、等量的将标准品分配到各个微孔中； k. 不混用不同批号试剂盒中组分；

	(9) 使用用过的封板胶纸 (10) 加入的体积不正确 (11) 不同批号试剂盒中组分混用；	
3.空白背景高	(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；	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；
4.边缘效应	(1) 蒸发； (2) 温度不均匀；	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；
5.标准曲线良好，但样品无检测信号	(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。	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。