

## resDetect™庆大霉素残留检测试剂盒（高灵敏度） (酶联免疫分析法)

### 【产品名称】

resDetect™庆大霉素残留检测试剂盒（高灵敏度）

### 【规格】

96 Tests

### 【货号】

RES-A079

### 【用途】

本试剂盒用于CGT、疫苗和其他生物药物的质粒DNA原料和蛋白质中残留庆大霉素的定量测定。该试剂盒使用NIFDC和USP标准品进行校准,仅供研究使用(RUO)。

### 【背景介绍】

庆大霉素的残留是生物制品生产过程中容易出现的问题。这容易导致人体的异常反应。因此应严格控制庆大霉素在生物制品或生物制品半成品中的残留量。

### 【检测原理】

本试剂盒采用竞争ELISA法,微孔板上预包被的庆大霉素偶联抗原与样品中残留的庆大霉素竞争结合HRP-抗庆大霉素单克隆抗体,然后通过添加TMB底物使用酶标板读取器检测吸光度值,吸光度值与样品中庆大霉素含量呈负相关。

### 【注意事项】

1. 仅供科研使用，不可用于体外诊断；
2. 该试剂盒适用于 CGT、疫苗和其他生物药物的质粒 DNA 原料和蛋白质中残留的庆大霉素的定量测定；
3. 对于其他生物制品样品的检测，建议进行适用性验证，以排除基质干扰；
4. 请在试剂盒有效期内使用；
5. 不同试剂盒及不同批号试剂盒的组分不能混用；
6. 样品值若大于标准曲线的最低值，应将样品用 1×Dilution Buffer 稀释后重新检测；
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品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
RES79-C01	Gentamicin Coated Plate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
RES79-C02	Gentamicin Standard	0.1152 µg	冻干粉	2-8°C	-70°C
RES79-C03	HRP-Anti-Gentamicin Antibody	6 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
RES79-C04	1×Dilution Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES79-C05	20×Washing Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES79-C06	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
RES79-C07	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，请在有效期前使用。
2. 已开封：试剂盒开封后各组分按照表 1 存贮条件保存，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：1. 不要使用过期试剂。

2. 重构后的庆大霉素标准品每管分装量应大于300uL，在-70°C可稳定储存24个月，不可反复冻融使用。

## 【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、50μL、300 μL、1000 μL加样需求
2. 酶标仪，含450 nm/630 nm波长
3. 离心管：1.5 mL，10 mL
4. 计时器
5. 试剂瓶
6. 超纯水或去离子水

## 【实验前注意事项】

1. 使用前将所有试剂恢复至室温（20°C-25°C）。
2. 使用后的试剂盒内组分需立即放回对应储存温度，样品及标准品准备完成后才可以将酶标板开封，未使用的酶标板条需立即放回密封袋中2-8°C储存。

## 【试剂准备】

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，在室温下静置10分钟，轻轻震荡后即可使用，避免剧烈摇动或涡旋。未使用的庆大霉素标准品每管分装量应大于300 uL，立即储存在-70°C。

表2. 配制方法

ID	组份名称	规格 (96 T)	存储溶液浓度	重构水体积Vol.
RES79-C02	Gentamicin Standard	0.1152 $\mu$ g	64 ng/mL	1.8 mL

## 【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。

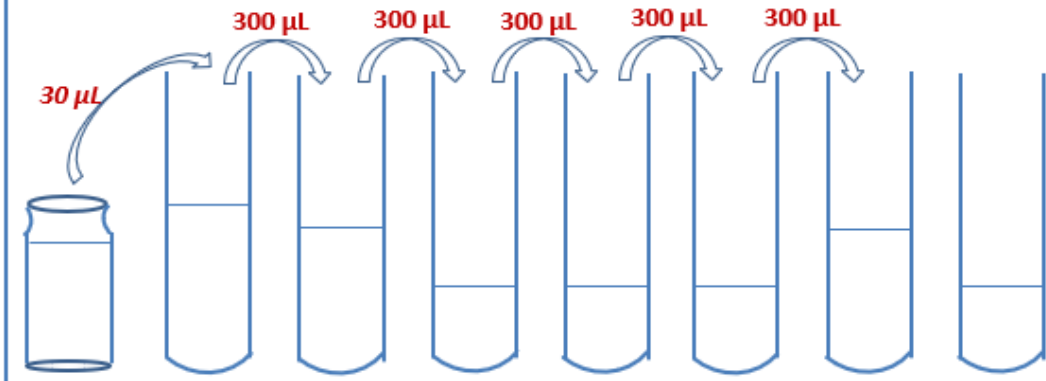
#### 1.2 待测样品前处理:

样品按照样品本身的干扰所确定的稀释比进行稀释。

### 2. 制备标准曲线

复溶后庆大霉素标准品(RES79-C02) 浓度为 64 ng/mL, 取 30 $\mu$ L 的标准品加入到 570  $\mu$ L 1×Dilution Buffer 中作为标曲的最高浓度 Std1(3.2 ng/mL)。后续每一个离心管中加入 300  $\mu$ L 1×Dilution Buffer, 使用高浓度标准品做 1:1 系列稀释。每次移液时, 确保充分混匀。以 1×Dilution Buffer 作为标准曲线的零浓度。具体操作如下:

**注:** 建议使用实际生产厂家来源和批次的标准品建立标准曲线, 用于样品检测, 避免不同公司来源标准品由于定量方法等因素带来测定结果的差异。

Tubes/ Solution Code	Gentamicin standard Stock Solution	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Blank
Operating								
Solution Conc.	64 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 ng/mL
Dilution Buffer Vol.		570µL	300µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL

### 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 µL，然后立即加入 50 µL HRP-Anti-Gentamicin 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°C-25°C）静置孵育 1.0 h。

### 5. 洗板

小心揭开封板膜，弃去孔中液体，每孔加入 300 µL 1×Washing Buffer，浸泡 30 s，共洗板 4 次。每次洗板后，需在吸水纸上拍干。

### 6. 显色

每孔加入 100 µL Substrate Solution。用封板膜封板，需避光，室温（20°C-25°C）孵育 20 min。

### 7. 终止

每孔加入 50  $\mu$ 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。

## 8. 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  $R^2$  应大于 0.9900。
4. 标准曲线范围：0.1 ng/mL-3.2 ng/mL。小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。大于标准曲线最低浓度点 OD 值的样品应报告为小于 0.1 ng/mL。

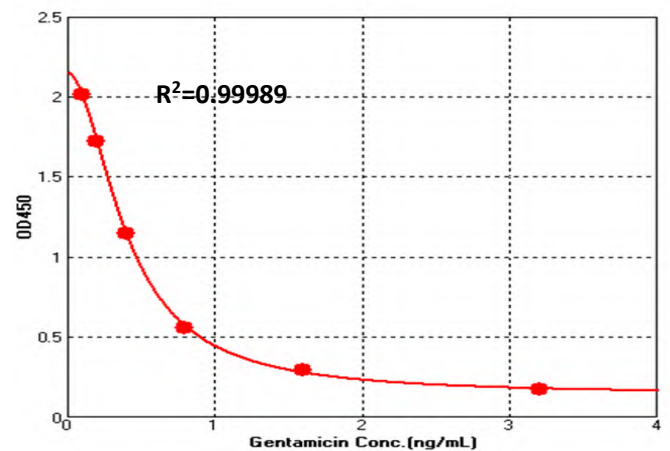
## 【检测流程简述】



## 【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。

标准品浓度. (ng/mL)	OD450-1	OD450-2	平均值
3.2	0.172	0.170	0.171
1.6	0.282	0.301	0.292
0.8	0.542	0.579	0.561
0.4	1.126	1.165	1.146
0.2	1.713	1.731	1.722
0.1	1.999	2.022	2.011



## 【定量限】

线性区间为 0.1-3.2ng/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 75%-120%之间且 OD 值 CV $\leq$ 20%时所对应的最低浓度为 0.1 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(%)	5	6
回收率(%)	93	120

## 【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， $CV \leq 15\%$ 。

样品浓度.(ng/mL)	批内精密度			批间精密度		
	3.2	0.5	0.1	3.2	0.5	0.1
n	10	10	10	10	10	10
平均值(ng/mL)	2.974	0.497	0.120	2.957	0.466	0.117
标准差	0.041	0.134	0.122	0.328	0.467	0.017
变异系数(%)	14	9	5	12	6	15

## 【准确度】

通过对 5 个不同浓度的庆大霉素样品进行 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	2.4	0.5	0.25	0.1
n	10	10	10	10	10
平均值(ng/mL)	2.974	2.605	0.497	0.299	0.120
标准差	0.041	0.035	0.134	0.204	0.122
变异系数(%)	14	11	9	9	5
回收率 (%)	93	109	99	92	120

## 【专属性】

### 1. 交叉反应

在 1×Dilution Buffer 中分别添加 500  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素，四环素，氯霉素，未观察到明显的交叉反应。

反应物	交叉反应程度

庆大霉素(500 µg/mL)	100%
氨苄青霉素(500 µg/mL)	<1%
四环素(500 µg/mL)	<1%
氯霉素(500 µg/mL)	<1%

## 2. 干扰

在稀释液中添加2000 ng/mL大肠宿主蛋白，500 ng/mL大肠宿主DNA，100 ng/uL质粒DNA，3个样品回收率均在75%-125%之间。

干扰物	大肠宿主蛋白(HCP) (2000 ng/mL)			大肠宿主 DNA(HCD) (500 ng/mL)			质粒 DNA (200 ng/µL)		
	3.2	0.5	0.25	3.2	0.5	0.25	3.2	0.5	0.25
样品浓度 (ng/mL)	3.2	0.5	0.25	3.2	0.5	0.25	3.2	0.5	0.25
检测浓度 (ng/mL)	3.050	0.556	0.298	3.196	0.455	0.277	3.934	0.543	0.217
回收率(%)	93	99	95	100	91	111	123	109	87

### 【基质干扰】

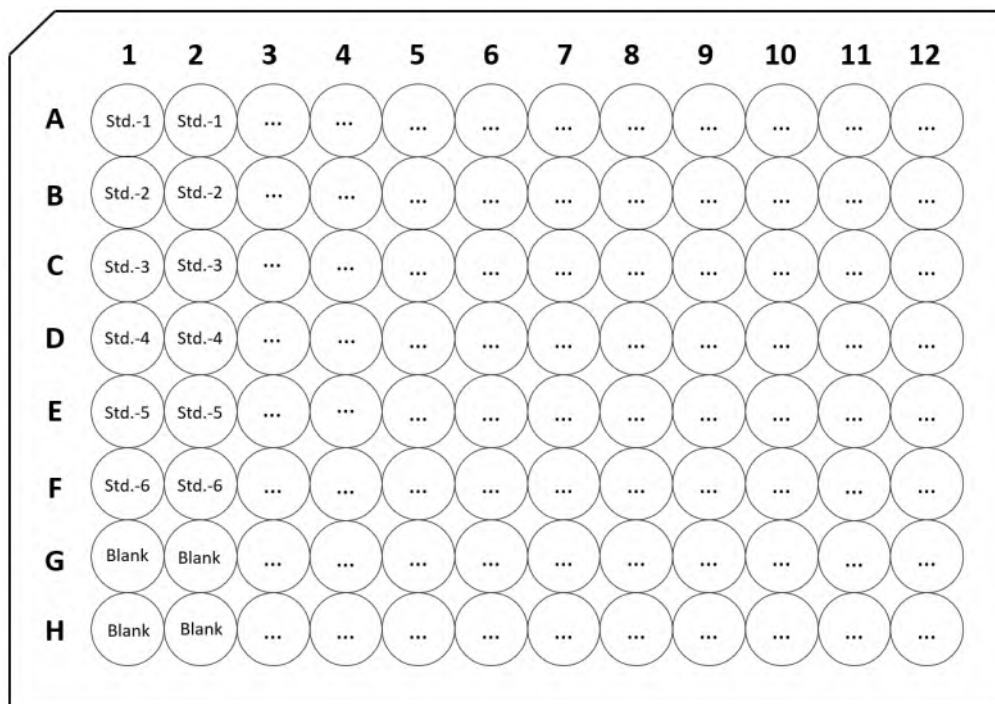
我们做了常用缓冲液的干扰试验，在缓冲液中添加已知浓度的庆大霉素标准品，计算回收率在75%-120%，结果表示本试剂盒具有良好的缓冲液兼容性。对于特定的缓冲液，建议您验证回收率确定最佳稀释倍数。

样品	庆大霉素标品	
	回收率 %	稀释倍数
20mM L-histidine with 0.1% (w/v) PF68, pH6.0	99	2
20mM L-histidine with 0.4% (w/v) Tween-80, pH6.0	103	1
1×PBS, pH7.3	94	1

1*PBS, pH7.3 with 11% Trehalose	98	1
20mM L-histidine, pH6.0	79	2
50mM Tris,100mM Glycine, pH7.5	111	2
100mM Tris,20mM Sodium citrate, pH7.5	114	2
20mM L-histidine 10% trehalose,pH6.0	115	1
25 mM Phosphate, pH 7.5	75	2
25 mM Phosphate, pH 7.5	90	2
100 mM Glycine, pH 3.5	108	1
100 mM Triscitrate, 7.5	105	1

## 【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°C）； 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	这是典型的由测定操作引起的问题，包括但不限于：	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

差	(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 (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；	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；
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；	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，

	(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；	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。