

resDetect™ 牛血清白蛋白残留检测试剂盒（USP校准）

【产品名称】

resDetect™ 牛血清白蛋白残留检测试剂盒（USP校准）

【规格】

96 Tests

【货号】

RES-A098

【产品用途】

本试剂盒适用于生物制品制备过程中残余牛血清白蛋白（BSA）的定量检测。本试剂盒经过USP标准品(Cat# 1076192)校准。本试剂盒仅供科研使用，不能用于人类或动物的临床诊断。

【特点】

1. 快速：90 min 内完成检测。
2. 标品溯源：标准品溯源至 USP 标准品(Cat# 1076192) ；
3. 严格的方法学验证：可根据要求提供符合 ICH 标准的验证报告；
4. 高灵敏度：牛血清白蛋白（BSA）的灵敏度< 0.5 ng/mL；
5. 特异性强：非目标蛋白无交叉反应；
6. 良好的缓冲液兼容性；

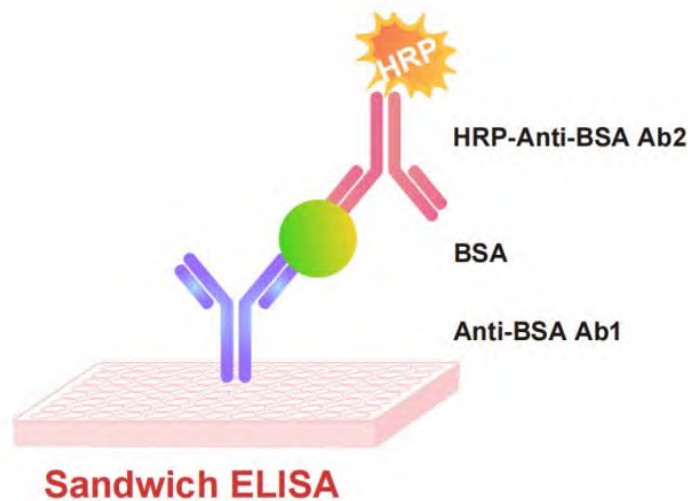
【背景介绍】

牛血清是生物制品制备过程中的重要组分，而BSA是牛血清的主要成分。当产品用作人类或动物的治疗剂时，该产品应高度纯化，将BSA残留减少到最低水平。BSA作为异源蛋白，超过一定浓度能够引起人类或动物的免疫病理反应，引起严重的副作用，影响生物制品的安全性。因此，

严格控制生物制品的BSA含量成了生物制品产品的重点工作之一。

【检测原理】

试剂盒基于ELISA双抗体夹心法原理检测样品中BSA的残留量。微孔板预先包被了Anti-BSA antibody，在预包板中加入标准品及待测样品，再加入HRP-Anti-BSA antibody，孵育后形成抗体-抗原-HRP标记抗体的复合物。洗板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值与样品中的BSA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. 测定 BSA 含量的容器具应专用，防止实验室中 BSA 污染；
3. 实验时，穿戴适当的个人服及佩戴口罩,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；
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. 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；
7. 样品值若大于标准曲线的最高值，应将样品用 1×Sample Dilution Buffer 稀释后重新检测；
8. 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；
9. 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
RES98-C01	Pre-Coated Anti-BSA Antibody Microplate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
RES98-C02A	BSA Standard (200ng/mL)	500 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RES98-C02B	BSA Standard 5 (40.5ng/mL)	500 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RES98-C02C	BSA Standard 4 (13.5ng/mL)	500 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RES98-C02D	BSA Standard 3 (4.5ng/mL)	500 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RES98-C02E	BSA Standard 2 (1.5ng/mL)	500 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RES98-C02F	BSA Standard 1 (0.5ng/mL)	500 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RES98-C02G	BSA Standard 0 (0ng/mL)	500 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RES98-C03	HRP-Anti-BSA Antibody	100 µL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
RES98-C04	1×Sample Dilution Buffer	50 mL×2	液体	2-8°C	2-8°C
RES98-C05	20×Washing Buffer	25 mL	液体	2-8°C	2-8°C

RES98-C06	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES98-C07	Stop Solution	8 mL	液体	2-8°C	2-8°C

注：建议HRP-Anti-BSA 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：试剂盒开封后各组分按照表 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. 微孔板振荡器：用于微孔板孵育反应,如没有微孔板振荡器,也可使用 37°C 恒温培养箱静置孵育；
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 450 nm 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；

【实验前准备】

1. 实验环境准备

为了确保实验的准确性，实验环境要求操作过程中不引入额外的抗体或者 BSA；请准备洁净的实验台和所需的工具：实验操作前用 75%乙醇对操作台面进行清洁，实验中对操作人手及

手臂用 75%乙醇进行擦拭，避免实验中引入额外的 BSA 造成实验结果的偏差。

2. 设备和工具准备

2.1 参考“**需要但未提供的实验仪器与耗材**”，准备实验所需的设备、工具、试剂瓶以及其他器具。

2.2 彻底清洗抗体包被板以去除多余的未反应试剂，对于良好的检测重现性和灵敏度至关重要。如果使用自动洗板机清洗酶标板，建议专用于此项实验，与含有 BSA 的缓冲液体系区分使用，以避免引入额外的 BSA。如果没有自动洗板机，你可以用多通道移液器手动清洗板子。彻底的洗涤程序通常提供更低的背景，更高的特异性结合信号和更好的精密度。

【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。

【检测流程】

1. 工作液配制

1.1 配制1×Washing Buffer:

取25 mL 20×Washing Buffer (RES98-C05)，用超纯水/去离子水稀释并定容至500 mL，轻轻混匀建议按实验用量配制所需的1×Washing Buffer，现用现配。

1.2 配制HRP-Anti-BSA Antibody工作液:

根据实验用量 (50 μL/孔)，用1×Sample Dilution Buffer (RES98-C04)将 HRP-Anti-BSA Antibody稀释至100倍，即为HRP-Anti-BSA Antibody工作液。(注：**HRP-Anti-BSA Antibody不要长时间处于室温，随用随取；HRP-Anti-BSA Antibody工作液需现用现配**)。可参考以下表格方法配制溶液。

表2. 配制方法

规格 (96 T)	HRP-Anti-BSA Antibody 工作液	HRP-Anti-BSA Antibody	1×Sample Dilution Buffer
96 Tests	6000 μL	60 μL	5940 μL

1.3 待测样品前处理:

将待测样品恢复至室温，加样前混匀样品，如样品有沉淀，建议1500 rpm/min，离心5 min，取上清进行检测。

如待测样品浓度高于试剂盒检测上限，需用1×Sample Dilution Buffer稀释至线性范围内进行检测。

注:

- a. 建议待测样品至少做2个稀释度。
- b. 待测样品需做加标回收。
- c. 首次使用该试剂盒检测的样品，需做干扰试验。
- d. 可用使用RES98-C02A做加标回收测试及干扰试验。

2. 加样

将标准品(0-40.5 ng/mL)和待测样品按顺序加入到酶标板中，50 μL/孔；之后再加入HRP-Anti-BSA Antibody工作液，50 μL/孔；实验中，建议标准曲线每个浓度点和待测样品均做复孔，如果需要加入自己的阳性参考品、阴性参考品，阳性对照的测定孔数应不小于1个，阴性参考品的测定孔数应不小于2个。

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。

3. 孵育

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

4. 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 μL 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4次。

注：使用自动洗板机时，建议第一次清洗，为手动洗板，后三次再使用自动洗板机，以避免污染洗板机针头。

5. 显色

每孔加入 100 μL Substrate Solution。用封板膜封板，需避光，室温静置孵育 20 min。

6. 终止

每孔加入 50 μL 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。

7. 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 5min 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。
3. 标准曲线 R^2 应大于 0.9900。
4. 标准曲线范围：0.5 ng/mL - 40.5 ng/mL。如果样品的 OD 值大于分析标准曲线范围应报告为大于 40.5 ng/mL，需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应报告为小于 0.5 ng/mL。

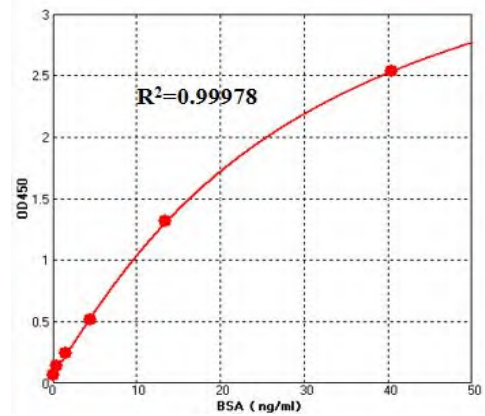
【检测流程简述】



【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}
Standard 5	40.5 ng/mL	2.536
Standard 4	13.5 ng/mL	1.318
Standard 3	4.5 ng/mL	0.519
Standard 2	1.5 ng/mL	0.239
Standard 1	0.5 ng/mL	0.142
Standard 0	0 ng/mL	0.067



【灵敏度】

BSA 的最低可检测浓度为 0.3826 ng/mL (3 次独立实验的平均值)。20 个零标准品浓度 OD 的平均值加上两倍 SD，计算最低可检测浓度。

【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, $CV \leq 15\%$ 。

2. 批间精密度

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

样本	批内精密度			批间精密度		
	1	2	3	1	2	3
n	10	10	10	3	3	3
平均值(ng/mL)	36.885	4.693	0.481	39.155	4.812	0.496
标准差	0.051	0.041	0.018	4.611	0.752	0.070
变异系数(%)	2	8	13	11	15	14

【准确度】

制备 5 个不同浓度样品，每个浓度重复 10 次：定量上限浓度（ULOQ），线性范围内高、中、低浓度点，定量下限浓度（LLOQ），并进行测定，样品检测浓度相对偏差和回收率均符合，回收率满足 80%-120%。

样品浓度 (ng/mL)	BSA (Bovine serum albumin)				
	40.5	30	5	1.2	0.5
n	10	10	10	10	10
平均值(ng/mL)	39.16	29.01	4.76	1.11	0.48
标准差	1.682871566	1.773271568	0.148459014	0.103718394	0.029793978
变异系数(%)	4	6	3	9	6
回收率 (%)	97	97	95	92	97

【稀释线性】

将高浓度的 BSA (Bovine serum albumin) 加入到不同的稀释基质中，进行梯度稀释，评估检测的线性。

		细胞培养基 (DMEM)	细胞培养基 (MEM)	血清
1:2	Average Recovery (%)	97.4	94.2	116.2
	Range (%)	89.6-111.8	94.5-104.1	110.8-123.9
1:4	Average Recovery (%)	98.4	102.3	114.7
	Range (%)	93.0-104.0	93.1-123.0	112.8-117.3
1:8	Average Recovery (%)	96.6	103.9	115.4
	Range (%)	93.4-103.6	96.9-108.5	109.6-120.4
1:16	Average Recovery (%)	96.0	104.3	113.2
	Range (%)	92.8-99.9	93.4-112.4	111.9-115.1

【专属性】

专属性-1: 分别在以下基质中添加高、中、低浓度的牛血清白蛋白标准品，以回收率作为特异性验证指标，加标回收率满足 80%-125%。

样品名称	1%人血清			2.5%鼠血清			人血清白蛋白国家参考品 (1.25 mg/mL)			10%兔血清		
	30	5	0	30	5	0	30	5	0	30	5	0
样品加标浓度 (ng/mL)	30	5	0	30	5	0	30	5	0	30	5	0
检测浓度均值 (ng/mL)	25.805	4.239	0.0	24.319	4.369	0.327	26.009	4.535	0.056	35.252	5.995	0.3
回收率 (%)	86.0	85.9	/	80	87.4	/	86.5	89.6	/	107.4	119.3	/

专属性-2: 分别在以下基质中添加高、中、低浓度的牛血清白蛋白标准品，以回收率作为特异性验证指标，加标回收率满足 80%-125%。

细胞名称	MDCK			HEK293			CHO		
细胞密度 (cells/mL)	2×10 ⁶			3.5×10 ⁶			4.32×10 ⁶		
稀释倍数	2			2			2		
样品加标浓度 (ng/mL)	30	5	0	30	5	0	30	5	0
检测浓度均值 (ng/mL)	32.519	4.778	0	32.519	4.778	0	32.519	4.778	0
回收率 (%)	108.4	95.6	/	108.4	95.6	/	108.4	95.6	/

细胞名称	T-lymphocyte			Vero		
细胞密度 cells/mL	2.15×10 ⁶			3×10 ⁶		
稀释倍数	2			2		
样品加标浓度 (ng/mL)	30	5	0	30	5	0
检测浓度均值 (ng/mL)	31.509	4.862	0	28.502	4.306	0
回收率 (%)	105.0	97.2	/	95.0	86.1	/

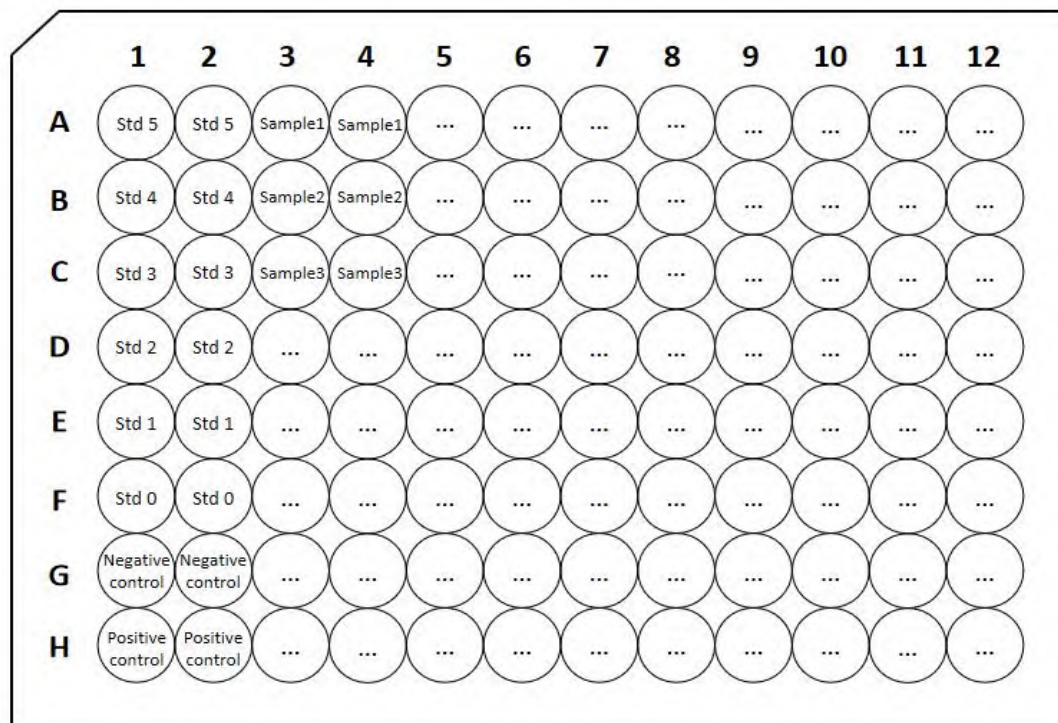
【基质干扰】

通过在稀释缓冲液中添加不同含量的基质，验证潜在的基质效应。对于特定的缓冲液，建议您验证回收率确定最佳稀释倍数。

Additive	Tolerated concentration
1×PBS	100%
50 mM Tris	100%
DMSO	5%
Multiple Electrolytes Injection	100%
Glucose	10%
Dextran	10%
Fish gelatin	1%
DMEM	100%

【PLATE LAYOUT】

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℃）； 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；

	<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>	
3.空白背景高	<p>(1) 洗板不干净;</p> <p>(2) 试剂过期;</p> <p>(3) 洗涤不充分;</p> <p>(4) 阴性对照孔被阳性对照或样品污染;</p> <p>(5) 蒸馏水受酶等污染;</p> <p>(6) 试剂混用;</p> <p>(7)试剂配制浓度有误,如酶的浓度过高;</p> <p>(8) 孵育温度过高或反应时间过长;</p> <p>(9) 显色时间过长;</p> <p>(10) 底物在使用前曝光;</p> <p>(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;</p> <p>b. 使用保质期内试剂;</p> <p>c. 充分洗涤, 彻底拍干;</p> <p>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;</p> <p>e. 使用新鲜蒸馏水;</p> <p>f. 不同批号试剂勿混用;</p> <p>g. 请按说明书所示稀释倍数配制;</p> <p>h. 检查孵育箱的温度是否正确、稳定;</p> <p>i. 显色反应时间适当缩短;</p> <p>j. 应保存在暗处, 避光;</p> <p>k. 加终止液后 10 分钟内读数;</p>
4.边缘效应	<p>(1) 蒸发;</p> <p>(2) 温度不均匀;</p>	<p>a. 各步之间, 须使用封版胶密封反应板;</p> <p>b. 校准孵育箱, 勿叠放反应板;</p>
5.标准曲线良好, 但样品无检测信号	<p>(1) 样品中无检测物或检测物含量极低;</p> <p>(2) 样品中其他物质影响/掩盖检测;</p> <p>(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;</p> <p>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;</p> <p>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>