

Residual Trypsin ELISA Kit

胰蛋白酶残留检测ELISA试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

目录号: NE112

保存: 2~8°C避光保存1年



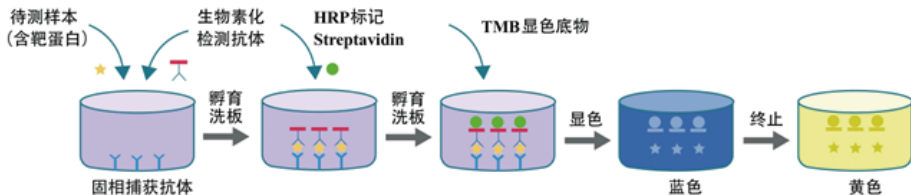
目录

| | |
|--------------|---|
| 1. 产品说明 | 1 |
| 2. 试剂盒组成 | 1 |
| 3. 自备材料设备 | 2 |
| 4. 样本处理 | 2 |
| 5. 工作液配制 | 2 |
| 6. 操作步骤 | 2 |
| 7. 酶标板孔加样示意图 | 3 |
| 8. 结果分析 | 4 |
| 9. 参考数据 | 4 |
| 10. 精密度 | 5 |
| 11. 线性 | 5 |
| 12. 灵敏度 | 5 |
| 13. 特异性 | 6 |
| 14. 标准品溯源 | 6 |
| 15. 注意事项 | 6 |



产品说明

胰蛋白酶 (Trypsin) 是一种丝氨酸蛋白酶, 可特异性切割赖氨酸及精氨酸 C 末端肽键。胰蛋白酶常用于多种生物制品的生产工艺中, 例如重组胰岛素的生产, 重组蛋白药物或融合表达工艺中的酶切, 疫苗和干细胞生产工艺中细胞的处理。本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法, 可用于生物制品中重组以及天然 (猪胰腺) 来源猪胰蛋白酶的微量残留检测。本试剂盒采用高亲和力的抗猪胰蛋白酶抗体预包被酶标板, 将标准品 / 待测样本和生物素标记的抗猪胰蛋白酶检测抗体同步加入微板孔中, 经过孵育后样本中存在的胰蛋白酶会与酶标板上的预包被抗体及检测抗体特异性结合。洗涤去除未结合物后, 将辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 (Streptavidin-HRP) 加至微板孔中并孵育, 通过检测抗体上的生物素和链霉亲和素发生的高强度非共价结合, 形成“包被抗体 - 胰蛋白酶 - 检测抗体 - Streptavidin-HRP”免疫复合物。再次洗涤后, 将显色底物 TMB 加至微板孔中, HRP 会催化 TMB 底物生成蓝色产物, 颜色反应的深浅将与样本中胰蛋白酶的浓度成正相关。而后加入终止液终止反应, 在 450 nm 波长 (参考波长 570-630 nm) 处测定吸光度值。通过绘制标准曲线, 由样本吸光度值可计算出样本中所含胰蛋白酶浓度。本试剂盒特异性强、检测灵敏度高, 同时操作更加便捷。



双抗体夹心 ELISA 原理示意图



试剂盒组成

| Component | NE112-01 | Storage |
|--------------------------|------------|--------------|
| 胰蛋白酶抗体预包被酶标板 | 96 T | 2~8°C |
| 10×胰蛋白酶标准品 | 120 μl / 支 | 2~8°C |
| 标准品&样本稀释液 | 15 ml/ 瓶 | 2~8°C |
| 100×胰蛋白酶检测抗体 | 60 μl / 支 | 2~8°C |
| 100×Streptavidin-HRP | 120 μl/ 支 | 2~8°C (避光) |
| 检测抗体&Streptavidin-HRP稀释液 | 25 ml/ 瓶 | 2~8°C |
| 20×洗液 | 50 ml/ 瓶 | 2~8°C |
| TMB显色底物 | 12 ml/ 瓶 | 2~8°C (避光) |
| 终止液 | 6 ml/ 瓶 | 2~8°C |
| 封板膜 | 4 张 | |

注意：试剂盒在开封的条件下，2~8°C可储存 1 个月；未开封试剂盒请在有效期 1 年内使用。

自备材料设备

1. 去离子水；
2. 实验过程中用到的 EP 管、移液器、吸头、量筒等；
3. 微孔板振荡器；
4. 自动洗板机或 8 道手动洗瓶或多道移液器；
5. 酶标仪：主波长 450 nm，参考波长 620 nm。

样本处理

对初次使用或胰蛋白酶含量未知的情况，建议进行样品适用性验证，确定适宜的样品稀释倍数，使其在线性范围内。

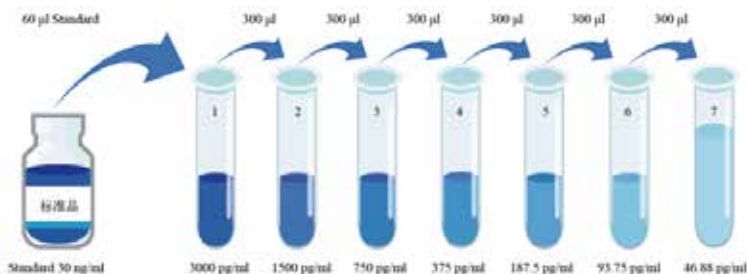
工作液的配制

配制前请将所有试剂恢复至室温。

1. 1×胰蛋白酶检测抗体：使用前点甩离心，使管壁上的液体集中在管底。按当次实验所需用量，用检测抗体&Streptavidin-HRP稀释液将100×胰蛋白酶检测抗体稀释至1×工作浓度。配制完成后需在15分钟内使用。
2. 1×Streptavidin-HRP：使用前点甩离心，使管壁上的液体集中在管底。按当次实验所需用量，用检测抗体&Streptavidin-HRP稀释液将100×Streptavidin-HRP稀释至1×工作浓度。配制完成后需在15分钟内使用。
3. 1×洗液：根据实验所需用量，用去离子水将20×洗液稀释至1×工作浓度。配制完成后可在2~8°C保存30天。（20×洗液若出现结晶，放37°C温浴至结晶全部溶解。）



4. 标准品梯度稀释：用标准品&样本稀释液将 $10\times$ 胰蛋白酶标准品储液稀释10倍，即取标准品 $60\ \mu\text{l}$ ，加入到 $540\ \mu\text{l}$ 标准品&样本稀释液中，记为1号管，此时1号管的浓度为 $3000\ \text{pg/ml}$ ；然后按照下图进行2倍梯度稀释，在2-7号管中分别加入 $300\ \mu\text{l}$ 标准品&样本稀释液；取 $300\ \mu\text{l}$ 1号管液体加入至2号管，此时2号管的浓度为 $1500\ \text{pg/ml}$ ，混匀后取 $300\ \mu\text{l}$ 加入至3号管，此时3号管的浓度为 $750\ \text{pg/ml}$ ，以此类推梯度稀释至7号管（ $46.88\ \text{pg/ml}$ ）。 $3000\ \text{pg/ml}$ 作为标准曲线的最高点，标准品&样本稀释液作为标准曲线的零点（ $0\ \text{pg/ml}$ ），即空白值。

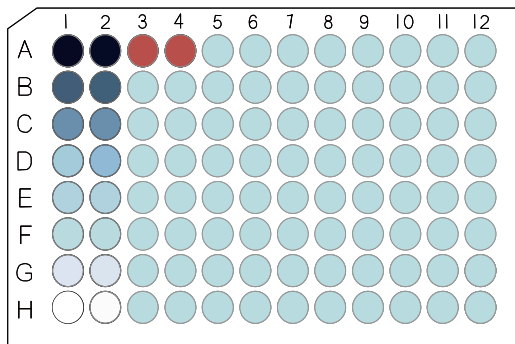


操作步骤

1. 检测前请将所有试剂恢复至室温。取出本次实验所需板条，未用的板条请及时放入铝箔袋中封口， $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存。
2. 将稀释好的标准品及样本分别加入到对应的板孔中，空白孔加入标准品&样本稀释液， $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$ 。标准品和样本建议做复孔检测，且加入试剂的顺序应保持一致，使各复孔测试结果一致。
3. 每孔中加入 $1\times$ 检测抗体， $50\ \mu\text{l}/\text{孔}$ ，在微孔板振荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育1小时。
4. 弃掉孔内液体，用 $1\times$ 洗涤液板， $300\ \mu\text{l}/\text{孔}$ ，每次洗板时建议先在微孔板振荡器上震荡30秒后，弃掉孔内液。重复操作5次，末次在吸水纸上拍干。
5. 在所有板孔中加入 $1\times$ Streptavidin-HRP， $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$ ，在微孔板振荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育30分钟。
6. 重复步骤4。
7. 每孔加入TMB显色底物， $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$ ，在微孔板振荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育10分钟。
8. 孵育完成后加入终止液， $50\ \mu\text{l}/\text{孔}$ ，在主波长 $450\ \text{nm}$ ，参考波长 $620\ \text{nm}$ 的波长下进行读数。
9. 实验完毕后将未用完的试剂及酶标板外框放回试剂盒并于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 储存，建议1个月内用完。



酶标板孔加样示意图



- 注：A1/A2: 100 μ l 3000 pg/ml 标准品
 B1/B2: 100 μ l 1500 pg/ml 标准品
 C1/C2: 100 μ l 750 pg/ml 标准品
 D1/D2: 100 μ l 375 pg/ml 标准品
 E1/E2: 100 μ l 187.5 pg/ml 标准品
 F1/F2: 100 μ l 93.75 pg/ml 标准品
 G1/G2: 100 μ l 46.88 pg/ml 标准品
 H1/H2: 100 μ l 0 pg/ml 标准品 (即标准品 & 样本稀释液)
 A3/A4: 100 μ l 样本

结果分析

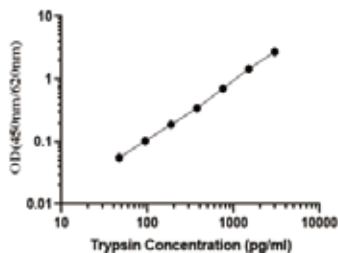
1. 用酶标仪进行双波长检测，测定主波长450 nm和参考波长620 nm的OD值。OD值为450 nm的OD测定值减去620 nm的OD测定值。
2. 计算标准品复孔的平均OD值，然后减去空白值 (0 pg/ml标准品的平均OD值)，得到标准品的校正值。以标准品的浓度为横坐标，OD校正值为纵坐标，用直线回归或四参数法生成标准曲线。
3. 通过样本OD值和标准曲线方程计算样本浓度。若样本OD值高于标准曲线上限，应进行适当稀释后重测，计算浓度时应乘以相应稀释倍数。

参考数据

每次检测均需建立标准曲线，以下数据仅作为建立标准曲线的参考数据。



| 标准品 pg/ml | OD 值 | | 平均值 | 校正值 |
|-----------|-------|-------|--------|--------|
| | | | | |
| 3000 | 2.668 | 2.747 | 2.7075 | 2.6895 |
| 1500 | 1.448 | 1.447 | 1.4475 | 1.4295 |
| 750 | 0.712 | 0.695 | 0.7035 | 0.6855 |
| 375 | 0.346 | 0.338 | 0.342 | 0.324 |
| 187.5 | 0.178 | 0.196 | 0.187 | 0.169 |
| 93.75 | 0.1 | 0.104 | 0.102 | 0.084 |
| 46.88 | 0.053 | 0.058 | 0.0555 | 0.0375 |
| 0 | 0.017 | 0.019 | 0.018 | 0 |



准品复孔结果数据解读：上表中 0 pg/ml 标准品两个复孔的平均 OD 值为 $(0.017+0.019)/2=0.018$ ，校正值定为 0。3000 pg/ml 标准品两个复孔的平均 OD 值为 $(2.668+2.747)/2=2.7075$ ，则其校正值为 $2.7075-0.018=2.6895$ 。

精密度

板内精密度

用 3 个已知浓度的样本在一块酶标板上测定 20 个重复孔，以此评估板内的精密度。

板间精密度

用 3 个已知浓度的样本在不同酶标板上测定 20 个重复孔，以此评估板间的精密度。

| | 板内 | | | 板间 | | |
|-------------|------|------|-----|------|------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 平均值 (pg/ml) | 811 | 442 | 136 | 754 | 408 | 124 |
| 标准差 | 70.7 | 32.4 | 7.9 | 54.7 | 32.3 | 6.3 |
| 变异系数 (%) | 8.7 | 7.3 | 5.8 | 7.3 | 7.9 | 5.1 |

灵敏度

胰蛋白酶的最低可检测浓度为 19.6 pg/ml。灵敏度是根据 20 个重复的零标准品 OD 值的平均值加两倍标准差计算得到的相对应浓度。

特异性

与 CHO、E.coli、293T、Vero 细胞宿主蛋白无交叉反应。

标准品溯源

试剂盒标准品可溯源至国家药品标准物质 (410026) 重组胰蛋白酶。



注意事项

1. 本试剂盒应 2~8°C 避光保存，开封后 1 个月内用完。
2. 为保证结果准确，每次检测均需做标准曲线。
3. 实验中所用试剂均需充分混匀。
4. 每次洗板完成后，均需在吸水纸上拍干，若板孔内有气泡，可用吸头戳破，注意每个孔只能用一个吸头，避免交叉污染。
5. TMB 显色底物为无色透明液体，如有变色请勿使用。
6. TMB 显色后可根据显色的深浅来判断是否需要提前或延后加入终止液。
7. 加完终止液后，请在 30 分钟内完成读数。
8. 推荐使用主波长 450 nm，参考波长 620 nm 的波长下进行读数，若只使用单波长 450 nm 读数，OD 值可能整体偏高，空白值也会相应增高，导致试剂盒的准确度降低。
9. 试剂盒中的终止液具有腐蚀性，操作人员在使用时需戴上手套并注意防护，如果不慎接触，请用大量清水冲洗并及时就医。
10. 为避免交叉污染，加样时请注意每个样品和标准品必须更换枪头。请在实验中使用一次性试管、枪头、封板膜及洁净塑料容器。
11. 不同批号或不同来源的试剂盒组分不可混用。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202407

服务电话 +86-10-57815020

6 服务邮箱 complaints@transgen.com

