



VH3 配体脱落检测 ELISA 试剂盒

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 操作步骤.....	2
3. 注意事项.....	3
4. 订购信息及相关产品.....	4

1. 产品介绍

VH3 亲和填料用于高效分离双特异性抗体 (bsAbs) 和含有 VH3 家族序列的抗体片段 (Fabs 和 VHs)。利用 Protein A Fc 段特异性结合 VH3 序列家族 Fab 段, 实现一步高效纯化。该亲和纯化介质具有高动态结合载量, 高分辨率等特点。在利用固定化 VH3 配体进行生物大分子纯化的过程中, 配体可能因化学、物理或酶解作用等从纯化柱上脱落。脱落的配体进入最终产品, 影响产品质量、安全性和有效性, 如下:

- 1 影响产品纯度, 脱落的 VH3 配体本身作为蛋白质杂质混杂在最终的目标产物中, 直接导致最终产品的纯度下降, 无法满足严苛的药品质量标准;
 - 2 免疫原性风险, 脱落的 VH3 配体作为外源蛋白, 超过一定剂量会引发免疫反应;
 - 3 干扰分析及检测, 脱落的 VH3 配体可能会干扰一些用于监控产品质量的分析方法, 导致对杂质水平的错误判断;
- 因此, 对纯化柱洗脱液及中间过程液体中的 VH3 配体脱落进行监控至关重要。

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法实现高灵敏度、高特异性的 VH3 配体定量检测。捕获抗体已包被于酶标板上, 向酶标板中加入标准品 (或待测样品), 样本和标准品中的 VH3 配体蛋白会与包被于酶标板上的捕获抗体结合, 再加入一抗与 VH3 配体蛋白结合形成免疫复合物, 通过洗板, 将游离的成分洗去; 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗, 二抗与一抗特异性结合, 加入 TMB (3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺) 底物, 二抗上的 HRP 催化 H_2O_2 氧化 TMB 生成蓝色产物, 随后加入终止液终止酶催化反应, 生成黄色产物。通过酶标仪测定 450 nm OD 值, VH3 配体蛋白浓度与 OD₄₅₀ 值之间呈正相关, 可通过试剂盒内的标准品生成的标准曲线计算出样本中 VH3 配体浓度。

本试剂盒 VH3 配体脱落最低检测限度 0.06 ng/ml, 检测范围 0.06 ng/ml-13.72 ng/ml。

表 1.VH3 配体脱落检测 ELISA 试剂盒组成和保存条件

组分	数量	规格	保存温度
96 孔预包板	1 块	96 T	2-8°C
VH3 配体标准品	1 支	0.010 mg/ml、1 ml/支	
一抗	1 支	200 μ l/支	
二抗	1 支	5 μ l/支	
10 $\times$ 清洗液	1 瓶	150 ml/瓶	
TMB 显色液	1 瓶	15 ml/瓶	
终止液	1 瓶	15 ml/瓶	

2. 操作步骤

2.1 试剂准备

- 1) 将试剂盒所有组分恢复至室温;
- 2) 清洗液: 将 10 $\times$ 清洗液用去离子水稀释至 1 $\times$, 混合均匀;
注: 整板使用量为 50 ml 10 $\times$ 清洗液, 用 450 ml 去离子水稀释至 500 ml, 可根据实验所需板条量稀释合适体积清洗液;
- 3) 标准品: 将 10000 ng/ml 浓度的 VH3 配体标准品, 用 1 $\times$ 清洗液 3 倍倍比稀释至 41.15 ng/ml, 稀释过程见表 2, 并按照表 3 稀释浓度为 13.72 ng/ml、4.57 ng/ml、1.52 ng/ml、0.51 ng/ml、0.17 ng/ml、0.06 ng/ml 的标曲;

表 2.VH3 配体标准品预稀释对照表

编号	清洗液体积 (μ l)	加入样品体积和来源 (μ l)	VH3 配体终浓度 (ng/ml)
1	200	100 μ l 10000 ng/ml 标准品	3333.33





表 2.VH3 配体标准品预稀释对照表 (续)

编号	清洗液体积 (μl)	加入样品体积和来源 (μl)	VH3 配体终浓度 (ng/ml)
2	200	100 μl 1	1111.11
3	200	100 μl 2	370.37
4	200	100 μl 3	123.46
5	200	100 μl 4	41.15

表 3.VH3 配体标准品标准曲线稀释对照表

编号	清洗液体积 (μl)	加入样品体积和来源 (μl)	VH3 配体终浓度 (ng/ml)
A	400	200 μl 41.15 ng/ml 标准品	13.72
B	400	200 μl A	4.57
C	400	200 μl B	1.52
D	400	200 μl C	0.51
E	400	200 μl D	0.17
F	400	200 μl E	0.06
G	400	0	0

4) 一抗：用 1×清洗液稀释 200 倍后使用，现配现用；

注：整板使用量为 50 μl 一抗样品，用 9950 μl 1×清洗液稀释至 10 ml，可根据实验所需板条量稀释合适体积一抗样品；

5) 二抗：用 1×清洗液稀释 5000 倍后使用，现配现用；

注：整板使用量为 2 μl 二抗样品，用 9998 μl 1×清洗液稀释至 10 ml，可根据实验所需板条量稀释合适体积二抗样品；

2.2 样品准备

1) 待测样品应澄清，沉淀需离心去除；

2) 使用 1×清洗液稀释备用，推荐稀释后浓度为 0.01~1 mg/ml，稀释后待测样品体积应不小于 200 μl；

2.3 实验步骤

2.3.1 样品孵育

1) 从冰箱里按需要取出板条，将不用的板条放回铝箔袋，保存于 2-8℃；

2) 将稀释好的编号 A~G 标准品及待测样品，放置 100℃水浴锅中加热 15 min，加热后 11000 rpm 离心 5 min；

3) 将离心上清按每孔 100 μl 加入到酶标板中，建议每个标准品或待测样品至少 3 个复孔；

4) 将酶标板用 parafilm 封口膜或硅胶盖覆盖好，避光放置 37℃孵育 1 h；

5) 孵育结束后甩干孔内液体，加入 1×清洗液 300 μl/孔，将酶标板倒置在吸水纸上轻轻拍打以去除残留液体并彻底干燥，重复清洗共 5 次。

2.3.2 一抗孵育

1) 将稀释好的一抗，按每孔 100 μl 加入到酶标板中；

2) 将酶标板用 parafilm 封口膜或硅胶盖覆盖好，避光放置 37℃孵育 1 h；

3) 孵育结束后甩干孔内液体，加入 1×清洗液 300 μl/孔，将酶标板倒置在吸水纸上轻轻拍打以去除残留液体并彻底干燥，重复清洗共 3 次；

2.3.3 二抗孵育

1) 将稀释好的二抗，按每孔 100 μl 加入到酶标板中；

2) 将酶标板用 parafilm 封口膜或硅胶盖覆盖好，避光放置 37℃孵育 1 h；

3) 孵育结束后甩干孔内液体，加入 1×清洗液 300 μl/孔进行清洗，再次甩干孔内液体并将酶标板倒置在吸水纸上轻轻拍打以去除残留液体并彻底干燥，重复清洗共 3 次；

2.3.4 显色

1) 事先将 TMB 显色液恢复至室温，按每孔 100 μl 加入酶标板中，25℃避光反应 5 min；





2) 显色结束后，立即加入 100 μ l 孔终止液终止反应；

2.3.5 读数

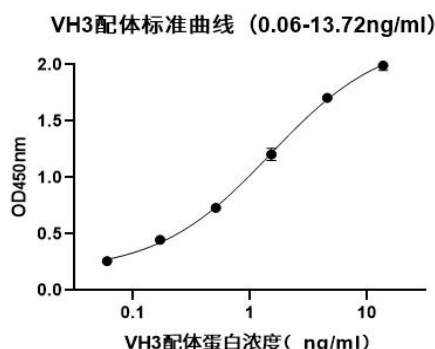
用酶标仪在 450 nm 波长读取数据（应在加入终止液 5 分钟内进行）；

2.3.6 结果分析与计算

- 1) 样品 OD 值=测量 OD₄₅₀-空白 OD₄₅₀，OD 值取复孔平均值；
- 2) 以标准品浓度作横坐标，OD 值作纵坐标，用 Origin 或 prism 等相关软件，对编号 A~F 标准品 OD 值结果进行四参数曲线拟合（Four parameter logistic curve），校准曲线的 $R^2 \geq 0.99$ ；
- 3) 利用拟合的标准曲线计算出待测样品中 VH3 配体含量；
- 4) 若样本 OD 值高于校准曲线上限，应适当稀释后重新检测，最后计算浓度时应乘以稀释倍数；

示例：

VH3 配体蛋白浓度 ng/ml	OD ₄₅₀
13.72	1.8920
4.57	1.6061
1.52	1.1037
0.51	0.6305
0.17	0.3472
0.06	0.1592
0	0.1004
R^2	0.99896



3. 注意事项

- 1) 试剂及样品稀释时，均需混合均匀；
- 2) 初次使用试剂盒时，将各种试剂离心数分钟，使试剂集中在管底；
- 3) 各种试剂根据需要配置使用，未用完试剂请勿倒回试剂瓶；
- 4) 为防止样品蒸发或污染，孵育过程中酶标板必须使用 parafilm 封口膜或硅胶盖进行覆盖；
- 5) 务必将稀释后的标曲样品、待测样品、空白样品按照同样的操作步骤进行处理；
- 6) 实验所用枪头、加样槽及离心管应一次性使用；
- 7) 样品加热离心后，勿大力晃动或倾斜放置，避免沉淀重悬，取上清时枪头在液体上层吸取避免取到沉淀；
- 8) TMB 显色时需提前恢复至室温，且严格控制显色时间，显色时间到后应尽快加入终止液；
- 9) 为了保证实验结果的准确性，终止液的加入顺序应尽量与显色液的加入顺序相同；
- 10) 该试剂盒的最佳显色温度为 25℃，温度过高或过低都将导致检测吸光值和灵敏度发生变化；
- 11) 检测过程中，酶标板清洗后需充分拍干，避免残留及串孔影响检测；
- 12) 本产品仅限科研使用。

4. 订购信息及相关产品

产品名称	货号	规格
VH3 脱落检测 ELISA 试剂盒	SA122K	96 T
Smac VH3 Affinity Beads	SA122005	5 ml
	SA122025	25 ml
	SA122100	100 ml
	SA122500	500 ml
	SA12201L	1 L
	SA12210L	10 L

