

非特异性核酸酶残留检测试剂盒

（酶联免疫吸附法）

说明书

货号：1402421

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点和常见问题！

版本：A/2

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 产品名称

通用名: 非特异性核酸酶残留检测试剂盒 (酶联免疫吸附法)。

■ 包装规格

96 测试/盒。

■ 预期用途

非特异性核酸酶残留检测试剂盒 (酶联免疫吸附法) 适用于生物制品下游纯化工艺中非特异性核酸酶的定量测定。该试剂盒能识别市面上常见的全能核酸酶, 如 Benzonase® endonuclease。

该试剂盒仅供研究使用, 不可用于临床。

■ 检测原理

本试剂盒基于固相酶联免疫吸附分析法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA), 采用双抗体夹心的技术原理检测样品中非特异性核酸酶的残留量。该分析方法通过包被针对非特异性核酸酶的多克隆抗体来捕获样品中的残留非特异性核酸酶, 接着加入生物素标记的抗非特异性核酸酶抗体进一步孵育结合, 随后加入 HRP (Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶) 标记的链霉亲和素, 温育后洗涤; 加入 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 底物反应, HRP 催化 H_2O_2 氧化 TMB 生成蓝色产物 (最大吸收峰 655 nm), 随后加入终止液终止酶催化反应, 生成黄色产物 (最大吸收峰 450 nm)。酶标仪采集 450 nm 波长下吸光度值, 其吸光度与校准品和样品中的非特异性核酸酶浓度成正相关。通过剂量-反应曲线可计算得出样品中非特异性核酸酶的浓度。

该方法对样品无需特殊处理, 通过实际样品的适用性验证, 在合适的稀释比例进行检测。本试剂盒检测快速, 专一性强, 性能稳定可靠。

❖ 下文中 SMNE 表示非特异性核酸酶或全能核酸酶。

■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

组分	产品号	规格	说明
SMNE 校准品	PNB004	100 μ L \times 1 管	含已赋值的非特异性核酸酶, 液体试剂, 具体浓度见瓶身标注。
抗 SMNE 预包被酶标板	PNA004	8 孔 \times 12 条	已包被适量的绵羊抗非特异性核酸酶抗体, 铝箔袋密封包装, 含干燥剂。用后所余板条及时密封保存。
SMNE 稀释液	PNE003	25 mL \times 2 瓶	用于校准品、待检样品、检测抗体和 HRP 复合物的稀释。初次检测的样品, 需进行样品适用性验证, 确定最佳稀释倍数。
浓缩缓冲液 (10 \times)	PNF001	25 mL \times 2 瓶	低温时易产生结晶, 使用前可在 37 $^{\circ}$ C 水浴中溶解后用新鲜制备的超纯水稀释 10 倍, 即为 1 \times 缓冲液, 只用于洗板。
生物素偶联 SMNE 抗体 (100 \times)	PNG004	120 μ L \times 1 管	经生物素偶联的抗非特异性核酸酶的绵羊多抗, 使用前用 SMNE 稀释液稀释 100 倍。
链霉亲和素 HRP 复合物 (100 \times)	PNH002	140 μ L \times 1 管	HRP 偶联的链霉亲和素, 使用前用 SMNE 稀释液稀释 100 倍。
TMB 显色液	PND003	12 mL \times 1 瓶	使用前平衡于室温 20 分钟以上, 应避光并密封保存。
终止液	PNI002	6 mL \times 1 瓶	为盐酸溶液, 操作时戴好护目镜并避免接触皮肤。
封板膜	PNK001	3 片	用于检测过程中温育时间超过 30 分钟时密封覆盖酶标板条, 防止污染和液体蒸发。

■ 储存条件及有效期

1. 未开封试剂盒置 2-8 $^{\circ}$ C 保存, 有效期为 12 个月。
2. 开封组分的保存要求如下:

表 2.开封组分有效期

名称	效期
开封预包被酶标板	开封后的酶标板条连同干燥剂于自封袋中密封保存, 在 2-8 $^{\circ}$ C 条件经验证可以稳定保存 30 天。
SMNE 校准品	校准品经验证在 2-8 $^{\circ}$ C 条件下可以稳定保存 1 年。

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 稀释用的无菌离心管
- 拍干酶标板用吸水纸
- 加样槽
- 无菌滤芯吸头

■ 相关设备

- 酶标仪（能够检测 450 nm 和 620-650 nm 区间内单一波长的吸光度值）
- 单道或多道的微量移液器
- 微孔板恒温振荡器
- 恒温箱（可选）
- 洗板机（可选）

■ 实验操作流程

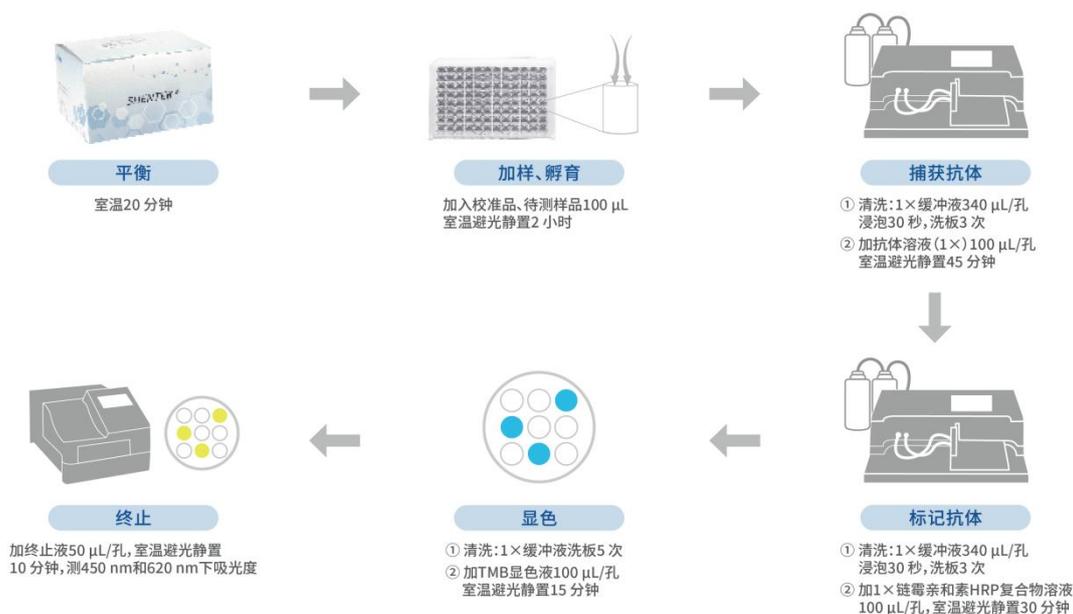


图 2 操作流程示意图

一、试剂、仪器准备

(一) 实验前准备:

1. 将 SMNE 校准品、抗 SMNE 预包被酶标板取出, 室温平衡 20 分钟。
2. 其余试剂在使用前 20 分钟取出于室温平衡, 使用后立即放回 2-8 °C 保存。
3. 根据检测样品数量计算所需孔数, 取出相应数量的预包被酶标板条, 剩余板条连同干燥剂置于自封袋中密封, 放回试剂盒中, 保存在 2-8 °C 冰箱, 请于效期内使用完。

备注: 室温指 25 °C ± 3 °C。

(二) 试剂配制:

1. 抗体配制: 用 SMNE 稀释液于无菌离心管中将其稀释 100 倍, 轻轻颠倒混匀, 即为 1×生物素偶联 SMNE 抗体。配制合适体积, 以保证加液时有充足的余量。
备注: 将生物素偶联 SMNE 抗体 (100×) 提前 20 分钟从 2-8 °C 取出, 于室温平衡。
2. 链霉亲和素 HRP 复合物溶液配制: 用 SMNE 稀释液将链霉亲和素 HRP 复合物 (100×) 稀释 100 倍, 轻轻颠倒混匀, 即为 1×链霉亲和素 HRP 复合物溶液。配制合适体积, 以保证加液时有充足的余量。

3. 1×缓冲液配制: 浓缩缓冲液 (10×) 用超纯水稀释 10 倍, 例如取 25 mL 浓缩缓冲液 (10×) 加入 225 mL 超纯水混匀, 即为 1×缓冲液, 用于洗板。建议现配现用。若采用洗板机洗涤, 可能发生试剂量不够, 可单独采购相同产品号的缓冲液。

备注: 取出浓缩缓冲液 (10×) 和 SMNE 稀释液, 观察如有结晶属正常现象, 于 37 °C 温育直至完全溶解。

4. 校准曲线配制: 参照图 3 和表 3 对校准品进行梯度稀释, 建议现配现用。

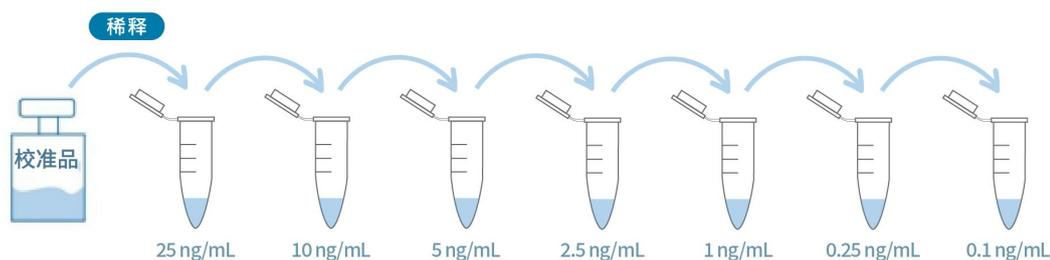


图 3 校准品稀释操作示例

表 3. 系列校准品梯度稀释

校准曲线 样品	加样	浓度 (ng/mL)
ST1	将校准品原液用 SMNE 稀释液稀释到 ST1 浓度	25
ST2	400 μ L ST1 溶液 + 600 μ L SMNE 稀释液	10
ST3	500 μ L ST2 溶液 + 500 μ L SMNE 稀释液	5
ST4	500 μ L ST3 溶液 + 500 μ L SMNE 稀释液	2.5
ST5	400 μ L ST4 溶液 + 600 μ L SMNE 稀释液	1
ST6	250 μ L ST5 溶液 + 750 μ L SMNE 稀释液	0.25
ST7	400 μ L ST6 溶液 + 600 μ L SMNE 稀释液	0.1
NCS (阴性对照)	SMNE 稀释液	0

建议先将校准品原液稀释 10 倍, 即 10 μ L 校准品原液加入到 90 μ L SMNE 稀释液中混匀。用 10 倍稀释后的校准品配制 ST1。

二、样品准备

- 样品: 表达纯化工艺过程样品, 原液等。应清澈透明, 经离心或过滤等方式去除不溶物。

- 存放: 样品务必事先有稳定性的研究, 明确最佳的保存条件; 一般建议样品长期储存应放置于-65 °C及以下环境中, 且不宜反复冻融。
- 处理: 预估待测样品中所含的非特异性核酸酶浓度, 用 SMNE 稀释液稀释适当倍数, 使其检测值落入标曲定量范围之内。
- 对初次使用或非特异性核酸酶含量未知的情况, 强烈建议进行样品适用性验证, 确定适宜的样品稀释倍数, 以便更好进行后续常规检测。相关验证方案可咨询我司技术支持。

三、操作步骤

(一) 加样孵育

1. 加入校准品和待测样品: 单通道移液器配合无菌吸头准确移取 100 μ L 系列校准品溶液及 SMNE 稀释液 (NCS) 加入相应微孔板中, 溶液加入孔底部, 操作时避免产生气泡, 每个浓度做 3 个平行复孔, 并记录各浓度孔所在位置。
2. 将处理好的待测样品按同样操作加入相应微孔板中。加样后将微孔板用封板膜密封, 于室温条件下水平静置, 孵育 2 小时。
3. 实际检测时可根据样品数量, 参照表 4 示例进行 96 孔板排版加样。

表 4.96 孔酶标板加样排版示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NCS	NCS	NCS		S1	S1	S1					
B	ST7	ST7	ST7		S2	S2	S2					
C	ST6	ST6	ST6		S3	S3	S3					
D	ST5	ST5	ST5		S1+SR C	S1+SR C	S1+SR C					
E	ST4	ST4	ST4		S2+SR C	S2+SR C	S2+SR C					
F	ST3	ST3	ST3		S3+SR C	S3+SR C	S3+SR C					
G	ST2	ST2	ST2									
H	ST1	ST1	ST1									

- ◇ 该示例表示的是检测 7 个浓度梯度的校准曲线 (ST1-ST7)、1 个阴性对照 NCS、3 个待测样品 (S1-S3) 和每个样品加标回收 SRC (S1 SRC-S3 SRC)。每个检测做 3 个重复孔。
- ◇ 实际检测时可根据样品多少, 参照此示例进行 96 孔板排版加样。

(二) 捕获抗体:

1. 倒去反应液, 用 1×缓冲液洗板, 340 μL/孔, 浸泡 30 秒, 迅速甩掉液体, 于纸巾上拍干。如此洗板 3 次。洗板后的微孔板应立即进行后续操作, 不可放置, 期间避免微孔板干燥。
2. 取 1×生物素偶联 SMNE 抗体溶液倒入加样槽中, 用多通道移液器配合无菌吸头快速将抗体溶液 100 μL/孔加入上述微孔板孔底部, 勿引入气泡。封板膜密封后, 于室温避光反应 45 分钟。

(三) 标记抗体:

1. 将上述微孔板用 1×缓冲液洗板 3 次, 340 μL/孔, 浸泡 30 秒, 迅速甩掉液体, 于纸巾上拍干后, 立即进行以下操作, 避免干燥。
2. 取 1×链霉亲和素 HRP 复合物溶液倒入加样槽中, 用多通道移液器配合无菌吸头快速将溶液 100 μL/孔加入上述微孔板孔底部, 勿引入气泡。封板膜密封后, 于室温避光温育 30 分钟。

(四) 显色:

1. 提前 20 分钟将 TMB 显色液置于室温避光条件下平衡。
2. 将上述板子用 1×缓冲液洗板 5 次, 于纸巾上拍干后, 立即进行以下操作, 避免干燥。
3. 取合适体积的 TMB 显色液于加样槽中, 用多通道移液器迅速将 TMB 显色液 100 μL/孔加入上述微孔板中, 于室温避光温育 15 分钟。此步骤勿用封板膜密封。

(五) 终止:

1. 取合适体积的终止液于加样槽中, 用多通道移液器迅速将终止液 50 μL/孔加入上述微孔板中, 加入顺序需同显色液加入顺序一致, 加样时吸头应悬空, 避免接触微孔板中溶液, 切勿产生气泡。终止后的微孔板于室温避光放置 10 分钟。

(六) 测读:

1. 设定酶标仪波长 450 nm 和 620-650 nm (620-650 nm 区间内单一长波长均可), 测定各孔 OD 值。测定时不可覆盖封板膜或盖子。
备注: 若酶标仪没有配备长波长时, 可以省去此步骤。

四、结果计算与判断

(一) 结果计算:

1. 各孔 OD450nm 数值需减去各自孔的长波长 OD 值。若酶标仪没有配备长波长时, 可以省去此步骤, 但是需确保孔底干净, 无指纹或刮痕。
2. 各校准点的 OD 值减去 NCS (SMNE 稀释液对应的 OD 均值) 后, 将 3 个重复孔取均值, 以浓度值和 OD 值进行四参数拟合, 获得校准曲线方程。将样品的平均 OD 值带入方程计算得到样品浓度。该浓度需乘以稀释倍数得到样品的实际浓度。
3. 标曲的拟合软件可以用酶标仪自带的软件。如无, 则建议采用专业的标曲制作软件, 如 *curve expert*, *ELISA Calc* 等。

(二) 结果判断:

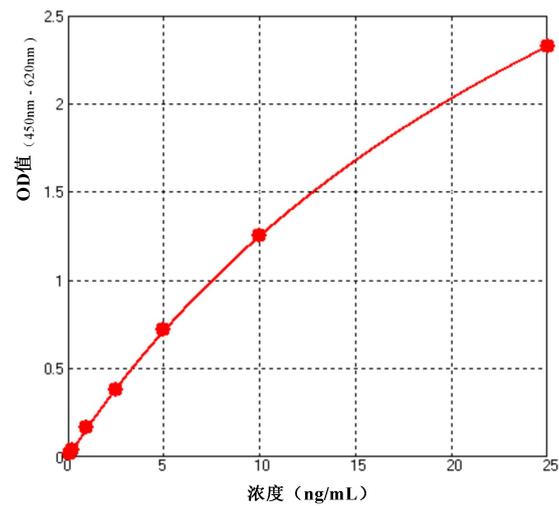
1. 对于吸光度值超出校准品 ST1 的样品, 可用 SMNE 稀释液稀释适宜倍数后再行测定, 样品中非特异性核酸酶浓度值为稀释后测定值 \times 稀释倍数。同时设置在该稀释度下的适宜加标样品, 准确度 (加标回收率) 符合相应法规的方法学验证要求。

(三) 检测方法的局限性:

1. 本品仅适用于研究用途, 不用于临床诊断。
2. 样品 pH 值应在 6.0-8.0 之间, 过低或过高的 pH 可能会造成测量值异常。

(四) 检测方法的局限性:

1. 校准曲线拟合范围: 0.1-25 ng/mL, 线性相关系数 $R^2 \geq 0.990$ 。
2. 最低检测限 LLOD: 0.1 ng/mL。
3. 最低定量限 LLOQ: 0.25 ng/mL。
4. 典型校准曲线如下图:



5. 精密性: 批内变异系数不高于 15%, 批间变异系数不高于 15%。
6. 专属性: 与 CHO、Vero、293T、*E.coli* 宿主蛋白和牛血清白蛋白无交叉反应。与汉逊酵母宿主蛋白交叉反应率小于 1%。与 RNA 酶无交叉反应。试剂盒能覆盖检测 DNase I, 但与 SMNE 校准品无平行性。

■ 重要事项提醒

试剂盒的使用人员需经过培训,合格后方可使用。为了获得满意的检测结果,请您务必事先留意如下几点事项:

1. 所有的试剂配制务必使用无菌一次性的吸头、试管和加样槽等,充分混匀。避免微量移液器与吸头连接部分的污染,建议每次实验前后用 75%酒精擦拭移液器。规范移液操作,严禁液体倒吸至移液器中,或未去掉吸头时横放在试验台上。
2. 校准品和样品的稀释混匀要轻柔充分,勿产生大量泡沫。
3. 终止液为酸性溶液,在使用中注意眼睛、面部、手和衣服的防护。
4. 不建议混用其他试剂盒内的试剂。同批次的除外。
5. 配制缓冲液所用水需为无菌水或新鲜制备的超纯水,水温不得超过 37 °C。
6. 加样时将样品加于酶标板底部,尽量不接触孔壁。注意不要有气泡,可轻轻晃动混匀。在上机检测前若有气泡存在,需用干净的 10 μ L 吸头或针头等戳破,注意不要吸走孔内液体,导致结果误差大。
7. 在孵育反应时需给酶标板覆膜,防止样品蒸发。
8. 倒去缓冲液后应马上加后续溶液,勿让酶标孔处于干燥状态,以防影响试剂盒检测性能。
9. 未使用的酶标板条需用试剂盒附带的自封铝箔袋避光保存,以免被其他样品污染,导致试剂盒报废。
10. 校准品配制、样品稀释等务必精确,配制时最小的取样量不要小于 5 μ L,防止结果出现较大的误差。
11. 生物素偶联 SMNE 抗体 (100 \times) 和链霉亲和素 HRP 复合物 (100 \times) 试剂请在用前进行快速离心,将管盖中残留的试剂甩到管底,防止试剂的污染和损失。
12. 已稀释到工作浓度的校准品、生物素偶联 SMNE 抗体、链霉亲和素 HRP 复合物等因无法保证其稳定性,不建议再次重复使用。
13. 显色液应是无色透明液体。吸取时务必更换干净的吸头,防止 HRP 污染。如发现已有淡蓝色,请弃用。
14. 终止 10 分钟后再上机检测,结果更稳定。
15. 由于叠氮钠能抑制 HRP 活性,对检测结果有很大影响,因此样品中不能添加叠氮钠。
16. 山梨醇会导致信号异常,背景偏高,样品中山梨醇浓度不能超过 0.01%。

■ 常见问题分析

若实验结果出现异常,请及时对未使用的酶标板和试剂进行妥善保管,对显色的酶标板实验结果拍照,保留实验原始数据。联系我司技术支持为您解决问题。以下常见的异常现象及解决方法供您参考:

问题描述	可能原因	解决方法
背景信号高: 样品稀释液对应 OD450 值超过 0.200	<ol style="list-style-type: none"> 1. 稀释所用的水污染; 2. 配液所用移液器、吸头、离心管等耗材污染; 3. 操作环境不洁净; 4. 非特异性核酸酶校准品稀释过程中造成污染; 5. 洗板操作不规范; 6. 洗板次数不够,加液量不足。浸泡时间不足; 7. 试剂错配。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 使用无菌或新制备的超纯水稀释缓冲液; 2. 移液器应专用,并使用无菌带滤芯吸头; 3. 试验操作分区; 4. 校准品稀释操作应规范,瓶(管)口切勿触碰移液器外壁,造成管间交叉污染。 5. 手动洗板时移液器吸头应悬空,切勿触及管内液面。 6. 严格按照说明书推荐的加液量、洗板次数和浸泡时间,切勿随意更改。 7. 生物素偶联 SMNE 抗体(100×)或者链霉亲和素 HRP 复合物(100×)使用时稀释错误。
读数后某些孔 OD 值异常偏高	<ol style="list-style-type: none"> 1. 手动洗板过程中,甩液不迅速,或反复多次甩板,造成孔间液体飞溅交叉污染; 2. 手动洗板后,纸巾上拍干时操作不当或未更换新纸巾; 3. 加样操作不当; 4. 温育时未覆盖封板膜; 5. 揭开封板膜时操作不当,导致孔内液体飞溅。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 手动洗板时,甩液应一次完成,快速彻底; 2. 板子拍干用的纸巾是一次性用品,不得重复使用。在纸巾上拍干时,每拍一次更换一个新位置或新纸张,勿使拍痕重叠,若残留液体造成纸巾湿透,应弃去旧纸巾,重新铺就多层纸巾,每洗板一次拍干4-5次为宜; 3. 加样应匀速加于微孔板孔底部,防止加在孔壁上缘,飞溅造成邻近孔污染; 4. 微孔板孵育时应覆盖封板膜防止液体蒸发和污染杂物; 5. 揭开封板膜时,将微孔板平放在水平桌面上,用一只手的拇指和食指紧紧压在板子两侧防止移动,另一只手从一个角开始匀速揭开封板膜,过程中要始终保持板子不离开桌面,防止孔内液体飞溅。

■ 参考文献

- 1、《细胞治疗产品申请临床试验药学研究和申报资料的考虑要点》，药品评审中心，2018年3月13日。
- 2、Gimadutdinow O A, Khamidullina R G, Fazleeva I I, et al. STRUCTURE, FUNCTION AND EVOLUTION OF *Serratia marcescens* ENDONUCLEASE[J]. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, 2018, 6(1):53-61.
- 3、Willem, Kools, Priyabrata, et al. Nucleic Acid Impurity Reduction in Viral Vaccine Manufacturing[J]. BioProcess International, 2014, 12(2):59-59.
- 4、YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂（盒）。

修订日期：2023年07月19日

生效日期：2023年07月26日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址：浙江省湖州市红丰路1366号6号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话：0572-2165910