

resDetect™ CD3抗体定量检测试剂盒(酶联免疫分析法-间接法)(残留检测)

【产品名称】

resDetect™ CD3抗体定量检测试剂盒(酶联免疫分析法-间接法)(残留检测)

【规格】

96 Tests

【货号】

RES-A095

【背景介绍】

自 20 世纪 90 年代以来，CD3 单克隆抗体被用于 CIK 细胞治疗，以刺激 T 细胞的增殖和活化。在 IL2、IL1a 等其他细胞因子的协同作用下，产生增殖快、杀瘤活性高、肿瘤杀伤谱宽、不受 mhc 限制的 CIK 细胞，对癌症、慢性白血病、肝脏疾病和神经系统疾病的治疗有显著作用。显然，在最终的细胞治疗产品中必须控制原料的残留。为支持生物制品的开发，ACROBiosystems 经过严格的方法学验证，自主研发出 CD3 抗体定量检测试剂盒，在药物开发及 CMC 质控阶段对生物制品的质量进行评价。此外，该试剂盒还可用于 GMP CD3 抗体(ACROBiosystems, Cat# GMP-MC0323)浓度的定量测定。

【检测原理】

本试剂盒应用ELISA间接法。微孔板预包被了Human CD3E & CD3G，样本中的Anti-CD3 Antibody与微孔板上固定的Human CD3E & CD3G结合，然后加入HRP-conjugated antibody，形成抗原-抗体复合物，用底物显色，随后用终止液终止，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_{450 nm}- OD_{630 nm}与样本中的CD3抗体含量呈正相关。

【注意事项】

1. 仅供科研使用，不可用于体外诊断；
2. 该试剂盒适用于细胞上清、血清和血浆样本；
3. 请在试剂盒有效期内使用；
4. 不同试剂盒及不同批号试剂盒的组分不能混用；
5. 样本值若大于标准曲线的最高值，应将样本用 1×Dilution Buffer 稀释后重新检测；
6. 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；
7. 本试剂盒在设计上去除或降低了生物学样本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
RES095-C01	Pre-coated Human CD3E & CD3G Microplate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
RES095-C02	Anti-CD3 Antibody Standard	20 µg	冻干粉	2-8°C	-70°C
RES095-C03	HRP-conjugated antibody	10 µg	冻干粉	2-8°C, 避光	-70°C, 避光
RES095-C04	10×Washing Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES095-C05	2×Dilution Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RES095-C06	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
RES095-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. 冻干粉重构后需-70°C储存，建议冻融次数不要超过1次，分装规格不低于5 µg。

【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、300 µL、1000 µL加样需求
2. 恒温培养箱
3. 酶标仪，含450 nm/630 nm波长
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

【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（可将溶液放置于恒温培养箱37°C平衡10-15 min）。

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，在室温下溶解15至30分钟，轻轻吹吸混匀，避免剧烈摇动或涡旋。重构的存储液应在-70°C保存，建议冻融次数不要超过1次，分装规格不低于5 µg。

注：由于不同批次蛋白定量存在难以避免的合理的差异，如果希望有更小的回算误差，客户可以考虑使用生产工艺中特定批次的蛋白作为标准品生成标准曲线，进行相应的检测。

表2. 配制方法

ID	组份名称	规格 (96 T)	存储液浓度	重构水体积Vol.
RES095-C02	Anti-CD3 Antibody Standard	20 µg	200 µg/mL	100 µL
RES095-C03	HRP-conjugated antibody	10 µg	100 µg/mL	100 µL

【检测流程】

1. 工作液配制

1.1 配制1×Washing Buffer:

取50 mL 10×Washing Buffer, 用超纯水/去离子水稀释并定容至500 mL, 轻轻混匀。

1.2 配制1×Dilution Buffer:

取50 mL 2×Dilution Buffer, 用1×Washing Buffer稀释并定容至100 mL, 轻轻混匀。

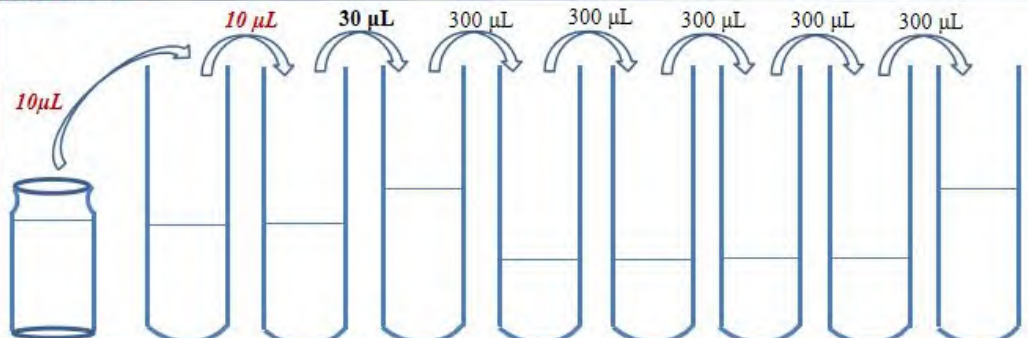
1.3 配制HRP-conjugated antibody工作液:

用1×Dilution Buffer将HRP-conjugated antibody稀释至0.08 µg/mL, 该工作液需现用现配。

2. 制备标准曲线

复溶后标准品 (RES095-C02) 的浓度为 200 µg/mL, 取 10 µL 的标准品储存液, 加入到 490 µL 的稀释液中 (Std.-0), 然后取 Std.-0 溶液 10 µL, 加入到 490 µL 的稀释液中 (Std.-1'), 最后取 Std.-1' 溶液 30 µL, 加入到 570 µL 的稀释液中, 作为标准曲线的最高浓度 **Std.-1 (4 ng/mL)**。在后续每一个离心管中加入 300 µL 稀释液, 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。以稀释液作为标准曲线的零浓度。

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, 用于样本残留检测, 避免不同公司来源标准品由于定量方法等不同带来测定结果的差异。

Tubes/ Solution Code	Anti-CD3 Antibody Standard stock solution	Std.-0	Std.-1'	Std.-1	Std.-2	Std.-3	Std.-4	Std.-5	Std.-6
Operating									
Solution Con.	200 µg/mL	4000 ng/mL	80 ng/mL	4 ng/mL	2 ng/mL	1 ng/mL	0.5 ng/mL	0.25 ng/mL	0.125 ng/mL
Dilution Buffer Vol.		490 µL	490 µL	570 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL

3. 加样

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 100 µL。空白对照孔加入 100 µL Dilution Buffer。

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，室温孵育 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 10 s，共洗板 3 次。每次洗板后，需在吸水纸上拍干。

6. 加 HRP-conjugated antibody 工作液

在对应板孔内加入 100 µL 稀释的 HRP-conjugated antibody（稀释至 0.08 µg/mL），该工作液现用现配。

7. 孵育

用封板膜封板，室温孵育 1.0 h。

8. 洗板

重复步骤 5 洗板。

9. 显色

每孔加入 100 μ L Substrate Solution。用封板膜封板，需避光，室温孵育 20 min。

10. 终止

每孔加入 50 μ 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。

11. 读数

用酶标仪测定各孔在 450 nm 和 630 nm 波长的吸光值，请在终止后 10 分钟内读数。

注：各孔 OD_{450 nm}扣除OD_{630 nm}读值可降低背景干扰。

【结果分析】

- a. 将标准品和样本的复孔读数求取平均值，然后减去零浓度标准品的 OD 值。
- b. 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，进行样本浓度的计算，计算浓度时需乘以相应的稀释倍数。若利用直线回归拟合，需选取合适的绘制区间，从而得到最佳的拟合曲线，保证回归分析的准确性。
- c. 标准曲线 R²应大于 0.9900。
- d. 标准曲线范围：0.125ng/mL-4 ng/mL。大于分析标准曲线范围的样品应报告为大于 4 ng/mL 或稀释样品使其在线性范围内。小于分析标准曲线的样品应报告为小于 0.125 ng/mL。

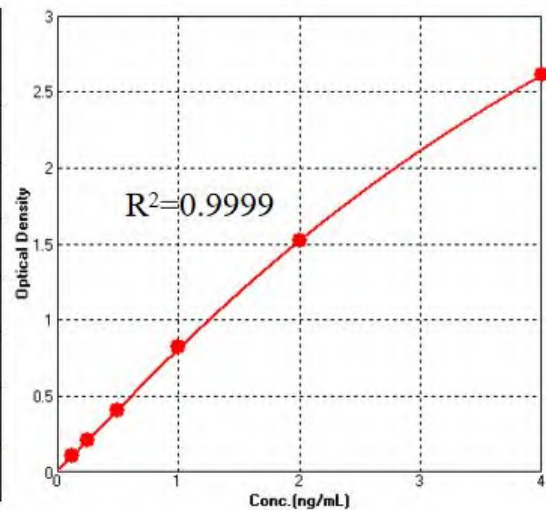
【检测流程简述】



【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 (ng/mL)	O.D.-1	O.D.-2	Average	Corrected
4	2.638	2.638	2.638	2.612
2	1.551	1.541	1.546	1.520
1	0.855	0.842	0.849	0.823
0.5	0.435	0.420	0.428	0.402
0.25	0.241	0.232	0.237	0.211
0.125	0.135	0.136	0.136	0.110
0	0.026	0.026	0.026	/



【灵敏度】

Anti-CD3 Antibody 的最低可检测浓度为 0.053 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】

a. 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。

b. 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。

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)	2.897	0.786	0.369	2.879	0.758	0.342
标准差	0.265	0.033	0.022	0.035	0.030	0.023
变异系数(%)	9.2	4.2	5.9	1.2	3.9	6.8

【准确度】

5 份 T 细胞培养上清中加入 3 个不同浓度的 Anti-CD3 Antibody，未加入 Anti-CD3 Antibody 的 T 细胞培养上清作为本底，计算回收率。回收率的范围在 81.3-102.5%，平均回收率为 89.0%。

样品类型	平均回收率%	范围(%)
T 细胞培养上清(n=5)	89.0	81.3-102.5

【稀释线性】

将高浓度的标准品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(1640)	血清
1:2	平均回收率%	93.3	92.1	89.6
	范围(%)	90.1-101.9	84.9-103.8	84.8-92.8
1:4	平均回收率%	92.6	88.0	88.4
	范围(%)	88.2-95.4	83.4-94.8	85.1-90.2
1:8	平均回收率%	96.9	92.2	93.1
	范围(%)	95.7-97.7	85.8-102.4	85.6-99.4
1:16	平均回收率%	90.7	92.3	94.0
	范围(%)	86.7-95.5	84.7-101.9	87.7-101.3

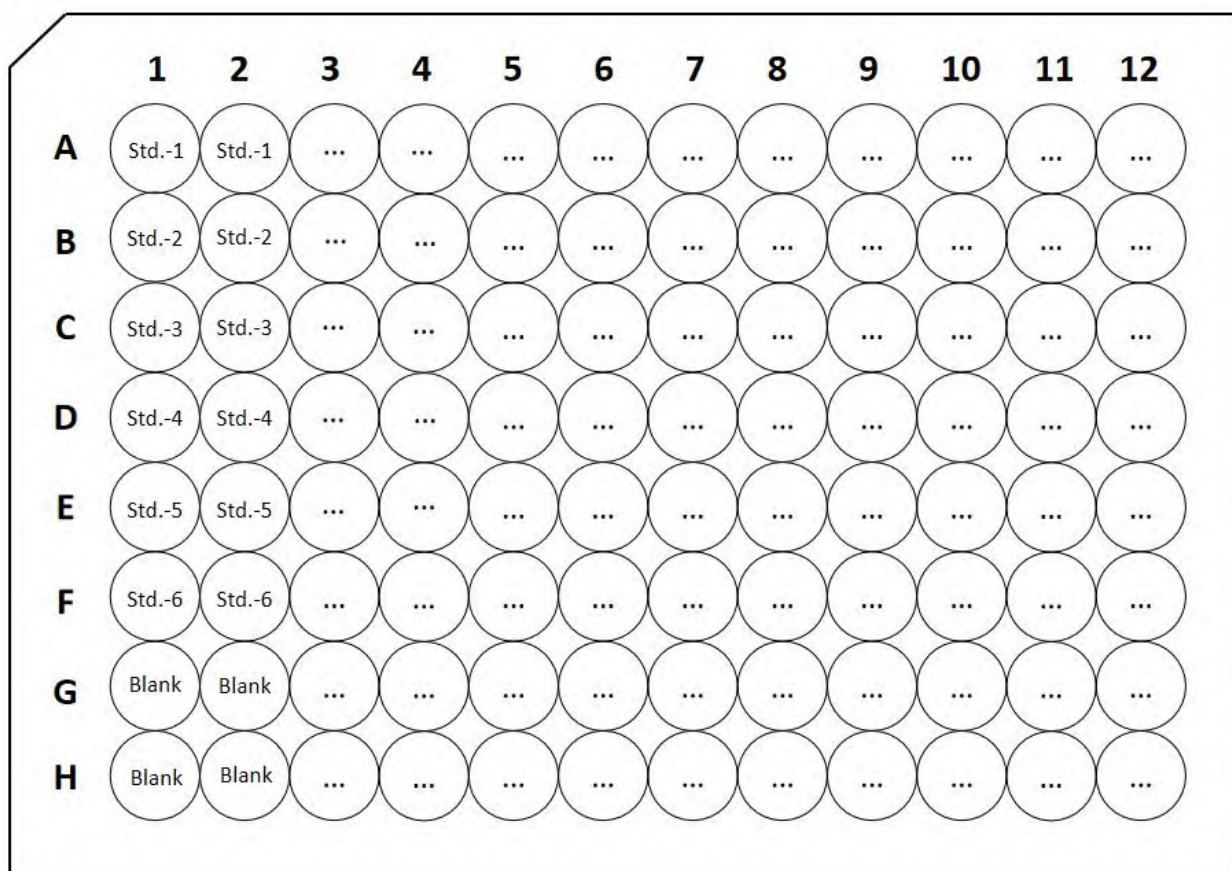
【基质干扰】

通过在稀释缓冲液中添加不同含量 DMSO 和 HSA，验证潜在的基质效应。

Additive	Tolerated concentration
DMSO	2%
HSA	5%

【PLATE LAYOUT】

建议使用此平板布局记录标准品和样品



注：Blank为空白对照Dilution Buffer孔。

【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
----	-------	------

<p>1. 结果 OD 值非常低</p>	<p>(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；</p>	<p>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；</p>
<p>2. 标准曲线和测定的重复性差</p>	<p>这是典型的由测定操作引起的问题，包括但不限于： (1) 加样本及试剂量不准；孔间不一致；加错样本；温育时间、洗板、显色时间不一致；</p>	<p>a. 重复测定样本，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；</p>

	<p>(2) 加样本及试剂时，加在孔壁上部非包被区；</p> <p>(3) 加样过快，孔间发生污染；</p> <p>(4) 试剂/样本没有混匀；</p> <p>(5) 样本中有杂质或沉淀物；血清样本未完全凝固即加入，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；</p> <p>(6) 微孔中有气泡；</p> <p>(7) 倍比稀释标准品时未混匀；</p> <p>(8) 过早稀释</p> <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>	<p>d. 样本稀释前应充分混匀，确保充分混匀试剂；</p> <p>e. 使用前离心；</p> <p>f. 用针尖挑破气泡；</p> <p>g. 稀释标准品的每一步均需混匀；</p> <p>h. 标准品在快要使用时稀释；</p> <p>i. 每次须使用新的封板胶封住反应；</p> <p>j. 快速、等量的将标准品分配到各个微孔中；</p> <p>k. 不混用不同批号试剂盒中组分；</p>
<p>3.空白背景高</p>	<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>a. 浓缩洗液准确配制：10×Washing 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>

	(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;	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, 但样本无检测信号	(1) 样本中无检测物或检测物含量极低; (2) 样本中其他物质影响/掩盖检测; (3) 样本中检测物浓度过高, 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. 适当倍数稀释样本, 检测物浓度尽量在试剂盒检测范围内。