

慢病毒滴度 p24 试剂盒 (一步酶联免疫吸附法) 说明书

货号：1703100

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/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 产品名称

慢病毒滴度 p24 试剂盒（一步酶联免疫吸附法）

■ 包装规格

96 测试/盒

■ 预期用途

慢病毒滴度 p24 试剂盒（一步酶联免疫吸附法）适用于基于 HEK293T 细胞基质中生产、增殖及纯化后慢病毒滴度测定。

该试剂盒仅供研究使用，不可用于诊断。

■ 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），采用双抗体夹心的方式对存在于样品中人类免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）p24 / 衣壳蛋白 p24 进行定量检测。

该分析方法通过在抗 p24 预包被酶标板中加入裂解液、校准品或待测样品、HRP 标记的 p24 酶标抗体进行共孵育。洗涤后，加入 TMB 底物进行显色反应，最后使用终止液终止酶催化反应。利用酶标仪在 450 nm 波长下测读吸光度，其吸光度与校准品或待测样品中的人类免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）p24 / 衣壳蛋白 p24 浓度成正相关，通过校准品拟合的剂量-反应曲线即可计算得出待测样品中人类免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）p24 / 衣壳蛋白 p24 的浓度。

本试剂盒对待测样品无需进行特殊处理，仅需通过合适的稀释比例进行适用性验证即可直接使用。本试剂盒操作步骤少，快速，检测专一性强，性能稳定可靠。

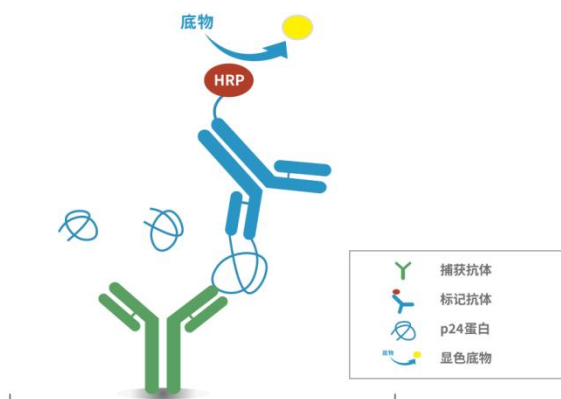


图 1 检测原理示意图

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	规格	说明
p24-Ag 校准品	PNB014	300 μL \times 1 管	溶液应该澄清透明，无肉眼可见不溶物。具体浓度见瓶身标注。
裂解液	PNS002	1.2 mL \times 1 管	溶液应该澄清透明，无肉眼可见不溶物。
抗 p24 预包被酶标板	PNA014	8 孔 \times 12 条	已包被适量的抗人类免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）p24 / 衣壳蛋白 p24 特异性单克隆抗体，铝箔袋密封包装，含干燥剂。酶标板部分孔壁可能会有结晶，属正常现象，无需特殊处理。
稀释液	PNE004	25 mL \times 2 瓶	用于校准品、待测样品和酶标抗体的稀释。对初次检测的样品，需进行样品适用性验证，以确定最佳稀释倍数。
浓缩缓冲液 (10 \times)	PNF001	25 mL \times 2 瓶	用于洗板。低温时易产生结晶，可在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴溶解，使用前用新鲜制备的超纯水稀释 10 倍。
p24 酶标抗体 (100 \times)	PNN008	120 μL \times 1 管	经 HRP 标记的抗人类免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）p24 / 衣壳蛋白 p24 单克隆抗体，使用前用稀释液稀释 100 倍，应避光并密封保存。
TMB 显色液	PND005	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

未开封试剂盒置 2-8 °C 保存，有效期为 12 个月，具体详见试剂盒标签。

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 °C 条件经验证可以稳定保存 30 天。

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 稀释用无菌离心管
- 移液器配套用枪头
- 拍干酶标板用吸水纸
- 加样槽

■ 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

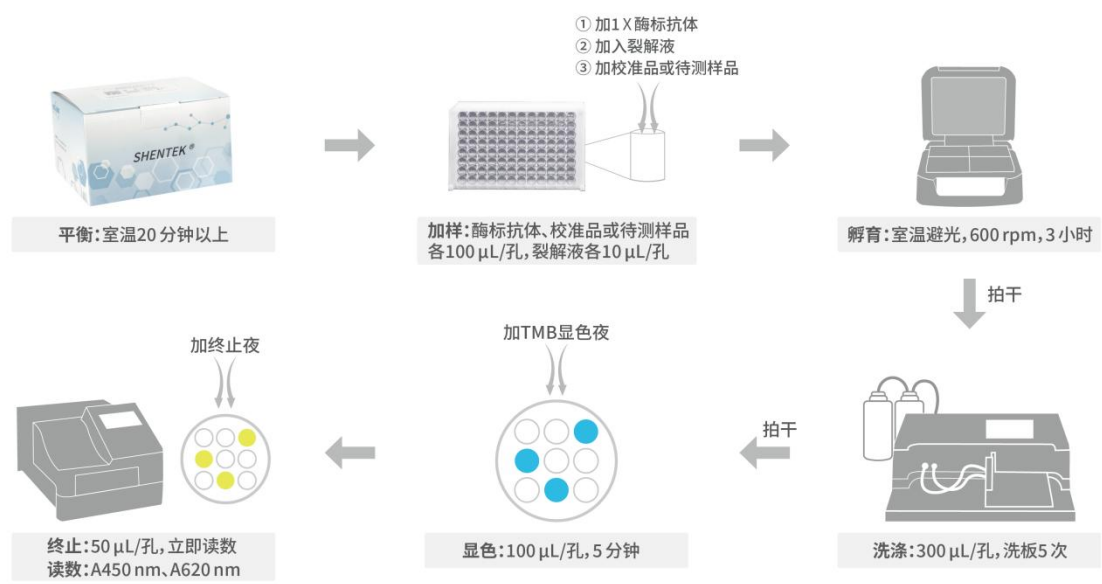


图 2 操作流程示意图

一、试剂、仪器准备

(一) 实验前准备

1. 取出试剂盒，于室温平衡约 20 分钟。
2. 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，于效期内使用完。

备注：室温指 25 °C ± 3 °C。

(二) 试剂配制

1. 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。

2. 1×p24 酶标抗体配制：用稀释液于无菌离心管中将 p24 酶标抗体（100×）稀释 100 倍，轻轻颠倒混匀，即为 1×p24 酶标抗体。配制合适体积，以保证加液时有充足的余量。现配现用。

3. 校准曲线配制：参照图 3 和表 3 对校准品进行梯度稀释。

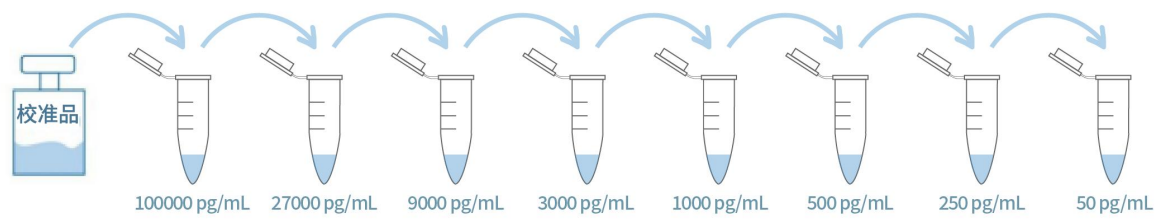


图 3 校准品稀释操作示例

表 3. 系列校准品梯度稀释

校准曲线样品	加样	浓度（pg/mL）
ST0	将校准品原液用稀释液稀释到 ST0 浓度	100000
ST1	270 μL ST0 溶液 + 730 μL 稀释液	27000
ST2	300 μL ST1 溶液 + 600 μL 稀释液	9000
ST3	300 μL ST2 溶液 + 600 μL 稀释液	3000
ST4	300 μL ST3 溶液 + 600 μL 稀释液	1000
ST5	400 μL ST4 溶液 + 400 μL 稀释液	500
ST6	400 μL ST5 溶液 + 400 μL 稀释液	250
ST7	100 μL ST6 溶液 + 400 μL 稀释液	50
NCS（阴性对照）	稀释液	0

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：待测样品根据其预估所含的人类免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）p24 / 衣壳蛋白 p24 浓度，用稀释液稀释适当倍数，使其检测值落入校准曲线定量范围之内。
- 对初次使用或样品人类免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）p24 / 衣壳蛋白 p24 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。

备注：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 1×p24 酶标抗体：取 1×p24 酶标抗体溶液到加样槽中，用多通道移液器快速将抗体溶液 100 μL /孔加入微孔板孔底部，勿引入气泡。实际检测时可根据样品数量加样（可参考表 4 示例进行 96 孔板排版）。
2. 加入裂解液、校准品和待测样品：准确移取 10 μL 裂解液加入微孔板底部，再准确移取 100 μL 系列校准品溶液、稀释液（阴性对照）、待测样品加入相应微孔板中。每个浓度建议做 2-3 个平行复孔，并记录各浓度孔所在位置。
3. 加样完毕后将微孔板用封板膜密封，放置于微孔板恒温振荡器上，室温条件下 600 rpm，避光振荡孵育 3 小时。

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									
B	ST7	ST7	ST7									
C	ST6	ST6	ST6	S1	S1	S1						
D	ST5	ST5	ST5	S2	S2	S2						
E	ST4	ST4	ST4	S3	S3	S3						
F	ST3	ST3	ST3	S1+SRC	S1+SRC	S1+SRC						
G	ST2	ST2	ST2	S2+SRC	S2+SRC	S2+SRC						
H	ST1	ST1	ST1	S3+SRC	S3+SRC	S3+SRC						

- ✧ 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）。
- ✧ 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。
- ✧ 客户可根据方法验证结果确定日常检测复孔数及是否设置加标回收。

（二）洗涤、显色

1. 提前 20 分钟将 TMB 显色液置于室温条件下平衡。
2. 将上述板子用 1×缓冲液洗板，300 μL /孔，迅速甩掉液体，于纸巾上拍干如此重复洗板 5 次。洗板后的微孔板应立即进行后续操作，不可放置。
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 5 分钟。此步骤勿用封板膜密封。

（三）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。
2. 终止后的微孔板应立即上机检测。

（四）测读

1. 设定酶标仪波长 450 nm 和 620-650 nm（620-650 nm 区间内单一波长均可），测定各孔 OD 值。测定时不可覆盖封板膜或盖子。

四、结果计算与判断

（一）结果计算

1. 各孔 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 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。
2. 各校准点和样品的 OD 值分别减去阴性对照的 OD 值后，重复孔取均值。
3. 以校准点浓度值和 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。
4. 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，可用稀释液稀释适宜倍数后再行测定，则样品中人类免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）p24 / 衣壳蛋白 p24 浓度值 = 稀释后测定值 \times 稀释倍数。若同时设置在该稀释度下的适宜加标样品，回收率符合相应法规的方法学验证要求。

（三）慢病毒滴度计算

1. 为校准病毒生产系统并建立 p24 水平与感染性之间的关联性，建议先用其他方法（比如荧光蛋白或抗性基因）测一次真实感染滴度（TU/ml），再与 p24 含量做对应关系。
2. 依据每个慢病毒颗粒（Lentiviral Particle, LP）中约有 2000 个 p24 蛋白分子这一观察结果，通过测得的 p24 浓度值来估算慢病毒上清的相对滴度：
✧ 正常情况下每 100-1000 LPs 中会有一个具有感染活性的病毒载体，即 1TU（Transducing Unit），对应 2×10^5 - 2×10^6 个 p24 蛋白分子，设 a 为 2×10^5 - 2×10^6 （ TU^{-1} ）

慢病毒滴度 (TU/mL) =
$$\frac{\text{p24含量 (g} \cdot \text{mL}^{-1}) \times 6.02 \times 10^{23} (\text{mol}^{-1})}{2.4 \times 10^4 (\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}) \times a (\text{TU}^{-1})}$$

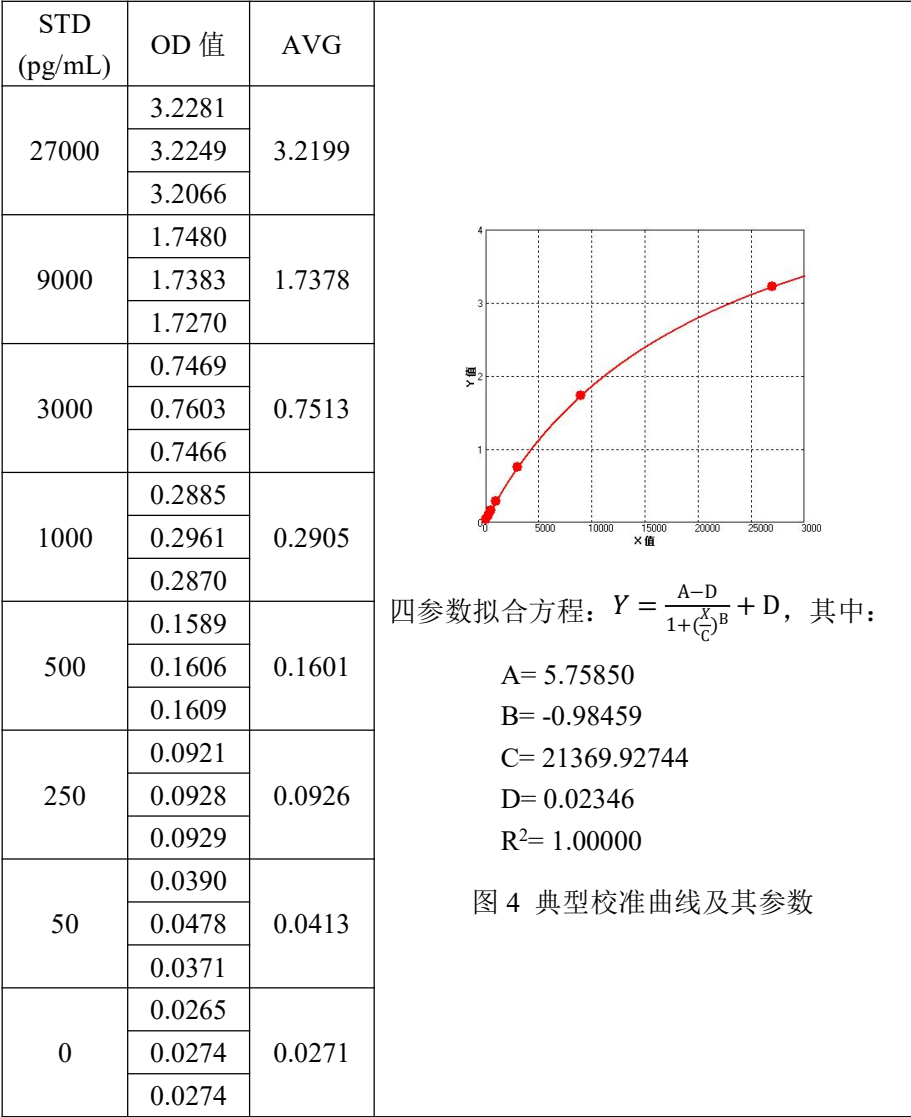
备注：该慢病毒滴度公式仅用于估算，实际以功能滴度为准。

(四) 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 6.5-8.5 间，过低或过高的 pH 值可能会造成测量值异常。

(五) 性能参数

- 1. 线性范围：50-27000 pg/mL，线性相关系数 $R^2 \geq 0.990$ 。
- 2. QL：50 pg/mL。
- 3. 典型校准曲线及其数据如下：



- 4. 特异性: 与 HEK293T 细胞系基质和细胞培养添加的 10%胎牛血清无明显交叉反应。

■ 重要事项提醒

试剂盒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:

- ✧ 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,切勿混用。避免微量移液器吸头连接部分的污染,建议每次实验前后用 75 %酒精擦拭。规范移液操作,严禁液体倒吸到移液器,或未去掉吸头时横放在桌上。
- ✧ 校准品和样品的稀释混匀要轻柔充分,勿产生大量泡沫。
- ✧ **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。**
- ✧ 不同批次试剂盒不建议混用。
- ✧ 所有生物样本均具有潜在安全风险,请使用者妥善处理和丢弃样本。同时在实验操作时佩戴合适的个人防护用品。
- ✧ 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。
- ✧ 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。
- ✧ 在孵育反应时需给酶标板覆膜,防止样品蒸发。
- ✧ 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。
- ✧ 不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。
- ✧ 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。
- ✧ p24 酶标抗体 (100 \times) 请在使用前快速离心,将管盖中残留的试剂甩到管底,防止试剂的污染和损失。
- ✧ 已稀释到工作浓度的校准品、1 \times p24 酶标抗体等因无法保证其稳定性,不建议再次重复使用。
- ✧ 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。
- ✧ 确保加入终止液后立即上机检测。
- ✧ 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。

■ 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	<div><div>1. 共耗污染，如试剂、仪器、环境等；</div><div>2. 人类免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）p24 / 衣壳蛋白 p24 校准品稀释过程中造成污染；</div><div>3. 洗板操作不规范，如洗板次数不够，加液量不足，浸泡时间不足；</div><div>4. 试剂错配。</div></div>	<div><div>1. 共耗试剂应现用现配，共耗仪器使用前后应及时清洁；</div><div>2. 校准品稀释应规范，瓶（管）口切勿触碰移液器外壁，造成管间交叉污染；</div><div>3. 手动洗板时移液器吸头应悬空，切勿触及管内液面；</div><div>4. 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；</div><div>5. p24 酶标抗体（100×）使用时未稀释或稀释错误。</div></div>
实验结果与参考性能参数相差较大	<div><div>1. 试剂过期；</div><div>2. 实验过程未严格按照说明书进行。</div></div>	<div><div>1. 确认试剂盒及其各组分在有效期内，若已过期，请联系销售/采购部门更换；</div><div>2. 实验前需对实验人员进行实操培训，保证实验顺利；</div><div>3. 对实验关键步骤，如使用浓度、加样量、孵育时间等需进行严格控制，不可以经验值判断替代说明书。</div></div>
复孔间平行性较差	<div><div>1. 移液失误；</div><div>2. 移液枪精度差；</div><div>3. 边缘孔效应引起的不均一性。</div></div>	<div><div>1. 进行回顾性审查或进行验证实验，确认各试剂加样量准确、均一；</div><div>2. 对移液设备进行定期校准和测试；</div><div>3. 更换布局方式，或避免使用边缘孔保证实验的准确性；</div><div>4. 强烈建议对各样本做三重复以上。若同一样本出现异常值，可采用适合的异常值剔除方法去除异常值后进行数据处理。</div></div>

■ 参考文献

- 中国国家药品监督管理局. 《CAR-T 细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床研究考虑要点》
- 中国国家药品监督管理局. 《基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则》
- White S M, Renda M, Nam N Y, et al. Lentivirus vectors using human and simian immunodeficiency virus elements. Journal of virology, 1999, 73(4): 2832-2840.
- Kahl C A, Marsh J, Fyffe J, et al. Human immunodeficiency virus type 1-derived lentivirus vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from Ross River virus and Semliki Forst virus. Journal of virology, 2004, 78(3): 1421-1430.

生效日期：2025 年 12 月 19 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：400-878-2189