

HIV-p24 ELISA Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号：NE107

保存：2~8°C避光保存1年



目录

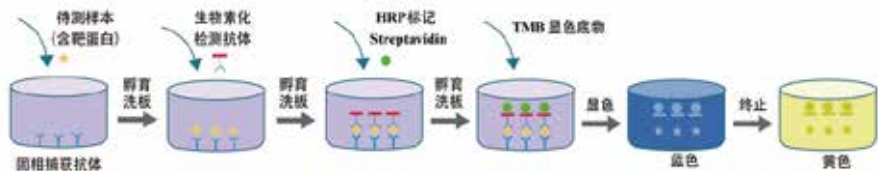
1.	产品说明.....	1
2.	产品适用性.....	1
3.	试剂盒组成.....	2
4.	自备材料设备.....	2
5.	样本收集.....	2
6.	样本稀释.....	2
7.	工作液配制.....	3
8.	操作步骤.....	3
9.	酶标板孔加样示意图.....	4
10.	结果分析.....	5
11.	参考数据.....	5
12.	精密度.....	6
13.	校准.....	6
14.	灵敏度.....	6
15.	病毒滴度.....	6
16.	注意事项.....	7



产品说明

p24 是 HIV 病毒颗粒中高度保守的、含量最多的主要结构蛋白，是结构基因 gag 编码的产物，在病毒的包装和成熟过程中起到关键作用。慢病毒载体则是在 HIV-1 病毒基础上改造而生成的病毒载体系统，可以高效地将目的基因转入到细胞中。p24 蛋白的含量代表着慢病毒的颗粒数，因此，可通过 ELISA 方法检测 p24 含量来测定慢病毒的物理滴度。

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法定量测定慢病毒上清中 HIV-p24 含量。本试剂盒采用高亲和力的 HIV-p24 抗体预包被酶标板，将病毒裂解液和标准品/待测样本加入微板孔中，经过孵育后样本中存在的 HIV-p24 会与酶标板上的预包被抗体特异性结合。洗涤去除未结合物后，将生物素标记的 HIV-p24 检测抗体加入微板孔中，再次孵育后检测抗体会与锚定在酶标板上的 HIV-p24 特异性结合。随后，将辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 (Streptavidin-HRP) 加至微孔板中并孵育，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- HIV-p24 蛋白-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 HIV-p24 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 HIV-p24 浓度。本试剂盒特异性强、检测灵敏度高，同时操作更加便捷。



双抗体夹心原理示意图

产品适用性

慢病毒上清



试剂盒组成

Component	NE107-01	Storage
HIV-p24抗体预包被酶标板	96 T	2~8°C
HIV-p24标准品	120 µl /瓶	2~8°C
裂解液	6 ml/瓶	2~8°C
1×HIV-p24检测抗体	12 ml/瓶	2~8°C
1× Streptavidin-HRP	12 ml/瓶	2~8°C (避光)
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	12 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.新鲜完全培养基（如含有10%FBS的DMEM）；
- 3.实验过程中用到的EP管、移液器、吸头、量筒等；
- 4.微孔板震荡器；
- 5.自动洗板机或8道手动洗瓶或多道移液器；
- 6.酶标仪：主波长450 nm，参考波长620 nm。

样本收集

慢病毒上清：收取慢病毒上清，300×g，4°C离心10分钟，将上清等量分装于EP管中并保存于-20°C，避免反复冻融（24小时内检测可于2~8°C保存）。

样本稀释

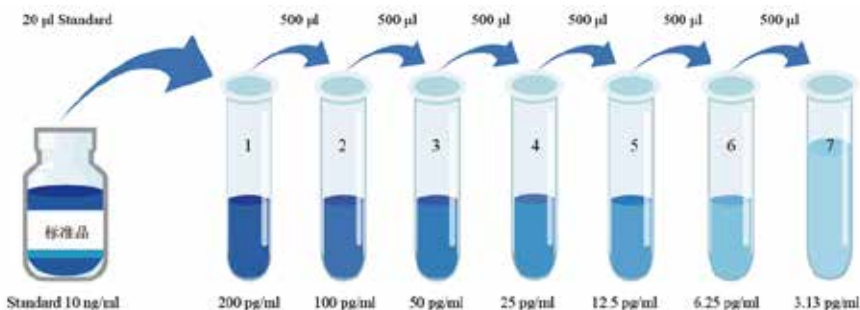
- 1.若慢病毒上清样本阳性值在曲线范围内，不需用新鲜完全培养基（如含有10%FBS的DMEM）稀释，可用原液直接检测；若阳性值超出曲线范围，需要用新鲜完全培养基稀释到曲线范围内进行检测，以获得准确的p24浓度值。通常未浓缩的慢病毒上清需稀释10~10000倍，计算浓度时应乘以相应稀释倍数。
- 2.建议正式实验前做预实验以确定稀释倍数。



工作液的配制

配制前请将所有试剂恢复至室温。

- 1) 1×洗液:** 按当次实验所需用量, 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℃保存30天。
- 2) 标准品梯度稀释:** 用新鲜完全培养基(如含有10%FBS的DMEM)将标准品(10 ng/ml)稀释50倍, 即取标准品20 μl, 加入到980 μl新鲜完全培养基中, 充分混匀, 记为1号管, 此时1号管的浓度为200 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500 μl新鲜完全培养基; 取500 μl 1号管液体加入至2号管, 此时2号管的浓度为100 pg/ml, 混匀后取500 μl加入至3号管, 此时3号管的浓度为50 pg/ml, 以此类推梯度稀释至7号管(3.13 pg/ml)。200 pg/ml作为标准曲线的最高点, 新鲜完全培养基作为标准曲线的零点(0 pg/ml), 即空白值。



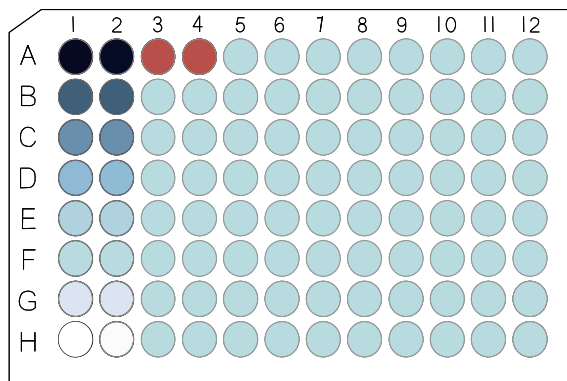
操作步骤

- 检测前请将所有试剂恢复至室温。取出当次实验所需板条, 未用的板条请及时放入铝箔袋中封口, 2~8℃保存。
- 先在板孔中加入裂解液, 20 μl/孔, 再将稀释好的标准品及样本分别加入到对应的板孔中, 200 μl/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; 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。
- 弃掉孔内液体, 用1×洗液洗板, 350 μl/孔, 每次洗板时建议在微孔板振荡器上震荡30秒后, 弃掉孔内洗液。重复操作5次, 末次在吸水纸上拍干。



- 4.所有板孔中加入1×检测抗体，100 μl/孔，在微孔板震荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育1小时。
- 5.重复步骤3。
- 6.在所有板孔中加入1×Streptavidin-HRP，100 μl/孔，在微孔板震荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育30分钟。
- 7.重复步骤3。
- 8.在所有板孔中加入TMB显色底物，100 μl/孔，在微孔板震荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育15分钟。
- 9.孵育完成后加入终止液，100 μl/孔，在主波长450 nm，参考波长620 nm的波长下进行读数。
- 10.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2~8℃储存，建议1个月内用完。

酶标板孔加样示意图



- 注：A1/A2：20 μ l裂解液+200 μ l 200 pg/ml标准品
 B1/B2：20 μ l裂解液+200 μ l 100 pg/ml标准品
 C1/C2：20 μ l裂解液+200 μ l 50 pg/ml标准品
 D1/D2：20 μ l裂解液+200 μ l 25 pg/ml标准品
 E1/E2：20 μ l裂解液+200 μ l 12.5 pg/ml标准品
 F1/F2：20 μ l裂解液+200 μ l 6.25 pg/ml标准品
 G1/G2：20 μ l裂解液+200 μ l 3.13 pg/ml标准品
 H1/H2：20 μ l裂解液+200 μ l 0 pg/ml标准品（即新鲜完全培养基）
 A3/A4：20 μ l裂解液+200 μ l 慢病毒上清

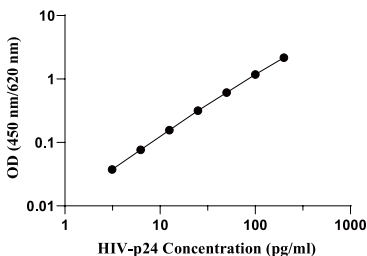
结果分析

- 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
200	2.159	2.203	2.181	2.170
100	1.215	1.159	1.187	1.176
50	0.630	0.617	0.6235	0.6125
25	0.331	0.326	0.3285	0.3175
12.5	0.167	0.167	0.167	0.156
6.25	0.087	0.088	0.0875	0.0765
3.13	0.048	0.049	0.0485	0.0375
0	0.011	0.011	0.011	0.000



标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 $(0.011+0.011)/2=0.011$ ，校正值定为0。200 pg/ml标准品两个复孔的平均OD值为 $(2.159+2.203)/2=2.181$ ，则其校正值为 $2.181-0.011=2.170$ 。

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)	96.2	48.3	22.2	93.6	47.7	21.5
标准差	2.6	1.1	0.98	4.0	2.9	1.4
变异系数 (%)	2.7	2.3	4.4	4.3	6.1	6.5

校准

本试剂盒的标准品为TransGen Biotech校准过的高纯度的重组HIV-p24。

灵敏度

HIV-p24的最低可检测浓度为1.0 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。

病毒滴度

根据以下数据计算病毒上清的近似慢病毒滴度。

每个慢病毒颗粒大约有 2000 个 p24 分子，因此

1个病毒颗粒含 8×10^5 pg p24 (算法 $2000 \times (24 \times 10^3) / (6 \times 10^{23}) \times 10^{12}$)

1 ng p24相当于 1.25×10^7 个病毒颗粒

通常情况下，1 TU (Transducing Unit) 大概含有100~1000个病毒颗粒，因此

10^7 TU/ml $\approx 10^9 \sim 10^{10}$ 病毒颗粒/ml $\approx 80 \sim 800$ ng p24 /ml。



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. 先加裂解液，再加标准品/样本，需震荡30秒使其完全混匀。
5. 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。
6. TMB显色底物为无色透明液体，如有变色请勿使用。
7. 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。
8. 加完终止液后，请在30分钟内完成读数。
9. 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。
10. 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。
11. 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。
12. 不同批号或不同来源的试剂盒组分不可混用。





品质高于一切
精品服务客户

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202211

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

Website www.transgen.com

E-mail trans@transgen.com

Customer Service +86-400-898-0321

Phone +86-10-57815030

