

# HIV-p24 ELISA Kit (One-step)

使用前请仔细阅读说明书

目录号: NE109

保存: 2~8°C避光保存1年



## 目录

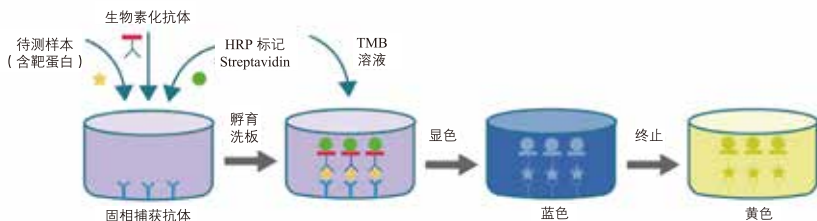
1. 产品说明.....	1
2. 产品适用性.....	1
3. 试剂盒组成.....	2
4. 自备材料设备.....	2
5. 样本收集.....	2
6. 样本稀释.....	2
7. 工作液配制.....	3
8. 操作步骤.....	3
9. 酶标板孔加样示意图.....	4
10. 结果分析.....	5
11. 参考数据.....	5
12. 精密度.....	5
13. 校准.....	6
14. 灵敏度.....	6
15. 病毒滴度.....	6
16. 注意事项.....	6



## 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慢病毒载体系统，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。

本试剂盒采用一步法的双抗体夹心 ELISA 快速定量测定病毒上清中 HIV-p24 含量，全程孵育时间为 70 分钟。首先将病毒裂解液、标准品 / 待测样本、生物素标记的 HIV-p24 检测抗体以及辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 (Streptavidin-HRP) 依次加至 HIV-p24 抗体预包被的酶标板孔中并一起孵育，形成“包被抗体 - HIV-p24 蛋白 - 检测抗体 - Streptavidin-HRP”免疫复合物。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

病毒上清



### 试剂盒组成

Component	NE109-01	Storage
HIV-p24抗体预包被酶标板	96 T	2~8°C
HIV-p24标准品	120 $\mu$ l / 瓶	2~8°C
标准品&样本稀释液	50 ml/ 瓶	2~8°C
裂解液	6 ml/ 瓶	2~8°C
1×HIV-p24检测抗体	6 ml/ 瓶	2~8°C
1× Streptavidin-HRP	6 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. 实验过程中用到的 EP 管、移液器、吸头、量筒等；
3. 微孔板震荡器；
4. 自动洗板机或 8 道手动洗瓶或多道移液器；
5. 酶标仪：主波长 450 nm，参考波长 620 nm。

### 样本收集

1. 病毒上清：收取病毒上清，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

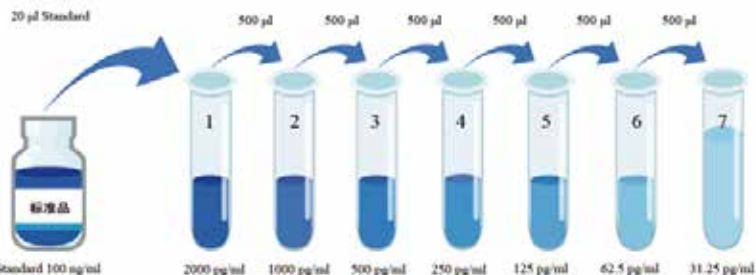
1. 若病毒上清样本阳性值在曲线范围内，不需标准品 & 样本稀释液稀释，可用原液直接检测；若阳性值超出曲线范围，需要用标准品 & 样本稀释液稀释到曲线范围内进行检测，以获得准确的 p24 浓度值。通常稀释 10~10000 倍，计算浓度时应乘以相应稀释倍数。
2. 建议正式实验前做预实验以确定稀释倍数。



### 工作液的配制

配制前请将所有试剂恢复至室温。

- 1× 洗液:** 根据实验所需用量，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°C 保存 30 天。
- 标准品梯度稀释:** 用标准品 & 样本稀释液将标准品 (100 ng/ml) 稀释 50 倍，即取标准品 20  $\mu$ l，加入到 980  $\mu$ l 标准品 & 样本稀释液中，充分混匀，记为 1 号管，此时 1 号管的浓度为 2000 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  $\mu$ l 标准品 & 样本稀释液；取 500  $\mu$ l 1 号管液体加入至 2 号管，此时 2 号管的浓度为 1000 pg/ml，混匀后取 500  $\mu$ l 加入至 3 号管，此时 3 号管的浓度为 500 pg/ml，以此类推梯度稀释至 7 号管 (31.25 pg/ml)。2000 pg/ml 作为标准曲线的最高点，标准品 & 样本稀释液作为标准曲线的零点 (0 pg/ml)，即空白值。



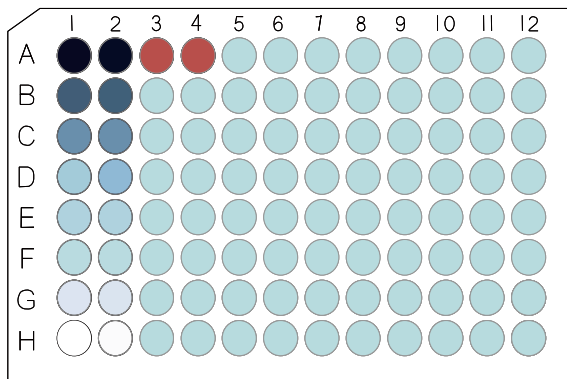
### 操作步骤

- 检测前请将所有试剂恢复至室温。取出实验所需板条，未用的板条请及时放入铝箔袋中封口，2~8°C 保存。
- 先在板孔中加入裂解液，20  $\mu$ l/孔，再将稀释好的标准品及样本分别加入到对应的板孔中，100  $\mu$ l/孔，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。
- 在所有板孔中加入 1× 检测抗体，50  $\mu$ l/孔；
- 在所有板孔中加入 1× Streptavidin-HRP，50  $\mu$ l/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 60 分钟。
- 弃掉孔内液体，用 1× 洗液洗板，300  $\mu$ l/孔，每次洗板时建议先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。



6. 在所有板孔中加入 TMB 显色底物, 100  $\mu$ l/ 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 10 分钟。
7. 孵育完成后加入终止液, 100  $\mu$ l/ 孔, 在主波长 450 nm, 参考波长 620 nm 的波长下进行读数。
8. 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 $^{\circ}$ C 储存, 建议 1 个月内用完。

### 酶标板孔加样示意图



- 注: A1/A2: 20  $\mu$ l 裂解液 +100  $\mu$ l 2000 pg/ml 标准品 +50  $\mu$ l 1 $\times$  检测抗体 +50  $\mu$ l 1 $\times$ Streptavidin-HRP  
 B1/B2: 20  $\mu$ l 裂解液 +100  $\mu$ l 1000 pg/ml 标准品 +50  $\mu$ l 1 $\times$  检测抗体 +50  $\mu$ l 1 $\times$ Streptavidin-HRP  
 C1/C2: 20  $\mu$ l 裂解液 +100  $\mu$ l 500 pg/ml 标准品 +50  $\mu$ l 1 $\times$  检测抗体 +50  $\mu$ l 1 $\times$ Streptavidin-HRP  
 D1/D2: 20  $\mu$ l 裂解液 +100  $\mu$ l 250 pg/ml 标准品 +50  $\mu$ l 1 $\times$  检测抗体 +50  $\mu$ l 1 $\times$ Streptavidin-HRP  
 E1/E2: 20  $\mu$ l 裂解液 +100  $\mu$ l 125 pg/ml 标准品 +50  $\mu$ l 1 $\times$  检测抗体 +50  $\mu$ l 1 $\times$ Streptavidin-HRP  
 F1/F2: 20  $\mu$ l 裂解液 +100  $\mu$ l 62.5 pg/ml 标准品 +50  $\mu$ l 1 $\times$  检测抗体 +50  $\mu$ l 1 $\times$ Streptavidin-HRP  
 G1/G2: 20  $\mu$ l 裂解液 +100  $\mu$ l 31.25 pg/ml 标准品 +50  $\mu$ l 1 $\times$  检测抗体 +50  $\mu$ l 1 $\times$ Streptavidin-HRP  
 H1/H2: 20  $\mu$ l 裂解液 +100  $\mu$ l 0 pg/ml 标准品 (即标准品 & 样本稀释液) +50  $\mu$ l 1 $\times$  检测抗体 +50  $\mu$ l 1 $\times$ Streptavidin-HRP  
 A3/A4: 20  $\mu$ l 裂解液 +100  $\mu$ l 病毒上清 +50  $\mu$ l 1 $\times$  检测抗体 +50  $\mu$ l 1 $\times$ Streptavidin-HRP



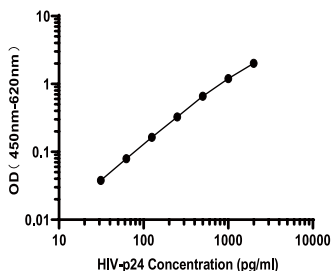
### 结果分析

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
2000	2.037	2.005	2.021	2.008
1000	1.238	1.188	1.213	1.200
500	0.687	0.653	0.670	0.657
250	0.348	0.330	0.339	0.326
125	0.176	0.178	0.177	0.164
62.5	0.094	0.09	0.092	0.079
31.25	0.051	0.051	0.051	0.038
0	0.013	0.013	0.013	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  $(0.013+0.013)/2=0.013$ ，校正值为 0。2000 pg/ml 标准品两个复孔的平均 OD 值为  $(2.037+2.005)/2=2.021$ ，则其校正值为  $2.021-0.013=2.008$ 。

### 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)	1127.3	402.8	95.2	1078.9	424.8	101.7
标准差	53.6	20.3	4.7	56.5	21.8	7.1
变异系数 (%)	4.8	5.1	5.4	5.2	5.5	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 10.0 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 p24 含量，可用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

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

$$1 \text{ ng p24 相当于 } 1.25 \times 10^7 \text{ 个病毒颗粒}$$

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

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

### 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。
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。

**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](mailto:complaints@transgen.com)

