

慢病毒滴度 ELISA 检测试剂盒

货号	规格
BF06203	96T

试剂盒组成

微孔板	8孔×12
裂解液	3.5ml
阴性对照	6ml
阳性对照	1ml
酶结合物	13ml
20×浓缩洗涤液	50ml
显色剂	7ml
底物液	7ml
终止液	6ml

保存：2-8℃（避光），保质期 1 年

一、原理

本试剂盒采用双抗体夹心法测定 HIV-1 P24 蛋白，即将抗 HIV-1 P24 的单克隆抗体包被于微孔板，待测样本加入已包被的反应孔内孵育，若标本中含有 HIV-1 P24 蛋白，则该蛋白与孔内的抗体形成抗原抗体复合物，加入酶标抗 HIV-1 P24 单抗，孵育后，酶标抗体与抗原抗体复合物上的抗原结合，再与底物反应显色。最后用硫酸终止反应，用酶标仪测定 OD 值。

二、用途

本试剂盒采用 ELISA 法可定性、定量检测 HIV-1 P24 蛋白，适用于血清、培养上清、样品等中慢病毒的滴度检测。仅限于实验室研究。

三、使用方法

1. 配液：将 50 ml 浓缩洗涤液（20×）用蒸馏水稀释至 1000 ml；
2. 定量 HIV-1 P24 系列稀释：阳性对照（PC）含有 320pg/ml 的重组 HIV-1 P24 抗原，用阴性对照（NC）倍比系列稀释五个浓度的阳性对照（稀释方法见表 1），如果定量测定的样品为细胞培养上清液，则需用未感染的细胞培养上清液进行系列稀释抗原，每个稀释浓度做两个复孔；

表 1 定量 HIV-1 P24 系列稀释

HIV-1 P24 抗原浓度	管号	P24 抗原 (ml)	稀释液 (ml)
80 pg/ml	#1	0.15ml of PC	0.45ml
40 pg/ml	#2	0.3ml of #1	0.3 ml
20 pg/ml	#3	0.3 ml of #2	0.3 ml
10pg/ml	#4	0.3 ml of #3	0.3 ml
5pg/ml	#5	0.3 ml of #4	0.3 ml

3. 编号：将样品对应孔按序编号，每板应设阴性对照 3 孔、阳性对照两孔、空白 1 孔，如果测定样品为细胞培养上清液，则需用未感染的细胞培养上清液做阴性对照 3 孔；
4. 每个反应孔中加入 25 μ l 裂解液；
5. 将 100 μ l 待测样品或对照品加入到有裂解液的反应孔中，振荡 30-60 秒混匀，置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时；
6. 洗板 5 次，拍干后每孔加入酶结合物 125 μ l/孔（空白孔不加），置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
7. 洗板 5 次，拍干后每孔加入底物（底物液:显色液=1:1 混合）125 μ l/孔。置 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟；
8. 加入终止液 50 μ l/孔；
9. 用酶标仪读数，波长 450nm（建议使用双波长酶标仪，参考波长 630nm）。

四、结果判断

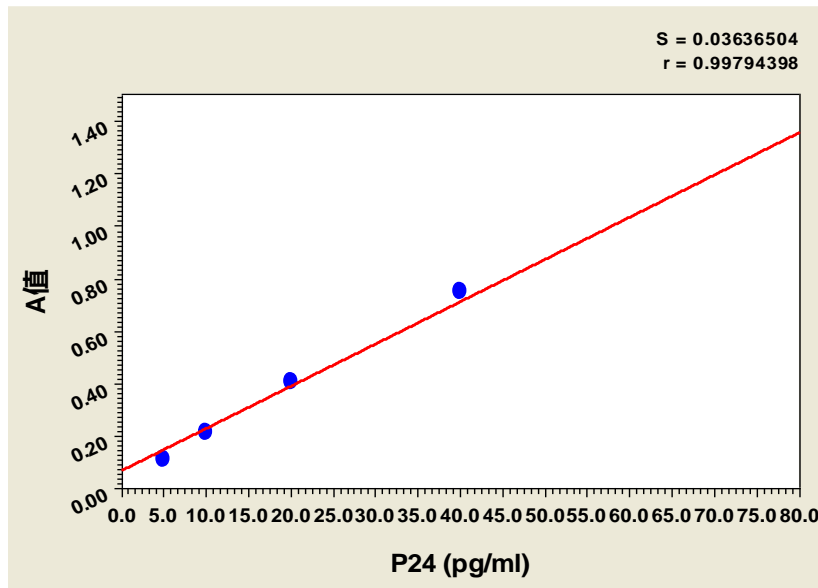
1. 阴性对照的正常范围：正常情况下，阴性对照 OD 值应 ≤ 0.150 ；
2. 阳性对照的正常范围：正常情况下定性测定（160 pg/ml）阳性对照 OD 值 ≥ 1.000 ；定量测定 80 pg/ml 阳性对照 OD 值 ≥ 0.650 ；
3. 临界值（Cut off）计算：测定样品为血清或血浆时，临界值=阴性对照平均值+0.071；测定样品为细胞培养上清液，则临界值=细胞培养上清液阴性对照平均值+0.071；
4. 阳性定性判定：测试标本的 OD 值小于临界值则为阴性；测试标本的 OD 值大于或等于临界值则为阳性；
5. 阳性定量判定：参照如下表（表 2）及图的方法，绘出标准曲线并进行定量判定。

表2 阳性定量判定

管号	HIV-1 P24 浓度	OD 值		平均 OD 值
1	80 pg/ml	1.370	1.296	1.333
2	40 pg/ml	0.778	0.737	0.758
3	20 pg/ml	0.414	0.415	0.415
4	10 pg/ml	0.222	0.218	0.220
5	5pg/ml	0.123	0.116	0.120

NC1=0.033, NC2=0.032, NC3=0.034, 平均值 NCx=0.033

Cut off=0.033+0.071=0.103



五、滴度计算

P24 蛋白是慢病毒外壳中含量最大的标志性蛋白，一个慢病毒颗粒（Lentiviral Particle, LP）中约有 2000 个 P24 蛋白分子，用以下公式可以计算慢病毒载体的颗粒数（LP）：

一个 LP 相当于： $2000 \times 24 \times 10^3 / (6 \times 10^{23})$ g of P24 = 8×10^{-5} pg of P24；或者说，1ng P24 = 1.25×10^7 LPs ($\approx 1.25 \times 10^{4.5}$ TU*)

*正常情况下，每 100-1000 LPs 中会有 1 个具有感染活性的病毒载体，即 1 TU (Transducing Unit)。¹⁻³

注意：上述公式计算得到的 LP 值是理论值，样品中可能含有的游离 P24 蛋白可能会使该值偏高。

提示：通常上清中病毒含量需要超过 10^6 TU/ml，才能确保浓缩纯化后得到足够浓度的慢病毒载体（一般能浓缩 150 倍左右）。

六、注意事项

1. 从冷藏环境取出的试剂盒内全部成份及待测标本应在室温平衡 30 分钟后方可使用。微孔板为真空包装，打开后受潮易失效，未用完的用自封袋等排除空气密封保存，并在 3 天内使用；

2. 洗涤液若出现结晶，可置 37℃ 使之溶解后方可使用；
3. 结果判定必须以酶标仪读数为准，建议使用双波长 450nm/630nm 检测，并在反应终止后 20 分钟内完成；
4. 终止液为 2M 的硫酸，使用时必须注意安全；
5. 加液时必须用加液器，并经常校对加液器的准确性；
6. 洗涤时，各孔均需加满洗液，防止孔口内有游离酶存在。使用洗板机洗涤应设定 30-60 秒的浸泡时间；
7. 不同批次试剂不得混用，封板膜为一次性用品，不能重复使用。

七、参考文献

1. Kahl C. A., Marsh J., Fyffe J., Sanders D. A., and K. Cornetta (2004) *J Virol.* 78: 1421-30.
2. White S. M., Renda M., Nam N. Y., Klimatcheva E., Zhu Y., Fisk J., Halterman M., Rimel B. J., Federoff H., Pandya S., Rosenblatt J. D., and V. Planelles (1999) *J Virol.* 73: 2832-40.
3. Kafri T., van Praag H., Ouyang L., Gage F. H., and I. M. Verma (1999) *J Virol.* 73:576-84.