



## 慢病毒滴度ELISA检测试剂盒

Cat: AC72816

Content: 96 Tests

Storage: 2°C-8°C

**For research use only**

# 目录

---

## CONTENT

产品介绍.....	01
检测原理.....	01
试剂盒提供的材料.....	02
试剂盒未提供的材料与设备.....	02
储存条件及有效期.....	03
注意事项.....	03
试剂配制.....	03
操作流程.....	05
流程总结.....	06
数据处理.....	06
产品数据展示.....	07

## 产品介绍

慢病毒(Lentivirus)载体是在HIV-1(人类免疫缺陷I型病毒)基础上发展的基因治疗载体,可以将外源基因稳定、有效整合到宿主染色体上,并且持久表达,产生的免疫反应小。

慢病毒生产后的滴度检测对其后续应用至关重要。p24蛋白含量代表着慢病毒的颗粒数,因此通过ELISA检测p24蛋白含量是常用的慢病毒物理滴度检测方法。艾策生物的慢病毒滴度检测试剂盒(AC72816)利用ELISA方法精确定量慢病毒样本中的HIV-1 p24核心蛋白浓度以准确测定慢病毒样品的滴度。

## 检测原理

慢病毒滴度ELISA检测试剂盒原理是基于“三明治”夹心ELISA法(图1)。将慢病毒裂解样本添加至捕获板上,样本中的p24蛋白可以被包被在捕获板上的抗p24重组抗体捕获。捕获的p24蛋白与另一个生物素偶联的抗p24重组抗体结合。加入链霉亲和素-辣根过氧化物酶偶联物(Streptavidin-HRP),与生物素偶联的抗p24的重组抗体发生反应。加入显色液反应后,加入终止溶液终止反应,整体颜色强度与特异性结合的p24蛋白含量成正相关。用酶标仪在450 nm处测量吸光度(可选:在650 nm处的参考波长)。根据p24蛋白标准曲线对病毒裂解液样品中p24含量进行精确定量,最后通过p24含量推算出慢病毒的滴度。

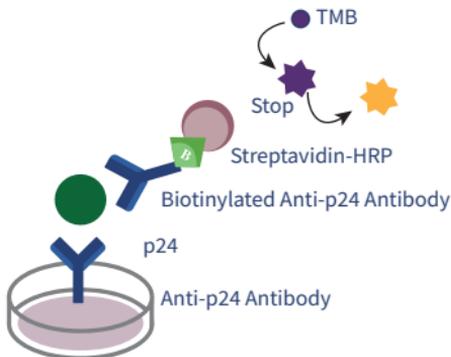


图1. 慢病毒滴度ELISA试剂盒检测原理

## 试剂盒提供的材料

产品组分	编号	规格
Capture Plate	A308301	96孔/板
p24 Control	A308303	1瓶, 冻干粉
Biotinylated Anti-p24 Antibody	A308306	1瓶, 冻干粉
Streptavidin-HRP	C7789	1瓶 (250 $\mu$ L)
5 $\times$ Sample Dilution Buffer	C6199	1瓶 (10mL)
TMB Solution	C3679	1瓶 (10 mL)
Stop Solution	C9269	1瓶 (10 mL)
Lysing Buffer	C5399	1瓶 (14 mL)
20 $\times$ Wash Solution	C2779	1瓶 (40 mL)
Plate Sealer	N/A	5

Capture Plate: 96孔微孔板(8孔 $\times$ 12条), 板内配置12条, 板用干燥剂密封在铝箔袋中。

p24 Control /Biotinylated Anti-p24 Antibody: 使用前用1 $\times$ 样品稀释缓冲液溶解重新配制, 溶解后的生物素化抗体在2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C保存长达2周, 若要长期储存, 请在-20 $^{\circ}$ C或以下的条件中储存, 避免反复冻融。

## 试剂盒未提供的材料与设备

- (1) 能够检测450 nm吸光度的酶标仪, 参考波长650 nm
- (2) 涡旋振荡器、微孔板振荡器
- (3) 离心机
- (4) 移液器、枪头、加样槽等
- (5) 准备试剂用的试管、离心管、量筒等
- (6) 去离子水或蒸馏水
- (7) 吸水纸
- (8) 计时器
- (9) PBS

## 储存条件及有效期

检测试剂盒2°C-8°C保存,有效期12个月;开封后,有效期1个月。

## 注意事项

- (1) 所有的化学试剂理应被认为具有潜在危害,请按照当地规定进行处理。
- (2) 所有使用本试剂盒的人员必须完成适当的生物安全培训,操作时请佩戴合适的防护设施,例如白大衣、乳胶手套、安全眼镜等。
- (3) 请避免试剂接触皮肤和眼睛,如不慎接触,请立即用大量清水清洗。
- (4) 试剂盒中的终止液为酸性溶液,在使用终止液时,请佩戴防护服,及防护眼睛、手及面部的设施。
- (5) 本试剂盒用于科学研究,不得用于其它用途。
- (6) 如果包装或内容有任何可见损坏,不要使用套件。
- (7) 为保证测试的准确性,请不要使用其他批号或其他来源的试剂替代本试剂盒中的试剂。
- (8) 请不要使用超过规定效期的试剂。
- (9) 在试剂盒的贮存或孵育过程中请避免强光照射。
- (10) 试剂的准备必须使用蒸馏水或去离子水。
- (11) 为了避免微生物的污染,以及试剂与样本间的交叉污染,请使用一次性枪头。
- (12) 浓缩洗液在4°C时会有结晶析出属于正常现象,恢复室温后混匀即可使用。
- (13) 检测前,所有试剂必须平衡至室温(20°C-25°C)。一次只取适量的试剂,不要将未使用过的试剂放回小瓶中,避免发生试剂污染。
- (14) 实验过程中,不要让孔板长时间处于干燥状态,清洗步骤完成后立即进行下一步。

## 试剂配制

检测前,请将所有的试剂、样本平衡到室温(20°C-25°C),使用后请立即放回冰箱。若浓缩的试剂出现结晶,37°C水浴,直至结晶完全溶解。

### ● 1×清洗液

用去离子水或蒸馏水稀释20×清洗液至1×清洗液, 备用。

### ● 1×样品稀释缓冲液

用去离子水或蒸馏水稀释5×样品稀释缓冲液至1×样品稀释缓冲液, 备用。

### ● Biotinylated Anti- p24 Antibody

用250  $\mu\text{L}$ 的1×样品稀释缓冲液溶解Biotinylated Anti-p24 Antibody, 室温下放置5 min, 根据标准品和待检样本的数量, 用1×样品稀释缓冲液按 1:50稀释 Biotinylated Anti-p24 Antibody。

### ● Streptavidin-HRP

根据标准品和待检样本的数量, 用1×样品稀释缓冲液按 1:100稀释浓缩的 Streptavidin-HRP。

### ● 标准品配制

用1.25 mL的1×样品稀释缓冲液溶解p24 Control, 室温下放置5 min, 根据标准品的数量, 用1×样品稀释缓冲液按 1:100稀释p24 Control, 确保充分混匀, 再从中取60  $\mu\text{L}$ 加入540  $\mu\text{L}$ 的1×样品稀释缓冲液, 此p24稀释液浓度为800  $\text{pg/mL}$ , 记为ST-1。再取300  $\mu\text{L}$  ST-1加入300  $\mu\text{L}$ 的1×样品稀释缓冲液混匀, 记为ST-2, 以此类推, 稀释至ST-7。以1×样品稀释缓冲液作为标准曲线的零浓度。

表1. 标曲样品溶液配制

标曲样品	加样	p24浓度 (pg/mL)
ST-1	60 $\mu\text{L}$ 稀释100倍标准品原液+ 540 $\mu\text{L}$ 1×样品稀释缓冲液	800
ST-2	300 $\mu\text{L}$ ST-1+300 $\mu\text{L}$ 1×样品稀释缓冲液	400
ST-3	300 $\mu\text{L}$ ST-2+300 $\mu\text{L}$ 1×样品稀释缓冲液	200
ST-4	300 $\mu\text{L}$ ST-3+300 $\mu\text{L}$ 1×样品稀释缓冲液	100
ST-5	300 $\mu\text{L}$ ST-4+300 $\mu\text{L}$ 1×样品稀释缓冲液	50
ST-6	300 $\mu\text{L}$ ST-5+300 $\mu\text{L}$ 1×样品稀释缓冲液	25
ST-7	300 $\mu\text{L}$ ST-6+300 $\mu\text{L}$ 1×样品稀释缓冲液	12.5
ST-8	1×样品稀释缓冲液	0

标曲拟合范围为ST-1~ST-7。

## ● 慢病毒样品预处理

将未知滴度的慢病毒样品用1×PBS进行梯度稀释，取150 μL各个稀释梯度的样品加入150 μL Lysing Buffer，混匀反应3 min，将混合液稀释1000倍以制得检测用样品。建议所有样品都准备一式两份。将结果乘以稀释系数，确定原始样品中的p24浓度值以计算慢病毒滴度。

## ELISA操作流程

(1) 按试剂配制步骤制备标准品和样品。将不需要的板条拆卸下来，放回铝箔袋中重新封好封口。

(2) 标准品与样品孵育：在相应孔中加入100 μL待测样品、标曲样品（ST-1~ST-8），用封板膜覆盖平板，在37°C下孵育60 min。

(3) 洗板：取下封板膜，弃掉孔板中液体，每孔加入250 μL 1×清洗液，充分洗涤4次，每次浸泡30 s，在清洗步骤后将倒置的平板放在吸水纸上拍干，为了保证理想的实验性能，需尽量去除残留液体。

(4) 生物素标记抗体孵育：在所有检测孔中加入100 μL稀释的Biotinylated Anti-p24 Antibody（参见试剂配制），封板膜封板，在37°C下孵育60 min。

(5) 洗板：重复步骤（3）。

(6) 酶偶联链霉亲和素孵育：在所有检测孔中加入100 μL的Streptavidin-HRP（参见试剂配制），封板膜封板，过程避光，在37°C下孵育60 min。

(7) 洗板：重复步骤（3）。

(8) 显色：每孔加入100 μL显色液，轻轻振荡混匀，避光，室温孵育15 min（在第一孔加入显色液后开始计时）。

(9) 检测：每孔加入100 μL终止液，轻轻振荡混匀，立即使用酶标仪进行双波长检测，测定450 nm最大吸收波长和650 nm参考波长下的OD值。校准后的OD值为450 nm的测定值减去650 nm的测定值（仅使用450 nm测定会导致OD值偏高，并且准确度降低）。

## ELISA流程总结



## 数据处理

### 1. 制作标准曲线

以p24标准品浓度 (pg/mL) 作为横坐标, 相应的吸光度作为纵坐标, 若设有复孔, 则取其平均值。利用绘图和统计学等软件, 采用四参数逻辑曲线拟合程序, 通过标准曲线的各个点计算出最佳拟合的线性关系。

### 2. 样品p24浓度计算

将样品的OD值代入标准曲线的拟合方程, 计算样品p24浓度, 所得的值乘以稀释倍数, 即样品的实际p24浓度 (pg/mL)。该试剂盒的稀释范围是定量的, 为了获得最高的精确度, 未知样品的OD值需稀释至推荐的定量范围内。

### 3. 样品慢病毒滴度计算

一个慢病毒颗粒 (Lentiviral Particle, LP) 中约有2000个p24蛋白分子, 则一个LP中p24的含量为:

$$2000 \times 24 \times 10^3 / (6 \times 10^{23}) \text{ g of p24} = 8 \times 10^{-5} \text{ pg}$$

或者说 800 pg p24所代表的LP数目为

$$800 \text{ pg} / 8 \times 10^{-5} \text{ pg} = 1 \times 10^7 \text{ LPs}$$

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), 那么80 ng/mL-800 ng/mL的p24浓度对应的滴度为:

$$80 \text{ ng/mL} - 800 \text{ ng/mL p24} = 1 \times 10^{9-10} \text{ LPs/mL} \approx 1 \times 10^7 \text{ TU/mL}$$

## 产品数据展示

### 1. 标曲数据

数据拟合绘制标准曲线, 生成的标准曲线用于实验数据分析。

表2. 慢病毒滴度ELISA检测试剂盒标准曲线数据

p24浓度 (pg/mL)	OD (450-650) nm
800	3.2015
400	1.9831
200	1.1106
100	0.6240
50	0.3432
25	0.1922
12.5	0.1344
Blank	0.0573

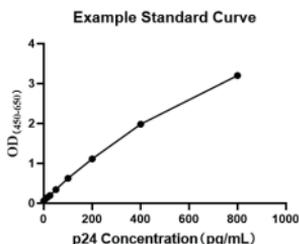


图2. 慢病毒滴度ELISA检测试剂盒标准曲线

## 2. 线性范围

试剂盒的线性范围为12.5 pg/mL-800 pg/mL。

## 3. 加样回收率

使用试剂盒,在Expi293F细胞上清中检测三个不同p24浓度分析样本的加样回收率,结果显示加样回收率均在80%-120%之间,表明Expi293F细胞上清并不影响慢病毒滴度的检测。

表3. 慢病毒滴度ELISA检测试剂盒的加样回收率验证

	重复次数	平均测值	Expi293F细胞上清加样回收率	
			实测	标准:80%-120%
p24	8	800 pg/mL	89%	符合
p24	8	100 pg/mL	91%	符合
p24	8	12.5 pg/mL	107%	符合

## 4. 精密度

使用试剂盒,分别对p24高、中、低3个浓度的样本进行测试,每个样本重复检测10次,每个样本计算10次测量浓度结果的平均值,计算变异系数(CV)。根据性能评估结果,所测结果CV(%)均低于10%,表明试剂盒精密度良好。

表4. 慢病毒滴度ELISA检测试剂盒的精密度验证

	重复次数	平均测值	CV(%)	
			实测	标准:≤10%
p24	10	800 pg/mL	1.2%	符合
p24	10	100 pg/mL	6.3%	符合
p24	10	12.5 pg/mL	9.8%	符合

A series of 20 horizontal dashed lines for writing, arranged in a rounded rectangular frame with a dark blue border.



杭州艾策生物技术有限公司

☎ 0571-87032695

✉ [support@acnovia.com](mailto:support@acnovia.com)

🌐 [www.acnovia.com](http://www.acnovia.com)

📍 浙江省杭州市钱塘区下沙街道福城路400号5幢1层