



慢病毒滴度ELISA检测试剂盒 (磁珠法)

Cat: AC72837

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.....	03
试剂盒未提供的材料与设备.....	03
储存条件及有效期.....	04
注意事项.....	04
试剂配制.....	04
操作流程.....	06
流程总结.....	07
数据处理.....	07
产品数据展示.....	08

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。

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。通常情况下,从细胞中收获的慢病毒上清液中含有大量游离p24蛋白,其对ELISA检测结果造成很大误差。传统的慢病毒ELISA试剂盒检测的是总p24水平(慢病毒包被p24和游离p24),其不能用于精确测定慢病毒上清样本中的病毒颗粒数。

艾策生物的慢病毒ELISA检测试剂盒(磁珠法)(AC72837)用于定量检测慢病毒相关的HIV-1 p24核心蛋白,先采用磁珠去除样本中游离p24干扰,再用ELISA方法精确定量慢病毒相关的p24蛋白。

检测原理

慢病毒滴度检测ELISA试剂盒(磁珠法)的检测原理是基于磁珠法和“三明治”夹心ELISA法。首先,慢病毒上清样本中游离的p24通过磁珠法进行去除,将去除游离p24的慢病毒裂解样本添加至捕获板上,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重组抗体发生反应。加入显色液,最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。

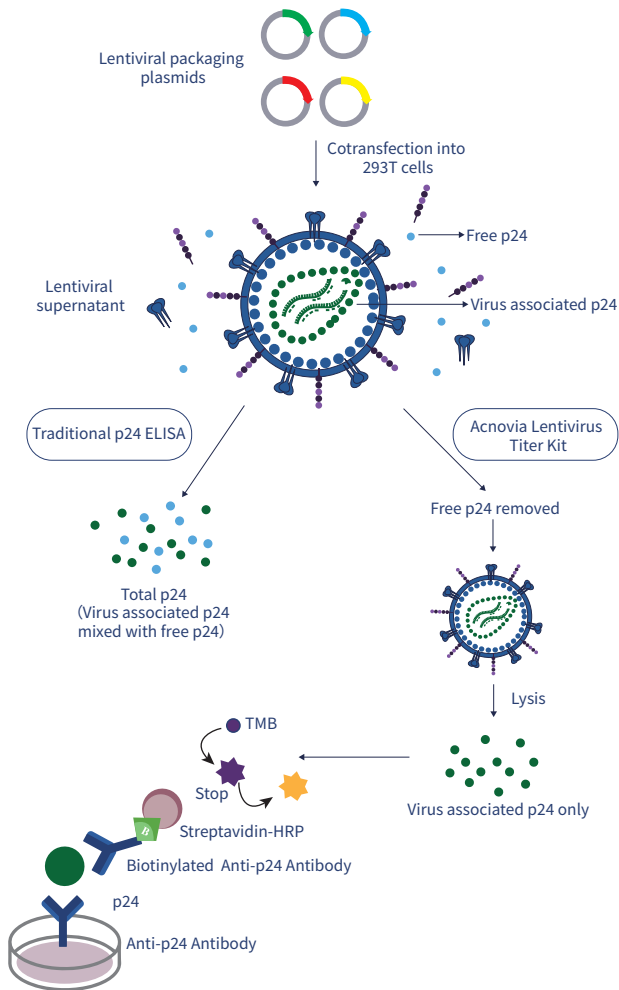


图1. 慢病毒滴度ELISA试剂盒(磁珠法)检测原理

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 μ L)
5 \times Sample Dilution Buffer	C6199	1瓶 (10 ml)
TMB Solution	C3679	1瓶 (10 mL)
Stop Solution	C9269	1瓶 (10 mL)
p24 Binding Reagent	C0097	2瓶 (2 mL/瓶)
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, 溶解后的试剂在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,及防护眼镜、手及面部的设施。
- (5) 本试剂盒仅用于科学研究,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 μ 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 μ L加入540 μ L的1×样品稀释缓冲液, 此p24稀释液浓度为800 pg/mL, 记为ST-1。再取300 μ L ST-1加入300 μ 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 μ L 稀释100倍标准品原液+ 540 μ L 1×样品稀释缓冲液	800
ST-2	300 μ L ST-1+300 μ L 1×样品稀释缓冲液	400
ST-3	300 μ L ST-2+300 μ L 1×样品稀释缓冲液	200
ST-4	300 μ L ST-3+300 μ L 1×样品稀释缓冲液	100
ST-5	300 μ L ST-4+300 μ L 1×样品稀释缓冲液	50
ST-6	300 μ L ST-5+300 μ L 1×样品稀释缓冲液	25
ST-7	300 μ L ST-6+300 μ 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

将未知样品用1×PBS稀释,使样品中游离p24含量在500 ng/mL以内(建议搭配使用艾策生物慢病毒快速检测试纸(Cat#AC72843),初步判定游离p24的浓度),加入50 μL p24 Binding Reagent,涡旋混匀后旋转孵育30 min(建议反应体系为0.5 mL-1.0 mL)。将EP管置于磁力架静置2 min,取150 μL上清加入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。

注:用于结合游离p24的磁珠可重复利用2-4次(具体根据实际情况而定),推荐用0.5 mL Glycine-HCl缓冲液(50 mM pH 2.5)重悬洗涤磁珠3-5次,每次吹打洗涤后静置1 min。洗涤后的磁珠可短期保存于10mM PBS中,若需长期保存,建议将磁珠置于磁珠保存液(10mM PBS, 0.1%BSA, 2mM EDTA)中4°C保存。

ELISA操作流程

(1)按试剂配制步骤制备好p24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的待测样品、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的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)。

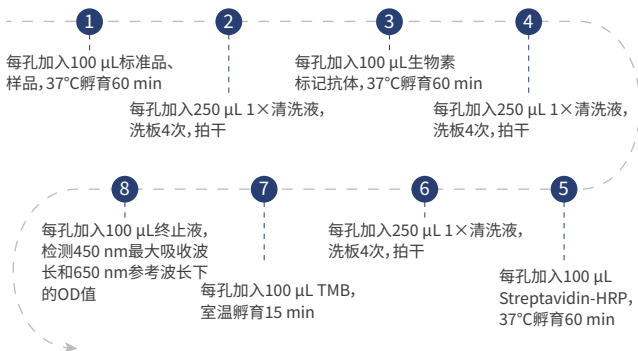
(6)酶偶联链霉素亲和素孵育:在所有检测孔中加入100 μL的Streptavidin-HRP(参见试剂配制),封板膜封板,过程避光,在37°C下避光孵育60 min。

(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(磁珠法)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

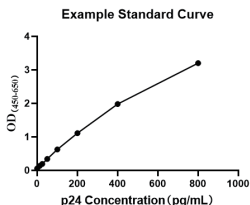


图2. 慢病毒滴度ELISA检测试剂盒(磁珠法)标准曲线

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(磁珠法)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(磁珠法)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



杭州艾策生物技术有限公司

☎ 0571-87032695

✉ support@acnovia.com

🌐 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