BlueKit®
Powered by Hillgene

Ver202501

慢病毒滴度 p24 快速 ELISA
检测试剂盒说明书

Cat.No. HG-P001L

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

目录 | CONTENTS

1. 产品简介 1
2. 应用 1
3. 试剂盒规格 1
4. 试剂盒组分 1
5. 储存条件及有效期 2
6. 定义或术语 2
7. 需要准备的试剂、耗材与设备 2
8. 操作步骤 2
9. 结果分析 4
10. 故障排除 5
11. 参考文献 6
12. 联系方式 6
13. 买方须知 6

1. 产品简介

在慢病毒载体制备的工艺开发过程中，需关注病毒载体质量标准的建立，包括病毒滴度、宿主细胞 DNA 残留、宿主细胞蛋白残留、支原体等检测指标。测量病毒滴度对于病毒使用以及进行感染细胞是至关重要的，也是慢病毒载体生产的关键质量属性（CQA）。滴度检测包括物理滴度（病毒载体总颗粒数）和转导滴度（病毒载体感染性颗粒数）。物理滴度：载体特定蛋白 / 核酸的定量可用于载体颗粒数量（物理滴度）的估计。也即总颗粒数和基因组滴度表示病毒的物理数量，为物理滴度。例如，HIV-1 衍生的慢病毒载体，可通过 ELISA 方法检测病毒载体样本中的 p24 蛋白从而进行物理滴度的检测，也可以通过 qPCR 的方法检测载体基因组 RNA 拷贝数而实现物理滴度的检测。

本试剂盒采用双抗体夹心法（一种 ELISA 法）检测供试品中的 p24 总含量，通过换算，得到 p24 的物理滴度。使用预先包被有抗 HIV-1 p24 捕获抗体的微孔板，反应孔内加入标准品及待测样本，同时加入抗 HIV-1 p24 二抗，室温孵育，形成抗体 - 抗原 - 二抗复合物。洗涤除去未结合物，通过 HRP 催化底物 TMB 产生蓝色，终止后使用酶标仪在 450 nm ~ 630 nm 波长下检测吸光度，根据标准曲线计算供试品中 p24 含量。

检测范围：1.37 ng/mL ~ 1000 ng/mL

2. 应用

适用于快速检测基于 HIV-1 的慢病毒的 p24 蛋白含量测定。

3. 试剂盒规格

产品名称	产品货号	产品规格
慢病毒滴度 p24 快速 ELISA 检测试剂盒	HG-P001L	96T

4. 试剂盒组分

组分	规格	存储条件
Coated Plate	1×96 wells	2 ~ 8°C
Anti HIV-1 p24+HRP	6 mL	
HIV-1 p24 Standard	S1 ~ S7,S0	
Virus Lysis	6 mL	
Sample Diluent Buffer	50 mL	
10×PBST Wash Buffer	50 mL	
Color Reagent	12 mL	
Stop Solution	12 mL	
Plate Sealer	5 张	
Instructions for Use （IFU）	1 份	

5. 储存条件及有效期

存储条件见上表，有效期 12 个月。开封后，未使用完的试剂盒，仍在规定储存条件下保存。

6. 定义或术语

◆ ELISA（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay）：酶联免疫吸附实验，利用抗原抗体的特异性反应，固相结合的抗体或抗原仍然具有免疫活性，加入检样后，通过酶标记抗体与固相抗体 - 检样中抗原形成免疫复合物，添加酶显色底物，通过测量光吸收度定量测定供试品中目标分子含量。

◆ p24：p24 蛋白是慢病毒外壳含量最大的一种标志性蛋白。

◆ 物理滴度：根据 p24 总蛋白含量换算而来的滴度为物理滴度。换算过程为：1 LP 含有 8×10^{-5} pg 的 p24，1 ng p24 约等于 1.25 x 10^7 LPs，一个典型的慢病毒载体，每 100 ~ 1000 LPs 约为 1 IFU。所以，10^7 IFU/mL 约等于 10^9 ~ 10^{10} LP/mL 或 80 ~ 800 ng p24/mL。

◆ CV（Coefficient of Variation）：变异系数，定义为标准差与平均系数的比值。

◆ ERC：加标质控。

◆ NC：阴性对照。

7. 需要准备的试剂、耗材与设备

实验前请准备好下列试剂、耗材与设备：

◆ 生物安全柜
◆ 酶标仪（至少配备 450nm 和 630nm 波长）
◆ 各规格移液器（如 1000 µL，200 µL，10 µL 等）
◆ 涡旋仪
◆ 吸水纸
◆ 恒温振荡孵育器
◆ 1000 µL，200 µL，10µL 等低吸附枪头
◆ 离心机
◆ 去离子水

8. 操作步骤

8.1. 检测流程图



总时长约 1 小时

8.2. 准备工作

8.2.1. 打开生物安全柜紫外灯，照射 30 分钟。

8.2.2. 试剂盒提前从 2-8°C冰箱取出后，于室温放置至平衡（30 分钟及以上），保证本次实验检测所需试剂。试剂盒开启时要标注开启日期，优先使用先开启的试剂盒，同一批号试剂盒可以混用，不同批号试剂盒不可混用。准备本次实验所需要的 Coated Plate，其它的可从微孔板上拆下，密封，按照说明书要求于 2 ~ 8°C保存，以备下次使用。

8.3. 洗涤液配制：用去离子水将 10×PBST Wash Buffer 稀释至 1×Wash Buffer，混匀，即得。

8.4. 供试品溶液配制：供试品的稀释需在生物安全柜内操作，使用 Sample Diluent Buffer 进行稀释。供试品稀释或加样前，确认供试品已溶解并平衡室温，操作前使用 90% 体积量程的移液器连续匀速吹打混匀 20 次或低速振荡混匀，待供试品样本充分混

匀后使用。稀释倍数可根据实际浓度进行适当调整。注意：单步稀释倍数不应高于 10 倍。

8.5. 标准品浓度确认：

HIV-1 p24 Standard	标准品浓度（ng/mL）
S1	1000
S2	333.33
S3	111.11
S4	37.04
S5	12.35
S6	4.12
S7	1.37
S0	0

8.6. 内控溶液配制（200 ng/mL 标准品）：取 80 µL Sample Diluent Buffer，加入 1000 ng/mL 标准品（S1）20 µL，混匀即得。

8.7. 加标质控溶液配制：取供试品溶液 20 µL，加入 20 µL 的 200 ng/mL 标准品，混匀，即得。

8.8. 阴性对照样本：取 Sample Diluent Buffer 直接检测。

8.9. 加样板布局（仅供参考，可根据实验实际需要进行调整）：

/	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S0	S0	S#01	S#01	S#09	S#09	S#17	S#17	S#25	S#25	S#33	S#33
B	S7	S7	S#02	S#02	S#10	S#10	S#18	S#18	S#26	S#26	S#34	S#34
C	S6	S6	S#03	S#03	S#11	S#11	S#19	S#19	S#27	S#27	S#35	S#35
D	S5	S5	S#04	S#04	S#12	S#12	S#20	S#20	S#28	S#28	S#36	S#36
E	S4	S4	S#05	S#05	S#13	S#13	S#21	S#21	S#29	S#29	S#37	S#37
F	S3	S3	S#06	S#06	S#14	S#14	S#22	S#22	S#30	S#30	S#38	S#38
G	S2	S2	S#07	S#07	S#15	S#15	S#23	S#23	S#31	S#31	ERC	ERC
H	S1	S1	S#08	S#08	S#16	S#16	S#24	S#24	S#32	S#32	NC	NC

8.10. 加样：取出已平衡至室温的Coated Plate，依次加入Virus Lysis，50 µL/ 孔；再分别加入HIV-1 p24 Standard 0 ng/mL、1.37 ng/mL、4.12 ng/mL、12.35 ng/mL、37.04 ng/mL、111.11 ng/mL、333.33 ng/mL、1000 ng/mL、供试品溶液、阴性对照、加标质控溶液、内控溶液，各10 µL/ 孔，平行2 孔。

8.11. 加酶标二抗：每孔加 50 µL Anti HIV-1 p24+HRP。

8.12. 孵育：用封板膜封板后，放置恒温震荡孵育器中，调节参数，室温 18 ~ 25°C，500 转 / 分钟，孵育 30 分钟。

8.13. 洗涤：在生物安全柜内，小心揭掉封板膜，将板孔内液体倾倒于废液缸中，在事先准备好的吸水纸上将板孔内液体拍干，每孔加入 300 µL 1× Wash Buffer，静置 30 秒后，将板孔内液体倾倒于废液缸中，在吸水纸上拍干（确保孔内无残留液体），如

此重复 4 次。

8.14. 显色：加入 Color Reagent，各 100 µL/ 孔。此步骤需要在生物安全柜中避光操作（关闭照明）。

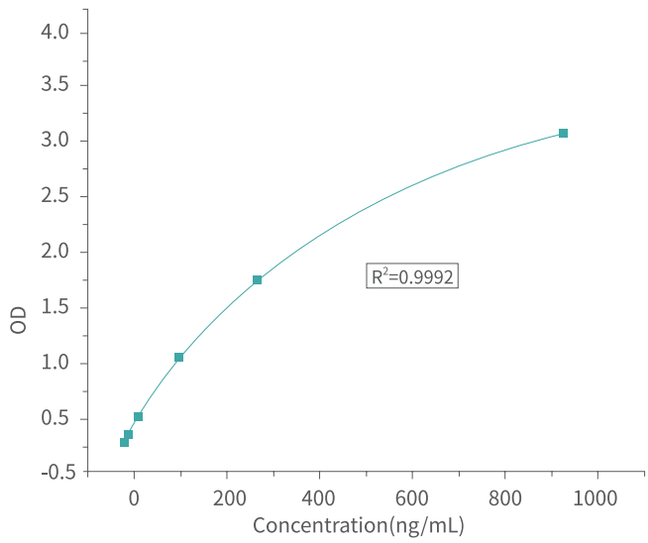
8.15. 孵育：用封口膜封板后置恒温震荡孵育器中，调节参数，室温 18 ~ 25°C避光孵育 5 ~ 10 分钟。

8.16. 终止：孵育结束后，加 Stop Solution 各 100 µL/ 孔，在 25 分钟内，用酶标仪于 450nm 检测波长、630nm 参比波长下读取吸光度。

9. 结果分析

9.1. 以标准品的吸光度为纵坐标，浓度为横坐标，采用四参数拟合方式对标准曲线进行拟合。

9.2. 示意图：



9.3. 结果计算

9.3.1. 供试品最终 p24 含量（ng/mL）计算公式

供试品最终 p24 含量（ng/mL）= 稀释倍数 × 四参数拟合供试品 p24 含量

9.3.2. 病毒颗粒数（PP/mL）计算公式

病毒颗粒数（PP/mL）= 供试品最终 Lenti-p24 含量 $\times 1.25 \times 10^7$

9.3.3. 内控溶液回收率计算

$$回收率\ \% = \frac{内控检测浓度}{内控理论浓度} \times 100\%$$

9.3.4. 加标回收率的计算

$$回收率\ \% = \frac{（加标检测浓度 \times 总体积）-（供试品检测浓度 \times 供试品体积）}{加标理论浓度 \times 加标体积} \times 100\%$$

9.4. 系统适用性

9.4.1. 对于检测值≥ 1.37 ng/mL 的检测复孔（包括标准品，加标质控样品和检测样品），复孔 OD CV 值需≤ 20%；

9.4.2. 标准曲线决定系数 $R^2 > 0.980$；

9.4.3. 内控溶液回收率为 70% ~ 130%

9.4.4. 加标质控样本的回收率在 70% ~ 130% 之间；

10. 故障排除

序号	问题描述	可能原因	相应对策
1	标准曲线梯度差	吸液或加液不准	检查移液器及吸头
		酶标板洗涤不完全	保证洗板次数及每孔的洗液用量
2	标曲和样本均不显色或显色很弱	温育时间太短	保证足够的温育时间
		实验温度不正确	使用推荐的温育温度
		漏加某个组分，尤其是检测抗体或酶	检查试验记录和剩余试剂。每次加液前均应核对标签
		试剂过期	使用有效期内的产品
		标准品 / 抗体 / 酶 / 显色底物失活或者丢失	正确保存、更换新的标准品 / 抗体 / 酶 / 显色底物
		酶标板洗涤、拍干后，未及时添加下一步反应溶液	在洗板、拍板完成后，立即添加下一步反应溶液
3	标曲不显色或显色很弱，样本显色	标准品倍比稀释时，未涡旋震荡或不够充分	溶解、稀释时、采用涡旋震荡混匀
4	OD 值读数低	酶标仪设置不正确	在酶标仪上检查波长和滤光片装置
			读数前应提前打开酶标仪进行预热
		酶标板洗涤操作不当：如洗板次数过多、加洗液后停留时间过长等	按说明书推荐的方法进行洗板
5	变异系数大	移液枪与吸头不匹配	更换枪头
		移液枪精度差	对移液设备进行定期校准和测试
		检查酶标板底部情况	检查酶标板底部是否有残留的液体和手印
		移液时操作手法不一致	反复练习移液，保持移液操作的一致性
		板孔内有异常	加样前确认板孔内无异物，加样后确认无气泡
6	背景值高	酶标板洗涤不完全	按说明书推荐的方法进行洗板
			如果用自动洗板机，请检查所有的加液口和排废液口是否有堵塞
			如果是手洗板，可适当增加洗板次数
		共用试剂污染：如超纯水	更换无污染试剂重新配制
		共和仪器污染：如移液器、离心机	移液器专用，并使用无菌带滤芯吸头
		操作环境不洁净，ELISA 试验操作区域与细胞培养、破碎区域混用	试验操作分区
		试剂错配：如洗液、检测抗体稀释倍数不对	按正确稀释倍数重新配制
		反应时间过长	当酶标板显色足够进行吸光度读数时立即使用终止液终止反应，适当缩短显色时间
		显色反应没有避光	显色反应应在避光条件下进行

序号	问题描述	可能原因	相应对策
7	实验结果与参考性能参数相差较大	试剂盒保存不当	按说明书要求保存相关试剂
		试剂过期	确认试剂盒及其各组分在有效期内
		实验过程未严格按照说明书进行。	实验前需对实验人员进行实操培训，保证实验顺利
			对实验关键步骤，如使用浓度、加样量、孵育时间等需进行严格控制，不可以经验值判断替代说明书
8	阴性对照出现阳性结果	样品、试剂被污染，或加样时操作不当导致相邻孔之间溶液溅洒出现交叉污染	更换试剂，小心操作
		酶标板洗涤不彻底	洗板前先将抗体溶液倒干净，然后洗液加满板孔，确保能充分洗涤
9	样本经不同梯度稀释，计算得到的样本值差异较大	样本的基质效应较强	选择某 2 个稀释梯度下，计算得到的样本值接近的稀释倍数（针对目的蛋白含量较高的样本）

11. 参考文献

《体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则（试行）》

12. 联系方式

地址：江苏省苏州市吴中经济技术开发区越溪街道吴中大道 1463 号

邮编 Postal code：215104

联系电话 Tel：400-900-1882

邮箱 E-Mail：info@hillgene.com

售后邮箱：technical@hillgene.com

网址 Website：https://www.hillgene.com

13. 买方须知

我们的产品仅供研究使用。它们不得用于任何其他目的，包括但不限于用于人体、治疗或诊断或任何商业用途。未经我们同意，不得将我们的产品转让给第三方、转售、为转售而修改或用于制造商业产品或向第三方提供服务。

您在使用本产品时还必须遵守 https://www.hillgene.com 上产品网页中描述的任何适用许可要求。您有责任查看、理解并遵守此类声明中规定的任何限制。

更多产品、知识产权和限制使用信息，请访问 https://www.hillgene.com。

附件 1：安全注意事项

● 一般说明

用户未按本说明书说明方式使用本产品可能会导致人身伤害或仪器或设备损坏。确保使用本产品的人员已接受实验室一般安全操作说明和本文档中提供的安全信息。

（1）在使用仪器或设备之前，请阅读并理解仪器或设备制造商提供的用户文档中的安全信息。

（2）在处理化学品之前，请阅读并理解所有适用的安全数据表（SDS），并使用适当的个人防护设备（手套、防护服、护目镜等）。

● 生物危险

（1）生物样本，如人和其他动物的组织、体液、传染性病原体和血液，有传播传染病的可能。在配备适当安全设备（如生物安全柜）的设施中进行所有工作。安全设备还包括个人防护用品，如手套、外套、工作服、鞋套、靴子、呼吸器、面罩、安全眼镜或护目镜。

（2）在使用可能具有生物危害性的材料之前，个人应根据当地的法规和公司 / 机构要求接受培训。

● 危险废物（来自仪器）

仪器产生的废物具有潜在危险性。请遵守前述 “生物危险”警告中的指导原则。

附件 2：相关产品（更多产品可咨询谱新生物 https://www.hillgene.com）

类别	产品名称	产品货号
病毒检测	Human 残留 DNA 检测试剂盒（qPCR- 荧光探针法）	HG-HD001
	Human 残留 DNA 片段分析检测试剂盒（qPCR- 荧光探针法）	HG-HF001
	E.coli 残留 DNA 检测试剂盒（qPCR- 荧光探针法）	HG-ED001
	质粒残留 DNA 检测试剂盒（qPCR- 荧光探针法）	HG-ZL001
	E1A&SV40LTA 残留 DNA 检测试剂盒（多重 qPCR- 荧光探针法）	HG-EA001
	全能核酸酶 ELISA 检测试剂盒	HG-BE001
	BSA ELISA 检测试剂盒	HG-BS001
	胰蛋白酶 ELISA 检测试剂盒	HG-TR001
	PG13 残留 DNA 检测试剂盒（qPCR- 荧光探针法）	HG-PG001
	宿主细胞残留 DNA（磁珠法）样本前处理试剂盒	HG-CL100
	血液 / 组织 / 细胞基因组 DNA 提取试剂盒	HG-NA100
	293T HCP ELISA 检测试剂盒	HG-HCP001
病毒包装	悬浮无血清慢病毒快速制备试剂盒	HG-HIV-CUL-001
	CD19 CAR-T 现货慢病毒	HG-CT1901
	CD19 CAR-NK 现货慢病毒	HG-CN1901

让细胞药物
谱写生命新篇章
/
CELL THERAPY
INNOVATION INSPIRED

BlueKit®
Powered by Hillgene

关注公众账号
获取更多咨询

欢迎订购

江苏谱新生物医药有限公司

地　址：苏州市吴中大道1463号越旺智慧谷4号楼
电　话：400-900-1882
邮　箱：info@hillgene.com
网　址：www.hillgene.com