

慢病毒滴度 ELISA 检测试剂盒(一步法)

货号	规格
BF06224	96T

试剂盒组成

微孔板	8孔×12
裂解液	4ml
阳性对照	0.15ml
酶结合物	10ml
20×浓缩洗涤液	30ml
底物液	12ml
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、样品等中的慢病毒的滴度检测。仅限于实验室研究。

三、使用方法

- 1、配液：将30 ml浓缩洗涤液（20倍）用蒸馏水稀释至600 ml；或取适量浓缩液按需配制成1*洗涤液。
- 2、定量HIV-1 P24系列稀释：阳性对照（PC）含有25.6ng/ml的重组HIV-1 P24抗原，用完全DMEM或者1*洗涤液梯度系列稀释六个浓度的阳性对照（稀释方法见下表），每个稀释浓度做两个复孔，并使用完全DMEM或者1*洗涤液稀释待测样本。此处需要注意的是，如果您使用完全DMEM稀释阳性对照就请用完全DMEM稀释待测样本；如果您使用1*洗涤液稀释阳性对照就请用1*洗涤液稀释待测样本。

表1 定量 HIV-1 P24 系列稀释

HIV-1 P24抗原浓度 (pg/ml)	管号	抗原 (ml)	稀释液 (ml)
640 pg/ml	1#	0.02 ml PC	0.78 ml
320 pg/ml	2#	0.2 ml 1#	0.2 ml
160 pg/ml	3#	0.2 ml 2#	0.2 ml
80 pg/ml	4#	0.2 ml 3#	0.2 ml
40 pg/ml	5#	0.2 ml 4#	0.2 ml
20 pg/ml	6#	0.2 ml 5#	0.2 ml

- 3、编号：将样品对应孔按序编号，每板应设阴性对照共计四孔（建议四孔，最少两孔）、阳性对照每个梯度各两孔。其中阴性对照即您稀释待测样本及阳性对照的溶液，其中阳性对照即为表1中您梯度稀释的六管HIV-1 p24抗原。
- 4、将25μl裂解液加入到反应孔中。
- 5、将75μl待测样品或对照品加入到反应孔中。
- 6、将75μl酶结合物加入到反应孔中。振荡30-60秒混匀，置37℃孵育50分钟。
- 7、洗板5次，拍干后每孔加入单组分TMB底物100μl/孔。置37℃孵育10分钟。
- 8、加入终止液50μl/孔，振荡30-60秒混匀。
- 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 ≤ 0.05 。
- 2、阳性对照的正常范围：正常情况下定量测定640pg/ml阳性对照OD值 ≥ 1.00
- 3、临界值=阴性对照平均值+0.02；
- 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

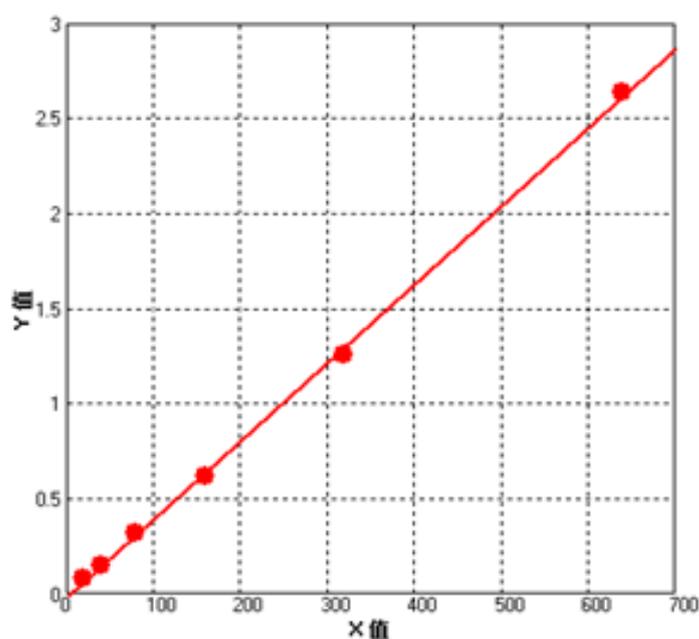
2 / 4

界值则为阳性。

5、阳性定量判定：参照如下图表的方法，绘出标准曲线并进行定量判定。推荐使用直线回归或者四参数曲线拟合。

表2. 阳性定量判定

管号	HIV-1 P24抗原浓度 (pg/ml)	OD值		OD平均值
1#	640 pg/ml	2.693	2.582	2.6375
2#	320 pg/ml	1.248	1.267	1.2575
3#	160 pg/ml	0.615	0.624	0.6195
4#	80 pg/ml	0.327	0.319	0.323
5#	40 pg/ml	0.149	0.15	0.1495
6#	20 pg/ml	0.076	0.078	0.077



NC1=0.013 NC2=0.012 NC3=0.012 NC4=0.011 平均值NCx=0.012

Cut off=0.012+0.02=0.032

五、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°C 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，若手动洗涤，各孔均需加300 μ l洗涤液，并振荡30-60秒；若洗板机洗涤则各孔均需加满洗涤液，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. 操作应严格按说明书进行，不同批次试剂不得混用；
8. 若实验室无可用的37度孵育温箱，也可室温（25度）进行孵育操作。