

## 慢病毒滴度 P24 检测试剂盒 使用说明

货号：JK-021-96

储存条件：2-8℃避光保存。

有效期：12个月。

本产品仅用于科研用途。

本试剂盒采用 ELISA 法可定性、定量检测 HIV-1p24 抗原，适用于血清、血浆及 HIV 培养上清标本，仅限于 HIV 辅助诊断和实验室研究。

本试剂盒采用双抗体夹心法测定 HIV-1p24 抗原，即将抗 HIV-1p24 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-1p24 抗原，则该抗原与孔内的抗体形成抗原抗体复合物，加入酶标抗 HIV-1p24 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，确定反应的阴阳性。

试剂盒组成：

微孔反应板 8 孔×12  
2、裂解液 4ml  
3、阳性对照 0.15ml  
4、酶结合物 10 ml  
5、20 倍浓缩洗涤液 30ml  
6、单组分 TMB 底物 12ml  
7、终止液 6ml

测定步骤：

- 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-1p24 系列稀释：阳性对照（PC）含有 6.4ng/ml 的重组 HIV-1p24 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.

HIV-1p24 抗原浓度 (pg/ml)	管号	抗原 (ml)	稀释液 (ml)
160 pg/ml	1#	0.01 ml PC	0.39 ml
80 pg/ml	2#	0.2 ml 1#	0.2 ml
40 pg/ml	3#	0.2 ml 2#	0.2 ml
20 pg/ml	4#	0.2 ml 3#	0.2 ml
10 pg/ml	5#	0.2 ml 4#	0.2 ml
5 pg/ml	6#	0.2 ml 5#	0.2 ml

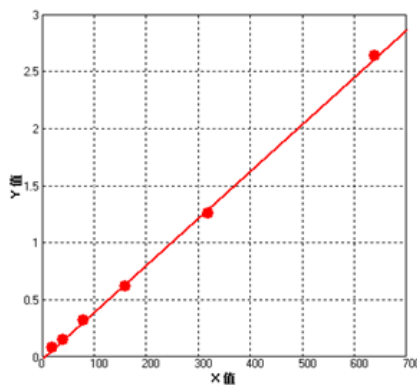
- 3、编号：将样品对应孔按序编号，每板应设阴性对照共计四孔、阳性对照每个梯度各两孔。其中阴性对照即您稀释待测样本及阳性对照的溶液，其中阳性对照即为表 1 中您梯度稀释的六管 HIV-1 p24 抗原。
- 4、将 25ul 裂解液加入到反应孔中。
- 5、将 75 μl 待测样品或对照品加入到反应孔中。
- 6、将 75 μl 酶结合物加入到反应孔中。振荡 30-60 秒混匀，置 37℃ 孵育 50 分钟。
- 7、洗板 5 次，拍干后每孔加入单组分 TMB 底物 100 μl/孔。置 37℃ 孵育 10 分钟。
- 8、加入终止液 50 μl/孔，振荡 30-60 秒混匀。
- 9、用酶标仪读数，波长 450nm(建议使用双波长酶标仪，参考波长 630nm)。

结果判定：

- 1、阴性对照的正常范围：正常情况下，阴性对照 OD 值应 $\leq 0.05$ 。
- 2、阳性对照的正常范围：正常情况下定量测定 160pg/ml 阳性对照 OD 值 $\geq 1.00$
- 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.

管号	HIV-1p24 抗原浓度 (pg/ml)	OD 值	OD 平均值	
1#	160 pg/ml	2.693	2.582	2.6375
2#	80 pg/ml	1.248	1.267	1.2575
3#	40 pg/ml	0.615	0.624	0.6195
4#	20 pg/ml	0.327	0.319	0.323
5#	10 pg/ml	0.149	0.15	0.1495
6#	5 pg/ml	0.076	0.078	0.077



NC1=0.013 NC2=0.012 NC3=0.012 NC4=0.011 NCx=0.012  
Cut off=0.012+0.02=0.032

## 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，余者应及时密封保存于冰箱中，已备后用（一般不超过 7 天）。
- 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、本试剂的使用单位必须是经当地卫生行政部门批准的 HIV 初筛实验室。
- 5、检测必须符合 HIV 实验室管理规范 and 生物安全守则的规定，严格防止交叉污染。操作时须带手套、穿工作服，严格健全和执行消毒隔离制度。所有样品、洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理，终止液为 2M 的硫酸，使用时必须注意安全。
- 6、加液时必须用加液器，并经常校对加液器的准确性。
- 7、洗涤时 若手动洗涤，各孔均需加 300ul 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。
- 8、操作应严格按说明书进行，不同批次试剂不得混用。
- 9、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。