

版本号 01

更新日期: 03/22/2024

产品说明书

**Lentivirus Titer p24 Kit Easy**

**Cat. No. L01019**

**For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.**

The operator should read the technical manual carefully before using this product.

# 目录

I. 产品描述 .....	2
II. 检测模式 .....	2
III. 试剂盒组份 .....	2
IV. 储存条件 .....	2
V. 实验所需但本试剂盒中未提供的材料或仪器 .....	3
VI. 注意事项 .....	3
VII. 样本收集与处理 .....	3
VIII. 实验步骤 .....	4
● 试剂准备 .....	4
● 实验步骤 .....	5
IX. 结果说明 .....	5
● 数据处理建议 .....	5
● 代表数据 .....	6
● 慢病毒物理滴度计算 .....	6
X. 分析性能 .....	7
● 检测灵敏度 .....	7
● 线性范围 .....	7
● 精密度验证 .....	7
● 钩状效应 (Hook效应) .....	8
XI. 常见问题 .....	8
XII. 附录 .....	9
● 可选购的配套产品 .....	9
● 检测板的选择 .....	9
● 参考文献 .....	9

## I. 产品描述

慢病毒载体 (Lentiviral vector, LV) 是一种重要的基因操作工具, 它能够将外源基因片段插入宿主细胞基因组并较长期表达目的基因, 被广泛应用于 CAR-T 基因治疗和药物研究领域。慢病毒载体是通过人免疫缺陷病毒(HIV-1)改造形成的, p24 蛋白是慢病毒外壳中含量最多的核心蛋白, 在慢病毒颗粒的包装和成熟过程中起重要作用, 缺失 p24 蛋白导致病毒颗粒无法正常组装。慢病毒滴度是指重组慢病毒颗粒数量或者感染单位, 能够决定靶细胞转导效率和整合的基因拷贝数。p24 蛋白含量是检测慢病毒物理滴度的常用方法。

Lentivirus Titer p24 Kit Easy 是一种通过检测 p24 蛋白含量, 计算慢病毒载体物理滴度的检测工具, 适用于慢病毒载体生产全流程样本, 检测范围为 40 – 320,000 pg/mL。

## II. 检测模式

Lentivirus Titer p24 Kit Easy 检测方案无需洗涤, 如图 1 所示仅需 30 分钟即可完成所有检测。

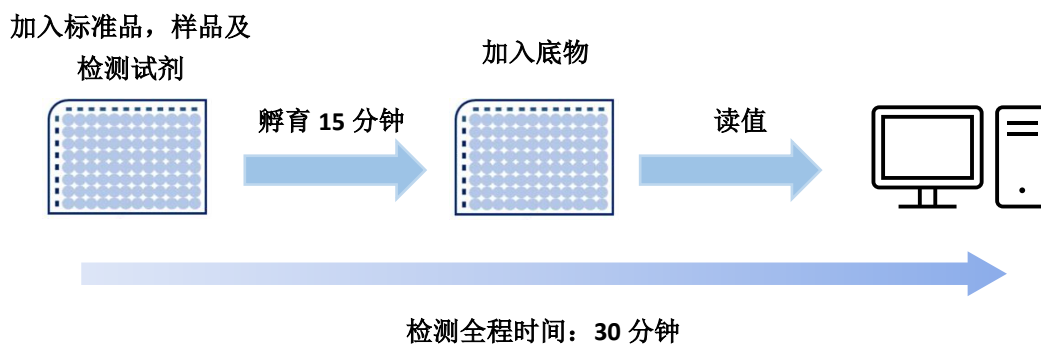


图 1. Lentivirus Titer p24 Kit Easy 检测示意图

## III. 试剂盒组份

本产品提供以下试剂 (表 1), 用于细胞上清中慢病毒载体 p24 蛋白的定量测定。

表 1. 试剂盒组份

组份	规格	组份编号
p24 标准品浓缩液	1 管 (0.1 mL)	U1-10
裂解液	1 管 (1.6 mL)	U1-A0
试剂 A, 1000×	1 管 (20 μL)	U1-20
试剂 B, 1000×	1 管 (20 μL)	U1-30
底物稀释液	2 管 (1.2 mL/管)	U1-40
发光底物	1 管 (50 μL)	U1-41

说明: p24 标准品浓缩液中含有 10 μg/mL 重组 p24 蛋白, 用于标准曲线配制。

## IV. 储存条件

未开封的完整试剂盒应置于 -20°C 条件下保存, 有效期 1 年。开封后的试剂盒, p24 标准品浓缩液和裂解液可置于 2-8°C 条件下保存至多 1 个月, 其余试剂均需置于 -20°C 条件下保存至多 1 个月, 避免反复冻融和污染, 冻融次数不可超过 5 次。稀释后的试剂即用即弃, 不可重复使用。

## V. 实验所需但本试剂盒中未提供的材料或仪器

- 可进行化学发光检测的微孔板读数仪/读板机/酶标仪
- 与检测仪器兼容的白色或黑色多孔检测板（例如金斯瑞，货号：D00042。其他检测板的具体选择指南参见 [附录I检测板的选择](#)）
- 分析稀释液（例如金斯瑞，货号：B00062。自行配制的具体配方参见 [实验步骤|试剂准备|配制分析稀释液](#)）
- 恒温箱
- 自动微孔板振荡器或恒温摇床
- 1  $\mu\text{L}$  - 1000  $\mu\text{L}$  移液器与配套枪头
- 稀释用试管
- 离心机
- 定时器
- 冰箱
- 计算机及分析软件

## VI. 注意事项

- 任何具有潜在传染性物质污染的材料都应作为感染性物质进行处理。
- 慢病毒样本含有潜在生物感染危险，需要遵循就职机构的生物安全指南进行操作。
- 吸入或溅到含有防腐剂的试剂可能引起中毒。避免皮肤、眼睛或衣服接触试剂。
- 发现试剂盒有任何明显损坏，请勿使用。
- 不要混合不同批次试剂盒的组份。
- 不要使用超过规定有效期的试剂。
- 在进行测定之前，所有试剂必须平衡至室温（20°- 25°C）。
- 一次实验仅取适量试剂，请勿将未使用完的试剂倒回试剂瓶中。
- 在使用试剂前通过瞬时离心将液体试剂聚集到试剂管的底部，开盖时避免液体溅出。
- 发光底物工作液需要在显色前配制，现配现用。

## VII. 样本收集与处理

- 当样品需要短期保存时，可将待测样品储存在-20°C或更低的温度下。避免反复冻融。
- 当样品需要长期保存时，测试者需要评估待测样品的稳定性。

## VIII. 实验步骤

### ● 试剂准备

所有试剂在使用前必须平衡至室温（20°C-25°C）。所有样品和试剂在使用前均应涡旋。使用后立即将所有试剂放回对应的储存温度。所有试剂和样品建议按复孔进行配制。

**配制分析稀释液：**推荐使用 Assay Dilution Buffer（金斯瑞，货号：B00062）。自行配制推荐配方为 1×PBS，10% FBS，1% Tween 20。

**配制 p24 标准品：**用离心机对 p24 标准品浓缩液进行瞬时离心。用分析稀释液将 p24 标准品浓缩液 10 µg/mL 稀释 31.25 倍至 320,000 pg/mL。例如，将 16 µL 的 p24 标准品浓缩液与 484 µL 分析稀释液混合，制成 500 µL 的浓度为 320,000 pg/mL 的 p24 蛋白标准品，标记为“Std1”。按表 2 所示依次配制以下 8 个 p24 蛋白标准品（320,000、80,000、20,000、5,000、1,000、200、40 和 0 pg/mL），用于建立标准曲线。

表 2. p24 蛋白标准品配制方案

标准品编号	终浓度 (pg/mL)	来源	来源体积 (µL)	稀释液体积 (µL)	终体积 (µL)
Std1	320,000	p24 标准品浓缩液	16	484	500
Std2	80,000	Std1	100	300	400
Std3	20,000	Std2	100	300	400
Std4	5,000	Std3	100	300	400
Std5	1,000	Std4	100	400	500
Std6	200	Std5	100	400	500
Std7	40	Std6	100	400	500
Std8	/	/	/	500	500

**配制 AB 混合工作液：**首先根据待测样本和标准品个数，计算出检测孔数量以及所需的 AB 混合工作液体积。例如，需要检测孔数量为 45 孔，每孔需要 80 µL 的 AB 混合工作液，考虑加样损耗，可适当增加配制体积 200 - 400 µL，即需要配制 AB 混合工作液体积为 80 µL/孔 × 45 孔 + 400 µL，总计 4000 µL。

试剂 A 和试剂 B 都需要 1000 倍稀释，需选择合适的体积的离心管，取 4 µL 的试剂 A，1000×，和 4 µL 的试剂 B，1000×，加入到 3992 µL 的分析稀释液中，得到 4000 µL 的 AB 混合工作液。

$$\text{AB 混合工作液体积} = \text{检测孔数量} \times 80 \mu\text{L} + 400 \mu\text{L}$$

$$\text{A 试剂或 B 试剂取量体积} = \frac{\text{AB 混合工作液体积}}{1000}$$

$$\text{AB 混合工作液} = \text{A 试剂} + \text{B 试剂} + \text{分析稀释液}$$

**稀释待测样品：**当对未知样本进行初次检测时，建议使用分析稀释液按 1:10 稀释待测样品，可设计多稀释度，使得稀释后的待测样品浓度至少有一个能在标准曲线的检测范围内。

**配制发光底物工作液：**根据待测样本和标准品的个数，计算出检测孔数量。按照每孔所需发光底物工作液 20  $\mu\text{L}$ ，计算出所需发光底物工作液的总体积。用发光底物和底物稀释液体积比为 1:50 进行稀释制备发光底物工作液。例如：检测孔 40 个，则需要 800  $\mu\text{L}$  的底物液，考虑加样损耗，可以配制 900  $\mu\text{L}$  底物液，取 900  $\mu\text{L}$  底物稀释液加入 18  $\mu\text{L}$  发光底物液，混匀。该工作液需要在显色前配制，现配现用。

**准备检测板：**根据待测样品和标准品数量拿取所需的检测板条，将检测板板条牢固卡入检测板框架中。所有样品按复孔检测，如表 3 所示。

表 3. 标准曲线及样品稀释设计

	标准品 (pg/mL)		待测样品									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	320,000	320,000										
<b>B</b>	80,000	80,000										
<b>C</b>	20,000	20,000										
<b>D</b>	5,000	5,000										
<b>E</b>	1,000	1,000										
<b>F</b>	200	200										
<b>G</b>	40	40										
<b>H</b>	0	0										

### ● 实验步骤

实验前试剂及待测样本恢复室温（20°C-25°C），标准品工作液和待检样本进行复孔测定。

1. 在检测板各孔中依次加入 10  $\mu\text{L}$  裂解液，40  $\mu\text{L}$  已配制的 p24 标准品或稀释后的待测样品，以及 80  $\mu\text{L}$  已配制的 AB 混合工作液；
2. 将检测板放置在微孔板上振荡器混匀 30 秒，25°C 恒温培养箱静置反应 15 分钟；
3. 在检测板各孔中加入配制的 20  $\mu\text{L}$  底物工作液，将检测板置于微孔板振荡器混匀 30 秒。
4. 用微孔板读数仪立即读取发光信号值 RLU。

## IX. 结果说明

### ● 数据处理建议

计算标准品和样品复孔的平均信号值。以标准品 Std1- Std7 浓度 (Std8 除外) 的对数为横坐标，信号值的对数为纵坐标绘制标准曲线。

多种绘图和统计学软件可以用于辅助绘制标准曲线并进行未知样本浓度的计算。四参数拟合法往往拟合效果较好，其它方法如线性拟合也可能获得较好拟合结果，需要根据具体实验数据进行分析。

● 代表数据

表 4 为标准曲线测试值，图 2 为根据该组数据使用四参数拟合绘制的标准曲线示例图。该组数据仅作为代表性标准曲线示例，不可将其用于未知样品的计算。针对每一次检测需要建立新的标准曲线，从而对实验样品中 p24 浓度进行插值计算。对于超出标准曲线浓度范围的样本，建议增加稀释倍数，重新复测。

表 4. p24 标准曲线测试值示例

p24 标准品 浓度 (pg/mL)	信号值 (RLU)			p24 标准品 回算浓度 (pg/ml)
	重复 1	重复 2	平均值	
320,000	4083000	3797000	3940000	319,999
80,000	1457000	1420000	1438500	80,008
20,000	429600	420800	425200	19,970
5,000	117500	119700	118600	5,053
1,000	24750	26280	25515	976
200	5414	6117	5765.5	183
40	1969	1893	1931	41
0	1076	1011	1043.5	/

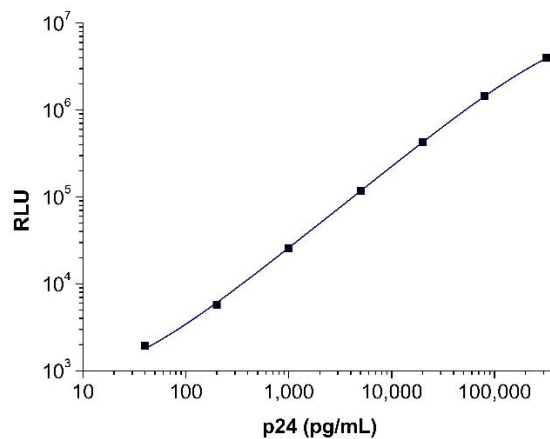


图 2. Lentivirus Titer p24 Kit Easy 的标准曲线示例图

● 慢病毒物理滴度计算

1. 将输出的 RLU 值，带入标准曲线方程式，得到 p24 蛋白测定浓度 (pg/mL)
2. 按以下公式计算慢病毒载体原液中 p24 蛋白量：

$$\text{p24 蛋白浓度 (pg/mL)} = \text{p24 蛋白的测定浓度 (pg/mL)} \times \text{待测样本稀释倍数}$$

3. 按下式计算慢病毒载体原液的物理滴度：

$$8 - 80 \text{ ng/mL} = 10^{8-9} \text{ LP/mL} = 10^6 \text{ TU/mL}$$

注：该公式基于每个慢病毒颗粒 (LP) 含有约 2,000 个 p24 分子。1 个 LP 颗粒包含  $2,000 \times 24 \times 10^3 / (6 \times 10^{23})$  g 的 p24 蛋白 (即  $8 \times 10^{-5}$  pg p24 蛋白) 或 1 ng 的 p24 蛋白相当于  $1.25 \times 10^7$  个 LP 颗粒<sup>[1-3]</sup>。对于慢病毒载体，1TU 单位约为 100 – 1,000 个 LP。结果是根据

p24 蛋白水平计算出的慢病毒的物理滴度。感染滴度效果与靶细胞系类型或转导方法有关。

## X. 分析性能

- **检测灵敏度**

根据 M10 法规推荐的评估方法<sup>[4]</sup>，LoQ 定量限 40 pg/mL。

- **线性范围**

根据 M10 生物分析方法验证及样品分析推荐<sup>[5]</sup>方法，建立线性范围 40 - 320,000 pg/mL。

表 5 是使用本试剂盒，计算的标准曲线的准确度和精密度。

表 5. 试剂盒标准曲线准确度及精密度测试结果

标准品	理论浓度 ng/mL	测值 1 ng/mL	测值 2 ng/mL	平均测值 ng/mL	CV	准确度 偏倚
Std1	320,000	319,491	326,826	323,159	2%	1%
Std2	80,000	79,481	75,652	77,566	3%	-3%
Std3	20,000	20,116	21,381	20,748	4%	4%
Std4	5,000	4,831	5,017	4,924	3%	-2%
Std5	1,000	998	992	995	0%	0%
Std6	200	209	194	201	5%	1%
Std7	40	41	38	40	6%	0%

- **精密度验证**

使用本试剂盒对低、中、高 3 个浓度水平的样本进行测试，每个样本各重复检测 10 次，每个样本计算 10 次测量浓度结果的变异系数（CV），表 6 为批内精密度验证结果。

表 6. 批内精密度验证结果

重复次数	平均测值 ng/mL	CV
10	286.75	3%
10	4.42	3%
10	0.13	4%

使用 3 个不同批次的本试剂盒分别对低、中、高 3 个浓度水平的样本进行测试，每个样本各重复检测 10 次，每个样本计算 30 次测量浓度结果的变异系数（CV），表 7 为批间精密度验证结果。

表 7. 三批次试剂盒批间精密度验证结果

批次数量	重复次数	平均测值 ng/mL	CV
3	3×10	263.81	9%
3	3×10	4.36	4%
3	3×10	0.12	11%



- 钩状效应 (Hook效应)

当样本浓度高至 500 - 750 ng/mL 区间, 如图 3 所示, 测试开始出现 HOOK 效应。

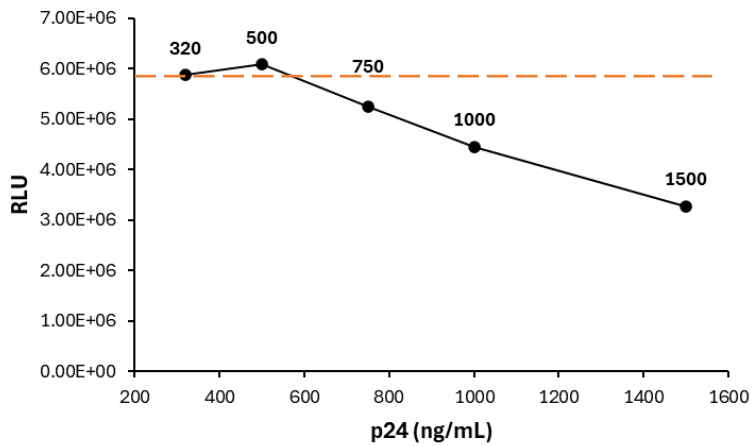


图 3. 试剂盒钩状效应验证结果

## XI. 常见问题

问题	原因	解决方法
精密度差	样品中发现颗粒物	测定前通过离心去除任何颗粒
信号弱	底物未添加或添加时间错误	按照说明书正确添加底物
	使用其他批次或来源的组份	仅使用批次特定的组份
	底物被污染	使用同一批次的新底物
	试剂体积不正确	按照手册中所述, 使用所需体积重复测定
	板未孵育适当的时间或温度	按照手册重复测定
	规定时间范围内未读板	5 分钟内读完
高背景	底物被污染	使用同一批次的新底物
	培养过程中孔的蒸发	在重复测定中使用板密封剂执行孵育步骤
	孵育时间和/或温度不正确	按照手册重复测定

## XII. 附录

- 可选购的配套产品

产品名	货号
Assay Dilution Buffer	B00062
96-well Low Binding White Microplates & Sealers	D00042

- 检测板的选择

本产品建议优先使用不透光的白色多孔检测板检测发光信号；

不透光的黑色多孔检测板亦可用于本测试，信号相比于白色多孔检测板低，低约一个数量级，但不影响样品浓度的回算；

底部透明但侧壁不透光的微孔板，若搭配本产品进行测试，需要在进行检测前，在微孔板底部贴一张白纸或白色封板膜以降低孔与孔之间光信号的交叉干扰；

不推荐使用全透明微孔板，透明的侧壁会使相邻孔之间造成信号干扰，影响输出准确值。

- 参考文献

1. Kahl C A, Marsh J, Fyffe J, et al. Human immunodeficiency virus type 1-derived lentivirus vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from Ross River virus and Semliki Forest virus[J]. *Journal of virology*, 2004, 78(3): 1421-1430.
2. White S M, Renda M, Nam N Y, et al. Lentivirus vectors using human and simian immunodeficiency virus elements[J]. *Journal of virology*, 1999, 73(4): 2832-2840.
3. Kafri T, van Praag H, Ouyang L, et al. A packaging cell line for lentivirus vectors[J]. *Journal of virology*, 1999, 73(1): 576-584.
4. CLSI document EP17-A2 (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures, 2nd Edition).
5. CLSI document EP06-A (Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline, 2nd Edition).

**For research use only. Not intended for human and animal therapeutic or diagnostic use.**

生产商：南京金斯瑞生物科技有限公司 江苏省南京市江宁区科学园雍熙路 28 号

Manufacturer: Nanjing GenScript Biotech Co., Ltd. No. 28 Yongxi Road, Jiangning District, Nanjing, Jiangsu, China