

京天成生物技术（北京）有限公司

AbMax BiotechnoLogy Co., LTD

北京市亦庄经济技术开发区科创十四街 99 号

汇龙森 18 号楼 2 单元 201B

Address: 99Kechuang 14th Street,BuiLding 18,

Unit 2,Suite 201B,BDA,Beijing,

China Zip:101111

TeL: 86-10-59755729, Fax: 86-10-59755718

E-maiL:info@antibodychina.com

Website: www.antibodychina.com

## HPV 45型抗原定量检测试剂盒 说明书

Cat#17-0120

试剂盒用于检测样本中HPV45-L1抗原的含量。

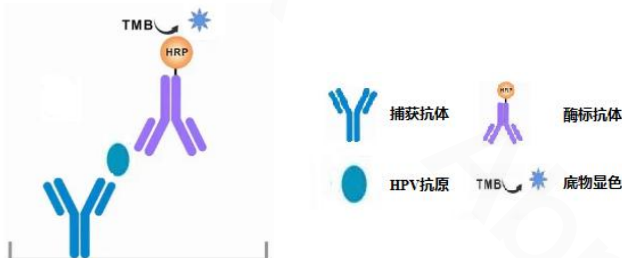
本产品仅供研究使用，不用于诊断用途。

## 目 录

1. 实验原理 .....	1
2. 使用须知 .....	1
3. 提供的材料与试剂 .....	1
4. 实验需要, 但是未提供的材料 .....	1
5. 贮藏条件与有效期 .....	1
6. 操作提示 .....	1
7. 试剂准备 .....	2
8. 参考品与样本准备 .....	2
9. 流程图 .....	2
10. 操作规程 .....	2
11. 结果处理 .....	3
12. 产品性能指标 .....	4
13. 问题及解决办法 .....	5

## 1. 实验原理

本品采用双抗体夹心法原理，用一株HPV45-L1单克隆中和活性抗体包被酶联反应板，加入待检样本反应后，洗涤除去未结合物，再加入HRP标记的另一株HPV45-L1单克隆中和活性抗体，形成了包被抗体-抗原-HRP抗体复合物，通过TMB显色程度指示待检疫苗生产中间产物、原液 (Drug Substance) 和9价HPV疫苗混合液 (加佐剂前) 中活性HPV45-L1抗原的含量。



## 2. 使用须知

在开始试验前请仔细阅读本说明书。

- 遵守良好的实验室规范：手套、白大褂和防护眼镜应该一直戴着，请勿在实验室区域内进食、饮水或吸烟。
- 所有生物材料都应被视为具有潜在危险并予以处理，应按照既定的安全程序进行处置。
- 请勿混合或替代其他试剂盒批次或供应商的试剂或材料，如果替代则不能保证性能。

## 3. 提供的材料与试剂

试剂盒内组分	数量	保存条件
预包被板	8孔×12条	2~8°C
酶结合物 (500×)	100μL×1管	-20°C
单组分显色液II	11mL×1瓶	2~8°C
终止液	7mL×1瓶	2~8°C
BSA	3g/袋×2袋	2~8°C
HRP酶标抗体稀释液	12mL×1瓶	2~8°C
20×PBST	50mL×1瓶	2~8°C
封板膜	2张	2~8°C/室温
说明书	1份	2~8°C/室温

## 4. 实验需要，但是未提供的材料

这些材料不包括在试剂盒中，但检测过程中需要用到：

- 1) HPV45原液参考品
  - 2) HPV45原液企业参考品
  - 3) 9价HPV混合液企业参考品 (可选)
- 酶标仪，去离子水，多通道和单通道移液器，稀释管，震荡孵育器。

## 5. 贮藏条件与有效期

- 酶结合物 (500×)，-15~-25°C保存，其他组分2~8°C避光保存。
- 有效期6个月截至2024年01月29日。

## 6. 操作提示

- 在配液或加样时，尽量避免产生气泡。
- 及时更换枪头，避免样本或试剂的交叉污染。
- 确保酶标板在孵育过程中用封板膜覆盖。

- 所有样本应充分且轻微震荡混匀。
- 在所有孵育步骤中，应在震荡孵育器上孵育ELISA板。

## 7. 试剂准备

- 平衡：将所需试剂移到室温（18~25℃）平衡30分钟。
- 20×PBST可能含有沉淀，这是正常的。如果通过温和搅拌没有溶解沉淀物，可以在37℃烘箱中加热来溶解沉淀物，待完全溶解后再使用。

### 7.1 1×PBST配制

取1瓶20×PBST，用去离子水稀释至1000mL，混匀后备用。配液量可根据实验需要调整，现用现配。

### 7.2 5%BSA稀释液配制

准确称取5.0g BSA完全溶解到100mL1×PBST中，充分混匀备用即为5%BSA稀释液。

配液量可根据实验需要调整，现用现配。

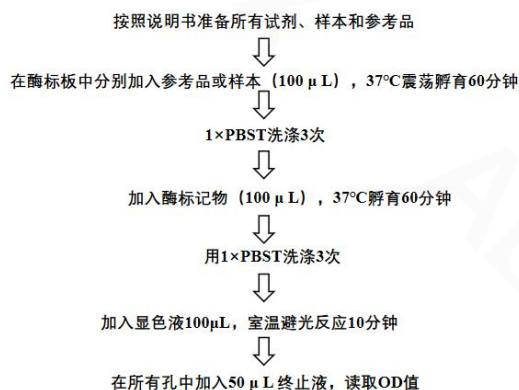
### 7.3 酶结合物工作液配制

计算实验所需工作液体积，取适量酶结合物（500×）用HRP酶标抗体稀释液100倍稀释，然后再进行5倍稀释，充分混匀备用。

## 8. 参考品与样本准备

- 使用5%BSA稀释液配制不同浓度参考品（2倍梯度稀释）：4000ng/mL、2000ng/mL、1000ng/mL、500ng/mL、250ng/mL、125ng/mL、62.5ng/mL、31.25ng/mL、15.625ng/mL、7.8125ng/mL、3.9ng/mL、0ng/mL（5%BSA稀释液）。
- 使用5%BSA稀释液将待检样本分别稀释至标曲线性范围内进行检测，若是待检样本浓度未知，可进行10倍、30倍、100倍、300倍和1000倍梯度稀释后检测上样，选择在标曲范围内的OD值反算样本浓度即为测得值（ng/mL），最后样本浓度应在测得值的基础上再乘以样本稀释倍数。
- 每次使用前都要准备新的参考品与样本，使用后的参考品与样本应丢弃。

## 9. 流程图



## 10. 操作规程

- 按照前面章节的要求准备所有试剂、参考品与样本。
- 该酶标板随时可用，使用前没有必要冲洗。

### 10.1 加样

将所有的参考品与样本分别加入到酶标板上，做好标记，每孔加样本100μL（设复孔），用封板膜封板后置37℃恒温震荡培养箱，300rpm，温育60分钟。

### 10.2 洗涤

弃去各孔内液体，用1×PBST注满微孔（350μL/孔），静置30秒后弃去孔内液体，重复3次，最后一次洗板完成后在

面巾纸上轻轻拍干。

### 10.3 加酶结合物

每孔加酶结合物工作液100 $\mu$ L，用新的封板膜封板后置37 $^{\circ}$ C恒温震荡培养箱，300rpm，温育60分钟。

### 10.4 洗涤

重复步骤10.2.

### 10.5 显色

每孔加单组分显色液100 $\mu$ L，轻微振荡混匀后置室温（25 $^{\circ}$ C左右）暗处显色10分钟。

### 10.6 终止

每孔加终止液50 $\mu$ L，轻微混匀。

### 10.7 读数

选择酶标仪主波长450nm，参考波长630nm，测定各孔吸光值（OD值=OD<sub>450</sub>-OD<sub>630</sub>）。

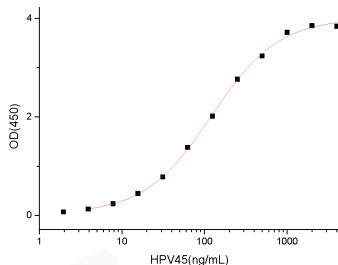
## 11. 结果处理

### 11.1 标准曲线

计算参考品的OD均值（见下例，仅为示例，具体以实际测定为准）：

标曲ng/mL	OD值1	OD值2	OD均值
4000	3.720	3.96	3.840
2000	3.881	3.823	3.852
1000	3.628	3.799	3.714
500	3.338	3.133	3.236
250	2.759	2.770	2.765
125	2.057	1.972	2.015
62.5	1.338	1.421	1.380
31.25	0.765	0.795	0.780
15.625	0.447	0.442	0.445
7.8125	0.243	0.231	0.237
3.90625	0.125	0.131	0.128
NC	0.016	0.012	0.014

以标准曲线浓度与对应OD均值采用四参数拟合方式进拟合及计算，得到标准曲线，如下图所示，四参数拟合方程为： $y = 4.00641 - 3.98098/[1 + (x/120.55552)^{1.06357}]$ 。



四参数拟合标准曲线（线性相关系数 $R^2=0.99909$ ）

### 11.2 样本浓度的计算

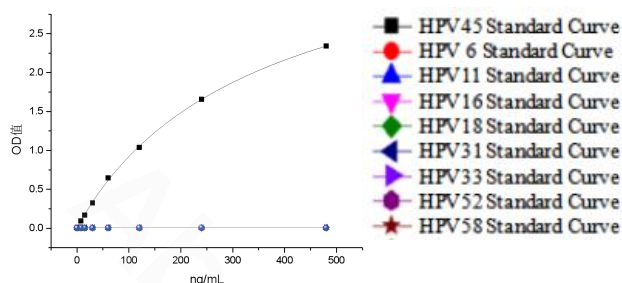
选择在标曲范围内的OD值反算样本浓度，即为样本测得值（ng/mL），在测得值的基础上再乘以样本稀释倍数即为样本浓度。若是样本检测OD值超过定量上限（480ng/mL）的OD值，需要增大样本稀释倍数再次测试。

## 12. 产品性能指标

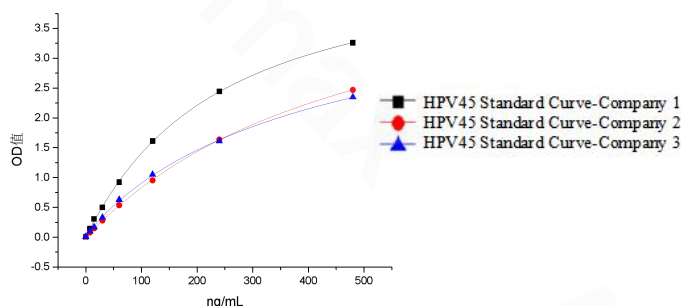
- 线性范围：3.9~4000ng/mL。
- 灵敏度：<3.9ng/mL。
- 准确性与精密度：高中低3个浓度质控点回收率均在80%~120%范围内，符合要求；CV (%) ≤10%，符合要求。

准确性/精密度	准确性 (回收率%)			精密度 (CV%)		
	实验 1	实验 2	实验 3	实验 1	实验 2	实验 3
HQC-400ng/mL	101%	98%	90%	2.84%	2.02%	3.36%
MQC-100ng/mL	105%	100%	102%	1.27%	3.48%	2.34%
LQC-20ng/mL	94%	106%	105%	3.93%	3.01%	2.41%

- HOOK效应：使用高于4000ng/mL HPV45参考品测试，信号值未出现降低，无HOOK效应。
- 稀释线性：选择高于4000ng/mL的参考品稀释至标曲线性范围内（400ng/mL、100ng/mL、20ng/mL），计算准确性，偏差在80%~120%范围内。
- 特异性：与HPV6、11、16、18、31、33、52、58 8种其他HPV亚型无明显交叉。



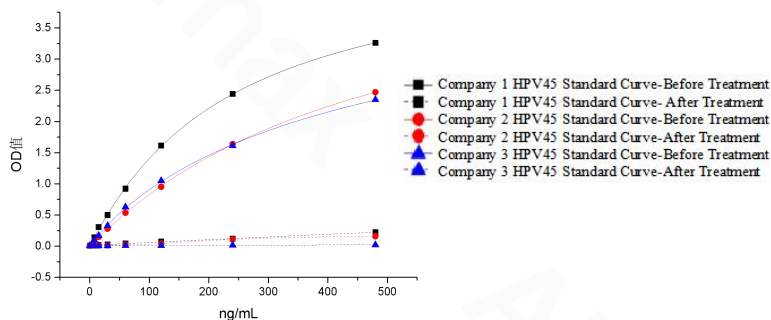
- 广谱性：与3家以上不同公司不同表达体系的HPV45均有结合。



- 适用性：可用于检测HPV45单价原液和9价HPV混合液（加佐剂前）中活性HPV45抗原含量。与HPV45外的其他8个HPV亚型混合疫苗无交叉，总交叉率为0。9价混合液中HPV45的检出OD值与单价检出OD值结果接近，标曲基本重合，可用于九价HPV中HPV45的检出。

样品	单价-HPV45				8价混合-HPV6、11、31、33、52、16、18、58				9价混合-HPV6、11、31、33、45、52、16、18、58			
	OD1	OD2	OD 均值	P/N	OD1	OD2	OD 均值	P/N	OD1	OD2	OD 均值	P/N
480	1.838	1.818	1.828	203.11	0.009	0.008	0.009	1.00	1.818	1.81	1.814	213.41
240	1.152	1.145	1.149	127.61	0.008	0.008	0.008	0.94	1.105	1.127	1.116	131.29
120	0.699	0.642	0.671	74.50	0.008	0.007	0.008	0.88	0.61	0.626	0.618	72.71
60	0.353	0.356	0.355	39.39	0.008	0.008	0.008	0.94	0.352	0.354	0.353	41.53
30	0.197	0.194	0.196	21.72	0.007	0.008	0.008	0.88	0.194	0.206	0.2	23.53
15	0.115	0.11	0.113	12.50	0.009	0.008	0.009	1.00	0.097	0.103	0.1	11.76
7.5	0.064	0.065	0.065	7.17	0.008	0.007	0.008	0.88	0.062	0.058	0.06	7.06
NC	0.009	0.009	0.009	1.00	0.008	0.009	0.009	1.00	0.008	0.009	0.009	1.00

- 疫苗破坏处理：3家公司HPV45原液经56°C30min破坏处理后，与未处理的对比，信号均出现降低，该试剂盒可以反映HPV原液是否失活。



### 13. 问题及解决办法

问题	原因	解决办法
标曲线性较差	标曲稀释不当	检查吸管，使用校正后的移液器，规范操作，重新稀释。
信号值低	孵育时间短	确保足够的孵育时间。
	试剂量不足或稀释不当	检查移液管，确保试剂准备正确充足。
	显色液长期曝光	显色液应避光保存，更换新的显色液。
CV值较大	洗涤不充分	按照洗涤步骤严格操作。
	洗涤液被污染	更换新的洗液。
灵敏度不足	酶联免疫吸附试验试剂盒储存不当	按照说明书要求保存。
稀释液中有结晶	稀释剂中组分的沉淀和/或凝固。	将稀释剂加热至37°C完全溶解沉淀物。