

TransLv™ AAV qPCR Titration Kit

腺相关病毒滴度检测试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

目录号: FV301

保存: -18℃及其以下保存两年。

产品说明

TransLv™ AAV qPCR Titration Kit提供了一种利用qPCR方法检测腺相关病毒滴度的方法。本产品基于荧光探针定量PCR原理,检测来源于AAV2的ITR序列。若制备的病毒粒子中的病毒基因组ITR区域来源于AAV2,无论哪一种血清型均可使用本试剂盒进行检测。该方法简单快速、灵敏高效,通过标准曲线可得到病毒拷贝数,并通过计算确定AAV滴度。此外,本产品还引入了dUTP和UDG系统,用来消除PCR产物导致的交叉污染。

特点

- 操作简单、灵敏度高。
- 可在1.5小时内完成病毒滴度检测。
- 包含病毒基因组提取试剂和qPCR扩增试剂。
- 检测范围广,标准曲线具有良好的线性关系。

试剂盒组成

Component	FV301-01 (100 rxns)
10×DNaseI Buffer	100 μL
DNaseI	100 μL
AAV Lysis Buffer	1 mL
2×AAV SuperMix	1.25 mL
25×AAV引物探针混合液	100 μL
AAV定量参考品 (1.23×10^8 copies/μL)	50 μL
50×Universal Passive Reference Dye	50 μL
DNA稀释液	3×1 mL
无核酸酶的水	1 mL

实验步骤

1、外源DNA消化

AAV病毒液可通过收集AAV包装细胞及其上清,并经过冻融法或超声破碎法或细胞裂解液处理得到。

使用DNase I处理病毒颗粒,去除AAV病毒液中残留的背景细胞基因组和质粒DNA。

(1) 外源消化反应体系

组分名称	组分用量/μL
10×DNase I Buffer	1
DNase I	1
AAV病毒液	8
总计	10

(2) 外源消化反应程序

温度	时间
37℃	10 min
65℃	10 min



2、病毒基因组提取

使用AAV Lysis Buffer裂解病毒颗粒，释放病毒基因组。提取后的AAV病毒基因组DNA于-20℃保存。

(1) 提取反应体系

组分名称	组分用量/ μL
AAV Lysis Buffer	10
步骤1中消化后的产物	10
总计	20

(2) 提取反应程序

温度	时间
25℃	10 min

3、qPCR扩增

(1) 定量参考品的稀释：

取干净1.5 mL离心管6支，标为S1、S2、S3、S4、S5和S6，每管中加入90 μL DNA稀释液。从AAV定量参考品中取10 μL 加至S1中，振荡混匀并瞬时离心。再从S1中取10 μL 至S2中，以此类推重复上述步骤进行10倍梯度稀释。

S1-S6浓度如下：

稀释管	S1	S2	S3	S4	S5	S6
copies/ μL	1.23×10^7	1.23×10^6	1.23×10^5	1.23×10^4	1.23×10^3	1.23×10^2

(2) **qPCR工作液配制**：将扩增试剂平衡至室温，振荡混匀后备用，整个过程中避免被光源直射。根据所检测的样品数量按照下表配制反应液，建议每次检测均设置阴性对照。待检样品数为n时，需配制反应体系数N=【待检样品数(n)+标准曲线样品(6)+阴性对照NTC (1)】 $\times$ 重复孔数+1。

反应体系：

组分名称	组分用量/ μL
2 $\times$ AAV SuperMix	12.5*N
25 $\times$ AAV引物探针混合液	1*N
无核酸酶的水	6.5*N
总计	20*N

使用50 $\times$ Universal Passive Reference Dye时的反应体系：

组分名称	组分用量/ μL
2 $\times$ AAV SuperMix	12.5*N
25 $\times$ AAV引物探针混合液	1*N
无核酸酶的水	6*N
50 $\times$ Universal Passive Reference Dye	0.5*N
总计	20*N

(3) 加样：

提取后的AAV病毒基因组DNA浓度偏高，为确保待测样品在标曲范围内，推荐使用DNA稀释液将AAV病毒基因组DNA稀释100倍后再进行加样。

若稀释100倍后浓度仍偏高，可稀释更高倍数，在后续计算数据时调整计算公式即可。

向每个PCR管中分装加入上一步准备好的qPCR工作液20 μL ，并在相应孔中按顺序分别添加5 μL 模板：阴性对照NTC（水）、待测样品（稀释后的AAV病毒基因组DNA）、标准曲线样品(S1-S6)。建议以上三类样品在反应孔设计布板时分区放置，以免互相污染，导致测试结果不准确。盖上管盖或使用光学膜封闭后，轻柔振荡混匀，瞬时离心使液体全部沉于管底。



(4) qPCR扩增:

a. 荧光通道选择

选择FAM通道 (Reporter: FAM, Quencher : none) 检测AAV;

使用50×Universal Passive Reference Dye时, 可将参比荧光 (Passive Reference) 设置为ROX, 反之设置为none。

设置反应体系为25 μ L。

b. 反应程序

温度	时长	循环
95°C	5 min	1
95°C	5 s	40
60°C (荧光采集: FAM)	30 s	

(5) 结果分析:

在结果分析软件中, 将相应反应孔的样品类型分别设置为NTC (阴性对照)、Unknown (待测样品)以及Standard (标准曲线样品S1-S6), 并对Standard样品的浓度赋值(单位为copies/ μ L)。设置完成后运行分析, 软件自动生成标准曲线与扩增曲线以及相应数值。生成的标准曲线相关系数R²应不低于0.99, 斜率应位于-3.1~-3.6之间 (表示扩增效率位于90%~110%之间)。NTC (阴性对照) 样品Ct值应为无显示或 ≥ 38 。

标准曲线需要进行调整时, 可参照以下原则:

·根据复孔间 Ct 值差异 ≤ 0.3 的原则, 可对DNA Standards原始Ct值进行过滤。

·NTC阴性对照应比标准曲线最低浓度Ct值大。

·结果分析的参数设置需依据具体的机型和软件版本, 一般由仪器自动判读。但有时系统给出的阈值线离基线太近, 导致复孔之间Ct值相差甚远, 可手动调节阈值线至合适位置。此时可初步查看扩增曲线形态和扩增效率是否正常, 再进行数据分析。

(6) 病毒滴度计算:

按照本说明书中的实验步骤的的滴度计算公式如下, 可根据实验具体情况调整计算方法。

稀释系数=1.25 (外源DNA消化时稀释倍数) $\times$ 2 (提取病毒DNA时稀释倍数) $\times$ 100 (qPCR前将样品稀释100倍)

病毒滴度 (GC/mL) = 稀释系数 $\times$ 1000 (μ L to mL) $\times$ 2 (dsDNA to ssDNA) $\times$ 标曲测定的拷贝数 (copies/ μ L)

性能指标

详见试剂盒性能验证报告

本产品适用机型

可选Universal Passive Reference Dye参比染料的机型:

ABI系列机型: ABI Prism7000/7300/7700/7900, ABI Step One, ABI 7900HT, ABI 7900HT Fast; ABI Prism 7500, ABI Prism 7500 Fast, ABI QuantStudio Dx/3/5, ABI QuantStudio 6/7/12K Flex, ABI ViiA7, Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000等。

无需Universal Passive Reference Dye参比染料的机型:

包括但不限于Bio-Rad CFX系列, 博日LineGene 9600 Plus, Bio-Rad iCycler iQ, Qiagen Corbrtt Rotor-Gene 6000, Slan-96p等。

注意事项

- 本产品仅用于科研使用, 使用前请仔细阅读本说明书。
- 实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项, 对每次实验进行质量控制。
- 实验室管理需严格遵照PCR基因扩增实验室的管理规范, 实验人员必须进行专业培训, 实验过程严格分区进行, 所有消耗品仅作一次性使用, 实验操作的每个阶段使用专用仪器和设备, 各区各阶段用品不可交叉使用。所有检测样品均视为具有传染性的物质, 实验过程中穿工作服并经常更换手套, 以避免样品间的交叉污染; 样品操作、废弃物处理应符合相关法规要求: 《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
- 所有试剂使用前均需彻底化冻、混匀。

本产品仅供研究, 不用于临床诊断。

版本号: V1-20241220

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

