



AAV滴度试剂盒

货 号: GC231000498

规 格

储存条件: -20℃保存12个月

50nx / 100rnx

【产品概述】

本AAV滴度测定试剂盒使用SYBR green法测定AAV病毒中含有目的基因元件组的颗粒数。测定原理为通过对AAV基因组中的ITR序列测定确定AAV颗粒数，计算出AAV滴度 (vg/ml)。

【产品组成】

试剂名称	内容	数量
Solution-1	DNA标准质粒 (2×10^9 copies/ μ l)	100 μ L
Solution-2	Fwd ITR primer (10 μ mol)	50 μ L
Solution-3	Rev ITR primer (10 μ mol)	50 μ L
Solution-4	Universal SYBR Master Mix 2X	500 μ L
Solution-5	DNase I (RNase Free)	30 μ L
Solution-6	10 $\times$ DNase Buffer	200 μ L

【所需其他材料及仪器】

序号	内容
1	DNase, RNase Free Water
2	RNase-Free 枪头/离心管
3	移液器 (可选, 强烈推荐使用时多通道移液器)
4	金属浴或PCR仪
5	RNase-Free DNase
6	q-PCR仪

【一般性原则】

1. 标准品或样品至少要做一个复孔。
2. 如果条件允许, 以已知滴度的AAV作为参考样本。参考样本的滴度与被检测样品的预期滴度不应超过一个数量级。
3. 必须做一个无模板对照(NTC), 即master mix+水。
4. 尽可能使用精确的多通道移液器进行实验, 以减少误差。

[基因修饰细胞 \(敲除、敲入、点突变\)](#) [基础实验服务 \(动物实验、载体构建\)](#)[病毒包装 \(慢病毒、非整合慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、病毒样颗粒蛋白、脂质体纳米颗粒\)](#)[试剂 \(常规试剂、感受态、基因敲除敲入点突变试剂盒、滴度检测试剂盒\)](#)

5.在每一步使用移液枪反复吹打来混匀体系。

【试剂准备】

反应体系预混:计算样品的数量(n), 并准备10个标曲预混体系用量的试剂, 为防止反应孔添加的预混液不足, 应配制n+12~14个样品的预混液。每个样品含有15 μ L的成份一致的预混液。

试剂	单个反应体系用量	终浓度	96孔板用量 (100次反应)
Universal SYBR Master Mix 2X	10 μ L	1X	1000 μ L
Fwd ITR primer	0.4 μ L	0.2 μ M	40 μ L
Rev ITR prime	0.4 μ L	0.2 μ M	40 μ L
Nuclease Free Water	4.2 μ L	/	420 μ L
Total	20 μ L		1500 μ L

*注意:

1.Universal SYBR其中含有高质量的DNA聚合酶和dTTP/dUTP, 以最大限度地减少外部污染的干扰。反应体系还应包含一个内部被动参考(通常为ROX染料), 以标准化与pcr无关的荧光扰动, 并尽量减少由移液误差和样品蒸发各种原因引起的孔间差异(视PCR仪器而定, 可选)。

2.将所有样品加入到qPCR板的样品孔后, 再加入反应体系。建议将除模板外的体系组分提前预混以减少误差, 首先加入水, 然后加入SYBR, 之后是正向引物和反向引物。使用前短暂涡旋混匀。

3.使用储液器和多通道移液管将预混液加入孔中。

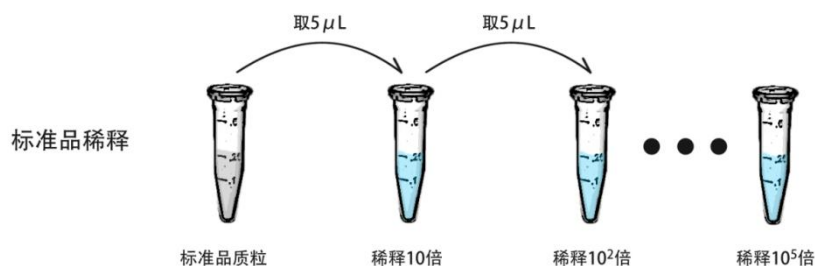
【实验步骤】

*注意: 实验开始前务必仔细阅读操作步骤。

以下步骤以浓缩的AAV为例, 简述本试剂盒的测定方法, q-PCR所得数据可经客户计算, 得到最终滴度。q-PCR的灵敏性高, 请尽量确保实验环境和所用试剂耗材无DNA和DNase污染。

1.标准曲线测定, 本试剂盒中的DNA标准质粒经ddPCR精确定量拷贝数, 浓度为 2×10^9 copies/ μ L。按下图表, 梯度稀释DNA标准质粒。

编号	标准品			
	总稀释倍数	超纯水	标准品	Copies/ μ L
#1	10 ¹ X	45 μ L	5 μ L DNA标品	2 $\times 10^8$
#2	10 ² X	45 μ L	5 μ L #1	2 $\times 10^7$
#3	10 ³ X	45 μ L	5 μ L #2	2 $\times 10^6$
#4	10 ⁴ X	45 μ L	5 μ L #3	2 $\times 10^5$
#5	10 ⁵ X	45 μ L	5 μ L #4	2 $\times 10^4$



*建议:

1.获得经过验证的标准曲线后, 将每个梯度的标准标准样品分装(足够做1到2个新曲线), 存储于-20°C。一旦拿出解冻后

[基因修饰细胞\(敲除、敲入、点突变\)](#) [基础实验服务\(动物实验、载体构建\)](#)

[病毒包装\(慢病毒、非整合慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、病毒样颗粒蛋白、脂质体纳米颗粒\)](#)

[试剂\(常规试剂、感受态、基因敲除敲入点突变试剂盒、滴度检测试剂盒\)](#)



，请不要再将其冻结，请于4°C下存储，并在1周内使用完毕。

2. 注意关注后续标准曲线每个梯度标准质粒对应的CT值，其误差范围不应超过首次Ct值 ± 0.5 。如果标准曲线的CT值开始漂移，则应用原管DNA标准曲线重新梯度稀释。

2. 样品处理：用DNase I处理纯化的AAV样品，以消除包装病毒过程中携带的任何质粒DNA的污染（DNase不会穿透病毒体）。

a. 5 μ L AAV病毒浓缩液 + 39 μ L H₂O + 5 μ L 10x DNase buffer + 1 μ L DNase

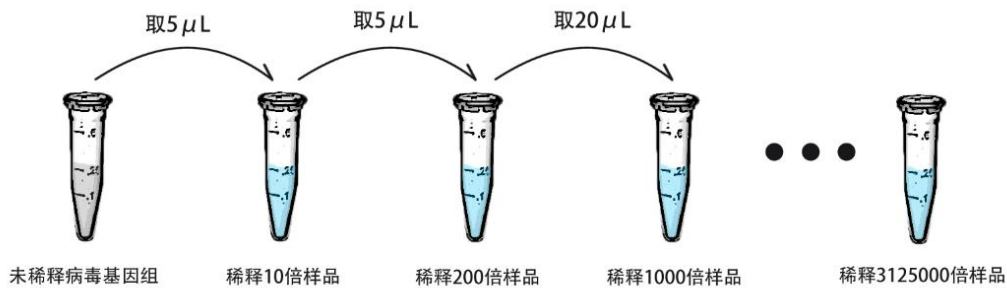
b. 轻轻混合样品(不要涡旋震荡)

c. 37°C 孵育30分钟

d. 转移至冰上

*注意：切勿向标准质粒样品中加入DNase!

2. 根据下表中的稀释方案稀释DNase处理的AAV样品。



编号	标准品			
	样本体积	无核酶水体积	稀释倍数	总稀释倍数
#1 (DNase step)	5 μ L AAV	45 μ L	10X	10X
#2	5 μ L #1	95 μ L	20X	200X
#3	20 μ L #2	80 μ L	5X	1000X
#4	20 μ L #3	80 μ L	5X	5000X
#5	20 μ L #4	80 μ L	5X	25000X
#6	20 μ L #5	80 μ L	5X	125000X
#7	20 μ L #6	80 μ L	5X	625000X
#8	20 μ L #7	80 μ L	5X	3125000X

整个梯度稀释过程中，需使用移液枪反复吹打，充分混匀各管溶液。

绿色突出显示是大多数待测样上样使用的稀释样品。

如果样品的滴度 $< 1 \times 10^{12}$ vg/ml，请使用3-6；

如果样品的滴度 $> 3 \times 10^{13}$ vg/ml，请使用稀释液5-8。

*注意：

1. 样品通常范围从 1×10^{12} vg/mL到 $> 2 \times 10^{13}$ vg/mL。我们建议您使用的已知滴度的参照病毒滴度与预期滴度属于同一数量级。

样品稀释的质量至关重要。确保在每次稀释时使用最终体积的至少一半体积的移液器至少反复吹打混匀10次以上（如果您的最终体积为100 μ L，则使用最小50 μ L混合）

使用多通道移液器将标准品和样品加载到qPCR板上。

4. 按以下图表配置q-PCR反应体系，每个样品孔有一个复孔对照。

设置并加样，96孔板或8连管：

[基因修饰细胞（敲除、敲入、点突变）](#) [基础实验服务（动物实验、载体构建）](#)

[病毒包装（慢病毒、非整合慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、病毒样颗粒蛋白、脂质体纳米颗粒）](#)

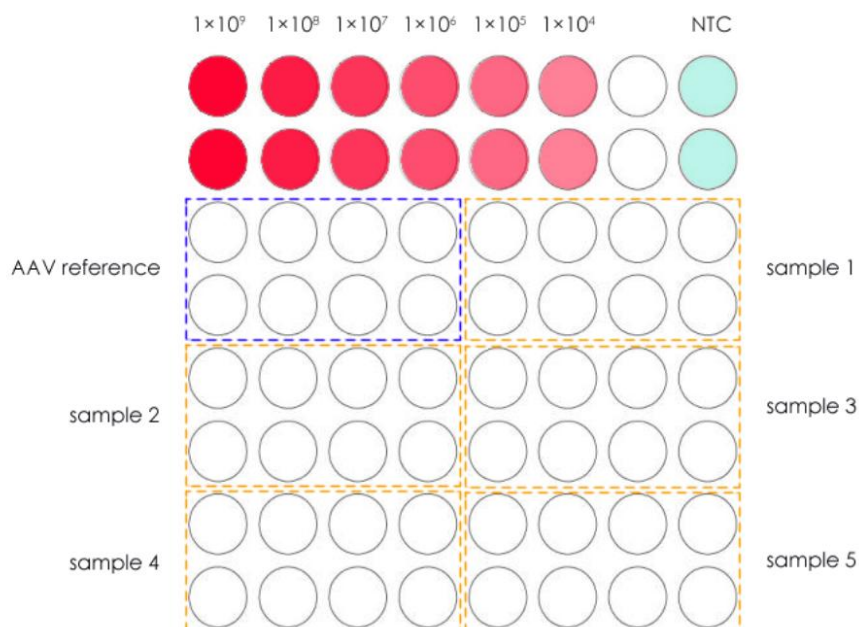
[试剂（常规试剂、感受态、基因敲除敲入点突变试剂盒、滴度检测试剂盒）](#)

每个浓度梯度的标准样品添加一个复孔，每个样本添加一个复孔（NTC=预混液+水）。

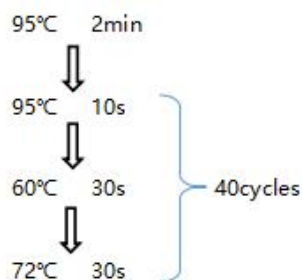
每孔加入15 μ l的预混液，并用移液枪反复吹打至少5次来混合。

96板使用透明膜密封，8连管使用适配的盖子密封。

在3000 rpm离心2分钟，将样品离心到管的底部。



在qPCR仪器中运行以下程序：



6.标准曲线绘制和AAV滴度计算：

使用仪器软件进行数据分析，根据标准曲线和样品稀释度确定样品的AAV病毒基因组滴度vg/mL。

通过以下控制点检查确保qPCR是有效的：

标准曲线： R^2 (相关系数)应大于0.99，E (PCR扩增效率)~100%(90%~110%范围可接受)

基线删除：所有样品会有一些少量的背景信号，最明显的是在初始PCR循环。为了准确地确定样本之间的差异，必须去除这个背景信号。

熔体曲线分析：应该看到一个单峰。在~70-75°C的温度下出现第二个峰通常表明引物二聚体的存在，它可以增加背景信号并改变样品的Ct值。

[基因修饰细胞（敲除、敲入、点突变）](#) [基础实验服务（动物实验、载体构建）](#)

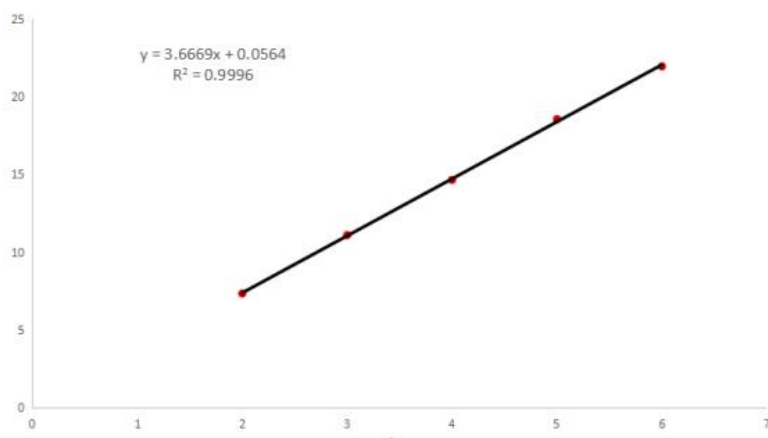
[病毒包装（慢病毒、非整合慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、病毒样颗粒蛋白、脂质体纳米颗粒）](#)

[试剂（常规试剂、感受态、基因敲除敲入点突变试剂盒、滴度检测试剂盒）](#)



标准曲线:应该使用对你有意义的差异稀释Ct值(10倍稀释约为Ct值为3.3的差值)。

重复数据的质量:如果重复数据之间的差异超过0.5, 则从分析中排除重复数据。



样品滴度为各样品滴度计算结果的算术平均数。

【引用文献】

Aurnhammer C, Haase M, Muether N, Hausl M, Rauschhuber C, Huber I, Nitschko H, Busch U, Sing A, Ehrhardt A, Baiker A. Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. Hum Gene Ther Methods. 2012 Feb;23(1):18-28. PMID: 22428977



- 扫码关注基恩科生物公众号获得更多资讯
- Website www.genecarer.com
- Service hotline 029-84613682

[基因修饰细胞 \(敲除、敲入、点突变\)](#) [基础实验服务 \(动物实验、载体构建\)](#)

[病毒包装 \(慢病毒、非整合慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、病毒样颗粒蛋白、脂质体纳米颗粒\)](#)

[试剂 \(常规试剂、感受态、基因敲除敲入点突变试剂盒、滴度检测试剂盒\)](#)