



慢病毒滴度试剂盒

目录

储存条件：-20°C保存12个月

货号 GC230100531 规格 50RNX

【产品概述】

本产品可以对慢病毒包装系统含有WPRE元件的慢病毒进行有效滴度TU (Transducing Units) 的测定。测定原理为通过对感染慢病毒的细胞基因组 DNA 中整合的慢病毒插入片段拷贝数进行Q-PCR 测定，计算出初始病毒的有效滴度。

【产品组成】

试剂名称	内容	数量
Solution-1	DNA标准质粒 (3.85*10 ⁹ copies/μl)	100μL
Solution-2	WPRE Primer F (10μmol)	50μL
Solution-3	WPRE Primer R (10μmol)	50μL
Solution-4	WPRE probe (10μmol)	55μL
Solution-5	Probe qPCR premix (Universal) 2X	1000μL

【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, 以已知滴度的慢病毒作为参考样本。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。
- 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16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11.3 μL的成份一致的预混液体系。

试剂	单个反应体系用量	终浓度	96孔板用量 (100次反应)
Probe qPCR premix (Universal) 2X	10μL	/	1000μL
WPRE Primer F	0.4μL	0.2μM	40μL
WPRE Primer R	0.4μL	0.2μM	40μL
WPRE probe	0.5μL	0.25μM	50μL
Total	11.3μL		1130μL

*注意:

1. Probe qPCR premix (Universal)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Probe qPCR premix, 之后是正向引物和反向引物, 最后加入。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】

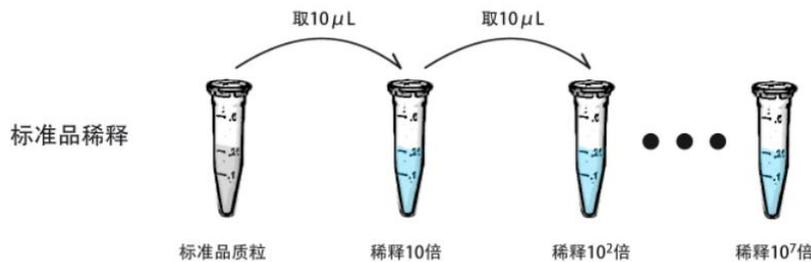
*注意: 实验开始前务必仔细阅读操作步骤。

以下步骤以感染慢病毒的293T细胞为例, 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的灵敏度高, 请尽量确保实验环境和所用试剂耗材无DNA和DNase污染。

1. 取慢病毒感染72后的293T细胞, 消化制备单细胞悬液, 细胞计数为**M**。

2. 将悬液中的293T细胞使用基因组抽提试剂盒提取细胞基因组DNA, 测定提取的基因组DNA总量为**G**μg。将其稀释至50ng/μL, 记录稀释倍数**D**。

3. 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 3.85×10^9 copies/μl。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/μl
#1	1X	-	DNA标品	3.85×10^9
#2	10^1X	90μL	10μL #1	3.85×10^8
#3	10^2X	90μL	10μL #2	3.85×10^7
#4	10^3X	90μL	10μL #3	3.85×10^6
#5	10^4X	90μL	10μL #4	3.85×10^5
#6	10^5X	90μL	10μL #5	3.85×10^4
#7	10^6X	90μL	10μL #6	3.85×10^3

*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, 请不要再

基因修饰细胞, 病毒包装(LV、IDLV、AD、AAV、VLP、LNP); 基础实验服务(载体构建、动物实验、Western Blot、QPCR、Seahorse细胞能量代谢检测); 合成服务(siRNA合成、miRNA合成、基因合成、ASO合成等)



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。

4. 样品处理及稀释方法如下图所示：

编号	标准品				
	样本体积	无核酶水体积	稀释倍数	总稀释倍数	稀释后浓度
#1	/	/	D	DX	50ng/μL
#2	20μL #1	80μL	5X	5DX	10ng/μL
#3	10μL #2	90μL	5X	50DX	1ng/μL

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。

如果样品的浓度 > 50ng/μL，请按上表稀释；

如果样品的滴度 < 50ng/μL，则极大可能慢病毒感染细胞，提取基因组等前期步骤出现问题，建议重新进行。

*注意：

1. 提取的基因组浓度一般不低于100ng/μL。

2. 样品为基因组模板，而质粒为环状DNA分子，通常情况下，高浓度的基因组模板的扩增效率会不在90%~100%的区间内。我们建议您将提取的基因组稀释至50ng/μL。

3. 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100μL，则使用最小50μL混合）

4. 使用多通道移液器将标准品和样品加载到qPCR板上。

5. 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。

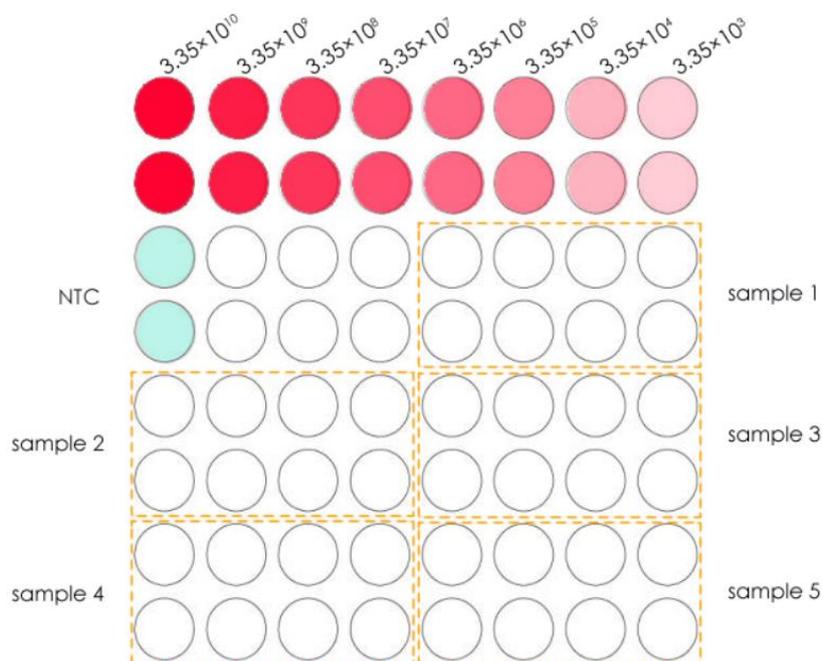
设置并加样，96孔板或8连管：

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）。

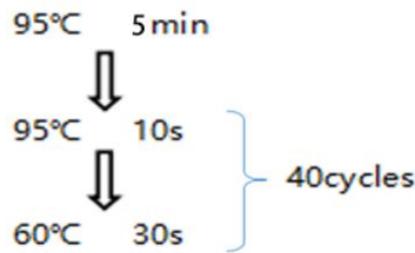
每孔加入11.3μL的预混液和8.7μL稀释好的样品，并用移液枪反复吹打至少5次来混合。

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：

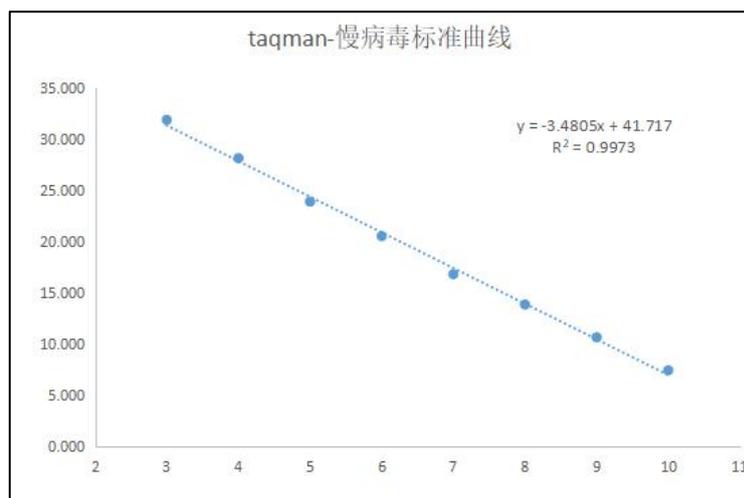


*上述程序仅为推荐程序，客户可根据使用设备自行调整程序。

6.标准曲线绘制：以每个稀释梯度的标准品平均Ct值为纵坐标Y，对应的lg (copies)为横坐标X，生成标准曲线 $y=bx+a$ 。标准曲线的相关系数 $R^2 \geq 0.995$ ， $90\% < \text{扩增效率} < 110\%$ 是可以接受的。

举例说明：

标准曲线		
编号	Copies	Ct值
#1	$3.85 \times 10^9 \times 8.7$	7.380
#2	$3.85 \times 10^8 \times 8.7$	10.599
#3	$3.85 \times 10^7 \times 8.7$	13.793
#4	$3.85 \times 10^6 \times 8.7$	16.761
#5	$3.85 \times 10^5 \times 8.7$	20.476
#6	$3.85 \times 10^4 \times 8.7$	23.840
#7	$3.85 \times 10^3 \times 8.7$	28.079
#8	$3.85 \times 10^2 \times 8.7$	31.823



曲线扩增效率为93.8%，R2为0.9973

7.计算慢病毒滴度

根据得到的样品Ct值可计算出该样品的拷贝数n；

计算该样品与样品原液的稀释比值E（例如，样品1#为E=D；样品2#为E=5D；样品2#为E=50D）；

使用抽提试剂盒提取的细胞总数M，所得的DNA总量为 μg ；

慢病毒感染细胞时的细胞数N，慢病毒用量Vml。



按照以下公式进行计算：

$$\text{titer (TU/mL)} = \frac{n * E * 10G * N}{M * V}$$

样品滴度为各样品滴度计算结果的算术平均数。

*当样品Ct值未能落在标准曲线有效区间内时，应该适当调整样品浓度重新测定。



GENECARER 官方微信，专注于细胞基因编辑和病毒包装：

- Website www.genecarer.com
- Service hotline 029-84613682



基恩科 | GENECARER

创新基因递送 服务人类健康

基因修饰细胞, 病毒包装 (LV、IDLV、AD、AAV、VLP、LNP); 基础实验服务 (载体构建、动物实验、Western Blot、QPCR, Seahorse细胞能量代谢检测); 合成服务 (siRNA合成、miRNA合成、基因合成、ASO合成等)