

Replication-competent AAV Serotype 2 (rcAAV2) Detection Kit

复制型腺相关病毒血清型 2 (rcAAV2)检测试剂盒

产品简介

复制型腺相关病毒血清型 2 (rcAAV2)检测试剂盒是用于定量分析检测各种使用 AAV2 血清型的重组腺相关病毒载体进行基因治疗、肿瘤治疗及疫苗研发等产品中可能发生的复制型腺相关病毒(Replication Competent AAV, rcAAV)的潜在风险。

本试剂盒基于荧光探针定量 PCR 原理,采用 qPCR 方法分别检测 rAAV 末端重复序列(ITR)(即参考基因 Reference)和 rcAAV 的连接序列(即靶基因 Target),实现对 rAAV 和 rcAAV 的同时定量检测。且配套同时含有参考基因 Reference 和靶基因 Target 的 DNA 定量参考品(rcAAV2 Reference&Target DNA Control)。

使用本试剂盒前需确认待测样品同时满足下述条件:

1. 待测样本中腺相关病毒的血清型为 AAV2;
2. 待测样本的重组腺相关病毒载体 rAAV 的 ITR 序列需与下述 rAAV2 的 ITR 序列匹配:

>rAAV-2/N 的 ITR

```
TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGG
CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCATCACTAGGGGTTTCCT
```

产品信息

货号	41327ES50 / 41327ES60
规格	50 T / 100 T

组分信息

组分编号	组分名称	41327ES50	41327ES60
41327-A	rcAAV2 qPCR Mix	300 μL×2 管	600 μL×2 管
41327-B1	rcAAV2 Reference Primer&probe Mix	200 μL	400 μL
41327-B2	rcAAV2 Target Primer&probe Mix	200 μL	400 μL
41327-C	DNA Dilution Buffer	1.8 mL×2 管	1.8 mL×4 管
41327-D	rcAAV2 Reference&Target DNA Control (2×10 ⁸ copies/μL)	50 μL	100 μL

运输和储存条件

1. 所有组分均干冰运输, -25~-15°C保存, 有效期 2 年。其中, 41327-A、41327-B1 和 41327-B2 均需避光保存。
2. 收到货后, 请检查共 5 个组分是否齐全, 并立即放入对应的保存温度中储存。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
3. 使用本试剂前请仔细阅读说明书, 实验应规范操作, 包括样本处理、反应体系的配制及加样。
4. 每个组分在使用前都应充分震荡混匀, 低速离心。

适用机型

包含但不限于以下仪器：

Thermo Scientific：ABI 7500，ABI Quant Studio 5；

上海宏石医疗科技：SLAN-96S。

使用说明

1. 待测样本的前处理

待测样本需经核酸提取试剂盒（推荐：翌圣生物 Cat#18461ES 磁珠法残留 DNA 样本前处理试剂盒）提取纯化后进行检测，并需考虑以下内容：

- 1) 设置提取过程的阴性质控 NCS；
- 2) 根据需要，对待测的重组腺相关病毒原液或终产品先进行 DNase^{*}处理并灭活，以排除无蛋白衣壳保护的核酸片段的假阳性干扰，然后再使用病毒核酸提取试剂盒开展提取纯化。

^{*}本试剂盒不含 DNase 试剂，推荐您购买本公司的 Recombinant Deoxyribonuclease I (DNase I, RNase-free) (Cat#10235ES)。

2. 待测样本提取纯化液的检测说明

本试剂盒针对基于 qPCR 快检的 rcAAV 检测方法和针对基于细胞培养的 rcAAV 检测方法，在使用方式上有所不同：

2.1 基于 qPCR 快检的 rcAAV 检测方法

- 1) 根据待检基因的不同，需要对待测样本提取纯化液进行不同程度的稀释。
- 2) 针对参考基因 Reference 检测时，需将待测样本的提取纯化液稀释到标曲范围(2×10^1 copies/ μ L~ 2×10^6 copies/ μ L)内；针对靶基因 Target 的检测时，由于其浓度较低，无需稀释待测样本提取纯化液（eg. 浓度 $1E+12$ vg/mL 的 rAAV 病毒原液，在提取纯化后可直接用于靶基因 Target 的检测；而对参考基因 Reference 的检测，则至少需要稀释 1000 倍）。

2.2 基于细胞培养法的 rcAAV 检测方法

- 1) 在用**步骤 1**所得的待测样本提取纯化液进行细胞转染前，采用参考基因 Reference 对待测样本提取纯化液中 rAAV 的浓度进行测定。

^{*}待测样本的提取纯化液需稀释到标曲范围(2×10^1 copies/ μ L~ 2×10^6 copies/ μ L)内，再进行 rAAV 浓度测定。

- 2) 在经过转染和细胞培养后，再对新获得的待测样本也进行病毒核酸提取试剂盒提取纯化（具体操作参照**步骤 1**），然后无需稀释样本，直接使用靶基因 Target 对 rcAAV 的浓度进行测定。

3. rcAAV2 Reference&Target DNA Control 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

复制型腺相关病毒血清型 2 (rcAAV2)检测试剂盒中参考基因 Reference 和靶基因 Target 位于同一定量参考品中，但为适应多种检测需求，在建立标曲时，需分别对不同检测基因设置标曲，然后计算每个基因的检测值。

用试剂盒中提供的 DNA Dilution Buffer (DNA 稀释液) 将 rcAAV2 Reference&Target DNA Control 定量参考品进行梯度稀释^{*}，稀释浓度依次为 2×10^7 copies/ μ L、 2×10^6 copies/ μ L、 2×10^5 copies/ μ L、 2×10^4 copies/ μ L、 2×10^3 copies/ μ L、 2×10^2 copies/ μ L、 2×10^1 copies/ μ L。具体操作如下：

- 1) 将试剂盒中的 rcAAV2 Reference&Target DNA Control 定量参考品和 DNA Dilution Buffer 置于冰上融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，低速离心 10 sec。
- 2) 取 7 支洁净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 Std0、Std1、Std2、Std3、Std4、Std5、Std6。
- 3) 在标记为 Std0 的 1.5 mL 离心管中加 90 μ L DNA Dilution Buffer 和 10 μ L rcAAV2 Reference&Target DNA Control 定量参考品，Std0 即稀释为 2×10^7 copies/ μ L 浓度，振荡混匀后低速离心 10 sec，该浓度可分装置于 $-25 \sim -15^\circ\text{C}$ 短期保存（不超过 3 个月）^{**}，使用时避免反复冻融。

4) 在 Std1、Std2、Std3、Std4、Std5、Std6 离心管中先分别加入 90 μL DNA Dilution Buffer^{***}，再进行梯度稀释^{****}，具体稀释方法如下：

稀释管	稀释比例	终浓度
Std1	10 μL Std0 + 90 μL DNA Dilution Buffer	2×10^6 copies/ μL
Std2	10 μL Std1 + 90 μL DNA Dilution Buffer	2×10^5 copies/ μL
Std3	10 μL Std2 + 90 μL DNA Dilution Buffer	2×10^4 copies/ μL
Std4	10 μL Std3 + 90 μL DNA Dilution Buffer	2×10^3 copies/ μL
Std5	10 μL Std4 + 90 μL DNA Dilution Buffer	2×10^2 copies/ μL
Std6	10 μL Std5 + 90 μL DNA Dilution Buffer	2×10^1 copies/ μL

表 1 标准品梯度稀释

^{*}每个浓度做 3 个复孔，该试剂可测试 2×10^1 copies/ μL ~ 2×10^6 copies/ μL 线性范围。若需要，可适当扩大或缩小线性范围。

^{**}为减少反复冻融次数和避免污染，建议初次使用时将 DNA 定量参考品分装储存于 $-25 \sim -15^\circ\text{C}$ 。

^{***}已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 7 天，若长时间不用，请放置于 $-25 \sim -15^\circ\text{C}$ 。

^{****}为确保模板完全混匀，每个梯度稀释时需轻微震荡混匀约 1 min。

4. 样本加标回收质控 ERC 的制备

根据需要设置 ERC 中 rcAAV2 DNA 标准品浓度（以制备加 2×10^4 copies DNA 量的 ERC 为例），具体操作如下：

- 1) 取 100 μL 待测样本^{*}加入 1.5 mL 洁净的离心管中，再加入 10 μL Std4，混匀，标记为 ERC。
- 2) 加标回收 ERC 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备加标回收 ERC 纯化液。

^{*}建议使用未转染培养液这一阴性对照作为加标回收的背景溶液，以避免由于待测样本中 Reference 含量远高于加标 Std4 而导致的加标回收不合格。

5. 阴性抽提质控 NCS 的制备

根据实验设置阴性抽提质控 NCS，具体操作如下：

- 1) 取 100 μL 样本基质溶液（或 DNA 稀释液）加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为 NCS。
- 2) 阴性质控 NCS 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

6. 无模板对照 NTC 的制备

根据实验设置无模板对照 NTC，具体操作如下：

- 1) 无模板对照 NTC 无需进行样本前处理，在 qPCR 法检测残留 DNA 含量阶段开始配置即可。
- 2) 每管或孔中 NTC 样本为 10 μL Mix 混合液（即 6 μL rcAAV2 qPCR Mix + 4 μL 对应 Primer&Probe Mix）+ 20 μL DNA Dilution Buffer，建议配置 3 个重复孔的量。

7. 反应体系

Reference 基因	
组分	体积(μL)
rcAAV2 qPCR Mix [*]	6
rcAAV2 Reference Primer&probe Mix	4
DNA Template ^{**}	20
总体积 ^{***}	30
Target 基因	
rcAAV2 qPCR Mix [*]	6
rcAAV2 Target Primer&probe Mix	4
DNA Template ^{**}	20

总体积***	30
--------	----

表 2 样本反应体系

*根据反应孔数计算本次所需 Mix 混合液总量：Mix 混合液=（反应孔数+2）×（6+4）μL（含有 2 孔的损失量）。通常，每个样本做 3 个重复孔。

**反应孔数=（6 个浓度梯度的标准曲线+1 个无模板对照 NTC+1 个阴性抽提质控 NCS+待测样 TS 个数+待测样本对应加标回收 ERC 个数）× 3。

NTC (No Template Control): DNA Dilution Buffer

NCS (Negative Control Solution): 样本基质溶液或 DNA Dilution Buffer 进行样本前处理后，所得纯化液为 NCS

TS (Test Sample): 待测样本

ERC (Extraction Recovery Control): 待测样本中加入如 10 μL 的 2×10^3 copies/μL 标准品 DNA 后进行样本前处理，所得纯化液为加标回收 ERC

***加样完成密封好管子后，请低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底，再震荡混匀 5 sec 以上，完全混匀反应液，再低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底，如有气泡，需将气泡排尽。

下表为参考板位：

	Reference						Target					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	1/x TS1*	1/x TS2	Std1	Std1	Std1	NTC	TS1	TS2	Std1	Std1	Std1
B	NTC	1/x TS1	1/x TS2	Std2	Std2	Std2	NTC	TS1	TS2	Std2	Std2	Std2
C	NTC	1/x TS1	1/x TS2	Std3	Std3	Std3	NTC	TS1	TS2	Std3	Std3	Std3
D				Std4	Std4	Std4				Std4	Std4	Std4
E	NCS	1/x ERC1**	1/x ERC2	Std5	Std5	Std5	NCS	ERC1	ERC2	Std5	Std5	Std5
F	NCS	1/x ERC1	1/x ERC2	Std6	Std6	Std6	NCS	ERC1	ERC2	Std6	Std6	Std6
G	NCS	1/x ERC1	1/x ERC2				NCS	ERC1	ERC2			
H												

表 3 上机参考板位

该示例是对 rAAV 中 rcAAV 含量分析的 qPCR 法检测操作的展示，检测样本包括：针对 rAAV 的 6 个浓度梯度的 Reference 基因标准曲线、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、2 个 1/x 待测样本 TS、2 个 1/x 加样回收 ERC；以及针对 rcAAV 的 6 个浓度梯度的 Target 基因标准曲线、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、2 个待测样本 TS、2 个加样回收 ERC。建议每个样本做 3 个重复孔。

*1/x TS1: 稀释 X 倍后的待测样本 TS 提取纯化液，X 指稀释倍数，稀释原则为稀释后的提取纯化液需在标曲范围(2×10^1 copies/μL~ 2×10^6 copies/μL)内。

**1/x ERC1: 稀释 X 倍后的待测样本加标 ERC 提取纯化液，X 指稀释倍数，稀释原则为稀释后的加标提取纯化液也需在标曲范围(2×10^1 copies/μL~ 2×10^6 copies/μL)内。

8. 扩增程序参数设置（两步法）（以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.0 为例）

- 1) 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。
- 2) 创建 2 个检测探针，Target 1 命名为“Reference”，选择报告荧光基团为“CY5”，猝灭荧光基团为“None”；Target 2 命名为“Target”，选择报告荧光基团为“FAM”，猝灭荧光基团为“None”。参比荧光为“ROX”（参比荧光可根据仪器型号等情况，选择是否需要添加）。
- 3) 在“Assign target (s) to the selected wells”面板中，将标准曲线孔的“Task”一栏设置为“Standard”，并且在“Quantity”一栏分别赋值为“2000000”、“200000”、“20000”、“2000”、“200”、“20”（含义为每孔 DNA 浓度，单位为 copies/μL），并且在相应的“Sample Name”一栏命名为“ 2×10^6 copies/μL”、“ 2×10^5 copies/μL”、“ 2×10^4 copies/μL”、“ 2×10^3 copies/μL”、“ 2×10^2 copies/μL”、“ 2×10^1 copies/μL”；将无模板对照 NTC 孔的“Task”一栏设置为“NTC”；

将阴性质控 NCS 孔、待测样本 TS 孔、样本加标回收 ERC 孔的“Task”一栏设置为“Unknown”，并且在相应的“Sample Name”一栏中分别命名为“NCS”、“TS”、“ERC”，参比荧光勾选“ROX”，之后点击“Start Run”，开始仪器运行。

4) 扩增程序设置：设置三步法扩增程序，反应体积 30 μL 。

循环步骤	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间	循环数
污染消化	37 $^{\circ}\text{C}$	5min	1
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	10 min	1
变性	95 $^{\circ}\text{C}$	15 sec	45
退火/延伸 (收集荧光)	60 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	
	72 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	

表 4 扩增程序

9. qPCR 结果分析

1) 在“Analysis”的“Amplification Plot”面板中，系统会自动给出“Threshold”，有时系统给出的“Threshold”离基线太近，导致复孔之间 Ct 相差甚远，可手动调节“Threshold”至合适位置，点击“Analyze”。此时可在“Multicomponent Plot”初步查看扩增曲线的形态是否正常。

2) 在“Analysis”的“Standard Curve”面板中，可读取标准曲线的 R^2 、扩增效率 (Eff%)、斜率 (Slope)、截距 (Intercept) 等。正常的标曲： $R^2 > 0.99$ ，扩增效率在 $90\% \leq \text{Eff}\% \leq 110\%$ 范围内，Slope 在 -3.6~-3.1。

3) 在“Analysis”的“View well table”面板中，“Quantity”一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样本 TS、样本加标回收 ERC 的检测值，单位为 copies/ μL ，后续可在检测报告中将单位换算。

4) 结果分析的参数设置需依据具体的机型及使用的软件版本，一般也可由仪器自动判读。

5) 根据待测样本 TS 和样本加标回收 ERC 的检测结果计算加标回收率，加标回收率要求在 50%~150% 之间。加标回收率计算公式：回收率 (%) = {样本加标测定值(eg.copies/ μL)-样本测定值(eg.copies/ μL)} \times 洗脱体积(eg. μL) / DNA 加入量理论值(eg.copies) \times 100%。

6) Reference 和 Target 的阴性质控 NCS 的 Ct 值检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 40 。

7) Reference 和 Target 的无模板对照 NTC 的 Ct 值的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 40 。

8) 根据分析软件给出的待测样品各检测点的浓度(copies/ μL)，通过稀释倍数回算出待测样品的实际浓度，并根据以下公式计算 rAAV 中 rcAAV 的污染率 = Target 基因的检测值 / {(1/2) \times Reference 基因的检测值 \times 稀释倍数}

^{*}(1/2) \times Reference 基因：每个 rAAV 含有两个 Reference 基因。

9) 本试剂盒除了检测 rAAV 中 rcAAV 的污染率，还可以根据研究需要，使用 Reference 靶标检测相关质粒浓度以及使用 Reference 或 Target 基因检测相关病毒中靶标的拷贝数。