

Lentivirus Physical Titer qPCR Detection Kit

慢病毒物理滴度 qPCR 检测试剂盒

产品简介

慢病毒物理滴度 qPCR 检测试剂盒是一款以 HIV-1 衍生的慢病毒载体基因组中的保守区(LTR)为靶标定量检测慢病毒物理滴度（病毒总颗粒数）的试剂盒。

本试剂盒采用探针法荧光定量 PCR 原理，专一快速的检测慢病毒 RNA，线性范围最宽可达 5 copies/ μ L~ 5×10^8 copies/ μ L，检测限低至 0.5 copies/ μ L。试剂盒配套有 Lentivirus RNA Control（RNA 定量参考品）。该试剂盒可与本公司的磁珠法残留 DNA 样本前处理试剂盒(Cat#18461ES)及 Recombinant DNase I (RNase-free) (Cat#10325ES)配套使用。

产品信息

货号	41333ES50 / 41333ES60
规格	50 T / 100 T

组分信息

组分编号	组分名称	41333ES50	41333ES60
41333-A	Lentivirus qPCR Mix	0.75 mL	1.5 mL
41333-B	One Step Enzyme Mix	200 μ L	400 μ L
41333-C	RNA Dilution Buffer	1.8 mL \times 2 管	1.8 mL \times 4 管
41333-D	Lentivirus RNA Control (5×10^8 copies/ μ L)	25 μ L	50 μ L
41333-E	IC*	50 μ L	100 μ L

*IC: Internal control, 内部对照。

运输和储存条件

1. 所有组分均干冰运输，-25~-15 $^{\circ}$ C保存，有效期 1 年。其中，41333-A 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;

Bio-Rad: CFX96 Optic Module;

上海宏石医疗科技: SLAN-96S。

使用说明

1. Lentivirus RNA Control 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

用试剂盒中提供的 RNA Dilution Buffer 将 Lentivirus RNA Control 定量参考品进行梯度稀释[†]，浓度为 5×10^7 copies/ μ L、 5×10^6 copies/ μ L、 5×10^5 copies/ μ L、 5×10^4 copies/ μ L、 5×10^3 copies/ μ L、 5×10^2 copies/ μ L、 5×10^1 copies/ μ L。具体操作如下：

- 1) 将试剂盒中的 Lentivirus RNA Control 定量参考品和 RNA 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 RNA Dilution Buffer 和 10 μ L Lentivirus RNA Control，Std0 即稀释为 5×10^7 copies/ μ L 的浓度，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 μ L RNA 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 μ L Std0 + 90 μ L RNA Dilution Buffer	5×10^6 copies/ μ L
Std2	10 μ L Std1 + 90 μ L RNA Dilution Buffer	5×10^5 copies/ μ L
Std3	10 μ L Std2 + 90 μ L RNA Dilution Buffer	5×10^4 copies/ μ L
Std4	10 μ L Std3 + 90 μ L RNA Dilution Buffer	5×10^3 copies/ μ L
Std5	10 μ L Std4 + 90 μ L RNA Dilution Buffer	5×10^2 copies/ μ L
Std6	10 μ L Std5 + 90 μ L RNA Dilution Buffer	5×10^1 copies/ μ L

表 1 标准品梯度稀释

[†]每个浓度进行 qPCR 检测时做 3 个复孔，本试剂盒的线性范围 5×10^6 copies/ μ L~ 5×10^1 copies/ μ L。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 15 sec。

2. 待测样本的前处理

- 1) 可先采用本公司的磁珠法残留 DNA 样本前处理试剂盒(Cat#18461ES)对待测样本进行提取，以获得慢病毒 RNA。
- 2) 再对提取纯化的含有慢病毒 RNA 的液体，进行 DNase[†]处理，以消除 gDNA 对后续做慢病毒滴度的 qPCR 检测的影响。
- 3) DNase 用量和消化条件需按实际样品优化，可咨询翌圣生物获取相关建议。

[†]本试剂盒不含 DNase 试剂，推荐您购买本公司的 Recombinant DNase I (RNase-free) (Cat#10325ES)。

3. 样本加标回收质控 ERC 的制备

根据需要设置 ERC 中 Lentivirus RNA 标准品浓度（以制备加 5×10^5 copies Lentivirus RNA 量的 ERC 为例），操作如下：

- 1) 取 100 μ L 待测样本加入 1.5 mL 洁净的离心管中，再加入 10 μ L Std3，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。

4. 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 μ L 样本基质溶液（或 RNA 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。

5. 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 法检测慢病毒物理滴度（病毒 RNA）阶段开始配置即可。
- 2) 每管或孔中 NTC 反应体系为 20 μL Mix 混合液（即 15 μL Lentivirus qPCR Mix + 4 μL One Step Enzyme Mix + 1 μL IC）+ 10 μL RNA Dilution Buffer，建议配置 3 个重复孔的量。

6. 反应体系

组分	体积(μL)
Lentivirus qPCR Mix [*]	15
One Step Enzyme Mix	4
IC	1
RNA Template ^{**}	10
总体积 ^{***}	30

表 2 标准品反应体系

^{*}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） \times （15+4+1） 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） \times 3。

NTC (No Template Control)：RNA Dilution Buffer

NCS (Negative Control Solution)：样本基质溶液或 RNA 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 5×10^4 copies/ μL 标准品 RNA 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：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC		待测样本 TS1	待测样本 TS1	待测样本 TS1		标准曲线 Std1	标准曲线 Std1	标准曲线 Std1			
B	NTC		待测样本 TS2	待测样本 TS2	待测样本 TS2		标准曲线 Std2	标准曲线 Std2	标准曲线 Std2			
C	NTC		待测样本 TS3	待测样本 TS3	待测样本 TS3		标准曲线 Std3	标准曲线 Std3	标准曲线 Std3			
D							标准曲线 Std4	标准曲线 Std4	标准曲线 Std4			
E	NCS		样本加标 ERC1	样本加标 ERC1	样本加标 ERC1		标准曲线 Std5	标准曲线 Std5	标准曲线 Std5			
F	NCS		样本加标 ERC2	样本加标 ERC2	样本加标 ERC2		标准曲线 Std6	标准曲线 Std6	标准曲线 Std6			
G	NCS		样本加标 ERC3	样本加标 ERC3	样本加标 ERC3							
H												

表 3 上机参考板位

该示例是对慢病毒物理滴度 qPCR 检测试剂盒检测操作的展示，检测样本包括：6 个浓度梯度的慢病毒 RNA 标准曲线、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、3 个待测样本 TS、3 个加样回收 ERC。建议每个样本做 3 个重复孔。

7. 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“Lentivirus-RNA”，选择报告荧光基团为“FAM”，猝灭荧光基团为“None”；Target 2 命名为“IC”，选择报告荧光基团为“CY5”，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”一栏进行赋值,FAM 通道为“5000000”、“500000”、“50000”、“5000”、“500”、“50”(含义为每孔慢病毒 RNA 浓度,单位为 copies/ μ L),并且在相应的“Sample Name”一栏命名为“Std1”、“Std2”、“Std3”、“Std4”、“Std5”、“Std6”;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 μ L。

循环步骤	温度 ($^{\circ}$ C)	时间	循环数
逆转录	50 $^{\circ}$ C	20 min	1
预变性	95 $^{\circ}$ C	5 min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	15 sec	45
退火/延伸 (收集荧光)	60 $^{\circ}$ C	30 sec	

表 4 扩增程序

8. 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/ μ L。

滴度换算公式: 样本原液病毒 RNA 颗粒/mL = {标曲算得浓度(copies/ μ L)* $10^*(Y/10)*(B/X)*0.5$ } / (A/1000), 其中提取投入样本原液体积 A μ L, 提取洗脱体积 B μ L, 酶切投入体积 X μ L, 酶切总体积 Y μ L。

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。样本加标回收率计算公式: 回收率(%) = {样本加标测定值(eg.copies/ μ L)-样本测定值(eg.copies/ μ L)} \times 洗脱体积(eg. μ L) / DNA 加入量理论值(eg.copies) \times 100%。

6) 阴性质控 NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 的均值。

7) 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 40 。

8) 待测样本的 Ct-IC 值应该与 NTC 的 Ct-IC 值一致或 ± 1 , 如果待测样本的 Ct-IC 值与 NTC 的 Ct-IC 值相比明显增大,则表明样本可能存在明显抑制。如果同时测试加标样本,则优先考虑样本加标回收率结果,IC 结果作为参考。