



慢病毒滴度 qPCR 检测试剂盒完全版说明书

► 产品信息

货号	产品名称	规格
EDY016-Y03	慢病毒滴度 qPCR 检测试剂盒完全版 (100T)	10 次提取+100T
EDY016-Y04	慢病毒滴度 qPCR 检测试剂盒完全版 (200T)	20 次提取+200T

► 产品概述

ED 慢病毒滴度 qPCR 检测试剂盒提供了一种快速简便的方法来检测慢病毒物理滴度。本试剂盒采用 qRT-PCR 技术来确定慢病毒 RNA 基因组的含量,包含从 RNA 反转录和 qRT-PCR 过程的全套试剂。

► 产品组分

表 1 产品组分信息表

组分	体积 (100T)	体积 (200T)
Lentivirus RNA Control Template (5×10^8 copies/ μ L)	30 μ L	60 μ L
RNA Dilution Buffer	1 mL \times 2	1 mL \times 4
One Step qPCR Mix	100 μ L	200 μ L
2 x One Step SYBR Green Mix	1 mL	1 mL \times 2
Lenti-qPCR Forward Primer (10 μ M)	100 μ L	200 μ L
Lenti-qPCR Reverse Primer (10 μ M)	100 μ L	200 μ L
RNase-Free Water	1 mL \times 3	1 mL \times 6
50X ROX Reference Dye1	50 μ L	100 μ L
50X ROX Reference Dye2	50 μ L	100 μ L
DNase I	30 units	60 units
DNase I Reaction Buffer (10 \times)	30 μ L	60 μ L
Viral RNA Kit	10 T	20 T

储存条件: Lentivirus RNA Control Template 储存在 -80°C ; 其它所有组分储存在 -20°C 。





Viral RNA 提取试剂 Carrier RNA 储存在 -20°C , 建议分装保存, 避免反复冻融, Viral RNA Kit 其它试剂组分常温保存。

ROX Reference Dye 用于校正孔与孔之间产生的荧光信号误差: 50X ROX Reference Dye1 适用于用 ABI 7900HT/7300 Real-Time PCR System 和 StepOnePlus 仪器, 50X ROX Reference Dye2 适用于 ABI 7500, 7500 Fast Real-Time PCR System, Stratagene Mx3000P 仪器; Roche, Bio-Rad 的 Real Time PCR 仪无需使用 ROX。

► 慢病毒滴度检测实验说明

请在开始之前仔细阅读整个实验步骤。

● 注意事项

鉴于 qPCR 技术具备极高的扩增效率和检测灵敏度, 即使是微量的 DNA 和 RNA 污染即可引发非特异性扩增, 导致 Ct 值偏移和定量结果失真。理想情况下, 建议设立三级独立操作区: 对照和样品制备稀释区、RT-PCR 扩增反应组装区、PCR 产物分析区 (建议在不同房间)。同时, 我们还建议设置不含任何模板的阴性模板对照 (NTC) 反应。

1. 慢病毒基因组 RNA 提取

(1) 从细胞中收获慢病毒上清, 并以 2000 转/分钟的速度离心 5 分钟, 以去除细胞和碎片。

(2) 取 150 μL 上清, 到 1.5mL 离心管中。

(3) 加入 500 μL Lysis Buffer, 涡旋混匀 15s。

Note: Lysis Buffer 使用前需要添加 Carrier RNA, 每 1 mL Lysis Buffer 需添加 10 μL Carrier RNA, 现配现用。

(4) 室温放置 10min, 短暂离心收集管盖上液体。

(5) 加入 350 μL 无水乙醇至管中, 涡旋 30s 混匀, 短暂离心收集管盖上液体将 RNA Column 套入到 2mL 收集管中, 转移 750 μL 混合液至 RNA Column 中, 13,000xg 离心 15s, 弃除废液。

(6) 重复步骤 5, 直至所有混合液通过, 即把未转移完的混合液再次加到结合柱中, 离心, 弃除废液。

(7) 将 RNA Column 套回到 2 mL 收集管中, 加入 500 μL 已稀释的 RNA Wash Buffer I, 13,000xg 离心 15s, 弃除废液。

Note: RNA Wash Buffer I 在使用前必须按照说明加入 3.82 mL 无水乙醇稀释。每





3 mL RNA Wash Buffer I 加入 3.82 mL 无水乙醇稀释。

(8) 将 RNA Column 套入到新的 2 mL 收集管中, 加入 500 μ L 已稀释的 RNA Wash Buffer II, 13,000 \times g 离心 15s, 弃除废液。

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明加入无水乙醇稀释。每 2.4 mL RNA Wash Buffer II 加入 9.6 mL 无水乙醇稀释。

(9) 重复步骤 9, 即进行第二次 RNA Wash Buffer II 洗涤。

(10) 将 RNA Column 套回到 2 mL 收集管中, 最大速度离心 2 min 至柱基质完全干燥。

(11) 将 RNA Column 套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 20-50 μ L DEPC Water, 最大速度离心 1min 洗脱 RNA。

(12) 如果您的慢病毒是由暂时感染的包装细胞系产生的, 则必须在 qRT-PCR 之前去除残留的载体 DNA。用 DNase I 反应处理这些类型的病毒 RNA 样本。

(13) 按照表 2 加入反应试剂, 混合, 并在 37°C 30 min, 然后在 65°C 10 min 下孵育。应使用热循环仪进行该反应。将试管保存在冰上, 直至准备进行 qRT-PCR。

表 2 DNase I Reaction

Reagent	Volume (μ L)
RNA Sample	10
DNase I Buffer (10X)	2
DNase I (3 units/ μ L)	1
RNase-Free Water	7
Total	20

2. 慢病毒基因组 RNA 的 qRT-PCR 扩增方案

(1) 在 RT-PCR 反应组装区进行实验, 根据表 3 试剂组分在冰上配制反应混合样, 为了确保有足够的混合样, 最低需要多加约 10% 的量, 每个反应均应进行 3 个技术重复。





表 3 反应体系 (20 μ L)

组分	One tube (μ L)
RNA Template	2
RNase-Free Water	5
Lenti-Forward Primer (XZ3035)	1
Lenti-Reverse Primer (XZ3036)	1
2 \times One Step SYBR Green Mix	10
One Step SYBR Green Enzyme Mix	1
Total	20

(2) 构建 Lentivirus RNA Control Template 标准品稀释的标准曲线, 并对纯化的病毒 RNA 样品进行如下和表 4 所示的连续稀释。

(3) 在 PCR 8 联排相应孔中加入 RNA Dilution Buffer 稀释缓冲液, 如表 4 所示。PCR 8 联排 1 的孔 6-8 中 NTC 仅含有 RNA Dilution Buffer 稀释缓冲液。

(4) 在 Strip 1 的 1-5 孔中, 制备 10 倍连续稀释的 Lentivirus RNA Control Template 如下:

a. 在管 1 中, 将 2 μ L 的 Lentivirus RNA Control Template 原液稀释到 18 μ L 的缓冲液中, 稀释 1: 10 (原液=5 \times 10⁸copes/ μ L)。

b. 在 2-5 管中, 将 2 μ L 1 号管的液体取到 2 孔的 18 μ L 缓冲液中, 将 1 孔稀释后的对照模板连续稀释 10 倍。对 3-5 号管重复类似的稀释。

(5) 连续稀释病毒 RNA 样本, 如表 3 所示。每个 8 孔管可用于 4 个不同浓度的样品。

a. 每个样品的第一个孔 (孔 1 和 5) 应包含 20 μ L 未稀释样品 (1X)。

b. 随后进行连续的 10 倍样品稀释液 (2-4 孔和 6-8 孔), 将 2 μ L 的稀释液连续转移到 18 μ L 的缓冲液中。

(6) 轻轻混匀, 以 2000 rpm (4 $^{\circ}$ C) 的速度离心 1 min, 以去除气泡。

(7) 将 PCR 管放在冰上, 每个孔加入 18 μ L 混合样品。

(8) 每孔加入 2 μ L Lentivirus RNA Control Template 稀释样品。

(9) 以 2,000 rpm (4 $^{\circ}$ C) 的速度离心平板 2 min, 以去除任何气泡。

(10) 按照表 5 反应程序进行 qPCR 扩增。





表 4 qRT-PCR 的对照和样品稀释

孔	Strip 1: Controls			Strip 2: Samples		
	RNA Dilution Buffer	Additive	copies/ μ l	RNA Dilution Buffer	Additive	copies/ μ l
1	18	2	5×10^7	Sample 1	20	X
2	18	2	5×10^6	18	2	0.1X
3	18	2	5×10^5	18	2	0.01X
4	18	2	5×10^4	18	2	0.001X
5	18	2	5×10^3	Sample 2	2	X
6	NTC	/		18	2	0.1X
7	NTC	/		18	2	0.01X
8	NTC	/		18	2	0.001X

表 5 qPCR 扩增程序

	温度	时间
逆转录	50°C	5 min
预变性	95°C	30 sec
40 个循环	95°C	10 sec
	58.5°C	30 sec
收集荧光		
Melt Curve	65 °C to 95 °C	$\Delta T = -0.5^\circ C$

► 数据分析

1. 确定对照稀释重复样本的平均 Ct 值, 并将其与拷贝数 (对数值) 作图, 以生成标准曲线 (如图 1 所示)。
2. 确定每个重复样本稀释的平均 Ct 值, 并从标准曲线上读取相应的拷贝数。高于 NTC 的 Ct 值存在异常, 数据不可用。
3. 将得到拷贝数乘以相应的稀释倍数, 得到原始样本的拷贝数 (copies/mL)。计算公式如下所示:

$$\text{Copies/mL} = \frac{(\text{copies})(1,000 \mu\text{L/mL})(2X \text{ DNase})(\text{Elution volume})}{(\text{Virus sample volume})(2 \mu\text{L added to well})}$$





注: 2X DNase 为使用 DNase I 消化反应时的稀释系数;

Elution volume 为病毒 RNA 提取时的洗脱液体积;

Virus sample volume 为进行病毒 RNA 提取的样品体积。

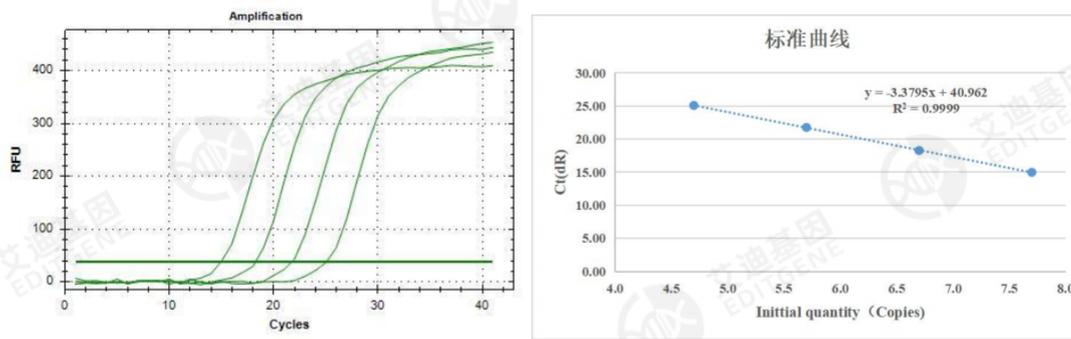


图1 扩增曲线(左)和溶解曲线(右): 使用 Lentivirus RNA Control Template 对照模板 (10^6 - 10^2 copies) 和 ED qRT-PCR 滴定试剂盒进行的 qRT-PCR 反应的扩增曲线, 且无模板对照背景低 (未显示)。从扩增曲线显示的图表创建的标准曲线显示了 Ct 值与 RNA 拷贝数 (Log₁₀ 对数值) 之间的强线性相关性, $R^2=0.9999$, PCR 效率为 98%。

► 注意事项

- (1) 本产品仅供实验室作为科研目的使用, 请严格遵守相关法律法规和伦理要求, 否则产生一切后果与本公司无关。
- (2) 请按要求运输、存储及使用试剂, 非必要请勿反复冻融, 因未按要求保存、操作造成的实验失败, 本公司概不负责。

