

ED 慢病毒滴度 qPCR 检测试剂盒说明书

1 产品简介

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。

2 试剂盒组分

表 1 试剂盒组成

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
Lenti-qPCR Forward Primer (10 μ M)	50 μ L	100 μ L
Lenti-qPCR Reverse Primer (10 μ M)	50 μ L	100 μ L
RNase-Free Water	1 mL	1 mL \times 2

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

3 所需额外试剂和材料

- NucleoSpin RNA Virus Kit (10 preps; Cat. No. 740956.10)
或者采用 E.Z.N.A.®Viral RNA Kit (Omega)
- DNase I

4 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 200 μL 上清,立即滴度,或储存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下。

(3) 根据慢病毒基因组 RNA 提取试剂盒说明书从上述病毒上清液中进行基因组 RNA 提取纯化,最后使用 50-100 μL 不含 RNase 的水中洗脱 RNA。

(4) 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。

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 2 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 2 反应体系 (20 μL)

组分	One tube (μL)
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 3 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 μL 的 Lentivirus RNA Control Template 原液稀释到 18 μL 的缓冲液中,稀释 1:10 (原液=5 \times 10⁸copes/ μL)。



b. 在 2-5 管中, 将 2 μL 1 号管的液体取到 2 孔的 18 μL 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 μL 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 μL 的稀释液连续转移到 18 μL 的缓冲液中。

(6) 轻轻混匀, 以 2000 rpm (4°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 μL 混合样品。

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

(9) 以 2,000 rpm (4°C) 的速度离心平板 2 min, 以去除任何气泡。

(10) 按照表 4 反应程序进行 qPCR 扩增。

表 3 qRT-PCR 的对照和样品稀释

孔	Strip 1: Controls			Strip 2: Samples		
	RNA Dilution Buffer	Additive	copies/ μl	RNA Dilution Buffer	Additive	copies/ μl
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 4 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	$\Delta T = -0.5^\circ\text{C}$



5 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。

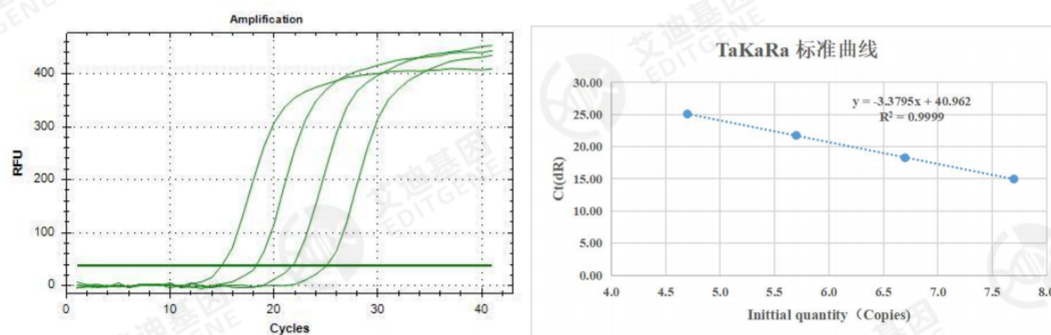


图 1 扩增曲线（左）和溶解曲线（右）：使用 Lentivirus RNA Control Template 对照模板 (10^6 - 10^2 copies) 和 ED qRT-PCR 滴定试剂盒进行的 qRT-PCR 反应的扩增曲线，且无模板对照背景低（未显示）。从扩增曲线显示的图表创建的标准曲线显示了 Ct 值与 RNA 拷贝数 (Log10 对数值) 之间的强线性相关性， $R^2=0.9999$ ，PCR 效率为 98%。

