



AAV9滴度ELISA检测试剂盒

Cat: AC72856

Content: 96 Tests

Storage: 2°C-8°C

For research use only

目录

CONTENT

| | |
|------------------|----|
| 产品介绍..... | 01 |
| 检测原理..... | 01 |
| 试剂盒提供的材料..... | 02 |
| 试剂盒未提供的材料设备..... | 02 |
| 储存条件及有效期..... | 03 |
| 注意事项..... | 03 |
| 试剂配制..... | 03 |
| 操作流程..... | 05 |
| 流程总结..... | 05 |
| 数据处理..... | 06 |
| 产品数据展示..... | 06 |

产品介绍

腺相关病毒 (AAV) 是一种非致病性的ssDNA病毒，目前是广泛用于基因治疗的病毒载体，其中AAV9为研究最为广泛的血清型。AAV9颗粒的滴度检测是基因治疗中重要的环节，能够可靠地检测出病毒滴度，以确保治疗型病毒基因载体的合理用量，稳定及精确的检测结果是临床给药的基础保障。目前AAV衣壳的鉴定方法包括滴度ELISA、qPCR、ddPCR、DNA点印迹、细胞分析等。

艾策生物的AAV9滴度检测ELISA试剂盒(AC72856)提供了一种快速、灵敏和可重复的方法来滴定完整的AAV9野生型病毒颗粒、AAV9重组病毒颗粒或组装且完整的空AAV9衣壳。

检测原理

艾策生物的AAV9滴度ELISA检测试剂盒是基于“三明治”夹心法ELISA。将AAV9重组抗体添加到捕获板上，用于样本中捕获AAV9衣壳蛋白。捕获的AAV9衣壳蛋白与生物素偶联的抗AAV9的重组抗体结合。加入链霉亲和素-辣根过氧化物酶偶联物 (Streptavidin-HRP)，与生物素偶联的抗AAV9的重组抗体发生反应。加入显色液，最后加入终止溶液终止反应，整体颜色强度与特异性结合的病毒颗粒的数量成正比。用酶标仪在450 nm处测量吸光度(可选:在650 nm处的参考波长)。根据AAV9标准曲线对样品中AAV9衣壳的数量进行精确定量。

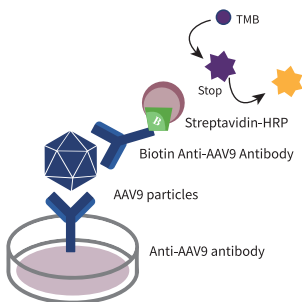


图1. AAV9滴度衣壳蛋白ELISA试剂盒检测原理

试剂盒提供的材料

| 产品组分 | 编号 | 规格 |
|-----------------------------------|---------|------------------|
| Capture Plate | A303901 | 96孔/板 |
| AAV9 Control | A303903 | 3瓶, 冻干粉 |
| Biotin Anti-AAV9 Antibody | A303906 | 1瓶, 冻干粉 |
| Streptavidin-HRP | C7789 | 1瓶 (250 μ L) |
| 5 \times Sample Dilution Buffer | C6199 | 1瓶 (10 mL) |
| TMB Solution | C3679 | 1瓶 (10 mL) |
| Stop Solution | C9269 | 1瓶 (10 mL) |
| 20 \times Wash Solution | C2779 | 1瓶 (40 mL) |
| Plate Sealer | N/A | 5 |

Capture Plate: 96孔微孔板 (8孔 \times 12条), 板内配置12条, 板用干燥剂密封在箔袋中。

AAV9 Control: 3瓶含有AAV9空衣壳的冻干粉末。使用前用1 \times 样品稀释缓冲液溶解重新配制, 每批试剂盒中的AAV9标准品滴度不同, 具体信息在产品标签上注明, 溶解后的AAV9标准品在2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C保存长达2周, 若要长期储存, 请在-20 $^{\circ}$ C或以下的条件中储存, 避免反复冻融。

试剂盒未提供的材料设备

- (1) 能够检测450 nm吸光度的酶标仪, 参考波长650 nm
- (2) 涡旋振荡器、微孔板振荡器
- (3) 离心机
- (4) 移液器、枪头、加样槽等
- (5) 准备试剂用的试管、离心管、量筒等
- (6) 去离子水或蒸馏水
- (7) 吸水纸
- (8) 计时器

储存条件及有效期

检测试剂盒2°C-8°C保存,有效期12个月;开封后,有效期1个月。

注意事项

- (1) 所有的化学试剂理应被认为具有潜在危害,请按照当地规定进行处理。
- (2) 所有使用本试剂盒的人员必须完成适当的生物安全培训,操作时请佩戴合适的防护设施,例如白大衣、乳胶手套、安全眼镜等。
- (3) 请避免试剂接触皮肤和眼睛,如不慎接触,请立即用大量清水清洗。。
- (4) 试剂盒中的终止液为酸性溶液,在使用终止液时,请佩戴防护服,及防护眼睛、手及面部的设施。
- (5) 本试剂盒用于科学研究,不得用于其它用途。
- (6) 如果包装或内容有任何可见损坏,不要使用套件。
- (7) 为保证测试的准确性,请不要使用其他批号或其他来源的试剂替代本试剂盒中的试剂。
- (8) 请不要使用超过规定效期的试剂。
- (9) 在试剂盒的贮存或孵育过程请避免强光照射。
- (10) 试剂的准备必须使用去离子水或蒸馏水。
- (11) 为了避免微生物的污染,以及试剂与样本间的交叉污染,请使用一次性枪头。
- (12) 检测前,所有试剂必须平衡至室温(20°C-25°C)。一次只取适量的试剂,不要将未使用过的试剂放回小瓶中,避免发生试剂污染。
- (13) 在打开AAV9标准品前,确保所有冻干粉都位于瓶子底部,防止冻干粉在开盖后飞溅,影响后续实验结果。
- (14) 实验过程中,不要让孔板长时间处于干燥状态,清洗步骤完成后立即进行下一步。

试剂配制

检测前,请将所有的试剂、样本平衡到室温(20°C-25°C)。使用后立即放回冰箱。若浓缩的试剂出现结晶,37°C水浴,直至结晶完全溶解。

● 1×清洗液

用去离子水或蒸馏水稀释20×清洗液至1×清洗液,备用。

● 1×样品稀释缓冲液

用去离子水或蒸馏水稀释5×样品稀释缓冲液至1×样品稀释缓冲液, 备用。

● Biotin Anti-AAV9 Antibody

用400 μL的1×样品稀释缓冲液溶解Biotin Anti-AAV9 Antibody, 室温下放置5min, 根据标准品和待检样本的数量, 用1×样品稀释缓冲液按1:50稀释Biotin Anti-AAV9 Antibody。

● Streptavidin-HRP

根据标准品和待检样本的数量, 用1×样品稀释缓冲液 1:100稀释浓缩的Streptavidin-HRP。

● 样品准备

检测未知的样品, 特别是滴度很高的样品, 必须在检测前进行稀释, 以获得准确的AAV9滴度值, 且在试剂盒的线性范围内。建议对未知样品进行连续多次的10倍稀释, 以确保至少有一个稀释的样品在标准曲线的范围内。通常需要将样品稀释10-10000倍。建议所有样品都准备一式两份。将结果乘以稀释系数, 确定原始样品中的AAV9滴度值。

● 标准品配制

用900 μL的1×样品稀释缓冲液溶解AAV9 Control, 确保充分混匀, 重溶后标准品的浓度为 $1.32E+09$ Capsids/mL, 室温静置5 min。重溶后的标准品作为标准曲线的最高浓度, 记为ST-1。在每个试管中加入250 μL的1×样品稀释缓冲液, 取250 μL标准品加入第一个试管中并混匀, 用1×样品稀释缓冲液做1:1系列稀释, 每次移液时, 请确保充分混匀。以1×样品稀释缓冲液作为标准曲线的零浓度。

| 标曲样品 | 加样 | 衣壳滴度 (Capsids/mL) |
|------|------------------------------|-------------------|
| ST-1 | 标准品原液 | $1.32E+09$ |
| ST-2 | 250 μL ST-1+250 μL 1×样品稀释缓冲液 | $6.60E+08$ |
| ST-3 | 250 μL ST-2+250 μL 1×样品稀释缓冲液 | $3.30E+08$ |
| ST-4 | 250 μL ST-3+250 μL 1×样品稀释缓冲液 | $1.65E+08$ |
| ST-5 | 250 μL ST-4+250 μL 1×样品稀释缓冲液 | $8.25E+07$ |
| ST-6 | 250 μL ST-5+250 μL 1×样品稀释缓冲液 | $4.13E+07$ |
| ST-7 | 250 μL ST-6+250 μL 1×样品稀释缓冲液 | $2.06E+07$ |
| ST-8 | 1×样品稀释缓冲液 | 0 |

标曲拟合范围为ST-1~ST-7。

操作流程

- (1) 准备好待检样品、标曲样品。将不需要的板条拆卸下来，放回铝箔袋中重新封好封口。
- (2) 标准品与样品孵育：在相应孔中加入100 μL 的待检样品、标曲样品 (ST-1~ST-8)，用封板膜覆盖平板，在37°C下孵育60 min。
- (3) 洗板：取下封板膜，弃掉孔板中液体，每孔加入250 μL 的1 \times 清洗液，充分洗涤4次，每次浸泡30 s，在清洗步骤后将倒置的平板放在吸水纸上拍干，为了保证理想的实验性能，需彻底去除残留液体。
- (4) 生物素标记抗体孵育：在所有检测孔中加入100 μL 稀释的Biotin Anti-AAV9 Antibody (参见试剂配制)，封板膜封板，在37°C下孵育60 min。
- (5) 洗板：重复步骤(3)。
- (6) 酶偶联链霉亲和素孵育：在所有检测孔中加入100 μL 的Streptavidin-HRP (参见试剂配制)，封板膜封板，过程避光，在37°C下孵育60 min。
- (7) 洗板：重复步骤(3)。
- (8) 显色：每孔加入100 μL 显色液，轻轻振荡混匀，避光，室温孵育15 min (在第一孔加入显色液后开始计时)。
- (9) 检测：每孔加入100 μL 终止液，轻轻振荡混匀，立即使用酶标仪进行双波长检测，测定450 nm最大吸收波长和650 nm参考波长下的OD值。校准后的OD值为450 nm的测定值减去650 nm的测定值，仅使用450 nm测定会导致OD值偏高，并且准确度降低。

流程总结



数据处理

1、制作标准曲线

以标准品AAV9滴度(Capsids/mL)作为横坐标,相应的吸光度作为纵坐标,若设有复孔,则取其平均值。利用绘图和统计学等软件,采用四参数逻辑曲线拟合程序,通过标准曲线的各个点计算出最佳拟合的线性关系。

2、样品滴度计算

将样品的OD值代入标准曲线的拟合方程,计算样品滴度,所得的值乘以稀释倍数,即样品的实际滴度(Capsids/mL)。该试剂盒的稀释范围是定量的,为了获得最高的精确度,未知样品的OD值需稀释至推荐的定量范围内。

产品数据展示

1、标曲数据

数据拟合绘制标准曲线,生成的标准曲线用于实验数据分析。

表2. AAV9滴度ELISA检测试剂盒标准曲线数据

| AAV9滴度(Capsids/mL) | OD (450-650) nm |
|--------------------|-----------------|
| 1.32E+09 | 3.2820 |
| 6.60E+08 | 2.0611 |
| 3.30E+08 | 1.2747 |
| 1.65E+08 | 0.7813 |
| 8.25E+07 | 0.4232 |
| 4.13E+07 | 0.3103 |
| 2.06E+07 | 0.2052 |
| Blank | 0.0758 |

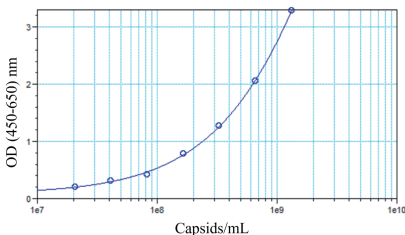


图2. AAV9滴度ELISA检测试剂盒标准曲线

2. 线性范围

试剂盒的线性范围为 $2.06E+07$ - $1.32E+09$ Capsids/mL。

3. 加样回收率

使用试剂盒,在Expi293F细胞上清中检测三个不同滴度AAV9分析样本的加样回收率,结果显示加样回收率均在80%-120%之间,表明在Expi293F细胞上清并不影响AAV9滴度的检测。

表3. AAV9滴度ELISA检测试剂盒的加样回收率验证

| | 重复次数 | 平均测值 (Capsids/mL) | Expi293F细胞上清加样回收率 | |
|------|------|----------------------|-------------------|-------------|
| | | | 实测 | 标准:80%-120% |
| AAV9 | 3 | $1.32E+09$ | 90% | 符合 |
| AAV9 | 3 | $1.65E+08$ | 84% | 符合 |
| AAV9 | 3 | $2.06E+07$ | 88% | 符合 |

4. 精密度

使用试剂盒,分别对AAV9高、中、低3个滴度的样本进行测试,每个样本重复检测10次,每个滴度样本计算10次测量浓度结果的平均值,计算变异系数(CV)。根据性能评估结果,所测结果% CV均低于10%,表明试剂盒精密度良好。

表4. AAV9滴度ELISA检测试剂盒的精密度验证

| | 重复次数 | 平均测值 (Capsids/mL) | %CV | |
|------|------|----------------------|-----|----------|
| | | | 实测 | 标准: ≤10% |
| AAV9 | 10 | 1.32E+09 | 5% | 符合 |
| AAV9 | 10 | 1.65E+08 | 4% | 符合 |
| AAV9 | 10 | 2.06E+07 | 2% | 符合 |

5. 交叉作用验证

将血清型2、5、6、8、9的AAV衣壳蛋白作为样品，以各自不同的浓度添加到ELISA试剂盒微孔板中，检测得到的OD值如下。

表5. AAV9滴度ELISA检测试剂盒的AAV血清型交叉反应性验证

| 血清型 | 衣壳滴度(Capsids/mL) | OD(450-650) nm |
|-------|------------------|----------------|
| AAV2 | 2.40E+09 | 0.1697 |
| AAV5 | 2.40E+09 | 0.1660 |
| AAV6 | 2.40E+09 | 0.1859 |
| AAV8 | 2.40E+09 | 0.1932 |
| AAV9 | 1.32E+09 | 3.2350 |
| Blank | 0 | 0.0897 |

A series of horizontal dashed lines for writing, arranged in a rounded rectangular frame with a dark blue border.



杭州艾策生物技术有限公司

☎ 0571-87032695

✉ support@acnovia.com

🌐 www.acnovia.com

📍 浙江省杭州市钱塘区下沙街道福城路400号5幢1层