

## AAV2滴度ELISA检测试剂盒

Cat: AC72858

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AAV2为研究最为广泛的血清型。AAV2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AAV2滴度检测ELISA试剂盒 (AC72858) 提供了一种快速、灵敏和可重复的方法来滴定完整的AAV2野生型病毒颗粒、AAV2重组病毒颗粒或组装且完整的空AAV2衣壳。

## 检测原理

艾策生物的AAV2滴度ELISA检测试剂盒是基于“三明治”夹心法ELISA。将AAV2重组抗体添加到捕获板上,用于样本中捕获AAV2衣壳蛋白。捕获的AAV2衣壳蛋白与生物素偶联的抗AAV2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AAV2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AAV2标准曲线对样品中AAV2衣壳的数量进行精确定量。

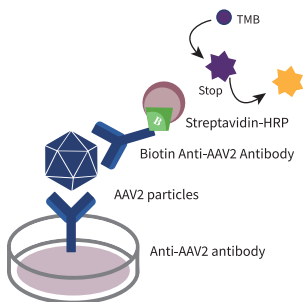


图1. AAV2滴度衣壳蛋白ELISA试剂盒检测原理

## 试剂盒提供的材料

产品组分	编号	规格
Capture Plate	A303401	96孔/板
AAV2 Control	A303403	4瓶, 冻干粉
Biotin Anti-AAV2 Antibody	A303406	1瓶, 冻干粉
Streptavidin-HRP	C7789	1瓶 (250 $\mu$ 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。

AAV2 Control: 4瓶含有AAV2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AAV2标准品滴度不同, 具体信息在产品标签上注明, 溶解后的AAV2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AAV2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-AAV2 Antibody

用500 μL的1×样品稀释缓冲液溶解Biotin Anti-AAV2 Antibody, 室温下放置5 min, 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-AAV2 Antibody。

### ● Streptavidin-HRP

根据标准品和待检样本的数量, 用1×样品稀释缓冲液按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AAV2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AAV2滴度值。

### ● 标准品配制

用600 μL的1×样品稀释缓冲液溶解AAV2 Control, 确保充分混匀, 重溶后标准品的浓度为 $2.08E+09$  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。

表1. 标曲样品溶液配制

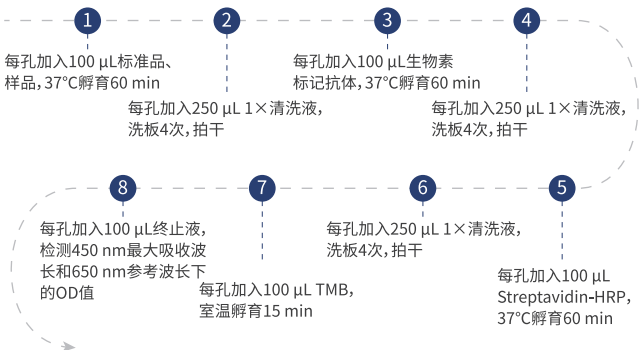
标曲样品	加样	衣壳滴度 (Capsids/mL)
ST-1	标准品原液	$2.08E+09$
ST-2	250 μL ST-1+250 μL 1×样品稀释缓冲液	$1.04E+09$
ST-3	250 μL ST-2+250 μL 1×样品稀释缓冲液	$5.20E+08$
ST-4	250 μL ST-3+250 μL 1×样品稀释缓冲液	$2.60E+08$
ST-5	250 μL ST-4+250 μL 1×样品稀释缓冲液	$1.30E+08$
ST-6	250 μL ST-5+250 μL 1×样品稀释缓冲液	$6.50E+07$
ST-7	250 μL ST-6+250 μL 1×样品稀释缓冲液	$3.25E+07$
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) 准备好待检样品和标曲样品，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  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ 稀释的Biotin Anti-AAV2 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) 酶偶联链霉素亲和素孵育：在所有检测孔中加入100  $\mu\text{L}$ 稀释的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  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ 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AAV2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

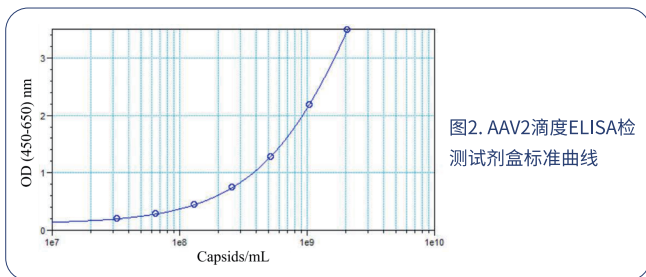
### 1、标曲数据

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. AAV2滴度ELISA检测试剂盒标准曲线数据

AAV2滴度 (Capsids/mL)	OD(450-650)nm
2.08E+09	3.4893
1.04E+09	2.1872
5.20E+08	1.2818
2.60E+08	0.7475
1.30E+08	0.4392
6.5E+07	0.2813
3.25E+07	0.1990
Blank	0.0603





## 2、线性范围

试剂盒的线性范围为 $3.25E+07$ - $2.08E+09$  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AAV2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AAV2滴度的检测。

表3. AAV2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%
AAV2	3	$2.08E+09$	85%	符合
AAV2	3	$2.60E+08$	88%	符合
AAV2	3	$3.25E+07$	90%	符合

## 4、精密度

使用试剂盒,分别对AAV2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. AAV2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%
AAV2	10	2.08E+09	3%	符合
AAV2	10	2.60E+08	6%	符合
AAV2	10	3.25E+07	7%	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. AAV2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	2.08E+09	3.4187
AAV5	2.40E+09	0.0223
AAV6	2.40E+09	0.0493
AAV8	2.40E+09	0.0347
AAV9	2.40E+09	0.0362
Blank	0	0.0523

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