

【产品名称】

rcAAV-2/N 检测试剂盒（PCR-荧光探针法）
货号：BP-QN28-100

【包装规格】

100 Reactions/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定量检测血清型 rAAV-2/N (N 为不同的衣壳血清型)中 rcAAV-2/N*污染率。样品类型包括但不限于重组腺相关病毒载体收获液、生产终末期细胞、纯化后的病毒载体原液以及基于细胞培养法检测 rcAAV 的细胞样品等。

*注意，在使用本试剂盒前请务必确定：

- 1) AAV 血清型；
- 2) 待检测样品 rAAV 的末端重复序列（ITR）与以下序列匹配。
TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTT
TGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT

【产品简介】

本试剂盒采用 PCR-荧光探针法，试剂盒中包含两个体系：检测 rcAAV 的体系和检测 rAAV 的体系；两个体系校准品包含在同一定量参考品中，试剂盒可同时实现对 rcAAV 和 rAAV 快速、灵敏、特异的定量检测。
试剂盒含有外源性内标，内标可以与样本一起参与提取扩增，用于监控提取与扩增是否异常，防止假阴性的产生。本试剂盒含有 UDG 酶，用于预防扩增产物的污染。
本试剂盒与珠海横琴宝锐核酸提取或纯化试剂盒配套使用。

【主要成分与含量】

试剂盒组分	规格（100 Reactions/盒）
Target qPCR MIX	1.0mL×2 管
Reference qPCR MIX	1.0mL×2 管
rcAAV-2/N 内标*	1.0mL×1 管
rcAAV-2/N 阴性对照	1.0mL×2 管
rcAAV-2/N 校准品 ST1	1.0mL×1 管（2×10 ¹ copies/μL）
rcAAV-2/N 校准品 ST2	1.0mL×1 管（2×10 ² copies/μL）
rcAAV-2/N 校准品 ST3	1.0mL×1 管（2×10 ³ copies/μL）
rcAAV-2/N 校准品 ST4	1.0mL×1 管（2×10 ⁴ copies/μL）
rcAAV-2/N 校准品 ST5	1.0mL×1 管（2×10 ⁵ copies/μL）

说明：
不同批号试剂盒中各组分不可以互换。
实验操作中需要但试剂盒中未提供的试剂：核酸提取或纯化试剂盒。
*若不使用试剂盒内标功能，提取时无需添加内标，程序设置时不设置 ROX 通道，结果分析时无需关注 ROX 结果。
*若样品提取时未添加内标，扩增时加内标，则配制 MIX 时每反应液加 1μL 内标，分装 qPCR MIX 时分装 21μL/反应，此时 PCR 总反应体积为 41μL/反应。

【储存条件及有效期】

- 1、置于≤-20℃下避光保存，有效期 24 个月。
- 2、避免反复冻融，反复冻融次数不超过 10 次。
- 3、产品有效期及失效日期见标签。

【适用机型】

包括但不限于以下机型：SLAN-96P、SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统；ABI7500、ABI QuantStudio™ 5 实时荧光定量 PCR 仪；Roche LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪；伯乐 CFX96 定量 PCR 仪。

【检验方法】

一、待测样品的前处理

待测样品进行检测前需进行核酸酶处理，以排除无蛋白衣壳保护的核酸片段的干扰。

二、不同待测样品纯化液的检测说明

本试剂盒针对直接 qPCR 法或基于细胞培养法的使用方式有所不同：

1. 直接 qPCR 法

1.1 根据检测的基因不同，需要对样品纯化液进行不同程度的稀释。

1.2 针对 Target 基因检测时，无需对样品纯化液进行稀释；而针对 Reference 基因检测时，需要先将样品纯化液稀释到线性范围（ $20 \sim 2.0 \times 10^6$ copies/ μ L）内。

例如：已知 rAAV 病毒原液的浓度约为 2.0×10^{12} VG/mL，那么其样品纯化液可直接用于 Target 基因检测，但应至少稀释 1000 倍后才能用于 Reference 基因检测。

2. 基于细胞培养法：

2.1 细胞转染前，先用 Reference qPCR MIX 对 rAAV 的浓度进行测定；

注：同 1 也需要将待测样本的提取纯化液稀释到线性范围（ $20 \sim 2.0 \times 10^6$ copies/ μ L）内；

2.2 细胞转染后，再用 Target qPCR MIX 对 rcAAV 的浓度进行测定。

三、体系配制及检测

1. 试剂准备

1.1 从试剂盒中取出 Target qPCR MIX、Reference qPCR MIX、rcAAV-2/N 内标、rcAAV-2/N 阴性对照、rcAAV-2/N 校准品 ST1-ST5，置于室温融化，充分震荡混匀后瞬时离心备用。

1.2 加样回收质控 ERC 制备，根据需要设置 ERC 中的加样浓度（以制备加 2×10^4 copies 的 ERC 为例），具体操作如下：

1) 取 100 μ L 待测样本加入 1.5mL 干净的离心管中。

2) 加入 10 μ L rcAAV-2/N 校准品 ST3 后混匀瞬时离心，标记为样本 ERC。样本 ERC 和同批待测样本一起进行核酸提取纯化，得到的核酸即为样本 ERC 核酸。

根据待测标本数，计算所需的 PCR 反应液数，一般建议做 3 个重复/样本。

PCR 反应液数 N = （5 个浓度梯度的校准品 + 1 个无模板对照 NTC + 1 个阴性对照样本 NCS + 待测样本 + 待测样本 ERC） \times 3。然后将相应数量的 PCR 反应液，按照一孔 20 μ L 的量分装至 96 孔 PCR 板或者 PCR 八连管中。

2. 核酸提取与纯化

操作步骤参照核酸提取或纯化试剂盒说明书，样本量为 100 μ L，内标添加量为 10 μ L。

3. 扩增和检测

3.1 各反应孔加样示例：

针对 Target 体系：

组分	加样量
标准曲线	20 μ L Target qPCR MIX + 20 μ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20 μ L Target qPCR MIX + 20 μ L 阴性对照
NCS	20 μ L Target qPCR MIX + 20 μ L NCS 纯化液
待测样本	20 μ L Target qPCR MIX + 20 μ L 待测样本纯化液
样本 ERC	20 μ L Target qPCR MIX + 20 μ L 样本 ERC 纯化液

针对 Reference 体系：

组分	加样量
标准曲线	20 μ L Reference qPCR MIX + 20 μ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5

NTC	20μL Reference qPCR MIX + 20μL 阴性对照
NCS	20μL Reference qPCR MIX + 20μL NCS 纯化液
待测样本	20μL Reference qPCR MIX + 20μL 待测样本纯化液
样本 ERC	20μL Reference qPCR MIX + 20μL 样本 ERC 纯化液

3.2 孔板排版布局可参考下表：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC-Target	NTC-Target	NTC-Target				ST1-Target	ST1-Target	ST1-Target	ST1-Reference	ST1-Reference	ST1-Reference
B	NCS-Target	NCS-Target	NCS-Target				ST2-Target	ST2-Target	ST2-Target	ST2-Reference	ST2-Reference	ST2-Reference
C	S-Target	S-Target	S-Target				ST3-Target	ST3-Target	ST3-Target	ST3-Reference	ST3-Reference	ST3-Reference
D	ERC-Target	ERC-Target	ERC-Target				ST4-Target	ST4-Target	ST4-Target	ST4-Reference	ST4-Reference	ST4-Reference
E	NTC-Reference	NTC-Reference	NTC-Reference				ST5-Target	ST5-Target	ST5-Target	ST5-Reference	ST5-Reference	ST5-Reference
F	NCS-Reference	NCS-Reference	NCS-Reference									
G	1/X S-Reference	1/X S-Reference	1/X S-Reference									
H	ERC-Reference	ERC-Reference	ERC-Reference									

* 该示例表示的是检测 1 个无模板对照 NTC、1 个阴性对照样本 NCS、1 个待测样品、1 个待测样品 ERC，每个检测做 3 个复孔。

* 1/X 表示该样本稀释了 X 倍。

* 实际检测时可根据样品多少，参照此示例进行排版布局。

3.3 将上述配制好的反应液，盖好反应管盖，混匀后瞬时离心，转移到荧光 PCR 仪器上。

3.4 在荧光 PCR 仪上运行以下程序：

步骤	条件	循环数
UDG 处理	50℃：2 分钟	1
预变性	95℃：3 分钟	1
PCR 扩增	95℃：10 秒，60℃（采集荧光）：30 秒	45

荧光通道选择 FAM、ROX，其中 FAM 为 Target 和 Reference DNA，ROX 为内标。若仪器为 ABI 系列，参比荧光选择 none。

4. 结果判定

4.1 阈值线设定

阈值线依据仪器噪声情况进行调整，将阈值线设置到超过本底信号波动位置。阈值线设定应基于实验室验证数据，以满足检测限要求为基准。

4.2 试验成立条件

4.2.1 对于阴性结果内标 Ct 值应≤35；对于阳性结果，可能会因为竞争抑制，导致阳性结果内标不出值或者出值较差。

4.2.2 NTC、NCS 的 FAM 通道显示 Ct 值≥35 或无典型扩增曲线；标准曲线线性相关性 $R^2 > 0.98$ 。

5. 结果分析

5.1 以 SLAN-96P 为例：

- 1) 若需要调整阈值线，在“实验分析”面板的“参数设置”中，将阈值设置到合适高度,分析类型为定量；
- 2) 在“孔板编辑”面板中，将校准品的“样本类型”一栏设置为标准品，并且在“属性”一栏分别赋值为 2×10^1 、 2×10^2 、 2×10^3 、 2×10^4 、 2×10^5 （含义为每孔加入的 DNA 浓度，单位为 copies/μL），并且在相应的“样本名称”一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5；
- 3) 在“实验分析”的“标准曲线”面板中，可读取标准曲线的斜率、截距、相关系数、扩增效率；

4) 在“实验分析”的“反应孔信息表”面板中，“浓度”一栏可读取检测结果的浓度值，单位为 copies/ μ L。根据待测样本和样本 ERC 的检测结果计算加样回收率，加样回收率要求在 50%-150%之间；

5) 根据分析软件给出的待测样品各检测点的浓度 (copies/ μ L)，通过稀释倍数回算出待测样品的实际浓度。

5.2 以 ABI7500 qPCR 仪、软件版本 2.4 为例：

1) 若需要调整阈值线，在 Analysis 的 Amplification Plot 面板中，将 FAM 通道、ROX 通道 Threshold 设置到超过本底信号波动位置，点击 Analyze；

2) 在 Setup 的 Plate Setup 面板中，将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard，并且在 Quantity 一栏分别赋值为 2×10^1 、 2×10^2 、 2×10^3 、 2×10^4 、 2×10^5 （单位为 copies/ μ L），并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5；

3) 将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC，将阴性对照样本 NCS 孔、待测样品孔、待测样品 ERC 孔的 Task 一栏设置为 Unknown，并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NCS-Reference、NCS-Target、1/x S-Reference、S-Target、ERC-Reference、ERC-Target；

4) 在 Analysis 的 Standard Curve 面板中，可读取标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Intercept)、 R^2 ；

5) 在 Analysis 的 View Well Table 面板中，Quantity 一栏可读取检测结果的浓度值，单位为 copies/ μ L。通过稀释倍数回算出待测样品的实际浓度。根据待测样本和样本 ERC 的检测结果计算加样回收率，加样回收率要求在 50%-150%之间。

并根据以下公式计算 rAAV 中 rcAAV 的污染率：

$$\text{污染率} = \text{Target 的检测值} \div (\text{Reference 的检测值} \times \text{稀释倍数} \div 2)$$

注：每个 rAAV 含有两个 Reference 基因

注：上述示例结果分析的参数设置仅供参考，具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定，一般也可由仪器自动判读。

【注意事项】

- 1、试剂盒应在-20℃以下保存。
- 2、实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，严格按照操作步骤执行，在操作过程中对时间、试剂体积等精确控制可以获得最好的结果。
- 3、核酸提取有关耗材确保洁净、无 DNase/RNase，提取过程尽量快速，完成后进入下一步实验或冷冻保存。
- 4、不要使用过期组分或者不同批次组分混合使用。
- 5、冻存试剂使用前应于室温下完全融化，瞬时离心使液体完全沉于管底。避免反复冻融，以免影响试剂性能。
- 6、要带新的一次性 PE 手套对反应管封盖，避免徒手或使用过的手套接触反应管底，检测过程中使用不带荧光物质一次性无粉乳胶手套。
- 7、实验室应严格按照有关规定分区管理，依照配液区→模板提取区→扩增区→分析区顺序进行基因检测。各区间人员、器材、试剂及空气流向应有严格要求。
- 8、样品、校准品等在使用后及时封盖，避免组分间及气溶胶等的污染造成假阳性。
- 9、扩增产物禁止开盖，实验产生的废弃物应及时收集，远离 PCR 实验室进行无害化处理。
- 10、如果样本中靶标为强阳性时，由于体系的竞争抑制，可能会对内标检测造成影响。
- 11、建议使用各仪器新版本的软件进行实验及数据分析。

【免责声明】

在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

【公司信息】

邮箱：marketing@biori.com.cn

网址：www.biori.com

