



AAV 血清型快速筛选试剂盒

一、产品概述

腺相关病毒 (AAV) 血清型种类繁多, 其中 11 种血清型常被作为基因治疗载体使用。不同的血清型有不同的组织亲嗜性, 选择合适的 AAV 血清型对后续实验的进行至关重要。以往, 研究人员使用不同血清型的 AAV 分别感染动物, 解剖后获得靶组织, 通过免疫染色筛选出最适 AAV 血清型。但该实验过程繁琐, 费时较长, 实验数据存在批次差异。为快速筛选出针对靶组织的最适 AAV 血清型, 维真生物研发出基于 Q-PCR 技术的 AAV 血清型快速筛选试剂盒。

本产品中 AAV mix 可同时感染靶组织或细胞。通过检测靶组织或细胞内 GFP 表达水平, 得到 AAV mix 的感染效果; 通过 Q-PCR 检测出感染能力最强的 AAV 血清型。一次感染实验即可筛选得到靶组织或细胞的最适 AAV 血清型, 有效地解决了原始筛选方法复杂费时费力等问题。

同时本公司还提供 AAV 血清型快速筛选试剂盒定制服务。我们已有 200 多种 AAV 血清型包装辅助质粒, 可根据客户需求, 选择除上述 11 种血清型之外的其他 AAV 血清型, 并定制专属的 AAV 血清型快速筛选试剂盒。

二、产品组分

2.1 含有 11 种血清型的 AAV mix, 滴度为 1×10^{13} vg/ml。

序号	AAV 血清型 mix	序号	AAV 血清型 mix
1	AAV1	7	AAV9
2	AAV2	8	AAV-DJ
3	AAV5	9	AAV-rh10
4	AAV6	10	AAV-PHP.EB
5	AAV7	11	AAV-Anc80
6	AAV8		

2.2 Q-PCR 引物。

组分	浓度	体积
引物-1 (AAV1)	10 μ M/ μ l	10 μ l
引物-2 (AAV2)	10 μ M/ μ l	10 μ l
引物-3 (AAV5)	10 μ M/ μ l	10 μ l
引物-4 (AAV6)	10 μ M/ μ l	10 μ l
引物-5 (AAV7)	10 μ M/ μ l	10 μ l
引物-6 (AAV8)	10 μ M/ μ l	10 μ l
引物-7 (AAV9)	10 μ M/ μ l	10 μ l
引物-8 (DJ)	10 μ M/ μ l	10 μ l
引物-9 (AAVrh10)	10 μ M/ μ l	10 μ l
引物-10 (PHP.EB)	10 μ M/ μ l	10 μ l
引物-11 (Anc80+AAP)	10 μ M/ μ l	10 μ l
GFP 引物	10 μ M/ μ l	10 μ l

注: 引物为正, 反向引物 mix。



三、操作流程



四、使用方法

4.1 体内注射及细胞感染

- 体内注射：建议注射剂量为 10E12vg/kg。不同的细胞或组织用量需根据前期实验摸索条件而定，AAV mix 最高用量可比平时用量多加 5 倍。
- 细胞感染：绝大多数细胞推荐感染剂量为 MOI=10E5。

4.2 组织处理与免疫染色

- 动物体内注射 3 周后，可解剖动物，获得靶组织。对部分靶组织进行免疫染色，检测 GFP 表达水平，或在荧光显微镜下观察组织切片是否有绿色荧光产生。同时，保存部分靶组织为后续 mRNA 提取及 Q-PCR 检测做准备。
- 感染细胞 72h 后，可使用荧光显微镜观察是否细胞内产生绿色荧光。
- 若通过免疫染色检测 GFP 完全没有表达，或在荧光显微镜下完全观察不到荧光，则考虑加大感染剂量。

4.3 mRNA 提取及逆转录

若靶组织或细胞中检测到 GFP 的表达，则使用 RNA 提取试剂盒（需自备）提取细胞或组织样品 RNA，使用逆转录试剂盒（需自备）将 1μg RNA 逆转录为 cDNA，定容至 100μl。

4.4 Q-PCR 法检测 GFP 的表达

使用 GFP 引物进行 Q-PCR 检测病毒感染后是否表达 GFP 蛋白。

反应体系：

成分	体积/μl
cDNA	4
GFP 引物	1
Q-PCR buffer	10
ddH ₂ O	5
总体积	20



扩增条件：

95°C	3 min	}	39 cycles
95°C	5 sec		
60°C	15 sec		
72°C	15 sec (收集荧光信号)		

请同时使用纯水为模板作为阴性对照。

注意：若通过免疫染色可在靶组织或细胞中检测到 GFP 的表达，则通过 Q-PCR 检测 GFP 时 Ct 值应小于 25。

4.5 Q-PCR 法检测各种血清型 AAV 病毒含量

使用本产品中 11 种引物对 11 种 AAV 血清型病毒同时进行 Q-PCR 检测，模板分别用 AAV mix（稀释 1000 倍）及样品 cDNA，反应按下表进行。

引物	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
cDNA											
AAV mix											

反应体系：

成分	体积/ μ l
AAV mix/cDNA	4
11 种引物之一	1
Q-PCR buffer	10
ddH ₂ O	5
总体积	20

扩增条件同步骤 4。

五、结果计算及分析

将 Q-PCR 实验所得 Ct 值对应填入下表，并按表中所示计算方式进行计算，最终的占比数值即为 AAV mix 中不同血清型病毒相对感染效率，数值越大则表示该种血清型的感染效率越高。计算步骤如下：

病毒样品	AAV1	AAV2	AAV5	...	Anc80+AAP	AAV mix (总病毒)
引物	引物-1	引物-2	引物-3		引物-11	GFP 引物
AAV mix Ct 值	A	B	C	...	K	Y
样品 cDNA Ct 值	a	b	c	...	k	y
效率系数 S	$S = (2^{-A} + 2^{-B} + 2^{-C} + \dots + 2^{-K}) / (2^{-a} + 2^{-b} + 2^{-c} + \dots + 2^{-k})$					
相对感染效率	$2^{A-a} * S$	$2^{B-b} * S$	$2^{C-c} * S$		$2^{K-k} * S$	



计算过程说明：

1、AAV1 在 AAV mix 中的占比

$$=2^{Y-A}/(2^{Y-A}+2^{Y-B}+2^{Y-C}+\dots+2^{Y-K})=2^Y*2^{-A}/2^Y*(2^{-A}+2^{-B}+2^{-C}+\dots+2^{-K})$$

$$=2^{-A}/(2^{-A}+2^{-B}+2^{-C}+\dots+2^{-K})$$

同理类推，

$$\text{AAV2 在 AAV mix 中的占比} = 2^{-B}/(2^{-A}+2^{-B}+2^{-C}+\dots+2^{-K})$$

$$\text{AAV5 在 AAV mix 中的占比} = 2^{-C}/(2^{-A}+2^{-B}+2^{-C}+\dots+2^{-K})$$

....

2、AAV1 在 cDNA 样品中的占比 = $2^{-a}/(2^{-a}+2^{-b}+2^{-c}+\dots+2^{-k})$

$$\text{AAV2 在 cDNA 样品中的占比} = 2^{-b}/(2^{-a}+2^{-b}+2^{-c}+\dots+2^{-k})$$

$$\text{AAV5 在 cDNA 样品中的占比} = 2^{-c}/(2^{-a}+2^{-b}+2^{-c}+\dots+2^{-k})$$

....

3、各种血清型病毒的相对感染效率 = cDNA 样品中的占比 / AAV mix 中的占比

$$\text{令 } S = (2^{-a}+2^{-b}+2^{-c}+\dots+2^{-k}) / (2^{-a}+2^{-b}+2^{-c}+\dots+2^{-k})$$

$$\text{AAV1 相对感染效率} = 2^{-a}/(2^{-a}+2^{-b}+2^{-c}+\dots+2^{-k}) / 2^{-A}/(2^{-A}+2^{-B}+2^{-C}+\dots+2^{-K})$$

$$= 2^{A-a} * (2^{-A}+2^{-B}+2^{-C}+\dots+2^{-K}) / (2^{-a}+2^{-b}+2^{-c}+\dots+2^{-k}) = 2^{A-a} * S$$

同理类推其余病毒的相对感染效率

六、保存条件

本产品 AAV mix 请于 -80°C 保存，开启后一个月之内有效。其他组分请于 -20°C 保存。

七、自备材料

RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒等。

八、常见问题

8.1 若免疫染色检测 GFP 无明显表达或荧光显微镜下观察不到绿色荧光，且用 GFP 引物进行 Q-PCR 检测 GFP 无明显表达（Ct 值大于 25，但与阴性对照有明显区别），则考虑因病毒用量太低或感染时间短导致。

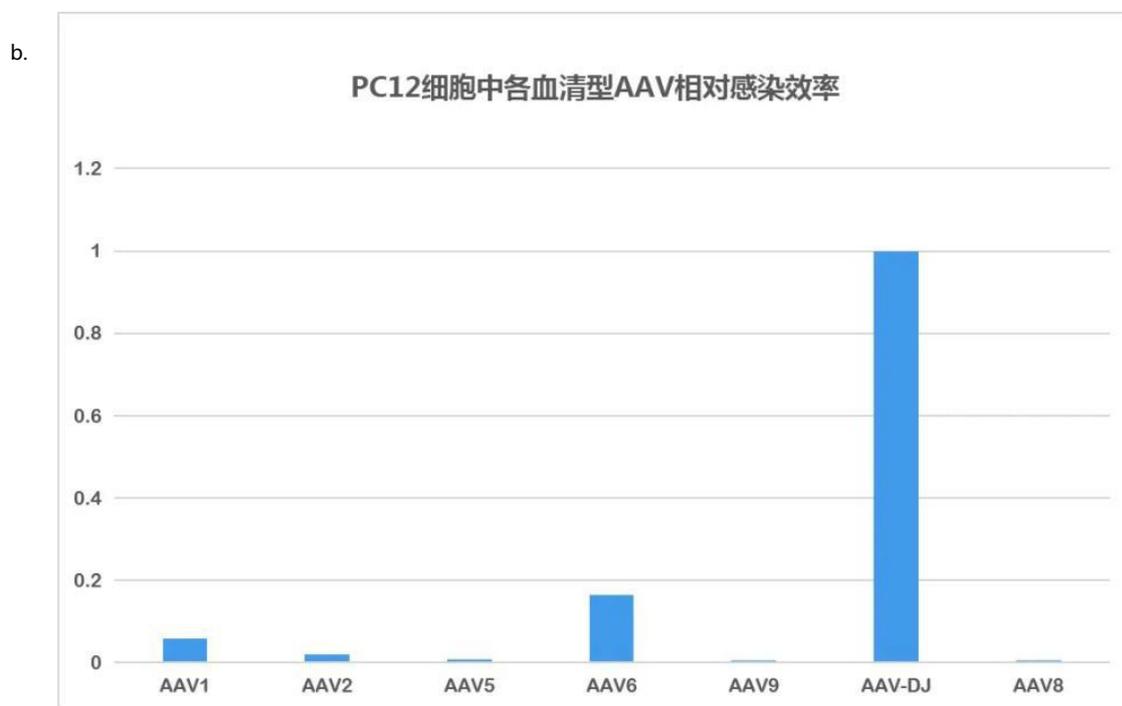
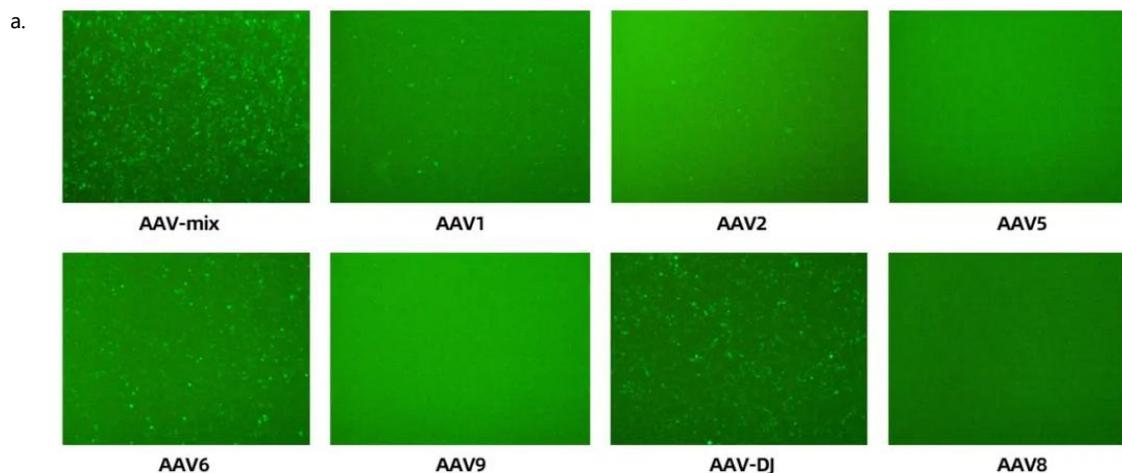
8.2 若免疫染色可检测到 GFP 表达或荧光显微镜下能观察到绿色荧光，但 GFP 引物检测 GFP 无表达（Ct 值与阴性对照一致），则考虑 RNA 提取和逆转录过程是否存在问题。

8.3 若增加病毒感染剂量后，Q-PCR 检测 GFP 仍完全无表达，荧光显微镜下完全不见绿色荧光，若实验操作无问题，则说明本产品中 11 种 AAV 血清型均不能感染该细胞或组织。

九、应用示例

9.1 体外实验

使用本产品中的 AAV mix(AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9, DJ)感染 PC12 细胞, MOI=5*10E5, 48h 后收集细胞;同时分别使用各个血清型 AAV 单独感染 PC12 细胞, MOI=1*10E5, 48h 后将细胞置于荧光显微镜下观察拍照,并收集细胞,用此试剂盒检测各病毒的感染效率,Q-PCR 结果显示 AAV-DJ 感染 PC12 细胞效果最好(图 1b),与荧光结果具有一致性(图 1a)。



9.2 体内实验

通过尾静脉注射 AAV mix 感染 4 周龄 C57 小鼠，注射病毒量为 1×10^{12} vg，2 周后取脑组织神经元进行检测。通过荧光显微镜观察脑组织冷冻切片，在大多数神经元细胞中均可观察到 GFP 表达（图 2a，右图放大）。用试剂盒通过 Q-PCR 分析不同血清型 AAV 的表达水平，可成功筛选出通过尾静脉注射感染小鼠大脑神经元组织最适 AAV 血清型为 PHP.EB 血清型（图 2b）。

