



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 AAVmix 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 AAVmix 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 AAVmix, 滴度为 5×10^{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.B
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.B)	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

2.3 Q-PCR buffer。



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，AAVmix 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 1μgRNA 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 qPCR 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
维真 qPCR 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 AAVmix (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											
AAVmix											

反应体系：

成分	体积/ μ l
AAVmix/cDNA	4
11 种引物之一	1
维真 qPCR 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 AAVmix 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	AAVmix (总病毒)
引物	引物-1	引物-2	引物-3		引物-11	GFP 引物
AAVmix 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 AAVmix 中的占比

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

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

同理类推，

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

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

....

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 / AAVmix 中的占比

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

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

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

同理类推其余病毒的相对感染效率

六、保存条件

本产品 AAVmix 请于 4°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。

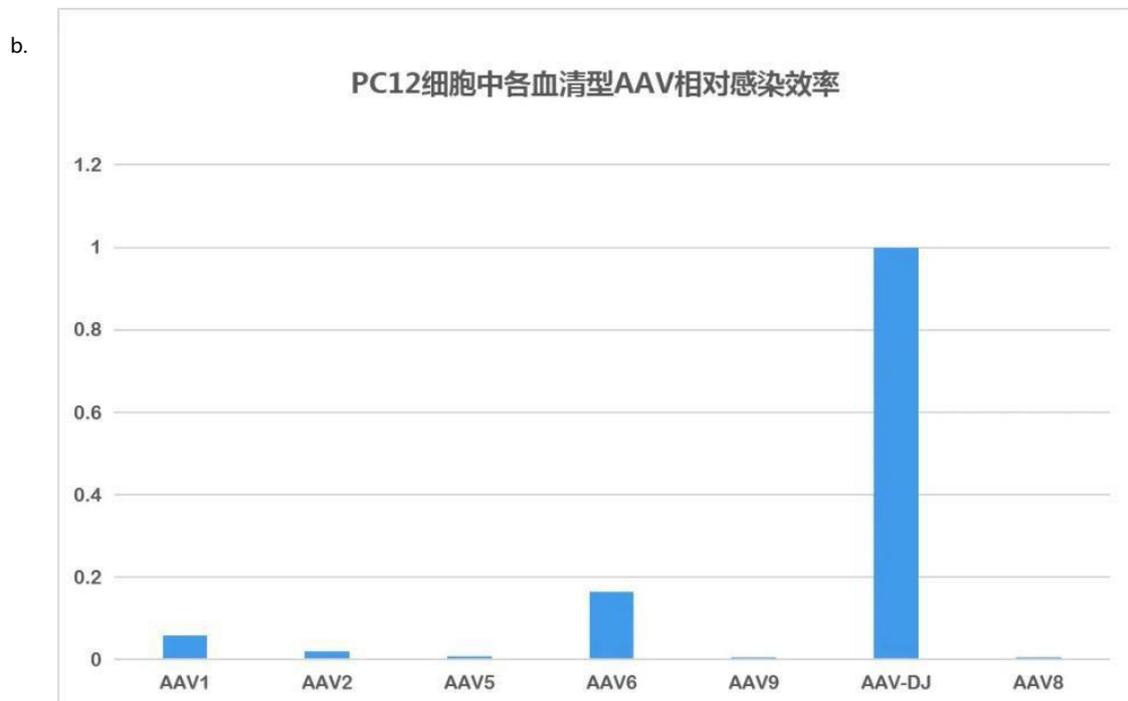
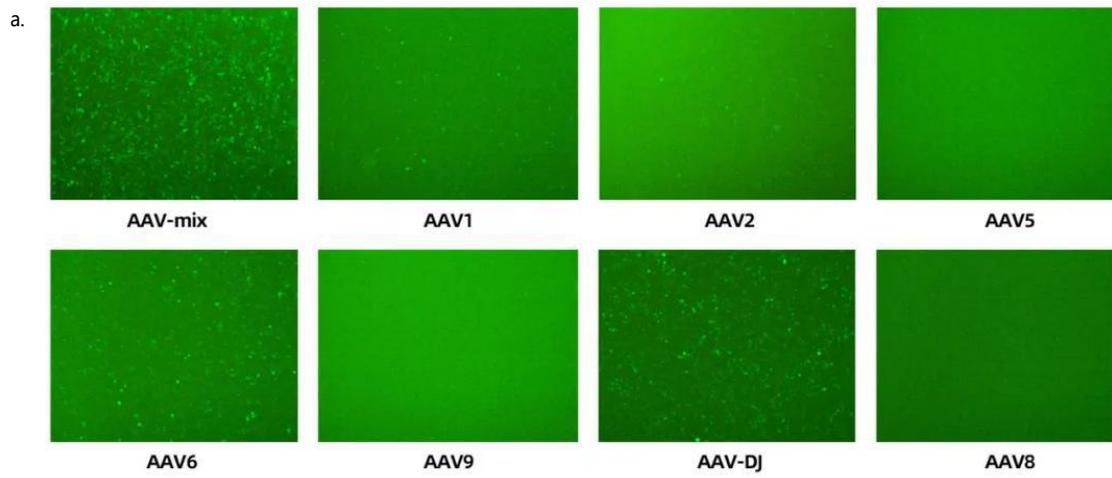
8.3 若增加病毒感染剂量后，Q-PCR 检测 GFP 仍完全无表达，荧光显微镜下完全不见绿色荧光，若实验操作无问题，则说明本产品中 11 种 AAV 血清型均不能感染该细胞或组织。



九、应用示例

9.1 体外实验

使用本产品中的 AAVmix(AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9, DJ)感染 PC12 细胞, MOI 5×10^5 , 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 1×10^5 , 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,qPCR 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 AAVmix 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.B 血清型（图 2b）。

