

腺相关病毒5(AAV5)滴度检测试剂盒

(酶联免疫分析法)

【产品名称】

腺相关病毒5(AAV5)滴度检测试剂盒

【规格】

96 Tests

【货号】

AAV-A005

【预期用途】

本试剂盒用于腺相关病毒5(AAV5)特异性滴度检测

【检测原理】

本试剂盒应用ELISA夹心法。微孔板预包被了Anti-AAV5 Antibody，样本中的AAV5与微孔板上固定的Anti-AAV5 Antibody结合，然后加入Biotin-Anti-AAV5 Antibody，形成抗体-抗原-生物素标记抗体复合物，最后加入Streptavidin-HRP，用底物显色，随后用终止液终止，板孔中溶液会由蓝色变为黄色，使用酶标仪在450 nm和630 nm处测定样品吸光度值（OD450nm 、OD630nm），OD450nm- OD630nm与样本中的AAV5含量呈正相关。

【产品组份】

表1.产品组份

ID	组份名称	规格 (96 T)	物理状态	存储条件	
				未开启	已开启
AAV05-C01	Pre-coated Anti-AAV5 Antibody Microplate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
AAV05-C02	AAV5 Standard	8.7E+10 capsids	冻干粉	2-8°C	-70°C
AAV05-C03	Biotin-Anti-AAV5 Antibody	20 µg	冻干粉	2-8°C	-70°C
AAV05-C04	Streptavidin-HRP	50 µL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
AAV05-C05	10xWashing Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
AAV05-C06	2xDilution Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
AAV05-C07	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
AAV05-C08	Stop Solution	7 mL	液体	2-8°C	2-8°C

【储存条件及有效期】

1. 未开封：试剂盒保存于2-8°C，有效期见外包装盒标签。
2. 已开封：试剂盒开封后各组分按照表1存贮条件保存，有效期自开封之日起为30天，未使用完的微孔板条需与干燥剂一起密封保存。

【需要但未提供的实验仪器与耗材】

1. 单道、多道微量移液器和移液器吸头：需满足10 µL、300 µL、1000 µL加样需求
2. 恒温培养箱
3. 酶标仪，含450 nm/630 nm波长
4. 离心管：1.5 mL，10 mL
5. 计时器
6. 试剂瓶
7. 超纯水或去离子水

【试剂准备】

使用前将所有试剂恢复至室温 (20°C-25°C)。如果溶液中有晶体形成，需平衡溶液至晶体完全溶解（可将溶液放置于恒温培养箱37°C平衡10-15 min）。

按照表2建议，用1xPBS将所提供的冻干品配制成存储溶液，在室温下溶解15至30分钟，轻轻吹吸混匀，避免剧烈摇动或涡旋。重构的存储液应在-70°C保存，建议AAV05-C02分装规格不低于40uL，冻融次数不要超过1次。建议AAV05-C03分装规格不低于5ug，冻融次数不要超过1次

表2. 配制方法

ID	组份名称	规格 (96 T)	重构体积Vol.	存储液浓度.
AAV05-C02	AAV5 Standard	8.7E+10 capsids	100 μ L 1xPBS	8.70E+11 capsids/mL
AAV05-C03	Biotin-Anti-AAV5 Antibody	20 μ g	100 μ L 1xPBS	200 μ g/mL

【检测流程】

1. 工作液配制

1.1 配制1×Washing Buffer:

取50 mL 10×Washing Buffer，用超纯水/去离子水稀释并定容至500 mL。

1.2 配制1×Dilution Buffer:

取50 mL 2×Dilution Buffer，用1×Washing Buffer稀释并定容至100 mL。

1.3 配制Biotin-Anti-AAV5 Antibody工作液:










用1×Dilution Buffer将Biotin-Anti-AAV5 Antibody储存液稀释至0.5ug/mL，需现用现配。

1.4 配制Streptavidin-HRP工作液:

用1×Dilution Buffer将Streptavidin-HRP进行2000倍稀释, 该工作液避光保存, 需现用现配。

2. 制备标准曲线

复溶后标准品(AAV05-C02)的浓度为 **8.70E+11 capsids/mL**, 取 10 μ L 的标准品储存液, 加入 490 μ L 的稀释液, 作为 Std.-0, 然后取 Std.-0 溶液 50 μ L, 加入到 750 μ L 的稀释液中, 作为标准曲线最高浓度 **Std.-1(1.09E+9 capsids/mL)**。在后续每一个离心管中加入 300 μ L 稀释液, 使用高浓度标准品做 1:1 系列稀释。每次移液时, 确保充分混匀。以稀释液作为标准曲线的零浓度。

Tubes/ Solution Code	Standard stock solution	Std.-0	Std.-1	Std.-2	Std.-3	Std.-4	Std.-5	Std.-6	Std.-7
Operating									
Solution Con.	8.70E+11 capsids/mL	1.74E+10 capsids/mL	1.09E+9 capsids/mL	5.44E+8 capsids/mL	2.72E+8 capsids/mL	1.36E+8 capsids/mL	6.80E+7 capsids/mL	3.40E+7 capsids/mL	1.70E+7 capsids/mL
Dilution Buffer Vol.		490 μ L	750 μ L	300 μ L	300 μ L	300 μ L	300 μ L	300 μ L	300 μ L

3. 加样

将待测样品和系列稀释后的标准品 (Std.-1 ~ Std.-7) 加入反应孔内, 每孔加入 100 μ L, 空白对照孔加入 100 μ L 1×Dilution Buffer。

注：待测样品和标准曲线建议设置复孔。

4. 孵育

用封板膜封板，室温孵育 1.0 h。

5. 洗板

小心揭开封板膜。弃去孔中液体，每孔加入 300 μ L 1 \times Washing Buffer，浸泡 30 s，共洗板 3 次。

6. 加 Biotin-Anti-AAV5 Antibody

在对应板孔内加入 100 μ L 的 **Biotin-Anti-AAV5 Antibody (稀释至 0.5 μ g/mL)**工作液，该工作液现用现配，依次重复操作步骤 4 及步骤 5。

7. 加 Streptavidin-HRP

在对应板孔内加入 100 μ L 的 **Streptavidin-HRP (1:2000 稀释)**工作液，该工作液现用现配，依次重复操作步骤 4 及步骤 5。

8. 显色

将微孔板拍干，每孔加入 100 μ L Substrate Solution。用封板膜封板，室温避光孵育 20 min。

9. 终止

每孔加入 50 μ L Stop Solution，轻轻震荡酶标板至混合均匀。

注：孔中液体由蓝色变为黄色。

10. 读数

用酶标仪测定各孔在 450 nm 和 630 nm 波长的吸光值，请在终止后 5 分钟内读数。

注：各孔 OD_{450 nm} 扣除 OD_{630 nm} 读值可降低背景干扰。

【结果分析】

1. 标准曲线 R^2 应大于 0.9900，检测范围为 $1.70E+7-1.09E+9$ capsids/mL。
2. 如果待测样品 OD 值超过标准曲线最高点，需将待测样品用样品稀释液进行稀释并重新测定。
3. 将标准曲线和待测样品的 OD 值，扣减空白孔的 OD 值后得到校准的吸光度值。以标准品的浓度为横坐标，用校准的吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。利用四参数拟合进行绘制标准曲线并进行样品浓度的计算。若使用直线拟合，需选取合适的作图区间绘制标准曲线，以保证浓度计算的准确性。

【注意事项】

1. 本产品仅供科研使用，不能用于治疗 and 诊断。
2. 请严格按使用说明进行操作。
3. 不可与其他厂家试剂混用。本试剂盒不同批号的试剂不能混用。
4. 使用前各组份需平衡至室温，保证溶液晶体全部溶解。请在结净的环境下进行操作使用。
5. 试剂盒请在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存，请勿使用过有效期的试剂盒。

【TYPICAL DATA】

每次实验，每块酶标板都需要设置标准曲线，具体 OD 值可能因不同实验室、实验员或设备而不同，以下 Example 数据仅供参考。

AAV5 Standard (capsids/mL)	OD450-630nm
1.09E+09	2.179
5.44E+08	1.366
2.72E+08	0.753
1.36E+08	0.421
6.80E+07	0.227
3.40E+07	0.137
1.70E+07	0.097
0	0.050

