

Code No. 6233

研究用

---

**TAKARA**

AAVpro<sup>®</sup> Titration Kit  
(for Real Time PCR) Ver.2

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	2
● 制品内容	3
● 保 存	4
● 试剂盒以外所需器具及试剂	4
● 操作注意事项	4
● 实验操作	4
● 定量原理	7
● 实验例	7
● 关联产品	8

### **Safety & Handling of Adeno-associated Virus Vectors**

The protocols in this User Manual require the handling of adeno-associated virus vectors. It is imperative to fully understand the potential hazards of and necessary precautions for laboratory use of these vectors.

Viruses produced with AAV-based vectors could, depending on your gene insert, be potentially hazardous. Similar vectors have been approved for human gene therapy trials, attesting to their potential ability to express genes *in vivo*. For these reasons, due caution must be exercised in the production and handling of any recombinant viruses.

Follow all applicable guidelines for research involving recombinant DNA. Take appropriate safety measures when producing or handling recombinant adeno-associated viruses, including working in a biological safety cabinet and wearing protective laboratory coats, face protection, and gloves.

#### **Available AAVpro Products**

AAVpro <sup>®</sup> Helper Free System (AAV2)	Code No. 6230
AAVpro <sup>®</sup> Purification Kit (AAV2)	Code No. 6232
AAVpro <sup>®</sup> Purification Kit Maxi (All Serotypes)	Code No. 6666
AAVpro <sup>®</sup> Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2	Code No. 6233
AAVpro <sup>®</sup> Extraction Solution	Code No. 6235
pAAV-ZsGreen1 Vector	Code No. 6231
AAVpro <sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase)	Code No. 6652
AAVpro <sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-LacZ)	Code No. 6655
AAVpro <sup>®</sup> Tet-One™ Inducible Expression System (AAV2)	Code No. 634310

## ● 制品说明

本制品是本公司特别研发的利用 Real Time PCR 对腺相关病毒 (AAV) 的滴度进行定量的试剂盒。试剂盒中含有从产生 AAV 病毒的包装细胞中提取 AAV 病毒及利用 Real Time PCR 对病毒基因组进行定量的所有试剂。同以往的 DNA 印迹法和 ELISA 法相比, 可以更准确、更快速地 (2.5 小时以内) 获得实验结果。本制品以两末端存在的 ITR (Inverted Terminal Repeat) 为目的基因对 AAV 病毒基因组进行检测, 可在宽广的范围进行 AAV 病毒的滴度测定。本试剂盒改进了 Positive Control 稳定性。

### AAV 载体

AAV 是属于微小病毒科依赖病毒属的无包膜病毒, 在辅助病毒诸如腺病毒及疱疹病毒等存在条件下, AAV 能复制产生子代病毒颗粒。AAV 对人的致病性目前还不清楚, 但其化学、物理性状非常稳定。AAV 基因组是分子量为 4.7 kb 的一个线性、单链 DNA 分子, 在其两末端存在有被称为 ITR 的 T 字型发夹结构。AAV 载体利用上述 AAV 特性, 用于培养细胞及动物的基因转染。AAV 载体不仅是研究工具, 同时作为病毒载体也有效用于基因治疗。使用 AAVpro Helper Free System (AAV2) (Code No. 6230) 时不需要使用辅助病毒, 只需将含必需元件的质粒转染 HEK293 细胞即可制备 AAV2 病毒。

### 使用本制品可测定的 AAV

AAV 的血清型取决于制备病毒时使用的 pRC 载体质粒中编码的 Cap 基因的种类。而 AAV 病毒粒子中插入的病毒基因组包含 AAV2 的 ITR 序列, 与血清型无关。本制品是以 AAV2 的 ITR 为目的基因进行病毒基因组定量的试剂盒, 如果病毒粒子中插入的病毒基因组的 ITR 区域是 AAV2 来源的, 无论是哪一种血清型都可以使用本制品。确认使用的 AAV 载体的 ITR 区域是 AAV2 来源后再使用本制品。

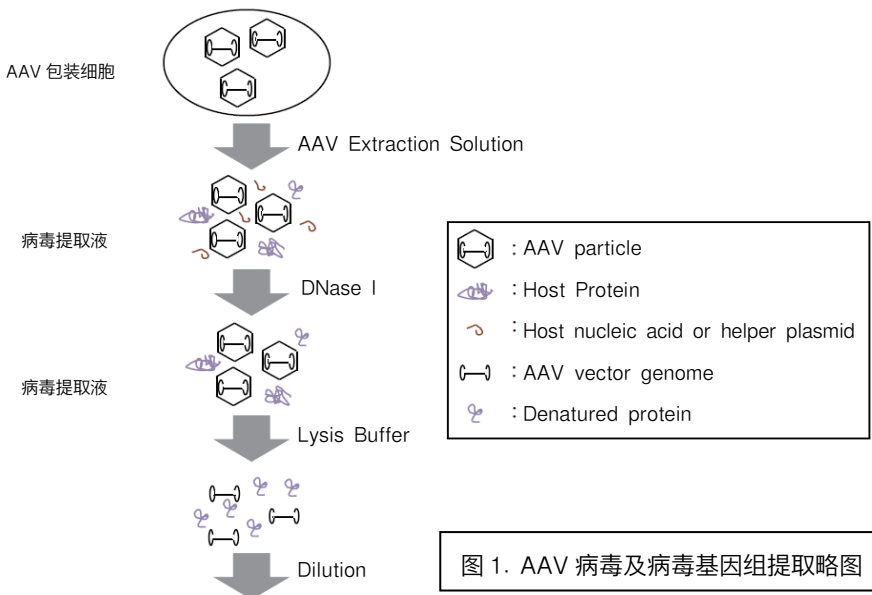
### AAV 基因组的简易提取法

#### A. 使用 AAV Extraction Solution 提取 AAV 病毒

以往从 AAV 包装细胞制备病毒时, 使用冻融法或超声波破碎法, 但使用这两种方法时必须准备液氮或超声波破碎仪。本制品使用本公司特别研发的 AAV Extraction Solution, 可有效抑制宿主来源的蛋白质及核酸的混入, 可高效、简便地提取 AAV 病毒。另外, 冻融法获得的 AAV 病毒也可使用本制品进行滴度测定。

#### B. 从 AAV 病毒提取液中提取 AAV 基因组

AAV 病毒提取液中含有病毒包装细胞来源的蛋白质及核酸。使用核酸酶去除游离核酸, 使用 Lysis Buffer 使蛋白质变性, 即可简单地提取目的病毒基因组。



利用 Real Time PCR 进行病毒基因组定量

## Real Time PCR 法

Real Time PCR 法是对 PCR 扩增过程中的荧光物质进行实时监测，是一种具有快速性和定量性优点的基因检测方法。本制品中含有的 TB Green *Premix Ex Taq II* 是使用 TB Green 进行嵌合荧光染料法的 Real Time PCR 用试剂。

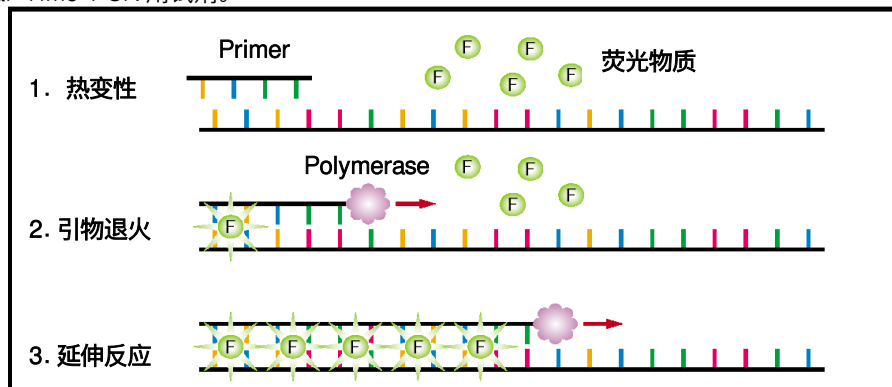


图 2. 嵌合荧光染料法原理

在反应液中加入与双链 DNA 结合的荧光试剂，通过 PCR 反应生成双链 DNA，荧光染料与双链 DNA 结合发出荧光，通过检测荧光可以检测反应体系中的 DNA 扩增量。

## ● 制品内容

### 1. AAV 病毒提取

AAV Extraction Solution A	1.5 ml × 2
AAV Extraction Solution B	300 μl

### 2. AAV 基因组简易提取 (100 次量)

DNase I	100 μl
10X DNase I Buffer	200 μl
Lysis Buffer	1 ml × 2

### 3. Real Time PCR 反应 (25 μl 反应 × 100 次量)

TB Green <i>Premix Ex Taq II</i> (Tli RNaseH Plus)	625 μl × 2
AAV Forward Titer Primer	20 μl
AAV Reverse Titer Primer	20 μl
dH <sub>2</sub> O <sup>*1</sup>	1 ml × 3
ROX Reference Dye <sup>*2</sup>	50 μl
ROX Reference Dye II <sup>*2</sup>	50 μl
Positive Control	50 μl
EASY Dilution (for Real Time PCR)	1 ml × 5

\*1: dH<sub>2</sub>O 也用于 DNase I 反应中。

\*2: 用于 Applied Biosystems 等的 Real Time PCR 仪，用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。

#### ◆ 添加 ROX Reference Dye 的仪器

- StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

#### ◆ 添加 ROX Reference Dye II 的仪器

- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

#### ◆ 不需要添加 ROX Reference Dye 的仪器

- Thermal Cycler Dice™ Real Time System 系列 (Code No. TP900/TP960: 终卖, 等)

## ● 保 存

- TB Green *Premix Ex Taq* II 4°C可保存 6 个月。避光保存，避免污染。  
**注意：**长期保存请置于-20°C。产品融解后请于 4°C保存，并在 6 个月内用完。
- AAV Extraction Solution A、B 及 Lysis Buffer 于-20°C保存；融解后请于室温保存。
- 其它组分请于-20°C保存。TB Green *Premix Ex Taq* II 以外的组分请在 2 年内用完。

## ● 试剂盒以外所需器具及试剂

- 细胞培养所需设备
- 转染用试剂（如 CalPhos™ Mammalian Transfection Kit, Code No. 631312; Xfect™ Transfection Reagent, Code No. 631317）
- 0.5 M EDTA (pH8.0) (EDTA Buffer Powder, pH8.0 (Code No.T9191))
- Heat Block (37°C、70°C、95°C)  
※ AAV 基因组提取时，使用 Thermal Cycler 十分便利。
- Real Time PCR 扩增仪及专用反应管  
Thermal Cycler Dice Real Time System II (Code No. TP900/TP960: 终卖)  
Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760: 终卖)  
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)  
StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) 等

## ● 操作注意事项

下面是使用本制品时的注意事项，使用前请认真阅读。

1. 试剂盒中附带从 AAV 包装细胞提取 AAV 病毒、从 AAV 病毒提取基因组及进行 Real Time PCR 反应时所需试剂。
2. 附带的 Primer 于-20°C保存，不可混合或稀释，反应前现配制 Primer mix。
3. 将各种试剂（dH<sub>2</sub>O、Buffer、酶等）配制成混合液后，分装到每个反应管中。这样，可使所取的试剂体积更准确，减少试剂损失，避免重复分取同一试剂。同时也可以减少实验操作或实验样品之间产生的误差。
4. TB Green *Premix Ex Taq* II 使用前轻微离心，使试剂集中至管底，因 TB Green *Premix Ex Taq* II 粘性大，请仔细缓慢吸取。
5. 分装试剂时必须使用新的一次性枪头，防止样品间污染。
6. 反应液的配制、检测样品的制备及向反应液中添加检测样品要尽量分区操作。严禁从 Tube 管中取出扩增产物。本制品使用 Real Time PCR 法，扩增反应与检测同时进行，反应后的扩增产物不需要再进行电泳。

## ● 实验操作

以下操作流程包括从 AAV 包装细胞提取 AAV 病毒的操作步骤。已获得 AAV 病毒，需要进行滴度测定时，请从操作步骤 B 开始。

### A. 提取 AAV 病毒

下面是从一个 10 cm 培养皿培养的 AAV 包装细胞中提取 AAV 病毒的操作流程。不同类型培养器皿所需的溶液体积请参考表 1。

1. 在 10 cm 培养皿培养的含 AAV 包装细胞的培养液(10 ml 培养液)中加入 125 μl 的 0.5 M EDTA (pH8.0) (1/80 细胞培养液体积量)。不同培养皿添加溶液量请参考表 1。室温反应 10 分钟。
2. 剥离细胞，回收至 15 ml 灭菌离心管中。
3. 1,750g、4°C离心 10 分钟后，弃上清，回收细胞沉淀物。

注 1: 如果有上清液残留会影响病毒提取的操作，确认完全去除上清液后再进行下一步操作。

4. 轻弹或 vortex 振荡细胞沉淀物，使沉淀物完全松散。  
注 2: 细胞沉淀物如果不完全松散，提取效率会下降。确认无细胞团块后再进行下一步操作。
5. 加入 0.5 ml AAV Extraction Solution A。
6. vortex 振荡 15 秒悬浮细胞。
7. 室温静置 5 分钟，再 vortex 振荡 15 秒悬浮细胞。
8. 2,000~14,000g 4℃离心 10 分钟。  
注 3: 如果回收的 AAV 病毒滴度低，重复上述 6~8 的操作步骤，可提高提取效率。
9. 将上清液回收至新的灭菌离心管中，加入 50 μl AAV Extraction Solution B，吸打混合。  
注 4: 此时可-80℃保存。-80℃保存时，使用前需要在 37℃水浴锅中快速融解。  
注 5: 在加入 AAV Extraction Solution B 后，上清液可能会变为粉色。

表 1. 使用各种培养皿时所需要的溶液量

	培养液量	0.5 M EDTA (pH8.0)	AAV Extraction Solution A	AAV Extraction Solution B
6-cm dish	4 ml	50 μl	200 μl	20 μl
10-cm dish	10 ml	125 μl	500 μl	50 μl
15-cm dish	26 ml	325 μl	1,300 μl	130 μl
T25 flask	4 ml	50 μl	250 μl	25 μl
T75 flask	13 ml	162.5 μl	650 μl	65 μl
T225 flask	40 ml	500 μl	2,000 μl	200 μl

#### B. 提取 AAV 基因组

1. 在制备的 AAV 病毒提取液中如下所示添加 DNase I 配制成混合液后，37℃反应 15 分钟以上，去除游离的基因组及质粒 DNA。

AAV 病毒提取液	2 μl
10X DNase I Buffer	2 μl
DNase I	1 μl
dH <sub>2</sub> O	15 μl
Total	20 μl
2. 95℃热处理 10 分钟，使 DNase I 失活。
3. 在上述 2 的 20 μl 样品中加入等量的 Lysis Buffer。
4. 70℃热处理 10 分钟。
5. 使用 EASY Dilution (for Real Time PCR) 稀释获得的 AAV 基因组提取液至 50 倍以上，以此稀释液为模板进行 Real Time PCR 反应，对基因组 DNA 进行定量。

#### C. Real Time PCR 反应

从 B.制备的 DNA 溶液中取 5 μl 作为模板进行 Real Time PCR 反应。同时用标准品制作标准曲线。

##### 1. 标准曲线用标准品的制备

使用 EASY Dilution 梯度稀释 Positive Control 后作为标准曲线用标准品。(进行 Real Time PCR 反应时，每个反应分别使用 5 μl。)

- (1)  $2 \times 10^7$  copies/μl (Positive Control 原液)
- (2)  $2 \times 10^6$  copies/μl (Positive Control 原液 5 μl + EASY Dilution 45 μl)
- (3)  $2 \times 10^5$  copies/μl ( $2 \times 10^6$  copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl)
- (4)  $2 \times 10^4$  copies/μl ( $2 \times 10^5$  copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl)
- (5)  $2 \times 10^3$  copies/μl ( $2 \times 10^4$  copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl)
- (6)  $2 \times 10^2$  copies/μl ( $2 \times 10^3$  copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl)

2. 配制 50X Primer mix

按照下面的组分配制 50X Primer mix。50X Primer mix 的所需量现用现配，不能保存。

AAV Forward Titer Primer	5 $\mu$ l
AAV Reverse Titer Primer	5 $\mu$ l
TE 或 dH <sub>2</sub> O	15 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

3. 配制反应液

按照下面的组分在冰上配制反应液。

将下列组分除模板外配成所需管数+ $\alpha$ 的混合液后，向每个0.2 ml microtube中添加20  $\mu$ l混合液，轻轻盖上盖子。其中一个microtube作为阴性对照加5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O后，盖紧盖。

【使用Thermal Cycler Dice Real Time System时】

试剂	使用量
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (2X conc.)	12.5 $\mu$ l
50X Primer mix	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	7.0 $\mu$ l
模板	(5.0 $\mu$ l)
Total	25.0 $\mu$ l

【使用Applied Biosystems的Real Time PCR仪时】

试剂	使用量
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (2X conc.)	12.5 $\mu$ l
50X Primer mix	0.5 $\mu$ l
ROX Reference Dye或ROX Reference Dye II*	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	6.5 $\mu$ l
模板	(5.0 $\mu$ l)
Total	25.0 $\mu$ l

\*: StepOnePlus 使用 ROX Reference Dye, Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System 使用 ROX Reference Dye II。

4. 添加模板 (DNA 溶液)

在上述3的分装液中加入5  $\mu$ l检测样品DNA溶液或标准品，盖紧盖。0.2 ml反应管用小型离心机轻微离心后，放置于Real Time PCR仪上。

[注意]不要直接用手触摸microtube表面，以免影响荧光信号的收集。

5. 开始 Real Time PCR 反应

**注:** 按照下面的条件进行 Real Time PCR 反应。

※ Real Time PCR 仪的操作方法请参照仪器的使用说明书。

预变性

95°C 2 min.

2 Step PCR

35 Cycles

95°C 5 sec.

60°C 30 sec. (荧光检测: FAM)

融解曲线分析



## ● 定量原理

制品中自带的 Positive Control 是插入了 ITR 序列的质粒 DNA，根据 OD<sub>260</sub> 值换算后调整至  $2 \times 10^7$  copies/ $\mu$ l。Positive Control 梯度稀释后作为标准品可进行定量分析。因 Positive Control 插入的 ITR 拷贝数与 AAV 病毒基因组上的 ITR 拷贝数相同，因此从获得的定量值可以直接换算病毒基因组量(vg/ml 和 vg/cell)。

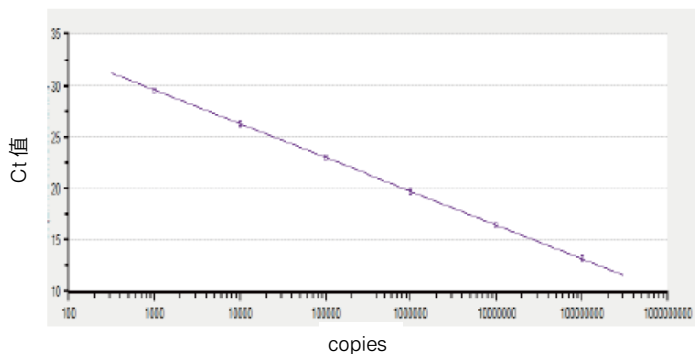


图 3. 使用阳性对照 (Positive Control) 制作标准曲线例

## ● 实验例

实验例 1: 以 ITR 及其它区域为目的基因时，病毒基因组定量结果的比较

以 ITR 区域为目的基因(本制品) 及以 AAV 中存在的其它区域为目的基因进行了 Real Time PCR 反应并对定量结果进行了比较分析。

### 【实验方法】

分别制备包装 AAV1、AAV2、AAV6 的 HEK293 细胞后，使用 AAV Extraction Solution 从制备的细胞中提取 AAV 病毒并进行了 Real Time PCR 定量分析。目的扩增片段分别为 ITR 和 AAV 上的 CMV promoter，对 Real Time PCR 反应获得的定量值进行了比较。定量结果如图 4 所示。

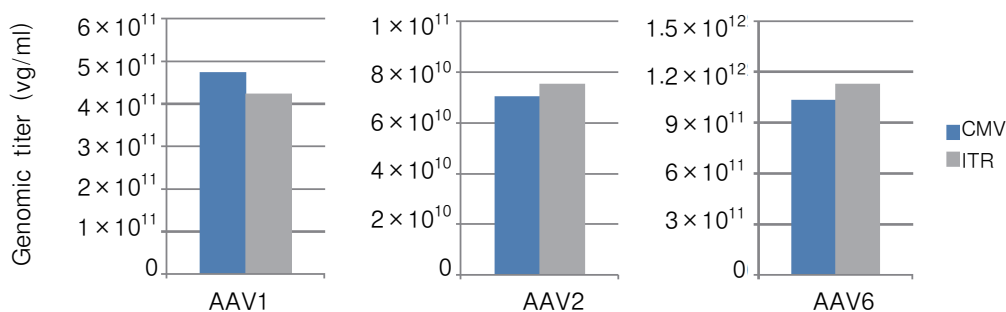


图 4. 以 ITR 和 CMV promoter 为目的基因进行定量测定 AAV 滴度

无论以 ITR 为目的基因，还是以 CMV promoter 为目的基因，二者的滴度大致相同。

实验例 2: 与冻融法的比较实验

使用 AAV Extraction Solution 和冻融法从制备的细胞中提取 AAV 病毒，进行提取结果比较。

### 【实验方法】

分别制备包装 AAV1、AAV2、AAV6 的 HEK293 细胞，使用 AAV Extraction Solution 和冻融法从制备的细胞中提取 AAV 病毒进行了 Real Time PCR 定量分析。定量结果如图 5 所示。

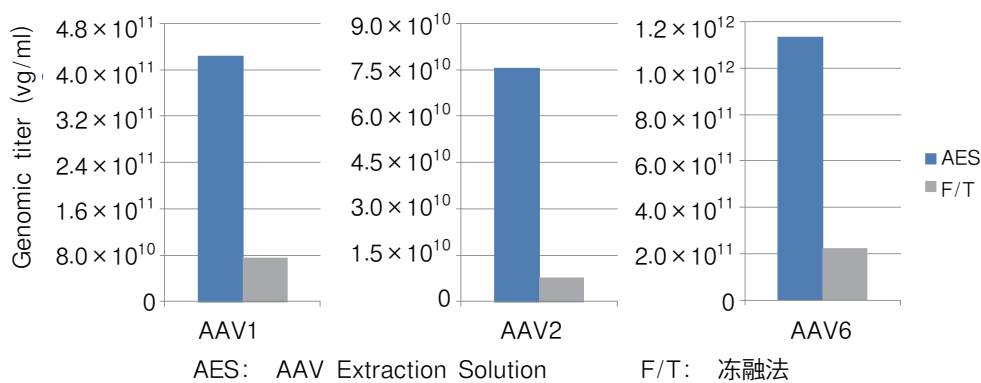


图 5. 使用 AAV Extraction Solution 和冻融法提取的 AAV 滴度

从以上结果可以表明：使用以往的冻融法制备的 AAV 病毒也可利用本制品进行滴度测定。同时，表明使用 AAV Extraction Solution 提取 AAV 病毒的效率更高。

## ● 关联产品

- AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2) (Code No. 6230)
- pAAV-ZsGreen1 Vector (Code No. 6231)
- AAVpro<sup>®</sup> Purification Kit (AAV2) (Code No. 6232)
- AAVpro<sup>®</sup> Purification Kit Maxi (All Serotypes) (Code No. 6666)
- AAVpro<sup>®</sup> Extraction Solution (Code No. 6235)
- AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase)(Code No. 6652)
- AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-LacZ)(Code No. 6655)
- AAVpro<sup>®</sup> Tet-One™ Inducible Expression System (AAV2)(Code No. 634310)
- EASY Dilution (for Real Time PCR) (Code No. 9160)

AAVpro and TB Green are registered trademarks of Takara Bio Inc.

Premix Ex Taq and Thermal Cycler Dice are trademarks of Takara Bio Inc.

Xfect, CalPhos, and Tet-One are trademarks of Takara Bio USA, Inc.

### 注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日生物技术有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

**TAKARA BIO INC.**

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>