

TransLv™ Lentivirus qPCR Titration Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: FV201

保存: -20°C避光保存一年。

产品说明

TransLv™ Lentivirus qPCR Titration Kit提供了一种利用qPCR方法检测慢病毒转导细胞中整合的前病毒序列拷贝数的方法。该方法简单快速、灵敏高效,兼容第二代和第三代HIV-1慢病毒包装载体。慢病毒包装后转导易感细胞(如HT1080, HEK-293T等),提取慢病毒转导细胞基因组,进行qPCR反应,通过标准曲线Cq值计算整合的前病毒拷贝数,进而得到确定的慢病毒滴度。

特点

- 操作简单、灵敏度高。
- 提供内参基因作为参照,测得慢病毒滴度更准确。
- 兼容第二代和第三代HIV-1慢病毒包装载体。
- 检测范围广,标准曲线在 10^3 - 10^8 copies/ μ l范围内呈良好的线性关系。

试剂盒组成

Component	FV201-01 (100 rxns)
2×TransLv™ Lentivirus qPCR Titration SuperMix	1 ml
10×GC Enhancer	200 μ l
Provirus Gene Standards (P1-P6) (10^8 - 10^3 copies/ μ l)	30 μ l each
Reference Gene Standards (R1-R6) (10^8 - 10^3 copies/ μ l)	30 μ l each
Provirus Gene Primer Mix (5 μ M)	100 μ l
Reference Gene Primer Mix (5 μ M)	100 μ l
Passive Reference Dye (50×)	40 μ l
Nuclease-free Water	1 ml

实验步骤

自备

Product Name	Catalog
EasyPure® Genomic DNA Kit	TransGen, Cat. EE101
TransLv™ Lentivirus Precipitation Solution	TransGen, Cat. FV101

A、慢病毒转导细胞

慢病毒包装完成后,为保证较高的病毒转导效率,建议利用慢病毒浓缩试剂进行浓缩,推荐使用TransLv™ Lentivirus Precipitation Solution(目录号:FV101)。慢病毒滴度测定细胞建议选用易感细胞(如HT1080, HEK-293T等)作为转导靶细胞,转导后48-72小时收取细胞,制备基因组样本。

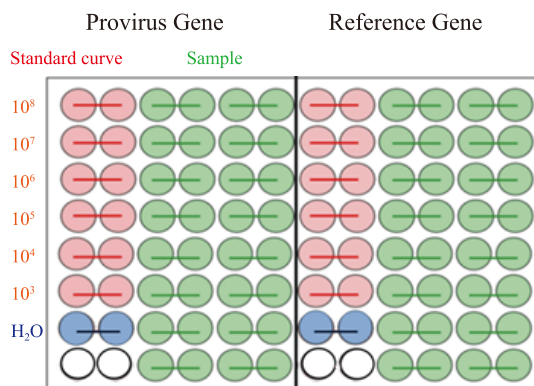
B、细胞基因组样品的制备

按照实验需求提取慢病毒感染后细胞的基因组,可根据基因组提取量稀释至5-100 ng/ μ l,也可根据实际提取情况适当调整模板浓度,使拷贝数处于 10^3 - 10^8 copies/ μ l范围内,第一次使用可以设置浓度梯度进行摸索。推荐使用EasyPure® Genomic DNA Kit(目录号:EE101)进行基因组提取。



C、前病毒序列扩增

提取的细胞基因组和两组标准品在同一程序上进行qPCR反应，每个样品至少两个平行。



(1) 推荐qPCR反应体系

Component	Volume
Template	2 μ l
Primer Mix (5 μ M)	1 μ l
2 \times TransLv™ Lentivirus qPCR Titration SuperMix	10 μ l
10 \times GC Enhancer	2 μ l
Passive Reference Dye (50 \times) (optional)	0.4 μ l
Nuclease-free Water	Variable
Total Volume	20 μ l

Passive Reference Dye适用机型

- Passive Reference Dye I (50 \times)
ABI Prism 7000/7300/7700/7900, ABI Step One, ABI Step One Plus, ABI 7900HT, ABI 7900HT Fast
- Passive Reference Dye II (50 \times)
ABI Prism 7500, ABI Prism 7500 Fast, ABI QuantStudio Dx/3/5, ABI QuantStudio 6/7/12K Flex, ABI ViiA 7, Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000
- No Passive Reference Dye
Roche LightCycler 480, Roche Light Cycler 96, MJ Research Chromo4, MJ Research Opticon 2, Takara TP-800, Bio-Rad iCycler iQ, Bio-Rad iCycler iQ5, Bio-Rad CFX96, Bio-Rad C1000 Thermal Cycler, Thermo Scientific Pikoreal 96, Qiagen Corbett Rotor-Gene 6000, Qiagen Corbett Rotor-Gene G, Qiagen Corbett Rotor-Gene Q, Qiagen Corbett Rotor-Gene 3000, Mastercycler ep realplex

(2) 推荐qPCR反应条件

50 $^{\circ}$ C 2 min
 95 $^{\circ}$ C 5 min
 95 $^{\circ}$ C 15 sec
 60 $^{\circ}$ C 30 sec ★ } 35-40 cycles
 Dissociation Stage



对于ABI仪器，荧光信号采集步骤的时间如下

- ★使用ABI Prism7000/7300时，采集时间设定为31秒；
- ★使用ABI Prism7500时，采集时间设定为34秒。

D、数据分析

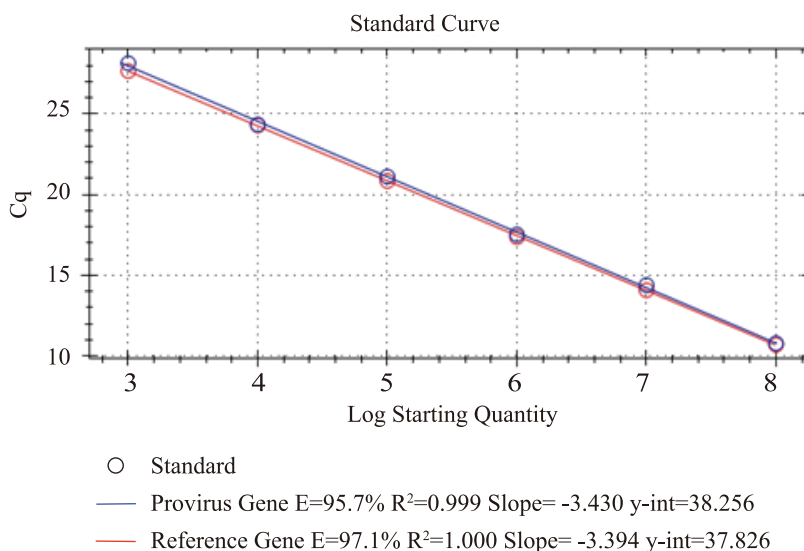
- (1) 根据标准曲线确定样品基因组对应的拷贝数。
- (2) 依据下述计算公式计算得到慢病毒的滴度。

每个细胞整合慢病毒拷贝数 = (Provirus Gene拷贝数的均值 ÷ Reference Gene拷贝数的均值) × 2

慢病毒滴度 (IU/ml) = 每孔接种细胞数 × 每个细胞整合慢病毒拷贝数 ÷ 慢病毒液使用体积 (ml)

应用举例

1、以12孔板为例，取浓缩的慢病毒0.5 μl、5 μl和50 μl转导HEK-293T细胞 (1×10⁵个/孔，12孔板)，72小时后提取细胞基因组，按照上述操作流程进行qPCR扩增反应(如图所示)。



上图表示Provirus Gene (蓝色)和Reference Gene (红色)以各标准品对应的Cq值为纵坐标，相应拷贝数Log值为横坐标绘制的标准曲线，其中Provirus Gene R²=0.999，扩增效率为95.7%；Reference Gene R²=1.000，扩增效率为97.1%。

2、根据扩增曲线计算慢病毒滴度

Volume (μl)	0.5	5	50
Quantity mean of Provirus Gene	4766.357247	44434.476404	856284.4205
Quantity mean of Reference Gene	34936.87539	30825.52798	28223.79423
Lentivirus copies of per cell	0.27	2.88	60.68
IU/ml	5.46E+07	5.75E+07	1.20E+08
Mean (IU/ml)	7.74E+07		

注意事项

- 避免qPCR反应体系交叉污染。
- 为保证实验数据可靠，需至少设置2个以上平行。
- 为了您的健康，请佩戴手套，规范实验操作。





品质高于一切
精品服务客户


本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202008

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

北京全式金生物技术股份有限公司

 www.transgen.com

 +86-400 898 0321

 trans@transgen.com

 北京市海淀区中关村东升国际科学园4号楼

