

Lenti-Pac™ 慢病毒滴度检测试剂盒

Cat. Nos. LT005 / LT006

产品概述

Lenti-Pac™ 慢病毒滴度检测试剂盒系列产品为简便、快速检测慢病毒颗粒的滴度而设计。试剂盒包含从RNA抽提到qRT-PCR检测过程的全套试剂，样品经过RNA抽提、DNase消化、反转录、qRT-PCR步骤即可确定慢病毒滴度。

产品优势

- 能够判断慢病毒是否包装成功
- 准确测定病毒拷贝数，以确保细胞转导和基因表达的效率
- 提供滴度检测过程从病毒的RNA提取到qPCR检测所需要的试剂

试剂盒组分

LT005(20次RT反应, 50次qPCR反应); LT006 (40次RT反应, 100次qPCR反应)。

试剂组分	体 积	浓 度	寄送	储 存
RNAzol® RT RNA Isolation Reagent	1 × 6 mL 2 × 6 mL		常温	室温保存至少 12 个月
Linear Polyacrylamide	1 × 75 µL 2 × 75 µL	1.5 mg/mL	低温	4°C 保存至少 12 个月
DEPC Water	1 × 1.25 mL 2 × 1.25 mL			室温保存至少 12 个月
DNase I (RNase-free)	1 × 20 µL 2 × 20 µL	2,000 units/mL		-20°C 保存至少 12 个月
DNase I Buffer (10 ×)	1 × 50 µL 2 × 50 µL			-20°C 保存至少 12 个月
RNase Inhibitor	1 × 20 µL 2 × 20 µL	40,000 units/mL		-20°C 保存至少 12 个月
Reverse Transcription Enzyme	1 × 20 µL 2 × 20 µL			-20°C 保存至少 12 个月
Reverse Transcription Buffer (10 ×)	1 × 40 µL 2 × 40 µL			-20°C 保存至少 12 个月
dNTP	1 × 20 µL 2 × 20 µL	25 mM each		-20°C 保存至少 12 个月
cDNA Synthesis Primer	1 × 100 µL 2 × 100 µL	4.0 µM		-20°C 保存至少 12 个月
qPCR Standard	1 × 20 µL 2 × 20 µL	1×10 ⁹ copies/µL		-20°C 保存至少 12 个月
qPCR Primer Mix	1 × 100 µL 2 × 100 µL	2.5 µM each		-20°C 保存至少 12 个月
All-in-One™ qPCR Mix (2 ×)	1 × 1 mL 2 × 1 mL	含 SYBR Green 染料		-20°C 保存至少 12 个月

RNAzol® RT是美国分子研究中心有限公司（MRC）的注册商标，美国专利号7794932，中国专利号200580017853.5。

实验所需其他试剂和材料

分子生物学级异丙醇或乙醇

分子生物学级75%乙醇（存于4°C）

溶于TE的500 µg/mL（约250 µM）随机引物（可选项）

相关产品

Lenti-Pac慢病毒包装试剂盒 (cat.#LT001)

Lenti-Pac 293Ta 慢病毒包装细胞 (cat.#LT008)

Lenti-Pac慢病毒浓缩试剂盒 (cat.#LT007)

转染试剂 (e.g., Endofectin-Lenti 转染试剂, GeneCopoeia cat.#EF001)

实验方法

实验前请仔细阅读整个实验步骤说明。

1. RNA提取

1) 取0.25 mL RNAzol® RT RNA抽提试剂加入装有50 µL或100 µL澄清粗慢病毒溶液（或10 µL纯化浓缩的慢病毒溶液）的1.5 mL离心管中，将离心管颠倒10次混匀溶液（裂解病毒颗粒并溶解蛋白），室温静置至少15 min。

2) 短暂离心后，根据步骤1.1) 中慢病毒溶液添加量，参考下表向步骤1.1) 加入一定量纯水。

慢病毒	100 µL粗慢病毒	50 µL粗慢病毒	10 µL纯化慢病毒
水	0	50 µL	90 µL
Total*	100 µL		

Note: 表格中 Total 100 µL体积为慢病毒与水的总量，不包括RNAzol® RT RNA抽提试剂。

3) 匀浆液在20°C条件下18,000×g离心10 min。

4) 小心地将上清液转移至新的1.5 mL离心管中，加入线性聚丙烯酰胺（Linear Polyacrylamide），使其终浓度约为15 µg/mL。例如，在100 µL上清液中加入浓度为1.5 mg/mL的线性聚丙烯酰胺1.0 µL。

注意！线性聚丙烯酰胺作为共沉淀剂，可以改善乙醇沉淀过程中RNA的恢复，也有助于RNA沉淀的显现，但不会影响后续的酶消化、反转录和qPCR反应。

5) 加入上述溶液相同体积的100%异丙醇（或3倍体积100%乙醇），反复颠倒离心管混匀溶液。混匀的溶液最好在-20°C下保存4小时以上或者过夜。

6) 溶液在10°C条件下18,000×g离心20 min，并弃去上清液。

7) 用0.5 mL 75%乙醇洗涤RNA沉淀，溶液在10°C条件下18,000×g离心5 min，弃去上清液。再重复洗涤过程一次。

8) 尽可能除去残留乙醇。室温下晾干RNA沉淀3 min，切勿过干。最后用50 µL的DEPC Water溶解RNA沉淀。

2. 用 DNase I 处理（去除游离细胞基因组及包装质粒）

DNase I 反应。用 1.5mL 管子进行以下反应 (总体积 25 μ L):

DEPC water	1.5 μ L
Lentiviral RNA	20.0 μ L
DNase I buffer (10 $\times$)	2.5 μ L
DNase I	1.0 μ L
Total	25.0 μ L

孵育:

①37°C, 30-60 分钟

②75°C, 10 分钟 (使 DNase I失活)

Note: 如果遗漏了DNase I消化步骤, 必须在qPCR反应步骤中加上以未反转录的RNA样品为模板的qPCR反应作为对照, 该对照确定 (未经过DNase I消化的) 样品中所携带的质粒DNA拷贝数, 用反转录产物作为模板进行的qPCR反应所确定的拷贝数减去该对照确定的质粒DNA拷贝数即为样品中RNA拷贝数。

3. 反转录

1) 在0.2 mL或0.5 mL离心管中制备RNA-Primer Mix, 混匀RNA-Primer Mix, 在70°C温育5 min后, 将离心管立即置于冰上至冷却。

RNA (经过 DNase I 消化过的)	10.0 μ L
cDNA Synthesis Primer (4.0 μ M)	5.0 μ L (终浓度 1.0 μ M)

Note: 随机引物 (在反转录反应液中的终浓度为10 μ M) 可用于替代HIV cDNA Synthesis Primer。无需同时使用cDNA Synthesis Primer和随机引物。

2) 准备反转录反应体系, 继续加入其它组分 (总体积20 μ L), 短暂离心 (混匀反应液并富集于离心管底), 37°C温育60 min。

Reverse Transcription Buffer (10 $\times$)	2.0 μ L
25 mM dNTP	1.0 μ L
RNase Inhibitor	1.0 μ L
Reverse Transcription Enzyme	1.0 μ L
Total	20.0 μ L

3) 90°C, 10 min。该产物可直接用于qPCR检测实验, 或者保存于-20°C。

4. qPCR反应

1) 准备制作标准曲线样品

稀释阳性标准品制作标准曲线。(每个稀释梯度取 5 μ L 作为模板进行 qPCR 反应)

(1) 2 x 10⁷ copies/ μ L (5 μ L of qPCR standard (DNA) + 245 μ L of ddH₂O)

(2) 2 x 10⁶ copies/ μ L (5 μ L of (1) + 45 μ L of ddH₂O)

(3) 2 x 10⁵ copies/ μ L (5 μ L of (2) + 45 μ L of ddH₂O)

- (4) 2×10^4 copies/ μ L (5 μ L of (3) + 45 μ L of ddH₂O)
 (5) 2×10^3 copies/ μ L (5 μ L of (4) + 45 μ L of ddH₂O)
 (6) 2×10^2 copies/ μ L (5 μ L of (5) + 45 μ L of ddH₂O)
 (7) 2×10 copies/ μ L (5 μ L of (6) + 45 μ L of ddH₂O)

2) qPCR 反应体系 (总体积 20 μ L):

cDNA Sample 或 ddH ₂ O	2.0 μ L
2×All-in-One™ qPCR Mix	10.0 μ L
qPCR Primer Mix (2.5 μ M)	2.0 μ L
ddH ₂ O	6.0 μ L
Total	20 μ L
qPCR Standard	5.0 μ L
2×All-in-One™ qPCR Mix	10.0 μ L
qPCR Primer Mix (2.5 μ M)	2.0 μ L
ddH ₂ O	3.0 μ L
Total	20 μ L

Notes:

- 将反应体系中的各个组分进行预混（除了 DNA 标准品和样品）后再进行分装。
- qPCR 反应中要设置无模板(NTC) 组。
- 标准品取样:

qPCR Standard	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^3	1×10^2
从 1 中取样	5 μ L of (1)	5 μ L of (2)	5 μ L of (3)	5 μ L of (4)	5 μ L of (5)	5 μ L of (6)	5 μ L of (7)

3) qPCR 反应程序

以下反应程序适用于 Bio-Rad iQ5 real time PCR 检测系统。您可能需要根据您所使用的检测系统进行微调您的反应程序。

Cycle	Steps	Temperature	Duration	Read
1	Denaturation	95 °C	10 min	off
	Denaturation	95°C	10 sec	off
40	Annealing	60 °C	20 sec	off
	Extension	72 °C	15 sec	on

溶解曲线分析:

Temperature	Interval	Duration	Read
72-95 °C	0.5°C	6 sec/each	on
30 °C		30 sec	off

4) 数据分析

- (1) 读取每一个标准品的 Ct 值，以 LOG（拷贝数）和 Ct 值生成标准曲线。标准曲线的相关系数应高于 0.99。
 (2) 读取样品的 Ct 值，代入**(1)**中生成的公式，计算其对应的拷贝数。

(3) 将上述拷贝数乘以稀释系数，得到原始样本的拷贝数(copies/ml)。

$$\text{稀释系数} = \frac{\text{RNA体积}(\mu\text{L})}{\text{原始样品体积}(\mu\text{L})} \times \frac{\text{DNase反应体积}(\mu\text{L})}{\text{DNase反应中RNA体积}(\mu\text{L})} \times \frac{\text{RT反应体积}(\mu\text{L})}{\text{RT反应中RNA体积}(\mu\text{L})} \times \frac{1000 \mu\text{L/mL}}{\text{PCR反应中cDNA体积}(\mu\text{L})}$$

Note:

- RNA 体积：50 μL （根据本实验流程）
- 原始样品体积：用于 RNA 抽提的慢病毒颗粒溶液体积
- DNase 反应体积：25 μL （根据本实验流程）
- DNase 反应中的 RNA 体积：20 μL （根据本实验流程）
- RT 反应体积：20 μL （根据本实验流程）
- RT 反应中的 RNA 体积：10 μL （根据本实验流程）
- PCR 反应中的 cDNA 体积：2 μL （根据本实验流程）

(4) 每一个慢病毒颗粒含有 2 个单股正链的 RNA 基因组，因此，得到的病毒颗粒数应为拷贝数的 1/2。

Limited Use License and Warranty

Limited use license

The following terms and conditions apply to use of the Lenti-Pac™ qRT-PCR Titration Kit (the Product). If the terms and conditions are not acceptable, the Product in its entirety must be returned to GeneCopoeia within 5 calendar days. A limited End-User license is granted to the purchaser of the Product. The Product shall be used by the purchaser for internal research purposes only. The Product is expressly not designed, intended, or warranted for use in humans or for therapeutic or diagnostic use. The Product must not be resold, repackaged or modified for resale, or used to manufacture commercial products or deliver information obtained in service without prior written consent from GeneCopoeia. Use of any part of the Product constitutes acceptance of the above terms.

Limited warranty

GeneCopoeia warrants that the Product meets the specifications described in the accompanying Product Datasheet. If it is proven to the satisfaction of GeneCopoeia that the Product fails to meet these specifications, GeneCopoeia will replace the Product. In the event a replacement cannot be provided, GeneCopoeia will provide the purchaser with a refund. This limited warranty shall not extend to anyone other than the original purchaser of the Product. Notice of nonconforming products must be made to GeneCopoeia within 30 days of receipt of the Product. GeneCopoeia's liability is expressly limited to replacement of Product or a refund limited to the actual purchase price. GeneCopoeia's liability does not extend to any damages arising from use or improper use of the Product, or losses associated with the use of additional materials or reagents. This limited warranty is the sole and exclusive warranty. GeneCopoeia does not provide any other warranties of any kind, expressed or implied, including the merchantability or fitness of the Product for a particular purpose.

GeneCopoeia is committed to providing our customers with high-quality products. If you should have any questions or concerns about any GeneCopoeia products, please contact us at 020-32068595.