

腺相关病毒5(AAV5)滴度检测试剂盒（快速版）

（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（快速版）

【规格】

96 Tests

【货号】

AAV-A005H

【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HRP-Anti-AAV5 Antibody，形成抗体-抗原-标记抗体复合物，最后加入底物显色，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 |
| AAV05H-C01 | Pre-coated Anti-AAV5 Antibody Microplate | 1 plate | 固体 | 2-8°C | 2-8°C |
| AAV05H-C02 | AAV5 Standard | 8.7E+10 capsids | 冻干粉 | 2-8°C | -70°C |
| AAV05H-C03 | HRP-Anti-AAV5 Antibody | 20 µg | 冻干粉 | 2-8°C | -70°C |
| AAV05H-C04 | 10xWashing Buffer | 50 mL | 液体 | 2-8°C | 2-8°C |
| AAV05H-C05 | 2xDilution Buffer | 50 mL | 液体 | 2-8°C | 2-8°C |
| AAV05H-C06 | Substrate Solution | 12 mL | 液体 | 2-8°C, 避光 | 2-8°C, 避光 |
| AAV05H-C07 | 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。

注：1. 不要使用过期试剂。

2. 冻干粉重构后需-70°C储存，建议分装规格不低于5 µg，冻融次数不要超过1次。

【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AAV05H-C02分装规格不低于20uL，冻融次数不要超过1次。建议AAV05H-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. |
|------------|------------------------|-----------------|-------------------|---------------------|
| AAV05H-C02 | AAV5 Standard | 8.7E+10 capsids | 50 μ L 1xPBS | 1.74E+12 capsids/mL |
| AAV05H-C03 | HRP-Anti-AAV5 Antibody | 20 μ g | 100 μ L 1xPBS | 200 ug/mL |

【检测流程】

1. 工作液配制

1.1 配制1xWashing Buffer:

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

1.2 配制1xDilution Buffer:









取50 mL 2xDilution Buffer，用1xWashing Buffer稀释并定容至100 mL。

1.3 配制HRP-Anti-AAV5 Antibody工作液:

用1×Dilution Buffer将HRP-Anti-AAV5 Antibody储存液稀释至0.5 ug/mL，需避光保存，现用现配。

2. 制备标准曲线

复溶后标准品(AAV05H-C02)的浓度为 **1.74E+12 capsids/mL**，取 10 μL 的标准品储存液，加入 390 μL 的稀释液，作为 Std.-0，然后取 Std.-0 溶液 150 μL，加入到 450 μL 的稀释液中，作为标准曲线最高浓度 **Std.-1(1.09E+10 capsids/mL)**。在后续每一个离心管中加入 300 μL 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. | 1.74E+12 capsids/mL | 4.35E+10 capsids/mL | 1.09E+10 capsids/mL | 5.44E+9 capsids/mL | 2.72E+9 capsids/mL | 1.36E+9 capsids/mL | 6.80E+8 capsids/mL | 3.40E+8 capsids/mL | 1.70E+8 capsids/mL |
| Dilution Buffer Vol. | | 390 μL | 450 μL | 300 μL | 300 μL | 300 μL | 300 μL | 300 μL | 300 μL |

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 μL，空白对照孔加入 100 μL 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，37°C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 HRP-Anti-AAV5 Antibody

在对应板孔内加入 100 μ L 的 HRP-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. 显色

将微孔板拍干，每孔加入 100 μ L Substrate Solution。用封板膜封板，37°C避光孵育 20 min。

8. 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。

9. 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+8-1.09E+10 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℃ 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。

