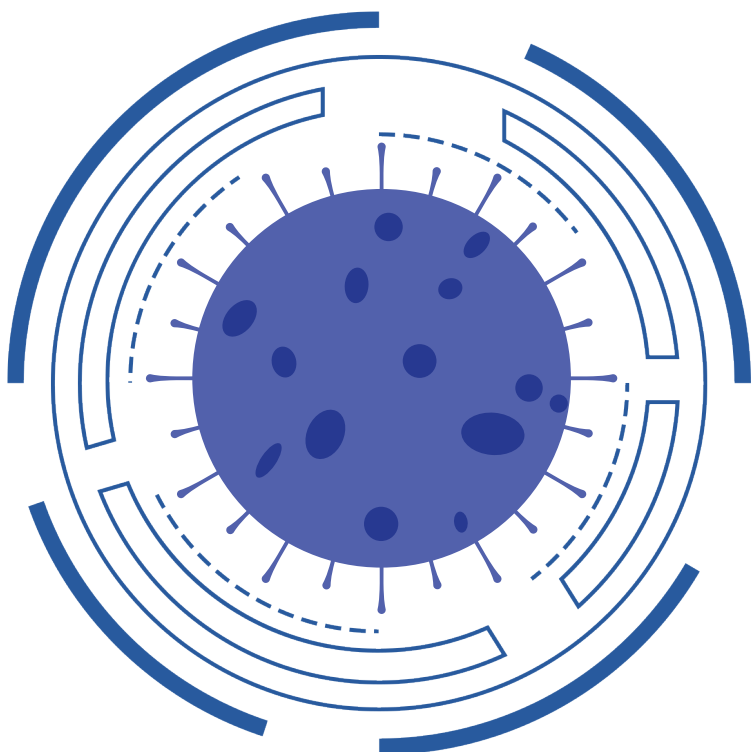


Pseudovirus-H5N1

-GFP-Luciferase说明书



产品名称

Pseudovirus-H5N1-GFP-Luciferase

产品货号

FNV-H5N1GL

产品组分

组分	规格
FNV-H5N1GL	200μl/支
靶细胞	1mL/支
FBE001	200μl/支

存储条件及有效期

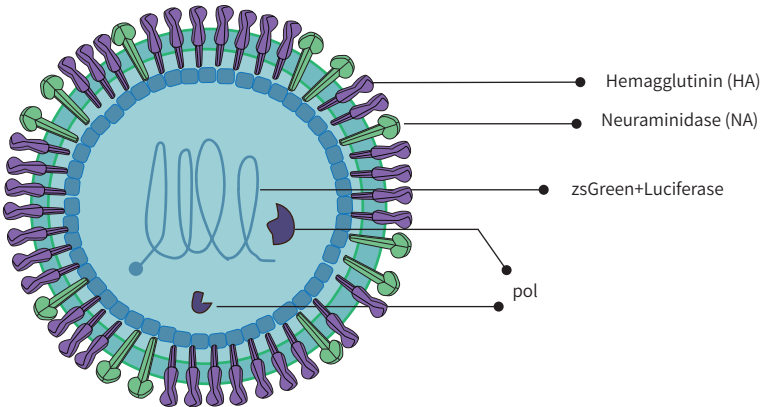
置于-75±5℃条件下密封保存，有效期12个月。

预期用途

- 1) 抗流感病毒血清中和抗体效价测试；
- 2) 抗流感病毒单克隆抗体滴度检测。

产品概述

本产品是基于慢病毒包装系统，以人类免疫缺陷病毒 I 型 (HIV-1) 为骨架，表面镶嵌流感病毒衣壳蛋白血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA)，可自我组装并包裹装载双报告基因的质粒，形成病毒样颗粒 (Virus-like Particle, VLP)。该假病毒结构高度类似活病毒，可模拟真病毒与受体结合并诱导膜融合进入细胞的过程。该假病毒具有单轮感染能力，感染特定细胞系后可表达绿色荧光蛋白 (GFP) 和荧光素酶 (Luciferase)，安全性好。



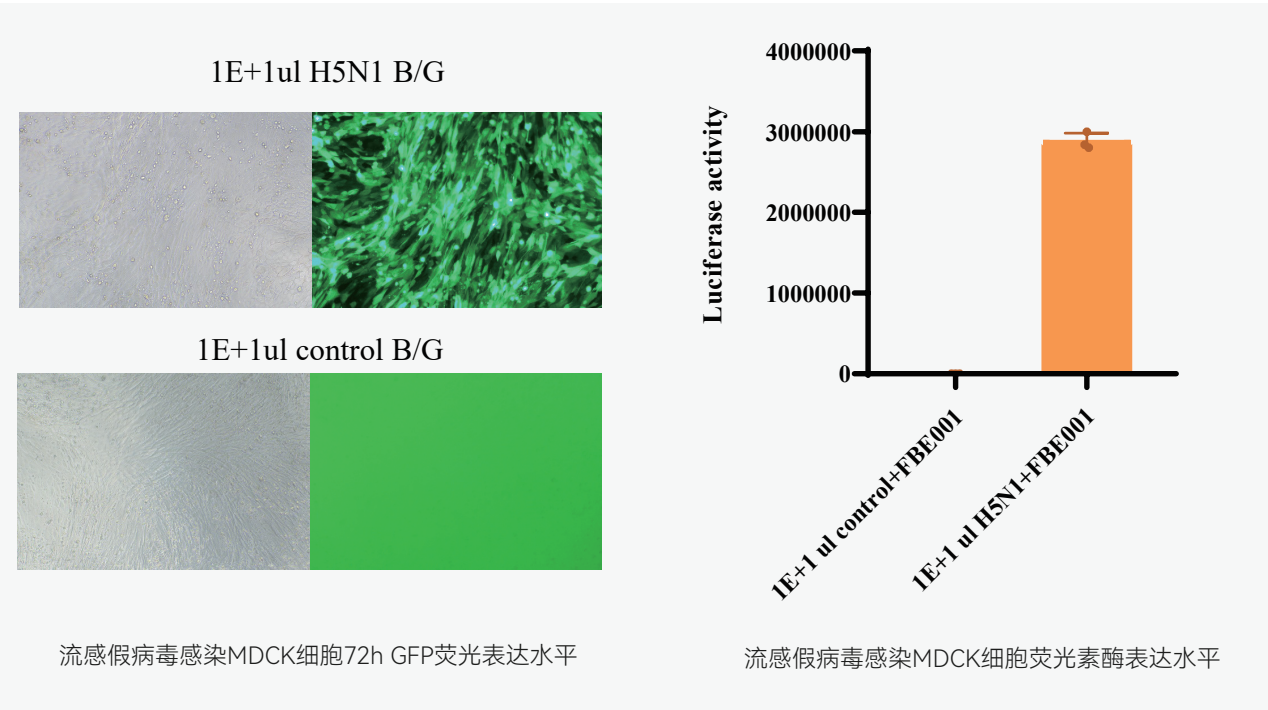
产品结构示意图

检测原理

中和抗体可由感染病原体或接种疫苗产生,可以特异识别病毒表面的抗原位点,阻止病毒入侵细胞繁殖,保护机体免受其害,具有真正的抗病毒作用。

该流感病毒假病毒含有病毒的中和抗原,且具有感染细胞活力。有中和活性的样品在与假病毒作用后,会丧失感染细胞的能力。通过 Elispot 读数仪扫描计数每孔的荧光斑点数,或多功能酶标仪读取每孔的荧光素酶表达量,将待测样品孔的数值与假病毒对照组的数值进行比较,可判断样品是否具有中和活性,并计算出样品的有效作用浓度。计算 50% 假病毒被抑制时抗体的稀释倍数的倒数即中和抗体滴度。

活性检测示例图



实验材料

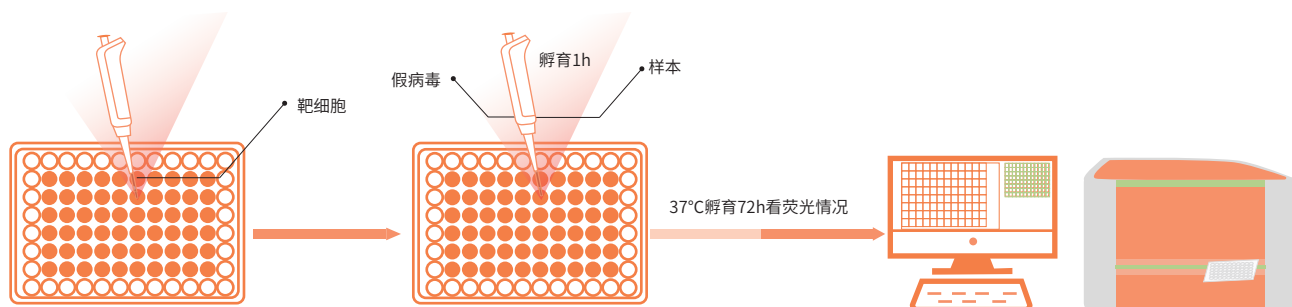
1、实验试剂

靶细胞、DMEM、胎牛血清、PBS、0.25%胰酶、FBE001、血清或抗体、荧光素酶检测试剂盒

2、实验设备

生物安全柜、荧光倒置显微镜、CO2细胞培养箱、离心机、多功能酶标仪、Elispot读数仪、水浴锅、移液器（单道、多道）、电动移液器、96孔板、酶标板

I 实验流程（以血清样本为例）



H7N9中和抗体假病毒实验流程图

I 实验步骤

- 1、感染前一天下午细胞铺板：取对数生长期的靶细胞进行胰酶消化，计数后使用 5%FBS 的 DMEM 培养基制成 1×10^5 cells/mL 细胞悬液，96 孔板接种 100 μ L/孔细胞液（或铺孔细胞密度为 20%），置于 37°C、5%CO₂ 细胞培养箱中继续培养。
 - 2、感染当天上午样品准备（细胞密度汇集至 30%-40% 时）：
 - a) 血清样品置于 56°C 水浴锅中灭活 30 min-1h；单抗起始浓度调至 300 μ g/mL。
 - b) 稀释：使用 DMEM 培养基对血清样本进行稀释，分别进行梯度稀释，作为独立血清样品或单抗样品进行中和抗体检测；
 - 3、假病毒稀释：从 -80°C 超低温冰箱中取出假病毒置于冰上或 4°C 条件下融化，待其完全融化后短暂离心，使病毒液聚集于保存管底，依据报告中假病毒滴度和实验方案设计使用无血清 DMEM 培养基进行系列稀释（1TCID₅₀=1 荧光斑点）；建议 96 孔板每孔加入 4000 TCID₅₀ 假病毒液。
 - 4、待测样品和假病毒稀释液预孵育：将稀释的待测样品与假病毒稀释液进行等体积混合，同时设置细胞对照（无血清 DMEM 培养基，100 μ L/well）、假病毒对照（假病毒稀释液与无血清 DMEM 培养基等体积混合），放入 37°C、5%CO₂ 培养箱中孵育 1 h。
 - 5、感染细胞：孵育结束后各取 100 μ L 混合液（包括细胞对照、假病毒对照、实验组）+1 μ L 100x FBE001 混匀贴壁缓慢加入已经接种好细胞的 96 孔板对应孔中，贴着工作台面轻轻划“十”字混匀，放入 37°C、5%CO₂ 培养箱中培养 72h（感染 12h 时需补液 100 μ L 1%FBS DMEM 完全培养基）。
- 注意：测试假病毒感染靶细胞效率时可跳过步骤 2-4，每孔取 10 μ L 假病毒 +100 μ L 1% FBS DMEM 培养基混匀后加入已铺细胞过夜的 96 孔板中，感染超过 12h 补液 100 μ L 1%FBS DMEM 完全培养基，72h 观察荧光比例和检测双荧光素酶的含量。
- 6、感染检测：病毒感染细胞 72 h 后，取出 96 孔板置于荧光倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白表达效率，拍照记录。
- 检测方法一：使用 Elispot 荧光斑点计数仪进行检测，计算感染抑制率（%）；
- 检测方法二：从孔板中吸弃 150 μ L 上清，加入 100 μ L 室温平衡后的荧光素酶检测试剂，充分吹打混匀后，从每孔中吸取 100 μ L 反应液转移至酶标板中对应孔位，使用酶标仪检测其发光值，注意在 20 min 内完成检测。
- （两种检测方法可以只选择一种，依据客户需求设置）。

7、结果判定

- 1) 结果判断：中和抗体检测实验过程中需设置假病毒阳性对照、细胞阴性对照，来判定实验是否成立：细胞样品组荧光素酶表达量与空细胞组的数值相近，无明显差异，则实验成立；
- 2) 抑制率 = $1 - \frac{(\text{样品组检测值均值} - \text{细胞对照组检测值均值})}{(\text{假病毒对照组检测均值} - \text{细胞对照组检测值均值})} \times 100\%$ ，中和抗体滴度被表示为抑制率为 50% 时对应的血清稀释度的倒数。

I 注意事项

- 1) 因细胞水平检测受细胞类型、细胞培养状态、环境条件等影响较大, 客户需要根据自身条件确定细胞量、病毒加入量等关键实验参数; 建议提前进行预实验, 通过预实验计算出合适的假病毒使用浓度;
- 2) 本产品仅供流感病毒抗血清或中和抗体滴度体外检测;
- 3) 假病毒、待测样本避免反复冻融, 建议启用后依据实验需求分装储存;
- 4) 血清梯度稀释时注意不要产生气泡;
- 5) 所有实验操作过程均需要在生物安全柜内进行, 实验过程中产生的废弃物均需进行高压灭菌处理;
- 6) 假病毒为微量体积, 使用前请短暂离心后再取样进行操作。

I 参考文献

- 1) Nie, Jianhui et al. "Development of in vitro and in vivo rabies virus neutralization assays based on a high-titer pseudovirus system." Scientific reports vol. 7 42769. 20 Feb. 2017, doi:10.1038/srep42769
- 2) Ozaki, Daniel A et al. "International technology transfer of a GCLP-compliant HIV-1 neutralizing antibody assay for human clinical trials." PloS one vol. 7,1 (2012): e30963. doi:10.1371/journal.pone.0030963
- 3) Wei, Xiping et al. "Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy." Antimicrobial agents and chemotherapy vol. 46,6 (2002): 1896-905. doi:10.1128/AAC.46.6.1896-1905.2002

专注基因递送，守护生命健康

We are dedicated to gene delivery, to protect life-health



● 联系我们

● Add: 苏州工业园区朝前路21号生物医药产业园五期C区17栋/F4
4th Floor, Building C17, BioBAY phase 5,
21 Chaoqian Rd, Suzhou Industrial Park, China

☎ Tel: 400-8792-452 (技术热线)

🌐 Web: www.fubio.cn

✉ Email: fubio@fubio.cn