

腺病毒滴度检测试剂盒说明书

【产品名称】

通用名称：腺病毒滴度检测试剂盒

【产品规格】

货 号：FBP2402

规 格：20 Tests

【产品介绍】

本试剂盒用于快速定量腺病毒滴度，相比于标准的测定方法，使用该试剂盒可以快速得到检测结果(约 48 小时)且效果相当。腺病毒感染 HEK293 细胞后表达六邻体蛋白质 Hexon，感染腺病毒的细胞使用甲醇固定后，用腺病毒六邻体蛋白特异性抗体进行标记、染色、计数，利用公式计算得到病毒滴度。

【包装清单】

组分	包装
Mouse Anti-Hexon Antibody	20 μ L
Goat Anti-Mouse Antibody (HRP conjugate)	20 μ L
DAB 显色液 A	10mL
DAB 显色液 B	10mL

【存储条件及有效期】

-20℃ 保存， 1 年期有效。

【安全信息】

腺病毒转染的细胞培养液和纯化后的病毒是潜在的生物危险品，对人类和动物具有传染性，因此，所有的操作步骤至少在生物安全级别二级条件下进行。

【操作流程】

一、 感染细胞

1、选取状态良好的 HEK293 细胞，使用 DMEM + 10% FBS 培养基重悬细胞 (2.5×10^5 cells/ml)，24 孔

板每个孔中加入 1mL 细胞悬液，37° C、5% CO₂ 培养 1 小时。

2、使用 PBS 或 DMEM 培养基作为稀释液，将病毒样品 10 倍梯度连续稀释病毒样品，从 10⁻² 至 10⁻⁶ ml。
标记为 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷。

3、将 10⁻² 至 10⁻⁷ 稀释病毒液加入 24 孔板中，每孔加入 100μL 病毒稀释液，37℃、5%CO₂ 培养 48h。

二、试剂配制

1、1% BSA+PBS 溶液：用 PBS 稀释 BSA，于 100ml PBS 中加 1g BSA 粉末，4℃保存；

2、一抗工作液：将 Mouse Anti-Hexon Antibody 按 1：1000 稀释于 1% BSA+PBS 溶液中，置于冰上备用；

3、HRP 二抗工作液：将 Goat Anti-Mouse Antibody (HRP conjugate) 按 1：1000 稀释于 1%BSA+PBS 溶液中，置于冰上备用；

4、DAB 工作液：按 1：1 的比例依次加入 DAB 显色液 A、显色液 B，混匀配制成 DAB 染色工作液；

注：DAB 工作液需新鲜配制，尽量在 30min 内使用。

三、标记

1、细胞感染 48h 后，去除培养液，沿 24 孔板侧壁缓缓加入 0.5mL/孔预冷甲醇，-20℃ 固定 20min；弃去甲醇，用 1mL PBS 轻轻冲洗细胞 3 次（避免细胞脱落），然后加入 500μL/孔的 1% BSA+PBS 溶液，37℃ 封闭 1 小时。

2、弃去封闭液，加入 200μL/孔的一抗工作液，37℃ 孵育 1 小时；弃去一抗工作液，用 PBS 轻轻冲洗细胞 3 次（避免细胞脱落），然后加入 200μL/孔的 HRP 二抗工作液，37℃ 孵育 1 小时。

3、弃去 HRP 二抗工作液，用 PBS 轻轻冲洗细胞 3 次，然后加入 200μL/孔新配制的 DAB 工作液，室温孵育 5-10min。

4、弃去 DAB 工作液，使用 PBS 清洗 2 次，然后每孔加入 1mL 的 PBS；每孔随机选择至少 5 个视野，在光学显微镜下观察计数，计算每孔阳性细胞的平均个数。

四、病毒滴度计算

1、理想的视野内应包含 5-50 个阳性细胞，随机选择至少 5 个区域计数（为了最大限度提高准确性，应尽量做多个重复）。

2、计算 24 孔板中每孔视野的个数：

eg. 标准 10x 目镜与 20x 物镜所观察到的视野直径为 0.9mm，故每个视野的面积=3.14*0.2025≈0.64mm²。

对于一个标准的 24 孔板，培养面积为 2cm^2 ，故每孔视野数= $2\text{cm}^2 \div (0.64 \times 10^{-2}\text{cm}^2) = 313$ 。

不同细胞培养板每孔视野面积参考						
物镜 倍数	目镜10x			细胞培养板		
	放大倍数	视野直径	视野面积	12孔板 $3.8\text{cm}^2/\text{孔}$	24孔板 $2\text{cm}^2/\text{孔}$	96孔板 $0.32\text{cm}^2/\text{孔}$
4x	40x	5mm	19.6	19	10	1.6
5x	50x	4mm	12.5	30	16	2.6
10x	100x	1.8mm	2.54	158	79	12.6
20x	200x	0.9mm	0.64	594	313	50

3、滴度计算：每孔的感染单位(IFU)/mL=[(平均阳性细胞/孔)*（视野数/孔）]÷[病毒体积(mL) *稀释倍数]。

eg. 在200x显微镜下5个视野中计算的阳性细胞平均数为28，此孔病毒稀释了 10^6 倍，则病毒滴度= $28 \times 313 \times 10^6 \div 10^{-1} = 8.76 \times 10^9$ （IFU/mL）。

四、常见问题分析

1) 无任何阳性细胞出现，可能原因如下：

- 遗漏一抗或二抗孵育；
- 抗体或DAB显色液过期失效；
- 病毒样品活性低或稀释度过高；

2) 所有细胞均呈阳性，可能原因如下：

- 洗涤不完全；
- 抗体或病毒样品稀释不正确；

- c. DAB显色反应时间过长，出现非特异性染色，背景加深；
- 3) 细胞脱落严重，可能原因如下：
 - a. 加甲醇或清洗时，动作不够轻柔，将贴壁细胞吹起；
 - b. 细胞状态不佳，贴壁情况较差。

【文献参考】

1. Bauer U, Flunker G, Bruss K, Kallwellis K, Liebermann H, Luetlich T, Motz M, Seidel W. Detection of antibodies against adenovirus protein IX, fiber, and hexon in human sera by immunoblot assay. J Clin Microbiol. 2005 Sep;43(9):4426-33. doi: 10.1128/JCM.43.9.4426-4433.2005. PMID: 16145087; PMCID: PMC1234141.
2. Bewig, B., and W. E. Schmidt (2000) Accelerated titering of adenoviruses. BioTechniques 28:870-873.
3. Nyberg-Hoffman C, Shabram P, Li W, Giroux D, Aguilar-Cordova E. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. Nat Med. 1997 Jul;3(7):808-11. doi: 10.1038/nm0797-808. PMID: 9212113

附图：

