

# AAV9 中和抗体使用说明书

## 【产品名称】

通用名称：AAV9 中和抗体（多抗）

## 【产品规格】

货 号：FAB2401

规 格：100  $\mu$ L/管

## 【产品介绍】

中和抗体是可以特异识别病毒表面的抗原中和位点，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。AAV 病毒含有病毒的中和抗原，且具有感染细胞活力；中和抗体可以识别 AAV 病毒，并发生中和反应，降低 AAV 病毒感染能力，导致携带的报告基因（如绿色荧光蛋白 EGFP、荧光素酶 Luciferase 等）表达量减弱。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病毒对照组的数值进行比较，可计算待测样品的抑制百分比。计算当 50%病毒被抑制时抗体的稀释倍数的倒数即中和抗体滴度。

## 【存储条件及有效期】

数量	100 $\mu$ L (1.89mg/mL)	免疫原	AAV9 capsids
应用	Neutralization assay	缓冲液	0.5%BSA 的 PBS
纯化	亲和层析	宿主	Mouse IgG
存储	-20℃ 两年	抗体类型	polyclone
反应	AAV9	无反应	AAV2、AAV5、AAV8

## 【实验材料】

### 1. 实验试剂

293T 细胞、DMEM、胎牛血清、PBS、0.25%胰酶、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、CO<sub>2</sub>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。

### 【实验流程】以血清样本为例

1. 96 孔细胞板：取对数生长期的 293T 细胞进行胰酶消化，计数后制成  $1 \times 10^5$  cells/mL 细胞悬液，96 孔板每孔接种 100 $\mu$ L 细胞液，置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中继续培养；
2. 血清准备：
  - a) 血清样品置于 56℃ 水浴锅中加热 30min (建议加热，去除补体干扰)；
  - b) 稀释：使用 DMEM 培养基对血清样本分别进行系列梯度稀释，作为独立血清样品进行中和抗体检测；
3. 病毒稀释：从 -80℃ 超低温冰箱中取出病毒置于冰上或 4℃ 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，依据报告中病毒滴度和实验方案设计进行系列稀释；建议 96 孔板每孔加入  $10^7$  copies/mL 病毒液。

因病毒对不同来源的 293T 细胞感染效率不同，建议正式实验前进行预实验，以确定最适病毒量。

4. 待测血清样品和病毒稀释液预孵育：将稀释的待测血清样品与病毒稀释液等体积混合，同时设置空白对照（DMEM 培养基）、阴性对照（病毒稀释液与 DMEM 培养基等体积混合），放入 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1h；
5. 感染细胞：孵育结束后各取 100 $\mu$ L 混合液（包括阴性、空白对照）贴壁缓慢加入 96 孔细胞板对应孔中，贴着工作台面轻轻划“十”字混匀，放入 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 h；
6. 感染检测：病毒感染细胞 72h 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（%）；

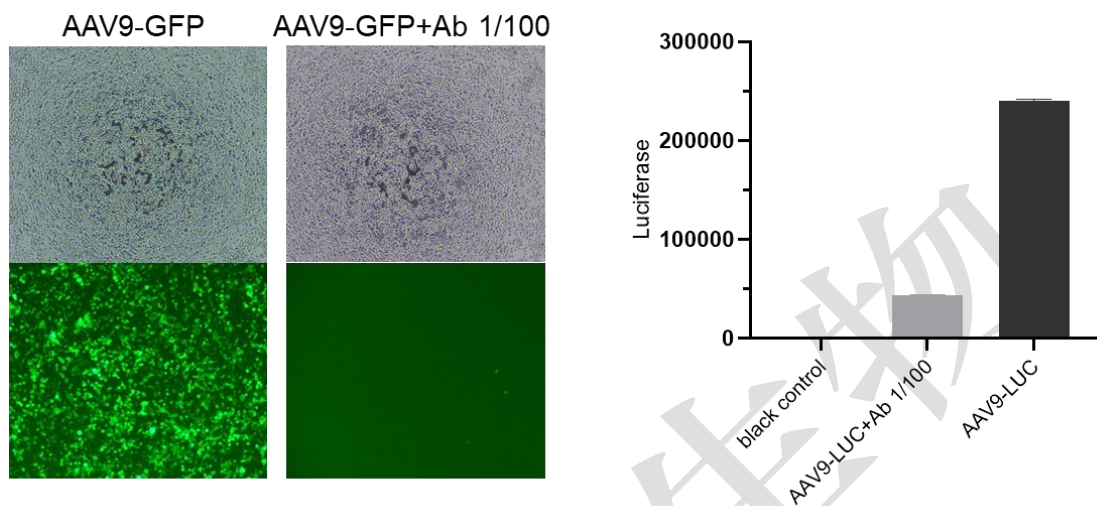
检测方法二：弃掉孔板中上清，加入 100 $\mu$ L 室温平衡后的荧光素酶检测试剂，充分吹打混匀后，从每孔中吸取 100 $\mu$ L 反应液转移至酶标板中对应孔位，使用酶标仪检测其发光值，注意在 20min 内完成检测（两种检测方法可以只选择一种，依据需求设置）。

### 7. 结果判定：

- 1) 结果判断：中和抗体检测实验过程中需设置阳性对照、阴性对照，来判定实验是否成立，阴性对照无绿色荧光蛋白表达，荧光素酶表达量与空细胞组的接近，无明显差异，阳性对照绿色荧光蛋白表达效率为 30-50%，则实验成立；

2) 抑制率 =  $1 - \frac{\text{样品组检测值均值} - \text{空白对照组检测值均值}}{\text{阴性对照组检测值均值} - \text{空白对照组检测值均值}} \times 100\%$ , 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。

### 【结果展示】



### 【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病毒使用浓度；
- 2) 本产品仅供 AAV 抗血清或中和抗体滴度体外检测；
- 3) 病毒、待测血清样本避免反复冻融，建议启用后依据实验需求分装储存；
- 4) 抗体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) 抗体为微量体积，使用前请短暂离心后再取样进行操作；
- 7) 为避免反复冻融的影响，可先将抗体进行分装。