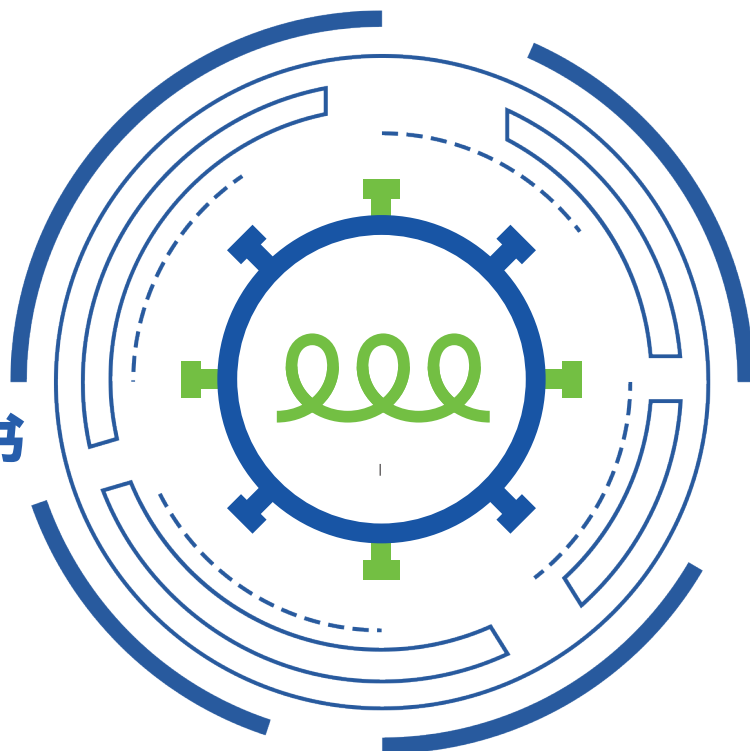


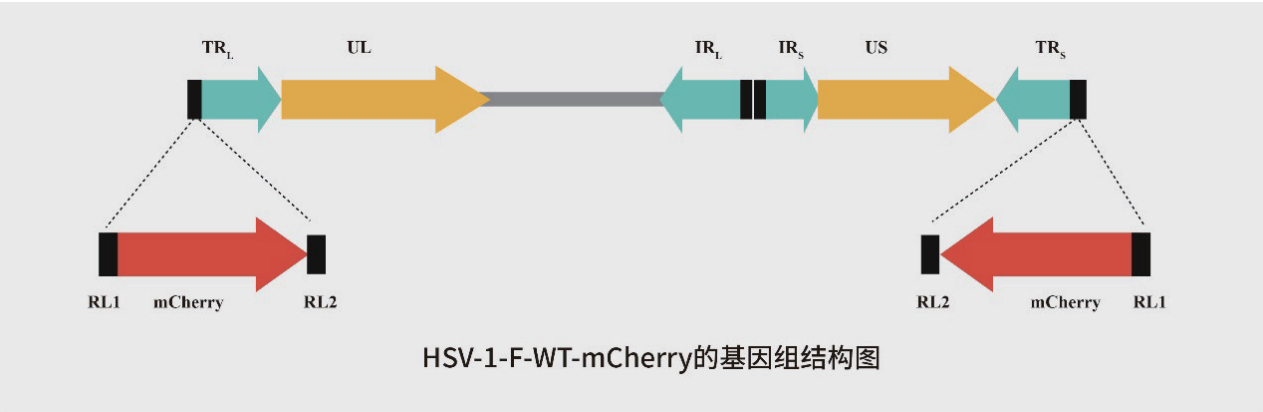
复百澳生物

单纯疱疹病毒说明书



I 产品概述

HSV-1-F-WT-mCherry 是从人类患者的面部水疱中分离出来的 F 型单纯疱疹病毒, 其宿主是人喉表皮样癌细胞(Hep-2)。本产品是在野生型单纯疱疹病毒 1(HSV-1)的基因组两侧的 RL1 和 RL2 之间引入荧光标记基因 mCherry, 且 mCherry 基因与 RL2 融合表达, 感染细胞系(如 Hep-2、神经胶质瘤细胞 U251、非洲绿猴肾细胞 Vero 和非小细胞肺癌细胞 A549 等)后可表达红色荧光蛋白(mCherry)。该病毒可以使用 Vero 细胞进行扩增。



I 预期用途

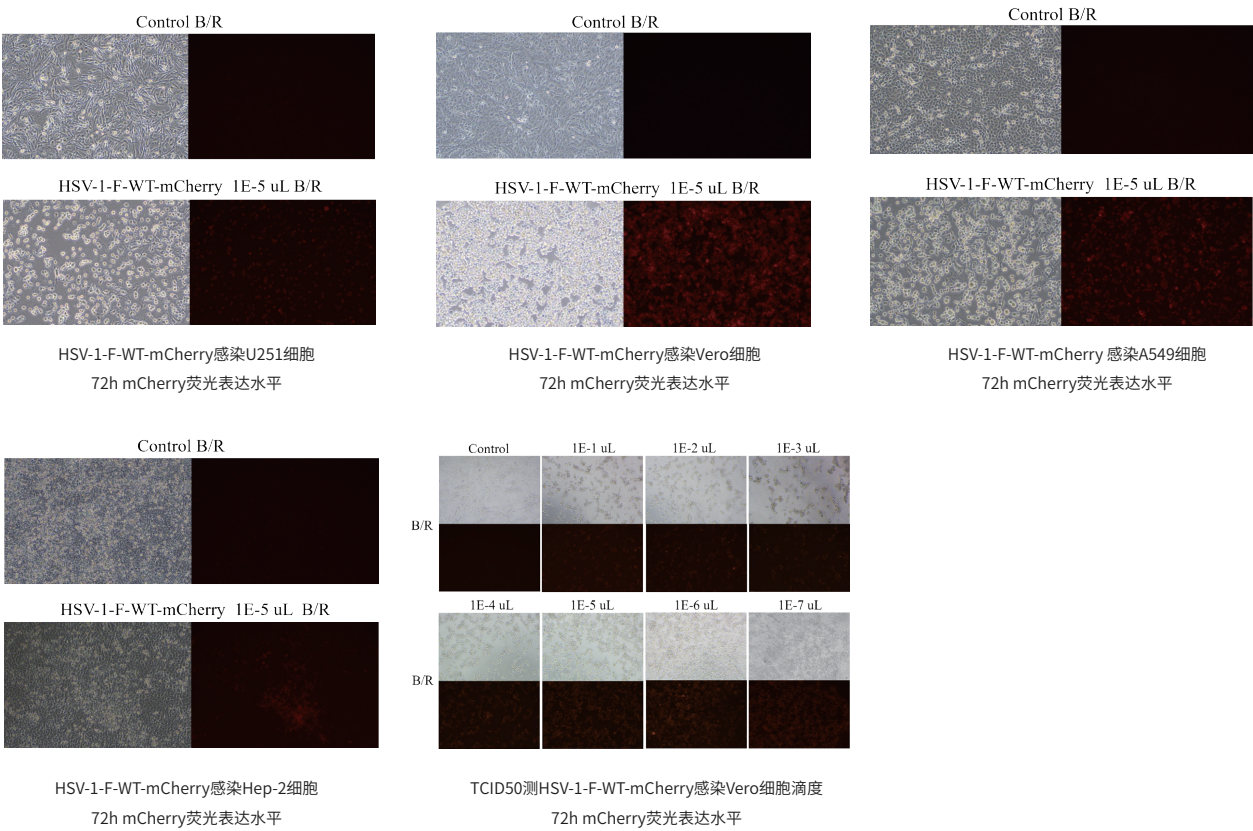
- 1、抗HSV-1血清中和抗体效价测试;
- 2、抗HSV-1单克隆抗体滴度检测;
- 3、作为溶瘤病毒载体筛选使用, 筛选适应症和进行肿瘤杀伤等用途;
- 4、作为示踪工具用于神经科学等功能性研究, 如有效地标记和追踪神经环路。

I 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。

HSV-1-F-WT-mCherry 含有病毒的中和抗原, 且具有感染细胞活力。该病毒与有中和活性的样品作用后, 会丧失感染细胞的能力。病毒感染细胞后可通过 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% 病毒被抑制时抗体的稀释倍数的倒数即中和抗体滴度。

数据展示



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。

实验条件

依据《人间传染的病原微生物名录》要求，单纯疱疹病毒需在BSL-2实验室下进行相关实验，按照BSL-2实验管理规定对使用的废弃物进行处理。

实验材料

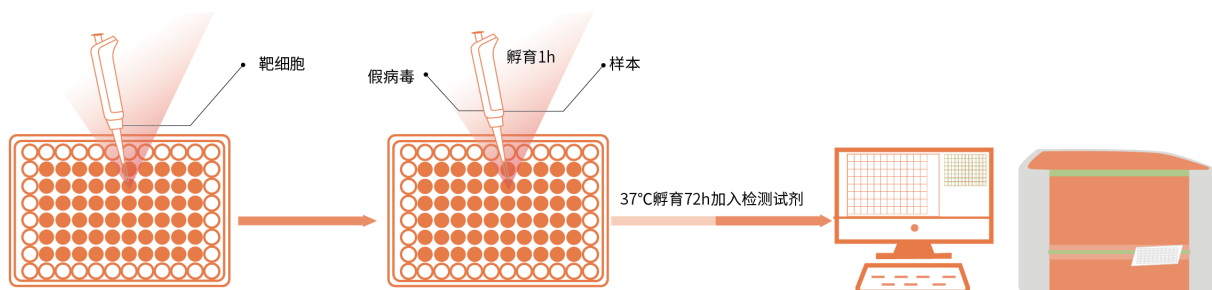
1、实验试剂

靶细胞、DMEM、胎牛血清、PBS、0.25%胰酶+EDTA、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

实验流程（以血清样本为例）



HSV-1-F-WT-mCherry实验流程图

实验步骤

1、细胞铺板

取对数生长期的 293T 细胞进行胰酶消化, 计数后制成 1×10^5 cells/mL 细胞悬液, 96 孔板每孔接种 100 μ L 细胞液, 置于 37°C、5%CO₂ 细胞培养箱中继续培养。

2、感染当天样品准备（细胞密度汇集至40%-60%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, 分别进行系列梯度稀释, 作为独立血清样品或单抗样品进行中和抗体检测;

3、病毒稀释

从-80°C超低温冰箱中取出HSV-1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, 依据报告中病毒滴度和实验方案设计进行系列稀释 (1TCID₅₀=1荧光斑点); 建议96孔板每孔加入4000 TCID₅₀病毒液。。

4、待测样品和病毒稀释液预孵育

4.将稀释的待测样品与病毒稀释液进行等体积混合, 同时设置**细胞对照 (DMEM培养基, 100 μ L/well)**、**病毒对照(病毒稀释液与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

5.孵育结束后各取100 μ L混合液(包括细胞对照、病毒对照、实验组)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100ul MEM完全培养基);

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红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 μL上清，加入100 μL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 μL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：1) 中和抗体检测实验过程中需设置病毒阳性对照、细胞阴性对照，来判定实验是否成立：细胞对照无红色荧光蛋白表达，荧光素酶表达量与空细胞组的数值相近，无明显差异。如病毒对照红色荧光蛋白表达效率为30-50%，则实验成立；

2) 抑制率 = $1 - \frac{(\text{样品组检测值均值} - \text{细胞对照组检测值均值})}{(\text{假病毒对照组检测均值} - \text{细胞对照组检测值均值})} \times 100\%$ ，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病毒使用浓度；
- 2) 本产品仅供HSV-1-F-WT-mCherry抗血清或中和抗体滴度体外检测；
- 3) 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) 病毒为微量体积，使用前请短暂离心后再取样进行操作。

参考文献

1. Shen Y, Nemunaitis J et al. "Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment." Cancer Gene Ther. 13(11) (2006): 975-92. doi: 10.1038/sj.cgt.7700946.
2. Thomas S, Kuncheria L et al. "Development of a new fusion-enhanced oncolytic immunotherapy platform based on herpes simplex virus type 1." J Immunother Cancer. 7(1) (2019): 214. doi: 10.1186/s40425-019-0682-1.
3. Cuchet D, Potel C, et al. "HSV-1 amplicon vectors: a promising and versatile tool for gene delivery." Expert Opin Biol Ther. 7(7) (2007): 975-95. doi: 10.1517/14712598.7.7.975.

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C17/F4-5
4th and 5th floor, Building C17, BioBAY park 5,
21chaoqian Rd, Suzhou Industrial Park, China

☎ Tel: 400-8792-452 (技术热线)

🌐 Web: www.fubio.cn

✉ Email: fubio@fubio.cn