



2023 年 3 月

CGT Viral Vector Lysis Kit 和 CGT dPCR Assay 手册

用于使用 QIAcuity dPCR 系统测定病毒载体基
因组滴度

目录

试剂盒内容物.....	4
运输和存放条件	5
预期用途	5
安全信息	6
质量控制	6
简介.....	7
原理和步骤.....	7
方案说明	9
由使用者提供的设备和试剂.....	10
重要提示	11
起始材料.....	11
高滴度和低滴度病毒载体	11
基因组滴度.....	11
ITR 二级结构.....	12
方案：不使用蛋白酶 K 的 AAV 颗粒处理.....	13
方案：使用蛋白酶 K 处理 AAV 颗粒	17
方案：使用 CGT dPCR Assay 进行病毒载体绝对定量.....	22
故障排除向导.....	25
联系信息	29
附录：qPCR 检测向 dPCR 的转移以及定制设计检测的设计指南	30
附录：关于使用 CGT Viral Vector Lysis Kit 进行的整个处理工作流程中稀释步骤的建议 ...	32

订购信息	35
文档修订历史	41

试剂盒内容物

CGT Viral Vector Lysis Kit	(盒子 1 和盒子 2)	(盒子 1 和盒子 2)
目录编号	250272	250273
反应数	100*	1000*
CGT Sample Stabilizer (CGT 样本稳定剂)	0.5 mL	0.5 mL
DNase I, RNase free (不含 RNase 的 DNase I)	1 小瓶	10 小瓶
CGT Lysis Buffer (CGT 裂解缓冲液)	45 mL	4 x 45 mL
CGT DNase I Buffer (CGT DNase I 缓冲液)	1.5 mL	5 x 1.5 mL
CGT Dilution Buffer (CGT 稀释缓冲液)	40 mL	5 x 40 mL
Nuclease-Free Water (无核酸酶水)	50 mL	4 x 50 mL

* 反应数是根据本手册中所述的 50 μ L DNase I 反应计算的。增加反应体积会减少反应数。

试剂盒	(20x)
目录编号	250230 - 250256
反应数	500*
CGT dPCR assay, lyophilized (冻干 CGT dPCR 检测)	1 小瓶

* 反应数是根据 12 μ L QIAcuity dPCR 反应计算的。

运输和存放条件

CGT Viral Vector Lysis Kit 在 2 个单独的盒子内运输。盒子 1 在常温下运输，而盒子 2 放在干冰内运输。

收货后，盒子 1 应在室温 (15 - 25°C) 下保存，盒子 2 应立即将其保存在 -30 至 -15°C 的恒温冷冻柜中。收货后，盒子 1 中的 DNase I 小瓶应立即在 2 - 8°C 温度下保存。

在上述条件下，各组分可在其标签注明的到期日之前保持稳定且不会有任何性能和质量损失，除非标签上另有说明。

CGT dPCR Assay 在常温下运输，收货后应立即将其避光保存在 -30 至 -15°C 的恒温冷冻柜中，以便长期储存（例如 12 个月）。在上述条件下，CGT dPCR Assay Kit 可保持稳定且不会出现任何性能和质量损失。复溶后，这些检测可保持稳定至少 12 个月。建议将 CGT dPCR 检测分装为等分试样并保存在 -30 至 -15°C 的温度下，以避免反复冻融循环。

预期用途

CGT Viral Vector Lysis Kit 和 CGT dPCR Assay Kit 旨在用于分子生物学应用。这些产品不能用于疾病诊断、预防和治疗。

使用本产品时须小心谨慎。我们建议 QIAGEN® 的所有用户遵照 NIH 颁布的重组 DNA 实验指南以及其他相关实验指南。

安全信息

工作中如接触化学品，则必须始终穿着合适的实验工作服，并戴好一次性手套和护目镜。有关更多信息，请参阅相关安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS)。安全数据表可在 www.qiagen.com/safety 网页上找到，格式为紧凑、方便的 PDF 文件。在该网页上，您可查找、浏览、打印每一种 QIAGEN 试剂盒及组分的 SDS 文件。

质量控制

QIAGEN 根据 ISO 认证的质量管理体系，针对预先确定的规范，测试每批 CGT Viral Vector Lysis Kit 和 CGT dPCR Assay Kit 以确保产品品质始终如一。

简介

CGT Viral Vector Lysis Kit 提供了从腺相关病毒 (Adeno-Associated Virus, AAV) 样本裂解到病毒滴度定量的完整标准化工作流程。它兼具稳健的样本处理和定量能力，无需进行费力的纯化。该试剂盒特别适用于不同纯度的 AAV 样本，例如从流程中样本（如采集样本）到高度纯化的病毒载体样本。

CGT Viral Vector Lysis Kit 可以在 QIAcuity dPCR 平台、qPCR 或其他 dPCR 平台上与定制开发的检测结合使用。然而，为了获得最佳的定量结果，强烈建议 CGT dPCR Assay 与 QIAcuity Probe PCR Kit 和 QIAcuity dPCR 系统结合使用，这不仅能够提供与 qPCR 类似的端到端 dPCR 工作流程，而且可以对各种病毒颗粒样本的衣壳包被基因组拷贝进行绝对定量。

CGT Viral Vector Lysis Kit 的配方经过改进，可在使用或不使用蛋白酶 K (Proteinase K, Prot-K) 的情况下，对最终病毒滴度进行一致、准确、精密且高度可重复的测定。

原理和步骤

CGT Viral Vector Lysis Kit 与 CGT dPCR Assay 和 QIAcuity 仪器共同构成了一个独特的病毒载体滴度测定系统，可以提供性能和易用性的最佳组合。

样本处理和病毒滴度测定仅包括 4 个步骤——去除 DNA 杂质（如残留的宿主细胞 DNA 或质粒），裂解病毒载体衣壳，连续稀释原始裂解物，并最终通过 dPCR 进行定量（图 1）。

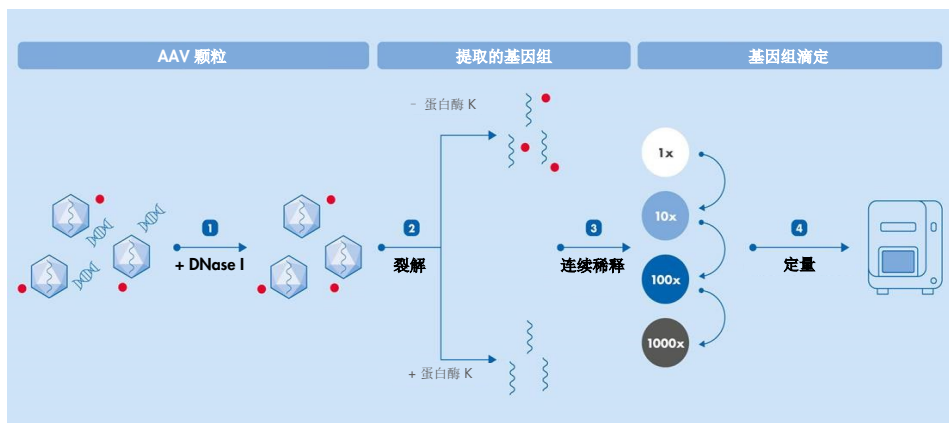


图1.根据 CGT Viral Vector Lysis Kit 工作流程进行 AAV 载体滴度测定。 **1:** 使用 DNase I 处理从生产细胞中提取的 AAV 颗粒（无论纯度如何）以去除 DNA 杂质。**2:** 通过裂解提取载体基因组。裂解可以使用或不使用蛋白酶 K。**3:** 将提取的基因组连续稀释至 dPCR 浓度范围内。**4:** 使用 QIAcuity 探针混合物和 CGT dPCR Assay 进行滴定测定。

去除 DNA 杂质

DNA 杂质，例如用于生产病毒载体的质粒和源自受损颗粒的 DNA，可能会对最终测定的滴度产生影响。需要去除杂质才能实现安全且可靠的给药。DNase I 反应能够有效地去除杂质并制备用于后续衣壳裂解的病毒颗粒。

裂解病毒载体衣壳

CGT Viral Vector Lysis Kit 内附带的 CGT 裂解缓冲液经过优化，可以在广泛的衣壳（各种纯度）输入浓度范围内进行有效的衣壳裂解（与 AAV 血清型无关），并且与 QIAcuity Probe PCR 化学试剂高度兼容。

QIAcuity Probe PCR 化学试剂

热启动 QuantiNova DNA 聚合酶以及其他专有化学成分，能够实现最佳的病毒滴度测定。

CGT dPCR Assay

该检测提供即用型 20x 引物-探针混合物，有 3 种荧光基团（FAM、HEX 和 Cy5）可供选择。检测采用双淬灭探针技术，能够进行单重和多重病毒载体滴度测定。

方案说明

本手册包含 2 种处理病毒载体颗粒（特别是 AAV 颗粒）的方案以及 1 种使用 QIAcuity dPCR 技术测定滴度的方案。

不使用蛋白酶 K 的 AAV 颗粒处理

病毒颗粒处理工作流程的说明，从去除 DNA 杂质到裂解颗粒以准备通过 dPCR 进行定量。无需使用蛋白酶 K 即可实现衣壳裂解。

包括蛋白酶 K 的 AAV 颗粒处理

病毒颗粒处理工作流程的说明，从去除 DNA 杂质到裂解颗粒以准备通过 dPCR 进行定量。该方案在衣壳裂解步骤中添加蛋白酶 K。

使用 CGT dPCR Assay 进行病毒载体绝对定量

使用 QIAcuity dPCR 系统进行病毒基因组定量的说明。

由使用者提供的设备和试剂

工作中如接触化学品，则必须始终穿着合适的实验工作服，并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息，请查阅该产品供应商提供的相关安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS)。

- 蛋白酶 K (RP107B-1 或 RP107B-5)；仅适用于蛋白酶 K 方案
- 限制酶 *Hpa*II (Thermo Scientific™ *Hpa*II (10 U/μL, 目录编号 ER0511、ER0512) 或 Invitrogen™ Anza™ 93 *Hpa*II (目录编号 IVGN0936))
- CGT dPCR assay (目录编号 250230 - 250256)；可选
- QIAcuity Probe PCR Kit, 用于携带 DNA 基因组的病毒颗粒 (目录编号 250101-250103)
- QIAcuity Nanoplates (目录编号 250001、250011 或 250021)
- 带有适当密封薄膜的微型离心管或 PCR 板或联排管。离心管/反应板需要与加热装置兼容
- 单通道或多通道移液器 (手动或自动)，带有无核酸酶的气溶胶屏障吸头
- 能够达到 95°C 的加热块、PCR 循环仪或水浴器
- 涡旋仪
- 离心机 (用于离心管和反应板)

重要提示

起始材料

CGT Viral Vector Lysis Kit 针对 AAV 颗粒的处理进行了优化。根据上游工艺（颗粒的生产系统、纯化和富集）的不同，起始材料的用量可能存在很大差异。AAV 样本可以保存在各种存储缓冲液中。处理和定量工作流程对于各种缓冲液组分（洗涤剂、高盐、载体）以及潜在的抑制剂（如包被剂、从生产细胞系（如 HEK 293 细胞）提取颗粒后携带的分泌性细胞内和细胞外物质）都非常稳健。

高滴度和低滴度病毒载体

可以使用 CGT Viral Vector Lysis Kit 处理各种颗粒滴度。预期滴度很高的颗粒可以在转移至 DNase I 消化之前和/或在整个处理工作流程中进行稀释。

基因组滴度

AAV 载体基因组浓度可能因方案、靶标在基因组上的位置、DNA 杂质以及基因组的完整性而异。使用多重 dPCR 方法能够对病毒载体基因组进行高分辨率的表征。

使用 qPCR 和 ITR 检测测定的 AAV 参比标准品的病毒滴度可能与使用 dPCR 获得的病毒滴度存在显著偏离，这是由于标准曲线法和/或使用理论化学计量转换因子来获得基于 ITR 浓度的滴度。

ITR 二级结构

AAV 的末端反向重复序列 (inverted terminal repeat, ITR) 包括强二级结构、序列重复和高 GC 含量，这可能限制了 PCR 过程中的靶标可及性。

HpaII 的限制性消化会释放 DNA 中可能干扰靶序列可及性的任何二级结构。*HpaII* 酶 (Thermo Scientific *HpaII* (10 U/ μ L, 目录编号 ER0511、ER0512) 或 Invitrogen Anza 93 *HpaII* (目录编号 IVGN0936)) 已进行过广泛测试并且显示出与 QIAcuity Probe PCR 混合物的高度兼容性。ITR 二级结构的限制性消化可以直接在 PCR 混合物中进行。

在开始测定病毒基因组滴度之前，应单独测试 QIAcuity Probe PCR 化学试剂与其他限制酶的兼容性。

方案：不使用蛋白酶 K 的 AAV 颗粒处理

该方案针对不同纯度 AAV 颗粒的处理进行了优化，用于使用 QIAcuity dPCR 系统进行载体基因组滴度测定。该方案不需要使用蛋白酶 K 对 AAV 衣壳进行消化。

开始前重要注意事项

- 参见第 11 页的“重要提示”。
- CGT Viral Vector Lysis Kit 已经针对 AAV 颗粒的处理进行了优化。其他病毒载体（如腺病毒颗粒）可以按照相同的操作流程进行处理。
- 不同滴度的 AAV 颗粒可以按照相同的方案进行处理。必须相应调整稀释系列以适应 dPCR 浓度范围。更多信息参见附录：关于使用 CGT Viral Vector Lysis Kit 进行的整个处理工作流程中稀释步骤的建议。
- 不建议长期储存 AAV 样本和裂解物。
如果需要使用蛋白酶 K 的操作流程，请按照第 17 页的“方案：使用蛋白酶 K 处理 AAV 颗粒”进行操作。

开始之前的准备事项

- 在开始以下所述的处理工作流程之前，可以使用添加 0.01% CGT 样本稳定剂的相应样本存储缓冲液对预期滴度很高（例如，滴度 $> 1 \times 10^{11}$ vg/mL）的病毒载体样本进行稀释。或者，可以在低蛋白结合试管中进行样本稀释。
- 复溶冻干 DNase I 酶：将冻干 DNase I（1500 孔尼兹单位*）溶于 550 μ L 水中。为了避免损失，请勿打开玻璃瓶。用不含 RNase 的针头和注射器将水注入玻璃瓶。轻轻翻转数次混匀，请勿以旋涡方式混合。
长期储存 DNase I 原液时，从玻璃瓶中取出原液，将其分为多个单次使用等分试样。等分试样可在 -15 至 -30°C 下最多储存 9 个月。解冻后的等分试样可在 $2 - 8^{\circ}\text{C}$ 下最多储存 6 周。请勿在解冻后重新冷冻等分试样。

* 孔尼兹单位是用于测量 DNase I 的常用单位，定义为在 25°C 、pH 5.0 并且以聚合 DNA 作为底物的情况下，导致每毫升样本每分钟 A_{260} 增加 0.001 的 DNase I 含量。

- 使用无核酸酶水将 CGT 样本稳定剂原液从 10% (v/v) 稀释为 1% (v/v) 的工作溶液。1% 工作溶液可以在 2 - 8°C 下保存。使用前应彻底混匀。
- 在开始处理病毒颗粒之前解冻试剂盒组分，并在临近使用前混合所有组分（也包括在室温下保存的组分）。使用前小心地翻转 3 次，混匀 CGT 裂解缓冲液。CGT 裂解缓冲液往往会产生大量泡沫，因此，请确保使用移液器吸取的是液体而非泡沫。然而，液体上方的泡沫层不会影响裂解性能。
- 将热循环仪、加热块或水浴器预热至 37°C 以进行 DNase I 消化，然后加热至 95°C 以进行衣壳裂解。

操作流程

1. 临近使用前，将病毒载体样本在室温下或在冰上 (2 - 8°C) 解冻。
2. 根据表 1 制备 DNase I 消化反应混合物。病毒颗粒应该最后添加。短暂离心，并通过移液器吹打 5 次或轻弹试管 5 次使其适当混合。请勿以旋涡方式混合。短暂离心，并在 37°C 下孵育 30 分钟（例如，在热循环仪上）。然后，在 4°C 下冷却反应 5 分钟。短暂离心，并通过移液器吹打 5 次或轻弹试管 5 次使其适当混合，然后再执行下一步。

重要提示：即使在上游样本制备过程中（例如，在层析过程中）已经去除了样本中残留的 DNA 污染物，也不应跳过这一步骤。然而，在这种情况下，可以使用无核酸酶水取代 DNase I 酶。无需在 37°C 下进行孵育。

表 1. DNase I 反应体系

组分	单个反应体系的体积 (μL)*
病毒载体样本（例如 AAV2）	5
CGT DNase I 缓冲液 (7x)	7.14
DNase I	5
CGT 样本稳定剂 (1%)	5
无核酸酶水	27.86
总反应体积	50

* 总反应体积可以扩大或缩小至 20 μL。当扩大规模时，试剂盒的反应数将相应减少。

- 根据表 2 制备病毒载体裂解混合物。样本应该最后添加。短暂离心，并通过涡旋反应混合物 5 次（每次 1 秒）彻底混匀。短暂离心，并在 95°C 下孵育 10 分钟（例如，在热循环仪上）。孵育后，在 4°C 下冷却 5 分钟。短暂离心，然后继续下一步。

不建议长期储存裂解物。

提示：在 95°C 下孵育前，预期滴度很高的病毒载体样本可根据需要使用 CGT 裂解缓冲液进行连续稀释。

示例：对病毒颗粒进行 10x 稀释，连续四次，只有最后一个稀释步骤在 95°C 下孵育 10 分钟。

适当的稀释步骤次数取决于预期的载体滴度。在使用 8.5K 纳米微孔板进行 dPCR 时，建议的检测范围为 2.5 拷贝/ μL 至 15,000 拷贝/ μL 。

表 2.病毒载体裂解反应体系

组分	单个反应体系的体积 (μL)*
病毒载体样本（来自第 2 步）	5
CGT 裂解缓冲液	45
总反应体积	50

* 总反应体积可以扩大或缩小至 20 μL 。当扩大规模时，试剂盒的反应数将相应减少。

- 根据表 3 稀释来自第 3 步的裂解物。短暂离心，并通过涡旋 5 次（每次 1 秒）彻底混匀。短暂离心，并继续执行第 5 步。

提示：对于预期滴度很高的病毒载体样本，可以在裂解后使用 CGT 稀释缓冲液进行稀释。第 4 步和第 5 步加在一起，裂解物**必须**稀释至少 100x。建议稀释 200x。

示例：如表 3 所述，在第 4 步中使用 CGT 稀释缓冲液将病毒载体样本稀释 20x。然后如表 4 所示，在第 5 步中建议稀释 10x。在第 5 步中至少需要稀释 5x。可以进行更高倍数的稀释，而无需担心。

表 3. 裂解物稀释体系

组分	单个反应体系的体积 (μL)*
病毒载体裂解物 (来自第 3 步)	2.5
CGT 稀释缓冲液	47.5
总反应体积	50

* 总反应体积可以扩大或缩小至 20 μL。所需稀释步骤的次数取决于预期的病毒滴度，可相应进行调整。

5. 根据表 4，使用 QIAcuity Probe PCR Kit 在标准 PCR 板中制备 PCR 反应混合物。密封反应板，通过涡旋反应混合物 5 次（每次 1 秒）彻底混匀，并在室温下孵育 10 分钟。

重要提示： 样本稀释可以在第 1 步、第 3 步、第 4 步和第 5 步中进行。第 4 步和第 5 步加在一起，第 3 步产生的裂解物**必须**总共稀释至少 100x。建议稀释 200x。

提示： 建议多制备 10% 的 PCR 反应混合物，以便能够将所需体积全部转移到纳米微孔板上。

表 4. PCR 反应体系

组分	Nanoplate 8.5K (24 孔, 96 孔)	Nanoplate 26K (24 孔)
QIAcuity Probe PCR 预混液	3 μL	10 μL
CGT dPCR Assay, 20x [†]	0.6 μL	2 μL
限制酶 <i>Hpa</i> II (10 U/μL)	0.15 μL (0.125 U/μL) [‡]	0.5 μL (0.125 U/μL) [‡]
裂解物 (来自第 4 步)	1.2 μL*	4 μL*
无核酸酶水	7.05 μL	23.5 μL
总反应体积	12 μL	40 μL

* 裂解物体积视情况而定，取决于所需的稀释度。PCR 反应体系中的水可以完全用病毒裂解物替代。

[†] 可以使用定制设计的检测。从推荐的引物和探针浓度开始，每个引物的浓度为 0.8 μM，探针浓度为 0.4 μM。

[‡] 当使用 0.025 - 0.125 U/μL 范围内的 Invitrogen™ ANZA 93 *Hpa*II 酶或 0.25 - 0.5 U/μL 范围内的 Thermo Scientific™ *Hpa*II 酶时，可以获得最佳性能。

6. 重新悬浮 PCR 混合物，并将适当的体积转移到纳米微孔板上。密封纳米微孔板并将其装入 QIAcuity 仪器。开始运行。

有关 PCR 设置、推荐循环和成像条件的其他信息，请参阅本手册第 22 页的“方案：使用 CGT dPCR Assay 进行病毒载体绝对定量”。本方案已经涵盖了第 1 - 2 步。

方案：使用蛋白酶 K 处理 AAV 颗粒

该方案针对不同纯度 AAV 样本的处理进行了优化，用于使用 QIAcuity dPCR 系统进行载体基因组滴度测定。该方案包括使用蛋白酶 K 对 AAV 衣壳进行消化。

开始前重要注意事项

- 开始前，请阅读本手册第 11 页的“重要提示”章节。
- CGT Viral Vector Lysis Kit 已经针对 AAV 颗粒的处理进行了优化。其他病毒载体（如腺病毒颗粒）可以按照相同的操作流程进行处理。
- 不同滴度的 AAV 颗粒可以按照相同的方案进行处理。必须相应调整稀释系列以适应 dPCR 浓度范围。更多信息参见附录：关于使用 CGT Viral Vector Lysis Kit 进行的整个处理工作流程中稀释步骤的建议。
- 不建议长期储存 AAV 样本和裂解物。
- 如果需要不使用蛋白酶 K 的操作流程，请按照第 9 页的“不使用蛋白酶 K 的 AAV 颗粒处理”进行操作。

开始之前的准备事项

- 在开始以下所述的处理工作流程之前，可以使用添加 0.01% CGT 样本稳定剂的相应样本存储缓冲液对预期滴度很高（例如，滴度 $> 1 \times 10^{11}$ vg/mL）的病毒载体样本进行稀释。或者，可以在低蛋白结合试管中进行样本稀释。
- 复溶冻干 DNase I 酶：将冻干 DNase I（1500 孔尼兹单位*）溶于 550 μ L 水中。为了避免损失，请勿打开玻璃瓶。用不含 RNase 的针头和注射器将水注入玻璃瓶。轻轻翻转数次混匀，请勿以旋涡方式混合。

*孔尼兹单位是用于测量 DNase I 的常用单位，定义为在 25°C、pH 5.0 并且以聚合 DNA 作为底物的情况下，导致每毫升样本每分钟 A260 增加 0.001 的 DNase I 含量。

长期储存 DNase I 原液时，从玻璃瓶中取出原液，将其分为多个单次使用等分试样。等分试样可在 -15 至 -30°C 下最多储存 9 个月。解冻后的等分试样可在 $2 - 8^{\circ}\text{C}$ 下最多储存 6 周。请勿在解冻后重新冷冻等分试样。

- 使用无核酸酶水将 CGT 样本稳定剂原液从 10% (v/v) 稀释为 1% (v/v) 的工作溶液。1% 工作溶液可以在 $2 - 8^{\circ}\text{C}$ 下保存。使用前应彻底混匀。
- 在开始处理病毒颗粒之前解冻试剂盒组分，并在临近使用前混合所有组分（也包括在室温下保存的组分）。使用前小心地翻转 3 次，混匀 CGT 裂解缓冲液。CGT 裂解缓冲液往往会产生大量泡沫，因此，请确保使用移液器吸取的是液体而非泡沫。然而，液体上方的泡沫层不会影响裂解性能。
- 将热循环仪、加热块或水浴器预热至 37°C 以进行 DNase I 消化，然后加热至 95°C 以进行衣壳裂解。

操作流程

1. 临近使用前，将病毒载体样本在室温下或在冰上 ($2 - 8^{\circ}\text{C}$) 解冻。
2. DNase I 消化后直接加入蛋白酶 K。
 - 2a. 根据表 5 制备 DNase I 消化反应混合物。病毒颗粒应该最后添加。短暂离心，并通过移液器吹打 5 次或轻弹试管 5 次使其适当混合。请勿以旋涡方式混合。短暂离心，并在 37°C 下孵育 30 分钟（例如，在热循环仪上）。然后，在 4°C 下冷却反应 5 分钟。短暂离心，并通过移液器吹打 5 次或轻弹试管 5 次使其适当混合，然后再执行下一步。

重要提示：即使在上游样本制备过程中（例如，在层析过程中）已经去除了样本中残留的 DNA 污染物，也不应跳过这一步骤。在这种情况下，可以使用无核酸酶水取代 DNase I 酶。无需在 37°C 下进行孵育。

表 5.DNase I 反应体系

组分	单个反应体系的体积 (μL)*
病毒载体样本 (例如 AAV2)	5
CGT DNase I 缓冲液 (7x)	7.14
DNase I	5
CGT 样本稳定剂 (1%)	5
无核酸酶水	27.86
总反应体积	50

* 总反应体积可以扩大或缩小至 20 μL。当扩大规模时，试剂盒的反应数将相应减少。

- 2b. 在来自第 2a 步的每 50 μL 反应体系中添加 2 μL 蛋白酶 K。短暂离心，并通过移液器吹打 5 次或轻弹试管 5 次使其适当混合。短暂离心，并在室温下孵育 30 分钟。通过将反应混合物涡旋 5 次（每次 1 秒）彻底混匀，并短暂离心，然后执行第 3 步。
3. 根据表 6 制备病毒载体裂解混合物。样本应该最后添加。短暂离心，并通过涡旋反应混合物 5 次（每次 1 秒）彻底混匀。短暂离心，并在 95°C 下孵育 10 分钟（例如，在热循环仪上）。孵育后，在 4°C 下冷却 5 分钟。短暂离心，然后继续下一步。

不建议长期储存裂解物。

提示：在 95°C 下孵育前，预期滴度很高的病毒载体样本可根据需要使用 CGT 裂解缓冲液进行连续稀释。

示例：对病毒颗粒进行 10x 稀释，连续 4 次，只有最后一个稀释步骤在 95°C 下孵育 10 分钟。

适当的稀释步骤次数取决于预期的载体滴度。在使用 8.5K 纳米微孔板进行 dPCR 时，建议的检测范围为 2.5 拷贝/μL 至 15,000 拷贝/μL。

表 6.病毒载体裂解反应体系

组分	单个反应体系的体积 (μL)*
病毒载体样本（来自第 2 步）	5
CGT 裂解缓冲液	45
总反应体积	50

* 总反应体积可以扩大和缩小至 20 μL。当扩大规模时，试剂盒的反应数将相应减少。

4. 根据表 3 稀释来自第 7 步的裂解物。短暂离心，并通过涡旋 5 次（每次 1 秒）彻底混匀。短暂离心，并继续执行第 5 步。

提示：对于预期滴度很高的病毒载体样本，可以在裂解后使用 CGT 稀释缓冲液进行稀释。第 4 步和第 5 步加在一起，裂解物**必须**稀释至少 100x。建议稀释 200x。

示例：如表 3 所述，在第 4 步中使用 CGT 稀释缓冲液将病毒载体样本稀释 20x。如表 8 所示，在第 5 步中建议稀释 10x。至少需要稀释 5x。可以进行更高倍数的稀释，而无需担心。

表 7.裂解物稀释体系

组分	单个反应体系的体积 (μL)*
病毒载体裂解物（来自第 3 步）	2.5
CGT 稀释缓冲液	47.5
总反应体积	50

* 总反应体积可以扩大和缩小至 20 μL。所需稀释步骤的次数取决于预期的病毒滴度，可相应进行调整。

5. 根据表 8，使用 QIAcuity Probe PCR Kit 制备 PCR 反应混合物。在标准 PCR 板中构建 PCR 反应体系。密封反应板，通过涡旋反应混合物 5 次（每次 1 秒）彻底混匀，并在室温下孵育 10 分钟。

重要提示：样本稀释可以在第 1 步、第 3 步、第 4 步和第 5 步中进行。第 4 步和第 5 步加在一起，第 3 步产生的裂解物**必须**总共稀释至少 100x。建议稀释 200x。

提示：建议多制备 10% 的 PCR 反应混合物，以便能够将所需体积全部转移到纳米微孔板上。

表 8.PCR 反应体系

组分	Nanoplate 8.5K (24 孔, 96 孔)	Nanoplate 26K (24 孔)
QIAcuity Probe PCR 预混液	3 μL	10 μL
CGT dPCR Assay, 20x [†]	0.6 μL	2 μL
限制酶 <i>HpaII</i> (10 U/ μL)	0.15 μL (0.125 U/ μL) [‡]	0.5 μL (0.125 U/ μL) [‡]
裂解物 (来自第 4 步)	1.2 μL *	4 μL *
无核酸酶水	7.05 μL	23.5 μL
总反应体积	12 μL	40 μL

* 裂解物体积视情况而定，取决于所需的稀释度。PCR 反应体系中的水可以完全用病毒裂解物替代。

[†] 可以使用定制设计的检测。从推荐的引物和探针浓度开始，每个引物的浓度为 0.8 μM ，探针浓度为 0.4 μM 。

[‡] 当使用 0.025 - 0.125 U/ μL 范围内的 Invitrogen™ ANZA 93 *HpaII* 酶或 0.25 - 0.5 U/ μL 范围内的 Thermo Scientific™ *HpaII* 酶时，可以获得最佳性能。

6. 重新悬浮 PCR 混合物，并将适当的体积转移到纳米微孔板上。密封纳米微孔板并将其装载入 QIAcuity 仪器。开始运行。

有关 PCR 设置、推荐循环和成像条件的其他信息，请参阅本手册第 22 页的“方案：使用 CGT dPCR Assay 进行病毒载体绝对定量”。本方案已经涵盖了第 1 步和第 2 步。

方案：使用 CGT dPCR Assay 进行病毒载体绝对定量

该方案描述了如何构建 QIAcuity PCR 反应体系，用于使用 CGT Viral Vector Lysis Kit 和 CGT dPCR Assay 对产生的病毒载体裂解物进行载体基因组滴度测定。

开始前重要注意事项

- 4x QIAcuity Probe PCR 预混液含有 QuantiNova DNA 聚合酶，该聚合酶在室温下不起作用。PCR 方案必须从 95°C 下 2 分钟的强制性初始孵育步骤开始以激活该酶。
- 提供荧光染料作为 QIAcuity Probe PCR 预混液的组分，用于可靠地检测 dPCR 板中的适当填充量。
- 务必从本手册中规定的循环条件和引物浓度开始。
- CGT dPCR Assay 可用于单重或多重反应。
- 移液准确度和精密度会影响定量结果的一致性。确保在移液过程中没有气泡引入 dPCR 纳米微孔板的反应孔中。

开始之前的准备事项

- 重新悬浮冻干 CGT dPCR Assay：在首次打开试管之前，先将其短暂离心。向试管中加入 330 μ L TE 缓冲液得到 20x 原液，并在室温下放置 20 分钟。涡旋并短暂离心。
- 解冻 QIAcuity Probe PCR 预混液并适当混匀。

操作流程

1. 根据表 9，使用 QIAcuity Probe PCR Kit 在标准 PCR 板中制备 PCR 反应混合物。密封反应板，通过涡旋反应混合物 5 次（每次 1 秒）彻底混匀，并在室温下孵育 10 分钟。

提示：建议多制备 10%，以便能够将所需体积全部转移到纳米微孔板上。

表 9.PCR 反应体系

组分	Nanoplate 8.5K (24 孔, 96 孔)	Nanoplate 26K (24 孔)
QIAcuity Probe PCR 预混液	3 μL	10 μL
CGT dPCR Assay 1, 20x [†]	0.6 μL	2 μL
可选：用于最多五重反应的其他 CGT 检测 (2、3、4、5) [‡]	0.6 μL	2 μL
限制酶 <i>Hpa</i> II (10 U/ μL)	0.15 μL (0.125 U/ μL) [§]	0.5 μL (0.125 U/ μL) [§]
裂解物 (来自第 4 步)	1.2 μL *	4 μL *
无核酸酶水	视情况而定	视情况而定
总反应体积	12 μL	40 μL

* 裂解物体积视情况而定，取决于所需的稀释度。PCR 反应体系中的水可以完全用病毒裂解物替代。

† 可以使用定制设计的检测。从推荐的引物和探针浓度开始，每个引物的浓度为 0.8 μM ，探针浓度为 0.4 μM 。

‡ 添加其他的 20x CGT dPCR Assay 或目标基因检测，以进行多重反应并同时检测多个靶标。重要提示：染料组合必须与 20x CGT dPCR Assay 1 中使用的染料组合不同。有关染料建议和 QIAcuity 上可用的相应通道，请参阅《QIAcuity 用户手册》(www.qiagen.com/HB-2717) 或《QIAcuity 用户手册扩展：应用指南》(www.qiagen.com/HB-2839)。

§ 当使用 0.025 - 0.125 U/ μL 范围内的 Invitrogen™ ANZA 93 *Hpa*II 酶或 0.25 - 0.5 U/ μL 范围内的 Thermo Scientific™ *Hpa*II 酶时，可以获得最佳性能

2. 重新悬浮 PCR 混合物，并将适当的体积转移到纳米微孔板上。使用 QIAcuity Nanoplate Kit 中提供的 QIAcuity Nanoplate Seal 正确密封纳米微孔板，并将其装载入 QIAcuity 仪器。开始运行。

热循环和成像条件

1. 在 QIAcuity Software Suite 中或 QIAcuity 仪器上，根据表 10 在 dPCR 参数下设置循环条件。
2. 在 QIAcuity Software Suite 中或 QIAcuity 仪器上的 dPCR 参数下，激活 **Imaging (成像)** 中所有需要的通道。根据表 11，从默认成像设置开始*。
3. 将纳米微孔板放入 QIAcuity 仪器并启动 dPCR 程序。

表 10.循环条件

步骤	时间	温度
初始热激活	2 分钟	95°C
两步循环（40 个循环）		
变性	15 秒	95°C
合并退火和延伸反应	30 秒	60°C

* 始终从推荐的循环条件开始。当使用定制设计的检测或其他供应商提供的检测时，循环次数以及退火/延伸反应期间的温度可能会有所不同。60°C 是 CGT dPCR 检测的最佳温度。

表 11.成像设置*

通道	暴露时间	增益
绿色 (FAM)	500 毫秒	6
黄色 (HEX)	500 毫秒	6
深红色 (Cy5)	400 毫秒	8
橙色	400 毫秒	6
红色	300 毫秒	4

* 成像设置可能需要根据检测进行调整。始终从建议的设置开始。

数据分析

1. 要根据实验设计设置反应板布局，请打开 QIAcuity Software Suite 并定义反应混合物、样本和对照品。可以在纳米微孔板运行之前或之后定义反应板布局。

提示：有关设置反应板布局的详细信息，请参阅《QIAcuity 用户手册》。

2. 运行完成后，原始数据会自动发送至 QIAcuity Software Suite。
3. 对于数据分析，请打开 QIAcuity Software Suite，在 **Plate Overview**（反应板概览）中选择单独的纳米微孔板进行分析。

提示：有关如何分析绝对定量数据的详细信息，请参阅《QIAcuity 用户手册扩展：应用指南》和《QIAcuity 用户手册》。

故障排除向导

故障排除向导能帮助解决可能出现的任何问题。如需更多信息，请参见我们技术支持中心的常见问题网页：www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx（如想获取联系信息，请访问www.qiagen.com）。

意见和建议

DNase I 消化

未能充分去除 DNA 杂质

- 确保 DNase I 酶的活性。
- 复溶后 DNase I 酶的正确储存：长期储存时，从玻璃瓶中取出原液，将其分为多个单次使用等分试样。等分试样可在 -15 至 -30°C 下最多储存 9 个月。解冻后的等分试样可在 2-8°C 下最多储存 6 周。请勿在解冻后重新冷冻等分试样。
- DNase I 酶的物理变性：请勿以涡旋方式混合复溶的 DNase I 或 DNase I 消化反应体系。应通过吹打、颠倒或翻转进行混合。
- 缓冲液条件欠佳，无法进行有效 DNase 消化：CGT DNase I 缓冲液的粘度很高。确保使用移液器吸取指定的体积且不含气泡。
- 饱和 DNase I 消化：在构建 DNase I 消化体系之前，尝试使用病毒颗粒样本的存储缓冲液或首选使用添加 0.01% CGT 样本稳定剂的存储缓冲液在低蛋白结合试管中稀释 AAV 样本（例如，1:10）。

反应体系

- 必须使用 CGT DNase I 缓冲液进行 DNase I 反应。缓冲液组分已经过优化用于去除 AAV 样本中的 DNA 杂质。使用其他缓冲液可能导致初步衣壳开口和病毒基因组丢失。
- 在 37°C 孵育后需要在 4°C 下冷却。偏离方案可能导致病毒基因组滴度定量不足。

消化后的样本储存

- 病毒基因组滴度定量不足：不建议在 DNase I 消化后储存样本。DNase I 酶在这一步骤中没有灭活，仍然能够消化可接触的 DNA。样本冷冻和解冻可能导致衣壳开口并且病毒基因组被活性酶消化。

衣壳裂解

衣壳在纳米微孔板反应器内开口

- 根据目标病毒颗粒，衣壳裂解效率在反应器内可能降低。确保在转移入纳米微孔板之前裂解颗粒衣壳。

衣壳裂解不足

- 进入裂解步骤之前未进行 DNase I 步骤：不应跳过 DNase I 反应。缓冲液组分对于颗粒的最佳裂解是不可避免的。可以跳过向反应体系中加入 DNase I 酶。在 DNase I 反应体系中加入 CGT DNase I 缓冲液是必不可少的。
- 跳过在 95°C 下孵育 10 分钟：必须进行热孵育，以实现有效的衣壳裂解以及待扩增基因组靶标在 PCR 过程中的最佳可及性。

意见和建议

蛋白酶 K

- 跳过蛋白酶 K 步骤：不是必须使用蛋白酶 K。建议使用不含蛋白酶 K 的工作流程。
- 跳过 95°C 孵育 10 分钟：必须进行加热步骤才能使蛋白酶 K 灭活。灭活不足会导致聚合酶在 PCR 步骤中被消化。
- 衣壳开口不足：不要使用涡旋方式混合蛋白酶 K 反应体系。

反应体系

- 在 95°C 孵育后需要在 4°C 下冷却。偏离方案可能导致病毒基因组滴度定量不足。

已裂解衣壳的连续稀释

总稀释度低于 100x

- 必须至少进行 100x 稀释（裂解后的稀释步骤和 PCR 反应体系中的稀释步骤算在一起）以避免抑制作用。请确保适当的连续稀释，使原始裂解物稀释至少 100x 或建议的 200x。

使用水进行稀释

- 使用水进行稀释可能会对滴度测定的稳健性和可重复性产生负面影响。CGT 稀释缓冲液配方已经过优化，可提供样本稳定性以及与 QIAcuity Probe PCR 化学试剂的高度兼容性。

需要更高的稀释度

- 需要高于 200x 的稀释度以符合 dPCR 浓度范围：更高的稀释度不是关键。

PCR

滴度低于预期

- *HpaII* 限制性消化不足：请按照方案中所述的 PCR 反应体系和限制酶说明进行操作。
- 在限制性消化中使用 *MspI* 酶代替 *HpaII*：*MspI* 与 QIAcuity 探针混合物的兼容性较差。请按照方案中所述的说明进行操作。
- 限制酶的选择：如果使用方案中建议以外的其他酶，请确保测试兼容性

预先使用 QIAcuity Probe PCR 化学试剂并优化 ITR 二级结构消化。

- 限制酶与 QIAcuity Probe PCR 混合物长时间孵育：新鲜制备预混液，在加入稀释的裂解物之前，不要孵育超过 90 分钟。

意见和建议

无阳性反应器

- 样本输入量低于检测限 (limit of detection, LOD)。
- 滴度很低或稀释度过高的样本：尝试减少稀释步骤，同时在衣壳裂解后始终保持至少 100x 的稀释度。
- 增加 PCR 的样本输入量。
- 从 8.5K 纳米微孔板改为 26K 纳米微孔板。
- 检测：检查与样本的兼容性。
- 循环条件：使用定制设计的检测或其他供应商提供的检测时，检查并优化退火/延伸温度。使用 QIAGEN 检测时，请遵循建议的循环程序。
- 成像设置：检查通道选择并与探针染料匹配。
- 抑制：裂解物必须在裂解后稀释至少 100x（稀释和 PCR 步骤算在一起）。
- 长时间初始变性：确保使用在 95°C 下初始变性 2 分钟的 QIAcuity Probe PCR 混合物运行 PCR。长时间变性可能会对 PCR 性能产生负面影响。

无限信号/无阴性反应器

- 样本稀释：增加稀释度以适应 dPCR 浓度范围。
- DNase I 灭活：DNase I 酶未正确灭活。请按照本手册中的说明进行操作。

阳性反应器和阴性反应器分离不良

- 定制检测：请检查探针系统（淬灭基团和荧光基团）的选择。遵循本手册附录中的设计指南。
- 裂解物稀释：必须至少稀释 100x，建议稀释 200x。
- 蛋白酶 K 灭活：需要对蛋白酶 K 进行适当的灭活。残留的蛋白酶 K 活性会对 PCR 性能和信噪比产生负面影响。按照本手册的蛋白酶 K 方案中描述的说明进行操作，以确保蛋白酶 K 正确灭活。

滴度

滴度高于预期

- DNase I 消化不足（请参阅故障排除章节“DNase I 消化”）。
- 使用参照方法时低估了滴度（例如，从 qPCR 转换为 dPCR；参比标准品供应商提供的滴度不准确）。

滴度低于预期

- 样本处理：使用水稀释 AAV 颗粒可能导致颗粒损伤以及下游处理过程中可量化基因组的损失。
- 衣壳开口不足（请参阅故障排除章节“衣壳裂解”）。
- DNase I 灭活不足（在 95°C 下孵育 10 分钟）。
- PCR/检测性能欠佳（请参阅故障排除章节“PCR”）。

滴度测定不一致

- 请参阅故障排除章节“处理和存放条件”

意见和建议

两种非 ITR 检测产生不同的滴度

- 目标样本可能包含片段化基因组或错误包装的基因组。
- 未正确执行 *HpaII* 消化：与距离较远的靶标相比，ITR 的二级结构对彼此相邻靶标的影响更大。
- PCR 检测不能完全匹配载体基因组（例如，引物和/或探针结合位点中的单核苷酸多态性 [single nucleotide polymorphism, SNP]）。
- 检测性能欠佳：请参阅故障排除章节“PCR”以及本手册附录中总结的设计指南。

使用 ITR 和非 ITR 检测测定的滴度存在差异

- ITR 滴度取决于多种因素，如处理方案、PCR 定量前 ITR 二级结构的有效去除、缓冲液条件以及目标病毒颗粒的碎片化和错误包装状态。
- 理论上，化学计量转换因子（例如，ITR 和非 ITR 靶标之间的因子为 2）不应用于将 ITR 靶标滴度转换为非 ITR 靶标滴度。

处理和存放条件

结果不一致

- 确保在每次使用前混匀试剂，如 CGT 裂解缓冲液。缺乏均质性可能导致结果不一致。
- 避免试剂盒试剂的反复冻融循环。
- 不同操作员之间的重复性欠佳：确保操作员遵守 CGT 病毒载体裂解方案。使用自动移液器时，所有操作员应使用相同的移液设置（例如，建议使用预分配模式，而不是直接移液模式）。

试剂盒中提供的试剂不足

- CGT 样本稳定剂：使用前，请确保使用水将提供的原液从 10% [v/v] 稀释至 1% [v/v]。
- CGT 裂解缓冲液：所提供的裂解缓冲液足以进行总共四次 10x 稀释（50 μ l 反应体系）。
- CGT 稀释缓冲液：所提供的稀释缓冲液足以进行总共四次 10x 稀释（50 μ l 反应体系）。

使用 PCR 循环仪进行加热步骤时的盖子温度

- 加热的盖子（如有可能）比未加热的盖子更可取。应选择比孵育温度高 5°C 的盖子温度。

存放条件

- 不建议长期储存工作流程的中间产物。

移液量

- 确保遵循移液器的下限和上限。我们建议移液量不要低于 1 μ l。考虑到试剂的粘度，并相应调整移液设置。

联系信息

如需技术支持和更多信息，请参见技术支持中心网页 www.qiagen.com/Support，拨打 00800-22-44-6000，或与 QIAGEN 技术服务部门或当地经销商（参见封底或访问 www.qiagen.com）联系。

附录：qPCR 检测向 dPCR 的转移以及定制设计检测的设计指南

CGT Viral Vector Lysis Kit 经过优化，可用于 CGT dPCR 检测。然而，该试剂盒也可用于定制设计检测或已经成功用于通过 qPCR 进行滴度测定的检测。

dPCR 取得成功的重要因素包括最佳引物对和探针的设计、使用合适的引物和探针浓度以及引物和探针的正确储存。最大限度减少引物和探针的非特异性退火特别重要。设计检测时，应遵循以下方面：

引物和水解探针的 T_m

- 所有引物的 T_m 均应为 58 – 62°C，且彼此之间应在 2°C 以内
- 探针的 T_m 应比引物的 T_m 高 8 – 10°C
- 由于淬灭效应，避免在探针的 5' 端靠近报告基因处使用胍
- 避免重复 4 个或更多相同的核苷酸，尤其是胍
- 选择结合链，以便使探针的 C 碱基多于 G 碱基

引物序列

- 引物的长度应为 18 – 30 个核苷酸，GC 含量应为 30 – 70%
- 应始终通过进行 BLAST 搜索来检查引物特异性。确保引物序列在样本中是唯一的
- 引物和探针序列不应互补
- 避免引物对 3' 末端的 2 个或 3 个碱基互补，以最大限度减少引物二聚体形成

存放条件

- 冻干引物和探针应在少量低盐缓冲液中溶解，以得到浓缩的原液（例如，100 μM ）。建议使用 TE 缓冲液 (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 溶解以大多数荧光染料标记的标准引物和探针。以荧光染料如 Cy5 和 Cy5.5 标记的探针应存放在 pH 7.0 的 TE 缓冲液中
- 引物和探针应分装为更小的等分试样并在 -20°C 下保存。避免反复冻融循环。

qPCR 检测向 dPCR 的转移

- 适宜的 real-time PCR 检测设计中采用的所有原则同样适用于 dPCR
- 请注意选用对 dPCR 推荐采用的循环条件和引物/探针浓度
- 为了优化表现欠佳的检测，退火步骤中的温度梯度可以在任何使用 QIAcuity Probe PCR 化学试剂的 real-time PCR 仪器上运行

更多信息参见《QIAcuity 应用指南》：www.qiagen.com/HB-2839

附录：关于使用 CGT Viral Vector Lysis Kit 进行的整个处理工作流程中稀释步骤的建议

CGT Viral Vector Lysis Kit 允许处理不同滴度的病毒载体样本。该试剂盒允许在整个工作流程中的不同步骤中进行稀释。有些稀释为强制性，如果不遵守，会对性能产生负面影响。其他稀释则为可选性，以便在广泛的基因组滴度范围内适应各种样本（纯化和未纯化）。

整个处理工作流程中所需的稀释

● 第 2 步：DNase I 反应

病毒载体样本可以直接加入到 DNase I 反应体系中，而无需初始稀释。在该步骤中，样本以 1:10 比例稀释。由此产生的总稀释度为 10x。

● 第 3 步：衣壳裂解

DNase I 消化后，样本在 CGT 裂解缓冲液中以 1:10 比例稀释。当第 2 步和第 3 步加在一起时，这将导致 100x 的总稀释度。

● 第 4 步：稀释系列

选项 1：建议使用 CGT 稀释缓冲液以 1:20 比例稀释裂解物。当第 2 步、第 3 步和第 4 步加在一起时，这将导致 2,000x 的总稀释度。

选项 2：裂解物可以使用 CGT 稀释缓冲液以 1:10 比例稀释。当第 2 步、第 3 步和第 4 步加在一起时，这将导致 1,000x 的总稀释度。

选项 3：裂解物可以在稀释系列中进行稀释。CGT Viral Vector Lysis Kit 提供的 CGT 稀释缓冲液足以进行四次 50 μ L 1:10 比例稀释。当第 2 步、第 3 步和第 4 步加在一起时，这将导致总稀释度为 1,000x（稀释系列中的第一次稀释）至 1,000,000x（稀释序列中的最后一次稀释）。

● 第 5 步：dPCR 设置

第 4 步中的选项 1：建议在 PCR 反应体系中以 1:10 比例稀释样本。为此，使用 1.2 μ L 稀释的裂解物进行 12 μ L 的 PCR 反应。当第 2 步至第 5 步加在一起时，这将导致 20,000x 的总稀释度。

或者，1:5 的稀释度就足够了，不会对 PCR 性能产生负面影响。为此，使用 2.4 μL 稀释的裂解物进行 12 μL 的 PCR 反应。当第 2 步至第 5 步加在一起时，这将导致 10,000x 的总稀释度*。

第 4 步中的选项 2：建议在 PCR 反应体系中以 1:20 比例稀释样本。为此，使用 0.6 μL 稀释的裂解物进行 12 μL 的 PCR 反应。当第 2 步至第 5 步加在一起时，这将导致 20,000x 的总稀释度。

或者，1:10 的稀释度就足够了，不会对 PCR 性能产生负面影响。为此，使用 1.2 μL 稀释的裂解物进行 12 μL 的 PCR 反应。当第 2 步至第 5 步加在一起时，这将导致 10,000x 的总稀释度*。

第 4 步中的选项 3：来自第一个稀释步骤的样本在 PCR 反应体系中需要进行至少 1:10 比例的稀释。为此，使用 1.2 μL 稀释的裂解物进行 12 μL 的 PCR 反应。当第 2 步至第 5 步加在一起时，这将导致 10,000x 的总稀释度*。稀释系列中的所有其他样本均已经过充分稀释。其在 dPCR 反应体系中的输入体积可以自由选择。

*为了保持 dPCR 检测范围（在 8.5K 纳米微孔板上为 2.5 拷贝/ μL - 15,000 拷贝/ μL ），可以选择更高的稀释度，而无需担心。

表 12. 总稀释度概览

步骤	各个步骤内的稀释度	总稀释度
第 2 步: DNase I 反应	1:10	10x
第 3 步: 衣壳裂解	1:10	100x
第 4 步: 稀释系列		
选项 1	1:20	2,000x
选项 2	1:10	1,000x
选项 3	1:10	1,000x - 1,000,000x
第 5 步: dPCR 设置		
第 4 步中的选项 1	1:5 - 1:10	10,000x - 20,000x
第 4 步中的选项 2	1:10 - 1:20	10,000x - 20,000x
第 4 步中的选项 3: 稀释系列中的第一个样本	1:10	10,000x
第 4 步中的选项 3: 稀释系列中的所有其他样本	视情况而定	>10,000x - 1,000,000x

预期滴度 $> 1 \times 10^{11}$ vg/mL 的病毒载体样本的初始稀释

- 在开始处理工作流程之前，可以使用添加 0.01% CGT 样本稳定剂的相应样本存储缓冲液对预期滴度很高的病毒载体样本进行稀释。在存储缓冲液中添加 CGT 样本稳定剂可能会减少使用 CGT Viral Vector Lysis Kit 可以处理的样本数量。或者，可以在低蛋白结合试管中进行样本稀释。

预期基因组滴度 $< 1 \times 10^{11}$ vg/mL 的病毒载体样本的初始稀释

- 不建议进行初始样本稀释。如果需要，可以在衣壳裂解和下游稀释步骤中进行额外的稀释。CGT Viral Vector Lysis Kit 具有足够的裂解和稀释缓冲液，可在 50 μ L 的最终反应体积中进行 4 次 1:10 比例的稀释。

订购信息

产品名称	内容物	目录编号
CGT Viral Vector Lysis Kit (100)	对于 100 次 DNase I 反应 (50 μ L): CGT 样本稳定剂、CGT DNase I 缓冲液、DNase I、CGT 裂解缓冲液、CGT 稀释缓冲液和无核酸酶水	250272
CGT Viral Vector Lysis Kit (1000)	对于 1000 次 DNase I 反应 (50 μ L): CGT 样本稳定剂、CGT DNase I 缓冲液、DNase I、CGT 裂解缓冲液、CGT 稀释缓冲液和无核酸酶水	250273
dPCR CGT Assay ITR2/5 (FAM) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250230
dPCR CGT Assay ITR2/5 (HEX) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250231
dPCR CGT Assay ITR2/5 (HEX) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250232
dPCR CGT Assay bGH polyA (FAM) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250233
dPCR CGT Assay bGH polyA (HEX) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250234
dPCR CGT Assay bGH polyA (Cy5) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250235

产品名称	内容物	目录编号
dPCR CGT Assay GFP (FAM) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250236
dPCR CGT Assay GFP (HEX) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250237
dPCR CGT Assay GFP (Cy5) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250238
dPCR CGT Assay WPRE (FAM) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250239
dPCR CGT Assay WPRE (HEX) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250240
dPCR CGT Assay WPRE (Cy5) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250241
dPCR CGT Assay SV40 promoter (FAM) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250242
dPCR CGT Assay SV40 promoter (HEX) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250243
dPCR CGT Assay SV40 promoter (Cy5) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250244

产品名称	内容物	目录编号
dPCR CGT Assay SV40 polyA (FAM) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250245
dPCR CGT Assay SV40 polyA (HEX) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250246
dPCR CGT Assay CMV promoter (FAM) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250247
dPCR CGT Assay CMV promoter (HEX) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250248
dPCR CGT Assay CMV promoter (Cy5) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250249
dPCR CGT Assay hGH polyA (FAM) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250250
dPCR CGT Assay hGH polyA (HEX) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250251
dPCR CGT Assay CMV enhancer (FAM) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250252
dPCR CGT Assay CMV enhancer (HEX) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250253

产品名称	内容物	目录编号
dPCR CGT Assay CMV enhancer (Cy5) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250254
dPCR CGT Assay AMP resistance (FAM) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250255
dPCR CGT Assay AMP resistance (HEX) (20x)	对于 500 次 dPCR 反应 (8.5K 纳米微孔板, 每个反应体系 12 μ L) 冻干预混引物和探针。	250256
Proteinase K (1 mL, 5 mL)	蛋白酶 K 溶液 (浓度 \geq 20 mg/mL, 活性 \geq 800 U/mL)	RP107B-1 RP107B-5
QIAcuity Probe PCR Kit (1 mL, 5 mL)	即用型 4x 浓缩预混液, 水	250101 250102
QIAcuity Nanoplate 8.5K 96-well (10)	10 个 QIAcuity Nanoplates 8.5K (96 孔) 11 个 Nanoplate Seal	250021
QIAcuity Nanoplate 8.5K 24-well (10)	10 个 QIAcuity Nanoplates 8.5K (24 孔) 11 个 Nanoplate Seal	250011
QIAcuity Nanoplate 26K 24-well (10)	10 个 QIAcuity Nanoplates 26K (24 孔) 11 个 Nanoplate Seal	250001
QIAcuity One, 2plex Instrument	可检测最多 2 种荧光染料的单板数字 PCR 仪、封板滚轮、USB 闪存和 QIAcuity Software Suite: 包括 1 次预防性保养访问。还包括为期一年的人工、差旅和部件担保。	911000

产品名称	内容物	目录编号
QIAcuity One, 5plex Instrument	可检测最多 5 种荧光染料的单板数字 PCR 仪、封板滚轮、USB 闪存和 QIAcuity Software Suite: 包括 1 次预防性保养访问。还包括为期一年的人工、差旅和部件担保。	911020
QIAcuity Four Instrument	可检测最多 5 种荧光染料的四板数字 PCR 仪、笔记本电脑、条形码扫描仪、封板滚轮、USB 闪存和 QIAcuity Software Suite: 包括安装、培训及 1 次预防性保养访问。为期一年的人工、差旅和部件担保。	911040
QIAcuity Eight Instrument	可检测最多 5 种荧光染料的八板数字 PCR 仪、笔记本电脑、条形码扫描仪、纳米板封板滚轮、USB 闪存和 QIAcuity Software Suite: 包括安装、培训及 1 次预防性保养访问。为期一年的人工、差旅和部件担保。	911050
相关产品		
Nanoplate Seals (11)	11 个 Nanoplate Seal	250099
RNase-Free DNase Set (50)	1500 孔尼兹单位不含 RNase 的 DNase I	79254
RNase-Free DNase Set (250)	5 x 1500 孔尼兹单位不含 RNase 的 DNase I	79256
QIAcuity HEK293 resDNA Quant Kit (96)	适用于 96 次反应: QIAcuity HEK293 resDNA Quant 冻干预混液 (4x), 阳性对照品, 内部对照品, 不含 RNase 的水	250224
HEK293 resDNA Quant Standard Kit	HEK293 resDNA Quant Standard, 复水缓冲液	250225

产品名称	内容物	目录编号
QIAcuity CHO resDNA Quant Kit (96)	适用于 96 次反应: QIAcuity CHO resDNA Quant 预混液, 阳性对照品, 内部对照品, 不含 RNase 的水	250222
CHO resDNA Quant Standard Kit	CHO resDNA Quant Standard, 复水缓冲液	250223
QIAcuity <i>E. coli</i> resDNA Quant Kit (96)	适用于 96 次反应: QIAcuity <i>E. coli</i> resDNA Quant 预混液, 阳性对照品, 内部对照品, 不含 RNase 的水	250220
<i>E. coli</i> resDNA Quant Standard Kit	<i>E. coli</i> resDNA Quant Standard, 复水缓冲液	250221

有关最新许可信息以及产品特定免责声明, 请参阅相应的 QIAGEN 试剂盒手册或用户手册。QIAGEN 试剂盒手册和用户手册可从 www.qiagen.com 或 QIAGEN 技术服务部门以及当地经销商处获取。

文档修订历史

修订版本

说明

2023 年 3 月

初次发布

提示

CGT Viral Vector Lysis Kit 和 CGT dPCR Assay 有限许可协议

使用本产品表示本产品的任何购买者或使用者同意遵循如下条款：

1. 本产品在使用时只能遵守本产品随附的方案和本手册，且只能与试剂盒内包含的组分协同使用。除了本产品随附的方案、本手册以及 www.qiagen.com 上提供的其他方案中所述的情况，QIAGEN 并未在其任何知识产权下许可将这些试剂盒的所含组件与这些试剂盒中未包含的任何组分协同使用或者相整合。其中一些附加方案可能是由 QIAGEN 用户为 QIAGEN 用户提供的。这些方案未经 QIAGEN 彻底测试或优化。QIAGEN 既不对其进行担保，也不保证其没有侵犯第三方的权利。
2. 除非相关许可明确说明，否则 QIAGEN 并不保证这些试剂盒和/或其使用不会侵犯第三方的权利。
3. 本检测板及其组件为一次性用品，不可重复使用、翻新或转卖。
4. 除了明确陈述的许可外，QIAGEN 否认提供任何其他明示或暗示许可。
5. 这些试剂盒的购买者和使用者同意不采取、也不允许其他人采取任何步骤来实施或推动实施以上禁止的任何行为。为使本“有限许可协议”条款的规定内容或者保护这些试剂盒和/或其组分的知识产权，QIAGEN 可能会在法庭上执行本协议的相关禁令，并追讨所有调查和诉讼费用（包括律师费）。

如需获得更新的许可条款，请访问 www.qiagen.com。

商标：QIAGEN®、Sample to Insight® (QIAGEN Group)；QIAcuity®；FAM™ (Life Technologies Corporation)；Invitrogen™、Anza™（赛默飞世尔科技或其子公司）。
03/2023 HB-3362-001 © 2023 QIAGEN，保留所有权利。

