

产品手册

Influenza A (H7N9) Pseudotyped Virus(GFP-Luciferase)

甲型流感 (H7N9) 假病毒(GFP-Luciferase)

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗!

版本号: V6.0.1

目录

一、	产品基本信息及组分.....	3
二、	包装、运输及储存.....	3
三、	原理描述.....	3
四、	感染能力.....	4
五、	使用方法.....	4
	中和验证实验.....	4
	1) 细胞准备.....	5
	2) 抗体稀释.....	5
	3) 假病毒感染液稀释.....	6
	4) 假病毒中和抗体孵育.....	6
	5) 加样步骤.....	7
	6) 荧光素酶检测.....	7
六、	结果示例.....	7
七、	使用注意事项.....	7

一、产品基本信息及组分

基本信息

产品编号	产品名称
GM-0220PV142	Influenza A (H7N9) Pseudotyped Virus(GFP-Luciferase) 甲型流感 (H7N9) 假病毒(GFP-Luciferase)

组成成分

组分编号	产品名称	储存	编号/规格		
			GM-0220PV142-1	GM-0220PV142-2	GM-0220PV142-3
GM-84723PLV	Influenza A (H7N9) Pseudotyped Virus(GFP-Luciferase)	-80°C	50 μL/管*1 管	50 μL/管*5 管	50 μL/管*10 管

二、包装、运输及储存

1. 假病毒产品干冰运输，-80°C储存。（保存时间以 12 个月以内为宜，如保存时间过长，使用前请重新检测病毒滴度）
2. 请收到产品立即确认产品是否为冻存状态，并立即存入-80°C冰箱。

三、原理描述

H7N9 以人类免疫缺陷病毒 I 型 (HIV-1) 的结构蛋白 (gag-pol) 和流感病毒的衣壳蛋白——血凝素 HA (GenBank ID: AGI60292.1) 和神经氨酸酶 NA (GenBank ID:AGI60295.1) (Strain: A/Shanghai/4664T/2013) 共同在 HEK-293T 细胞内表达后，自我组装并包裹表达 ZsGreen1 荧光和 Luciferase 荧光素酶的核酸。该假病毒为复制缺陷型病毒，感染后不能产生新的病毒颗粒，安全性高，结构高度类似真病毒，因此可用于中和抗体滴度测定、抑制剂筛选、病毒入侵研究以及 H7N9 疫苗开发。

ZsGreen1 相较于传统 GFP 的主要优势在于：本身量子产率更高、荧光更亮，同时 ZsGreen1 对 pH 和环境条件相对更稳定，有利于提高检测的灵敏度和信噪比

H7N9 假病毒包含病毒的中和抗原，并具有感染细胞的能力。当样品具有中和活性时，与假病毒作用后，其感染细胞的能力会减弱。通过多功能酶标仪测量每个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进行比较，可以判断样品是否具有中和活性，并计算样品有效作用浓度。中和抗体滴度是指在 50%假病毒被抑制时，抗体稀释倍数的倒数。

四、 感染能力

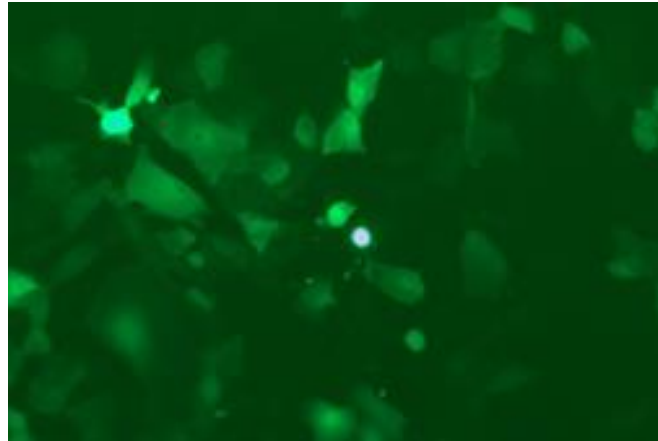


图1 Influenza A (H7N9) 假病毒感染 MDCK 细胞荧光图片

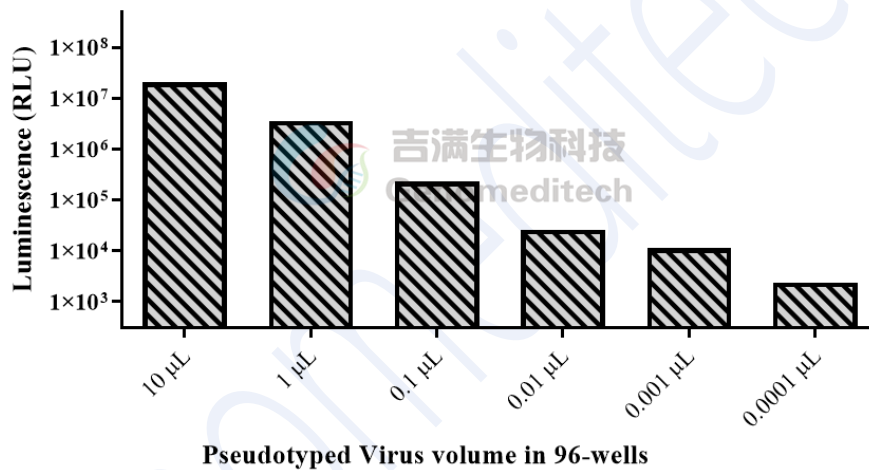


图2 吉满 Influenza A (H7N9) 假病毒感染 MDCK 细胞测定 Luciferase 数值

五、 使用方法

因细胞表面受体表达情况不同、细胞培养状态不同、实验环境的差异等，假病毒量、受体细胞量、细胞密度、抗体或血清的用量均需进行预实验优化操作步骤以获得更好的结果。

中和验证实验

在本实验案例中，MDCK (MEM+1%P.S+10% FBS) 细胞量为 1×10^4 Cells/孔，病毒使用 0.5μ L/孔。假设本次使用抗体母液浓度为 1 mg/mL ，Conc.01 终浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$ ，4 倍梯度稀释。Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11，B12 为 0 浓度对照。周围孔加入 100μ L PBS，以防止边孔蒸发。孔板排布如下：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	抗体 100 μg/mL	25 μg/mL	6.25 μg/mL	1.56 μg/mL	390.63 ng/mL	97.66 ng/mL	24.41 ng/mL	6.1 ng/mL	1.53 ng/mL	381.47 pg/mL	95.37 pg/mL	0
C	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D												
E												
F												
G												
H												

1) 细胞准备

在实验前 20-24 h，将细胞从培养皿中消化下来，以新鲜完全培养基（MEM +1%P.S+10% FBS）重悬细胞，检测细胞活力并计数。离心 130–200 × g (根据不同细胞可调整转速)收集细胞，再以新鲜完全培养基调整细胞浓度为 1×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μL Cells /孔至中间 12 个孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖上班盖，于孵箱中孵育过夜。

2) 抗体稀释

使用无菌 96 孔 U 底板准备抗体稀释。（如果是血清样品，需置于 56 °C 水浴锅中灭活 30 min~1 h 后使用）

对于待测样品，使用一行（如 B 行，单重复可以检测 6 个抗体）

加入 Assay buffer（基础培养基含 10% FBS），各孔体积见下表。如 B1 孔中加入 58.67 μL 的 Assay buffer，B2-B12 加入 55 μL 的 Assay buffer。

吸取 14.67 μL 待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B1），混匀。

母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 18.33 μL，加入次孔											对照孔
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	14.67 μL 抗体加入	58.67 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL
C												
D												
E												
F												
G												
H												

从第一个梯度稀释孔 (B1) 中吸取 18.33 μL , 加入到第二个梯度稀释孔 B2, 充分混匀。

对于不同浓度的抗体, 首孔加入药物量不同, 首孔后的梯度稀释操作是相同的, 可以使用排枪进行实验。

以此类推, 直至 B11 孔, B12 为不加抗体的对照。

抗体稀释完毕后, 盖上市盖, 以备后续使用。

3) 假病毒感染液稀释

准备 2 个无菌 1.5 mL EP 管, EP 管 A 加入 90 μL Assay buffer, EP 管 B 加入 630 μL Assay buffer。

从 -80°C 冰箱中取出病毒, 置于冰上融化后使用。

EP 管 A: 加入 10 μL 病毒液与 Assay buffer 混匀。

EP 管 B: 取 70 μL EP 管 A 稀释混匀后的病毒液, 与 Assay buffer 混匀。(根据 12 个孔病毒使用量计算, 实际按需求稀释)

使用无菌 96 孔 U 底板, B1-B12 孔, 每孔加入 55 μL EP 管 B 稀释后的病毒液。

同时设置不加病毒液及抗体液的细胞对照孔 (空白)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	假病毒	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL	55 μL
C												
D												
E												
F												
G												
H												

4) 假病毒中和抗体孵育

按下表将连续稀释的抗体与上述假病毒液等体积混合:

组分	体积
假病毒感染稀释液	55 μL
抗体稀释液	55 μL
Total	110 μL

混合液在室温孵育 1h。

5) 加样步骤

步骤 1 接种过夜的靶细胞，每孔吸弃 100 μ L 培养基。

将孵育完成的混合液每孔加入 100 μ L。

盖上板盖，于 37°C CO₂ 培养箱中培养。

培养箱孵育 6 h 后更换新鲜完全培养基继续培养 48 h。

6) 荧光素酶检测

48h 后，通过荧光素酶检测试剂盒（GMOne-Step 2.0 荧光素酶报告基因检测试剂盒/GM-040513A）在酶标仪（Moleculardevices/SpectraMax L）上检测荧光素酶的活性判定抗体中和效率。

数据分析：

感染抑制率

$$\text{Inhibition}(\%) = \left(1 - \frac{\text{处理组 RLU} - \text{空白}}{\text{SO RLU} - \text{空白}} \right) \times 100\%$$

GraphPad Prism 6.0 计算 50% 中和剂量。

六、 结果示例

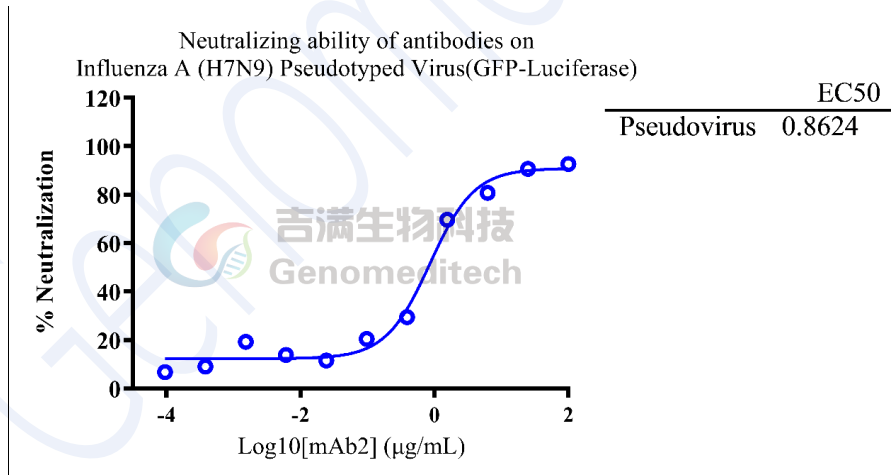


图 2 mAb3 抗体的中和验证结果

七、 使用注意事项

- 1、冻融会导致假病毒稳定性降低，从而影响检测结果，使用时应避免反复冻融。
- 2、病毒操作时请在生物安全柜中进行。
- 3、病毒操作时请穿好实验服，戴口罩和乳胶手套。
- 4、如果使用时本品不慎溅到眼睛、皮肤或其他身体部位请立即使用大量清水冲洗。
- 5、使用本品所产生的实验废弃物需要通过高压灭菌处理后按照医疗废弃物处理要求进行处理。