吉玛重组腺相关病毒操作手册

GenePharma Recombinant Adeno-Associated Virus Operation Manual

2017 年 6 月

如有疑问欢迎垂询

上海电话：021-51320195-8009　　E-mail：rnaisupport@genepharma.com

苏州电话：0512-86668828-8042　　E-mail：szsupport@genepharma.com

http://www.genepharma.com

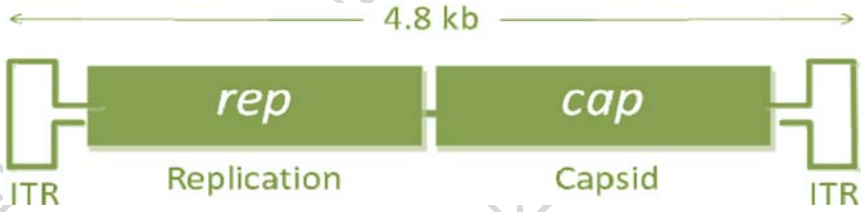
目 录

产品简介 3
腺相关病毒载体优势 3
重组腺相关病毒载体不同血清型 4
实验室安全措施 6
流程描述 7
材料与仪器 8
使用方法 9
运输和储存 13
常见问题及解决方案 13
吉玛案例 15
附录 18

产品简介

腺相关病毒属微小病毒科(parvovirus)，为无包膜的单链线状DNA 病毒。AAV的基因组约4700bp，包括上下游两个开放读码框架(ORF)，位于分别由145 个核苷 酸组成的2 个反向末端重复序列(ITR)之间。

基因组中有3 个启动子(P5、P19 和P40) 和2 个开放阅读读框(ORF)，rep和 cap，如下图所示。



rep 编码4 个重叠的多功能蛋白，即Rep78、Rep68、Rep52 和 Rep40，其中Rep78 与Rep68 参与AAV 的复制与整合，Rep52 和Rep40 具有解螺旋 酶和ATP 酶活性，与Rep78、Rep68 共同参与单链基因组的复制；cap 编码的VP1、 VP2、VP3 是装配成完整病毒所需要的衣壳蛋白，它们在AAV 病毒整合、复制和装 配中其重要作用。

腺相关病毒载体优势

1. 安全性高：迄今从未发现野生型AAV 对人体致病，重组AAV 基因组序列上去 除了大部分的野生型AAV 基因组元件，进一步保证了安全性；
2. 免疫原性低：AAV2 的基因组仅4681个核苷酸，便于用常规的重组DNA

技术 进行操作，而且进行动物实验时造成的免疫反应小；

3. 宿主范围广：能感染分裂细胞和非分裂细胞；
4. 表达稳定：能介导基因的长期稳定表达；
5. 物理性质稳定：在60℃不能被灭活，能抗氯仿。

重组腺相关病毒载体不同血清型

研究发现 AAV 具有多种血清型，各种不同血清型的 AAV 载体的主要区别是衣壳蛋白不同，因此对不同的组织和细胞的转染效率存在差异。目前吉玛基因在包装腺相关病毒时有 AAV-2 和 AAV-DJ 血清型可供客户选择（后续将不断完善可供选择的血清型），建议客户针对不同组织器官选择相应血清型的 AAV 病毒，见下表。

血清型	组织亲和性
AAV1	肌肉，心脏，骨骼肌（包括心肌），神经组织
AAV2	中枢神经，肌肉，肝脏，脑组织，眼
AAV3	肌肉，肝脏，肺，眼
AAV4	中枢神经，肌肉，眼，脑
AAV5	肺，眼，中枢神经，关节滑膜，胰腺
AAV6	肺，心脏
AAV7	肌肉，肝脏
AAV8	肝脏，眼，中枢神经，肌肉
AAV9	心脏，肌肉，肺（肺泡），肝脏，中枢神经

9 种不同血清型 AAV 对各组织器官细胞的亲和性

细胞系	AAV-1	AAV-2	AAV-3	AAV-4	AAV-5	AAV-6	AAV-8	AAV-9	AAV-DJ	AAV-DJ/8
Huh-7	13	100	2.5	0.0	0.1	10	0.7	0.0	500	0.2
HEK293	25	100	2.5	0.1	0.1	5	0.7	0.1	500	0.3
HeLa	3	100	2.0	0.1	6.7	1	0.2	0.1	667	0.2

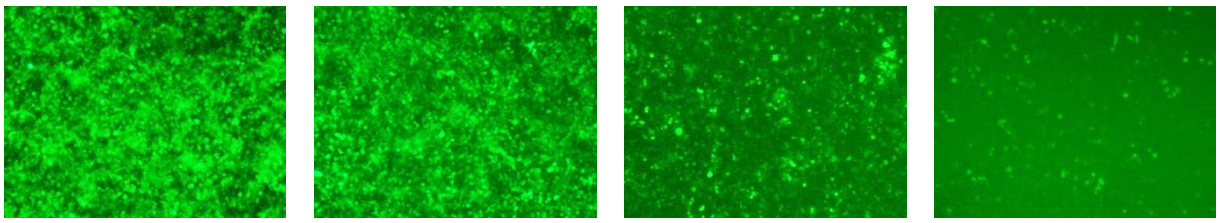
HepG2	3	100	16.7	0.3	1.7	5	0.3	ND	1250	0.5
Hep1A	20	100	0.2	1.0	0.1	1	0.2	0.0	400	0.1
911	17	100	11	0.2	0.1	17	0.1	ND	500	0.0
CHO	100	100	14	1.4	333	50	10	1.0	25000	5.0
COS	33	100	33	3.3	5.0	14	2.0	0.5	500	0.3
MeWo	10	100	20	0.3	6.7	10	1.0	0.2	2857	1.0
NIH3T3	10	100	2.9	2.9	0.3	10	0.3	ND	500	0.1
A549	14	100	20	ND	0.5	10	0.5	0.1	1000	0.1
HT1180	20	100	10	0.1	0.3	33	0.5	0.1	333	0.2
单核细胞	1111	100	ND	ND	125	1429	ND	ND	100	ND
不成熟 DC	2500	100	ND	ND	222	2857	ND	ND	200	ND
成熟 DC	2222	100	ND	ND	333	3333	ND	ND	100	ND

注：

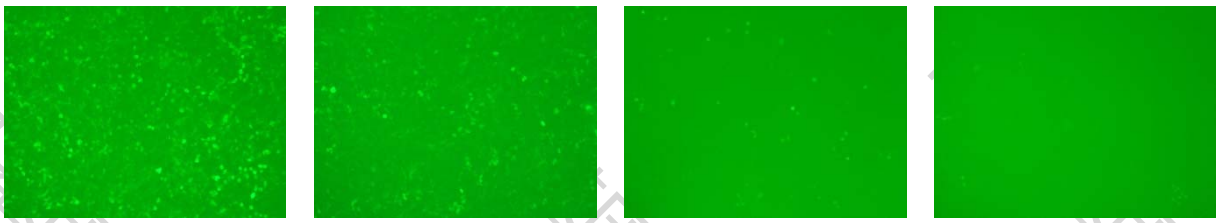
1. ND = 未确定；
2. AAV-DJ 经过 DNA 改组生成混合衣壳，其中结合了 8 种不同天然血清型；
   AAV-DJ 载体的感染率比天然血清型有大幅提升，适用于各种组织和细胞。

不同血清型AAV 感染体外培养细胞比较

AAV-DJ



AAV-2



实验室安全措施

重组腺相关病毒的安全等级被 NIH 官方定为 BL-2 级，使用时请严格遵从 NIH 推荐的安全指南。更多生物安全标准信息，您可以从 http://bmbl.od.nih.gov/获得。

基本操作规范如下：

1、在实验室工作时，请穿着连体衣、隔离服或工作服；应戴上合适的手套和口罩。

2、病毒操作时请使用生物安全柜。如果使用普通的超净工作台操作病毒，请在取用病毒前关闭风机，并在关闭所有含有病毒的相应容器盖子后，再打开风机。

3、所有操作请尽量减少气溶胶和微小液滴的形成。如果出现病毒污染，请立即用 70%的酒精加 1%SDS 溶液擦拭干净。

4、如需离心，应使用密封性好的离心管，可用 Para film 膜封口后在专用离心机中离心。

5、用显微镜观察细胞感染情况时请先拧紧培养瓶或盖紧培养板，并在使用 70%乙醇清理瓶外壁后到显微镜处观察拍照。离开显微镜试验台之后，用 70%乙醇清理显微镜实验台。

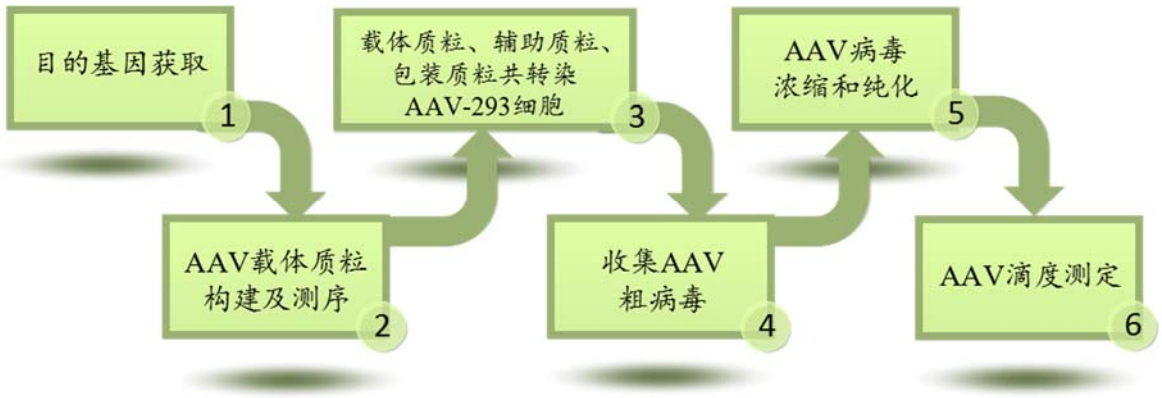
6、所有受到污染的材料、标本和培养物在废弃或清洁再利用之前，必须清除污染。废弃的含病毒的培养基加入 84 消毒液（1:20 左右），浸泡一天后丢弃。接触过病毒的枪头，离心管，培养板等其他物品可用 84 消毒液稀释液处理，也可以用煮沸

处理半小时或高压湿热灭菌（121℃，30min）。

7、手套用完后，应先消毒再摘除，随后必须洗手。

流程描述

制备腺相关病毒颗粒的穿梭质粒及其骨架质粒，上述质粒载体分别进行高纯度无内毒素抽提，用本公司的转染试剂 RNAi-Mate 进行共转染 AAV-293 细胞，转染后 6 h 更换为完全培养基，培养 72H，然后收集细胞和上清液置于离心管中，冻融三次，2000rpm 离心 5 分钟，取上清，而后对其纯化和浓缩后得到高滴度的腺相关病毒浓缩液，在 293T 细胞中测定并标定病毒滴度。 在一定滴度范围内的腺相关病毒颗粒可以满足大部分体内体外实验需求。



材料与仪器

实验材料

细胞株

AAV-293，腺相关病毒的包装细胞，为贴壁依赖型成上皮样细胞，经培养生长增殖形成单层细胞，购自中国科学院细胞库，常规培养使用含 10% FBS 的 DMEM (含 4.0 mM L-Glutamine, 100 U/ml penicillin,100 ug/ml Streptomycin)中，37° C 5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。

质粒

重组穿梭质粒和包装质粒由吉玛构建制备，采用高纯度质粒中量抽提试剂盒抽提质粒 DNA，质粒 DNA 溶于除菌的双蒸水中，以紫外光吸收法测定其浓度及纯度，保证所提质粒 DNA 的 A260/A280 在 1.8～2.0 之间。

试剂

试剂名称	试剂来源	Cat No.
DMEM	GIBCO	12100-046
胎牛血清 FBS	GIBCO	10099-141
胰酶 Trypsin-EDTA Solution	GIBCO	25200-072
双抗（青链霉素）	GIBCO	15140-122
Hepes	AMRESCO	7365-45-9
RNAi-Mate 转染试剂	吉玛基因	G04001
Polybrene	Sigma	H9268

使用方法

重组腺相关病毒在细胞水平使用

腺相关病毒有很广泛的宿主范围，可以感染多数人类或者其他哺乳动物细胞系或部分原代细胞。

要得到最佳的实验结果，确定腺相关病毒的最佳用量是非常重要的。用量不足，则不能达到理想的感染效率；用量过大，会对细胞有毒害作用或者其他不可预测的效应。最佳用量因不同的细胞类型而有显著差异。

为了确定最适病毒用量，可使用 Genepharma 提供的携带报告基因的阴性对照腺相关病毒做预实验。用不同稀释倍数的阴性对照腺相关病毒感染细胞，在感染 3 天后检测感染效率。通过在显微镜下观察细胞的报告基因的表达情况来确定既达到所需感染效率又不会引起细胞表型变化的病毒浓度范围。

1、病毒滴度复核（有限稀释法测定）

（1）滴度检测前一天，对 293T 细胞传代，96 孔板每个孔加入约 0.5~10×10^3 个细胞，体积 100ul；

（2）第二天，准备 7~10 个无菌 EP 管，在每个管中加入 90ul 的新鲜完全培养基（高糖 DMEM+10%FBS）；

（3）取待测定的病毒原液 10ul 加入到第一个管中，轻轻混匀后，取 10ul 加入到第二个管中，然后依次操作直到最后一管；

（4）选取所需的细胞孔，吸弃 90ul 培养液，然后将稀释好的病毒液，从低浓度到高浓度依次加入，放入 37℃ 5% CO2 培养箱中培养；

（5）24 小时后，每孔换入 100ul 新鲜培养液，小心操作，不要吹起细胞；放入 37℃ 5% CO2 培养箱中继续培养。

（6）3 天后，观察荧光表达情况，正常情况下，荧光细胞数随稀释倍数增加而相应减少，计数最后二个含有荧光细胞的孔中的荧光细胞个数，将得到的数值除以各自相应的稀释倍数，即可计算出病毒原液的滴度值（通常以倒数第二个孔中的读数值更为准确）。

注释：

（1） 典型的病毒滴度测定结果见图一（Fig. 1）；

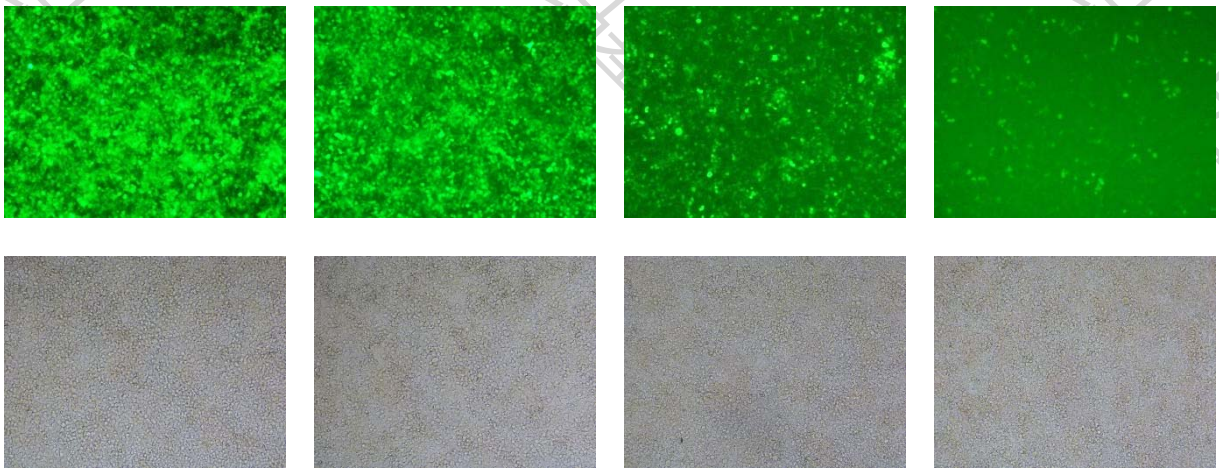


Fig. 1 典型的腺相关病毒滴度

（2）病毒滴度测定结果还依赖于本身实验系统，如 293T 细胞代数、细胞状态、荧光显微镜品质、相关实验试剂及实验人员操作技能，因此不同实验室测得滴度数值会有所差异（2~10 倍），但基本不会影响正常实验流程；

（3）病毒滴度(BT = TU/ml, transducing units)计算方法：

TU/uL=（P×N/100×V）×1/DF，P=%GFP+cells，N=转染时的细胞数，V=每孔加入

病毒稀释液体积（uL），DF=稀释因子（dilution factor）=1（undiluted）、10^{-1} (diluted 1/10)、 10^{-2} (diluted 1/100)。

2、靶细胞感染预实验

1） 试验前一天分别接种 3~5×10^3 个目的细胞于 96 孔培养板每孔中，所加培养基体积为 100uL。不同种类的细胞生长速度有所差异，为保证有较好的实验结果，进行病毒感染时细胞的融合度为 60~80%。因为腺相关病毒表达需要一定的时间，故在进行感染实验时细胞接种不宜过密。

2） 干扰预试验共分为二组，每组均有不同梯度的 MOI 值（Multiply of Infection）。第一组为正常情况下感染，也就是在完全培养基中直接加入病毒。第二组为感染时添加 3~8 ug/mL 的 Polybrene。Polybrene 在大部分细胞中可以有效的提高感染效率。

3） 感染前为细胞换液，吸去细胞上清，按不同的分组情况加入所需的培养基 90uL，每组三个复孔。

4） 准备 3 个无菌的 EP 管，吸取 10ul 的 1×10^8TU/ml 的病毒（预先从-80℃取出，迅速融化，4℃低温操作）加入到第一个管子中，轻柔混匀，勿产生泡沫。同样从第一管中吸取 10ul 的病毒到第二管中，混匀。再从第二管中吸取 10ul 的病毒到第三管中，混匀。这样就得到了四个不同梯度的病毒：原液，10 倍稀释，100 倍稀释，1000 倍稀释。

5） 把细胞放回培养箱孵育。

6） 8-12 小时以后，请观察细胞状态。如果细胞状态与未感染组无明显差异，表明腺相关病毒对细胞没有明显毒性作用，请不要换液，继续培养，直至 24 小时后更换

为新鲜培养基。

7） 感染 48~72 小时后，观察荧光表达情况。对于生长迟缓代谢慢的细胞，可以适当延长观察时间，中途可以换液保持细胞的良好状态。

8） 以上的操作是针对贴壁细胞设计的。悬浮细胞的区别主要在细胞的分盘上，它不需要提前一天分盘。操作时直接将细胞离心后悬浮在不同的培养基中，计数分盘后，即可加入病毒。

10） 通过首次实验和重复实验，确认目的细胞的感染方法和感染参数。

3、正式试验

通过预实验可以帮助确定使用重组腺相关病毒颗粒感染目的细胞的优化条件，如细胞接种密度，是否需要添加 Polybrene，合适的 MOI 值等参数。正式实验前，调整并保持细胞的良好状态是非常重要的。有些对 Polybrene 敏感，建议不能添加 Polybrene 去增强感染效率。

腺相关病毒表达时间较长，但在一般代谢较旺盛的细胞（如 293T，BHK21 等）上，病毒感染 24hrs 后可以观察到 GFP 荧光；代谢比较缓慢的细胞（如原代培养细胞，神经干细胞，胚胎干细胞等）GFP 蛋白表达时间较长，感染后 72-96hrs 甚至更长时间才可以观察到 GFP 荧光。感染后的细胞可以连续培养一周，通过观察 GFP 的表达时间和表达强度来确定腺相关病毒对目的细胞的感染情况。感染后期请根据细胞生长的情况对细胞进行及时换液和传代，以保证细胞良好的生长状态。

运输和储存

对于长距离运输，应先将腺相关病毒载体保存在-80℃，再采用全程干冰运输，以防滴度下降。

腺相关病毒载体在-80℃保存 6 个月，滴度不会明显下降。建议保存 6~12 个月以上的样品，进行实验前，重新测一次滴度。应尽量避免反复冻融（小于 3 次）。

使用前从-80℃取出病毒，室温迅速融化，操作过程应置于冰盒上进行。用不完的病毒可以暂时放在-20℃冰箱中，但最好尽快用完。

常见问题及解决方案

1、 Q： 什么是 Adeno-associated virus (AAV) 和 重组 AAV(rAAV)?

A：腺相关病毒（AAV）属于微小病毒科，是一类微小的、二十面体、无包膜病毒。AAV 是一种复制缺陷病毒，复制依赖于其他辅助病毒，如腺病毒和疱疹病毒。AAV 不编码自己的聚合酶，因此其复制过程依赖于宿主细胞的聚合酶活性。

重组 AAV（rAAV）是人工改造的 AAV，没有编码 AAV 病毒复制和结构蛋白的 rep 和 cap 基因。rAAV 中与复制和包装相关的 rep 和 cap 基因被替换为 ITRs 间的基因或结构，这使 rAAV 具有 4.1-4.9 kb 的包装容量。

2、 Q：使用 AAV 有哪些生物安全性要求?

A：推荐在生物安全 1 级（BSL-1）实验室操作无辅助病毒和编码非致癌基因

的重组 AAV。

3、 Q：重组 AAV 的克隆容量有多大?

A：AAV 具有约 4.7kb 的外源基因包装能力。2 个 ITR 之间插入的 DNA 长度越大时，包装效率随之显著降低。例如，共表达 GFP（约 0.8kb），则可包装的容量大约为 2.4kb。

4、 Q：如何保存 AAV 载体?

A：纯化的 AAV 载体在 4℃或更低温度下高度稳定。建议将 AAV 分装后，-80℃下长期保存。

5、 Q：AAV 对目的细胞的感染效率很低，如何提高病毒的感染效率?

A：一般，我们通过提高 MOI 值来提高病毒的转染效率，必要时以在培养基中加入 Polybrene（4-8ug/ml）来提高病毒的感染效率。同时，目的细胞良好的生长状态是获得正常感染效率的保证。

6、 Q：目的细胞可以被 AAV 感染，但是 GFP 荧光强度很弱，为什么?

A：目的细胞中 GFP 荧光轻度取决于病毒感染细胞的颗粒数、细胞本身的增殖状态、细胞类型以及观察时间等。一般来讲，目的细胞感染病毒颗粒数越多，细胞本身增殖越快，GFP 荧光会越强。AAV 一般在增殖较快的细胞中病毒感染 72h 后，GFP 基因表达才达到高峰。对于增殖较慢的细胞，GFP 基因表达时间还会延长。

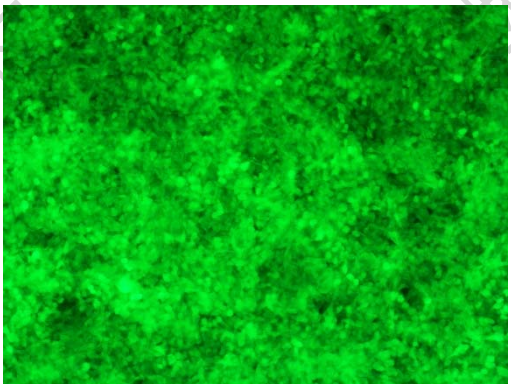
7、 Q：加入病毒后，目的细胞死亡很厉害，为什么?

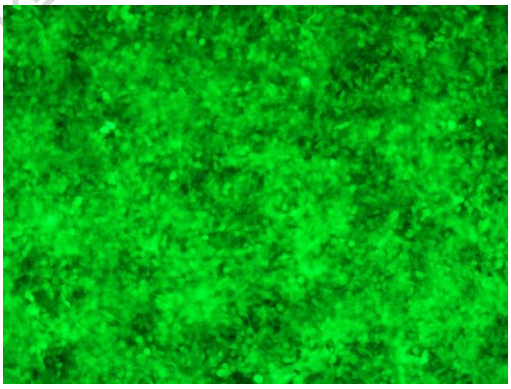
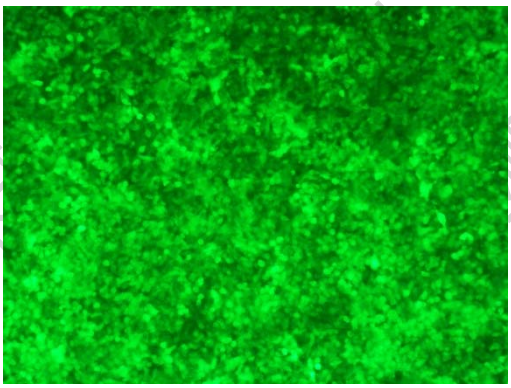
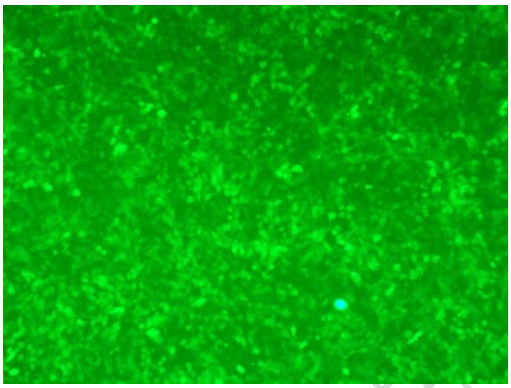
A：可能对您的目的细胞有一定的毒性，请调整并降低感染的 MOI 值，并且在 4h，8h 或者 12h 后对细胞进行换液，用新鲜的完全培养液继续培养观察。

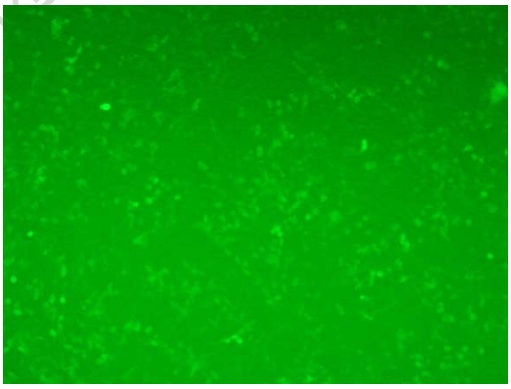
8、

吉玛案例

病毒滴度测定：

	荧光视野	明场视野
10^{-1}		

10^{-2}		
10^{-3}		
10^{-4}		

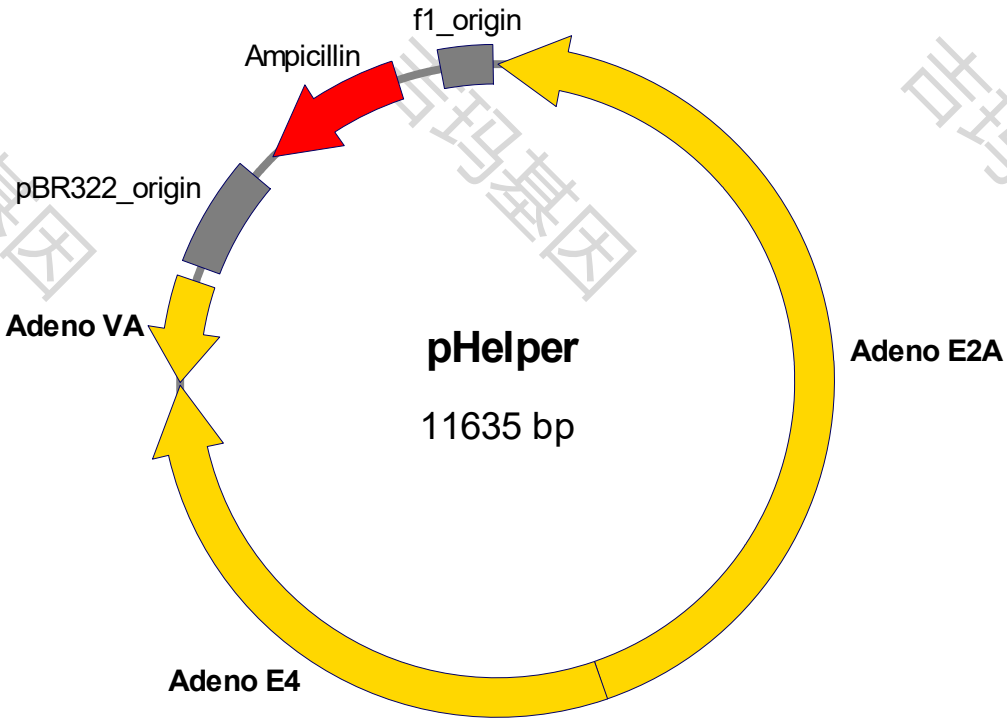
10^{-5}		

吉玛基因

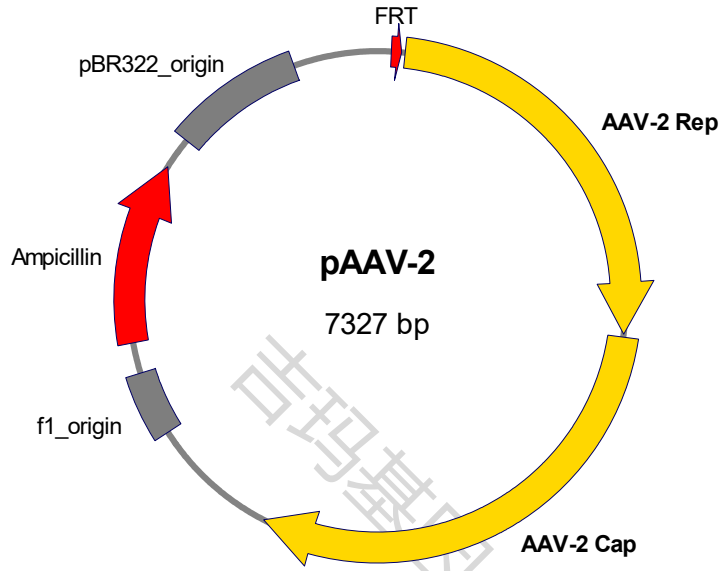
附录

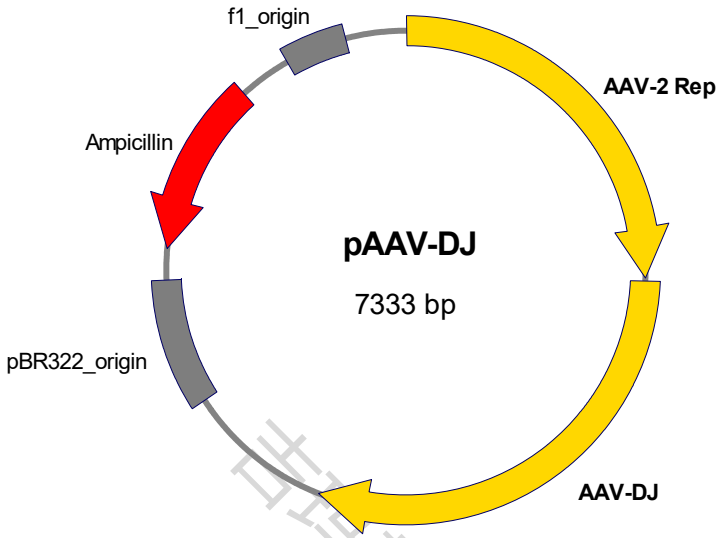
1. 质粒图谱

a) 包装质粒：pHelper



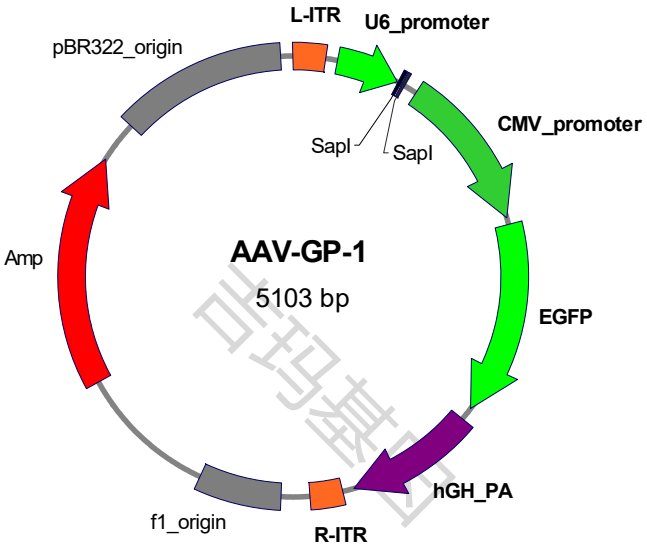
b) 两款不同血清型的辅助质粒：



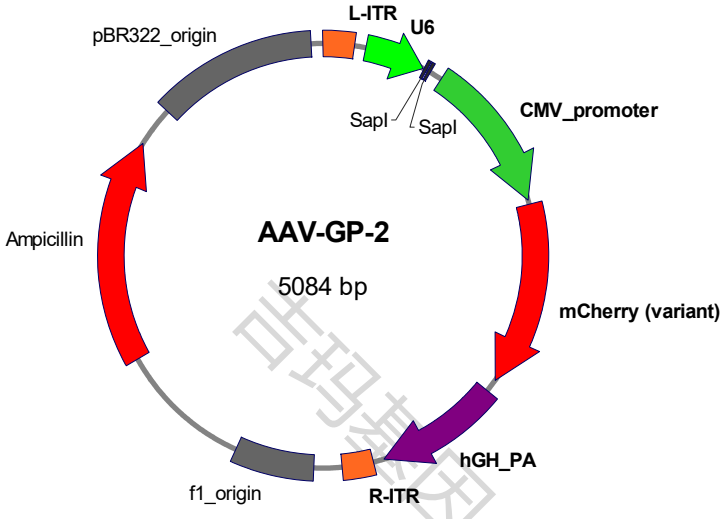


c) 干扰病毒载体：

1、AAV-GP-1　　pAAV-U6-EGFP

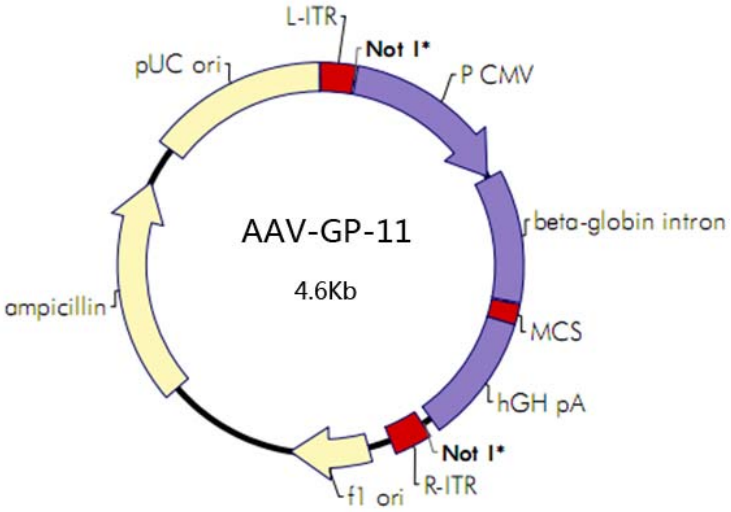


2、AAV-GP-2　　pAAV-U6-mCherry

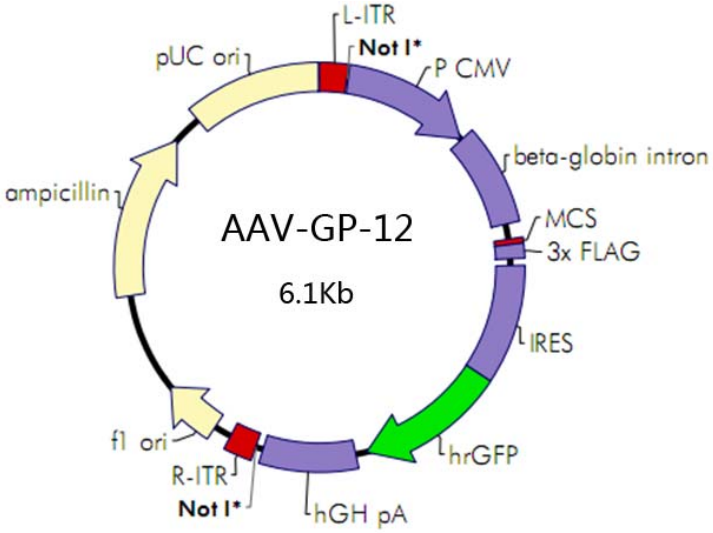


d) 过表达病毒载体:

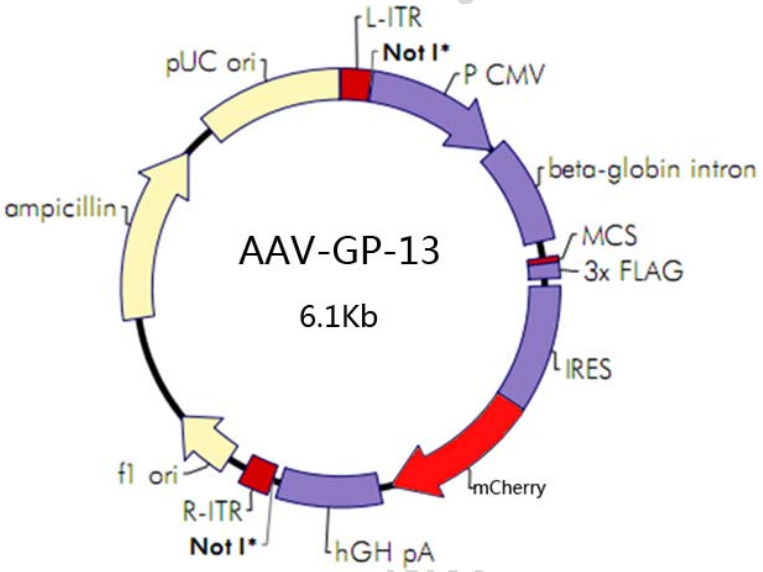
1、AAV-GP-11　　pAAV-MCS



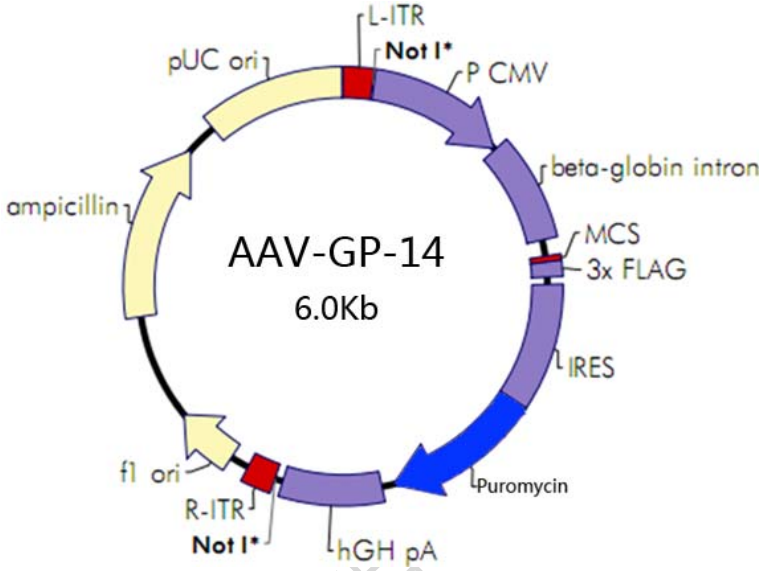
2、AAV-GP-12　　pAAV-IRES-hrGFP



3、AAV-GP-13　　pAAV-IRES-mCherry



4、AAV-GP-14　　pAAV-IRES-Puromycin



上海吉玛制药技术有限公司

电话：021-51320195，51370738，51370739

传真：021-51320295

地址：上海浦东新区张江高科技园区哈雷路 1011 号邮编：201203

E-mail ：order@genepharma.com

网 址 ：www.genepharma.com

苏州吉玛基因股份有限公司

电话：0512-8666 8828

传真：0512-8666 5900

地址：苏州工业园区东平街 199 号邮编：215125

E-mail：szorder@genepharma.com

网 址 ：www.genepharma.com