

rAAV 包装手册

载体构建

根据实验目的和受试细胞选择载体，包装启动子在细胞内高效表达，具体操作详见“基因调控”中“载体构建”部分。

质粒抽提

为了保证质粒 DNA 的高质量 and 纯度，可使用亲和柱 DNA 纯化法和氯化铯密度梯度离心法，获取的质粒 DNA 溶解于 pH7.5 的 TE 缓冲液中待用。

AAV-293 细胞培养

冻存细胞复苏

- 1) 在培养瓶中加入 10 mL DMEM 生长培养基，将细胞冻存管于冰上融化，转移至培养瓶中；
- 2) 室温下 200 ×g 离心 3 min，弃上清。加入 5 mL 新鲜生长培养基，轻轻重悬细胞后，将混合液转移至含 10 mL 新鲜生长培养基的 75 cm² 组织培养瓶中，置于 37 °C 下 5 % CO₂ 培养箱中培养；
注：此时细胞刚复苏较为脆弱，吹打重悬即可，避免过度吹打导致细胞破裂。
- 3) 每日检查细胞密度，50 % 汇合率时进行传代（汇合率超过 70 % 时，AAV-293 会失去增强的病毒生产表型）。

AAV-293 传代

- 1) 在 37 °C 水浴中预热 DMEM 完全培养基和胰酶-EDTA 溶液；
- 2) 移去培养瓶中的培养基，用无菌的 PBS 清洗细胞一次。后用 5 mL 胰酶-EDTA 溶液消化细胞 1-3 min；
注：消化时间以最短为准，以免过度消化破坏或杀死细胞。
- 3) 用 5 mL 培养基稀释细胞使胰酶失活，并将悬浮细胞液转移至锥底管中；
- 4) 室温下 200 ×g 离心 3 min，弃上清；
- 5) 用 10 mL 培养基重悬细胞沉淀，转移培养瓶中，置于 37 °C 下 5 % CO₂ 培养箱中培养。
每日检查细胞密度，细胞汇合率保持在 50 % 以下。
注：AAV-293 细胞在培养盘中贴壁不佳且具有成团趋势，因此换液时吸液管需靠在培养皿上靠边加入，而不是直接添加到细胞上，避免细胞单层破裂。

AAV-293 细胞液氮冻存

收集健康对数生长期细胞，移除培养基，用无菌 PBS 溶液清洗细胞，随后用胰酶-EDTA 消化细胞 1-3 min。加入培养基稀释细胞阻止胰酶作用，计数后离心收集细胞沉淀。用冻存培养基重悬细胞，并使其保持在 1×10^6 个/mL，每冷冻管分装 1 mL。通过逐渐降温冷冻细胞，后转移至 -80°C 冷冻过夜，于液氮中长期保存。冻存第二天可取出一小管细胞复苏，以判断这批细胞的冻存质量。

AAV 病毒出毒包装

AAV-293 细胞准备

在含 DMEM 生长培养基的组织培养盘 (100 nm) 中加入 3×10^6 个 AAV-293 细胞，48 hrs 后用于转染。

注：细胞汇合度达到 50 % 时必须传代，保持细胞处于低代，避免转染时细胞抱团。

AAV-293 细胞转染

- 1) 检查传代的细胞，保证其汇合度达到 70-80 %;
- 2) 取出低温保存的共转染质粒，用 TE 缓冲液 (pH=7.5) 稀释质粒浓度 (1 mg/mL) ;
- 3) 根据包装盘数计算转染体系和质粒用量，如包装一盘需三种质粒各 10 μL (共 0.03 mL)，1 mL 的 0.3 M CaCl_2 ，混合均匀;
- 4) 吸取 1 mL 的 2 \times HBS 溶液，加入 1.03 mL 的 DNA 和 CaCl_2 混合液中，翻转或轻轻吹打混匀。随后立即滴加到细胞培养盘上，轻轻晃动培养盘，保证液体分布均匀;
- 5) 置于 37°C 下培养 6 hrs，转染结束后将培养盘中剩余培养基替换为新鲜的 10 mL 培养基，继续培养 66-72 hrs。

观察出毒

通过观察 AAV-293 细胞形态可了解 AAV 颗粒包装进行程度，如与阴性对照 (不加 DNA 转染) 比较，培养基颜色由红色变成橙色或黄色；或者随着出毒的进行，一些细胞会圆起来并从盘上脱落，漂浮在培养基中。

一般而言，转染后 3 天是收毒的最佳时机。。

收毒

- 1) 将产毒的细胞及其培养基一同转移至离心管中，室温下 200 \times g 离心 3 min，分开沉淀和上清，沉淀用 1 mL 的无菌 PBS 重悬;
- 2) 将细胞悬液在干冰乙醇和 37°C 水浴中反复转移，冻融 4 次 (凝固和解冻一次各需要约 10 min)。每次融解后稍加震荡;
- 3) 10000 \times g 离心去除细胞碎片，将上清转移至新的离心管中。

AAV 病毒浓缩

- 1) 向收集的上清中加入 40 % 的 PEG8000 (终浓度 8 %)，冰上放置 2 hrs (每 15 min 来回

- 混匀一次)，2500 ×g 离心 30 min。弃上清后用 PBS 重悬，与细胞裂解上清合并；
- 2) 加入 Benzonase 核酸酶消化去除残留的质粒 DNA(终浓度 50 U/mL)，混合均匀后 37 °C 孵育 30 min；
 - 3) 用 0.45 μm 过滤器过滤混合液，取滤出液。

AAV 纯化

向混合液中加入固体 CsCl 直至密度为 1.41 g/mL（折射率为 1.372，10 mL 约加入 6.5 g 的 CsCl），振荡融解。转移至离心管后，175000 ×g 离心 24 hrs，以形成密度梯度。分步收集不同密度的样品，取样测定滴度。

超滤脱盐

将密度梯度离心得到的病毒液加入超滤装置中，加入 PBS 至终体积为 4 mL。1500 ×g 离心 5-10 min，保证终体积为 200-250 μL。随后将滤除液收集，将滤膜重置于装置中。

加入 1 ×PBS 稀释浓缩后的病毒，至终体积为 4 mL。重复操作 3 次。

病毒保存

在病毒浓缩液中加入甘油，直至终浓度为 5%，分装-80 °C 保存。

滴度测定

可使用 Dot-Blot 法、ELISA 法和定量 PCR 法检测病毒滴度，但 Dot-Blot 法需要使用探针因而操作麻烦且定量不准确，ELISA 法通过检测外壳蛋白以判断滴度。因此我们使用定量 PCR 法检测。首先准备样品和标准品，梯度稀释至原浓度的 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 。根据反应体系添加试剂，上机反应，得到 Ct 值并计算 AAV 样品中的拷贝数。