

rAAV 细胞感染实验手册

直接感染

主要适用于可直接表达荧光的重组 rAAV。

细胞获取和培养

从组织中或保藏的细胞株中获取目的细胞，将细胞培养在含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中 2 至 4 周，期间每周换液两次。对细胞的特异性标志物进行染色，定期检测培养物纯度，纯度需大于 95 %。

铺板

将对数生长期的细胞消化重悬后， 2×10^4 /孔接种于 96 孔板中，过夜生长。

感染

将 70-80 % 铺满 96 孔板中的培养液吸除，换新鲜的培养液，同时加入 PBS 浓度梯度稀释的病毒液，混合均匀后即可放入培养箱中，37 °C 培养，4 hrs 后补充等体积的培养基，20 hrs 后用新鲜的培养基进行换液。

病毒感染率测定

感染 48-72 hrs 后可观察荧光，测定病毒感染率。

- 1) 将培养基移除，用 PBS 缓冲液洗涤细胞两次；
- 2) 使用封闭缓冲液将细胞在室温下封闭；
- 3) 将固定好的细胞用特定的抗体孵育 1 hrs，其后用 PBS 洗涤 3 次，除去未结合的一抗；
- 4) 其后将细胞与二抗进行孵育，在室温下封闭 1 hrs，后用 PBS 洗涤 3 次除去未结合的二抗；
- 5) 用染料复染细胞，在荧光显微镜下捕获荧光图像，计算病毒感染率。

注意事项

- 1) 选择梯度稀释预实验中死亡率低、转导效率高的 MOI；
- 2) 病毒浓度应适宜，太少细胞被感染较少，太多对细胞有毒害作用。（8 型和 9 型 rAAV 对细胞的感染性偏低，所加 rAAV 总量偏大在 5×10^{10} vg/孔，MOI 参考值在 10^4 - 10^6 之间）。
- 3) 感染病毒时培养基较少，为保证病毒的浓度，一般 100ul 培养基/孔（96 孔）；
- 4) 在加病毒后一般 24 hrs 左右可换液，48 hrs 可看荧光，具体时间随细胞状态而定；
- 5) 推荐使用少量的表达绿色荧光蛋白的 AAV 对照病毒来进行预实验，以确定细胞的 MOI。

AAV-DJ 型和其他血清型体外感染细胞效率

(参考文献: In Vitro and In Vivo Gene Therapy Vector Evolution via Multispecies Interbreeding and Retargeting of Adeno-Associated Viruses)

TABLE 3. In vitro infectivities of AAV-DJ and wild-type vectors^a

Cell line	Tissue or cell type	Infectivity of vector:									
		AAV-1	AAV-2	AAV-3	AAV-4	AAV-5	AAV-6	AAV-8	AAV-9	AAV-DJ	AAV-DJ/8
Huh-7	hu liver	4e3	5e2	2e4	2e6	4e5	5e3	7e4	7e6	<u>1e2</u>	3e5
293	hu kidney	2e3	5e2	2e4	7e5	4e5	1e4	7e4	7e5	<u>1e2</u>	2e5
HeLa	hu cervix	7e4	2e3	1e5	2e6	3e4	2e5	1e6	2e6	<u>3e2</u>	1e6
HepG2	hu liver	2e6	5e4	3e5	2e7	3e6	1e6	2e7	ND	<u>4e3</u>	1e7
Hep1A	mu liver	1e4	2e3	1e6	2e5	2e6	2e5	1e6	2e7	<u>5e2</u>	2e6
911	hu retina	6e3	1e3	9e3	5e5	7e5	6e3	1e6	ND	<u>2e2</u>	4e5
CHO	ha ovary	1e4	1e4	7e4	7e5	3e3	2e4	1e5	1e6	<u>4e1</u>	2e5
COS	si kidney	3e3	1e3	3e3	3e4	2e4	7e3	5e4	2e5	<u>2e2</u>	3e5
MeWo	hu skin	2e3	2e2	1e3	7e4	3e3	2e3	2e4	1e5	<u>7e0</u>	2e4
NIH3T3	mu fibroblasts	2e5	2e4	7e5	7e5	7e6	2e5	7e6	ND	<u>4e3</u>	2e7
A549	hu lung	7e4	1e4	5e4	ND	2e6	1e5	2e6	7e6	<u>1e3</u>	2e7
HT1180	hu fibroblasts	5e4	1e4	1e5	7e6	3e6	3e4	2e6	1e7	<u>3e3</u>	5e6
Monocytes	hu primary monocytes	<u>9e5</u>	1e7	ND	ND	8e6	<u>7e5</u>	ND	ND	1e7	ND
Immature DC	hu monocyte-derived DC	<u>8e5</u>	2e7	ND	ND	9e6	<u>7e5</u>	ND	ND	1e7	ND
Mature DC	hu monocyte-derived DC	<u>9e5</u>	2e7	ND	ND	6e6	<u>6e5</u>	ND	ND	2e7	ND

^a Each cell line was infected with 10-fold serial dilutions of each serotype, AAV-DJ, or the mutant AAV-DJ/8 expressing a *gfp* reporter gene. Vector preparations were normalized to contain 2×10^8 total (vector DNA-containing) particles per ml prior to infection. Three days later, green fluorescent protein-expressing cells were counted and infectious titers were determined by taking into account the dilution factor. Numbers shown are average ratios (rounded) of total to infectious AAV particles from at least three independent titrations. Lower numbers indicate higher levels of infectivity. For each cell line, values corresponding to the most efficient AAV are underlined, while boldface indicates the lowest level of efficiency. AAV-DJ vectors showed the highest levels of infectivity on all tested cell lines. hu, human; mu, murine; ha, hamster; si, simian; DC, dendritic cells; ND, not detectable ($>2 \times 10^7$).

常用细胞培养皿使用参数

类型	单孔底面积	一般培养时体积	感染时总体积
96 孔板	0.3 cm ²	100 μL	100 μL
24 孔板	2 cm ²	500 μL	500 μL
6 孔板	10 cm ²	2 mL	1 ml
10 cm 培养皿	60 cm ²	10 mL	5 mL

企业名称：布林凯斯生物技术有限公司

地址：中国·武汉经济技术开发区 华中智谷

Tel: +027-8439-6606 | E-mail: j.li@wiat.ac.cn