

重组腺相关病毒(rAAV)

产品使用手册

Product User Manual

Brain Case

布林凯斯

1 安全使用规范

- rAAV的实验操作需要在其对应的生物安全等级实验室中进行；若表达特殊基因(致病等)，请按照相应的生物安全等级安排实验；
- 离心应当是在密闭状态下进行；使用普通超净工作台分装病毒，请不要打开风机；
- 实验完成后务必使用以下任一方式进行病毒灭活：1%次氯酸钠溶液，2%戊二醛，70%乙醇，1%SDS溶液，高温高压等处理方式。

2 rAAV存储及运输

- 重组腺相关病毒 (rAAV) 产品使用干冰运输。收到病毒后，可直接放置于-80℃冰箱冷冻保存至少1年，也可放置于-20℃冰箱冷冻保存2-3周；
- 使用前，将病毒液放置冰上进行融解。实验过程中，亦需保持冰上放置。融解后的rAAV可放置4℃保存1周（在4℃条件下，rAAV比慢病毒相对稳定，一般不会出现显著的活性降低问题）；
- 若实际用量较少，可将融解的rAAV少量分装多管，再置于-80℃冰箱冷冻保存。如果您需要对rAAV进行稀释，请使用无菌PBS现稀释现用。

注意：rAAV相对于其他病毒更为稳定，尽管反复冻融不会造成其活性显著降低，但请尽量避免反复冻融。

3 重组腺相关病毒(rAAV)

- 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus, AAV) 属于细小病毒科 (parvoviridae)，单链DNA病毒。AAV是迄今发现的一类结构最简单的天然的复制缺陷型病毒，不能独立复制，只有在辅助病毒如单纯疱疹病毒或腺病毒存在时才能完成复制，生成子代AAV。
- AAV基因组大小约4.7kb，基因组两端为末端反向重复序列(ITR)，中间基因组为编码病毒衣壳蛋白Cap及参与病毒复制和整合的蛋白Rep，ITRs对于病毒的复制和包装具有决定性作用。重组腺相关病毒(rAAV)载体通过将ITRs之间的所有病毒基因组替换为目的DNA片段的表达框(如图1所示)，经改造过的重组AAV病毒工具已被广泛应用于动物水平的基因表达、基因操作和基因治疗。

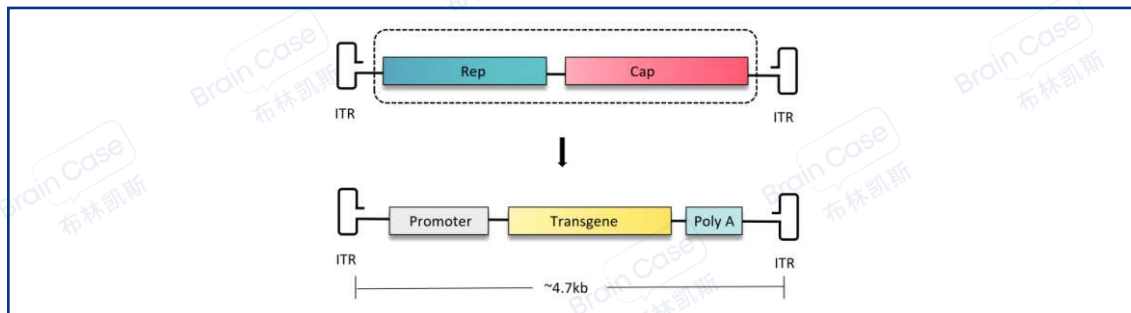


图1 rAAV基因示意图

3.1 rAAV优点

- **表达时间长**：rAAV能介导基因的长期稳定表达，在细胞分裂不旺盛的组织中可持续表达6个月以上；
- **扩散性强**：rAAV的体积小，滴度高，具有远高于腺病毒和慢病毒的扩散性，可穿透血脑屏障，是理想的神经元和胶质细胞感染工具；
- **特异性强**：rAAV有几十种常用的血清型，同组织特异性启动子搭配使用，可实现不同脏器的特异性感染并表达外源基因，是动物实验首选病毒载体。
- **安全性高**：目前还没有发现rAAV对人体致病，是美国FDA批准的可以直接用于人体基因治疗的最安全的病毒载体；
- **免疫原性低**：当rAAV用局部大剂量感染肌肉、脑、眼等组织时，不易造成免疫反应；
- **高稳定性**：rAAV病毒在4°C可以保存1周，并且对氯仿等试剂具有抗性。

4 rAAV生产

重组腺相关病毒的生产主要基于三质粒(核心质粒pAAV-GOI/shRNA、血清型质粒pAAV-RC、辅助质粒pHelper)共转染HEK293T细胞。包装细胞反式提供rAAV的结构蛋白Cap及功能蛋白Rep，并在辅助质粒pHelper的帮助下，高效地将带有ITR的目的DNA片段包装到rAAV病毒颗粒中。

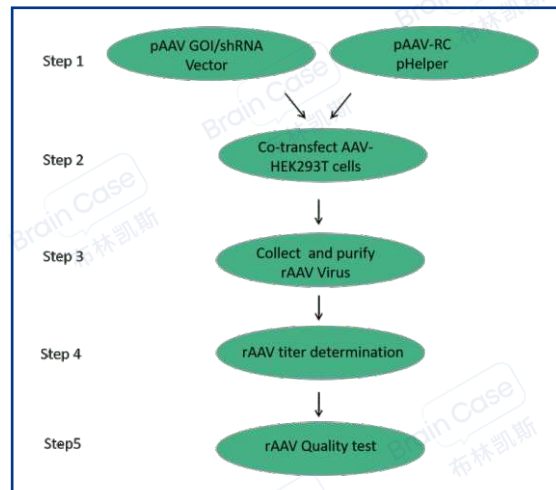


图2 rAAV的生产流程

4.1 rAAV载体构建

- 1) 根据实验目的和受试细胞选择不同的rAAV载体。一般通过简单酶切-连接-转化-测序的方式将目的基因克隆至rAAV表达载体，并验证载体表达功能。
- 2) 为了获得高质量、高浓度且低内毒素含量的质粒，通过柱离心法及去内毒素试剂进行质粒DNA纯化。

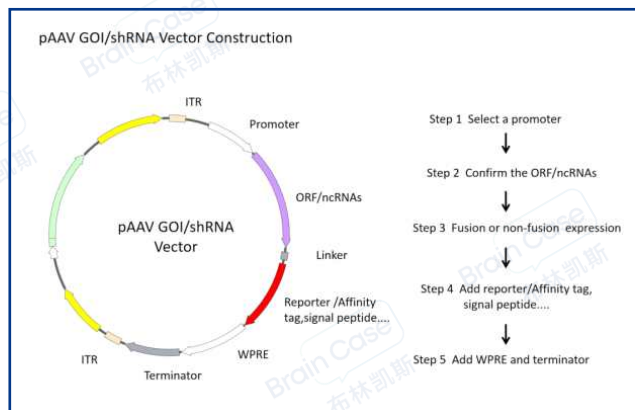


图3 rAAV核心质粒构建流程图

4.2 rAAV病毒包装

● 细胞准备

从液氮灌中取出冻存细胞，迅速放入37°C水浴锅中复苏，离心后向细胞中加入新鲜培养基，37°C、5%CO₂条件下培养，每2-3天进行细胞传代；待细胞生长正常后转入10cm的培养皿中贴壁培养备用。

● 质粒转染

当细胞密度达到约80~90%的汇合率即可进行转染，将转染三质粒体系按照一定比例配置后，按照每皿1000μL体系进行转染及培养。

● 细胞培养

培养一天后，通过显微镜观察细胞转染情况。一般情况下需转染效率在80%以上，转染率过低会导致病毒产量下降。

● 病毒收毒及除杂

培养72hr后，收集病毒上清。将病毒培养上清液低温离心去除细胞碎片，并加入适量核酸酶，37°C去除游离的核酸，然后加入PEG8000/NaCl溶液过夜聚沉。

● 病毒纯化及浓缩

将聚沉的病毒用PBS进行重悬并置于超速离心机进行密度梯度离心；离心后，抽取病毒对应层的溶液，利用透析袋进一步4°C透析过夜；第二天将透析液0.22μm过滤，并通过浓缩管进行浓缩和清洗，达到除杂和浓缩的目的。

5 rAAV质量检测

- 腺相关病毒的质量主要包括滴度检测、纯度检测、无菌检测、支原体检测及内毒素检测。

5.1 滴度检测

- **检测方法：**完整的rAAV病毒粒子含有1个拷贝的基因组DNA，将病毒样品进行酸碱裂解处理，使其暴露出基因组DNA。进一步利用特异性的引物进行荧光定量PCR实验，检测rAAV病毒粒子的DNA拷贝数，即rAAV的数量VG (Viral genomes)，换算成单位体积中rAAV的含量，即rAAV的滴度VG/mL (Viral genomes/mL)。

- **QC标准：**滴度 $\geq 1.0E+12$ VG/mL

5.2 纯度检测

- **检测方法：**利用SDS-PAGE方法对病毒样品进行纯度检测。
- **QC标准：**银染染色结果中，只有VP1、VP2、VP3三种蛋白的染色条带，亮度比约为1:1:10且无明显杂带。

5.3 无菌检测

- **检测方法：**将病毒样品接种到适于各菌生长的培养基中，37°C培养7天后，检测细菌和真菌的生长情况。
- **QC标准：**培养基需澄清透明，无任何细菌及真菌污染。

5.4 支原体检测

- **检测方法：**利用支原体16S rRNA基因的保守区设计引物，通过凝胶电泳和荧光定量检测病毒样品中是否有支原体的污染。
- **QC标准：**PCR胶图无条带。

5.5 内毒素检测

- **检测方法：**按照内毒素检测试剂盒（试管定量显色基质法）使用说明书进行操作。
- **QC标准：**< 10EU/ml

6 rAAV的使用说明

6.1 rAAV—细胞转导实验

● 转导前1天（第0天）

将一定数量靶细胞接种至一个新的培养皿中（转导时靶细胞的融合度应为30%–50%），37℃、5%CO₂培养18–20个小时。例如，当靶细胞为293T时，建议接种 3×10^5 个细胞至6孔板的一个孔中。

● 转导当天（第1天）

在冰上融解冻结的病毒液。离心去除原有培养基，然后加入含有病毒的新鲜培养基，轻柔地摇动培养板使病毒液都能覆盖每一处细胞，37℃、5%CO₂培养过夜。为获得较好的转导效果，培养基用量尽可能少，以覆盖培养皿表面为宜，一般用量约100uL/cm²。例如，当在6孔板中进行转导时，建议每孔使用1mL培养基。若担心细胞暴露在病毒液中太久可能会影响细胞状态，可以将转导时间缩短在6–8小时。

● 第2天

吸出含有病毒的培养基，加入新鲜的完全培养基，37℃、5%CO₂继续培养过夜。

● 第3天及之后

转导后，需要在理想的时间点分析目的基因的表达情况。一般而言，转导后24–48小时，目的基因明显表达。

注意：对于分裂活跃的细胞（如倍增时间约24小时），转导后24小时内即可检测到转基因的表达，在转导后第48–96小时（第2–4天）表达量达到最大，转导5天后，表达水平通常会开始下降。对于分裂周期较长或者无分裂行为的细胞，高水平的转基因表达则通常会持续更长时间。如果您是第一次使用rAAV转导哺乳动物细胞，建议您先进行时间摸索实验，以确定目的基因的最佳表达时间。

细胞转导注意事项

- 在设计rAAV的转导实验时，可使用表达绿色荧光蛋白的不同血清型的rAAV来确定待转导组织或者细胞的最适血清型。
- 由于8型和9型rAAV对细胞的感染性偏低，故所加rAAV总量偏大，转导细胞的初始MOI（感染复数，即病毒量与细胞数的比值）参考值在 10^4 – 10^6 之间。对于较难感染的细胞则需要更高的MOI。
- 一般而言，选择那些转导效率高但细胞死亡率最低的MOI。而对某些细胞种类而言，无论怎么调整MOI，也可能无法获得较高的转导效率。
- 由于rAAV组织特异性，体外感染细胞的效率比较低，所以我们一般推荐您购买rAAV用于动物实验。

rAAV 体外感染细胞效率参考表

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-DJ8
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	hu 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

(Dirk Grimm, et al. JOURNAL OF VIROLOGY, 2008)

常用细胞培养皿使用参数表

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
10cm 培养皿	60 cm ²	10 mL	5 mL

6.2 rAAV—动物实验

在动物实验中，rAAV注射方法主要分为系统性注射和原位注射。系统性注射，常见的有尾静脉注射、腹腔注射等。针对不同脑区常用的方法是脑立体定位注射。病毒的不同注射操作方法可查阅文本的6.2.1章节内容。

- 通过尾静脉注射rAAV病毒感染小鼠组织，rAAV推荐总量为 10^{11-12} vg；
- 通过脑立体定位注射rAAV病毒感染小鼠脑部，如M1脑区，建议使用病毒滴度为 $2.0E+12$ vg/mL，体积150-200 nL。若感染其他具体脑区核团，可根据文献介绍以及预实验梯度摸索最佳注射量；

小鼠脑立体定位注射常用坐标参考

核团名称	AP (mm)	ML (mm)	DV (mm)
DG	-1.7	-1	-2
dCA1	-1.7	-0.85	-1.5
dCA3	-1.7	-2	-2
S1BF	-1.7	-3	-1.5
BLA	-1.4	-3.25	-4.85
MS	0.64	0	-3.8
ACC	1.34	0.4	-2
HDB	0.14	-1.5	-5.5
LH	-1	-1.1	-5
DR	后囟往后 0.60 mm, 13°角下针 3.0 0mm		
OB	4.3	-1.25	-2

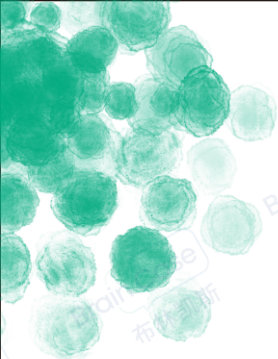
6.2.1 病毒注射方法

脑部立体定位注射

- 1.1主要仪器及耗材

仪器：脑立体定位系统、手术剪刀、手术镊子、颅骨钻、体重秤。

耗材：实验动物、病毒、注射器、液体石蜡、红霉素眼膏、生理盐水、75%酒精、麻醉剂。

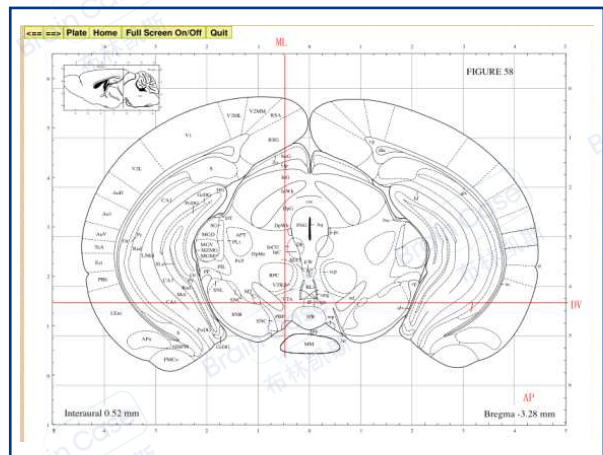


● 1.2实验操作步骤

1) 查阅图谱，确定注射位点坐标

2) 准备玻璃电极和微量进样器

微量进样器和玻璃电极中分别灌注液体石蜡，然后把电极套在微量进样器尖端，保证里面没有气泡，然后用热熔胶密封连接处，静置变干。把制作好的微量注射针固定在定位仪上，确保注射针垂直并且牢固地固定在定位仪上。



以小鼠大脑腹侧被盖区VTA为例：
AP: -3.28, ML: ±0.45, DV: -4.30

3) 老鼠麻醉与固定

小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠，大约5分钟后小鼠进入深层麻醉状态。使用剃毛器清除目标区域表面的毛发，随后将小鼠固定在小鼠适配器上，微调适配器左右耳杆使刻度保持一致并拧紧旋钮，门齿固定器不宜太紧，以防损伤鼻骨，最后于眼部涂抹适量红霉素眼膏。

4) 鼠脑调平

暴露头骨：用70%酒精消毒小鼠头皮，用洁净的手术剪刀剪开头皮，用干棉球擦掉颅骨表面软组织，完全暴露颅骨。

定前凶：将注射针尖移至中缝线靠前部分，接触颅骨表面，以前凶位置（bregma点）为参考点，刚接触到表面时，停针，将数字显示仪的X，Y，Z轴坐标读数归零。下针的时候，用显微镜观察针尖位置，以免折断针头！

左右调平：将注射针向上提起少许，以免碰到颅骨表面，然后以bregma为中点左右移动相同的距离（推荐3.0mm/2.5mm/2mm）并下针接触颅骨表面，分别读对应点Z坐标，通过Z坐标的数值来确定左右是否齐平，如果读数相差0.03mm以内，则认为小鼠脑袋左右齐平。通过调整两边的耳杆将左右调平，调整过程中，移动支杆后必须重新定位bregma零点。

前后调平：前凶点和后凶点调平，方法同左右调平。

5) 病毒注射

开颅：调平后，通过数显仪开始定位自己的目标脑区，以VTA坐标为例，AP:-3.2mm ML:±0.45mm DV:-4.3mm，Y轴向后移动3.2mm，X轴向右移动0.45mm，下针，接触颅骨表面的一瞬间停针，观察颅骨表面特征并记住或做个标记，提针至较高处，然后用颅钻在目标位点磨孔，待打磨到硬脑膜附近时，使用1ml注射器针尖小心挑开脑膜，暴露脑组织。

吸取病毒：打开控制泵，设置好需要的体积、速度和模式，用生理盐水清洗玻璃电极尖端，将针尖浸没到液面下，按start开始吸取液体，吸液结束后再用生理盐水擦拭针头。

注射：然后将进样器移至目标脑区，根据坐标开始下针，下针过程必须足够缓慢，下到目标脑区的深度，设置体积、速度和模式，然后按start注射病毒。病毒注射完成后，停针10分钟，然后将注射针缓慢提起。

术后处理：用医用针线缝合头部皮肤并进行消毒，处理完后将小鼠放回鼠笼，必要时放在加热垫上保暖。

尾静脉注射

● 1.1 主要仪器及耗材

仪器：尾静脉显影仪，小鼠固定器。

耗材：小鼠、病毒、胰岛素注射针、无菌PBS（或生理盐水）、75%酒精等。

● 2.2 实验操作步骤

1) 小鼠固定

将小鼠装入固定器中，盖紧盖子，并使其尾巴朝外露出，尾部用40-50℃的温水浸润几分钟或用75%酒精棉球反复擦拭使血管扩张，并使表皮角质软化。

2) 病毒注射

将病毒提前稀释至合适滴度，用注射器吸取合适体积病毒。以左手拇指和中指捏住鼠尾，并用食指辅助固定鼠尾，右手持注射器，使针头尽量采取与尾部平行的角度进针；建议从尾部后1/3处刺入，注入药液，如无阻力，表示针头已进入静脉；注射后把尾部向注射侧弯曲，或拔针后立即以干棉球按住注射部位以止血。将小鼠从固定器取下，放回原饲养笼中。

脊髓注射

● 3.1 主要仪器及耗材

仪器：体重秤，脊髓夹持器、手术剪刀、手术镊子。

耗材：小鼠、病毒、注射器、石蜡油、红霉素眼膏、PBS、75%酒精、生理盐水、1%戊巴比妥钠。

● 3.2 实验操作步骤

1) 玻璃电极和微量进样器准备

见6.2.1病毒注射方法 第1.2章节

2) 老鼠麻醉与脊髓固定

腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉小鼠，大约5分钟后小鼠进入深层麻醉状态。使用剃毛器将小鼠背部毛发剔除干净。小心剪开小鼠背部皮肤，用镊子钝性分离目标椎骨外围的肌肉组织，随后将暴露椎骨的小鼠用脊髓夹持器在目标椎骨附近固定。

3) 病毒注射

暴露脊髓：根据需要可使用镊子小心撬开目标区域椎骨，或使用颅钻小心打磨目标区域椎骨以暴露脊髓。

吸取病毒：见6.2.1病毒注射方法 第1.2章节。

术后处理：见6.2.1病毒注射方法 第1.2章节。

股骨注射

● 4.1 主要仪器及耗材

仪器：体重秤

耗材：小鼠、病毒、注射器、石蜡油、红霉素眼膏、PBS、75%酒精、生理盐水、1%戊巴比妥钠。

● 4.2 实验操作步骤

1) 老鼠麻醉与股骨固定

用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠，大约5分钟后动物进入深层麻醉状态。用剃毛器把股骨附近的毛发剃干净，随后将小鼠用医用胶带仰卧固定在泡沫板上。

2) 病毒注射

暴露股骨：将小鼠大腿部消毒后，然后剪开股骨附近皮肤，对覆盖在股骨外围的肌肉组织进行钝性分离；

病毒注射：确定病毒注射位点，使用1mL注射器尖端小心钻开股骨，可见血液流出；使用洁净的干棉球小心吸取渗出来的血液，待血液停止渗出后进行病毒注射；注射完成后缓慢提高微量注射针；

术后处理：提针10分钟后对伤口进行缝合，伤口缝合完毕后小心对伤口外围进行消毒，并将小鼠置于加热垫上加速苏醒。

更多rAAV的产品相关信息可在BrainCase官网进行检索查阅。

公司地址：中国·深圳光明新区·卫光生命科学园

中国·武汉经济技术开发区·华中智谷

官方网站：www.braincase.cn

联系电话：18971216876

合作邮箱：support@braincase.cn



扫码关注布林凯斯



添加小布微信号