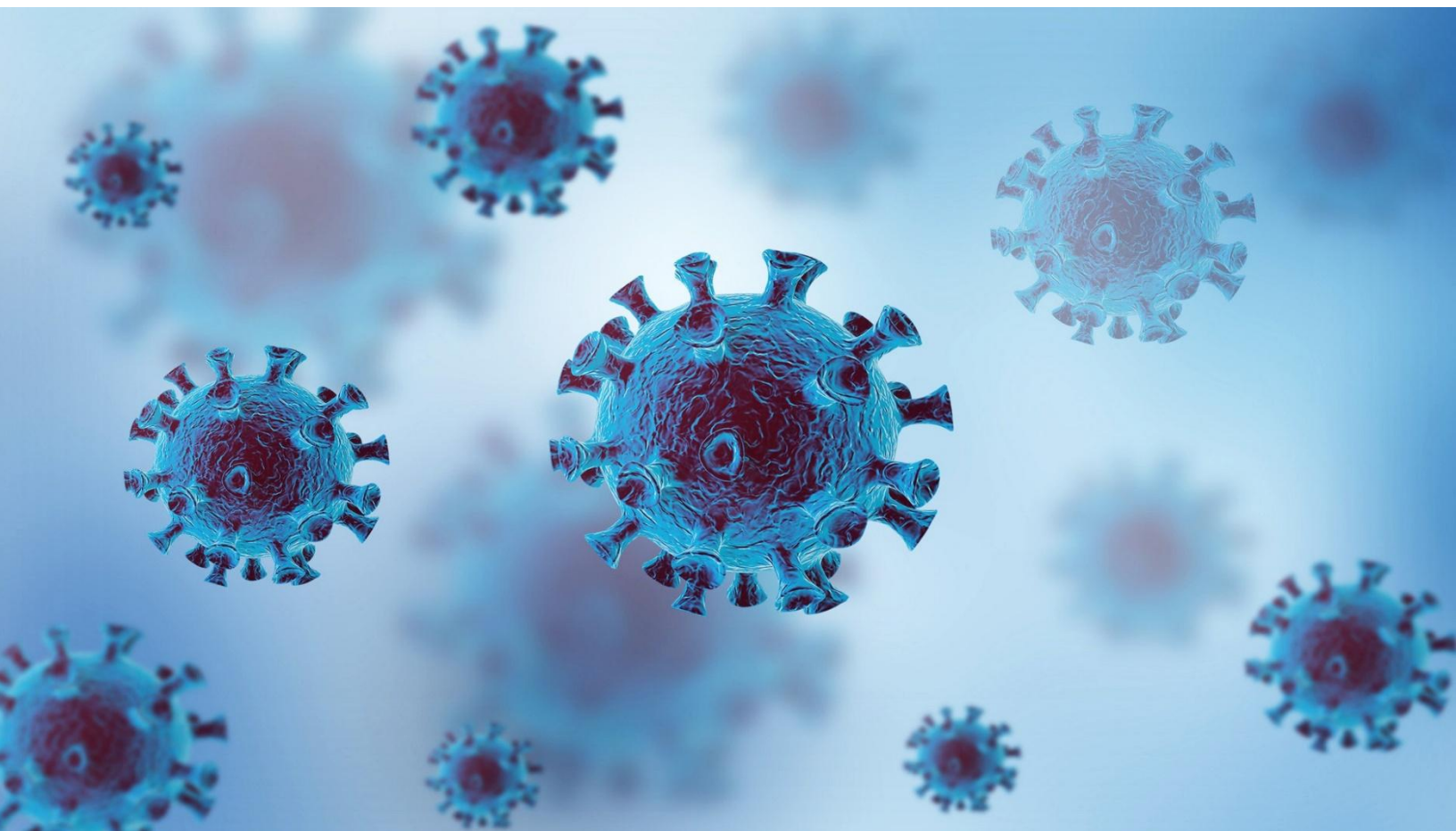


腺相关病毒（AAV）表达系统 产品说明书



- 分子克隆
- 腺病毒
- 腺相关病毒
- 慢病毒
- 细胞系建立
- 筛选检测

目录

产品有限责任担保.....	3
产品订购和技术支持.....	错误!未定义书签。
产品储存.....	3
一、腺相关病毒安全操作规范.....	2
二、个人防护措施.....	2
三、不慎接触病毒时的急救.....	3
四、消毒处理.....	3
五、腺相关病毒的保存.....	3
六、AAV载体概述.....	4
七、腺相关病毒基因传递和表达的优势.....	5
八、赛恩宝生物腺相关病毒的优势.....	5
九、赛恩宝生物rAAV产品简介.....	6
1. rAAV载体.....	7
2. rAAV克隆服务.....	8
十、腺相关病毒颗粒生产流程.....	10
1. 腺相关病毒重组克隆构建.....	12
2. 细胞冻存流程.....	12
3. 细胞复苏流程.....	13

4. 细胞培养流程（以10cm细胞培养皿，传代为例）.....	13
5. AAV病毒包装.....	14
6. AAV病毒纯化.....	15
7. 病毒浓缩.....	15
8. 病毒滴度检验.....	15
十一、腺相关病毒感染目的细胞预实验.....	17
十二、常见问题解答.....	31
参考文献.....	36

产品有限责任担保

赛恩宝生物保证您收到的产品符合产品目录上的规格。本担保规定了赛恩宝生物更换产品的责任。赛恩宝生物不提供其他任何形式的对于产品商业或健康用途的保证。赛恩宝生物不对任何由于使用或不正确使用本公司产品造成的直接、间接的、衍生的或偶然的损害所产生的后果负责。

产品储存

收到产品后，请第一时间在BL2生物安全柜中根据实验所需量将病毒进行分装。分装病毒时请将病毒始终放置在冰上。分装的病毒可在4℃保存3天，其余病毒请于-80℃冰箱冻存。**请避免反复冻融，否则会降低病毒滴度！**

一、腺相关病毒安全操作规范

1. 请在BL2生物安全二级生物安全柜中操作病毒。
2. 操作病毒和转染细胞时，请务必穿着实验服，佩戴口罩和手套。
3. 请小心操作，避免产生气雾或飞溅。被病毒污染的超净工作台，请立即用70%乙醇加1%SDS溶液擦拭干净。接触病毒的枪头、离心管、培养板、培养液请使用新鲜配制的10%漂白粉进行消毒操作后丢弃。
4. 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，用70%乙醇擦拭培养瓶外壁后，显微镜下观察拍照。观察完毕，请用70%乙醇再次擦拭显微镜实验台。
5. 离心病毒时，应使用密封性好的离心管，或用封口膜封口后进行离心，请尽量使用组织培养室内的离心机。
6. 实验完毕脱掉手套后，请立即用肥皂和水清洗双手。

二、个人保护措施

1. 使用一次性手套。
2. 在注射病毒或是其后的解剖时，使用一次性手术服或是相当的衣物，如果是感染细胞时，可以穿着实验服。
3. 佩戴护目镜或是面罩。
4. 所有的操作应当是在ClassII生物安全柜中进行。如果实验条件不能满足，则应当在空气稳定的空间中操作，减少操作时间和病毒与外界接触的时间。

三、不慎接触病毒时的急救

1. 病毒飞溅或是气溶胶与人体接触—眼，皮肤或是粘膜用大量清水冲洗眼睛或是其他接触的部位至少15min。
2. 含病毒的针头或是其他利器刺破皮肤。伤口立即用10%的碘伏溶液擦洗数分钟，然后用大量清水冲洗。

四、消毒处理

对AAV最有效的消毒剂是新鲜配制的1%次氯酸钠溶液。

1. 配制时，将84消毒液原液加水稀释。
2. 浸泡15min以达到消毒目的。
3. 可以用它处理可回收的物品如玻璃器皿或是污染废液（终浓度是1%），但如果是不锈钢器物切不可直接擦拭，否则会引起表面腐蚀。

其他的处理方式包括用2%戊二醛溶液或是0.25%SDS溶液，还可以121℃高温消毒1小时。

五、腺相关病毒的保存

收到产品后，请根据实验所需的量在无菌操作台中将病毒进行分装，并于-80℃冰箱冻存。分装病毒时请将病毒始终放置在冰上。

注：请避免反复冻融。

六、AAV载体概述

腺相关病毒(AAV)是一种无包膜的单链DNA病毒，是细小病毒家族的一员，通常需要腺病毒、疱疹病毒等辅助病毒的帮助，才能进行自我复制。在没有辅助病毒的情况下，AAV可在哺乳动物细胞中长期潜伏。现阶段已发现的AAV有12种的血清型（AAV1至AAV12）和130多种突变型^[1]。不同AAV血清型具有不同的衣壳蛋白空间结构、序列和组织特异性，因而其识别与结合的细胞表面受体也相应有很大差别^[2]，这也导致不同血清型转染的细胞类型和感染效率也各不相同。在基因治疗中，将携带有外源基因的重组腺相关病毒定点整合到宿主基因组，既能克服随机插入所导致的染色体缺失和基因重排等潜在危险，又可以达到长期治疗的目的。

野生型AAV基因组编码两大开放阅读框架（openreadingframes，ORF）rep和cap，它们位于两侧的末端倒转重复序列（intertedteminalrepeats，ITRs）之间。在Anzhenbio的AAV病毒基因传递系统中，只有ITRs是复制和包装所必需的顺式元件，rep和cap基因从病毒载体中被转移到辅助质粒AAVrep/capVector中，转移后空出的位置是允许外源基因插入病毒基因组中的最大限度。在辅助质粒AdHelperVector和pAAV-rep/capVector的帮助下，仅需两端的ITR就能将携带的外源片段包装进入腺相关病毒颗粒。

重组腺相关病毒是基因传递和表达的一个重要工具^[3]，其具有广泛的宿主范围及组织感染能力，既能感染分裂细胞，也能转导外源基因进入非分裂细胞，长期表达外源基因，而不依赖于宿主细胞活跃的分裂能力。在赛恩宝生物的AAV病毒基因传递系统中，包含末端重复序列（ITRs）的载体质粒pAV-FHAAV载体与包含rep/cap基因的辅助质粒

pAAV-rep/cap载体没有任何共同区域，避免通过重组而恢复出野生型病毒，宿主细胞免疫反应被降至最低，从而允许对具有免疫能力的宿主细胞进行基因传递。我们的AAV病毒基因传递系统可以生产出重组病毒滴度 $\geq 10^9$ 病毒颗粒/毫升的病毒，浓缩后滴度最高可达 10^{14} 病毒颗粒/毫升，可以最大程度保证在动物细胞中的基因传递。rAAV进入细胞后，作为附加的DNA能稳定存在。基因的表达通常在第2~7天出现峰值，并可在体内持续数周甚至数月。

七、腺相关病毒基因传递和表达的优势

1. 宿主范围广：随时可转染的AAV可高效感染分裂和非分裂细胞；
2. 多种血清型：AAV1-9, rh10, retro, phpb等；
3. 安全性高：ITR序列和rep/cap基因分别由独立的质粒表达；未发现AAV对人体致病，rAAV去除了wtAAV基因组的96%，进一步保证了安全性；
4. 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。

八、赛恩宝生物腺相关病毒的优势

1. 载体全：不同的启动子（神经特异性启动子HumanSynapsin、CamkII α 、GFAP等）和多种报告基因（EGFP、mCherry、RFP和luciferase等）可供客户选择；
2. 货期短：AAV克隆载体均与我们18,000个预制人类全长cDNAORF克隆载体MCS区通用，2~3周即可发货；
3. 滴度高：可提供 10^{12} V.G/mL及以上滴度的病毒，最高可达

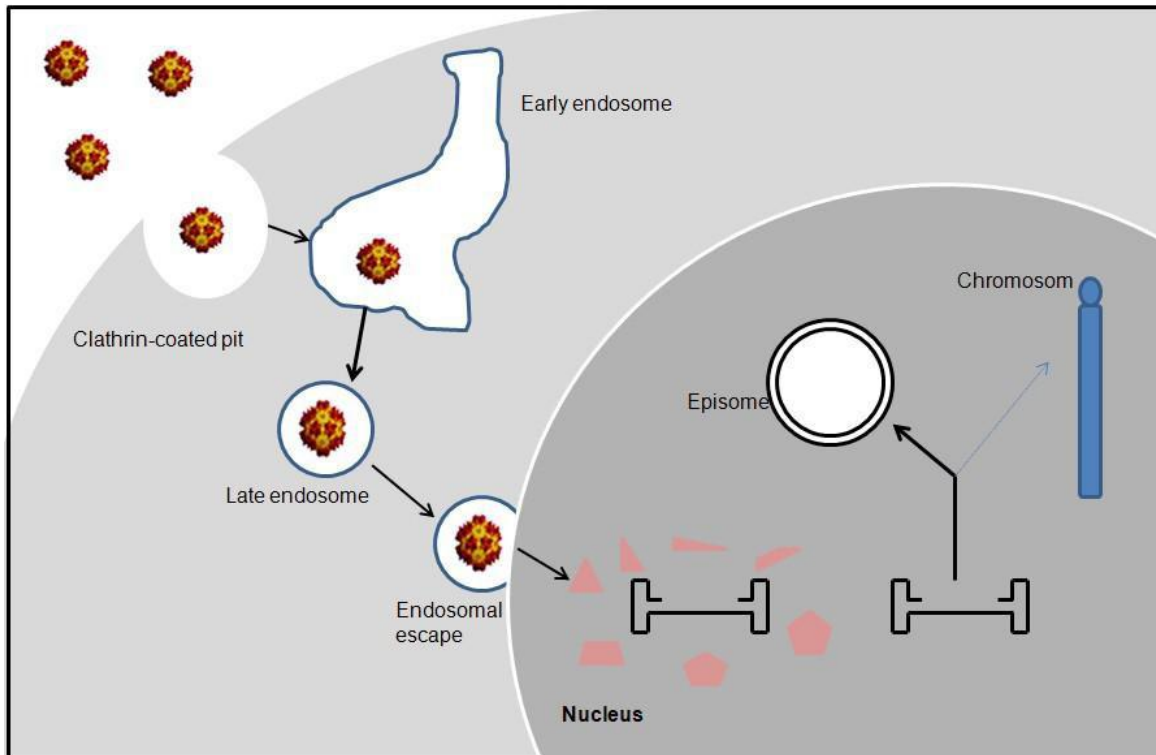
10¹⁴ V.G/mL;

4. 服务优：可根据客户的具体需求提供特殊定制服务。

九、赛恩宝生物rAAV产品简介

赛恩宝生物独有的专利技术和创新性的rAAV载体和完善的AAV表达系统，可用于体内和体外表达shRNA，humanORF和CRISPR，具有稳定可靠、重复性好、纯度高、滴度高的优点。

AAV无辅助病毒系统（AAVHelper-FreeSystem）可以在无辅助病毒条件下生产出重组人腺相关病毒。这种系统利用已经明确与调节AAV复制和表达的腺病毒基因产物，并且将这些基因产物通过转染引进宿主细胞。重组腺相关病毒（rAAV）由多个质粒（Cis质粒、辅助质粒、Rep/Cap质粒）组成。生产具感染性的AAV病毒颗粒所需的腺病毒基因产物（例如：E2A,E4和VARNA基因）大部分由与其他质粒共转染进细胞的pHelper质粒提供，其余的腺病毒基因产物由稳定表达腺病毒E1基因的AAV-293T宿主细胞提供。Rep和Cap基因从病毒载体中被转移到辅助质粒pAAV-RC中，AAVITRs仍位于病毒载体中，实际上在辅助质粒的帮助下，仅需两端的ITR就能将携带的外源片段包装进入腺相关病毒颗粒，Rep和Cap基因的转移后空出的位置是允许外源基因插入病毒基因组中的最大限度。Cis质粒、辅助质粒与Rep/Cap质粒之间不具有同源性序列，因此重组AAV在理论上不具有复制的能力。赛恩宝生物腺相关病毒载体ITR序列Rep/Cap基因分别由独立的质粒表达,具有高度安全性。下图为rAAV进入细胞和转运的过程。



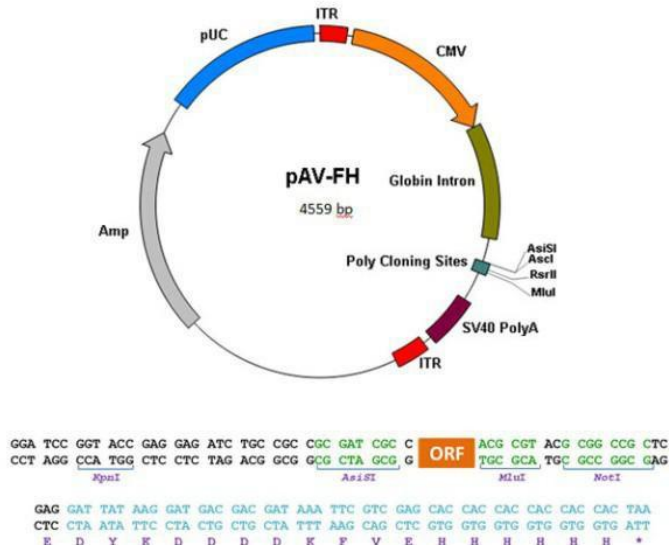
1. rAAV载体

赛恩宝生物为您提供了多种腺相关病毒载体。包装AAV无需辅助腺病毒，非致病性、免疫原性低。AAV包装系统包括辅助质粒和Rep/Cap质粒，ITR序列和rep/cap基因分别位于独立的质粒，安全性高。多种血清型(AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9)可供选择。根据不同客户的需要，提供了分别适用于humanORF、shRNA和CRISPR、TALEN基因组靶向操作服务的AAV载体。

2. rAAV克隆服务

rAAVHumanORF克隆服务

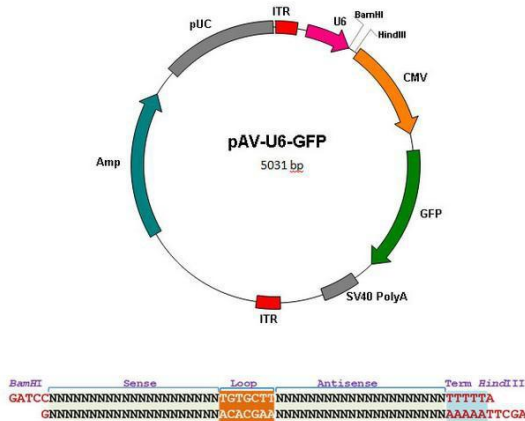
P100034



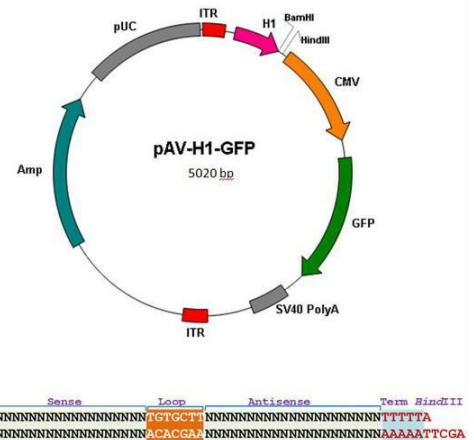
赛恩宝生物为humanORF克隆设计的pAV-FHA^{AV}载体，具有Amp抗性、CMV启动子，带有Flag-His标签。多克隆位点与赛恩宝生物的humanORF穿梭克隆相兼容。非常适于哺乳动物ORF的表达。

rAAVshRNA克隆服务

P100037



P100035



赛恩宝生物为您提供了多种表达shRNA的rAAV，包括U6或H1启动子和作为哺乳动物表达标记的GFP或RFP。同时，也可根据您感兴趣的基因提供shRNA设计服务。

rAAV载体容量

腺相关病毒载体能够感染分裂和非分裂细胞。毒性和免疫原性低，适合以相对较高的转染效率在非分裂细胞中长期表达和在分裂细胞中短期表达基因。但AAV载体的外源基因容纳量有限，两个ITR之间的空间只有4.7kb，因此可插入的外源基因为3.5kb甚至更小。请参阅下表选择适合您的病毒载体系统。

	腺病毒	腺相关病毒	慢病毒
病毒基因组	dsDNA	ssDNA	ssRNA(+)
病毒外壳	无	无	具有包膜蛋白
基因组大小	38-39kb	5kb	9kb
感染的细胞类型	分裂和非分裂细胞	分裂和非分裂细胞	分裂和非分裂细胞
整合至宿主基因组	非整合	非整合	整合
外源基因表达	短暂	潜在的持久	长久
包装容量	7.5kb	4.5kb	6kb
免疫反应	高	非常低	低
相对病毒滴度	10E11（非纯化）	10E10-11（非浓缩）	10E7（非浓缩）
相对转染效率	100%	70%	70%
外源基因的相对表达量	高	中	中

十、腺相关病毒颗粒生产流程

第一步：基因克隆。将外源基因克隆进入赛恩宝生物医药科技有限公司的人源或shRNA腺相关病毒载体，pAV-FHAAV等载体的多克隆位点与我们的humanORF穿梭克隆相兼容，非常适于哺乳动物ORF的表达。

第二步：细胞转染。将携带外源基因的重组质粒与辅助质粒AdHelperVector和pAAV-rep/capVector共转染进入HEK293T细胞，感染72h之后即包装完毕。

第三步：收毒。分别收获培养基上清与细胞沉淀，PEG8000沉淀培养基上清中的病毒，培养基上清先用0.45um滤膜过滤。

第四步：病毒纯化。通过碘克沙醇法对病毒进行纯化，一方面提高病毒滴度，另一方面某些动物实验需要纯化之后才可进行。

第五步：滴度检测。用QPCR的方法来检测病毒的滴度，得到的结果为包装得到的病毒颗粒数。

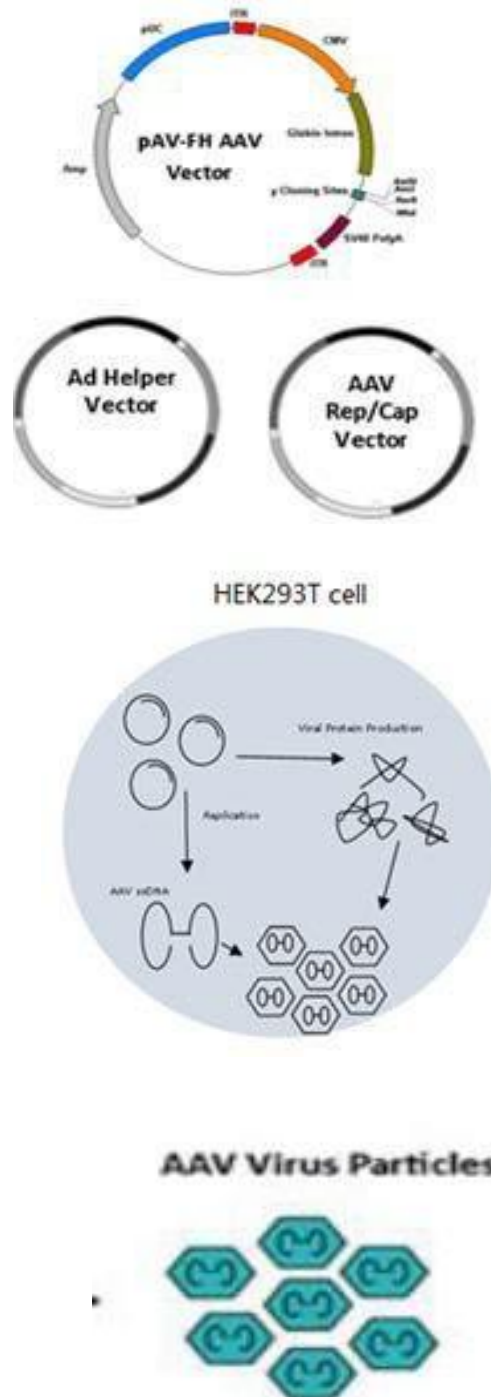
赛恩宝生物的pAV-FHAAV载体，具有Amp抗性、CMV启动子，带有Flag-His标签。多克隆位点与赛恩宝生物的humanORF穿梭克隆相兼容。非常适于哺乳动物ORF的表达。赛恩宝生物为您提供了多种表达shRNA的rAAV，包括U6或H1启动子和作为哺乳动物表达标记的GFP或RFP。同时，也可根据您感兴趣的基因提供shRNA设计服务。

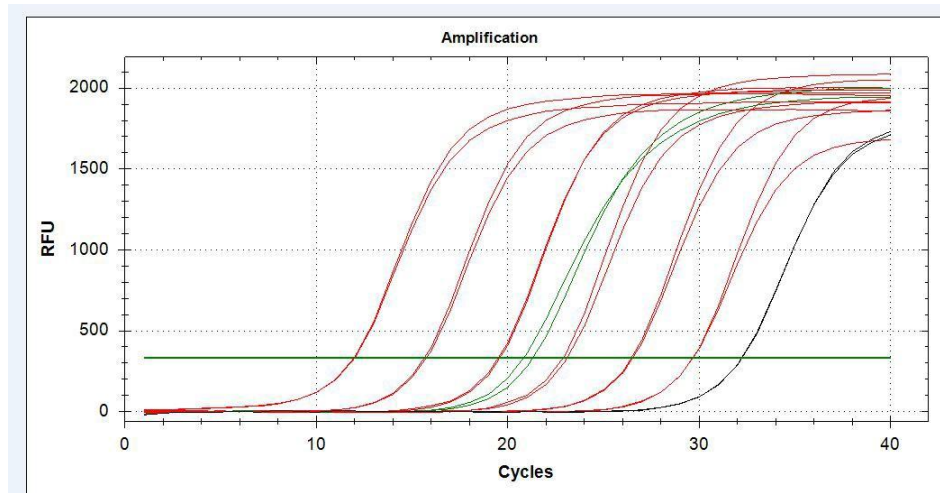
pAAV-rep/cap质粒（图）包含AAV编码复制蛋白和病毒衣壳蛋白的rep和cap基因，获得期望的高滴度病毒产品的关键基因。

pHelper质粒（图）包含AAV-HEK293T生产高滴度病毒必须的腺病毒基因VA，E2A和E4的集合。提供AAV生产所必需的腺病毒蛋白

质E1A和E1B在HEK293T细胞中稳定表达。

生产流程示意图





1. 腺相关病毒重组克隆构建

根据订单不同选择不同的载体，在此以人源基因克隆为例。

赛恩宝生物公司的AAV载体与我们的人源ORF库中的穿梭质粒的多克隆位点相兼容，通过酶切，连接，转化的方式将基因亚克隆进入pAV-FHAAV载体，得到阳性克隆之后进行酶切跑胶验证及测序以确认插曲片段的正确性。

2. 细胞冻存流程

1. 按照培养细胞流程，将细胞吹下来加入50mL离心管中，800g离心5min。
2. 配制冻存液，90%血清，10%DMSO，混匀。
3. 离心后去上清，将配制的冻存液加入，将细胞吹匀
4. 取上述溶液1mL分至1.5mL细胞冻存管中，做好标记和日期。
5. 放入装有异丙醇的冻存盒中，放入-80℃冰箱过夜。（冻存盒要提前一天从冰箱中拿至室温，使异丙醇的温度达到室温，每次冻存前确

保异丙醇的加入量在刻度线上)。

6. 第二天将冻存盒放入液氮或-150℃冰箱中。

3. 细胞复苏流程

1. 10cm培养盘中加10cm新鲜DMEM培养基，放培养箱预热至37℃。
2. 从液氮中取出冷冻管，迅速投入37℃~38℃水浴中，使其融化（1-2min左右）。
3. 待细胞冻存管中溶液尚未完全融化时加入预热的培养盘中。
4. 摇晃均匀，放培养箱培养。
5. 4h后待细胞完全贴壁后更换新鲜培养基（除去冻存液中DMSO对细胞的毒害作用。也可在第3步中800g离心5min，除去培养基后再悬浮细胞添加至新鲜预热的DMEM细胞培养皿中）。

4. 细胞培养流程（以10cm细胞培养皿，传代为例）

1. 生物安全柜紫外灭菌半小时。
2. 灭菌期间，DMEM培养基(含10%FBS，1%青链霉素混合液)、PBS以及0.25%胰酶在37℃水浴锅中预热。
3. 取汇合度接近100%活性好的HEK293T细胞，吸弃培养盘中培养基，加约5mL，1×PBS，摇晃几下，吸弃PBS。（加PBS目的主要除去残留在皿中的培养基中的FBS，以提高胰酶的消化效率）
4. 加1mL0.25%胰酶在生物安全柜内消化约1min，室温低时可放置于培养箱中消化。消化时间不宜过长，否则影响细胞再次贴壁效率和活性。
5. 加入约5mL的预热的培养基。

6. 用移液管吹打均匀，按照1:3比例传代。各洗2mL培养基至新的10cm皿中，再加入8mL预热的DMEM培养基。（吹打过程中不可用力过大，否则会吹破细胞）。

注意：传代盘数较多时，要先将预热的DMEM培养基加入到10cm皿中，再加入含细胞的培养基，以避免细胞分布不均。放置于培养箱前轻轻混匀皿中的培养基，使细胞均匀分散于培养基中。细胞培养条件为5%-7%CO₂浓度，37℃，培养箱内无菌水盘内水份提供一定的湿度。细胞传盘以及分6孔板，24孔板，96孔板分细胞都经过上述流程，只是细胞数与分的比例不同，具体情况具体操作。

5. AAV病毒包装

以10cm细胞培养皿为例

1. 第一天：聚合度90%以上的HEK293T细胞按1：3比例传盘（每盘大约 2.5×10^6 ），培养基Hyclone高糖DMEM培养基（含10%FBS）。
2. 第二天：转质粒前1~2h左右，换成无血清培养基（所有血清型AAV），用转染试剂将目的基因质粒和辅助质粒（需用酚氯仿提取的质粒）转入HEK293T中。
3. 第三天：质粒转化24h后，换新的无血清培养基（所有血清型AAV）
4. 第五天：转染72h收毒。带着培养基，吹下细胞，离心；然后分别收获培养基上清与细胞沉淀。用PEG8000沉淀培养基上清中的病毒，沉淀过夜后收集病毒沉淀。

6. AAV病毒纯化

1. 收集病毒沉淀和细胞沉淀。
2. 细胞沉淀-80℃保存，后续实验用。
3. 破碎细胞。
4. 将病毒的混合液用碘克沙醇密度梯度离心进行纯化。

7. 病毒浓缩

用超滤管进行浓缩。

8. 病毒滴度检验

1. 腺性相关病毒处理破除AAV病毒外壳，37℃孵育30min，然后加热95℃，5min使酶失活，体系如下：

组成成分	体积
病毒液	5ul
蛋白酶K（5ug/ul）	1ul
超纯水	4ul

2. 离心12000rpm，2min取上清。
3. 标准品的拷贝数，7个梯度稀释浓度分别：

$7.2 \times 10^8 \text{V.G./}\mu\text{L}$ ， $7.2 \times 10^7 \text{V.G./}\mu\text{L}$ ， $7.2 \times 10^6 \text{V.G./}\mu\text{L}$ ， $7.2 \times 10^5 \text{V.G./}\mu\text{L}$ ， $7.2 \times 10^4 \text{V.G./}\mu\text{L}$ ， $7.2 \times 10^3 \text{V.G./}\mu\text{L}$ ， $7.2 \times 10^2 \text{V.G./}\mu\text{L}$ 并将超纯水作为阴性对照。

4. 配制PCR反应体系，每个样品20uL体系，体系如下：

组成成分	体积
2×SYBRGreen缓冲液	10μL
F、R引物混合物	0.8μL
超纯水	7.2μL
病毒样品或标准品	2μL

5. PCR反应体系

组成成分	体积
95℃	5min
95℃	15sec
60℃	15sec
72℃	15sec
40个cycles	

6. 病毒颗粒数公式：病毒颗粒数（个/mL）=与标准品相对值×1000

十一、腺相关病毒感染目的细胞预实验

以2型AAV病毒为例，赛恩宝生物为您推荐MOI值10000:1-100000:1，是根据HEK293T细胞得出的数据，不同的细胞所使用的病毒MOI值会有所不同。建议您感染目的细胞前，进行预实验摸索最佳MOI值，推荐使用有荧光的对照病毒来摸索条件。

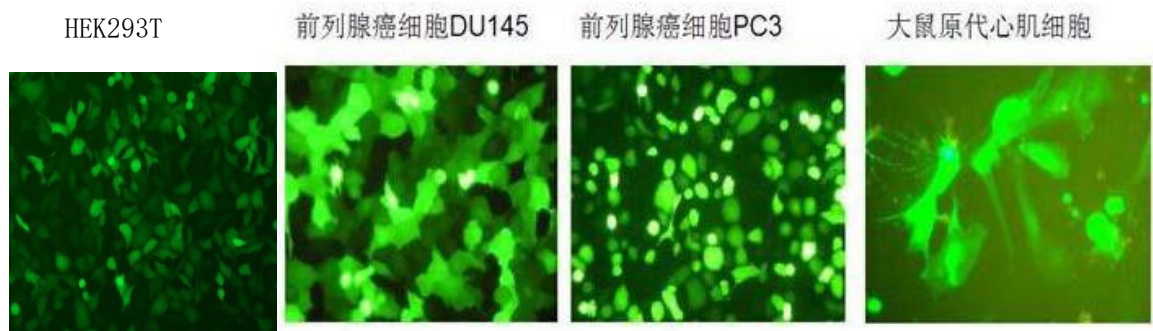
1. 为了节省病毒，推荐使用96孔板进行预实验。
2. 将目的细胞接种于96孔板中，细胞融合率为50%为最佳。为保证细胞生长良好，请保证细胞贴壁过夜。
3. 取10 μ L AAV病毒原液加入90 μ L培养基中做1:100稀释（ 10^{-2} ），以此为起点做梯度稀释直至稀释 10^{-7} 。可根据实际情况降低或提高稀释倍数。
4. 取出提前准备好的96孔板，先确定细胞生长状况是否良好。用准备好的病毒稀释液替代旧培养基，注意保留未加入病毒的细胞孔作为对照组。
5. 在加入病毒稀释液后，请在12~24h后观察细胞状态来确认加入的病毒量是否合适，是否因为加入的病毒量影响细胞状态。如果细胞没有变化，即所加病毒对细胞没有毒性，可以继续培养。
6. AAV病毒对细胞的感染较慢，请在感染细胞后每天观察细胞中荧光表达情况。(成功案例：山大医院学生利用我司提供的AAV病毒感染jurkat, ca46细胞,在MOI值 10^5 时一个星期后看到荧光表达,并且成功通过WB检测到目的基因的表达)（如果您选择的产品带有GFP标签，如果没有荧光标签请选择在96小时以后的不同时间段分别收获细胞并通过Western-Blot或其他检测手段来检测基因表达）。

注：由于AAV组织特异性，体外感染细胞的效率比较低，所以我们强烈推荐您购买AAV

用于动物实验。

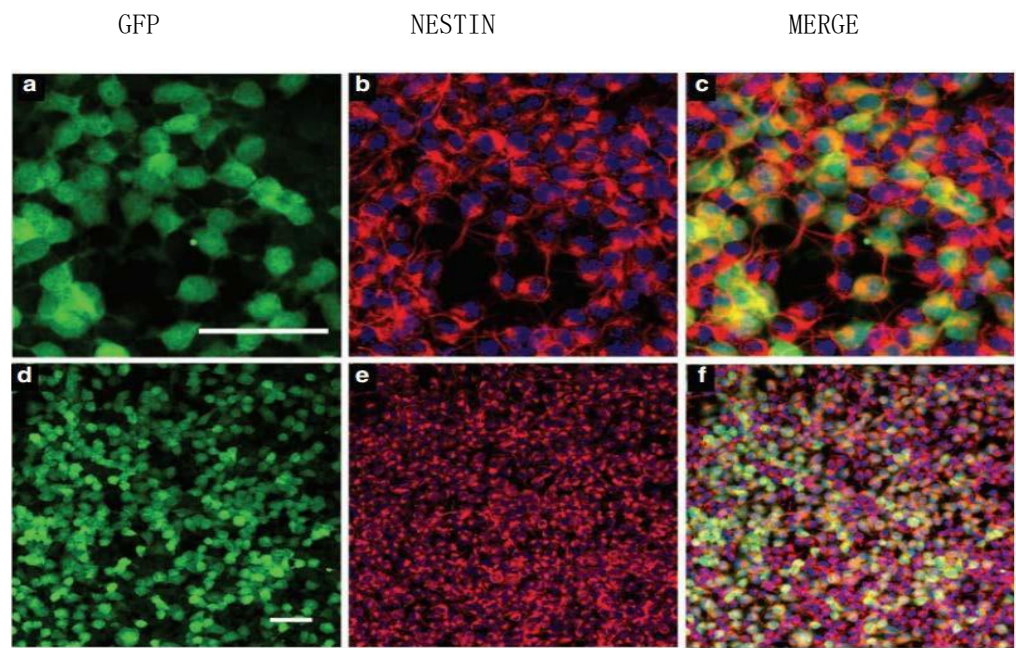
AAV使用情况实例分析

1.1、AAV感染不同种类的细胞



AAV虽然也可体外感染一些细胞，但感染效率比较低。具体感染效率可以参考本手册的常见问题解答中的附表。

1.2、AAV感染神经干细胞

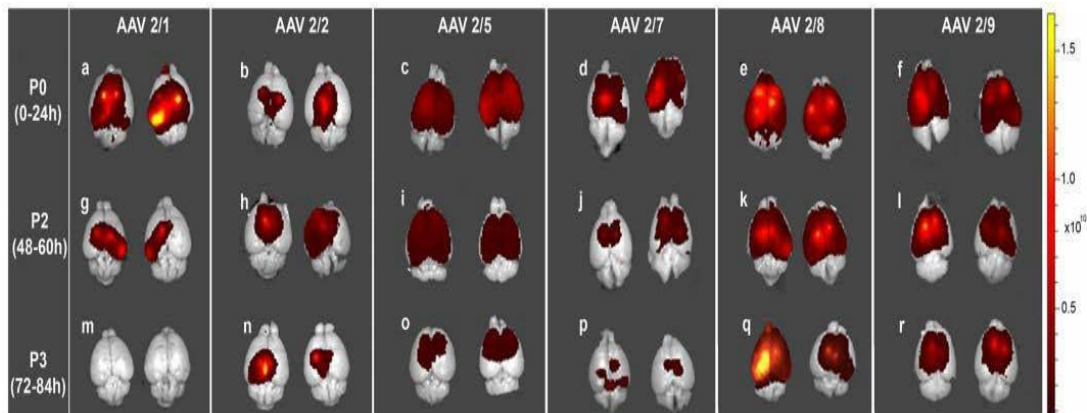


Sorted cells were expanded for an additional 26 days (total 40 days after AAV infection), and ~94.5% of cells maintained GFP and nestin expression

Jang JH, Koerber JT, Kim JS, et al. An evolved adeno-associated viral variant enhances gene delivery and gene targeting in neural stem cells [J]. Molecular Therapy, 2011, 19(4):667-675.

由于AAV的低免疫原性，即便感染干细胞，也不会引起细胞的分化。

1.3、各种类型的重组AAV注射入不同神经发育阶段的小鼠脑内产生不同分布

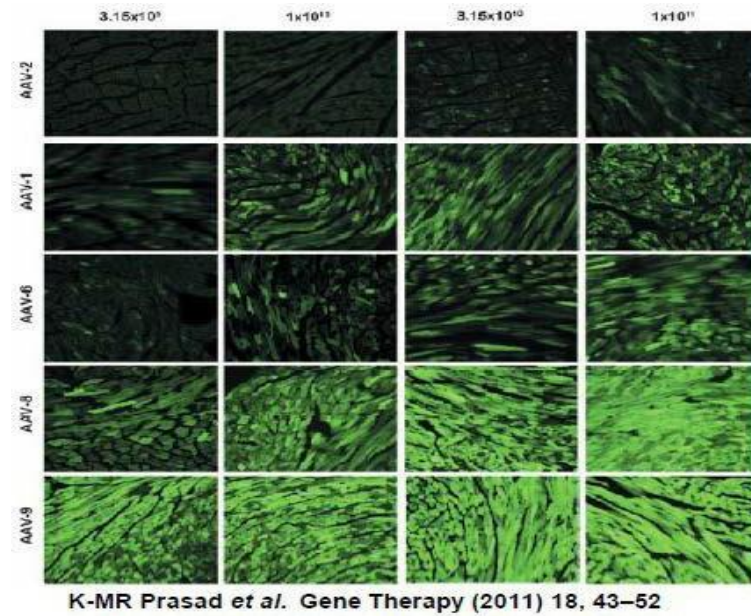


Chakrabarty P, Rosario A, Cruz P, et al. Capsid serotype and timing of injection determines AAV transduction in the neonatal mice brain [J]. PloS one, 2013, 8(6): e67680.

注射方法：脑室注射

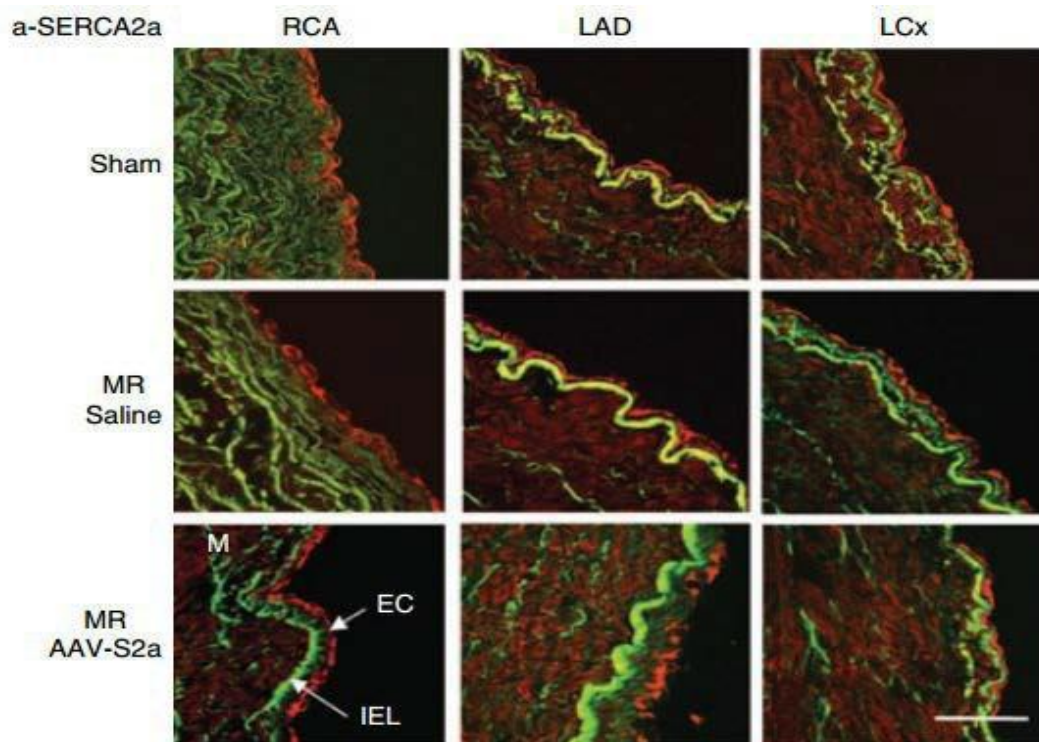
注射剂量： 2×10^{10} v.p

1.4、不同血清型的AAV感染心脏心肌细胞



由于组织特异性，即便提高病毒的注射量，对于低表达的血清型，其所携带基因的表达水平没有太大的改善。由图可知，AAV9型对心肌细胞的感染效率极高，AAV8次之。

15、重组AAV1-SERCA2a转导入猪冠状动脉的表达

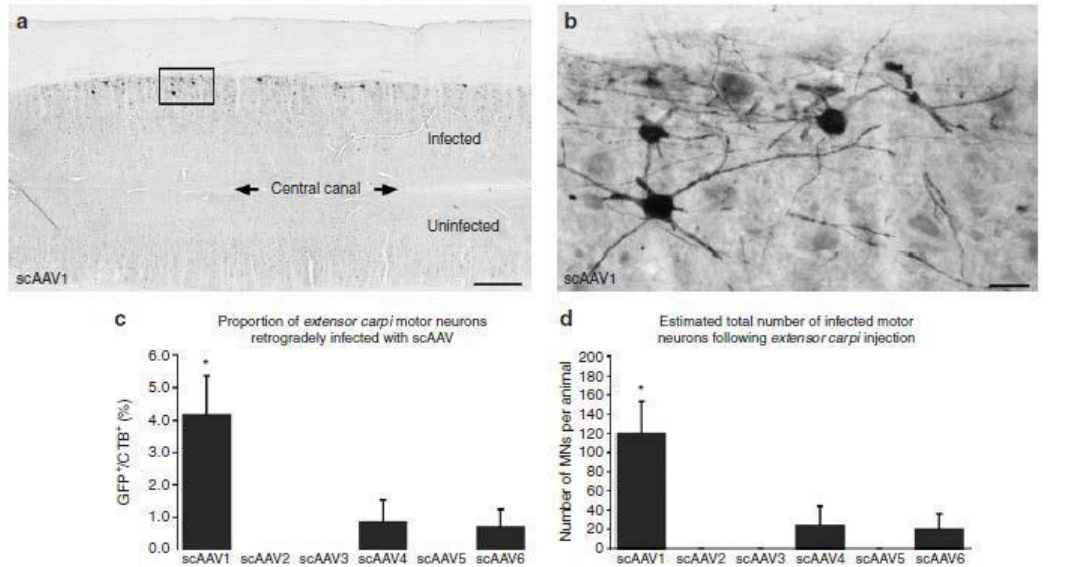


Hadri L, Bohe R, Molecular Therapy, 2010, 18(7): 1284-1292.

注射方法：冠状动脉注射

注射剂量： 10^{12} v.p

1.6、AAV1特异性²感染中枢神经系统以及不同类型AAV感染中枢神经系统的效果



Edmund R Hollis II, Ken Kadoya, Matthew Hirsch, Richard J Samulski and Mark H Tuszynski, Molecular Therapy, vol16, no. 2, feb, 2008.

注射方法：神经肌肉注射注射剂量： 2.1×10^8 v.p

分别用AAV1-6感染中枢神经系统，AAV1的效果最好，感染运动神经元的数目最多。

1.7、不同血清型AAV体外注射大鼠5天后在脑的海马回中的表达

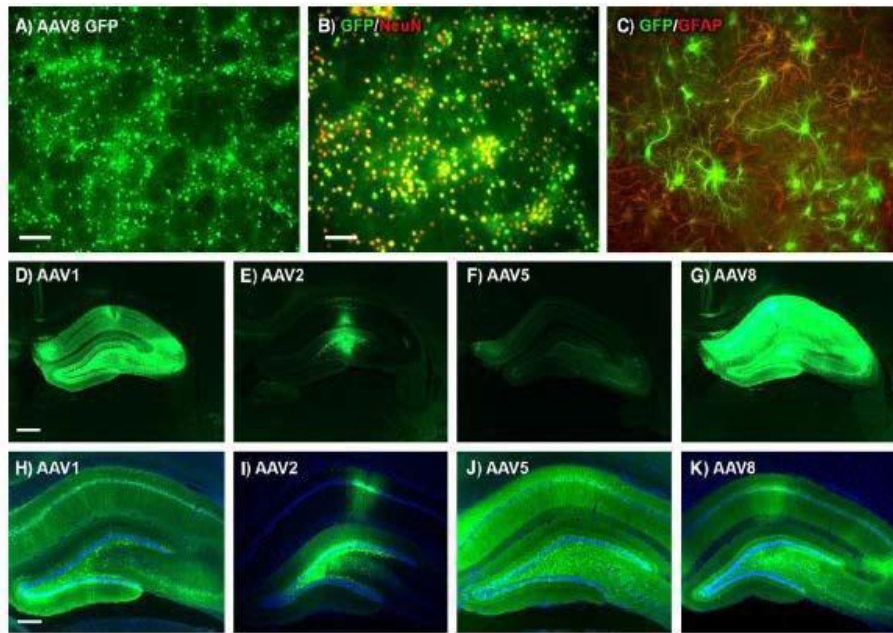
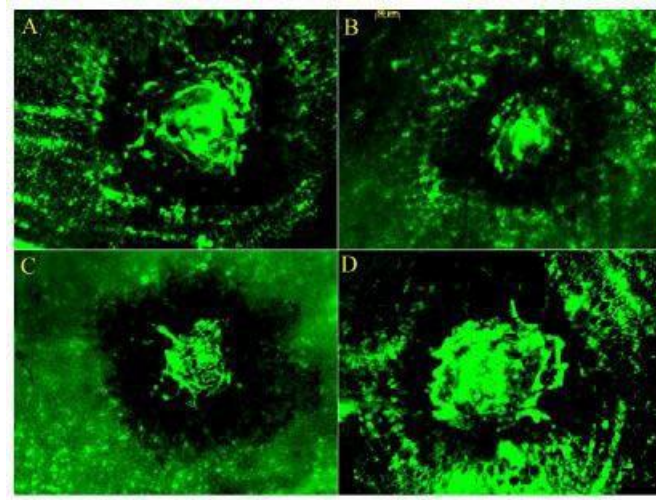


FIG. 1. AAV8 in cultured cells and AAV1, AAV2, AAV5, and AAV8 in rat hippocampus. (A) GFP epifluorescence in mixed neuron/astroglia culture 5 days after adding AAV8 GFP (1×10^{11} vector genomes per 1×10^5 plated cells). (B) Colocalization of GFP (green) and the neuronal marker NeuN (red) demonstrating efficient neuronal gene transfer. (C) Colocalization of GFP (green) and the astroglial marker GFAP (red) in a microscopic field containing mostly astrocytes. (D) Green fluorescence from AAV1 GFP vector. (E) AAV2 GFP. (F) AAV5 GFP. (G) AAV8 GFP. Equal dose (2×10^{10} vector genomes), equal expression interval (4 weeks), and equal exposure time for image capture in D-G (1 s) demonstrate relatively robust GFP signal with AAV8. Sections shown in D-G are proximal to the injection track, are the peak sections for each subject shown, and represent the overall trend in relative brightness observed in 10 animals/serotype group. (H-K) Same order of serotypes as D-G with DAPI counterstain and with various exposure times. Bars: A, 160 μm ; B, 100 μm ; D, 610 μm ; H, 305 μm . B and C, D-G, and H-K same magnifications.

Ronald L. Klein, Robert D. Dayton, Nancy J. Leidenheimer, Karen Jansen, Todd E. Golde, and Richard M. Zweig. MOLECULAR THERAPY, 2006, 3, 13(3).

1.8、AAV2在研究小鼠脉络膜新生血管形成中作为基因导入的载体



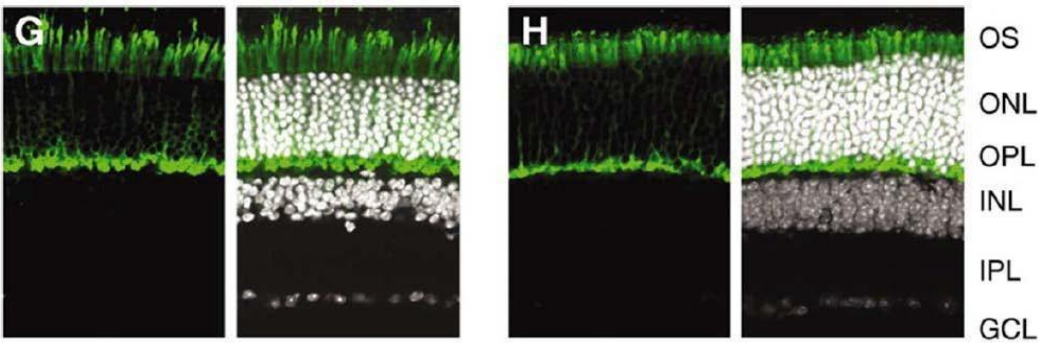
Therapeutic effect of CBAPEDF-AAV2 on choroidal neovascularization development and antibody responses to AAV2 capsid following single and sequential intravitreal injections. **A-D**: Representative CNV images from mouse eyes that were untreated (**A**), received a single intravitreal (IV) treatment (**B**), received first IV treatment (**C**), and received a second IV treatment (**D**) of AAV2-PEDF.

Qihong Li, Rehae Miller, Ping-Yang Han, Jijing Pang, Astra Dinculescu, Vince Chiodo, William W. Hauswirth. *Molecular Vision*, 2008, 14:1760-1769.

注射方法：玻璃体腔内注射

注射剂量： 4×10^{10} V.G.

1.9、AAV7,8感染视锥形细胞



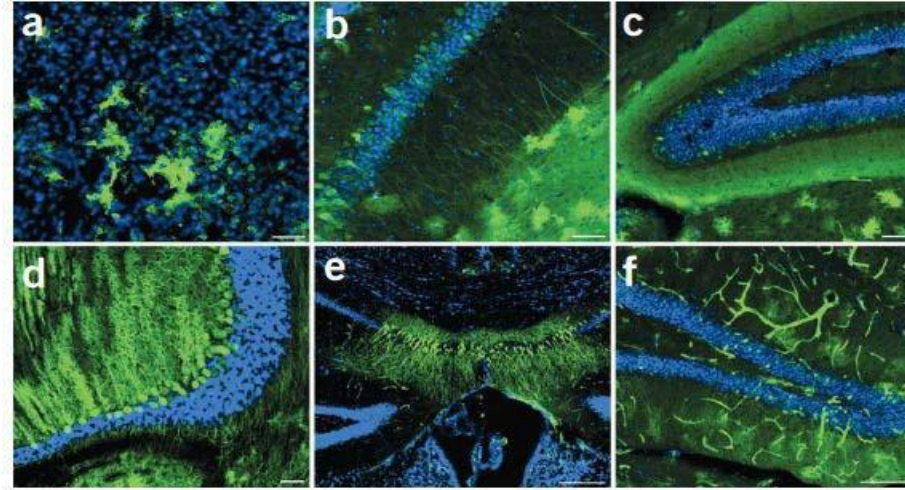
AAV 病毒滴度

图	AAV样品	血清型	启动子	基因	滴度[V.G./mL]
G	AAV2-hRHO-eNpHR-EYFP	7	hRHO	eNpHR-EYFP	3.28x10 ¹²
H	AAV2-hRO-eNpHR-EYFP	8	hRO	eNpHR-EYFP	3.08x10 ¹²

注射方法：在接近晶状体的虹膜上切开一个小口后，缓慢（20~30s内）注射。至少在3个星期后进行后续的实验。

注射剂量：2uL

1.10、scAAV9介导的CB-GFP标记静脉注射入大鼠3周后在脑的星形胶质和神经元中表



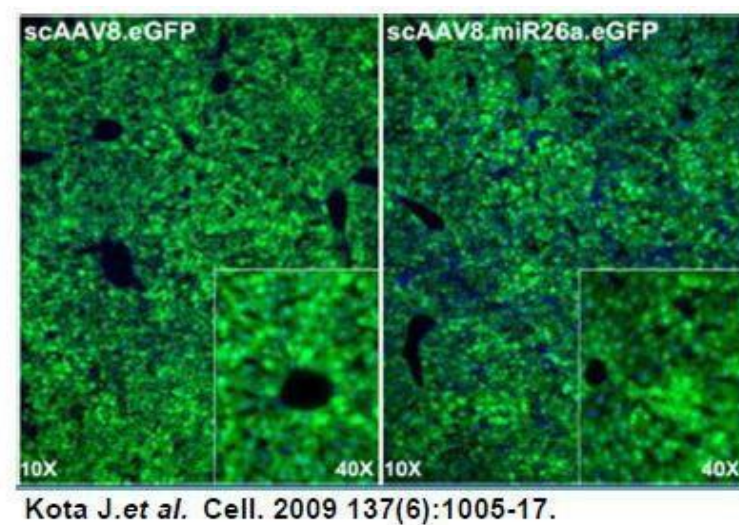
a:纹状体; b:海马回; c:齿状回; d :小脑浦肯野细胞; e:海马回的椎体细胞 f:齿状回的颗粒细胞; a-d 新生鼠 e-f 成年鼠 (f) 200 mm (e); 100 mm (f),50 mm (a-d)

Foust K D, et al. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes[J]. Nature biotechnology, 2009, 27(1): 59-65.

注射方法：尾静脉注射

注射剂量： 4×10^{11} v.p

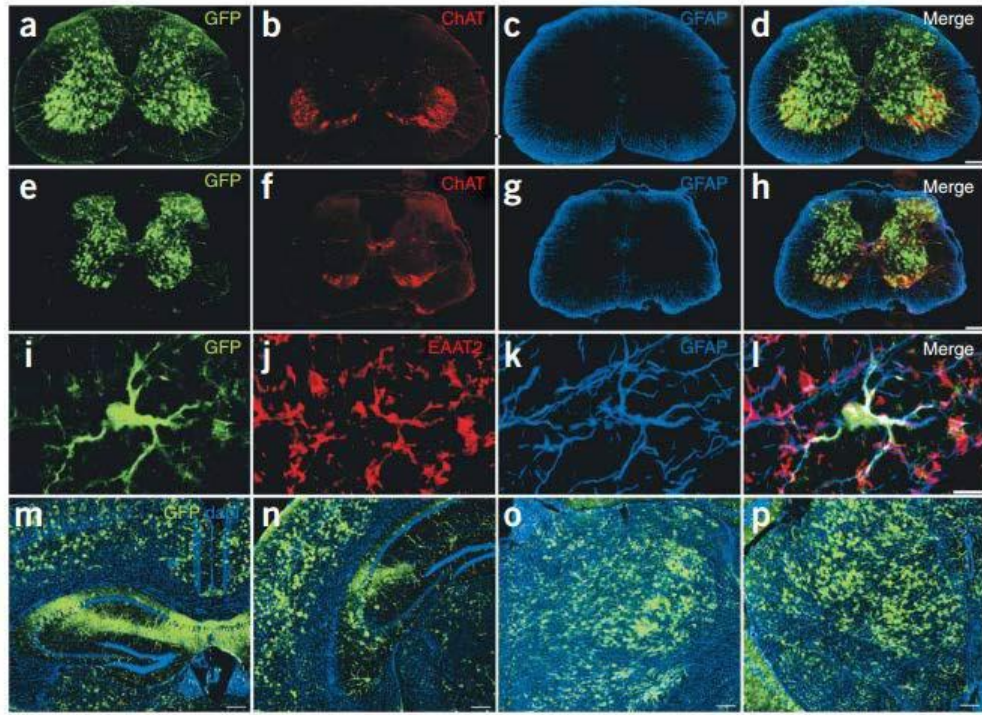
1.11、AAV8感染肝脏肝细胞



注射方法：尾部静脉注射

注射体积：200uL， 10^{12} v.p

1.12、AAV9介导的标记注射成年小鼠7周后在脊髓和大脑的表达



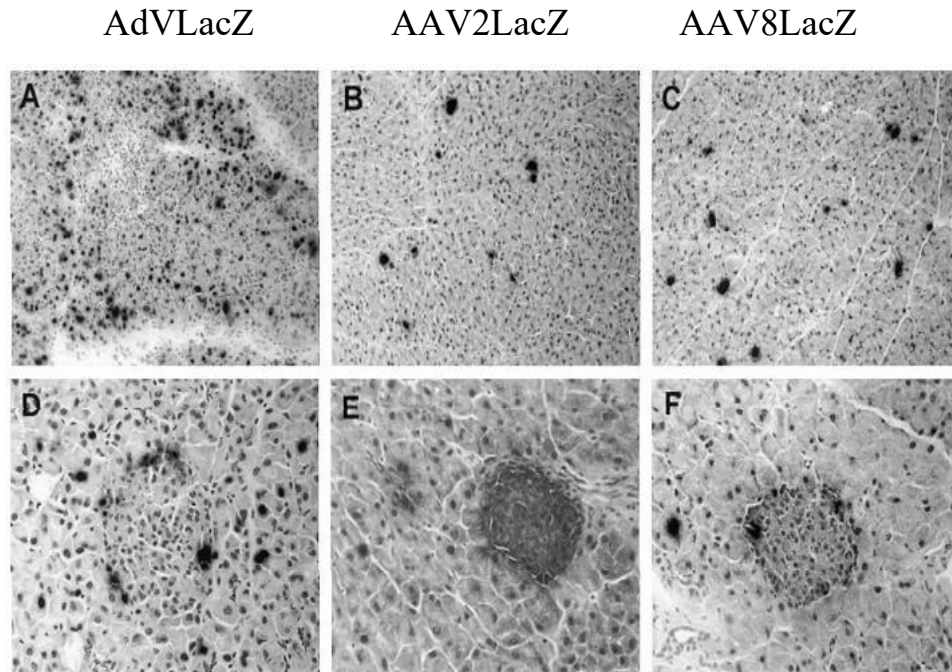
a-d:颈椎， e-h:腰椎， i-l:星形胶质细胞， m-p:脑

Foust K D, et al. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes[J]. Nature biotechnology, 2009, 27(1): 59-65.

注射方法：尾静脉注射

注射剂量： 4×10^{12} v.p

1.13、AdVLacZ,AAV2LacZ,和AAV8LacZ介导的标记在C57Bl/6鼠的胰腺中的表达



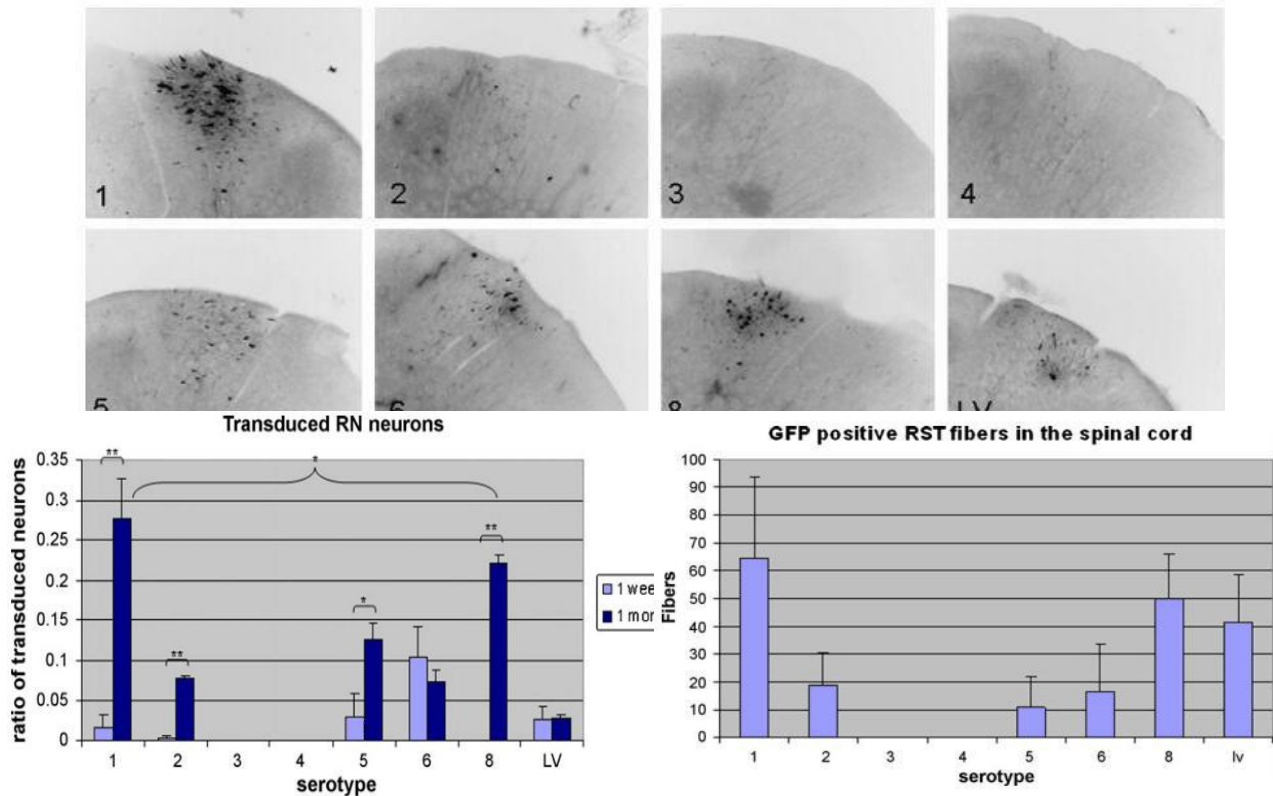
Wang A Y, et al. Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo[J]. Human gene therapy, 2004, 15(4): 405-413.

注射方式：胰腺注射

注射剂量：AdVLacZ- 10^8 pfu；AAV2，8LacZ- 10^{11} v.p

AAV和腺病毒的持续表达时间长，通常AAV和腺病毒可在体内表达数周甚至数月。

1.14、AAV-1-6, 8和慢病毒介导的GFP在大鼠的脊髓中的表达



Blits B, Derks S, Twisk J, et al. Journal of neuroscience methods, 2010, 185(2):257-263.

注射方法：脊髓注射

注射剂量：注射 5×10^8 v.p不同外壳的AAV病毒

由图显示，AAV介导的在大鼠脊髓中的基因表达要比慢病毒介导的表达更高。AAV比慢病毒更容易转染脊髓。

十二、常见问题解答

1. 什么是 Adeno-associate dvirus(AAV)& 重组 AAV(rAAV)&helper freerAAV?

腺相关病毒 (AAV) 属于微小病毒科，是一类小的、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4.1-4.7kb的包装容量。

2. 使用AAV有哪些生物安全性要求?

可在生物安全1级 (BSL-1) 实验室操作生产无辅助病毒和编码非致癌基因的重组AAV。另外，应在生物安全2级 (BSL-2) 实验室封闭处理具有生物危害性的材料。

3. 重组AAV安全吗?

迄今为止，未发现野生型AAV有致病性。野生型AAV，在无需辅助病毒（如腺病毒）的存在下，复制效率非常低。重组腺相关病毒（rAAV）由多个质粒（cis质粒、辅助质粒、rep/Cap质粒）组成。Cis质粒、辅助质粒与rep/Cap质粒之间不具有同源性序列，因此重组AAV在理论上不具有复制的能力。

4. 重组AAVs的克隆容量有多大?

AAV具有~4.7Kb的包装能力。2个ITR之间插入的DNA长度接近允

许的最大值4.7Kb时，包装效率显著降低。例如，对于过表达来自cDNA的基因，CMV-poly（A）信号元件约为1KB，因此最大可包装的cDNA长度约为3.2kb，如果共表达GFP（约0.8kb），则可包装的容量大约为2.4kb。

5. 哪些血清型的AAV可供选择？我该选用哪种AAV呢？

目前为您提供的AAV血清型为AAV1，AAV2，AAV3，AAV4，AAV5，AAV6，AAV7，AAV8，AAV9和AAV-rh10以及一些其他血清型。请参阅下面指南中参考文献的建议。

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

组织亲和性	推荐血清型
肝脏	AAV8、AAV9
心脏	AAV9
肺	AAV6
肌肉	AAV9
脑组织	AAV2、AAV9、AAV5、AAV8
眼部 - 视网膜	AAV2、AAV-DJ
眼部 - 角膜	Anc80L65
视网膜穆勒细胞	AAV-shH10
内耳	AAV-Anc
脂肪	AAV9
胰腺	AAV8
穿血脑屏障感染脑组织	AAV-BBB
逆行示踪	AAV-retro
血管内皮	AAV-Vec
小胶质细胞	AAV-MG
脑血管内皮	AAV-br1

请同时参阅转染效率与不同细胞类型对照表，以确定哪种血清型 AAV 更适合您的细胞。

注射部位	推荐的血清型	注射方式	动物	注射体积 (μL)
心脏	9 型	原位多点注射	大鼠	20-50μL/点, 3-5 个点
			小鼠	10-15μL/点, 3-5 个点
		尾静脉注射	大鼠	250μL (200g 体重)
			小鼠	100μL
肝脏	8 型 (特异)	尾静脉注射	大鼠	200μL (200g 体重)
	9 型 (较亮)		小鼠	100μL
全脑	AAV-BBB	尾静脉注射	大鼠	250-300μL
			小鼠	100μL
大脑 (局部)	9 型, 2 型, 5 型, 8 型	立体定位注射	大鼠	1-5μL
			小鼠	0.2-2μL
脊髓	9 型, 5 型, 1 型	鞘内注射	大鼠	10-20μL
			小鼠	
脂肪	9 型	腹内脂肪-腹腔注射	大鼠	300μL
			小鼠	150-200μL
		皮下脂肪-原位注射	大鼠	10-15μL/点, 5-8 个点
			小鼠	10-15μL/点, 5-8 个点
骨骼肌	9 型	原位多点注射	大鼠	10-15μL/点, 3-5 个点
			小鼠	10-15μL/点, 3-5 个点
眼睛	2 型 (玻璃体腔)	玻璃体腔注射	大鼠	3-5μL
			小鼠	1-2μL
	DJ 型 (视网膜下腔)	视网膜下腔注射	大鼠	3-5μL
			小鼠	1-2μL
肺脏	6 型 (特异)	无创气管注射	大鼠	100-150μL (200g 体重)
			小鼠	50-75μL
肾脏	2 型或 9 型	肾脏肾盂注射	大鼠	100-150μL
			小鼠	50-75μL
肠道	1 型或 5 型	灌肠	大鼠	1000μL (200g 体重)
			小鼠	500μL

6. 使用重组腺相关病毒rAAV传递基因的优势是什么？

rAAV病毒滴度很高，可感染分裂和非分裂细胞、免疫原性极小、

体内表达外源基因时间长。

7. AAV载体稳定吗?如何保存AAV载体?

纯化的AAV载体在4°C或更低温度下高度稳定。建议您将AAV分装后，-80°C下长期保存。

8. 订制AAV服务，客户需要提供哪些材料?&客户收到的产品是怎样的?

您可以从我们的人源全长cDNA库(17,000预制ORF)中挑选，或者提供您的质粒DNA或DNA序列，我们将基因克隆至AAV载体。您还可以指定特定的融合标签和AAV血清型。

基因沉默服务，请您提供确切的shRNA的序列以构建重组rAAV载体。我们的标准载体具有U6启动子和GFP标记。

通常情况下，可为客户提供1000uL病毒液 1×10^{13} V.G./mL。也可根据客户的需要，提供特定体积和滴度的产品。

参考文献

- [1] Daya, S. and K.I. Berns, Gene therapy using adeno-associated virus vectors. Clin Microbiol Rev, 2008. 21(4): p. 583-93.
- [2] Ding W, Zhang L, Yan Z, et al. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. Gene Therapy, 2005, 12(11): 873~880
- [3] Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R. (1977) J Gen Virol 36(1):59- 74.
- [4] Jang J H, Koerber J T, Kim J S, et al. An evolved adeno-associated viral variant enhances gene delivery and gene targeting in neural stem cells[J]. Molecular Therapy, 2011, 19(4): 667-675.
- [5] K-MR Prasad, et al. Gene Therapy, 2011, 18, 43-52.
- [6] Chakrabarty P, Rosario A, Cruz P, et al. Capsid serotype and timing of injection determines AAV transduction in the neonatal mice brain[J]. PloS one, 2013, 8(6): e67680.
- [7] Hadri L, Bobe R, Molecular Therapy, 2010, 18(7): 1284-1292.
- [8] Klein R L, Wang D B, King M A. Versatile somatic gene transfer for model ing neurodegenerative diseases[J]. Neurotoxicity research, 2009, 16(3): 329-342.
- [9] Foust K D, et al. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes[J]. Nature biotechnology, 2009, 27(1): 59-65.
- [10] Blits B, Derks S, Twisk J, et al. Journal of neuroscience methods, 2010, 185(2): 257-263.
- [11] Edmund R Hollis II, Ken Kadoya, Matthew Hirsch, Richard J Samulski and Mark H Tuszynski, Molecular Therapy, 2008, 16(2).
- [12] Ronald L. Klein, Robert D. Dayton, Nancy J. Leidenheimer, Karen Jansen, Todd E. Golde, and Richard M. Zweig. MOLECULAR THERAPY, 2006, 13(3).
- [13] Qihong Li, Rehae Miller, Ping-Yang Han, Jijing Pang, Astra Dinculescu, Vince Chiodo, William W. Hauswirth. Molecular Vision, 2008, 14:1760-1769.

声明:

- 1、赛恩宝生物医药有限公司的产品仅限用于研究，不可用于包括人类或体外诊断和治疗在内的其他用途。
- 2、赛恩宝生物医药有限公司的产品，不得修改和转售、转赠给任何第三方，未经赛恩宝生物医药有限公司的书面批准，不得将产品用于向其他第三方提供服务或用于制造商品化产品。