

腺病毒使用说明书

★ 腺病毒的储存与稀释

1. 病毒的储存：收到病毒液后在很短时间内即使用腺病毒进行实验，可以将病毒暂时放置于 4℃ 保存；如需长期保存请放置于 -80℃（病毒置于冻存管，并使用封口膜封口）。

① 病毒可以存放于 -80℃ 6 个月以上；但如果病毒储存时间超过 6 个月，建议在使用前需要重新测定病毒滴度。

② 反复冻融会降低病毒滴度：每次冻融会降低病毒滴度 10%；因此在病毒使用过程中应尽量避免反复冻融，为避免反复冻融，建议收到病毒后按照每次的使用量进行分装。

2. 病毒的稀释：如果需要稀释病毒，请将病毒取出置于冰浴融解后，使用 PBS 缓冲液或培养目的细胞无血清培养基(含血清或含双抗不影响病毒感染)。混匀分装后 4℃ 保存(请尽量在三天内用完)分装后使用。

★ 腺病毒感染目的细胞预实验

在正式实验前，需要进行腺病毒感染目的细胞的预实验，该实验的目的：第一，检测腺病毒是否能够感染目的细胞；第二，腺病毒感染目的细胞的最佳条件（即最佳的 MOI 值）。通常使用带有荧光标记的腺病毒。具体实验步骤如下：

1. 以 96 孔板为例，实验前一天分别接种 $1-2 \times 10^4$ 个目的细胞于 96 孔培养板中（至少接种 8 个孔的细胞），所加培养基体积为 100 μ l。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率约为 50~60%。

2. 准备 6 个无菌的 EP 管，在第一个 EP 管中加入 990 μ l 的完全培养液，其余的 5 个管子中各加入 900 μ l 的完全培养液。

3. 取 10 μ l 腺病毒原液加入 990 μ l 的 EP 管中做 1:100 稀释 (10^{-2})；然后以此为起点，再取 100 μ l 稀释液加入到 900 μ l 的 EP 管中做 1:10 稀释 (10^{-3})，直至稀释到 10^{-7} 。

4. 从孵箱中取出 96 孔板，在显微镜下确定每孔的细胞均生长良好。吸弃旧培养液，然后依次将 10^{-3} 至 10^{-7} 稀释的病毒液加入 96 孔板中，每种稀释度的病毒取

100 μ l 加入到 96 孔板中, 未加入病毒的细胞孔中加入同样量的完全培养基作为对照组。

5. 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, 表明该病毒对细胞没有明显毒性作用, 请不要换液, 继续培养。

6. 由于腺病毒感染细胞速度快, 分别在感染后 12、24、48 小时观察细胞中荧光表达情况。根据细胞的生长状况、荧光表达情况综合判断病毒在哪个稀释度下作用效果最好, 并以此稀释度下的病毒浓度作为后继实验的依据。

注意:在进行细胞感染时, 请选择生长状态良好的细胞进行感染, 并根据适当的 MOI 值以确定好适宜的感染剂量, 过高滴度的感染剂量会对细胞产生毒性甚至死亡。若是用于免疫实验, 请根据不同的动物和不同的免疫途径确定合适的免疫剂量。

★ 腺病毒感染目的细胞

1. 按照一定的细胞数接种目的细胞, 感染前需换液;
2. 根据所需的 MOI 值 (预实验确认的) 加入合适的病毒数量感染细胞;
3. 感染 6-12 小时后, 置换新鲜培养液;
4. 感染 24 小时后, 可以开始观察到荧光表达情况 (只对于含有 GFP/RFP/YFP 荧光标记的腺病毒载体), 过表达和干扰的感染时间以 36-48 小时实验为最佳。

★ 注意事项

1. 操作病毒时请尽量使用生物安全柜。如果使用普通超净工作台操作病毒, 请在打开含有病毒的容器盖子前关闭超净台的排风机。尽快操作, 尽量缩短开盖后的病毒在关闭了排风机的超净台中停留的时间。关闭所有含有病毒的相应容器盖子后, 再打开超净台排风机。
2. 操作病毒时请穿实验服, 戴口罩和手套。
3. 操作病毒时特别小心不要产生气雾或飞溅。如果操作时超净工作台有病毒污染, 请立即用 70%乙醇加 1%的 SDS 溶液擦拭干净。接触过病毒的枪头, 离心管, 培养板, 培养液请于 84 消毒液或 1% SDS 中浸泡过夜后弃去。
4. 用显微镜观察细胞感染情况时应遵从以下步骤: 拧紧培养瓶或盖紧培养板。用 70%乙清理培养瓶外壁后到显微镜处观察拍照。离开显微镜实验台之前, 用

70%乙醇清理显微镜实验台。

5. 如需要离心，应使用密封性好的离心管，或者用膜封口后离心，而且尽量使用组织或细胞培养室内的离心机。

6. 脱掉手套后，用肥皂和水清洗双手。

★ 常见问题

1. 如何确定我所用的目的细胞是否可以被腺病毒感染？

腺病毒有广泛的宿主范围，它可以感染人类或者其他哺乳动物细胞系或原代细胞，包括可分裂的和不可分裂的细胞。只有少数细胞系不被感染，例如一些淋巴细胞系对腺病毒有更强的抵抗性。为了确认所使用的目的细胞是否能够被腺病毒感染，需要通过带有标记（如 GFP）的腺病毒对目的细胞进行**预实验**，预实验的步骤参考“**目的细胞感染预实验**”。

2. 腺病毒载体在体外实验中应注意哪些问题？

由于细胞表面受体的差异，腺病毒载体在不同的细胞中转导效率不同，可以通过预实验来判断目的细胞中的腺病毒用量。病毒感染细胞的最佳时期是细胞处于对数生长期时，因此，在细胞消化后 12~24 小时加入病毒。病毒感染时细胞培养液的体积尽量小一些，以完全覆盖细胞为准。一般感染腺病毒 24 小时后就能检测到目的基因的表达，48 小时表达达到较高水平。

3. 如何确定感染细胞时腺病毒的最佳浓度？

最佳的实验结果需要最佳的腺病毒用量，用量少则达不到 100% 的感染效率，用量多可能会对细胞有毒害作用或其他不可预测的效应。为了确定目的细胞的最适病毒用量，需要在正式实验开始前，建议先完成“**目的细胞感染预实验**”，以此获得的数据作为正式实验的依据。

★ 附录

百恩维生物腺病毒感染复数（MOI）与体积对应表

规格	长满后细胞大约数目	MOI 值	加入病毒数量	腺病毒
----	-----------	-------	--------	-----

96 well	2-5.0×10 ⁴	50-100	1-5.0×10 ⁶	0.1-0.5ul
48 well	1.0-2.0×10 ⁵	50-100	0.5-2.0×10 ⁷	0.5-2ul
24 well	2.0-3.0×10 ⁵	50-100	1-3.0×10 ⁷	1-3ul
12 well	3.0-5.0×10 ⁵	50-100	1.5-5.0×10 ⁷	1.5-5ul
6 well	1.0-2.0×10 ⁶	50-100	0.5-2.0×10 ⁸	5-20ul
35mm	1.0-2.0×10 ⁶	50-100	0.5-2.0×10 ⁸	5-20ul
60mm	2.0-5×10 ⁶	50-100	1-5.0×10 ⁸	10-50ul
100mm	8.0-10.0×10 ⁶	50-100	4-10.0×10 ⁸	40-80ul

腺病毒滴度以 10¹⁰pfu/ml 为准，其他滴度需相应换算；大约细胞数目是根据 80%~100%细胞密度估算而出，具体细胞数请种细胞时进行细胞计数。

注：

1) 96 孔板长满了细胞大约有 5×10⁴ 个细胞。如果一天后要长到 70% (3.5×10⁴), 建议接种 2×10⁴ 个细胞左右。因为细胞刚放进去的前几个小时需要粘在生长表面及适应新的生长条件，不会达到 24 小时翻一倍的速度。其他规格培养可参照此确定相应 culture 细胞量。

2) MOI 值：MOI 是 multiplicity of infection 的缩写，中文译为感染复数，实际的含义即为每个细胞被多少个有活力病毒所感染。各种细胞的最适 MOI 值有差别，请客户正式实验前先进行**预实验**摸索最适 MOI。