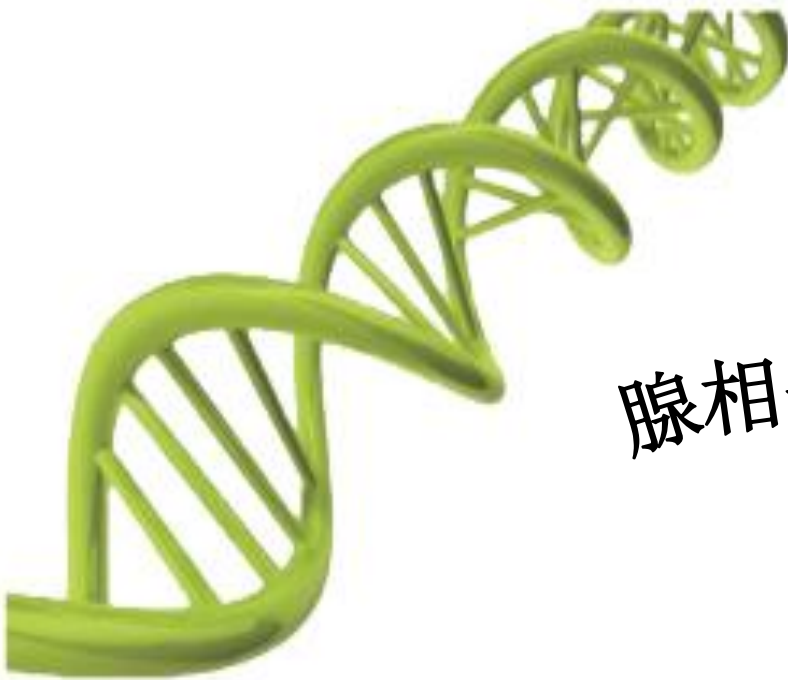




**百恩维生物**

**Biowit Technologies**

专注 创新 诚信 和谐



# 腺相关病毒操作手册

仅供参考

深圳市百恩维生物科技有限公司

## 目录

一、腺相关病毒 (AAV) 简介 .....	3
二、腺相关病毒的优点 .....	4
三、AAV293 (Biowit 货号: C0003) 细胞培养 .....	4
1. AAV293 细胞培养特性 .....	4
2. AAV293 细胞完全培养液 .....	5
3. AAV293 细胞的复苏 .....	5
4. AAV293 细胞的传代 .....	5
5. AAV293 细胞的冻存 .....	6
四、腺相关病毒 (AAV) 包装 .....	7
1. HET(Biowit 产品号: BW11002)转染 AAV293 细胞 .....	7
2. rAAV 病毒纯化与浓缩 .....	7
五、腺相关病毒滴度测定 (采用 Q-PCR 法, 滴度单位为 v.g/ml) .....	8
六、腺相关病毒感染目的细胞预实验 .....	8
七、腺相关病毒的储存、稀释 .....	10
八、使用安全注意事项 .....	10
九、腺相关病毒操作注意事项 .....	11
附录 .....	11

## 一、腺相关病毒（AAV）简介

腺相关病毒属微小病毒( parvovirus)家族的成员，为无包膜的单链线状 DNA 病毒。AAV 的基因组约 4700bp，包括上下游两个开放读码框架(ORF)，位于分别由 145 个核苷酸组成的 2 个反向末端重复序列(ITR)之间。

基因组中有 3 个启动子(P5、P19 和 P40) 和 2 个开放阅读框(ORF)，rep 和 cap，如图 1 所示。rep 编码 4 个重叠的多功能蛋白，即 Rep78、Rep68、Rep52 和 Rep40，其中 Rep78 与 Rep68 参与 AAV 的复制与整合，Rep52 和 Rep40 具有解螺旋酶和 ATP 酶活性，与 Rep78、Rep68 共同参与单链基因组的复制；cap 编码的 VP1、VP2、VP3、是装配成完整病毒所需要的衣壳蛋白，它们在 AAV 病毒整合、复制和装配中其重要作用。

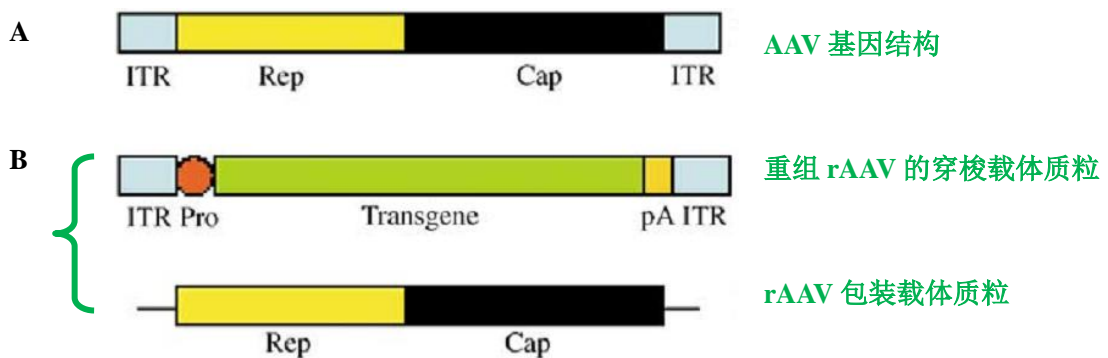


图 1 AAV 基因结构以及改造后的 AAV 载体

A, AAV 基因结构；B,改造后的 AAV 载体

重组 AAV 载体 (rAAV) 的制备即 AAV 的 rep 及 cap 基因由外源基因表达框替代，而只保留了两端的 ITR 序列。在生产 rAAV 时，只要提供 rep 及 cap 蛋白的反式功能以及其他辅助病毒（如腺病毒）的辅助功能，带有外源基因的重组 AAV 基因组就会被包装成 rAAV 病毒。如图 1 所示。

研究发现 AAV 具有多种血清型，各种不同血清型的 AAV 载体的主要区别是衣壳蛋白不同，因此对不同的组织和细胞的转染效率存在差异。目前百恩维生物在包装腺相关病毒时有 9 中不同的 AAV 血清型可供客户选择，建议客户针对不同

组织器官选择相应血清型的 AAV 病毒，见表 1。

表1 9种不同血清型对各组织器官细胞的亲和性

血清型	组织亲和性
AAV1	肌肉，心脏，骨骼肌（包括心肌），神经组织
AAV2	中枢神经，肌肉，肝脏，脑组织，眼，
AAV3	肌肉，肝脏，肺，眼
AAV4	中枢神经，肌肉，眼，脑
AAV5	肺，眼，中枢神经，关节滑膜，胰腺
AAV6	肺，心脏
AAV7	肌肉，肝脏
AAV8	肝脏，眼，中枢神经，肌肉
AAV9	心脏，肌肉，肺（肺泡），肝脏，中枢神经

## 二、腺相关病毒的优点

**1 安全性高** 迄今从未发现野生型 AAV 对人体致病，重组 AAV 去除了野生型 AAV 基因组的 96%，进一步保证了安全性。

**2 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。

**3 宿主范围广** 能感染分裂细胞和非分裂细胞。

**4 能介导基因的长期稳定表达**

**5 物理性质稳定** 在 60℃ 不能被灭活，能抗氯仿。

## 三、AAV293 (Biowit 货号: C0003) 细胞培养

### 1. AAV293 细胞培养特性

1.1 来源于 Biowit 公司的 AAV293 细胞 (Biowit 货号: C0003) 专用于包装腺相关病毒。

1.2 AAV293 细胞形态：呈成纤维细胞样并在培养瓶中贴壁形成单层细胞。

## 2. AAV293 细胞完全培养液

DMEM +10%FBS +1% Pen-Strep。

## 3. AAV293 细胞的复苏

3.1 把 AAV293 细胞从液氮中快速取出，并迅速放入 37℃ 水浴中快速晃动，使其在 1-2min 内完全融化。

3.2 在超净台内，用 70%乙醇将冻存管的盖沿擦拭干净。

3.3 将细胞转入 15 mL 无菌离心管中，加入 10 mL 完全培养基(预热)，1000 rpm 离心 4 分钟使细胞沉淀，弃上清，沉淀用 2mL 完全培养基重悬，把重悬液转入包含 12mL 完全培养基的 T75 培养瓶中培养。

3.4 放入 5% CO<sub>2</sub>，37℃ 二氧化碳培养箱内培养。第二天观察细胞生长状态并进行换液。

3.5 每天进行细胞状态观察直至细胞汇合度在 80%~90%之间。

## 4. AAV293 细胞的传代

细胞生长达到 80%-90% 汇合度即可传代，不可生长过密。

4.1 在水浴锅中预热完全培养基、1×PBS、0.25%胰酶-0.04%EDTA，预热 20min 即可。

4.2 待细胞生长达到 80-90% 汇合度时进行传代，轻轻的移除细胞上清培养液。

4.3 加入 1×PBS (T75 培养瓶加 6mL，T25 培养瓶加入 3mL)，轻轻的清洗细胞表面。

4.4 重复 4.3 步骤 2 次。

4.5 加入 0.25%胰酶-0.04%EDTA (一般 T75 培养瓶加 2mL，T25 培养瓶加入 1mL)，轻轻的上下摇晃，室温下孵育直至 80%的细胞脱壁变圆。

**注意：**避免 0.25%胰酶-0.04%EDTA 加入时间过长，AAV293 细胞在 0.25%胰酶-0.04%EDTA 作用下，在 2min 之内能脱壁变圆。)

4.6 立即加入完全培养基终止细胞消化（一般 T75 培养瓶加入 5mL，T25 加入 3mL）。轻轻用吸管吹打细胞，使细胞完全脱落培养瓶。

**注意：**吹打细胞时，应轻轻的吹打细胞，勿大力吹打细胞以免细胞死亡。

4.7 把细胞转移至 15mL 离心管中，1000 rpm 离心 4 分钟使细胞沉淀，弃上清，沉淀用 2 mL 完全培养基重悬，按照比例接入培养瓶中培养，补加培养基至培养瓶。（T75 培养瓶补至 15 mL，T25 培养瓶补至 6 mL。）

**注意：**AAV293 细胞传代比例在 1:2~1:10 之间。

4.8 放入 5% CO<sub>2</sub>，37℃ 二氧化碳培养箱内培养。

## 5. AAV293 细胞的冻存

建立细胞库时必须使培养的细胞汇合率低于 50%，以保证亚克隆的特定表型。

5.1 使完全培养基、1×PBS、0.25%胰酶-0.04% EDTA 平衡至室温。

5.2 轻轻的移除细胞上清培养液，加入 1×PBS（T75 培养瓶加 6 mL，T25 培养瓶加入 3mL），轻轻的清洗细胞表面。

5.3 重复 5.2 步骤 2 次。

5.4 加入 0.25%胰酶-0.04%EDTA（一般 T75 培养瓶加 2 mL，T25 培养瓶加入 1 mL），轻轻的上下摇晃，室温下孵育直至 80%的细胞脱壁变圆。

**注意：**避免 0.25%胰酶-0.04%EDTA 加入时间过长，AAV293 细胞在 0.25%胰酶-0.04%EDTA 作用下，在 2min 之内能脱壁变圆。

5.5 立即加入完全培养基终止细胞消化（一般 T75 培养瓶加入 5 mL，T25 加入 3 mL）。轻轻用吸管吹打细胞，使细胞完全脱落培养瓶。

**注意：**吹打细胞时，应轻轻的吹打细胞，勿大力吹打细胞以免细胞死亡。

5.6 把细胞悬液转移至 15mL 离心管中，1000 rpm 离心 4 分钟使细胞沉淀，弃上清，沉淀用适量的冻存液重悬，按照比例分装冻存管中，将冻存管放入冻存盒中，-80℃ 储存 24h。

**注意：**冻存液配制后应预冷至 4℃再使用。

5.7 第二天将冻存的细胞转入液氮罐中长期保存。

## 四、腺相关病毒 (AAV) 包装

### 1. HET(Biowit 产品号: BW11002)转染 AAV293 细胞

1) 在转染的前一天, 传代准备细胞: 用 0.25% 胰蛋白酶消化 AAV293 细胞, 以含 10% 血清的 DMEM 培养基调整细胞密度后, 按照每 10cm 细胞培养皿接种  $6\sim 8 \times 10^6$  cells 到 10cm 细胞培养皿中, 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 16h~24h 后待细胞密度生长到 80%~90% 时即可用于转染。

2) 第二天, 在转染前 2~4h, 用 5ml 不含 P/S 的完全培养基换液 (DMEM+10% FBS)。

3) 按照以下实验步骤来进行转染: [请参考 HET 转染试剂盒说明书](#)

A、加入 500ul HET Buffer A 到一支洁净的 1.5ml EP 管中 (可标记为 A 管)

B、在另一支洁净的 1.5ml EP 管中 (可标记为 B 管), 加入以下试剂, 终体系为 500ul

试剂名称	试剂数量
载体质粒	5ul(1.0ug/ul)
包装质粒	5ul(1.0ug/ul)
辅助质粒	5ul(1.0ug/ul)
HET Buffer B	50ul
ddH <sub>2</sub> O	435ul

C、将 B 管中的 DNA 混合液缓缓逐滴加入到 A 管中, 用移液器轻轻混匀 10min。

D、将混匀后的混合物室温静置 30min, 然后将混合物逐滴均匀加入到 10cm 细胞培养皿中, 轻微混匀。置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

4) 第三天, 即培养 12h~16h 后弃去培养基, 用 10ml 新鲜的完全培养基换液 (DMEM+10% FBS+P/S)。

### 2. rAAV 病毒纯化与浓缩

1) 换液 48h 后收集细胞和培养上清, 1000rpm 低温离心 10min, 分别收集细胞

和培养上清。

- 2) 收集的细胞加入 PBS 缓冲液(每皿细胞加 200~500 ul)经 3 次反复冻融后(置于-80℃冰箱或酒精干冰 25min 及 37℃水浴 5min, 振荡器混匀 1min), 10,000rpm 低温离心 10min, 收集上清。
- 3) 将两次收集的上清混合在一起, 用 0.45um 滤器过滤除杂质
- 4) 加入 1/5 体积的 2.5M NaCl, 20% PEG8000 溶液, 混合均匀, 冰浴 1h
- 5) 50,000g 低温离心 2h, 弃上清, 病毒沉淀用适量的 PBS 溶液溶解, 待完全溶解后用 0.22um 滤器过滤除菌。即为浓缩和纯化的 rAAV 病毒。

## 五、腺相关病毒滴度测定(采用 Q-PCR 法, 滴度单位为 v.g/ml)

- 1) 取 20ul 浓缩病毒液, 加入 1ul RNase-free DNase, 混匀, 37℃水浴反应 30min。
- 2) 4℃, 12 000 rpm, 离心 10 min, 取 10ul 上清到另一个无菌的 1.5ml EP 管中。
- 3) 加入 90ul Dilution Buffer (1 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 150 mM NaCl), 混匀, 100℃金属浴反应 10min。
- 4) 自然冷却至室温, 加入 1ul 蛋白酶 K, 37℃水浴反应 1h。
- 5) 100℃金属浴反应 10min, 自然冷却至室温。
- 6) 进行 Q-PCR 检测滴度。

## 六、腺相关病毒感染目的细胞预实验

感染培养原代细胞和建系细胞。慢病毒对各种细胞和组织的亲嗜性不同, 在使用慢病毒之前可以通过查阅相关文献, 了解慢病毒对您的目的细胞的亲嗜性, 感染复数 (MOI 值) 以及在体内 (In Vivo) 注射所需要的病毒量。如果没有相关文献支持, 可以通过感染预实验得到合适的感染复数 (MOI 值) (使用 24 孔板检测病毒对目的细胞的亲嗜性)。

腺相关病毒感染目的细胞预实验:



1. 腺相关病毒感染目的细胞预实验注意事项:

① 测定腺相关病毒对目的细胞的亲嗜性时, 需要同时设置对腺相关病毒亲嗜性较高的细胞(293, HeLa) 作为平行实验的对照细胞。

② 在进行腺相关病毒感染实验时, 可以用完全培养基(培养目的细胞用)稀释; 理论上, 含有血清, 双抗或者其他营养因子的完全培养基不影响腺相关病毒的感染效率。

③ 一般腺相关病毒单位为 vg/ml, 即每毫升中含有的病毒颗粒数。

2. 以 24 孔培养板为例, 进行目的细胞和 293 细胞的感染预实验前按照不同的 MOI 设置不同的感染孔, 并根据 MOI 和细胞数量计算所需要的病毒量, 如有必要可以使用 PBS 溶液或者无血清培养基稀释病毒原液。

(1) 第一天, 准备细胞: 在 24 孔培养板接种若干孔, 每个孔内接种  $3\sim 5 \times 10^4$  个目的细胞, 每孔培养基体积为 100  $\mu$ l; 进行病毒感染时细胞的融合度约为 50~60%左右。

(2) 第二天, 准备病毒: 取出 4 $^{\circ}$ C 保存的病毒, 使用台式离心机离心 20 秒(使病毒完全悬于离心管底部即可); 如果是冻存在 -80 $^{\circ}$ C 的病毒需要先在冰上融化后使用。亦可以根据实验室的实际情况将按照 MOI 准确计算好的腺相关病毒稀释到培养基中, 并尽可能保证所获得的含有腺相关病毒的培养基的总体积为最小体积, 以期获得最佳的感染效率。

(3) 第二天, 感染目的细胞: 病毒准备好之后, 从培养箱中拿出细胞, 首先观察细胞生长状态, 如细胞状态较好则可以开始实验。

a 使用移液器吸取准确体积的病毒液加入准备好的培养基。

b 吸去培养器皿中的培养基(如果细胞生长良好, 密度适宜, 则不用换液)。

c 在目的细胞和对照细胞中分别加入计算好的病毒液。

d 混匀后放于二氧化碳培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>) 孵育过夜。

**注意:** 感染前细胞的状态好坏对最终的感染效果高低影响很大, 所以务必保证加病毒之前细胞处于良好的生长状态。亦可以将预先准备好的培养基和腺相关病毒的混合液直接加入培养器皿中。腺相关病毒对目的细胞的感染效率较低, 通过提高 MOI 值可以提高病毒的感染效率。

(4) 第三天, 更换培养液: 一般在 24 小时候后将含有腺相关病毒的培养液更

换成正常培养液；在感染后观察细胞状态，如果腺相关病毒对细胞有明显毒性作用而影响细胞生长状态，可以最短在加病毒 4 小时更换新鲜培养液后继续培养（建议在 8~12 小时更换为宜）。第一次换液后，如果腺相关病毒对细胞没有明显毒性作用，按照正常培养条件培养换液。

(5) 感染后 72~96 h 左右，进行感染效率检测：在倒置荧光显微镜观察荧光，估计腺相关病毒感染目的细胞的效率；如果由于目的基因较大而造成选择的载体不能携带 Marker Gene 的，可以通过 Real-time PCR 检测目的基因的表达来评估感染效率。

## 七、腺相关病毒的储存、稀释

1. 病毒的储存：收到病毒液后在很短时间内即使用腺相关病毒进行实验，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。

## 八、使用安全注意事项

1. 病毒操作时最好使用生物安全柜。如果使用普通超净工作台操作病毒，请不要打开排风机。

2. 病毒操作时请穿实验服，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% 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%乙醇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,或者用封口膜封口后离心,而且尽量使用组织培养室内的离心机。
6. 脱掉手套后,用肥皂和水清洗双手。

## 九、腺相关病毒操作注意事项

1. 需要使用去内毒素的质粒抽提试剂盒来抽提质粒,而且质粒 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值在 1.8~2.0 之间。
2. 细胞生长状态对于病毒包装至关重要,因此需要保证良好的细胞生长状态和较少的细胞传代次数,细胞代数不要超过 20 代。
3. 在质粒转染时细胞培养基里面不要添加抗生素(如 P/S、G418 等)。
4. 病毒包装试剂盒应与 HET 高效转染试剂盒配套使用才能达到最佳的病毒包装效率;一般来说包装基因过表达的腺相关病毒其生物学滴度能够达到 10<sup>12</sup> vg/ml,而包装 RNAi 的腺相关病毒其生物学滴度能够达到 10<sup>13</sup> vg/ml。
5. 病毒切勿反复冻融,冻融次数尽量不要超过 3 次,每冻融一次大约有 10%左右的病毒损失,应按每次使用的病毒量来分装然后冻存于-80 度冻箱,保存时间尽量不要超过 6 个月。

## 附录

1. 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。

2. 细胞培养器皿的相关参数:

<b>Flask/Dish</b>	<b>Surface (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Cell seeding number</b>	<b>Media Volume</b>
96 well plate	50	$0.5\sim 1.0\times 10^4$	100 $\mu$ l
48 well plate	100	$3.0\sim 5.0\times 10^4$	200 $\mu$ l
24 well plate	200	$5.0\sim 7.0\times 10^4$	500 $\mu$ l
12 well plate	401	$1.0\sim 2.0\times 10^5$	1.0 ml
6 well plate	962	$5.0\times 10^5$	2.0 ml
35mm	962	$5.0\times 10^5$	2.0 ml
60mm	2827	$1.0\times 10^6$	6.0 ml
100mm	7854	$4.0\sim 6.0\times 10^6$	10.0 ml