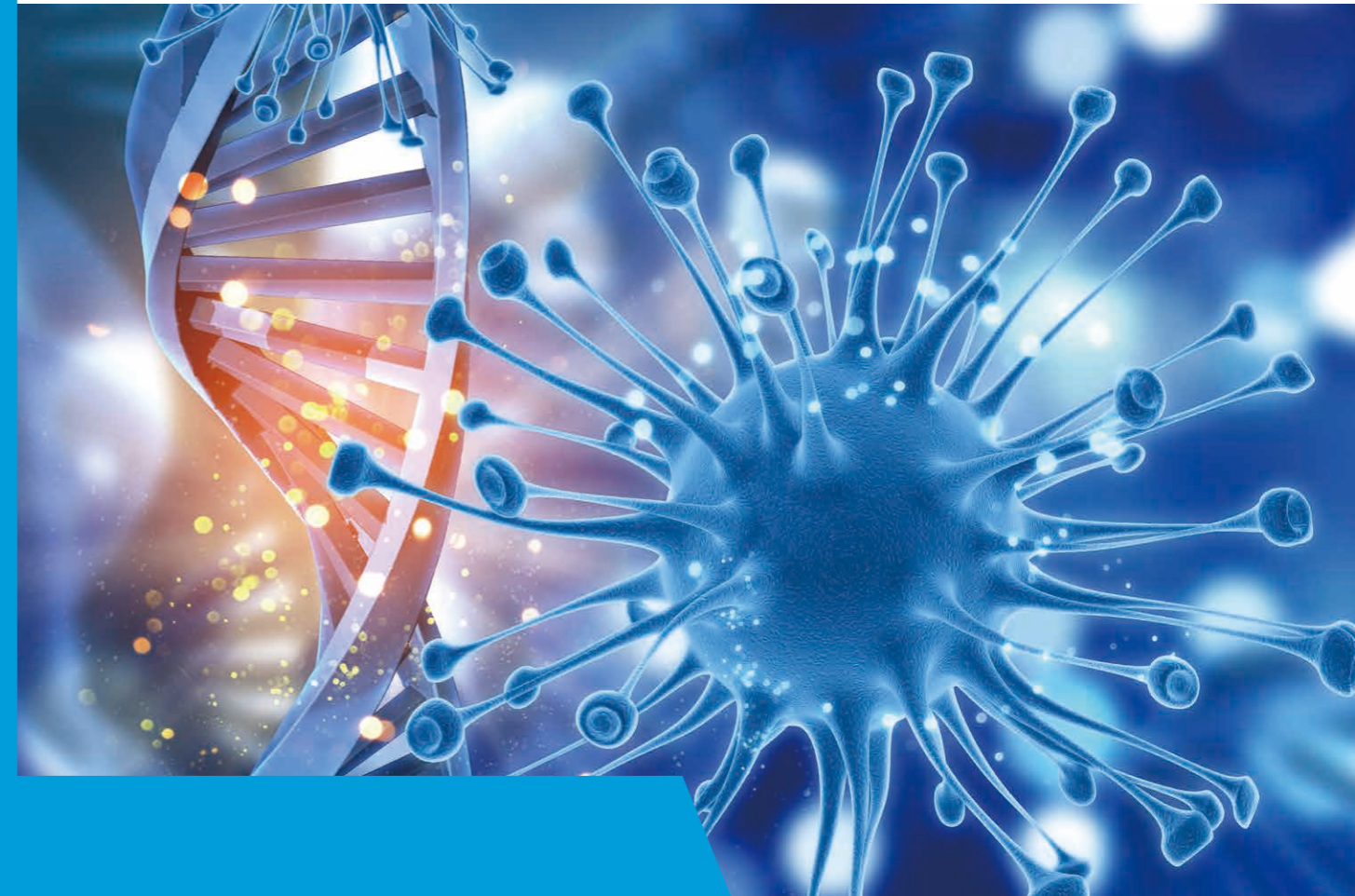


 400-077-2566
 WWW.WZBIO.COM.CN



山东维真生物科技有限公司

地址: 山东省济南市高新区港源四路416号维真产业园
网址: www.wzbio.com.cn
技术交流QQ群: 290156365 企业客服QQ: 4000772566
邮箱: service@wzbio.cn



腺相关病毒

Adeno-associated virus

Technical Manual
技术手册



维真生物公司于 2012 年在中国济南创立，注册资金 1 亿元。维真生物公司定位于生物与健康产业，专注于腺病毒、慢病毒、腺相关病毒（AAV）病毒载体产业。

公司已拥有包含 18000 余个人源 ORF cDNA 克隆、1300 余个人源 miRNA 克隆的现货质粒库和包含 12000 余个人源 ORF 的腺病毒现货库；公司还提供分子克隆、基因敲减、基因敲除、基因突变等基因编辑服务，并在此基础上提供各类病毒包装服务。我们的客户遍及中国、美国、欧洲各国及各大院校、科研院所、医院及高科技生物企业。

在“让生命更健康，让世界更美好”伟大愿景的指引下，维真生物以帮助客户解决问题为目标，以专业的服务共创未来。

INTRODUCTION

维真生物

● 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

产品简介	01
生产与检测	03
案例分析	09
运输&储存	17
有限责任担保	18
安全操作规范与免责声明	18
常见问题解答	19
产品分类	21
专题讨论	25
维真产品与服务	28

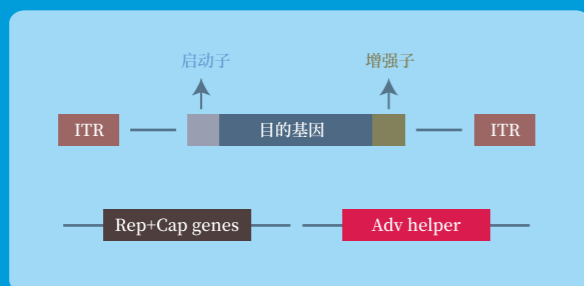
CONTENTS

Part - 1

腺相关病毒 产品简介

重组腺相关病毒 (rAAV) 是目前广泛使用的基因转导及基因治疗工具。它可以将4.5kb以下的DNA分子转导到分裂细胞及终末分化细胞中，并维持基因的相对长效表达。rAAV不带有或表达任何的病毒功能与结构蛋白，不具有致病性，安全性好，免疫原性低。

如图所示，维真生物的rAAV生产基于三质粒共转染方法。包装细胞反式提供AAV的结构蛋白CAP及功能蛋白Rep，在包装辅助质粒Adv-Helper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。



腺相关病毒基因传递和表达的优势

宿主范围广	可高效感染分裂和非分裂细胞
组织特异性高	多种血清型和特异性启动子，联合运用不同重组酶系统，实现外源基因高特异性表达
安全性高	ITR序列和Rep/Cap基因分别由独立质粒表达，未发现对人体致病
免疫原性低	重组AAV不带有病毒功能及结构蛋白，用于基因治疗基本不引起免疫反应
体内感染效率高	体内实验首选

维真生物腺相关病毒的优势

载体全	30多种组织特异性启动子和多重报告基因
货期短	AAV克隆载体与18,000余个预制人类全长cDNA ORF克隆载体MCS区通用，生产周期短
滴度高	滴度 10^{12} V.G/mL以上，可高达 10^{14} V.G/mL
服务优	根据客户具体实验，由专业技术人员提供载体构建方案和特殊定制服务

Part - 2

腺相关病毒 生产与检测

- 第一步 基因克隆
- 第二步 病毒包装
- 第三步 收毒
- 第四步 纯化浓缩
- 第五步 滴度和特异性检测



第一步 基因克隆

将外源基因克隆进入腺相关病毒载体，载体构建快。

第二步 病毒包装

将携带外源基因的重组质粒与辅助质粒 Ad Helper Vector 和 pAAV-rep/capVector 共转染包装细胞 HEK293T，转染 72h 后细胞内会产生大量的重组病毒。

第三步 收毒

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，裂解细胞沉淀收毒，合并从细胞沉淀和上清中得到的病毒。

第四步 纯化浓缩

碘克沙醇法对病毒进行纯化。碘克沙醇密度梯度离心，可以有效地将有感染力的病毒与空衣壳病毒及其他细胞杂质分离开，将有感染力的病毒由 10% 富集到 90% 以上。纯化完成后，再将收集到的病毒液置于超滤管中进行浓缩。

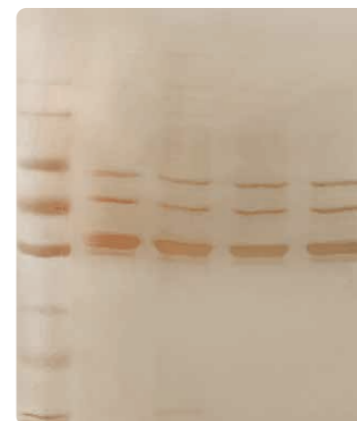
第五步 QC

- ① qPCR 法检测病毒滴度
- ② PCR 法检测病毒特异性
- ③ 银染法检测病毒纯度

银染意义：

1. SDS-PAGE 电泳，采用银染法进行 AAV 纯度鉴别是一种经济、实用、简单、直观的方法，不仅可以用来鉴别 rAAV，也可以通过衣壳蛋白 VP1、VP2、VP3 的 3 条蛋白染色带（有时也可见 APP 蛋白），分析 rAAV 的纯度。

2. 纯度较高的 rAAV 应该只有 3 条或者 4 条衣壳蛋白条带，而且大小相对固定，引入的杂蛋白越多，条带数目越多，纯度也越差。



AAV 生产步骤详情

1. 腺相关病毒重组载体构建

- 1) 根据客户实验目的和受试细胞选择不同的载体，在此以人源 ORF 为例。
- 2) 维真生物公司 AAV 载体的 MCS 区与人源 ORF cDNA 克隆现货库中的 MCS 区相兼容，可以通过简单酶切 - 连接 - 转化的方式将目的基因亚克隆至目标 AAV 表达载体，得到阳性克隆后通过测序以确认插入片段的正确性。

2. 细胞冻存流程

- 1) 按照细胞培养流程，将对数生长期的细胞吹下来加入50mL离心管中，200g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) 取上述溶液每1mL分至1.5mL 细胞冻存管中，做好标记和日期。
- 5) 将冻存管放入装有异丙醇的冻存盒中，放入 -80°C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°C冰箱中以长期保存；同时取一支细胞做复苏检测，以判断该批细胞的冻存质量。

3. 细胞复苏

- 1) 10cm dish中加10ml新鲜DMEM培养基，放培养箱预热至37°C。
- 2) 从液氮中取出冷冻管，迅速投入 37 °C ~ 38°C水浴中，使其融化（1-2 分钟左右）。
- 3) 待细胞冻存管中溶液融化后，200g 离心 5min，弃掉液体并吸取 1ml 预热的培养基将细胞沉淀轻轻吹起，转移到 10cm dish 中。
- 4) 摇晃均匀，置于培养箱培养。
- 5) 培养过夜，更换新鲜培养基（除去冻存液中DMSO对细胞的毒害作用）。

4. 细胞传代（以 10cm dish 为例）

- 1) 生物安全柜紫外灭菌半小时。

高滴度
1×10¹³VG/mL以上

短周期
可2周发货



- 2) 灭菌期间，将 DMEM 培养基（含 10%FBS，1% 青链霉素混合液）和 PBS 置于 37°C水浴锅中预热；0.25% 胰酶放置室温，不可水浴加热。
- 3) 取汇合度接近 100% 且活性较好的 HEK293T 细胞，吸弃培养盘中培养基，加入约 5mL,1×PBS, 摇晃几下，吸弃 PBS。
- 4) 加 1mL 0.25% 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 预热的培养基，终止消化。
- 6) 用移液管吹打均匀（吹打过程中不可用力过大，否则会吹破细胞），按照 1:3 的比例传代。各取 2mL 培养基至新的 10cm dish 中，再加入 8mL 预热的 DMEM 培养基。
注意：传代盘数较多时，要先将预热的 DMEM 培养基加入到 10cm dish 中，再加入含细胞的培养基，以避免细胞分布不均匀。置于培养箱前轻轻混匀 dish 中的培养基，使细胞均匀分散于培养基中。

5. AAV 病毒包装（以 10cm dish 为例）

第一天：汇合度90%以上的HEK293T细胞按1：3比例传盘（每盘大约 2.5×10^6 ），培养基为Hyclone 高糖DMEM培养基（含10%FBS）。

第二天：转染前1-2h左右，换成无血清培养基。

按照以下比例配制转染试剂：

Mix 1	体积 μ l	Mix 2	量
DMEM（无 FBS）	500 μ l	DMEM（无 FBS）	500 μ l
		LTR-plasmid	5 μ g
TR	60-70 μ l（1 μ g/ μ l）	RC-plasmid	6 μ g
		AAV-helper	10 μ g

Mix 1和Mix 2分别混合后，室温5-10min，后将Mix 1和Mix 2混合，室温15-30min，逐滴加入至10cm dish中。（此时细胞汇合度在80%-90%比较适宜，细胞过少会影响转染效率）

第三天：质粒转染24h后，换新的无血清培养基。

第五天：转染72h收毒，将产毒的细胞连同培养基一起收集至50ml离心管中，离心，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；裂解细胞沉淀收毒；合并从细胞沉淀和上清中得到的AAV。

6. AAV 病毒纯化与浓缩

6.1 纯化——碘克沙醇密度梯度离心

- ① 配制不同浓度的碘克沙醇；
- ② 取一个超离管，用电动移液器逐层、缓慢加入不同浓度的碘克沙醇；
- ③ 将处理好的病毒液加入到最上层；
- ④ 配平后超速，18°C、48000rpm、2.5h离心。

6.2 浓缩

- ① 离心完毕后，将超滤管底用针头刺破，收集腺相关病毒所在层至15mL管中；
- ② 将收集的病毒液注入浓缩柱中，加PBS+0.001%PF68至满，混匀；
- ③ 4000rpm，10°C，离心约1h；
- ④ 将超滤管中剩下的液体反复吹打后吸至病毒储存管中，最后加入病毒储存液，标明名称和日期；
- ⑤ 将收集起来的病毒涡旋震荡混匀后离心，吸 10μL 病毒液进行滴度检测。

7. 病毒滴度检测方法

实时定量PCR法是一种简单的、高通量的测定纯化病毒样本中腺相关病毒颗粒数量的方法。每个模板的Ct值与该模板起始拷贝数的对数存在线性关系，利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。

7.1 去除游离DNA分子

先将病毒稀释 10 倍，以保证样品中游离的 DNA 充分降解：取 5μL 病毒至 45μL PBS 缓冲液中，充分混匀。按以下体系配制 Mixture：

组成成分	体积
超纯水 (DNase & RNase Free)	4 μl
DNAaseI	1 μl
10×DNAaseI Buffer	1 μl
病毒稀释液	4μl
Total	10μl

37°C 孵育 30min，95°C 加热 5min 使 DNA 酶失活。

严格质控标准
银染检测

确保病毒纯度



7.2 去除病毒蛋白外壳

向上述体系中再加入 1μL 蛋白酶 K (5μg/μl)。37 °C 孵育 30 min；再加 30ul 超纯水稀释至 40ul (至此病毒原液稀释 100 倍)，95°C 加热 5 min 使蛋白酶 K 失活，然后 12000rpm，离心 2min，取上清进行 qPCR 检测。

37 °C 孵育 30 min，95°C 加热 5min 使 DNA 酶失活。

7.3 qPCR

将步骤 2 得到的上清，取 5μL 进行 10 倍梯度稀释，即病毒原液稀释了 1000 倍。分别取 2μL 待测样品及标准品作为模板进行 qPCR 检测。

qPCR 反应体系如下：

组成成分	体积
2 × SYBR Green mix	10 μl
Primers (Forward & Reverse mixture)	0.8 μl
Primers (Forward & Reverse mixture)	7.2μl
DNA	2μl
Total	20μl

qPCR 反应程序：

循环参数	
预变性 95°C	3min
95°C	5S
60°C	15S
72°C	15S+Plate Read
39 个循环	

7.4 数据分析

病毒颗粒数的计算：病毒颗粒数 (VP/mL) = 与标准品相对值 × 1000

维真生物

可次日发货 银染验证 质量保障

Part - 3

腺相关病毒 案例分享

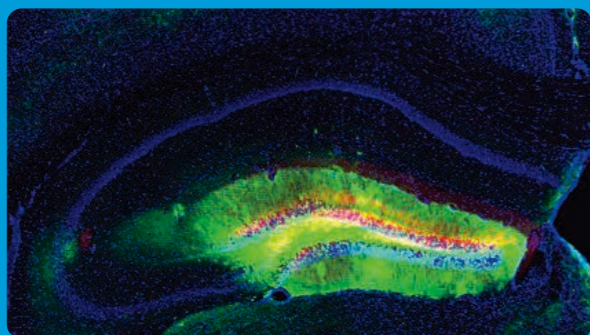
AAV体外感染案例分享

01-03



AAV体内感染案例分享

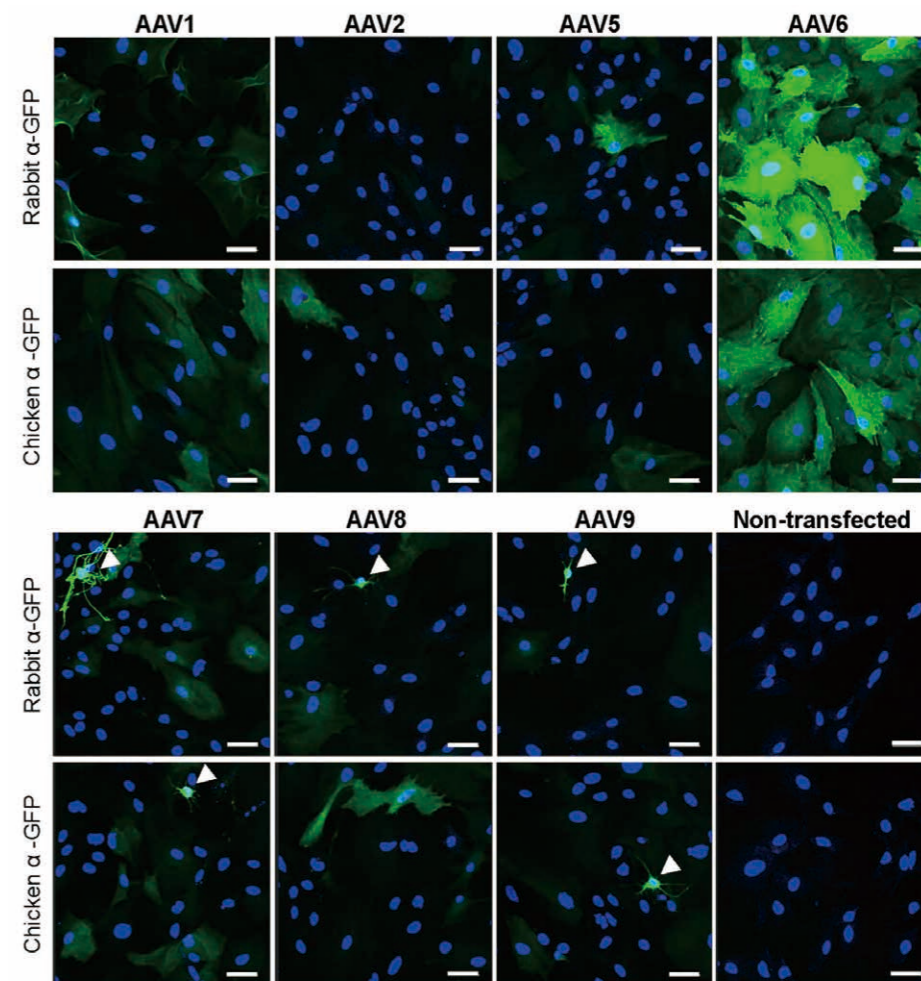
04-13



分子克隆 腺病毒 腺相关病毒 慢病毒 细胞系建立 筛选检测

注：部分为行业优秀案例分享，并未使用维真生物产品，在此仅供参考。

1. 不同血清型AAV感染大鼠原代星形胶质细胞



产品描述：7种 AAV 血清型筛选试剂盒 滴度： 1.0×10^{13} VG/mL 病毒量： 10^5 VG/cell
 所用细胞：大鼠原代星形胶质细胞 检测时间：感染 48h

Front Cell Neurosci. (IF=4.609). Alexandra L, et.al. (2016).



3 万余 病毒包装案例，品质保障

400-077-2566 / www.wzbio.com.cn / service@wzbio.cn

2. AAV6 体外感染胶质瘤细胞 T98G

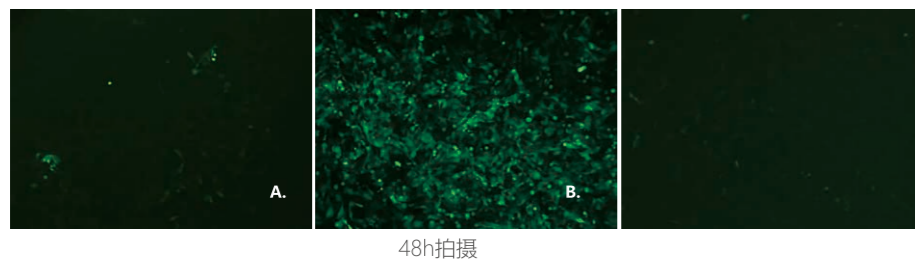
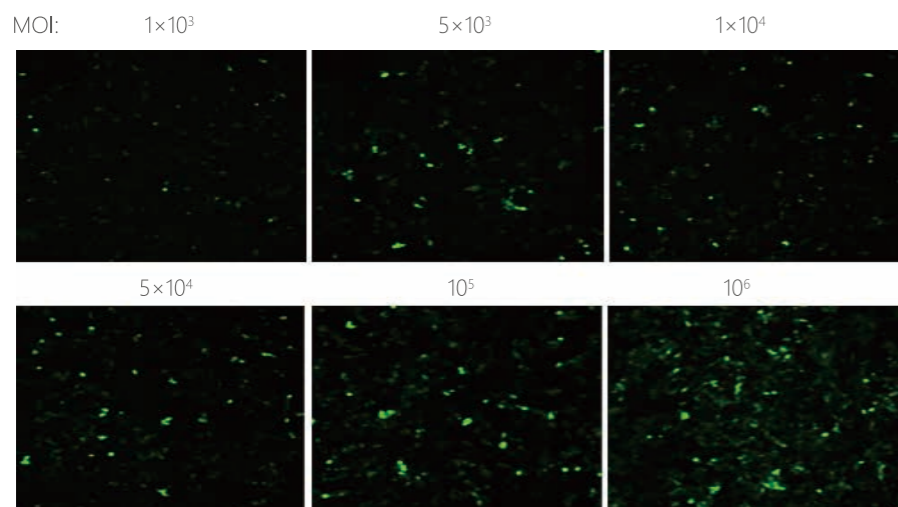


Figure	病毒产品	滴度	MOI	病毒量
A	慢病毒	1×10^8 TU/mL	0.33	1 μ L/孔
B	AAV6	1.19×10^{13} VG/mL	1.98×10^4	0.5 μ L/孔
C	AAV9	2×10^{13} VG/mL	3.33×10^4	0.5 μ L/孔

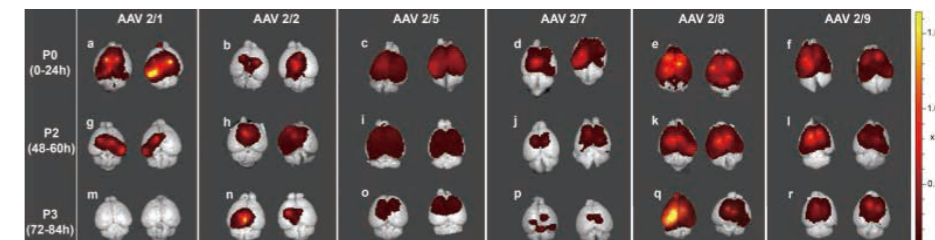
从对T98G胶质瘤细胞感染效率来看：AAV6 > AAV9 > 慢病毒
有感染T98G胶质瘤细胞的科研者可以选择AAV6哦！

3. AAV5 感染肺癌细胞



产品：AAV5-CMV-GFP
感染细胞：肺癌细胞 NCI-H460
滴度： 1.89×10^{13} VG/mL
检测时间：感染 72h

4. AAV 注射不同神经发育阶段的小鼠脑内

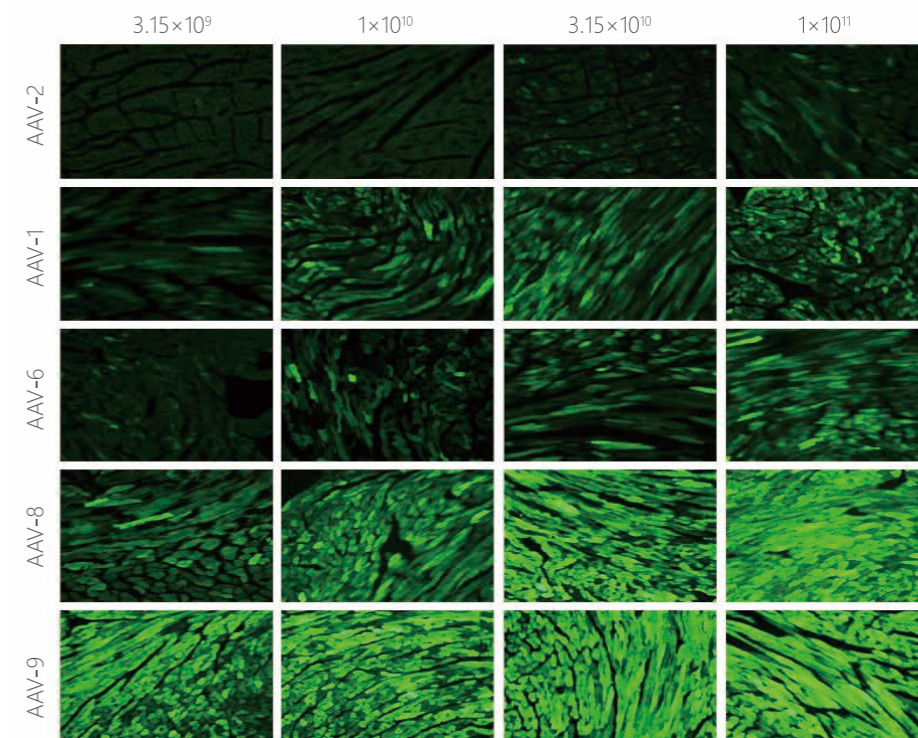


注射方法：脑室注射
病毒滴度： 10^{13} VG/mL
注射量： 2μ L (2×10^{10} VP)
检测方式：光谱荧光成像

Chakrabarty P. et al. PloS one, 2013, 8(6): e67680.

AAV2/8 和 AAV2/9 在感染脑部中的效果优于其他血清型。

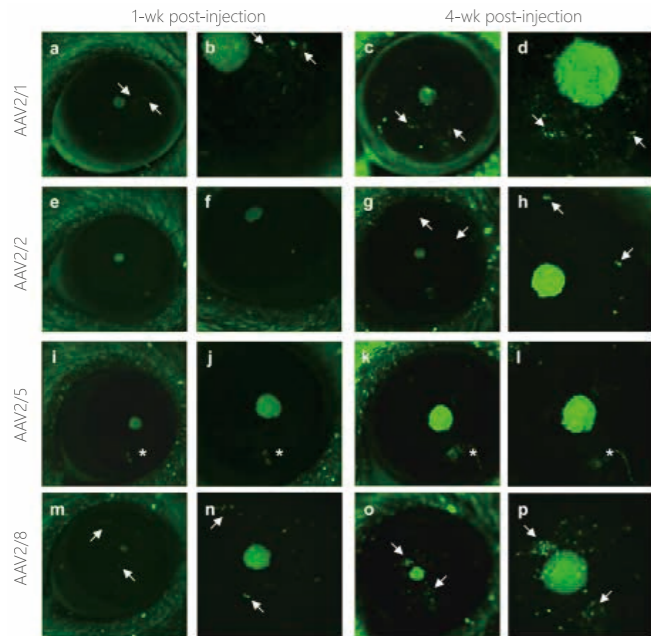
5. AAV 感染心脏心肌细胞



K-MR Prasad et al. Gene Therapy (2011) 18, 43-52.

AAV9型对心肌细胞的感染效率极高，AAV8次之。

6. 不同血清型 AAV 在小鼠角膜中的转导效率



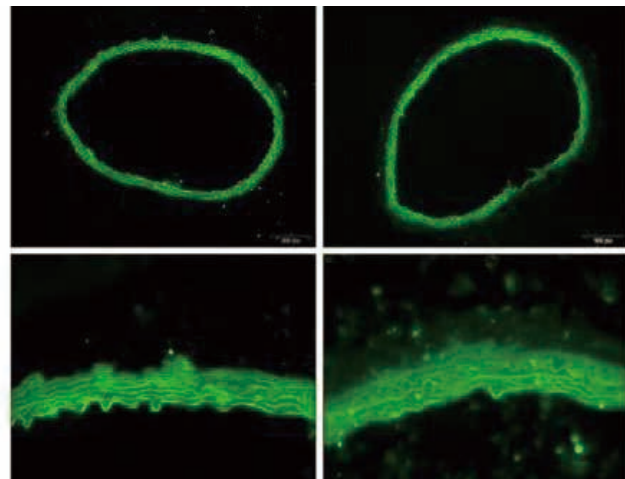
注射方式：
小鼠角膜基质注射

注射量：2 μ L

滴度：
AAV2/1- 5.3×10^{11} VG/mL;
AAV2/2- 1.9×10^{12} VG/mL;
AAV2/5- 8.8×10^{11} VG/mL;
AAV2/8- 1.56×10^{12} VG/mL

Claire Hippert, et al. PLoS One.
2012;7(4):e35318.

7. AAV2 感染腹主动脉血管



病毒名称：
pAAV2-CMV-GFP

滴度：
 1.18×10^{13} VG/mL

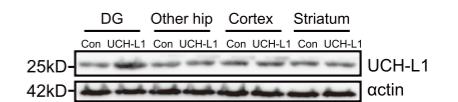
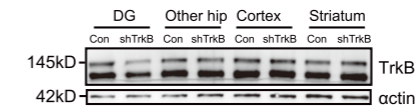
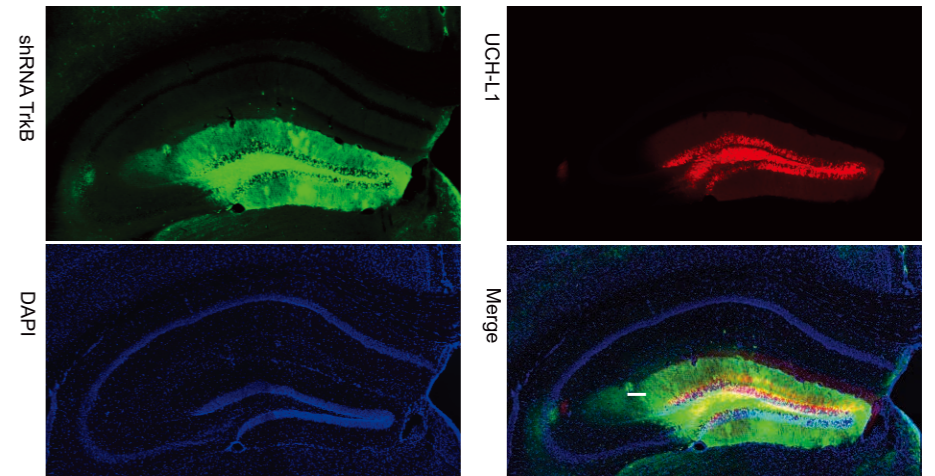
注射量：10 μ L

尾静脉注射，4周后取组织观察，腹主动脉血管感染效果好。



碘克沙醇纯化，毒性低，
更适合动物实验的病毒载体

8. AAV9注射小鼠海马齿状回



产品：AAV9-UCH-L1 and AAV9-shTrkB

注射量：0.5 μ L

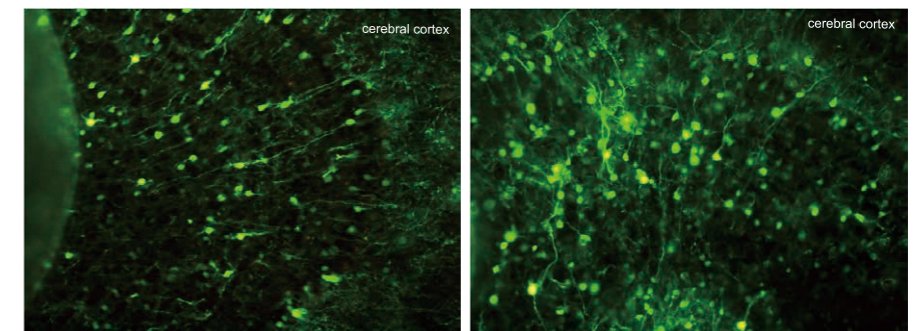
检测时间：注射后 10 天

J Neurosci. (IF=5.924). Guo YY, et.al. (2017).

种属：8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠

注射方式：脑定位注射 小鼠 DG 区

9. AAV9 在小鼠脑部的长效感染



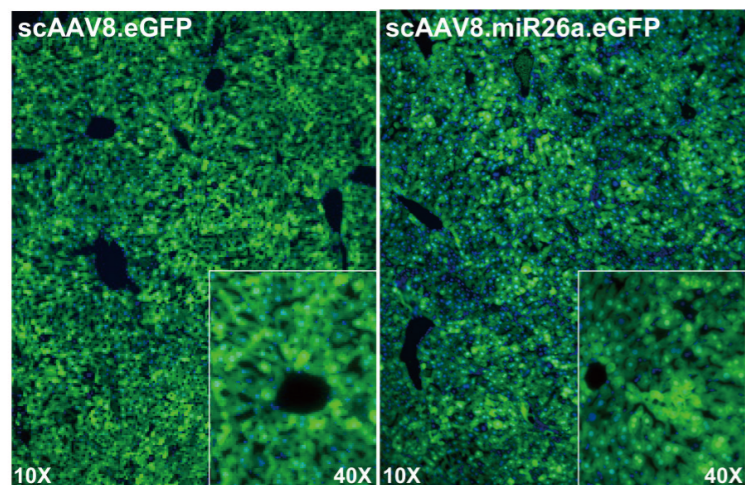
注射方式：侧脑室注射新生小鼠

注射剂量：2 μ L 5.1×10^{11} VG

检测时间：注射后一年

结论：AAV9可在脑内持续表达长达一年之久

10. AAV8 高效感染肝细胞

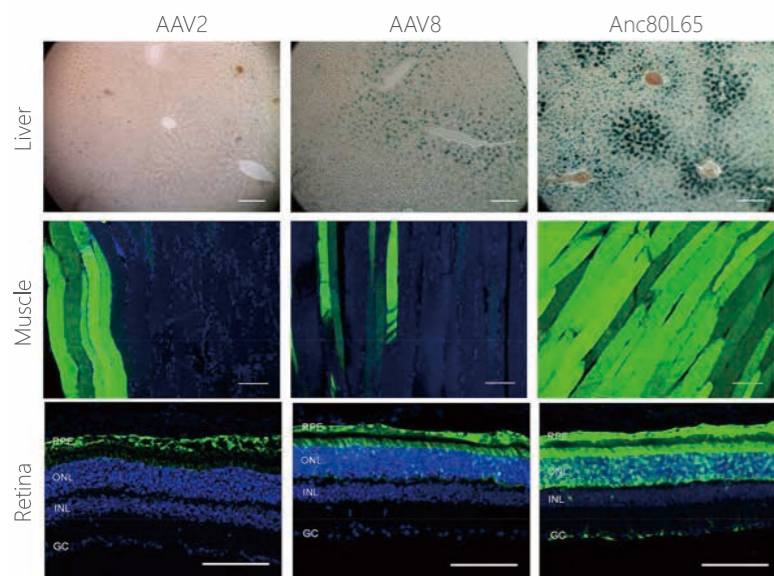


注射方法：尾部静脉注射 注射体积：200 μ L、 10^{12} VP

检测时间：注射后 21 天

Kota J. et al. Cell 2009 137(6) : 1005-17.

11. 不同 AAV 血清型感染小鼠多器官效果图



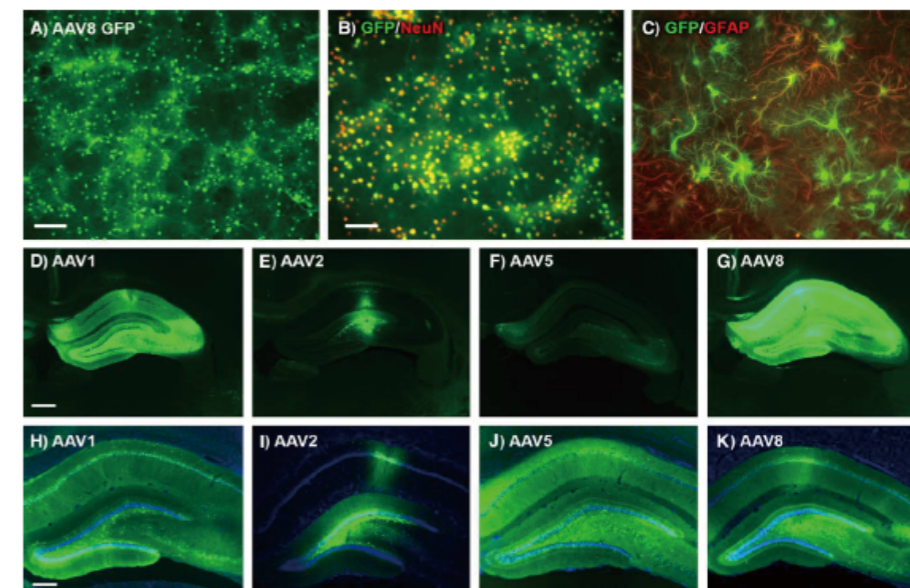
liver: 腹腔注射；注射量： 3.9×10^{10} VG

Muscle: 肌肉注射；注射量： 10^{10} VG

Retina: 视网膜下腔注射；注射量： 2×10^9 VG

Eric Zinn, et al. Cell Rep. 2015; 12(6): 1056-1068.

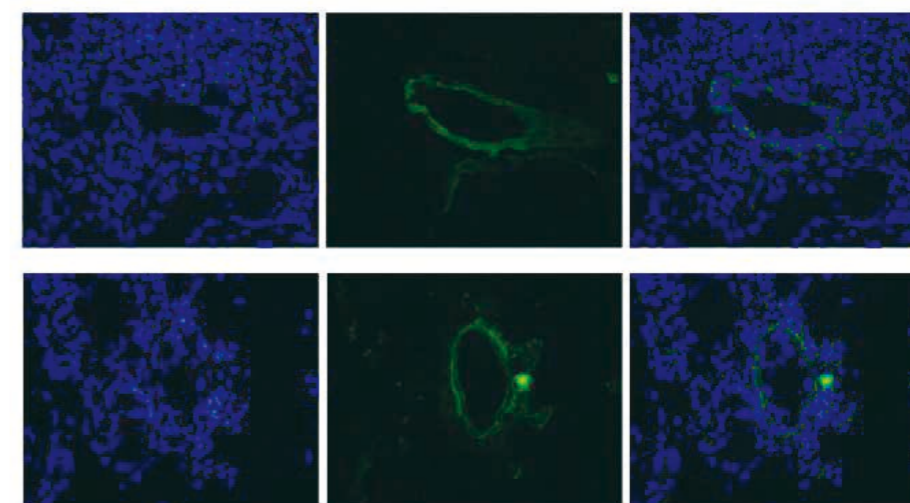
12. AAV 在大鼠脑海马回中的表达



注射剂量： 2×10^{10} VG/mL 检测时间：注射后 4 周

Ronald L. Klein, et al. MOLECULAR THERAPY, 2006, 3, 13(3).

13. AAV1 感染肺部血管



产品名称：AAV1-CMV-GFP

滴度： 1.0×10^{13} VG/mL

注射方式：支气管喷注

病毒用量： 1×10^9 VG

检测时间：3 周

Part - 4

腺相关病毒 运输&储存

为保证病毒活性，维真生物病毒产品均通过干冰快递运输，请于收到产品后，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，其余病毒请于液氮或 -80℃冰箱冻存。请避免反复冻融，否则会影响病毒滴度。在未反复冻融情况下，-80℃质保 6 个月，超出该储存时间则需重新进行质控鉴定。



品
质
保
障

成
就
客
户

Part - 5

安全操作规范 与免责声明

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 1% 次氯酸钠溶液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。
6. 实验完毕脱掉手套后，请立即用肥皂和水清洗双手。
7. 维真生物保证您收到的产品符合产品目录上的规格。
8. 维真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。
9. 维真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的、间接的、衍生的或偶然的损害所产生的后果负责。

Part - 6

腺相关病毒 常见问题解答

1. 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，因而基因重组产生野生型 AAV 的几率很低。

2. 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。

3. 哪些血清型的 AAV 可供选择？我该选用哪种 AAV 呢？

血清型	AAV在各组织器官细胞的亲和性
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，
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

目前维真生物为您提供的 AAV 血清型为 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 等。您可以选择我们的 AAV 血清型快速筛选试剂盒（含有 AAV1/2/5/6/7/8/9/PHPeB/rh10/Anc80/DJ 11 种血清型 Mix），只需一次感染实验即可筛选得到靶组织或细胞的理想 AAV 血清型，省时省力。

AAV血清型筛选试剂盒

除了常规的含11种血清型的AAV筛选试剂盒，维真生物还为您提供定制服务：可根据您的需要定制专属的AAV血清型筛选试剂盒。

可供选择的血清型有：

rAAV2/1	AAV2	rAAV2/5	rAAV2/6	rAAV2/7
rAAV2/8	rAAV2/9	rAAV2/rh10	rAAV2-retro	rAAV2/Anc80L65
AAV-DJ	AAV-DJ/8	AAV-PHPeB	AAV-PHPeB	AAV-7m8
AAV-shh10			

4. 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。

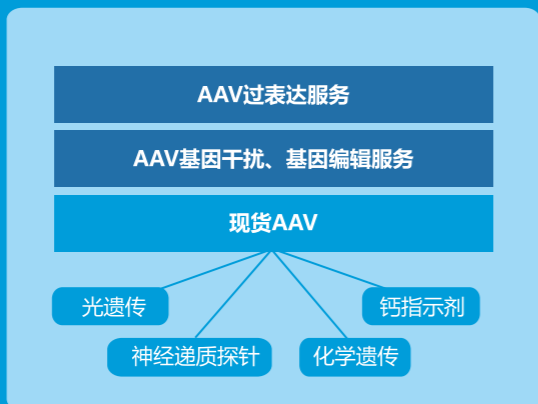
5. 订制 AAV 服务，客户需要提供哪些材料？客户收到的产品规格是怎样的？

- (1) 含有目的基因的质粒（包括测序结果），或基因名和 NM 号；
- (2) 选择哪种 AAV 血清型；
- (3) 交付结果（病毒量和病毒滴度）；
- (4) 订单要求，如对病毒载体的要求（启动子、标签和报告基因的要求）；对照病毒的要求等。

通常情况下，我们默认的 AAV 规格为：滴度 $\geq 1 \times 10^{13}$ vg/ml；体积 500 μ l。当然，我们也可根据客户的具体需求，提供特定规格的产品。

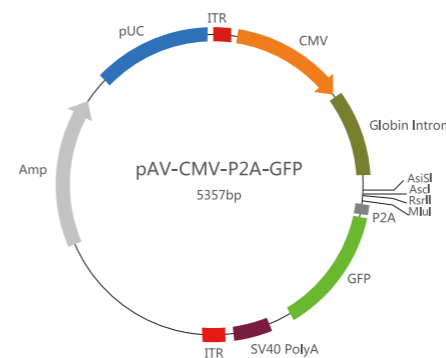
Part - 7 腺相关病毒 产品分类

维真生物可为客户提供定制AAV过表达服务，AAV基因干扰、基因编辑服务，此外更有大量现货AAV产品可供选择，涵盖光遗传、化学遗传、钙指示剂、神经递质探针等工具。



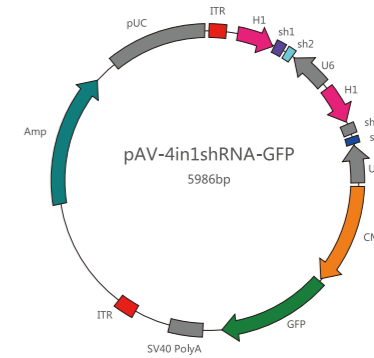
分子克隆 腺病毒 腺相关病毒 慢病毒 细胞系建立 筛选检测

定制服务



AAV- 过表达服务

- ☀ 可2周发货，质量保证
- ☀ 血清型AAV1/2/5/6/7/8/9/DJ/retro/php等



AAV-shRNA 服务

- ☀ 30余种组织特异性启动子
- ☀ 滴度高达 1.0×10^{13} VG/mL

启动子

ALB
GFAP104
CAG
CamKIIa
EF1A
CK1.3
CK0.4
GFAP
MBP
EFS
TbG
aMHC
cTNT
Synapsin
MeCP2
c-fos
ApoE/AAT1
UBC
PGK
SST
Rpe65
Insulin1
3Xenhancer Mck
NSE
MCK

元件

GFP
RFP
mCherry
Cre
LacZ
tTA
DIO-MCS
DIO-GFP
DIO-RFP
DIO-mCherry
DIO-LacZ
Luciferase

您要的载体

启动子+元件=您要的载体

示例:
启动子 ALB
+
元件 mCherry
=
AAV-ALB-mCherry

启动子 CAG
+
元件 DIO-LacZ
=
AAV-CAG-DIO-LacZ

400余种 **现货** 任意选，现在下单，2-3周发货，滴度达 1×10^{13} VG/mL 以上

维真生物AAV现货列表 (部分)

类别	载体	类别	载体
光遗传	AAV9 - CamKII-hChr2(H134R)-mCherry	神经递质探针	组胺探针
	AAV9 - CamKII-eNpHR3.0-EYFP		AAV9 - hsyn-HA1.0h (His1.0)
	AAV9 - CamKII-eArchT-EYFP		AAV9 - hsyn-HA1.0mut (His1.0mut)
	AAV9 - hSyn-eNpHR3.0-EYFP		AAV9 - hsyn-HA1.0m (His1.0M)
	AAV9 - hSyn-eArch3.0-EYFP		AAV9 - hsyn-DIO-HA1.0h
化学遗传	AAV9 - hM3D(Gq)-mcherry	AAV9 - hsyn-HA1.0h-mScarlet	AAV9 - hsyn-NE1m(NE2.1)
	AAV9 - hM4D(Gi)-mcherry	AAV9 - hSyn-NE1m(NE2.1)	AAV9 - hSyn-DIO-NE1m(NE2.1)
	AAV9 - hsyn-DIO-hM3D(Gq)-mcherry	AAV9 - hSyn-NEmut(NE2.1mut)	AAV9 - hSyn-NEmut(NE2.1mut)
	AAV9 - hsyn-DIO-hM4D(Gi)-mcherry	AAV9 - TRE-NE1m(NE2.1)	AAV9 - TRE-NE1m(NE2.1)
	AAV9 - EF1a-DIO- hM3D(Gq)-mcherry	AAV9 - hsyn-mRuby3-NE1m(NE2.1)	AAV9 - hsyn-mRuby3-NE1m(NE2.1)
Cre, Flp	AAV9 - GFAP-Cre	神经肽类	神经肽类
	AAV1 - hSyn-Cre	血管活性肠肽探针	AAV9 - hsyn-VIP1.0
	AAV9 - gfaABC1D-Cre	AAV9 - hsyn-VIP1.0	AAV9 - hsyn-DIO-VIP1.0
	AAV6 - CD68-Cre-P2A-GFP	神经肽 Y 探针	AAV9 - hsyn-NPY1.0
	AAV2 retro - hSyn-Cre-P2A-GFP	AAV9 - EF1a-DIO-NPY1.0	AAV9 - EF1a-DIO-NPY1.0
钙成像	AAV9 - EF1a-DIO-GCaMP6s-P2A-nls-dTomato	神经降压肽探针	AAV9 - hsyn-NTS1.0
	AAV9 - EF1a-DIO-GCaMP6m-P2A-nls-dTomato	胆囊收缩素	AAV9 - hsyn-CCK2.0
	AAV9 - EF1a-DIO-jGCaMP7b-P2A-nls-dTomato	AAV1 - hsyn-CCK2.0	AAV9 - hsyn-CCK2.0
	AAV9 - EF1a-DIO-jGCaMP7c-P2A-nls-dTomato	AAV9 - hsyn-DIO-CCK2.0	AAV9 - hsyn-DIO-CCK2.0
	AAV9 - EF1a-DIO-jGCaMP7s-P2A-nls-dTomato	促肾上腺皮质激素释放激素探针	AAV9 - hSyn-CRF3.0
胆碱类	乙酰胆碱探针	AAV9 - hSyn-CRF3.0	AAV9 - EFS-DIO-CRF3.0
	AAV9 - hSyn-GACh2.0	AAV9 - EFS-DIO-CRF3.0	AAV9 - CaMKII-CRF3.0
	AAV9 - TRE-GACh2.0	AAV9 - hSyn-CRFmut	AAV9 - hSyn-CRFmut
	AAV9 - hSyn-ACh3.0(ACh4.3)	AAV9 - EFS-DIO-CRFmut	AAV9 - EFS-DIO-CRFmut
	AAV9 - CaMKII-ACh3.0(ACh4.3)	精氨酸血管加压素探针	AAV9 - hsyn-AVP2.0
嘌呤类	腺苷探针	AAV9 - hsyn-AVP2.0	AAV9 - hSyn-OXT1.0
	AAV9 - hsyn-Ado1.0(B10)	AAV9 - hsyn-OXT1.0	AAV9 - EFS-DIO-OXT1.0
	AAV DJ - hsyn-Ado1.0(B10)	AAV9 - hSyn-OXTmut	AAV9 - hSyn-OXTmut
	AAV9 - EFS-DIO-Ado1.0	AAV9 - EFS-DIO-OXTmut	AAV9 - EFS-DIO-OXTmut
	AAV9 - GfaABC1D-Ado1.0	生长激素抑制素探针	AAV9 - hsyn-SST2.0
神经递质探针	AAV9 - hsyn-Ado1.0mut(B10-F168A)	AAV9 - hsyn-SST2.0	AAV9 - hsyn-eCB2.0
	腺苷三磷酸探针	AAV9 - hSyn-OXT1.0	AAV9 - hsyn-DIO-eCB2.0
	AAV9 - hsyn-ATP1.0(B09)	AAV9 - EFS-DIO-OXT1.0	AAV9 - hsyn-eCB2.0mut
	AAV DJ - hsyn-ATP1.0	AAV9 - hSyn-OXTmut	AAV9 - hsyn-DIO-eCB2.0mut
	AAV9 - EFS-DIO-ATP1.0	AAV9 - EFS-DIO-OXTmut	AAV9 - GfaABC1D-eCB2.0
单胺类	多巴胺探针	其他	大麻素 AEA 探针
	AAV9 - hSyn-DA1h(DA4.2)	AAV9 - hsyn-AEA1.0	AAV9 - hsyn-AEA1.0
	AAV9 - hSyn-DIO-DA1h(DA4.2)	内源性大麻素 eCB 探针	AAV9 - hsyn-eCB2.0
	AAV9 - hSyn-DA1hmut(DA4.2mut)	AAV9 - hsyn-eCB2.0	AAV9 - hsyn-DIO-eCB2.0
	AAV9 - TRE-DA1hmut(DA4.2mut)	AAV9 - hsyn-eCB2.0mut	AAV9 - hsyn-DIO-eCB2.0mut
五羟色胺探针	AAV9 - CaMKII-DA1h(DA4.2)	AAV9 - GfaABC1D-eCB2.0	AAV9 - hsyn-5HT2.1(renamed as 5-HT1.0)
	褪黑素探针	AAV9 - hsyn-MT2.0	AAV9 - hsyn-DIO-5HT2.1(renamed as 5-HT1.0)
	AAV9 - hsyn-r5HT1.0	AAV9 - hsyn-MT2.0	AAV9 - hsyn-DIO-5HT2.1(renamed as 5-HT1.0)
	AAV9 - CAG-r5HT1.0	AAV9 - hsyn-MT2.0	AAV9 - hsyn-DIO-5HT2.1(renamed as 5-HT1.0)
	AAV9 - hsyn-r5HT2.0	AAV9 - hsyn-MT2.0	AAV9 - hsyn-DIO-5HT2.1(renamed as 5-HT1.0)

维真启动子列表(部分):

组织	启动子名称	启动子大小	启动子来源	启动子应用
神经	hSyn	471bp	人源	神经元特异性启动子
	CamKIIa	1.2kb	小鼠	大脑新皮质和海马兴奋性神经元特异性启动子
	c-fos	1.7kb	小鼠	兴奋性神经元启动子
	Mecp2	230bp	小鼠	短的神经元特异性启动子
	NSE	1.3kb	小鼠	神经元特异性启动子
	Somatostat(SST)	1.2kb	人源	gamma 氨基丁酸能抑制性神经元 SST 亚型特异性启动子
	TH	2.5kb	大鼠	多巴胺能神经元特异性启动子
	GFAP	2.0kb	人源	星形胶质细胞特异性启动子
	GFAP104	845bp	人源	星形胶质细胞特异性启动子
	GfaABC1D(truncated GFAP)	681bp	人源	星形胶质细胞特异性启动子
肝脏	ALB	2.4kb	小鼠	肝脏特异性启动子
	TBG	460bp	人源	肝脏特异性启动子
	ApoEHCR-hAAT	1.3kb	人源	肝脏特异性启动子
心脏	aMHC	0.4kb	小鼠	心脏特异性启动子
	cTNT+intron	0.7kb	鸡	心肌特异性启动子
眼睛	Rep65	0.7kb	小鼠	视网膜色素上皮细胞特异性启动子
	VMD2 promoter	0.65bp	人源	视网膜色素上皮细胞特异性启动子
胰腺	Insulin	0.85kb	小鼠	胰腺β细胞特异性启动子
	PDX1	2.7kb	小鼠	胰腺β细胞特异性启动子
血管	SM22a	0.45kb	小鼠	血管平滑肌特异性启动子
	ICAM2	0.15kb	人源	血管内皮特异性启动子
	CD68	0.7kb	人源	单核巨噬细胞特异性启动子
	F4/80	1.2kb	小鼠	巨噬细胞特异性启动子
肌肉	MCK	1.3kb	小鼠	肌肉细胞特异性启动子
	3×enhancer Mck	728bp	小鼠	肌肉细胞特异性启动子
肾脏	NPHS1	1.2kb	小鼠	肾脏特异性启动子

Part - 8

腺相关病毒 专题讨论

- 1、为什么 AAV 包装总失败？
- 2、需不需要添加荧光标签？
- 3、如何选择注射方式？
- 4、为什么 AAV 感染后检测不到表达？

.....



专题讨论

一、选用 AAV 病毒需考虑的几个因素

- 1、AAV 需对靶组织和细胞有较高的转导效率；
- 2、外源基因长度不能太大，须在 rAAV 的包装容量以内；
- 3、要根据组织类型选择特异性的血清型和启动子；
- 4、根据实验要求，选择合适的示踪及基因表达调控工具；
- 5、根据实验对象、实验要求，选用正确的注射方式和理想的 AAV 剂量等；

二、氯化铯 (CsCl) 密度梯度离心与碘克沙醇密度梯度离心的区别

- 1、CsCl 是最早用于分离纯化 AAV 的方法；这种方法可获得极高纯度的病毒，但是 CsCl 有毒，需要通过透析或正切向流过滤除去，且 AAV 在 CsCl 中的活性随着时间的延长而降低，周期长；
- 2、碘克沙醇密度梯度离心能保持 AAV 的高活性，并在一定程度上抑制载体颗粒物的聚集。AAV 的总回收率、纯度与 CsCl 相比显著升高。

三、AAV 注射方式的选择

AAV 基因药物的给药途径对基因的表达和治疗有着很大的关联和影响。

按注射部位，可分为全身给药、局部给药和口服给药。

- 1、全身给药主要分为静脉注射和动脉注射；静脉注射又分为尾静脉注射和门静脉注射等；
- 2、局部给药主要分为肌内注射、肿瘤内注射、脑部注射、玻璃体注射、鼻腔吸入等；
- 3、口服给药，在消化道局部性疾病动物模型中已取得成功，在全身性疾病（糖尿病、贫血等）的基因治疗研究同样取得了显著的疗效。然而口服 AAV 基因药物在基因治疗中仍然面临药物传输上的挑战，如胃肠道中的 DNA 酶的降解作用、体内体液屏障等。

四、AAV 病毒包装失败的原因

- 1、外源基因长短：是否超出 AAV 包装容量 (ITR 之间超出 4.7kb)；
- 2、ITR 是否完整：SmaI 酶切是否有正确的条带；
- 3、DNA 制备时用的感受态细胞是否限制 DNA 重组；

五、AAV 体外感染的理想 MOI 是多少

AAV 一般多用于体内实验，较少用于体外实验，根据文献及客户反馈，维真为您推荐的 AAV 体外感染细胞的 MOI 值为 10^4 - 10^7 。建议根据细胞种类摸索理想病毒用量。

六、AAV 体内注射时，用量是否越多越好

不是的。不同种属、不同注射部位和注射方式等所需的 AAV 病毒量都是不同的。总的来说，动物全身注射量应当小于 10^{12} VG/KG。

七、是否应该添加荧光标签

建议根据具体实验要求确定。如果后期需要观察感染效率及蛋白定位，则须添加合适的荧光标签；如果后续没有类似需求，可以选择不添加。一方面，添加荧光标签增大了 ITR 之间的序列，限制了外源基因插入的长度，另一方面，可能降低包装的效率和表达效率。

八、病毒感染细胞 / 注射动物后检测不到表达或者表达效果不好的原因

- 1、首先，排除病毒包装制备本身的问题（如外源基因是否正确、滴度是否合格等）；
 - 2、其次，血清型、启动子、病毒注射方式和注射量等都是影响病毒感染效果的重要因素；
 - 3、最后，排除检测方式的问题，建议采用多种检测方式对病毒感染和基因表达进行检测；
-

维真生物 产品与服务

PRODUCTS & SERVICES



分子克隆



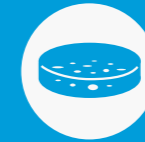
腺病毒



腺相关病毒



慢病毒



细胞系建立



筛选检测

