

基因导入实验操作手册

目录

◆基因导入实验开始前，请了解以下内容

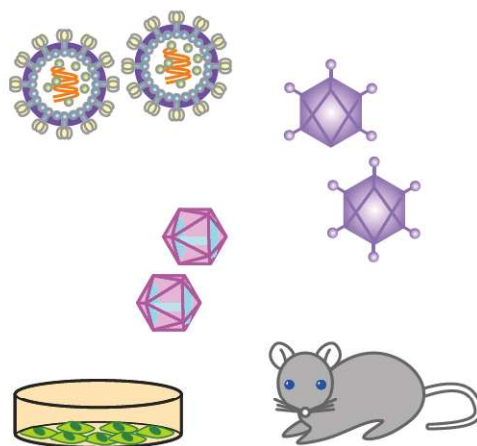
- 基因导入方法及其特点
- 主要基因导入方法的原理
- 主要病毒载体特征
- 病毒载体选择指南

◆转染·电穿孔

◆病毒载体

- 慢病毒载体
- 腺相关病毒载体
- 逆转录病毒载体
- 腺病毒载体

◆关联产品



基因导入实验开始前

基因导入是研究细胞和活体内基因及基因产物功能不可或缺的一项技术。

根据本操作手册，想要开展基因导入实验的科研工作者们，都可以根据自己的实验目的选择到合适的基因导入方法，这样可以更有效地开展实验。我们以易于理解的方式总结了必要的知识要点，所以这本操作手册可作为基因导入实验指南来使用。

基因导入实验目的和研讨要点

- **基因功能分析**…过表达和表达调控功能分析，表达抑制（RNAi）功能分析，表达调控区域分析
- **蛋白质表达**…表达突变蛋白质进行病理分析，表达正常蛋白质进行功能修复，大量生产重组蛋白质

获取目的基因	构建表达载体	选择解析方法	选择靶标	选择导入方法
<ul style="list-style-type: none"> · 选择启动子和筛选标记 · 克隆目的基因 · 制备突变体 	<ul style="list-style-type: none"> · siRNA设计 等 	<ul style="list-style-type: none"> · 确定mRNA表达量 · 确定蛋白质表达量 	<ul style="list-style-type: none"> · 株化细胞/原代细胞 · 培养组织切片/动物个体 	<ul style="list-style-type: none"> · 化学方法 · 物理方法 · 生物学方法

基因导入方法及其特点

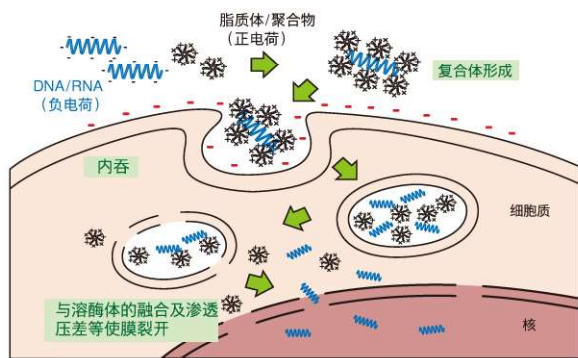
基因导入方法大致可分为3类（化学、物理、生物学导入方法），根据实验目的选择合适的导入方法。

分类	方法	靶标	优势	劣势
化学方法	转染 * 阳离子聚合物 * 阳离子脂质体 * 磷酸钙	培养细胞	<ul style="list-style-type: none"> · 效率相对较高 · 简便 · 没有导入大小限制 · 产品丰富 	<ul style="list-style-type: none"> · 化学毒性 · 细胞类型和状态会影响转导效率 · 很难选择性导入特定细胞
物理方法	电穿孔 显微注射 声致穿孔 激光照射	培养细胞	<ul style="list-style-type: none"> · 原理简单 · 可导入到正确位置 · 不需要载体 · 没有导入大小限制 	<ul style="list-style-type: none"> · 需要特殊的器具及装置 · 核酸易受损伤 · 需要经验
生物学方法	病毒载体	培养细胞 动物个体	<ul style="list-style-type: none"> · 效率高 · 相对简单 	<ul style="list-style-type: none"> · 有污染风险 · 插入变异 · 免疫失活

主要基因导入方法的原理

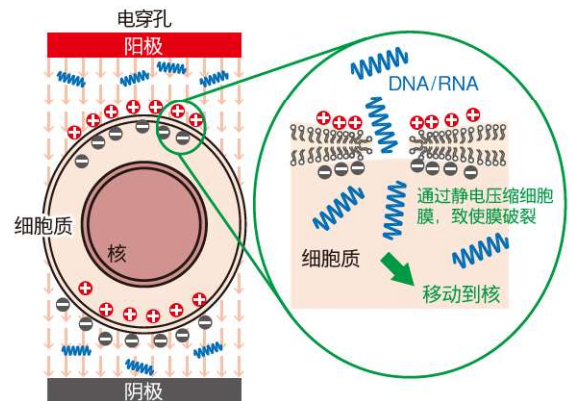
通过转染方法导入基因

由于核酸（DNA或RNA）带有负电荷，因此可以与带有正电荷的物质（脂质体和聚合物）结合形成复合体。当该复合体靠近带有负电荷的细胞表面时，通过内吞作用进入细胞。



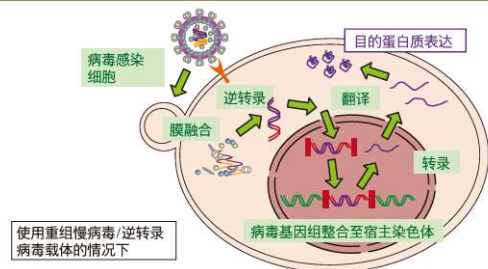
通过电穿孔方法导入基因

将核酸和细胞悬液置于阳极和阴极间，通过施加电脉冲在细胞膜上形成小孔，使细胞外的核酸可以通过小孔进入到细胞内。



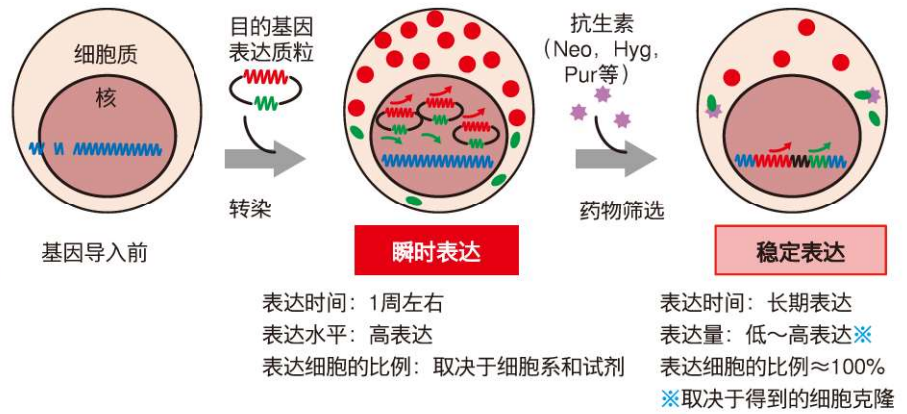
使用病毒载体导入基因

当细胞膜表面存在与病毒粒子表面蛋白质相结合的受体时，该细胞就会被病毒感染，病毒粒子内的核酸就可以被转移至细胞内。作为基因导入的病毒载体，通常使用的有逆转录病毒、慢病毒、腺相关病毒（AAV）和腺病毒。各病毒载体的特征，以及不同实验目的如何选择合适的病毒载体，请参见第2页选择指南。



关于瞬时表达和稳定表达

将表达目的基因的质粒导入至细胞后，会瞬时性表达大量蛋白质（瞬时表达），但随着细胞分裂蛋白质表达量会随之降低。由于一部分表达质粒会整合到细胞基因组中，因此可通过在质粒中预先插入抗性基因，确定瞬时表达后再进行药物筛选，从而能够筛选获得持续表达目的蛋白质（稳定表达）的细胞。

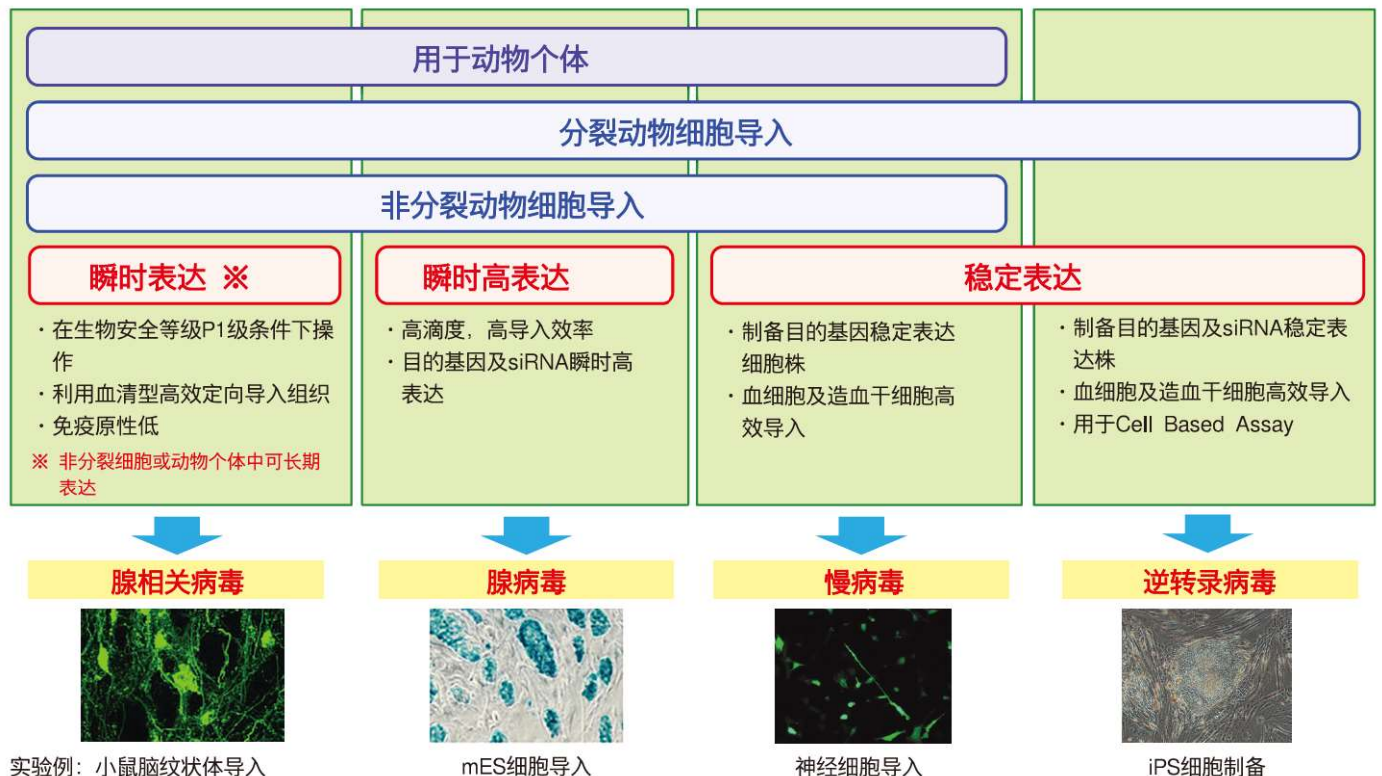


主要病毒载体特征

		重组腺相关病毒 (AAV)	重组腺病毒	重组慢病毒/ 重组逆转录病毒
分类 (Family)		小DNA病毒科	腺病毒科	逆转录病毒
病毒基因组	结构	ssDNA	dsDNA	ssRNA
	大小	约5 kb	约36 kb	8-9 kb
壳外层 (包膜)		-	-	+
病毒粒子直径		18-26 nm	70-90 nm	80-130 nm
基因组整合至宿主染色体		-	-	+
被感染细胞中目的基因的表达		可持续表达 (非分裂细胞)	瞬时表达	持续表达
实验时应该执行的生物安全等级		P1	P2	P2

病毒载体选择指南

请根据基因导入的目标（培养细胞、动物个体）和基因表达方式（瞬时，稳定），结合实验目的选择合适的病毒载体。



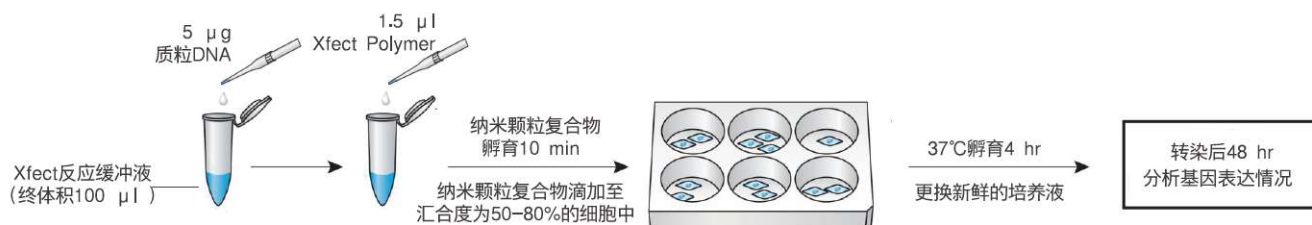
转染

使用化学方法通过转染的方式，将核酸导入至哺乳动物细胞是非常简单的基因导入方法。Xfect™转染试剂和CalPhos™磷酸钙转染试剂是高效转染、适用广普的转染试剂。

■ Xfect™转染试剂

Xfect™转染试剂细胞毒性低，可实现高效的基因导入。除下面列表产品外，Xfect™系列还可以提供更多类型的转染试剂，包括蛋白质转染试剂、RNA转染试剂、小鼠胚胎干细胞（mESC）转染试剂等，详情请登录Takara官网查询。

Xfect操作方法概要



用途	产品名称	包装量	Code No.
高效率·低毒性转染试剂，适用于广泛哺乳动物细胞	Xfect™ Transfection Reagent	50 次反应 × 2	631317
		100 次反应 × 3	631318

Xfect™转染试剂操作流程

★ 使用6孔板时（显示每个培养孔的用量）

由于不同的细胞培养板上每个培养孔的表面积是不同的，因此每孔中所添加的由转染试剂和质粒DNA所形成的复合物的量也是不同的。此外，不同的靶细胞类型，合适的转染试剂和质粒DNA的混合比例也是不同的。请以第5页的推荐用量作为初始条件研讨合适的转染条件。

A. 准备细胞

- 贴壁细胞：转染前一天，将靶细胞接种于1 ml完全培养基（含血清）中，转染时细胞汇合度为60-75%。
- 悬浮细胞：准备转染复合物前，接种 5×10^5 - 1.25×10^6 个细胞于1 ml完全培养基中。

B. 转染复合物形成（转染开始前准备）

- (1) 将Xfect Polymer放置至室温，使用前轻柔涡旋振荡混匀。
- (2) 在微量离心管中，使用Xfect Reaction Buffer稀释5 μg质粒DNA至终体积100 μl，高速涡旋振荡5秒充分混匀。
- (3) 添加1.5 μl Xfect Polymer至稀释后的质粒DNA中，高速涡旋振荡10秒充分混匀。
- (4) 室温孵育10分钟，形成纳米颗粒复合物。
- (5) 离心1秒将溶液收集至离心管底部。

C. 转染

- (1) 将100 μl纳米颗粒复合物溶液全部滴加到细胞培养基中，前后左右轻轻摇动培养板使复合物均匀分布。
- (2) 37°C孵育4小时-过夜。
- (3) 移除纳米颗粒复合物，更换为2 ml新鲜完全培养基，继续37°C孵育培养直至分析。通常在转染后48小时达到表达高峰。

★ 不同规格培养体系推荐用量详见第5页。

! 要点:

转染时靶细胞的总体健康状况是转染效率的关键因素。建议质粒转染时细胞汇合度为60-75%，这时细胞活性较高，转染试剂所带来的毒性风险也较低。但为了达到更高的转染效率，对于不同的细胞类型有必要研讨合适的细胞数。

培养细胞的质量会随着重复传代而降低，因此有必要保持低的细胞代数。新解冻的细胞需要传代至少两次，并在转染前根据用户手册进行铺板。

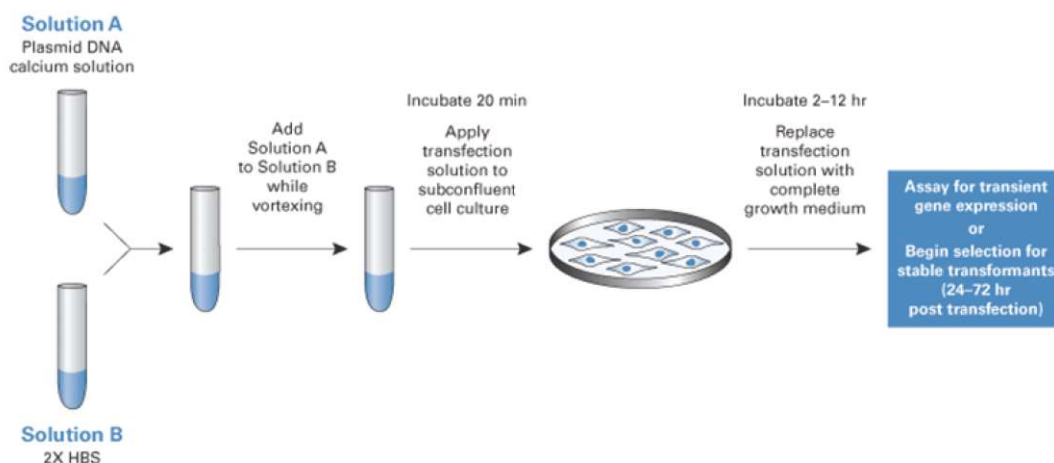
! 参考:

Xfect转染操作，可以在含有血清的完全培养基中进行，通常情况下不需要更换为无血清培养基。

■ CalPhos™磷酸钙转染试剂

CalPhos™磷酸钙转染试剂可以提供高度一致的pH值和盐浓度，实现高度一致的转染效率，这是home brew版本很难做到的。

CalPhos™磷酸钙转染试剂操作方法概要



用途	产品名称	包装量	Code No.
高效转染质粒DNA，提供高度一致的pH值和盐浓度	CalPhos™ Mammalian Transfection Kit	700 Rxns	631312

CalPhos™磷酸钙转染试剂操作流程

★ 使用6孔板时（显示每个培养孔的用量）

以下操作方案针对培养在6孔板中的贴壁细胞。如果使用其它不同大小的培养皿、培养板或者培养瓶，需要根据培养量相应调整转染试剂的用量。整个操作过程的所有步骤需在无菌操作台中进行。

A. 准备细胞

- 转染实验前一天接种细胞，转染当天细胞汇合度应达到50-80%。一般情况下，对于6孔板，我们接种 $2-4 \times 10^5$ 个细胞/孔。

B. 转染复合物形成（转染开始前准备）

- (1) 每次转染，在单独的无菌管中准备溶液A和溶液B。

Solution A: 按以下顺序添加各组分

___ μ l (1-3 μ g) 质粒DNA

___ μ l 灭菌水

12.4 μ l 2 M钙溶液

100 μ l 总体积

Solution B: 100 μ l 2X HBS

- (2) 向溶液A滴加溶液B，同时小心并且缓慢地涡旋溶液A。
- (3) 在室温下孵育转染混合液5-15 min。

! 要点:

为了降低相同质粒DNA转染多个培养板时可能产生的差异性，请先制备足够所有培养板使用的溶液A和B的母液。

C. 转染

- (1) 轻柔涡旋转染混合液，然后将混合液滴加至培养液中。（6孔板每孔添加200 μ l转染混合液）
- (2) 轻柔地来回移动培养板，使转染混合液均匀分布。（不要旋转培养板以免将转染复合物集中在孔或板的中心。）
- (3) 将培养板放置于CO₂培养箱中37°C培养8 hr-过夜。
- (4) 去除含有磷酸钙的培养基，使用新鲜的培养液或1X PBS洗涤细胞。
- (5) 添加2 ml新鲜完全生长培养基，在37°C继续孵育培养，直至分析实验前。

★ 不同规格培养体系推荐用量详见第5页。

★ Xfect转染试剂 (Code No. 631317/631318) 推荐用量

培养板/皿	培养面积/well	完全培养基 (含血清) 量/well	DNA	稀释终体积 (in Xfect Reaction Buffer)	Xfect Polymer 体积
24 well plate	2 cm ²	250 μl	0.5–1 μg	25 μl	每1 μg 质粒DNA 对应0.3 μl Xfect Polymer
12 well plate	4 cm ²	500 μl	1–2.5 μg	50 μl	
6 well plate	10 cm ²	1 ml	2.5–2.5 μg	100 μl	
10 cm dish	60 cm ²	10 ml	10 ml	600 μl	

★ CalPhos™磷酸钙转染试剂 (Code No. 631312) 推荐用量

Plate/Flask	Solution A			Solution B	
	Plasmid DNA	Calcium Solution	Sterile H ₂ O	2X HBS	Culture Volume
96-well	30–100 ng	0.5 μl	to 4 μl total	4 μl	200 μl
24-well	200–600 ng	3.1 μl	to 25 μl total	25 μl	500 μl
12-well	0.4–1.2 μg	6.2 μl	to 50 μl total	50 μl	1 ml
6-well	1–3 μg	12.4 μl	to 100 μl total	100 μl	2 ml
35 mm	1–3 μg	12.4 μl	to 100 μl total	100 μl	2 ml
60 mm	2.5–7.5 μg	32 μl	to 260 μl total	260 μl	5 ml
10 cm	6–18 μg	87 μl	to 700 μl total	700 μl	10 ml
T25 flask	3–9 μg	37 μl	to 300 μl total	300 μl	5 ml
T75 flask	8–24 μg	112 μl	to 900 μl total	900 μl	12 ml



常见问题

【Q1】DNA纯度对目标细胞基因导入效率是否有影响？

【A1】当DNA纯度较低时（DNA部分降解，亦或是混入了抑制剂或者内毒素等），转染效率可能会降低，建议使用高纯度DNA (OD_{260/280}>1.8)。使用TaKaRa MidibEST Endo-free Plasmid Purification Kit (Code No. 9783) 可以非常方便地提取各种无内毒素质粒。

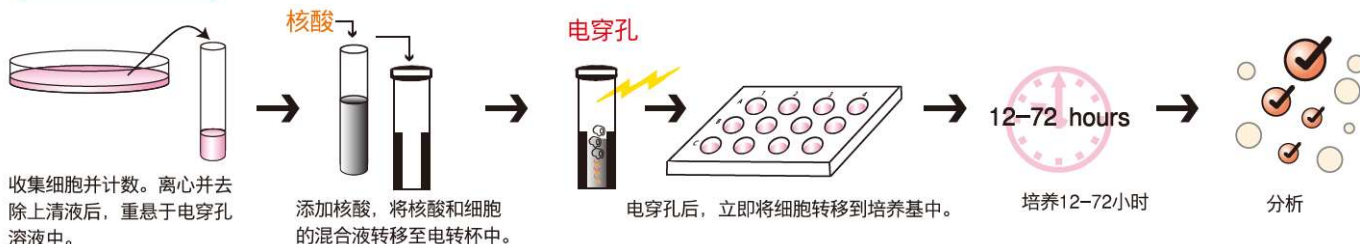
【Q2】转染时，培养基中是否可以含有抗生素？

【A2】卡那霉素等阳性的抗性物质，有可能会干扰转染复合物的形成，因此建议在复合物形成的过程中去除抗生素。培养基中含有10 units/ml的青霉素及链霉素是没有问题的。

电穿孔

对于使用化学转染法核酸导入困难的哺乳动物细胞、干细胞、原代细胞等，可以使用物理电穿孔导入方法，能够获得较高的核酸导入效率。

操作方法概要

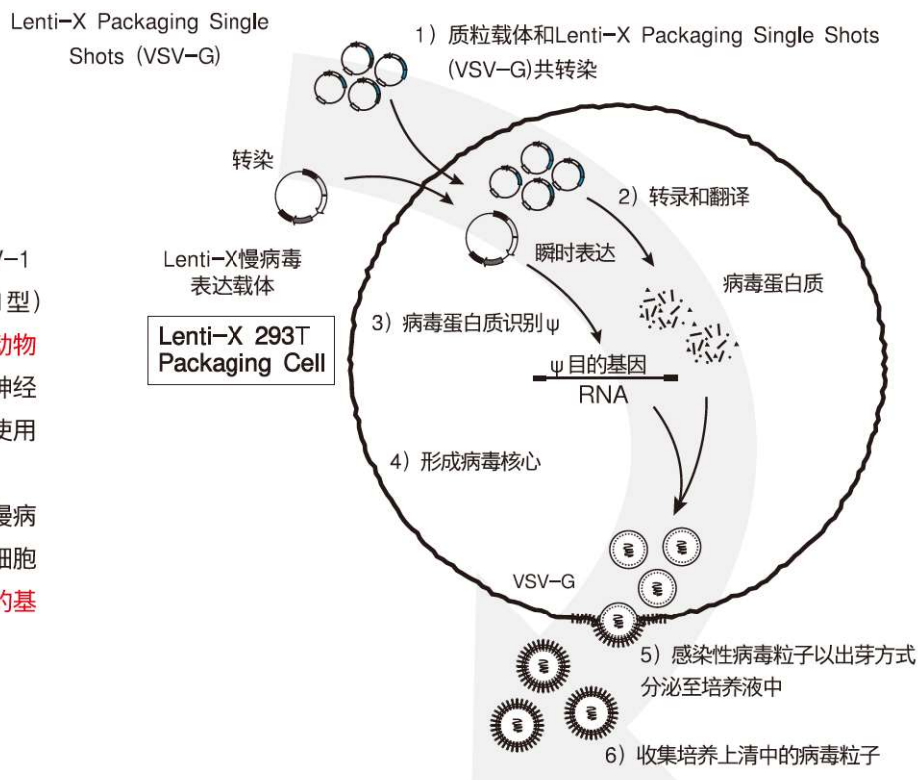


★ 重组慢病毒载体的特征及使用注意事项



目前使用的重组慢病毒，一般是以HIV-1 (Human immunodeficiency virus 1型) 为基础开发的，**可用于绝大多数哺乳动物细胞基因导入**，包含如造血干细胞及神经细胞等在内的非分裂细胞，而这些是使用逆转录病毒难以实现的。

另外，和逆转录病毒一样，使用重组慢病毒导入的目的基因也可以整合到宿主细胞的基因组中，因此也**可实现长期稳定的基因表达**。



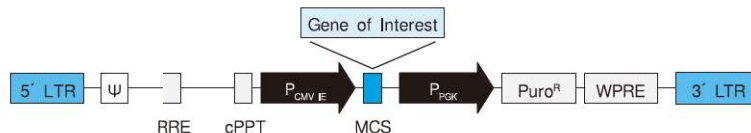
操作方法概要

1. 目的基因克隆

将目的基因克隆至慢病毒载体。我们为许多应用提供多种高度优化的慢病毒载体，这些慢病毒载体是所有Lenti-X基因传递系统的关键参与者，可用于大部分哺乳动物细胞类型，包括分裂和非分裂细胞，原代细胞培养物，干细胞和神经元。我们所有的pLVX慢病毒载体都含有HIV-1 LTR和慢病毒包装信号(Ψ)，也包含了改善转基因表达、病毒滴度和整体慢病毒载体功能的特定元件(cPPT/CTS, RRE, WPRE)。

野生型慢病毒基因组约为9.7 kb (包含两个LTR)。人工创建大于此长度的基因组，将导致产生不稳定的病毒颗粒和病毒滴度明显下降。对于重组慢病毒来说，大部分病毒基因组已经被其他有用的序列所取代，如筛选标记或荧光蛋白质，但仍有足够的空间克隆转基因。由于每个pLVX载体含有的有用序列不同，因此克隆转基因的可用空间也有所不同。要确定可克隆的最大转基因大小，请参考pLVX载体图谱，确定3'LTR末端的位置(5'LTR的末端始终位于1)，然后以9.7 kb减去它。例如：pLVX-Puro的3'LTR末端位置为5.4 kb，因此还有~4.3 kb的空间可以克隆。

Lenti-X慢病毒表达载体结构



- cPPT/CTS : cPPT和CTS能够促进靶细胞感染过程中病毒基因组向核内的运输，提高载体整合和基因导入效率。
- RRE : 促进未拼接病毒基因组RNA向核外输出，从而提高病毒滴度。
- WPRES : 阻止polyA位点通读，促进RNA的加工和成熟，促进RNA向核外输出。该WPRES作用于包装细胞内的病毒基因组转录产物，从而促进载体包装并提高病毒滴度。此外，通过促进载体内部启动子所产生的mRNA转录本成熟，来增强靶细胞内目的基因的表达。

2. 病毒包装

将插入目的基因的慢病毒载体和病毒包装所需要的 *gag*, *pol*, *tat*, *rev* 慢病毒蛋白质及包膜蛋白质 (VSV-G) 表达质粒, 共转染至 Lenti-X 293T Cell Line 等包装细胞中。

在包装细胞中, 慢病毒载体转录的重组病毒RNA基因组, 通过包装信号 (ψ) 被包装蛋白质识别, 并与之组装形成病毒核心。之后, 病毒核心被转运至细胞膜, 被聚集了包膜蛋白质的细胞膜所包裹。然后感染性病毒粒子会从细胞膜上以出芽的方式释放到培养液中。(如第六页慢病毒制备过程原理图所示: 病毒粒子以未成熟的粒子出芽, 然后在体液和培养液中逐渐成熟。)

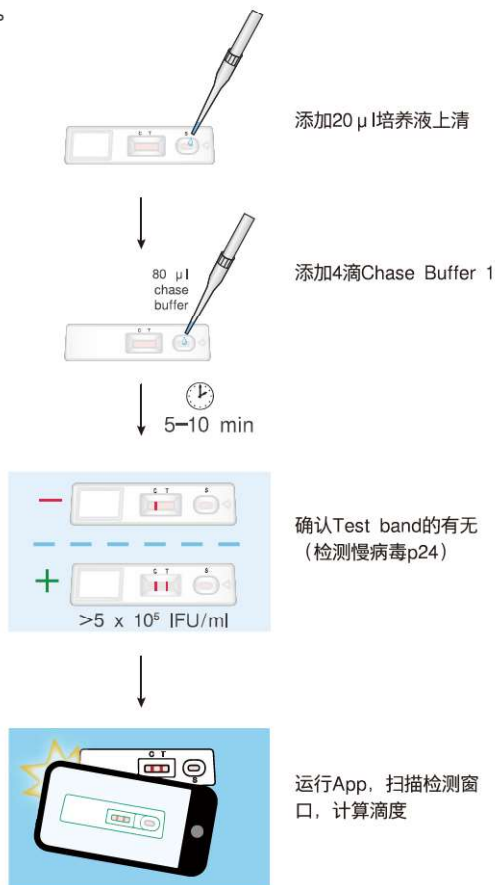
慢病毒包装可以使用 Lenti-X Packaging Single Shots, 可分别提供泛嗜性 (VSV-G)、单嗜性 (Ecotropic) 和整合酶缺陷型 (Integrase Deficient) 慢病毒包装系统。这是第四代慢病毒包装系统, 将包装质粒和转染试剂进行了预混, 一步操作, 简便易用, 高病毒滴度。泛嗜性慢病毒包装系统预期可获得的滴度为 10^7 - 10^8 IFU/ml。

3. 收集病毒粒子

转染包装细胞 48 h 后收集培养液上清, 使用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤收集病毒粒子。收集足够滴度 (5×10^5 IFU/ml) 的培养液上清的时机, 可以通过使用 Lenti-X GoStix Plus 简便测定滴度来确认。

使用 Lenti-X GoStix Plus 只需要将 $20 \mu\text{l}$ 病毒上清液和 Chase Buffer 滴加到 GoStix 验毒棒检测窗口中, 最短 30 秒 (~10 分钟) 通过确认 Test Band 的有无即可测定滴度。

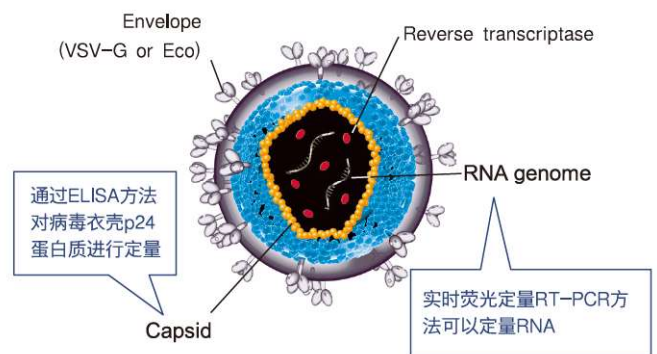
Lenti-X GoStix Plus 将慢病毒验毒棒和一款简便的手机 APP 相结合使用, 还可快速定量测定慢病毒滴度。先使用已知滴度的慢病毒建立 IFU/GV ratio, 通过样品测定的 GV 值 (GoStix Value) 计算出相应的 IFU/ml 值。



4. 病毒滴度测定

为了确认合适的感染复数 (MOI), 以得到可重复的基因导入实验结果, 需要准确计算所收集病毒的滴度。慢病毒滴度的测定方法, 主要分为以下两大类方法: 一类是使用实时荧光定量 RT-PCR 方法和 ELISA 方法分别测定病毒基因组 RNA 拷贝数和蛋白质含量来计算病毒粒子数, 另一类是通过荧光蛋白质或者抗性标记基因来评价基因导入效率 (生物学滴度)。

其中, 基于基因导入效率的生物学滴度, 可以通过病毒感染细胞来进行测定, 可得到与实际更接近的评价结果, 但检测时间需要数日~数周。相比而言, 使用实时荧光定量 RT-PCR 方法来测定 RNA 滴度, 使用 ELISA 方法来测定病毒粒子数, 可以在相对短的时间测定出病毒滴度。此外, 如果预先建立实时荧光定量 RT-PCR 方法得到的 RNA 滴度 (IFU/ml) 与生物学滴度的相关值 (copies/IFU), 可在短时间内通过 RNA 滴度推算出生物学滴度, 也可以确定 MOI 值。

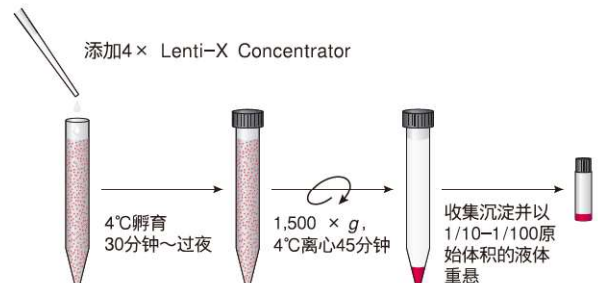


5. 病毒纯化·浓缩

收集的培养上清液中含有残存的质粒 DNA、培养基中的血清成分、具有强免疫原性的病毒蛋白质及核酸等物质, 这些物质会抑制病毒感染及基因导入。当使用慢病毒进行体内研究或作用于高敏感性的脆弱细胞时, 去除这些杂质是非常重要的。

使用 Lenti-X Maxi Purification Kit 来纯化病毒, 能够非常简便的获得高收量·高纯度的病毒。

此外, 如果收集的慢病毒滴度较低, 需要收集大量的病毒上清液时, 可以通过浓缩病毒上清液来获得高滴度的慢病毒。使用 Lenti-X Concentrator 仅需要离心 45 分钟, 可简便浓缩约 100 倍。



6. 慢病毒载体导入基因

使用慢病毒载体高效率导入基因推荐以下方法。

• Polybrene法

Polybrene（聚凝胺）法是贴壁细胞（HT-1080、HeLa等）导入慢病毒载体和逆转录病毒载体常用的方法。细胞表面和病毒粒子通常带有负电荷。通过加入聚凝胺，其正电荷可以中和病毒的负电荷并与病毒非特异性结合，这样更有利于与细胞表面的结合。由于细胞表面与病毒包膜更容易接触到，因此可显著提高基因导入效率。聚凝胺的浓度一般为2-12 μg/ml，但由于细胞长时间（24小时以上）暴露在聚凝胺中，会产生毒性反应，因此需要更换培养基以去除聚凝胺。

• RetroNectin法

使用慢病毒载体/逆转录病毒载体导入基因时，对于淋巴细胞等悬浮细胞及基因导入困难的造血干细胞、聚凝胺等基因导入辅助剂有毒性作用的细胞等，适于使用RetroNectin包被的培养板或培养皿进行导入，可以有效提高基因导入效率。（详细信息请参考13页）

! 可关注产品

Lenti-X Accelerator是一款使用磁珠将慢病毒及基于MMLV和MSCV的逆转录病毒快速高效地转导至细胞的试剂。

将病毒与磁珠（包含在Lenti-X Accelerator试剂中）预先孵育20分钟，之后将病毒·磁珠混合液添加至细胞培养液中孵育5分钟，只需通过上述简单操作即可将病毒转导至细胞中，这款试剂也适用于敏感性细胞。

用途	产品名称	包装量	Code No.
高滴度慢病毒包装试剂	Lenti-X™ Packaging Single Shots (VSV-G)	16 次	631275
包装细胞	Lenti-X™ 293T Cell Line	1 ml	632180
转染试剂	Xfect™ Transfection Reagent	300 次	631317
10分钟简便快速测定滴度	Lenti-X™ GoStix™ Plus	20 次	631280
qRT-PCR方法测定滴度	Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit	200 次	631235
ELISA方法测定滴度	Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit	96 次	632200
慢病毒纯化	Lenti-X™ Maxi Purification Kit	2 次	631233
慢病毒浓缩	Lenti-X™ Concentrator	100 ml	631231
提高基因导入效率	RetroNectin®	0.5 mg (0.5 ml)	T100A
	Lenti-X™ Accelerator	400 μl	631256

※ 我们还可以提供EF1a启动子类型和荧光蛋白质融合表达类型等多种慢病毒表达载体。

【关联产品】

用途	产品名称	包装量	Code No.
SARS-CoV-2假病毒包装系统	Lenti-X™ SARS-CoV-2 Packaging Single Shots (WT Spike, Full Length)	12 Rxns	632668
	Lenti-X™ SARS-CoV-2 Packaging Single Shots (D614G Spike, Full Length)	12 Rxns	632669
	Lenti-X™ SARS-CoV-2 Packaging Single Shots (WT Spike, Truncated)	12 Rxns	632670
	Lenti-X™ SARS-CoV-2 Packaging Single Shots (D614G Spike, Truncated)	12 Rxns	632671
SARS-CoV-2假病毒宿主细胞	Human ACE2 293T Cell Line	1 ml	631289

★ 腺相关病毒 (AAV) 载体的特征及使用注意事项



腺相关病毒 (Adeno-Associated Virus: AAV) 是一种无包膜病毒，需要在腺病毒和疱疹病毒等辅助病毒存在的情况下增殖生长。

AAV载体可在P1级生物安全实验室条件下操作，而且易于操作。AAV载体可用于分裂细胞和非分裂细胞进行基因导入，对于非分裂细胞可以实现长期表达。此外，由于其免疫原性低，也适用于动物个体的基因导入。它是一种非常稳定的病毒，而且易于纯化。

众所周知，AAV根据血清型不同而具有不同的宿主范围和病毒特征。请根据靶标细胞·组织选择相应的血清型。基因导入效果因实验条件不同而不同，请参照参考文献。

血清型及针对的主要靶组织 (血清型为1、2、5、6时) 【参考文献】

血清型	主要靶组织
AAV1	肌肉、肝脏、呼吸道、中枢神经系统
AAV2	广泛的细胞·组织
AAV5	中枢神经系统、肝脏、视网膜
AAV6	心脏、肌肉、肝脏

Miyake K, Miyake N, Yamazaki Y, Shimada T, Hirai Y. Serotype-independent method of recombinant adeno-associated virus (AAV) vector production and purification. *J Nippon Med Sch.* 2012;79(6):394-402.

小泽敬也

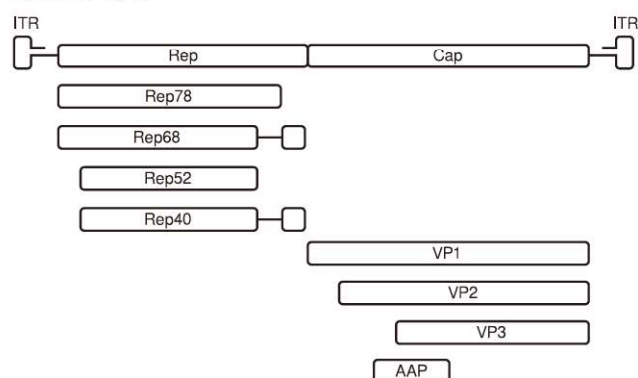
AAV载体的开发及其在基因治疗中的应用: 蛋白质核酸酶vol.52.No.10 (2007) 1288-1293.

Ellis BL, Hirsch ML, Barker JC, Connelly JP, Steininger RJ 3rd, Porteus MH. A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. *Virology.* 2013 Mar 6;10:74.

AAV基因组结构

AAV基因组是约4.7 kb的单链线状DNA分子，两端都含有被称为反向末端重复序列 (Inverted Repeat Sequence, ITR) 的T字形发夹结构 (下图)。ITR的功能在于基因组复制起始位点及辅助病毒粒子包装。

AAV基因组包含了3个开放阅读框 (下图Rep编码参与复制和转录的蛋白质; Cap编码病毒衣壳蛋白质; AAP编码用于病毒粒子形成的非结构蛋白质。Rep区域编码4种不同的蛋白质 (Rep78, Rep68, Rep52和Rep40), Cap区域编码3种不同的蛋白质 (VP1, VP2和VP3)。



野生型AAV基因组结构和编码蛋白质

■ AAV Helper Free System

AAV Helper Free System是一种特别的可制备高滴度AAV的无辅助病毒系统。每个试剂盒包含3种质粒，只需将制备AAV病毒所需的这3种载体质粒转染于HEK293细胞中，即可制备AAV病毒。

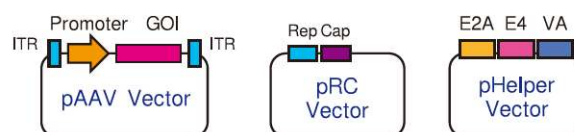
■ 使用AAVpro Helper Free System制备AAV载体

操作方法概要

1. 目的基因克隆

制备AAV载体需要以下3种质粒:

- pAAV Vector:
含有目的基因表达框和2个ITR的质粒
- pRC Vector:
包含AAV2 Rep基因和各种血清型Cap基因的质粒
- pHelper Vector:
包含腺病毒E2A、E4、VA基因的质粒



使用标准克隆方法将目的基因 (Gene of Interest, GOI) 插入到pAAV载体的多克隆位点 (MCS) 中，也可以使用In-Fusion® HD Cloning Plus进行基因克隆。确认目的基因正确插入后，使用转染级别的质粒纯化试剂盒纯化质粒，并将质粒浓度调整至1 μg/μl。
※可克隆的目的基因大小: 最大2.5 kb。

2. 病毒包装

将HEK293或者HEK293T细胞按照2.5-4.0x10⁶个/皿，接种至100 mm细胞培养皿中进行培养。接种次日，将经过纯化的pAAV Vector和本试剂盒中自带的pRC Vector及pHelper Vector共转染至细胞中。使用Xfect Transfection Reagent进行转染，具体操作如下:

- ① 将Xfect Polymer涡旋振荡混匀。

② 将Xfect Reaction Buffer和质粒DNA剧烈涡旋混匀5 秒钟。

pAAV Vector (1 µg/µl)	13 µl
pRC Vector (1 µg/µl)	13 µl
pHelper Vector (1 µg/µl)	13 µl
Xfect Reaction Buffer	561 µl
Total	600 µl

③ 添加11.7 µl Xfect Polymer到质粒混合物中，剧烈涡旋振荡混匀10 秒钟。

④ 室温静置10分钟。瞬时离心后，将混合物逐滴加入到HEK293或者HEK293T细胞中，晃动均匀后继续培养。

⑤ 转染后6~25小时，使用含2%FBS的新鲜DMEM更换培养基。

3. 收集病毒粒子

收集AAV载体制备细胞（转染后2~3天）

① 按照培养液体积的1/80添加0.5 M EDTA(pH8.0)，充分混匀后，室温静置10分钟，使细胞从培养皿表面分离。

② 将分离后的细胞收集至离15 ml无菌离心管中，于4°C以1,750 × g离心10分钟，去除上清液收集细胞。1,750 × g离心10分钟后，去除上清收集细胞。

从AAV制备细胞中提取AAV载体

使用试剂盒中所包含的AAV Extraction Solution，可以简便地提取AAV载体。与反复冻融法和超声破碎法不同，使用此方法不需要准备液氮或者超声破碎仪。

① 涡旋振荡或轻弹所收集的细胞沉淀，使其充分散开。

② 添加0.5 ml AAV Extraction Solution A。

③ 涡旋振荡15秒使细胞沉淀充分重悬。

④ 室温静置5分钟后，再涡旋振荡15秒重悬。

⑤ 于4°C 2,000~14,000 × g离心10分钟，去除细胞碎片。

⑥ 收集上清至新的离心管中。

⑦ 添加50 µl的AAV Extraction Solution B，吸打混匀。

※ 收集的AAV载体可保存于-80°C。

4. 病毒载体纯化·浓缩

AAV载体溶液的纯度对于动物个体实验尤为重要。要去除AAV病毒载体提取液中的杂质，使用以往常用的超速离心等方法耗时较长，而使用AAVpro Purification Kit (All Serotypes)可以通过过滤器过滤这种操作简便且耗时较短的方式进行纯化，可以达到基本相同的纯化效果。

① 在上述⑦得到的从AAV载体制备细胞中提取的载体溶液中，添加1/100量的Cryonase Cold-active Nuclease (终浓度为200 U/ml)，37°C反应1小时。

② ①溶液中加入1/10量的Precipitator A，涡旋振荡混合10秒后37°C反应30分钟，再次涡旋振荡混合10秒。

注1) Precipitator A低温保存时可能会产生白色沉淀，不影响制品的品质及性能。此时，只需将试剂在37°C下充分溶解即可使用。

注2) 反应过程中产生沉淀对实验本身没有影响，可直接进入下一步操作。

③ ②溶液中加入1/20量的Precipitator B，迅速涡旋振荡混合10秒，5,000~9,000 × g 4°C离心5分钟。

注) 加入Precipitator B会产生沉淀，属正常现象，需要进行离心。

④ 使用0.45 µm Millex-HV过滤器过滤上清液。

⑤ 将过滤后的AAV载体溶液，转移至Amicon Ultra-15, 100 kDa超滤管中，2,000 × g 15°C离心5分钟。确认AAV载体溶液体积是否<1.5 ml。

注) 如果AAV载体溶液体积>1.5 ml，重复⑤离心操作。

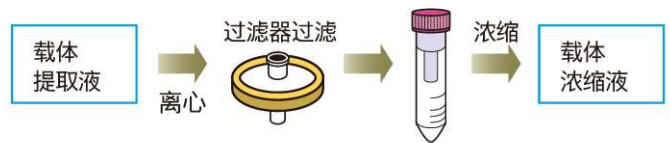
⑥ 去除滤液后，在超滤杯中添加5 ml Suspension Buffer吸打混匀，2,000 × g 15°C离心5分钟。确认AAV载体溶液体积是否<1.5 ml。

注) 如果AAV载体溶液体积>1.5 ml，重复⑥离心操作。

⑦ 步骤⑥重复4次（总共5次），最终浓缩至适当体积。

⑧ 去除滤液，吸打或涡旋振荡30秒使其充分悬浮，然后将Amicon Ultra-15,100 kDa超滤杯中的AAV溶液转移到新离心管中。

※⑤⑥⑦离心操作请使用摆动转子



此外，使用AAVpro Concentrator可以简便有效地浓缩AAV载体培养液上清（有无血清均可），还可以用于含有AAV载体溶液的缓冲液置换等多种应用。

5. 病毒载体滴度测定

病毒载体滴度测定方法，主要包括以下两种：一种是通过实时PCR测定AAV载体基因组的载体基因组定量方法，另一种是通过细胞感染实验测定滴度的生物学滴度测定方法。

前者是快速定量测定方法，后者通过细胞感染实验，是一种更准确更接近于实际的滴度测定方法。

常见问题:

[Q1]一般情况下，动物实验需要的AAV载体的量是多少？

[A1]根据血清型、靶组织及给药方式的不同而不同。对小鼠而言，AAV载体用量大约是 1×10^{11} ~ 1×10^{12} vg/小鼠。注意，此处列出的用量仅供参考。具体请参考文献确定用量。(Vg=Vector genome; 通过实时定量PCR方法测定)

[Q2]AAVpro Purification kit (All Serotypes)能够处理的细胞数量是多少？

[A2]每次纯化最多可从5个T225培养瓶培养的细胞中纯化AAV病毒粒子。

※1个试剂盒进行4次纯化。

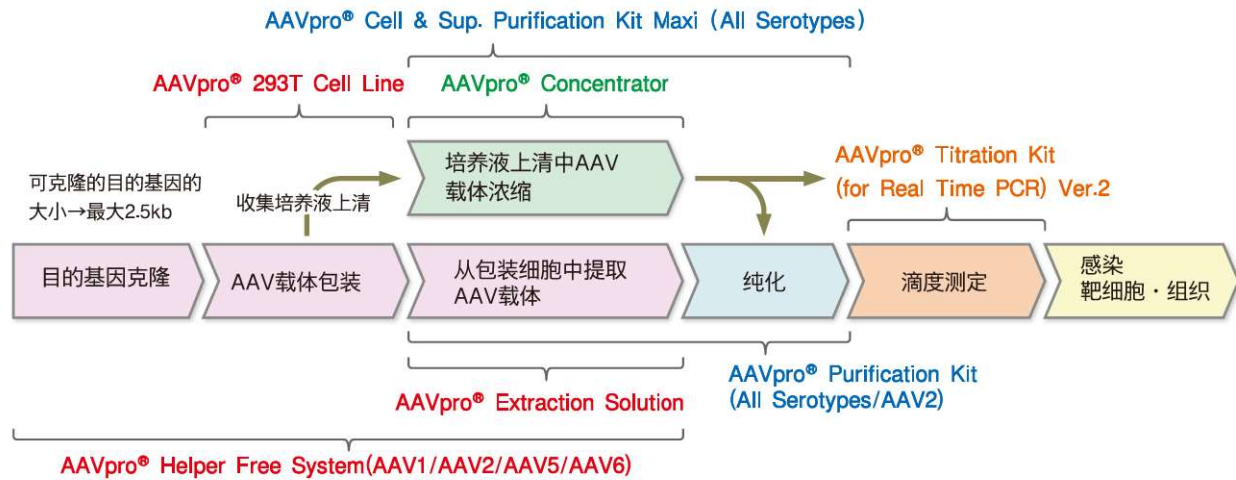
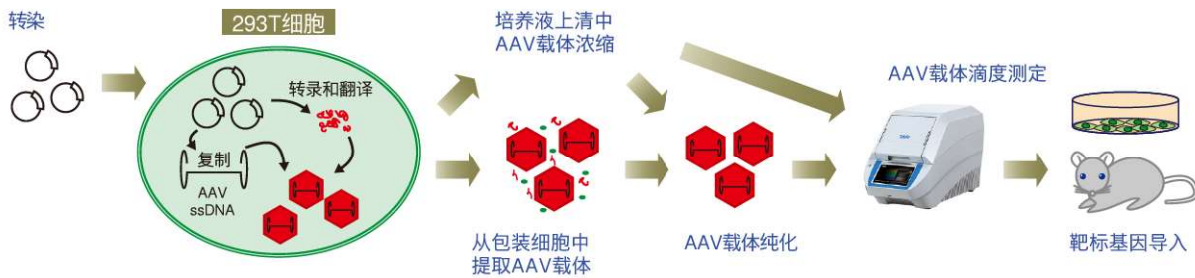
Troubleshooting

包装细胞中导入了制备AAV载体用的质粒，但却无法确认滴度，其原因可能是AAV载体的产量低。为了获得高滴度的AAV载体，请确认以下内容：

1.众所周知，AAV病毒载体包装可以使用HEK293及HEK293T细胞。我公司已确认使用AAVpro 293T Cell Line (产品编号: 632273) 或HEK293T/17(ACTT CRL 11268)可以稳定制备出AAV载体，并且我们也推荐使用这些细胞来制备AAV载体。

2.考虑可能是转染效率低。获得高滴度AAV载体，高转染效率是必要的。请尝试使用用户手册推荐的转染方法。

AAV载体制备实验流程和对应产品



用途	产品名称	包装量	Code No.
制备AAV2	AAVpro® Helper Free System(AAV2)※	1 Kit	6230
简便高效提取AAV	AAVpro® Extraction Solution	1 Set	6235
纯化各种血清型AAV	AAVpro® Purification Kit Maxi(All Serotypes)	4 次	6666
纯化各种血清型AAV	AAVpro® Purification Kit Midi (All Serotypes)	4 次	6675
可同时从包装细胞和培养上清液中纯化AAV	AAVpro® Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes)	4 次	6676
可从AAV包装细胞（活细胞或者冷冻细胞）中提取AAV的细胞悬浮液	AAVpro® Freeze-Thaw Extraction Buffer (All Serotypes)	20 ml × 2	6679
AAV2高纯度纯化	AAVpro® Purification Kit (AAV2)	2 次	6232
AAV滴度测定	AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2	100 次	6233
AAV高效浓缩	AAVpro® Concentrator	1 Kit	6674

【关联产品】

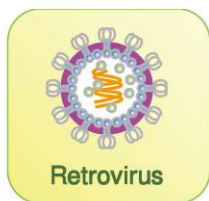
用途	产品名称	包装量	Code No.
高效率·低毒性转染试剂，适用于广泛哺乳动物细胞	Xfect Transfection Reagent	50 次反应 × 2	631317
经济高效的磷酸钙转染试剂	CalPhos™ Mammalian Transfection Kit	1 Set	631312
制备不同类型AAV2 (对照用, shRNA表达用) ※	AAVpro® Helper Free System(AAV2-LacZ)	1 Kit	6655
	AAVpro® Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase)	1 Kit	6652
适合AAV载体制备的293T细胞	AAVpro® 293T Cell Line	1 ml	632273
使用SaCas9和重组腺相关病毒进行基因组编辑的系统（单载体类型）	AAVpro® CRISPR/SaCas9 Helper Free System(AAV2)	1 Kit	632619

※ AAV1, AAV5, AAV6相应产品，请登录Takara官网查看详细信息。

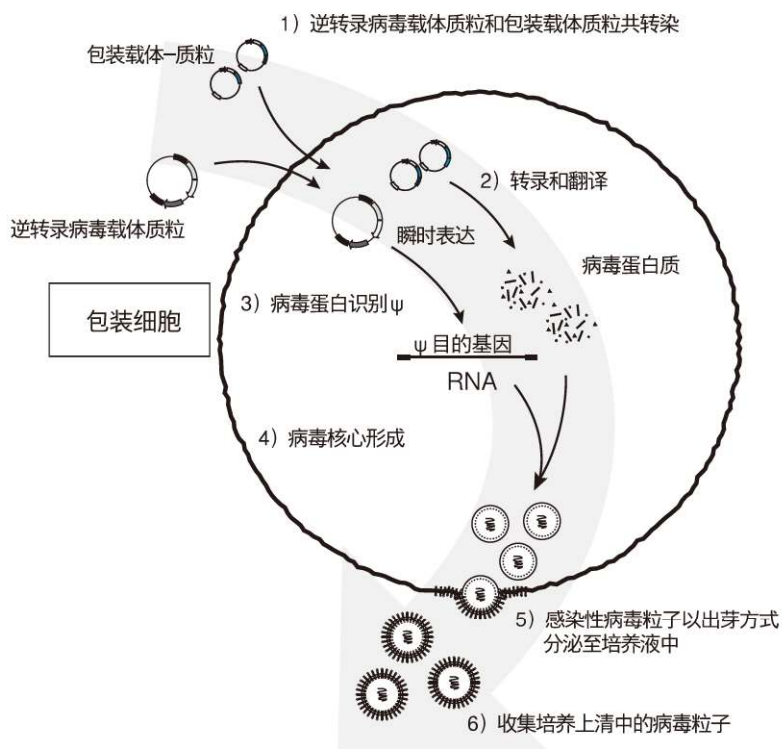
非 非营利目的的研究机构购买时：购买之前需用户填写专利确认书，且使用目的注明研究用。

营 营利目的的研究机构或者法人购买时：首先需要获得专利许可，方可订购。订购时，需同时填写专利确认书与当地代理商。

★ 逆转录病毒载体的特征及使用注意事项



逆转录病毒载体是基于莫罗尼小鼠白血病病毒 (MoMLV) 开发的, 在基因治疗方面有着丰富的应用实绩。逆转录病毒载体能够将基因导入至多数处于增殖期的细胞中, 由于导入基因可整合到染色体中, 因此可以实现长期稳定的基因表达。病毒载体制备相对容易, 但需要在P2级实验室条件下操作。

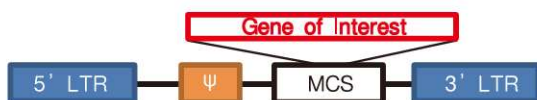


操作方法概要

1. 目的基因克隆

分别准备携带LTR, 包装信号 (ψ) 及目的基因的逆转录病毒质粒载体和携带包装所必需的gag, pol, env基因的质粒载体, 通过共转染 (共导入) 这些质粒, 可以获得高安全性的缺失自我复制能力的重组逆转录病毒。

将目的基因序列 (Gene of Interest: GOI) 按照标准的克隆方法插入到逆转录病毒质粒载体的多克隆位点 (MCS)。



另外, 自失活型Retro-X Q Vector可实现高病毒滴度和稳定的表达水平, 该载体进行了减少启动子干扰优化设计。

2. 病毒包装

将携带目的基因的逆转录病毒载体质粒和pGP vector (携带gag和pol基因), pE vector (携带VSV-G/Ecotropic/Amphotropic等包膜编码基因env), 共转染至AmphoPack-293等包装细胞中, 48小时后可通过瞬时包装获得重组逆转录病毒。另外一种方法就是使用部分或全部包装所需要的基因已整合到基因组中所形成的包装细胞 (Code No. 631510)

包装细胞	gag基因	pol基因	env基因
293T细胞	-	-	-
GP2-293细胞	+	+	-
PT67细胞	+	+	+

+: 细胞基因组已整合 - : 使用质粒导入

由于重组逆转录病毒的感染取决于包膜, 因此请根据靶细胞类型来选择pE vector。

指向性	Env	受体	靶细胞
Ecotropic	gp70	mCAT1	小鼠, 大鼠
Amphotropic	4070A	rPit-2	广泛的哺乳动物类细胞
Dualtropic	10A1	Pit-1, Pit-2	广泛的哺乳动物类细胞
Pantropic	VSV-G	不要	绝大部分动物细胞

3. 收集病毒粒子

产生的重组逆转录病毒会释放到培养液上清中，过滤培养液上清获得病毒液。

4. 病毒滴度测定

逆转录病毒载体滴度可通过Real Time RT-PCR测定。Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) 可测定大部分以MoMLV为基础的逆转录病毒载体RNA基因组含量并计算出病毒滴度 (RNA滴度)。

5. 病毒浓缩

Retro-X Concentrator是一款无需超速离心的浓缩试剂，可简便、快速、高效地浓缩多种包膜类型的逆转录病毒上清液。

6. 逆转录病毒基因导入

逆转录病毒基因导入通常使用Polybrene法和Protamine法，这两种方法都是将病毒液与带有正电荷的基因导入辅助剂混合液添加到靶细胞中并进行培养来辅助基因导入。基因导入辅助剂能够使带负电荷的细胞和带负电荷的病毒更易结合，从而提高基因导入效率。此外，通过物理和化学方法导入困难的造血干细胞等，使用RetroNectin可以成功实现基因导入。另外，使用Receptor Booster可通过瞬时提高靶细胞表面病毒受体浓度，从而提高基因导入效率。

用途	产品名称	包装量	Code No.
逆转录病毒质粒载体	pDON-5 Neo DNA	20 μg	3657
自失活型质粒载体	Retro-X™ Q Vector Set	20 μg × 4	631516
包装试剂	Retrovirus Packaging Kit Eco	10 次反应	6160
包装试剂	Retrovirus Packaging Kit (Ampho)	10 次反应	6161
病毒滴度测定	Retro-X™ qRT-PCR Titration Kit	200 次反应	631453
病毒浓缩	Retro-X™ Concentrator	100 ml	631455
促进靶细胞基因导入	RetroNectin®	0.5 mg(0.5 ml)	T100A
提高基因导入效率	Ecotropic Receptor Booster	20 次反应	631471

! 可关注产品

RetroNectin® (Code No.T100A/B)

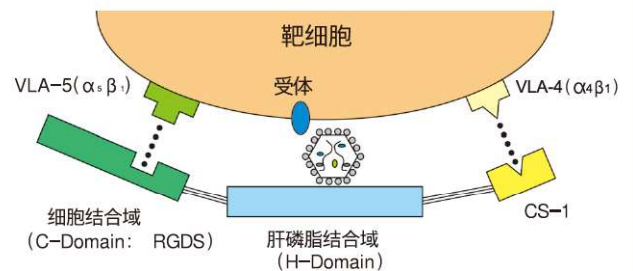
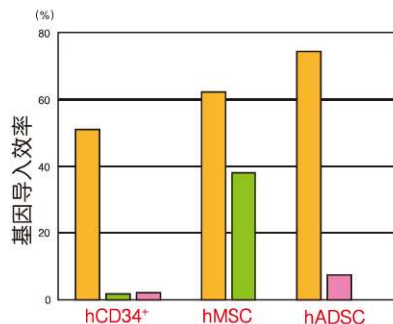
- ✓ 用于逆转录病毒/重组慢病毒载体导入基因
- ✓ 淋巴细胞等悬浮细胞、基因导入困难的造血干细胞、基因导入辅助剂

→ (如Polybrene) 有毒性作用的细胞的理想选择

【使用方法】包被细胞培养板后使用

【干细胞基因导入实例】

使用逆转录病毒载体用于人造血干细胞 (hCD34+)，人间充质干细胞 (hMSC) 及人脂肪来源细胞 (hADSC) 基因导入并检测基因导入效率，每种细胞分别使用了RetroNectin法 ■，Polybrene法 ■ 和Protamine法 ■。相比于其他两种方法，RetroNectin法基因导入效率更高。



RetroNectin用于使用重组逆转录病毒和慢病毒载体向表达整合蛋白VLA-4、VLA-5的哺乳动物细胞中导入基因。表达VLA-4的细胞与CS-1位点结合，表达VLA-5的细胞与细胞结合域结合，同时，病毒载体可以与肝磷脂结合域结合而共存于RetroNectin上。这样，细胞与病毒载体在局部范围内以高浓度共存，从而提高了基因导入效率。

★ RetroNectin产品详细信息请登录Takara网站查询。

★ 腺病毒载体的特征及使用注意事项



重组腺病毒通过细胞受体CAR介导的内吞作用来侵入细胞，以游离基因存在而不整合至靶细胞基因组中，可实现目的基因产物瞬时高表达。腺病毒可感染包含人在内的广泛哺乳动物细胞，分裂细胞和非分裂细胞，株化细胞及原代细胞，动物个体等。

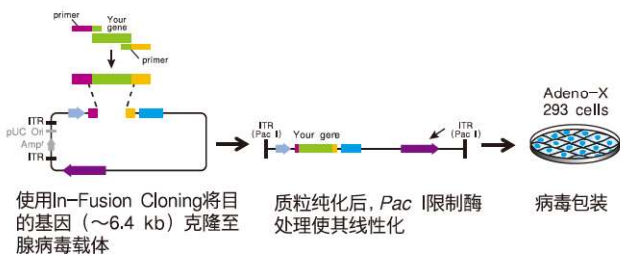
*CAR表达水平低的血细胞往往较难感染。

操作方法概要

1. 目的基因克隆

以往通常使用限制酶将目的基因克隆到腺病毒载体中，但由于腺病毒载体是长36 kb的线性双链DNA病毒，使用常规的克隆方法很难高效克隆目的基因。

Adeno-X Adenoviral System 3使用In-Fusion方法来连接线性化pAdenoX Vector和目的基因，能够实现简便快速的高效克隆。克隆后，使用限制酶(Pac I)线性化经过纯化的含有目的基因的腺病毒质粒载体。

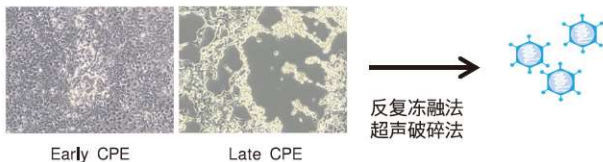


2. 病毒包装

将线性化腺病毒载体(E1A缺陷型)导入至表达E1A的包装细胞中,例如Adeno-X 293 Cell Line。病毒的结构蛋白在细胞质中翻译完成后转运到细胞核内,通过识别病毒基因组包装信号(ψ)包装基因组形成病毒粒子。

3. 收集病毒粒子种子

腺病毒是在引起细胞坏死的同时进行增殖,因此病毒包装后可以观察到细胞坏死(CPE=cytopathic effect)的状态。取决于基因导入效率,持续培养细胞大约1周左右,CPE的比例逐渐提高,培养至Late CPE时,收集细胞和培养液,通过反复冻融法或超声破碎法收集病毒粒子种子(下图所示)。



4. 高滴度病毒载体制备和收集

由于在病毒种子阶段不能获得足以进行基因导入的滴度,因此需要将病毒种子导入细胞中并使其自我复制来获得高滴度的病毒粒子。由于病毒种子缺失自我复制所必需的E1A,感染持续表达E1A的Adeno-X 293 Cell Line,培养3-4天后,大约50%左右的细胞漂浮时,收集培养液和细胞。此时使用Adeno-X GoStix,可以非常简便地测定培养液上清的病毒滴度。通过反复冻融法或超声破碎法收集细胞和培养液上清中高滴度的病毒载体。

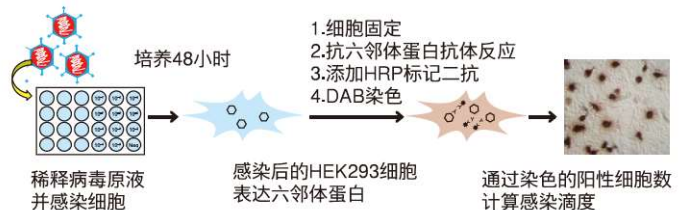


5. 病毒载体纯化

由于收集的病毒溶液中含有很多杂质,根据实验目的决定是否需要病毒纯化。使用Adeno-X Maxi Purification Kit,通过将腺病毒载体吸附在滤膜上可简便纯化病毒,在2小时内就可以获得高纯度的腺病毒载体。

6. 病毒载体滴度测定

使用Adeno-X Rapid Titer Kit通过抗体染色法,可以测定纯化后腺病毒载体的滴度(IFU=infection units)。



7. 使用腺病毒载体导入基因

合适的腺病毒载体感染条件是MOI=10-100(每个细胞10-100个病毒感染单位)。由于腺病毒有细胞毒性,过量的MOI感染会损伤细胞。对于基因导入困难的细胞类型,使用CAR Receptor Booster能够有效提高腺病毒导入效率。

用途	产品名称	包装量	Code No.
腺病毒制备系统	Adeno-X™ Adenoviral System 3 (CMV)	1 Set	632269
包装细胞	Adeno-X™ 293 Cell Line	1 ml	632271
简便滴度测定	Adeno-X™ GoStix™	20 次	632270
腺病毒纯化	Adeno-X™ Maxi Purification Kit	2 次	631532
免疫法测定滴度	Adeno-X™ Rapid Titer Kit	120 次	632250
qPCR法测定滴度	Adeno-X™ qPCR Titration Kit	200 次	632252
提高腺病毒转导效率	CAR Receptor Booster	20 次	631470

【基因导入】其他关联产品

产品名称	概要	包装量	Code No.	备注
“第三代”重组慢病毒载体相关				
LVpro Packaging Mix (pLVpro-MSCV Vector)	HIV-1 tat非依赖性第三代慢病毒载体。临床使用可能，将HIV-1来源序列排除到极限，提高安全性。优化了包装系统，制备高滴度慢病毒粒子。和3' LTR/ΔU3 pLVpro vector组合使用可进行P2实验（注：取决于插入基因）。	1 Set	6962	
LVpro Packaging Mix (pLVpro-MSCV-EI Vector)		1 Set	6963	
LVpro Packaging Mix (pLVpro-EF1α Vector)		1 Set	6964	
LVpro Packaging Mix (pLVpro-MSCV-ZsGreen1 Vector)		1 Set	6965	
LVpro Packaging Mix (pLVpro-MSCV-EI-ZsGreen1 Vector)		1 Set	6966	
LVpro Packaging Mix (pLVpro-EF1α-ZsGreen1 Vector)		1 Set	6967	
LVpro Packaging Mix	独立的包装系统单品	16次反应	6195	
重组逆转录病毒载体相关				
Lenti-X™ Packaging Single Shots (Envelope-Free)	可灵活制备任何所选包膜蛋白的假型慢病毒	16次反应	631294	
Retro-X™ Universal Packaging System	重组逆转录病毒制备系统，可根据靶细胞选择合适的包膜蛋白质	1 Set	631530	
MSCV Retroviral Expression System	适用于造血干细胞、ES细胞等多能性细胞基因导入	1 Set	634401	非营
重组慢病毒载体相关				
Lenti-X™ Packaging Single Shots (Integrase Deficient)	制备非整合型重组慢病毒	16次反应	631277	
Lenti-X™ Provirus Quantitation Kit	快速测定前病毒基因拷贝数	200次反应	631239	
Lenti-X™ Integration Site Analysis Kit	确定前病毒基因组插入位点	1 Kit	631263	
重组腺相关病毒载体相关				
pAAV-ZsGreen1 Vector	制备表达荧光蛋白质的AAV载体	20 μg	6231	非营
AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2)	AAV载体型CRISPR/Cas9系统	1 Kit	632608	
克隆用试剂及PCR酶				
In-Fusion® Snap Assembly Master Mix	简便易用的定向克隆试剂盒	10次	638947	
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	兼具高保真性和良好反应性的PCR酶（人基因组为模板可扩增~6 kb）	100次	R045A	

非 非营利的研究机构或法人购买时：购买专利产品，需要填写专利确认书，说明使用目的为研究用。订货时，请将填好的专利确认书交与我们当地代理商，没有专利确认书我们将不能接收订单。

营 营利的研究机构或法人购买时：购买专利产品，需要获得专利许可（有偿）。订货时，先要获得专利许可，然后填写专利确认书交与当地代理商。没有专利许可和专利确认书我们将不能接收订单。获得专利许可后，每次订货时都要填写专利确认书。

- 本宣传页上登载的制品，都是以科研为目的。请不要用于其它方面，如：不要用于人、动物的临床诊断和治疗。也不能用于食品、化妆品及家庭用品等方面。
- 未经本公司许可，严禁产品的转售·转让、以转售·转让为目的的产品更改、以及用于商品的制造。
- 专利许可信息请在本公司网站上确认：<https://www.takarabiomed.com.cn/>。
- 本宣传页上登载的公司名称及制品名称即使没有特殊标注，使用的也是各公司的商标或注册商标。
- 本宣传页仅限于中国大陆地区客户使用，其他地区客户请咨询当地代理商。
- 本宣传页上记载的产品信息是2022年12月1日的信息，最新信息请参考公司官网。