

研究用

---

# Takara

pDON-AI-2 Neo DNA	(Code No. 3653)
pDON-AI-2 DNA	(Code No. 3654)
pMEI-5 Neo DNA	(Code No. 3655)
pMEI-5 DNA	(Code No. 3656)
pDON-5 Neo DNA	(Code No. 3657)
pDON-5 DNA	(Code No. 3658)

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 载体图谱及克隆位点	1
● 逆转录病毒载体的特点	2
● 使用 pDON-AI-2, pMEI-5 和 pDON-5 系列构建重组逆转录病毒载体的方法	3
● 实验例	4
● 参考文献	5
● 关联产品	5
● 使用注意	5

## ● 制品说明

pDON-AI, pMEI-5 和 pDON-5 系列载体是逆转录病毒载体。只包含 MoMLV 基因组的 LTR 和包装信号 ( $\Psi$  序列), 而不含 *gag*、*pol* 和 *env* 编码序列。

### 【pDON-AI-2 系列】

该质粒用于制备高滴度的逆转录病毒。

5' -LTR 的 U3 区域被替换成 HCMV IE promoter 强启动子, 转录效率高, 所以可以获得高效价的重组逆转录病毒。为了提高导入细胞之后的目的基因的表达效率, 在多克隆位点上游插入了人肌动蛋白的内含子 (intron) 和剪接受体 (splice acceptor, SA)。pDON-AI-2 Neo DNA (Code No. 3653) 有新霉素选择标记。

### 【pMEI-5 系列】

该质粒用于制备高表达的逆转录病毒。

为了提高导入细胞的目的基因的表达效率, 在多克隆位点上游插入了具有较高剪接能力的人源 EF1  $\alpha$  内含子 (intron), 所以它具有很高的转录能力。pMEI-5 Neo DNA (Code No. 3655) 有新霉素选择标记。

### 【pDON-5 系列】

该质粒用于制备高表达、高滴度的逆转录病毒。

为了提高导入细胞的目的基因的表达效率, 在多克隆位点上游插入了具有较高剪接能力的人源 EF1  $\alpha$  内含子 (intron), 使之具有高转录能力的特点。并且 5' -LTR 的 U3 区域被替换成 HCMV IE promoter 强启动子, 可以获得高效价的重组逆转录病毒。使用本制品, 与 pMEI-5 系列载体相比, 可以获得更高效价的重组逆转录病毒。pDON-5 Neo DNA (Code No. 3657) 有新霉素选择标记。

## ● 制品内容

pDON-AI-2 Neo DNA	(Code No. 3653)	20 $\mu$ g
pDON-AI-2 DNA	(Code No. 3654)	20 $\mu$ g
pMEI-5 Neo DNA	(Code No. 3655)	20 $\mu$ g
pMEI-5 DNA	(Code No. 3656)	20 $\mu$ g
pDON-5 Neo DNA	(Code No. 3657)	20 $\mu$ g
pDON-5 DNA	(Code No. 3658)	20 $\mu$ g
浓度: 1 $\mu$ g/ $\mu$ l		
形态: 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA		

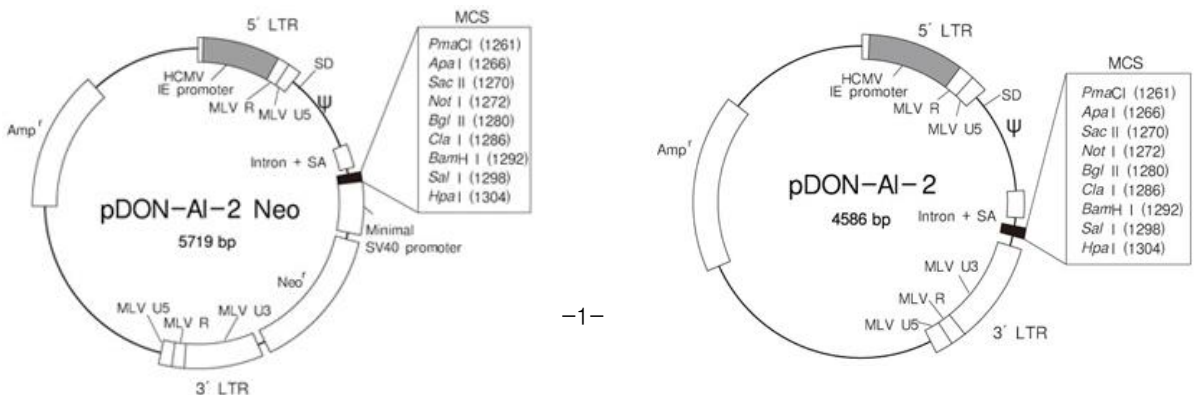
## ● 保存: -20°C。

## ● 载体图谱及克隆位点

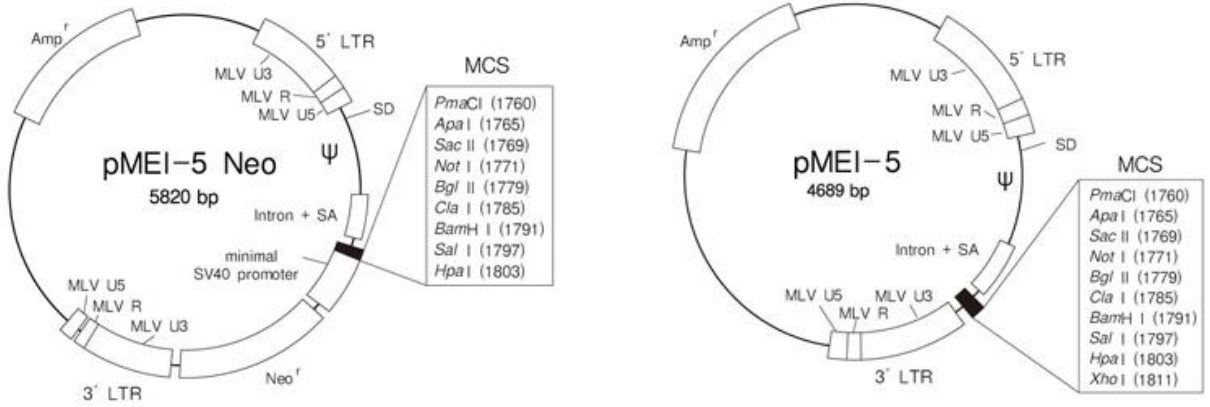
多克隆位点共有 9 种酶切位点 (pMEI-5 DNA 和 pDON-5 DNA 增加一种酶切位点), 很容易插入目的基因, 并且容易在各载体之间进行比较。

### <载体图谱>

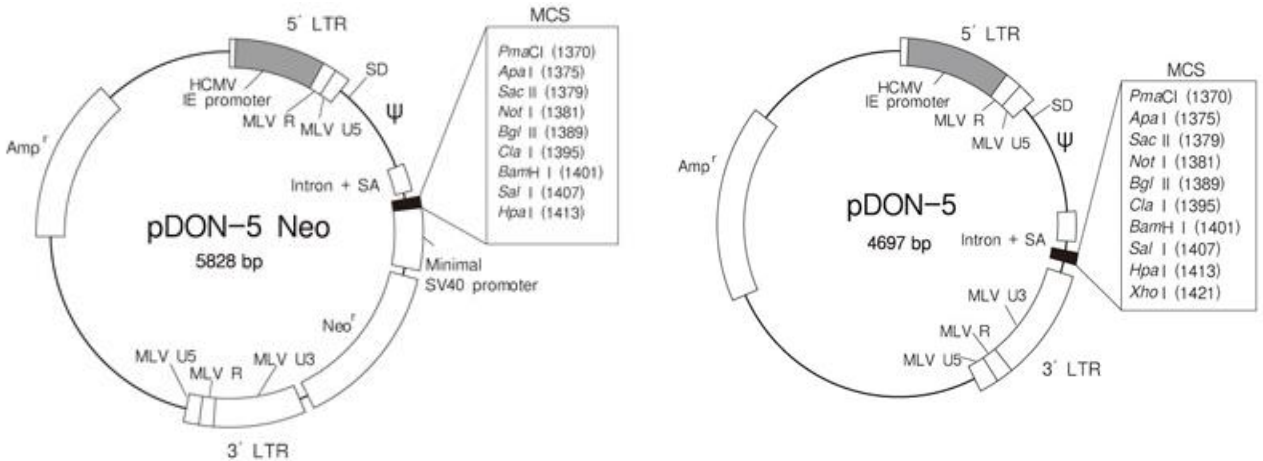
#### pDON-AI-2 series



## pMEI-5 series

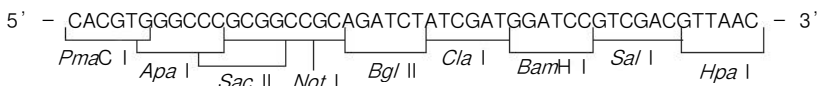


## pDON-5 series

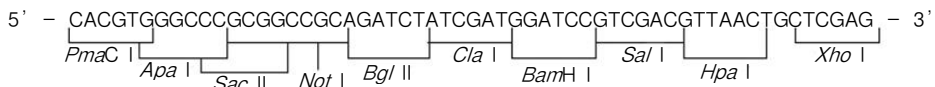


### <多克隆位点>

pDON-AI-2 Neo, pDON-AI-2, pMEI-5 Neo, pDON-5 Neo



pMEI-5, pDON-5



## ● 逆转录病毒载体的特点

利用逆转录病毒载体将目的基因导入靶细胞并使之获得表达，有以下的优点。

- 1) 将导入的基因重组到染色体上，基因能够长时间、稳定的表达。不能将导入的基因重组到染色体上的载体，在基因导入后，将会被降解，或者随着细胞分裂而被稀释。因此，基因表达呈瞬时性，不能持续表达。逆转录病毒载体重组到染色体中，在细胞分裂后，也能够稳定传代。
- 2) 除了逆转录病毒以外的病毒载体都需要复杂的制作方法，但是，逆转录病毒比较容易构建病毒载体。

3) 逆转录病毒载体能够将基因导入许多种类的增殖期细胞。特别是当利用物理或化学方法几乎不能将基因导入造血干细胞中时，利用Fibronectin Fragment (RetroNectin<sup>®</sup> (Recombinant Human Fibronectin Fragment (Code No. T100A/B)), 有可能介导逆转录病毒载体高效率的导入造血干细胞。

### ● 利用 pDON-AI-2、pMEI-5 和 pDON-5 系列构建重组逆转录病毒载体的方法

利用 Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho (Code No. 6160/6161) 通过瞬时转染 G3T-hi 细胞产生重组病毒，如图 1 所示。另外，还可以通过转染包装细胞，制备重组病毒。

- (1) 转染前一天，准备 G3T-hi 细胞。
- (2) 用 *TransIT*-293 Transfection Reagent (Mirus Bio)或磷酸钙法共转染插入目的基因的重组逆转录病毒质粒和 Kit 中逆转录病毒 *gag-pol* 和 *env* 表达载体。
- (3) 转染 24 小时后，更换培养基，再次培养 24 小时后，上清培养液用 0.45  $\mu\text{m}$  过滤器过滤。
- (4) 回收液作为病毒溶液，回收后的病毒溶液分装后  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

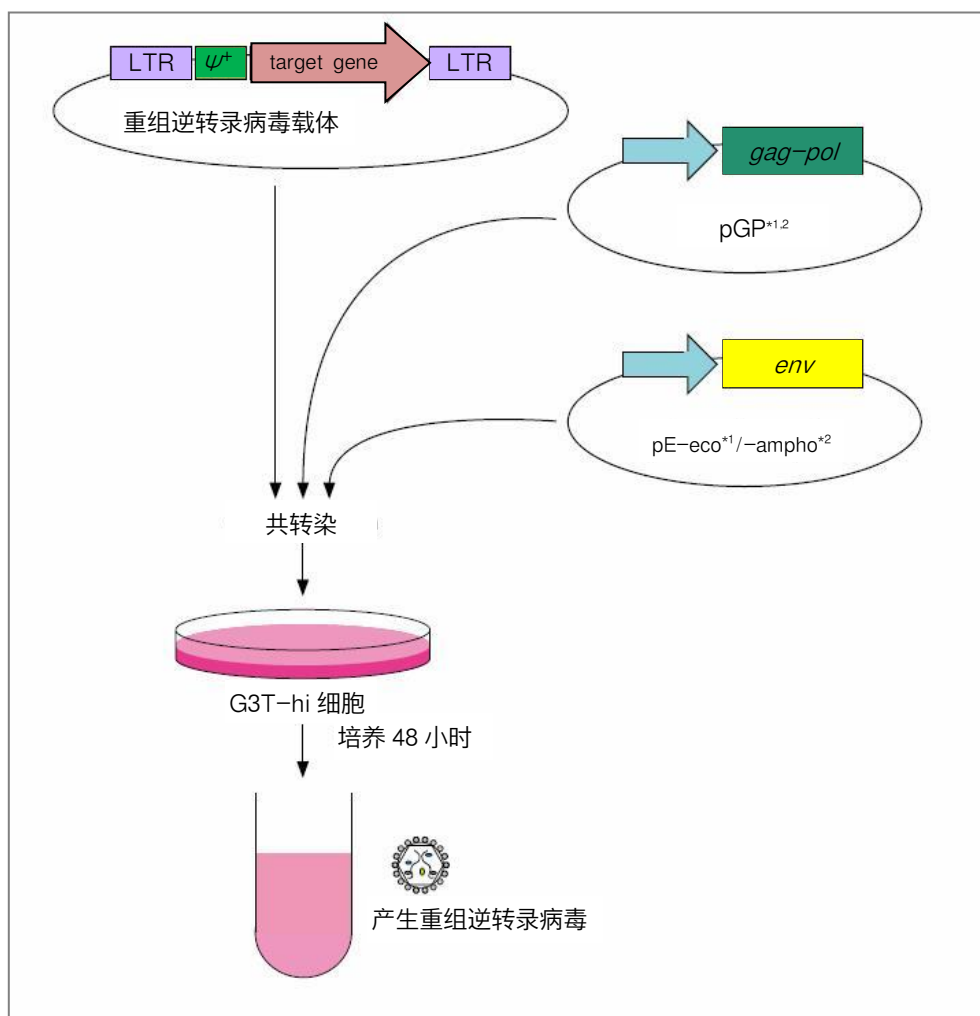


图 1 利用 Retrovirus Packaging Kit 制备重组逆转录病毒的方法

\*1 包含在 Retrovirus Packaging Kit Eco (Code No. 6160) 中。

\*2 包含在 Retrovirus Packaging Kit Ampho (Code No. 6161) 中。

## ● 实验例

利用以下 pDON-AI-2 Neo DNA、pDON-AI-2 DNA、pMEI-5 Neo DNA、pMEI-5 DNA、pDON-5 Neo DNA、pDON-5 DNA 载体，制作重组逆转录病毒实验例。

### 1. 方法

在 pDON-AI-2 Neo DNA、pDON-AI-2 DNA、pMEI-5 Neo DNA、pMEI-5 DNA、pDON-5 Neo DNA、pDON-5 DNA 的 *Bam*H I/*Hpa* I 位点插入 ZsGreen 基因，构建 pDON-AI-2 Neo-ZsGreen、pDON-AI-2-ZsGreen、pMEI-5 Neo-ZsGreen、pMEI-5-ZsGreen、pDON-5 Neo-ZsGreen、pDON-5-ZsGreen 载体。利用 Retrovirus Packaging Kit Ampho (Code No. 6161) 瞬时转染 G3T-hi 细胞制备重组逆转录病毒。

### 2. 结果

#### 2-1. 病毒滴度比较 (表 1, 图 2)

(1) 梯度稀释的逆转录病毒载体在 polybrene 存在下感染 HT1080 细胞，利用流式细胞仪测定 ZsGreen 的导入效率，计算病毒的滴度。

(2) 梯度稀释的逆转录病毒载体感染 HT1080 细胞，在 G418 试剂筛选下计数克隆数，计算病毒的滴度。(只适合 Neo 系列载体使用)

表 1: 逆转录病毒滴度的比较

	(1) ZsGreen / HT1080	(2) G418 / HT1080
	ivp/ml	cfu/ml
DON-AI-2 Neo	$4.08 \times 10^6$	$4.43 \times 10^6$
DON-AI-2	$7.35 \times 10^6$	—
MEI-5 Neo	$3.96 \times 10^5$	$5.88 \times 10^5$
MEI-5	$1.31 \times 10^6$	—
DON-5 Neo	$2.65 \times 10^6$	$3.83 \times 10^6$
DON-5	$3.26 \times 10^6$	—

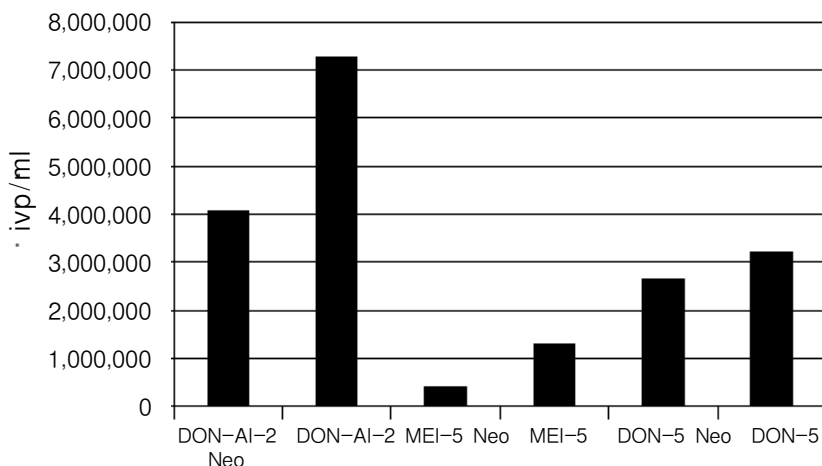


图 2: 逆转录病毒载体的比较 (ZsGreen/HT1080)

#### 2-2. 表达强度的比较 (图 3)

逆转录病毒载体按不同梯度稀释后，使用 polybrene 方法感染 HT1080 细胞，在感染 3 天后，利用流式细胞仪测定基因导入效率和 ZsGreen 的表达强度。基因导入效率在 20% 以下的稀释倍数的表达强度可以看作导入了

单克隆，比较表达强度。以DON-AI-2病毒载体在细胞的表达强度为1作基准。

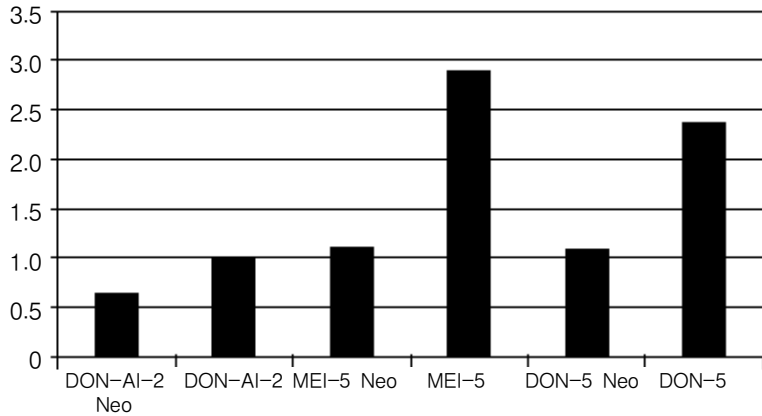


图 3: ZsGreen 表达强度 (1 copy/cell 的荧光强度的平均值的相对值)

## ● 参考文献

- 1) Kim, S.H., Yu, S.S., Park, J.S., Robbins, P.D., and An, C.S. *J Virol.* (1998) **72**: 994–1004.
- 2) Yu, S.S., Kim, J.M., and Kim, S. *Gene Ther.* (2000) **7**: 797–804.
- 3) Lee, J.T., Yu, S.S., Han, E., Kim, S., and Kim, S. *Gene Ther.* (2004) **11**: 94–99.

## ● 关联产品

RetroNectin<sup>®</sup> Recombinant Human Fibronectin Fragment (Code No. T100A/B)  
RetroNectin<sup>®</sup> Dish (RetroNectin Pre-coated Dish, 35 mm  $\phi$ ) (Code No. T110A)  
Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho (Code No. 6160/6161)  
Retro-X<sup>™</sup> Universal Packaging System (Clontech Code No. 631530)  
Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) (Code No. 6166)  
Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time PCR) (Code No. 6167)  
Retro-X<sup>™</sup> qRT-PCR Titration Kit (Code No. 631453)  
Retro-X<sup>™</sup> Integration Site Analysis Kit (Code No. 631467)

## ● 使用注意

1. 使用者在计划将这些产品用于研究用途以外时，必须与 Takara Bio 公司联系。  
有关这些产品的许可问题应直接或通过子公司向 Takara Bio 公司咨询。  
(请参考 Takara Bio 网站<https://www.takarabio.com>)
2. 利用本逆转录病毒载体系列产品制备的病毒上清液，根据插入片段的不同，可能含有危险的病毒。
3. 因此，重组病毒的制备和操作都需要恰当的处理。使用时，请遵从管辖范围内安全部门制定的要求实验。
4. 因使用本产品而产生的事故和损失，本公司概不承担责任。

RetroNectin is a registered trademark of Takara Bio Inc.

Retro-X is a trademark of Takara Bio USA, Inc.

**注意**

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站[www.takara-bio.com](http://www.takara-bio.com)。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。



**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

**TAKARA BIO INC.**

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>