



吉玛基因
www.genepharma.com

吉玛重组腺病毒操作手册

GenePharma Recombinant Adenovirus Operation Manual

2017年6月

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>



吉玛基因

www.genepharma.com

目 录

| | |
|--------------------|----|
| 一、 产品简介 | 4 |
| 二、 腺病毒载体优势 | 4 |
| 三、 生物安全性 | 5 |
| 3.1 安全性 | 5 |
| 3.2 实验室安全措施 | 5 |
| 四、 流程描述 | 6 |
| 五、 材料与仪器 | 7 |
| 5.1 实验材料 | 7 |
| 5.1.1 细胞株 | 7 |
| 5.1.2 质粒 | 7 |
| 5.1.3 试剂 | 8 |
| 5.2 实验耗材及仪器 | 8 |
| 5.2.1 耗材 | 8 |
| 5.2.2 仪器 | 9 |
| 六、 具体步骤 | 9 |
| 6.1 细胞培养 | 9 |
| 6.1.1 活细胞计数 | 9 |
| 6.1.2 细胞株的冻存 | 9 |
| 6.1.3 细胞复苏 | 10 |
| 6.1.4 细胞传代 | 10 |
| 6.2 病毒包装 | 10 |
| 6.3 病毒收集 | 11 |
| 6.4 病毒扩增 | 12 |
| 6.5 病毒纯化 | 12 |
| 6.6 病毒重悬和保存 | 13 |
| 6.7 病毒滴度检测 | 13 |
| 七、 使用方法 | 14 |

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>



GenePharma®

吉玛基因

www.genepharma.com

| | |
|---------------------------|----|
| 重组腺病毒在细胞水平使用 | 14 |
| 7.1 病毒滴度复核（有限稀释法测定） | 14 |
| 7.2 靶细胞感染预实验 | 16 |
| 7.3 正式试验 | 18 |
| 八、 运输和储存 | 18 |
| 九、 常见问题及解决方案 | 19 |
| 十、 吉玛案例 | 20 |
| 十一、 附录 | 21 |

如有疑问欢迎垂询

上海电话：021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话：0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

一、产品简介

腺病毒(Adenovirus, Adv)是一种线性双链 DNA 病毒。腺病毒不仅可以作为哺乳动物基因转移载体而得到广泛应用,亦可被用来在人体细胞中过量表达蛋白(Massie et al., 1998a,b)。迄今为止已有大量关于腺病毒及其应用的综述表明:重组腺病毒在科学研究和治疗应用领域都具有很大的潜力,同时作为基因转移工具相对于其他病毒载体有多方面的优势。

GenePharma 运用了去除 5' ITR、包装信号和 E1 序列的全新的腺病毒骨架基因,无需进行细菌体内的同源重组步骤,无需使用多蚀斑分离方法分离目的重组腺病毒的步骤,因此较其他系统生长更快,并且大大降低了重组形成野生型可复制腺病毒的危险;无E1a,不产生复制型腺病毒,因此更为安全。

二、腺病毒载体优势

- 1) 可感染的细胞种类多,宿主范围广,几乎可以感染所有类型的细胞;
- 2) 感染效率高,重组腺病毒被广泛应用于使用脂质体转染效率较低细胞的基因转导和蛋白表达;
- 3) 包装外源基因的片段大,高达 8kb;
- 4) 腺病毒载体构建及包装容易操作,易于制备出滴度高的大量病毒;
- 5) 当腺病毒感染细胞后,病毒基因组存在于细胞染色体外,不整合到细胞染色体中,避免了因整合引起的基因突变及激活致癌基因,生物安全性高。

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

三、生物安全性

3.1 安全性

GenePharma 运用了去除 5' ITR、包装信号和 E1 序列的全新的腺病毒骨架基因，大大降低了重组形成野生型可复制腺病毒的危险；无 E1a，除 293 细胞等能反式提供 E1 蛋白的细胞株外，重组腺病毒在其它细胞当中都无法复制。所生产的腺病毒只能用于科学研究，不能用于诊断和治疗。

重组腺病毒的安全等级被 NIH 官方定为 BL-2 级，使用时请严格遵从 NIH 推荐的安全指南。更多生物安全标准信息，您可以从 <http://bmbi.od.nih.gov/> 获得。

3.2 实验室安全措施

- 1) 在实验室工作时，请穿着连体衣、隔离服或工作服；应戴上合适的手套和口罩。
- 2) 病毒操作时请使用生物安全柜。如果使用普通的超净工作台操作病毒，请在取用病毒前关闭风机，并在关闭所有含有病毒的相应容器盖子后，再打开风机。
- 3) 所有操作请尽量减少气溶胶和微小液滴的形成。如果出现病毒污染，请立即用 70% 的酒精加 1% SDS 溶液擦拭干净。
- 4) 如需离心，应使用密封性好的离心管，可用 Para film 膜封口后在专用离心机中离心。
- 5) 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，并在使用 70% 乙醇清理瓶外壁后到显微镜处观察拍照。离开显微镜试验台之后，用 70% 乙醇清理显微镜实验台。
- 6) 所有受到污染的材料、标本和培养物在废弃或清洁再利用之前，必须清除污染。

如有疑问欢迎垂询

上海电话：021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话：0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

废弃的含病毒的培养基加入 84 消毒液（1:20 左右），浸泡一天后丢弃。接触过病毒的枪头，离心管，培养板等其他物品可用 84 消毒液稀释液处理，也可以用煮沸处理半小时或高压湿热灭菌（121°C，30min）。

7) 手套用完后，应先消毒再摘除，随后必须洗手。

四、流程描述

制备腺病毒颗粒的穿梭质粒及其骨架质粒，上述质粒载体分别进行高纯度无内毒素抽提，用本公司的转染试剂 RNAi-Mate 进行共转染 293A 细胞，转染后 6 h 更换为完全培养基，培养十几天，每七天左右补充一次新鲜培养基，然后收集细胞和上清液置于离心管中，冻融三次，2000rpm 离心 5 分钟，取上清即为病毒液初代原液。连续三代反复扩增收集病毒后，行病毒的大量扩增，而后对其纯化和浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液，在 293T 细胞中测定并标定病毒滴度。在一定滴度范围内的腺病毒颗粒可以满足大部分体内体外实验需求。

如有疑问欢迎垂询

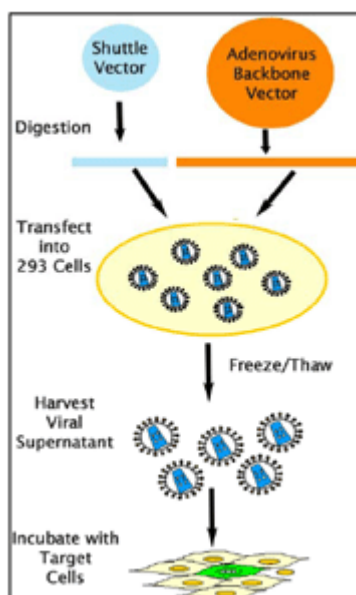
上海电话：021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话：0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>



五、材料与仪器

5.1 实验材料

5.1.1 细胞株

293A, 腺病毒的包装细胞, 为贴壁依赖型上皮样细胞, 经培养生长增殖形成单层细胞, 购自中国科学院细胞库, 常规培养使用含 10% FBS 的 DMEM (含 4.0 mM L-Glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 ug/ml Streptomycin) 中, 37°C 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。

5.1.2 质粒

重组穿梭质粒和包装质粒由吉玛构建制备, 使用了全新的腺病毒骨架基因 (缺失

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

左侧 ITR、包装信号和 E1 序列），无需进行 pAdEasy 的细菌体内的同源重组步骤，无需使用多蚀斑分离方法分离目的重组腺病毒的步骤，因此不管是操作上还是时间上都进行了很大的提升。该腺病毒表达系统较其他系统生长更快，只需要 2 周时间；并且大大降低了重组形成野生型可复制腺病毒的危险，无 E1a，不产生复制型腺病毒。

5.1.3 试剂

| 试剂名称 | 试剂来源 | Cat No. |
|--------------------------|---------|-----------|
| DMEM | GIBCO | 12100-046 |
| 胎牛血清 FBS | GIBCO | 10099-141 |
| 胰酶 Trypsin-EDTA Solution | GIBCO | 25200-072 |
| 双抗（青链霉素） | GIBCO | 15140-122 |
| Hepes | AMRESCO | 7365-45-9 |
| RNAi-Mate 转染试剂 | 吉玛基因 | G04001 |
| Polybrene | Sigma | H9268 |

5.2 实验耗材及仪器

5.2.1 耗材

| 耗材名称 | 耗材来源 | Cat No. |
|----------|------------------|---------|
| 10cm 培养皿 | Corning | 430167 |
| 15cm 培养皿 | Corning | 430599 |
| 50ml 离心管 | Corning | 430828 |
| 过滤器 | Sartorius Stedim | 16533 |

如有疑问欢迎垂询

上海电话：021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话：0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

| | | |
|-------|---------|------|
| 96 孔板 | Corning | 3599 |
|-------|---------|------|

5.2.2 仪器

| 仪器名称 | 耗材来源 | Cat No. |
|-----------|---------------|-----------|
| 二氧化碳培养箱 | 日本三洋 SANYO | MCO-15AC |
| 生物安全柜 | 上海上净净化设备有限公司 | BSC-II A2 |
| 台式高速冷冻离心机 | 长沙湘仪离心机仪器有限公司 | TGL-20M |
| 超速离心机 | BECKMAN | A1330011 |
| 荧光显微镜 | Motic | AE31-252B |

六、具体步骤

6.1 细胞培养

6.1.1 活细胞计数

用无血清培养基把细胞悬液稀释到 200~2000 个/ml (一般稀释倍数为 100 倍), 在 0.1ml 的细胞悬液中加入 0.1 ml 的 0.4% 的台盼兰溶液。轻轻混匀, 数分钟后, 用血球计数板计数细胞。活细胞排斥台盼兰, 因而染成蓝色的细胞是死细胞。

6.1.2 细胞株的冻存

- 1) 取培养 2~3 天生长旺盛的细胞, 用细胞培养液将细胞配成 $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ /ml。

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

- 2) 在 1 ml 细胞冻存管中加入 0.5 ml 细胞悬液, 0.4 ml 小牛血清和 0.1 ml 二甲基亚砷(或甘油), 混匀后密封。置 4°C 1 小时, -20°C , 2 小时, 然后直接放入液氮中或置液氮蒸汽上过夜后浸入液氮中。

6.1.3 细胞复苏

- 1) 从液氮罐中取出细胞冻存管, 应带防护眼睛和手套。
- 2) 迅速放入盛有 37°C 水的水浴中, 并不时摇动, 尽快解冻。
- 3) 2000rpm, 3min 离心。
- 4) 用 70%酒精擦拭消毒后, 移至净化台上, 吸出上清液, 加 3 ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 吹打均匀, 加入到 6cm 培养皿中, 置温箱培养。
- 5) 次日更换一次培养液后再继续培养。

6.1.4 细胞传代

- 1) 弃去旧培养液, 加入 5 ml 灭菌 PBS 溶液, 轻轻晃动, 洗涤细胞生长面, 然后弃去 PBS 溶液。
- 2) 加入 2 ml 胰酶消化液, 消化 1- 2 min 直到细胞完全消化下来。
- 3) 加入含 10%胎牛血清和 100 U/ml 双抗的 DMEM 培养基 5 ml, 用刻度吸管吹打数次, 将瓶壁上的细胞冲洗下来。
- 4) 混匀细胞后分至两个新的培养瓶中, 继续培养。

6.2 病毒包装

- 1) 293A 细胞在 10cm 培养皿中培养至 80-90%融合时, 接种 6 cm 培养皿。
- 2) 倾去培养液, 用 1 ml D-Hank's solution 洗涤细胞两次。

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

- 3) 加入 1 ml Trypsin-EDTA solution, 混匀后, 37°C 放置 2-3 分钟。
- 4) 小心吸去胰酶溶液, 加入 2 ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 吹打使细胞形成单细胞悬液。
- 5) 将 0.5mL 细胞悬液接种 6 cm 培养皿, 加入 4ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 混匀后 37°C 5% CO₂ 培养过夜。
- 6) 在一支无菌的 1.5ml 离心管中加入 0.5ml 无血清 DMEM, 按比例加入含客户目的序列的穿梭质粒和骨架质粒, 混匀, 取另一支无菌的 1.5ml 离心管, 加入 0.5ml 无血清 DMEM, 再加入 30ul RNAi-Mate, 混匀, 室温放置 5 分钟后将两管混合, 室温放置 20~25 分钟。
- 7) 除去 6cm 培养皿中的培养液, 加入 3ml 无血清的 DMEM 培养液。
- 8) 将转染混合物逐滴加入 6cm 培养皿中, 轻轻地前后摇晃培养皿以混匀复合物, 在 37°C 5% CO₂ 培养箱中温育 4-6 小时。
- 9) 吸弃转染液, 加入 4ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养液。37°C 5% CO₂ 继续培养。

6.3 病毒收集

- 1) 孵育 7 天后, 检查是否存在空斑。如果可以收获 (剩余>50%的细胞), 然后收集病毒裂解原液。如果不能收获, 添加 1 mL 完全培养基, 继续在 CO₂、37°C 下孵育;
- 2) 第 10 天, 检查是否存在空斑。如果可以收获 (剩余>50%的细胞), 然后收集病毒裂解原液。如果不能收获, 添加 1 mL 完全培养基, 继续在 CO₂、37°C 下孵育。持续检查是否存在空斑, 但不要超过 15 天;
- 3) 用 5 或 10ml 无菌吸管将含腺病毒的细胞从皿上吹下, 将细胞和培养基转移到一

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

个 15ml 管中，必要时使用细胞刮。

- 4 37°C水浴和干冰-甲醇浴，每次 10 分钟，反复冻融三次释放病毒。
- 5 室温下，细胞溶胞产物在台式离心机中以 3000rpm 离心 15 分钟以沉淀细胞碎片。
- 6 分装并-80°C 储存病毒裂解原液（初始病毒原料）。

6.4 病毒扩增

- 1) 感染前一天，按 $3-5 \times 10^6$ 个细胞铺一个 15 cm 培养皿。
- 2) 加入 50% 的上述病毒裂解原液至培养基。我们建议使用大于 >0.5 PFU（空斑形成单位）或足够的病毒使细胞在 48h 内表现细胞病变效应（CPEs）。
- 3) 在感染 24 – 48h，每天两次显微镜下检查细胞病变效应（CPE）。当 CPE 是接近完成（即大多数细胞圆，但尚未脱离瓶底）时，用移液管将感染的细胞从皿上吹到培养基中，收获细胞。
- 4) 合并感染的细胞和培养基。在 1000g 下离心 5 分钟沉淀细胞。吸弃上清液，用培养基或 10 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl 重悬细胞（每 15 cm 培养皿 0.25-0.5 毫升）。
- 5) 反复冻融三次释放腺病毒，3000 g 10 分钟离心，以沉淀细胞碎片。弃去沉淀，保存病毒上清物。
- 6) 病毒上清可以储存在-80°C，或立即纯化或滴度检测。

6.5 病毒纯化

- 1) 病毒纯化采用 CsCl 密度梯度离心-透析联用法纯化病毒，CsCl 梯度的制备方法如下：加入 2.0ml 密度为 1.40g/ml 的 CsCl 溶液，然后缓慢加入 3.0ml 密度为 1.30g/ml 的 CsCl 溶液，再加入 5ml 的病毒悬浮液。

如有疑问欢迎垂询

上海电话：021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话：0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

- 2) 20000rpm, 室温离心 2 小时。
- 3) 收集密度在 1.30g/ml 和 1.40g/ml 之间的病毒条带至透析袋中 (透析袋使用前用 10mM 的 EDTA-Na₂ 煮沸 10min)。在透析缓冲液 (50g 蔗糖, 10ml 1M Tris-HCl, PH8.0, 2ml 1MMgCl₂ 定容至 1L) 中。
- 4) 4°C 搅拌透析过夜, 中间换一次透析液。收集病毒。

6.6 病毒重悬和保存

- 1) 500ul PBS 重悬病毒沉淀, 一周内使用则置于 4 度冰箱保存。
- 2) 如需长时间存放需置于 -80°C 甚至液氮保存。

6.7 病毒滴度检测

- 1) 采用微量全细胞病变法检测病毒滴度 (参考复旦大学遗传学研究所方法), 取 96 孔板 1 块, 每孔加入 293T 细胞 10⁴ 个, 加液量 200ul, 置孵箱培养 24 h。待测病毒用 DMEM 全培养基稀释至 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 等稀释度。吸去上清后, 分别加入每个稀释度的病毒液体, 每孔 200 ul, 每种样本均作复孔, 同时设培养基对照 (不含腺病毒)。再置于 37 °C、5% CO₂ 条件下继续培养 36 ~ 48 h。镜检观察 CPE 现象, 按公式②(美国 Baxter 公司张维维博士提供) 计算病毒滴度。
- 2) 按 MOI 100 接种腺病毒后 72 h, 40 倍光镜下观察, 293T 细胞出现完全 CPE 现象: 95% ~ 100% 的细胞变圆, 其中约 60% 脱落浮起, 未浮起者有聚集融合

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

现象。收集并裂解细胞获得待测腺病毒。

- 3) 用微量全细胞病变法检测腺病毒滴度。按 10^4 /孔 293T 细胞接种腺病毒后 36 ~ 48 h, 观察到在 10^{-2} 、 10^{-3} 稀释度的样本中 293T 细胞出现完全 CPE 现象: 90% 细胞变圆, 10% 细胞浮起。按上述公式计算扩增所得腺病毒的滴度约为 5×10^8 PFU/ml。(通过不同的检测方法, 滴度会有差异, 请在试验过程中注意生物安全要求。)

七、使用方法

重组腺病毒在细胞水平使用

腺病毒有很广泛的宿主范围, 可以感染多数人类或者其他哺乳动物细胞系或部分原代细胞。

要得到最佳的实验结果, 确定腺病毒的最佳用量是非常重要的。用量不足, 则不能达到理想的感染效率; 用量过大, 会对细胞有毒害作用或者其他不可预测的效应。最佳用量因不同的细胞类型而有显著差异。

为了确定最适病毒用量, 可使用 Genepharma 提供的携带报告基因的阴性对照腺病毒做预实验。用不同稀释倍数的阴性对照腺病毒感染细胞, 在感染 1-3 天后检测感染效率。通过在显微镜下观察细胞的报告基因的表达情况来确定既达到所需感染效率又不会引起细胞表型变化的病毒浓度范围。

7.1 病毒滴度复核 (有限稀释法测定)

- 1) 滴度检测前一天, 对 293T 细胞传代, 96 孔板每个孔加入约 $0.5 \sim 10 \times 10^3$ 个细胞, 体积 100ul;

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

- 2) 第二天, 准备 7~10 个无菌 EP 管, 在每个管中加入 90ul 的新鲜完全培养基 (高糖DMEM+10%FBS);
- 3) 取待测定的病毒原液 10ul 加入到第一个管中, 轻轻混匀后, 取 10ul 加入到第二个管中, 然后依次操作直到最后一管;
- 4) 选取所需的细胞孔, 吸弃 90ul 培养液, 然后将稀释好的病毒液, 从低浓度到高浓度依次加入, 放入 37°C 5% CO₂ 培养箱中培养;
- 5) 24 小时后, 每孔换入 100ul 新鲜培养液, 小心操作, 不要吹起细胞; 放入 37°C 5% CO₂ 培养箱中继续培养。
- 6) 1~3 天后, 观察荧光表达情况, 正常情况下, 荧光细胞数随稀释倍数增加而相应减少, 计数最后二个含有荧光细胞的孔中的荧光细胞个数, 将得到的数值除以各自相应的稀释倍数, 即可计算出病毒原液的滴度值 (通常以倒数第二个孔中的读数数值更为准确)。

注释:

- 1) 典型的病毒滴度测定结果见图一 (Fig. 1);

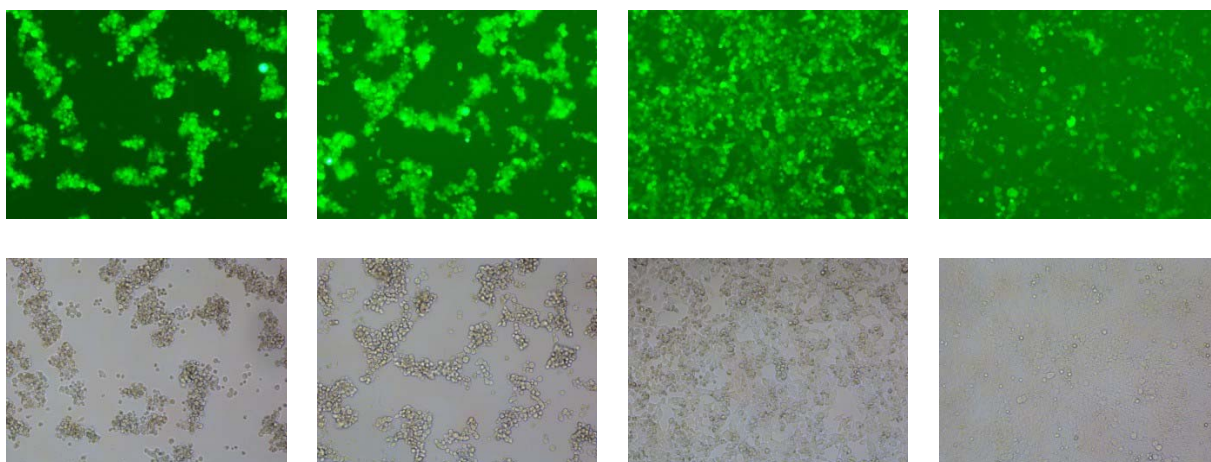


Fig. 1 典型的腺病毒滴度

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

2 病毒滴度测定结果还依赖于本身实验系统，如 293T 细胞代数、细胞状态、荧光显微镜品质、相关实验试剂及实验人员操作技能，因此不同实验室测得滴度数值会有所差异（2~10 倍），但基本不会影响正常实验流程；

3 病毒滴度(BT = PFU/ml, transducing units)计算方法：

$$\text{PFU/ml} = \frac{\text{接种细胞数} \times \text{稀释度} \times 10 \text{Ad/cell}}{V \text{ (加入的病毒体积)}}$$

按 10^4 /孔 293T 细胞接种腺病毒后 36~48h，观察到在 10^{-2} 、 10^{-3} 稀释度的样本中 293T 细胞出现完全 CPE 现象：90%细胞变圆，10%细胞浮起。按上述公式计算扩增所得腺病毒的滴度约为 5×10^8 PFU/ml。

常用腺病毒滴度检测方法比较

| 方法 | 类型 | 时间 | 优缺点 | 可重复性 |
|--------|-------|-----|--------------------------------|------|
| VP | 物理学方法 | 2小时 | 较为稳定，不能区分感染性和缺陷性病毒颗粒 | 好 |
| GTU | 生物学方法 | 2天 | 含有报告基因如GFP或LacZ等则可以用这种方法进行测定 | 可变 |
| PFU | 生物学方法 | 21天 | 重复性不好 | 变化很大 |
| TCID50 | 生物学方法 | 10天 | 速度是PFU的2倍，结果更具预料性，在不同操作个体间也更稳定 | 可变 |

7.2 靶细胞感染预实验

如有疑问欢迎垂询

上海电话：021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话：0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

- 1) 试验前一天分别接种 $3\sim 5\times 10^3$ 个目的细胞于 96 孔培养板每孔中，所加培养基体积为 100uL。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度为 60~80%。因为腺病毒表达需要一定的时间，故在进行感染实验时细胞接种不宜过密。
- 2) 干扰预试验共分为二组，每组均有不同梯度的 MOI 值 (Multiply of Infection)。第一组为正常情况下感染，也就是在完全培养基中直接加入病毒。第二组为感染时添加 3~8 ug/mL 的 Polybrene。Polybrene 在大部分细胞中可以有效的提高感染效率。
- 3) 感染前为细胞换液，吸去细胞上清，按不同的分组情况加入所需的培养基 90uL，每组三个复孔。
- 4) 准备 3 个无菌的 EP 管，吸取 10ul 的 1×10^8 TU/ml 的病毒 (预先从 -80°C 取出，迅速融化，4°C 低温操作) 加入到第一个管子中，轻柔混匀，勿产生泡沫。同样从第一管中吸取 10ul 的病毒到第二管中，混匀。再从第二管中吸取 10ul 的病毒到第三管中，混匀。这样就得到了四个不同梯度的病毒：原液，10 倍稀释，100 倍稀释，1000 倍稀释。
- 5) 把细胞放回培养箱孵育。
- 6) 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，表明腺病毒对细胞没有明显毒性作用，请不要换液，继续培养，直至 24 小时后更换为新鲜培养基。
- 7) 感染 48~72 小时后，观察荧光表达情况。对于生长迟缓代谢慢的细胞，可以适当延长观察时间，中途可以换液保持细胞的良好状态。如无荧光标记可以通过 Real-time-PCR 检测目的基因的表达或通过 western blot 检测目的基因蛋白的表达情况来评估感染效率。

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

- 8) 以上的操作是针对贴壁细胞设计的。悬浮细胞的区别主要在细胞的分盘上，它不需要提前一天分盘。操作时直接将细胞离心后悬浮在不同的培养基中，计数分盘后，即可加入病毒。
- 9) 通过首次实验和重复实验，确认目的细胞的感染方法和感染参数。

7.3 正式试验

通过预实验可以帮助确定使用重组 Adenovirus 颗粒感染目的细胞的优化条件，如细胞接种密度，是否需要添加 Polybrene，合适的 MOI 值等参数。正式实验前，调整并保持细胞的良好状态是非常重要的。有些对 Polybrene 敏感，建议不能添加 Polybrene 去增强感染效率。

Adenovirus 表达时间较长，但在一般代谢较旺盛的细胞（如293T，BHK21 等）上，病毒感染24hrs 后可以观察到 GFP 荧光；代谢比较缓慢的细胞（如原代培养细胞，神经干细胞，胚胎干细胞等）GFP 蛋白表达时间较长，感染后 72-96hrs 甚至更长时间才可以观察到 GFP 荧光。感染后的细胞可以连续培养一周，通过观察 GFP 的表达时间和表达强度来确定 Adenovirus 对目的细胞的感染情况。感染后期请根据细胞生长的情况对细胞进行及时换液和传代，以保证细胞良好的生长状态。

八、运输和储存

对于长距离运输，应先将腺病毒载体保存在-80°C，再采用全程干冰运输，以防滴度下降。

腺病毒载体在-80°C保存6个月，滴度不会明显下降。建议保存6~12个月以上的样品，进行实验前，重新测一次滴度。应尽量避免反复冻融（小于3次）。

如有疑问欢迎垂询

上海电话：021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话：0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

使用前从-80℃取出病毒，室温迅速融化，操作过程应置于冰盒上进行。用不完的病毒可以暂时放在-20℃冰箱中，但最好尽快用完。

九、常见问题及解决方案

1) Q: 通常在转移载体中最大能够插入多大的目的基因序列?

A: 腺病毒作为优秀的外源基因转移载体，通常原则上插入的目的基因序列可达6~8kb。

2) Q: Adenovirus 对目的细胞的感染效率很低，如何提高病毒的感染效率?

A: 一般，我们通过提高病毒稀释度来提高病毒的转染效率，必要时可在培养基中加入 Polybrene (3-8μg/ml) 来提高病毒的感染效率。同时，目的细胞良好的生长状态是获得正常感染效率的保证。

3) Q: 目的细胞可以被 Adenovirus 感染，但是 GFP 荧光强度很弱，为什么?

A: 目的细胞中 GFP 荧光强度取决于病毒感染细胞的颗粒数、细胞本身的增殖状态、细胞类型以及观察时间等。一般来讲，目的细胞感染病毒颗粒数越多，细胞本身增殖越快，GFP 荧光会越强。Adenovirus 属于腺病毒，一般在增殖较快的细胞中病毒感染 48-72h 后，GFP 基因表达才达到高峰。对于增殖较慢的细胞，GFP 基因表达时间还会延长。

4) Q: 加入病毒后，目的细胞死亡很厉害，为什么?

A: Adenovirus 可能对您的目的细胞有一定的毒性，请降低感染时的病毒稀释度，并且在 4hrs, 8hrs 或者 12hrs 后对细胞进行换液，用新鲜的完全培养液继续培养观察。

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

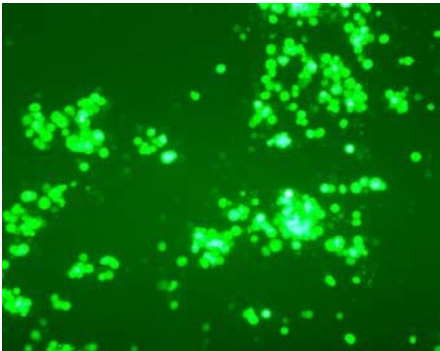
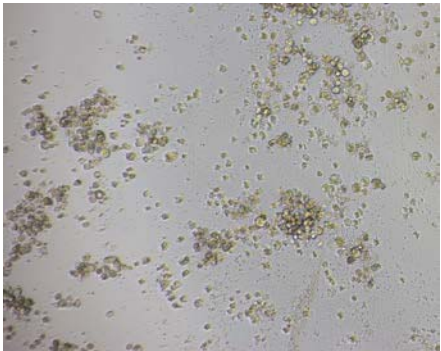
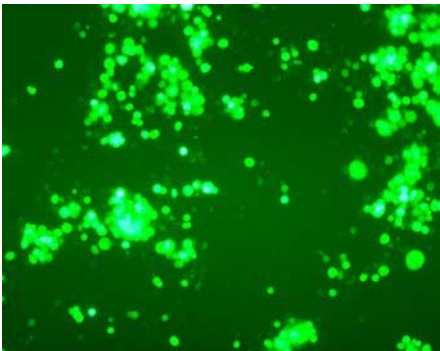
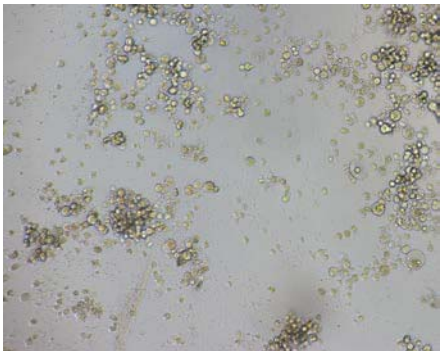
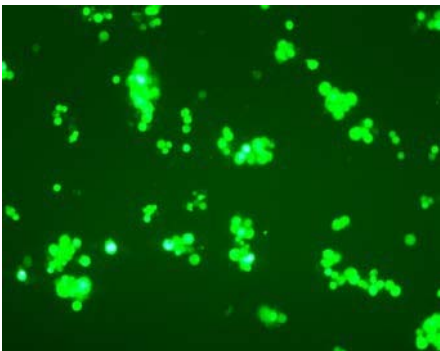
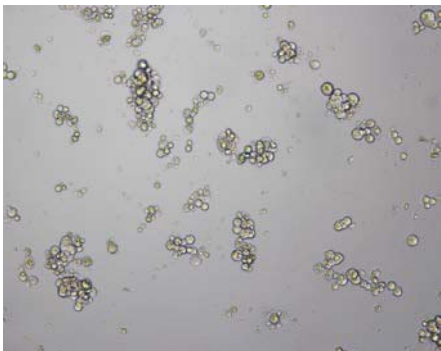
苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

十、吉玛案例

病毒滴度测定：

| | 荧光视野 | 明视野 |
|-----------|---|--|
| 10^0 |  |  |
| 10^{-1} |  |  |
| 10^{-2} |  |  |

如有疑问欢迎垂询

上海电话：021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话：0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>



GenePharma

吉玛基因

www.genepharma.com

| | | |
|-----------|--|--|
| 10^{-3} | | |
| 10^{-4} | | |
| 10^{-5} | | |

十一、 附录

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

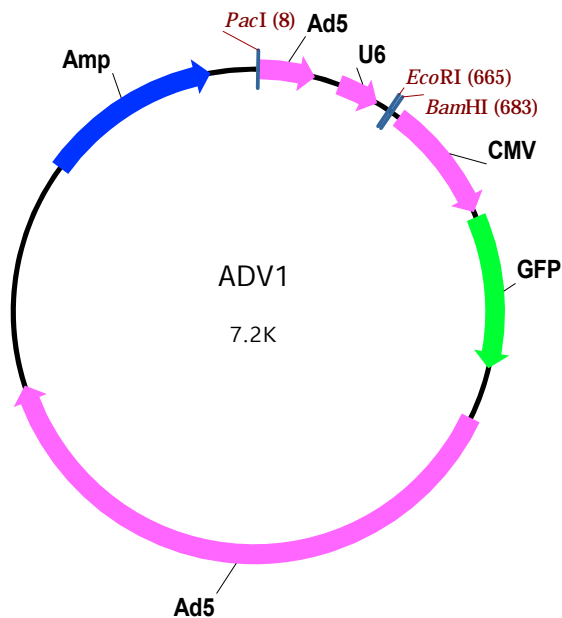
苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

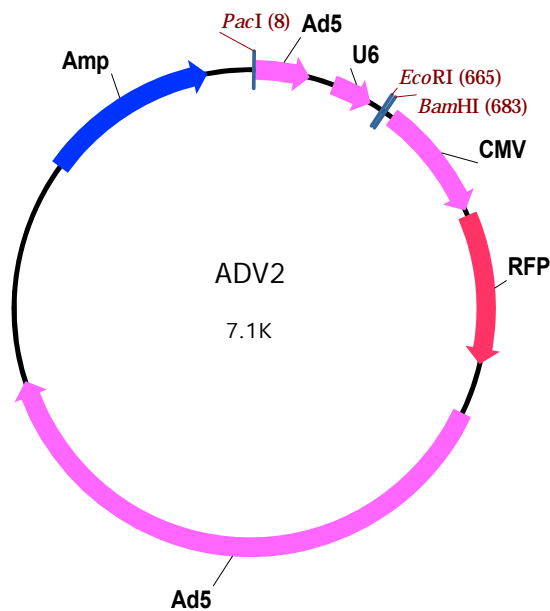
<http://www.genepharma.com>

1. 质粒图谱

1.1 ADV1 穿梭质粒



1.2 ADV2 穿梭质粒



如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

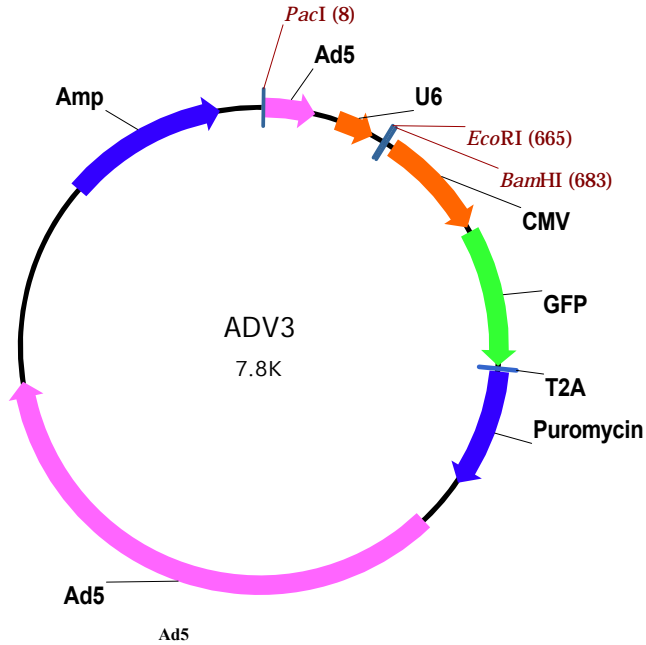
苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

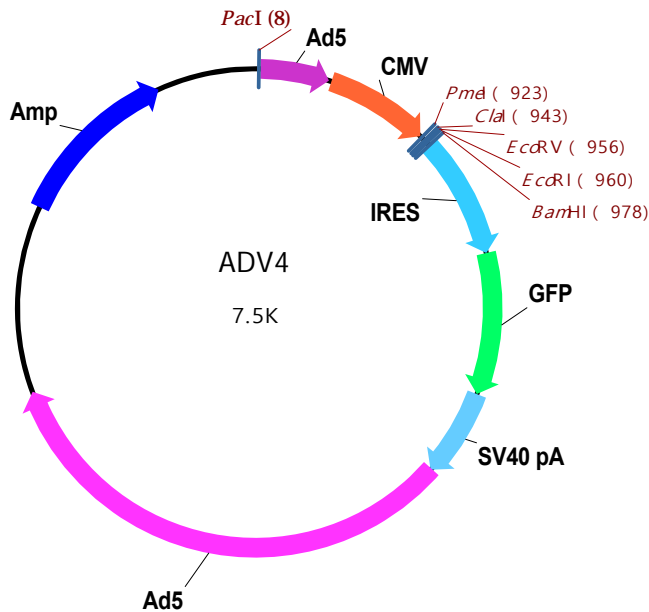
<http://www.genepharma.com>



1.3 ADV3 穿梭质粒



1.4 ADV4 穿梭质粒



如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

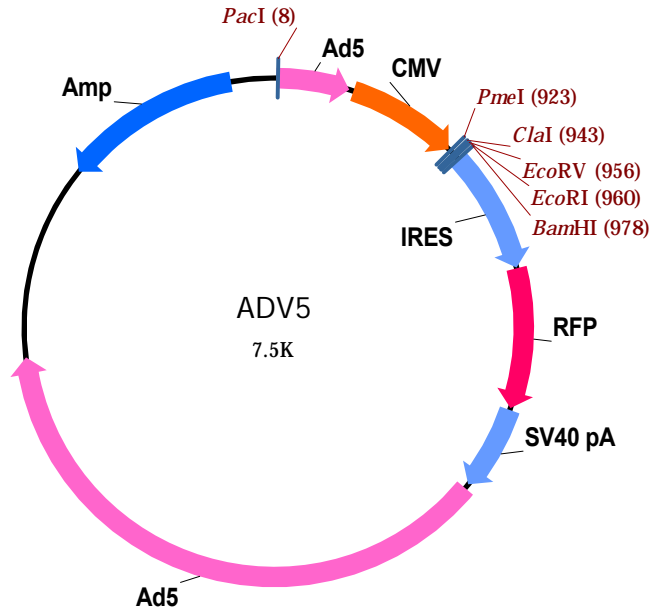
苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

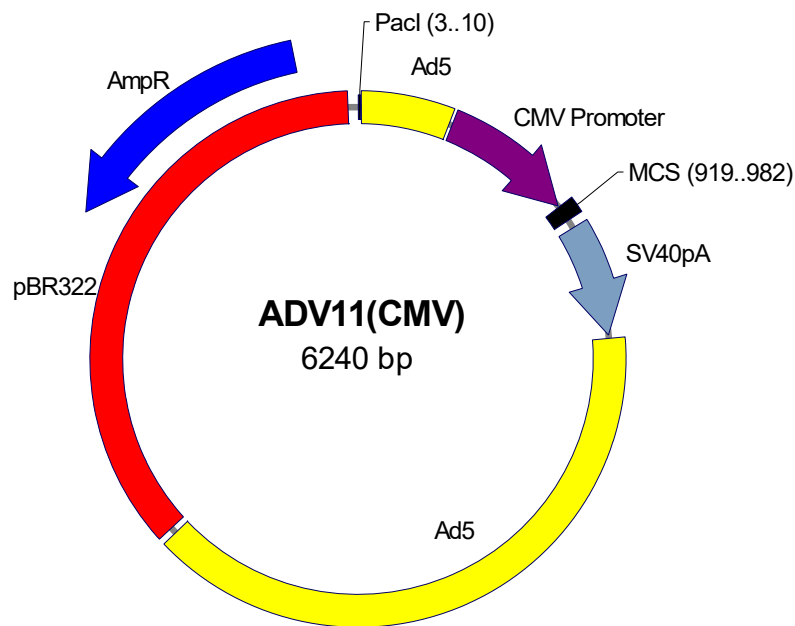
<http://www.genepharma.com>



1.5 ADV5 穿梭质粒



1.6 ADV11穿梭质粒



如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

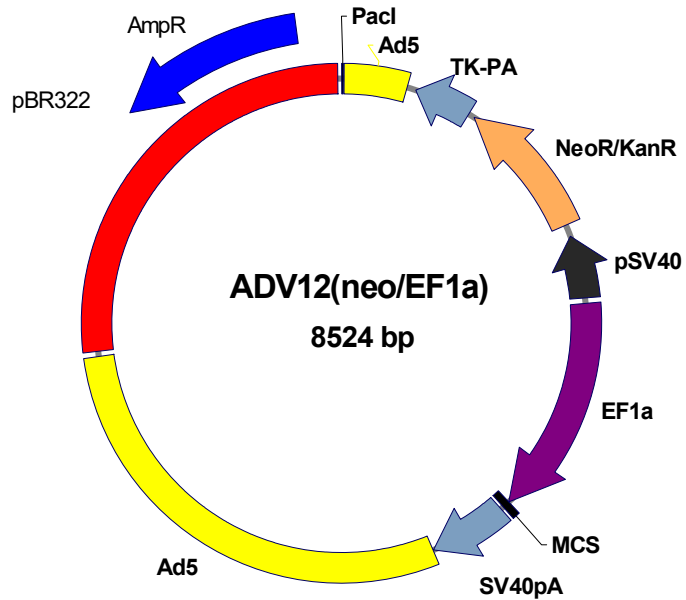
苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

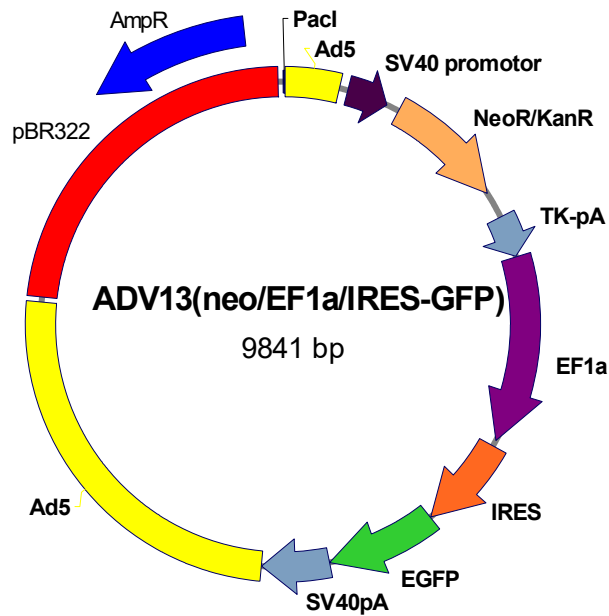
<http://www.genepharma.com>



1.7 ADV12穿梭质粒



1.8 ADV13穿梭质粒



如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

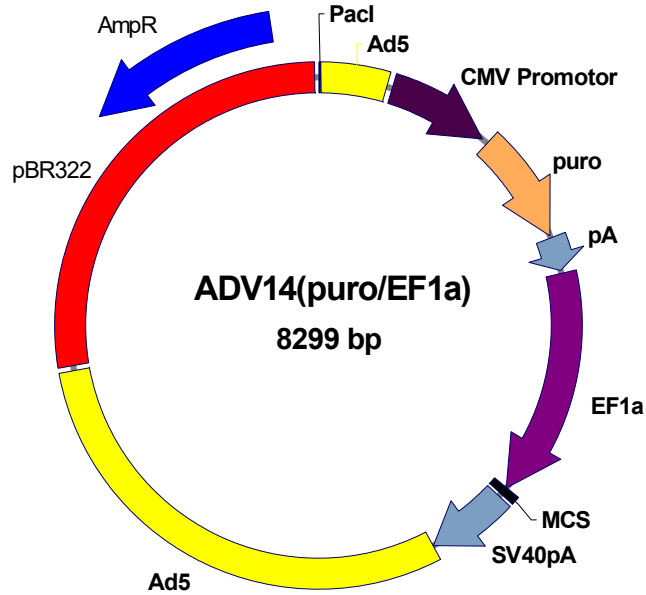
苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

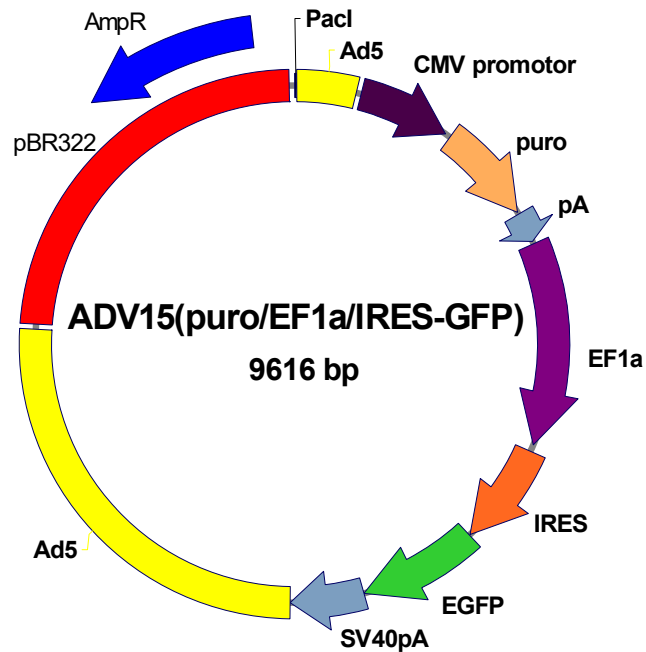
<http://www.genepharma.com>



1.9 ADV14穿梭质粒



1.10 ADV15穿梭质粒



如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

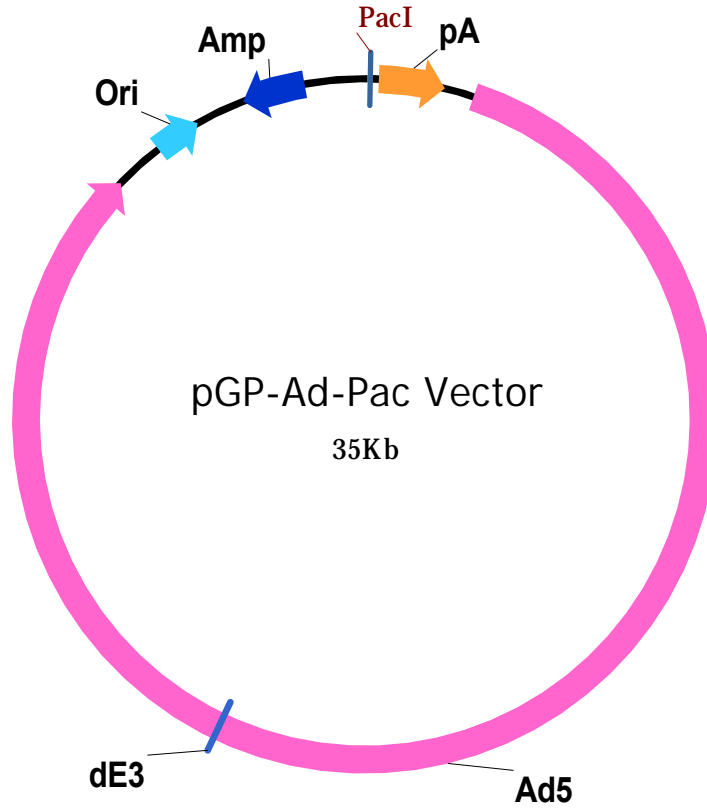
苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>



1.11 骨架质粒



如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>



吉玛基因
www.genepharma.com

上海吉玛制药技术有限公司

电话：021-51320195，51370738，51370739

传真：021-51320295

地址：上海浦东新区张江高科技园区哈雷路 1011 号邮编：201203

E-mail：order@genepharma.com

网址：www.genepharma.com

苏州吉玛基因股份有限公司

电话：0512-8666 8828

传真：0512-8666 5900

地址：苏州工业园区东平街 199 号邮编：215125

E-mail：szorder@genepharma.com

网址：www.genepharma.com

如有疑问欢迎垂询

上海电话：021-51320195-8009

E-mail：rnaisupport@genepharma.com

苏州电话：0512-86668828-8042

E-mail：szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>