

腺相关病毒 操作手册

☎ 售前tel:400-092-0065
☎ 售后tel:400-092-0566



扫一扫 关注汉恒生物公众号
咨询更多服务内容

汉恒生物科技（上海）有限公司

- 📍 地址：上海浦东新区蔡伦路150号1号楼
- ✉ 邮箱：service@hanbio.net
- ☎ 电话：021-51296258
- ☎ 免费热线：400-092-0065
- 🌐 <http://www.hanbio.net>

目 录

腺相关病毒安全使用注意事项 /01

腺相关病毒的存储与稀释 /01

腺相关病毒的感染与使用 /02

-各脏器AAV注射方式 /02

-AAV注射指南 /04

1、尾静脉注射 /04

2、肝门静脉注射(肝脏AAV局部递送) /04

3、脑立体定位注射 /05

4、无创气管插管法(肺部病毒递送) /05

5、乳腺脂肪垫注射 /06

6、肾盂感染(肾脏AAV递送) /06

7、腿部骨骼肌注射 /06

8、玻璃体腔注射 /07

9、鞘内注射 /07

-AAV注射后的观察 /07

腺相关病毒的FAQ /11

为了确保您的实验准确严谨,建议您拿到病毒后先进行预实验,确定好最适合您实验的病毒用量、操作方式和感染效果后再进行正式实验!

腺相关病毒安全使用注意事项

- 01 腺相关病毒相关实验请在生物安全柜(BL-2级别)内操作。
- 02 操作病毒时请穿实验服,佩戴口罩和手套,尽量不要裸露双手及手臂的皮肤。
操作病毒时特别小心病毒溅出。如果操作时超净工作台有病毒污染,请立即用70%乙醇加1%的SDS溶液擦拭干净。接触过病毒的枪头,离心管,培养板,培养液请用84消毒液浸泡后统一处理。
- 03 如需要离心,应使用密封性好的离心管,如有必要请用封口膜封口后离心。
- 04 病毒相关的废弃物需要特殊收集,统一经高温灭菌处理。
- 05 实验完毕用肥皂清洗双手。

腺相关病毒的存储与稀释

+ 腺相关病毒的储存

收到病毒液后如在短期内使用腺相关病毒进行实验,可以将病毒暂时放置于4℃保存(尽量一周内用完);如需长期保存请分装后放置于-80℃。

注:a. 在病毒使用过程中应尽量避免反复冻融,反复冻融会降低病毒滴度(每次冻融会降低病毒滴度10%-50%);汉恒生物前期对病毒进行了分装(200 μL/tube),收到后直接放置-80℃保存即可。

b. 如果病毒储存时间超过6个月,我们建议在使用前重新测定病毒滴度。

当需要稀释病毒时, 请将病毒取出置于冰浴融解后, 使用培养目的细胞的PBS或生理盐水混匀分装后置于4°C保存(请尽量一周内用完)。

腺相关病毒的感染与使用

+ 各脏器AAV注射方式

AAV病毒主要应用于在体组织器官的感染, 根据不同的组织选择合适的血清型, 可用于神经系统、眼睛、心肌、肝脏、肺脏、肾脏和肌肉等组织器官。

表1. 不同AAV血清型对各组织器官细胞亲和性

血清型名称	对应特异性组织/细胞
AAV1	神经, 肠道
AAV2	玻璃体腔, 神经, 肾
AAV5	肺, 软骨, 肠道
AAV6	肺
AAV8	肝脏
AAV9	肝脏, 心脏, 肾脏, 神经, 肠道, 肌肉, 皮肤等
AAV-lung	肺
AAV-pan	胰腺
AAV-DJ	视网膜下腔
AAV-GL/AAV-NN	视网膜
AAV-shH10	视网膜穆勒细胞
AAV-Retro	逆行示踪
AAV-BBB2.0	穿越血脑屏障
AAV-cap-B10	穿越血脑屏障升级版
AAV-br1/AAV-BI30	脑血管内皮细胞
AAV-eVEC	外周血管内皮
AAV-Vec	内皮细胞
AAV-anc80L	视网膜, 内耳
AAV-ie	内耳
AAV-BLS	膀胱

表2. 注射方式及血清型推荐

注射部位	推荐血清型	注射方式	动物	注射体积 (μl)
眼睛	2型	玻璃体腔注射	大鼠	3-5
	DJ型	视网膜下腔注射	小鼠	1-3
心脏	9型	原位多点注射	大鼠	1-2
			小鼠	1-2
		尾静脉注射	大鼠	10-15/点, 3-5个点
			小鼠	10-15/点, 3-5个点
肝脏	8型 (特异) 9型 (较亮)	尾静脉注射	大鼠	250-300
			小鼠	100-150
		肝门静脉注射	大鼠	200
			小鼠	100
侧脑室	9型	立体定位注射	大鼠	100-200
			小鼠	50-100
全脑	BBB2.0或cap-B10	尾静脉注射	大鼠	1-5
			小鼠	1-5
大脑 (局部)	9型, 2型, 5型, 8型	立体定位注射	大鼠	250-300
			小鼠	100
脊髓	9型, 5型, 1型	鞘内注射	大鼠	1-5
			小鼠	0.2-2
血管 脑血管内皮	1型, 5型, 9型, Vec br1, BI30	尾静脉注射	大鼠	1-10
			小鼠	200-300
脂肪	9型	腹内脂肪-腹腔注射	大鼠	100-200
			小鼠	300
		皮下脂肪-原位注射	大鼠	150-200
			小鼠	10-15/点, 5-8个点
骨骼肌	9型	原位多点注射	大鼠	10-15/点, 5-8个点
			小鼠	10-15/点, 3-5个点
视网膜	anc80L, GL, NN	玻璃体腔注射	大鼠	10-15/点, 3-5个点
		视网膜下腔注射	小鼠	1-3
内耳	anc80L, ie	原窗膜RWM注射	大鼠	3-6
			小鼠	1-3
		后半规管PSCC注射	大鼠	3-6
			小鼠	1-3
肺脏	5型, lung	气管注射或滴鼻	大鼠	100-150
			小鼠	50-75
肾脏	9型	原位多点注射	大鼠	10-15/点, 3-5个点
			小鼠	10-15/点, 3-5个点
		肾脏肾盂注射	大鼠	100-150
			小鼠	50-75
肠道	1型, 2型, 5型	尾静脉	大鼠	200-250
			小鼠	100-150
		灌肠	大鼠	500-700
			小鼠	200-300
胰腺	8型, 9型, pan	胰系膜上动脉注射SMA	大鼠	100-200
			小鼠	100-200
皮肤	DJ, 5型, 8型, 9型	皮内/皮下注射	大鼠	200-250
			小鼠	100-150
			大鼠	20ul/点, 5点/cm ²
			小鼠	2.5 cm x 2.5 cm, 约250ul

注: 表中用量适用于~25g小鼠, ~200g大鼠。

+ AAV注射指南

关注汉恒生物微信公众号:菜单栏——微官网——实验视频



图1

1 尾静脉注射

感染部位:心脏、肝脏、AAV-BBB感染全脑

- ① 把小鼠放入尾静脉注射的装置中(如果没有该装置,可以用50mL的离心管自己制备一个,注意通气、固定即可)。
- ② 用70%的酒精消毒小鼠尾部。注意保持小鼠尾部温暖,太冷血管则会收缩。
- ③ 用左手食指拇指拉住小鼠尾巴,稍用力拉直,然后食指稍微向前向上,使尾巴稍微弯折。可以在弯折处进针注射病毒(27-30G胰岛素针,100 μ L/小鼠)。
- ④ 缓缓注射,完成后保持5-10秒防止病毒回流。
- ⑤ 拔针,用手指或者干的无菌棉球或纱布按压几秒。

2 肝门静脉注射(肝脏AAV局部递送)

感染部位:肝脏

- ① 麻醉-皮下注射麻醉剂 Xylazine/Ketamine 混合液(10mg/kg, 100 mg/kg) (Xylazine/Ketamine, Sigma-Aldrich X1251, K2753)。
- ② 在小鼠的眼睛上涂上眼药膏(OcuLentum simplex, Teva Pharmachemie),防止眼睛干掉。
- ③ 小鼠仰卧,腹部朝上。将第二肋骨和第四乳头之间的区域脱毛处理。这步操作可以在小鼠清醒状态下提前1天完成。
- ④ 对去毛区域反复消毒。然后用手术刀划开从肋骨到第四乳头区域,长度约3cm。注意不要伤及乳腺、肠道、肝脏等其他组织。
- ⑤ 用消毒棉签小心把大小肠等内脏拉出来,并用纱布轻轻遮盖,防止触碰。直到看清肝门静脉。
- ⑥ 病毒事先吸入32g针头注射器,在肝脏下方距离约1cm的位置,以小于5度的夹角沿着肝门静脉缓缓插入3-5 mm(肝门静脉示意图,如果难以看清,可以借助解剖镜辨识)。
- ⑦ 接着缓缓注射病毒。注射完成停留3-5s再拔出针头,并用棉签轻轻按压片刻。然后用止血棉覆盖肝门静脉,用棉签轻轻按压5min协助止血。这一步务必确保止血完成。
- ⑧ 然后去除止血棉(如果止血棉粘连组织严重可以用灭菌PBS湿润)。
- ⑨ 再把拉出的脏器轻轻归位。4-0线缝合伤口,10-15针。
- ⑩ 伤口部位注射100 μ L bupivacaine (5 mg/mL)止痛;并用26G胰岛素针皮下注射500 微升无菌PBS进行水合。整个手术耗时30min左右。
- ⑪ 实验完毕需要保持小鼠身体足够温暖(比如37度加热灯、温箱等),以利于苏醒。

3 脑立体定位

感染部位:脑部

- ① 麻醉-皮下注射麻醉剂 Xylazine/Ketamine 混合液(10mg/kg, 100 mg/kg) (Xylazine/Ketamine, Sigma-Aldrich X1251, K2753)。
- ② 剃除小鼠头部眼睛到耳朵之间的毛发,放到立体定位仪的保暖托盘上。
- ③ 归零牙齿和耳朵的标尺。并在小鼠的眼睛上涂上眼药膏(OcuLentum simplex, Teva Pharmachemie),防止眼睛干掉。
- ④ 将小鼠上门牙固定到固定板的槽内,确保头部保持固定。调节Bregma和Lambda在同一矢状线上和水平面。务必确保小鼠鼻子居中、稳定。
- ⑤ 用手术刀划开小鼠头部皮肤,用手术刀刮掉表面硬脑膜,如有血迹请用棉签擦干,确保bregma 和lambda位置清晰可见。

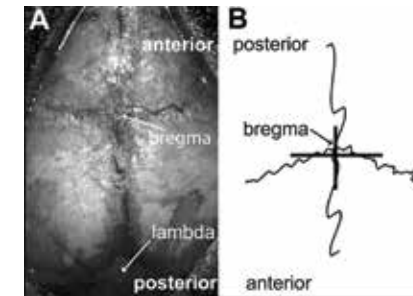


图3 bregma 和lambda示意图

- ⑥ 把bregma 坐标归位0 (X, Y, Z=0),确保lambda位置与bregma位于同一水平面上。
- ⑦ 根据目的脑区设定好坐标。一旦坐标固定,用marker笔在颅骨做出标记,并在10秒内在颅骨钻出一个约0.015mm的孔。钻的过程务必小心,以防损伤脑组织。
- ⑧ 把带注射AAV吸入针内,根据上一步设好的坐标进针。进针完成后以0.05-0.1 μ L /min的速度缓缓注射病毒,通常一只小鼠注射体积在0.2-2 μ L之间。
- ⑨ 注射完毕,保持10min,然后慢慢回针。
- ⑩ 操作过程中如有血流出需要用棉签及时吸干。
- ⑪ 缝合头皮。实验完毕需要保持小鼠身体足够温暖(比如37度加热灯、温箱等),以利于苏醒。

4 无创气管插管法(肺部病毒递送)

感染部位:肺部

- ① 麻醉-皮下注射麻醉剂 Xylazine/Ketamine 混合液(10mg/kg, 100 mg/kg) (Xylazine/Ketamine, Sigma-Aldrich X1251, K2753)。
- ② (可选) 在小鼠的眼睛上涂上眼药膏(OcuLentum simplex, Teva Pharmachemie),防止眼睛干掉。
- ③ 正式插管之前可以通过解剖一只小鼠确定插管的位置。对于黑色成年鼠(25g)来说,插入的参考距离是约1.5 cm。
- ④ 把麻醉好的小鼠固定到一个约60°的斜面上,腹部朝上。用细绳固定下小鼠牙齿,防止头部晃动太大。
- ⑤ 小心打开小鼠嘴部,用平头镊子轻轻把小鼠舌头外拉。用Exel Safelet IV 留置针(24G)慢慢插入气管(注意距离,大约是1.5 cm)。然后轻轻把针头拔出。
- ⑥ 将75 μ L的病毒(或无菌PBS/生理盐水对照)注入留置针顶端,让小鼠慢慢吸入肺部,一定要控制病毒的体积,防止呛死小鼠。
- ⑦ 实验完毕需要保持小鼠身体足够温暖(比如37度加热灯、温箱等),以利于苏醒。

5 乳腺脂肪垫注射

感染部位:脂肪

- ① 麻醉-皮下注射麻醉剂 Xylazine/Ketamine 混合液 (10mg/kg, 100 mg/kg) (Xylazine/Ketamine, Sigma-Aldrich X1251, K2753)。
- ② 在小鼠的眼睛上涂上眼药膏 (OcuLentum simplex, Teva Pharmachemie), 防止眼睛干掉。
- ③ 乳腺处皮肤去毛。注意消毒。
- ④ 用手术刀在乳头与中线间轻轻切开一个小口, 然后用浸湿PBS的棉签温柔分离皮肤和乳腺; 然后用夹子轻轻把乳腺脂肪垫拉出伤口, 用另一镊子夹起, 使其充分暴露, 以看到偏白色的脂肪垫。
- ⑤ 然后胰岛素针向乳腺脂肪垫注射50 μ L病毒。
- ⑥ 轻轻把注射过的脂肪垫放回小鼠体内; 缝合伤口; 如有必要可以注射止痛药, 如temgesic (0.05-0.1 mg/kg, Schering-Plough)。
- ⑦ 把手术过的小鼠放回独立的笼子, 直到恢复清醒。

6 肾盂感染(肾脏AAV递送)

感染部位:肾脏

- ① 麻醉-皮下注射麻醉剂 Xylazine/Ketamine 混合液 (10mg/kg, 100 mg/kg) (Xylazine/Ketamine, Sigma-Aldrich X1251, K2753)。
- ② 把小鼠一侧的毛剃掉。
- ③ 在小鼠的眼睛上涂上眼药膏 (OcuLentum simplex, Teva Pharmachemie), 防止眼睛干掉。
- ④ 把待注射病毒100 μ L吸入0.5 mL U-100胰岛素注射器 (29G针头) 【注射器的选择极其关键】, 待用。
- ⑤ 手术暴露小鼠左侧肾脏。用手术夹夹住小鼠裸露皮肤, 选择距离小鼠胸腔下方和脊椎各1 cm的地方剪开约0.5 cm长的伤口。

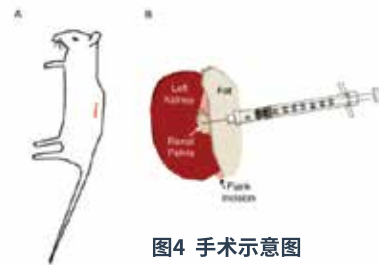


图4 手术示意图

- ⑥ 用手指小心曝露出肾脏以周围的脂肪组织, 轻轻扒开脂肪暴露肾盂。肾盂应位于肾脏中间, 为淡黄色透明/白色小点。
- ⑦ 注射的时候注意插针位置, 要避开肾静脉、动脉以及输尿管, 插针深度在0.5cm左右。100 μ L病毒要在2-3秒内注射完成, 太慢无法引起逆流, 会极大影响感染效率。
- ⑧ 注射完成等待2-3秒拔针, 然后小心把肾脏归位, 缝合伤口。
- ⑨ 实验完毕需要保持小鼠身体足够温暖 (比如37度加热灯、温箱等), 以利于苏醒。

7 腿部骨骼肌注射

感染部位:肌肉

注:腿部肌肉注射通常不需要麻醉动物, 但对拿取动物的姿势、手法等要求很高。以防小鼠或者大鼠咬伤手指。我们以大鼠为例讲解腿部肌肉注射方法。

- ① 练习正确抓取大鼠的脖子, 动作务必要轻, 绝对不要让动物惊慌, 防止被动物咬伤。推荐配戴足够厚实的手套。
- ② 把大鼠轻轻放到胸前, 用左手小臂托起大鼠。
- ③ 参照视频方式抓好动物, 露出需要注射的腿部, 防止剧烈挣扎;
- ④ 另外一人用左手拇指和中指轻轻拉住大鼠的腿部, 食指轻轻托起, 右手注射, 注意注射时下针的角度 (30度左右)。注射

剂量每个点不超过50 μ L, 小鼠为10-20 μ L。

- ⑤ 注射要缓慢、稳定。注射完成后用手指或者棉签按压注射部位片刻, 防止出血。
- ⑥ 放回鼠笼, 注射完毕。注意整个过程不要惊吓动物。

8 玻璃体腔注射

感染部位:眼

- ① 麻醉-皮下注射麻醉剂 Xylazine/Ketamine 混合液 (10mg/kg, 100 mg/kg) (Xylazine/Ketamine, Sigma-Aldrich X1251, K2753)。
- ② (选做) 在小鼠的眼睛上涂上眼药膏 (OcuLentum simplex, Teva Pharmachemie), 防止眼睛干涩。
- ③ 将30G一次性针头在角膜缘旁边插入玻璃体内, 缓缓注入病毒, 通常注射体积在1~3微升/眼。
- ④ 一般每只小鼠只注射一只眼睛, 另外一只作为对照。对注射病毒的眼睛做局部抗菌处理, 防止感染。
- ⑤ 一周后可用眼底照相机进行眼底检查。

9 鞘内注射

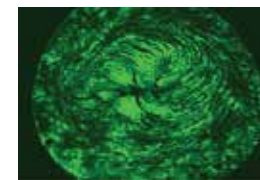
感染部位:脊髓神经

- ① 麻醉-皮下注射麻醉剂 Xylazine/Ketamine 混合液 (10mg/kg, 100 mg/kg) (Xylazine/Ketamine, Sigma-Aldrich X1251, K2753)。
- ② 在小鼠的眼睛上涂上眼药膏 (OcuLentum simplex, Teva Pharmachemie), 防止眼睛干掉。
- ③ 靠近小鼠的尾部根部约2cm²皮肤去毛, 以利于清晰看见下针部位。
- ④ 把小鼠放到一个特殊的架子上, 在小鼠下身用一根15mL离心管垫起, 从而使下针部位稍微拱起。
- ⑤ 把病毒吸入25 μ L的hamilton, 配30G针头。
- ⑥ 定位脊椎的L6 (最突出的一个), 并用手指轻轻按压使之平缓。
- ⑦ 小心将针头插入L5椎骨和L6椎骨的凹槽之间, 并注意小鼠尾部会稍微上翘, 这标志针头成功插入髓鞘。
- ⑧ 一旦成功插入, 用手指固定针头, 另一只手缓慢注射10-20 μ L病毒。注意注射体积要适当, 太小会加大实验误差, 体积太大会增加鞘内压力。
- ⑨ 如有需要, 24hr之后可重复注射一次。
- ⑩ 实验完毕需要保持小鼠身体足够温暖 (比如37度加热灯、温箱等), 以利于苏醒。

+ AAV注射后的观察

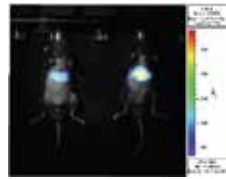
AAV注射感染组织器官至少3周后可取材进行冰冻切片直接观察荧光 (如GFP, RFP等)、石蜡切片 (可以组化染色)、荧光定量PCR (qPCR), 甚至免疫印迹 (WB) 来考察基因表达情况。(一般情况下, 对于心肌、骨骼肌、肝脏、肾脏、皮肤等适合原位注射的组织器官, 如果AAV带有GFP荧光标记, 注射感染适量病毒3~4周后肉眼即可观察到注射部位组织发绿。)

1 心肌的基因转导



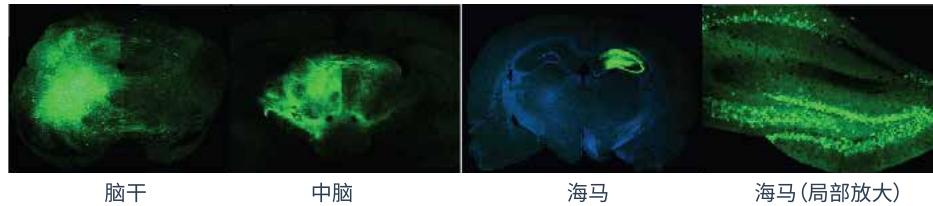
病毒类型及滴度: AAV9-GFP, 滴度 1×10^{12} vg/mL
感染动物: 小鼠, C57, 8周龄
感染部位: 心脏
注射方式和体积: 眼眶静脉注射; 50 μ L
检测方法: 感染3周后冰冻切片, 荧光显微镜检测

2 肝脏特异性AAV (AAV-pTBG-Luc) 体内感染效果



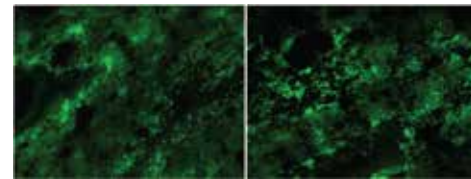
病毒类型及滴度: AAV-pTBG-Luc, 滴度 1.4×10^{12} vg/mL
 感染方式: 尾静脉, 100 μ L
 检测方式: 感染3周, 小动物活体成像
 结论: AAV-pTBG-Luc尾静脉注射可高效感染体内肝脏, 无非特异脏器感染;

3 脑区基因转导



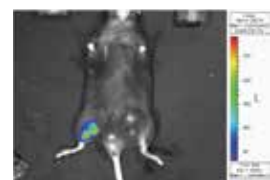
病毒类型及滴度: AAV9-GFP, 滴度 1×10^{12} vg/mL
 感染动物: 小鼠, C57, 8周龄
 感染部位: 见图
 注射方式和体积: 脑定位注射; 1 μ L
 检测方法: 感染3周后冰冻切片, 荧光显微镜检测

4 高效的肺组织基因转导



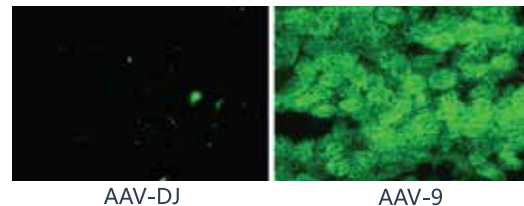
病毒类型及滴度: AAV6-GFP, 滴度 1×10^{12} vg/mL
 感染动物: 大鼠, SD, 2月龄
 感染部位: 肺脏
 注射方式和体积: 气管注射; 100 μ L
 检测方法: 感染3周后冰冻切片, 荧光显微镜检测

5 在体感染小鼠肌肉组织



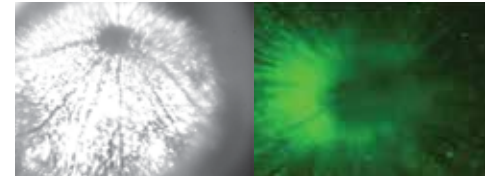
病毒类型及滴度: AAV9-Luc, 滴度 1×10^{12} vg/mL
 感染动物: 小鼠, C57, 8周龄
 感染部位: 骨骼肌
 注射方式和体积: 骨骼肌原位多点注射; 10 μ L/点, 4个点
 检测方法: 感染4周, 活体成像

6 肾脏原位注射



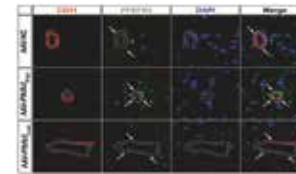
病毒类型及滴度: AAV-GFP, 9型和DJ型, 滴度 1×10^{12} vg/mL
 感染动物: 小鼠, C57, 8周龄
 感染部位: 肾脏
 注射方式和体积: 肾脏内多点注射; 10 μ L/点, 6个点
 检测方法: 感染4周, 冰冻切片, 荧光显微镜检测

7 眼科学专用AAV视网膜基因转导



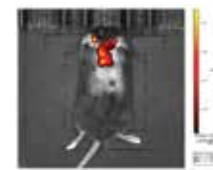
病毒类型及滴度: AAV2-GFP, 滴度 1×10^{12} vg/mL
 感染动物: 小鼠, C57, 8周龄
 感染部位: 视网膜
 注射方式和体积: 玻璃体腔注射; 3 μ L

8 AAV-Vec-Tie对心脏血管内皮的基因转导



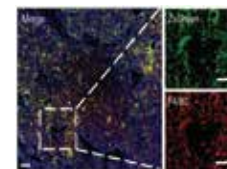
病毒类型及滴度: AAV-Vec-Tie (启动子), 滴度 $> 1 \times 10^{12}$ vg/mL
 感染动物: 小鼠
 感染部位: 心脏内皮细胞
 注射方式和体积: 静脉注射; 100 μ L
 检测方法: 感染4周后对心脏切片进行免疫荧光染色观察
 来源: 中国药科大学客户文献

9 在体感染小鼠脂肪组织



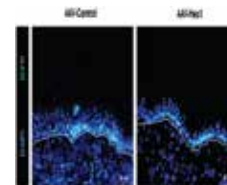
病毒类型及滴度: AAV9-ZsGreen, 滴度 $> 1 \times 10^{12}$ vg/mL
 感染动物: 6周龄小鼠
 感染部位: 肩胛间区棕色脂肪组织
 注射方式和用量: 原位注射; 10^{11} vg
 检测方法: 感染8周后进行活体成像
 来源: 解放军中部战区总医院客户文献

10 AAV2-F4/80对骨髓巨噬细胞的基因转导



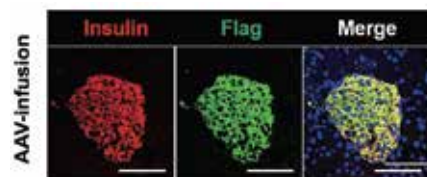
病毒类型及滴度: AAV2-F4/80 (启动子) -cre-ZsGreen, 滴度 $> 1 \times 10^{12}$ vg/mL
 感染动物: 小鼠
 感染部位: 骨髓巨噬细胞
 注射方式和用量: 股骨髓内注射; 30 μ L
 检测方法: 切片免疫荧光染色
 来源: 中南大学湘雅医院客户文献

11 在体感染小鼠耳部皮肤



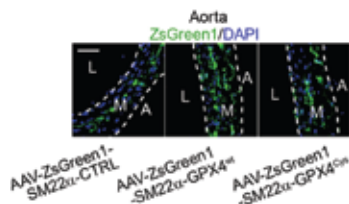
病毒类型及滴度: AAV9-GFP, 滴度 $> 1 \times 10^{12}$ vg/mL
 感染动物: 小鼠
 感染部位: 耳部皮肤
 注射方式和用量: 皮下注射; 20 μ L
 检测方法: 感染25天后进行荧光显微镜观察
 来源: 上海交通大学客户文献

12 AAV8-Insulin-2对胰岛β细胞的基因转导



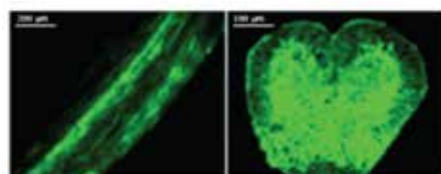
病毒类型及滴度: AAV8-Insulin-2 (启动子), 滴度 $>1 \times 10^{12}$ vg/mL
感染动物: 6周龄小鼠
感染部位: 胰岛β细胞
注射方式和用量: 胰腺导管注射; 注射速率6uL/min
检测方法: 免疫荧光切片观察
来源: 南京医科大学客户文献

13 AAV9-SM22a在体感染主动脉平滑肌



病毒类型及滴度: AAV9-SM22a (启动子), 滴度 $>1 \times 10^{12}$ vg/mL
感染动物: 8周龄小鼠
感染部位: 主动脉平滑肌
注射方式和用量: 尾静脉注射; 3×10^{11} vg, 注射2次
检测方法: 免疫荧光切片观察
来源: 海军军医大学客户文献

14 在体感染小鼠脊髓



病毒类型及滴度: AAV9-EGFP, 滴度 $>1 \times 10^{12}$ vg/mL
感染动物: 6周龄小鼠
感染部位: 脊髓
注射方式和用量: 鞘内注射L5-L6椎间隙; 2uL, 注射速率0.2uL/min
检测方法: 免疫荧光切片观察
来源: 安徽医科大学客户文献

AAV使用FAQ

Q1: 腺相关病毒产品的安全性如何?

腺相关病毒载体整合几率低, 分子量小, 免疫原性低, 因此安全性高。即使用于人体, 也被认为是安全性非常高的一类基因治疗载体。

Q2: AAV的包装容量一般有多大?

AAV的包装容量(两个ITR之间的片段大小)通常不能超过4.5Kb, 除掉启动子、EGFP标记、转录终止信号polyA等元件之外, 外源基因的容量能力一般在2kb以下。

Q3: 不同的AAV血清型主要区别是什么?

几乎所有的AAV病毒骨架都是来源AAV2型的。AAV不同血清型的差异在于包裹AAV遗传物质的蛋白质外壳(Capsid), 比如AAV5型, AAV8型和AAV9型等, 也可以分别标记为AAV2/5, AAV2/8和AAV2/9, 其中2代表骨架来源于AAV2, 血清型为5, 8和9。

Q4: 什么情况下适合用腺相关病毒?

如果需要在动物个体(小鼠、大鼠、兔子、狗、猴子等)水平验证基因功能, 则AAV是最佳的递送工具。

Q5: AAV一般通过何种方式感染动物组织或脏器?

一般情况下AAV可以通过两种方式递送到目的脏器或者组织: 一是系统性给药方式, 比如静脉注射, 是通过血液循环递送到全身各处, 但这种方法对肝脏感染效果很好, 对其他组织和脏器效果欠佳; 二是局部给药, 比如脑立体定位注射, 肌肉注射, 心肌注射等, 这种方法可以比较高效地感染局部组织, 特异性好, 免疫原性更小。

Q6: AAV注射动物以后一般多久可以观察效果?

AAV属于单链DNA病毒, 感染到胞内需要形成双链形式的附加体才能进行基因表达。所以, 一般情况下建议病毒注射3-4周以后再检测基因表达情况比较稳妥。在1-2周的时候即使有表达表达量通常也比较低, 不建议过早处死动物检测。

Q7: AAV注射动物以后如何检测?

病毒注射3-4周以后开始检测。如果是基因过表达, 可以通过免疫组化、免疫荧光和WB在蛋白水平进行检测, 但通常会对使用的抗体质量要求比较高。为了最大化方便检测, 我们通过在过表达蛋白末端添加3xFLAG标签, 检测的时候只需要购买商品化的抗FLAG抗体即可; 除此之外, 还可以通过qPCR对RNA水平进行检测; 对于基因干扰检测, 一般只通过qPCR进行定量分析。

Q8: 腺相关病毒的滴度是如何测定的?这个测定方法如何?我拿到病毒后需要自己测滴度吗?

AAV滴度测定我们是采用的国际标准-对ITR或者WPRE元件采取绝对qPCR定量法, 该方法是通过一系列梯度稀释病毒, 并最终根据标准曲线计算出单位体积含有的基因组拷贝数(Vg/mL)。客户拿到病毒后一般无需自己再测滴度, 可以直接冻存在-80°C。但要注意避免反复冻融和超过半年时间的保存, 否则需要重新测定滴度。

Q9: AAV能否用来体外感染细胞系?

一般情况下不推荐用AAV来直接感染细胞系做基因研究。究其原因, AAV在快速分裂的细胞系中表达能力有限, 如果非要感染细胞系, 通常要使用较高MOI ($1E4 \sim 1E5$) 进行感染, 比较浪费病毒。综上, 我们不推荐在细胞系上使用AAV进行基因功能研究。