



重组腺病毒用户使用手册

● 保存方法:

重组腺病毒在所标的滴度下以液态形式保存。保存液:

DMEM/2.5%BSA/2.5%glycerol. 保存温度: -80°C 。如果需要, 分装成小管, 并立即储存于 -80°C 。切记: 不要反复冻融

● 产品描述

我们所提供的腺病毒是基于人 5 型血清型, E1/E3 缺陷型腺病毒

重组腺病毒载体作为基因转移工具的主要优点:

1. 可感染大多数细胞类型, 可感染分裂和不分裂的细胞, 几乎 100% 的感染效率。
2. 比起其他病毒载体来说相对容易得到较高的滴度 (可达到 1×10^{12} PFU/ml, 或者 5×10^{13} VP/ml)

● 使用方法

1. 在室温或在冰上解冻腺病毒储存液
2. 吸取所需要的量的腺病毒加到培养基中, 如果需要的话, 可以用 DMEM 或者其他培养基稀释腺病毒。
3. 吸去旧培养基, 加入带有病毒的新鲜培养基。下面是推荐使用的培养基 (带病毒) 的用量:

96 孔板:	0.05-0.10ml/孔	6 孔板:	1-2ml/孔
4 孔板:	0.2-0.3ml/孔	60mm 培养皿:	3-5ml/皿
12 孔板:	0.5-0.8ml/孔	10cm 培养皿:	8-12ml/皿
4. 孵育 6-12 小时, 或根据需要更长时间
5. (可选做) 吸取培养基, 加入新鲜培养基。

● 最适 MOI 值的确定

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。如果, 用量不足, 那么不能达到 100% 的感染效率, 如果用量太高, 会对细胞有毒害作用或者其他不可预测的效应。对于大多数细胞系来说, 最适用量的范围很窄。另外, 不同细胞系的细胞表面腺病毒受体的数量也是不一样的, 这也决定了不同细胞系需要不同的病毒用量。



为了确定你的细胞系的最适病毒用量，可以用带报告基因的腺病毒做预实验，如 AdCMV-B-gal 或者 AdCMV-GFP。用不同稀释倍数的报告基因病毒感染细胞，在感染 1-2 天后检测感染效率。可以通过 B-gal 染色或者通过在荧光显微镜下观察细胞的 GFP 的表达情况来确定可达到 100%感染效率但又不会引起细胞表型变化病毒浓度范围。

● 安全提示

时刻提醒自己你所要处理的是被感染病毒的细胞。遵从 NIH 的推荐的安全指南来处理各种携带 BL-2 级生物样品。使用橡胶手套，使用带滤芯的枪头，戴生物安全帽操作实验。所生产的腺病毒只能用于科学研究，不能用于诊断和治疗。

● 服务保证

保证产品在遵照说明书使用时与标签上的描述相符。除此保证外，不提供额外的担保。不提供隐含的适销性和适合于特殊使用目的的担保。对于购买者的赔偿，本单位可选择对产品进行修复或更换。对于产品造成的相关损害，本单位概不负责。



常见问题解答 (FAQs)

- 使用重组腺病毒需要的生物安全级别？
- 怎么确定我所用的细胞模型可以感染腺病毒？
- 感染细胞时腺病毒的最适浓度？
- 感染腺病毒时所需要的培养基的量？
- VP, PFU, IFU 的区别？哪一个能更好地反映所使用的有活性的病毒的量？
- 病毒滴度是如何测定的？
- 对于体外实验（细胞实验）CsCl 纯化或层析柱纯化有必要么？
- 重组腺病毒的贮藏条件？
- 重组腺病毒表达系统承载外源基因的容量？
- 腺病毒有多种血清型，哪一种是基因传递中最普遍使用的？
- 什么是 RCAs？
- 目前存在的许多基因传递载体系统，包括：腺病毒、逆转录病毒和慢病毒，我应该使用哪个系统？

Q. 使用重组腺病毒需要的生物安全级别？

我们所提供的重组腺病毒是 E1/E3 区缺失的复制缺陷型病毒。根据 NIH 官方的参考信息，重组腺病毒的生物安全等级被确定为 II 级，您只需要 BL-II 级实验设施，值得注意的是，大多数实验室都具备 BL-II 级的实验设施。

野生型腺病毒可复制，能引起感冒和很强的免疫反应，通常不会引起很严重的疾病。要想获得更多生物安全信息，请参考网站 <http://bmb1.od.nih.gov>

Q. 怎么确定我所用的细胞模型可以感染腺病毒？

腺病毒有很广泛的宿主范围。它可以感染人类或者其他哺乳动物细胞系或原代细胞，包括可分裂的和不可分裂的细胞。只有少数细胞系不被感染。一些淋巴细胞系对腺病毒有更强的抵抗力，因此需要大量的病毒来感染细胞。

为了客户的方便，我们提供含有报告基因的病毒，如 Ad-CMV-B-gal 和 Ad-CMV-GFP 从而方便地进行您的预实验。

Q. 感染细胞时腺病毒的最佳浓度？

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。如果，用量不足，那么不能达到 100% 的感染效率，如果用量太高，会对细胞有毒害作用或者其他不可预测的效应。我们应该尽量用最小浓度的病毒来达到 100% 的基因传递效率。这个最佳的浓度因不同的细胞类型而有显著差异。为了确定你的细胞系的最适病毒用量，可以用带报告基因的腺病毒做预实验，如 AdCMV-B-gal 或者 AdCMV-GFP。用不同稀释倍数的报告基因病毒感染细胞，在感染 1-2 天后检测感



染效率。可以通过 B-gal 染色或者通过在荧光显微镜下观察细胞的 GFP 的表达情况来确定可达到 100%感染效率但又不会引起细胞表型变化病毒浓度范围。

我们已经针对多种细胞系做了预实验，加入已混合病毒的培养基，6-8 小时或者过夜。对于大多数细胞系来说病毒浓度在 $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ IFU/PFU (infectious unit) /ml 培养基都能得到 100%的感染效率而且不会有副作用。我们推荐在您实验系统中用报告基因病毒重新摸索一下最适培养基用量。

Q. 感染腺病毒时所需要的培养基的量？

作为参考，我们推荐您按照如下的量加培养基（已混入病毒）：

10cm 培养皿：8-10ml

6 孔板：1ml/孔

12 孔板：0.5ml/孔

24 孔板：0.2ml/孔

Q. VP, PFU, IFU 的区别？哪一个能更好地反映所使用的有活性的病毒的量？

VP (Viral particles) 反映病毒颗粒的总数（包括活病毒和死病毒），由于在病毒制备过程中，每次活/死细胞比率都不同，VP 并不能反映有活性的病毒的数量。

PFU (plaque formation unit) 代表可感染的或者活病毒的数量。能反映实验中所需要的病毒的量。

IFU (infectious unit) 相当于 PFU

大多数情况下所制备的病毒，VP/PFU 比值在 20:1 到 50:1 范围。

应用 VP (viral particles) 做单位会与实际应用的活病毒的数量有很大出入。用 IFU 或者 PFU 做单位会得到比较一致的结果。

Q. 病毒的滴度是如何测定的？

测定腺病毒的滴度有三种常用的方案：（1）OD260 检测，（2）空斑形成实验，和（3）终点稀释实验。

OD260 可以检测病毒 DNA 和蛋白的浓度，但不能区分完整的、有感染能力的病毒和损伤的、无感染能力的病毒。这是一个可以检测全部病毒（包括存活和死亡的病毒）含量的物理实验。因此通过检测 OD260 可以反映并计算出病毒颗粒（VP）的浓度。但在检测 OD260 以前，病毒首先必须被纯化。



另外，空斑形成实验能够检测有感染能力的病毒，是一个生物学实验。一般来讲，用一系列病毒稀释物感染单层 HEK293 细胞。病毒将会在感染的细胞中繁殖，最终导致细胞毒性效应，并被释放出来。释放的病毒将感染邻近的细胞。这整个过程将被不断重复，最终导致空斑的形成。为了阻止病毒扩散到细胞的其他区域并开始新的空斑形成过程，在完成最初的感染后，要将一层软琼脂铺在细胞的表层上面。

终点稀释实验的生物学原则类似于空斑形成实验，尽管二者过程和测量是不同的，而该法计算病毒滴度的公式则较之复杂。

尽管空斑形成实验和终点稀释实验给出了有感染能力或者有作用的病毒的滴度，但它们是通过人眼给出分值的，并受人及过程的变化影响。对于相同的病毒源，不同人给出显著不同的滴度读值是很普遍的。

Q. 对于体外实验（细胞实验）CsCl 纯化或层析柱纯化有必要么？

不需要。如果病毒被用于体外细胞实验，双 CsCl 纯化是不需要的。假如病毒被用于体内实验（如动物实验），为了去除有缺陷的病毒颗粒、细胞碎片和少量培养基成分，纯化是必需的，因为这些污染诱导显著的免疫学反应。此外，CsCl 纯化会将病毒浓缩到一个体内注射的适宜水平。

Q. 重组腺病毒的推荐存储条件是什么？

对于长期存储，病毒应该被保存在 -80°C ，特别是在经过 CsCl 或层析柱纯化后。在 -80°C ，病毒可以稳定保存 6 个月到一年，在某些情况下甚至可以达到 2 年。如果病毒是在添加血清或 BSA 的 DMEM 中储存在 -80°C ，它能够稳定储存更长的时间并可以经受多次冻融过程。

另外，如果病毒经过 CsCl 纯化并被保存在 PBS 或 Tris 溶液(10mM Tris PH8.0, 200 NaCl, 2-3% 甘油或蔗糖)，应该避免反复冻融，因为这将导致滴度显著下降。

Q. 腺病毒表达系统承载外源基因的容量？

对于 (DE1/E3) 5 型腺病毒承载外源基因的能力大约为 8 Kb。

Q. 腺病毒有多种血清型，哪一种是在基因传递中最普遍使用的？

基因传递中最常使用的腺病毒是人类腺病毒血清 5 型 (DE1/E3)，这正是我们使用的。

Q. 什么是 RCAs？

在以腺病毒作为载体时一个关注之处在于：在大群复制缺陷病毒中尽可能少的产生有复制能力的腺病毒 (Replication Competent Adenoviruses: RCAs)。RCAs 是由于重组腺病毒和 HEK293 细胞基因组存在重叠序列并双向交叉重组而产生的，而发生几率比较小。这就导致了目的基因被 E1 区域置换。一旦发生这种情况



况，腺病毒将不再需要辅助细胞系进行复制。

检测 RCA 的一个方法是：使用非辅助细胞如 A549 细胞，将病毒储液稀释(约 10^4 - 10^6 PFU)，孵育并监测细胞病变效应(CPE)、空斑形成实验。根据 NIH 原则，在大约 10^4 病毒中产生 <1 个空斑被认为是可以安全使用的。为了防止 RCA 的发生，应该在代数较少的包装细胞中包装及扩增腺病毒。

Q. 目前存在的许多基因传递载体系统，包括：腺病毒、逆转录病毒和慢病毒，针对我的实验应该使用哪个系统？

腺病毒：针对大多数细胞有几乎 100% 的感染效率，包括分裂和不分裂细胞及原代细胞，不整合到宿主细胞。但是构建和包装的操作相对复杂。

逆转录病毒：对于大多数细胞的感染效率 < 30%，而且依赖细胞的分裂。操作人员需要注意的是，逆转录病毒会整合到宿主细胞的基因组上，并且有引起基因突变、激活癌基因的风险。与腺病毒不同的是，它的构建及包装要比后者简单很多。

慢病毒：对于分裂细胞和非分裂细胞能够达到 30% 的感染效率。和逆转录病毒一样存在整合到宿主细胞基因组上的风险，以致引起基因突变、致癌。并且构建和包装相对简单。

目前腺病毒系统是最好的一种对于所有细胞将外源基因及 siRNA 导入细胞的有效途径。但是，如果是针对个别细胞的研究的话，逆转录病毒、慢病毒甚至直接将带有目的基因的表达质粒转染细胞即可。