

# RNAi 腺病毒载体构建和包装手册

Version3.0

吉凯基因

# 目 录

简 介 .....	3
第一部分 RNAi 腺病毒克隆的制备 .....	4
一、实验流程.....	4
二、实验材料.....	5
三、RNAi 靶点设计.....	6
四、克隆构建实例.....	6
五、质粒抽提.....	11
第二部分 腺病毒包装与质量检测 .....	13
一、实验流程.....	13
二、实验材料.....	14
三、质粒转染与腺病毒收获.....	16
四、腺病毒的扩增.....	16
五、腺病毒纯化 .....	17
六、腺病毒质量检测 .....	19
参考文献.....	21

## 简介

腺病毒(Adenovirus)是一种线性双链 DNA 无包膜病毒,线状双股 DNA 与核心蛋白形成直径为 60-65 nm 的髓芯,被包裹于蛋白外壳内。蛋白外壳是直径约 80 nm 的正二十面体,由 252 个直径 8-10 nm 的壳粒组成,壳粒排列在三角形的面上,每边 6 个,其中 240 个为六邻体(非顶点壳粒),另 12 个为五邻体基底(顶点壳粒)。腺病毒载体是以腺病毒为基础发展起来的基因治疗载体,它对分裂期细胞和非分裂期细胞均具有感染能力,它通过受体介导的内吞作用进入细胞内,将腺病毒基因组转移至细胞核内,保持在染色体外,不整合进入宿主细胞基因组中。吉凯基因所使用的腺病毒载体 E1 和 E3 基因是缺失的,所以其感染细胞后不会在细胞体内进行复制(转有 E1 基因的 HEK293 细胞除外),因而是较为安全的基因治疗载体。但该病毒仍然具有可能的潜在的生物学危险,吉凯基因建议不要使用编码已知或可能会致癌的基因的假型病毒,除非已经完全公认某个基因肯定没有致癌性,否则均不建议采用假型病毒进行生物学实验。

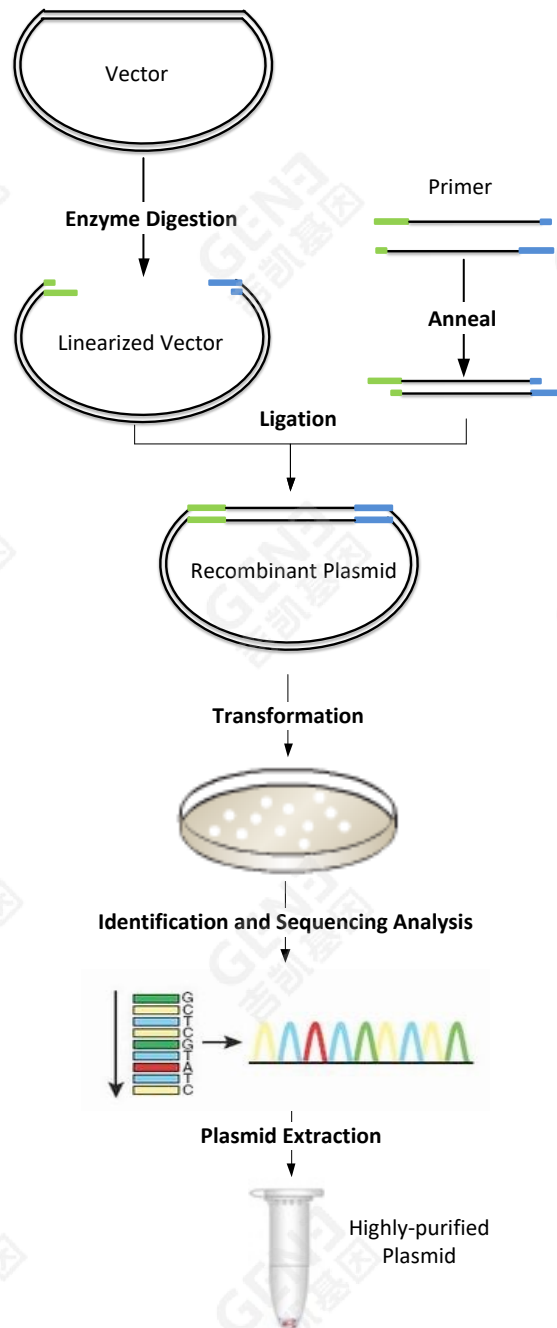
我们将靶点序列构建在腺病毒载体上。靶点序列在 II 型或 III 型启动子的转录下,形成发夹结构,经过细胞内 Dicer 的处理,产生小片段 RNA(大约 21-23 bp),即 siRNA。siRNA 在细胞内 RNA 解旋酶的作用下解链成正义链和反义链,继之由反义 siRNA 再与体内一些酶(包括内切酶、外切酶、解旋酶等)结合形成 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)。RISC 与外源性基因表达的 mRNA 的同源区进行特异性结合,RISC 具有核酸酶的功能,在结合部位切割 mRNA,切割位点即是与 siRNA 中反义链互补结合的两端。被切割后的断裂 mRNA 随即降解,从而诱发宿主细胞针对这些 mRNA 的降解反应。

吉凯基因重组腺病毒系统是将携带外源基因的腺病毒穿梭质粒与携带腺病毒基因组的包装质粒共转染 HEK293 细胞,通过 Cre/loxP 重组酶系统的作用实现重组,产生重组腺病毒。重组腺病毒能够表达较大的外源基因片段,感染分裂与非分裂细胞,具有广泛的宿主范围。

本手册为吉凯基因 RNAi 腺病毒载体的构建和病毒包装的通用操作流程,目的是为了更方便大家交流使用,部分细节内容未能做到一一详述,敬请谅解。同时希望大家能够针对手册中的错误和问题,提出宝贵的意见。

## 第一部分 RNAi 腺病毒克隆的制备

### 一、实验流程



利用限制性内切酶消化获得线性化载体。引物退火制备目的片段。所设计引物在其两端添加酶切位点（图中以绿色和蓝色标记）。该引物退火后与线性化克

## GENE 吉凯基因

隆载体两末端含有相同的酶切位点。以线性化载体和退火产物配制反应体系，进行连接反应，产物直接进行转化。挑取平板上的单克隆进行 PCR 鉴定，对阳性克隆进行测序及结果分析。将正确克隆菌液扩大培养、抽提，获得高纯度质粒，用于下游病毒包装。

## 二、实验材料

### 1. 主要试剂

试剂名称	试剂来源	Cat. No.
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific	#SM0311
NormalRun™ 250 bp-II DNA Ladder	GeneRay	#DL2502
Restriction Endonuclease	NEB	
Taq Plus DNA polymerase	Vazyme	#P201-D3
T4 DNA ligase	Thermo Scientific	#EL0016
Primer	GeneRay	
TOP10 competent cell	Genechem	
EndoFree midi Plasmid Kit	TIANGEN	#DP118-2

### 2. 主要仪器

仪器名称	仪器来源	Cat. No.
PCR 仪	Applied Biosystems 公司	2720 Thermal Cycler
测序仪	美季生物公司	ABI3730
数显式稳压稳流电泳仪	天能公司	EPS 200
凝胶成像仪	天能公司	Tanon-2500
细菌摇床	华利达实验设备公司	HZ-9211K
Blue Pard 隔水式恒温培养箱	上海一恒科学仪器有限公司	GHP-9080
移液器	吉尔森公司	
超净工作台	苏州佳宝净化工程设备有限公司	JB-CJ-2FX
高速离心机	Thermo Scientific	Legend Micro 17

### 三、RNAi 靶点设计

针对目的基因序列，根据 RNAi 序列设计原则，设计多个 RNAi 靶点序列，选择最佳的动力学参数靶点进入后续实验流程。除了自行设计的 RNAi 靶点序列之外，我们也使用一些 RNAi 实验中公认序列，比如 RNAi 阴性对照(Negative Control, NC) Scramble 序列：TTCTCCGAACGTGTCACGT。同时，RNAi 靶点序列亦可由客户提供，我们将根据客户的不同要求将靶点序列构建到相应的腺病毒载体上。

### 四、克隆构建实例

以构建 RNAi 阴性腺病毒对照为例描述详细实验过程

#### 1. 目的基因及工具载体信息

##### 1.1 基因信息：Scramble 序列

##### 1.2 工具载体：

载体图谱	载体说明
	<p>载体编号：GV 119</p> <p>元件顺序：hU6-MCS-CMV-EGFP</p> <p>克隆位点：Age I、EcoR I</p>

#### 2. 载体酶切

根据如下列表，配制 50  $\mu$ l 酶切体系。按列表顺序依次加入各种试剂，用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心，置于 37°C 反应 3 h 或过夜。对载体酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，回收目的条带。

试剂	体积(μl)
ddH <sub>2</sub> O	41
10×CutSmart Buffer <sup>2</sup>	5
纯化的质粒 DNA ( 1 μg/μL )	2
<i>Age</i> I ( 10 U/μl )	1
<i>EcoR</i> I ( 10 U/μl )	1
Total	50

- 1 大部分限制性内切酶的最适反应温度为 37°C，但也有一些不是 37°C，例如 *Apa* I 为 25°C，*Bsi* I 为 75°C。根据所需限制性内切酶确定相应的反应温度。
- 2 限制性内切酶在选定的 Buffer 下应该具有不低于 50%的反应活性。各种限制性内切酶在不同 Buffer 下的具体活性请参考其说明书。

**载体酶切结果：**

载体酶切电泳图谱	电泳图说明
	<p><b>1#:</b> 1kb DNA Ladder(条带从上到下依次为 :10 kb、8 kb、6 kb、5 kb、4 kb、3.5 kb、3 kb、2.5 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp)</p> <p><b>2#:</b> 经过 <i>Age</i> I 和 <i>EcoR</i> I 酶切的 GV119 Vector</p> <p><b>3#:</b> GV119 Vector</p>

**3. 目的基因片段的获取**

**3.1 核心序列**

NO.	GENE	SOURCE	Target Sequence
1	NC	None	TTCTCCGAACGTGTCACGT

该序列在多篇文章中使用，在 google 中 search 以上序列，可以得到部分文献，本手册仅列举如下：

[Overexpression of PKCa is Required to Impart Estradiol Inhibition ...](#)

GATCCCC(TTCTCCGAACGTGTCACGT)TTCAAGAGA(ACGTGACACGTTCCGGAGAA)T ...  
 5'AGCTTTTCCAAAAA(TTCTCCGAACGTGTCACGT)TCTCTTGAA(ACGTGACACGTTCCGGAGAA)GGG-3'. ...  
[carcin.oxfordjournals.org/cgi/reprint/bgl002v1.pdf](http://carcin.oxfordjournals.org/cgi/reprint/bgl002v1.pdf)

[Importin 7 May Be Dispensable for Human Immunodeficiency Virus ...](#)

... [5] or a nonspecific control (NS; 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'; QIAGEN or Ambion) siRNA in OptiMEM (Invitrogen) using Oligofectamine reagent (Invitrogen). ...  
[www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?&pubmedid=16103209](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?&pubmedid=16103209)

[Biochemical and Biophysical Research Communications : NF-κB ...](#)

The control virus Ad-siNT, in which the A-p50 minigene was replaced with this sequence (5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3') that has no known target (NT) in the ...  
[linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X07010819](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X07010819)

将该 NC 序列在 genbank 中进行比对,结果仅和 Zebrafish 的两个基因有连续 16 个碱基的同源性,除此外和基因组中的任何序列没有连续 16 个碱基的同源性,因此可以用做普适型阴性对照。

**3.2 病毒载体构建框架**

NO.	5'	STEM	Loop	STEM	3'
GV119-NC-1	CCGG	TTCTCCGAACGTGTCACGT	CTCGAG	ACGTGACACGTTCCGGAGAA	TTTTTG
GV119-NC-2	AATTCAAAAA	TTCTCCGAACGTGTCACGT	CTCGAG	ACGTGACACGTTCCGGAGAA	

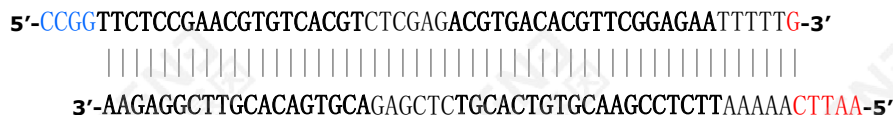
说明:由于部分客户的特殊需要,STEM 的碱基数量和 LOOP 的序列可能与本例中有所差异,请以具体的实验报告中的序列为准。

**3.3 合成单链引物**

NO.	DNA Synthesis (5' -STEM-Loop-STEM-3' )
GV119-NC-1	5' -CCGGTTCTCCGAACGTGTCACGTCTCGAGACGTGACACGTTCCGGAGAATTTTTG-3'
GV119-NC-2	5' -AATTCAAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTCTCGAGACGTGACACGTTCCGGAGAA-3'

**3.4 引物退火形成双链 DNA**

合成后成对的引物干粉溶解于退火缓冲液中,95°C水浴 15 min,自然冷却至室温, GV119-NC-1 与 GV119-NC-2 理论配对结果如下:



注:TTTTT 是终止信号。

**4. 退火产物与载体进行连接**

通过 T4 DNA ligase 将双酶切线性化的载体和退火双链 DNA 在连接 buffer 中进



行连接反应，连接后的产物进行转化实验。

**反应体系：**

试剂	体积( $\mu$ l)
线性化载体 ( 100 ng/ $\mu$ l )	1*
双链 DNA ( 100 ng/ $\mu$ l )	1
10 $\times$ T4 DNA ligase 缓冲液	2
T4 DNA ligase	1
dd H <sub>2</sub> O	补足至 20

\* 根据载体大小做相应调整

## 5. 转化

将 10  $\mu$ l 交换反应产物加入到 100  $\mu$ l 感受态细胞中，轻弹管壁数下混匀，在冰上放置 30 min。42 $^{\circ}$ C 热激 90 s，冰水浴孵育 2 min。加入 500  $\mu$ l LB 培养基，置于 37 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养 1 h。取适量菌液均匀涂布在含有相应抗生素的平板上，在恒温培养箱中倒置培养 12-16 h。

## 6. 菌落 PCR 鉴定

### 6.1 引物

ID	Seq (5' $\rightarrow$ 3' )
鉴定引物-F	CCATGATTCCTTCATATTTGC
鉴定引物-R	GTAATACGGTTATCCACGCG

## 6.2 PCR 鉴定

配制如下反应体系，震荡混匀，短暂离心。在超净工作台中，用无菌的枪头挑取单个菌落至 20  $\mu\text{L}$  鉴定体系中，吹打混匀，置于 PCR 仪中进行反应。

**鉴定反应体系：**

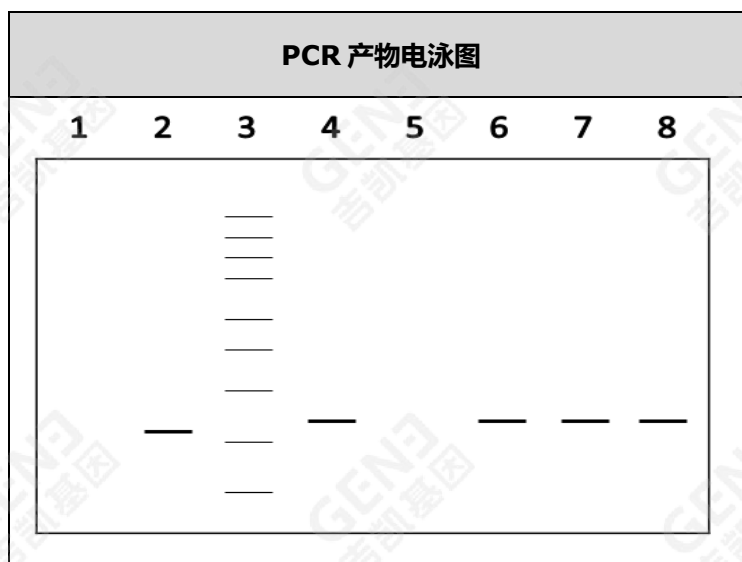
试剂	体积( $\mu\text{L}$ )
ddH <sub>2</sub> O	9.2
2×Taq Plus Master Mix	10
上游引物 (10 $\mu\text{M}$ )	0.4
下游引物 (10 $\mu\text{M}$ )	0.4
单菌落	-
Total	20

**PCR 反应条件：**

1 Cycle	22 Cycles			1 Cycle	1 Cycle
94°C	94°C	55°C <sup>1</sup>	72°C	72°C	4°C
3 min	30 s	30 s	30 s <sup>2</sup>	5 min	$\infty$

- 1 退火温度依据引物或基因 GC 含量而定，退火温度一般设定比引物的 T<sub>m</sub> 低 5°C。
- 2 延伸时间依据鉴定 PCR 产物的长度而定。Taq Plus DNA 聚合酶延伸时间按 1 Kb/min 计算。

## 6.3 鉴定结果



## 样品说明：

泳道	样品编号
1#	空白对照 <sup>1</sup>
2#	阴性对照 <sup>2</sup>
3#	250bp DNA Ladder(条带从上至下依次为 5 kb、3 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp)
4#-8#	1-5 号转化子

1 空白对照以 ddH<sub>2</sub>O 为模板，用于检测鉴定体系是否存在污染。

2 阴性对照以未插入目的基因的空载体为模板，用于证明扩增过程中无假阳性现象。

## 7. 测序

将鉴定出的阳性克隆转化子接种于适量含相应抗生素的 LB 液体培养基中，37°C 培养 12-16 h，取适量菌液进行测序。对测序结果与目的基因序列进行比对分析。比对结果如下：

```
GAGAtAATTGGaATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAG
AAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATG
CTTACCGTAACCTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAA
CACCGGTTCTCCGAACGTGTACAGTCTCGAGACGTGACACGTTTCGGAGAATTTTTG AATT
CGGATCCATTAGGCGGCCGCGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCATTAGTTATTAATAGT
AATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACG
GTAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACG
TATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
```

**说明：**RNAi 腺病毒载体中存在“发卡结构”，发卡结构的紧致与否是由基因本身特性决定，若发卡结构过于紧致则会直接影响测序结果的质量。尽管测序公司针对该问题进行了多次优化，也难以保证每个 RNAi 载体都能测通，因此测序结果会出现提前中断或前半部分测序 ok，后半部分测序乱峰的情况。对此，我们根据多年的经验判断，两个中断的测序结果如果前半部分序列相同且与目的序列一致，则该克隆即为正确克隆的可能性达 99%。

## 五、质粒抽提

将测序正确的菌液转接于 10 ml 含相应抗生素的 LB 液体培养基中，37°C 培养过夜，用天根无内毒素质粒小提中量试剂盒进行质粒抽提，抽提合格的质粒进入下游流程。详细操作步骤如下：

1. 收集过夜培养的菌液于标记好的 5 ml 离心管，12000 rpm，离心 2 min 收菌；

## GENE 吉凯基因

---

2. 弃上清,加入250  $\mu$ l细胞重悬液,充分振荡,使菌块悬浮均匀;
3. 加入250  $\mu$ l细胞裂解液,再加入10  $\mu$ l蛋白酶K,上下颠倒5-6次,轻轻混匀;静置1-2 min,致使菌体裂解澄清;
4. 加入350  $\mu$ l中和液,上下颠倒混匀,使蛋白完全析出,冰浴静置5 min;
5. 10000 rpm离心10 min,弃蛋白,收集上清于另一干净无菌的1.5 ml EP管;
6. 12000 rpm离心5 min,同时准备标记好的回收柱,将上清转移至回收柱中,12000 rpm离心1 min,弃下层废液;
7. 加入600  $\mu$ l预先配置好的漂洗液,12000 rpm离心1 min,弃下层废液,重复一次,12000 rpm空离2 min,进一步除去残留的漂洗液;
8. 在超净台中将回收柱转移至新的1.5 ml EP管中,静置10-20 min,自然晾干;
9. 往回收柱中加入95  $\mu$ l Nuclease-Free Water,静置2 min,12000 rpm离心2 min,收集样品做好编号,电泳、测定浓度,进行质检。

## 第二部分 腺病毒包装与质量检测

### 一、实验流程

吉凯采用 Frank L.Graham 教授建立的 AdMax 腺病毒包装系统进行腺病毒包装，将携带外源基因的腺病毒穿梭质粒与携带腺病毒大部分基因组 ( E1/E3 缺失 ) 的辅助包装质粒共转染 HEK293 细胞，利用 Cre-loxP ( 或 FLP/frt ) 重组酶切割系统，即可产生携带外源基因的非复制型重组腺病毒，如 Fig. 1。该包装系统操作简便，能够实现高效重组、病毒高产率及目的基因高表达。AdMax 腺病毒包装共涉及两个质粒，分别为：

- ◇ 携带目的基因或靶点序列的工具载体质粒 ( 吉凯推荐 GV314、GV135 载体等 )
- ◇ 腺病毒包装辅助质粒 ( PBHG )

我们参照经典的脂质体法进行两质粒共转染 HEK293 细胞。在转染完成后的 10-15 天进行出毒判定，根据不同的实验需求进行毒种扩增，采用相应的浓缩纯化方式，得到高滴度的腺病毒保存液，并制定严格的质量标准测定腺病毒的各项指标。在一定滴度范围内的腺病毒可以满足大部分体内外实验需求，腺病毒生产流程图如 Fig. 2。

关于 AdMax 腺病毒包装系统的详情，请登陆网站：<http://www.microbix.com/>。

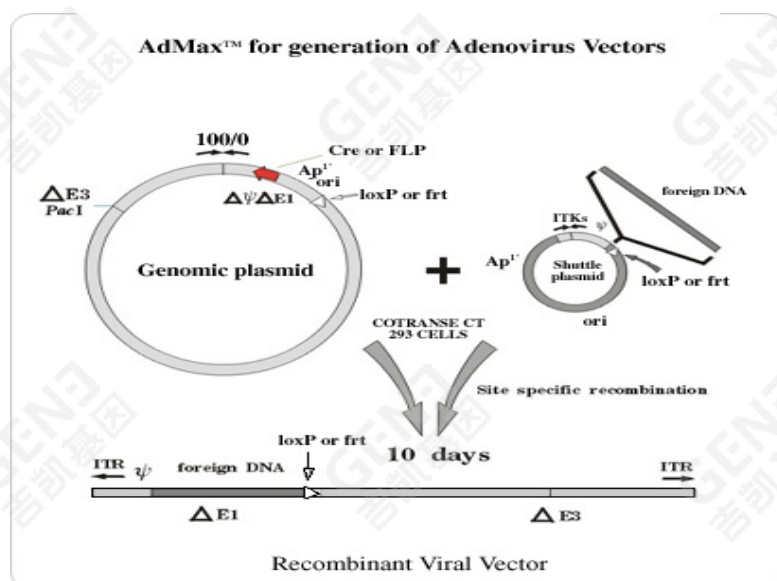


Fig. 1 Admax™ 重组腺病毒流程图

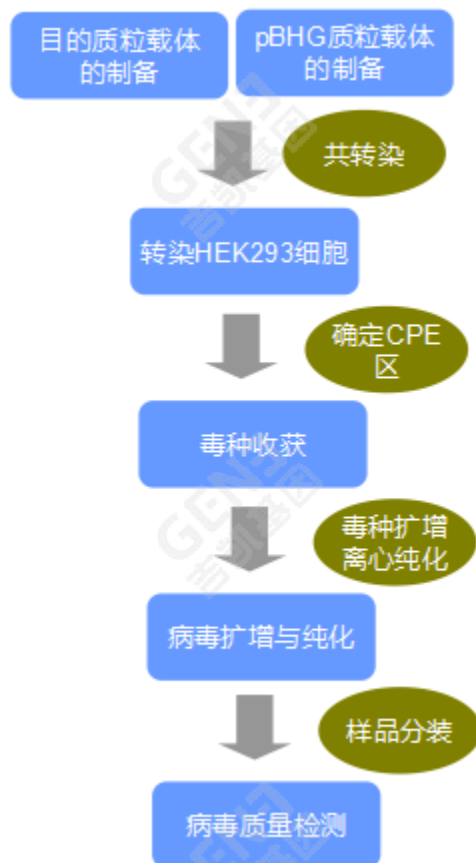


Fig. 2 腺病毒生产流程图

## 二、实验材料

### 1. 细胞株

HEK293 ( ATCC , cat# CRL-1573) 腺病毒的包装细胞，为贴壁依赖型成上皮样细胞，生长培养基为含 10% FBS 的 DMEM 培养基。该细胞中包含并表达 Ad5 型腺病毒的 E1 区域，E1 缺失的腺病毒可以在其间生长。

### 2. 菌株

大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ ，用于扩增腺病毒穿梭质粒和辅助包装载体质粒。

### 3. 质粒

- 1) 腺病毒穿梭质粒信息请参考“第一部分 腺病毒克隆的制备”。
- 2) 辅助包装质粒：pBHG lox  $\Delta$ E1, 3 Cre ( Microbix. Canada ) 携带了腺病毒大部分基因组和重组酶 CRE 基因等，质粒图谱如 Fig. 3。

pBHG lox  $\Delta$ E1, 3 Cre 序列信息请从以下网址下载：

<http://www.microbix.com/Plasmid-Sequences/pBHGloxdeltaE13Cre.zip>

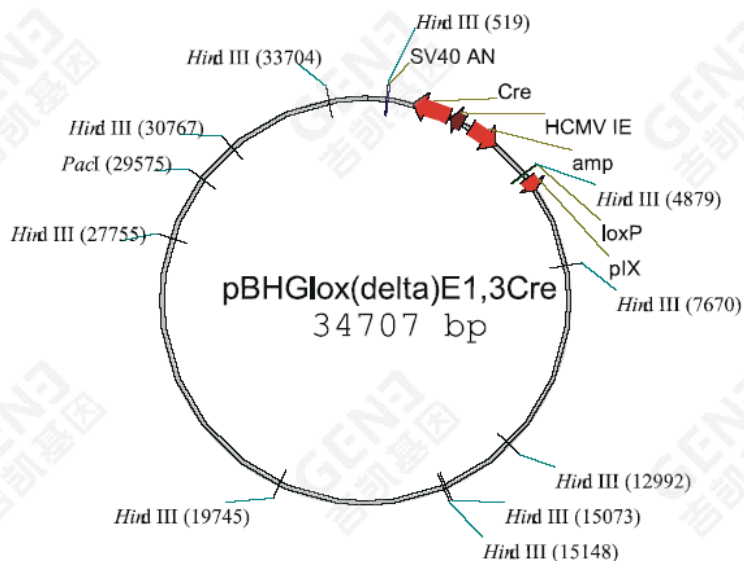


Fig. 3 pBHG lox ΔE1, 3 Cre 质粒图谱

**质粒的制备（病毒包装的质粒尽可能采用去内毒素质粒抽提试剂盒抽提）：**  
以 Qiagen 公司的质粒抽提试剂盒提取腺病毒包装系统中质粒 DNA，质粒 DNA 溶于除菌的 TE 中，以紫外光吸收法测定其浓度及纯度，保证所提质粒 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  在 1.8-2.0 之间。

#### 4. 试剂

试剂名称	试剂来源	cat.No.
胎牛血清(FBS)	上海微科生化试剂有限公司	A11-102
DMEM	Hyclone	12800-017
胰酶	上海化学试剂公司	T4665
Lipofectamine 2000	Invitrogen	11668-019
Adeno-X™ Virus Purification Kit	Clontech	631533

#### 5. 仪器

仪器名称	仪器来源	cat.No.
荧光显微镜	奥林巴斯	micropublisher 3.3RTV
CO <sub>2</sub> 培养箱	日本三洋 SANYO	MCO-175
超速离心机	Beckman	XE-90
生物安全柜	上海振样创空气净化设备有限公司	Bio 1200-II-A2

### 三、质粒转染与腺病毒收获

1. 转染前 24 h 用 0.25%胰蛋白酶消化对数生长期的 HEK293 细胞,以含 10% FBS 的 DMEM 培养基调整细胞密度为达 30%-40%,重新接种于细胞培养瓶中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。24 h 左右待细胞密度达到 50%-60% 时即可用于转染;

**注:细胞状态对于病毒包装至关重要,需保证良好的细胞状态和较少的传代次数。**

2. 转染前 2 h 更换为无血清培养基;
3. 将 DNA 溶液(穿梭质粒 5 μg、辅助质粒 5 μg)与 DMEM 混合均匀,调整总体积为 50 μl,室温下温育 5 min;取 10 μl Lipofectamine 2000 试剂与 50 μl DMEM 混合,室温下温育 5 min;将稀释后的 DNA 溶液与 Lipofectamine 2000 轻轻混匀,勿振荡,室温下温育 20 min,以便形成 DNA/Lipofectamine 2000 转染复合物;
4. 将转染复合液缓慢滴加至 HEK293 细胞培养液中,混匀,于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养;
5. 培养 6 h 后弃去含有转染混和物的培养基,加入 2 ml 的 PBS 清洗一次,轻柔晃动以洗涤残余的转染混和物后倒弃;
6. 缓慢加入含 10%血清的细胞培养基 5 ml,于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内继续培养,每天观察转染后细胞生长状况,若培养基明显变黄,酌情补加适量的新鲜完全培养液。
7. 转染后约 10-15 d,显微镜观察 HEK 293 细胞是否开始飘落,出现细胞病变 (cytopathic effect, CPE)。
8. 待大部分细胞显示典型 CPE,且有 50%细胞脱壁,低速离心收集细胞并重悬于 2 ml DMEM 中,-70°C/37°C反复冻融、振荡 3 次,4 °C、7000 g 离心 5 min,收集病毒上清于-70°C保存。

### 四、腺病毒的扩增

#### 1. 第 1 轮扩增

将生长状态良好的 HEK293 细胞传入 T25 细胞培养瓶中,待细胞汇合达 60%,弃去旧培养液,加入重组成功后的复制缺陷型腺病毒粗提液 2 mL,置于细胞培养箱中孵育 90 min 后补加完全培养液 3 mL,继续培养。待大部分细胞出现典型的 CPE,且有 50%细胞脱壁时,低速离心收集细胞并重悬于 2 ml DMEM 中,-70°C/37°C反复冻融、振荡 3 次,4 °C、7000 g 离心 5 min,收集病毒上清于-70°C保存。



## 2. 第 2 轮扩增

将生长状态良好的 HEK293 细胞传入 T25 细胞培养瓶中，待细胞汇合达 90%，弃去旧培养液，加入第 1 轮扩增所得的病毒液 2 ml，置于细胞培养箱中孵育 90 min 后补加完全培养液 10 mL，继续培养。待大部分细胞出现典型的 CPE，且有 50% 细胞脱壁时，低速离心收集细胞并重悬于 10 ml DMEM 中，-70°C/37°C 反复冻融、振荡 3 次，4 °C、7000 g 离心 5 min，收集病毒上清于 -70°C 保存。

## 五、腺病毒纯化

使用 Adeno-X™ Virus Purification Kit，BD Biosciences, Clontech，流程图如 Fig. 4。

1. 取出 BD Adeno-X 纯化装置，0.45 μm 滤膜过滤 10 ml 病毒粗提液，保存滤液于收集瓶中；
2. 向病毒滤液中加入 4 μl 25 U/μl 的 Benzonase，混匀，37°C 温育 30min 后，加入 10 ml 1×dilution buffer，混合均匀；
3. 组装过滤装置，使用灭菌 PBS 排尽滤器和套管中的空气后，将套管插入收集瓶病毒滤液中，以 5 ml/min 的速度向外拉动注射器，使病毒滤液流经滤器；

**注：避免空气进入系统。**

4. 使用 1×Wash Buffer 洗涤过滤装置；
5. 使用 5 ml 的 BD Luer-Lok 注射器洗脱腺病毒：在注射器中吸入 3 ml 的 1×Eultion Buffer；连接注射器和滤器的凹口，推入 1 ml Elution Buffer 流经滤器至 5 ml 灭菌离心管中；室温下孵育滤器 5 min，推入剩下的 elution buffer 流经滤器来收集剩下的腺病毒；
6. 将纯化后的腺病毒分装，-70°C 保存。

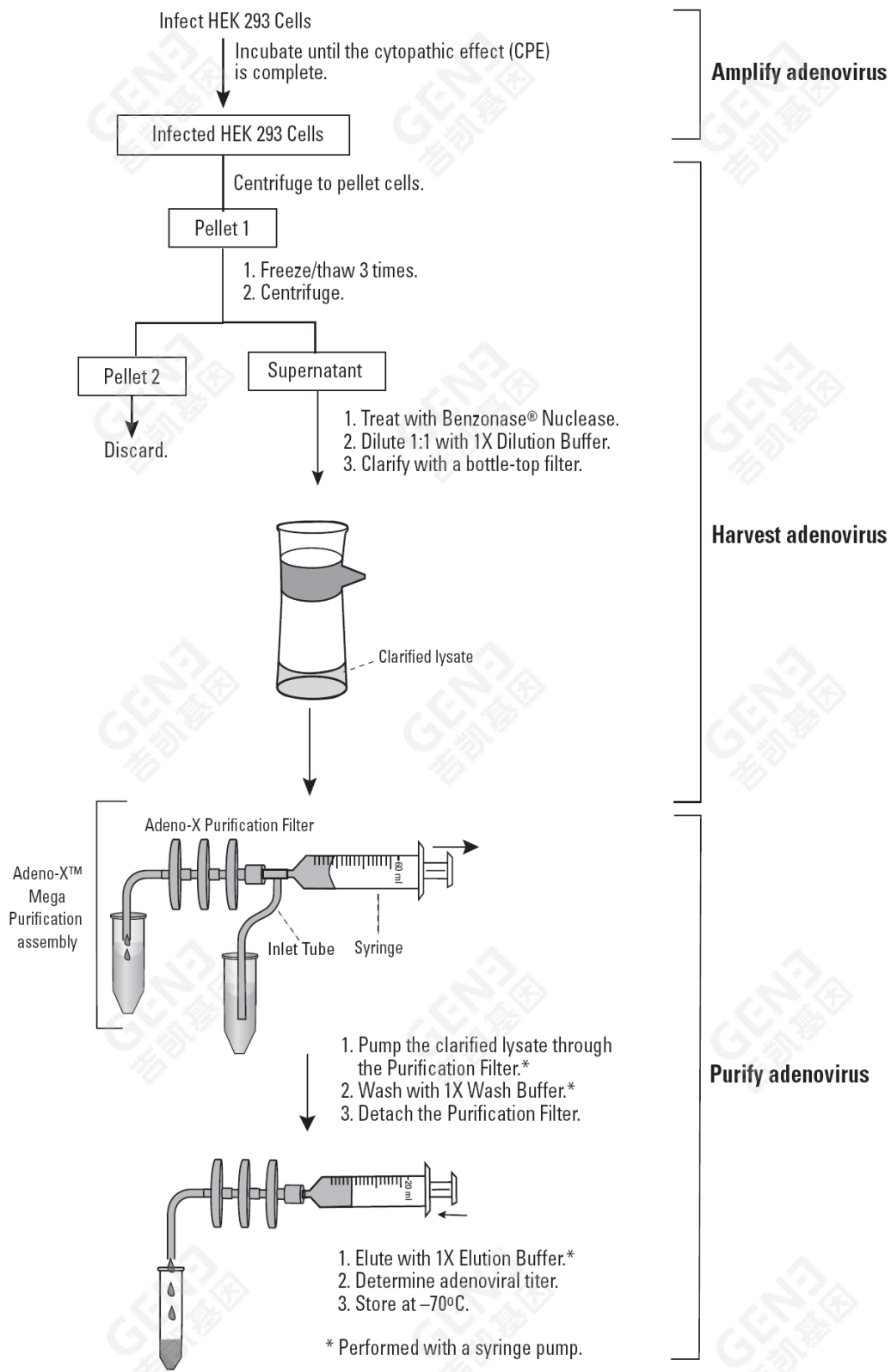


Fig. 4 Adeno-X™纯化试剂盒流程图

## 六、腺病毒质量检测

腺病毒的质量控制要点包括物理状态检测、无菌检测及病毒滴度检测。

### 1. 物理指标检测

- 1) PH 值判定：吉凯研发的腺病毒保存液 PH 值范围在 6.4-7.0 之间；
- 2) 粘稠度判定：用 20-200  $\mu\text{l}$  规格移液器缓慢吸取 50  $\mu\text{l}$  腺病毒保存液体，无明显粘稠感或吸液滞后现象；

### 2. 无菌检测

将病毒加入 HEK293 细胞验证，正常培养 24 h 后镜检，无任何细菌及真菌污染情况，同时参照空细胞组，细胞间隙无明显颗粒存在，培养基澄清透明。

### 3. 腺病毒滴度测定-终点稀释法

- 1) 实验前 24 h，铺 96 孔板，每孔传 100  $\mu\text{l}$  HEK293 细胞悬液，约含  $1 \times 10^3$  个细胞；
- 2) 准备 12 个无菌 EP 管，第一个 EP 管中加入 990  $\mu\text{l}$  完全培养液，其余 11 个 EP 管各加入 900  $\mu\text{l}$  完全培养液。
- 3) 待测病毒液的稀释：取 10  $\mu\text{l}$  腺病毒原液加入第一个 EP 管做 1:100 稀释；然后以此为起点，依次取 100  $\mu\text{l}$  病毒稀释液加入到下一个 EP 管中做 1:10 稀释，直至稀释到  $10^{-13}$ 。
- 4) 96 孔板弃旧培养液，依次加入稀释度为  $10^{-13}$  至  $10^{-6}$  的病毒液，每一稀释度占用一行，每行前 10 孔每孔加入 90  $\mu\text{l}$  病毒稀释液，第 11-12 孔加入 90  $\mu\text{l}$  不含病毒的完全培养基作为对照。
- 5) 将 96 孔板置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中继续培养。
- 6) 10 d 后观察细胞病变现象，并计数出现 CPE 的细胞孔，计算各稀释度病毒液处理后的 CPE 阳性率，计算病毒滴度。

### 病毒滴度分析(Spearman-Karber Method)：

**病毒滴度 =  $10^{(x+0.8)}$  (PFU/ml)\***

X—— $10^{-1}$  到  $10^{-13}$  依次稀释度下 CPE 阳性率总和

\*公式使用条件:

- A 阴性对照没有 CPE 和生长抑制现象；
- B 加入最小稀释浓度病毒粗提液的孔均有 CPE。

示例

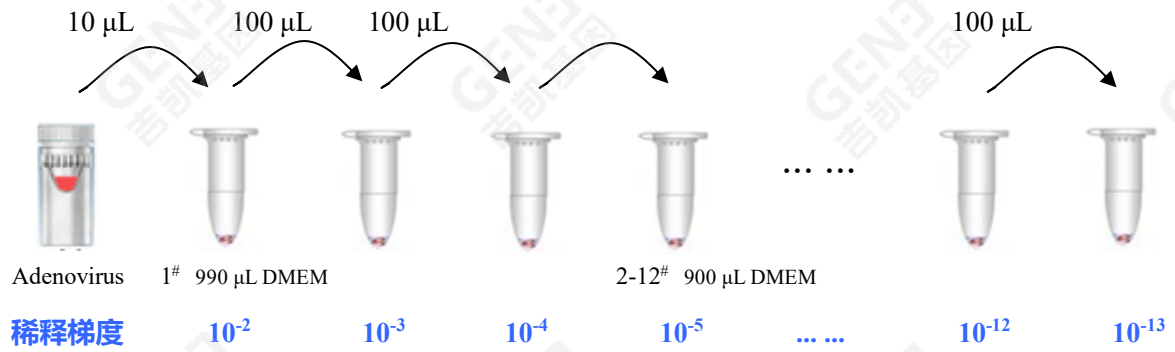


Fig.5 腺病毒稀释流程

假定终点稀释试验后得到如下结果：

dilution												Control		CPE
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
10 <sup>-6</sup>	A	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊖	⊖	100%
10 <sup>-7</sup>	B	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊖	⊖	100%
10 <sup>-8</sup>	C	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊖	⊖	100%
10 <sup>-9</sup>	D	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊖	⊖	100%
10 <sup>-10</sup>	E	⊕	⊕	⊕	⊖	⊕	⊕	⊖	⊕	⊕	⊕	⊖	⊖	80%
10 <sup>-11</sup>	F	⊕	⊖	⊕	⊖	⊕	⊖	⊕	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	40%
10 <sup>-12</sup>	G	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	0%
10 <sup>-13</sup>	H	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	0%

⊕表示 CPE 阳性 ⊖表示 CPE 阴性

由于稀释度为 10<sup>-6</sup> 的孔中 CPE 均为阳性，所以认为稀释度为 10<sup>-1</sup> 至 10<sup>-5</sup> 的孔中 CPE 也都为阳性，则 X = 1 × 9 + 0.8 + 0.4 = 10.2

**本样品病毒滴度 = 10<sup>(x+0.8)</sup> = 10<sup>(10.2+0.8)</sup> = 1 × 10<sup>11</sup> (PFU/ml)**

## 参考文献

1. Adeno-X™ Virus Purification Kit (BD Biosciences, Clontech) 说明书 (<http://www.bdbiosciences.com/cn/index.jsp>).
2. 天根无内毒素质粒小提中量试剂盒说明书 (<http://www.tiangen.com/?productShow/t1/1/id/305.html>).
3. Li M, Rossi JJ. Lentiviral Vector Delivery of siRNA and shRNA Encoding Genes into Cultured and Primary Hematopoietic Cells. *Methods Mol Biol.* 2005;309:261-72.
4. Fish RJ, Kruithof EK. Short-term cytotoxic effects and long-term instability of RNAi delivered using lentiviral vectors. *BMC Mol Biol.* 2004 Aug 3;5(1):9.
5. Bett, A. J., Haddara, W., Prevec, L. and Graham, F.L An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 91: 8802-8806, 1994.
6. Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A, Pavirani, A., and Mehtali, M. (1996). Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 70, 4805-4810.
7. Addison, C. L., Hitt, M., Kunsken, D., and Graham, F. L. (1997). Comparison of the human versus murine cytomegalovirus immediate early gene promoters for transgene expression by adenoviral vectors. *J. Gen. Virol.* 78, 1653-1661.
8. Fallaux, F.J., Kranenburg, O., Cramer, S.J., Houweling, A., Van Ormondt, H., Hoeben, R.C., Van der Eb, A.J. Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 7, 215-222, 1996.
9. Ng, P., Parks, R. J., Cummings, D. T., Eveleigh, C. M., Sankar, U., & Graham, F. L. (1999). A high efficiency Cre/loxP based system for construction of adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 10, 2667-2672.
10. Ng, P., Parks, R. J., Cummings, D. T., Eveleigh, C. M., & Graham, F. L. (1999). An enhanced system for construction of adenoviral vectors by the two plasmid rescue method. *Hum. Gene Ther.* 11:693-699, 2000.
11. Ng, P., Cummings, D. T., Eveleigh, C. M. and Graham, F. L. The yeast recombinase FLP functions effectively in human cells for construction of adenovirus vectors. *BioTechniques* 29: 524-528, 2000.

更多吉凯腺病毒相关文章信息，请登录吉凯网站获取：<http://www.genechem.com.cn/>