

过表达腺病毒载体

构建和包装手册

Version3.0

吉凯基因

目 录

第一部分 过表达腺病毒克隆的制备	4
一、实验流程	4
二、实验材料	5
三、克隆构建实例	6
四、质粒抽提	12
第二部分 腺病毒包装与质量检测	14
一、实验流程	14
二、实验材料	15
三、质粒转染与腺病毒收获	16
四、腺病毒的扩增	17
五、腺病毒纯化	18
六、腺病毒质量检测	19
参考文献	22

简介

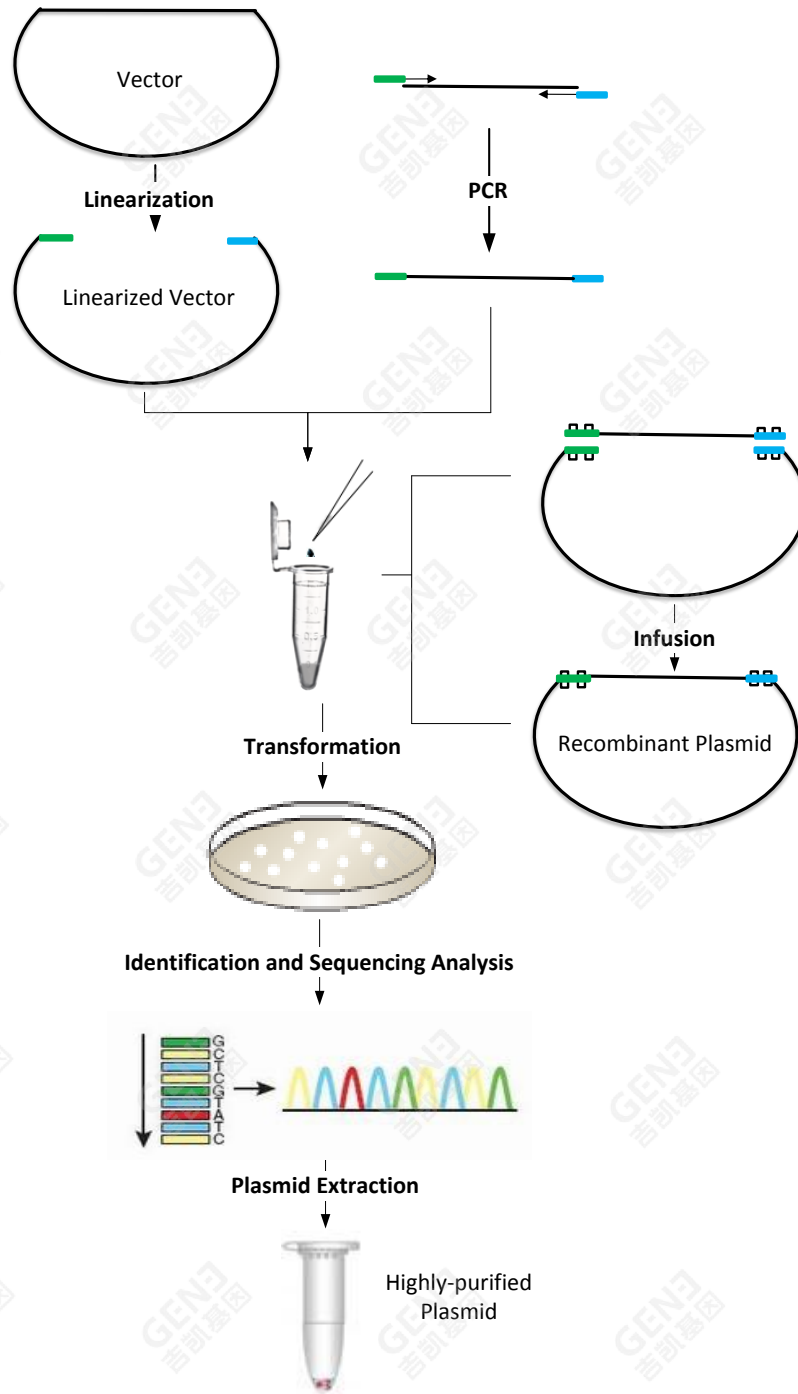
腺病毒(Adenovirus)是一种线性双链 DNA 无包膜病毒,线状双股 DNA 与核心蛋白形成直径为 60-65 nm 的髓芯,被包裹于蛋白外壳内。蛋白外壳是直径约 80 nm 的正二十面体,由 252 个直径 8-10 nm 的壳粒组成,壳粒排列在三角形的面上,每边 6 个,其中 240 个为六邻体(非顶点壳粒),另 12 个为五邻体基底(顶点壳粒)。腺病毒载体是以腺病毒为基础发展起来的基因治疗载体,它对分裂期细胞和非分裂期细胞均具有感染能力,它通过受体介导的内吞作用进入细胞内,将腺病毒基因组转移至细胞核内,保持在染色体外,不整合进入宿主细胞基因组中。吉凯基因所使用的腺病毒载体 E1 和 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。

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。

本手册为吉凯基因过表达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 过表达腺病毒克隆的制备

一、实验流程



利用限制性内切酶消化获得线性化载体。PCR 扩增制备目的基因片段。所

用扩增引物在设计时需在其 5'端添加同源重组序列（图中以绿色和蓝色标记），使用该引物扩增目的基因片段，扩增产物 5'和 3'最末端的序列分别与线性化克隆载体两末端序列完全一致。以线性化载体和目的基因扩增产物配制反应体系，进行重组反应，实现线性化载体和目的基因片段的体外环化。重组产物直接进行转化，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™ 250bp-II DNA Ladder	GeneRay	#DL2502
Restriction Endonuclease	NEB	
PrimeSTAR HS DNA polymerase	Takara	#R010B
Taq Plus DNA polymerase	Vazyme	#P201-D3
ClonExpress™ II One Step Cloning Kit	Vazyme	#C122
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、克隆构建实例

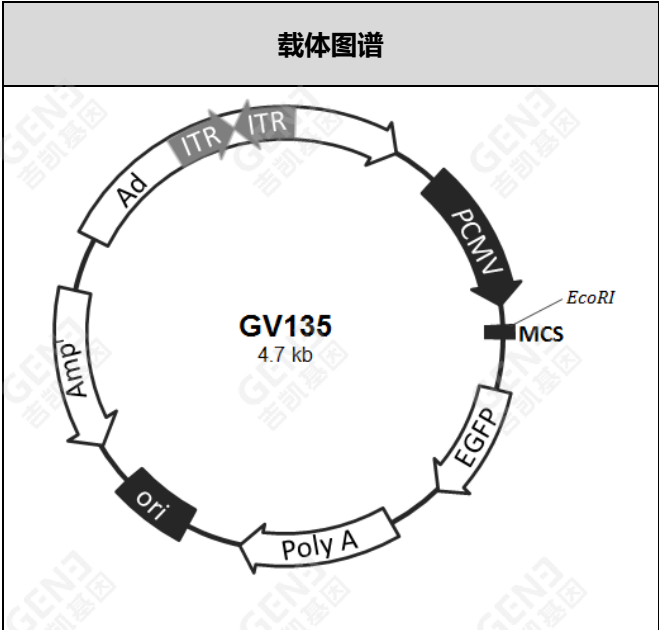
以 ANG1 基因为例描述详细实验过程

1. 目的基因及工具载体信息

1.1 目的基因：

Symbol : ANG1
Accession : NM_001146
Organism : Human
CDS Length : 1497 bp

1.2 工具载体：

载体图谱	载体说明
	<p>载体编号： GV135</p> <p>元件顺序： CMV-MCS-EGFP</p> <p>荧光标记： EGFP</p> <p>克隆位点： EcoR I</p>

2. 载体酶切

根据如下列表，配制 50 μ 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 $^{\circ}$ C¹ 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 ₂ O	42
10×CutSmart Buffer ²	5
纯化的质粒 DNA (1 μg/μL)	2
<i>EcoR</i> I (10 U/μl)	1
Total	50

- 大部分限制性内切酶的最适反应温度为 37℃，但也有一些不是 37℃，例如 *Apa* I 为 25℃，*Bsi* I 为 75℃。根据所需限制性内切酶确定相应的反应温度。
- 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>1#: 250 bp DNA Ladder (条带从上到下依次为：5 kb、3 kb、2 kb、1.5 kb、1 Kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp)</p> <p>2#: 经过 <i>EcoR</i> I 酶切的 GV135 Vector</p> <p>3#: GV135 Vector</p>

3. 目的基因片段的获取

3.1 引物

ID	Seq (5' → 3')
ANG1-F	GTAGAACGCAGATCGAATT <u>CCGCCACCAT</u> GACAGTTTTCTTTCTTTG
ANG1-R	CCCTTGCTCACCAT <u>GAATTC</u> AAAATCTAAAGGTCGAATCATC

扩增引物说明： 扩增引物包含交换配对碱基、酶切位点(下划线标记)、表达增强序列 (双下划线记) 以及目的基因 5'端部分序列用于 PCR 钓取目的基因。

3.2 PCR 扩增目的基因片段

配制如下反应体系，轻轻吹打混匀，短暂离心，置于 PCR 仪中进行反应。

反应体系：

试剂	体积(μL)
ddH ₂ O	32.5
5×PS Buffer	10
dNTP Mix(2.5 mM each)	4
上游扩增引物(10 μM)	1
下游扩增引物(10 μM)	1
模板 ¹ (10 ng/ μL)	1
PrimeSTAR HS DNA polymerase	0.5
Total	50


- ¹ 模板来源为质粒或者菌液。质粒模板用量一般小于 200 ng，菌液模板用量一般为 1 μL ，最佳用量请参考 PrimeSTAR HS DNA polymerase 使用说明书。

反应条件：

1 Cycle	30 Cycles			1 Cycle	1 Cycle
98°C	98°C	55°C ¹	72°C	72°C	4°C
5 min	10 s	10 s	90 s ²	8 min	∞

- 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_m 低 5°C。
² 延伸时间依据 PCR 产物的长度而定。PrimeStar HS DNA 聚合酶延伸时间按 1 Kb/min 计算。

3.3 PCR 扩增结果

PCR 产物电泳图	电泳图说明
	<p>1#: PCR 产物</p> <p>2#: 250 bp 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)</p>

4. PCR 产物与载体进行交换

于冰水浴中配制如下反应体系。用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心，避免产生气泡。于 37℃ 反应 30 min，随后置于冰水浴中冷却 5 min 后立即转化。

反应体系：

反应体系	阳性对照(μL)	自连对照(μL)	实验组(μL)
ddH ₂ O	2.5	4.5	3.5
5×CE II Buffer	2	2	2
酶切后的载体 DNA	2.5	2.5	2.5
纯化后的 PCR 产物片段	2	0	1
Exnase™ II	1	1	1
Total	10	10	10

说明：

- 加入的线性化载体 DNA 和纯化的 PCR 产物的最适摩尔比为 1 : 2
- 阳性对照加入的纯化的 PCR 产物为 GAPDH 基因 (带有同样的交换臂)

5. 转化

将 10 μL 交换反应产物加入到 100 μL 感受态细胞中，轻弹管壁数下混匀，在冰上放置 30 min。42℃ 热激 90 s，冰水浴孵育 2 min。加入 500 μL LB 培养基，置于 37℃ 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' → 3')
鉴定引物-F	TGCCATTACCAGTCAGAG
鉴定引物-R	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG

鉴定引物说明：本对引物一个位于目的基因中，一个位于载体上，用于菌落 PCR 鉴定转化子。

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 μ 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(μ L)
ddH ₂ O	9.2
2× Taq Plus Master Mix	10
上游引物 (10 μ M)	0.4
下游引物 (10 μ M)	0.4
单菌落	-
Total	20

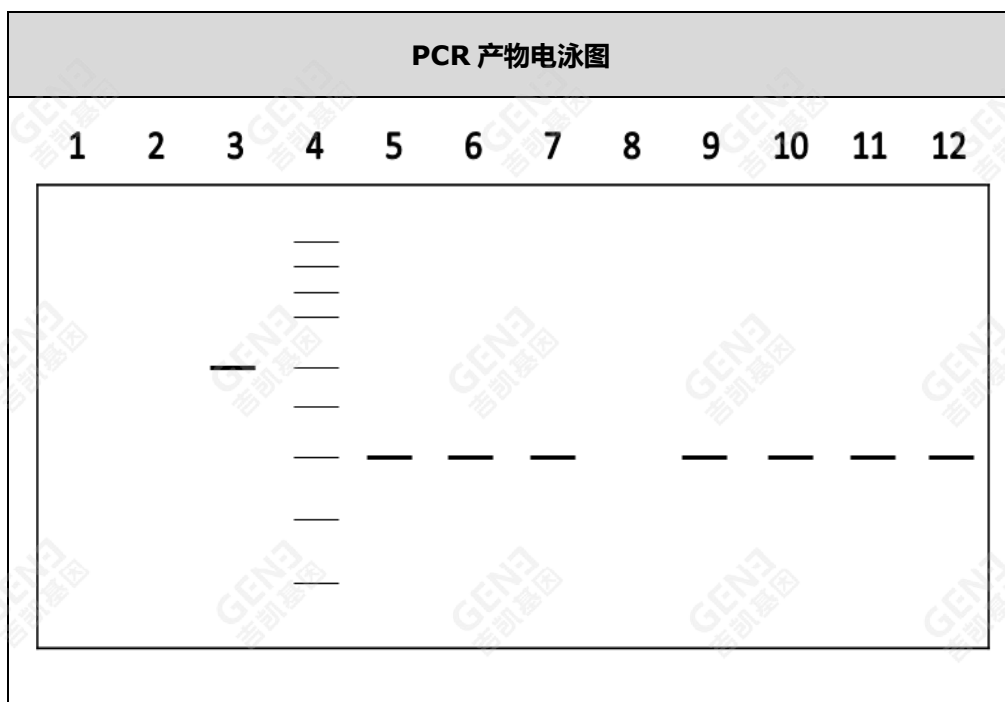
PCR 反应条件：

1 Cycle	22 Cycles			1 Cycle	1 Cycle
94 $^{\circ}$ C	94 $^{\circ}$ C	55 $^{\circ}$ C ¹	72 $^{\circ}$ C	72 $^{\circ}$ C	4 $^{\circ}$ C
3 min	30 s	30 s	45 s ²	5 min	∞

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_m 低 5 $^{\circ}$ 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 ¹
2#	阴性对照 ²
3#	阳性对照 ³
4#	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)
5# ~ 12#	ANG1-1 ~ 8 号转化子

¹ 空白对照以 ddH₂O 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。

³ 阳性对照以含有 GAPDH 基因的 DNA 为模板，用于验证鉴定工作体系是否正常。阳性对照也可以用含有目的片段的 DNA 作为模板及有效的引物进行扩增，扩增片段大小视具体情况而定。

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℃ 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：

TTCTGACCACCGTAGAACGCAGATCGAATTCGCCACCATGACAGTTTTCTTTCTTTGCTTTCTCGCTGCCATTCTGACTCACATAGGGTGCAGCAATCAGCGCCGAAGTCCAGAAAA

CAGTGGGAGAAGATATAACCGGATTCAACATGGGCAATGTGCCTACACTTTTCATTCTTCCA
GAACACGATGGCAACTGTCGTGAGAGTACGACAGACCAGTACAACACAAACGCTCTGCA
GAGAGATGCTCCACACGTGGAACCGGATTTCTCTTCCCAGAACTTCAACATCTGGAACA
TGTGATGGAAAATTATACTCAGTGGCTGCAAAAACCTTGAGAATTACATTGTGGAAAACATG
AAGTCGGAGATGGCCCAGATACAGCAGAATGCAGTTCAGAACCACACGGCTACCATGCT
GGAGATAGGAACCAGCCTCCTCTCTCAGACTGCAGAGCAGACCAGAAAGCTGACAGATG
TTGAGACCCAGGTAATACTAACTTCTCGACTTGAGATACAGCTGCTGGAGAATTCATT
ATCCACCTACAAGCTAGAGAAGCAACTTCTTCAACAGACAAATGAAATCTTGAAGATCCAT
GAAAAAACAGTTTATTAGAACATAAAATCTTAGAAATGGAAGGAAAACACAAGGAAGAGT
TGGACACCTTAAAGGAAGAGAAAAGAGAACCTTCAAGGCTTGGTTACTCGTCAAACATATAT
AATCCAGGAGCTGGAAAAGCAATTAACAGAGCTACCACCAACAACAGTGTCTTCAGAA
GCAGCAACTGGAGCTGATGGACACAGTCCACAACCTTGTCAATCTTTGCACTAAAGAAGG
TGTTTTACTAAAGGGAGGAAAAGAGAGGAAGAGAAACCATTTAGAGACTGTGCAGATGT
ATATCAAGCTGGTTTTAATAAAAGTGAATCTACACTATTTATATTAATAATATGCCAGAACC
CAAAAAGGTGTTTTGCAATATGGATGTCAATGGGGGAGGTTGGACTGTAATACAACATCGT
GAAGATGGAAAGTCTAGATTTCCAAAGAGGCTGGAAGGAATATAAAATGGGTTTTGGAAAT
CCCTCCGGTGAATATTGGCTGGGGAATGAGTTATTTTTGCCATTACCAGTCAGAGGCAGT
ACATGCTAAGAATTGAGTTAATGGACTGGGAAGGGAACCGAGCCTATTACAGTATGACA
GATTCCACATAGGAAATGAAAAGCAAACCTATAGGTTGTATTTAAAAGGTCACACTGGGAC
AGCAGGAAAACAGAGCAGCCTGATCTTACACGGTGTGATTTCAGCACTAAAGATGCTGA
TAATGACAACGTATGTGCAAATGTGCCCTCATGTTAACAGGAGGATGGTGGTTTGTGCT
TGTGGCCCCTCAATCTAAATGGAATGTTCTATACTGCGGGACAAAACCATGGAAAACCTGA
ATGGGATAAAGTGGCACTACTTCAAAGGGCCAGTTACTCCTTACGTTCCACAACCTATGAT
GATTCGACCTTTAGATTTTGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCGC

比对结果说明：测序结果与目标序列完全一致

四、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℃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；
2. 弃上清，加入250 μl细胞重悬液，充分振荡，使菌块悬浮均匀；
3. 加入250 μl细胞裂解液，再加入10 μl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 μl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 μ 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 μ 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/>。

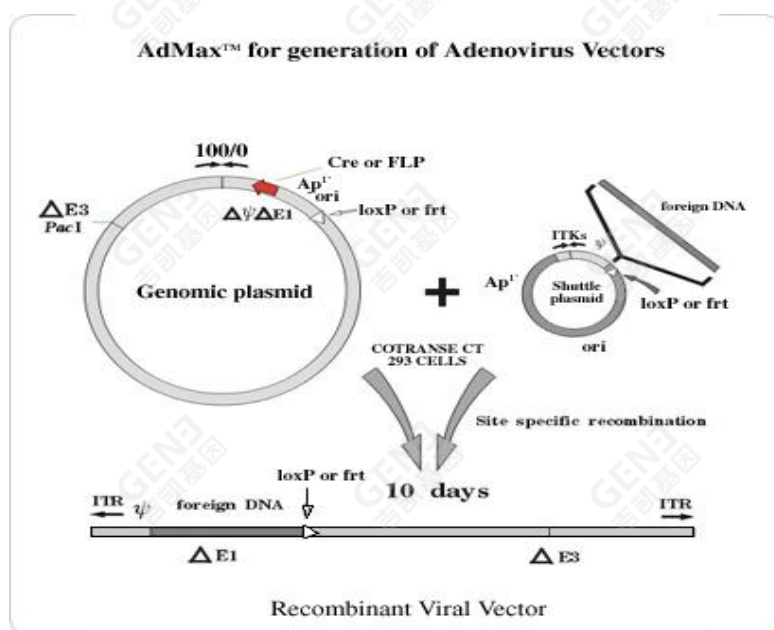


Fig. 1 Admax™ 重组腺病毒流程图

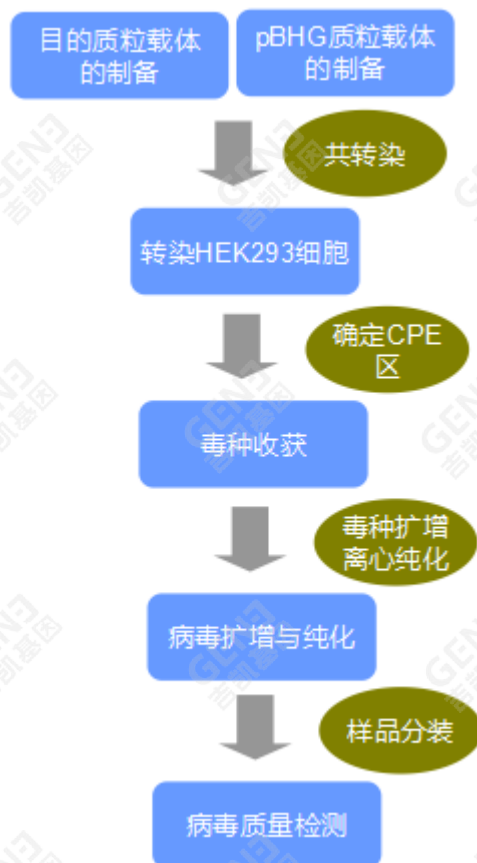


Fig. 2 腺病毒生产流程图

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 α ，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 Δ 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 Δ E1, 3 Cre 序列信息请从以下网址下载：

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

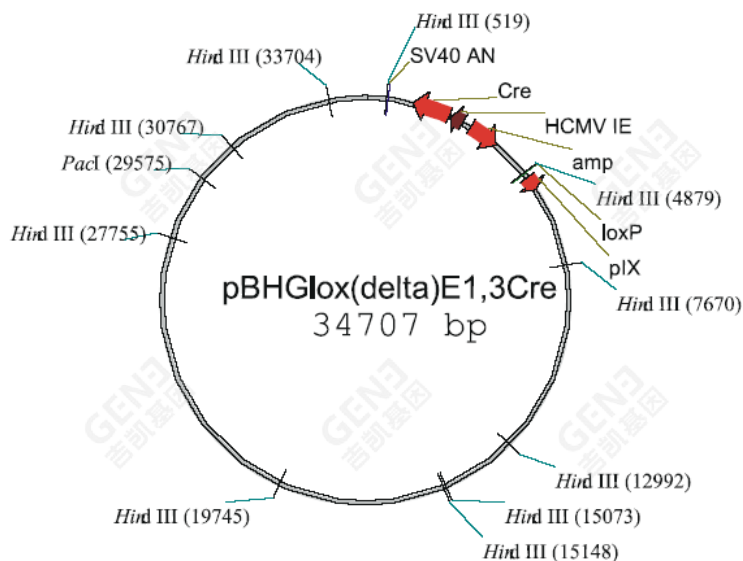


Fig. 3 pBHG lox ΔE1, 3 Cre 质粒图谱

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 A₂₆₀/A₂₈₀ 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 ₂ 培养箱	日本三洋 SANYO	MCO-175
超速离心机	Beckman	XE-90
生物安全柜	上海振祥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℃、5% CO₂ 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℃、5% CO₂ 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℃、5% CO₂ 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℃/37℃ 反复冻融、振荡 3 次，4℃、7000 g 离心 5 min，收集病毒上清于 -70℃ 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℃/37℃ 反复冻融、振荡 3 次，4℃、7000 g 离心 5 min，收集病毒上清于 -70℃ 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。

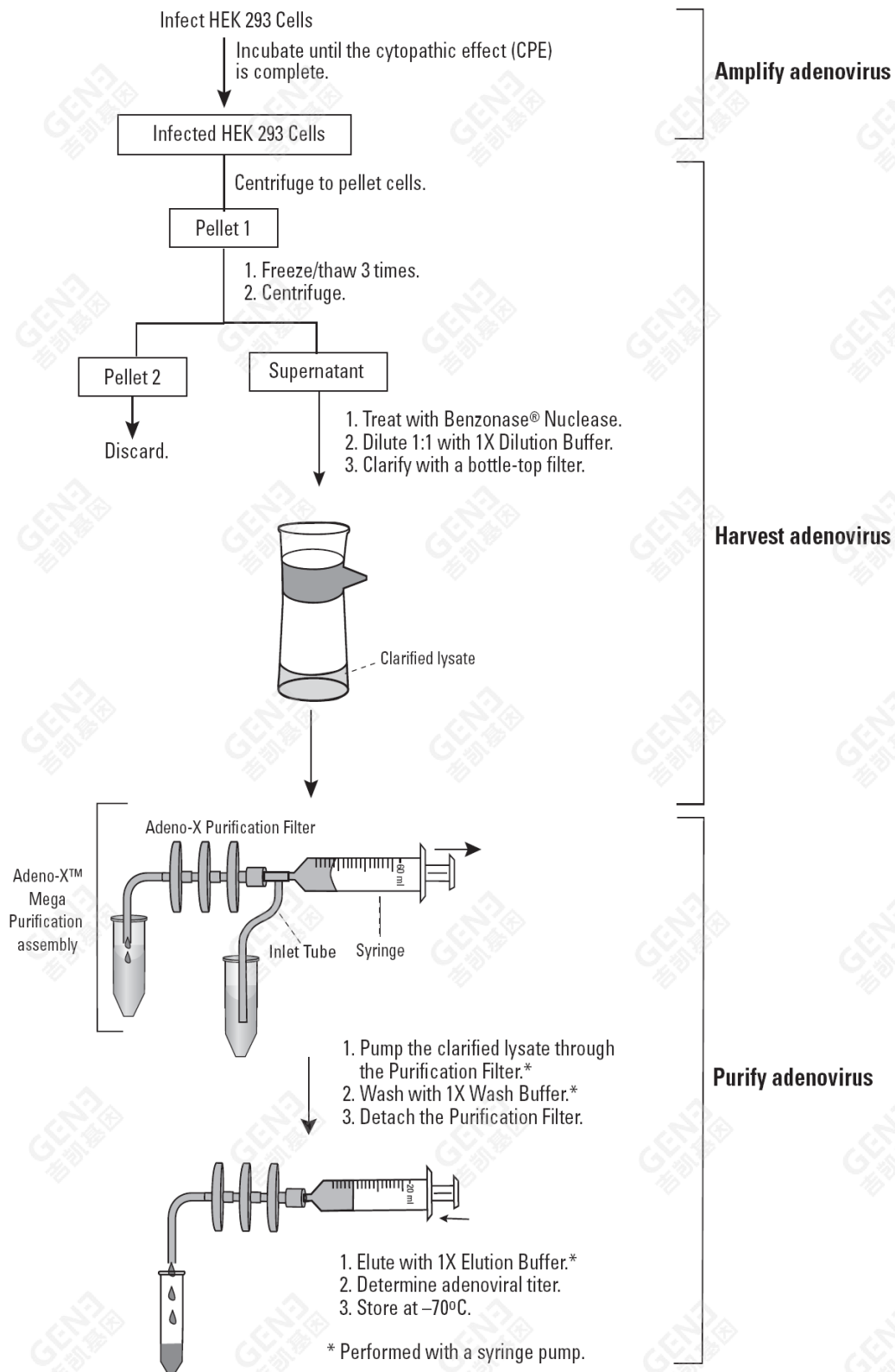


Fig. 4 Adeno-X™纯化试剂盒流程图

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 μl 规格移液器缓慢吸取 50 μl 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 μl HEK293 细胞悬液，约含 1×10^3 个细胞；
- 2) 准备 12 个无菌 EP 管，第一个 EP 管中加入 990 μl 完全培养液，其余 11 个 EP 管各加入 900 μl 完全培养液。
- 3) 待测病毒液的稀释：取 10 μl 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 μl 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 μl 病毒稀释液，第 11-12 孔加入 90 μl 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% 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)：

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

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

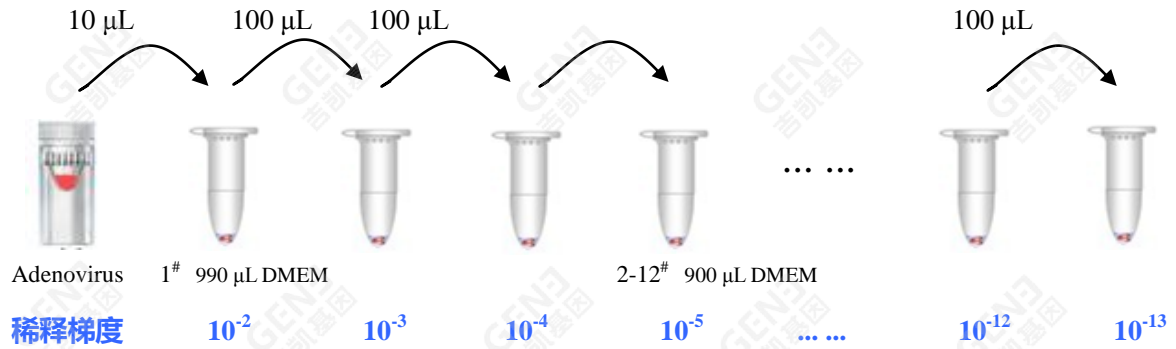


Fig.5 腺病毒稀释流程

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^{-6}	A	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊖	⊖	100%
10^{-7}	B	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊖	⊖	100%
10^{-8}	C	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊖	⊖	100%
10^{-9}	D	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊖	⊖	100%
10^{-10}	E	⊕	⊕	⊕	⊖	⊕	⊕	⊖	⊕	⊕	⊕	⊖	⊖	80%
10^{-11}	F	⊕	⊖	⊕	⊖	⊕	⊖	⊕	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	40%
10^{-12}	G	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	0%
10^{-13}	H	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	0%

⊕表示 CPE 阳性 ⊖表示 CPE 阴性

由于稀释度为 10^{-6} 的孔中 CPE 均为阳性，所以认为稀释度为 10^{-1} 至 10^{-5} 的孔中 CPE 也都为阳性，则 $X = 1 \times 9 + 0.8 + 0.4 = 10.2$

本样品病毒滴度 = $10^{(x+0.8)} = 10^{(10.2+0.8)} = 1 \times 10^{11}$ (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. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Mizuguchi, H., and Kay, M. A. (1998). Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. Hum. Gene Ther. 9, 2577-2583.
8. 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.
9. 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/>