

**GENE** 吉凯基因

致力转化医学 共创健康明天

STRIVE TO TRANSFORM MEDICINE TO  
CREATE A HEALTHY TOMORROW

**PRODUCT  
TECHNICAL  
MANUALS**  
**产品技术手册**



400 621 0302 (总机)

[www.genechem.com.cn](http://www.genechem.com.cn)



吉凯基因版权所有，未经许可禁止全部及部分复制。

Version GA118.3

**SHANGHAIGENECHM CO.,LTD.**

上海吉凯基因医学科技股份有限公司

[www.genechem.com.cn](http://www.genechem.com.cn)



DEDICATED

TO PROMOTING TRANSLATIONAL MEDCINE

CONTRIBUTE

TO BUILDING A HEALTHIER TOMORROW

致力转化医学 共创健康明天

# 目录 CONTENTS

## 01 基因操作方法及工具

基因操作方法简介	2
基因操作工具简介	4
基因操作工具选择指南	6
如何选择合适的启动子	7
热点专题-轻松玩转circRNA	8
热点专题- CRISPR/Cas9文库在手，靶标筛选不用愁！	9
基因操作方法及工具-FAQ	11

## 02 基因操作工具应用-细胞实验

细胞培养基本知识	13
细胞支原体污染解决	13
慢病毒感染细胞	14
稳定株细胞株筛选	15
热点专题-自噬，不可不知的诺奖级别热点！	15
热点专题-自噬的检测和评价方法	17
基因操作工具应用-FAQ	18

## 03 基因操作工具应用-动物实验

工具病毒在不同系统中的应用文献综述	19
工具病毒在不同系统中的注射方法综述	20
基因操作工具在体应用-FAQ	37

## 04 资源共享平台

过表达、RNAi慢病毒现货产品	39
cDNA克隆现货产品	40
CRISPR-POOL(TM)全基因组筛选文库现货产品	40
工具腺相关病毒(AAV)现货产品	42
工具细胞株现货产品	48

## 05 基因功能与机制研究相关产品及技术服务

基因操作工具	50
基因功能验证	52
机制研究	53
附录：吉凯推荐病毒载体列表	53

## 06 关于吉凯基因

企业简介	56
吉凯基因工程化服务平台	57
科研能力	57
科研合作成果	59

# GENE MANIPULATION METHODS AND TOOLS

## 基因操作方法及工具

- 基因操作方法简介
- 基因操作工具简介
- 基因操作工具选择指南
- 如何选择合适的启动子
- 热点专栏-轻松玩转circRNA
- 热点专栏- CRISPR/Cas9文库在手，靶标筛选不用愁！
- 基因操作方法及工具-FAQ

01

### BRIEF INTRODUCTION OF GENE MANIPULATION METHODS

## 基因操作方法简介

基因的功能研究可分为 loss-of-function 和 gain-of-function 两个方向, 分别通过抑制内源基因的表达和过表达该基因来进行。

### 下调基因表达

#### RNA 干扰

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi), 是指由小干扰 RNA (small mRNA 结合。核酸酶在 siRNA 反义链与 mRNA 所形成的双链区的中 interfering RNA, siRNA) 所介导的转录后基因沉默现象 (图 1)。双链 央区域切断并降解 mRNA, 导致靶基因的转录后沉默。 RNA (double strand RNA, dsRNA) 与 RNAi 核酸酶 Dicer 结合后, RNAi 可特异性的抑制靶基因表达, 不仅能灵活组合同时抑制多个靶被切割成 21~23nt 的 siRNA, 再被输送到 RNA 诱导沉默复合物 基因, 还可用于大规模的基因筛选, 已被广泛用于基因功能研究和基 (RNA-induced silencing complex, RISC), 并引导 RISC 与同源性 因治疗领域。

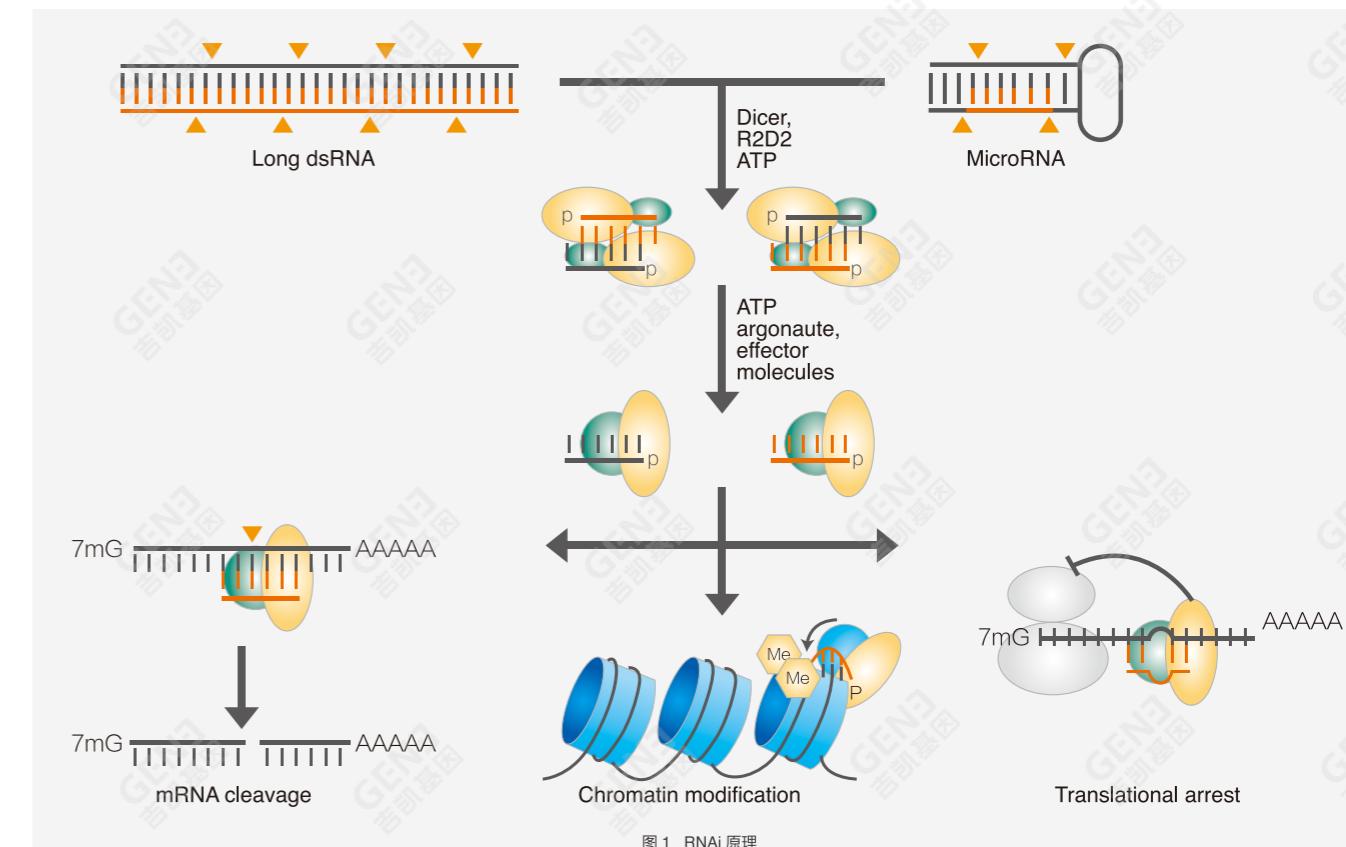


图 1 RNAi 原理

#### CRISPR / Cas9 基因敲除

目前研究最透彻、应用最广泛的 II 型 -CRISPR/Cas9 系统由两部分组成:

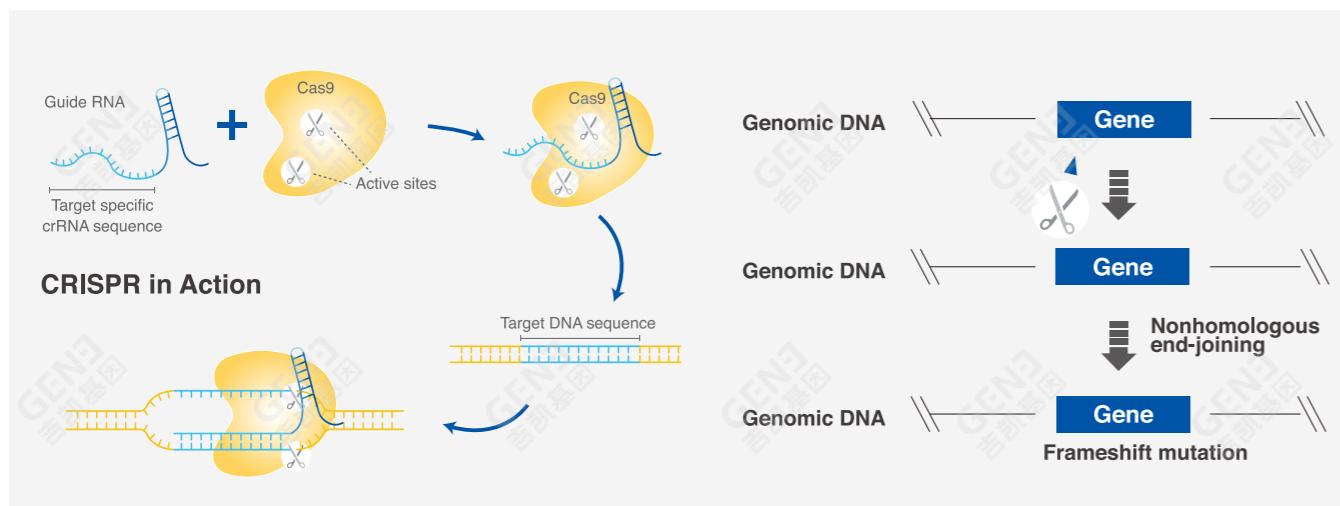
- 单链的 guide RNA (single-guide RNA, sgRNA)
- 有核酸内切酶活性的 Cas9 蛋白

CRISPR/Cas9 系统利用 sgRNA 来识别靶基因 DNA, 并引导 Cas9 核酸内切酶剪切 DNA(图 2)。当基因组发生双链 DNA 断裂后, 细胞通过

非同源性末端接合 (Non-homologous end joining, NHEJ) 将断裂接合, 在此过程中, 将随机引入 N 个碱基的缺失或增加, 若 N 非 3 的倍数,

则目的基因发生移码突变, 实现基因敲除。

CRISPR 相对 ZFN, TALEN 等基因打靶技术而言更为简单, 廉价,



RNA 干扰是从 mRNA 水平对目的基因进行敲减，而 CAS9 是从基因组水平对基因进行敲除，可完全消除目的基因在细胞内的表达，靶蛋白的功能也因此完全丧失。此外，CAS9 靶点选择范围可以扩大到所有基因组序列，如启动子、内含子等等都可以被剪切（表 1）。

对比	RNAi	CAS9
作用水平	mRNA 水平	基因组水平
靶位点范围	仅转录本	所有基因组序列，如外显子，内含子，启动子，增强子，基因间序列等
靶蛋白消除水平	不完全消除	完全消除
靶蛋白功能	部分丧失	完全丧失

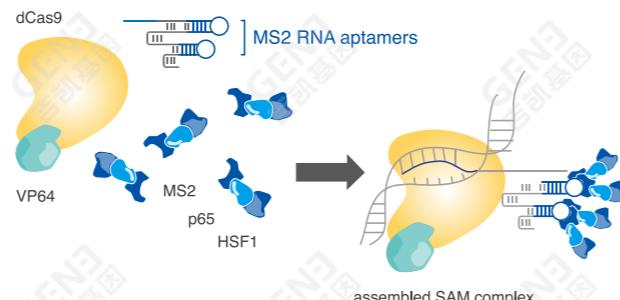
表 1 CRISPR/Cas9 基因敲除与 RNAi 比较

## 上调基因表达

研究基因功能时，除了采用 RNAi、Cas9 基因敲除构建功能缺失的表型，往往还需要观察基因激活表型。

目前上调基因表达的常用方法是将目的基因的编码区（CDS）构建到质粒或病毒载体中，导入细胞内使基因的表达量增加。但该技术受限于载体容量，只能用于研究一定长度内的基因。

相比而言，通过修饰 CRISPR/Cas9 系统中的一些元件，形成一种蛋白复合物 - 协同激活介质（SAM），可实现对多数细胞内源基因的特异性激活。该系统灵活方便，为研究基因功能提供了极为便利的工具。



## CRISPR-SAM

CRISPR-SAM 系统由三部分组成：

- 失去核酸酶活性的 dCas9 (deactivated Cas9) -VP64 融合蛋白
- 含 2 个 MS2 RNA adapter 的 sgRNA
- MS2-P65-HSF1 激活辅助蛋白

其中的 MS2-P65-HSF1 激活辅助蛋白就是 SAM，全称为 Synergistic Activation Mediator( 协同激活调节器 )，这也就是 CRISPR-SAM 的命名由来。

CRISPR-SAM 借助 dCas9-sgRNA 的识别能力，通过 MS2 与 MS2 adapter 的结合作用，将 P65/HSF1/VP64 等（均为转录激活因子）拉拢到目的基因启动子区域，成为一种强效的选择性基因活化剂，从而增强基因的转录表达（图 3）。

## CRISPR-SAM 优势

传统过表达技术受限于载体的容量，只能用于研究一定长度内的基因，且一次只能过表达基因的一个转录本。而 SAM 技术通过激活目的基因启动子的方式实现过表达，可以不受基因大小的限制，且一次可以过表达基因的所有转录本，实现整个基因层面的上调。除此之外，这种基于 Cas9 系统的基因激活方法还可作为高通量筛选的一个强有力工具。如需要实现多基因，甚至全基因组规模上的基因上调，只需将 1 个 sgRNA 换成含有成千上万个 sgRNA 的文库，就能靶向全基因组 23,430 个编码元件，实现全基因组水平上的 gain-of-function 筛选。

## BRIEF INTRODUCTION OF GENE MANIPULATION TOOLS 基因操作工具简介

涉及到基因操作，大家一开始接触到的应该就是质粒。

### 质粒的优势在于：

表达时间很快，导入细胞后约 24 小时就可以观察到目的基因的表达  
构建技术简单，因而成本也比较低。

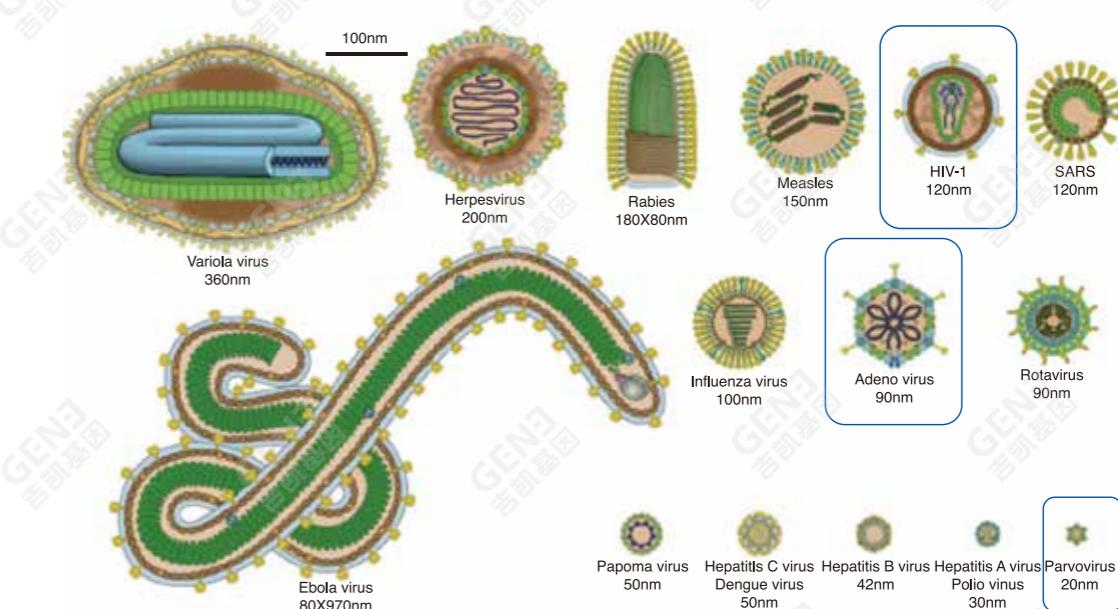
### 但是质粒的使用也有很大的局限性：

- 转染试剂具有细胞毒性，使用后影响细胞状态
- 大部分细胞较难转染，达不到基因操作的目的
- 质粒不整合到细胞基因组，只能进行短时间的瞬时表达，对于有些观察周期比较长的实验，就无法用质粒操作。

上个世纪 80 年代开始，科学家逐渐意识到病毒感染细胞的高效性，就利用这一点改造出了现在的工具病毒。病毒的转导效率比真核表达载体高很多，因此特别适合于介导外源基因在难转染甚至无法转染的细胞中表达。我们现在做实验用的病毒，都已经被人为改造过，去除了病毒本身致病基因，只保留了能高效感染细胞的基因，作为基因操作的工具被使用。

当前最常用的有 3 种工具病毒，分别是慢病毒、腺病毒、腺相关病毒。它们分别有哪些特点呢？

▶ 想要详细了解 —— P04 ▶ 只想挑选一个适合我的 —— P06



## 慢病毒

慢病毒（Lentivirus）是逆转录病毒的一种，基因组为双链 RNA。但区别于一般的逆转录病毒，慢病毒具有更广的宿主范围，对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。慢病毒的特征是从感染到基因表达需要较长的时间，其中 Lenti- 在拉丁文中就有慢的意思。重组慢病毒载体是以 HIV-1 (人类免疫缺陷 I 型病毒) 为基础，使用疱疹病毒 VSVG 外壳蛋白发展起来的基因治疗载体，其毒性基因已经被剔除并被外源性目的基因所取代，属于假型病毒。

慢病毒可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上，从而达到持久性表达。在感染能力方面可有效地感染神经元细胞、肝细胞、心肌细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、干细胞等多种类型的细胞，从而为基因功能的研究提供了更强有力的工具。

### 慢病毒的优势

- 表达时间长：**慢病毒通过将外源基因整合到宿主细胞基因组上，可实现目的基因长时间稳定的表达，不随着细胞分裂传代而丢失，是细胞实验的首选。
- 安全性高：**未发现致病性，已被用于 CAR-T 治疗作用于人体。
- 免疫原性低：**直接注射活体组织不易造成免疫反应，适用于动物实验。

### 慢病毒的局限性

- 整合到宿主细胞基因组中，有可能插入致突变性：**慢病毒会将外源基因随机整合到宿主细胞染色体上，有可能干扰其它的宿主基因表达。近年来研究揭示，慢病毒在宿主基因组的整合区域偏好在非编码区。

## 腺病毒

腺病毒 (Adenovirus) 是一种线性双链 DNA 无包膜病毒，对分裂期细胞和非分裂期细胞均具有感染能力，且具有嗜上皮细胞性。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，但保持在染色体外，不整合进入宿主细胞基因组中。

### 腺病毒的优势：

- 是研究原代非增殖细胞基因表达的最佳系统：**腺病毒感染细胞后，1-2 天即可表达，是研究原代非增殖细胞基因表达的最佳系统。
- 滴度高：**腺病毒系统在转有 E1 基因的 HEK293 细胞中可进行自我复制，可产生滴度为 1010 到 1011 PFU/mL 的病毒。
- 载体容量大：**可容纳不超过 5kb 的片段
- 不整合到染色体中，无插入致突变性：**腺病毒除了卵细胞以外几乎在所有已知细胞中都不整合到染色体中，因此避免了因整合引发的潜在的基因突变和随机效应。

### 腺病毒的局限性：

- 表达时间短：**绝大多数情况腺病毒不会整合到宿主细胞基因组中，因此在细胞复制和分裂后会丢失，并失去基因表达能力。在大部分细胞中，腺病毒可维持 7-14 天的表达时间。
- 免疫原性高：**在某些对外源刺激敏感的动物模型、组织部位中易造成炎症反应。

## 腺相关病毒

腺相关病毒 (adenov-associated virus, AAV) 是一类细小病毒，基因组为单链 DNA，对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。通常需要腺病毒或疱疹病毒帮助其在体内复制扩增。重组腺相关病毒 (recombinant AAV, rAAV) 是利用 AAV2 型基因组与不同血清型的衣壳蛋白基因组结合产生的混合体病毒载体，可将目的基因的 CDS 区序列或者 RNAi 干扰序列插入 rAAV 表达质粒中，包装病毒后感染细胞完成对目的基因操作。

在人类和小鼠中，AAV 感染可以介导外源基因发生低频率（不高于 2%）的定向整合，插入的位置一般在 19 号染色体短臂（人类基因组中的 AAV S1 和鼠中的 ROSA26 位点）。病毒基因组在不发生整合的情况下在被感染细胞内形成伴随体，可以随染色体复制。因此无论整合的外源 DNA 还是不整合的外源 DNA 都可以在细胞核内稳定的复制。

血清型	简介
1	适合肌肉、心脏、骨骼肌（包括心肌）、神经组织；在神经环路研究中，可作为顺向跨单突触标记的血清型使用
2	胞外吸附分子为硫酸乙酰肝素蛋白多糖，适合于神经等方向的研究
5	胞外吸附分子为 N-唾液酸，适合肺、眼睛、神经等
6	适合血液细胞，比如 T 细胞
8	适合肝脏、眼、中枢神经、肌肉，受体为 LamR
9	最广谱的血清型，感染全身效果极好，可以穿过血脑屏障、胎盘屏障；在神经环路研究中，可作为逆行示踪非跨突触标记的血清型使用
DJ,DJ8	适合体外实验、细胞感染
PHP.B	在神经元和神经胶质中感染效率更高，大约是 9 型的 40 倍，可以穿过血脑屏障、胎盘屏障
PHP.eB	基于 PHP.B，加强版，更适合中枢神经系统，可以穿过血脑屏障、胎盘屏障
PHP.S	能够感染外周神经元，可以穿过血脑屏障、胎盘屏障
Retro	逆向标记血清型，在神经环路研究中，可作为逆行示踪非跨突触标记的血清型使用

表 2 不同血清型的 AAV 组织趋向性

转录，产生 RNA 产物和蛋白产物。

### AAV 的优势：

- 表达时间长：**绝大多数重组 rAAV 不会整合到基因组上，而是在宿主细胞中串联形成附加体 (episome) 存在于细胞核中，分裂的细胞在细胞复制和分裂后会丢失附加体，并因此失去基因表达能力，而在细胞分裂不旺盛的组织中可持续表达 5 个月以上。
- 扩散性强：** rAAV 的体积小，滴度高，因此具有远高于腺病毒和慢病毒的扩散性，可以穿透血脑屏障，是最理想的神经元和胶质细胞感染工具。
- 特异性强：** rAAV 有十数种常用的血清型，不同的血清型对不同的脏器有较高的识别及感染能力。
- 安全性高：** 目前还没有发现 AAV 对人体致病，是美国 FDA 批准的可以直接用于人体基因治疗的最安全的病毒载体。
- 免疫原性低：** 当 AAV 用局部大剂量感染肌肉、脑、眼等组织时，很少有感染上的细胞之后被免疫系统所清除。这种特性对于动物实验显然极有帮助。
- 高稳定性：** rAAV 病毒在 4°C 可以保存 1 周，并且对氯仿等试剂具有抗性。

### AAV 的局限性：

- 适合在体实验，体外实验的感染效率较低：**由于 AAV 病毒衣壳本身结构的原因，除 DJ 血清型外，大部分 AAV 血清型在体外感染细胞的效率较低，所以一般不建议用 AAV 做细胞的体外感染实验。而该病毒在 293T 细胞中具有一定的感染效率，因此，如果病毒在体内实验的感染效果不甚满意，建议可以在 293T 细胞中观察 AAV 病毒的表达情况，以排除病毒本身的因素。

- 表达时间较长：** rAAV 病毒的基因组是单链 DNA，进入细胞后必须变成双链 DNA 才能转录，因此 rAAV 在感染后需要较长时间来表达外源基因。建议感染后至少 1 周后做切片观察。

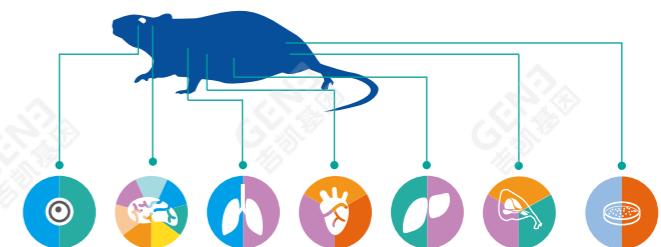
### 不同血清型的 AAV 组织趋向性

不同的 AAV 具有不同的衣壳蛋白空间结构、序列和组织特异性，因而其识别与结合的细胞表面受体也相应有很大差别，因此它们在体内产生不同的抗血清类型，这也导致不同血清型染色的细胞类型和感染效率也各不相同，其中 9 型因为感染谱比较广，应用最广泛（图 5）。

### AAV 的血清型（即 AAV 的抗血清类型，表 2）

- AAV1：肌肉、心脏、骨骼肌、神经系统
- AAV2：神经系统
- AAV5：肺、眼、神经系统
- AAV6：肺、心脏、血液细胞、免疫细胞
- AAV8：肝、肌肉、眼、神经系统
- AAV9：肺、肝、肌肉、心脏、神经系统
- DJ,DJ8：细胞体外感染
- PHPeB、PHP.B、PHP.S：神经跨血脑屏障
- Retro：神经逆行示踪

图 5 常见器官推荐血清型



## GUIDE FOR SELECTION OF GENE MANIPULATION TOOLS

# 基因操作工具选择指南

在实际应用中，如何根据实验目的来挑选合适的基因操作工具呢？

我们需要考虑这几个方面：

- 工具载体的表达时间与实验观察时间是否相符
- 工具载体可以容纳的片段大小与目的基因大小是否契合
- 工具载体对目的细胞、在体组织的转导是否足够高效。

下表总结了常用基因操作工具的选择方法：

	质粒	慢病毒	腺病毒	腺相关病毒
外源基因表达时间	24h 开始表达 持续 3-7 天	2-4 天开始表达 长时间稳定表达	1-2 天开始表达 持续 7-14 天	7-14 天开始表达 细胞分裂不旺盛部位可长时间表达
插入片段大小	<5~8kb	<4kb	<5~8kb	<2.8kb (包括必须的启动子以及荧光或者标签元件)
稳定细胞株筛选	可以，但转染与整合效率较低	可以，外源基因整合于宿主基因组，筛选简单	不可以，瞬时表达外源基因传代后效果减弱	不可以
细胞实验	细胞系，部分细胞转染效率较低	首选，广谱，感染效率高	广谱，感染效率高，适合原代非增殖细胞感染	不适合细胞实验
动物实验	不适合	适合，根据观察时间和注射部位选择	较适合（免疫原性高），根据观察时间和注射部位选择	首选，根据观察时间和注射部位选择
滴度	无	最高可达 10 <sup>10</sup> TU/mL	最高可达 10 <sup>12</sup> PFU/mL	最高可达 10 <sup>12~13</sup> v.g/mL

表 3 常用基因操作工具选择指南

想知道哪种病毒  
对你的细胞感染最高效

扫码进入实验专区  
查看 220 种细胞病毒感染效果及功能学实验数据



GEN吉凯基因

实验专区

一个实验知识分享地

## HOW TO CHOOSE THE RIGHT PROMOTER

# 如何选择合适的启动子

启动子通常位于基因编码区的 5'端上游，是 DNA 分子上可以与 RNA 聚合酶特异性结合并使之开始转录的部位。通过选择不同的启动子，可以控制基因表达（转录）的起始时间和表达的程度，是高效表达外源基因的关键。

根据启动子的转录模式可以将其分为 3 类：组成型启动子、组织或器官特异性启动子和诱导型启动子。

组成型启动子所启动基因的表达具有持续性，亦称之为非特异性表达启动子。如果对基因表达没有时空性的要求，通常都选择此类启动子。哺乳动物中常用的组成型启动子有 UbC、EF1a、SV40、PGK、CAG 等等。

组织特异性启动子是指在该启动子调控下，外源基因的表达一般只发生在某些特定来源的细胞或组织部位（表 4）。其中肿瘤特异性启动子在基因治疗方面应用较广，用来调控治疗基因在恶性细胞中的特异性表达（表 5）。治疗基因被限制于恶性细胞，这样就能避免非特异性的细胞毒性，而不影响周围正常的细胞。

启动子名称	启动子应用
Syn	成熟神经元特异性启动子
GFAP	星形胶质细胞启动子
ALB	肝脏特异性启动子
cTNT	心脏特异性启动子
B29	B 细胞特异性启动子
CD43	淋巴细胞及血小板细胞特异性启动子
CD45	造血细胞特异性启动子
CD105	内皮细胞特异性启动子

表 4 哺乳动物常用组织特异性启动子

启动子名称	启动子应用
hTERT	肿瘤广谱特异性启动子
AFP	肝癌特异性启动子
Survivin	肿瘤广谱特异性启动子
CCKAR	胰腺癌特异性启动子
PSA	前列腺癌特异性启动子
Tyr	黑色素瘤特异性启动子

表 5 常用肿瘤特异性启动子

## 诱导型启动子

诱导型启动子指在某些特定的物理或化学信号的刺激下，该种类型的启动子可以大幅度地提高基因的转录水平，准确、持续并且适时、适量地表达目的基因，特别适合研究自身具有毒性的蛋白。

该系统主要由诱导剂、可诱导的受体或转录因子、顺式作用元件以及

载体系统四部分组成。以诱导剂为分类依据可分为：四环素诱导的 (Tet) 基因表达调控系统、类固醇激素受体诱导的基因表达调控系统、缺氧诱导的基因表达调控系统、高热诱导的基因表达调控系统、电离辐射诱导的基因表达调控系统和 lac 基因表达调控系统等。



想了解每种启动子  
的使用效果

扫码进入实验专区  
查看启动子实验测评数据

GEN吉凯基因

实验专区

一个实验知识分享地

## HOT SPOT COLUMN WHAT YOU NEED TO KNOW ABOUT CIRC RNA

# 热点专栏-轻松玩转 CIRC RNA

有别于 LncRNA、mRNA、miRNA 等这些线性的 RNA, circRNA 以其闭环特征成功赢得了广大科研工作者的青睐，成为近来研究的热点。circRNA 由于特殊的可变剪切产生，广泛存在于真核细胞内且表达有一定的组织、时序和疾病特异性(图 6)。circRNA 研究较多的功能有两点：一是充当 ceRNA 作为 miRNA“海绵”，解除 miRNA 对编码基因的翻译抑制；二是结合转录相关复合物调控亲本基因表达。

但如何实现 circRNA 的“gain of function”及“loss of function”调控，对很多人来说是难点。今天就详细地剖析下这个奇形怪状的分子。

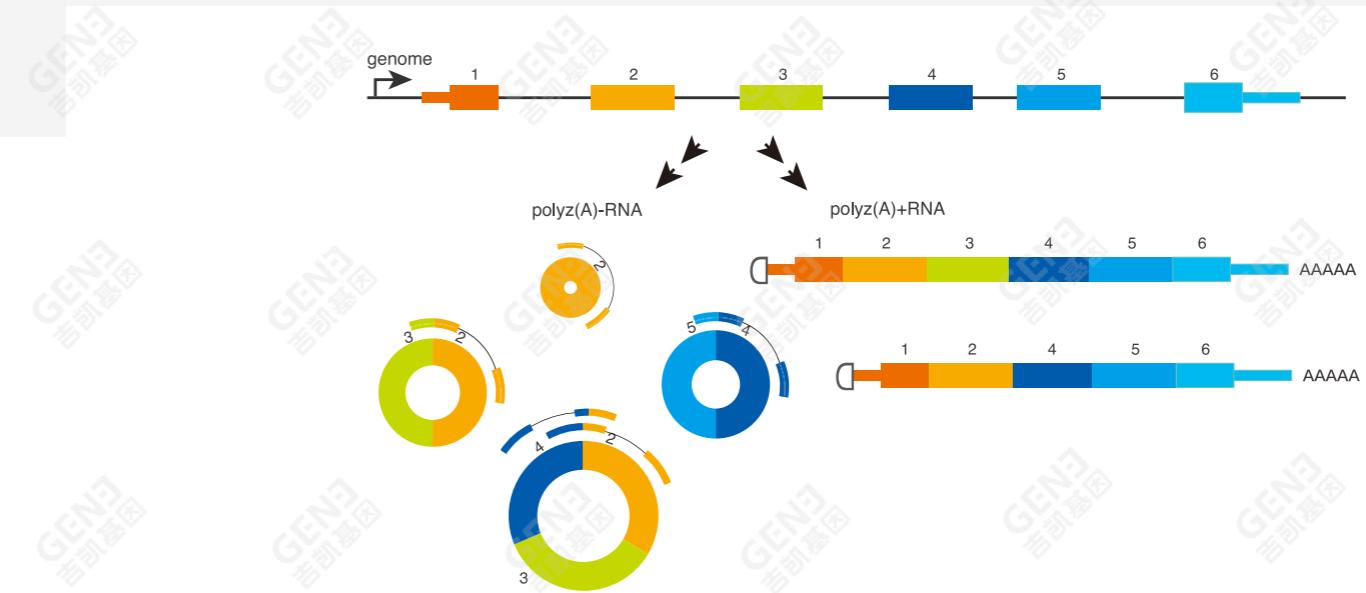


图 6 环状 RNA 的形成

## circRNA 序列的获得

网站：<http://www.circbase.org/>，输入 circRNA 名称搜索（以 hsa\_circ\_0032627 为例），打开 fasta（图 7）“circRNA sequence”选择“spliced”，下方选“search”即可得到成环序列；选择“genomic”，下方选择“Extend upstream by 1000 bases”即可得到上游延伸 1000bp 的包含成环以及内含子的序列（图 8）

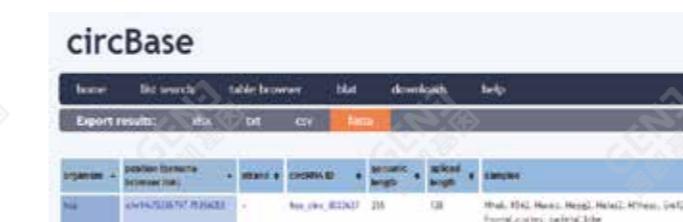


图 7 hsa\_circ\_0032627 搜索结果

circRNA sequence:  genomic  spliced

Extend upstream by: 0 bases

Extend downstream by: 0 bases

Sequence around splice sites only: 0 bases upstream 0 bases downstream

图 8 序列查找界面

## circRNA 过表达构建

目前文献多采用内源性的成环序列上游臂 1kb，并生成这 1kb 的反向互补序列作为下游臂，将这两个臂构建至成环序列上下游并在成环序列两端加上 AG-GT 剪切序列。这种包含 ALU 序列及稳定二级结构的构建方式成环效率最高（图 9）。

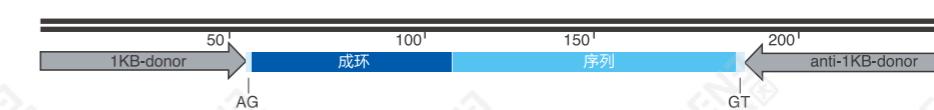


图 9 circRNA 过表达载体构建方法

### circRNA 干扰靶点设计

由于很多环状 RNA 属于外显子成环，所以，如果针对成环序列设计，靶点同时会脱靶至本底基因。由此，靶点只能设计在成环接头处，一般一个环状 RNA 只能设计 1-2 条靶点。直接在接头处的 40-45bp 设计靶点即可（图 10）。

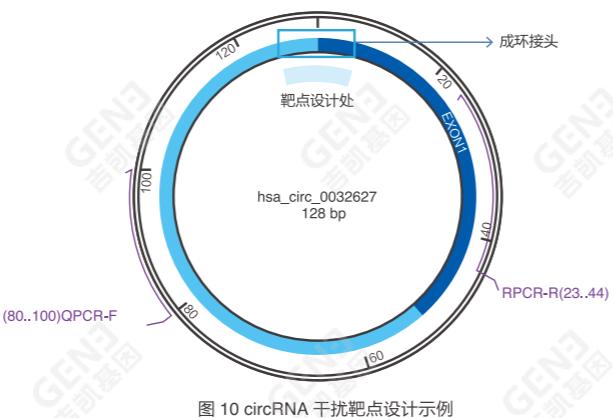


图 10 circRNA 干扰靶点设计示例

### HOT SPOT COLUMN - CRISPR/CAS9 LIBRARY FOR GENOME-WIDE SCREENING

## 热点专栏—CRISPR/CAS9文库在手，靶标筛选不用愁！

CRISPR/Cas9 系统是当今基因编辑领域最热门的明星工具，在一系列基因治疗的应用领域中展现出极大的应用前景。

来自英国剑桥大学的 Wellcome Trust Sanger 研究所利用 CRISPR/Cas9 强大的基因编辑功能，使用全基因组敲除文库病毒对多种 AML 细胞系进行全面筛选，为未来的 AML 疗法鉴定出很多潜在的基因靶标。这项研究成果于近日发表在 Cell Report 上，题目为 A CRISPR Dropout Screen Identifies Genetic Vulnerabilities and Therapeutic Targets in Acute Myeloid Leukemia。

AML 是最常见的成年人急性白血病，存活率只有不到 30%。它具有高度异质性，发病机制复杂，除急性早幼粒细胞白血病 (APL) 等少数类型 AML 的发病机制清楚外，大部分尚不清楚。因此开发新的治疗手段非常困难，在最近 40 年内一直没有特别大的进展。

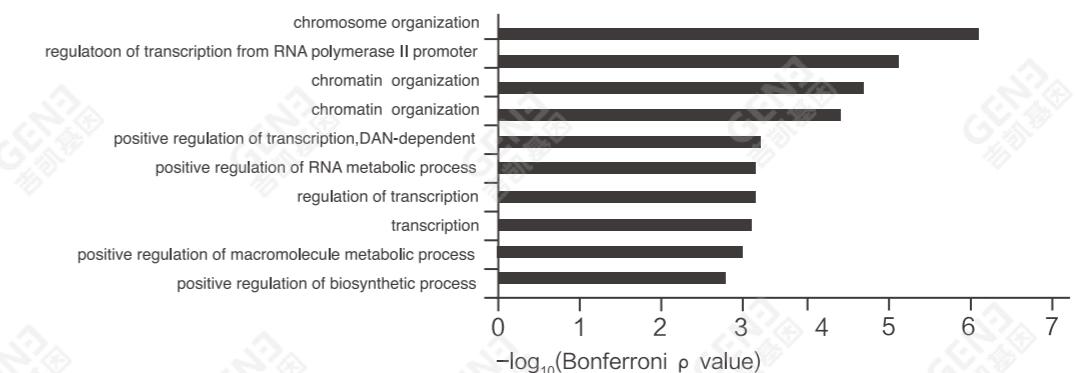
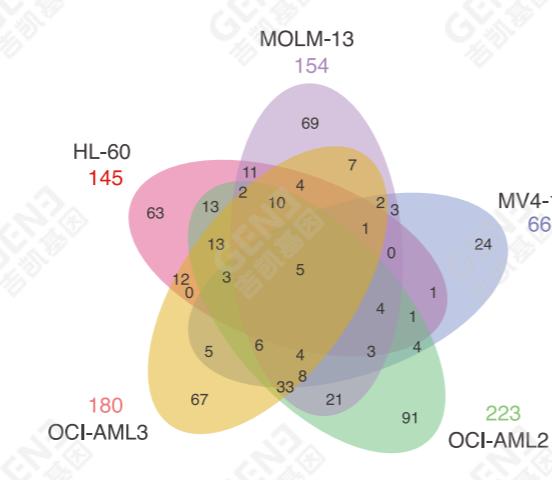
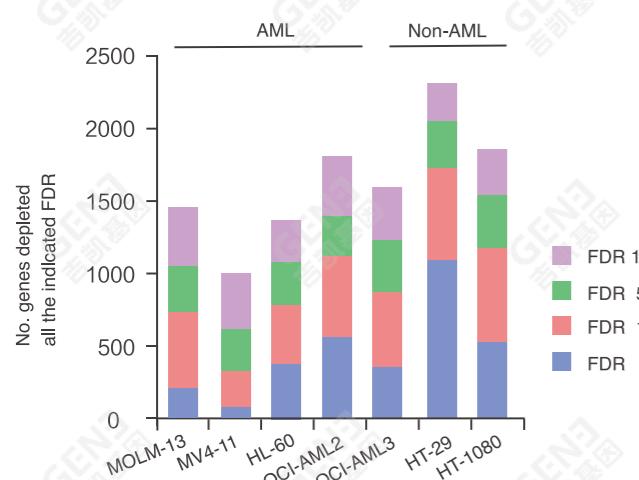
研究人员共选择了 5 株 AML 细胞作为研究对象，这样既能保证实验结果的可靠性，又便于筛选针对多种 AML 的药物靶标基因。

CRISPR/Cas9 文库进行筛选的主要步骤：

- 用涵盖 18010 个基因共 90709 个 sgRNA 的人源 CRISPR/Cas9 文库病毒感染细胞，选择合适的 MOI 值，使 1 个细胞中最多感染 1 个 sgRNA 病毒；
- 对经过文库筛选后不同时期的细胞基因组进行二代测序，通过分析、比较，可以获得被富集或缺失的 sgRNA 及其对应的基因；

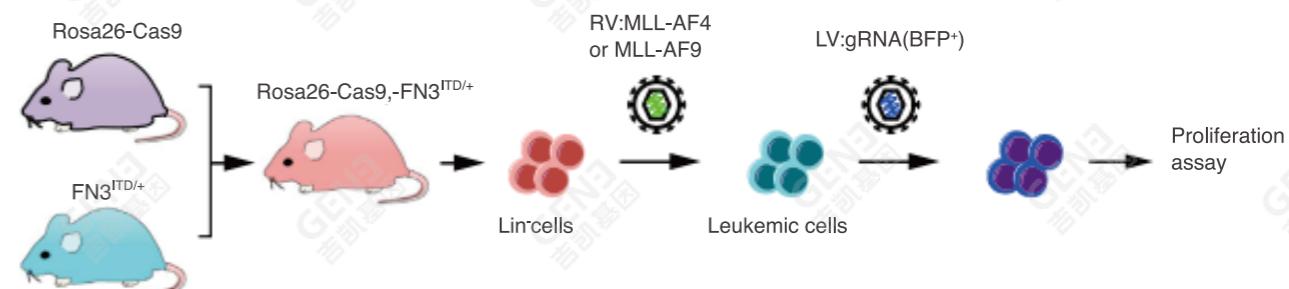
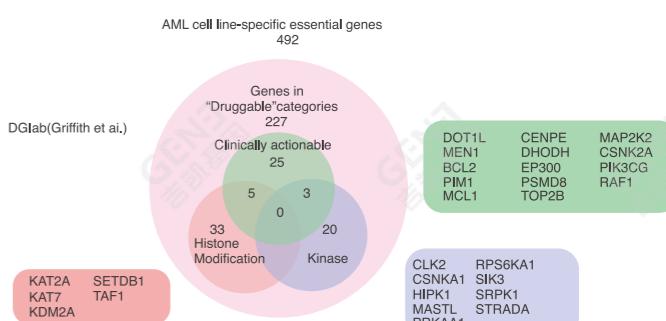
• 独立地分析每个基因在细胞中所起的作用。

利用这样的方法，研究人员筛选出了对 AML 细胞生存所必需、而在对照组细胞 HT-29 和 HT-1080 中并不重要的共 492 个基因，其中就有早已被确认为治疗靶标的 DOT1L、BCL2、MEN1 等基因。研究人员对其中至少在 3 种 AML 细胞中起重要作用的 66 个基因进行 GO 分析，结果显示它们基本都与染色体的组成、修饰和转录调控过程相关。



研究人员用遗传学和药理学的方法对其中 8 个基因进行验证，结果与文库筛选的结论相一致，这进一步证明了 CRISPR/Cas9 文库的高效和准确性。同时，研究人员应用 Drug Gene Interaction database ( DGIdb )，对 AML 细胞生存所必需的 492 个基因进行成药性分析，发现共有 227 个基因具有成药性，其中 33 个已用于临床治疗。

研究人员选择了未被用于临床治疗的组蛋白乙酰转移酶基因 KAT2A 和剪接体激酶基因 SRPK1 作为研究对象，在白血病模型小鼠体内进行 CRISPR/Cas9 基因敲除实验。他们发现这两个基因的敲除均能导致白血病细胞的生长受阻，而不影响正常细胞的生长，说明 KAT2A 和 SRPK1 都可以作为新的药物靶标。



和 SRPK1 相比，KAT2A 是更多种 AML 细胞的必需基因，因此研究人员进一步探索了 KAT2A 被敲除后 AML 细胞增殖受阻的机理，发现 KAT2A 是通过抑制 AML 细胞的转录程序和诱导细胞凋亡分化，最终导致 AML 细胞生长受阻。同时，用基因敲除和药物抑制剂的方法分别抑制白血病模型小鼠的 KAT2A，可让小鼠存活更长时间，展现出 KAT2A 作为治疗靶标在临床应用中的前景。

## Cas9 文库在手，高分文章我有！

想知道如何选择一个合适的 CRISPR-sgRNA 文库？

如何设计利用文库的筛选实验和数据分析？

扫码进入科研前线，了解更多信息

一个专业知识汇集地

科研前线



### 参考文献

Tzelepis, K., Koike-Yusa, H., De Braekeleer, E., Li, Y., Metzalopian, E., Dovey, O. M., ... & Gozdecka, M. (2016). A CRISPR dropout screen identifies genetic vulnerabilities and therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Cell reports*, 17(4), 1193-1205.

## 基因操作方法及工具-FAQ

**RNAi 稳定株 mRNA 水平敲减显著，为何 WB 检测蛋白水平无变化？**

RNAi的稳定细胞株，虽然在RNA水平因为siRNA的存在会一直保持较好的被抑制率，但是蛋白水平的抑制作为siRNA作用的副产物，同时受到细胞内其他复杂机制的调控。在稳定细胞株中，被抑制的蛋白产物可能通过其他的补偿机制逐渐恢复了其表达水平。因此建议采用可诱导表达的RNAi稳定株进行实验。

**慢病毒滴度检测的方法有哪些？**

滴度单位	滴度特点	与 TU/ml 相比	可用的检测方法
TU/ml	活性滴度	—	荧光计数法 RealTime 定量 PCR 法 ( 测定整合到病毒基因组的病毒数 )
PP/ml (由 pg/ml 换算得到 )	物理滴度	通常是 TU/ml 的 100-1000 倍	p24 ELISA 试剂盒法

**慢病毒浓缩纯化的方法有哪些？**

慢病毒纯化工艺，依据其纯化原理主要分为超速离心、密度梯度离心、PEG离心、超滤、切向流、离子交换层析等方法。当前主要的慢病毒纯化均是有以上方法的一种或几种方法组合在一起完成。

对于大部分的细胞感染以及普通的动物实验来说我们推荐超速离心方法对慢病毒进行浓缩。超滤过程中留下的细胞碎片会导致细胞毒性，直接影响病毒的应用。

	病毒上清 / 粗纯病毒	科研级慢病毒	科研 + 级慢病毒	临床级慢病毒
纯化方法	无 / 超滤	超速离心	切向流 + 超速离心	切向流 + 蛋白纯化 + 离心
纯度	极低	较高	高	极高
总 DNA 残留	较高	≤10μg/mL	≤1μg/mL	≤100pg/mL
总蛋白残留	较高	≤200μg/mL	≤100μg/mL	≤80μg/mL
BSA 残留	较高	≤10μg/mL	≤1μg/mL	≤200ng/mL
滴度	滴度较低且不稳定	≥1E+8TU/mL	≥1E+9TU/mL	≥2E+8TU/mL
工艺复杂度	操作简单	操作较简单	操作比较复杂	操作复杂，严格，耗时长
应用方向	易感染的永生化细胞系 不适合原代细胞或 干细胞等敏感细胞	绝大多数永生化的细胞系 原代细胞、干细胞、动物实验	对外源刺激极度敏感的 细胞及动物实验	临床前及临床研究

**还有其他问题**

AND THERE ARE  
OTHER QUESTIONS



扫码进入实验专区，查看更多问题及详细解答

实验专区 一个实验知识分享地



# 02

# APPLICATION OF GENE MANIPULATION TOOLS *In Vitro* EXPERIMENT

## 基因操作工具应用-细胞实验

细胞培养基本知识

细胞支原体污染解决

慢病毒感染细胞

稳定株细胞株筛选

热点专题-自噬，不可不知的诺奖级别热点！

热点专题-自噬的检测和评价方法

基因操作工具应用-FAQ

## CELL CULTURE BASIC KNOWLEDGE 细胞培养基本知识

细胞培养因组织来源的不同而异，动物细胞一般采用黏附培养或者悬浮培养。根据其增殖潜力不同而被分为三类：原代细胞、细胞株、细胞系。

### 黏附细胞

黏附细胞需要附着后才能生长，不断增殖的细胞在细胞培养器皿上铺成单细胞层。许多细胞在铺满细胞培养器皿后就不再增殖，有些细胞在此之后会死亡。从组织中得到的大多数细胞都是黏附细胞。

### 悬浮细胞

悬浮细胞在培养基中存活和增殖，不需要黏附在细胞培养器皿上，包括造血干细胞（来源于血液、骨髓、脾脏），一些转化的细胞系以及恶性肿瘤细胞等。

### 原代细胞

由酶法、化学法或者机械法得到的组织碎片中的细胞迁移到细胞培养皿上形成了原代细胞。这些细胞在分散组织的过程中幸存下来，黏附或悬浮于细胞培养液中。这些细胞不能或者仅能进行有限的细胞分裂，分裂相结束后进入衰老相，最后死亡。黏附原代培养细胞对接触抑制特别敏感，一但铺满细胞培养皿它们就停止生长了。培养原代细胞通常比培养细胞系更加困难。

### 细胞株

从原代细胞开始的头几次传代所得到的细胞被称为细胞株。这些细胞

传代几次后就衰老了，但可以导入病毒的转化因子增加细胞株的增殖代数。这些细胞的表型介于细胞株和细胞系之间，它们可以更长时间地增殖，但最终它们和原代细胞一样也会衰老，停止分裂。在筛选稳定转化的细胞克隆时，使用这些细胞比用原代细胞更方便。

### 细胞系

细胞株最终都会死亡，但它们中的某些个体发生了一些稳定可遗传的突变，这些突变使得这些细胞能够无限的繁殖。这类细胞和它的后代被称为细胞系，这个过程被称为体外转化或永生化，这和体内的细胞癌变相似。无论是自发还是经过某种诱变剂的诱导，啮齿类动物的原代细胞会更容易形成细胞系。相比较而言，人的原代细胞很少会形成细胞系，但是从人癌组织中分离得到的细胞可以通过传代形成细胞系。细胞系比原代细胞和细胞株更易于使用。

想学习细胞冻存、复苏、传代的标准操作？



想了解细胞特性以及最优培养条件？

扫码进入细胞专区

查看细胞培养操作视频及 300 多种细胞培养要点

细胞专区

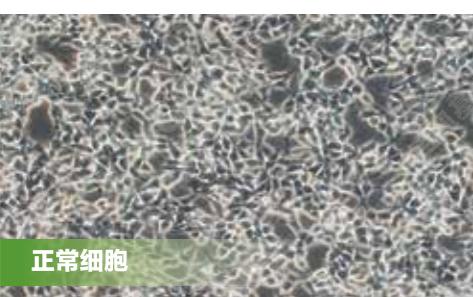
一个实验知识分享地

## DETECTION AND ELIMINATION OF MYCOPLASMA CONTAMINATION OF CELL CULTURES 细胞支原体污染解决

细胞污染物会抑制细胞的生长，严重时将导致细胞死亡，显著地影响并改变实验结果。在动物细胞培养中，细菌，真菌，霉菌，支原体和其他种类细胞是常见的污染物。其中支原体污染是一种极为常见，但极难检测到的微生物污染。

### 什么是支原体？

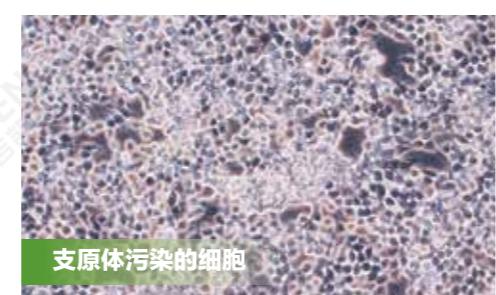
支原体是一类能够自我复制的最小的原核生物，直径为 $0.1\text{--}0.3\mu\text{m}$ ，无细胞壁，呈现高度多形性，有球形、杆形、丝状和分支状等多种形态，可透过一般过滤膜且对抗生素有耐药性，是原代细胞和传代细胞的常见污染物。



正常细胞

### 支原体污染的细胞有哪些症状？

细胞生长速率改变、活性减弱、形态改变、染色体畸变、转染效率显著降低、细胞复苏后存活率降低等（图1）。支原体污染的细胞不会马上死亡，但会改变细胞的新陈代谢，甚至会改变细胞的基因表达谱。随之而来的问题就是实验数据不可靠、不重复。



支原体污染的细胞

图 1 正常细胞与支原体污染细胞对比

### 支原体污染有哪些来源？

典型的支原体污染的来源包括细胞间交叉污染、工作环境或实验室器材的污染、操作者本身（一些支原体是人体的正常菌群）或无菌操作不佳、培养基、血清或其他试剂污染和制备细胞的原始组织或器官的污染。因为支原体污染不易被察觉，所以定期对培养的细胞进行支原体污染检测以及对环境支原体污染进行预防是每个细胞培养实验室所必备的。

### 支原体检测方法有哪些？

目前，检测支原体污染的方法有很多种，包括直接培养法、DNA荧光染色法、酶学检测法、探针法和PCR法等。其中，培养法需要的时间较长，敏感性较低，其敏感性依赖于培养基的成分和各成分含量；酶学检测法和探针法操作较为繁琐，涉及额外的细胞培养或特殊的仪器设备；DNA荧光染色检测法相对更简单，但容易出现假阳性结果。

PCR检测法能特异性扩增支原体DNA，因高敏感性及简单快捷的特点简化了支原体污染的检测流程，而被广泛采用。

### 细胞被支原体污染了，怎么办？

首先，对细胞进行支原体检测，以确定细胞是否被支原体污染。如检测结果是阴性，建议做好支原体预防工作。

如检测结果是阳性，只要细胞可以通过购买渠道获得，建议丢弃已被支原体污染的细胞，以免污染其他细胞，同时对细胞培养室及周围环境进行支原体去除处理；如是自建细胞系，或者无法通过购买渠道获得，建议先对细胞采取支原体去除措施，然后再采取预防策略。

此外，建议不定期的对细胞培养室、培养箱、生物安全柜和超净工作台等处做消毒除菌处理，以防止支原体污染发生。

## 还有其他细胞 培养问题？

细胞专区 一个实验知识分享地

扫码进入细胞专区  
细胞培养学问深，免费秘籍等你拿



## LENTIVIRUS INFECTION STANDARD OPERATING PROCEDURE 慢病毒感染细胞



### 特殊细胞感染注意事项

#### 悬浮细胞

对于悬浮细胞，可采用离心感染方法提高感染效率。如将细胞培养板密封后，用平角转子离心机1000g离心1h，再放回培养箱中正常培养。

#### 极难感染的细胞

对于极难感染的细胞，可采用多次感染的方法，即感染一次后，重新加入新鲜病毒再次感染，可显著提升感染效率。但需要注意调整两次感染间细胞状态。

#### 传代能力较差的原代细胞、非分裂细胞

原代细胞：由于细胞增长缓慢，可以在接种时提高汇合度到50%~60%，确保在感染后4天时细胞汇合度达到90%~100%；非分裂细胞：如神经元细胞，接种后不再增殖，需要按照100%的汇合度进行接种。

想查看详细的感染操作方法？

## 想提高感染效率？

扫码进入实验专区，获取细胞感染 Protocol 及操作视频  
还可查询 220 种细胞病毒感染 MOI 数据



实验专区 一个实验知识分享地

## STABLE CELL LINE CONSTRUCTION

# 稳定株细胞株筛选

构建稳定过表达细胞系的原理是将外源DNA克隆到具有某种抗性或荧光标记的载体上，载体被转染到宿主细胞并整合到宿主染色体中，用载体中所含的抗性标志或通过流式分选方法来进行筛选。

常用抗性筛选标志物：嘌呤霉素(Puromycin)、潮霉素 ( Hygromycin ) 和新霉素 ( Neomycin )， 实际操作中常用G418代替新霉素进行选择性筛选 ( 表1 ) 。

### Puromycin 抗性筛选

Puromycin的建议工作浓度为1~10 $\mu$ g/ml。在正式实验前，需先进行Puromycin梯度筛选预实验，确定能在3-5天杀死野生型细胞的最低Puromycin浓度。正式实验时，同时设置未感染病毒的野生型细胞对照，加入等量浓度的Puromycin。

慢病毒感染48-72h后(70-80%融合度)，将细胞继续培养于含适当浓度Puromycin的培养液中，每3-4天更换一次含Puromycin的培养液，直至未感染病毒的对照组细胞被Puromycin杀光，而感染病毒的组再无细胞

抗生素	筛选浓度	维持用量	作用时间
Puromycin	1-10	0.25-5	1 到 4 天
G418	400-800	100	7 到 14 天
Hygromycin	200	100	5-7 天

表1 常用筛选抗生素的推荐使用浓度 ( $\mu$ g/mL)

HOT SPOT COLUMN—  
WHAT YOU NEED TO KNOW ABOUT AUTOPHAGY

## 热点专题-自噬，不可不知的诺奖级别热点！

自噬是细胞中存在的一种非常关键的“减肥”机制。在饥饿、能量缺乏等代谢应激条件下，细胞会通过自噬来获得新的能量来源和物质需求以维持细胞的基本生命活动。同时自噬还参与多种疾病的发生和发展。大量研究表明，自噬功能障碍与衰老、肿瘤、神经退行性疾病、心脑血管病、代谢糖尿病和自身免疫疾病的发生发展密不可分。由此，揭示自噬在不

同疾病中的作用机制并发现靶向自噬功能障碍的药物正成为药物研发的热点领域。也正是由于自噬的重要性，自噬成为近年来年国自然中标热门词汇，也是“诺贝尔奖”级别的热点 ( 图3 ) ！那么时至2018年，自噬研究又有哪些突破性的研究方法和结果值得关注呢？



图3 自噬相关国自然课题分析 数据来源：<http://www.aiweibang.com/yuedu/55171437.html>

出现死亡(如病毒载体带有荧光标记，荧光效率需达到100%)后，进行以下操作：

### 混合克隆稳定株筛选

将Puromycin浓度减至维持浓度(筛选浓度的1/2~1/4)，继续对感染后的细胞进行筛选和扩增，同时收集细胞进行qPCR或Western Blot鉴定(鉴定目的基因表达水平)，并将鉴定结果正常的细胞冻存保种。

对感染并筛选后的细胞进行稀释培养，挑取单一细胞生长而成的细胞克隆，再进行扩大培养，以获得性状单一、表达稳定的细胞株；将细胞消化后接种于96孔板中，接种的细胞密度为1个/孔；标记出具有单个细胞的孔，将Puromycin浓度减至维持浓度(筛选浓度的1/2~1/4)，继续筛选和扩增；扩增完毕后，收集细胞进行qPCR或Western Blot鉴定，选择鉴

扫码进入实验专区

免费查询 220 种细胞病毒感染 MOI 及 Puromycin 筛选浓度

实验专区

一个实验知识分享地

## 自噬的基本介绍

自噬是一个吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并使其包被进入囊泡，并与溶酶体融合形成自噬溶酶体，降解其所包裹的内容物的过程 ( 图4 ) 。自噬是细胞内固有的用来降解非必须或者错误折叠的细胞组分的过程，单词autophagy来自于希腊语，auto=self, phagy=phagin=to eat, 吃掉自己~自噬过程中，待降解的组分形成双层膜结构的自噬小体，通过与溶酶体的融合，完成降解和再利用。在疾病发生的过程中，自噬一般被认为是细胞对外界环境压力的响应，在某些场合能够促进细胞存活，但在另一些场合促进细胞死亡。已有的自噬研究表明AMPK-mTOR

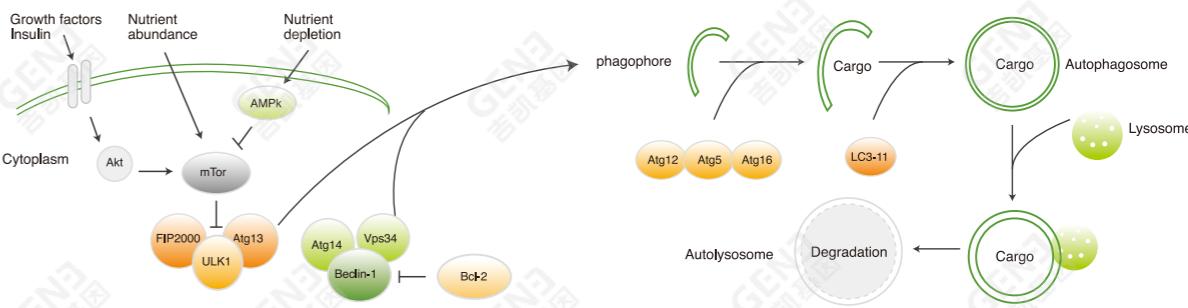


图4 细胞内自噬过程

通路在自噬过程中发挥重要作用，通过一系列自噬相关基因 ( autophagy associated gene, ATG ) 家族蛋白完成自噬的过程。

## 自噬在减数分裂中的作用

自噬除了在肿瘤疾病中同时扮演着正反面的作用，在其他很多细胞过程如能量代谢、骨关节炎、感染中也有着重要作用。例如一篇发表在2016年Autophagy的文章阐述了自噬作为重要的调节机制，参与精子的分化与成熟的过程<sup>[3]</sup>。中科院动物所的李卫研究组发现精细胞中自噬被阻滞后，精子分化过程中一系列的关键结构的组装遭到破坏，导致大量本该移除的胞质留存留在精子头部，出现形态畸形与运动障碍。该研究进一步证明自噬过程通过特异的降解细胞骨架调节蛋白PDLIM1促进了细胞骨架的正常组装，保证了精子分化的正常进行。该研究揭示了自噬在精子发育过程中的重要功能，使精子形态建成的机制研究得到进一步完善。总而言之，无论是研究自噬的启动、流程还是后果，我们最终的目的是探寻自噬在细胞异常中的作用，进而为疾病治疗寻找新的思路，在临床中得到相应地应用。



图5 自噬与肿瘤关系

## 参考文献

- Sharifi, M. N., Mowers, E. E., Drake, L. E., Collier, C., Chen, H., Zamora, M., ... & Macleod, K. F. (2016). Autophagy promotes focal adhesion disassembly and cell motility of metastatic tumor cells through the direct interaction of paxillin with LC3. *Cell reports*, 15(8), 1660-1672.
- Yamamoto, H., Fujio, Y., Suzuki, S. W., Noshiro, D., Suzuki, H., Kondo-Kakuta, C., ... & Ohsumi, Y. (2016). The intrinsically disordered protein Atg13 mediates supramolecular assembly of autophagy initiation complexes. *Developmental cell*, 38(1), 86-99.
- Shang, Y., Wang, H., Jia, P., Zhao, H., Liu, C., Liu, W., ... & Li, W. (2016). Autophagy regulates spermatid differentiation via degradation of PDLIM1. *Autophagy*, 12(9), 1575-1592.

## HOT SPOT COLUMN - AUTOPHAGY METHODS OF DETECTION AND EVALUATION

### 热点专题-自噬的检测和评价方法

无论是研究自噬与疾病的关系，还是筛选自噬相关药物亦或是研究自噬的信号通路，都离不开对自噬体的观察与检测。下表对比了目前比较主流的几种检测自噬的方法，各有利弊（表2）。

	优点	缺点
WB 内源检测 (LC3I/LC3II)	代表内源自噬水平	无法检测自噬流，无法判断是自噬改变原因
WB 内源检测 (LC3+p62)	代表内源自噬水平	P62 不只通过自噬降解
超微电镜	代表内源自噬水平 形象直观地显示自噬体	较难区分自噬溶酶体无法检测到自噬流，对仪器、取材、操作要求较高
LC3 免疫荧光	操作简单，可以从整个细胞水平观察 LC3 的含量、分布	无法检测自噬流，无法判断是自噬改变原因
荧光显微镜 LC3 单荧光	可以实时观察 LC3 的含量、分布变化，进而分析自噬的变化	无法区分自噬体和自噬溶酶体，无法检测自噬流 过表达外源 LC3，不能完全代表内源水平
荧光显微镜 LC3 双荧光	首选，可以实时观察自噬体到自噬溶酶体的变化，进而监控自噬流的变化	过表达外源 LC3，不能完全代表内源水平

表 2 常见自噬检测方法比较

就目前来说，采用RFP-GFP-LC3融合蛋白来示踪自噬流已成为检测自噬流的通用方法。它利用了绿色荧光蛋白对酸性环境敏感的特性，一旦自噬体与溶酶体融合成自噬溶酶体，绿色荧光在酸性环境下不发光，而红光则稳定发光，因此通过颜色变化就可以区分自噬体与自噬溶酶体（图6）。

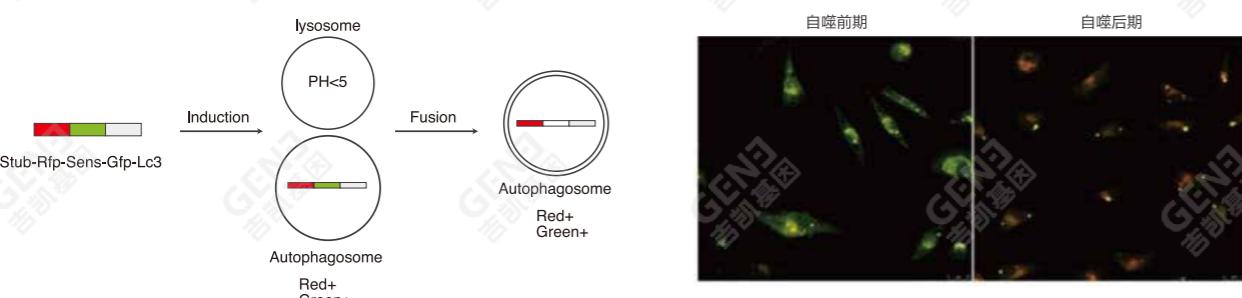


图 6 RFP-GFP-LC3 融合蛋白检测自噬原理

虽然利用双荧光标记蛋白克服了自噬流难以观察的局限性，但此方法需要摸索合适的时间点，并对每组细胞拍摄大量图片予以统计，采用人工统计自噬点的方法费时费力。如想要实现自噬相关基因的高通量筛选或药物筛选，则需要使用可自动拍摄并计算自噬体数目的高通量筛选仪器，如来自日本的yokogawa CQ1转盘式激光共聚焦细胞成像流式细胞仪（图7）。

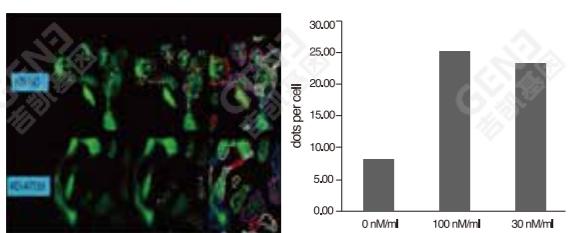


图 7 CQ1 拍摄得到高分辨率自噬体并且自动计数

想学习自噬研究还有哪些套路？  
**想了解 2017 还有哪些研究热点？**

扫码进入科研前线专区  
了解更多前沿研究热点

科研前线  
一个专业知识分享地



## APPLICATION OF GENE MANIPULATION TOOLS-FAQ

### 基因操作工具应用-FAQ

现在有哪些荧光标记蛋白？其激发波长和发射波长分别是什么？

荧光标记蛋白	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)
GFP( 绿色荧光蛋白 )	395,475	509
eGFP( 绿色荧光蛋白 )	484	507
eBFP( 蓝色荧光蛋白 )	383	445
eCFP( 青色荧光蛋白 )	439	476
YFP( 黄色荧光蛋白 )	514	527
DsRed( 红色荧光蛋白 )	558	583
mCherry( 红色荧光蛋白 )	587	610

用于慢病毒感染的细胞接种量是多少？

根据细胞增殖的速度调整细胞接种量，以保证在感染后 4 天左右细胞刚好快长满培养皿底部为宜。

针对大部分细胞系：传代周期在 2-3 天，感染时细胞铺板的密度保持在 20-30% 左右，则 72H 后细胞增殖后铺板密度约在 90% 左右；

针对某些原代细胞：由于细胞生长缓慢，可以在接种时提高汇合度到 50% ~ 60%，但要确保在感染后 4 天时细胞汇合度达到 90% ~ 100%；

针对非分裂细胞：如神经元细胞，接种后不再增殖，此时可以按照 100% 的汇合度进行接种。

**慢病毒感染细胞后什么时候基因表达到达峰值？**

慢病毒感染后大部分细胞 4 天左右 GFP 或目的基因表达达到峰值，但是对于生长缓慢的细胞，达到峰值的时间会更长。

**加入慢病毒病毒后，细胞死亡很厉害，该如何处理？**

这种情况是由于慢病毒对该细胞有一定的毒性作用，需要调整并降低感染的 MOI 值，并且在感染后 4 小时、8 小时、12 小时对细胞进行观察，若发现细胞状态变差时，则需要立刻对细胞进行换液操作，使用新鲜的完全培养液替换病毒感染培养液。

**细胞能被慢病毒感染，但为何 GFP 荧光很弱？**

GFP 慢病毒感染细胞后，细胞中荧光强度取决于病毒进入到细胞的颗粒数、细胞本身的增殖状态、细胞类型、观察时间、GFP 基因前面的启动子活性等因素。

通常目的细胞感染慢病毒颗粒数越多，细胞本身增殖越快，GFP 荧光会较强。慢病毒在增殖较快的细胞中感染 96~120 小时后，GFP 蛋白表达才达到峰值；在增殖较慢的细胞中感染后，GFP 蛋白表达达到峰值需要更长的时间。GFP 基因接在强启动子后面时荧光表达强；GFP 接在弱启动子后面时荧光表达较弱。

还有其他病毒  
感染操作相关问题？

扫码进入实验专区  
查看更多问题及详细解答

实验专区 一个实验知识分享地



## 03

致力转化医学 共创健康明天

# APPLICATION OF GENE MANIPULATION TOOLS

## In Vivo EXPERIMENT

### 基因操作工具应用-动物实验

[工具病毒在不同系统中的应用文献综述](#)  
[工具病毒在不同系统中的注射方法综述](#)  
[基因操作工具在体应用-FAQ](#)

03

### In Vivo INJECTION AN OVERVIEW OF THE INJECTION METHOD AND ITS APPLICATION IN DIFFERENT SYSTEMS

## 病毒在体注射-不同系统中的注射方法及应用文献综述

由于更能模拟人类的生理和病理条件，所以在科研上，动物实验获得的结果，比体外实验更具有说服力。在某个通路或某种疾病的研究中，通常会人为地将外源基因用病毒载体注入动物组织，检测其对其他基因和通路、组织器官、动物行为等的影响。但这类动物实验条件的摸索和优化，是一个难点。如何选择注射的部位、选择何种病毒、注射多少体积、以及注射后什么时间去检测等实验条件都需要摸索。

### 工具病毒在不同系统中的应用文献综述

在实际应用中，可根据实验目的来挑选合适的工具病毒，如：

工具载体的表达时间与实验观察时间是否相符；

工具载体可以容纳的片段大小与目的基因大小是否契合；

工具载体对在体组织的转导是否足够高效。

AAV 病毒的体积最小，因此载体的容量最小，但是正因为其体积小的特点，AAV 病毒的扩散效果好，病毒滴度高，因此，在载体容量、观

察时间可以满足的情况下，动物在体实验优先推荐使用 AAV。

以下为不同系统注射病毒所需体积及病毒量的文献参考值。

注：

文献综述分不同注射部位按序号展示

以下代表文献均来自权威杂志，其他文献为同一注射部位的其他参考文献，由于篇幅限制，不详细列举，若感兴趣可扫描相应二维码下载查阅。

### 工具病毒注射文献综述 - 神经系统

	病毒类型	注射部位	病毒滴度（量）	注射方法	检测时间	代表文献	其他文献
神经系统	慢病毒	小鼠右侧皮层	2×10 <sup>9</sup> TU/mL	每侧 3 位点, 0.7μL/位点, 速度 0.2μL/min 留针 10min	5 天	[1]	[2]
		大鼠下橄榄体	1×10 <sup>9</sup> TU/mL- 1×10 <sup>8</sup> TU/mL	1μL/位点, 速度 0.2μL/min, 留针 5min	21 天	[3]	
		大鼠丘脑	4×10 <sup>9</sup> TU/mL	4 个位点, 3μL/位点,	14 天	[4]	
		小鼠海马齿状回	2×10 <sup>7</sup> TU/mL 5×10 <sup>8</sup> TU/mL	2μL/位点, 0.5μL/min, 留针 5min	14 天	[5]	
		大鼠海马 CA1 区	1.5×10 <sup>9</sup> TU/mL	体积 5μL, 速度 0.3μL/min	14 天	[6]	[7][8]
		大鼠鞘内注射	1×10 <sup>9</sup> TU/mL		28 天	[9]	[10][11]
	腺病毒	大鼠坐骨神经	1.8×10 <sup>9</sup> TU/mL	2μL, 速度 0.4μL/min, 留针 2min, 左侧 注射干扰慢病毒, 右侧注射对照慢病毒。	28 天	[12]	[13]
		小鼠右脑室	1.3×10 <sup>10</sup> PFU/mL	3μL, 速度 0.2μL/min	8, 10, 14 天	[14]	
	AAV	大鼠鞘内注射	1×10 <sup>10</sup> PFU/mL		3 天	[15]	[16]
		小鼠大脑皮层	0.5-5×10 <sup>13</sup> v.g/mL	1.5μL/位点, 按照核团的坐标 一侧皮层注射 3 个位点	4 周	[17]	
		小鼠双侧皮层	1.49×10 <sup>12</sup> v.g/mL	0.5μL/位点, 速度 30nL/min, 留针 10min	至少 28 天	[18]	
		小鼠双侧海马		1μL/位点, 速度 0.2μL/min, 留针 10min	14 天	[19]	[20]
		小鼠双侧松果体	1×10 <sup>12</sup> v.g/mL	0.8-1μL/位点, 速度 100-150nL/min, 保留 5min		[21]	
		小鼠脊髓注射	1×10 <sup>12</sup> v.g/mL	8 个位点, 1μL/位点	30 天	[22]	

扫码二维码，下载文献原文

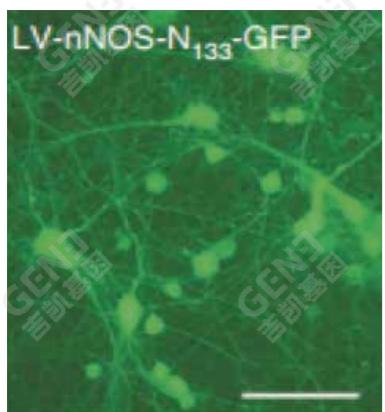
实验专区

一个实验知识分享地



**代表文献**

[1] 吉凯客户文章 Nature medicine, 2010, 16(12): 1439-1443.



病毒类型	过表达慢病毒
注射部位	小鼠右侧皮层
注射方法	立体定位注射右侧皮层 3 个位点, 0.7μL/位点, 速度 0.2μL/min, 留针 10min。
检测时间	5 天
病毒滴度	2×10 <sup>9</sup> TU/mL

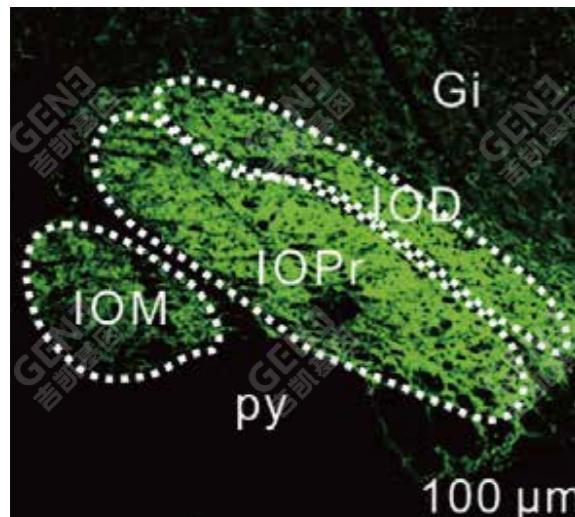
**其他文献**

[2] 吉凯客户文章 Nature communications, 2015, 6.

Deactivation of excitatory neurons in the prelimbic cortex via Cdk5 promotes pain sensation and anxiety.

**代表文献**

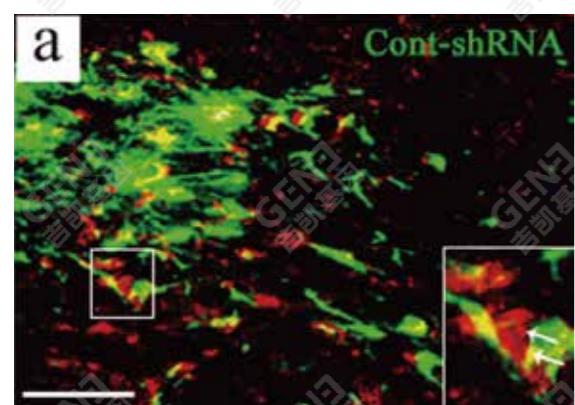
[3] 吉凯客户文章 Current Biology, 2017, 27(17): 2661-2669. e5.



病毒类型	干扰慢病毒
注射部位	大鼠下橄榄体
注射方法	病毒体积 1μL, 注射速率 0.2μL/min, 留针 5min。
检测时间	21 天
病毒滴度	1×10 <sup>8</sup> TU/mL - 1×10 <sup>9</sup> TU/mL

**代表文献**

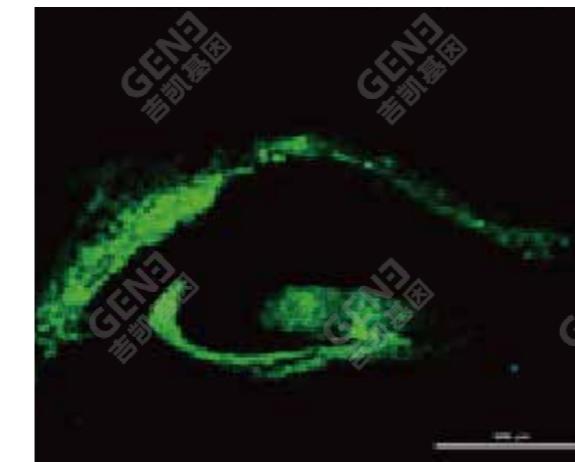
[4] 吉凯客户文章 Autophagy, 2012, 8(1): 63-76.



病毒类型	干扰慢病毒
注射部位	大鼠丘脑
注射方法	4 个位点, 3μL/位点
检测时间	14 天
病毒滴度	4×10 <sup>9</sup> TU/mL

**代表文献**

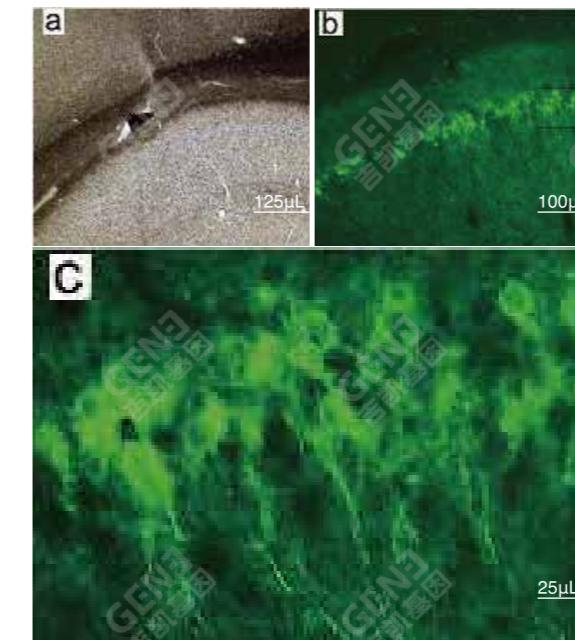
[5] 吉凯客户文章 Cerebral Cortex, 2017: 1-14.



病毒类型	过表达和干扰慢病毒
注射部位	小鼠海马齿状回
注射方法	注射体积 2μL, 注射速率 0.5μL/min 留针 5min
检测时间	14 天
病毒滴度	过表达病毒滴度 2×10 <sup>7</sup> TU/mL, 干扰病毒滴度 5×10 <sup>8</sup> TU/mL

**代表文献**

[6] 吉凯客户文章 Brain Pathology, 2017, 27(6): 822-838.



病毒类型	干扰慢病毒
注射部位	大鼠海马 CA1 区
注射方法	5μL, 注射速率 0.3μL/min。
检测时间	14 天
病毒滴度	1.5×10 <sup>9</sup> TU/mL

**其他文献**

[7] 吉凯客户文章 Cerebral Cortex, 2013, 24(10): 2533-2540.

Association of mitochondrial letm1 with epileptic seizures.

[8] 吉凯客户文章 Neuropharmacology, 2015, 89: 318-324.

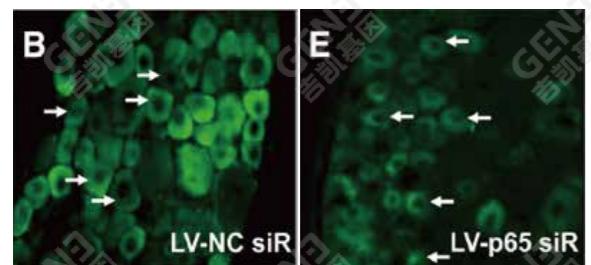
Insulin-like growth factor 2 mitigates depressive behavior in a rat model of chronic stress.

IF = 6.559

IF = 5.012

**代表文献**

[9] 吉凯客户文章 Diabetes, 2015, 64(12): 4272-4284.

**其他文献**

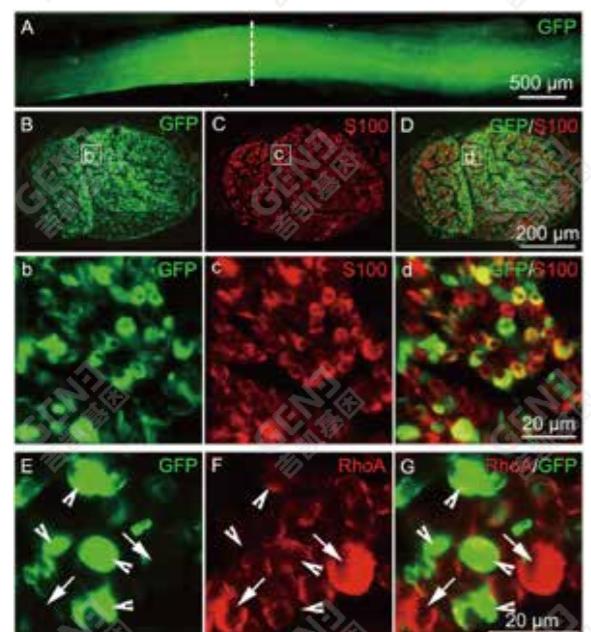
[10] 吉凯客户文章 Nature Communications, 2016, 7: 12531.

 $\beta$ -arrestin-2 regulates NMDA receptor function in spinal lamina II neurons and duration of persistent pain.

[11] 吉凯客户文章 Human gene therapy, 2010, 22(4): 465-475.

Intrathecal lentiviral-mediated RNA interference targeting PKC  $\gamma$  attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats.**代表文献**

[12] 吉凯客户文章 Molecular neurobiology, 2016: 1-11.

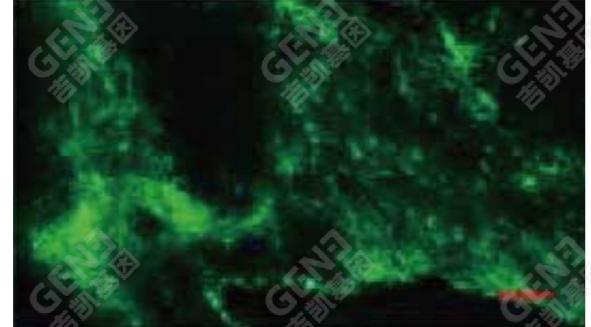
**其他文献**

[13] Diabetes, 2016, 65 (1) :34-43

Knockdown of GLP-1 Receptors in Vagal Afferents Affects Normal Food Intake and Glycemia.

**代表文献**

[14] 吉凯客户文章 Brain, Behavior, and Immunity, 2017.



IF = 8.684

病毒类型	干扰慢病毒
注射部位	大鼠鞘内注射
注射方法	注射总量 $1 \times 10^7$ TU。
检测时间	28 天
病毒滴度	$1 \times 10^9$ TU/mL

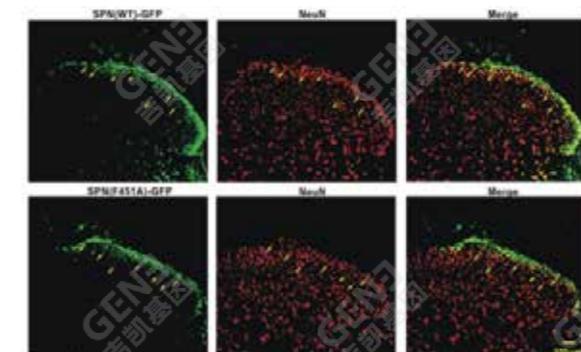
IF = 12.124

病毒类型	干扰慢病毒
注射部位	大鼠坐骨神经
注射方法	2 $\mu$ L, 速度 0.4 $\mu$ L/min, 留针 2min。 左侧注射干扰慢病毒, 右侧注射对照慢病毒。
检测时间	28 天
病毒滴度	$1.8 \times 10^9$ TU/mL

IF = 4.187

**代表文献**

[15] 吉凯客户文章 Journal of Neuroscience, 2015, 35(41): 13989-14001.

**其他文献**

[16] 吉凯客户文章 Molecular biology reports, 2012, 39(8): 8045-8051.

Effects of retrograde gene transfer of brain-derived neurotrophic factor in the rostral spinal cord of a compression model in rat.

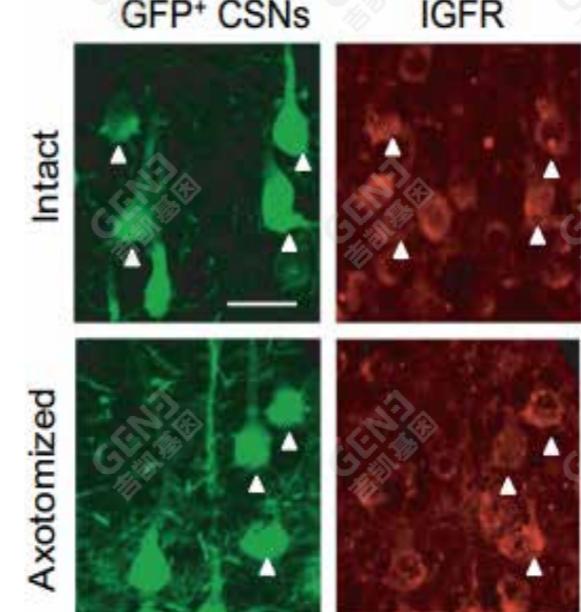
IF = 5.988

病毒类型	过表达腺病毒
注射部位	大鼠鞘内注射
注射方法	注射体积 10 $\mu$ L
检测时间	3 天
病毒滴度	$1 \times 10^{10}$ PFU/mL

IF = 1.828

**代表文献**

[17] Neuron, 2017, 95(4): 817.



IF=14.024

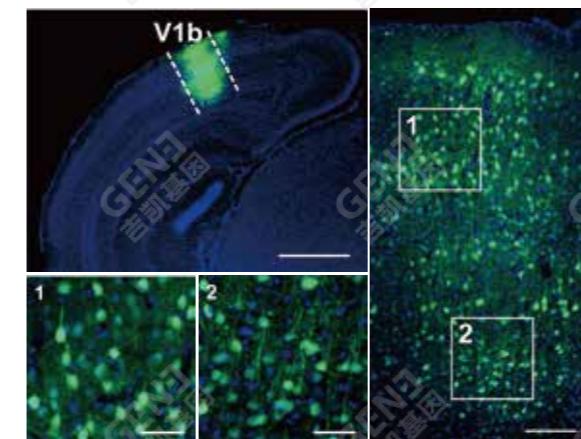
病毒类型	过表达 AAV
注射部位	小鼠皮层立体定位注射
注射方法	1.5 $\mu$ L / 位点, 按照核团的坐标一侧皮层注射 3 个位点
检测时间	4 周后取材
病毒滴度	$0.5-5 \times 10^{13}$ vg/mL

IF = 8.684

IF = 5.964

**代表文献**

[18] 吉凯客户文章 Neuropharmacology, 128 (2018) 207-220.

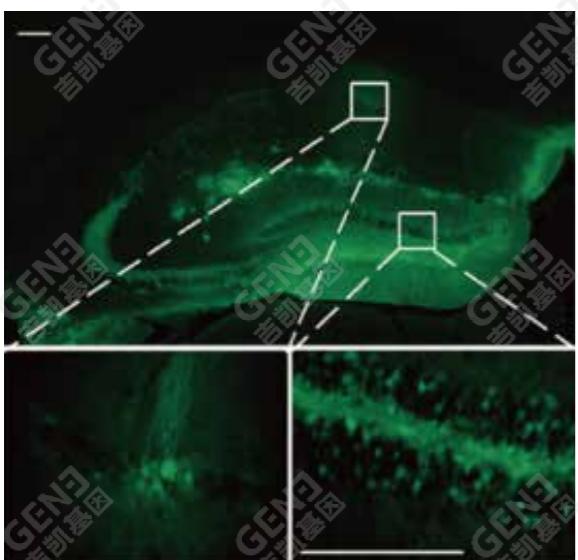


IF = 5.01

病毒类型	AAV 干扰
注射部位	小鼠双侧大脑皮层
注射方法	0.5 $\mu$ L / 位点, 速度 30 nL/min, 保留 10min
检测时间	至少 28 天
病毒滴度	$1.49 \times 10^{12}$ v.g/mL

**代表文献**

[19] 吉凯客户文章 Molecular Psychiatry, (2017) 00, 1–13



IF = 13.3

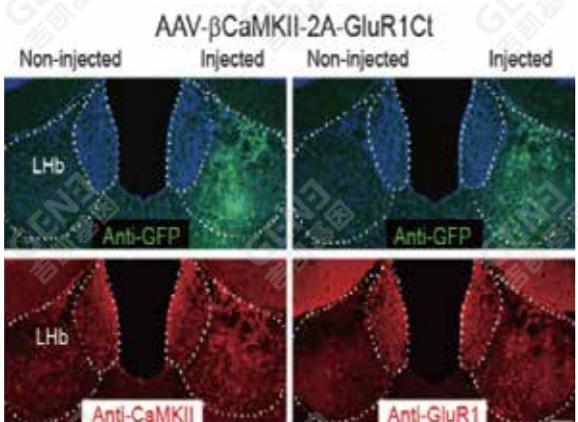
病毒类型	AAV 过表达
注射部位	小鼠双侧海马组织
注射方法	1μL / 位点, 速度 0.2μL/min, 保留 10 min
检测时间	14 天

IF = 2.45

病毒类型	AAV 过表达
注射部位	小鼠双侧松果体立体定位注射
注射方法	0.8-1μL / 位点, 速度 100-150μL/min, 保留 5min
检测时间	7 天
病毒滴度	10 <sup>12</sup> v.g/mL

**代表文献**

[21] Science, 2013, 341 (6149) :1016.

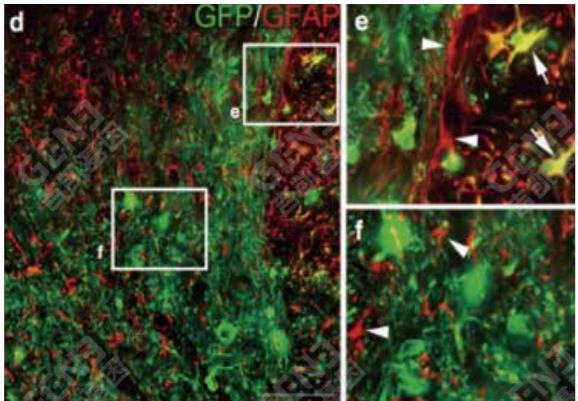


IF = 37.2

病毒类型	病毒类型: 过表达 AAV
注射部位	小鼠双侧松果体立体定位注射
注射方法	0.8-1μL / 位点, 速度 100-150μL/min, 保留 5min
检测时间	7 天
病毒滴度	10 <sup>12</sup> v.g/mL

**代表文献**

[22] Mol Ther Nucleic Acids, 2013, 2(7) :e108.



IF = 6.39

病毒类型	过表达 AAV
注射部位	小鼠脊髓注射 (8 个位点)
注射方法	1μL / 位点
检测时间	30 天
病毒滴度	10 <sup>12</sup> v.g/mL

**工具病毒注射文献综述 - 心血管系统**

心血管	病毒类型	注射部位	病毒滴度 (量)	注射方法	检测时间	代表文献	其他文献
	慢病毒	小鼠尾静脉注射 感染主动脉		100μL, 7.6×10 <sup>7</sup> IFUs/ 小鼠	28 天	[23]	
	腺病毒	小鼠心肌	1×10 <sup>9</sup> PFU/mL	5 个位点, 总体积 20μL	7, 14, 28 天	[24]	[25]
	AAV	小鼠尾静脉注射 感染心肌	3.15×10 <sup>9</sup> , 1×10 <sup>10</sup> 3.15×10 <sup>10</sup> , 1×10 <sup>11</sup> v.g/mouse	将这些病毒量的病毒稀释到 20μL, 尾静脉注射	4 周	[26]	
		小鼠左心室顶端	3×10 <sup>11</sup> v.g/mL	1.5×10 <sup>9</sup> 的病毒量, 稀释到 50μL	2、4、8 周	[27]	

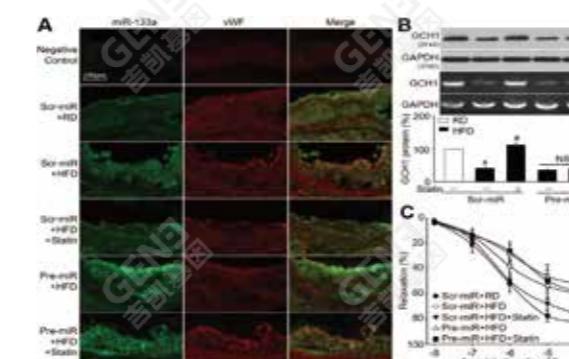
扫码二维码, 下载文献原文

实验专区

一个实验知识分享地

**代表文献**

[23] Circulation, 2016; CIRCULATIONAHA. 116.017949.

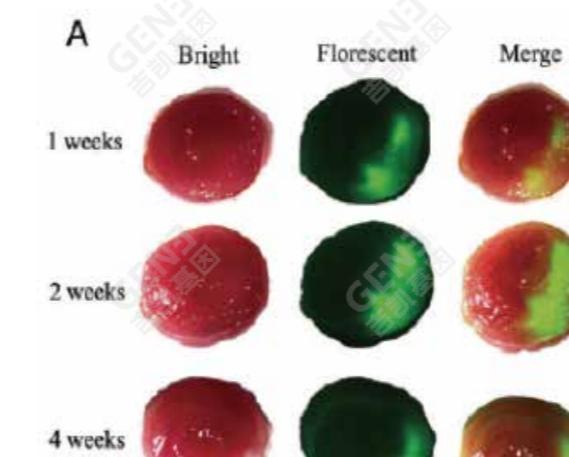


IF = 19.309

病毒类型	miRNA 慢病毒
注射部位	小鼠尾静脉注射感染主动脉
注射方法	100μL, 7.6×10 <sup>7</sup> IFUs/ 小鼠
检测时间	28 天
病毒总量	7.6×10 <sup>7</sup> IFUs

**代表文献**

[24] 吉凯客户文章 Cardiovascular research, 2014: cvu007.



IF = 5.878

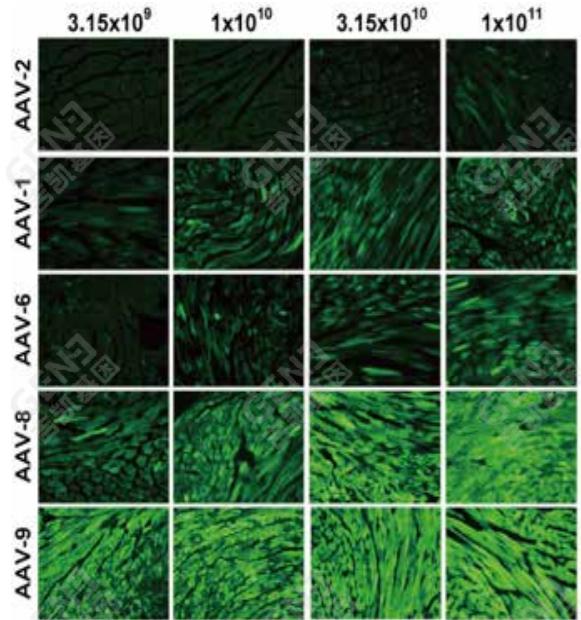
病毒类型	干扰腺病毒
注射部位	小鼠心肌
注射方法	5 个位点注射, 总体积 20μL, 注射病毒总量 2×10 <sup>7</sup> PFU。
检测时间	7 天、14 天、28 天
病毒滴度	1×10 <sup>9</sup> PFU/mL

**其他文献**

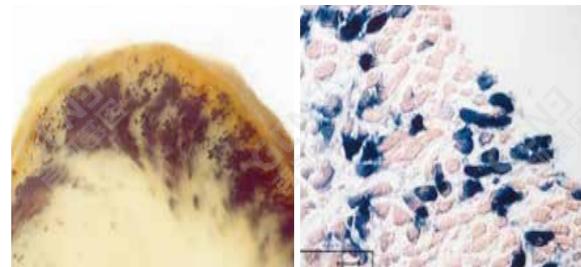
[25] 吉凯客户文章 Europace, 2015; euv276.  
Semaphorin 3a transfection into the left stellate ganglion reduces susceptibility to ventricular arrhythmias after myocardial infarction in rats.

**代表文献**

[26] Gene Therapy, 2011, 18(1): 43-52.

**代表文献**

[27] Circulation, 1999, 99(2): 201-5.

**工具病毒注射文献综述 - 眼**

病毒类型	注射部位	病毒滴度 (量)	注射方法	检测时间	代表文献	其他文献
眼 AAV	小鼠双侧视网膜下	3.28x10 <sup>12</sup> v.g/mL	2μL/ 视网膜, 在 20-30s 内注射完毕	至少三周以后	[28]	
	小鼠角膜下注射	3x10 <sup>12</sup> v.g/mL	1μL/ 位点, 速度 30nL/min, 留针 1min	4 周	[29]	[30]

扫码二维码, 下载文献原文

[实验专区](#) [一个实验知识分享地](#)



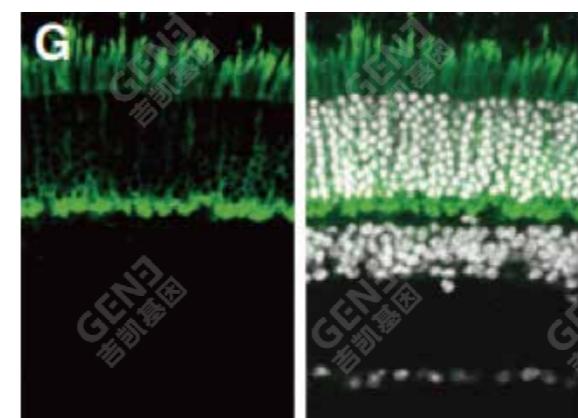
IF = 4.53

病毒类型	AAV-GFP
注射部位	尾静脉注射感染小鼠心肌细胞
注射方法	不同的病毒剂量不同分别为 $3.15 \times 10^9$ , $1 \times 10^{10}$ , $3.15 \times 10^{10}$ , $1 \times 10^{11}$ v.g/mouse, 将病毒稀释到 20μL, 通过尾静脉注射
检测时间	4 周

IF = 3.11

**代表文献**

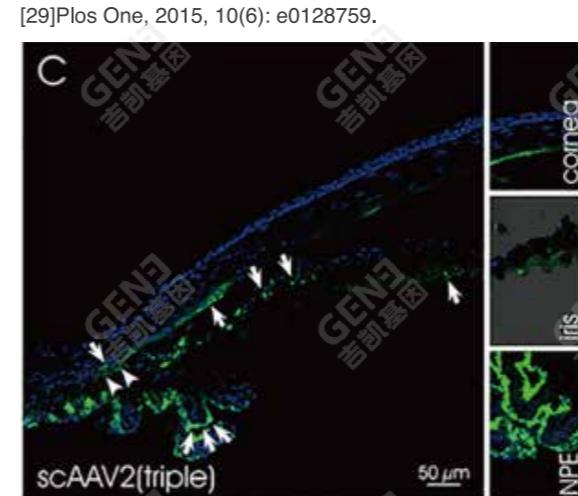
[28] Science, 2010, 329(5990): 413.



IF = 37.2

病毒类型	过表达 AAV
注射部位	小鼠双侧视网膜下注射
注射方法	2μL/ 视网膜, 在 20-30s 内注射完毕
检测时间	至少三周以后
病毒滴度	$3.28 \times 10^{12}$ v.g/mL

IF = 3.11



病毒类型	过表达 AAV
注射部位	小鼠角膜下注射
注射方法	1μL/ 位点, 速度 30nL/min, 留针 1min
检测时间	4 周
病毒滴度	$3 \times 10^{12}$ v.g/mL

IF = 1.17

**其他文献**

[30] 吉凯客户文章 International Journal of Ophthalmology, 2016, 9(5): 655-61. Human melanopsin-AAV2/8 transfection to retina transiently restores visual function in mice.

**工具病毒注射文献综述 - 肝脏**

	病毒类型	注射部位	病毒滴度 (量)	注射方法	检测时间	代表文献	其他文献
肝 慢病毒	慢病毒	小鼠尾静脉注射 感染肝脏			5x10 <sup>11</sup> IU/ 小鼠		[31]
		大鼠肝门静脉注射	3x10 <sup>8</sup> TU	100μL, 3x10 <sup>8</sup> TU 每 4 天注射一次 共 3 次	26 天	[32]	[33][34]
	腺病毒	小鼠尾静脉注射 感染肝脏		1x10 <sup>11</sup> vp 的病毒量稀释到 100μL	1 天	[35]	
肝 AAV	AAV	大鼠尾静脉注射 感染肝脏			5x10 <sup>9</sup> PFU	14 天	[36]
		肝动脉或门静脉原位注射 AAV 感染的 骨髓间充质干细胞		2x10 <sup>11</sup> 个病毒颗粒稀释于 300μL 的生理盐水	28 天	[37]	

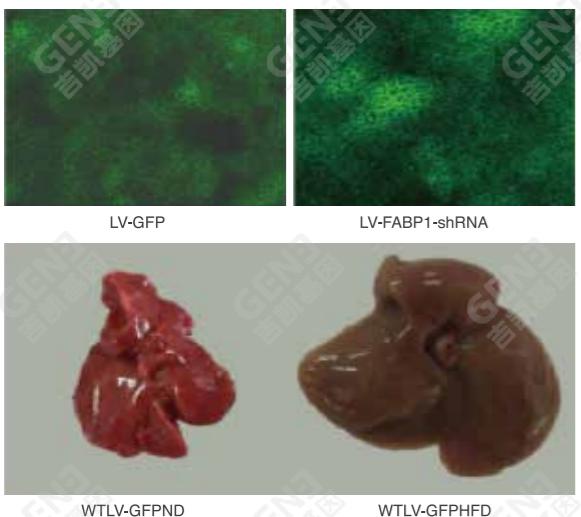


扫码二维码, 下载文献原文

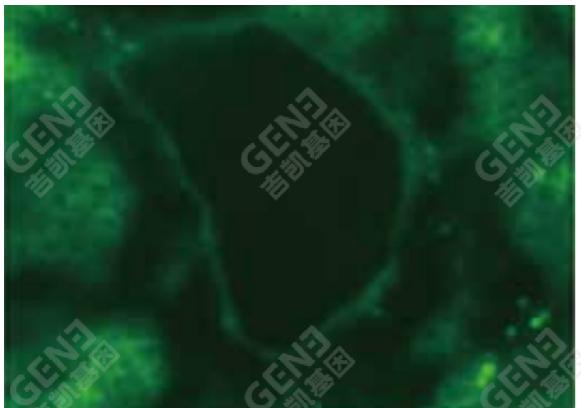
[实验专区](#) [一个实验知识分享地](#)

**代表文献**

[31] 吉凯客户文章 Journal of virology, 2016, 90(4): 1729-1740.

**代表文献**

[32] 吉凯客户文章 Molecular and cellular biochemistry, 2012, 369(1-2): 35-43.

**其他文献**

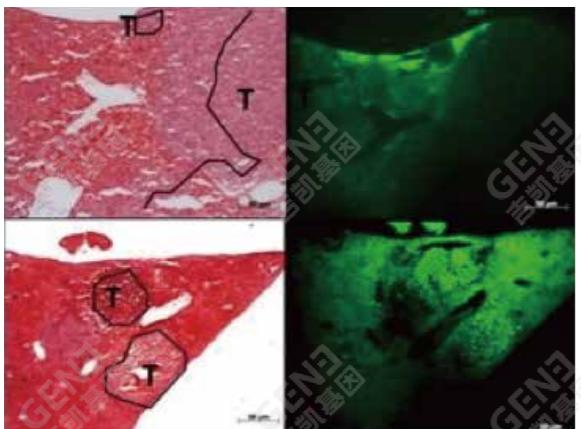
[33] Molecular Therapy, 2005, 11(1): 26-34.

Kupffer cells and not liver sinusoidal endothelial cells prevent lentiviral transduction of hepatocytes.

[34] 吉凯客户文章 Hepatology Research, 2011, 41(5): 475-483.

Effect of the regulation of retinoid X receptor -  $\alpha$  gene expression on rat hepatic fibrosis.**代表文献**

[35] Experimental &amp; molecular medicine, 2008, 40(4): 427-434.

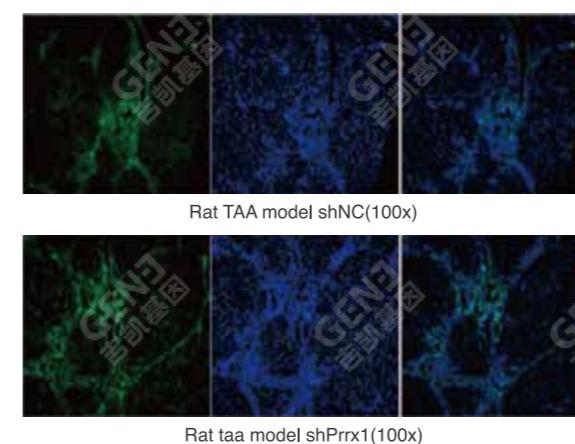


IF = 4.663

病毒类型	干扰慢病毒
注射部位	尾静脉注射感染肝脏
注射方法	5×10 <sup>7</sup> IU/ 小鼠
病毒总量	5×10 <sup>7</sup> IU

**代表文献**

[36] 吉凯客户文章 Laboratory Investigation, 2017, 97(9): 1020.



IF = 2.669

病毒类型	过表达慢病毒
注射部位	大鼠肝门静脉
注射方法	100 μL, 3×10 <sup>8</sup> TU。每4天注射一次，共3次
检测时间	26天
病毒滴度	3×10 <sup>8</sup> TU

IF = 6.9

病毒类型	过表达腺病毒
注射部位	小鼠尾静脉注射感染肝
注射方法	1×10 <sup>11</sup> vp, 100μL
检测时间	1天
病毒滴度	1×10 <sup>11</sup> vp

IF = 2.602

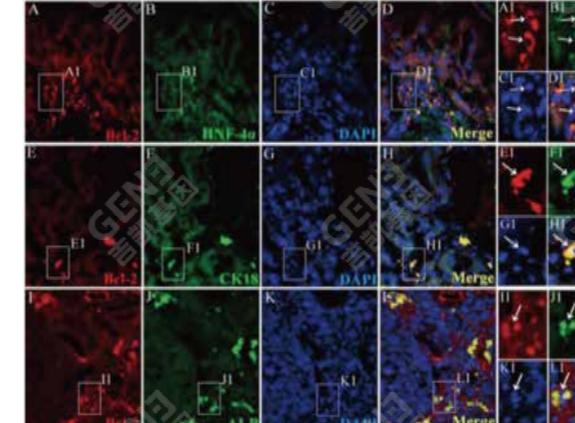
病毒类型	慢病毒
注射部位	恒河猴肺叶定点注射

IF = 5.063

病毒类型	腺病毒
注射部位	经呼吸道滴鼻法

**代表文献**

[37] 吉凯客户文章 Cellular physiology and biochemistry, 2016, 40 (5) :1117.



IF = 4.857

病毒类型	干扰腺病毒
注射部位	大鼠尾静脉注射感染肝脏
注射方法	5×10 <sup>9</sup> PFU/ 大鼠。一周一次。
检测时间	14天

**工具病毒注射文献综述 - 肺**

	病毒类型	注射部位	病毒滴度 (量)	注射方法	检测时间	文献
肺	慢病毒	小鼠尾静脉注射 感染肺	10 <sup>8</sup> MOL/ 小鼠	使用 30 号针头,超细胰岛素注射器注射, 200μL,1 周 2 次,注射 1 个月。	42 天	[38]
	腺病毒	恒河猴肺叶定点 注射		100μL	4 周	[39]
	AAV	经呼吸道滴鼻法	10 <sup>11-12</sup> v.g/mL	10 <sup>11-12</sup> v.g/mL	1 个月	[40]

扫码二维码, 下载文献原文

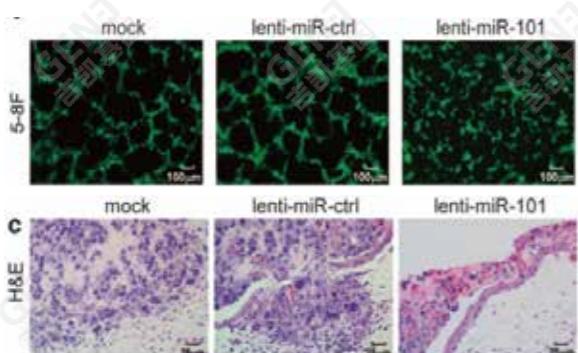
实验专区

一个实验知识分享地

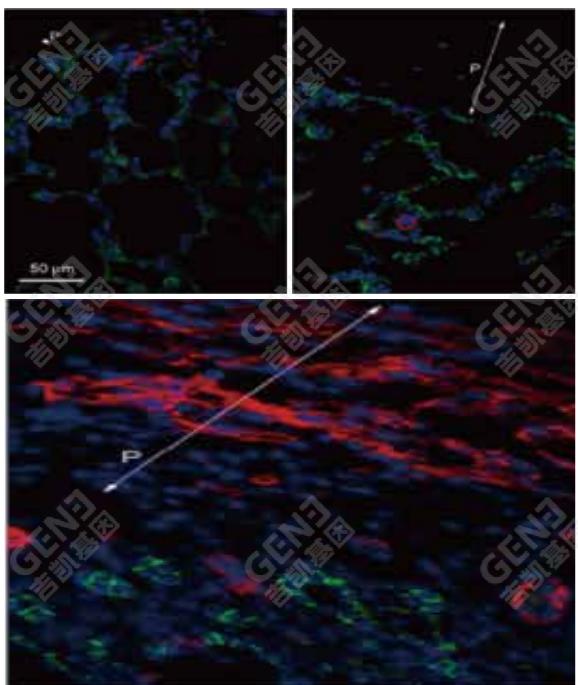


**代表文献**

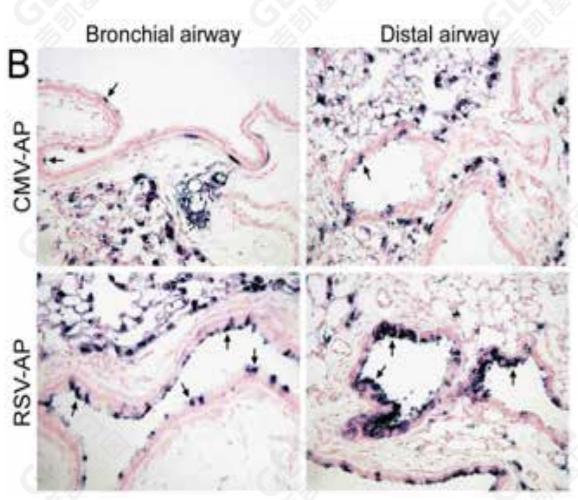
[38]Cell death &amp; disease, 2017, 8(1): e2566.

**代表文献**

[39]European Respiratory Journal, 2010, 36(4): 907-914.

**代表文献**

[40]Human Gene Therapy, 2007, 18(4): 344-354.



IF = 5.965

病毒类型	miRNA 慢病毒
注射部位	小鼠尾静脉注射感染肺
注射方法	200μL, 108MOI/ 小鼠, 1周2次, 共注射1个月。
检测时间	42天
病毒总量	108MOI

**工具病毒注射文献综述 - 肾**

	病毒类型	注射部位	病毒滴度 (量)	注射方法	检测时间	代表文献	其他文献
肾	慢病毒	小鼠左肾内注射	5×10 <sup>7</sup> IU/mL	病毒稀释到 100μL 终滴度 5×10 <sup>7</sup> IU/mL	至少三周以后	2 天	[41]
	AAV	小鼠肾脏注射	5×10 <sup>10</sup> 的病毒量		4 周	12 周	[42]

扫码二维码, 下载文献原文

实验专区

一个实验知识分享地

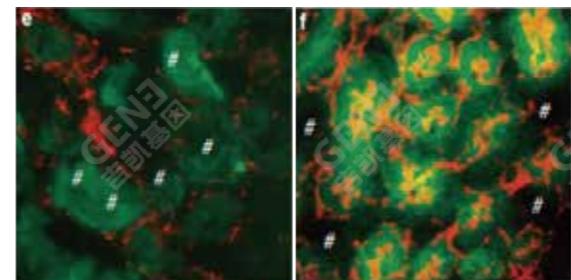


IF = 10.569

病毒类型	过表达腺病毒
注射部位	恒河猴肺内注射
注射方法	100μL
检测时间	4 天

**代表文献**

[41]Kidney international, 2009, 75(8): 809-823.



IF = 8.395

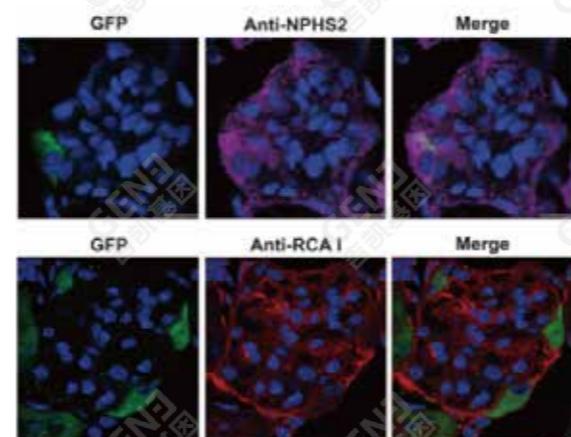
病毒类型	过表达慢病毒
注射部位	小鼠肾内注射
注射方法	100μL, 5×10 <sup>7</sup> IU/mL, 总量 5×10 <sup>6</sup> IU
检测时间	2 天

IF = 4.187

病毒类型	过表达 AAV
注射部位	小鼠肺脏
注射方法	经呼吸道滴鼻法
检测时间	1 个月
病毒滴度	10 <sup>11-12</sup> v.g/mL

**代表文献**

[42]Gene Therapy, 2014, 21(6): 618.



IF = 3.11

病毒类型	过表达 AAV
注射部位	小鼠肾脏
注射方法	5×10 <sup>10</sup> 的病毒量
检测时间	12 周

扫码进入干货区

SCAN CODE  
ENTER THE DRY GOODS AREA

获取更多系统病毒注射参考资料

实验专区

一个实验知识分享地



## 工具病毒在不同系统中的注射方法综述

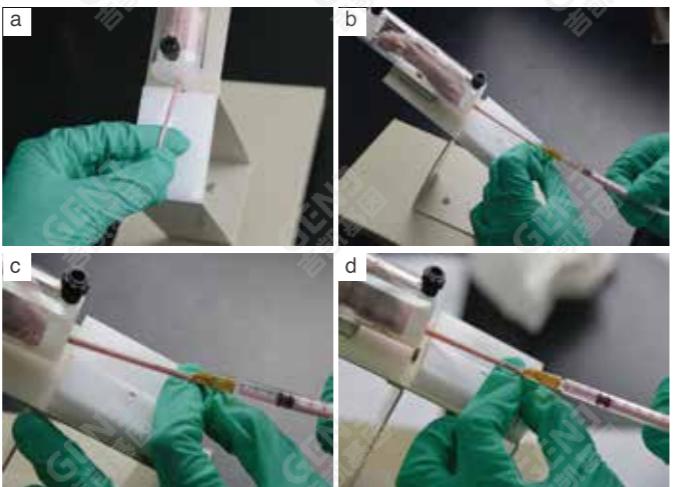
### 工具病毒常用注射方法

工具病毒的注射方法主要可以分为系统性注射和原位注射两种方法，下面分别简要介绍。

#### 系统性注射——尾静脉注射

具体操作步骤：

- 首先，提取小鼠尾巴，将其放在鼠笼盖或手背上，并进行适当安抚。
- 然后，将小鼠装入固定器中，盖紧盖子，并使其尾巴朝外露出。
- 用酒精棉球擦拭小鼠尾巴，使其血管扩张（或利用热水、浴霸加热）。
- 将鼠尾拉直，使其红色静脉清晰可见。
- 距鼠尾尖 1/3 处进针，若进针畅通无阻，则说明针头在血管内。
- 检查针管内有无回血，如有回血，则可以注射药物。
- 用棉球按压注射点 1MIN 左右止血。
- 最后，将小鼠从固定器上取下，放回笼中。



小鼠尾静脉注射示意图（图片来自吉凯基因）

#### 系统性注射——腹腔注射

具体操作步骤：

- 首先，从笼中提取小鼠尾巴，并将其放在手背上，进行适当安抚。
- 然后，左手握小鼠，用拇指、食指捏住小鼠颈背部，用无名指及小指固定其尾和后肢，腹部向上，头呈低位。
- 右手持注射器，插入小鼠腹部，注射部位为下腹部离腹白线约 0.5CM 处，使针头与小鼠腹部约成 30°角刺入腹腔，针头刺入的速度要快，刚开始刺时会有一种明显的抵抗力，那是因为鼠皮具有韧性，后来突然会有一种抵抗力消失的感觉，说明针头已刺入腹腔内，此时回抽没有回血，说明针头没有进入脏器，就可以进行注射。（注意：针头刺入腹腔不宜超过 1CM，进针动作要轻柔，防止刺伤腹部器官。）
- 注射完病毒后，缓缓拔出针头，并轻微旋转针头，防止漏液。
- 最后，将小鼠重新放回笼中，继续饲养观察。



小鼠腹腔注射示意图（图片来自吉凯基因）

**扫码进入技术视频专区  
获取 Protocol 及操作视频**

技术视频

一个实验知识分享地



#### 原位注射——脑立体定位注射

注意事项：

- 找准立体定位点：首先，在脑立体定位图谱上确定该核团的形状及坐标，再结合相关文献中的坐标值，最终确定一个合适的注射位点。
- 荧光、有色染料预实验：在病毒注射之前，为了确定核团定位是否正确，推荐神经顺行示踪的 Dil 染料，神经逆行示踪的荧光金（Fluoro gold）染料，分别在注射染料后 1 周、2 周切片并确认注射的位点无误，再进行病毒注射，可有效提高病毒标记的成功率。
- 注意小鼠的状态：由于俯卧体位以及脑立体定位仪的夹持，容易造成小鼠窒息死亡，因此需要随时确认小鼠气道通畅。另外，对于手术切开的部位，应适当滴加生理盐水，防止伤口干燥。

#### 实验前准备

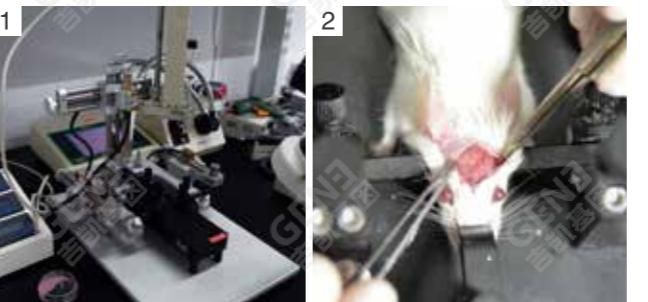
准备内容：

脑立体定位仪，常规手术器械，颅骨钻，微量注射器，干棉球，1% 的戊巴比妥钠，生理盐水，1ML 注射器，小鼠。

- 首先，用 1% 的戊巴比妥钠，以腹腔注射的方式麻醉小鼠，注射量为 80MG/KG 小鼠。
- 然后，从饲养笼中取出小鼠。
- 5-10MIN 后，麻醉剂起效。
- 待小鼠麻醉后，用剃毛器将小鼠头部毛发剔除干净。

#### 固定小鼠

- 将麻醉剃毛后的小鼠固定到立体定位仪上。
- 固定时，先将小鼠门齿卡在适配器门齿夹上，轻轻压上门齿夹横杆，调整适配器高度和前后，使耳杆可以方便进入小鼠外耳道。
- 左手托起小鼠头部，将左侧耳杆插入小鼠耳道，调节左右侧耳杆使动物头部保持在 U 型开口的中心位置，先锁紧固定一侧耳杆，后旋紧另一侧耳杆，使动物头部不能晃动，同时旋紧门齿夹螺丝。
- 检查是否固定成功：鼻对正中，头部不动，提尾不掉，目测大脑放置水平。



脑立体定位示意图（图片来自吉凯基因）



脑立体定位病毒注射示意图（图片来自吉凯基因）

#### 原位注射——心脏原位注射

- 尾静脉注射感染心脏

可能由于心脏血流太快等原因，使尾静脉注射的病毒不容易富集在心脏，因此相比其他器官，需要更大的病毒量。

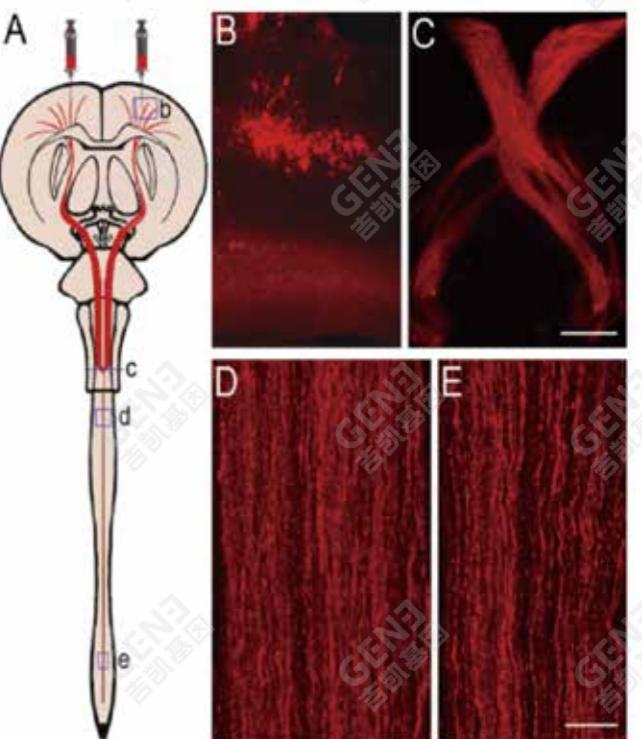
- 颈静脉注射、心脏内注射、心肌内定（多）点注射、心包内注射。

心脏内注射需要结合主动脉嵌夹进行，由于开胸腔手术需要辅助呼吸，对手术操作要求较高。病毒用量为 10 次方左右，稀释成 20L 左右。心肌内定点注射时，使用 27-29G 的针头，每点注射 2-5L，注意缓慢注射，效果是在注射的局部点附近表达较高，扩散有限。

- 用脱毛膏或者剃刀将需要手术部位的毛发去除。
- 然后用手术刀划开小鼠头部皮肤，去除颅骨表面结缔组织，暴露前后囟。
- 根据脑图谱，确定待注射脑区的位置参数，包含离 BREGMA 和 LAMBDA 点的距离以及核团深度。
- 以 BREGMA 为 0 点，按照预先确定好的坐标移动颅骨钻，打开合适大小的骨窗（窗口尽量小但是又不妨碍实验）。小心地用颅骨钻在注射位点处轻磨颅骨，将颅骨慢慢打薄，当颅骨出现裂缝的时候，用医用注射器的针头小心挑破，防止损伤，如果在此过程中有出血，可以用很小的医药棉球拉成长条形将血吸走，钻孔时一定要控制好，否则很容易在钻通颅骨后一不小心钻头进入脑组织，造成损伤。

#### 注射病毒

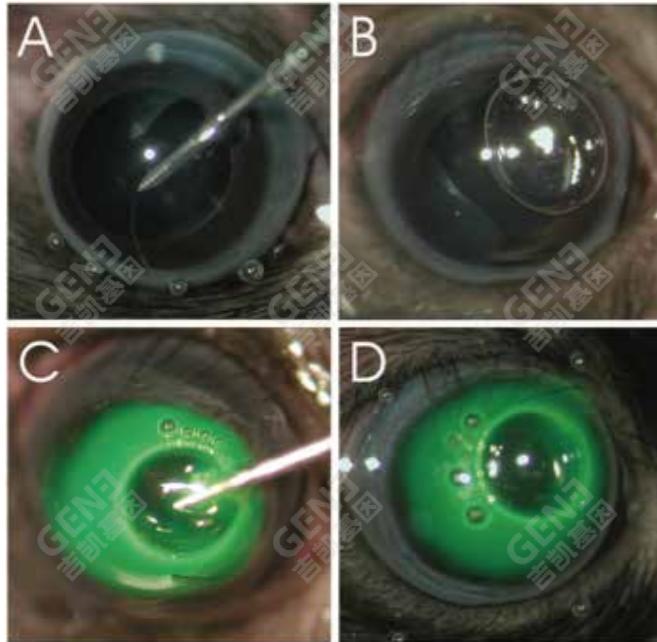
- 用 PBS 冲洗微量注射器（5L 规格）3-5 次。
- 先吸取 1L 空气，再吸取 1L 稀释好的病毒（方便病毒充分注射进脑），在空气中测试注射器是否通畅；
- 将微量注射泵，微量注射器组装好，置于钻好的孔上方，针尖与颅骨平行（Z=0），微调注射器位置使之与之前钻孔时位置相同。
- 根据定好的深度将注射针缓慢下降。



如果是一些长距离投射的神经元（以皮层神经元为例），那么在皮层和相应的脊髓水平都可以看到病毒标记  
(参考文献: Journal of Neuroscience Methods, 2008, 167)

## 原位注射——角膜下原位注射

- 实验开始前,先将小鼠进行麻醉。
- 然后将小鼠固定在台上,并将眼球部分突出。
- 夹紧小鼠头部,并对其角巩膜缘处进行扎孔。扎孔时,一般选择角膜缘后1MM位置,注意避开血管。
- 判断是否扎孔成功。
- 扎孔成功后,开始注射病毒。
- 注射时,针尖垂直进入,随后倾斜,缓慢推注。

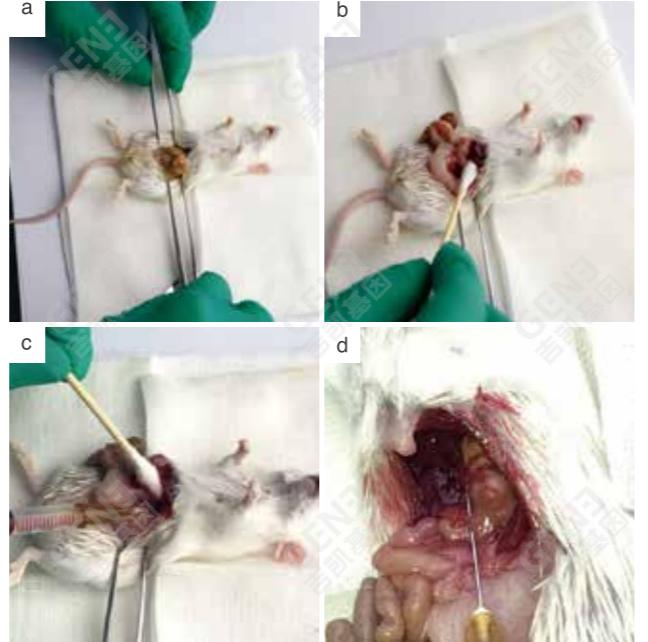


角膜下病毒注射

(参考文献: Journal of Neuroscience Methods, 2008, 167 (2):191)

## 原位注射——肝原位注射

- 肝脏一般使用尾静脉注射,尾静脉直接入肝;或者肝门静脉注射,用量与尾静脉类似。
- 腹部切开后,寻找到肝门静脉:将肝叶提起,下面就是门静脉,因为下腔静脉在后方,离肾脏比较近,所以,一般看到的大的静脉就是门静脉。
- 用注射器注射病毒,穿刺后压迫止血。



肝门静脉病毒注射示意图(图片来吉凯基因)

## 原位注射——肺原位注射

### 鼻内滴注法:

是一种直接的AAV感染法,操作简单且对设备要求低。缺点是AAV颗粒容易沉积在上呼吸道(鼻道、鼻窦和咽)和胃肠道,如果需要有效地感染到下呼吸道,则可能需要更大剂量的AAV才能实现。

- 使动物处于足够深的麻醉状态,以防止小鼠运动或对载体的反应而打喷嚏或咳嗽,但也需要防止小鼠麻醉过度而死亡。
- 将小鼠以背卧姿势固定,并慢慢地将AAV悬液通过小鼠鼻孔内壁逐滴滴入,为保证最大的肺部感染效率,最小体积为50 $\mu$ L(每个鼻孔25 $\mu$ L),最大体积为75 $\mu$ L(每个鼻孔37.5 $\mu$ L)。待小鼠呼吸恢复正常后,再滴入一次75 $\mu$ L的AAV悬液。
- 将小鼠轻轻从工作台拿下,并将头部和胸部用折叠的纸巾小幅度垫高,以保证小鼠顺畅的呼吸。待小鼠苏醒后,放回鼠笼。

### 免疫荧光切片的制备流程

除了病毒注射本身的原因,动物处理、组织处理、冰冻切片,后期染色、图像采集这一系列流程,往往都决定了后期得到的结果质量。经过多年的实验操作,我们总结出一条实验流程,流程看似简单,但是往往一个看似不起眼的细节都会决定结果的质量。

### 需要遵循的重要原则:

- 全程都要保证组织的湿润状态:防止组织干燥,非特异性背景过高。

3遍,每次5min,以去除组织上多余的多聚甲醛。然后浸于30%的蔗糖溶液4℃脱水。观察组织能否沉降到蔗糖溶液的底部,并且翻转或震荡后仍能沉降,则可判断组织已脱水完全。

### 包埋:

首先在包埋盒上做好标记,标明组织部位、头尾端方向、组别、日期。将处理好的组织从蔗糖里取出置于相应的包埋盒中,用滤纸吸干组织周围多余溶液(避免触碰组织),滴加适量的O.C.T包埋剂直至组织完全浸没。用移液枪头小心搅拌组织,使组织与O.C.T充分混匀,并尽量避免产生气泡,静置使O.C.T与组织充分接触。待气泡消失,调整组织到合适的位置,放与-80℃冰箱中,待O.C.T凝固。于-80℃冰箱储存备用(组织不可储存时间过久,尽量在2个月内用完,否则切片质量差)。

### 冰冻切片:

切片前30min将莱卡切片机的箱体温度及刀头温度调至-20℃,将包埋的组织从-80℃冰箱取出,置于切片机箱体中复温(以防切片时组织断裂)。然后用O.C.T将组织块固定于样品托上,然后将样品托固定在样品头上,调整至合适位置,使组织样品与刀头平行,保证组织切片无角度偏差。先将包埋块按大小、部位、切面等要求修理成小块(越小越不容易卷片),再配合使用防卷板与细毛笔,切成合适厚度的薄片。用细毛笔将切片整理平整,并注意一定要避免气泡(可以用毛笔沾一些PBS涂抹在贴片部位,再贴片,不会有气泡),再将切片铺在明胶包被过的载玻片上。

### 免疫荧光染色:

- 不需要再和其他的蛋白marker进行免疫组化共染:那么冰冻切片后,将切片放在干燥的片盒中,室温下避光晾片30-45min,待切片与载玻片贴合牢固,将切片放入染缸中用PBS洗3次,每次10min,清洗掉包埋剂后,用滤纸吸干玻片上多余的PBS,

就可以用封片剂或甘油封片,荧光显微镜观察并采集数据。

- 需要和其他的蛋白marker共染:

在冰冻切片后,将切片放在干燥的片盒中,室温下避光晾片30-45min,待切片与载玻片贴合牢固后,再将湿盒放入通风橱中,每张切片滴加1ml4%多聚甲醛室温固定10min,然后倒掉多聚甲醛,用PBS洗三次,一次10min。

### 一抗孵育:

将湿盒下部放水,并将切片放回湿盒内,用滤纸吸干玻片上多余的PBS。可以按照抗体说明书上推荐的比例配制一抗工作液,但是具体的比例还需要几次摸索和调整,然后按照每张切片200 $\mu$ l的量滴加一抗工作液,小心覆盖封口膜,4℃孵育(约24-48小时),适当延长一抗孵育时间,抗体结合的效果好。

### 二抗孵育:

一抗孵育时间到,取出切片,揭去封口膜,倒掉一抗,将切片放入染缸用PBS洗3次,每次10min。再按照合适的比例配制二抗工作液(具体的比例都需要一定的时间摸索),按照每张切片200 $\mu$ l的量滴加二抗工作液,覆盖封口膜,4℃避光孵育过夜(约12小时)。

### 封片:

第二天取出切片,揭去封口膜,倒掉二抗,将切片放入染缸用1xPBS洗3次,每次10min。将切片取出,并于室温避光晾干。晾干后的切片滴加适量的封片剂或者甘油到载玻片上,小心盖上盖玻片,避免产生气泡,用吸水纸蘸掉多余的封片剂,晾干后,用透明指甲油密封四周防止盖玻片滑动。处理好的切片于4℃冰箱避光保存,为保证图片质量,尽可能现染现拍,防止荧光猝灭。

扫码进入技术视频专区  
获取 Protocol 及操作视频

技术视频

一个实验知识分享地



## 基因操作工具在体应用-FAQ

### 慢病毒、腺病毒、AAV 的检测周期分别是多长？

	慢病毒	腺病毒	腺相关病毒
外源基因表达时间	2-4 天开始表达 长时间稳定表达	1-2 天开始表达 持续 7-14 天	7-14 天开始表达 细胞分裂不旺盛部位可长时间表达

AAV 注射动物后，一般会在 1-2 周左右开始表达，体内实验一般建议感染后 3-4 周看第一批结果。在体内，细胞的生存周期较长，特别是一些神经元细胞，AAV 持续表达时间甚至可以长达两年以上。

### 为何有时病毒在体实验的感染效率不理想？

生物体内的环境非常复杂，在病毒感染细胞后，可能病毒可以很好的感染细胞，但受到多种体内调控因素的影响，导致病毒携带的外源基因不表达，或者表达的水平不够高。而在细胞系或者提取的原代细胞上，由于去除了体内复杂的影响因素，病毒的感染和表达相对会比较好。

### 如何提高病毒的在体实验感染效率？

查询相关的文献，参考文献中病毒用量，注射方法，注射位点等详细信息，再摸索一下实验条件，改变一下病毒的注射方法和用量等。很多情况下，感染效率不好并不是病毒本身的原因，而是由于实验操作步骤、注射位点、或者注射方法的问题导致的。经过一段时间的实验条件摸索，可以得到相对更好的结果。

### 冰冻切片发现组织碎片很多、或者切片发现组织有洞？

首先，可能是组织在处理的时候，在多聚甲醛中浸泡的时间过长，或者是组织在处理过程中没有全程在 PBS 中浸泡，还可能是组织在 -80°C 冰箱中贮存的时间太久，这些原因都会使组织变脆，变干，缩小，产生空洞。其次，可能组织没有在切片前复温 30min，组织冻的太硬，会使切片产生碎片。

### 发现切片后的背景很高、或者出现许多异常明亮的亮点？

背景很高的原因主要是组织太干，一方面可能是由于在多聚甲醛中浸泡的时间太久，另一方面可能是由于切片后组织晾的太干燥，一些背景可以通过适当的图片的后期处理解决。明亮的亮点可能是 PBS 没有过滤就用来洗片子，里面有杂质，或者是镜头上面的杂质，有些亮点可能也与组织本身的结构有关。

### 如何选择裸鼠进行皮下成瘤实验？性别是否有影响？

目前裸小鼠是应用最广的皮下成瘤模型。一般取 5-6 周龄裸鼠饲养（此时大小约 16-23g）。雌雄都可以，和性别有关的实验除外。但有些肿瘤在雌性中生长不如雄性的好，比如在肝癌 HCC，雌激素会与 NF-κB 或 / 和 C/EBPbeta 等 interleukin-6 的转录因子直接结合并减弱其活性，从而影响 IL-6 的转录及其下游诱导（促进）癌进展，从而保护机体。因此目前大多数实验倾向使用雄性裸鼠。

### 如何确定细胞接种量？

一般细胞浓度可在  $1 \times 10^6$  到  $5 \times 10^7$  之间，浓度再大就可能打不进去了。具体浓度需要查相关文献。建议做细胞浓度梯度预实验，以确定接种量的范围。

### 为何待接种细胞用无血清培养基或者 PBS 悬浮？

因为培养液、血清等可能会导致动物的炎症反应而影响肿瘤的发生发展。

# 04

# RESOURCE SHARING PLATFORM

## 资源共享平台

过表达、RNAi慢病毒现货产品  
cDNA克隆现货产品  
CRISPR-POOL(TM)全基因组筛选文库现货产品  
工具腺相关病毒(AAV)现货产品  
工具细胞株现货产品

### 还有其他问题？

扫码进入实验专区  
查看更多问题及详细解答

实验专区 一个实验知识分享地



RESOURCES SHARING  
PLATFORM**吉凯基因资源共享平台**

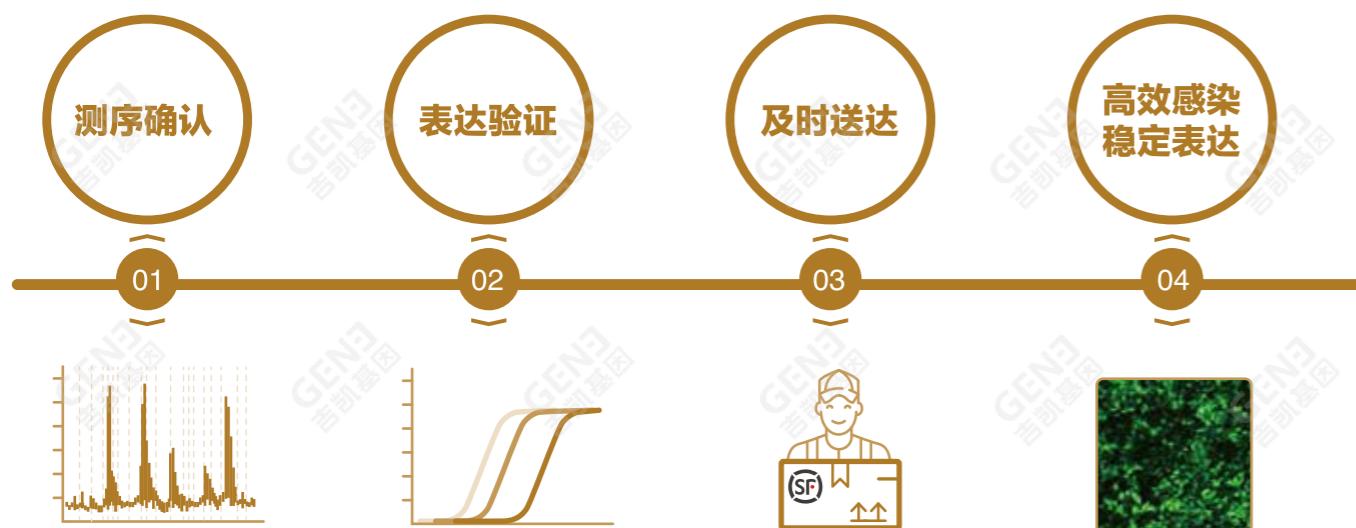
吉凯基因资源共享平台是国内首个集产品采购和资讯分享的一体化综合服务平台，为科研工作者提供一键式的采购服务，提供慢病毒、腺相关病毒（AAV）、cDNA 克隆、细胞株、Cas9 文库、支原体试剂盒等高品质、短周期的现货产品。平台拥有超过 10000 个基因的现货慢病毒载体，且产品最快 5 个工作日内配送，为科研工作者节约更多宝贵时间。同时还有高分文章解析、实验 Protocol、实验操作视频等众多科研资讯，为您的科研保驾护航。

**过表达、RNAi慢病毒现货产品****过表达慢病毒**

覆盖人、小鼠和大鼠基因组  
>10000 个热点基因已构建至慢病毒载体  
交付周期最短仅需 5 个工作日  
承诺在 293T 细胞中，对靶基因在 mRNA 水平上调达到 2 倍以上  
适用于在各类细胞中稳定过量表达不同大小的外源基因，满足永生化细胞，原代和干细胞感染，动物体内注射等不同实验需要。

**已验证靶点 RNAi 慢病毒**

>5000 个人类热点基因的 RNAi 单靶点慢病毒  
已在 293T 细胞中验证对靶基因的抑制效果  
交付周期仅需 15 个工作日  
承诺在 293T 细胞中，对靶基因的抑制效率在 mRNA 水平达到 50% 以上  
提供 1 个已经实验验证的 RNAi 靶点慢病毒。适用于在各类细胞中稳定抑制同源基因的表达，满足永生化细胞，原代和干细胞感染，动物体内注射等不同实验需要。

**价格及周期**

产品名称	滴度	规格 (含等量对照)	周期 (工作日)	价格 (元)
过表达慢病毒	≥ 1E+08TU/mL	5E+07TU	5	2880
		1E+08TU	5-15	3880-5880
已验证靶点 RNAi 慢病毒	≥ 1E+08TU/mL	1E+08TU	15	2880

**cDNA克隆现货产品****cDNA 克隆**

覆盖人、小鼠和大鼠基因组  
>10000 个热点基因已构建至表达载体  
CDS 序列已经全长测序，承诺无错义、插入、缺失、颠倒、移码等突变  
交货周期仅需 5 个工作日  
绝大多数载体包含有原核抗性（如，氨苄、卡那霉素）、真核抗性（如，嘌呤霉素、新霉素）、启动子（CMV、Ubi）与荧光标记（GFP、RFP）。

产品名称	规格 (不含对照)	周期 (工作日)	价格 (元)
cDNA 克隆	10μg	5	980

**CRISPR-Pool (TM) 全基因组筛选文库现货产品**

包装成慢病毒的基因组水平敲除 / 过表达文库

**CRISPR-poolTM KOUT( 敲除 )**

高通量敲除基因的慢病毒文库，包含 122411 个 sgRNA 靶点慢病毒，同时靶向人类基因组中 19050 个编码基因及 1864 个 microRNA  
适合于细胞增殖关键基因、药物敏感关键基因、致死致病原（病毒、细菌等）感染敏感关键基因的高通量功能性筛选

**CRISPR-poolTM SAM( 过表达 )**

内源性高通量上调编码基因的慢病毒文库，包含 70290 个 sgRNA 靶点慢病毒，同时靶向 23430 个编码基因转录本  
适用于耐药基因、毒性抵抗基因、促细胞增殖基因的高通量功能性筛选

**产品特色**

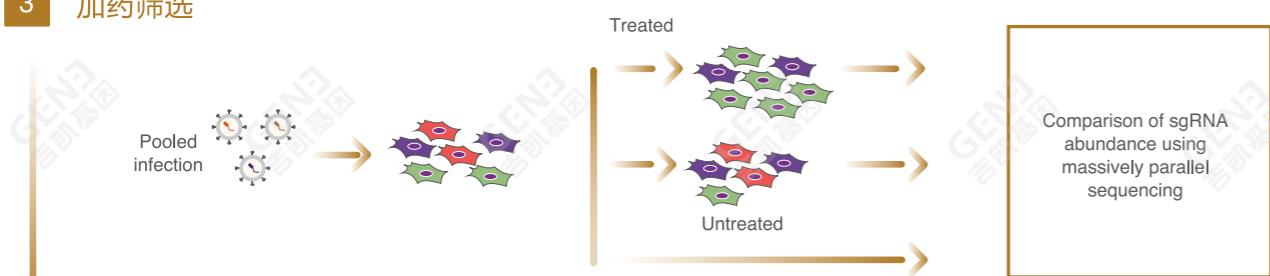
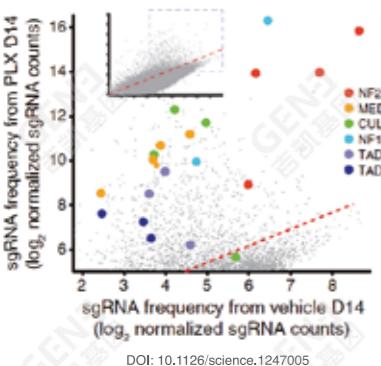
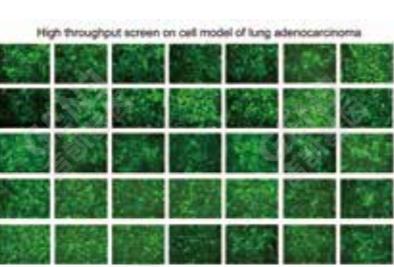
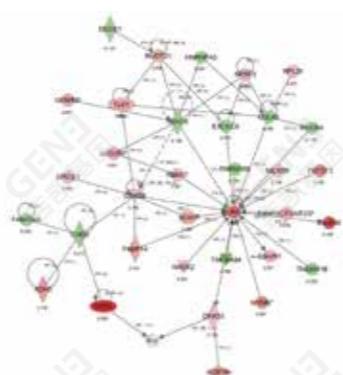
针对每一靶基因设计多条 sgRNA  
文库完整性：质粒覆盖度 >98%  
文库均一性：丰度最高的 10% 的 sgRNA 与丰度最低的 10% 的 sgRNA 之间的丰度差异在 15 倍之内  
文库质粒以慢病毒包裹，感染效率高

**价格及周期**

产品名称	功能描述	物种	靶基因 (个)	sgRNA (个)	载体数	周期 (工作日)	规格	价格 (元)
CRISPR-Pool™KOUT (Human/Dual vector)	基因敲除	Human	19050	123411	2	5		
CRISPR-Pool™KOUT (Human/Single vector)	基因敲除	Human	19050	123411	1	5		
CRISPR-Pool™KOUT (Mouse/Dual vector)	基因敲除	Mouse	20611	130209	2	5	超值试用装	2800
CRISPR-Pool™KOUT (Mouse/Single vector)	基因敲除	Mouse	20611	130209	1	15	超值试用装	26000
CRISPR-Pool™SAM (Human/Dual vector)	基因过表达	Human	23430	70297	2	15	超值试用装	48000
CRISPR-Pool™SAM (Human/Triple vector)	基因过表达	Human	23430	70297	3	5	超值试用装	72000
CRISPR-Pool™SAM (Mouse/Triple vector)	基因过表达	Mouse	23439	69716	3	15		

**应用示例****CRISPR-pool™ 用于抗肿瘤药物药敏 / 耐药基因的筛选**

慢病毒敲除 / 过表达文库可高效处理细胞进行抗肿瘤药物 / 致死致病原 / 毒物处理，富集耐药细胞群。收集细胞群进行深度测序获得高丰度 sgRNA，以此筛选获得关键抗性基因

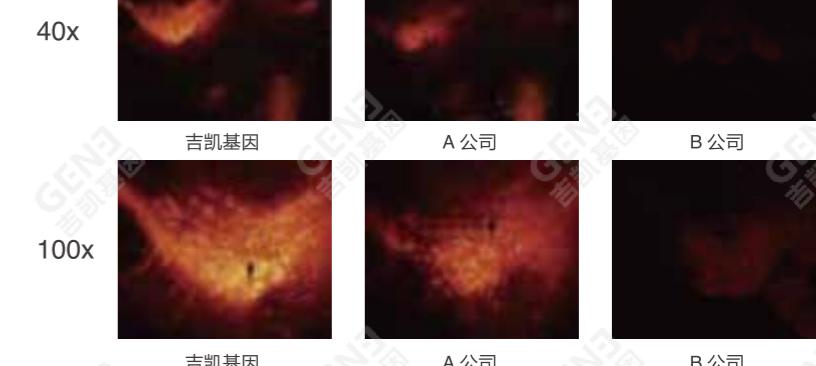
**1 文库制备及慢病毒包装****2 细胞感染及抗性筛选****3 加药筛选****4 生物信息学分析****5 HCS及功能验证****6 功能基因机制研究****工具腺相关病毒 (AAV) 现货产品****腺相关病毒 (AAV) 系列产品**

提供光遗传、化学遗传、钙指示剂、荧光示踪、重组酶等 108 种现货工具 AAV 产品  
涵盖 1/2/5/6/8/9/DJ/Retro/PHP.eB/PHP.S 十种血清型  
交付周期仅需 5 个工作日

**吉凯优势**

15 年专业病毒生产经验  
拥有 cGMP 病毒生产车间  
滴度准确，纯度更高  
加入 FTR 抗冻融因子，病毒质量更稳定

图注：光遗传载体定点注射小鼠海马体（以各自标定滴度计算注射等量病毒，注射体积 1.5 $\mu$ L, 14days），说明吉凯 AAV 滴度测定更准确，活性病毒颗粒占比更高。



吉凯基因 A 公司 B 公司

**价格及周期**

产品名称	血清型	规格 (不含对照)	周期 (工作日)	价格 (元)
腺相关 病毒现货	1/2/5/6/8/9/DJ/Retro PHP.eB/PHP.S	1E+12 v.g.	5-15	2000 (1/2/6/DJ/Retro/PHP.eB/PHP.S 型) 1400 (5/8/9 型)
		1E+13 v.g.		9145 (1/2/6/DJ/Retro/PHP.eB/PHP.S 型) 6400 (5/8/9 型)

**工具病毒小知识****AAV- 光遗传**

光遗传通常是指结合光学与遗传学手段，精确控制特定神经元活动的技术。其中，典型的用于激活神经元的光敏感通道蛋白为 ChR2 (channelrhodopsin)，该蛋白在蓝光(最大激发峰在 470nm 波长附近)的激发下会诱导阳离子通道的打开，促使神经元的去极化，进而诱发动作电位，激活神经元。典型的抑制神经元活动的光敏感蛋白为 NpHR(盐系菌视紫红质)，该蛋白在黄绿光(最大激发峰在 590nm 波长附近)的激发下会诱导氯离子通道的打开，氯离子内流造成神经元的超极化，从而抑制神经元动作电位的产生。除此之外，还有在苏打盐红菌里发现的 Arch(古紫质)，该蛋白在黄绿光(最大激发峰在 566nm 波长附近)的激发下会诱导质子的外流，从而产生超极化信号，抑制神经元的活动。

**AAV- 化学遗传**

化学遗传学是指：对一些生物大分子实行改造，使其能和先前无法识别的小分子进行相互作用的过程。化学遗传学和分子遗传学一样，均是遗传学的一个分支，由于其可控的、可逆的(可以随时加入或除去化合物，从而启动或中断特定的反应)特性，已经在信号转导、药物开发、功能基因组学等方面的研究中得到了广泛的应用。现在很多由叠氮平-N-氧化物(clozapine-N-oxide, CNO)激活的 DREADDs，他们会选择性地作用于不同的 GPCR 级联反应，包括激活 Gq、Gi、Gs、Golf 和  $\beta$ -arrestin，其中应用最广泛的是 Gq-DREADD 和 Gi-DREADD。一般来说，如果是想激活神经元，则选择 hM3Dq，如果是想抑制神经元的活性，则选择 hM4Di。

**AAV- 荧光示踪**

带有荧光标签的 AAV 病毒一般具有体内示踪功能，以及可以作为同载体其他病毒的对照病毒使用。

中不存在钙离子时，在 440nm 的激发波长下，ECFP 产生蓝色荧光，

Venus 不产生荧光；而当存在钙离子时，钙离子与钙调蛋白 CaM 结合，在 440nm 激发波长下 ECFP 发生能量共振转移至 Venus，最终产生黄色荧光；对于 Single-fluorophore GECI，在钙的存在下，钙调蛋白-M13 相互作用引起荧光团环境中的构象变化，导致荧光发射增加。目前常用的荧光蛋白指示剂有 Cameleons、TN-XXL、GCaMP、Pericams 和 Camgaroo 等。

GCaMP 系列蛋白(Single-fluorophore)特别是 GCaMP6 系列蛋白是最主要的钙离子指示剂，且越来越多地被用于体内钙成像研究。

GCaMP6 比 GCaMP3 强 10 倍，动力学快 2 倍。其中 GCaMP6s (slow), 6m (medium), 6f (fast) 分别代表慢、中、快三种动力学性质(动力学越快越适合检测快速变化的钙信号)。GCaMP6s 荧光变化最大，GCaMP6f 最灵敏。

**AAV- 重组酶**

Cre-loxP 系统是一种重组酶系统，源于 P1 噬菌体的一个 DNA 重组体系，该系统由组织特异性重组酶 Cre 和 loxP 位点组成，是一种被用作控制基因组 DNA 中位点特异性重组事件的遗传工具，被广泛应用于特异位点的基因敲除、基因插入、基因翻转和基因易位，可达到在基因水平上对生物体进行定向遗传改造的目的。该系统在真核生物和原核生物中均有广泛应用。

AAV 重组酶系列适用于 CKO/Loxp 小鼠体内，能够实现细胞/组织特异性表达。

## AAV-光遗传现货列表

货号	载体名称	启动子	启动子表达位置	主要元件	荧光	表达方式
AAV00006	pAAV-CAG-ArchT-GFP	Cag	广谱	ArchT	GFP	正常表达
AAV00020	pAAV-CAG-ChR2-GFP	Cag	广谱	ChR2	GFP	正常表达
AAV00021	pAAV-CAG-hChR2-H134R-tdTomato	Cag	广谱	hChR2(H134R)	tdTomato	正常表达
AAV00011	pAAV-FLEX-Arch-GFP	Cag	广谱	FLEX-Arch	GFP	Cre 诱导表达
AAV00018	pAAV-FLEX-ArchT-tdTomato	Cag	广谱	FLEX-ArchT	tdTomato	Cre 诱导表达
AAV00022	pAAV-FLEX-ArchT-GFP	Cag	广谱	FLEX-ArchT	GFP	Cre 诱导表达
AAV00034	pAAV-CaMKII-eNpHR3.0-mCherry	CaMKII	谷氨酸能神经元	eNpHR 3.0	mCherry	正常表达
AAV00076	pAAV-CaMKII-Jaws-KGC-GFP-ER2	CaMKII	谷氨酸能神经元	Jaws-KGC	GFP-ER2	正常表达
AAV00079	pAAV-CaMKII-Mac-GFP	CaMKII	谷氨酸能神经元	Mac	GFP	正常表达
AAV00025	pAAV-CaMKIIa-ChR2-mCherry	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	ChR2	mCherry	正常表达
AAV00026	pAAV-CaMKIIa-eArchT3.0-P2A-EGFP	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	eArchT3.0	EGFP	正常表达
AAV00012	pAAV-CaMKIIa-eArch 3.0-EYFP	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	eArchT3.0	EYFP	正常表达
AAV00013	pAAV-CaMKIIa-eNpHR 3.0-EYFP	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	eNpHR 3.0	EYFP	正常表达
AAV00027	pAAV-CaMKIIa-eNpHR 3.0-lrfp-WPRE	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	eNpHR 3.0	lrfp	正常表达
AAV00028	pAAV-CaMKIIa-hChR2(E123A)-EYFP	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	hChR2(E123A)	EYFP	正常表达
AAV00029	pAAV-CaMKIIa-hChR2(E123A)-mCherry	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	hChR2(E123A)	mCherry	正常表达
AAV00039	pAAV-CaMKIIa-hChR2(E123T/T159C)-mCherry	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	hChR2(E123T/T159C)	mCherry	正常表达
AAV00051	pAAV-CaMKIIa-hChR2(E123T/T159C)-EYFP	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	hChR2(E123T/T159C)	EYFP	正常表达
AAV00072	pAAV-CaMKIIa-hChR2(H134R)-EYFP	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	hChR2(H134R)	EYFP	正常表达
AAV00095	pAAV-CaMKIIa-hChR2(H134R)-mCherry	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	hChR2(H134R)	mCherry	正常表达
AAV00098	pAAV-CaMKIIa-C1V1 (t/t)-TS-EYFP	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	DIO-C1V1 (t/t)	TS-EYFP	Cre 诱导表达

货号	载体名称	启动子	启动子表达位置	主要元件	荧光	表达方式
AAV00102	pAAV-CaMKIIa-C1V1 (t/t)-TS-mCherry	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	DIO-C1V1 (t/t)	TS-mCherry	Cre 诱导表达
AAV00002	pAAV-EF1a-DO-hChR2(H134R)-mCherry-WPRE	EF1a	广谱	DO-hChR2(H134R)	mCherry-WPRE	Cre 诱导关闭
AAV00005	pAAV-Ef1a-DIO-C1V1 (t/t)-TS-EYFP	EF1a	广谱	DIO-C1V1 (t/t)	TS-EYFP	Cre 诱导表达
AAV00008	pAAV-Ef1a-DIO-C1V1 (t/t)-TS-mCherry	EF1a	广谱	DIO-C1V1 (t/t)	TS-mCherry	Cre 诱导表达
AAV00010	pAAV-Ef1a-DIO-ChETA-EYFP	EF1a	广谱	DIO-ChETA	EYFP	Cre 诱导表达
AAV00023	pAAV-Ef1a-DIO-eNpHR 3.0-EYFP	EF1a	广谱	DIO-eNpHR 3.0	EYFP	Cre 诱导表达
AAV00024	pAAV-EF1a-DIO-hChR2(E123A)-eYFP	EF1a	广谱	DIO-hChR2(E123A)	EYFP	Cre 诱导表达
AAV00036	pAAV-EF1a-DIO-mCherry-WPRE	EF1a	广谱	DIO-mCherry	mCherry-WPRE	Cre 诱导表达
AAV00037	pAAV-double floxed-eNpHR-EYFP-WPRE-pA	EF1a	广谱	double floxed-eNpHR	EYFP-WPRE-pA	Cre 诱导表达
AAV00080	pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA	EF1a	广谱	double floxed-hChR2(H134R)	EYFP-WPRE-HGHpA	Cre 诱导表达
AAV00001	pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-mCherry-WPRE-HGHpA	EF1a	广谱	double floxed-hChR2(H134R)	mCherry-WPRE-HGHpA	Cre 诱导表达
AAV00015	pAAV-GFAP-hChR2(H134R)-EYFP	GFAP	星形胶质细胞 神经干细胞	hChR2(H134R)	EYFP	正常表达
AAV00038	pAAV-GFAP-hChR2(H134R)-mCherry	GFAP	星形胶质细胞 神经干细胞	hChR2(H134R)	mCherry	正常表达
AAV00003	pAAV-hSyn-ChR2-mcherry	hSyn	神经元	ChR2	mCherry	正常表达
AAV00014	pAAV-hSyn-eArchT3.0-P2A-EGFP	hSyn	神经元	eArchT3.0	EGFP	正常表达
AAV00060	pAAV-hSyn-hChR2(H134R)-mCherry	hSyn	神经元	hChR2(H134R)	mCherry	正常表达
AAV00104	pAAV-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP	hSyn	神经元	hChR2(H134R)	EYFP	正常表达
AAV00035	pAAV-Syn-ChR2(H134R)-GFP	Syn	神经元	ChR2(H134R)	GFP	正常表达
AAV00078	pAAV-Syn-ChrimsonR-GFP	Syn	神经元	ChrimsonR	GFP	正常表达
AAV00033	pAAV-Syn-FLEX-Mac-GFP	Syn	神经元	FLEX-Mac	GFP	Cre 诱导表达
AAV00097	pAAV-Syn-FLEX-rc[ChrimsonR-tdTomato]	Syn	神经元	FLEX-rc[ChrimsonR-tdTomato]	tdTomato	Cre 诱导表达

## AAV- 化学遗传现货列表

货号	载体名称	启动子	启动子表达位置	主要元件	荧光	表达方式
AAV00101	pAAV-CaMKIIa-DIO-hM4D(Gi)-eGFP	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	DIO-hM4D(Gi)	EGFP	Cre 诱导表达
AAV00085	pAAV-EF1a-DIO-hM3D(Gq)-mCherry	EF1a	广谱	DIO-hM3D(Gq)	mCherry	Cre 诱导表达
AAV00087	pAAV-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry	EF1a	广谱	hM4D(Gi)	mCherry	正常表达
AAV00090	pAAV-GFAP-hM3D(Gq)-mcherry	GFAP	星形胶质细胞 神经干细胞	hM3D(Gq)	mCherry	正常表达
AAV00088	pAAV-GFAP-hM4D(Gi)-mcherry	GFAP	星形胶质细胞 神经干细胞	hM4D(Gi)	mCherry	正常表达
AAV00030	pAAV-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry	hSyn	神经元	DIO-hM3D(Gq)	mCherry	Cre 诱导表达
AAV00071	pAAV-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-eGFP	hSyn	神经元	DIO-hM3D(Gq)	EGFP	Cre 诱导表达
AAV00031	pAAV-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry	hSyn	神经元	DIO-hM4D(Gi)	mCherry	Cre 诱导表达
AAV00099	pAAV-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-EGFP	hSyn	神经元	DIO-hM4D(Gi)	EGFP	Cre 诱导表达
AAV00096	pAAV-hSyn-HA-hM3D(Gq)-IRES-mCitrine	hSyn	神经元	hM3D(Gq)	mCitrine	正常表达
AAV00093	pAAV-hSyn-HA-hM4D(Gi)-IRES-mCitrine	hSyn	神经元	hM4D(Gi)	mCitrine	正常表达
AAV00100	pAAV-hSyn-hM4D(Gi)-mCherry	hSyn	神经元	hM4D(Gi)	mCherry	正常表达

## AAV- 钙指示剂现货列表

货号	载体名称	启动子	启动子表达位置	主要元件	荧光	表达方式
AAV00041	pAAV-CAG-Flex-GCaMP6(S)	Cag	广谱	Flex-GCaMP6(S)	无	Cre 诱导表达
AAV00068	pAAV-CaMKIIa-GCaMP6f-P2A-nls-dTomato	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	GCaMP6(F)	dTomato	正常表达
AAV00073	pAAV-CaMKIIa-GCaMP6f	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	GCaMP6(F)	无	正常表达
AAV00074	pAAV-CaMKIIa-GCaMP6s	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	GCaMP6(S)	无	正常表达
AAV00075	pAAV-CaMKIIa-GCaMP6s-P2A-nls-dTomato	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	GCaMP6(S)	dTomato	正常表达
AAV00044	pAAV-CMV-GCaMP6(F)	CMV	广谱	GCaMP6(F)	无	正常表达
AAV00045	pAAV-CMV bGlobin-GCaMP6(S)-3Flag	CMV-bGlobin	广谱	GCaMP6(S)	3Flag	正常表达
AAV00092	pAAV-EF1a-DIO-GCaMP6f-P2A-nls-dTomato	EF1a	广谱	DIO-GCaMP6f	dTomato	Cre 诱导表达
AAV00094	pAAV-EF1a-DIO-GCaMP6s-P2A-nls-dTomato	EF1a	广谱	DIO-GCaMP6s	dTomato	Cre 诱导表达
AAV00054	pAAV-hSyn-GCaMP6(F)	hSyn	神经元	GCaMP6(F)	无	正常表达

## AAV- 钙指示剂现货列表

货号	载体名称	启动子	启动子表达位置	主要元件	荧光	表达方式
AAV00058	pAAV-hSyn1-mRuby2-GSG-P2A-GCaMP6f-WPRE-pA	hSyn	神经元	GCaMP6(F)	mRuby2	正常表达
AAV00063	pAAV-hSyn-Flex-GCaMP6f	hSyn	神经元	GCaMP6(F)	无	正常表达
AAV00067	pAAV-hSyn1-GCaMP6f-P2A-nls-dTomato	hSyn	神经元	GCaMP6(F)	dTomato	正常表达
AAV00032	pAAV-hSyn1-GCaMP6s-P2A-nls-dTomato	hSyn	神经元	GCaMP6(S)	nls-dTomato	正常表达
AAV00053	pAAV-hSyn-GCaMP6s	hSyn	神经元	GCaMP6(S)	无	正常表达
AAV00059	pAAV-hSyn1-mRuby2-GSG-P2A-GCaMP6s-WPRE-pA	hSyn	神经元	GCaMP6(S)	mRuby2	正常表达
AAV00064	pAAV-hSyn-Flex-GCaMP6s	hSyn	神经元	GCaMP6(S)	无	正常表达

## AAV- 荧光示踪货列表

货号	载体名称	启动子	启动子表达位置	主要元件	荧光	表达方式
AAV00017	pAAV-CAG-GFP	Cag	广谱	GFP	GFP	正常表达
AAV00091	pAAV-CAG-tdTomato	Cag	广谱	tdTomato	tdTomato	正常表达
AAV00019	pAAV-FLEX-GFP	Cag	广谱	FLEX-GFP	GFP	Cre 诱导表达
AAV00083	pAAV-CaMKIIa-EGFP	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	EGFP	EGFP	正常表达
AAV00042	pAAV-CaMKIIa-eYFP	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	EYFP	EYFP	正常表达
AAV00084	pAAV-CaMKIIa-mCherry	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	mCherry	mCherry	正常表达
AAV00049	pAAV-CMV bGlobin-eGFP	CMV-bGlobin	广谱	EGFP	EGFP	正常表达
AAV00108	pAAV-CMV-bGlobin-LUC	CMV-bGlobin	广谱	LUC	LUC	正常表达
AAV00050	pAAV-CMV bGlobin-mCherry	CMV-bGlobin	广谱	mCherry	mCherry	正常表达
AAV00046	pAAV-EF1a-mCherry	EF1a	广谱	mCherry	mCherry	正常表达
AAV00016	pAAV-EF1a-DIO-EYFP	EF1a	广谱	DIO-EYFP	EYFP	Cre 诱导表达
AAV00007	pAAV-EF1a-double floxed-EYFP-WPRE-HGHpA	EF1a	广谱	double floxed-EYFP	EYFP-WPRE-HGHpA	Cre 诱导表达
AAV00009	pAAV-EF1a-double floxed-mCherry-WPRE-HGHpA	EF1a	广谱	double floxed-mCherry	mCherry-WPRE-HGHpA	Cre 诱导表达
AAV00070	pAAV-gfaABC1D-eGFP	gfaABC1D	星形胶质细胞 神经干细胞	EGFP	EGFP	正常表达
AAV00069	pAAV-GFAP-mCherry	GFAP	星形胶质细胞 神经干细胞	mCherry	mCherry	正常表达

## AAV- 荧光示踪货列表

货号	载体名称	启动子	启动子表达位置	主要元件	荧光	表达方式
AAV00057	pAAV-hSyn-EGFP	hSyn	神经元	EGFP	EGFP	正常表达
AAV00082	pAAV-hSyn-eGFP-3Flag	hSyn	神经元	EGFP	EGFP	正常表达
AAV00004	pAAV-hSyn-eNpHR 3.0-EYFP	hSyn	神经元	eNpHR 3.0	EYFP	正常表达
AAV00047	pAAV-hSyn-EYFP-3Flag	hSyn	神经元	EYFP	EFYP-3Flag	正常表达
AAV00065	pAAV-hSyn-LUC	hSyn	神经元	LUC	LUC	正常表达
AAV00052	pAAV-hSyn-mCherry	hSyn	神经元	mCherry	mCherry	正常表达
AAV00066	pAAV-hSyn-mCherry-3Flag	hSyn	神经元	mCherry	mCherry	正常表达
AAV00077	pAAV-hSyn-tdTomato	hSyn	神经元	tdTomato	tdTomato	正常表达
AAV00061	pAAV-hSyn-DIO-mCherry	hSyn	神经元	DIO-mCherry	mCherry	Cre 诱导表达
AAV00062	pAAV-hSyn-FLEX-eGFP	hSyn	神经元	FLEX-eGFP	EGFP	Cre 诱导表达
AAV00089	pAAV-hSyn-FLEX-tdTomato	hSyn	神经元	FLEX-tdTomato	tdTomato	Cre 诱导表达
AAV00086	pAAV-pCAG-FLEX-tdTomato-WPRE	pCag	广谱	FLEX-tdTomato	tdTomato-WPRE	Cre 诱导表达
AAV00107	pAAV-U6-shRNA-CAG-EGFP	U6	广谱	shRNA-EGFP	EGFP	正常表达
AAV00106	pAAV-U6-shRNA-CAG-mCherry	U6	广谱	shRNA-mCherry	mCherry	正常表达

## AAV- 重组酶现货列表

货号	载体名称	启动子	启动子表达位置	主要元件	荧光	表达方式
AAV00040	pAAV-CAG-EGFP-T2A-Cre	Cag	广谱	Cre	EGFP	正常表达
AAV00043	pAAV-CAMKIIa-GFP-2A-Cre	CaMKIIa	谷氨酸能神经元	Cre	GFP	正常表达
AAV00055	pAAV-CMV bGlobin-Cre-eGFP	CMV-bGlobin	广谱	Cre	EGFP	正常表达
AAV00056	pAAV-hSyn-Cre-EGFP	hSyn	神经元	Cre	EGFP	正常表达
AAV00103	pAAV-pmSyn1-EBFP-Cre	pmSyn1	神经元	Cre	EBFP	正常表达
AAV00048	pAAV-Syn-Cre	Syn	神经元	Cre	无	正常表达

## 工具细胞株现货产品

## 工具细胞株现货产品

吉凯细胞现货库是一个细胞产品种类齐全，以最具代表性的、全认证的肿瘤细胞株为主要特色的肿瘤细胞库，涵盖上百种现货肿瘤细胞株。吉凯拥有一支高素质的，专业从事细胞培养、保种、鉴定和检测的技术团队。细胞库管理专业、规范，提供的细胞株背景清楚，包含不同密度的细胞图片，助您更好地掌握细胞的生长特性；基本实验参数、细胞特征特性和培养经验等。

## 产品特色

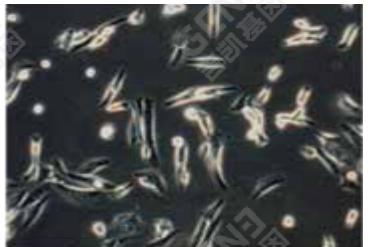
细胞来源可靠，均经过严格的 STR 分型鉴和无菌检测，不含有 HIV-1、HBV、HCV、支原体、细菌、酵母和真菌等细胞污染物

可提供完整的 STR 分型鉴定报告

可提供全面的功能学实验（包含克隆形成，Transwell，HCS 和细胞划痕）数据，手机端即可实现轻松查询

提供两种细胞产品发货形式：干冰发货和常温发货

交付周期最短仅需 6 个工作日



低密度 (100x)



高密度 (100x)

不同密度的细胞图片示例

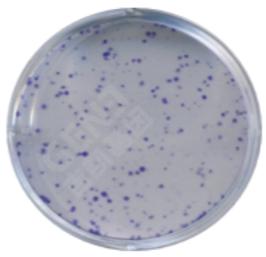


图 1 克隆形成 - 适合进行克隆形成实验，铺板细胞 1000，培养 8 天

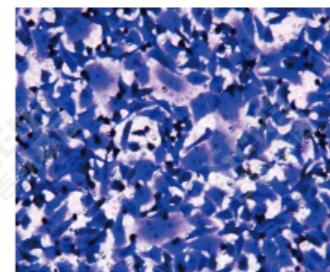
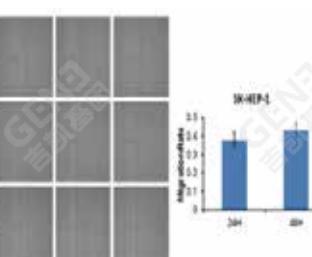
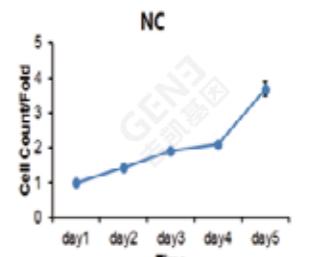


图 2 Transwell- 适合做 transwell 检测，铺板 10 万细胞，培养 21 小时



## 价格及周期

产品名称	规格	周期(工作日)	价格
细胞株	1x10 <sup>6</sup> cells	6-15	680-1280

# 现货查询 及购买入口

扫码进入网上商城  
自助查询及购买现货产品



## 05

致力转化医学 共创健康明天

# GENE FUNCTION AND MECHANISM RESEARCH PRODUCTS AND TECHNICAL SERVICES

## 基因功能与机制研究相关 产品及技术服务

基因操作工具

基因功能验证

机制研究

附录：吉凯推荐病毒载体列表

### GENE MANIPULATION TOOLS 基因操作工具

#### 质粒

##### Trans-OE™ 过表达质粒

产品名称	简介	产品规格	目录价格(元)	周期(工作日)
cDNA克隆 (现货)	提供无错义、插入、缺失、颠倒、移码突变的CDS模版序列	10μg	980	5
过表达质粒	用于过表达编码基因/lncRNA	10μg (含等量对照)	1308	16
microRNA-up质粒	用于过表达miRNA	10μg (含等量对照)	1428	20

说明：本表所列价格周期不包含模版获取、亚克隆，突变，缺失的部分。

##### Trans-KD™ 用于干扰基因的 shRNA 质粒

产品名称	简介	产品规格	目录价格(元)	周期(工作日)
RNAi-定制-shRNA质粒	用于下调编码基因/lncRNA, 需提供靶点序列	10μg (含等量对照)	1428	15
RNAi-Eeasy-shRNA质粒	用于下调编码基因, 提供3个干扰靶点序列, 确保其中1个有效	10μg (含等量对照)	3560	15
microRNA-down质粒	用于下调miRNA	10μg (含等量对照)	1428	20

#### 慢病毒

##### Lenti-OE™ 用于上调基因的高纯度慢病毒

产品名称	简介	产品规格	目录价格(元)	周期(工作日)
过表达慢病毒 (现货)	用于过表达编码基因/lncRNA	5E+7/1E+8TU (含等量对照)	2880/3880-5880	5-15
过表达慢病毒	用于过表达编码基因/lncRNA	1E+8TU (含等量对照)	14050	20
过表达慢病毒 (Tet-on)	Tet on诱导过表达慢病毒	1E+8TU (含等量对照)	16300	45
microRNA-up慢病毒	用于过表达miRNA	1E+8TU (含等量对照)	4000	20

说明：本表所列价格周期不包含模版获取、亚克隆，突变，缺失的部分。

##### Lenti-KD™ 用于下调基因的高纯度慢病毒

产品名称	简介	产品规格	目录价格(元)	周期(工作日)
RNAi-有效靶点-慢病毒 (现货)	用于下调编码基因/lncRNA, 提供1个干扰靶点序列, 确保293细胞50%干扰效率	1E+8TU (含等量对照)	2880	15
RNAi-定制-慢病毒	用于下调编码基因/lncRNA, 需提供靶点序列	1E+8TU (含等量对照)	4000	20
RNAi-定制-慢病毒 (Tet-on)	Tet on诱导干扰慢病毒, 用于下调编码基因/lncRNA, 需提供靶点序列	1E+8TU (含等量对照)	9800	20
RNAi-Eeasy-慢病毒	用于下调编码基因, 提供3个干扰靶点序列, 确保其中1个有效	1E+8TU (含等量对照)	12500	20
microRNA-down慢病毒	用于下调miRNA	1E+8TU (含等量对照)	4000	20

**Lenti-CRISPR™ 使用 CRISPR/cas9 技术的高效慢病毒**

产品名称	简介	产品规格	目录价格(元)	周期(工作日)
CAS9-定制-慢病毒 ( KO )	用于敲除编码基因, 需提供靶点序列	1E+8TU (含等量对照)	12330	20
CAS9-Easy-慢病毒 ( KO )	用于敲除编码基因, 提供3个sgRNA靶点, 确保其中1个有效	1E+8TU (含等量对照)	22030	20
CAS9-定制-慢病毒(SAM)	用于过表达编码基因, 需提供靶点序列	1E+8TU (含等量对照)	12330	20
CAS9-Easy-慢病毒(SAM)	用于过表达编码基因, 提供3个sgRNA靶点, 确保其中1个有效	1E+8TU (含等量对照)	22030	20
CAS9文库 ( KO )	高通量敲除基因的慢病毒文库	1E+7TU-5E+8TU	2800-72000	5-15
CAS9文库 ( SAM )	内源性高通量上调编码基因的慢病毒文库	1E+7TU/5E+8TU	2800-72000	5-15

**腺病毒****Adv-OE™用于上调基因的高纯度腺病毒**

产品名称	简介	产品规格	目录价格(元)	周期(工作日)
过表达腺病毒 ( 现货 )	用于过表达编码基因/IncRNA	2E+10PFU (含等量对照)	7880	30
过表达腺病毒	用于过表达编码基因/IncRNA	2E+10PFU (含等量对照)	20600	45
microRNA-up腺病毒	用于过表达miRNA	2E+10PFU (含等量对照)	13800	45

说明: 本表所列价格周期不包含模版获取、亚克隆, 突变, 缺失的部分。

**Adv-KD™用于下调基因的高纯度腺病毒**

产品名称	简介	产品规格	目录价格(元)	周期(工作日)
RNAi-定制-腺病毒	用于下调编码基因/IncRNA, 需提供靶点序列	2E+10PFU (含等量对照)	13800	45
RNAi-Eeasy-腺病毒	用于下调编码基因, 提供3个干扰靶点序列, 确保其中1个有效	2E+10PFU (含等量对照)	26800	45
microRNA-down腺病毒	用于下调miRNA	2E+10PFU (含等量对照)	13800	45

**腺相关病毒AAV****AAV-OE™用于上调基因的高纯度腺相关病毒**

产品名称	简介	产品规格	目录价格(元)	周期(工作日)
工具腺相关病毒 ( 现货 )	提供光遗传、化学遗传、钙指示剂、荧光示踪、重组酶等 108种现货工具AAV产品	1E+12v.g.-1E+13v.g	1400-9145	5-15
过表达腺相关病毒	用于过表达编码基因/IncRNA	1E+12v.g (含等量对照)	18500	25
microRNA-up腺相关病毒	用于过表达miRNA	1E+12v.g (含等量对照)	15860	25

说明: 本表所列价格周期不包含模版获取、亚克隆, 突变, 缺失的部分。

**AAV-KD™用于下调基因的高纯度腺相关病毒**

产品名称	简介	产品规格	目录价格(元)	周期(工作日)
RNAi-定制-腺相关病毒	用于下调编码基因/IncRNA, 需提供靶点序列	1E+12v.g (含等量对照)	15860	25
RNAi-外源筛选-腺相关病毒	用于下调编码基因, 预设计3个干扰靶点序列, 在293 细胞中筛选, 提供其中1个有效靶点	1E+12v.g (含等量对照)	25730	55
microRNA-down腺相关病毒	用于下调miRNA	1E+12v.g (含等量对照)	15860	25

**AAV-CRISPR™ 使用 CRISPR/CAS9 技术的高效腺相关病毒**

产品名称	简介	产品规格	目录价格(元)	周期(工作日)
CAS9-定制-腺相关病毒 ( KO )	用于敲除编码基因, 需提供靶点序列	1E+12v.g (含等量对照)	15860	25

**基因功能验证**  
**体外验证**

研究方向	简介	目录价格(元)	周期(工作日)
增值	MTT/MTS/CCK8	2450/板 (60孔内为一板)	10
	BrdU/EdU	BrdU: 330/孔; EdU: 510/孔	10
周期	流式细胞周期检测	410/孔	17
	流式细胞凋亡检测 (单/双染)	单染: 410/孔; 双染: 510/孔	10
凋亡	Tunel检测	510/孔	10
	Caspase 3/7检测	510/孔	10
克隆形成	平板克隆形成	410/孔	14
	软琼脂克隆形成	510/孔	22
转移	划痕	110/孔	10
	Transwell	410/孔	10
血管形成	Transwell (ECM)	850/孔	10
	EMT分子marker检测	预实验1125/抗体, 正式实验2250/板 (12孔内一板)	17
衰老	血管形成	850/孔	10
	衰老 (SA-b-gal染色)	330/孔	15
外泌体	Marker鉴定 (WB)	9150/板检测+3000/样抽提	12
	电镜鉴定	4500/样检测+1500/样抽提	15
自噬	内吞实验	2000/个样本	12
	激光共聚焦观察自噬流	预实验: 1250/株细胞, 正式实验510/孔	32
Cas9基因编辑细胞株	KO细胞株	95500/株	105
	KI细胞株	60600/株	90
药敏	药敏MTT/MTS/CCK8	2450/板 (60孔内为一板)	10

## 体内验证

研究方向	简介		目录价格(元)	周期(工作日)
裸鼠成瘤	皮下成瘤		1200/只	65
	肝原位模型		3500/只	105
	尾静脉转移模型		1800/只	85
	脾脏转移模型		2000/只	85
	药理药效模型		1400/只	65
基因编辑动物	基因敲入小鼠/大鼠 (KI)	全身性/条件型	9-11万	9-12个月
	定点突变小鼠/大鼠	全身型	8-10万	7-11个月
	基因敲除小鼠/大鼠 (KO)	全身性	4-6万	6-7个月
		条件型	9-12万	11-14个月
	饲养繁育		10-20元/笼/日	实际项目周期
	其他项目-小鼠/大鼠	复苏	5000-10000/例	3-4个月
		鉴定	100/只/次	实际项目周期

## MECHANISM RESEARCH

## 机制研究

研究方向	简介		目录价格(元)	周期(工作日)
间接机制	Patharray		25000~60000	35
	抗体芯片		4000/张	20
	iTRAQ/TMT、磷酸化iTRAQ/TMT或N-糖基化Label free		6500~15000/样本或标	40-50
直接机制	co-IP+质谱筛选		165000	155
	co-IP检测		10875	40

## RECOMMENDED VECTOR LIST

## 附录：吉凯推荐病毒载体列表

### 慢病毒常用载体列表

载体编号	元件顺序	原核抗性	真核抗性	荧光标记启动子	荧光标记	RNAi / 过表达启动子
过表达	GV365	Ubi-MCS-3FLAG-CMV-EGFP	Ampicillin	无	CMV	GFP
	GV320	Ubi-MCS-3FLAG-SV40-Cherry	Ampicillin	无	SV40	Cherry
	GV341	Ubi-MCS-3FLAG-SV40-puromycin	Ampicillin	Puromycin	无	Ubiquitin
	GV358	Ubi-MCS-3FLAG-SV40-EGFP-IRES-puromycin	Ampicillin	Puromycin	SV40	GFP
	GV492	Ubi-MCS-3FLAG-CBh-gcGFP-IRES-puromycin	Ampicillin	Puromycin	CBh	GFP

	载体编号	元件顺序	原核抗性	真核抗性	荧光标记启动子	荧光标记	RNAi / 过表达启动子
干扰	GV308	TetIIP-MCS-3FLAG-Ubi-TetR-IRES-Puromycin	Ampicillin	Puromycin	无	无	TetIIP
	GV112	hU6-MCS-CMV-Puromycin	Ampicillin	Puromycin	无	无	U6
	GV115	hU6-MCS-CMV-EGFP	Ampicillin	无	CMV	GFP	U6
	GV248	hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin	Ampicillin	Puromycin	Ubiquitin	GFP	U6
	GV298	U6-MCS-Ubiquitin-Cherry-IRES-puromycin	Ampicillin	Puromycin	Ubiquitin	Cherry	U6
干扰 Tet-on	GV493	hU6-MCS-CBh-gcGFP-IRES-puromycin	Ampicillin	Puromycin	CBh	GFP	U6
	GV307	TetIIP-TurboRFP-MCS(MIR30)-Ubi-TetR-IRES-Puromycin	Ampicillin	Puromycin	TetIIP	RFP	TetIIP
	GV369	Ubi-MCS-SV40-EGFP-IRES-puromycin	Ampicillin	Puromycin	SV40	GFP	Ubiquitin
	GV209	H1-MCS-CMV-EGFP	Ampicillin	无	CMV	GFP	H1
	GV309	hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin	Ampicillin	Puromycin	Ubiquitin	GFP	U6
micro RNA-up	GV280	hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin	Ampicillin	Puromycin	Ubiquitin	GFP	U6
	GV234	hU6-MCS-CMV-EGFP	Ampicillin	无	CMV	GFP	U6

### 腺病毒常用载体列表

	载体编号	元件顺序	原核抗性	真核抗性	荧光标记启动子	荧光标记	RNAi / 过表达启动子
过表达	GV345	CMV-MCS-3FLAG-SV40-Cherry	Ampicillin	无	SV40	Cherry	CMV
	GV314	CMV-MCS-3FLAG-SV40-EGFP	Ampicillin	无	SV40	GFP	CMV
干扰	GV119	hU6-MCS-CMV-EGFP	Ampicillin	无	CMV	GFP	U6
	GV202	hU6-MCS-CMV-EGFP	Ampicillin	无	CMV	GFP	U6
microRNA-up	GV317	CMV-MCS-SV40-EGFP	Ampicillin	无	SV40	GFP	CMV
	GV201	hU6-MCS-CMV-EGFP	Ampicillin	无	CMV	GFP	U6

### 腺相关病毒常用载体列表

	调控方式	载体编号	元件顺序	荧光	荧光是否融合表达
过表达	GV388	CMV bGlobin-MCS-EGFP-3FLAG-WPRE-hGH polyA	1200	EGFP	融合
	GV389	CMV bGlobin-MCS-mCherry-3FLAG-WPRE-hGH polyA	1200	mCherry	融合
	GV410	CMV bGlobin-MCS-3FLAG-T2A-EGFP	1100	EGFP	非融合
	GV411	CMV-betaGlobin-MCS-3Flag-SV40 PolyA	2800	无	无荧光
	GV461	CMV-betaGlobin-MCS-SV40 PolyA	2800	无	无荧光
	GV467	CMV-betaGlobin-MCS-EGFP-3Flag-SV40 PolyA	2000	EGFP	融合
	GV489	CMV bGlobin-EGFP-MCS-WPRE-hGH polyA	1200	EGFP	融合
	GV466	hSyn promoter-MCS-EGFP-3FLAG-SV40 PolyA	2100	EGFP	融合
	GV475	hSyn promoter-MCS-mcherry-3FLAG-SV40 PolyA	2100	mCherry	融合
干扰	GV488	gfaABC1D promoter-MCS-EGFP-WPRE-bGH PolyA	1500	EGFP	融合
	GV478	U6-MCS-CAG-EGFP		EGFP	非融合
	GV480	U6-MCS-CAG-mCherry		mCherry	非融合
	GV412	CMV bGlobin-EGFP-MCS-WPRE-hGH polyA		EGFP	非融合
microRNA-up	GV413	CMV bGlobin-mCherry-MCS-WPRE-hGH polyA		mCherry	非融合
	GV479	U6-MCS-CAG-EGFP		EGFP	非融合
	GV480	U6-MCS-CAG-mCherry		mCherry	非融合

# 06

致力转化医学 共创健康明天

## ABOUT GENECHEM 关于吉凯基因

- 企业简介
- 吉凯基因工程化服务平台
- 科研能力
- 科研合作成果

06

### ENTERPRISE INTRODUCTION 企业简介

吉凯基因成立于 2002 年,是一家以转化医学为核心模型的创新诊疗产品开发公司。

在国外,转化医学是创新药物形成的成熟模式,但在中国仍处于起步阶段。致力于与研究型医生共同解决中国特有、高发疾病的新药研发难题,开发属于中国人自己的创新药物,吉凯基因积极接轨国际成熟的创新药物形成模式,潜心深耕 17 年,目前已建成从基础研究到临床前研究再到临床研究的完整研究开发体系,形成独一无二的转化医学系统。

吉凯基因总部位于上海张江,目前在员工超过 500 人,其中 50% 以上具有硕士学位,10% 以上具有博士学位;拥有涵盖组学研究平台、载体制备平台、细胞与动物模型构建平台在内的全面基础科研平台以及 1500m<sup>2</sup> 的标准化 GMP 车间,可针对不同医生的临床科研需求展开合作,并协助研究型医生高效、高质的形成研究成果,目前已累计参与 10000 多篇 SCI 文章的基础科研工作,并申请专利 121 项,其中获得授权 62 项; PCT 专利申请 5 项,其中获得美国授权 2 项。

基于工程化、系统化、产业化的专家系统及技术平台,吉凯基因与全

国超过 90% 的研究型医院建立了良好的信任合作关系,累计助力研究型医生超过 30%,在合作中不断加深对疾病机制的深刻理解,并发现数百个在中国特有、高发肿瘤中发挥关键作用的候选靶标基因,建成吉凯独特的疾病关键基因数据库,形成吉凯基因丰富的临床资源。

临床资源是吉凯基因新药开发的基础,吉凯基因在中国开创性地应用从疾病标志物及靶标发现、靶点验证到药物开发,最终到临床试验的全链条新药开发流程,与研究型医生共同进行基因治疗、细胞治疗以及抗体药物新靶标的研发,并挖掘具有开发转化前景的项目,利用自身所具备的新药开发能力,进行新药研发以及后期的成果转化。其中, CD19-CART 在顶尖三甲医院进行的超过 30 例临床试验中获得极好的安全性及疗效,目前该项目已进入 IND 申报阶段,同时多个血液瘤和实体瘤项目也与临床医生共同推进至临床研究阶段。

“致力转化医学,共创健康明天”,吉凯基因将建立“以终为始”的基因诊疗品种创新创制平台,开发中国高发、少药和难诊疾病的先进诊疗产品,让患者因为吉凯的努力获得更高的五年生存率!



SCIENTIFIC RESEARCH  
PRODUCTS AND SERVICES

## 吉凯基因工程化服务平台

### 基因分型

基因组	转录组	蛋白质组
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Cancer panel</li> <li>■ Whole genome sequencing</li> <li>■ Whole exon sequencing</li> <li>■ MassARRAY</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Gene expression microarray</li> <li>■ miRNA microarray</li> <li>■ LncRNA microarray</li> <li>■ Single cell sequencing</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ SILAC</li> <li>■ iTRAQ</li> <li>■ WES</li> <li>■ Tissue Microarray</li> </ul>

### 生信分析

组学分析	IPA分析	跨组学联合分析
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Genomics</li> <li>■ Transcriptomics</li> <li>■ Proteomics</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Signal transduction</li> <li>■ Molecular interaction</li> <li>■ Network analysis</li> <li>■ Metabolism pathway</li> <li>■ Multiple network analysis</li> <li>■ Target prediction</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Genomics vs Transcriptomics</li> <li>■ Genomics vs Proteomics</li> <li>■ microRNA vs mRNA</li> </ul>

### 基因操作工具制备

基因敲除/敲入	基因过表达	基因沉默
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Lenti-Cas9-Custom™</li> <li>■ Lenti-Cas9-Easy™</li> <li>■ Lenti-Cas9-SAM™</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Lenti-cDNA™</li> <li>■ Lenti-miR-up™</li> <li>■ Adv-cDNA™</li> <li>■ Adv-miR-up™</li> <li>■ AAV-cDNA™</li> <li>■ AAV-miR-up™</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Lenti-shRNA™</li> <li>■ Lenti-miR-down™</li> <li>■ Adv-shRNA™</li> <li>■ Adv-miR-down™</li> <li>■ AAV-shRNA™</li> <li>■ AAV-miR-down™</li> </ul>

### 基因功能体外验证

细胞增殖能力检测	细胞转移/侵袭能力检测	细胞功能高通量筛选	分子机制分析
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ MTT/MTS/CCK8/Brdu/Edu</li> <li>■ Annexin V apoptosis detection</li> <li>■ Cell cycle analysis ( PI staining )</li> <li>■ Colony formation ( 2D/3D )</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Transwell Cell Migration</li> <li>■ Wound scratch</li> <li>■ EMT marker analysis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Cell proliferation</li> <li>■ Cell migration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Patharray</li> <li>■ Antibody microarrays</li> <li>■ Co-IP</li> <li>■ IPA Pathway Analysis</li> </ul>

### 动物模型

肿瘤模型	CRISPR/Cas9 转基因动物
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Subcutaneous</li> <li>■ Orthotopic</li> <li>■ Syngenic</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ KO mice</li> <li>■ Conditional KO mice</li> </ul>

### 科研能力

国内最大的慢病毒文库，  
包含**15万个**独立克隆。  
肿瘤候选靶标基因库。  
肿瘤模式细胞库，  
所有细胞均经过**STR分型**鉴定。  
吉凯关键基因数据库。



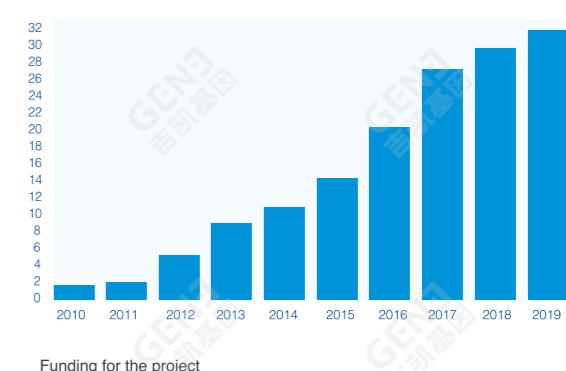
## 累积承担国家科技部、上海市科委、上海市经委支持的疾病诊疗基因靶标研究相关课题30余项

2007 国家863目标导向研究项目-脑胶质瘤增殖侵袭病理机制研究	2011 上海市生物医药产业化项目-治疗型抗体有效性筛选评价技术服务	2013 上海市智能制造及先进材料领域项目-转化医学研发智能分析与管理系统及服务应用	2015 上海市产学研医合作项目-髓系白血病CD123-CART细胞治疗成药性研究及cGMP生产技术标准的研究	2017 上海市生物医药科技支撑项目-全自动全封闭工程化细胞培养系统样机的研制	2019 浦东新区产学研专项-结直肠肿瘤粪便Biomarker筛选及早筛试剂盒的应用研发
2010 上海市生物医药产业化项目-肿瘤治疗药物基因靶标筛选和有效性评价技术服务	2012 国家“863计划”项目-小核酸技术的前沿研究	2014 上海市中小企业发展专项资金项目-用于肿瘤诊疗靶标发现的慢病毒产品的产业化技术改造	2016 国家重点研发计划重点专项-消化道肿瘤诊疗生物标志物验证及应用研究	2018 上海市生物医药科技支撑项目-人源化抗原受体T细胞疗法治疗B细胞淋巴瘤/白血病的研究	

## 销售网络覆盖



## 历年合作申请基金

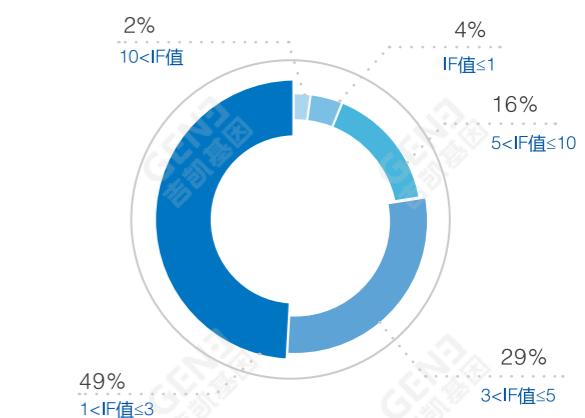


## 授权的发明专利

累计申请**138**项专利，获得授权**70**项  
PCT专利申请**7**项，获得美国授权**2**项  
75%为项目专利，25%为平台专利  
( 截止到 2019 年 12 月 )



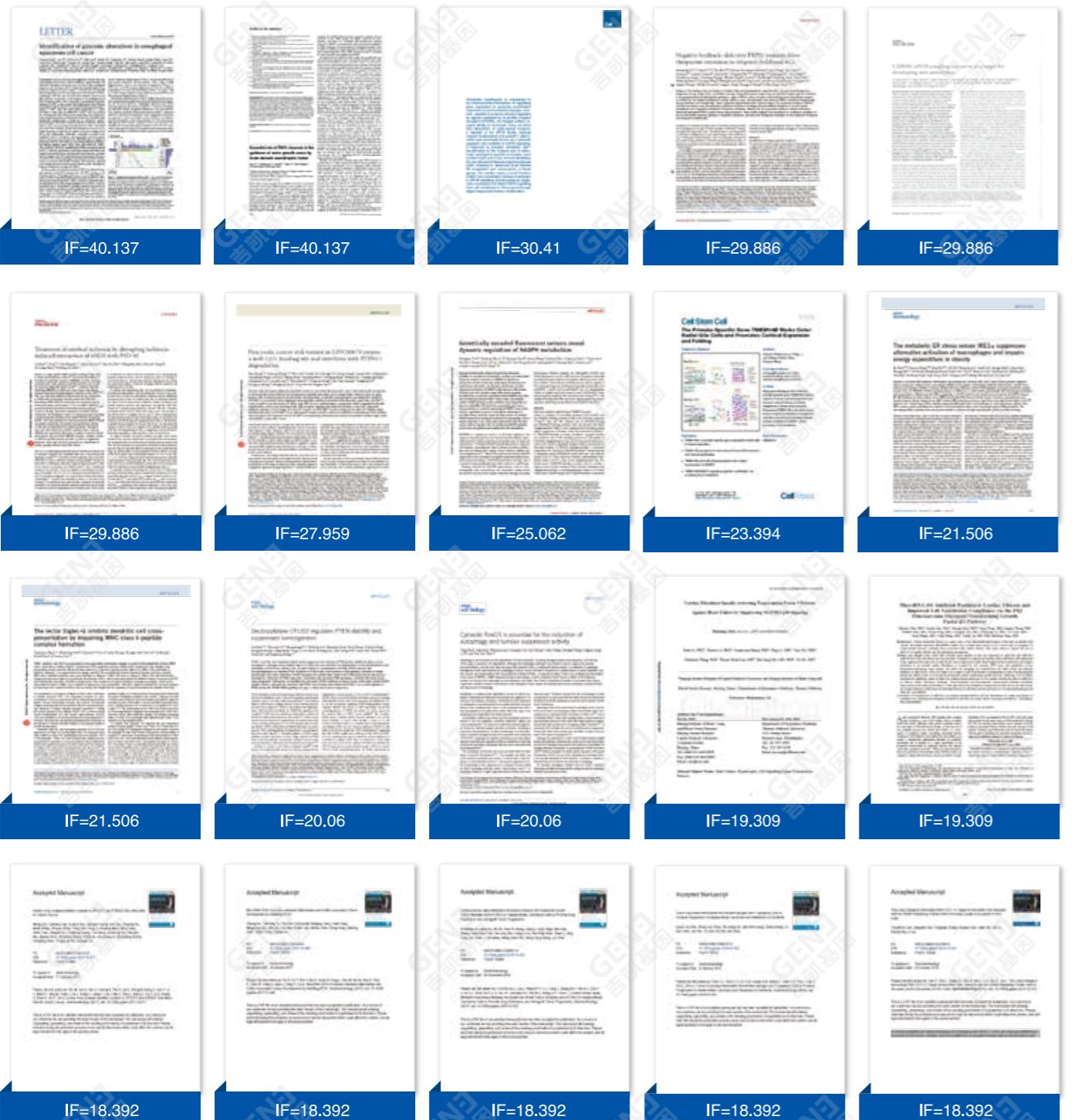
## 历年客户使用吉凯基因产品和服务发表文章统计



SCIENTIFIC RESEARCH COOPERATION  
ACHIEVEMENTS

## 科研合作成果

## 客户文章(部分)



## 合作单位(部分)

安徽省立医院  
安徽肿瘤医院  
安徽医科大学第二附属医院  
安徽医科大学第一附属医院  
白求恩国际和平医院  
蚌埠医学院第一附属医院  
包头医学院第二附属医院  
包头医学院第一附属医院  
北京大学第六医院  
北京大学第三医院  
北京大学第一医院  
北京大学口腔医院  
北京大学人民医院  
北京大学深圳医院  
北京大学肿瘤医院  
北京清华长庚医院  
北京协和医院  
北京医院  
北京中医药大学第三附属医院  
北京中医药大学东直门医院  
常州市第二人民医院  
常州市第一人民医院  
成都军区总医院  
成都中医药大学附属医院  
川北医学院附属医院  
大连医科大学附属第二医院  
大连医科大学附属第一医院  
第二军医大学附属东方肝胆外科医院  
第三军医大学大坪野战外科研究所  
第三军医大学第二附属医院  
第三军医大学第三附属医院  
第三军医大学第一附属医院  
第四军医大学口腔医院  
第四军医大学唐都医院  
第四军医大学西京医院  
东南大学附属中大医院  
东南大学医学院附属南京胸科医院  
佛山市第一人民医院  
福建省立医院  
福建省肿瘤医院  
福建医科大学附属第一医院  
福建医科大学附属省立医院  
福建医科大学附属协和医院  
复旦大学附属儿科医院  
复旦大学附属妇产科医院  
复旦大学附属华东医院  
复旦大学附属华山医院  
复旦大学附属金山医院  
复旦大学附属浦东医院  
复旦大学附属眼耳鼻喉科医院  
复旦大学附属中山医院  
复旦大学附属肿瘤医院  
甘肃省人民医院  
赣南医学院第一附属医院  
赣州市肿瘤医院  
广东省第二人民医院  
广东省中医院  
广东医科大学附属医院  
广西医科大学第四附属医院  
广西医科大学第一附属医院  
广西医科大学附属肿瘤医院  
广西中医药大学第一附属医院  
广西壮族自治区人民医院  
广州军区广州总医院  
广州市第一人民医院  
广州市红十字会医院  
广州医科大学附属第二医院  
广州医科大学附属肿瘤医院  
广州中医药大学第一附属医院  
贵州省人民医院  
贵州医科大学附属医院  
桂林医学院附属医院  
哈尔滨市第一医院  
哈尔滨医科大学附属第二医院  
哈尔滨医科大学附属第四医院  
哈尔滨医科大学附属第一医院  
哈尔滨医科大学附属肿瘤医院  
海口市人民医院

海南省农垦总局医院  
海南省人民医院  
海南医学院第一附属医院  
杭州市第三人民医院  
杭州市第一人民医院  
杭州市肿瘤医院  
河北医科大学第二医院  
河北医科大学第三医院  
河北医科大学第四医院  
河南省人民医院  
河南省肿瘤医院  
湖北省口腔医院  
湖南省儿童医院  
湖南省马王堆医院  
湖南省人民医院  
湖南省肿瘤医院  
湖南中医药大学第二附属医院  
华中科技大学同济医学院附属同济医院  
华中科技大学同济医学院附属协和医院  
淮安市第一人民医院  
吉林大学第二医院  
吉林大学第一医院  
吉林大学中日联谊医院  
济南军区总医院  
济南市第二人民医院  
济南市儿童医院  
济南市市中心医院  
江苏省口腔医院  
江苏省人民医院  
江苏省中医院  
江苏省肿瘤医院  
江西省人民医院  
江西省肿瘤医院  
解放军第150医院  
锦州医科大学附属第一医院  
九江市第一人民医院  
昆明医科大学第二附属医院  
昆明医科大学第一附属医院  
昆明医科大学附属口腔医院  
昆明医科大学附属延安医院  
兰州大学第二医院  
兰州大学第一医院  
兰州大学口腔医院  
兰州军区兰州总医院  
兰州市第二人民医院  
丽水市中心医院  
连云港市第一人民医院  
辽宁省肿瘤医院  
聊城市人民医院  
南昌大学第二附属医院  
南昌大学第一附属医院  
南方医科大学南方医院  
南方医科大学中西医结合医院  
南方医科大学珠江医院  
南华大学附属第一医院  
南华大学附属南华医院  
南京大学医学院附属鼓楼医院  
南京军区福州总医院  
南京市第一医院  
南京医科大学第二附属医院  
南京医科大学附属儿童医院  
南京医科大学附属江宁医院  
南通大学第三附属医院  
南通大学附属医院  
南通市附属肿瘤医院  
南通市第三人民医院  
内蒙古包钢医院  
内蒙古民族大学附属医院  
内蒙古医科大学附属医院  
内蒙古自治区人民医院  
宁波市第一医院  
宁波市医疗中心李惠利医院  
宁夏回族自治区人民医院  
宁夏医科大学总医院  
青岛大学附属医院  
青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院  
青岛市市立医院  
青海大学附属医院  
厦门大学附属第一医院

厦门大学附属中山医院  
山东大学第二医院  
山东大学附属千佛山医院  
山东大学附属山东省肿瘤医院  
山东大学附属生殖医院  
山东大学口腔医院  
山东大学齐鲁医院  
山东大学齐鲁医院青岛院区  
山东省立医院  
山东省皮肤病医院  
山东省医学科学院附属医院  
山西大医院  
山西省人民医院  
山西省肿瘤医院  
山西医科大学第二医院  
山西医科大学第一医院  
陕西省人民医院  
陕西中医药大学第二附属医院  
上海交通大学附属第六人民医院  
上海交通大学附属儿童医院  
上海交通大学医学院附属第九人民医院  
上海交通大学医学院附属仁济医院  
上海交通大学医学院附属瑞金医院  
上海交通大学医学院附属新华医院  
上海市第六人民医院东院  
上海市第七人民医院  
上海市第十人民医院  
上海市第五人民医院  
上海市第一人民医院  
上海市东方医院  
上海市肺科医院  
上海市静安区中心医院  
上海市普陀区中心医院  
上海市胸科医院  
上海长征医院  
上海中医药大学附属龙华医院  
上海中医药大学附属曙光医院  
上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院  
绍兴市人民医院  
深圳大学第一附属医院  
深圳市人民医院  
沈阳军区总医院  
石河子大学医学院第一附属医院  
首都医科大学附属北京安贞医院  
首都医科大学附属北京朝阳医院  
首都医科大学附属北京儿童医院  
首都医科大学附属北京妇产医院  
首都医科大学附属北京口腔医院  
兰州市第二人民医院  
兰州市第一人民医院  
丽水市中心医院  
连云港市第一人民医院  
辽宁省肿瘤医院  
聊城市人民医院  
南昌大学第二附属医院  
南昌大学第一附属医院  
南方医科大学南方医院  
南方医科大学中西医结合医院  
南方医科大学珠江医院  
南华大学附属第一医院  
南华大学附属南华医院  
南京大学医学院附属鼓楼医院  
南京军区福州总医院  
南京市第一医院  
南京医科大学第二附属医院  
南京医科大学附属儿童医院  
南京医科大学附属江宁医院  
南通大学第三附属医院  
南通大学附属医院  
南通市附属肿瘤医院  
南通市第三人民医院  
内蒙古包钢医院  
内蒙古民族大学附属医院  
内蒙古医科大学附属医院  
内蒙古自治区人民医院  
宁波市第一医院  
宁波市医疗中心李惠利医院  
宁夏回族自治区人民医院  
宁夏医科大学总医院  
青岛大学附属医院  
青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院  
青岛市市立医院  
青海大学附属医院  
厦门大学附属第一医院

温州医科大学附属眼视光医院  
无锡市第三人民医院  
无锡市第四人民医院  
无锡市人民医院  
武汉大学人民医院  
武汉大学中南医院  
武汉市第三医院  
武警医学院附属医院  
西安交通大学第二附属医院  
西安交通大学第一附属医院  
西安交通大学口腔医院  
西安市中心医院  
西安消化病医院  
西南医科大学附属口腔医院  
西南医科大学附属医院  
西南医科大学附属中医医院  
新疆维吾尔自治区中医医院  
新疆医科大学第二附属医院  
新疆医科大学第五附属医院  
新疆医科大学第一附属医院  
新疆医科大学附属肿瘤医院  
徐州市中心医院  
徐州医科大学附属医院  
烟台毓璜顶医院  
延边大学附属医院  
宜昌市中心人民医院  
右江民族医学院附属医院  
云南省第一人民医院  
云南省肿瘤医院  
浙江大学医学院附属第二医院  
浙江大学医学院附属第一医院  
浙江大学医学院附属儿童医院  
浙江大学医学院附属妇产科医院  
浙江大学医学院附属邵逸夫医院  
浙江省人民医院  
浙江省台州医院  
浙江省肿瘤医院  
浙江医院  
浙江中医药大学附属第二医院  
镇江市第一人民医院  
郑州大学第三附属医院  
郑州大学第一附属医院  
中国人民解放军第302医院  
中国人民解放军第307医院  
中国人民解放军海军总医院  
中国人民解放军空军总医院  
中国人民解放军陆军总医院  
中国人民解放军南京军区南京总医院  
中国人民解放军总医院(301医院)  
中国人民解放军总医院第一附属医院  
中国医科大学附属第四医院  
中国医科大学附属第一医院  
中国医科大学附属口腔医院  
中国医科大学附属盛京医院  
中国医学科学院阜外心血管病医院  
中国医学科学院皮肤病医院  
中国医学科学院血液病医院  
中国医学科学院肿瘤医院  
中国医学科学院广安门医院  
中国医学科学院西苑医院  
中南大学湘雅二医院  
中南大学湘雅三医院  
中南大学湘雅医院  
中日友好医院  
中山大学附属第二医院  
中山大学附属第六医院  
中山大学附属第三医院  
中山大学附属第五医院  
中山大学附属第一医院  
中山大学附属肿瘤医院  
中山大学光华口腔医学院附属口腔医院  
中山大学孙逸仙纪念医院  
中山市人民医院  
重庆市肿瘤医院  
重庆医科大学附属第二医院  
重庆医科大学附属第一医院  
重庆医科大学附属儿童医院  
遵义医学院附属医院

※ 按名称拼音首字母排序