

——您身边的病毒载体专家

## 腺相关病毒操作手册

☎ 021-51296258

☎ 400-092-0065



扫一扫

直接与汉恒技术工程师  
咨询详细服务内容

### 汉恒生物科技（上海）有限公司

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

# 目 录

- 01 一、AAV安全注意事项  
二、AAV储存和稀释注意事项
- 02 三、AAV介绍  
四、汉恒生物AAV产品服务及载体信息与现货列表
- 06 五、AAV整体实验流程  
六、实验材料
- 07 七、AAV载体构建  
八、AAV包装  
九、AAV收集和纯化
- 08 十、AAV滴度测定
- 09 十一、AAV感染细胞测试  
十二、AAV用于动物实验（重磅干货，五星推荐）
- 14 十三、AAV病毒的使用
- 15 附录1  
参考文献

## 一、AAV安全使用注意事项

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

## 二、AAV储存与稀释的注意事项

### + AAV的储存

收到病毒液后若在短期内使用，可将病毒放置于4℃保存（一周内使用完最佳）；如需长期保存请分装后放置于-80℃。

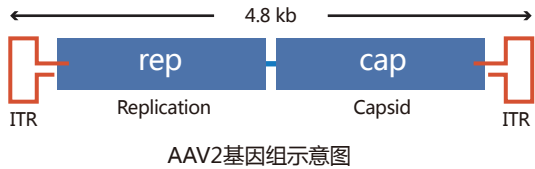
- 注：a. 反复冻融会降低病毒滴度（每次冻融病毒滴度会降低10%-50%），因此在病毒使用过程中应尽量避免反复冻融。汉恒生物已对病毒进行了分装（200 μl/tube），收到后请直接放置-80℃保存即可。
- b. 若病毒储存时间超过6个月，汉恒生物建议在使用前重新测定病毒滴度。

+ AAV的稀释

需要稀释病毒时，请将病毒取出置于冰浴融解后，使用培养目的细胞用无菌PBS或生理盐水混匀分装后置于4℃保存（一周内使用完最佳）。

三、AAV介绍

腺相关病毒（AAV）属微小病毒科（parvovirus），为无包膜的单链线状DNA病毒。只有在腺病毒或者疱疹病毒等辅助病毒协助下，宿主才能产生具有感染性的AAV，所以AAV被称作腺相关病毒。典型的AAV2基因组约 4800 bp，包括2个反向末端重复序列（ITR，145 bp）和两个读码框（ORF）-Rep和Cap（图1）。ITR对合成互补DNA链是必需的；Rep和Cap可以翻译成多种不同蛋白，如AAV生活周期必需的Rep78、Rep68、Rep52和Rep40以及包膜蛋白VP1、VP2及VP3等。AAV病毒系统就是用目的基因替换掉Rep和Cap，然后与表达Rep和Cap基因的质粒共转，从而产生包含目的基因的AAV。目前AAV有12种血清型、100多种变体。不同的血清型对组织或器官有着不同的亲和性。由于安全性高、免疫原性小、表达周期久等优点，AAV被称为目前最适合在体研究（in vivo）基因功能的利器。



四、汉恒生物AAV产品服务及载体信息与现货列表

+ 汉恒AAV产品分类

- 常规基因的过表达和干扰定制（载体列表见“七、载体构建”部分）；
- 组织特异性启动子过表达定制（载体列表见“七、载体构建”部分）；
- 常规启动子和组织特异性启动子驱动的AAV-Cas9定制；
- AAV介导的光遗传、化学遗传载体现货及改造服务等（见表3）；
- 双标、单标LC3自噬流监测工具（见表5）；
- 组织特异性AAV-DIO载体的定制（原理见附件1）。

+ 汉恒AAV产品特点

- 安全-AAV不参与任何疾病的发生，已经用于临床疾病的治疗；
- 高效-病毒滴度高达 $10^{13}$ 以上，组织感染能力超强；
- 表达周期久-AAV免疫原性超低，基因持续表达半年以上；
- 最全血清型-拥有全部血清型和一系列突变体亚型，几乎可以感染所有的组织和脏器；
- 组织特异性-拥有DIO元件载体系统和最全的组织特异性启动子工具箱，如心脏、肝脏、肌肉以及各种神经元特异的启动子等；
- 病毒产品全部经过无菌、无支原体、无内毒素检测，让实验安全放心。

+ 汉恒生物AAV主要载体及现货列表

1、汉恒生物AAV主要载体列表（表1）

（部分组织特异性启动子如心脏、肝脏、肌肉等没有在表中列出，欢迎咨询定制。）

载体类型	载体名称	可插入片段大小	启动子及其特点	标记基因	是否Cre依赖
	pHBAAV-CMV-MCS-T2A-ZsGreen	1.6 kb	CMV，广谱，强	ZsGreen	否
	pHBAAV-CMV-MCS-EF1-ZsGreen	1.2 kb	CMV，广谱，强	ZsGreen	否
	pHBAAV-CAG-MCS-T2A-ZsGreen	1.5 kb	CAG，广谱，强	ZsGreen	否
	pHBAAV-CAG-MCS-T2A-mcherry	1.5 kb	CAG，广谱，强	mcherry	否
	pHBAAV-CAG-DIO-MCS-T2A-ZsGreen	1.2 kb	CAG，广谱，强	ZsGreen	是
	pHBAAV-CAG-DIO-MCS-T2A-mCherry	1.2 kb	CAG，广谱，强	mcherry	是
过表达	pHBAAV-CAG-DIO-MCS-T2A-mCherry	1.2 kb	CAG，广谱，强	mcherry	是
	pHBAAV-hsyn-MCS-T2A-ZsGreen	1.6 kb	hSyn，成熟神经元，中强度	ZsGreen	否
	pHBAAV-hsyn-MCS-T2A-mCherry	1.6 kb	hSyn，成熟神经元，中强度	mcherry	否
	pHBAAV-CamkII-MCS-T2A-ZsGreen	1.6 kb	CamkII，兴奋性神经元特异启动子，强	ZsGreen	否
	pHBAAV-CamkII-MCS-T2A-mCherry	1.6 kb	CamkII，兴奋性神经元特异启动子，强	mcherry	否
	pHBAAV-GFAP-T2A-EGFP	1.6 kb	GFAP，星形胶质细胞，中强度	EGFP	否
干扰	pHBAAV-U6-MCS-CMV-ZsGreen	shRNA	U6	ZsGreen	否
	pHBAAV-U6-CMV-mCherry	shRNA	U6	mcherry	否
circRNA过表达	pHBAAV-CMV-crRNA-EF1-ZsGreen	1.2 kb	CMV，广谱，强	ZsGreen	否
在体敲除	pHBAAV-gRNA-saCas9	gRNA	U6	无	否

2、汉恒生物AAV光遗传学工具现货列表（表2）

载体类型	载体名称	启动子及其特点	标记基因	是否Cre依赖
抑制	pHBAAV-CAG-DIO-eNpHR3.0-EYFP		EYFP	是
激活	pHBAAV-CAG-DIO-hChR2(H134R)-mcherry		mcherry	是
抑制	pHBAAV-CAG-DIO-ArchT-EYFP	CAG（人巨细胞病毒启动子CMV和鸡beta-actin嵌合型启动子），广谱，强	EYFP	是
红光激活	pHBAAV-CAG-DIO-C1V1 (t/t)-TS-mcherry		mcherry	是
抑制	pHBAAV-CAG-DIO-Arch3.0-EYFP		EYFP	是
激活	pHBAAV-CAG-DIO-hCHETA-EYFP		EYFP	是
抑制	pHBAAV-CMV-DIO-eNpHR3.0-EYFP		EYFP	是
激活	pHBAAV-CMV-DIO-hChR2(H134R)-mcherry		mcherry	是
抑制	pHBAAV-CMV-DIO-ArchT-EYFP	CMV（人巨细胞病毒启动子），广谱，强	EYFP	是
红光激活	pHBAAV-CMV-DIO-C1V1 (t/t)-TS-mcherry		mcherry	是
抑制	pHBAAV-CMV-DIO-Arch3.0-EYFP		EYFP	是
激活	pHBAAV-CMV-DIO-hCHETA-EYFP		EYFP	是
抑制	pHBAAV-hSyn-eNpHR3.0-EYFP		EYFP	否
激活	pHBAAV-hSyn-hChR2(H134R)-mcherry		mcherry	否
抑制	pHBAAV-hSyn-ArchT-EYFP	hSyn（人源成熟神经元特异启动子），中强度	EYFP	否
红光激活	pHBAAV-hSyn-C1V1-(t/t)-TS-mcherry		mcherry	否
抑制	pHBAAV-hSyn-Arch3.0-EYFP		EYFP	否
激活	pHBAAV-hSyn-DIO-hCHETA-EYFP		EYFP	否
抑制	pHBAAV-GFAP-eNpHR3.0-EYFP		EYFP	否
激活	pHBAAV-GFAP-hChR2(H134R)-mcherry		mcherry	否
抑制	pHBAAV-GFAP-ArchT-EYFP	GFAP（星形胶质细胞特异启动子），中强度	EYFP	否
红光激活	pHBAAV-GFAP-C1V1 (t/t)-TS-mcherry		mcherry	否
抑制	pHBAAV-GFAP-Arch3.0-EYFP		EYFP	否
激活	pHBAAV-GFAP-hCHETA-EYFP		EYFP	否
抑制	pHBAAV-CaMKII-eNpHR3.0-EYFP		EYFP	否
激活	pHBAAV-CaMKII-hChR2(H134R)-mcherry		mcherry	否
抑制	pHBAAV-CaMKII-ArchT-EYFP	CaMKII（兴奋性神经元神经特异启动子），强	EYFP	否
红光激活	pHBAAV-CaMKII-C1V1 (t/t)-TS-mcherry		mcherry	否
抑制	pHBAAV-CaMKII-Arch3.0-EYFP		EYFP	否
激活	pHBAAV-CaMKII-hCHETA-EYFP		EYFP	否

3、汉恒生物AAV化学遗传学工具现货列表（表3）

载体类型	载体名称	启动子及其特点	标记基因	是否Cre依赖
	pHBAAV-CAG-DIO-DTR-2A-GFP	CAG（CMV和鸡beta-actin嵌合型启动子），广谱，强	GFP	是
白喉毒素介导的细胞毒性	pHBAAV-hSyn-DTR-2A-GFP	hSyn（人源成熟神经元特异启动子），中强度	GFP	否
	pHBAAV-CaMKII-DTR-2A-GFP	CaMKII（兴奋性神经元神经特异启动子），强	GFP	否
Gq-DREADD	pHBAAV-CAG-DIO-hM3D(Gq)-mCherry	CAG（CMV和鸡beta-actin嵌合型启动子），广谱，强	mCherry	是
Gi-DREADD	pHBAAV-CAG-DIO-hM4D(Gi)-mCherry	CAG（CMV和鸡beta-actin嵌合型启动子），广谱，强	mCherry	是
Gq-DREADD	pHBAAV-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry	hSyn（人源成熟神经元特异启动子），中强度	mCherry	是
Gi-DREADD	pHBAAV-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry	hSyn（人源成熟神经元特异启动子），中强度	mCherry	是
Gq-DREADD	pHBAAV-hSyn-hM3D(Gq)-mCherry	hSyn（人源成熟神经元特异启动子），中强度	mCherry	否
Gi-DREADD	pHBAAV-hSyn-hM4D(Gi)-mCherry	hSyn（人源成熟神经元特异启动子），中强度	mCherry	否
Gq-DREADD	pHBAAV-CaMKII-hM3D(Gq)-mCherry	CaMKII（兴奋性神经元神经特异启动子），强	mCherry	否
Gi-DREADD	pHBAAV-CaMKII-hM4D(Gi)-mCherry	CaMKII（兴奋性神经元神经特异启动子），强	mCherry	否

4、汉恒生物AAV-retro神经逆行示踪工具现货列表（表4）

载体类型	载体名称	启动子及其特点	标记基因	功能说明
神经逆行标记	AAV2/retro-EGFP	CAG，广谱	EGFP	表达EGFP
神经逆行标记	AAV2/retro-CAG-cre	CAG，广谱	无	表达cre重组酶
神经逆行标记	AAV2/retro-DIO-EGFP	CAG，广谱	EGFP	cre依赖表达EGFP
神经逆行标记	AAV2/retro-DIO-tdtomato	CAG，广谱	tdtomato	cre依赖表达tdtomato
神经逆行标记	AAV2/retro-EF1a-DIO-Flp	EF1a，广谱	无	cre依赖表达Flp重组酶

5、汉恒生物AAV-mRFP-GFP-LC3自噬流监测工具（表5）

载体类型	载体名称	启动子及其特点	标记基因	是否Cre依赖
双标	pHBAAV-mRFP-GFP-LC3	CMV，广谱，强	mRFP/GFP	否
单标	pHBAAV-GFP-LC3	CMV，广谱，强	GFP	否

## 五、整体实验流程（图2）

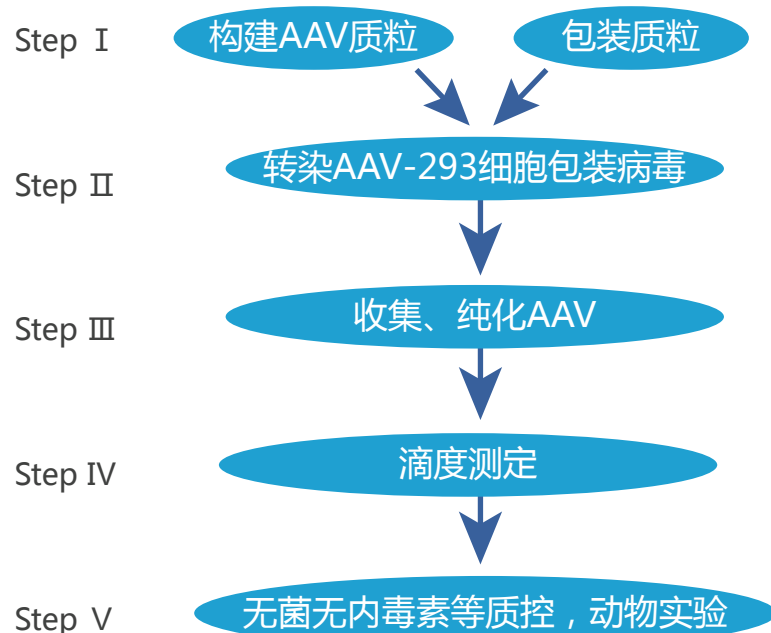


图2、AAV包装实验流程图

## 六、实验材料

AAV系统包括目的基因表达质粒（过表达、干扰等）pHBAAV-xxx（表1~5）、包装载体pAAV-RC和pHelper。

- pHBAAV-xxx载体信息请参考表1~5。
- 菌株：大肠杆菌菌株Stbl3。用于扩增pHBAAV-xxx及其包装质粒。
- 细胞株：AAV-293，AAV病毒的包装细胞，生长培养基为DMEM+10% FBS+双抗（完全培养基）。为了保证实验的稳定性和持续性，在AAV-293细胞对数生长期尽量多冻存一些细胞作为备份，增加细胞复苏成活率。

注：为了达到最好的细胞培养状态，推荐使用汉恒生物推出的SaveIt™抗支原体试剂（货号：HB-SV-1/2/3/5/10）。

## 七、AAV载体构建

AAV包装之前需要构建表达目的基因的载体pHBAAV-xxx。汉恒生物提供表1所示的载体骨架，可以自由选择启动子（包括组织特异性启动子定制）、荧光标记、是否需要Cre依赖等特点进行定制。同时汉恒生物也拥有大量的AAV通用载体现货，比如光遗传、化学遗传、自噬流监测等。质粒构建完成后需要转化后再使用去内毒素质粒试剂盒（比如Qiagen、MN等）抽提，浓度要求大于1 μg/μl，A260/280在1.7~1.8范围内方可用于下一步的病毒包装。

注：为了快速高效构建载体，强烈推荐使用汉恒生物推出的HB-Infusion™无缝克隆载体构建试剂盒（货号：HB-infusion-20/50/100）。

## 八、AAV病毒包装

事先准备好用于包装病毒的AAV-293细胞（50-70%的汇合度，无支原体污染）和病毒质粒，转染一个10 cm培养皿成分如下（表6）：

pAAV-RC	10 μg
pHelper	20 μg
pHBAAV-xxx	10 μg
LipoFiter™	100 μl

表6、AAV包装过程中转染一个标准10 cm dish所需要质粒和转染试剂组分表。

DMEM需在37℃水浴中预热，LipoFiter™转染试剂需恢复至室温方可使用，使用前需摇匀。转染后6 h换新鲜培养液。

- 注：a、LipoFiter™转染试剂为汉恒生物产品，使用说明参考LipoFiter™说明书（货号：HB-TRLF-1/2/3/10）。  
b、转染前细胞必须处于良好的生长状态。  
c、病毒实验带有一定的危险性，为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套，在生物安全柜（BL-2）里进行实验操作。

## 九、AAV收集和纯化

转染后72 h，收集所有的细胞用液氮反复冻融三次收集上清液，然后使用Benonase 酶消化，所得上清用Biomiga品牌纯化柱纯化，所得病毒分装后于-80℃保存。



## 十、AAV滴度测定

标准品和待测样品的Ct值如下 (表7)

样品名称	CT值1	CT值2	CT值3
10 <sup>10</sup> 标准品	4.51	4.32	4.42
10 <sup>9</sup> 标准品	7.21	7.61	7.25
10 <sup>8</sup> 标准品	10.97	10.55	10.67
10 <sup>7</sup> 标准品	14.19	14.38	14.35
10 <sup>6</sup> 标准品	17.75	17.58	17.68
待测AAV样品	12.78	12.65	12.81

表7、一次典型绝对定量过程中标准品和待测样品的CT值。

以每组AAV标准品的Ct (average)为纵坐标Y, 其对应拷贝数的对数为横坐标X, 绘制标准曲线如下 (图3) :

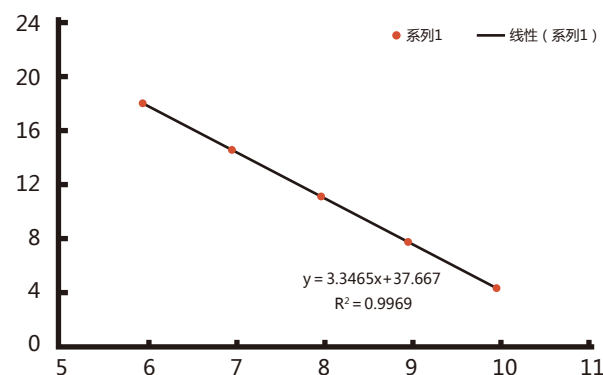


图3、绝对定量中的标准曲线。

把待测样品的Ct平均值带入公式, 得到X=7.45。代入AAV病毒滴度公式:  $10^X \times 40000$  v.g./ml =  $10^{7.45} \times 40000 = 1.1 \times 10^{12}$  v.g./ml.

## 十一、AAV感染细胞测试

病毒滴度测定完成之后还不能贸然进行动物实验。汉恒生物需要确认纯化的病毒是否有细菌、真菌、支原体和衣原体等污染, 以及是否符合内毒素指标。除此之外, 汉恒生物还需要确认得到的病毒是否具有活性。通常会用纯化之后的AAV感染293T、CHO等细胞系测试一下基因表达情况, 通常MOI控制在10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup>之间 (MOI是感染复数, 即每个细胞对应的病毒粒子数目)。如荧光蛋白表达情况等。最终会得到具有感染活力、无菌、无支原体衣原体、去除内毒素的AAV病毒, 可以直接用于下一步的动物实验。

注: AAV对细胞系的感染能力很弱, 一般不推荐用于体外实验。

## 十二、AAV用于动物实验

纯化后的AAV通过细胞感染测试之后方可用于动物试验。对于常规的组织或器官, 如心脏、肝脏、肺、肾脏、乳腺、胰腺、卵巢、脑、眼睛、骨骼肌、肠道、血管、脂肪组织等, 汉恒生物系统整理了小鼠和大鼠各组织脏器病毒感染对应的最优AAV亚型、注射方法以及剂量等关键信息, 另外汉恒生物也整理了常见组织脏器AAV注射的操作视频 (限于篇幅没有一一附上), 欢迎大家下方扫描二维码联系客服, 咨询索取参阅。



汉恒生物官方营销账号二维码

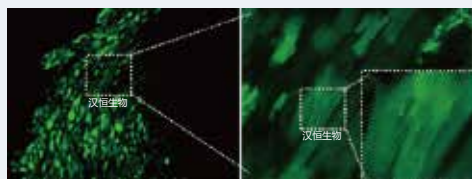
AAV注射感染组织器官至少3周后可取材进行冰冻切片直接观察荧光 (如GFP, RFP等)、石蜡切片 (可以组化染色)、荧光定量PCR (qPCR), 甚至免疫印迹 (WB) 来检测基因表达情况。 (一般情况下, 对于心肌、骨骼肌、肝脏、肾脏、皮肤等适合原位注射的组织器官, 注射感染适量带有GFP标记的AAV (3-4周后用肉眼即可观察到))。

汉恒生物制作了常用组织器官的感染条件和效果图谱 (图4-图15) 供大家参阅:

## 效果图谱

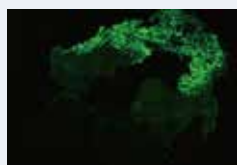
### 汉恒生物-AAV in vivo

#### 实例-心肌的基因转导



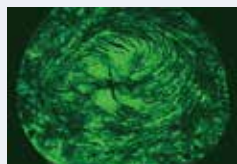
汉恒实验室自验证！

**病毒类型及滴度：**AAV-GFP，9型，滴度 $1 \times 10^{12}$  vg/ml  
**感染动物：**大鼠，SD，2月龄  
**感染部位：**心脏  
**注射方式和体积：**心肌原位注射；10  $\mu$ l /点，注射5个点  
**检测方法：**感染3wk后冰冻切片，荧光显微镜检测



汉恒实验室自验证！

**病毒类型及滴度：**AAV-GFP，9型，滴度 $1 \times 10^{12}$  vg/ml  
**感染动物：**大鼠，SD，2月龄  
**感染部位：**心脏  
**注射方式和体积：**心肌原位注射；10  $\mu$ l /点，注射5个点  
**检测方法：**感染3周后冰冻切片，荧光显微镜检测

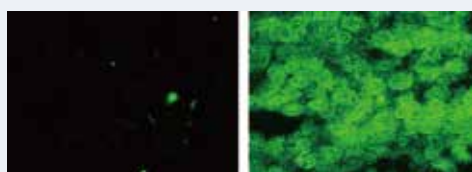


武汉大学人民医院

**病毒类型及滴度：**AAV-GFP，9型，滴度 $1 \times 10^{12}$  vg/ml  
**感染动物：**小鼠，C57，8周龄  
**感染部位：**心脏  
**注射方式和体积：**眼眶静脉注射；50  $\mu$ l  
**检测方法：**感染3周后冰冻切片，荧光显微镜检测

(图4)

#### 实例-肾脏原位注射



AAV-DJ

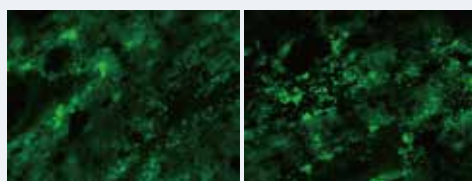
AAV-9

第四军医大学

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

(图5)

#### 实例-高效的肺组织基因转导



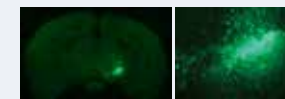
汉恒实验室自验证！

**病毒类型及滴度：**AAV-GFP，6型，滴度 $1 \times 10^{12}$  vg/ml  
**感染动物：**大鼠，SD，2月龄  
**感染部位：**肺脏  
**注射方式和体积：**气管注射；100  $\mu$ l  
**检测方法：**感染3周后冰冻切片，荧光显微镜检测

(图6)

#### 实例-神经逆行示踪基因转导

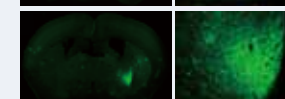
**注射部位**  
**SNc (黑质致密部)**



**逆行标记部位**  
**MGP (内侧苍白球)**



**逆行标记部位**  
**LGP (外侧苍白球)**



**逆行标记部位**  
**PFC (前额叶皮层)**

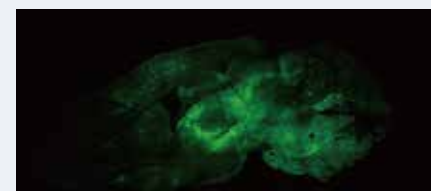


汉恒实验室自验证

**病毒：**汉恒生物逆行标记病毒AAV2/retro-EGFP  
**滴度：** $1.3 \times 10^{12}$  vg/ml  
**注射量：**1  $\mu$ l  
**注射部位：**SNc (黑质致密部)  
**检测：**注射感染3周，取材切片，confocal检测拍照

(图7)

#### 实例-穿血脑屏障-感染全脑

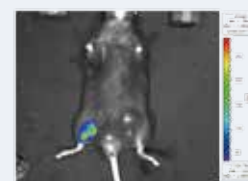


汉恒实验室自验证

**病毒：**汉恒生物穿血脑屏障AAV2/BBB-GFP  
**滴度：** $1.4 \times 10^{12}$  vg/ml  
**注射量：**100  $\mu$ l  
**注射部位：**尾静脉  
**检测方法：**注射感染3周，取材冰冻切片，confocal检测拍照

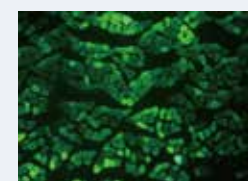
(图8)

#### 实例-在体感染小鼠肌肉组织



中科院上海生科院丁秋蓉组

**病毒类型及滴度：**AAV-Luc，9型，滴度 $1 \times 10^{12}$  vg/ml  
**感染动物：**小鼠，C57，8周龄  
**感染部位：**骨骼肌  
**注射方式和体积：**骨骼肌原位多点注射；10  $\mu$ l /点，4个点  
**检测方法：**感染4周，活体成像



汉恒实验室自验证

**病毒类型及滴度：**AAV-GFP，9型，滴度 $1 \times 10^{12}$  vg/ml  
**感染动物：**小鼠，C57，8周龄  
**感染部位：**骨骼肌  
**注射方式和体积：**骨骼肌原位多点注射；10  $\mu$ l /点，4个点  
**检测方法：**感染4周，冰冻切片，荧光显微镜检测

(图9)

## 实例-高效的肝脏基因转导

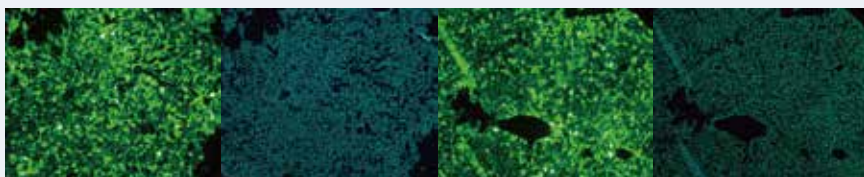
病毒类型及滴度：AAV-GFP，9型，滴度 $1 \times 10^{12}$  vg/ml

感染动物：小鼠，C57，8周龄

感染部位：肝脏

注射方式和体积：尾静脉，100  $\mu$ l

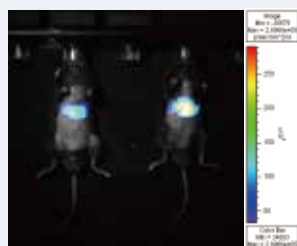
检测方法：感染3周后冰冻切片，荧光显微镜检测



汉恒实验室自验证！

(图10)

## 肝脏特异性AAV ( AAV-pTBG-Luc ) 体内感染效果



汉恒实验室自验证

病毒：AAV-pTBG-Luc，滴度 $1.4 \times 10^{12}$  vg/ml

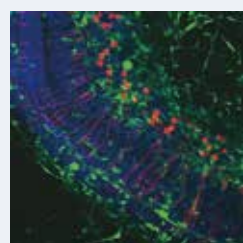
感染方式：尾静脉，100  $\mu$ l

检测方式：感染3周，小动物活体成像

结论：AAV-pTBG-Luc尾静脉注射可高效感染体内肝脏，无非特异脏器感染；

(图11)

## 实例-耳蜗组织（离体组织培养，离体感染）



汉恒某客户（按要求匿名）

病毒类型及滴度：AAV-DJ，滴度 $1 \times 10^{12}$  vg/ml

感染对象：新生4天的大鼠耳蜗

感染部位：离体耳蜗组织

注射方式和体积：200  $\mu$ l病毒直接感染

检测方法：感染48h染色观察-绿色是病毒感染表达的GFP，红色荧光是nf200染色，蓝色荧光是hechst33342标记细胞核

(图12)

## 实例- 眼科学专用AAV视网膜基因转导

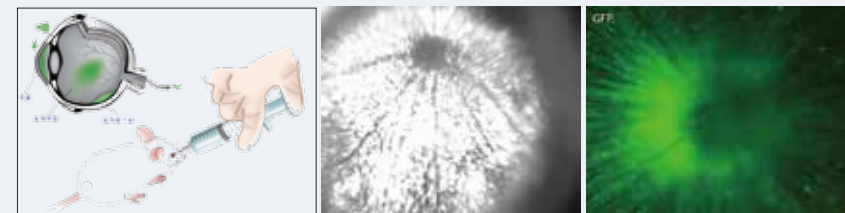
病毒类型及滴度：AAV-GFP，2型，滴度 $1 \times 10^{12}$  vg/ml

感染动物：小鼠，C57，8周龄

感染部位：视网膜

注射方式和体积：玻璃体腔注射；3  $\mu$ l

检测方法：感染3周，wholemount，荧光显微镜检测



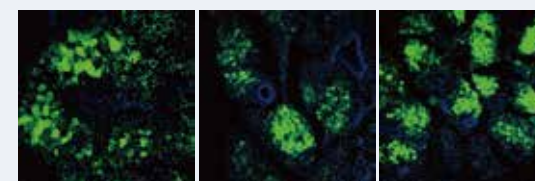
注射示意图

中科院上海生科院张翼凤组

江苏省人民医院

(图13)

## 实例-乳腺原位注射



汉恒某客户（按要求匿名）

病毒类型及滴度：AAV-GFP，9型，滴度 $1 \times 10^{12}$  vg/ml

感染动物：小鼠，C57，8周龄

感染部位：乳腺脂肪垫

注射方式和体积：乳腺内多点注射；10  $\mu$ l /点，4个点

检测方法：感染4周，冰冻切片，荧光显微镜检测

(图14)

## 实例-脑区基因转导

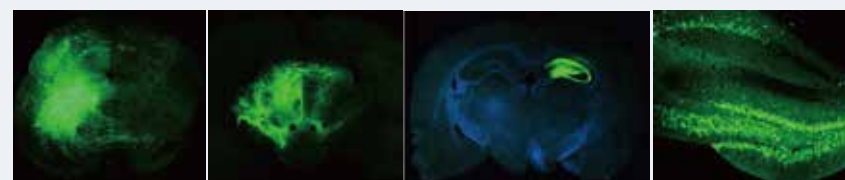
病毒类型及滴度：AAV-GFP，9型，滴度 $1 \times 10^{12}$  vg/ml

感染动物：小鼠，C57，8周龄

感染部位：见图

注射方式和体积：脑定位注射；1  $\mu$ l

检测方法：感染3周后冰冻切片，荧光显微镜检测



脑干

中脑

海马

海马(局部放大)

汉恒实验室自验证！

(图15)



### 十三、AAV病毒的使用

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

汉恒生物多种不同血清型对各组织器官细胞亲和性列表（表8）

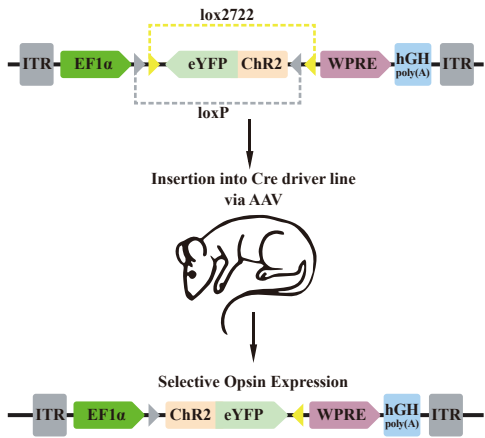
组织亲和性	推荐血清型
肝脏	AAV8、AAV9
心脏	AAV9
肺	AAV6
肌肉	AAV9
脑组织	AAV2、AAV9
眼部—视网膜	AAV2、AAV-DJ
眼部—角膜	Anc80L65
内耳	AAV-Anc
脂肪	AAV9
胰腺	AAV8
穿血脑屏障感染脑组织	AAV-BBB
逆行示踪	AAV-retro

汉恒生物不同动物及不同组织部位AAV注射器材、体积和病毒量列表（表9）

感染部位	动物	注射方式	推荐注射体积（μl）	备注
脑室	大鼠 小鼠	立体定位注射	1-5	10μl Hamilton微量注射器，30-33G针头
心脏	大鼠 小鼠	原位多点注射 尾静脉注射	10-15/点，3-5个点 100-250	50μl Hamilton微量注射器，针头>29G 1 ml BD无菌胰岛素针，针头>27G
肝脏	大鼠 小鼠	尾静脉注射	100-200	1 ml BD无菌胰岛素针，针头>27G
肺脏	大鼠 小鼠	气管切开注射	50-100	1 ml BD无菌胰岛素针，针头>27G
肾脏	大鼠 小鼠	原位多点注射	10-15/点，3-5个点	50μl Hamilton微量注射器，针头>29G
骨骼肌	大鼠 小鼠	原位多点注射	10-15/点，3-5个点	50μl Hamilton微量注射器，针头>29G
肠道	大鼠 小鼠	肠系膜上动脉注射	100-200	1 ml BD无菌胰岛素针，针头>27G
腹部脂肪	大鼠 小鼠	腹内脂肪-腹腔注射 皮下脂肪-原位注射	100-300	1 ml BD无菌胰岛素针，针头>27G 50μl Hamilton微量注射器，针头>29G
胰腺	大鼠 小鼠	胰腺导管注射	150	1 ml BD无菌胰岛素针，针头>27G
尾静脉	大鼠 小鼠	血管内注射	每点10-15 μl	1 ml BD无菌胰岛素针，针头>27G
眼睛	大鼠 小鼠	玻璃体腔注射 视网膜下腔注射	1-5	10μl Hamilton微量注射器，30-33G针头

### 附件1-DIO原理

DIO全称是Double-floxed Inverted Orientation，是依赖于Cre-LoxP重组原理设计的组织特异性基因表达系统。原理如下图所示：



目的基因两侧分别带有两对正交的LoxP位点（如图中灰色的LoxP和黄色的lox2722）。在Cre工具鼠体内，比如肝脏特异性的Cre小鼠，感染到肝脏的目的基因在Cre重组酶表达的情况下，目的基因的表达框（图中eYFP和ChR2）会颠倒（inverted）一次，从而使目的基因和上游启动子的方向一致，确保基因正确表达翻译蛋白。在肝脏以外的组织，由于缺乏Cre表达，目的基因不会逆转，所以不会成功地翻译出蛋白。因此，DIO系统可以保证目的基因的表达依赖于Cre重组酶的表达，从而实现了基因表达的组织特异性。

### 参考文献

1. Feng D, Wang B, Wang L et al. Pre-ischemia melatonin treatment alleviated acute neuronal injury after ischemic stroke by inhibiting ER stress-dependent autophagy via PERK and IRE1 signalings. J Pineal Res 2017. (客户文章: 自噬双标 AAV-GFP-RFP-LC3感染小鼠皮质监测自噬流)

2. Landegger, L. D., et al. (2017). "A synthetic AAV vector enables safe and efficient gene transfer to the mammalian inner ear." Nature Biotechnology.(改造的AAV亚型高效感染小鼠内耳细胞治疗耳聋)

3. Chen, M., et al. (2017). "Efficient Gene Delivery and Expression in Pancreas and Pancreatic Tumors by Capsid-Optimized AAV8 Vectors." Hum Gene Ther Methods 28(1): 49-59. (优化AAV8亚型高效感染小鼠胰腺和胰腺肿瘤)

4. Yang H, Yang J, Xi W et al. Laterodorsal tegmentum interneuron subtypes oppositely regulate olfactory cue-induced innate fear. Nat Neurosci 2016; 19:283-289. (汉恒客户：AAV9感染小鼠大脑)

5. Wu X, Wu X, Ma Y et al. CUG-binding protein 1 regulates HSC activation and liver fibrogenesis. Nat Commun 2016; 7:13498. (客户文章: AAV8介导肝脏特异性启动子在小鼠肝脏中特异性表达目的基因)

6. Wei, Y., et al. (2016). "Prevention of Muscle Wasting by CRISPR/Cas9-mediated Disruption of Myostatin In Vivo." Molecular Therapy 24(11): 1889-1891. (汉恒合作发表论文：AAV-saCas9编辑肌肉细胞)

7. Deverman, B. E., et al. (2016). "Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain." Nature Biotechnology 34(2): 204-209. (尾静脉注射AAV突变亚型可以直接透过小鼠血脑屏障感染大脑)

8. Yang, Y., et al. (2016). "A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice." Nature Biotechnology 34(3): 334-338. (AAV8介导CRISPR-Cas9矫正小鼠肝脏基因)

9. Lei S, Sun R-z, Wang D et al. Increased Hepatic Fatty Acids Uptake and Oxidation by LRPPRC-Driven Oxidative Phosphorylation Reduces Blood Lipid Levels. Frontiers in Physiology 2016; 7.(客户文章: AAV-8感染小鼠肝脏)

10. Bennett, J., et al. (2016). "Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial." Lancet 388(10045): 661-672. (临床试验：AAV2治疗遗传性视网膜病变)

11. Zhang X, Yuan Y, Jiang L et al. Endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin and thapsigargin protects against transient ischemic brain injury: Involvement of PARK2-dependent mitophagy. Autophagy 2014; 10:1801-1813. (客户文章：感染小鼠原代神经元)

12. Mingozzi, F. and K. A. High (2011). "Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges." Nature Reviews Genetics 12(5): 341-355. (综述：AAV用于在体治疗遗传性疾病)

13. Zincarelli, C., et al. (2008). "Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection." Molecular Therapy 16(6): 1073-1080. (系统研究AAV1-9不同血清型在小鼠不同组织的偏好性及其基因表达动力学差异)