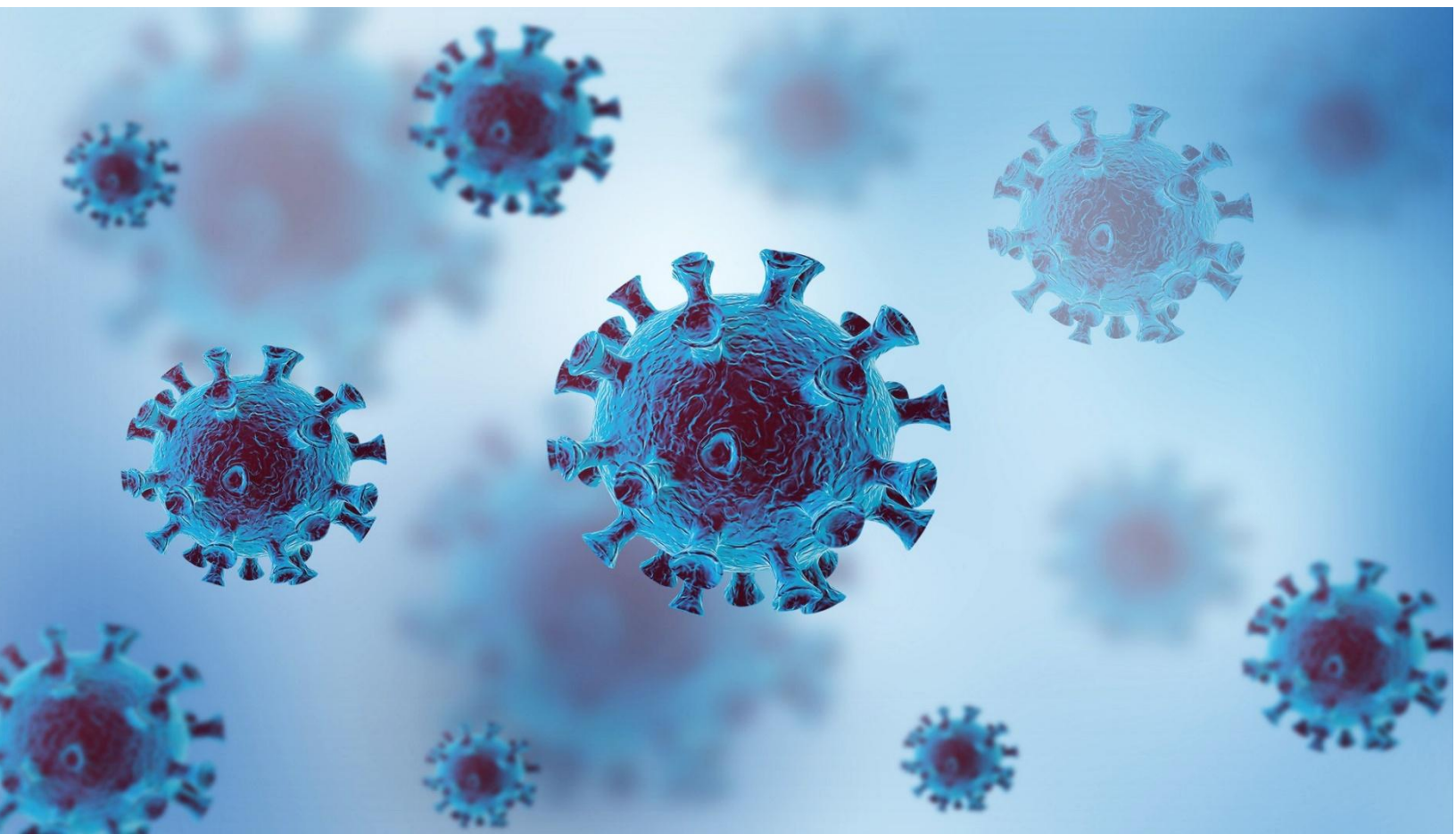


赛恩宝生物腺病毒（Adenovirus）

系统产品手册



• 分子克隆 • 腺病毒 • 腺相关病毒 • 慢病毒 • 细胞系建立 • 筛选检测

目 录

产品有限责任担保.....	1
产品订购和技术支持	错误!未定义书签。
产品储存.....	1
一、产品介绍.....	2
二、操作步骤.....	4
(一) 腺病毒安全操作规范.....	4
(二) 腺病毒感染目的细胞预实验.....	4
(三) Quantitative-PCR腺病毒滴度测定	6
(四) 腺病毒感染目的细胞.....	8
三、附录.....	10
附录1. 常见问题解答.....	10
附录2. 赛恩宝生物腺病毒感染HEK293 细胞案例	15
附录3. 赛恩宝生物腺病毒滴度测定案例.....	16
附录4. 助感染试剂 ADV-HR 在 Anzhenbio 腺病毒感染中的作用（孵育法）	17
附录5. 摸索助感染试剂 ADV-HR 的使用极值实验.....	18
附录6. 赛恩宝生物 腺病毒感染 HepG2、A549 和 Hela 细胞的参考用量.....	20

声明:

1. 赛恩宝生物科技有限公司的产品仅限用于研究，不可用于包括人类或体外诊断和治疗在内的其他用途。
2. 赛恩宝生物科技有限公司的产品，不得修改和转售、转赠给任何第三方，未经赛恩宝生物科技有限公司的书面批准，不得将产品用于向其他第三方提供服务或用于制造商品化产品。

产品有限责任担保

赛恩宝生物保证您收到的产品符合产品目录上的规格。本担保规定了赛恩宝生物更换产品的责任。赛恩宝生物不提供其他任何形式的对于产品商业或健康用途的保证。赛恩宝生物不对任何由于使用或不正确使用本公司产品造成的直接、间接的、衍生的或偶然的损害所产生的后果负责。

产品储存

收到产品后，请第一时间在 BL2 生物安全柜中根据实验所需量将病毒进行分装。分装病毒时请将病毒始终放置在冰上。分装的病毒可在4℃保存3天，其余病毒请于-80℃冰箱冻存。**请避免反复冻融，否则会降低病毒滴度！**

一、产品介绍

腺病毒(Adenovirus, Ad)是一种无包膜的线状双链 DNA 病毒，其复制不依赖于宿主细胞的分裂。腺病毒拥有近 50 个血清型，大多数腺病毒载体都是基于血清型 2 和血清型 5，通过转基因的方式取代 E1 和 E3 基因，降低病毒的复制能力。这些重组病毒仅在高水平表达 E1 和 E3 基因的细胞中复制，因此是一种适用于治疗的高效控制系统。重组腺病毒是进行基因转移和表达的工具，功能强大并易于操作。腺病毒独特的生物学特征使它成为“载体的首选”，被科研工作者广泛应用。

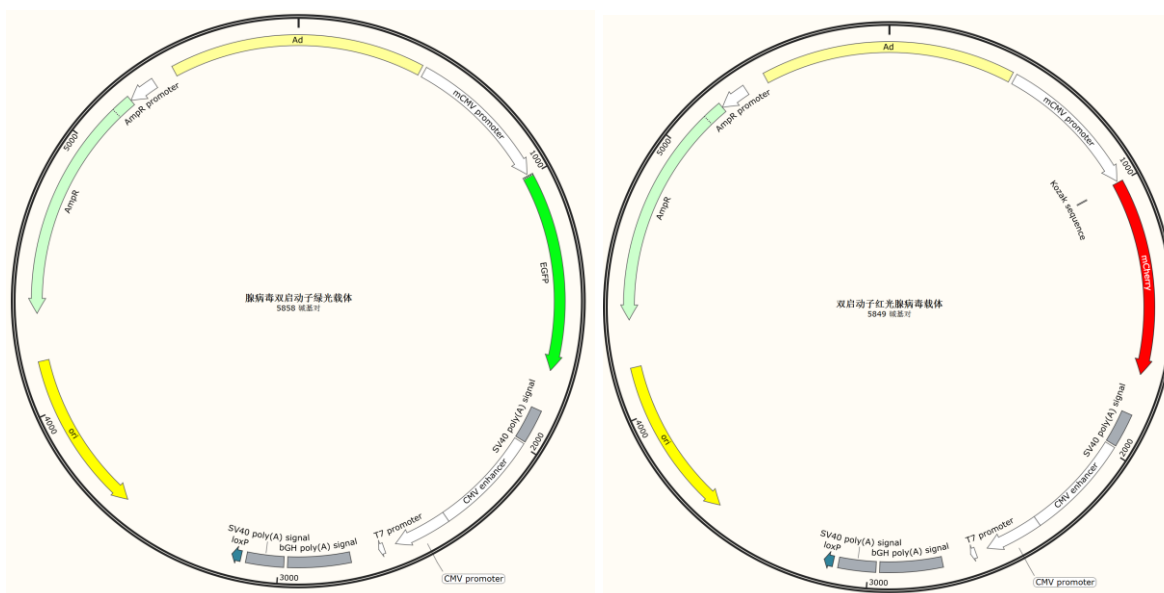
腺病毒主要具有以下特点：

1. 可广泛地感染各类细胞，包括分裂细胞和不分裂细胞（某些抗腺病毒感染的淋巴瘤细胞除外）；
2. 高效率地感染细胞，感染率可达100%；
3. 可达到较高的病毒滴度，一般粗病毒可达 10^{11} vp/mL，而浓缩后可达 10^{13} vp/mL
4. 易于扩增；
5. 不整合到染色体中，无插入致突变性；
6. 稳定保存，-80℃可以保存2年以上。

赛恩宝生物使用的是应用最广泛的复制缺陷型的人类血清5型腺病毒。该腺病毒载体缺失E1和E3基因。E1基因在组装感染性病毒颗粒时必不可少，可在HEK293T细胞病毒包装过程中得到补充，而E3基因不影响病毒的包装。由于E1和E3基因的缺失，腺病毒载体可插入高达7.5kb的外源基因。

赛恩宝生物的ORF AD-腺病毒ORF表达系统包括三个相关产品：ORF穿梭载体系统，pAD-ORF腺病毒载体和预制ORF AD-腺病毒。

ORF 穿梭载体系统



赛恩宝生物率先推出了 双启动子绿光/红光 穿梭载体，该载体与其他载体，如腺病毒、慢病毒、腺相关病毒 和 shRNA载体完全兼容。穿梭质粒中的ORF可以通过限制性内切酶简单的“剪切和粘贴”转移至所有目标载体和病毒载体。两组限制性内切酶 AsiSI/MluI (96%) 和 AsiSI/RsrII (99%) 可涵盖人类基因ORF 的99.5%。其他的人类基因ORF，可由其他限制性内切酶组合, 如 AsiSI/NotI, AscI/RsrII 转移。ORF在CMV启动子启动下表达，在ORF的C'端融合了Flag和His标签，并具有SV40 poly (A) 加尾信号。双启动子绿光/红光穿梭载体含有loxP位点，能有效与腺病毒基因组进行重组，可用于将ORF序列同源重组到腺病毒载体。

二、操作步骤

（一）腺病毒安全操作规范

1. 使用腺病毒载体前请向您所在机构的生物安全部门征得许可和指令。
2. 请在BL2生物安全二级生物安全柜中操作病毒粒子。
3. 请务必穿着实验服，佩戴一次性口罩和手套。
4. 小心操作，避免产生气雾、飞溅或洒落。
5. 被病毒污染的超净工作台，请立即用加入1% SDS的70%乙醇溶液擦拭干净；请务必将接触病毒的枪头、离心管、培养板、培养液使用新配制的10%漂白粉、84消毒液或0.6%次氯酸钠溶液浸泡1小时以上再丢弃。
6. 装盛腺病毒的实验用品需单独放置及培养，并加以标示。
7. 用显微镜观察细胞感染情况时，请先拧紧培养瓶或盖紧培养板，用70%乙醇擦拭培养瓶外壁后，显微镜下观察拍照。观察完毕，请用70%乙醇再次擦拭显微镜实验台。
8. 离心病毒时，应使用密封性好的离心管，或用封口膜封口后进行离心，请尽量使用组织培养室内的离心机。
9. 实验完毕脱掉手套后，请立即用肥皂和水清洗双手。
10. 对共用实验室的人员需进行腺病毒安全培训或提示。

（二）腺病毒感染目的细胞预实验

不同的细胞所使用的病毒MOI值会有所不同。建议在正式实验前，在目的细胞中进行预实验摸索最佳MOI值（使用赛恩宝生物腺病毒感染HepG2、A549和Hela细胞的参考用量见附录6。

为了节省病毒，推荐使用 96 孔板进行预实验。操作步骤如下：

1. 第一天 细胞的准备

将目的细胞接种于 96 孔板中，细胞融合率为 50%为最佳。为保证细胞生长良好，请保证细胞贴壁过夜。

2. 第二天 病毒的稀释

取 10 μL 腺病毒原液加入 90 μL 培养液中做 1:10 稀释 (10^{-2})，以此为起点做梯度稀释直至稀释 10^{-7} 。可根据实际情况降低或提高稀释倍数。

3. 第二天 感染目的细胞

取出提前准备好的 96 孔板，用准备好的病毒稀释液替代旧培养液，注意保留未加入病毒的细胞孔作为对照组。

4. 第二至四天 观察荧光或检测

腺病毒对细胞的感染较快，请在感染细胞后 12、24、36、48 小时分别观察细胞中荧光表达情况（如果您选择的产品不带有荧光标签，请在 48、72、96、120 小时分别收获细胞并通过 Western-Blot 或其他检测手段来检测基因表达）。

注意事项：感染前细胞的状态好坏对最终的感染效果高低影响很大，请务必保证加入病毒前，细胞处于良好的生长状态。

(三) Quantitative-PCR腺病毒滴度测定

实时定量PCR法是一种简单的、高通量的测定病毒粗提裂解液和纯化病毒样本中腺病毒颗粒数量的方法。该方法用腺病毒基因组特异性引物进行实时定量PCR。在定量曲线的线性范围内，Ct值与已知拷贝数质粒的Ct值的比值即为病毒基因组的初始拷贝数。

1. 纯化腺病毒基因组DNA

腺病毒颗粒基因组DNA外面包被有衣壳蛋白，使用蛋白酶K消化酶解病毒衣壳。

组成成分	体积
病毒液	5 μ l
蛋白酶K (5 μ g/ μ l)	1 μ l
超纯水	4 μ l

- 1) 37 °C 孵育30 min。然后加热 95 °C 20 min 使酶失活；
- 2) 3000g 离心10 min，取上清冻存。

2. QPCR:

- 1) 赛恩宝生物使用的病毒标准品的滴度为 3.6×10^8 VP/mL。梯度稀释标准品至滴度为 3.6×10^2 - 3.6×10^8 ，并将超纯水作为阴性对照；
- 2) 配制PCR反应体系，每个样品20 μ L体系；

组成成分	体积
2× SYBRGreen缓冲液	10 μ L
引物混合物	1 μ L
超纯水	7 μ L
病毒样品或标准品	2 μ L（相当于加入1 μ L初始病毒样品）

样品应按下表准备：

标准品 0	标准品 3.6×10^2	标准品 3.6×10^3	标准品 3.6×10^4	标准品 3.6×10^5	标准品 3.6×10^6	标准品 3.6×10^7	标准品 3.6×10^8
标准品 0	标准品 3.6×10^2	标准品 3.6×10^3	标准品 3.6×10^4	标准品 3.6×10^5	标准品 3.6×10^6	标准品 3.6×10^7	标准品 3.6×10^8
病毒 样品 1	病毒 样品 1	病毒 样品 2	病毒 样品 2	病毒 样品 3	病毒 样品 3	病毒 样品 4	病毒 样品 4

- 3) 进行PCR反应；
- 4) 病毒颗粒数的计算：病毒颗粒数(VP/mL) = 与标准品相对值 $\times 1000$ 。

（四）腺病毒感染目的细胞

进行腺病毒感染实验时可使用完全培养液（培养目的细胞用）稀释。培养液中的血清、双抗或其他营养因子不会影响腺病毒的感染效率。

以 24 孔培养板为例，进行 HEK 293 细胞的感染实验操作步骤如下：

注意事项：实验前请按照不同的 MOI 设置不同的感染孔，并根据 MOI 和细胞数量计算所需要的病毒量。

第一天 细胞的准备

在 24 孔培养板接种若干孔，每个孔内接种 $3-5 \times 10^4$ 个 HEK 293 细胞，铺板时细胞的融合率为 50% 左右，每孔培养液体积为 300 μ L，进行病毒感染时细胞的融合率约为 70% 左右。

第二天 病毒的准备

根据实验的实际情况和 MOI 值，用培养液准确稀释腺病毒原液。

注意事项：可使用 PBS 缓冲液或无血清培养液稀释病毒原液。

第二天 感染目的细胞

在目的细胞和对照细胞中分别加入计算好的病毒液，混匀后放于二氧化碳培养箱（37 °C、5% CO₂）孵育过夜。

注意事项：

- 1) 感染前细胞的状态好坏对最终的感染效果高低影响很大，请务必保证加入病毒前，细胞处于良好的生长状态。
- 2) 若病毒对目的细胞的感染效率较低，可通过提高 MOI 值提高病毒的感染效率，也可在培养液中加入助感染试剂 ADV-HR（详见附录 1、附录 4、附录 5）来提高病毒的感染效率。

第二天 更换培养液

病毒感染细胞 12 小时后，更换培养液。

注意事项：换液具体时间需视细胞状态而定。如果腺病毒对细胞有明显毒性作用，影响细胞生长状态，最短可于加病毒 4 小时后更换新鲜培养液后继续培养。

第三天 感染效率检测

感染 24 小时后，可利用倒置荧光显微镜观察病毒感染目的细胞的效率。如选择的腺病毒载体不带有荧光标记，可以通过 Q-PCR(定量 PCR)检测目的基因的表达来评估感染效率。

三、附录

附录1. 常见问题解答

1. 从赛恩宝生物购买的人类ORF开放阅读框克隆的序列与参考序列完全一致吗？

克隆序列并不总是与RefSeq的公布的序列完全一致。赛恩宝生物的大部分人类ORF克隆的序列与NCBI公布的参考序列完全匹配，但部分克隆的序列含有SNP单核苷酸多态性，存在短序列的插入或缺失。赛恩宝生物人类ORF 的亚克隆模板来自哺乳动物MGC库或cDNA文库，序列的差别反映了来自不同组织和不同个体的差异。

2. 赛恩宝生物所有的人类ORF克隆都已全长测序验证了吗？

是的。赛恩宝生物医药科技有限公司所有的人类ORF克隆都已通过全长序列测序。每个克隆首先用Sanger法对两端序列进行测序验证，然后通过NextGene二代测序方法对全长序列测序。赛恩宝克隆的序列与参考序列之间的差异也可在网站上查阅。提交您的订单前，我们强烈建议您下载我们的序列并比对差异。

3. 在什么情况下可以选用腺病毒载体作为将外源基因导入细胞的工具？

腺病毒载体能感染分裂和非分裂细胞。它适用于体内和体外基因传递，转染效率高，对外源基因瞬时表达量高。但相对于其他病毒载体系统，腺病毒载体在靶细胞中具有相对较高的免疫原性。

您应考虑以下几点：

1. 外源基因需要瞬时表达还是稳定的基因表达？
2. 需转染分裂细胞还是非分裂的细胞？
3. 对于靶细胞的潜在免疫原性是否有充分的了解？
4. 病毒用来进行体内还是体外基因传递？

当有以下实验要求时，可以考虑使用腺病毒替代慢病毒：

需缩短实验周期；

慢病毒感染效率约70%左右，不能直接进行后续实验，需筛选稳定细胞株，而筛选时间至少为两周。而腺病毒感染效率高，在很多细胞株中的效率可以达到99%，可直接进行后续实验，节约经济成本和时间成本。

需进行动物实验；

用于动物实验的病毒需具有较高的滴度，才能达到使用最小体积注射的目的。目前，慢病毒能达到的最高有效滴度通常在 10^8 TU/mL左右，如选用慢病毒，约需1 mL 病毒注射体积。大体积的液体量对于动物是有害的，尤其是注射脑部。腺病毒的滴度可达 10^{11} PFU/mL，应用于动物实验时，每只小鼠只需要1 μ L，而每只大鼠10 μ L既可。不仅如此，腺病毒可进行扩增纯化，从而避免重新包装，以节约经济成本和时间成本。

请参阅下面的表格，选择适合您的病毒载体。

病毒表达系统	慢病毒	腺病毒	腺相关病毒
病毒基因组	RNA病毒	双链DNA病毒	单链DNA病毒
是否整合	病毒基因组整合于宿主基因，长时间，稳定表达外源基因	病毒基因组游离于宿主基因组外，瞬时表达外源基因	重组AAV极小概率整合，以附加体形式长期表达
感染细胞类型	感染分裂和不分裂细胞	感染分裂和不分裂细胞	感染分裂和不分裂细胞
表达丰度	高水平表达	高水平表达	体内高水平表达
表达时间	慢（2-4天）	快（1-2天）	慢（2-3周）
滴度	最高 1×10^9 TU/mL	最高 1×10^{12} pfu/mL	最高 $1 \times 10^{13-14}$ VG/mL
克隆容量	可插入不超过6kb的外源片段，滴度随外源片段长度增加而降低	可插入高达6-8kb的外源片段	可插入不超过4.5kb的外源片段
免疫原性	低免疫原性	高免疫原性	低免疫原性
动物模型	可产生转基因动物，效率达50%以上	不能得到转基因动物	可产生转基因动物，效果好
启动子	可更换特异性启动子	可更换特异性启动子	可更换特异性启动子

4. 病毒滴度如何测定？

测定腺病毒的滴度有三种常用的方法：空斑形成实验、孔稀释法和BAC法

空斑形成实验是一种检测有感染能力的病毒（PFU）的生物学方法。通常是用一系列病毒稀释液感染单层HEK 293细胞，病毒在感染的细胞中繁殖，最终导致细胞毒性效应并被释放出来。释放的病毒将感染邻近的细胞，这整个过程将被不断重复，最终导致空斑的形成。为了阻止病毒扩散并形成新的空斑，在完成最初感染后，要将一层0.5%的琼脂铺在细胞表面上。病毒滴度（PFU/ml）可通过统计空斑数目获得。空斑的形成需3周时间。

孔稀释法是在Eppendorf管中做10倍梯度稀释。稀释方法为：每种病毒准备8个1.5 mL Eppendorf管，每管加入297 μ L完全培养液，向第一个管中加入33 μ L病毒原液，混匀后，吸取30 μ L加入第二个管混匀。依此类推，做8个稀释度（ 10^{-1} ~ 10^{-6} ）。弃去96孔板中原有的培养液，每个稀释度重复3个孔，每孔加入含稀释好的病毒液100 μ L。并做好标记。感染24小时后用荧光显微镜对荧光阳性细胞进行计数。数出最后两个能观察到荧光的孔内的荧光细胞数，计算3个重复孔内的总数之和并计算出平均数，假设为A（倒数第二个能见荧光孔的荧光细胞平均数）和B（倒数第一个能见荧光孔的荧光细胞平均数）。腺病毒病毒滴度计算公式：腺病毒滴度 (PFU/mL) = $(A+B \times 10) \times 1000 / 2 / A$ 孔病毒量 (μ L)

BAC法是检测蛋白浓度，仅适用于纯化后的腺病毒。通常1 μ g蛋白=1 $\times 10^9$ VP。

5. 如何选择病毒感染细胞的最佳 MOI 值？

由于病毒用量过少会无法达到理想的感染效率，病毒用量过多会造成细胞毒性。建议感染目的细胞前，根据赛恩宝生物为您提供的“腺病毒感染目的细胞预实验”来选择最佳腺病毒用量。

6. 如何确定目的细胞是否可被腺病毒感染？

建议使用前查询相关文献。通常腺病毒可以感染哺乳动物细胞系或原代细胞，包括可分裂和不可分裂的细胞。只有少数细胞系不能被感染，例如一些淋巴细胞系。为确保目的细胞可被腺病毒感染，建议使用有荧光标记的腺病毒对目的细胞进行预实验（详见“腺病毒感染目的细胞预实验”）。

7. 腺病毒需要纯化吗？

如果病毒被用于体外细胞实验，不需要进行纯化。由于未纯化病毒液中含有的细胞碎片和少量培养基成分易诱导显著的免疫学反应，用于体内实验或动物实验的病毒需进行纯化，从而除去有缺陷的病毒颗粒和其他培养基中的成分。

8. 什么是RCAs？如何检测 RCAs？

HEK293细胞中存在与血清5型腺病毒相同的序列，重组腺病毒与293细胞的重叠序列交叉重组，可产生复制能力的腺病毒（Replication Competent Adenoviruses: RCAs），RCAs发生的几率较小。

RCA可使用非辅助细胞，如HeLa进行检测。将梯度稀释的病毒液感染HeLa细胞，并培养8天。8天后，若没有空斑产生，重组的腺病毒则不是有复制能力的腺病毒。

9. 怎样提高腺病毒的感染效率？

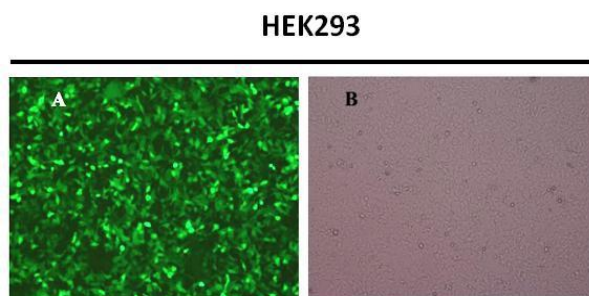
细胞良好的生长状态和感染时适合的MOI值是达到高感染效率的保证，而且腺病毒是通过细胞的表面受体CAR和细胞接触后，侵染细胞的。所以如果目的细胞的CAR受体少，病毒的感染效率就会低。一般情况下，可以通过提高感染时的MOI值来提高病毒的感染效率，必要时可在感染时加入助感染试剂ADV-HR来提高腺病毒的感染效率。

10. 助感染试剂ADV-HR的使用浓度和使用方法是什么？

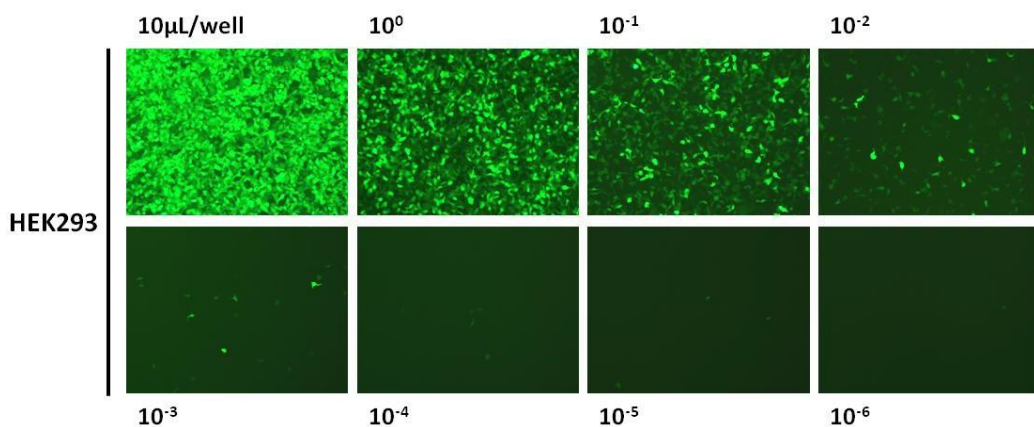
助感染试剂ADV-HR能够显著提高腺病毒的感染效率。但较高浓度的ADV-HR具有细胞毒性，影响细胞状态和感染效率。我们建议您务必于目的细胞中进行ADV-HR浓度梯度预实验。我们在HEK 293中的实验表明（详见附录5），当ADV-HR使用浓度小于等于 1.0×10^{-2} mg/mL时，细胞状态良好。

此外，对于较难感染的细胞系（如CNE2）建议使用“孵育法”（即附录4提供的方法），即将助感染试剂、腺病毒和一定数量的细胞悬液加至1.5mL Eppendorf管中，轻轻混匀，置于37°C培养箱中孵育0.5至1小时后转至培养皿中培养；对于较易感染的细胞系（如HepG2）建议使用“直接加入法”，即在感染时，直接将助感染试剂、腺病毒滴加至培养皿中。建议您针对目的细胞的具体情况，选择合适的感染方法。

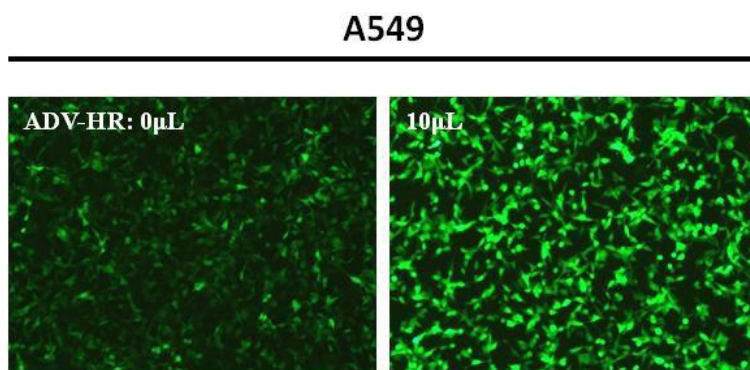
附录2. 赛恩宝生物腺病毒感染 HEK293 细胞案例



附录3. 赛恩宝生物腺病毒滴度测定案例



附录4. 助感染试剂 ADV-HR 在 Anzhenbio 腺病毒感染中的作用（孵育法）



操作步骤:

1. 准备细胞:

贴壁细胞消化后离心、悬浮细胞直接离心，弃去上清，用无血清培养液调整细胞浓度至 10^6 cell/88ul，备用。

2. 在1.5ml EP 管中建立感染体系如下所示:

助感染试剂（10 $\times$ ） 10 uL

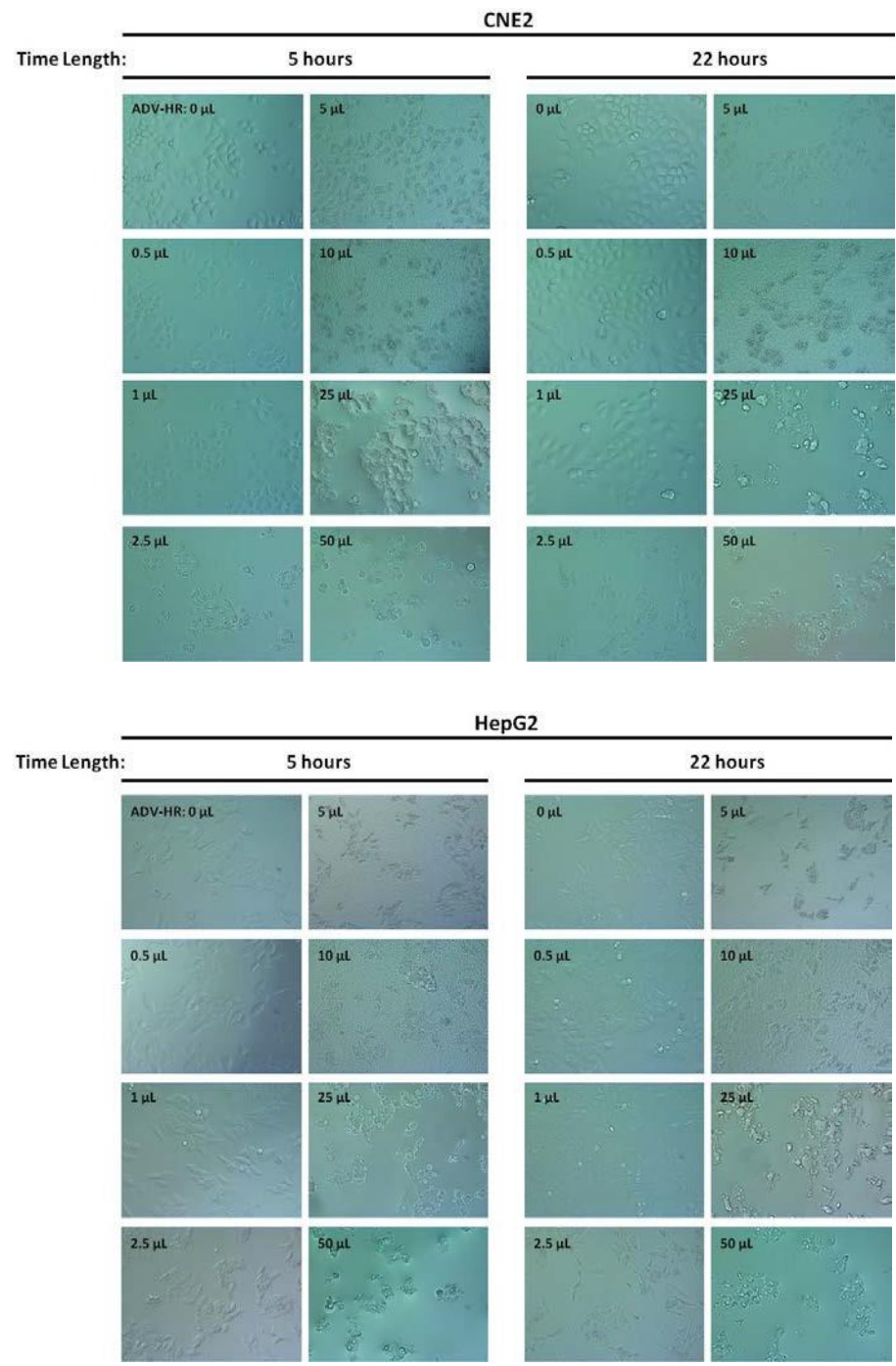
病毒 (10^{11} VP/mL) 2 uL

细胞悬液 (10^6 cell/88 uL) 88uL

用移液器轻轻吹打混匀，于37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中孵育0.5~1h。

3. 用移液器将感染体系中的细胞轻轻悬起，转移至预先加有培养液的6孔板中培养，建议加入细胞培养液体积为2.5mL/孔。
4. 若为含有 GFP 标签的载体，可于感染24h 后不同时间段观察荧光表达。

附录5. 摸索助感染试剂 ADV-HR 的使用极值实验



实验规模：96 孔板(定容至 100 μ L)

ADV-HR 浓度：1mg/mL

说明：

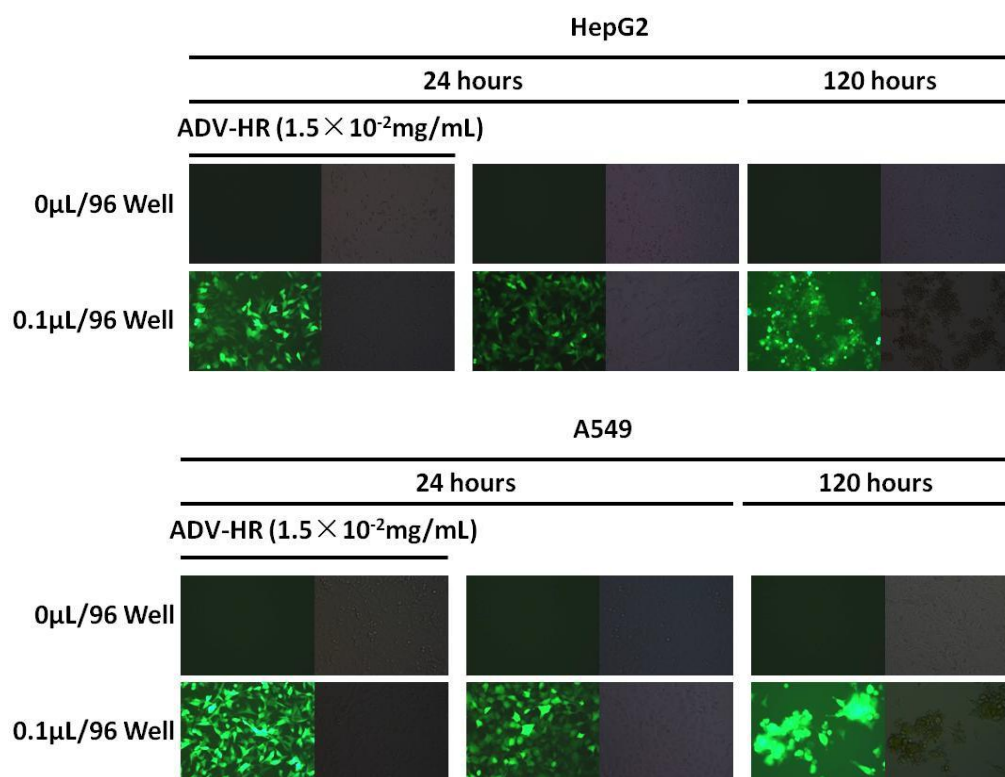
1. ADV-HR 终浓度在 0 至 1.0×10^{-2} mg/mL 之间对细胞状态无影响；
2. ADV-HR 终浓度在 2.5×10^{-2} mg/mL 时细胞生长缓慢；
3. ADV-HR 终浓度在 $5.0 \times 10^{-2} \sim 1.0 \times 10^{-1}$ mg/mL 时细胞呈现明显破碎， $2.5 \times 10^{-1} \sim 5.0 \times 10^{-1}$ mg/mL 时细胞皱缩甚至停止生长。

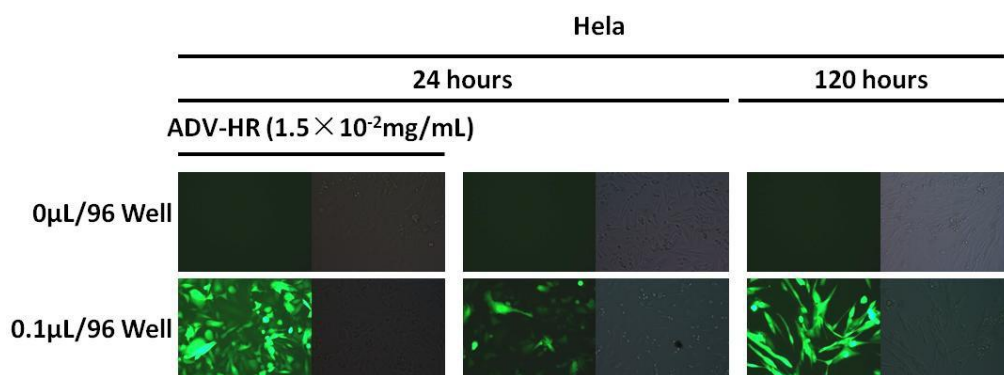
建议：

1. 请在使用 ADV-HR 前于目的细胞中进行浓度梯度预实验；
2. 建议 ADV-HR 的使用浓度不超过 2.5×10^{-2} mg/mL。

附录6. 赛恩宝生物 腺病毒感染 HepG2、A549 和 Hela 细胞的参考用量

因腺病毒种类、实验条件、细胞状态、实验人员熟练程度等的不同，以下 MOI 仅供参考。务必于实验前进行 MOI 摸索预实验。





腺病毒滴度： 3.7×10^{12} VP/mL

感染后 24 及 120 小时拍照

注： 0.1 μL 病毒体积为梯度稀释后获得，并非使用移液器直接吸取。

实验规模	每孔 Anzhenbio 腺病毒量 (联合 ADV-HR 的使用时)	每孔培养基定量
96 孔板	0.1 μL	100 μL
48 孔板	0.4 μL	200 μL
24 孔板	1 μL	500 μL
6 孔板	5 μL	2 mL