

产品手册

AAV (AAV2/9) Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)

AAV2/9 假病毒(GFP-Luciferase)

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V1.0.0

一、产品基本信息及组分

基本信息

产品编号	产品名称
GM-0220PV211	AAV (AAV2/9) Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)

组成成分

组分编号	产品名称	储存	编号/规格
GM-101400PV-200	AAV (AAV2/9) Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)	-80°C	200 µL

二、包装、运输及储存

1. 假病毒产品干冰运输，-80°C储存。（保存时间以 12 个月以内为宜，如保存时间过长，使用前请重新检测病毒滴度）
2. 请收到产品立即确认产品是否为冻存状态，并立即存入-80°C冰箱。

三、原理描述

腺相关病毒 9 型（Adeno-associated virus serotype 9, AAV9）是一种应用广泛的重组腺相关病毒血清型，具有较强的体内转导能力和良好的安全性特征。AAV9 以其对心肌、骨骼肌、肝脏以及中枢神经系统等多组织的高效转导而闻名，已被广泛用于基因递送、功能基因学研究、疾病模型构建以及临床前/临床基因治疗探索。由于其较低的免疫原性、持久表达和较好的组织穿透能力，AAV9 在全球基因治疗与分子医学研究中发挥着重要作用。

AAV2/9 假病毒（GFP-Luciferase）采用 AAV2 反式辅助元件（Rep）与 AAV9 衣壳蛋白（Cap）体系，在 HEK-293T 细胞中共同表达并组装，包装携带荧光素酶报告基因（Luciferase）与绿色荧光蛋白基因（GFP）的重组基因组。该假病毒为复制缺陷型载体，本身不具备自主复制产生新病毒颗粒的能力，安全性高，且在衣壳与入侵途径方面与 AAV9 的天然特性高度一致。因此，AAV2/9 假病毒（GFP-Luciferase）可用于受体/入侵机制研究、组织或细胞转导效率评估、中和抗体滴度测定、抑制剂筛选、启动子/载体构建优化以及 AAV9 相关基因递送策略与疫苗/免疫学研究中的方法学验证。

四、 感染能力

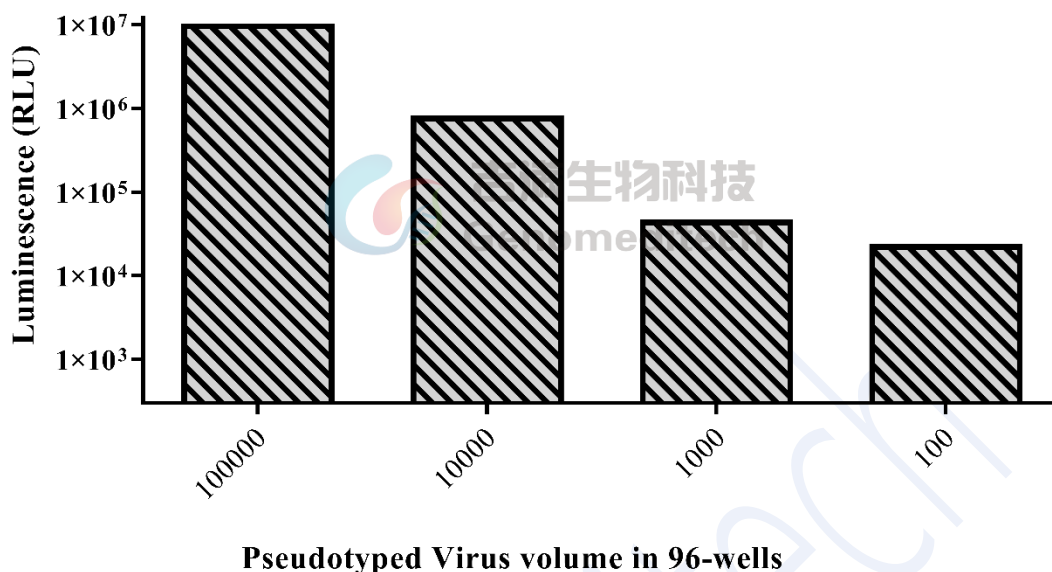


图1 吉满 AAV2/9 假病毒不同 MOI 感染 AAVR HEK-293 测定 Luciferase 数值

五、 使用方法

因细胞表面受体表达情况不同、细胞培养状态不同、实验环境的差异等，假病毒量、受体细胞量、细胞密度、抗体或血清的用量均需进行预实验优化操作步骤以获得更好的结果。

1. 中和验证实验

在本实验案例中，AAVR HEK-293 (DMEM+1%P.S+10% FBS) 细胞量为 1×10^4 Cells/孔，病毒使用 4 μ L。假定本次实验抗体，母液浓度为 100 μ g/mL，Conc.01 终浓度为 10 μ g/mL，4 倍梯度稀释。Conc.01-Conc.11 分别排布在 B1-B11，B12 为 0 浓度对照。周围孔加入 100 μ L PBS，以防止边孔蒸发。孔板排布如下：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
B	Antibody	10 μg/mL	2.5 μg/mL	625 ng/mL	156.26 ng/mL	39.06 ng/mL	312.5 ng/mL	9.77 ng/mL	2.44 ng/mL	610.35 pg/mL	152.59 pg/mL	38.15 pg/mL	0
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
D													
E													
F													
G													
H													

1) 细胞准备

在实验前 20-24 h, 将细胞从培养皿中消化下来, 以新鲜完全培养基 (DMEM + 1%P.S + 10% FBS) 重悬细胞, 检测细胞活力并计数。离心 $130-200 \times g$ (根据不同细胞可调整转速) 收集细胞, 再以新鲜完全培养基调整细胞浓度为 1×10^5 cells/mL。以排枪加 100 μ L Cells /孔至中间 12 个孔。周围的孔加 100 μ L PBS。盖上班盖, 于孵箱中孵育过夜。

2) 抗体稀释

使用无菌 96 孔板准备抗体稀释。(如果是血清样品, 需置于 56 °C 水浴锅中灭活 30 min~1 h 后使用)

对于待测样品, 使用一行 (如 B 行, 单重复可以检测 6 个抗体)

加入 Assay buffer, 各孔体积见下表。如 B1 孔中加入 58.67 μ L 的 Assay buffer (基础培养基含 10% FBS), B2-B12 加入 55 μ L 的 Assay buffer。

吸取 14.67 μ L 待测样品母液, 加入到第一个梯度稀释孔中 (如 B1), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 18.33 μ L, 加入次孔											对照孔
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	14.67 μ L Antibody 加入	58.67 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L
C													
D													
E													
F													
G													
H													

从第一个梯度稀释孔 (B1) 中吸取 18.33 μ L, 加入到第二个梯度稀释孔 B2, 充分混匀。

对于不同浓度的抗体, 首孔加入药物量不同, 首孔后的梯度稀释操作是相同的, 可以使用排枪进行实验。

以此类推, 直至 B11 孔, B12 为不加抗体的对照。

抗体稀释完毕后, 盖上班盖, 以备后续使用。

3) 假病毒感染液稀释

准备 2 个无菌 1.5 mL EP 管, EP 管 A 加入 20 μ L Assay buffer(基础培养基含 10% FBS), EP 管 B 加入 630 μ L Assay buffer。

从 -80°C 冰箱中取出病毒, 置于冰上融化后使用。

EP 管 A: 加入 80 μ L 病毒液与 Assay buffer 混匀。

EP 管 B: 取 70 μ L EP 管 A 稀释混匀后的病毒液, 与 Assay buffer 混匀。

使用无菌 96 孔板, B1-B12 孔, 每孔加入 55 μ L EP 管 C 稀释后的病毒液。

同时设置不加病毒液及抗体液的细胞对照孔(空白)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	假病毒 稀释液	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L
C												
D												
E												
F												
G												
H												

4) 假病毒中和抗体孵育

按下表将连续稀释的抗体与上述假病毒液等体积混合:

组分	体积
假病毒感染稀释液	55 μ L
抗体稀释液	55 μ L
Total	110 μ L

混合液在室温孵育 1h。

5) 加样步骤

步骤 1 接种过夜的靶细胞, 每孔吸弃 100 μ L 培养基。

将孵育完成的混合液每孔加入 100 μ L。

盖上车盖, 于 37°C CO₂ 培养箱中培养。

培养箱孵育 6 h 后更换新鲜完全培养基继续培养 48 h。

6) 荧光素酶检测

48h 后, 通过荧光素酶检测试剂盒 (GMOne-Step 2.0 荧光素酶报告基因检测试剂盒/GM-040513A) 在酶标仪 (Moleculardevices/SpectraMax L) 上检测荧光素酶的活性判定抗体中和效率。

数据分析:

感染抑制率

$$\text{Inhibition}(\%) = \left(1 - \frac{\text{处理组 RLU} - \text{空白}}{\text{SO RLU} - \text{空白}} \right) \times 100\%$$

GraphPad Prism 6.0 计算 50%中和剂量。

六、 使用注意事项

- 1、病毒操作时请在生物安全柜中进行。
- 2、病毒操作时请穿好实验服, 戴口罩和乳胶手套。
- 3、如果使用时本品不慎溅到眼睛、皮肤或其他身体部位请立即使用大量清水冲洗。
- 4、使用本品所产生的实验废弃物需要通过高压灭菌处理后按照医疗废弃物处理要求进行处理。
- 5、假病毒请避免反复冻融, 请启用后根据实验需求分装储存。