

腺相关病毒 操作手册

☎ 售前tel: 400-092-0065
☎ 售后tel: 400-092-0566



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>

扫一扫 关注汉恒生物公众号
咨询更多服务内容

目 录

腺相关病毒安全使用注意事项 /01

腺相关病毒的存储与稀释 /01

腺相关病毒的感染与使用 /02

-各脏器AAV注射方式 /02

-AAV注射指南 /04

- 1、尾静脉注射 /04
- 2、肝门静脉注射 (肝脏AAV局部递送) /04
- 3、脑立体定位注射 /05
- 4、无创气管插管法 (肺部病毒递送) /05
- 5、乳腺脂肪垫注射 /06
- 6、肾盂感染 (肾脏AAV递送) /06
- 7、腿部骨骼肌注射 /06
- 8、玻璃体腔注射 /07
- 9、鞘内注射 /07

-AAV注射后的观察 /07

腺相关病毒的FAQ /09

腺相关病毒安全使用注意事项

- 01 腺相关病毒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。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。
- 04 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。
- 05 病毒相关的废弃物需要特殊收集, 统一经高温灭菌处理。
- 06 实验完毕用肥皂清洗双手。

腺相关病毒的存储与稀释

+ 腺相关病毒的储存

收到病毒液后如在短期内使用腺相关病毒进行实验, 可以将病毒暂时放置于4 °C保存 (尽量一周内用完); 如需长期保存请分装后放置于-80°C。

注: a. 在病毒使用过程中应尽量避免反复冻融, 反复冻融会降低病毒滴度 (每次冻融会降低病毒滴度10%-50%); 汉恒生物前期对病毒进行了分装 (200 μL/tube), 收到后直接放置-80°C保存即可。

b. 如果病毒储存时间超过6个月, 我们建议在使用前重新测定病毒滴度。

当需要稀释病毒时，请将病毒取出置于冰浴融解后，使用培养目的细胞的PBS或生理盐水混匀分装后置于4°C保存(请尽量一周内用完)。

腺相关病毒的感染与使用

+ 各脏器AAV注射方式

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

表1 不同血清型对个组织器官细胞亲和性

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、AAV5、AAV8
眼部-视网膜	AAV2、AAV-DJ
眼部-角膜	Anc80L65
视网膜穆勒细胞	AAV-shH10
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
血管内皮	AAV-Vec
小胶质细胞	AAV-MG
脑血管内皮	AAV-br1

表2 注射方式及血清型推荐

注射部位	推荐的血清型	注射方式	动物	注射体积 (μL)
心脏	9型	原位多点注射	大鼠	10-15μL/点, 3-5 个点
			小鼠	10-15μL /点, 3-5 个点
		尾静脉注射	大鼠	250μL (200g 体重)
			小鼠	100μL
肝脏	8型 (特异)	尾静脉注射	大鼠	200μL (200g 体重)
	9型 (较亮)		小鼠	100μL
全脑	AAV-BBB	尾静脉注射	大鼠	250-300μL
			小鼠	100μL
大脑 (局部)	9型, 2型, 5型、8型	立体定位注射	大鼠	1-5μL
			小鼠	0.2-2μL
脊髓	9型, 5型, 1型	鞘内注射	大鼠	10-20μL
			小鼠	
脂肪	9型	腹内脂肪-腹腔注射	大鼠	300μL
			小鼠	150-200μL
		皮下脂肪-原位注射	大鼠	10-15μL /点, 5-8个点
			小鼠	10-15μL /点, 5-8个点
骨骼肌	9型	原位多点注射	大鼠	10-15μL /点, 3-5个点
			小鼠	10-15μL /点, 3-5个点
眼睛	2型——玻璃体腔	玻璃体腔注射	大鼠	3-5μL
			小鼠	1-2μL
	DJ型——视网膜下腔	视网膜下腔注射	大鼠	3-5μL
			小鼠	1-2μL
肺脏	6型 (特异)	无创气管注射	大鼠	100-150μL (200g体重)
			小鼠	50-75μL
肾脏	2型或9型	肾脏肾盂注射	大鼠	100-150μL
			小鼠	50-75μL
肠道	1型或5型	灌肠	大鼠	1000μL (200g 体重)
			小鼠	500μL
血管 (内皮为AAV-Vec)	AAV-Vec	腹主动脉局部感染	大鼠	50μL

+ AAV注射指南

关注汉恒生物微信公众号：菜单栏——微官网——实验视频



图1

1 尾静脉注射

感染部位：心脏、肝脏、AAV-BBB感染全脑

- ① 把小鼠放入尾静脉注射的装置中（如果没有该装置，可以用50mL的离心管自己制备一个，注意通气、固定即可）。
- ② 用70%的酒精消毒小鼠尾部。注意保持小鼠尾部温暖，太冷血管则会收缩。
- ③ 用左手食指拇指拉住小鼠尾巴，稍用力拉直，然后食指稍微向前向上，使尾巴稍微弯折。可以在弯折处进针注射病毒（27-30G胰岛素针，100μL/小鼠）。
- ④ 缓缓注射，完成后保持5-10秒防止病毒回流。
- ⑤ 拔针，用手指或者干的无菌棉球或纱布按压几秒。

2 肝门静脉注射（肝脏AAV局部递送）

感染部位：肝脏

- ① 麻醉-皮下注射麻醉剂 Xylazine/Ketamine 混合液（10mg/kg, 100 mg/kg）（Xylazine/Ketamine, Sigma-Aldrich X1251, K2753）。
- ② 在小鼠的眼睛上涂上眼药膏（Ocujentum simplex, Teva Pharmachemie），防止眼睛干掉。
- ③ 小鼠仰卧，腹部朝上。将第二肋骨和第四乳头之间的区域脱毛处理。这步操作可以在小鼠清醒状态下提前1天完成。
- ④ 对去毛区域反复消毒。然后用手术刀划开从肋骨到第四乳头区域，长度约3cm。注意不要伤及乳腺、肠道、肝脏等其他组织。
- ⑤ 用消毒棉签小心把大小肠等内脏拉出来，并用纱布轻轻遮盖，防止触碰。直到看清肝门静脉。
- ⑥ 病毒事先吸入32g针头注射器，在肝脏下方距离约1cm的位置，以小于5度的夹角沿着肝门静脉缓缓插入3-5 mm（肝门静脉示意图，如果难以看清，可以借助解剖镜辨识）。
- ⑦ 接着缓缓注射病毒。注射完成停留3-5s再拔出针头，并用棉签轻轻按压片刻。然后用止血棉覆盖肝门静脉，用棉签轻轻按压5min协助止血。这一步务必确保止血完成。
- ⑧ 然后去除止血棉（如果止血棉粘连组织严重可以用灭菌PBS湿润）。
- ⑨ 再把拉出的脏器轻轻归位。4-0线缝合伤口，10-15针。
- ⑩ 伤口部位注射100 μL bupivacaine (5 mg/mL)止痛；并用26G胰岛素针皮下注射500 微升无菌PBS进行水合。整个手术耗时30min左右。
- ⑪ 实验完毕需要保持小鼠身体足够温暖（比如37度加热灯、温箱等），以利于苏醒。

3 脑立体定位

感染部位：脑部

- ① 麻醉-皮下注射麻醉剂 Xylazine/Ketamine 混合液（10mg/kg, 100 mg/kg）（Xylazine/Ketamine, Sigma-Aldrich X1251, K2753）。
- ② 剃除小鼠头部眼睛到耳朵之间的毛发，放到立体定位仪的保暖托盘上。
- ③ 归零牙齿和耳朵的标尺。并在小鼠的眼睛上涂上眼药膏（Ocujentum simplex, Teva Pharmachemie），防止眼睛干掉。
- ④ 将小鼠上门牙固定到固定板的槽内，确保头部保持固定。调节Bregma和Lambda在同一矢状线上和水平面。务必确保小鼠鼻子居中、稳定。
- ⑤ 用手术刀划开小鼠头部皮肤，用手术刀刮掉表面硬脑膜，如有血迹请用棉签擦干，确保bregma 和lambda位置清晰可见。

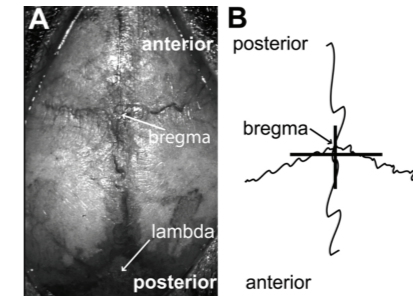


图3 bregma 和lambda示意图

- ⑥ 把bregma 坐标归位0 (X, Y, Z=0)，确保lambda位置与bregma位于同一水平面上。
- ⑦ 根据目的脑区设定好坐标。一旦坐标固定，用marker笔在颅骨做出标记，并在10秒内在颅骨钻出一个约0.015mm的孔。钻的过程务必小心，以防损伤脑组织。
- ⑧ 把带注射AAV吸入针内，根据上一步设好的坐标进针。进针完成后以0.05-0.1μL /min的速度缓缓注射病毒，通常一只小鼠注射体积在0.2-2μL之间。
- ⑨ 注射完毕，保持10min，然后慢慢回针。
- ⑩ 操作过程中如有血流出需要用棉签及时吸干。
- ⑪ 缝合头皮。实验完毕需要保持小鼠身体足够温暖（比如37度加热灯、温箱等），以利于苏醒。

4 无创气管插管法（肺部病毒递送）

感染部位：肺部

- ① 麻醉-皮下注射麻醉剂 Xylazine/Ketamine 混合液（10mg/kg, 100 mg/kg）（Xylazine/Ketamine, Sigma-Aldrich X1251, K2753）。
- ②（可选）在小鼠的眼睛上涂上眼药膏（Ocujentum simplex, Teva Pharmachemie），防止眼睛干掉。
- ③ 正式插管之前可以通过解剖一只小鼠确定插管的位置。对于黑色成年鼠（25g）来说，插入的参考距离是约1.5 cm。
- ④ 把麻醉好的小鼠固定到一个约60°的斜面上，腹部朝上。用细绳固定下小鼠牙齿，防止头部晃动太大。
- ⑤ 小心打开小鼠嘴部，用平头镊子轻轻把小鼠舌头外拉。用Exel Safelet IV 留置针（24G）慢慢插入气管（注意距离，大约是1.5 cm）。然后轻轻把针头拔出。
- ⑥ 将75μL的病毒（或无菌PBS/生理盐水对照）注入留置针顶端，让小鼠慢慢吸入肺部，一定要控制病毒的体积，防止呛死小鼠。
- ⑦ 实验完毕需要保持小鼠身体足够温暖（比如37度加热灯、温箱等），以利于苏醒。

5 乳腺脂肪垫注射

感染部位：脂肪

- ① 麻醉-皮下注射麻醉剂 Xylazine/Ketamine 混合液 (10mg/kg, 100 mg/kg) (Xylazine/Ketamine, Sigma-Aldrich X1251, K2753)。
- ② 在小鼠的眼睛上涂上眼药膏 (OcuLentum simplex, Teva Pharmachemie), 防止眼睛干掉。
- ③ 乳腺处皮肤去毛。注意消毒。
- ④ 用手术刀在乳头与中线间轻轻切开一个小口, 然后用浸湿PBS的棉签温柔分离皮肤和乳腺; 然后用镊子轻轻把乳腺脂肪垫拉出伤口, 用另一镊子夹起, 使其充分暴露, 以看到偏白色的脂肪垫。
- ⑤ 然后胰岛素针向乳腺脂肪垫注射50 μ L病毒。
- ⑥ 轻轻把注射过的脂肪垫放回小鼠体内; 缝合伤口; 如有必要可以注射止痛药, 如temgesic (0.05-0.1 mg/kg, Schering-Plough)。
- ⑦ 把手术过的小鼠放回独立的笼子, 直到恢复清醒。

6 肾盂感染 (肾脏AAV递送)

感染部位：肾脏

- ① 麻醉-皮下注射麻醉剂 Xylazine/Ketamine 混合液 (10mg/kg, 100 mg/kg) (Xylazine/Ketamine, Sigma-Aldrich X1251, K2753)。
- ② 把小鼠一侧的毛剃掉。
- ③ 在小鼠的眼睛上涂上眼药膏 (OcuLentum simplex, Teva Pharmachemie), 防止眼睛干掉。
- ④ 把待注射病毒100 μ L吸入0.5 mL U-100胰岛素注射器 (29G针头) 【注射器的选择极其关键】, 待用。
- ⑤ 手术暴露小鼠左侧肾脏。用手术夹夹住小鼠裸露皮肤, 选择距离小鼠胸腔下方和脊椎各1 cm的地方剪开约0.5 cm长的伤口。

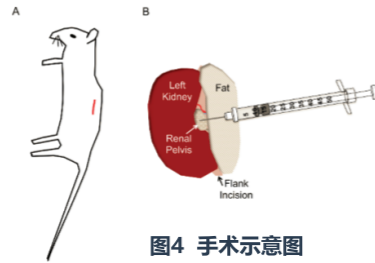


图4 手术示意图

- ⑥ 用手指小心暴露出肾脏周围的脂肪组织, 轻轻扒开脂肪暴露肾盂。肾盂应位于肾脏中间, 为淡黄色透明/白色小点。
- ⑦ 注射的时候注意插针位置, 要避开肾静脉、动脉以及输尿管, 插针深度在0.5cm左右。100 μ L病毒要在2-3秒内注射完成, 太慢无法引起逆流, 会极大影响感染效率。
- ⑧ 注射完成等待2-3秒拔针, 然后小心把肾脏归位, 缝合伤口。
- ⑨ 实验完毕需要保持小鼠身体足够温暖 (比如37度加热灯、温箱等), 以利于苏醒。

7 腿部骨骼肌注射

感染部位：肌肉

注：腿部肌肉注射通常不需要麻醉动物, 但对拿取动物的姿势、手法等要求很高。以防小鼠或者大鼠咬伤手指。我们以大鼠为例讲解腿部肌肉注射方法。

- ① 练习正确抓取大鼠的脖子, 动作务必要轻, 绝对不要让动物惊慌, 防止被动物咬伤。推荐配戴足够厚实的手套。
- ② 把大鼠轻轻放到胸前, 用左手小臂托起大鼠。
- ③ 参照视频方式抓好动物, 露出需要注射的腿部, 防止剧烈挣扎;
- ④ 另外一人用左手拇指和中指轻轻拉住大鼠的腿部, 食指轻轻托起, 右手注射, 注意注射时下针的角度 (30度左右)。注射

剂量每个点不超过50 μ L, 小鼠为10-20 μ L。

- ⑤ 注射要缓慢、稳定。注射完成后用手指或者棉签按压注射部位片刻, 防止出血。
- ⑥ 放回鼠笼, 注射完毕。注意整个过程不要惊吓动物。

8 玻璃体腔注射

感染部位：眼

- ① 麻醉-皮下注射麻醉剂 Xylazine/Ketamine 混合液 (10mg/kg, 100 mg/kg) (Xylazine/Ketamine, Sigma-Aldrich X1251, K2753)。
- ② (选做) 在小鼠的眼睛上涂上眼药膏 (OcuLentum simplex, Teva Pharmachemie), 防止眼睛干涩。
- ③ 将30G一次性针头在角膜缘旁边插入玻璃体腔内, 缓缓注入病毒, 通常注射体积在1~3 μ L/眼。
- ④ 一般每只小鼠只注射一只眼睛, 另外一只作为对照。对注射病毒的眼睛做局部抗菌处理, 防止感染。
- ⑤ 一周后可用眼底照相机进行眼底检查。

9 鞘内注射

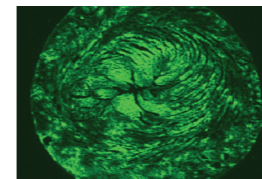
感染部位：脊髓神经

- ① 麻醉-皮下注射麻醉剂 Xylazine/Ketamine 混合液 (10mg/kg, 100 mg/kg) (Xylazine/Ketamine, Sigma-Aldrich X1251, K2753)。
- ② 在小鼠的眼睛上涂上眼药膏 (OcuLentum simplex, Teva Pharmachemie), 防止眼睛干掉。
- ③ 靠近小鼠的尾部根部约2cm²皮肤去毛, 以利于清晰看见下针部位。
- ④ 把小鼠放到一个特殊的架子上, 在小鼠下身用一根15mL离心管垫起, 从而使下针部位稍微拱起。
- ⑤ 把病毒吸入25 μ L的hamilton, 配30G针头。
- ⑥ 定位脊椎的L6 (最突出的一个), 并用手指轻轻按压使之平缓。
- ⑦ 小心将针头插入L5椎骨和L6椎骨的凹槽之间, 并注意小鼠尾部会稍微上翘, 这标志针头成功插入髓鞘。
- ⑧ 一旦成功插入, 用手指固定针头, 另一只手缓慢注射10-20 μ L病毒。注意注射体积要适当, 太小会增加实验误差, 体积太大会增加鞘内压力。
- ⑨ 如有需要, 24hr之后可重复注射一次。
- ⑩ 实验完毕需要保持小鼠身体足够温暖 (比如37度加热灯、温箱等), 以利于苏醒。

+ AAV注射后的观察

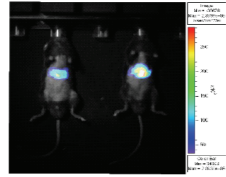
AAV注射感染组织器官至少3周后可取材进行冰冻切片直接观察荧光 (如GFP, RFP等)、石蜡切片 (可以组化染色)、荧光定量PCR (qPCR), 甚至免疫印迹 (WB) 来考察基因表达情况。 (一般情况下, 对于心肌、骨骼肌、肝脏、肾脏、皮肤等适合原位注射的组织器官, 如果AAV带有GFP荧光标记, 注射感染适量病毒3~4周后肉眼即可观察到注射部位组织发绿。)

1 心肌的基因转导



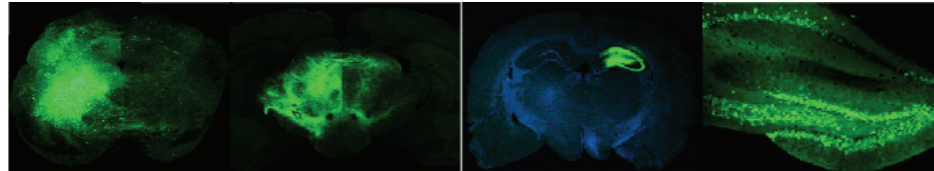
病毒类型及滴度: AAV9-GFP, 滴度 1×10^{12} vg/mL
感染动物: 小鼠, C57, 8周龄
感染部位: 心脏
注射方式和体积: 眼眶静脉注射; 50 μ L
检测方法: 感染3周后冰冻切片, 荧光显微镜检测

2 肝脏特异性AAV (AAV-pTBG-Luc) 体内感染效果



病毒类型及滴度: AAV-pTBG-Luc, 滴度 1.4×10^{12} vg/mL
感染方式: 尾静脉, 100 μ 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;

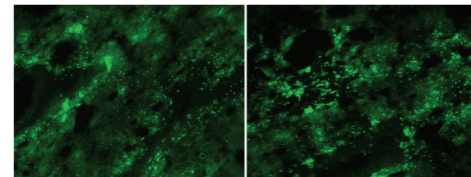
3 脑区基因转导



脑干 中脑 海马 海马 (局部放大)

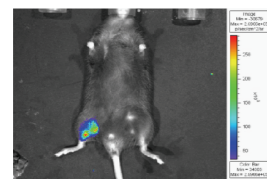
病毒类型及滴度: AAV9-GFP, 滴度 1×10^{12} vg/mL
感染动物: 小鼠, C57, 8周龄
感染部位: 见图
注射方式和体积: 脑定位注射; 1 μ L
检测方法: 感染3周后冰冻切片, 荧光显微镜检测

4 高效的肺组织基因转导



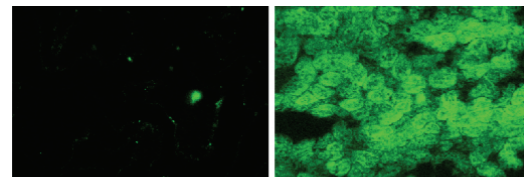
病毒类型及滴度: AAV6-GFP, 滴度 1×10^{12} vg/mL
感染动物: 大鼠, SD, 2月龄
感染部位: 肺脏
注射方式和体积: 气管注射; 100 μ L
检测方法: 感染3周后冰冻切片, 荧光显微镜检测

5 在体感染小鼠肌肉组织



病毒类型及滴度: AAV9-Luc, 滴度 1×10^{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 μ L / 点, 4个点
检测方法: 感染4周, 活体成像

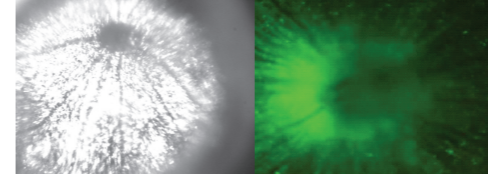
6 肾脏原位注射



AAV-DJ AAV-9

病毒类型及滴度: AAV-GFP, 9型和DJ型, 滴度 1×10^{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 μ L / 点, 6个点
检测方法: 感染4周, 冰冻切片, 荧光显微镜检测

7 眼科学专用AAV视网膜基因转导



病毒类型及滴度: AAV2-GFP, 滴度 1×10^{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 μ L

AAV使用FAQ

Q1: 腺相关病毒产品的安全性如何?

腺相关病毒载体整合几率低, 分子量小, 免疫原性低, 因此安全性高。即使用于人体, 也被认为是安全性非常高的一类基因治疗载体。

Q2: AAV的包装容量一般有多大?

AAV的包装容量 (两个ITR之间的片段大小) 通常不能超过4.5Kb, 除掉启动子、EGFP标记、转录终止信号polyA等元件之外, 外源基因的容量能力一般在2kb以下。

Q3: 不同的AAV血清型主要区别是什么?

几乎所有的AAV病毒骨架都是来源AAV2型的。AAV不同血清型的差异在于包裹AAV遗传物质的蛋白质外壳 (Capsid), 比如AAV5型, AAV8型和AAV9型等, 也可以分别标记为AAV2/5, AAV2/8和AAV2/9, 其中2代表骨架来源于AAV2, 血清型为5, 8和9。

Q4: 什么情况下适合用腺相关病毒?

如果需要在动物个体 (小鼠、大鼠、兔子、狗、猴子等) 水平验证基因功能, 则AAV是最佳的递送工具。

Q5: AAV一般通过何种方式感染动物组织或脏器?

一般情况下AAV可以通过两种方式递送到目的脏器或者组织: 一是系统性给药方式, 比如静脉注射, 是通过血液循环递送到全身各处, 但这种方法对肝脏感染效果很好, 对其他组织和脏器效果欠佳; 二是局部给药, 比如脑立体定位注射, 肌肉注射, 心肌注射等, 这种方法可以比较高效地感染局部组织, 特异性好, 免疫原性更小。

Q6: AAV注射动物以后一般多久可以观察效果?

AAV属于单链DNA病毒, 感染到胞内需要形成双链形式的附加体才能进行基因表达。所以, 一般情况下建议病毒注射3-4周以后再检测基因表达情况比较稳妥。在1-2周的时候即使有表达表达量通常也比较低, 不建议过早处死动物检测。

Q7: AAV注射动物以后如何检测?

病毒注射3-4周以后开始检测。如果是基因过表达, 可以通过免疫组化、免疫荧光和WB在蛋白水平进行检测, 但通常会对使用的抗体质量要求比较高。为了最大化方便检测, 我们通过在过表达蛋白末端添加3xFLAG标签, 检测的时候只需要购买商品化的抗FLAG抗体即可; 除此之外, 还可以通过qPCR对RNA水平进行检测; 对于基因干扰检测, 一般只通过qPCR进行定量分析。

Q8: 腺相关病毒的滴度是如何测定的? 这个测定方法如何? 我拿到病毒后需要自己测滴度吗?

AAV滴度测定我们是采用的国际标准-对ITR或者WPPE元件采取绝对qPCR定量法, 该方法是通过一系列梯度稀释病毒, 并最终根据标准曲线计算出单位体积含有的基因组拷贝数 (Vg/mL)。客户拿到病毒后一般无需自己再测滴度, 可以直接冻存在-80°C。但要注意避免反复冻融和超过半年时间的保存, 否则需要重新测定滴度。

Q9: AAV能否用来体外感染细胞系?

一般情况下不推荐用AAV来直接感染细胞系做基因研究。究其原因, AAV在快速分裂的细胞系中表达能力有限, 如果非要感染细胞系, 通常需要使用较高MOI ($1E4 \sim 1E5$) 进行感染, 比较浪费病毒。综上, 我们不推荐在细胞系上使用AAV进行基因功能研究。