

# 病毒包装

## Virus Packaging Service by Beyotime



碧云天  
Beyotime



碧云天网站



微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology

订购热线：400-168-3301或800-8283301

技术咨询：info@beyotime.com

技术服务：service@beyotime.com

网址：<http://www.beyotime.com>

# 碧云天病毒包装技术服务

## 服务介绍

- 病毒包装即病毒载体介导基因技术，将外源基因包装到天然病毒的外壳中，利用病毒对宿主细胞的感染性，将外源基因导入特定细胞中，病毒包装是一种高效的基因专业工具，广泛应用于基因诊断和基因治疗。
- 一般来说，病毒感染效率比质粒感染效率高，更适用于难转染细胞的外源基因感染与表达（例如：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）。
- 碧云天拥有成熟的病毒包装技术，为客户提供多种病毒包装服务，包括腺病毒（Adenovirus）、各种血清型的腺相关病毒（AAV）（AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9）和以HIV为基础发展起来的慢病毒（Lentivirus），并提供基于病毒包装技术的稳转细胞株构建服务。

# 碧云天病毒包装技术服务

## 服务介绍

	腺病毒	腺相关病毒	慢病毒
基因组	dsDNA	ssDNA	ssRNA(+)
囊膜	无	无	有
基因组大小	38-39kb	5kb	9kb
感染类型	分裂和非分裂细胞	分裂和非分裂细胞	分裂和非分裂细胞
与宿主基因组相互作用	非整合	非整合	整合
外源基因表达时间	瞬时	潜在长效	长效
包装容量	7.5kb	4.5kb	6kb
免疫原性	高	非常低	低
病毒滴度	10 <sup>11</sup> (未纯化)	10 <sup>7</sup> (未浓缩)	10 <sup>7</sup> (未浓缩)
转染效率	100%	70%	70%
外源基因表达量	高	中	中

# 碧云天病毒包装技术服务

## 服务介绍

---

### ➤ 服务项目明细

- 慢病毒包装
- 腺病毒包装
- 腺相关病毒包装
- 稳转细胞株构建

# 碧云天慢病毒包装技术服务

## 服务介绍

- 慢病毒( Lentivirus )载体是以 HIV-1 (人类免疫缺陷1型病毒)为基础发展起来的基因治疗载体, 属于逆转录病毒科, 为RNA病毒, 它对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。对于一些较难转染的细胞, 如原代细胞、干细胞、不分化的细胞等, 使用慢病毒载体, 能大大提高目的基因或目的shRNA的转导效率, 且目的基因或目的shRNA整合到宿主细胞基因组的几率大大增加, 能够比较方便快捷地实现目的基因或目的shRNA的长期、稳定表达。
- 在体外实验及体内实验的研究中, 慢病毒已经成为表达外源基因或外源shRNA的常用载体形式之一, 并且正在获得越来越广泛的应用。
- 碧云天提供慢病毒载体构建, RNAi、miRNA、过表达慢病毒包装, 以及基于慢病毒技术的稳定细胞系构建服务。

# 碧云天腺病毒包装技术服务

## 服务介绍

- 腺病毒是一种无包膜的球型结构的病毒，遗传物质为线型双股DNA形式。腺病毒的特点：(1)感染范围广，对人致病性低；(2)对分裂和非分裂细胞均具有感染性；(3)能有效进行增殖；(4)病毒滴度高；(5)不整合到染色体中，无插入致突变性；(6)外源基因装载容量大。由于腺病毒的这些特点使其广泛地应用于体外基因转导、体内接种疫苗、和基因治疗等各个领域。
- 碧云天的腺病毒（Adenovirus，AdV）包装采用的是最新的AdMAX系统，通过Cre-loxp重组酶，使共转染到HEK293细胞中的腺病毒载体穿梭质粒和骨架质粒（腺病毒基因组质粒）在重组酶的作用下产生重组腺病毒，获得的病毒滴度更高。

# 碧云天腺相关病毒包装技术服务

## 服务介绍

- 腺相关病毒 ( adeno-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。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。因此无论外源DNA是否被整合，都可以在细胞核内稳定复制和转录，产并生RNA和蛋白产物。
- 重组腺相关病毒载体(rAAV) 源于非致病的野生型腺相关病毒，由于其安全性好、宿主细胞范围广(分裂和非分裂细胞)、免疫源性低，在体内表达外源基因时间长等特点，这些特点使重组AAV成为用于基因转移和基因治疗的一个非常有吸引力的工具载体。

# 碧云天稳转细胞株构建技术服务

## 服务介绍

- 稳转细胞株（稳定表达细胞株）指在细胞中持续稳定表达特定基因或干扰特定基因表达。稳转细胞株的目的基因质粒DNA整合到细胞染色体上，使细胞长期稳定表达该基因。在基因功能的研究中，基因是否有效转染靶细胞，是功能研究的前提条件之一。而稳定表达细胞株则弥补了瞬时感染(或转染)一些功能实验中由于外源基因表达时间短的缺陷，便于长期观察基因对于细胞功能的影响以及蛋白间相互作用。
- 用转染质粒或病毒侵染的方法将构建好的含靶基因的载体导入细胞，根据不同的基因载体中所含的抗性标志选择相应的药物进行筛选混合阳性克隆。在阳性混合克隆的基础上，得到单细胞长出的阳性单克隆，继而得到稳定转染细胞株。常用的真核表达载体的抗性标志物有嘌呤霉素(puromycin)、潮霉素(hygromycin)和新霉素(neomycin)。



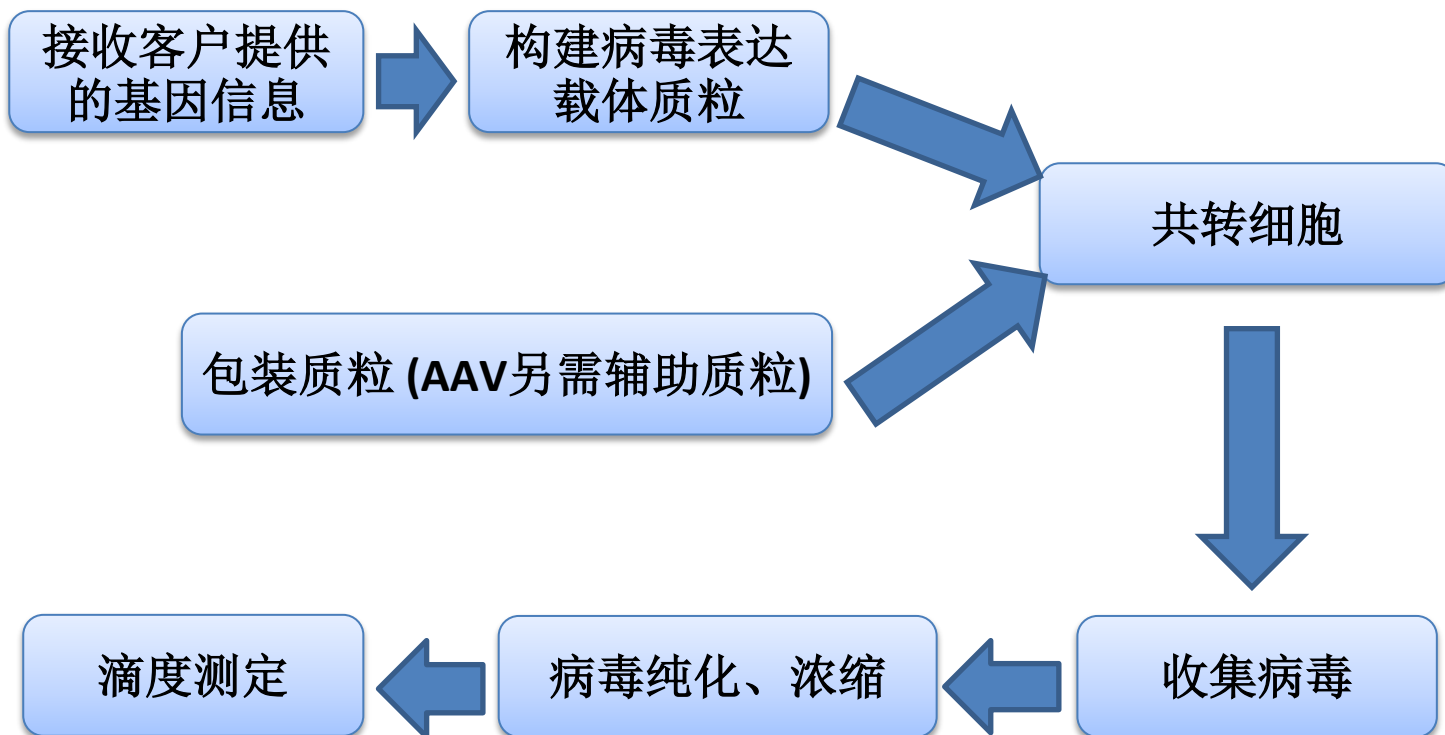
# 碧云天稳转细胞株构建技术服务

## 服务介绍

- 我们有着多年构建稳转细胞株的经验，已在H1299、THP-1、MCF7/ADR、A549、V79、MC3T3-E1、CHO、SiHa、3D4/2、HL7702、SW480、HepG2、SGC-7901、MGC-803、HT-29、Saos-2、U-2os、PC12、SK-BR-3、MCF-7、HMSC-ad、GIST-T1、HEK293、293T等多个种属细胞中成功构建过表达和RNAi稳转细胞株。

# 碧云天病毒包装技术服务

## 服务流程



➤ **询价与订购：**

[service@beyotime.com](mailto:service@beyotime.com)

# 碧云天病毒包装技术服务

## 服务内容

### ➤ 客户提供

- 客户提供含有目标基因的质粒（提供测序图谱）或所要表达/干扰的目的基因的名称、种属、序列，Genebank Accession Number；
- 客户告知所需要的病毒滴度及总量，以及病毒是否需要纯化；
- 其他要求。

### ➤ 碧云天交付

碧云天为客户提供病毒相关产品及相应的技术资料，包括：

- 与合同相符的病毒产品及对照病毒（构建好的稳定细胞系，若有）；
- 完整的实验报告。

# 碧云天病毒包装技术服务

## 服务内容

### 病毒的运输、保存

- 病毒产品一般采取干冰运输，腺病毒及腺相关病毒也可以采用冰袋运输。
- 避免重组病毒反复冻融，请酌情分装后于-80℃保存，建议不要在-20℃下长期保存。在我们提供的保存液中，病毒产品-80℃保存期为半年。建议保存6~12个月以上的样品，进行实验前，重新测一次滴度。病毒产品解冻后最好保持在冰浴中，并尽快使用。如果解冻后的病毒一时用不完，滴度足够高时，4℃可保存1~2周。但最好尽快用完，根据我们的经验，4℃放置1周，滴度会有4~5倍的下降。

### 病毒载体种类的选择

- 操作难度上慢病毒与腺病毒都差不多,是指重组病毒的制备和纯化角度来说的, AAV的制备就更复杂更难一些。
- 从载体毒性而言, 慢病毒毒性较大, 但它相对较少引起受体的免疫原性, 而腺病毒则有较大的免疫原性。腺相关病毒载体是比较理想的基因治疗载体, 免疫原性较低, 而且对受体伤害较少。
- 从插入目的基因角度考虑, 慢病毒最大插入基因长度是5k, 腺病毒最大插入基因长度是8k, 腺相关病毒最大插入长度是3k。
- 至于你的实验是选择腺病毒好, 还是慢病毒或别的病毒载体好, 主要还看具体实验目的, 其次才是看那种病毒载体容易操作。

### 重组病毒的纯化

- 病毒纯化是很必要的，因为细胞裂解液包含有缺损颗粒、大量的病毒外壳和penton蛋白(细胞毒素)、培养基、血清以及细胞碎片。这些杂质如果被注入动物体内，会引起宿主强烈的免疫反应。另外，纯化的作用还包括可以将病毒浓缩至一定浓度便于注射、使病毒悬浮于适于体内注射的缓冲液中等。

### 病毒载体的浓缩和稀释

- 浓缩：对于一般实验室用户，可以采用高速离心办法浓缩。目前市面上的病毒浓缩纯化办法很多，有不少商业化产品。不同的病毒纯化办法不同，腺病毒载体可以用300K以下的浓缩离心管(PALL 公司产品)进行浓缩。一般来说浓缩后的滴度以不超过 $3 \times 10^{12}$ vp/ml为宜，过浓可能导致病毒聚集而产生沉淀。
- 稀释：在实验过程中稀释病毒产品的等渗溶液没有其他特殊要求，常规的动物试验用等渗溶液即可，如PBS、生理盐水等。稀释后的样品尽量一次用完。

### 病毒滴度单位

- VP：病毒颗粒(viral particle)，是“活”（有感染性）和“死”（无感染性）的腺病毒颗粒的总量。在体内实验中，它代表了进入肌体可能引起宿主针对腺病毒的免疫反应的腺病毒颗粒总量。测定方法是OD260法，只有经过纯化的腺病毒才能通过此方法测定VP/ml值。
- PFU：空斑形成单位(plaque formation unit)，是有感染性的“活”的腺病毒的总量，即腺病毒的活性单位。测定方法是将腺病毒样品经过一系列梯度稀释后，感染293细胞并培养，通过计算细胞病变空斑数得到腺病毒样品中PFU/ml值。
- IU：感染单位(infectious unit)，和PFU一样，是另一种腺病毒活性单位。测定方法是TCID50法。
- VP/PFU或VP/IU的值是判断腺病毒纯品中活病毒所占比例的重要依据。如果该病毒产品要用于人体实验，按中国生物制品质量要求，该比值应该在33以下。用于普通实验研究，该比值要求可以适当放宽。



### 感染细胞最佳MOI的测定

- MOI(Multiplicity of Infection , 感染复数)是指每个细胞感染的病毒数 , 通常MOI越高 , 病毒整合到染色体的数量以及目的蛋白的表达量越高。
- 对于分裂活跃的细胞 , 比如HeLa、293细胞 , MOI=1时 , 80%以上的细胞均表达目的基因。而对于非分裂细胞 , 比如原代细胞 , 感染效率较低。我们建议通过比较不同MOI(比如0、1、5、10、50、100等) , 选择适合的MOI进行实验(可以考虑选用携带报告基因的病毒 , 比如Lenti-EGFP)。

### 病毒包装实验室安全

- 病毒载体已经被全世界许多实验室应用，没有出现过任何意外，但仍具有潜在的产生复制型病毒(RCL)和致癌的风险，操作者在实验中仍需要保持高度警惕！
- 所有操作均应尽量在BSL2级生物安全柜中进行，并佩戴一次性口罩和手套，尤其要避免病毒接触口、眼、鼻、耳、伤口等身体开放性区域，避免产生气溶胶，tip头一定要选择带有滤芯的。必须高度注意被污染的尖锐物品，包括针头、注射器、载玻片、移液管、毛细玻璃吸管和解剖刀。每次实验后，立即清理所有接触过病毒的器具，均应高压消毒再进行下一步处理。显微镜台、生物安全柜台面等使用后，用70%乙醇擦拭。意外洒落的含病毒的液体，用卫生纸吸干后，用0.6%次氯酸钠溶液浸泡被污染处1h。装盛病毒载体的实验用品，要单独放置，标示清楚，并标注“危险品”字样。尽量使用培养瓶，不要使用培养板来感染病毒，以防意外洒落。对共用实验室的人员进行病毒安全培训或提示。

### 病毒载体安全性

- 病毒载体的安全性是业界一直关心的问题。尽管病毒载体都删去了致病基因，但病毒在包装过程中会发生基因重组，存在致病风险性。该问题需要更多的实验进行验证。
- 病毒载体的免疫原性各不相同。关键在于如何使用载体，应针对不同疾病选用不同载体。
- 比如腺病毒载体的免疫原性很强，一般用于治疗肿瘤和用做疫苗载体。这时其免疫原性并不是什么缺点，反而还有好处，起到免疫佐剂的作用。
- 反转录病毒载体和AAV病毒载体的免疫原性很弱，用于需要长期表达和忌讳引起免疫反应的情况，比如自身免疫性疾病。

### 目的基因的长度要求

- 有AAV的总包装容量是4.7kb，载体中ITRs(两个ITR共290 bp)+hCMV(约750 bp)+polyA(约150 bp)约1200bp，所以如果用AAV包装载体，目的基因长度要求不超过3.5kb。
- 相对应慢病毒目的基因长度不超过5kb，腺病毒载体目的基因长度要求不超过8kb。

### 重组病毒载体在细胞上如何做出满意的结果

- ①病毒载体在不同的细胞由于细胞表面受体的差异而不同转导效率不同，尽量选择转导效率高的细胞，可用参考文献报道和转导报告基因进行筛选。
- ②良好的细胞状态，最好在细胞状态最佳时感染病毒。特别是不要在消化细胞后不久就感染，因为此时细胞膜上的病毒受体往往受到了暂时的破坏，应该培养过夜后再感染病毒，效果较好。
- ③ 适当的转导MOI(病毒基因组数/细胞的比)，一般可用 $10^5$ 上下做倍比稀释。
- ④ 适当的转导体积，如24孔板可用200ul，6孔板0.5ml。
- ⑤ 转导时间为1-2h，每25分钟晃动培养板混匀一次。(转导时，最好换用无血清培养基，因为血清对病毒的感染有些许不利影响)
- ⑥ 可加合适辅助药物刺激，增强表达。
- ⑦ 蛋白表达检测时间要适当，如是分泌蛋白可每24h连续取培养上清检测。通常蛋白表达量在几百纳克至几微克/ml水平。

### 重组病毒载体在动物体内如何做出满意的结果

- ①选择适当的血清型：例如不同的AAV血清型在动物体内同一组织有不同的转导效率，如AAV1在肌肉组织中、AAV5在肺组织中有很高的转导效率。
- ②选择适当的靶器官：同一血清型AAV在不同的组织具有不同的转导效率，尽量选择转导效率高的靶器官。
- ③转导途径：尽量选择局部直接多点注射靶器官。
- ④转导病毒量：根据我们的经验，所加病毒量太多表达量反而会降低。
- ⑤检测时间：根据我们的经验不同基因的表达高峰时间是不同的，一般在2周可检测到基因表达，如无抗体产生的影响，基因的表达可持续表达半年以上的时间。

# Thank You



碧云天网站



微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology  
订购热线：400-168-3301或800-8283301  
技术咨询：info@beyotime.com  
技术服务：service@beyotime.com  
网址：<http://www.beyotime.com>