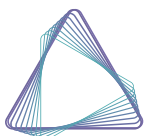
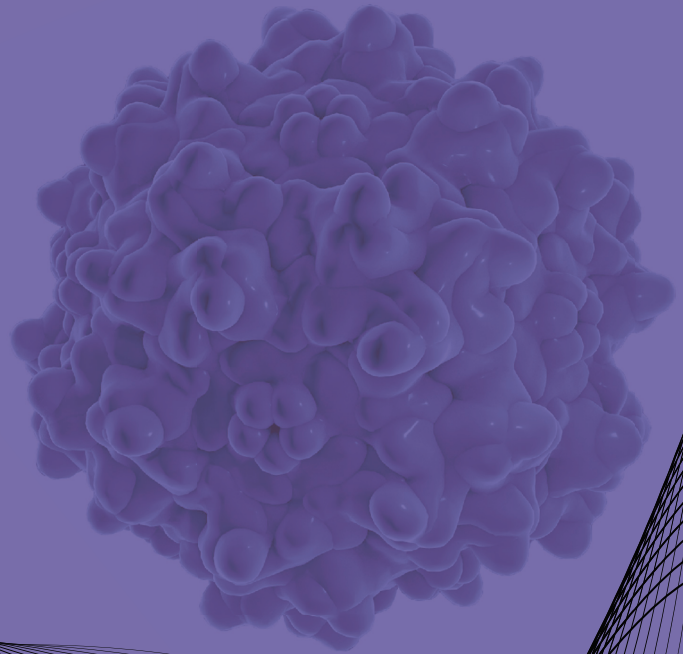


腺相关病毒(AAV) 反向末端重复序列(ITRs)测通方法

腺相关病毒基因组(AAV)的反向末端重复序列(ITR)能形成高度稳定的二级结构，利用现有技术很难进行序列验证。为了突破这重障碍，Azenta安升达创研自主知识产权技术，运用原创的测序方法，清晰地分析这些复杂序列，助力研发人员有效地评估ITR区域的完整性。



背景介绍

腺相关病毒(AAV)是一种单链DNA病毒,通常用于基因治疗,作为载体将遗传物质直接传递给患者。AAV基因组的每条单链DNA由4680个碱基构成,包括两端145bp的反向末端重复序列(ITR)和中间的2个开放性阅读框。ITR在病毒复制和包装过程中起了关键作用,并且参与了病毒基因组的整合以及从宿主基因组切除的过程。ITR序列中CG含量达80%以上,其前125bp(1~125)序列依次可分为A、B、B'、C'、C、A'等不同的区段(图1),其中B与B'、C与C'反向互补,可形成T型发夹结构,作为AAV的DNA自我复制的起点,随后的20bp形成特有的D序列。



图 1: AAV2 的 ITR 序列的示意图

ITR 由两个臂回文 (B-B' 和 C-C') 和一个长茎回文 (A-A') 组成。D 序列在 AAV 基因组的每一端只出现一次

面临挑战

目前的技术,可以通过限制性内切酶的酶切反应来研究ITR的定位及其完整性。但凝胶电泳的分辨率较低,很难检测到点突变或小缺失。

直接对ITR区域进行测序可以提供足够的分辨率,但是由高GC含量和长的回文序列(>100bp)组成的T型发夹结构会抑制普通Sanger测序试剂盒中的聚合酶链式反应,导致测序失败。

由于二级结构在线性模板中不稳定,所以通过PCR扩增ITR区域,然后对扩增产物进行测序可以得到更好的结果。然而,这种两步法的测序需要特殊的引物设计和循环设置。并且这种检测方法对于ITR区域的两端的序列要求较高,成功率也不能保证。

解决方案

为了解决这一难题，安升达开发了一种新型的ITR测序方法，可以改善ITR区域的测序信号并延长读取长度。

为了验证我们的ITR测序方法并与标准方法进行比较，我们首先使用T公司的测序试剂盒对含有AAV2 ITR的质粒进行测序。在ITR发夹开始处，测序信号突然下降(图2)，导致测序过早终止。

这一结果不能通过添加常见的添加剂，如DMSO和/或甜菜碱来改善。而安升达的新型AAV-ITR测序方法可以测通ITR发夹结构，并且在整个ITR区域没有明显的信号损失，达到了与常规测序反应类似的读取长度(图3)。

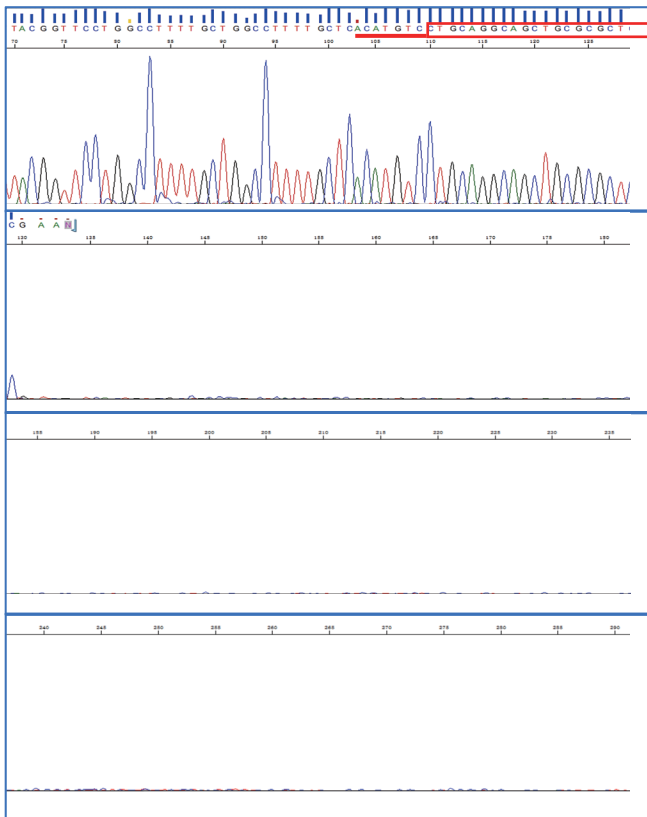


图 2：使用 T 公司的测序试剂盒对 AAV2 的 ITR 区域进行测序。红色下划线标记序列后的碱基“CCTGC”是一个无法成功测序的发夹结构的开端。

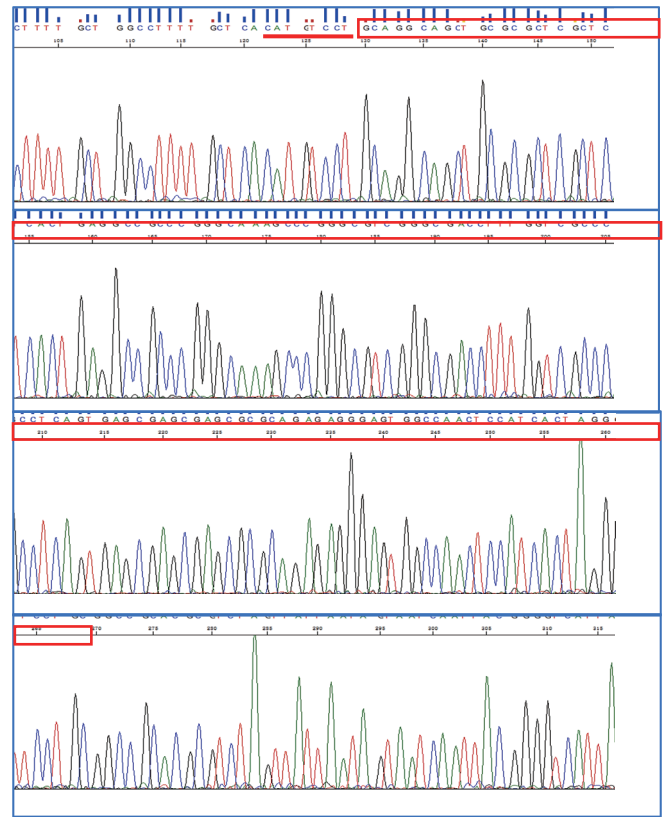


图 3：使用 Azenta 安升达 AAV-ITR 测序法测定 AAV2 的 ITR 区域的色谱图。红色下划线的序列表示图 2 中提到的相同序列。红框内显示完整的发夹结构。

rAAV质粒中ITR完整性的定性评价

目前, rAAV质粒主要在细菌中扩增。然而, 由于细菌中同源重组系统, ITR经常发生重排。细菌繁殖后, rAAV质粒中最常见的突变之一是ITR的B-B' 或C-C' 臂缺失(图4)。这种缺失使T型ITR发夹的茎更长, 比野生型ITR更加稳定。在对数百条来自不同细菌细胞系中扩增的rAAV质粒进行测序后, 我们发现, Azenta 安升达 AAV-ITR 测序方法可以测通野生型ITR序列(图4和图5A)以及更有挑战性的缺失突变的ITR序列(图5B), 并且能帮助定性评估ITR区域甚至是被部分截断的ITR区域的完整性(图5C)。

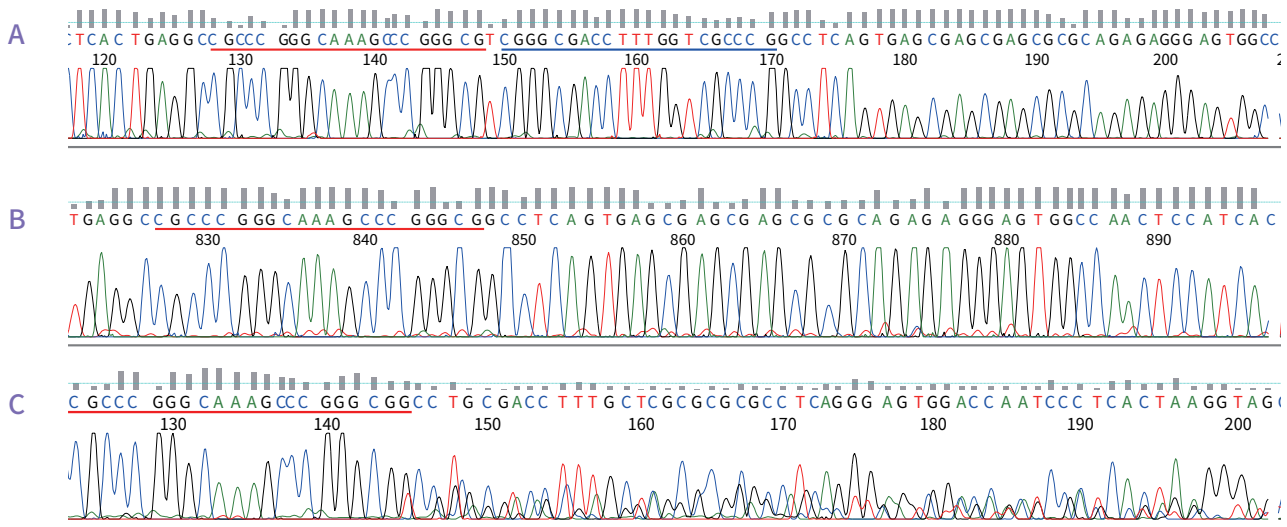
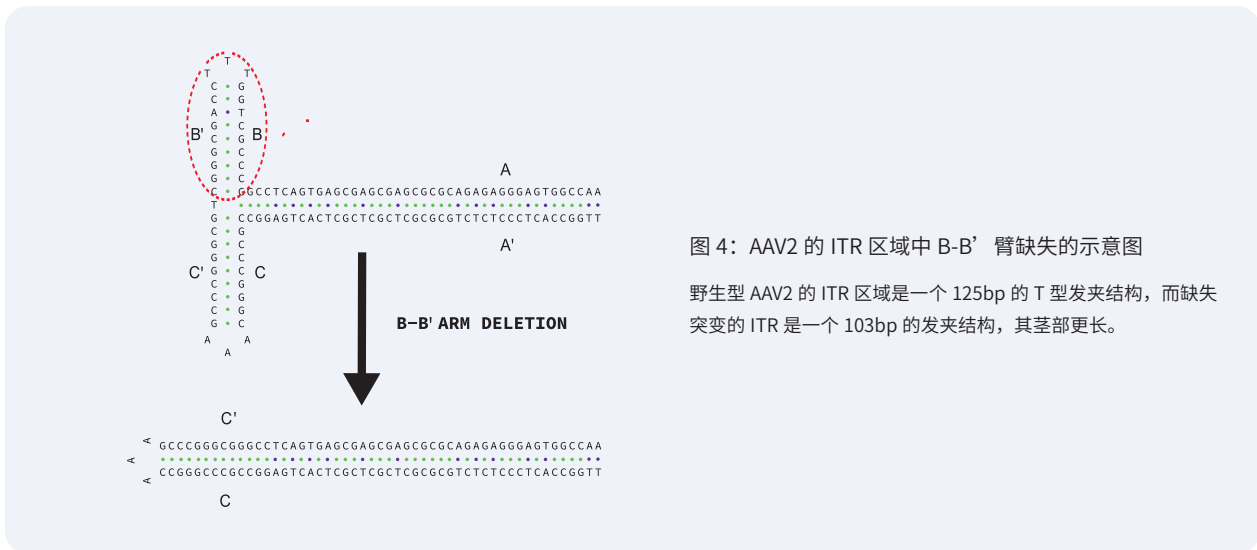


图 5: 利用 Azenta 安升达 AAV-ITR 测序方法分析 rAAV 质粒中 ITRs 的完整性

A) Azenta 安升达 AAV-ITR 测序法测定野生型 AAV2 的 ITR 区域的色谱图。C-C' 臂和 B-B' 臂分别用红色和蓝色标出。

B) Azenta 安升达 AAV-ITR 测序法对 AAV2 的缺失突变 ITR 区域进行色谱分析。测序结果显示 B-B' 臂出现缺失。

C) Azenta 安升达 AAV-ITR 测序法测定缺失突变的 AAV2 ITR 区域的色谱图。测序结果表明, 该质粒是完整 ITR 和缺失突变 ITR 的混合物。

在 155-157bp 处的 TTT 峰与完整的 ITR 序列一致, 其中存在缺少 B-B' 臂的质粒模板。

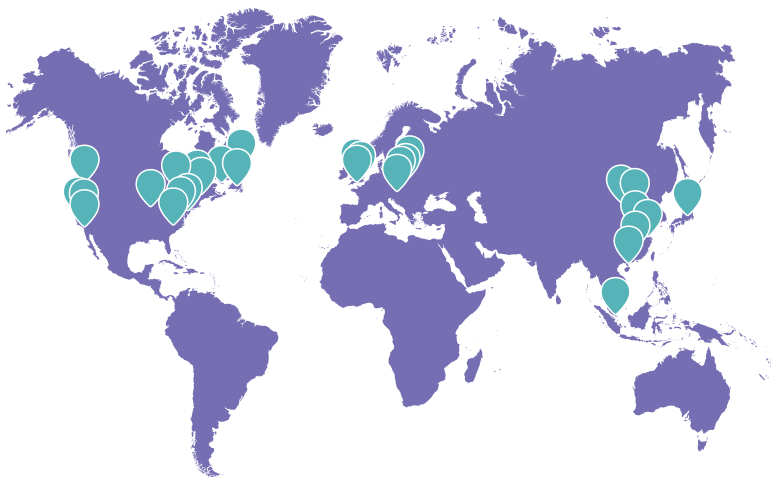
订购流程

- 下载《Azenta安升达ITR测序送样单》按要求填写并发送至邮箱:Support.Asia@Azenta.com
- 将样品按送样要求寄送或交给取样员
- 等待ITR测序结果(3-5个工作日)
- 完成测序

送样要求

- 样品类型:质粒
- 样品浓度: 200ng/μl-400ng/μl(最低不能低于150ng/μl, 浓度过高需稀释)
- 送样体积: 体积≥10μl, 每增加一个反应, 送样体积增加5μl
- 样品介质: 使用双蒸水溶解
- 引物要求: 遵循引物设计规范, 且设计的引物位置距离ITR区域150-350bp
- 其他要求: 送样时需注明浓度和质粒大小, 外包装需明显标注“ITR测序”字样

关于安升达



Azenta是全球领先的生命科学解决方案供应商, 致力于助力全球的生命科学组织更快地将重大突破性进展和疗法推向市场。Azenta 为全球业内顶尖的制药、生物技术、学术和医疗机构提供全套可靠的冷链样本管理解决方案和基因组服务, 涵盖药物开发、临床研究和先进细胞疗法等领域。

Azenta 总部位于马萨诸塞州切姆斯福德, 业务遍及北美、欧洲和亚洲。如需更多信息, 请访问 www.azenta.com。

更多详细信息可咨询Enews.China@azenta.com



AZENTA 安升达
LIFE SCIENCES

400-8100-669

Azenta Life Sciences 11025-B-CN 0322