

病毒包装



病毒载体是一种常见的基因转移载体,利用病毒载体可以将外源基因片段导入宿主细胞中。病毒载体在基础科学和临床研究中应用广泛,如稳定细胞株构建、gRNA文库筛选、转基因动物制备、临床治疗研究和疫苗研究等。

Azenta安升达凭借多年的科研服务经验,不断优化病毒包装流程和检测流程,可提供高质量的病毒包装服务,涵盖慢病毒、腺病毒、腺相关病毒和SARS-CoV-2假病毒等服务类型。

慢病毒

慢病毒(Lentivirus)载体是以HIV-1(人类免疫缺陷I型病毒)为基础发展起来的基因治疗载体(RNA类病毒),可有效感染神经元细胞、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。对于一些较难转染的细胞,如原代细胞、干细胞、不分化细胞等,使用慢病毒载体,能提高目的基因、shRNA或sgRNA的转导效率。

服务优势

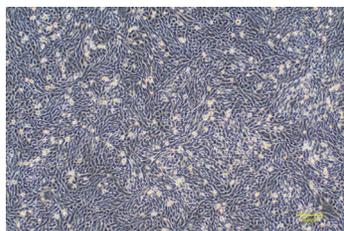
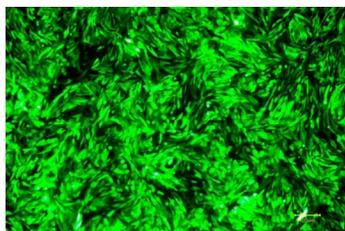
- 安全性好
- 可感染多种类型细胞
- 稳定高效表达
- 片段容量大
- 免疫原性低
- 病毒滴度高,总量大

服务类型

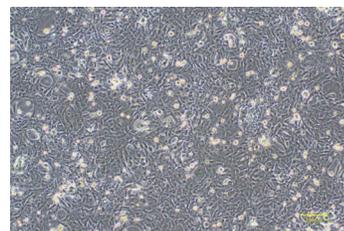
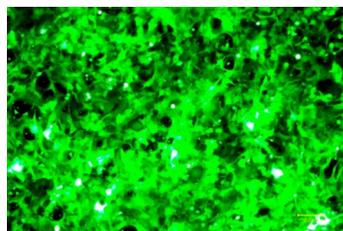
根据不同的需求,Azenta安升达可灵活配置多种类型的病毒包装服务。

需求	服务类型
载体类型	过表达慢病毒/sgRNA慢病毒/micRNA/shRNA干扰慢病毒/ 文库慢病毒/RNA假病毒/其他定制化慢病毒
周期	标准订单(12-15个工作日)/ Turbo订单(8-10个工作日)
纯化方式	普通纯度/高纯度
滴度	1.0E+08 TU/mL / 1.0E+09 TU/mL

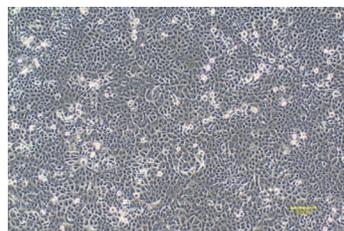
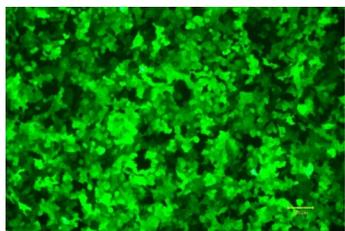
*客户提供序列进行基因合成,需额外增加费用与周期



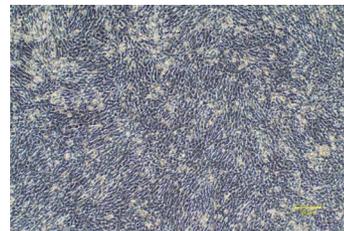
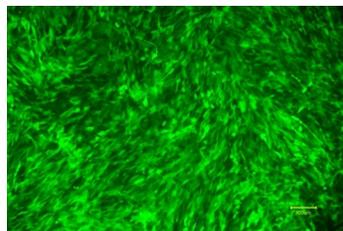
安升达参照慢病毒感染CHO-K1细胞 (MOI=10)



安升达参照慢病毒感染NCI-H1975细胞 (MOI=100)



安升达参照慢病毒感染A549细胞 (MOI=5)



安升达参照慢病毒感染NIH-3T3细胞 (MOI=10)

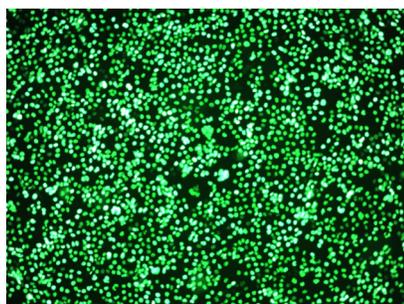
腺病毒

腺病毒 (Adenovirus) 载体是以腺病毒为原型进行基因功能改造而成, 无外壳的约36 kb长的线性双链DNA病毒, 感染范围广, 几乎可以感染所有的分裂和不分裂细胞系、原代细胞和部分组织, 感染效率高达100%, 滴度高, 可容载高达8 kb外源基因, 通过内吞作用进入细胞内, 但不整合到宿主细胞基因组中, 瞬间表达安全性高, 是一种最具潜力的基因递送工具。

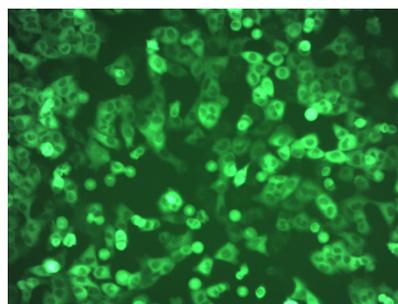
服务优势

- 感染效率高: 体外实验通常接近100%的转导效率
- 节约成本: 可以在体外扩增, 每次使用完后, 可以自己用包装细胞进行扩增
- 安全性高: 进入细胞内并不整合到宿主细胞基因组, 仅瞬间表达

腺病毒感染效果图



AdV-Hela



AdV-A375

腺相关病毒

腺相关病毒 (AAV) 载体是属于微小病毒科依赖病毒属,是目前发现的一类结构最简单的单链DNA缺陷型病毒,需要辅助病毒(通常为腺病毒)参与复制。根据衣壳的差异,目前AAV可分为12种血清型和100多种变异体,不同的血清型对组织有不同的亲和性。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,被视为最有前途的基因转移载体之一,在世界范围内的基因治疗和疫苗研究中得到广泛应用。

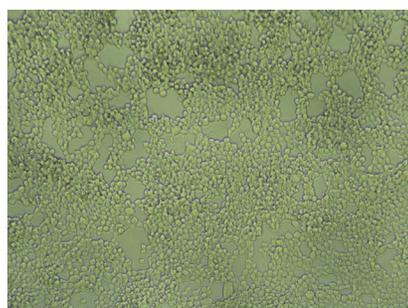
服务优势

- 安全性好,迄今未发现AAV对人体致病
- 多种血清型,宿主范围广,能够转染分裂和非分裂细胞
- 免疫原性低
- 物理性质稳定
- 利用AAV可实现基因长期稳定表达

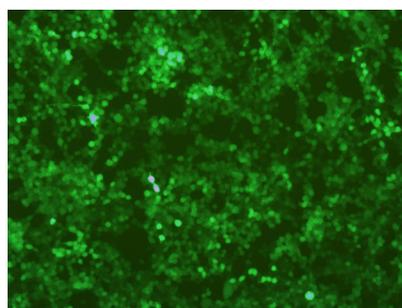
服务详情

服务	服务说明	周期	滴度	规格	备注
腺相关病毒 (AAV) 包装	过表达腺相关病毒包装 shRNA干扰腺相关病毒包装	12个工作日	1.0E+12 GC/mL	1 mL	赠送少量对照病毒; (常规产量血清型)
		12个工作日	1.0E+13 GC/mL	1 mL	赠送少量对照病毒; (常规产量血清型)
腺病毒包装	病毒包装 滴度检测	45个工作日	1.0E+10 PFU/mL	1 mL	包含数据报告; 赠送对照阴性病毒

腺相关病毒感染效果图



AAV-293T-1



AAV-293T-2

假病毒

假病毒是一类嵌合型病毒颗粒,是在一种复制缺陷型病毒(病毒载体)的表面上表达另一种病毒的重组糖蛋白的嵌合病毒颗粒。假病毒因为其生物安全性和稳定性等优点,已被广泛应用到疫苗研发,抗体中和研究,模拟病毒侵染细胞功能实验,检测试剂盒阳性参照等。

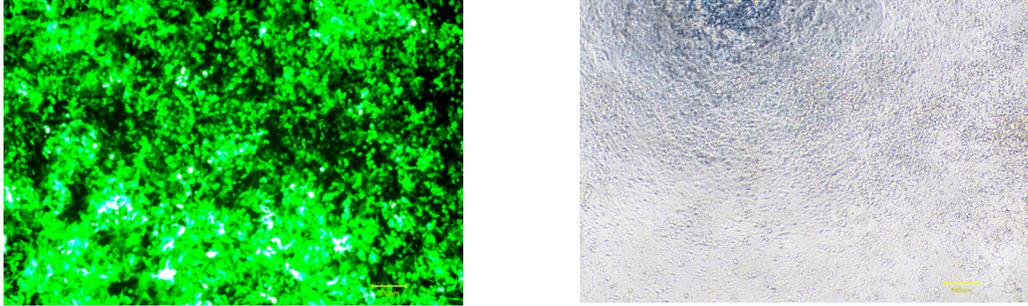
目前的SARS-CoV-2相关的假病毒系统主要有两种:一种是利用慢病毒系统构建的慢病毒蛋白外壳包裹SARS-CoV-2的ORF1a/b,N,E等基因,可用于核酸类检测试剂盒的阳性对照。另外一种是利用SARS-CoV-2的Spike蛋白包裹Luciferase/GFP等标记,可用于抗体中和试验,模拟病毒侵染细胞,抗体类检测试剂盒的阳性对照等。

Azenta安升达可以提供以上两种类型的假病毒,涵盖多种突变类型,可以提供定制化服务,满足个性化需求。此外,安升达还可提供过表达ACE2的293细胞,用于模拟病毒侵染实验。

服务详情

产品类型	产品名称	产品说明	产品标准	周期
核酸标准 品类假病毒	新冠RNA片段假病毒现货	慢病毒+SARS-CoV-2的ORF1a/b部分基因, E, N全基因	发货量:1.0E+09 copies/mL	3个工作日
	定制化RNA片段假病毒	慢病毒+定制化检测片段	发货量:1.0E+09 copies/mL	咨询
	定制化DNA片段假病毒	腺病毒or AAV+定制化检测片段	咨询	咨询
膜蛋白外壳类 假病毒	SARS-CoV-2假病毒现货	新冠病毒Spike S外壳+GFP or Luciferase标记	发货量:1.0E+7 TU/mL	3个工作日
	SARS-CoV-2(突变型, D614G/delta/Omicron等)假病毒现货	新冠病毒Spike S突变型+GFP or Luciferase标记	发货量:1.0E+7 TU/mL	3个工作日
	SARS-CoV-2(突变型, 客户定制化S蛋白突变)假病毒现货	新冠病毒Spike S突变型(客户指定突变)+GFP or Luciferase标记	发货量:1.0E+7 TU/mL	咨询
	SARS或MERS假病毒准现货	SARS或者MERS冠状病毒Spike蛋白+GFP or Luciferase标记	发货量:1.0E+7 TU/mL或1.0E+9 copies/mL	5-10个工作日
	定制化外壳蛋白假病毒	定制化外壳膜蛋白+GFP or Luciferase标记	咨询	咨询
	ACE2-293T现货	稳定表达ACE2受体蛋白的HEK-293T单克隆稳转细胞系	稳定表达ACE2的单克隆稳转细胞系一株(不少于1.0E+6 cells)	3个工作日
	定制化ACE2稳转细胞系服务	稳定表达ACE2受体蛋白的定制化目的单克隆细胞系	稳定表达ACE2的单克隆稳转细胞系一株(不少于1.0E+6 ccells)	6-10周

假病毒感染效果图



SARS-CoV-2假病毒感染ACE2-293T细胞效果图

病毒包装常见问题解答

Q 如何定义慢病毒滴度单位 (TU/ mL)?

A 安升达采用qPCR法测定慢病毒活性滴度(病毒感染HT1080细胞后,提取细胞基因组DNA,进行qPCR检测),滴度单位为TU/ mL,即每毫升病毒液中具有生物活性的慢病毒颗粒数。TU, Transducing Units, 转导单位。相比于其它滴度检测方法(如:p24 ELISA法、荧光FACS法等),qPCR法测定慢病毒活性滴度的优势在于其更真实准确地反映了慢病毒的活性颗粒数。例如:慢病毒滴度标注为1.0E+08 TU/mL,即每毫升病毒液中含有1.0E+08个具有生物活性的病毒颗粒(病毒颗粒能感染细胞并整合到基因组上)。

Q 什么是MOI?

A MOI (Multiplicity of Infection, 感染复数) 是指在感染时病毒与细胞的数量比值 ($MOI = \text{病毒总数} / \text{细胞总数}$)。不同类型细胞的感染效率(感染病毒的细胞数与总细胞数之比)相差较大,需要通过预实验摸索病毒与细胞数量的合适比例。提高MOI值可以增加感染效率,但过量的病毒也可能导致细胞死亡。安升达将某种类型细胞的病毒感染效率达到80%左右时的MOI值称为该类型细胞的最佳MOI值。

Q 病毒融化条件是选择在37°C水浴锅中快速融化还是冰上放置缓慢融化?

A 这两种方法理论上来说都可以,只要避免病毒的反复冻融即可,但是我们在实验过程中发现,冰上缓慢融化对病毒活性更有利,所以建议客户采取冰上缓慢融化的方法。

Q 通常在转移载体中最大能够插入多大的目的基因序列?

A 通常在转移载体中插入目的基因序列的大小不应超过4 kb,否则会影响病毒滴度甚至是目的基因表达。

Q LV-Assistant有什么用?在感染时是否需要添加?

A LV-Assistant是助染试剂,主要成分为非离子表面活性剂,可以通过提高细胞表面活性,大大增加病毒与细胞的接触面积,促进病毒更好的感染细胞,通常在感染时添加LV-Assistant,可以提高2~10倍的感染效率。但是LV-Assistant对细胞有一定毒性,因此在感染时是否需要添加LV-Assistant,以及需要添加的浓度,可通过预实验在1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内进行筛选,以24 h内细胞无明显毒性反应为佳, LV-Assistant最常用的工作浓度为6~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

Q 用于慢病毒感染的细胞接种量是多少？

A 将状态良好的目的细胞接种到24孔板中，细胞密度一般为 $1.0E+05$ cells/mL，每孔500 μ L。接种细胞数量需考虑到细胞状态、生长快慢等因素，一般是保证病毒感染时细胞融合度达到50%~70%为佳。

Q 在使用慢病毒产品时，为什么我按照文献上对应细胞的MOI值感染目的细胞，实际结果和预期结果差别较大？

A 主要有以下原因：

- 1) 不同公司在进行慢病毒滴度检测的时候，选择的滴度检测方法可能有所不同，有些采用荧光法进行检测，有些采用qPCR法进行检测，因此滴度检测结果会有一定差异，但是每一种检测方案都是行业认可的；
- 2) 不同公司或客户对于MOI值的定义不一样，建议客户在收到本公司的慢病毒产品后，按照产品使用手册进行预实验，确定病毒与细胞数量的最佳比例。

Q 加入慢病毒之后，目的细胞死亡很多，这是为什么？

A 主要有以下原因：

- 1) 慢病毒可能对您的细胞有毒性，需降低病毒量再次感染；
- 2) 感染时细胞状态差导致细胞死亡，尝试调整细胞状态再次感染；
- 3) 普通纯病毒含有较多杂质，细胞耐受性不好导致死亡，建议更换高纯病毒感染。

Q 为什么慢病毒质粒转染293T的荧光很强而慢病毒感染293T的弱呢？

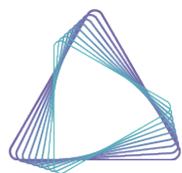
A 由于转染和感染都是在293T细胞中进行的，荧光表达差异的原因可能与以下几点有关：

- 1) 性质差异：转染是带有目的基因的转移载体在转染试剂作用下强行进入细胞的过程，而感染是慢病毒颗粒和目的细胞相互作用，通过受体结合等过程进入细胞；
- 2) 表达环节不同：转移质粒进入细胞后，目的基因先转录为mRNA，再翻译为蛋白质，这个过程相对较快；而慢病毒是RNA逆转录病毒，感染细胞后，需要先逆转录为DNA，再整合到目的细胞的基因组上，随后才能转录为mRNA，并翻译为蛋白质。慢病毒的表达高峰一般为感染后72~96小时，根据细胞的代谢情况有提前或延迟；
- 3) 拷贝数不同：转染293T的转移载体拷贝数可达到1000以上/细胞，而慢病毒感染293T的拷贝数大概在10左右/细胞，相差了有100倍左右。

Q Gene-GFP融合慢病毒可以感染目的细胞，但GFP荧光强度较低？

A Gene-GFP融合慢病毒感染细胞后GFP表达弱可能由以下几个因素引起：

- 1) 元件顺序：Gene-GFP融合表达，GFP处于目的基因的3'端，GFP蛋白的表达水平会受到目的基因的大小影响，通常接入的基因越大，GFP荧光越弱；
- 2) 目的基因的功能影响GFP的表达：对于核定位、膜定位、分泌类的蛋白与GFP融合表达，观察到的GFP荧光强度会受到目的蛋白功能的影响。通常在同等基因大小条件下，无定位趋势的Gene-GFP融合蛋白的荧光强度要远高于有定位趋势的Gene-GFP融合蛋白的荧光强度。



AZENTA 安升达
LIFE SCIENCES



400-8100-669

Azenta Life Sciences 17003-B-CN 0322