



西安基恩科生物科技有限公司

# AAV病毒使用操作手册



创新基因递送 服务人类健康

Innovative Gene Delivery For Human Health

## 前言

腺病毒相关病毒(AAV)最早是在20世纪60年代中期从实验室腺病毒(AdV)制剂中发现的，并且很快就在人体组织中发现。AAV属于细小病毒科，Dependoparvovirus属。它的生命周期依赖于辅助病毒的存在，例如AdV。

AAV存在于多种脊椎动物中，包括人类和非人类灵长类动物(NHP)。目前的共识认为AAV不会引起任何人类疾病。它由直径约 26nm 的二十面体蛋白质衣壳和~4.7 kb 的单链 DNA 基因组组成。衣壳包含三种类型的亚基VP1、VP2和VP3，总共 60 种拷贝，比例为1:1:10(VP1:VP2:VP3)。基因组的两端是两个T形反向末端重复序列(ITR)，其末端主要用作病毒复制起点和包装信号。rep基因编码病毒复制所需的四种蛋白质；它们以其分子量命名：Rep78、Rep68、Rep52 和 Rep40。cap 基因通过来自不同起始密码子的可变剪接和翻译编码三个衣壳亚基。此外，编码组装活化蛋白(AAP)的第三个基因在不同阅读框中的 cap 编码序列内编码，并且已显示出促进病毒粒子组装。



## 目 录

一、AAV 病毒的安全性 .....	01
二、AAV 病毒的储存与稀释 .....	02
三、AAV 病毒结构和表达方式 .....	02
四、AAV 病毒血清型 .....	04
五、组织特异性启动子 .....	06
六、AAV 病毒用于体外 ( In Vitro ) 实验 .....	08
七、AAV 病毒用于动物实验 ( in vivo ) .....	10
八、相关注射方法 .....	13
8.1.肺部的注射方法 .....	13
8.2.成年鼠尾静脉注射 .....	14
8.3新生小鼠静脉输液 .....	15
8.4心脏的注射方法 .....	16
8.5 大鼠左心室心肌直接注射 .....	17
8.6 大鼠超声微囊泡靶向心脏AAV输送 .....	19
8.7 超声微囊泡破坏 .....	20
8.8 眼睛的注射方法 .....	21
8.9 小鼠玻璃体内注射 .....	22



## 一 AAV 病毒的安全性

在现有认知中，AAV 为各种病毒载体中免疫原性最低，几乎没有毒性，无致病性。在 NIH 对于生物技术制品的相关评级中，AAV 处于最安全等级 (RG1)。出色的安全性是目前 AAV 成为体内基因治疗的首选载体的主要原因之一，几乎 90% 的基因治疗临床试验都在使用 AAV，针对的疾病包括但不限于 B 型血友病、LPL 缺乏症、囊性纤维化、肌营养不良、帕金森氏病和 HIV 等。

表 1 按风险组划分生物危害剂的基础 (RG)

Risk Group 1 (RG1)	Agents that are not associated with disease in healthy adult humans
Risk Group 2 (RG2)	Agents that are associated with human disease which is rarely serious and for which preventive or therapeutic interventions are <i>often</i> available
Risk Group 3 (RG3)	Agents that are associated with serious or lethal human disease for which preventive or therapeutic interventions <i>may be</i> available (high individual risk but low community risk)
Risk Group 4 (RG4)	Agents that are likely to cause serious or lethal human disease for which preventive or therapeutic interventions are <i>not usually</i> available (high individual risk and high community risk)

### Appendix B-I. Risk Group 1 (RG1) Agents

RG1 agents are not associated with disease in healthy adult humans. Examples of RG1 agents include asporogenic *Bacillus subtilis* or *Bacillus licheniformis* (see Appendix C-IV-A, *Bacillus subtilis* or *Bacillus licheniformis* Host-Vector Systems, Exceptions); adeno-associated virus (AAV – all serotypes); and recombinant or synthetic AAV constructs, in which the transgene does not encode either a potentially tumorigenic gene product or a toxin molecule and are produced in the absence of a helper virus. A strain of *Escherichia coli* (see Appendix C-II-A, *Escherichia coli* K-12 Host Vector Systems, Exceptions) is an RG1 agent if it (1) does not possess a complete lipopolysaccharide (*i.e.*, lacks the O antigen); and (2) does not carry any active virulence factor (*e.g.*, toxins) or colonization factors and does not carry any genes encoding these factors.

Those agents not listed in Risk Groups (RGs) 2, 3 and 4 are not automatically or implicitly classified in RG1; a risk assessment must be conducted based on the known and potential properties of the agents and their relationship to agents that are listed.

### AAV 病毒安全使用规范：

- 1、病毒操作时最好使用生物安全柜。如果使用普通超净工作台操作病毒，请不要打开排风机。
- 2、病毒操作时请穿实验服，戴口罩和手套。
- 3、操作病毒时特别小心不要产生气雾或飞溅。如果操作时超净工作台有病毒污染，请立即用70%乙醇加1%SDS溶液擦拭干净。接触过病毒的枪头，离心管，培养板，培养液请于84消毒液或1%SDS中浸泡过夜后弃去。
- 4、用显微镜观察细胞感染情况时应遵从以下步骤：拧紧培养瓶或盖紧培养板。用70%乙醇清理培养瓶外壁后到显微镜处观察拍照。离开显微镜实验台之前，用70%乙醇清理显微镜实验台。
- 5、如需要离心，应使用密封性好的离心管，或者用封口膜封口后离心，而且尽量使用组织培养室内的离心机。
- 6、脱掉手套后，用肥皂和水清洗双手。

## 二 AAV 病毒的储存与稀释:

1、病毒的储存：收到病毒液后在很短时间内即使用AAV病毒进行实验，可以将病毒暂时放置于4℃保存；如需长期保存请放置于负80℃冰箱保存（病毒置于冻存管，并使用封口膜封口）

①病毒可以存放于负80℃冰箱6个月以上；但如果病毒储存时间超过6个月，建议在使用前重新测定病毒滴度。

②反复冻融会降低病毒滴度：每次冻融会降低病毒滴度10%左右；因此在病毒使用过程中应尽量避免反复冻融，为避免反复冻融，建议收到病毒后按照每次的使用量进行分装然后冻存。

2、病毒的稀释：如果需要稀释病毒，请将病毒取出置于冰浴融化后，使用培养目的细胞用无血清培养基(含血清或含双抗不影响病毒感染)或PBS稀释。混匀分装后4℃保存(请尽量在三天内用完)或负80度冰箱冻存。

## 三 AAV 病毒结构和表达方式:

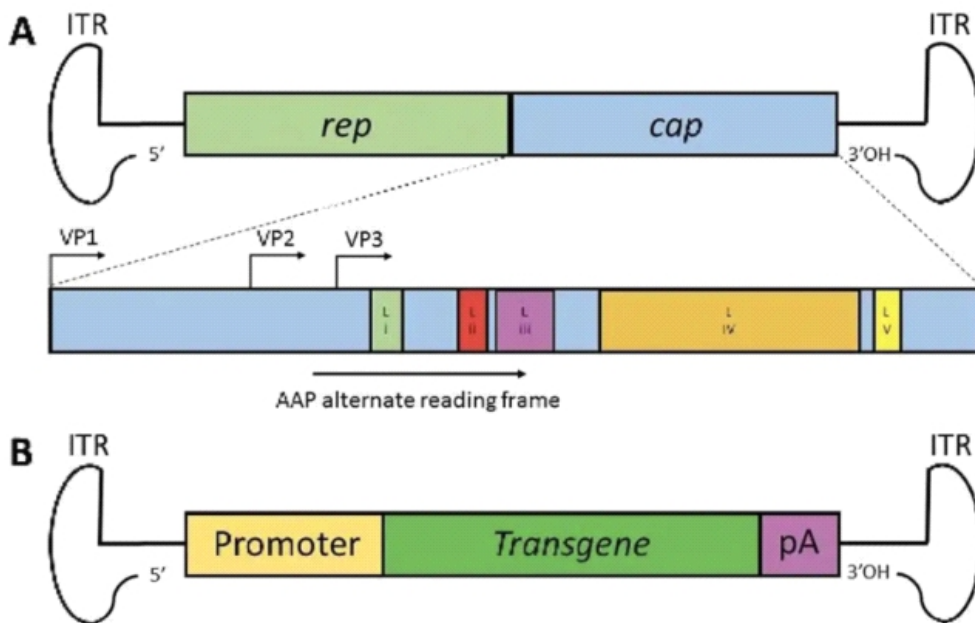


图 AAV病毒包装载体结构示意图

参数	慢病毒	腺病毒	腺相关病毒
病毒自身基因组	RNA	双链DNA	单链DNA
是否整合	整合到宿主细胞基因组上，稳定，长时间表达。	游离于宿主细胞基因组之外，瞬时表达。	游离于宿主细胞基因组之外，瞬时表达。
感染细胞类型	分裂和非分裂	分裂和非分裂	分裂和非分裂
克隆容量	< 4Kb外源基因，滴度随插入片段的大小增加而降低。	< 5Kb外源基因，滴度随插入片段的大小增加而降低。	< 3Kb外源基因，滴度随插入片段的大小增加而降低。
包装大小	大约6.6kb	大约8.3kb	大约4.7kb
免疫源性	低	高	很低
动物模型	可用于制备动物模型	不可用于制备动物模型	不可用于制备动物模型
优势	应用范围较广；转到效率高，可稳定遗传。	转导效率高；可携带大片段目的基因；可以扩毒。	免疫原性低；安全性高，有组织特异性亲和能力。

表1：常见种病毒横向对比

AAV的直径通常为20–25纳米。它可以很容易地进入靶细胞，并有效地将基因表达盒转移到细胞核中诱导转基因表达。然而，AAV的包装能力相对较小，不能有效包装超过4.7kb的基因。我公司可通过反剪切技术，同源重组技术，分子杂交技术来达到AAV系统的大尺寸基因表达。（Hirsch ML, Wolf SJ, Samulski RJ (2016) Delivering transgenic DNA exceeding the carrying capacity of AAV vectors. *Methods Mol Biol* 1382:21–39）。一些成功使用分离式AAV载体在细胞内表达的基因如下表所示：

病毒数量	重组方式	表达的基因	治疗的疾病
双	反剪切	Factor VIII	A型血友病
双	反剪切	EPO and EGFP	肾衰竭性贫血
双	反剪切	Dystrophin	肌营养不良
双	反剪切	Dysf	进行性肌无力

双	反剪切	AP and dystrophin	肌营养不良
双	反剪切	Von Willebrand factor	血管性血友病
双	同源重组	Dysf	进行性肌无力
双	同源重组	GDE	糖原储存病III型
双	同源重组	Dystrophin	肌营养不良
双	分子杂交	CFTR	囊性纤维化
双	分子杂交	ABCA4	黄斑变性病
双	分子杂交	LacZ and dystrophin	肌营养不良
双	反剪切, 同源重组, 分子杂交	ABCA4 and MYO7A	Usher综合征1B型
双	反剪切, 同源重组, 分子杂交, 基因碎片化	Dysf	进行性肌无力
双	反剪切, 同源重组, 分子杂交, 基因碎片化	MYO7A	Usher综合征1B型
三	反剪切, ITRs杂交	Dystrophin	肌营养不良
三	反剪切, 分子杂交	CDH23 and ALMS1	遗传性视网膜变性
三	同源重组, 分子杂交	Dystrophin	肌营养不良

表2:不同基因多病毒表达举例

#### 四 AAV 病毒血清型:

不同血清型AAV具有不同衣壳蛋白和组织特异性, 因而其识别与结合的细胞表面受体也有很大差异, 这也导致不同血清型AAV感染的细胞类型和感染效率各不相同, AAV各血清型介绍如下表所示。

血清型	组织亲和性
AAV1	肌肉, 心脏, 骨骼肌 (包括心肌), 神经组织, 平滑肌, 血管内皮细胞 (心脏, 肝脏, 脑, 肺)
AAV2	中枢神经, 肌肉, 肝脏, 脑组织, 眼,
AAV3	肌肉, 肝脏, 肺, 眼
AAV5	肺, 眼, 中枢神经, 关节滑膜, 胰腺
AAV6	肺, 心脏, 平滑肌, 胰腺
AAV6.2	肺, 肝脏, 内尔组织
AAV7	中枢神经系统, 脑, 视网膜, 肝脏
AAV7m8	视网膜, 内耳组织
AAV8	肝脏, 眼, 中枢神经, 肌肉, 脂肪组织
AAV9	心脏, 肌肉, 肺 (肺泡), 肝脏, 中枢神经, 骨细胞
AAVrh.10	中枢神经系统, 心脏, 肝脏, 肺, 血液系统
AAV-DJ	肝脏, 视网膜, 肺, 肾脏, 细胞(in vitro)
AAVDJ/8	肝脏, 眼, 中枢神经, 肌肉
AAV Rh10	肺, 心脏, 肌肉, 中枢神经, 肝脏, 细胞(in vitro)
AAV-PHP.eB	中枢神经系统
AAV-PHP.S	外周神经系统
AAV-ark313	小鼠T细胞
AAV9-DSS	骨
AAV-retro	神经系统 (逆向)
AAV2-EC71	小鼠血管内皮细胞
AAV-BR1	脑血管内皮细胞
AAV-shh10	视网膜Muller胶质细胞
AAV-rh74	肌肉 (血管系统进入)
AAV2-sig	内皮细胞特异性血清型
AAV9-ENT	内皮细胞高转导血清型
rAAV2/cMG	小胶质细胞特异性血清型
AAV r3.45	大小鼠神经干细胞 (NSCs)
AAV2/7M8	耳蜗毛细胞,支持细胞
AAV-br1	脑微血管内皮细胞
更多血清型请联系基恩科销售, 咨询技术支持。	

表4:不同血清组织亲和性

## 五 组织特异性启动子:

启动子是位于结构基因5'端上游的DNA序列，能活化RNA聚合酶，使之与模板DNA准确结合，具有转录起始的功能。基恩科生物可为客户提供多种特异性启动子来驱动特定细胞或组织中的基因表达，包装高度差异化的AAV病毒以满足客户需求。

组织	来源	启动子名称	简介
神经	人	FEV	五羟色胺能神经元启动子
	人	hSyn	神经元特异性启动子
	人	hVGAT	GABA 能神经元/中间神经元特异性启动子
	人	GFAP	星形胶质细胞特异性启动子
	人	GfaABC1D	星形胶质细胞特异性启动子
	人	GFAP104	星形胶质细胞特异性启动子
	人	MAG	少突神经胶质特异性启动子
	小鼠	CaMK1a	前脑谷氨酸能神经元特异性启动子
	小鼠	GAD65	抑制性神经元特异性启动子
	小鼠	GAD67	GABA 能神经元/中间神经元启动子
	小鼠	Iba1	小胶质细胞特异性启动子
	大鼠	TH	多巴胺能神经元儿茶酚胺能神经元启动子
	大鼠	ChAT	胆碱能神经元特异性启动子
	大鼠	TUBA1A	早期神经元特异性启动子
巨噬细胞	人	CD68(short)	巨噬细胞特异性启动子
	人	CD11b	巨噬细胞特异性启动子
	小鼠	F4/80	巨噬细胞特异性启动子

眼睛	人	Na65p	视网膜色素上皮细胞特异性启动子
	人	hRHO	视紫红质启动子
	人	hRK	视网膜视锥细胞和视杆细胞特异性启动子
	小鼠	Rpe65	视紫红质启动子
	小鼠	mOps	小鼠视蛋白启动子
心脏	人	TNNT2	人心肌肌钙蛋白启动子
	人	TCF21	心肌成纤维细胞特异性启动子
	小鼠	aMHC(short)	心肌细胞特异性启动子
	鸡	CTNT	心肌细胞特异性启动子
肝脏	人	TBG	肝脏特异性启动子
	人	AFP	甲胎蛋白基因启动子
	小鼠	ALB	肝脏特异性启动子
	小鼠	TTR	肝细胞转甲状腺素蛋白特异性启动子
肺	人	SP-C	肺上皮细胞特异性启动子
	小鼠	SP-C(3.8kb)	肺上皮细胞特异性启动子
脂肪	小鼠	FABP4(aP2)	脂肪细胞特异性启动子
	大鼠	PTKAA	棕色脂肪细胞特异性启动子
肾脏	小鼠	NPHS1	肾脏特异性启动子
	小鼠	KSP0.3k	肾组织特异性启动子
	小鼠	KSP1.3k	肾组织特异性启动子
平滑肌	小鼠	SM22a	血管平滑肌特异性启动子
内皮	小鼠	TIE2	内皮细胞特异性启动子
更多特异性启动子请联系基恩科销售，咨询技术支持。			

## 六 AAV 病毒用于体外 (In Vitro) 实验: ▼

感染培养原代细胞和建系细胞。AAV病毒对各种细胞和组织的亲嗜性不同, 在使用AAV病毒之前可以通过查阅相关文献, 了解AAV病毒对您的目的细胞的亲嗜性, 感染复数 (MOI值) 以及在体内 (In Vivo) 注射所需要的病毒量。如果没有相关文献支持, 可以通过感染预实验得到合适的感染复数 (MOI值) (使用24孔板检测病毒对目的细胞的亲嗜性)。

### AAV 病毒感染贴壁细胞预实验:

#### 1、AAV 病毒感染目的细胞预实验注意事项:

①测定AAV病毒对目的细胞的亲嗜性时, 需要同时设置对AAV病毒亲嗜性较高的细胞(HEK293, HeLa)作为平行实验的对照细胞。

②在进行AAV病毒感染实验时, 可以用完全培养基(培养目的细胞用)稀释; 理论上, 含有血清, 双抗或者其他营养因子的完全培养基不影响AAV病毒的感染效率。

③一般AAV病毒单位为vg/ml, 即每毫升病毒液中含有的病毒基因组拷贝数。如: 病毒滴度为 $1 \times 10^{12}$ vg/ml即每毫升病毒液中含有 $1 \times 10^{12}$ 病毒基因组拷贝数。

2、以24孔培养板为例, 进行目的细胞和HEK293细胞的感染预实验前按照不同的MOI设置不同的感染孔, 并根据MOI和细胞数量计算所需要的病毒量, 一般情况下MOI值从 $10^5 \sim 10^6$ 之间, 如有必要可以使用PBS溶液或者无血清培养基稀释病毒原液。

(1)第一天, 准备细胞: 在24孔培养板接种若干孔, 每个孔内接种 $3 \sim 5 \times 10^4$ 个目的细胞, 铺板时细胞的融合率为50%左右, 每孔培养基体积为 $100 \mu\text{l}$ ; 进行病毒感染时细胞的融合度约为70%左右。

(2)第二天, 准备病毒: 取出 $4^\circ\text{C}$ 保存的病毒, 用移液器混匀; 如果是冻存在 $-80^\circ\text{C}$ 的病毒需要先在冰上融化后使用。亦可以根据实验室的实际情况将按照MOI准确计算好的慢病毒稀释到培养基中, 并尽可能保证所获得的含有慢病毒的培养基的总体积为最小体积, 以期获得\*\*\*\*\*的感染效率。

(3)第二天, 感染目的细胞: 病毒准备好之后, 从培养箱中拿出细胞, 首先观察细胞生长状态, 如细胞状态较好则可以开始实验。

①使用移液器吸取准确体积的病毒液加入准备好的培养基。

②吸去培养器皿中的培养基(如果细胞生长良好, 密度适宜, 则不用换液)。

③在目的细胞和对照细胞中分别加入计算好的病毒液。

④混匀后置于二氧化碳培养箱( $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ ) 孵育过夜。

**注意:** 感染前细胞的状态好坏对最终的感染效果高低影响很大, 所以务必保证加病毒之前细胞处于良好的生长状态。亦可以将预先准备好的培养基和AAV病毒的混合液直接加入培养器皿中。AAV病毒对目的细胞的感染效率较低, 通过提高MOI值可以提高病毒的感染效率。

(4)第三天，更换培养液：一般在24小时后将含有AAV病毒的培养液更换成正常培养液，也可以不用换液，在感染后每天观察细胞生长状态。

(5)第六天，感染效率检测：在倒置荧光显微镜观察荧光，估计AAV病毒感染目的细胞的效率；如果由于目的基因较大而造成选择的载体不能携带Marker Gene的，可以通过Real-time PCR检测病毒的基因组拷贝数。

**注意：**

1、有些AAV病毒载体上带有GFP绿色荧光蛋白，使用者可以在病毒感染96小时后使用倒置荧光显微镜观察GFP绿色荧光，以观察AAV病毒对目的细胞的感染情况。如果AAV病毒载体携带其他Marker Gene如RFP\BFP可以用荧光显微镜在对应的激发光波长下观察荧光表达的情况。

2、AAV病毒表达时间较慢，荧光表达所需时间较长，建议感染后96小时后观测荧光表达。感染后的细胞可以连续培养两周，通过观察荧光的表达时间和表达强度来确定AAV病毒对目的细胞的感染情况。感染期间请根据细胞生长的情况对细胞进行及时换液，以保证细胞良好的生长状态。

**AAV 病毒感染悬浮细胞：**

1、根据细胞的量将细胞在15ml管中离心收集，然后用1~2ml的无血清培养液稀释细胞沉淀，以细胞完全浸没在培养基中为准。

2、按照MOI换算病毒颗粒数量，吸取病毒液加入细胞中，将15ml离心管置入水平离心机1000rpm低速离心1小时，然后再放入37℃，CO2培养箱中孵育2~3小时。

3、将离心管中混合液体吸出加到培养皿或培养瓶中。

4、加入足够量的新鲜培养液。

5、96小时后观察细胞阳性率。

表5：不同培养皿/瓶培养用量推荐

耗材名称	最大生长面积 (cm <sup>2</sup> )	平均细胞产量	建议培养基用量 (mL)	最低整数用量 (mL)
35mm细胞培养皿	8	$8 \times 10^5$	1.8-2.7	2mL
60mm细胞培养皿	21	$2.1 \times 10^6$	4.2-6.3	4mL
100mm细胞培养皿	55	$5.5 \times 10^6$	11-16.5	10mL
150mm细胞培养皿	152	$1.52 \times 10^7$	30.4-45.6	30mL
6孔板	9.5	$9.5 \times 10^5$	1.9-2.85	2mL

12孔板	3.8	$3.8 \times 10^5$	0.76-1.14	0.8mL
24孔板	1.9	$1.9 \times 10^5$	0.38-0.57	0.4mL
48孔板	0.95	$0.95 \times 10^5$	0.19-0.285	0.2mL
96孔板 (3599)	0.32	$3.2 \times 10^4$	0.1-0.2	0.1mL
T25细胞培养瓶	25	$2.5 \times 10^6$	5-7.5	5mL
T75细胞培养瓶	75	$7.5 \times 10^6$	15-22.5	15mL
T150细胞培养瓶	150	$1.5 \times 10^7$	20-30	20mL
T175细胞培养瓶	175	$1.75 \times 10^7$	35-52.5	35mL

\*假定100%融合培养的细胞平均产量为 $1 \times 10^5$ 细胞/cm<sup>2</sup>

## 七 AAV 病毒用于动物实验 (in vivo):

下表为以小鼠为例的病毒注射量。AAV感染能力与动物种类、基因大小、基因性质、组织部位、操作手法、病毒纯度等有关，可进行预实验，根据预实验结果对病毒的使用剂量进行适当调整。

表6：不同部位注射方式和病毒量

注射部位	注射方式	注射病毒量	滴度要求 (vg/mL)
皮层/海马等核团	脑定位注射	$1-5 \times 10^9$ vg/点	$\geq 1 \times 10^{13}$
多脑区	尾静脉注射	$1-5 \times 10^{10}$ vg/侧	$\geq 1 \times 10^{13}$
全脑	尾静脉注射	$1 \times 10^{11}$ vg	$\geq 2.5 \times 10^{12}$
脊髓	鞘内注射	$1 \times 10^{10}$ vg	$\geq 1 \times 10^{12}$
	DRG(背根神经节)注射	$5-10 \times 10$ vg	$\geq 1 \times 10^{13}$
	尾静脉注射	$1 \times 10^{11}$ vg	$\geq 1 \times 10^{12}$
	定点注射	$1-3 \times 10^{10}$ vg侧，可多点注射， $5 \times 10^9$ vg/点	$\geq 1 \times 10^{13}$

眼睛	视网膜下腔注射	$2-10 \times 10^9 \text{vg}$	$\geq 2 \times 10^{12}$
	玻璃体腔注射	$1-2 \times 10^9 \text{vg}$ 成年鼠 $\leq 1 \times 10^9 \text{vg}$ 幼鼠	$\geq 1 \times 10^{12}$
心脏	心肌定点注射	$1-2 \times 10^{11} \text{vg}$ (4-6点)	$\geq 5 \times 10^{12}$
	尾静脉注射	$1-5 \times 10^{11} \text{vg/只}$	$\geq 2.5 \times 10^{12}$
	新生小鼠皮下注射	$2-5 \times 10^{10} \text{vg}$	$\geq 1 \times 10^{13}$
肝脏	肝门静脉注射	$1 \times 10^{11} \text{vg/只}$	$\geq 1 \times 10^{12}$
	尾静脉注射	$1-5 \times 10^{11} \text{vg/只}$	$\geq 2.5 \times 10^{12}$
肺	气管注射	$1-2 \times 10^{11} \text{vg/只}$	$\geq 1 \times 10^{12}$
	尾静脉注射	$5 \times 10^{11} \text{vg/只}$	$\geq 2.5 \times 10^{12}$
脂肪	脂肪多点注射	$0.5-1 \times 10^{11} \text{vg/侧}$ (4-6点)	$\geq 2.5 \times 10^{12}$
肌肉	肌肉多点注射	$0.5-1 \times 10^{11} \text{vg/侧}$ (4-6点)	$\geq 2.5 \times 10^{12}$
关节	关节腔内注射	$0.5-1 \times 10^{11} \text{vg}$	$\geq 1 \times 10^{13}$
血管	心肌定点注射	$1-10 \times 10^{11} \text{vg}$	$\geq 5 \times 10^{12}$
	尾静脉注射	$1-5 \times 10^{11} \text{vg}$	$\geq 2.5 \times 10^{12}$
脾脏	脾脏原位注射	$1 \times 10^{11} \text{vg/只}$	$\geq 2.0 \times 10^{12}$
	尾静脉注射	$2-5 \times 10^{11} \text{vg}$	$\geq 2.5 \times 10^{12}$
肾脏	肾静脉注射	$1 \times 10^{11} \text{vg/只}$	$\geq 2.5 \times 10^{12}$
	肾实质注射	$1-1.5 \times 10^{10} \text{vg/点}$	$\geq 1 \times 10^{13}$
	经肾实质肾盂注射	$5 \times 10^{10} \text{vg}$	$\geq 5 \times 10^{12}$
	尾静脉注射	$5 \times 10^{11} \text{vg/只}$	$\geq 2.5 \times 10^{12}$
胰腺	胰胆管注射	$1 \times 10^{11} \text{vg/只}$	$\geq 1 \times 10^{12}$
	腹腔注射	$5 \times 10^{11} \text{vg/只}$	$\geq 2.5 \times 10^{12}$

内耳	耳蜗注射	$1 \times 10^{10}$ vg	$\geq 1 \times 10^{13}$
肠道	肠系膜上动脉注射	$5-10 \times 10^{10}$ vg/只	$\geq 1 \times 10^{12}$
	结肠壁注射	$1 \times 10^{11}$ vg/只	$\geq 5 \times 10^{12}$
	灌肠	$4-10 \times 10^{10}$ vg/只	$\geq 1 \times 10^{12}$
	腹腔注射	$1 \times 10^{11}$ vg/只	$\geq 2.5 \times 10^{12}$
	尾静脉注射	$2 \times 10^{11}$ vg/只	$\geq 2.5 \times 10^{12}$
肿瘤	瘤内注射	$5-10 \times 10^{10}$ vg/只	$\geq 1 \times 10^{12}$

表7: 靶向不同器官和组织推荐使用的AAV血清型及注射方式

感染部位	注射方式	启动子	血清型
腹侧海马	脑立体定位注射	广谱启动子	2、5、8、9
伏隔核	脑立体定位注射	广谱启动子	2、5、8、9
海马齿状回	脑立体定位注射	广谱启动子	2、5、8、9
中脑腹侧被盖区	脑立体定位注射	广谱启动子	2、5、8、9
全脑	侧脑室小脑延髓池	广谱启动子	9、AAV-PHP.eB
	尾静脉, 颈静脉/颈动脉	广谱启动子	9
	眼球后静脉	CMV	9、AAV-PHP.eB、AAV-shh10
眼睛	玻璃体腔注射/视网膜下注射/晶状体注射	CAG/rep65	6.2/6
肺	鼻吸、气管注射	CMV/CAG	8
胰腺	腹腔属注射	CAG	
肾脏	尾静脉注射	CMV	2、9
	肾盂原位注射		

肠道	腹腔注射/灌肠	CAG	8、9、10
骨髓	鞘内注射	Ef1a	9
心脏	原位多点注射	cTnT	9
	尾静脉注射		
脾脏	静脉注射	Ef1a	6
卵巢	腹腔注射	CMV/CAG	2
睾丸	原位多点注射	CMV/CAG	2
骨骼肌	原位多点注射	CAG/Col27/Sp7	8
肝脏	腹腔注射/尾静脉注射	TTR/CTBG/Ef1a	8
脂肪	尾静脉注射	FABP4	8、9
	腹腔内注射	CMV	8、9
	皮下注射	CMV	8、9
耳朵	静脉注射	CMV/CAG	ie、8
血管	腹主动脉注射	CMV	1、5
滑膜关节	原位多点注射	Ef1a	1
平滑肌	尾静脉注射	Sm22a	1、2

## 八 相关注射方法

### 8.1.肺部的注射方法

#### 8.1.1 门静脉注射

1、通过腹腔注射麻醉剂使成年小鼠处于手术麻醉状态。当动物没有反应时，确认麻醉与否，捏其脚趾，眨眼反射不再存在即为麻醉完成。

2、手术前用消毒剂清洗腹部，然后用聚维酮清洗。在腹部上方建立无菌区。

- 3、从骨突下2-3毫米处开始在腹部做一个2-3厘米长位于正中的切口。
- 4、取出肠子，向左翻一下肠子露出门静脉。门静脉是一条相对较大的静脉，起源于肠道，直接流入肝脏。为了看到静脉，肝脏的前叶可能需要被掀开。在手术过程中，用无菌纱布浸泡在无菌盐水中，以保持肠道的湿润。
- 5、将30G针头的注射器直接插入门静脉。
- 6、均匀缓慢注射0.2 ml病毒悬液，持续1分钟。
- 7、注射后将针头固定约10-20秒。
- 8、取下针头，轻轻地将一小块可吸收海绵压在插入点上以防止出血。
- 9、用4-0聚酯线缝合腹部，肌肉和皮肤共缝合两层。
- 10、将动物放在加热灯下，直到它恢复，然后单独饲养，直到伤口完全愈合。

### 8.1.2 肝实质内注射

- 1、可在4 - 5个单独的注射部位(40-50微升/部位)将最多200微升的总病毒量输送到成年小鼠肝脏。
- 2、通过腹腔注射麻醉剂使成年小鼠处于手术麻醉状态。当动物没有反应时，确认麻醉与否，捏其脚趾，眨眼反射不再存在即为麻醉完成。
- 3、用局部消毒剂清洗腹部，然后用聚维酮清洗。在腹部上方建立无菌区。
- 4、从骨突下2-3毫米处开始，在腹部做一个2-3厘米长的中线切口，露出肝脏。
- 5、将病毒悬液直接注射到肝实质，用30G针头固定在结核菌素注射器上。
- 6、间歇加压缓慢注入悬液。在注射过程中，通过外科立体镜监测注射部位，以确保没有出血或外渗。如果出现上述任何一种情况，则取出针头，轻轻地按压止血，并注入新的部位。
- 7、注射完毕后取下针头，用消毒棉轻轻按压止血。
- 8、选择一个新的注射点，重复上述补步骤。
- 9、用4-0聚酯线缝合腹部，肌肉和皮肤共缝合两层。
- 10、将动物放在加热灯下，直到它恢复，然后单独饲养，直到伤口完全愈合。

### 8.2.成年鼠尾静脉注射

- 1、通过这种途径，成年小鼠可静脉注射300-400微升的总病毒。
- 2、将鼠标放在标准的小鼠约束器中，这样注射器可以轻松地在小鼠尾巴任意地方进行手术操作。
- 3、老鼠尾巴上最容易接触到的静脉位于尾巴的外侧。小鼠尾巴背侧静脉通常注射困难。尾部腹侧的血管是动脉，不可注射。
- 4、将30G的针头固定在1毫升结核菌素注射器上，插入尾部尽可能远的侧静脉之一。  
选择远端注射部位，是因为，如果这样第一次注射失败，注射者可以简单地选择另一个更近端的注射部位。如果在使用注射器时遇到困难，请记住侧静脉是非常浅的。如果用温水轻轻地加热尾巴，可以使血管一定程度的扩张。

- 5、针头正确插入后，缓慢注射病毒悬液。如果注射器由于压力增加而难以压下柱塞，则很大概率针头没有正确插入静脉中。在这种情况下，取出针头并选择一个新的部位进行上述操作尝试。
- 6、注射完成后，取出针头，对创口处施加压力，直到止血为止。
- 7、注射后立即将小鼠放回笼子。

### 8.3 新生小鼠静脉输液

- 1、通过这种技术，可以将最多100微升的病毒悬液输送到新生小鼠体内。
- 2、这一步骤最好两人合作完成；一个控制动物，另一个注射。
- 3、新生小鼠可以在出生后1-4天通过这种途径注射。在出生的前4天之后，观察静脉变得越来越困难。
- 4、注射前将新生小鼠放在4°C的干毛巾上几分钟，以减少其运动和减少创伤。
- 5、一个人轻轻地固定前肢，并固定头部，使侧面朝上。这个姿势可以很好地暴露从眼后延伸到颈部的颞浅静脉。
- 6、将新生小鼠置于3倍照明放大镜下。
- 7、将30G针头的固定在1cc的结核菌素注射器上，另一个人将针头插入静脉旁边的皮肤下。应该从头部到颈部。
- 8、在静脉上移动针头，慢慢地进入静脉，直到斜面被血液掩盖。这表明针在血管内。新生小鼠的皮肤是半透明的，针的斜角可以很容易地透过皮肤看到。
- 9、注射器插入静脉后就不要再移动。
- 10、缓慢注射病毒悬液。通常情况下，如果注射成功，注射部位远端的静脉会变白。如果针头不在静脉中，只需皮下注射10毫升即可立即形成明显的凸起。
- 11、注射完成后，取出针头，轻轻地按压静脉。通常在2-3分钟内止血成功。
- 12、把老鼠放在加热灯下苏醒，然后再放回到母老鼠身边。
- 13、如果注射不成功，让小鼠恢复5-10分钟，然后在另一侧尝试第二次注射。
- 6、将新生小鼠置于3倍照明放大镜下。
- 7、将30G针头的固定在1cc的结核菌素注射器上，另一个人将针头插入静脉旁边的皮肤下。应该从头部到颈部。
- 8、在静脉上移动针头，慢慢地进入静脉，直到斜面被血液掩盖。这表明针在血管内。新生小鼠的皮肤是半透明的，针的斜角可以很容易地透过皮肤看到。
- 9、注射器插入静脉后就不要再移动。
- 10、缓慢注射病毒悬液。通常情况下，如果注射成功，注射部位远端的静脉会变白。如果针头不在静脉中，只需皮下注射10微升即可立即形成明显的凸起。
- 11、注射完成后，取出针头，轻轻地按压静脉。通常在2-3分钟内止血成功。
- 12、把老鼠放在加热灯下苏醒，然后再放回到母老鼠身边。
- 13、如果注射不成功，让小鼠恢复5-10分钟，然后在另一侧尝试第二次注射。

## 8.4心脏的注射方法

### 8.4.1新生小鼠心包内注射小鼠方案

1、出生4-5天大的幼鼠可用于注射(出生4-5天,且第6天之前的新生小鼠,心包壁是一层连续的浆膜,缺乏心包孔。心包孔的缺失有利于AAV病毒在心包间隙的存量)。

2、注射当天,用无菌生理盐水将AAV病毒原液稀释至最终浓度为 $5 \times 10^{12}$ 个基因组拷贝/mL (gc/mL),制备AAV病毒使用液。稀释准备好的AAV病毒允许每只幼崽注射50毫升,以及考虑制备和注射过程中的损失而额外增加的100微升注射量。将稀释后的病毒放在冰上直至注射。

3、33号针头安装在Tyton管上用于注射。切断油管,使针头露出3mm(Tygon管将形成一个3毫米的空心,将防止针进入心肌或左心室腔,并使研究者能够轻松地将针保持在心包空间进行注射。将病毒注入心包间隙,而不是心肌或左心室腔)。

4、在注射前,将幼崽从其母亲身边取走,并在冰上放置约2-3分钟低温麻醉。幼崽们会变得昏昏欲睡,但它们生命活动不会完全停止。

5、当幼崽在冰上时,将25号针头连接到注射器上,并取出足够的AAV病毒进行注射。

6、取下25号针头,将盖有Tygon管(在3步骤中的)的33号针头连接到注射器上。轻轻推进柱塞,直到空气完全排除,病毒开始注入。

7、为了更好地注射,用非惯用手的拇指和食指拍住幼鼠的颈背(背侧)。转动腕关节,以便观察幼崽的腹面,包括胸骨、肋骨和剑突。

8、用惯用手在幼犬左侧肋-剑突角处插入33号针头,并将针头向上推进,直到Tygon管接触皮肤(3mm)。随着穿刺针的推进,它必须保持与左胸骨边界平行。

9、针头向前推进3mm后,将50微升AAV病毒缓慢注入心包间隙。在使用33号针头时,经常会遇到响应时间延迟的问题,因此缓慢注入病毒至关重要。这将有助于避免过度注入和/或病毒丢失。新手可以考虑向几只对照幼崽注射生理盐水,以便在处理实验组之前熟悉汉密尔顿针和注射器。

10、注射后,将幼崽送回母体身边,并进行后续注射。

### 8.4.2成年小鼠静脉注射

1、用PBS稀释AAV病毒溶液,使每只动物至少注射100微升,最大体积不应超过200-250微升。

2、将其吸入U-100胰岛素注射器中,盖上针头并小心地去掉剩余的空气。

3、通过在笼子上方放置加热灯或将老鼠尾巴浸泡在温水中,使尾巴静脉扩张。

4、将老鼠放入老鼠约束器中,可去掉麻醉这一步。

5、用含70%乙醇的无菌纱布对尾部消毒。

6、小心地拉直尾巴,找到两条侧脉中的一条。

7、将针尖几乎平行于其中一条侧静脉插入,并向前进入尾静脉(2-3mm)。

8、小心地拉动柱塞，此时静脉血流入注射器，则可确认针尖插入静脉内。

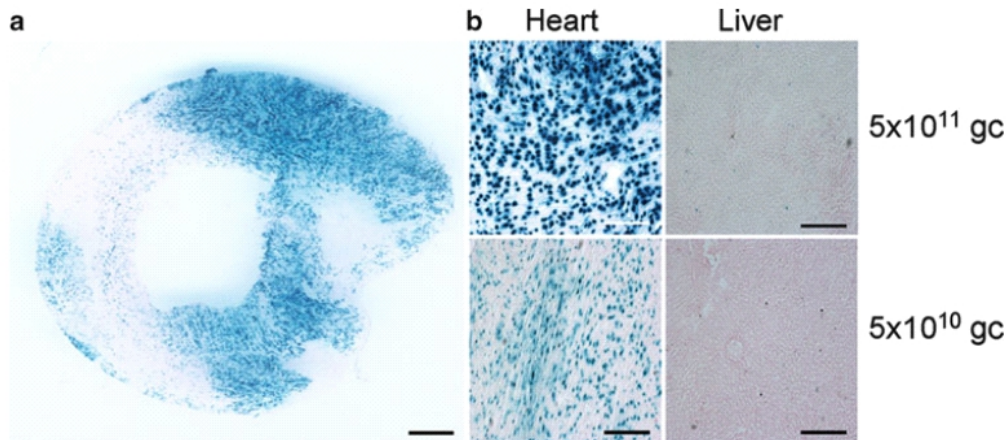
9、缓慢推动柱塞，观察静脉：若无阻力，血液暂时被冲出，则注射成功，应继续注射，直至注射完目标体积(在注射过程中或注射后立即观察到皮下突出表明有外渗，则表明至少不是完全静脉注射。因此，不应进行下一步试验。当宾度在40%的碘二醇(高粘度)中使用时，这种情况尤其可能发生。在PBS中稀释载体溶液可能好一些)。

10、取下针头，用纱布轻轻压迫注射部位。

11、将小鼠放回笼中，观察5分钟，确保充分止血(在小鼠心力衰竭模型中，载体的注射量应尽可能小。此外，建议长时间观察小鼠呼吸或活动是否正常)。

### 8.5 大鼠左心室心肌直接注射

1、注射当天，用无菌生理盐水将AAV病毒原液稀释至最终浓度为 $2 \times 10^{12}$ gc/mL，制备AAV病毒(研究人员确定了在大鼠心脏中aav9介导的LacZ高水平表达所需的最小剂量。以每只大鼠 $5 \times 10^{11}$ gc (250 mL /  $2 \times 10^{12}$ gc/mL)的剂量，几乎整个左心室游离壁可见高表达的转基因，肝脏和其他器官极少表达。低于此剂量，表达显著降低。见图)。准备足够的稀释的AAV病毒，保证每只幼崽注射250毫升，以及额外的100毫升，以弥补制备和注射过程中的损失。将稀释后的病毒放在冰上备用。



2、通过注射上述药物麻醉一只约300克成年大鼠(为了诱导麻醉，我们将1.8 mL氯胺酮(100 mg/mL)，0.75 mL噶嗪(20 mg/mL)和0.45 mL生理盐水混合制成氯胺酮/噶嗪cocktail。给一只300克的大鼠开始0.15–0.20毫升这种cocktail作为初始剂量。如果大鼠在5分钟后仍对疼痛有反应，可继续增加药量。如果大鼠属于缺血性心肌病模型，建议使用Lewis近交系大鼠。

3、诱导后，用切牙环和可调节约束器将大鼠固定在工作台上插管。

4、用带镜的耳镜插管观察大鼠声带。必要时使用镊子拉伸其舌头。将导丝穿过声带，然后取出耳镜，同时保留导丝。将气管内插管穿过导丝并插入气管内。拆下导丝。用10ml注射器充肺并确认放置位置。用缝线固定气管内管(插管应尽可能快速顺利地顺利进行。长时间插管和/或创伤性插管可能导致自发性呼吸丧失。如果发生这种情况，可以进行紧急气管切开术。)

5、将大鼠气管内管与麻醉工作站连接，大鼠左侧侧卧位(需要一个适配器，麻醉工作站的制造商一般可以提供。)。设置O<sub>2</sub>流量为2l/min;呼吸机的频率为每分钟70次，空气浓度为1%。

6、刮除手术部位；用氯己定溶液擦洗该部位三次，并用无菌方式包裹大鼠。

7、在第四肋间隙处做一个2厘米的皮肤切口；将皮下组织和下层肌肉分开，从第四肋间隙进入胸腔。观察穿过心包的左膈神经，在不破坏神经的情况下打开心包露出左心室(小自固定牵开器有助于最大限度地暴露心脏。)

8、用7-0 Prolene缝线穿过左心室顶端，用一副止血钳固定缝线末端。这条缝合线将在注射时操纵心脏时用到。

9、胰岛素注射器(0.5 mL, 28号, 0.5英寸。)加入250毫升AAV病毒，左手握住。

10、用非惯用手握住7-0缝合线，并使得心脏位置以最大限度地暴露左心室，进行注射(注意不要使心脏长时间(最多30秒)处于限制血液流入或流出的位置。如果无论出于何种原因导致心功能受损，建议在左心室腔内注射0.1 mL多巴酚丁胺(12.5 mg/mL)。

11、左心室心肌注射，每5个等距50ml注射一次。每次注射前，针头进入心肌后拉出柱塞，确保针头没有进入血管或左心室腔内(应该没有血液回流。)

必要时继续用7-0缝线缝住心脏位置(注射时避免损伤冠状动脉或静脉。一些实验人员可能会选择在检查过程中戴上眼镜。)每次注射后心肌应出现轮状。此外。如果研究者在5次注射时难以在整个左心室均匀注射病毒，则按比例减少每次注射的体积，使总容积保持在250mL不变，增加注射次数。增加病毒的总容积会导致心功能下降和死亡。使用容量为250mL的方案，大鼠死亡率极低。)

12、注射完成后，放置一个18号的血管导管穿过皮肤，经第五或第六肋间隙进入胸腔，取出针头。作为胸管恢复胸内负压。用呼吸机手动吸气，使肺部完全充满气体。

13、用中断的4-0Maxon使得肋骨重新靠近，肌肉用连续的4-0Vicryl，皮下组织用连续的5-0Vicryl，皮肤用连续的、皮下的5-0Vicryl。

14、一旦皮肤闭合，将一个10ml注射器连接到胸管上血管导管;取出注射器的柱塞，直到遇到阻力，并从动物身上取出血管导管和注射器，保持阻力，直到完全去除。

15、如果同一天进行多项手术，可将大鼠移至恢复呼吸机，直到观察到自主呼吸(只有在观察到大鼠自发运动后拔管，才能大大降低再插管率。)

16、术后4和12小时喂药丁丙诺平和头孢唑林。

## 8.6 大鼠超声微囊泡靶向心脏AAV输送

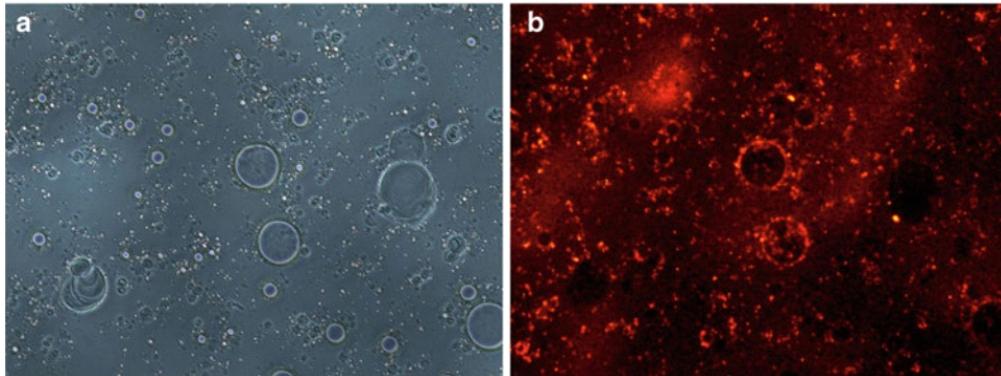
### 脂质悬浮液的制备:

10mLPBS加入200mg·DL- $\alpha$ -磷脂酰胆碱, 双棕榈醇(Sigma P-5911) 50mg·DL- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺, 双棕榈醇(Sigma P-3275) 1g葡萄糖溶解, 在沸水浴中加热(约20-30分钟), 每5分钟上下移液, 直到没有颗粒可见。此原液可在4°C下保存。

### 微囊泡制备:

- 1、在1.5或2毫升的吸管中恢复250毫升的原液至室温。
- 2、加入50ml甘油。
- 3、加入AAV-悬液, 体积小于200ml。
- 4、加入PBS使总体积为500ml。
- 5、用八氟丙烷气体替换空气。
- 6、在搅拌器中摇20秒。
- 7、输液前加入0.5 mL PBS, 仔细混合。
- 8、根据合适抗体, 可以观察到微囊泡是否制备成功(成功制备AAV2病毒微囊泡, 见图。其他血清型需使用其他可用抗体)。

Microbubbles loaded with adeno associated virus



### 动物实验部分:

- 1、麻醉大鼠后, 胸部必须脱毛, 颈部必须用酒精喷雾消毒。
- 2、用剪刀在颈前外侧(最好在右侧)可见脉搏处做一个切口(约5毫米)。
- 3、用弯曲钳扩大切口。
- 4、用夹钳在静脉下面缝6-0线。当把缝线穿过去时, 要小心不要扭曲静脉。
- 5、用颅骨缝合线结扎静脉, 并使用尾端缝合线在导管上结扎。

6、切开约30cm的聚乙烯管导管。使用剪刀的倾斜位置，使得导管的尖端变得弯曲。45°角最好。

7、将23号针插入导管的一端，用生理盐水或PBS冲洗导管。注意不要在导管中留下任何空气，因为小体积的空气足以通过栓塞杀死大鼠(如果错误地注入空气或微囊泡过大(泡沫状微囊泡)，就会发生肺栓塞。这种情况通常表现为左心室造影缺失和右心室高度混浊。通常，老鼠一分钟内停止呼吸的就很少能存活下来。)

8、将导管插入颈静脉，在颅缝合线处握住静脉，并用Vannas剪刀仔细地在表面切开。切开后，将导管插入静脉。

9、插入后，可通过抽吸注射器来验证导管位置是否正确(血液回流)。

10、将尾端缝线紧紧缠绕在导管周围。至此，导管可以与输液泵连接。

### 8.7 超声微囊泡破坏

1、导管插入后，三个心电图电极将连接到三个爪子上。在每个电极上滴一滴超声凝胶有助于改善心电图信号。

2、少量超声凝胶涂抹于在胸部。这有助于避免毛发下面的小气泡。

3、定位心脏(用手指感受脉搏)后，在胸部添加大量凝胶，为探头提供支撑点。小心避免出现气泡。

4、然后将S3超声探头夹在胸部，在探头与皮肤之间留出至少1厘米的凝胶。

在注射造影剂后要获得中短轴视图。高质量的图像对于AAV-微囊泡溶液的高效转移至关重要。图像良好时，心肌和腔清晰可见。以下超声设置适用于Sonos 5500 (Philips):

(a)超谐波模式(传输1.3 MHz)

(b)机械指数1.6

(c)触发成像-每四拍-四帧超声

(d)延迟80毫秒

(e)所有段增益为

(f)增益50

(g)压缩75

(h)后处理

5、1毫升微囊泡悬浮液应注入15 - 20分钟。为了保持均匀的微囊泡悬浮液，定期搅动输液泵。

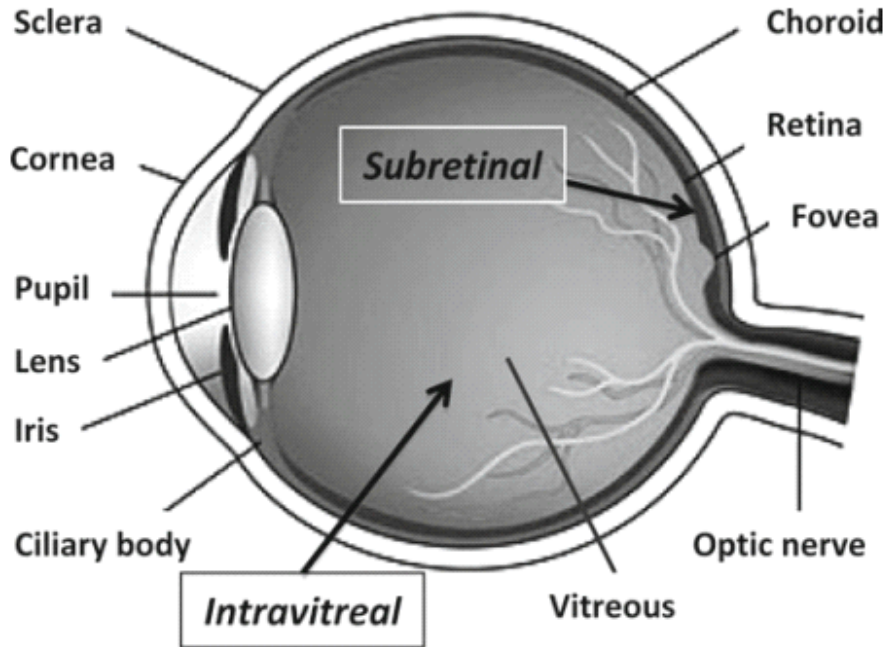
6、在输注过程中，通过观察左心室腔观察微囊泡输注成功和破坏情况。同时观察心电图(高机械指数(MI)超声可引起室性早搏。这种情况很少发生，就可以忽略。但是如果它们出现在每一个高心肌梗死US中，或者出现2-3次，则机械指数应该降低，因为有室性心动过速甚至室性颤动的风险。通常将心肌梗死指数降至1.3可减轻心律失常，几分钟后心肌梗死指数可再次逐渐升高。如果动物出现室性心动过速，应立即取出探针)。

7、实验结束后，取下导管，用4-0线缝合皮肤。动物应在30-60分钟内醒来。

8、根据实验问题的不同，可以对动物进行数周至数月的跟踪观察。

### 8.8 眼睛的注射方法

由于血液/视网膜屏障，不可能使用静脉注射AAV的方法向视网膜递送病毒。相反，rAAV必须被递送到与靶细胞接触的区域(玻璃体内间隙或视网膜下间隙)，以便递送这些细胞(见图2)。普遍使用的几种血清型AAV不会穿过到视网膜各层。



玻璃体内注射暴露了视网膜内表面和前段的细胞。因此，根据rAAV衣壳血清型和合适受体的存在，视网膜神经节细胞和Muller细胞可以被转导，在前段，小梁网、Schlemm管、角膜内皮细胞、晶状体、虹膜和睫状体上皮细胞可以被转导。

视网膜神经节细胞转导可以通过玻璃体内传递实现，可以将转基因产物传递到神经节细胞突触的大脑区域。视网膜光感受器、Muller细胞和RPE细胞在视网膜下注射后可以被转导。由于小鼠眼睛与大型动物眼睛的解剖特征不同，因此必须在不同物种中使用不同的视网膜下注射技术。

老鼠眼的晶状体几乎占据了整个玻璃体腔。

因此，由于有晶状体损伤和由此产生的白内障的风险，很难从小鼠的前路入路输送AAV。相比之下，在狗，猴子和男性视网膜下注射可以通过操作显微镜直接可视化进行。

### 8.9 小鼠玻璃体内注射

- 1、麻醉：使用0.01ml/g 4.3%水合氯醛麻醉小鼠；
- 2、双眼加入散瞳剂散瞳，以防一眼出现意外时可以迅速换眼；
- 3、向眼镜滴加甲基纤维素保持眼表湿润；
- 4、抗生素眼药水、表麻药术前滴眼；
- 5、调整小鼠头位，让小鼠眼球保持角膜缘水平位；
- 6、位置选择在膜缘后1mm，或者选择颞侧进行，注意避开血管。白鼠还可以看见视网膜血管，需避开；
- 7、使用ALCON的10-0针做切口，33G的针进去水密非常好。切口越整齐，跟针越匹配，越不易渗漏。针尖垂直进入，随后倾斜。（小鼠眼球小，晶体球形，倾斜角度小了会损伤晶体，大了会扎上视网膜，出血）；
- 9、缓慢推注，无阻力。（迅速推注的话取材时会发现视网膜散在出血点，可能干扰试验结果。推针以后留针0.5-1min，迅速出针）。



扫码关注Genecarer微信公众号  
更多资讯 更多技术

网址：[www.genecarer.com](http://www.genecarer.com)

电话：029-84613682

地址：陕西省西安市高新区发展大道25号欧凯创业小镇315

