

重组腺病毒操作说明

■ 注意事项

1. 操作病毒时请尽量使用生物安全柜。如果使用普通超净工作台操作病毒，请在打开含有病毒的容器盖子前关闭超净台的排风机。尽快操作，尽量缩短开盖后的病毒在关闭了排风机的超净台中停留的时间。关闭所有含有病毒的相应容器盖子后，再打开超净台排风机。
2. 操作病毒时请穿实验服，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%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parafilm膜封口后离心，而且尽量使用组织或细胞培养室内的离心机。
6. 脱掉手套后，用肥皂和水清洗双手。

■ 重组腺病毒颗粒的储存与稀释

1. 收到病毒液后，如需长期保存则分装后存放于-80°C。避免反复冻融，否则会降低病毒滴度。正常保存条件下，病毒可以存放于-80°C稳定保存6~12个月。如存放超过12个月，需要重新检测病毒滴度。
2. 吉凯基因提供的重组腺病毒颗粒溶于 Enhanced Infection Solution 中。使用病毒时，请将病毒从-80°C冰箱取出，冰浴融化。

■ 目的细胞感染预实验

在正式实验前，需要进行腺病毒感染目的细胞的预实验，该实验的目的：第一，检测腺病毒是否能够感染目的细胞；第二，腺病毒感染目的细胞的最佳条件。通常使用带有GFP标记的腺病毒。具体实验步骤如下：

1. 实验前一天分别接种 5×10^3 个目的细胞于96孔培养板中（至少接种8个孔的细胞），所加培养基体积为100 μ l。不同种类的细胞生长速度有所差异，为保证有较好的实验结果，进行病毒感染时细胞的融合率约为40~50%。

更多信息请登录吉凯基因官网，或致电来函吉凯基因。

2. 准备 6 个无菌的Ep 管，在第一个Ep 管中加入990 μl 的完全培养液，其余的5 个管子中各加入900 μl 的完全培养液。
3. 取 10 μl 腺病毒原液加入990 μl 的Ep 管中做1:100 稀释 (10-2)；然后以此为起点，再取100 μl 稀释液加入到900 μl 的Ep 管中做1:10 稀释(10-3)，直至稀释到10-7。
4. 从孵箱中取出 96 孔板，在显微镜下确定每孔的细胞均生长良好。吸弃旧培养液，依次将10-3 至 10-7 稀释的病毒液加入96 孔板中，每种稀释度的病毒取100 μl 加入到96孔板中，未加入病毒的细胞孔中加入同样量的完全培养基作为对照组。
5. 8-12 小时以后请观察细胞状态。如果细胞状态与未感染组无明显差异，表明该病毒对细胞没有明显毒性作用，请不要换液，继续培养。
6. 由于腺病毒感染细胞速度快，分别在感染后12、24、48 小时观察细胞中荧光表达情况。根据细胞的生长状况、荧光表达情况综合判断病毒在哪个稀释度下作用效果最好，并以此稀释度下的病毒浓度做为后续实验的依据。

■ 常见问题

1. 如何确定我所用的目的细胞是否可以被腺病毒感染？

腺病毒有广泛的宿主范围,它可以感染人类或者其他哺乳动物细胞系或原代细胞,包括可分裂的和不可分裂的细胞。只有少数细胞系不被感染,例如一些淋巴细胞系对腺病毒有更强的抵抗性。为了确认所使用的目的细胞是否能够被腺病毒感染,需要通过带有标记(如GFP)的腺病毒对目的细胞进行预实验,预实验的步骤参考“目的细胞感染预实验”。

2. 腺病毒载体在体外(in vitro)实验中应注意哪些问题？

由于细胞表面受体的差异,腺病毒载体在不同的细胞中转导效率不同,可以通过预实验来判断目的细胞中的腺病毒用量。病毒感染细胞的最佳时期是细胞处于对数生长期时,因此,在细胞消化后12~24 小时加入病毒。病毒感染时细胞培养液的体积尽量小一些,以完全覆盖细胞为准。一般感染腺病毒24 小时后就能检测到目的基因的表达,48 小时表达达到较高水平。

3. 如何确定感染细胞时腺病毒的最佳浓度？

最佳的实验结果需要最佳的腺病毒用量,用量少则达不到100%的感染效率,用量多可能会对细胞有毒害作用或其他不可预测的效应。为了确定目的细胞的最适病毒用量,需要在正式实验开始前,建议先完成“目的细胞感染预实验”,以此获得的数据作为正式实验的依据。