

重组腺病毒/慢病毒构建包装服务

为促进国内相关领域的研究进展，上海闪晶分子生物有限公司从 2008 年开始，对国内实验室开展重组腺病毒/慢病毒构建、包装及扩增服务，可以由客户提供自己的基因，完成腺病毒/慢病毒构建、鉴定、包装的服务。我们的宗旨是：“专业公司，打造专业服务！”

一、技术路线：

（一）A、腺病毒载体构建：

本系统是以 Ad5 血清型 E1/E3 缺陷型腺病毒 DNA 为骨架，在克隆、包装、扩增等各部条件做了改进和优化，达到了克隆阳性率更高、质量更可靠、包装稳定、出毒迅速、滴度高效果。在此基础上，还拓展了更广泛的应用，可以提供各种带报告基因的，带不同标签的腺病毒构建和包装服务。所包装的腺病毒已成功应用于信号转导，基因转位，Co-IP，动物实验，干细胞研究等科研实验。并且可以完成较高难度的克隆构建，包括具有细胞毒性作用基因的腺病毒构建，在短时间内完成从原始质粒到病毒 DNA 的构建工作。

1) 克隆目的基因到穿梭载体（中介载体）及鉴定

根据客户提供的原始质粒信息确定克隆方案：

- a) 如果原始质粒与本系统所用穿梭载体有匹配酶切位点，采用相应的内切酶切下相应片断，回收并连接到穿梭载体。酶切，测序鉴定；
- b) 如果原始质粒与本系统所用穿梭载体没有匹配酶切位点，设计带有特殊接头的引物进行 PCR 扩增，得到目的片断，采用相应的内切酶切下相应片断，回收并连接到穿梭载体。酶切，测序鉴定；
- c) 对于不适用于以上方案或者有特定要求的样品，与客户协商定制具体实施方案

2) 克隆目的基因到腺病毒载体 pAdPL 及鉴定

利用重组技术将目的片段的表达框从穿梭载体转移到腺病毒载体。

酶切鉴定阳性克隆，将阳性克隆测序二次鉴定。

B、慢病毒载体构建

慢病毒 (Lent virus) 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, 该载体可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上, 达到持久性表达的效果。可有效地感染神经元细胞、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, 效果非常理想, 因此具有广阔的应用前景。

(二) 病毒包装、扩增:

- 1) 将鉴定正确的基因克隆到慢病毒载体, 与辅助载体一起转染 293T 细胞进行包装;
- 2) 将包装好的病毒超速离心收集;
- 3) 将浓缩病毒进行滴定, 滴定结果单位为 PFU/ml (一般为 5×10^8 PFU/ml 以上, 体积为 500 μ l 以上, 根据客户需要, 不同量有价格差异)

二、质量控制与鉴定:

- 1) 测序鉴定
- 2) 根据特定引物作 RT-PCR 鉴定
- 3) 蛋白表达鉴定 (根据客户要求并由客户提供高特异性抗体)

三、客户须知:

对于客户所要构建腺病毒的目的基因, 客户须提供详细的基因相关信息, 包括基因序列, 载体序列, 载体图谱。

载体构建步骤所需时间, 根据不同构建方案, 需 15 到 25 个工作日。

从合同签订之日起, 客户需交纳首期技术服务费 (50% 服务费), 方可进行实验。服务结束时一次结清余款。

客户需提供的信息及材料:

- 1) 插入目的片段序列信息, 原始载体序列信息, 载体图谱, 酶切分析图等。
- 2) 鉴定正确的原始质粒, PCR 引物及 PCR 鉴定方法说明 (包括 PCR 体系及 PCR 条件) (非必需, 或需协商), 测序引物 (非必需, 或需协商)。
- 3) 原始质粒的酶切鉴定报告、测序报告, 如果客户确定基因的信息无误, 这条非必需。
- 4) 实验目的、要求, 目的基因有无细胞毒性, 是否需要构建对照病毒?
- 5) 实验要求包括: 是否自行构建腺病毒载体? 是否要求更换启动子、polyA 等基因元件?

6) 实验目的包括：用于细胞实验还是动物实验，需要感染的细胞类型或动物模型类型。

四、我们的承诺：

- 1) 构建腺病毒/慢病毒载体的时间约 15 到 25 个工作日。病毒的包装，扩增的时间约 20 到 30 个工作日。总计需要 45-55 个工作日。
- 2) 提供重组穿梭载体或者 siRNA 载体，重组腺病毒载体的酶切及测序报告。
- 3) 免费提供一管阴性对照（仅限通用型的，如果客户指定的序列，需要另外计费）。
- 4) 最大插入片段 5kb—8Kb。

补充说明：

- 1) 如果客户需更换启动子，需保证所插入的基因的表达产物对细胞无毒害作用，
- 2) 如果插入的目的片段太长，客户要求测序验证全长，需要提供基因的特异引物，以测得全长，加收一定的费用。

五、腺病毒和慢病毒比较表

| 腺病毒载体系统和慢病毒载体系统比较 | | |
|-------------------|-------------------------|----------------------------------------|
| 病毒表达系统 | 腺病毒表达系统 (Adenovirus) | 慢病毒表达系统 (Lentivirus) |
| 病毒基因组 | 双链 DNA 病毒 | RNA 病毒 |
| 复制 | 自主复制 | 自主复制 |
| 是否整合 | 病毒基因组游离于宿主基因组外，瞬时表达外源基因 | 病毒基因组整合于宿主基因组，长时间、稳定表达外源基因 |
| 感染细胞类型 | 感染分裂和不分裂细胞 | 感染分裂和不分裂细胞，适合难转染的原代细胞（如神经细胞，淋巴细胞）及体内实验 |
| 表达丰度 | 高水平表达 | 中水平表达 |
| 表达时间 | 快（1-2 天） | 慢（1-3 天） |
| 滴度 | 滴度高达 10^{12} pfu/ml | 滴度最高可达 10^{11} pfu/ml |
| 克隆容量 | 可插入高达 8kb 的外源片段，滴 | 可插入不超过 8kb 的外源片段，滴度随插入片 |

| | | |
|------|---------------|----------|
| | 度随插入片段长度增加而降低 | 段长度增加而降低 |
| 免疫原性 | 高免疫原性 | 低免疫原性 |



Shanghai ShineGene Molecular Bio-tech Co.,Ltd.

Add: Floor 2, Building A, 328#, Wuhe Road, Shanghai, 201109, China

Tel: +86-21-54460832

Fax: +86-21-54460831

E-mail: master@shinegene.org.cn

WebSite: www.synthesisgene.com