

载体平台

Vector Core

1 平台概况

载体平台是首都医学科学创新中心的科研辅助平台之一，主要负责为科研人员提供腺相关病毒（Adeno-associated virus, AAV）、慢病毒（Lentivirus, LV）、腺病毒（Adenovirus, AdV）、和逆转录病毒（Retrovirus, RV）等病毒载体的包装服务，涵盖从病毒载体选择、载体质粒设计、病毒包装纯化、病毒载体浓缩，到病毒载体使用、实验应用等多方面支撑服务。

平台也将积极开展自主研发，旨在优化现有工具,并开发杆状病毒（Baculovirus）、狂犬病病毒（Rabies virus）、单纯疱疹病毒 1 型（HSV-1），水疱性口炎病毒（VSV）等新的病毒载体，助力广大科研人员实现突破。

2 病毒载体应用和选择

2.1 病毒载体生产和应用

病毒可以感染细胞，在细胞中完成复制和翻译的过程，因此也可以将病毒作为一种高效的基因转移系统，即病毒载体。通过对病毒进行改造，删除或拆分病毒复制必需基因，可以得到重组病毒载体，使其在无法复制产生子代病毒的基础上，能够入侵宿主细胞并表达目的基因，成为相对安全基因递送工具（图 1）。

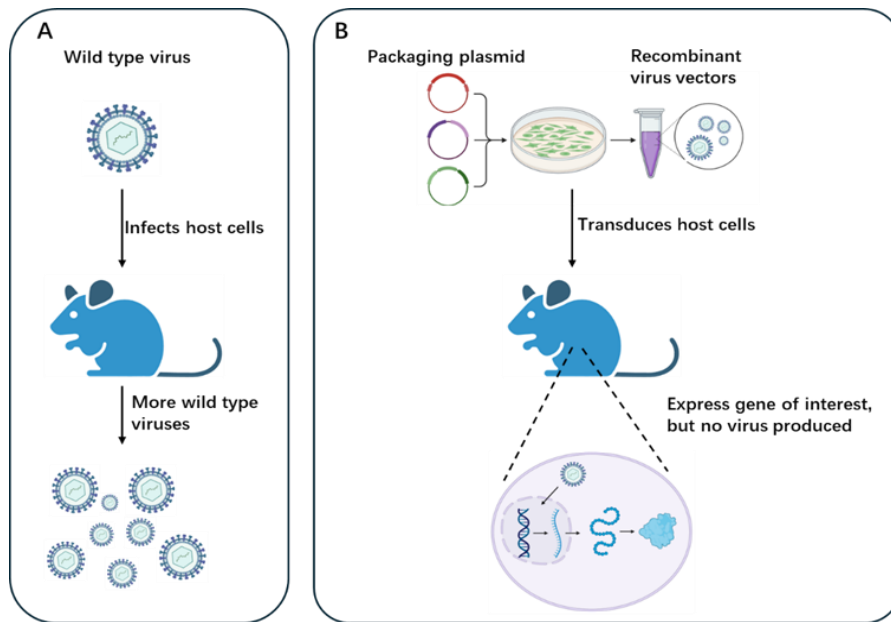


图 1. 野生型病毒感染的复制和重组病毒载体介导基因递送。A. 野生型病毒感染宿主细胞后，复制并产生大量子代野生型病毒。B. 通过质粒转染细胞获得的重组病毒载体，再感染宿主细胞后，由于缺乏病毒复制必需基因，无法复制和产生子代病毒，但能够完成目的基因的高效表达。

病毒载体是应用最多的基因递送载体之一，广泛应用于基础科研和基因治疗研究中，

目前已有数十款基因治疗药物被批准上市。传统的病毒载体主要应用于构建细胞系和表达蛋白，随着生物科学和医学研究的不断进步，病毒载体在疫苗开发、癌症和遗传性疾病的基因治疗、细胞治疗等领域也大放异彩（图 2）。

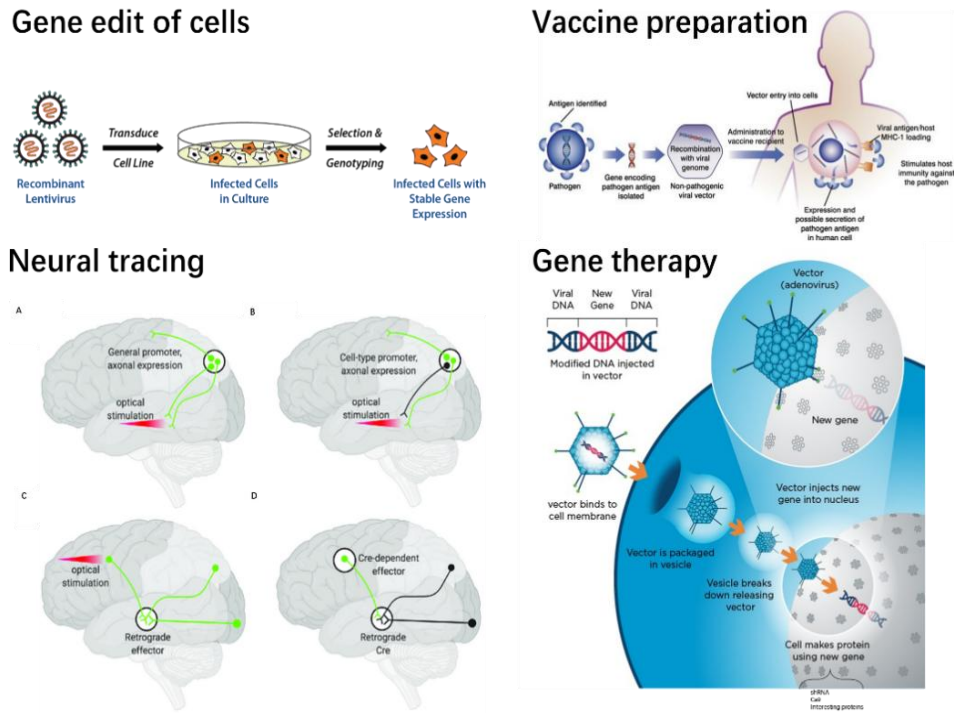


图 2. 病毒载体的应用

2.2 病毒载体的选择

目前常用病毒载体主要包括腺相关病毒（AAV）、慢病毒、腺病毒和逆转录病毒，它们各具特色以适应不同应用场景（表 1）。此外，HSV-1、VSV 等病毒载体也有较多的研究和应用。

AAV 以安全性高、免疫原性低著称。虽然其包装容量较小（约 4.5 kb），且不整合进宿主细胞基因组，却能实现长期稳定表达，是体内基因治疗的首选载体。

慢病毒能感染分裂及非分裂细胞并将基因整合至宿主基因组，实现永久表达，广泛用于 CAR-T 细胞疗法及干细胞研究，但需关注插入突变风险。

腺病毒具有较高的转导效率和较大的包装容量（可达 30 kb 以上），能诱导强免疫反应，适合疫苗开发及需要瞬时高水平蛋白表达的场景，但因免疫清除快而不适合长期治疗。

逆转录病毒仅能感染分裂细胞，且具有较高的基因组整合风险，因此正逐渐被慢病毒取代，但在干细胞等特定研究领域仍具有应用价值。

因此，需综合考量目标组织、细胞类型、表达时长、基因片段大小、病毒载体给药方式、免疫原性等因素，选择合适的病毒载体种类，以实现最佳递送效果。

表 1 不同病毒载体的特点

Vector Type	Genome	Packaging Capacity	Virus Size	Cells Infected	Expression	Host Genome Integration	Immune Response
Lentiviral	RNA	< 8 kb	80–130 nm	Dividing/Non-dividing	Stable	Yes	Low
Gamma-retroviral	RNA	< 8 kb	80–130 nm	Dividing	Stable	Yes	Moderate
AAV	Single-stranded linear DNA	~4.5 kb	18–26 nm	Dividing/Non-dividing	Transient or Stable*	No*	Very Low
Adenoviral	Double-stranded linear DNA	5–36 kb	105 nm	Dividing/Non-dividing	Transient	No	High

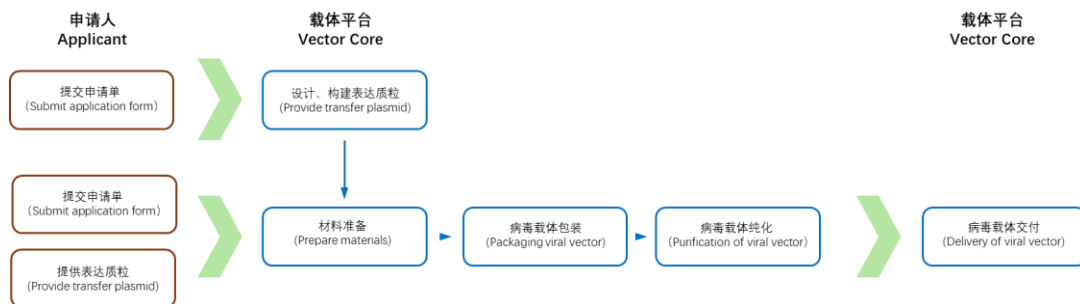
3 病毒载体包装服务

3.1 病毒载体包装流程

申请人通过邮件（平台服务邮箱 viral_vector@cimrbj.ac.cn）提交申请单，并提供病毒表达质粒的甘油菌或新鲜菌液，同时保证质粒序列的正确性。平台也可构建病毒表达载体质粒，需根据构建难度评估费用。载体平台在收到病毒包装申请和表达质粒后，开始病毒载体的制备工作，在经过最终滴度测定和质检后，交付病毒载体。平台目前可以提供 AAV 和 LV 包装服务，其它病毒载体后续将陆续提供。

AAV 和 LV 载体交付周期一般为 2 周，从平台收到病毒包装材料（如质粒、菌液）后的首个周一开始计时。如需构建质粒，需额外增加一周时间，复杂质粒构建时间可能会延长。包装超离纯化病毒，或遇到订单较多、节假日等特殊情况下，交付时间可能会延长，还望理解。

平台还会选择一些通用的表达质粒（如荧光报告基因、Cre、Cas9、化学遗传等）制备现货病毒，方便大家即时使用。



病毒载体包装服务流程

3.2 载体平台服务项目

服务项目	服务说明	
A. 腺相关病毒	a1.现货	提供预制备的常用通用病毒载体，最快可实现当天交付。
	a2.按需包装-氯仿抽提法纯化	采用氯仿纯化法，纯度较超速离心法略低，但产量高、成本低、交付快，可满足大多数体内外实验需求。
	a3.按需包装-超速离心法纯化	碘克沙醇超速离心法能减少空衣壳数量（不含 DNA 的 AAV 颗粒）；但滴度略低，费用较高，交付周期稍长。
B. 慢病毒	b1.现货	提供预制备的常用通用病毒载体，最快可实现当天交付。
	b2.按需包装-浓缩病毒	浓缩病毒产量较高，费用低，交付周期短，可满足大多数体外实验需求。
	b3.按需包装-超离纯化病毒	纯化病毒采用蔗糖密度梯度离心法，产量较低，费用高，交付周期略长，适用于体内和体外实验。
C. 克隆	c1.质粒转化	质粒转化到大肠杆菌，用于后续提质粒和病毒包装。
	c2.质粒构建	构建病毒表达质粒，用于病毒载体包装。
D. 逆转录病毒	按需包装	暂未开通，后续将提供按需包装服务。
E. 腺病毒	按需包装	暂未开通，后续将提供按需包装服务。

3.3 AAV 载体包装

AAV 是一种单链 DNA 病毒，因其非致病性、低免疫原性、不发生基因组整合、长期稳定表达等优势，是科研领域的重要体内基因递送工具，也是基因治疗中最常用的基因递送载体。同时，AAV 丰富的血清型及其组织或细胞感染嗜性差异，为实现靶向性的基因递送提供了可能。

(1) 平台可包装 AAV1、AAV2、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAV-rh10、AAV-retro、AAV2-PHP.B、AAV2-PHP.eB、AAV-PHP.S、AAV-B10、AAV-B22、AAV-ie、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAV2.7m8 等血清型病毒。如有其它血清型需求可与本平台沟通。

(2) 表达质粒（即表达目的基因并含有 ITR 序列的质粒，也称为穿梭质粒、transfer 质粒、pAAV 质粒、载体质粒等）需由申请人自行提供，或由平台代为构建。平台现有部分 AAV 表达质粒（见附表 1），可共大家免费使用，或在其基础上构建自己的 AAV 表达质粒。

(3) AAV 滴度为通过 qPCR 或 ddPCR 测得的病毒基因组拷贝数，一般为 2×10^{12} - 5×10^{13} viral genome/mL (vg/mL)。实际滴度会受 AAV 血清型、基因组大小、基因序列等影响（某些情况下滴度可能小于 1×10^{12} vg/mL）。表达基因（含两个 ITR 及其中间的所有序列）大于 4.8 kb 时，将可能严重影响病毒产量和基因表达水平，请严格控制表达基因的序列长度。

(4) 纯化方式：平台提供氯仿抽提法和碘克沙醇超速离心法两种纯化方式可供选择。氯仿纯化法纯化效果较超离法略差，可满足大多数体内外实验需求，病毒产量较高，费用较低（详见参考文献）；碘克沙醇超速离心法能减少空衣壳数量（不含 DNA 的 AAV 颗粒），但滴度略低，费用较高，交付周期略长。参考文献：[1] Negrini M, et al. AAV

Production Everywhere: A Simple, Fast, and Reliable Protocol for In-house AAV Vector Production Based on Chloroform Extraction. *Curr Protoc Neurosci.* 2020;93(1):e103. [2]
Davidsson M, et al. A comparison of AAV-vector production methods for gene therapy and preclinical assessment. *Sci Rep.* 2020;10(1):21532.

3.4 慢病毒（LV）载体

慢病毒是逆转录病毒的一种，是 RNA 病毒，可以有效地感染神经元细胞、肿瘤细胞、干细胞等多种类型细胞。此外，由于其可以整合至细胞基因组，也常用于稳定细胞株的筛选。

(1) 表达质粒（即表达目的基因并含有 LTR 序列的质粒，也称为穿梭质粒、transfer 质粒、pLV 质粒、载体质粒等）需由申请人自行提供，或由平台代为构建。

(2) 慢病毒载体交付形式为浓缩病毒或纯化的病毒。浓缩病毒产量较高，费用低，交付周期短，可满足大多数体外实验需求；纯化病毒采用蔗糖密度梯度离心法，产量较低，费用高，交付周期略长，适用于体内和体外实验。

(3) 病毒滴度默认免费通过 RT-qPCR 或 RT-ddPCR 测定病毒基因组拷贝数，滴度 $>1 \times 10^9$ vg/mL（对应感染性滴度 $>1 \times 10^8$ TU/mL，一般荧光对照病毒可达 10^9 TU/mL）。实际滴度会受基因组大小、基因序列等影响。平台可测定感染性滴度：根据感染细胞荧光计数得到的感染性滴度单位为 Transducing Units/mL（TU/mL）；根据感染细胞中病毒基因组整合计数得到的感染性滴度单位为 Integration Units/mL（IU/mL）。

4 联系方式

欢迎大家积极提供宝贵的建议或意见，有任何问题或需求请及时向我们反馈。

联系人：胡亮波

邮箱：huliangbo@cimrbj.ac.cn

单位：首都医学科学创新中心（CIMR）载体平台

地址：北京市丰台区右安门外西头条 10 号



微信：

附表 1: 可共享 pAAV 载体质粒
Appendix 1: Available pAAV Vector Plasmids for Sharing

Name	Short description
pscAAV-CAG-GFP	packaging self-complementary GFP under the CAG promoter
pAAV-hSyn-EGFP	Human synapsin promoter driving EGFP expression
pAAV-GFAP-hM3D(Gq)-mCherry	Gq-coupled hM3D DREADD fused with mCherry under the control of GFAP promoter (Low Copy)
pAAV-EF1 α -DIO-hM4D(Gi)-P2A-EGFP-WPRE-pA	Cre-dependent expression of hM4Di-P2A-EGFP under EF1 α promoter
pAAV-SFFV-mScarlet-WPRE-pA	SFFV promoter driving mScarlet expression with WPRE to enhance expression
pAAV-hSyn-mScarlet	Human synapsin promoter driving mScarlet expression
pAAV-EF1 α -mTagBFP2	EF1 α promoter driving mTagBFP2 expression
pAAV-hSyn-DIO-EGFP	Double floxed EGFP under the control of human synapsin promoter; Expression activation depends on Cre
pAAV-EF1 α -DO-mScarlet	Double floxed mScarlet under the control of EF1 α promoter; Expression inactivation depends on cre
pAAV-EF1 α -Cre-P2A-mScarlet	EF1 α promoter driving Cre expression and mScarlet reporter linked by P2A
pAAV-EF1 α -fDIO-Cre	Expresses Cre recombinase and HA tag in a Flp dependent fashion (fDIO)
pX601-AAV-CMV::NLS-SaCas9-NLS-3xHA-bGHpA;U6::BsaI-sgRNA	A single vector AAV-Cas9 system containing Cas9 from <i>Staphylococcus aureus</i> (SaCas9) and its sgRNA
pAAV-U6-sgRNA-scaffold	U6 drives sgRNA expression
pAAV-U6-shEGFP-SFFV-mScarlet	U6 drives shRNA targeting EGFP; express reporter mScarlet driven by SFFV promoter

pAAV-CAG-mEGFP-WPRE-v2	Has some multiple cloning site (MCS) and is convenient to make new construction
pAAV-CMV-NLS-dSaCas9-NLS-3xHA-U6-Sa sgRNA	A single vector AAV-Cas9 system containing dCas9 from Staphylococcus aureus (SaCas9) and its sgRNA
