

GeticoFect™ AAV-Plus Transfection Kit

产品说明书

订购信息

货号	规格	组分	体积
181701	1L	GeticoFect™ AAV-PLUS 转染试剂	6ml
		GeticoFect™ AAV-PLUS 转染增强剂	3ml
181702	10L	GeticoFect™ AAV-PLUS 转染试剂	60ml
		GeticoFect™ AAV-PLUS 转染增强剂	30ml
181703	50L	GeticoFect™ AAV-PLUS 转染试剂	5 X 60ml
		GeticoFect™ AAV-PLUS 转染增强剂	5 X 30ml

操作步骤

一、产品信息

(一) 产品描述

GeticoFect™ AAV-PLUS AAV 转染系统是一种基于克隆的 HEK293F 衍生细胞系的高产腺相关病毒 (AAV) 生产系统, 适用于在化学限定的病毒生产培养基中进行悬浮培养。该系统包含转染试剂、转染增强剂, 用于生产可扩展的、高滴度的腺相关病毒载体。

二、培养病毒生产细胞

(一) 细胞处理准则

1. 冻存细胞后, 立即放入液氮中储存, 直至使用。
2. 避免细胞短时间内经历极端温度变化。
3. 细胞从干冰接收后, 应储存于液氮中。
4. 细胞在液氮中放置 3-4 天后再进行解冻。
5. 所有细胞操作过程中, 通过轻轻旋转混匀细胞, 避免剧烈摇晃或吹打。
6. 常规细胞培养维护时, 当活细胞密度达到 $4-6 \times 10^6$ cells/mL, 每 3-4 天进行传代培养, 未达到早期对数生长期 ($\geq 4 \times 10^6$ cells/mL) 的细胞不可传代。

(二) 解冻病毒生产细胞

1. 向 125mL 锥形摇瓶中加入 30mL 预热至 37°C 且添加了 4mM 谷氨酰胺补充剂的病毒生产培养基。
2. 从液氮中取出一瓶病毒生产细胞, 在 37°C 水浴中轻轻旋转 1 - 2 分钟, 快速解冻, 直至仅剩余少量冰块, 注意不要将冻存管完全浸没在水中。
3. 在细胞完全解冻前, 用 70%乙醇对冻存管进行消毒, 然后在超净工作台中打开。
4. 轻轻颠倒细胞冻存管, 混合内容物。取 50 μ L 细胞转移至 450 μ L 不含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS 中, 使用台盼蓝拒染法测定细胞活力和活细胞密度。
5. 使用 1-5mL 移液器, 将剩余细胞悬液逐滴加入到步骤 1 准备的含有预热培养基的摇瓶中。
6. 将细胞置于 37°C、相对湿度 $\geq 80\%$ 、CO₂浓度为 8%的恒温培养箱中, 在轨道摇床上培养。根据摇床摇臂直径设置转速: 19mm 直径设为 125 ± 5 rpm, 25mm 直径设为 120 ± 5 rpm, 50mm 直径设为 95 ± 5 rpm。
7. 解冻后 3 - 4 天, 测定活细胞密度和细胞活力。细胞活力应 $\geq 90\%$, 活细胞密度应 $> 1 \times 10^6$ viable cells/mL。若活力 $< 90\%$, 可继续培养 3 天, 直至达到所需活力; 活细胞密度未达到 $> 1 \times 10^6$ viable cells/mL 时, 不可传代。
8. 后续常规细胞培养维护时, 当活细胞密度达到 $4-6 \times 10^6$ viable cells/mL, 根据细胞生长情况, 按照 3-4 天的周期进行传代培养, 调整初始接种密度, 以在传代时达到目标细胞密度。
- 9.

(三) 传代病毒生产细胞

1. 传代时, 计算活细胞密度。若使用 Vi-CELL™细胞计数仪, 按照推荐的细胞系设置进行操作。

2. 根据推荐的接种密度和培养体积，计算接种新摇瓶所需的细胞悬液体积。
3. 将适量细胞转移至含有新鲜预热且添加了 4mM 谷氨酰胺补充剂的病毒生产培养基的摇瓶中。
4. 将摇瓶置于 37°C、相对湿度 ≥80%、CO₂浓度为 8% 的恒温培养箱中，在轨道摇床上培养，直至细胞密度达到 4-6×10⁶ viable cells/mL。细胞在早期对数生长期之外的密度传代，可能导致倍增时间延长和滴度降低，因此需调整初始接种密度，以达到目标传代密度。
5. 重复步骤 1-3，维持或扩增细胞用于转染。

(四) 冻存病毒生产细胞

1. 确定冻存细胞所需的密度和体积，目标是最终密度为 1×10⁷ viable cells/mL，总体积为 1.1mL。在细胞扩增过程中，维持活细胞密度在 4-6×10⁶ viable cells/mL，直至达到所需冻存体积。培养细胞时，不要使用大于 2L 的摇瓶，因其形状不同，需调整摇晃速度，同时严格遵循摇晃速度、轨道直径和最大摇瓶体积的建议。
2. 在扩增用于冻存的细胞时，额外准备一个摇瓶用于制备条件培养基。该摇瓶的准备和细胞扩增方式与用于细胞冻存的摇瓶相同。根据冻存总体积，至少准备 1/2 体积的条件培养基。
3. 准备标签并标记适量冻存管。若在收获日之外的时间标记冻存管，需将其存放在生物安全柜中。
4. 准备条件培养基：将含有条件培养基的摇瓶从培养箱中取出，将全部细胞悬液转移至无菌聚丙烯离心管或瓶中；在 2-8°C、300×g 条件下离心 10 分钟；小心倒出上清液至无菌聚丙烯瓶中，避免扰动细胞沉淀，收集的上清液即为条件培养基；将条件培养基在 2-8°C 冰箱或冰上储存至少 2 小时，然后丢弃细胞沉淀。
5. 准备冻存培养基 (2X)：在无菌聚丙烯瓶中，加入新鲜培养基并补充 15% DMSO，配制成 2X 冻存培养基，使用玻璃血清吸管转移浓缩 DMSO，将 2X 冻存培养基在 2-8°C 或冰上保存；取出计算好体积的细胞，转移至无菌聚丙烯离心瓶/管中，在 2-8°C、200×g 条件下离心 10 分钟，小心倒出上清液，轻弹离心管底部使细胞沉淀松散；用宽口吸管吸取约 10% 总体积的条件培养基重悬细胞沉淀；添加额外的条件培养基，制备 2X 细胞储备液，轻轻摇晃使细胞均匀分布，并在冰上或冷块上保持冷却；使用玻璃血清吸管，向含有 2X 细胞储备液的瓶中加入计算好体积的冷 2X 冻存培养基；轻轻摇晃使溶液均匀，此时溶液总体积应等于冻存总体积，最终浓度为 7.5% DMSO、50% 条件培养基、42.5% 新鲜培养基，细胞密度为 1×10⁷ cells/mL；立即使用重复移液器或无菌血清吸管，将 1.1mL 最终细胞悬液分装至标记好的冻存管中；每次分装前，轻轻摇晃细胞悬液使其均匀，整个分装过程中保持细胞悬液低温；将冻存管转移至含有异丙醇的冻存盒中，在 -80°C 储存 24-48 小时，之后转移至液氮气相中长期保存。

三、转染病毒生产细胞

(一) 转染准则

1. 新鲜解冻的细胞在转染前需在培养中恢复至少 3 代。
2. 所有细胞操作过程中，通过轻轻旋转混匀细胞，避免剧烈混合或吹打，细胞健康状态对转染效果至关重要。
3. 使用前，将转染试剂轻轻颠倒 4-5 次，确保充分混匀。
4. 质粒 DNA 与转染试剂的复合过程在室温下进行。
5. 根据不同转染规模，参考文件中表格准备试剂。

(二) 设备准则

1. 为获得最佳性能，需遵循本方案中推荐的摇晃直径、摇晃速度、摇瓶尺寸 / 类型和转染培养体积。
2. 建议使用湿度为 80% 的恒温培养箱，以减少 AAV 生产过程中的蒸发。使用多孔板时，若有高湿度设置，应开启。
3. 确保设备温度校准准确，避免培养温度超出推荐范围，导致细胞生长不良、聚集或死亡；同时确保 CO₂ 浓度校准准确，CO₂ 水平不应超过 8%。

(三) 所需材料

1. 在添加了 4mM 谷氨酰胺补充剂的病毒生产培养基中培养的病毒生产细胞。
2. 用户特定的质粒：转移质粒（含目的基因）、Rep/Cap 质粒、辅助质粒。
3. AAV-PLUS 转染试剂盒。
4. Viral-Plex 复合缓冲液。
5. 预热至 37°C 且添加了 4mM 谷氨酰胺补充剂的病毒生产培养基。
6. 一次性无菌锥形摇瓶。
7. 置于 37°C、相对湿度 ≥ 80%、CO₂ 浓度为 8% 的恒温培养箱中的轨道摇床。
8. 用于测定活细胞密度和细胞活力的试剂和设备。

(四) 优化的转染条件

条件	用量
复合缓冲液	每 mL 转染培养体积 100μL
质粒 DNA	每 mL 转染培养体积 1.5μg 总质粒 DNA (转移质粒 + Rep/Cap 质粒 + 辅助质粒)
AAV-PLUS 转染试剂	每 mL 转染培养体积 6μL
AAV-PLUS 转染增强剂	每 mL 转染培养体积 3μL
AAV-PLUS 裂解缓冲液	每 mL 转染培养体积 100μL
病毒生产细胞	转染时密度为 3×10^6 cells/mL

(五) 转染步骤

1. 传代并扩增细胞，直至细胞密度达到约 $4-6 \times 10^6$ cells/mL。
2. **Day 0: 准备并转染细胞**
 - 转染当天 (Day 0)，测定活细胞密度和细胞活力。细胞密度应达到约 $4.5 - 6.0 \times 10^6$ viable cells/mL，活力 ≥ 95% 方可进行转染。
 - 用新鲜添加了 4mM 谷氨酰胺补充剂的病毒生产培养基将步骤 1 中的细胞稀释至最终

密度为 3×10^6 viable cells/mL。

- 将细胞置于 37°C、8% CO₂ 的恒温培养箱中，在轨道摇床上培养，直至完成 DNA / 转染复合物制备（步骤 5-7），摇晃速度参考附件表格。
- 准备转移质粒 DNA、Rep/Cap 质粒 DNA 和辅助质粒 DNA，每 mL 转染培养体积使用 1.5μg 总质粒 DNA，根据质粒大小优化质粒摩尔比（详见附录 A “质粒比例优化”）。
- 制备转染复合物：轻轻颠倒 AAV-PLUS 转染试剂瓶 4 - 5 次混匀；用 Viral-Plex™ 复合缓冲液将步骤 4 中的总质粒 DNA 稀释至转染培养体积的 10%（如转染 30mL 培养物，用 3mL Viral-Plex™ 复合缓冲液稀释 45μg 总 DNA），轻轻旋转混匀；在新管中，每 mL 转染培养体积加入 3μL AAV-PLUS 转染增强剂和 6μL AAV-PLUS 转染试剂（如转染 30mL 培养物，加入 90μL AAV-PLUS 转染增强剂和 180μL AAV-PLUS 转染试剂），轻轻吹打混匀（不可涡旋），AAV-PLUS 转染增强剂 / AAV-PLUS 转染试剂复合物在室温下可稳定保存 1 小时，在 2 - 8°C 可稳定保存 2 天；将步骤 5e 中预混合的 AAV-PLUS 转染增强剂和 AAV-PLUS 转染试剂加入到步骤 5c 中稀释的质粒 DNA 中，通过旋转、颠倒或轻轻吹打 2 - 3 次混匀（不可涡旋）。
- 将配置好的质粒 DNA/AAV-PLUS 转染增强剂/AAV-PLUS 转染试剂复合物在室温下孵育 20-30 分钟，然后轻轻转移至准备好的摇瓶中。对于不同质粒大小，可优化孵育时间以提高滴度。
- 将细胞置于 37°C、8%CO₂ 的恒温培养箱中，在轨道摇床上培养约 72 小时，摇晃速度参考 附件表格。

（六）收获 AAV 颗粒

1. AAV 颗粒的处理需遵循机构指南，所有接触 AAV 溶液的材料在处理前应进行适当消毒。
2. AAV-PLUS 裂解缓冲液为 10X 配方，可直接添加到细胞培养物中诱导裂解。在转染后 70-72 小时收获 AAV 颗粒。
3. 向培养瓶中直接加入 AAV-PLUS 裂解缓冲液，按 1:10 稀释（如 30mL 培养体积加入 3.3mL AAV-PLUS 裂解缓冲液），摇晃摇瓶使裂解缓冲液均匀分布。若进行 qPCR 滴度测量，完成此步后从培养瓶中取出 5mL，在 37°C、250rpm 的轨道摇床上孵育 1 小时进行裂解，然后进行步骤 5；若进行下游工作流程，向剩余培养物中加入 MgCl₂（终浓度 2mM）和 Benzonase（终浓度 90U/mL），然后进行步骤 4。
4. 将培养瓶在 37°C、轨道摇床上孵育至少 2 小时，细胞裂解后，培养物中会出现可见细胞碎片，裂解孵育时间因 AAV 血清型和生产规模而异，建议在大规模生产前优化裂解条件。
5. 将细胞裂解物转移至合适的烧瓶或管中，小体积（微量离心规模）在 4°C、13,000×g 条件下离心 10 分钟，大规模生产在 4°C、4,500×g 条件下离心 30 分钟。
6. 将含有粗 AAV 颗粒的上清液转移至合适的储存容器中。
7. 若进行 qPCR 滴度测量，将 50-100μL 裂解物转移至 96 孔板，具体操作详见“AAV 滴度的 qPCR 测量”章节，建议每个样品制备多个重复以减少 qPCR 检测的变异。
8. 收获的粗 AAV 颗粒可在 -80°C 长期储存，为避免反复冻融，建议分装病毒。解冻 AAV 样品时，将管置于室温，通过轻轻吹打或颠倒混匀，不可涡旋或剧烈混合。粗 AAV 载体可在 4°C 短期储存（如过夜），若储存时间过长可能会出现沉淀，这取决于 AAV 血清型或生产规模，若观察到沉淀，在进行下一步前需重新澄清样品。
9. 用 10% 漂白剂溶液对使用过的移液器吸头、血清吸管和培养瓶进行消毒后再丢弃；丢弃剩余 AAV 样品时，直接向 AAV 溶液中加入 10%漂白剂溶液，孵育至少 30 分钟后再处理。

四、AAV 滴度的 qPCR 测量

(一) 所需材料

项目	来源
用于 qPCR 标准曲线的线性化转移质粒 (1.0×10^{10} copies/ μ L)	-
DNase I	Getico
Exonuclease I	Getico
重组 Proteinase K 溶液	Getico
DNase I 缓冲液 (10X)	Getico
qPCR Mastermix	Getico
GFP 特异性引物 (正向 / 反向) 混合液 (10 μ M)	Getico
GFP 特异性 TaqMan 探针 (FAM/TAMRA 3 μ M)	Getico
DNase/RNase - Free 蒸馏水	Getico
粘性 PCR 板密封膜	Getico
光学粘性薄膜	Getico
PBS	Getico
TE, pH 8.0, 无 RNase	Getico
Pluronic™ F-68 非离子表面活性剂 (100X)	Getico

五、转染相关试剂用量及参数

内容	125 mL flask	250 mL flask	1 L flask	2 L flask	2.8 L flask
所需细胞数量	90×10 ⁶	180×10 ⁶	720×10 ⁶	1,440×10 ⁶	3,000×10 ⁶
转染培养体积	30 mL	60 mL	240 mL	480 mL	1,000 mL
摇床速度	125 ± 5 rpm (19 mm 轨道直径) 95 ± 5 rpm (55 mm 轨道直径)	125 ± 5 rpm (19 mm 轨道直径) 95 ± 5 rpm (55 mm 轨道直径)	125 ± 5 rpm (19 mm 轨道直径) 95 ± 5 rpm (55 mm 轨道直径)	125 ± 5 rpm (19 mm 轨道直径) 95 ± 5 rpm (55 mm 轨道直径)	95 ± 5 rpm 90 ± 5 rpm 55 ± 5 rpm
质粒 DNA 用量	每 mL 转染培养体积 1.5μg 总质粒 DNA	每 mL 转染培养体积 1.5μg 总质粒 DNA	每 mL 转染培养体积 1.5μg 总质粒 DNA	每 mL 转染培养体积 1.5μg 总质粒 DNA	每 mL 转染培养体积 1.5μg 总质粒 DNA
质粒 DNA 体积	45 μL	90 μL	360 μL	720 μL	1.5 mL
用于稀释质粒 DNA 的复合缓冲液体积	3 mL	6 mL	24 mL	48 mL	100 mL
AAV-PLUS 转染试剂体积	180 μL	360 μL	1.44 mL	2.88 mL	6 mL
AAV-PLUS 转染增强剂体积	90 μL	180 μL	720 μL	1.44 mL	3 mL
最终培养体积	~ 34 mL	~ 68 mL	~ 272 mL	~ 544 mL	~ 1,120 mL

注:

- [1] 推荐的摇床速度范围: 最佳摇床速度应根据所使用的具体实验室设备通过实验确定。
- [2] 假设质粒 DNA 浓度为 1 mg/mL, 最终质粒 DNA 浓度为 1.5 μg/mL。
- [3] 用于稀释质粒 DNA 的体积。