

## 基安生物~AAV 病毒载体的选择和使用策略

### AAV 病毒简介

AAV 病毒载体是极具应用前景的基因给药工具。野生 AAV 被认为是非致病性的，感染个体后产生的免疫应答水平极低，无法自行复制，需依赖于与腺病毒或疱疹病毒的共同感染才能复制。重组 AAV 载体自身只需携带一个顺式元件，ITR，就能生产出重组 AAV 颗粒。由于缺乏 Rep 基因，重组 AAV 病毒基因组不整合宿主基因组，以染色体外形式长期存在，在非分裂细胞（如肌细胞）中也能实现治疗性蛋白的持久表达，安全性极高<sup>[2]</sup>。另外，多种血清型 AAV 对肌细胞具有良好嗜性。

#### • r AAV 血清型的选择

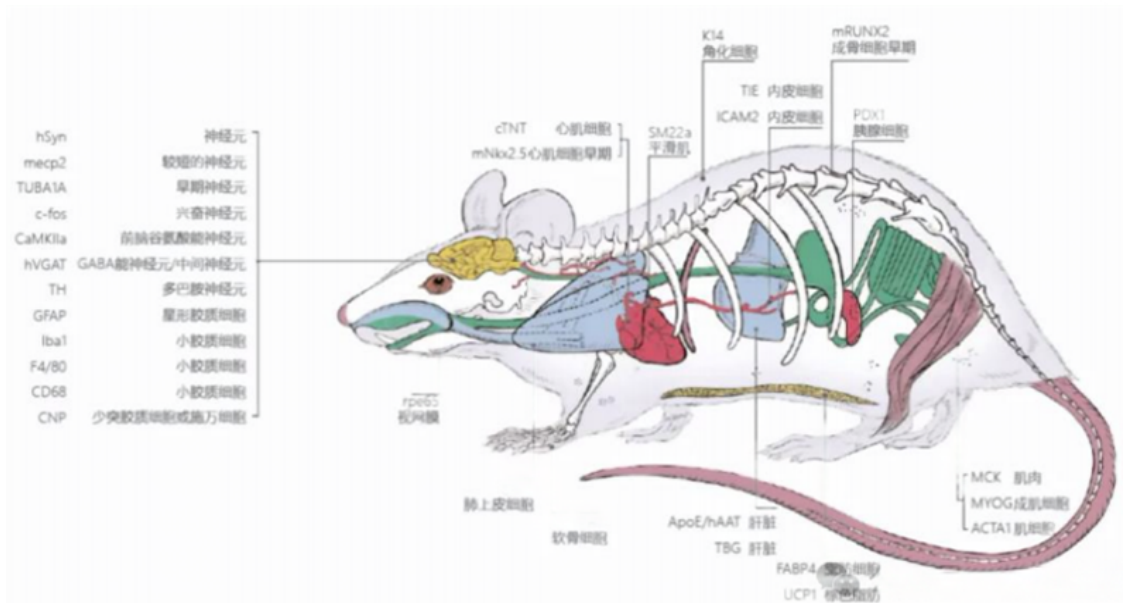
基安生物可提供多达 18 种 AAV 血清型：1-9、6.2、rh10、DJ、DJ/8、PHP.eB、PHP.S、AAV2-retro、AAV2-QuadYF、AAV2.7m8。不同的血清型在不同组织感染效率有显著差异，实验前可根据文献报道或做预实验确定最佳的血清型方案。

血清型	组织嗜性	推荐星级
AAV1	Smooth muscle, CNS, lung, retina, pancreas, heart, liver	★
AAV2	Smooth muscle, CNS, liver, kidney, retina	★★★★
AAV3	Smooth muscle, liver, lung	★
AAV4	CNS, retina, lung, kidney	★
AAV5	Smooth muscle, CNS, lung, retina	★★★★
AAV6	Smooth muscle, heart, lung, adipose, liver	★★★★
AAV6.2	lung, liver	★★
AAV7	Smooth muscle, retina, CNS, liver	★★
AAV8	Smooth muscle, CNS, retina, liver, pancreas, heart, kidney, adipose	★★★★★
AAV9	Smooth muscle, lung, liver, heart, pancreas, CNS, retina, testes, kidney	★★★★★★
AAVrh10	Smooth muscle, lung, liver, heart, pancreas, CNS, retina, kidney	★★★★★
AAV-DJ	Liver, heart, kidney, spleen	★★★★
AAV-DJ/8	Liver, brain	★
AAV-PHP.eB	CNS	★★★★★★
AAV-PHP.S	PNS	★★
AAV2-retro	Spinal nerves	★★
AAV2-QuadYF	Endothelial cell	★★
AAV2.7m8	Retinal cells (when injected into vitreous humor), inner ear cochlear hair cells (when injected into the semicircular canal).	★★★★

### rAAV 启动子的选择

除了选择适合的 AAV 血清型，启动子和调控元件的选用也至关重要。目前常用的启动子包括广谱型启动子，比如 CMV/EF1/ CAG，能够实现不同组织的高效率广谱表达。不同的血清型可提供一定的组织特异亲和性，然而血清型并不能避免 AAV 在非目标位置表达，例如在进行精细的脑部研究时，选择一种具有特异性、更强的启动子尤为重要。因此，通

常选择好 AAV 的血清型后我们还需要选择合适的启动子来实现目标基因的高强度表达或特异性表达。一般情况下，原位注射可提供一定的靶向性，对特异性启动子的需求并不强烈，可优先考虑强启动子以保证表达效率，如果要想通过尾静脉注射实现组织特异性表达，那么必须选择合适的血清型及特异性启动子来实现，



组织	启动子名称	启动子特性	推荐星级
广谱表达	CMV.PI	强启动子，目前强度最高的启动子，部分细胞 3 个月后会表达会有降低	★★★★★
	CAG	强启动子，人工构建的组合启动子，表达稳定但启动子过长	★★★★
	Ef1α	强启动子，人类靶向延长因子 1α (EF1A) 基因，可在多数种类细胞中稳定表达	★★★★★
神经	hSyn	最常用的神经元特异性启动子	★★★★★
	mecp2	较短的神经元特异性启动子	★★
	c-fos	兴奋神经元启动子	★★
	CaMKIIα	前脑谷氨酸能神经元特异性启动子	★★★★
	Nms	神经前体细胞特异性启动子	★★
	TUBA1A (Tα1)	早期神经元特异性启动子	★★
	hVGAT	GABA 能神经元/中间神经元特异性启动子	★★
	TH	多巴胺神经元特异性表达启动子	★★
	gfaABC1D (mini mal GFAP)	星形胶质细胞特异性启动子	★★★★
	CD68	活化状态的小胶质细胞特异性启动子	★★★★
	Iba1	活化和静息状态的小胶质细胞特异性启动子	★★★★
	Cx3cr1	小胶质细胞特异性启动子	★★★★★
	CNP (NPPC)	少突胶质细胞或施万细胞特异性启动子	★★
	MBP	少突胶质细胞特异性启动子	★★
	PLP	少突胶质细胞特异性启动子	★★
	Pdgfra	少突胶质前体细胞特异性启动子	★★

	NG2	少突胶质前体细胞特异性启动子	★★
	Pirt	感觉神经元特异性启动子	★★
	ALDH1L1	丘脑星形胶质细胞特异性启动子	★★
心脏	cTNT	心肌细胞特异性启动子	★★★★★
	TCF21	心肌成纤维细胞特异性启动子	★★
肌肉	MHCK7	肌肉特异性启动子	★★
	SM22a	平滑肌特异性启动子	★★★★★
	MHCK7	肌肉特异性启动子	★★
	ACTA1	肌细胞特异性启动子	★★
	MYOG	心肌成纤维细胞特异性启动子	★★
肺	SP-C (SFTPC)	肺上皮细胞特异性启动子	★★★★
肝脏	TBG	肝脏特异性启动子	★★★★★
肾脏	nphs1	肾脏足细胞特异性启动子	★★★★
	nphs	肾脏足细胞特异性启动子	★★★★
	Ksp-cadherin	肾小管上皮细胞特异性启动子	★★
胰腺	padx1 (pdx1)	胰腺特异性启动子	★★★★
	Insulin2	胰腺特异性启动子	★★★★
脂肪	FABP4 (aP2)	脂肪细胞特异性启动子	★★
	adiponectin	脂肪细胞特异性启动子	★★
	UCP1	棕色脂肪细胞特异性启动子	★★
	Myf5	前体脂肪细胞特异性启动子	★★
内皮	TIE1	内皮细胞特异性启动子	★★★★★
	Icam2	内皮细胞特异性启动子	★★★★★
视网膜	rpe65	视网膜特异性启动子	★★★★
	Arr3	视网膜视锥细胞特异性启动子	★★
	hrk	视网膜视锥细胞和视杆细胞特异性启动子	★★
前列腺	DD3	前列腺癌细胞特异性启动子	★★★★
皮肤	Keratin14 (K14)	皮肤表皮细胞特异性启动子	★★★★
	K14	角蛋白启动子	★★
巨噬细胞	F4/80	巨噬细胞特异性启动子	★★★★★
骨	COL2A1	软骨细胞特异性启动子	★★★★★
干细胞	Nanog	多功能干细胞启动子	★★★★★

### rAAV 注射方式的选择

重组 AAV 载体表达效果与注射剂量有一定的相关性，但注射剂量过大时会对肝脏造成损害。

#### 尾静脉注射：

小鼠尾静脉注射用量大，注射体积一般在 100-200ul，注射量一般在 1E+11vg 左右。

#### 局部注射：

小范围局部注射或原位注射体系小，单点注射量一般在 1E+09vg 左右。AAV 在感染后需要较长的时间来表达外源基因，一般 7-14 天开始表达，细胞分裂不旺盛的部位会需要更长时间表达。因此感染 AAV 后建议至少 2 周后再做检测，在体内表达一般在 3-4 周可以达到高峰，这个时间检测效果会较好。

通常情况下，包装总量为  $2E+12vg$  的 AAV 病毒足够使用，部分血清型需要的病毒量相对较高一些，局部注射体积有限，病毒滴度要求在  $1E+13vg/ml$  以上最佳。

感染部位	推荐血清型	注射方式	病毒用量
心脏	AAV9	原位多点注射 (局部)	1ul/点; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
		尾静脉注射 (系统性)	50-100ul/只; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
肝脏	AAV8/AAV9	尾静脉注射	50-100ul/只; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
全脑 (跨血脑屏障)	AAV-PHP.eB//AAV9	尾静脉注射	50-100ul/只; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
外周神经系统	AAV-PHP.S	立体定位注射	0.5-1.5ul/点; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
大脑 (局部)	AAV9 /AAV5/PHP.eB	立体定位注射	0.5-1.5ul/点; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
逆行示踪	AAV-Retro	局部注射	0.5-1.5ul/点; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
脊髓	AAV5/AAV1/AAV9	鞘内注射	0.5-1.5ul/点; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
脂肪	AAV9	腹内脂肪-腹腔注射	10-50ul/只; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
		皮下脂肪-原为注射	1-5ul/点; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
骨骼肌	AAV9	原位多点注射	1-5ul/点; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
眼睛	AAV2/ AAV2.7m8	玻璃体腔注射	0.5ul/点; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
	AAV-DJ	视网膜下腔注射	0.5ul/点; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
肺脏	AAV6	无创气管注射/滴鼻	50ul/只, 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
肾脏	AAV2/AAV9	肾脏肾盂原位注射	1-10ul/只; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
		尾静脉注射	50-100ul/只; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
肠道	AAV1/AAV5	灌肠/腹腔注射	50-100ul/只, 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
血管 (内皮为主)	AAV1/AAV5	腹主动脉局部感染	1-10ul/只; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$
胰腺	AAV8	腹腔注射/尾静脉注射	50-100ul/只; 滴度 $\geq 2E+12vg/ml$

注意：若滴度过高可用生理盐水或 PBS (PH7.4) 稀释后再使用，过高会引起异常代谢，反而会抑制感染及表达效果。