



腺病毒载体包装 Ad-dn-Akt 说明书

一、产品描述

重组腺病毒表达带有 HA 标签的钝化 Akt (Recombinant adenoviruses expressing hemagglutinin (HA)-tagged dominant-negative (dn) Akt, Ad-dn-Akt)。

Akt 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶 (serine-threonine kinase, Akt) 也被称为蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 分子量约为 57 kD, 是 PI3K-Akt 信号通路的重要组成部分; PI3K 将活化产生的 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇 (PIP3) 与 Akt 中的 PH 结构域结合后相互作用, 使得 Akt 的构象变化, 导致 Akt 的两个重要磷酸化位点暴露 (Thr308 位于激酶活性区, Ser473 位于羧基末端的调节区)。Thr308 磷酸化对于 Akt 的活化是必需的, 但同时位于羧基端 Ser473 残基磷酸化对于 Akt 的完全活化也是必需的。活化后的 Akt 发生转位, 进入细胞质和细胞核, 而这些区域则含有 Akt 的作用底物, 如 Bad、Caspase9、NF- κ B、Forkhead、mTOR、Par-4、p21 等, 从而介导细胞生长, 经多种途径促进细胞存活。Akt 是重要的抗细胞凋亡调节因子。Akt 处于多条信号通路的重要交叉点, 通过影响下游多种因子的活化状态, 发挥着抑制凋亡、促进增殖的关键作用。

腺病毒感染细胞后为瞬时表达, 通常不会与基因组 DNA 重组, 不能用于筛选稳定细胞株。本产品感染体内外细胞后, 有效表达时间通常不少于 7 天, 不同细胞和组织的有效表达时间有所不同。感染 10-14 天后蛋白的表达很可能会大大减弱。

二、组分和说明

本产品的滴度 $\geq 2 \times 10^9$ pfu/ml。

如果按照 20 MOI 感染 6 孔板的细胞, 每孔 50 万细胞计算, 200 μ l 本产品共可以感染 40 个孔; 如果按照 20 MOI 感染 24 孔板的细胞, 每孔 10 万细胞计算, 200 μ l 本产品共可以感染 200 个孔。

如果 MOI 值提高, 则相应可以感染的孔数会减少; 如果 MOI 值降低, 则相应可以感染的孔数会增加。

三、保存条件

-80 $^{\circ}$ C 保存, 1 年有效; -20 $^{\circ}$ C 保存, 1-2 个月内有效; 4 $^{\circ}$ C 保存, 1 周内有效。

四、使用说明

1. 感染条件的确定: 不同种类的细胞感染所需的 MOI 值是不同的, 如果是初次使用腺病毒感染需要通过实验确定最佳的感染条件。

1.1 细胞培养 (以 6 孔板 HeLa 细胞为例, 其它培养板或培养皿参考 6 孔板进行操作): 感染前 1 天在 6 孔板中以 5×10^5 /孔接种 HeLa 细胞, 每孔加入 2 ml 完全培养液 (具体的接种数量由细胞大小和细胞生长速度而定), 使第 2 天病毒感染时细胞密度达到约 70% 左右。

1.2 按照 MOI 分别为 2、5、10、20、40, 计算所需病毒量, 计算方法请参考附录。

1.3 冰上解冻病毒, 混匀后备用。



南京善本生物技术有限公司

Nanjing Sciben Biotech Co., Ltd.

1.4 从细胞培养箱中取出 6 孔板，在显微镜下确定每孔的细胞均生长良好，分别加入特定 MOI 值的病毒液，同时设置未加入病毒的细胞孔作为对照组。对于培养液体积比较小的多孔板，例如 96 孔板和 48 孔板，也可以先把病毒用培养液稀释至所需的 MOI 值后再加入。

1.5 感染后约 12 h，除去含有病毒的培养液，每孔加入 2 ml 新鲜的完全培养液，继续培养 24 h 后，收集细胞做 Western blotting，或提取 mRNA 做 qPCR。以不显著影响细胞生长、并由较强蛋白表达的 MOI 值为最佳条件。

2. 感染细胞：根据步骤 1 获得的最佳 MOI 进行感染实验。

五、注意事项

1、反复冻融会降低病毒滴度，如有必要请在收到本产品后分装保存。病毒融解后，如果在 1 周内使用，可以放置于 4℃。如果 -80℃ 保存时间超过 1 年，可能会导致滴度下降，此时建议重新测定病毒滴度。

2、腺病毒感染需要细胞表面 CAR 受体，请确认拟使用的细胞或组织可以被腺病毒感染。

3、本产品使用前请仔细阅读《腺病毒使用安全规范》。本产品生物安全等级为 Biosafety Level 1 (BSL-1)，没有确凿证据显示会导致健康成人产生疾病，可以按照常规的微生物实验操作要求进行操作。

4、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。

5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

六、附录

病毒 MOI 的计算

MOI (Multiplicity of Infection) 定义：病毒感染细胞时，病毒数量与细胞数量的比值。

pfu (plaque forming units) 定义：具有生物活性的病毒颗粒数量。

可以根据如下公式计算所需 pfu：

所需 pfu = 细胞数量 × MOI

例如，需要向 1×10^5 细胞中加入 20 MOI 的病毒，即所需 pfu = $(1 \times 10^5 \text{ cells}) \times (20 \text{ MOI}) = 2 \times 10^6 \text{ pfu}$ 。若病毒母液滴度为 $1 \times 10^9 \text{ pfu/ml}$ ，则细胞培养液中应加入 $(2 \times 10^6 \text{ pfu}) / (1 \times 10^9 \text{ pfu/ml}) = 0.002 \text{ ml}$ 病毒母液，即 2 μl 病毒母液。

南京善本生物技术有限公司

网址：<http://www.sciben.com>

电话：025-85300038

产品订购：sales@sciben.com

技术支持：support@sciben.com

产品编号：AD1003

生产批号：



善本生物网站



微信公众号