



腺病毒载体包装 Ad-myr-Akt 说明书

产品描述

Ad- myr-Akt, 带有 HA 标签, 是表达持续激活 AKT 的重组腺病毒。

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 活化产生的 PI (3, 4, 5) P3 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, 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。

组分和说明

本产品的滴度 $\geq 1 \times 10^9$ pfu/ml。

如果按照 20 MOI 感染 6 孔板的细胞, 每孔 50 万细胞计算, 200ul 本产品共可以感染 20 个孔; 如果按照 20 MOI 感染 24 孔板的细胞, 每孔 10 万细胞计算, 200ul 本产品共可以感染 100 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。

保存条件

-80°C 保存, 一年有效。-20°C 保存, 1-2 个月内有效。4°C 保存, 一周内有效。

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。



a. 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): 感染前一天在 6 孔板中以 5×10^5 /孔接种 HeLa 细胞, 每孔加入 2ml 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), 使第二天病毒感染时细胞密度达到约 70% 左右。

b. 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。

c. 冰上解冻病毒, 混匀后备用。

d. 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。

e. 感染后约 12h, 除去含有病毒的培养液, 每孔加入 2ml 新鲜的完全培养液, 继续培养 24h 后, 收集细胞做 western, 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。

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, 如果在一周内使用, 可以放置于 4℃。如果 -80℃ 保存时间超过一年, 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的 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(Not known to consistently cause diseases in healthy adults), 可以按照常规的微生物实验操作要求进行操作(Standard microbiological practices)。

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。



南京善本生物技术有限公司

Nanjing Sciben Biotech Co., Ltd.

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 $2 \mu\text{l}$ 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：AD1004

生产批号：



善本生物网站

微信公众号