

GenomONE-Neo EX 常见问题

	问题	回答
1	HVJ-E的特点	GenomONE-Neo EX是非病毒转染试剂。因为其中的RNA已经完全灭活，对人和动物没有任何潜在感染性和增殖能力。
2	转染原理	待转染的分子（DNA，蛋白质，反义寡核苷酸，siRNA等）与HVJ-E混合后，形成HVJ-E载体，导入靶细胞或组织。利用HVJ-E载体的HN蛋白唾液酸活性和F（融合）蛋白的膜融合活性侵染细胞。
3	HVJ-E载体与现有其他非病毒转染试剂作用机制的差异。 （阳离子脂质体等）	常规的非病毒类转染试剂，包括阳离子脂质体，通过内吞作用进入细胞，在溶酶体的作用下，会导致转染的DNA或其他分子多数区域发生降解。 与这些载体系统不同的是，HVJ-E载体能够抵抗溶酶体的降解作用，可将指定分子直接移到细胞质中。因此HVJ-E载体有更高的转染效率。
4	GenomONE-Neo EX 的用途限制	GenomONE 的研发和销售仅用于科研目的，不可用于人体或动物诊断或治疗（药物目的）。
5	有效期	产品有效期印在HVJ-E的铝质包装袋上。
6	HVJ-E载体的粒径有多大？	每个HVJ-E的颗粒的平均直径为约300 nm（200 ~400 nm）。
7	HVJ灭活方法	虽然HVJ-E采用HVJ（仙台病毒/鼠副流感病毒1）为原料，HVJ的基因组RNA已经过药物处理*完全灭活。所以HVJ-E不会传染或出现人类或动物的致病作用。 * 参考文献： Prior, P. <i>et al.</i> : BioPharm, 22-33 (Oct. 1996) Kaneda, Y. <i>et al.</i> : Advances in Genetics, Vol. 53, pp308-332 (2005).
8	检测和确认病毒灭活	每批HVJ都会使用培养细胞和受精的鸡蛋，进行病毒潜在增殖能力检测，以确保其已被灭活。
9	确认病毒灭活方法	用以下三种方法确认HVJ-E 对人和动物无潜在感染和增殖能力： (1) 细胞培养检测 (2) 受精鸡蛋检测 (3) 小鼠检测
10	实验室使用生物安全级别	GenomONE 在普通实验室内使用也非常安全。 虽然HVJ-E采用HVJ（仙台病毒/鼠副流感病毒1）为原料，但HVJ的基因组RNA已经被药物治疗灭活，不会传染或表现出人类或动物的致病作用。 然而，当本产品用于重组DNA实验的时候，则必须遵循重组DNA实验准则进行（国家相关法规提出的相关设施安全认定），只能在具备相应DNA重组实验条件的实验室内进行。
11	HVJ-脂质体对灵长类动物（非人类）的安全性评价	以下文章证明了HVJ-脂质体载体（混合了HVJ-E和脂质体的载体）对短尾猴的安全性： Tsuboniwa <i>et al.</i> : Human Gene Therapy, 12, 469-487 (2001).

12	质量保证	<ul style="list-style-type: none"> ● 每批HVJ都会使用培养细胞和受精鸡蛋对病毒增殖能力进行检测，以确保其已被灭活。（详细内容，请参见下一列） ● 无菌试验证明无细菌和真菌污染。 ● 内毒素水平小于2.5 EU/mL（鲎试剂胶凝试验）。 ● 在培养细胞中（BHK-21; ATCC CCL-10）加入表达基因，用血清验证。
13	许可证要求和商业用途	本产品及其使用涵盖多种专利（包括申请中专利），仅限科研使用。不可用于任何商业或其他用途，不可未经制造商允许，擅自更改、转卖。
14	每种试剂的作用	<ul style="list-style-type: none"> ● HVJ-E冻干粉：包裹传送分子的载体，与细胞膜融合，将目标分子导入细胞质内。 ● A试剂：带正电荷的肽，增加目标分子和HVJ-E之间的亲和性，促进分子导入HVJ-E载体。 ● B试剂：提高整个HVJ-E膜通透性。 ● C试剂：带正电荷的肽，增加HVJ-E载体和细胞（或组织）之间的亲和力，提高转染效率。 ● 缓冲液：中性生理浓度，用于悬浮或稀释HVJ-E和其他作用。
15	各试剂的构成和浓度	由于专利保护，无法公开。
16	HVJ-E复原液的储存	<ul style="list-style-type: none"> ● <u>不可冷冻。</u> ● HVJ-E复原液需储存于冰箱冷藏室（2~8 C），在2周内使用完。 ● 冻融后的HVJ-E复原液活性降低，请勿将悬浮液冷冻储存。
17	试剂A/B/C 及缓冲液的储存	<ul style="list-style-type: none"> ● <u>不可冷冻。</u> ● <u>储存于冰箱冷藏室（2~8 C）。</u>
18	每单位（1 AU）HVJ-E悬浮液中HVJ-E颗粒数量	1 单位 (AU) [40 uL HVJ-E复原液]包含HVJ-E颗粒数量约为 $10^9 \sim 10^{10}$ 。
19	1单位（AU）HVJ-E悬浮液中的HVJ-E凝血单位（HAU）	1 单位 (AU) [40 uL HVJ-E复原液] 相当于1,000-2,000 凝血单位(HAU).
20	HVJ-E 的结合效率	与DNA质粒结合的效率约为 15~20%。 Kaneda <i>et al.</i> , Mol. Ther.: 6, 219-225 (2002)
21	结合进入HVJ-E 的DNA大小限制	大小在10到15 kbp的DNA质粒可成功进入HVJ-E颗粒，并导入靶细胞内。没有明确的结果表明，结合进入HVJ-E的分子其大小有限制。
22	结合进入HVJ-E的蛋白或复合物的大小限制	荧光标记分子量为7kDa（胰岛素）到 150 kDa（兔 IgG）的蛋白，均可成功结合进入HVJ-E颗粒。 复合物（分子量>1000）也能与进入HVJ-E颗粒。
23	HVJ-E载体导入质粒DNA、siRNA、ODN或蛋白后的储存	HVJ-E载体（与特定分子结合后）需在制备当天使用。

24

不同规格细胞板，推荐细胞密度

● 贴壁细胞

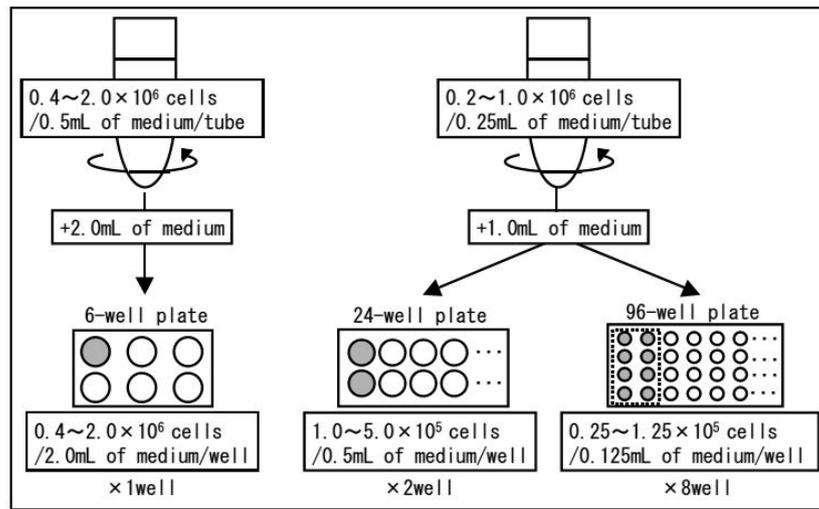
培养板	细胞浓度 (接种到平板*)
6-孔板	0.4 - 2.0 × 10 ⁵ 细胞/ 2.0 mL 培养基 /孔
24-孔板	1.0 ~ 5.0 × 10 ⁴ 细胞/ 0.5mL 培养基 /孔
96-孔板	0.25 ~ 1.25 × 10 ⁴ 细胞/ 0.125mL 培养基 /孔

*培养1天后需达到50~80% 融合状态才可用于转染。

● 悬浮细胞

悬浮细胞转染时，将细胞与HVJ-E载体在同一个管内混合、离心，促使细胞与HVJ-E载体接触，使其转染。

培养板	细胞密度		
	离心	悬浮培养基	接种平板
6-孔板	0.4 ~ 2.0 × 10 ⁶ 细胞 / 0.5mL 培养基/ 管	2.0 mL	0.4 ~ 2.0 × 10 ⁶ 细胞/ 2.0mL 培养基/ 孔
24-孔板	0.2 ~ 1.0 × 10 ⁶ 细胞 / 0.25mL 培养基/ 管	1.0 mL	1.0 ~ 5.0 × 10 ⁵ 细胞/ 0.5mL 培养基/ 孔
96-孔板			0.25 ~ 1.25 × 10 ⁵ 细胞/ 0.125mL 培养基/ 孔



悬浮细胞转染

25

使用次数 (体外)

按照说明书操作，GN004EX可使用25次（6孔板或35 mm 培养皿），如用于siRNA寡核苷酸转染，可用100~200次（6孔板）。

26

培养基中血清和抗生素对转染的影响 (体外)

通常，在转染培养基中（导入步骤）加入血清和抗生素不会对转染效率产生影响。

27

环状DNA和线性DNA的转染效率 (体外)

对于HVJ-E转染系统，目前没有研究表明，线性DNA的转染效率比环状DNA更高。

28

mRNA的转染效率 (体外)

对于HVJ-E转系统，目前没有研究证明，mRNA的转染效率比质粒DNA更高。

29	使用次数 (活体/ 实验动物)	<p>小鼠需要的HVJ-E总量约1~2AU (40~80 uL HVJ-E复原液)，大鼠为5~10 AU (200~400 uL HVJ-E复原液)。</p> <p>因此，该试剂盒 (GN004EX;0.26mLx4小瓶/盒) 可分别作用于12~25只小鼠或2~5只大鼠。</p> <p>对于不同实验，需要根据给药类型和靶器官的位置来优化最佳的体内转染条件，所以我们建议最好根据您的个人的实验情况优化给药剂量。</p>
30	体内转染注意事项 (给药途径)	<p>由于HVJ-E在体内会被组织吸附，尤其是血液会通过HN包膜蛋白吸附，体内转染中通过静脉注射 (全身) 给药的效率通常很低。建议选择较少与血液接触的给药途径，或者在给药前对试验动物进行灌注。</p> <p>以下文章报道了小鼠静脉注射给药的案例：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Matsuda N., et al.; Nuclear factor κ-B decoy oligodeoxynucleotides prevent acute lung injury in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis. <i>Mol. Pharmacol.</i>, 67 (4), 1018-1025 (2005). 2) Takeno M. al. : Th1-dominant shift of T cell cytokine production, and subsequent reduction of serum immunoglobulin E response by administration in vivo of plasmid expressing Txk/Rlk, a member of Tec family tyrosine kinase, in a mouse model. <i>Clin. Exp. Allergy</i>, 34, 965-970 (2004). 3) Kaneda Y. et al.; Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. <i>Mol. Ther.</i>, 6 (2), 219-226 (2002).
31	体内免疫原性及连续给药	<p>当HVJ-E复合物载体 (如F蛋白或 HN包膜蛋白) 注射到动物体内后，会产生相应抗体。但是Kaneda等人研究发现，当HVJ-E连续注射到小鼠肌肉后，荧光素酶基因未被抑制 (2周间隔注射2次)。</p> <p>参考文献： Kaneda, Y. et al.: <i>Advances in Genetics</i>, 53, 308-332 (2005).</p>
32	大/小鼠谱系对转染效率的影响	<p>大/小鼠的谱系类型不是影响基因表达的关键因素。其他因素，如启动子系统、制备DNA的纯度，均会影响转染效率。</p>
33	使用 GenomONE. 发表的文献	<p>相关体外及活体运用文献，请向我司索取！</p>