

rAAV-SP-C-iCre

产品说明书

货号：GC050402150

血清型：AAV2/6、AAV2/9

滴度： $\geq 1\text{E}+13\text{vg/mL}$

规格：5uL/20uL/50uL/100uL

1. 背景

SP-C 启动子介绍:

肺脏是一个由超过 40 种不同类型的细胞构成器官，其中肺泡上皮细胞又主要分为 I 型 (Type I Alveolar Epithelial Cells, ATI) 和 (Type II Alveolar Epithelial Cells II, ATII) 细胞，ATII 细胞尽管仅占肺泡表面积的约 5%，却承担着不可替代的角色。II 型 (ATII) 细胞是肺泡表面活性剂的唯一合成和分泌来源，同时也是肺泡上皮再生的前体细胞，在肺损伤后分化为 ATI 细胞以修复受损的气血屏障。因此，ATII 细胞成为了众多肺部疾病基因治疗的关键靶点。

肺表面活性蛋白 (Surfactant Protein, SP) 主要包括 SP-A、SP-B、SP-C 和 SP-D 四种，它们在肺内的表达分布存在显著差异，肺表面活性蛋白 C (Surfactant Protein C, SP-C) 是四种肺表面活性蛋白中唯一呈现肺泡 II 型上皮细胞 (Type II Alveolar Epithelial Cells, ATII) 严格限制性表达的蛋白，使得 SP-C 启动子成为 AAV 病毒在 II 型 (ATII) 细胞特异性表达的主要启动子，主要由近端启动子区 (-318 bp 至 +18 bp) 内的转录因子结合位点决定，其中甲状腺转录因子-1 (TTF-1)，核因子 I (NFI) 和 GATA 结合蛋白 6 (GATA-6) 的结合位点是核心调控因子。

2. iCre 酶介绍

iCre (codon-improved Cre recombinase) 是对噬菌体 P1 来源的 Cre 重组酶进行密码子优化改造的升级版。传统的 Cre 重组酶在原核宿主中进化而来，其编码序列含有较高的 CpG 二核苷酸含量，在哺乳动物细胞中易引发表观遗传沉默，导致表达效率低下和重组活性不稳定。iCre 通过将编码序列调整为哺乳动物偏好的密码子使用频率，在保持氨基酸序列和酶活性不变的前提下，显著提高了重组酶在哺乳动物细胞中的表达水平、mRNA 稳定性和翻译效率，同时降低了 CpG 含量以减少表观遗传沉默风险。自 2002 年首次报道以来，iCre 已广泛应用于转基因小鼠、斑马鱼等模式生物的构建，成为条件性基因敲除和谱系示踪研究中不可或缺的工具。

Cre 重组酶是来源于噬菌体 P1 的 I 型拓扑异构酶，由 343 个氨基酸组成，分子量约 38 kDa。该酶能够识别并结合 34 bp 的 LoxP 位点，介导两个 LoxP 位点之间的 DNA 重组反应。LoxP 位点由两个 13 bp 的反向重复序列 (作为 Cre 蛋白的结合位点) 和一个 8 bp 的核心间隔区 (决定重组的定向性) 组成。

Cre 重组酶无需 ATP 或其他能量辅助因子即可催化重组反应，其作用机制包括四个关键步骤：两个 Cre 蛋白分子分别结合两个 LoxP 位点的反向重复序列；通过蛋白-蛋白相互作用将两个 LoxP 位点靠近；在核心间隔区发生 DNA 链的切割和交换；完成重组并释放产物。根据两个 LoxP 位点的相对方向，Cre 介导的重组可导致三种结果：同向 LoxP 之间的序列被删除、反向 LoxP 之间的序列发生倒位、位于不同 DNA 分子上的 LoxP 之间发生易位。

表 1 不同 Cre 酶参数比对

特点	Cre	iCre	CreER ²	MerCreMer
全称	Cre recombinase	codon-improved Cre	Cre-ERT2 fusion	Mer-Cre-Mer fusion
核心改造	原始噬菌体序列	密码子优化, 降低 CpG	C 端融合 ERT2	N 端和 C 端各融合 Mer
时空控制	无 (组成型)	无 (组成型)	他莫昔芬诱导型	他莫昔芬诱导型
本底渗透表达	不适用	不适用	中等	更低 (双重锚定)
表达效率	低	高	取决于设计	取决于设计
适用实验	细菌/体外基础实验	组织特异性敲除、谱系示踪	时间可控的基因删除	对背景活性敏感的实验

二、病毒注射方式（注射量： 1×10^{11} vg/小鼠）

2.1 传统滴鼻法

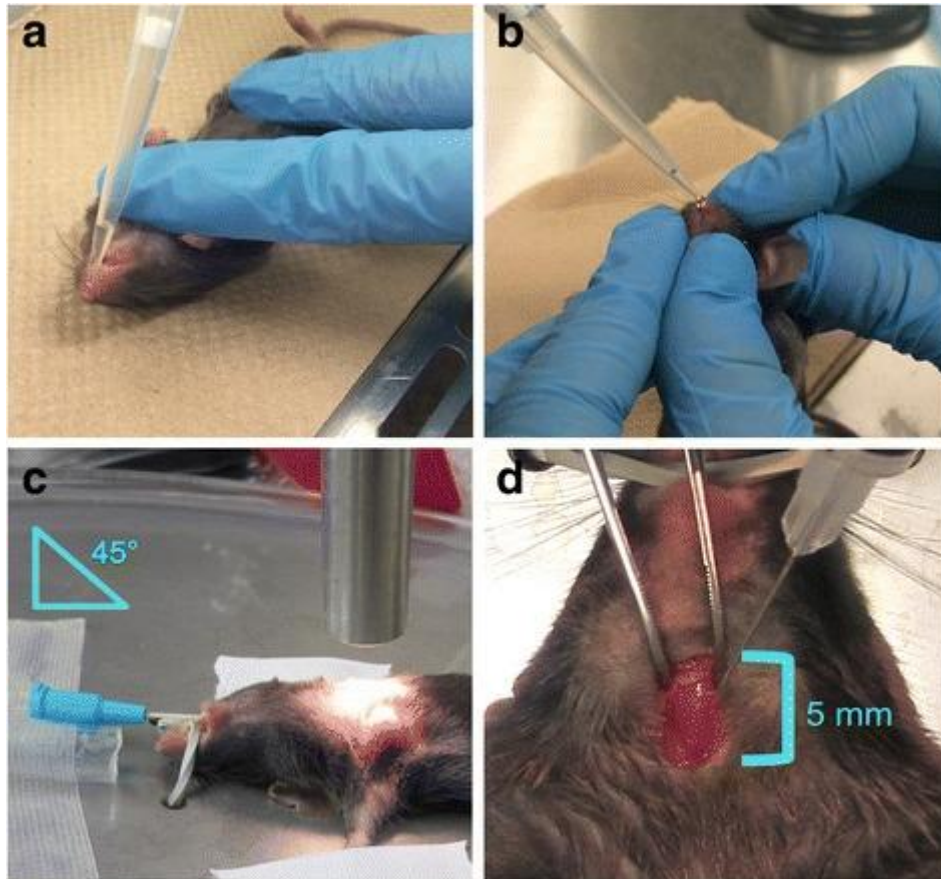
(1)、实验动物称重，使用麻醉剂（异氟烷、氯胺酮、赛拉嗪混合液等）或者小动物麻醉机进行麻醉，置于仰卧位。

(2)、用惯用手捏住小鼠颈背部皮肤，非惯用拇指轻压下颌使其张口，食指轻压鼻梁，将头部以约 45°角固定，确保气道通畅开放，避免压迫颈部影响呼吸。

(3)、用带滤芯的移液枪头吸取 AAV 病毒液，将枪头垂直对准小鼠一侧鼻孔（距鼻孔约 2–3 mm），缓慢滴下 3–5 μ L 液滴，待液体被完全吸入后再滴下一滴。每侧鼻孔分次滴入总剂量的一半（通常每侧 20 μ L，每次 3–5 μ L，间隔约 30 秒）

(4)、滴鼻结束后，将小鼠置于 37°C 加热垫上的空恢复笼中，持续观察至少 10 分钟直至完全清醒恢复。

传统滴鼻法的原理是利用小鼠的自主呼吸将液滴吸入呼吸道。但是由于小鼠在仰卧位时呼吸道解剖结构的特点，液滴容易经鼻咽部进入食管而被吞咽，导致实际进入肺部的载体剂量显著减少。



a. 传统滴鼻法; b. 改良滴鼻法; c. 气管插管法; d. 气管内注射法

(Adapted from [Santry LA, 2017])

2.2 改良滴鼻法

(1) 实验动物称重，使用麻醉剂（异氟烷、氯胺酮、赛拉嗪混合液等）或者小动物麻醉机进行麻醉，置于仰卧位。

(2) 取出麻醉小鼠后，将小鼠身体呈 45–60° 倾斜角（较传统法略大），以重力辅助液体流向气管方向。拇指轻压下颌使其微张，食指轻压鼻梁，但避免过度后仰以防止气管扭曲。（需 2 人配合完成）

(3) 第一轮给药：操作者 A 将总剂量的一半（如 40 μL 分两次，每次 20 μL ）进行滴鼻。每侧鼻孔采用 3–5 μL /次的微量分次方案，每滴间隔 30 秒以上，确保每滴液体完全吸入后再滴下一滴。

第二轮给药：第一轮完成后将小鼠放回恢复笼，待其完全清醒并恢复活动（约 15–20 分钟）后，再次麻醉进行第二轮滴鼻，操作同第一轮。

(4) 滴鼻结束后，将小鼠置于 37° C 加热垫上的空恢复笼中，持续观察至少 10 分钟直至完全清醒恢复。

改良滴鼻法在传统方法基础上进行了两处关键改进：其一，小鼠在给药时保持 45° 倾斜体位（头朝上）；其二，用手指轻轻捏住小鼠嘴巴，防止经口呼吸和吞咽。这两项改进旨在促进液体经鼻吸入并进入下呼吸道，同时最大限度地减少经口吞咽导致的载体丢失。

2.3 气管插管法

（1）实验动物称重，使用麻醉剂（异氟烷、氯胺酮、赛拉嗪混合液等）或者小动物麻醉机进行麻醉，将小鼠仰卧位固定于操作台，头部尽量后仰以拉直口腔-咽部-气管通路。用缝合线穿上门齿并向后牵拉固定，使口腔张开。

（2）喉镜叶片轻轻压下舌根部，在光源辅助下观察到会厌软骨和声门裂。将 PE-10 导管前端蘸取少量无菌生理盐水润滑，沿口腔中线轻柔插入，当导管前端通过声门进入气管时，可观察到导管内液面随呼吸节律上下波动，此为确认导管位置正确的关键体征，确认位置后，用胶带或缝线将导管固定于小鼠口角。

（3）用微量注射器吸取 AAV 病毒液（推荐按 3 $\mu\text{L/g}$ 体重计算注射体积），连接至导管外口，缓慢推注（约 10 - 15 秒完成）。推注完毕后，立即用 1 mL 无针注射器连接导管，注入 0.2 mL 空气，重复 2 - 3 次，以减少 AAV 在导管内的残留。

（4）注射完成后拔出导管，立即将小鼠从操作台取下，侧卧于加热垫上。用镊子轻张口以利呼吸通畅，持续观察直至呼吸平稳、完全清醒后放回饲养笼。

2.4 气管内注射法

（1）实验动物称重，使用麻醉剂（异氟烷、氯胺酮、赛拉嗪混合液等）或者小动物麻醉机进行麻醉。

（2）碘伏和酒精棉球交替擦拭颈部腹侧正中区域，共 2 分钟，在喉结下方约 0.5 cm 处做约 0.5-1 cm 纵行皮肤切口，用止血钳或镊子钝性分离皮下组织和颈前肌群，暴露气管（呈半透明环状软骨结构）。

（3）将 25G 蝴蝶针或胰岛素注射器（含 AAV 病毒液）沿气管环间隙斜向刺入气管腔内，进针角度约 30-45°。判断针尖进入气管的指征：**注射器内可观察到液柱随呼吸节律上下波动**，或连接注射器回抽可见气泡。缓慢推注病毒液（推荐按 **3 $\mu\text{L/g}$ 体重** 计算体积），约 30 秒内完成。

（4）注射完毕后快速拔出针头，用无菌纱布轻压穿刺点止血（通常 1-2 分钟即可止血）。皮肤切口用**氰基丙烯酸酯皮肤粘合剂**粘合，或用 5-0 缝线缝合 1-2 针。

（5）小鼠置于 37°C 加热垫上苏醒，给予**抗生素**（如头孢类）预防感染，术后前 2 天每日检查切口情况

参考文献:

- Degiulio JV, Kaufman CD, Dean DA. The SP-C promoter facilitates alveolar type II epithelial cell-specific plasmid nuclear import and gene expression. *Gene Ther.* 2010;17(4):541-549. doi:10.1038/gt.2009.166
- Glasser SW, Burhans MS, Eszterhas SK, Bruno MD, Korfhagen TR. Human SP-C gene sequences that confer lung epithelium-specific expression in transgenic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;278(5):L933-L945. doi:10.1152/ajplung.2000.278.5.L933
- Glasser SW, Eszterhas SK, Detmer EA, Maxfield MD, Korfhagen TR. The murine SP-C promoter directs type II cell-specific expression in transgenic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288(4):L625-L632. doi:10.1152/ajplung.00250.2004
- Shimshek DR, Kim J, Hübner MR, et al. Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. *Genesis.* 2002;32(1):19-26. doi:10.1002/gene.10023
- Tromp A, Wang H, Hall TE, Mowry B, Giacomotto J. Optimising the zebrafish Cre/Lox toolbox. Codon improved iCre, new gateway tools, Cre protein and guidelines. *Front Physiol.* 2023;14:1221310. Published 2023 Aug 2. doi:10.3389/fphys.2023.1221310
- Park CJ, Chen G, Koo Y, et al. Generation and characterization of an estrogen receptor alpha-iCre knock-in mouse. *Genesis.* 2017;55(12):10.1002/dvg.23084. doi:10.1002/dvg.23084
- Santry LA, Ingrao JC, Yu DL, et al. AAV vector distribution in the mouse respiratory tract following four different methods of administration. *BMC Biotechnol.* 2017;17(1):43. Published 2017 May 15. doi:10.1186/s12896-017-0365-2
- Halbert CL, Lam SL, Miller AD. High-efficiency promoter-dependent transduction by adeno-associated virus type 6 vectors in mouse lung. *Hum Gene Ther.* 2007;18(4):344-354. doi:10.1089/hum.2006.182
- Halbert CL, Allen JM, Miller AD. Efficient mouse airway transduction following recombination between AAV vectors carrying parts of a larger gene. *Nat Biotechnol.* 2002;20(7):697-701. doi:10.1038/nbt0702-697
- Halbert CL, Allen JM, Miller AD. Efficient mouse airway transduction following recombination between AAV vectors carrying parts of a larger gene. *Nat Biotechnol.* 2002;20(7):697-701. doi:10.1038/nbt0702-697