

RV 逆向跨单系统产品使用说明

产品信息

| 组合 | 产品编号 | 产品名称 | 载体荧光标记 | 功能基因 |
|----|-------------------|--|----------|----------|
| 1 | BC-0442 | rAAV-EF1 α -DIO-N2cG | — | N2cG |
| | BC-0041 | rAAV-EF1 α -DIO-EGFP-T2A-TVA | EGFP | TVA |
| | BC-RV-CVS EnvA462 | RV-CVS-EnvA- Δ G-tdTomato | tdTomato | — |
| 2 | BC-0442 | rAAV-EF1 α -DIO-N2cG | — | N2cG |
| | BC-0061 | rAAV-EF1 α -DIO-mCherry-F2A-TVA | mCherry | TVA |
| | BC-RV-CVS EnvA461 | RV-CVS-EnvA- Δ G-EGFP | EGFP | — |
| 3 | BC-0442 | rAAV-EF1 α -DIO-N2cG | — | N2cG |
| | BC-0041 | rAAV-EF1 α -DIO-EGFP-T2A-TVA | EGFP | TVA |
| | BC-RV-CVS EnvA472 | RV-CVS-EnvA- Δ G-mCherry-P2A-Cre | mCherry | Cre 重组酶 |
| 4 | BC-0442 | rAAV-EF1 α -DIO-N2cG | — | N2cG |
| | BC-0041 | rAAV-EF1 α -DIO-EGFP-T2A-TVA | EGFP | TVA |
| | BC-RV-CVS EnvA471 | RV-CVS-EnvA- Δ G-mCherry-P2A-FlpO | mCherry | FlpO 重组酶 |
| 5 | BC-0442 | rAAV-EF1 α -DIO-N2cG | — | N2cG |
| | BC-0061 | rAAV-EF1 α -DIO-mCherry-F2A-TVA | mCherry | TVA |
| | BC-RV-CVS EnvA715 | RV-CVS-EnvA- Δ G-GCaMP6s | 绿色荧光 | GCaMP6s |

概述

狂犬病毒 (Rabies Virus, RV) 属于弹状病毒科 (Rhabdoviridae) 狂犬病毒属 (Lyssavirus)，是有囊膜的负链 RNA 病毒。野生型 RV 是人畜共患的狂犬病的致病因子，在神经系统中具有逆向跨突触传播的特性，对人和动物均具有较高致病性[1,2]。经过改造后的 RV，毒性明显减弱，可用于神经环路研究。RV 感染中枢系统后，主要标记神经元，几乎不标记胶质细胞，被感染的神经元在短时间内几乎不发生明显病变及裂解[3]。目前基于 RV 重组病毒标记系统可分为逆向标记系统和逆向跨单突触系统。

基于 RV-CVS 株改造的重组狂犬病毒 RV-CVS-EnvA- Δ G，其 RV 基因组中病毒跨膜必须的 G 蛋白基因被敲除 (RV- Δ G)，并替换为荧光报告基因 (tdTomato、mCherry、EGFP 等) 和功能基因 (Cre、Flp 等)，同时将禽类肉瘤病毒 (ASLV) 囊膜糖蛋白 (EnvA) 的膜外区与 RV 囊膜糖蛋白跨膜及胞内区融合，形成重组的囊膜蛋白。因为 EnvA 识别的受体蛋白 TVA 只分布在禽类细胞表面，利用重组囊膜蛋白包装 RV，产生的病毒粒子不能直接感染哺乳动物，若利用 AAV、慢病毒、逆转录病毒等将 TVA 表达在哺乳动物的细胞膜上，则这种 RV 可特异性识别并感染表达了 TVA 的神经元。由于这种 RV 的 G 蛋白 (RV-G) 基因缺失，进入神经元后，可复制并表达外源基因，但不能包装产生成熟的病毒粒子来感染上一级神经元。如果同时在这类神经元中外源性补充 RV-G，即可在该类神经元中产生成熟的假病毒粒子，可以用来跨突触感染上一级神经元。进入上一级神经元后，RV-G 缺

失的病毒可以复制并表达外源基因，但不能继续跨突触感染。此过程使 RV 可控地逆向跨单级突触标记特异类型神经元的输入网络得以实现。

保存与操作方法

运输：使用干冰冷藏运输；

储存：收到病毒后，可直接放置-80℃保存，避免反复冻融，可稳定保存至少 1 年；

该产品需在生物安全二级实验室内开展实验。使用前，将其置于冰水混合物中融解。根据实验需求，可用无菌 PBS 适当稀释。融解后病毒液可暂存 4℃，但建议当日用完。**避免反复冻融，以防滴度下降和感染效率降低。**

实验方案

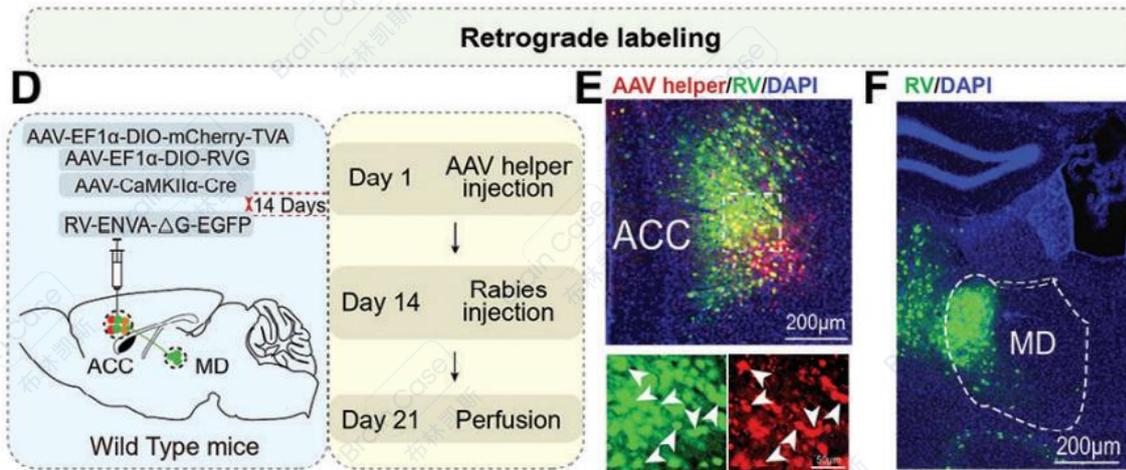
| 产品选择 | | |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| 产品名称 | 滴度 | 备注 |
| rAAV-启动子-DIO-EGFP/mCherry-T2A-TVA | 2.00E+12 VG/mL | RV 与 AAV-helper 的荧光标记应使用不同颜色 |
| rAAV-启动子-DIO-N2cG | 2.00E+12 VG/mL | |
| RV-CVS-EnvA-ΔG | 2.00E+08 IFU/mL | |
| 注射方案 | | |
| C57 小鼠 | Day0 | TVA:G:Cre=1:2:1 混合后注射，150-250nL/只 |
| | Day14 | BC-RV-EnvA 注射 100-200nL/只 |
| | Day21 | 灌流取材 |

注意事项

1. 一般情况下，辅助病毒 1:2 (TVA:G) 或者 1:2:1 (TVA:G:Cre) 混合，注射剂量 150-250nL，小核团如 NAc 注射 100nL 左右；
2. AAV 辅助病毒表达 14 天后，注射 RV 病毒，注射剂量 100-200nL，RV 表达 7 天后灌流取材；
3. 已有文献报道 TVA 占比剂量过高会导致注射位点炎症反应严重，细胞形态不清晰，跨突触效率受影响[4]，根据测试结果和客户反馈，总结得出 TVA 滴度最好不大于 2×10^{12} vg/mL；
4. 使用 Cre 转基因鼠诱导 AAV 辅助病毒表达时，根据注射位点 Cre 阳性神经元数量调整 AAV 注射剂量，辅助病毒表达量和 Cre 阳性细胞数量有关；
5. 以上推荐参数仅作为参考，实际请依据注射位点、实验需求、动物状态等适当调整方案，制定预实验摸索适合的注射方案。

应用举例

将 RV 逆向跨单系统注射到 ACC 中，观察到 MD 中荧光标记的神经元，验证了 MD 和 ACC 之间的解剖联系。每只小鼠注射的 AAV 辅助病毒和 CaMKIIa-Cre 混合物为 300nL，表达 2 周后，注射 RV (ΔG) 为 80 nL，一周后灌流取材，切片成像[5]。



原文链接: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/advs.202305939>

参考文献

- [1] Moschovakis AK, Gregoriou GG, Ugolini G, et al. Oculomotor areas of the primate frontal lobes: a transneuronal transfer of rabies virus and [14C]-2-deoxyglucose functional imaging study. *J Neurosci*, 2004, 24(25): 5726-40
- [2] Ugolini G. Use of rabies virus as a transneuronal tracer of neuronal connections: implications for the understanding of rabies pathogenesis. *Dev Biol: Basel*, 2008, 131: 493-506
- [3] Osakada F, Mori T, Cetin AH, et al. New rabies virus variants for monitoring and manipulating activity and gene expression in defined neural circuits. *Neuron*, 2011, 71(4): 617-31
- [4] Lavin TK, Jin L, Lea NE, Wickersham IR. Monosynaptic Tracing Success Depends Critically on Helper Virus Concentrations. *Front Synaptic Neurosci*. 2020;12:6.
- [5] Xiao H, Xi K, Wang K, et al. Restoring the Function of Thalamocortical Circuit Through Correcting Thalamic Kv3.2 Channelopathy Normalizes Fear Extinction Impairments in a PTSD Mouse Model. *Adv Sci (Weinh)*. 2024;11(9):e2305939.