

慢病毒技术手册



吉满公众号



咨询二维码

021-50432825

上海市浦东新区康威路299号1幢5层

www.genomeditech.com

service@genomeditech.com

Lentivirus

吉满生物科技(上海)有限公司

您身边的病毒包装服务专家



吉满生物科技（上海）有限公司成立于2011年，是专业从事生物科技前沿技术研发的高新技术企业。

以病毒包装为基础，密切关注行业最前沿的科研进展，十二年深耕细作，创建了具有自主知识产权的分子生物学、细胞生物学、慢病毒、腺相关病毒、报告基因、抗体表达六大技术平台。

2020年成立了专业细胞系子品牌DDXCELL，提供报告基因检测、病毒包装、工程细胞株构建，基因编辑及药物筛选评价等技术服务及相关产品。

2022年载体品牌“载体通·Genovector”焕新升级，同时推出全新试剂品牌“优试剂·Genoagent”，贯穿科研始末。

吉满可为客户提供几千种的现货载体和一站式定制服务。

1

慢病毒安全使用规范.....01

2

慢病毒的储存与稀释.....02

3

慢病毒简介.....03

4

贴壁细胞稳定株构建.....07

5

悬浮细胞稳定株构建.....19

6

常见问题解答.....22

Content

目录

*使用前请务必阅读

慢病毒安全使用规范

- 1) 吉满生物使用第二代、第三代慢病毒高效包装系统，安全性很高
- 2) 操作病毒时推荐使用生物安全柜，若使用普通超净工作台操作病毒，必须关闭风机
- 3) 操作病毒时必须穿实验服，戴口罩和手套
- 4) 操作病毒时必须特别小心，避免产生气雾或飞溅。如果操作时生物安全柜有病毒污染，立即用10%次氯酸钠溶液擦拭干净。接触过病毒的枪头、离心管、培养板、培养液需于10%次氯酸钠溶液内浸泡过夜后才可丢弃
- 5) 用显微镜观察细胞感染情况时应遵循以下步骤：拧紧培养瓶或盖紧培养板→用70%乙醇清理培养瓶外壁，使用显微镜观察拍照→用70%乙醇清理显微镜实验台
- 6) 操作病毒完毕后，脱掉手套，用肥皂和水清洗双手
- 7) 病毒飞溅或是气溶胶与人体接触(眼、皮肤或粘膜)，请用大量清水冲洗眼睛或其他接触部位至少15分钟
- 8) 含病毒的针头或其他利器刺破皮肤，立即用10%的碘伏溶液擦洗伤口数分钟，然后用大量清水冲洗

慢病毒的储存与稀释

慢病毒使用干冰运输

收到慢病毒后，请及时将病毒置于-80℃冰箱保存
储存条件及期限：-80℃保存半年

注：若病毒储存时间超过6个月，建议使用前重新测定滴度

储存

反复冻融对慢病毒滴度有较大影响，单次冻融会使病毒滴度降低10%左右，因此尽量避免反复冻融

建议在首次融化时按小体积分装（根据后续实验用量确定分装体积）

冻融

如需稀释病毒，可以先将病毒冰浴融化，再用完全培养基稀释混匀后4℃保存

为保证病毒滴度，建议在3天内使用完毕

稀释

03

慢病毒简介

- 慢病毒载体介绍
- 慢病毒包装系统
- 慢病毒特点及应用

慢病毒载体介绍

慢病毒(Lentivirus, LV)是目前细胞及模式生物实验中非常有效的基因研究工具。

慢病毒属于逆转录病毒科, 是二倍体RNA病毒。

慢病毒基因组结构复杂, 除gag, pol和env这三个和单纯逆转录病毒相似的结构基因外, 还包括4个辅助基因vif, vpr, nef, vpu和2个调节基因tat和rev。

慢病毒载体是以慢病毒基因组为基础, 对慢病毒自身的元件(如LTR, Gag, Pol, Env等)进行改造而发展起来的一类能够携带外源基因的载体。目前以HIV-1(人类免疫缺陷I型病毒)为基础改造而来的慢病毒载体最为常用。

与一般的逆转录病毒载体不同, 慢病毒对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力; 在慢病毒进入细胞后, RNA需要在逆转录酶、整合酶等作用下反转录为cDNA, 形成DNA整合前复合体。进入细胞核后, DNA随机整合到宿主细胞基因组中, 转录成mRNA, 随后mRNA转移至细胞浆中表达目的蛋白或产生小RNA。慢病毒载体介导的基因表达或shRNA干扰作用持续且稳定, 并随细胞基因组的分裂而分裂, 达到持久性表达。

表1 HIV-1基因组结构

分类	基因名	初级蛋白产物	成熟蛋白产物
病毒结构蛋白	gag	Gag多聚蛋白	MA,CA,SP1,NC,SP2,P6
	pol	Pol多聚蛋白	RT,RNase H,IN,PR
	env	gp160	gp120,gp41
调节元件	tat	Tat	
	rev	Rev	
其他调控蛋白	nef	Nef	
	vpr	Vpr	
	vif	Vif	
	vpu	Vpu	

慢病毒包装系统

慢病毒包装系统一般由慢病毒表达载体（又称穿梭载体）和慢病毒包装载体组成。

表达载体包含了包装、转染、稳定整合所需要的遗传信息。包装载体可提供转录并包装RNA到重组的假病毒载体过程中所需要的所有辅助蛋白。为产生高滴度的病毒颗粒，需要两种载体同时转染细胞，在细胞中进行病毒的包装，包装好的病毒颗粒分泌到细胞外的培养基中，离心后病毒颗粒悬浮于上清液中。取上清液，可直接用于宿主细胞的感染。

目前慢病毒载体相关的研究发展得很快，包装系统也在不断更新迭代。

常用的慢病毒包装系统为二代（三质粒）或三代（四质粒）包装系统。其中三代系统具有更好的生物安全性，因而应用更为广泛。

常用的慢病毒包装系统

	第二代	第三代
转移质粒	只能由包含tat的第二代包装系统包装	可以在二代或三代系统中包装
包装质粒	1个质粒包含: Gag, Pol, Rev, Tat	1个质粒包含: Gag, Pol 1个质粒包含: Rev
包膜蛋白质粒	通常是VSV-G	通常是VSV-G
安全性	安全，复制能力不佳，使用3个单独的质粒编码各种HIV基因	更安全，复制能力弱，使用4个质粒编码HIV基因，消除了对Tat的需求
LTR 启动子	野生型	杂合型: 5'LTR与异源增强子或启动子融合，例如:CMV 或 RSV

慢病毒特点

慢病毒作为目前细胞及模式生物实验中常用工具，具有强大的优势。

可有效感染神经元细胞、肝细胞、心肌细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、干细胞等多种类型细胞，特别适合质粒转染效率低的细胞

宿主广泛

慢病毒通过将外源基因有效整合到宿主染色体上，可实现目的基因长时间稳定表达，不随着细胞分裂传代而丢失，是细胞实验的首选

可实现稳定表达

未发现致病性，已被用于作用于人体的CAR-T治疗

安全性高

可用于体外细胞系和活体动物模型，研究基因功能

适用范围广

经过特定的元件修饰的慢病毒表达载体，可只在特定的外源或内源物质的作用下才进行表达，从而调控目的基因定时、定量表达

实现可控表达

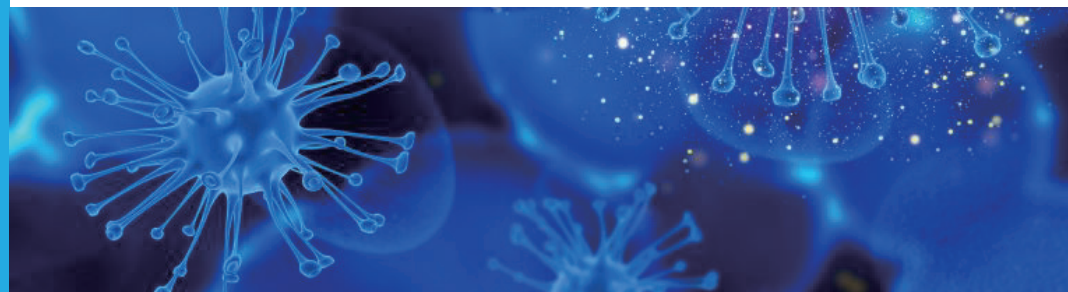
慢病毒应用

- 1 构建目的基因稳定表达或者沉默的细胞株
- 2 将目的基因/RNAi 基因转入难以转染的细胞
- 3 将目的基因/RNAi 基因转入动物组织
- 4 基因治疗
- 5 基因敲除
- 6 转基因动物

04

贴壁细胞稳定株构建

- 贴壁细胞预实验
- 抗生素预实验
- 稳定株筛选



贴壁细胞预实验

感染预实验 目的

不同细胞对慢病毒的敏感性不同，同时不同慢病毒载体荧光强度也有差异，所以在正式实验前需要通过预实验确定慢病毒对细胞的MOI值和最佳的感染条件，如接种的细胞量，感染时的总体积，感染后的换液时间等，以确保正式实验达到理想的效果。

理论上MOI值越高，慢病毒感染成功的可能性越大，感染效率越高，但对细胞的毒性也越大。MOI(Multiplicity of Infection, 感染复数)是指每个细胞感染的病毒数，通常MOI值越高，病毒整合到染色体的数量越多。对于分裂活跃的细胞，比如Hela、293细胞，MOI=1时，80%以上的细胞均被感染。而对于非分裂细胞，比如原代细胞，感染效率较低。

建议通过预实验选择合适的MOI值进行正式实验。在确定MOI值时，可以选用携带荧光的慢病毒(阴性对照，比如Lenti-eGFP)。

感染预实验 感染条件及MOI值的选择原则

- 1) 在细胞形态不受影响的情况下尽可能用少量的病毒
- 2) 选择感染效率80%左右的MOI值作为最佳感染条件

感染预实验步骤

以24孔培养板为例，进行目的细胞和平行对照组细胞（对慢病毒亲嗜性较高的细胞如293, HeLa）的感染预实验，实验前按照不同的MOI值设置不同的感染孔，并根据MOI值和细胞数量计算所需要的病毒量。

Day 1

目的细胞和平行对照组细胞以 2×10^4 个/孔接种于24孔板中

Day 2 调节

每孔培养基的体积为500 μ L，细胞数以第2天密度约30%-50%为宜，37°C培养过夜。对于大部分细胞，我们通常认为培养24h后细胞数量是铺板数量的2-3倍。

注：为了减小误差，推荐平行感染2~3个复孔，保持细胞状态良好（形态清晰、生长正常、无任何污染）。如细胞较大可适当减少接种量，细胞较小则可适当增加，原则上以第二天密度达到30%-50%为宜。

Day 2 实验

- 感染前，从-80 °C冰箱取出病毒后冰浴融化
- 准备5个无菌的EP管，分别加入250 μ L新鲜培养基，依次加入1、2、5、10、30 μ L病毒液（病毒滴度 5×10^8 TU/mL），轻轻吹打混匀。
- 根据实际实验需要可设计更多的MOI值
- 吸弃培养器皿中的培养基，在目的细胞和平行对照细胞中分别加入不同MOI值的病毒液（将EP管中病毒混合液全部加入），半体系感染。
- 5×10^4 个细胞对应的MOI值分别为10、20、50、100、300
- 混匀后放于二氧化碳培养箱（37°C、5%CO₂）孵育过夜

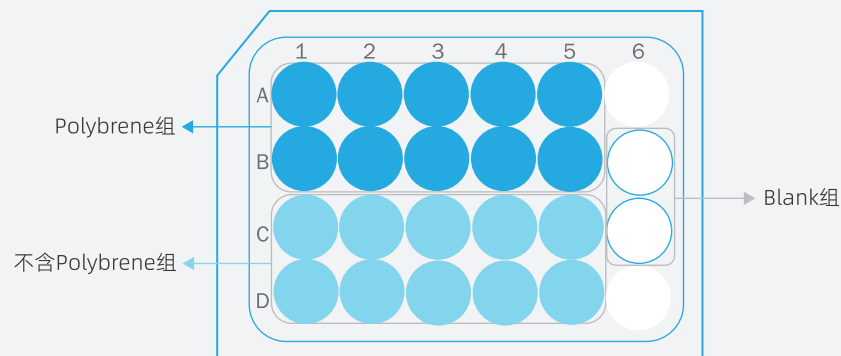
可同时设计含有Polybrene的培养基实验组以及空细胞组（即Blank组）

Polybrene组

用含细胞对应浓度的 Polybrene（可查阅文献，对于293细胞，终浓度5 μ g/mL）的新鲜培养基按不同的MOI值稀释病毒原液，Polybrene在大部分细胞中可以有效提高感染效率，但对于部分细胞可能存在细胞毒性，预实验可进行Polybrene的细胞毒性摸索

Blank组

可作为参照，以检验细胞的生长状态。实验分组设计可参考下图。



注：感染前细胞的状态对最终的感染效果影响很大，请保证加病毒之前细胞处于良好的生长状态。慢病毒对目的细胞的感染效率较低时，通过提高MOI值可以提高病毒的感染效率。当MOI值高于20时，建议在培养基中加入 Polybrene（具体浓度请参考相关文献）来提高病毒的感染效率。

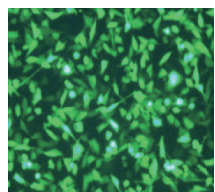
Day 3 更换培养液

一般在16~24h后将含有慢病毒的培养液更换成全量正常培养液。

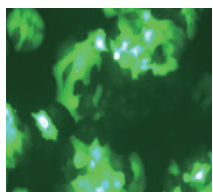
Day 5 感染效率检测

使用倒置荧光显微镜观察荧光并拍照，对比细胞明场及荧光图片估计慢病毒感染目的细胞的效率，确定合适的MOI值用于正式实验。

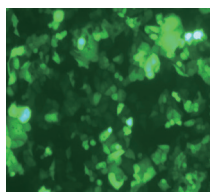
慢病毒感染效果图



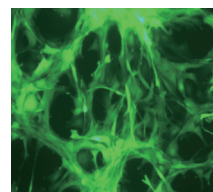
MDA-MB-231



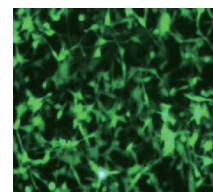
JEG-3



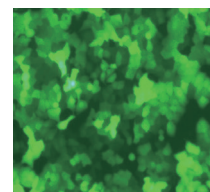
HEC-1A



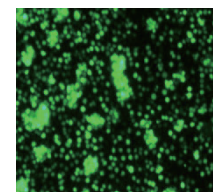
U87



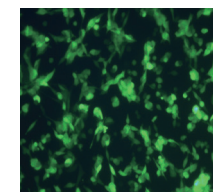
CT26



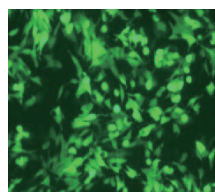
MCF-7



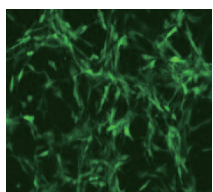
Jurkat



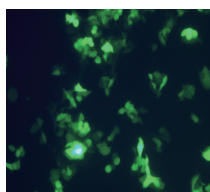
min6



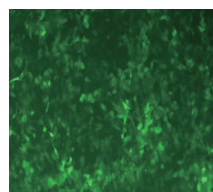
A375



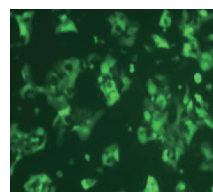
U87 MG



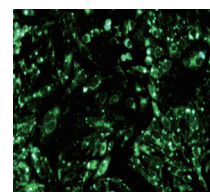
ZR-75-1



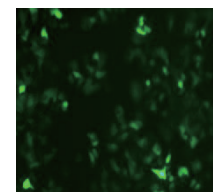
HCT116



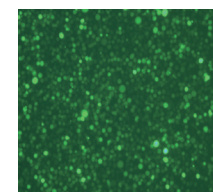
NCI-N87



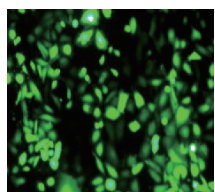
CHO



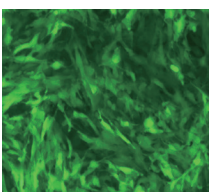
T-47D



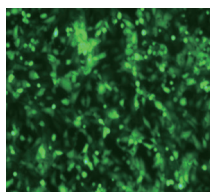
DHL-6



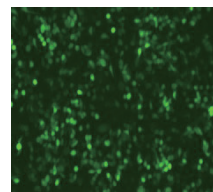
DU145



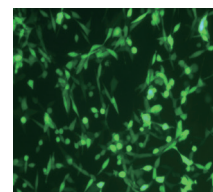
U251



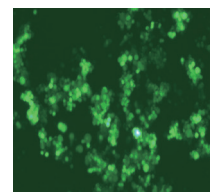
MCE12



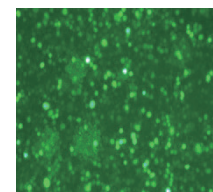
RKO



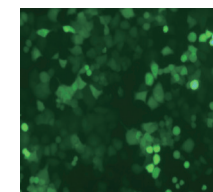
MC38



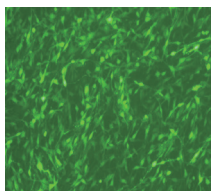
COLO 320DM



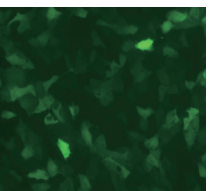
K562



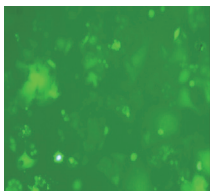
PANC-1



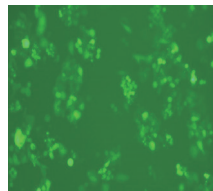
PC-12高分化



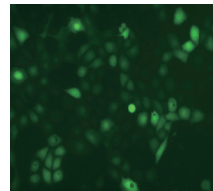
RBE



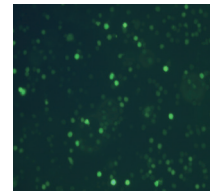
SW480



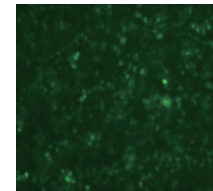
SW620



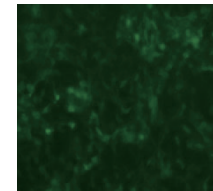
NCH1650



THP1



RAW264.7



B16-F10



注意事项

1) 测定慢病毒对目的细胞的亲嗜性时，需要同时设置对慢病毒亲嗜性较高的细胞(293, Hela)作为平行实验的对照细胞

2) 在进行慢病毒感染实验时，可以用完全培养基（培养目的细胞用）稀释，理论上含有血清、双抗或者其他营养因子的完全培养基不影响慢病毒的感染效率

3) 一般慢病毒单位为TU/mL，即每毫升病毒液中含有具有生物活性的病毒颗粒数。
如：病毒滴度为 $>1 \times 10^8$ TU/mL，即每毫升病毒液中至少含有 1×10^8 个具有生物活性的慢病毒颗粒

不同细胞培养体系推荐感染体积及不同病毒滴度感染用量可参考右侧表格

表2 不同细胞培养体系推荐感染体积

细胞培养容器	单孔底面积	接种体积	感染时体积
96孔板	0.3cm ²	100 μL	60 μL
48孔板	0.6cm ²	200 μL	120 μL
24孔板	2cm ²	500 μL	250 μL
12孔板	4cm ²	1 mL	500 μL
6孔板	10cm ²	2 mL	1 mL
T25瓶	25cm ²	5 mL	2.5 mL

注：孔板底面积较大时（如6、12孔板），为增加病毒与细胞接触几率，可减少感染时体积

表3 1×10^8 TU/mL病毒感染细胞所用的病毒量参考

细胞培养容器	细胞数	MOI=1	MOI=10	MOI=100
96孔板	$\sim 1 \times 10^4$	0.1 μL	1 μL	10 μL
48孔板	$\sim 2 \times 10^4$	0.2 μL	2 μL	20 μL
24孔板	$\sim 5 \times 10^4$	0.5 μL	5 μL	50 μL
12孔板	$\sim 1 \times 10^5$	1 μL	10 μL	100 μL
6孔板	$\sim 2 \times 10^5$	2 μL	20 μL	200 μL
T25瓶	$\sim 5 \times 10^5$	5 μL	50 μL	500 μL

表4 5×10^8 TU/mL病毒感染细胞所用的病毒量参考

细胞培养容器	细胞数	MOI=1	MOI=10	MOI=100
96孔板	$\sim 1 \times 10^4$	0.02 μL	0.2 μL	2 μL
48孔板	$\sim 2 \times 10^4$	0.04 μL	0.4 μL	4 μL
24孔板	$\sim 5 \times 10^4$	0.1 μL	1 μL	10 μL
12孔板	$\sim 1 \times 10^5$	0.2 μL	2 μL	20 μL
6孔板	$\sim 2 \times 10^5$	0.4 μL	4 μL	40 μL
T25瓶	$\sim 5 \times 10^5$	1 μL	10 μL	100 μL

抗生素预实验

抗生素预实验目的

确定抗生素的最佳作用浓度，同时确定抗生素对目的细胞的最低作用浓度，以用于病毒感染后通过抗生素筛选进行稳定株构建。

常见抗生素类型及浓度范围推荐

Puromycin (嘌呤霉素)

预实验浓度范围: 1~10 µg/mL

预实验时间: 72h

Blasticidin (杀稻瘟菌素)

预实验浓度范围: 5~50 µg/mL

预实验时间: 72h

G418 (遗传霉素)

预实验浓度范围: 100 µg/mL~1mg/mL

预实验时间: 10~14天

抗生素预实验步骤 以Puromycin筛选为例

1) 细胞培养: 取状态良好的待测细胞, 制备成细胞悬液, 等量接种入96孔培养板中, 待细胞生长至70%~80%汇合度左右开始加药

2) 加入Puromycin药物进行空细胞最低致死浓度筛选, 浓度梯度一般设置为1µg/mL、2.5 µg/mL、5 µg/mL、10 µg/mL等 (以上为终浓度, 浓度设计可参考文献中相关细胞常用浓度并设置梯度, 一般设置7~8个浓度点, 并做2~3复孔)

3) 药物处理72h后细胞全部死亡的最低浓度, 即为后续Puromycin抗性细胞的筛选浓度 (全致死浓度), 可通过不同加药浓度细胞拍摄的图片分析, 或酶标仪检测CCK8数据分析, 建立死亡曲线, 确定最佳筛选浓度

贴壁细胞感染

预实验确定慢病毒对靶细胞的亲嗜性以及合适的MOI值后, 进行正式感染实验。以在24孔板中用含有GFP荧光标记和Puromycin抗性的慢病毒感染细胞为例, 具体操作步骤如下:

Day 1

按实验目的将细胞铺板, 24孔板一般以 $2\sim 5 \times 10^4$ cells/孔的密度, 细胞数以第二天密度约30%-50%为宜, 37 °C培养过夜。

Day 2

感染前, 从-80 °C冰箱取出病毒后冰浴融化, 参考相关文献或者根据预实验得到的MOI值用新鲜完全培养基将病毒稀释成所需浓度。

注: 轻轻混匀, 不要使用振荡器

吸去细胞原有培养基, 将稀释好的病毒液加入细胞中, 进行半体系感染, 并根据预实验结果确定是否需要添加Polybrene。如对细胞无影响, Polybrene可以和病毒原液一起加到培养基中, 轻轻摇匀, 37 °C培养过夜。

Day 3

感染16~24h后, 吸除含慢病毒的培养基, 更换为全新新鲜培养基。

注: 感染时间可参考预实验中慢病毒对细胞状态的影响。

Day 4

继续培养48-72h后, 根据实验目的收集细胞, 检测目的基因的表达。

注: 慢病毒感染细胞后, 至少要培养48~72h才能检测目的基因的表达。因为慢病毒载体的基因组是RNA, 需要反转录为DNA, 并插入细胞染色体后才能表达。

干扰慢病毒由于需要反转录插入细胞染色体表达后才可作用到靶基因, 进而起到干扰作用, 建议培养至少72h再收样进行RT-qPCR和WB检测。如不需构建稳定株, 则可在基因表达后直接进行后续实验, 无需药筛。

抗生素筛选

带有不同抗性的慢病毒在成功感染细胞后，能使细胞在含有一定浓度对应抗生素的培养基中存活，而未感染上慢病毒的细胞则无法存活。因此在抗性筛选压力下，可成功筛选稳定表达目的基因的细胞株。

例如在带有Puromycin抗性的慢病毒感染72h后（70%~80%汇合度），将细胞继续培养于合适浓度Puromycin的培养液中，每2-3天更换一次含抗生素的培养液，直至未感染病毒的对照组细胞全部死亡，而感染病毒组再无细胞出现死亡（如病毒载体带有荧光标记，荧光效率需达到100%）后，进行混合克隆及单克隆稳定株筛选。

注：筛选浓度即为抗生素预实验中确定的该细胞的全致死浓度，筛选时可设置加入等量抗生素，未感染病毒的野生型细胞作为对照。

流式分选

除常用的抗生素筛选方式外，还可通过慢病毒荧光蛋白或携带表达的目的基因蛋白进行流式分选，该方式易对细胞状态产生影响，且容易造成污染，因此在样本制备及上机分选等过程中需要严格执行无菌操作，同时需要预实验优化流式细胞仪的测定条件，根据目标细胞的含量调整流速和样品浓度。

稳定株构建及保存

混合克隆稳定株筛选

将抗生素浓度降低至维持浓度（筛选浓度的1/2，即半致死浓度，可有效抑制空细胞生长），继续对感染后的细胞进行筛选和扩增，同时收集细胞进行RT-qPCR或Western Blot鉴定（鉴定目的基因表达水平），并将鉴定结果正常的细胞冻存保种。

单克隆稳定株筛选

对感染并筛选后的细胞进行稀释培养，挑取单一细胞生长而成的细胞克隆，进行扩大培养，以获得性状单一、表达稳定的细胞株。

将细胞消化后通过有限稀释或流式分选等方式接种于96孔板中，接种的细胞密度为1个细胞/孔。标记出具有单个细胞的孔，将抗生素浓度减至维持浓度（筛选浓度的1/2），继续筛选和扩增。扩增完毕后收集细胞进行RT-qPCR或Western Blot鉴定（鉴定目的基因表达水平），选择鉴定结果正常的单克隆细胞冻存保种。

注：不同细胞群体依赖性不同，可能由于细胞密度影响单个细胞无法正常增殖，可先用空细胞进行单克隆预实验确定细胞是否可正常增殖分裂。

稳定株建库保种

细胞筛选稳定并验证功能有效后可进行保种，将一定数量、成分均一的细胞悬液定量装于细胞冻存管，于液氮中进行保存。

不同细胞系传代能力不同，需根据细胞系情况确定细胞的传代次数，建库时需对细胞进行鉴定，如细胞鉴别、细菌真菌检测、支原体检测、细胞内外源病毒因子检查、致瘤性检查，必要时还需进行细胞染色体、细胞生长特性、细胞均一度 and 稳定性检查。



05

悬浮细胞稳定株构建

- 悬浮细胞预实验
- 悬浮细胞感染

悬浮细胞预实验

以24孔培养板为例，进行目的细胞和平行对照组细胞的感染预实验，实验前按照不同的MOI值设置不同的感染孔，计算所需要的病毒量。

Day 1

用完全培养基制备2mL密度为 4×10^5 个/mL的细胞悬液，以125 μ L/孔加入24孔板中，共计6孔，其中1孔作为Control组。

感染前，从-80 $^{\circ}$ C冰箱取出病毒后冰浴融化，准备6个无菌的EP管，先分别加入125 μ L新鲜培养基，依次加入0、1、2、5、10、30 μ L病毒液(病毒滴度 5×10^8 TU/mL)，轻轻吹打混匀。向各孔中加入全量体积的病毒液，使用2100r/min离心30min的方式进行感染，离心结束后细胞培养板置于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱，过夜培养。对应的MOI值分别为0、10、20、50、100、300。

Day 2

感染16-24h后，及时观察细胞状态，若状态明显变差，离心后全量换液，若状态正常直接将培养基补足至500 μ L，第三天再更换为全量新鲜培养基。

Day 4

感染72h后，用显微镜观察，感染效率80%左右且细胞生长良好的组所对应的感染条件和MOI值即可以作为后续感染实验的依据。

悬浮细胞感染

Day 1

按实验需要将细胞铺板（比如24孔板密度约50%-60%为宜）

感染前

从-80 °C冰箱取出病毒后冰浴融化，参考相关文献或者根据预实验得到的MOI值用新鲜完全培养基将病毒稀释成所需浓度。吸去细胞原有培养基，将按照MOI值稀释好的病毒液加入细胞中，进行半体系离心感染。

Day 2

感染16~24h后，及时观察细胞状态，若状态明显变差，离心后全量换液，若状态正常，直接将培养基补足至全量体系、第三天再更换为全量新鲜培养基。

Day 4

感染72h后，观察感染效率，根据实验内容，选择合适时间点进行相关实验

*悬浮细胞抗生素预实验及稳定株筛选方式可参考贴壁细胞相关步骤（P9-10）

06

常见问题解答（FAQ）

Q1 吉满提供的慢病毒具有复制能力吗？会传染人吗？

吉满生物提供的慢病毒颗粒是一种假病毒，病毒中的毒性基因已被剔除并被外源性目的基因取代，具有感染能力但不具有复制能力，因此是不会传染人的，是相对很安全的一种工具病毒。但慢病毒仍然具有潜在的生物学危险，不建议使用编码已知或可能致病的基因的慢病毒。进行慢病毒实验时建议使用生物安全柜。

Q2 慢病毒感染是不是一定要用生物安全柜，是否需要其他防护措施？

- 慢病毒操作时推荐使用生物安全柜，如果没有生物安全柜，使用普通超净工作台操作病毒必须关闭风机
- 使用前请检查和准备使用者防护措施，如一次性手套、口罩、护目镜/面罩、实验服/一次性手术服等
- 避免在操作病毒时使用利器，如需注射病毒，请选用安全针头；避免储存病毒的离心管或其他容器在离开生物安全柜或超净工作台的情况下处于打开状态；避免可能造成病毒暴露在空气或发生污染的其他情况

Q3 慢病毒如何保存？

吉满生物提供的慢病毒产品均为干冰运输，在收货后确定干冰情况，及时将病毒置于-80°C冰箱保存，避免反复冻融；如收到时病毒已融化，在短时间内开展实验的话，可将病毒置于4°C保存（一周内用完）。若病毒储存时间超过6个月，建议使用前重新测滴度。反复冻融会对病毒的滴度造成影响，每次冻融会使病毒的滴度降低10%左右，应尽量避免反复冻融，建议将病毒分装成小体积，方便使用。

Q4 慢病毒如何稀释？

可用完全培养基、生理盐水、PBS等将慢病毒稀释至需要的滴度，稀释过的病毒应尽快使用完。一般情况下，病毒可以直接加入正在培养的细胞培养基中，轻晃混匀孵育，不用提前配置含病毒的培养基。如原液病毒滴度为 5×10^8 TU/mL，则取20 μ L病毒原液加入到80 μ L的常规培养基中，即可得到 1×10^8 TU/mL滴度的病毒稀释液，依次类推得到不同滴度的病毒稀释液。

Q5 有现成的慢病毒质粒能不能直接用于吉满的病毒包装？

对于客户提供的慢病毒载体质粒，由于载体系统的来源及结构的不同，包装病毒时在兼容性、产量、滴度等方面都可能存在差异，吉满使用二三代兼容的包装系统，会先对提供的质粒进行售前评估，如包装风险较大建议更换我们常用载体，对包装滴度更有保障，低风险质粒可先进行少量包装，确定滴度后再进行大量扩增。

Q6 慢病毒通常可以装多大的基因？

通常情况下，需要构建的基因长度（含有标记基因在内）不超过4kb。慢病毒表达载体包含了5'LTR、3'LTR、WPRE等相关元件，一般情况下整个LTR长度与滴度相关，载体越大，病毒滴度越低，可通过载体情况及构建序列长度对病毒滴度进行预估。

Q7 慢病毒载体不包病毒能不能当质粒用？

不包病毒的慢病毒质粒可用于瞬转，类似于普通载体质粒，但装载序列的慢病毒载体整体较大，通常情况下，载体越大，瞬转效率越低。

Q8 什么是MOI值？如何确定某株细胞的MOI值

MOI值（Multiplicity of Infection，感染复数）是指每个细胞感染的病毒数，通常MOI值越高，病毒整合到染色体的数量越多，也代表了病毒对细胞的感染能力，MOI值越高，细胞越难被感染。通常把某株细胞有80%被感染时所用的病毒颗粒数和细胞数目的比值作为该株细胞的MOI值。

MOI值高低多受细胞本身影响，不同实验室细胞状态等差异可能导致细胞MOI值有区别，建议实验前先用带有GFP的对照病毒进行MOI值预实验摸索合适MOI值进而确定病毒用量，通过文献或参考数据设置预实验感染梯度，如MOI值较高可选择高滴度病毒或促感染试剂进行优化。

可通过如下公式进行计算MOI或病毒用量：

MOI=病毒滴度×感染的病毒量/细胞个数

Q9 用于慢病毒感染的细胞接种量是多少？

根据细胞增殖的速度调整细胞接种量，以保证在感染后4天左右细胞刚好快长满培养皿底部为宜。

- **针对大部分细胞系：**传代周期在2~3天，感染时细胞铺板的密度保持在20%~30%左右，则72h后细胞增殖后铺板密度约在90%左右
- **针对某些原代细胞：**由于细胞增长缓慢，可以在接种时提高汇合度到50%~60%但要确保在感染后4天时细胞汇合度达到90%~100%
- **针对非分裂细胞：**如神经元细胞，接种后不再增殖，此时可以按照100%的汇合度进行接种

Q10 如何提高慢病毒对细胞的感染效率？

慢病毒对细胞的感染效率受多种因素影响，如细胞自身生长状态、细胞数量、细胞被慢病毒感染的难易程度(MOI)等，因此**保证细胞状态良好，细胞密度适中，感染条件适宜**，可以达到更好的感染效率。

对于悬浮细胞，可采用离心感染的方法，减少病毒感染时的体积，从而提高感染效率，如将细胞培养板密封后，用离心机2100r/min离心30min，再放回培养箱中正常培养。

Q11 加入慢病毒后，细胞死亡很厉害，该如何处理？

慢病毒感染后细胞状态变差或大量死亡是由于慢病毒对该细胞有一定的毒性作用，需要调整MOI值。可在感染后4h，8h，12h，24h对细胞进行观察，若发现细胞状态变差，立刻对细胞进行换液，使用新鲜的完全培养液替换病毒感染培养液，调整细胞状态。在感染预实验时可确定最适感染时间，避免影响正式实验。

Q12 沾了慢病毒的东西应该怎样处理？

任何接触过慢病毒的枪头、管子、培养板等器材，应当采用1%SDS或84消毒液(1:20)浸泡消毒，也可以121℃，湿热灭菌30分钟处理。操作慢病毒后，应及时用肥皂清洗双手。

Q13 慢病毒感染细胞后什么时候基因表达到达峰值？

慢病毒表达时间较长，一般代谢旺盛的细胞(如293T,BHK21等)48h后可以观察到GFP荧光(或者RFP红色荧光)；代谢缓慢的细胞(如原代培养细胞、神经干细胞、胚胎干细胞等)蛋白表达所需时间较长，感染后72h-96h甚至更长时间可以观察到GFP(RFP)荧光。

过表达慢病毒因插入目的基因序列，可能荧光相比对照病毒稍弱，如载体中带有cas9/dcas9等较大蛋白，建议感染后7~10天再继续下游实验。感染后期请根据细胞生长的情况对细胞进行换液或传代，以保证良好的生长状态。

Q14 细胞能被慢病毒感染，但为何荧光很弱？

慢病毒感染细胞后，由于目的基因与荧光蛋白表达的方式不一样，导致荧光表达有差异的情况也时有发生。细胞中荧光强度受病毒载体及细胞等因素影响。

- **融合荧光：**目的基因与荧光蛋白融合表达，少数的目的基因对融合的荧光蛋白的荧光有影响。可能是目的基因表达量低，导致融合蛋白的表达量也低，进而荧光不亮；也可能是目的基因对荧光蛋白的结构和功能有影响，导致荧光不亮
- **IRES连接：**使用目的基因IRES-荧光蛋白的结构，由于IRES下游基因表达偏弱，容易导致荧光弱
- **2A连接：**使用目的基因-2A-荧光蛋白结构，2A上游的目的基因和下游荧光蛋白在蛋白翻译时断开，如果上游目的基因表达量低，也会导致下游荧光蛋白表达受影响，导致荧光弱，此外，2A元件连接断开不完全，可能存在融合表达同样存在影响。
- **启动子影响：**目的基因和荧光蛋白使用不同的启动子表达，荧光蛋白接在强启动子后面时荧光表达强，接在弱启动子后面时荧光表达较弱，同时，不同类型的启动子在不同细胞中启动效果也会有影响，某些细胞可能需要特殊的启动子启动荧光或者目的基因表达。
- **细胞增殖及观察时间：**通常目的细胞感染的慢病毒颗粒数越多，荧光会越强。慢病毒在感染增殖较快的细胞中感染96h~120h后，荧光蛋白表达才达到峰值；在感染增殖较慢的细胞后，荧光蛋白表达达到峰值需要更长的时间。

Q15 为什么过表达慢病毒没有对照病毒的荧光强?

和病毒的容量有关, 插入较长基因后, 荧光强度会随着插入基因的长度或特殊结构(高GC)的存在而减弱, 尤其是高GC片段, 由于影响了转录, 荧光强度会降低; 另外, 对照病毒的滴度相对较高, 同等体积的病毒, 对照的病毒量更大。

Q16 曝光时间很长才能观察到荧光?

- 荧光显微镜问题, 观察对照病毒组, 如对照病毒组无荧光可能是显微镜问题
- PH值, 若PH值较低, 会导致绿色荧光猝灭, 可根据培养基颜色判断(是否发黄)
- 目的基因的慢病毒可能会比对照病毒的光弱一些, 属于正常现象, 可延长曝光时间观察

Q17 Polybrene (聚凝胺) 该如何添加?

Polybrene (聚凝胺) 是一类高价离子季铵盐多聚物, 溶解后带正电, 与细胞表面的阴离子结合, 能显著提高逆转录病毒对细胞的感染效率, 一般能提高2~10倍。但Polybrene对某些细胞是存在毒性的, 因此使用之前需要先对细胞进行测试。

在感染过程中, 将按照MOI值稀释好的病毒液+培养基+Polybrene加入细胞中 (对于293细胞终浓度可参考6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 制备操作如下:

添加完全培养基
60mm培养皿2mL
100mm培养皿3mL
于37 $^{\circ}\text{C}$ 预热



加入病毒轻轻混匀



加入Polybrene至终浓度为2~12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 轻轻混匀

以上每个成分需要按顺序加入。当MOI值高于20时, 建议添加Polybrene提高病毒的感染效率, 终浓度为2~12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 浓度因不同的细胞而异, 具体浓度请参考相关文献。如果目的细胞是Jurkat、kasumi、NB4、H929、GBC-SD、MCF-7等, 建议不要添加Polybrene; 大部分原代细胞感染也不需要添加Polybrene。

*以上建议仅供参考

Q18 慢病毒能不能用于体内实验, 有什么优势?

应用于体内时, 慢病毒的表达更快, 基因容量更大, 可作为大容量的基因载体。但慢病毒具有一定的免疫原性, 且随机整合特性可能导致细胞功能基因异常, 体内慢病毒应用仍需谨慎。体内实验更推荐使用腺相关病毒。

Q19 不同病毒滴度的表示方法有何区别?

- **TU/mL**: 常用的慢病毒滴度单位, Transducing Units/mL的缩写, 中文为转导单位, 指每毫升中含有的具有生物活性的病毒颗粒数, 表示可以感染并进入到靶细胞中的病毒基因组数
- **VG/mL**: 腺相关病毒(AAV)常用的滴度单位, Vector Genomes/mL的缩写, 是指每毫升病毒液中含有的基因组拷贝数
- **PFU/mL**: 腺病毒常用滴度单位, Plaque Forming Units/mL的缩写, 指空斑形成单位, 通常测定腺病毒感染细胞后空斑的形成来确定腺病毒的滴度
- **VP/mL**: Vector Particles/mL的缩写, 指每毫升病毒溶液中含有的病毒颗粒数

附录一 常见人源细胞MOI值和感染条件

细胞系名称	细胞描述	MOI 值范围	能否添加 polybrene	Puro 致死浓度	Blast 致死浓度
Ca Ski	人子宫内膜癌细胞	10	-	1.5µg/mL	8µg/mL
SiHa	人宫颈鳞癌细胞	10	-	1.5µg/mL	8µg/mL
MIA PaCa-2	人胰腺癌细胞	20	-	1.5µg/mL	8µg/mL
AsPC-1	人胰腺癌细胞	10	-	1.5µg/mL	8µg/mL
BxPC-3	人胰腺癌细胞	20 ~ 40	√	1.5µg/mL	8µg/mL
Panc-1	人胰腺癌细胞	2 ~ 4	√	1.5µg/mL	8µg/mL
SW1990	人胰腺癌细胞	50	-	1.5µg/mL	8µg/mL
MKN-45	人胃低分化腺癌细胞株	20 ~ 40	√	1.5µg/mL	8 µg/mL
MKN-28	人胃癌细胞	20 ~ 40	√	1.5µg/mL	8 µg/mL
AGS	人胃癌细胞	100 ~ 150	√	1.5µg/mL	8 µg/mL
BGC-823	人胃癌细胞	100 ~ 150	√	1.5µg/mL	8µg/mL
SGC-7901	人胃癌细胞	10 ~ 30	√	1.5µg/mL	8µg/mL
MGC80-3	人胃癌细胞	10	-	1.5µg/mL	8µg/mL
NCI-N87	人胃癌细胞	10	-	1.5µg/mL	8µg/mL
HGC-27	人胃癌细胞 (未分化)	10	-	1.5µg/mL	8µg/mL
Eca-109	人食管癌细胞	20	-	1.5µg/mL	8µg/mL
TE-1	人食管癌细胞	10	-	1.5µg/mL	8µg/mL
A498	人肾癌细胞	100	-	1.5µg/mL	8µg/mL
786-O	人肾癌细胞	5	-	1.5µg/mL	8 µg/mL
Caki-1	人肾癌细胞	20	-	1.5µg/mL	8µg/mL
HK-2	人肾近曲小管细胞	5	-	2.0µg/mL	6µg/mL
MCF-7	人乳腺癌细胞	20 ~ 40	×	2.0µg/mL	6µg/mL
T-47D	人乳腺癌细胞	50	-	2.0ug/ml	6ug/ml
MDA-MB-231	人乳腺癌细胞	10	-	2.0µg/mL	6µg/mL
MDA-MB-468	人乳腺癌细胞	10	-	2.0µg/mL	6µg/mL
LNCaP	人前列腺癌细胞	5	-	2.0µg/mL	6µg/mL
DU 145	人前列腺癌细胞	20	-	2.0µg/mL	6µg/mL
PC-3	人前列腺癌细胞	20 ~ 40	√	3 µg/mL	70µg/mL
T24	人膀胱癌细胞	5	-	2.0µg/mL	6µg/mL
SW780	人膀胱癌细胞	5	-	1.5µg/mL	8µg/mL
U87	人脑星型胶质母细胞瘤	1 ~ 3	√	1.5µg/mL	8µg/mL
U251	人脑胶质母细胞瘤	1 ~ 3	√	1.5µg/mL	8µg/mL
IMR-32	人神经母细胞瘤细胞	10	-	1.5µg/mL	8µg/mL
SK-OV-3	人卵巢癌细胞	2 ~ 4	√	1.5µg/mL	8µg/mL
HEY	人卵巢癌细胞	50	-	1.5µg/mL	8µg/mL
OVCAR3	人卵巢癌细胞	30	-	1.5µg/mL	8µg/mL
ES-2	人卵巢透明细胞癌	5	-	1.5µg/mL	8µg/mL
HCT116	人结肠癌细胞	10	-	1.5µg/mL	8µg/mL
SW480	人结肠癌细胞株	10 ~ 30	√	1.5µg/mL	8µg/mL
HT-29	人结肠癌细胞	10 ~ 30	√	1.5µg/mL	8µg/mL

细胞系名称	细胞描述	MOI 值范围	能否添加 polybrene	Puro 致死浓度	Blast 致死浓度
LoVo	人结肠癌细胞	10	-	1.5µg/mL	8µg/mL
RKO	人结肠癌细胞	2	-	1.5µg/mL	8µg/mL
SW620	人结肠癌细胞	100	-	1.5µg/mL	8µg/mL
HCT-8	人回盲肠癌细胞	10	-	1.5µg/mL	8µg/mL
U-2 OS	人骨肉瘤细胞	3	-	1.5µg/mL	8µg/mL
HL-7702	人肝正常细胞	20	-	1.5µg/mL	8µg/mL
Huh-7	人肝癌细胞	10 ~ 30	√	1.5µg/mL	8µg/mL
Hep 3B	人肝癌细胞	10 ~ 30	√	1.5µg/mL	8µg/mL
Hep G2	人肝癌细胞	10 ~ 30	√	1.5µg/mL	8µg/mL
SMMC-7721	人肝癌细胞	10 ~ 30	√	1.5µg/mL	8µg/mL
SK-HEP-1	人肝癌细胞	30	-	1.5µg/mL	8µg/mL
RBE	人肝胆管癌细胞	20	-	1.5µg/mL	8µg/mL
NCI-H1299	人肺腺癌细胞	1	-	1.5µg/mL	8µg/mL
SPC-A-1	人肺腺癌细胞	100 ~ 150	√	1.5µg/mL	8µg/mL
A549	人肺腺癌细胞	20 ~ 40	√	1.5µg/mL	8µg/mL
NCI-H1975	人肺腺癌细胞	50	-	1.5µg/mL	8 µg/mL
BEAS-2B	人肺正常上皮细胞	>100	-	1.5µg/mL	8 µg/mL
THP-1	人单核细胞株	50 ~ 80	√	1.5µg/mL	8µg/mL
U937	人单核细胞	20 ~ 40	√	1.5µg/mL	8µg/mL
kasumi-1	人急性髓性白血病细胞	10	-	1.5µg/mL	8µg/mL
HL-60	人急性髓性白血病细胞	>100	√	2.0µg/mL	6µg/mL
THP-1	人急性单核细胞白血病细胞	30	-	2.0µg/mL	30µg/mL
Jurkat	人白血病细胞	50 ~ 80	×	2.0µg/mL	6µg/mL
NB4	人白血病细胞	50 ~ 80	×	2.0µg/mL	6µg/mL
K562	人白血病细胞	20 ~ 40	√	2.0µg/mL	6µg/mL
Daudi	人 Burkitt's 淋巴瘤细胞	>100	-	2.0µg/mL	6µg/mL
NAMALWA	人 Burkitt's 淋巴瘤细胞	50	-	2.0µg/mL	6µg/mL
Raji	人 Burkitt's 淋巴瘤细胞	>100	-	2.0µg/mL	6µg/mL
CAL27	人舌鳞状细胞癌	10	√	2.0µg/mL	6µg/mL
A375	人黑色素瘤细胞	10	-	2.0µg/mL	6µg/mL
SK-MEL-28	人黑色素瘤细胞	10	-	2.0µg/mL	6µg/mL
Hep-2	人喉癌细胞	10 ~ 30	√	2.0µg/mL	6µg/mL
HEK-293	人胚肾细胞	5	-	2.0µg/mL	6µg/mL
293T	人胚肾上皮细胞	1 ~ 3	√	2.0µg/mL	6µg/mL
NK-92	人天然杀伤性细胞系	>100	-	2.0µg/mL	6µg/mL
JEG-3	人绒癌细胞系	100	-	2.0µg/mL	6µg/mL
NCI-H929	人浆细胞系	100	-	2.0µg/mL	6µg/mL
Hela	人宫颈癌细胞	10 ~ 30	√	2.0µg/mL	5.0µg/mL
SH-SY5Y	人神经上皮瘤细胞	20	-	2.0µg/mL	6µg/mL

附录二 常见鼠源细胞MOI值和感染条件

细胞系名称	细胞描述	MOI 值范围	能否添加 polybrene	Puro 致死浓度	Blast 致死浓度
BRL-3A	大鼠肝细胞	100	-	1.5 µg/mL	8 µg/mL
HSC-T6	大鼠肝星型细胞	10 ~ 30	×	1.5 µg/mL	8 µg/mL
RSC96	大鼠雪旺氏细胞	20	-	1.5 µg/mL	8 µg/mL
C6	大鼠脑胶质瘤细胞	>100	√	1.5 µg/mL	8 µg/mL
GH3	大鼠垂体腺瘤细胞	100	-	1.5 µg/mL	8 µg/mL
4T1	小鼠乳腺癌细胞	>100	-	1.5 µg/mL	8 µg/mL
MC3T3-E1	小鼠颅顶前骨细胞亚克隆 14	100	-	1.5 µg/mL	8 µg/mL
B16	小鼠黑色素瘤细胞	>100	-	1.5 µg/mL	8 µg/mL
Hepa 1-6	小鼠肝癌细胞	100	-	1.5 µg/mL	8 µg/mL
Lewis	小鼠肺癌细胞	20	-	1.5 µg/mL	8 µg/mL
Raw264.7	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞	10 ~ 30 感染后分化	×	1.5 µg/mL	8 µg/mL
NIH-3T3	小鼠成纤维细胞系	20 ~ 40	√	1.5 µg/mL	8 µg/mL
C2C12	小鼠成纤维细胞及肌肉细胞	20	-	1.5 µg/mL	8 µg/mL
Vero-E6	非洲绿猴肾细胞	5	-	1.5 µg/mL	8 µg/mL
Mv1.Lu(NBL-7)	貂肺泡上皮细胞株	10	-	1.5 µg/mL	8 µg/mL
CHO	中国仓鼠卵巢细胞	20 ~ 40	√	1.5 µg/mL	8 µg/mL

附录三 常见原代细胞MOI值和感染条件

原代细胞名称与描述	MOI 值范围	能否添加 polybrene
大鼠软骨细胞	20 ~ 40	√
大鼠肝星状细胞	>100	×
大鼠骨髓间充质干细胞	3 ~ 5	×
大鼠乳鼠心肌细胞	20 ~ 40	√
大鼠神经胶质细胞	20 ~ 40	×
人骨髓间充质干细胞	100 ~ 150	×
人胚胎干细胞	2 ~ 10	×
人脐动脉血管平滑肌细胞	100 ~ 150	√
小鼠骨髓间充质干细胞	10 ~ 30	×
小鼠神经元细胞	1 ~ 3	×
小鼠胚胎干细胞	5 ~ 10	×

Genomeditech (Shanghai) Co.,LTD

