



# 慢病毒使用说明书

## 产品说明介绍

慢病毒载体是以 HIV-1（人类免疫缺陷 1 型病毒）为基础发展起来的基因治疗载体，其特点是可以将遗传信息整合到宿主细胞的慢病毒(Lentivirus)基因组中，从而实现基因的长期稳定表达。这种导入外源基因的有力工具，具有感染谱广泛、可以有效感染分裂期和静止期细胞、长期稳定表达外源基因等优点，已经被广泛应用到各种细胞系的基因过表达、RNA 干扰、microRNA 研究以及活体动物实验中。

本手册为慢病毒载体的构建和病毒包装的通用操作流程，目的是为了给大家交流使用，部分细节内容未能做到一一详述，敬请谅解。

## 病毒包装服务流程

慢病毒载体构建——质粒共转染~HEK293T 细胞——收集病毒上清液——病毒上清液过滤处理——浓缩病毒——分装入库——病毒质量检测——合格出库

## 慢病毒 使用注意事项

- 病毒使用时请使用生物安全柜（BL-2 级别）！如条件有限需使用普通超净工作台，请不要打开风机。
- 进行病毒实验时，请规范佩戴手套、口罩、实验服，不要裸露双手及手臂的皮肤。
- 小心病毒液溅出污染！如不慎洒落，请使用酒精擦拭工作台面，并用紫外照射 60min。
- 如需离心，请使用密封性好的离心管，或用封口膜封口后离心。
- 实验结束后，将所用到的培养基溶液及枪头培养板等耗材放入 84 消毒液中浸泡，24h 后按实验固废液废处理。
- 操作完毕后，请使用洗手液及清水清洗双手。

## 慢病毒储存及稀释

- (1) 收到病毒后请立即置于-80 °C冰箱中保存，避免反复冻融，多次冻融会降低病毒的活性（滴度），当病毒在-80 °C条件下存放超过 6 个月以上时，请安排滴度重新检测，如需多次使用，请分装后存放于-80 °C；
- (2) 使用病毒时，请将病毒从-80 °C冰箱中取出，进行冰浴融化。如果需要稀释病毒，可以用细胞培养基进行稀释；
- (3) 提供的慢病毒单位为 TU/mL，即每毫升慢病毒溶液中含有具有生物活性的慢病毒颗粒数。如：病毒滴度标注为  $2 \times 10^8$  TU/mL，即每毫升病毒液中含有  $2 \times 10^8$  个具有生物活性的病毒颗粒。TU 表示可以感染并进入到目标细胞群中的病毒数。

## 慢病毒滴度检测方法

- (1) 测定前，将生长状态良好的 HEK293T 细胞铺入 96 孔板，每个孔加  $0.5\sim 1\times 10^4$  细胞，体积为 100  $\mu\text{L}$ 。（也可以使用其他易感染细胞，如 H1299、HT1080 细胞等，但用不同细胞标定的滴度值会有所差异）。含 10% FBS 的 DMEM 培养基，5%  $\text{CO}_2$ ，37  $^\circ\text{C}$  培养过夜。
- (2) 种板次日，用含 10% FBS 的 DMEM 培养基对病毒原液进行 10 倍的梯度稀释：准备 8 个无菌的 EP 管，每管加入 180  $\mu\text{L}$  细胞培养基，取待测定的病毒样品 20  $\mu\text{L}$  加入到第一个管中（100 $\mu\text{L}$  含病毒原液  $10^1 \mu\text{L}$ ），混匀后，取 20  $\mu\text{L}$  加入到第二个管中混匀（100 $\mu\text{L}$  含病毒原液  $10^0 \mu\text{L}$ ），继续相同的操作直到最后一管。（每个梯度可做三复孔，以减少实验误差）。
- (3) 选取所需的细胞孔，吸去 96 孔板中原有的培养基，分别加入 100  $\mu\text{L}$  含病毒原液  $10^2$  到  $10^6 \mu\text{L}$  的培养液，每个病毒量加 3 个平行孔，并做好标记。放入培养箱培养，小心操作，不要吹起细胞。培养 24 小时内不要换液，培养 24 h 后，可根据细胞状态适当补液或更换培养基以维持细胞正常生长。
- (4) 感染 48~72 h 后，观察荧光表达情况，统计荧光细胞个数。
- (5) 滴度的计算：48~72 h 后用荧光显微镜对荧光阳性细胞进行计数，数出最后一个能观察到荧光的孔内的荧光细胞数，如：96 孔板 293T 细胞，在加入  $10^{-5} \mu\text{L}$  病毒原液的孔中观察到 9 个带有荧光的细胞，说明该孔中至少有 9 个病毒颗粒感染了细胞，则病毒滴度计算方式为：  
带有荧光的细胞数除以病毒原液量： $9/(10^{-5})=9\times 10^5$ ，单位为  $\text{TU}/\mu\text{L}$ ，也就是  $9\times 10^8 \text{ TU}/\text{mL}$ 。

## 慢病毒的使用

慢病毒对细胞的感染条件及 MOI 可参考文献数据。由于细胞状态差异，实际 MOI 可能与参考 MOI 存在差异。建议先通过预实验校正 MOI 再进行正式实验，以确定慢病毒对细胞的最佳感染条件。

\* MOI (Multiplicity of Infection, 感染复数), 含义为感染时病毒颗粒数与细胞数量的比值, 即每个细胞感染的病毒数。

我们将实验过程中某个细胞感染约 80% 时的病毒数与细胞数的比值定义为该细胞的 MOI 值。

### 一、贴壁细胞

#### 以 96 孔板摸索贴壁细胞 MOI:

Day 1: 接种细胞

用完全培养基制备密度为  $0.5 \sim 1 \times 10^5$  cells/mL 的细胞悬液, 取 100  $\mu$ L 加入 96 孔板中, 37  $^{\circ}$ C 过夜培养, 至细胞融合度为 30%~60% 左右。一般使用铺板数量的两倍计算 MOI。

Day 2: 感染 (1/2 小体积感染法)

1. 从冰箱中取出并在冰浴中融化病毒, 用培养基依次将病毒稀释至滴度: A:  $1 \times 10^8$  TU/mL, B:  $5 \times 10^7$  TU/mL, C:  $1 \times 10^7$  TU/mL, 各 40  $\mu$ L。

2. 推荐 1/2 小体积感染法, 即病毒感染时, 吸去原有细胞培养基, 按照下表所示, 加入含不同量病毒稀释液的 50  $\mu$ L 培养液, 轻摇混匀后继续培养, 对于需要加入 polybrene 的细胞, 可同时加入适量的 polybrene。慢病毒感染 4~6 h 后补足至正常培养体积 100  $\mu$ L (每组推荐设置 3 个复孔)。

细胞数量	MOI 值	病毒稀释液			完全培养基体积 ( $\mu$ L)
		编号	病毒滴度 (TU/mL)	病毒稀释液体积 ( $\mu$ L)	
10000	~	~	~	~	50
10000	1	C	$1 \times 10^7$	1	49
10000	10	C	$1 \times 10^7$	10	40
10000	50	B	$5 \times 10^7$	10	40
10000	100	A	$1 \times 10^8$	10	40

注：MOI=病毒滴度 (TU/mL) ×病毒量 (μL) ×10<sup>-3</sup>÷细胞数 (铺板数的 2 倍)

每孔病毒加入量 (μL) =MOI×细胞数÷病毒滴度 (TU/mL) ×1000

注：慢病毒感染 4~6 h 补足至培养体积，感染后 24 h 换液。

Day 3: 换液

感染 24 h 后，吸去含病毒的培养液，更换为预热的全新的完全培养基，继续培养。  
 (如细胞形态发生变化，可提前到 8 h 或 16 h 换液)

Day 4~5: 继续培养，确认感染效果

感染 48~72 h 后，可以通过荧光显微镜观察 GFP 表达效率，以判断感染效率。中途可根据细胞生长状况进行补液换液，保持细胞活性。

感染效率在 80%左右，且细胞生长良好的组所对应的感染条件和 MOI 即可作为后续感染实验的依据。如病毒不表达荧光，还可以通过目的基因的 qPCR、WB、免疫荧光、免疫组化等方式摸索最佳 MOI。

### 正式实验：慢病毒感染贴壁细胞

按下表所示的接种数，用完全培养基制备密度适宜的细胞悬液，接种细胞数量因细胞的生长速度而略有不同，一般保证第二天进行病毒感染时的细胞汇合度在 40%~60%左右。感染前，从冰箱取出并在冰上融化病毒。我们推荐 1/2 小体积感染法，即病毒感染时，吸去原有细胞培养基，加入 1/2 体积的含病毒的新鲜培养液。

培养皿	底面积/cm <sup>2</sup>	贴壁细胞数/×10 <sup>4</sup>	病毒感染时体积	正常完全培养基体积
96~well	0.3	0.5~2	50 μL	100 μL
24~well	2	2.5~10	250 μL	0.5 mL
12~well	4.5	5~20	0.5 mL	1 mL
6~well	9.6	10~40	1 mL	2 mL

以 24 孔板铺板 5×10<sup>4</sup> HepG2 细胞为例：细胞悬液 10×10<sup>4</sup> cells/mL，取 0.5 mL/孔加入 24 孔板中，37 °C 过夜培养。24 h 后使用滴度为 1×10<sup>8</sup> TU/mL 的病毒进行感染，小心吸去细胞原有培养基，加入 250 μL 预热的新鲜培养基，我们一般使用铺板量的 2 倍计算 MOI，下表示例了 4 组不同 MOI 时的病毒液加入量，可根据摸索到的 MOI 值，将相应

的病毒原液加入细胞孔中，轻轻混匀，根据需要，可同时加入 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 polybrene（有细胞毒性，浓度不宜过高）。继续培养，慢病毒感染 4~6 h 后补足至正常培养体积。

培养皿	病毒感染时体积	正常完全培养基体积	MOI	加入病毒液体积
24 孔板	250 $\mu\text{L}$	0.5 mL	1	1 $\mu\text{L}$
			5	5 $\mu\text{L}$
			10	10 $\mu\text{L}$
			20	20 $\mu\text{L}$

感染 48~72h 时确认结果，中途根据细胞状态进行补液换液，保持细胞活性。

注：慢病毒表达需要一定时间，当细胞代谢较快时，如 293T、BHK21，48 h 即可看到 GFP 荧光，当代谢较慢时，如原代细胞等，感染后 72~96 h 才可观察到 GFP 荧光，一般我们推荐 72 h 观察感染效果；

极难转染的贴壁细胞，如 DC（树突状细胞），可采用多次感染的方法，即感染 24 h 后，使用新鲜病毒液进行二次感染，可提高感染效率。

## 二、悬浮细胞

### 少量细胞摸索悬浮细胞 MOI:

悬浮细胞无需消化，接种当天即可进行慢病毒感染。

将  $1 \times 10^5$  悬浮细胞在 1.5 mL 离心管中低速离心收集，用 100~200  $\mu\text{L}$  预热的新鲜培养液重悬细胞沉淀（以能完全重悬细胞沉淀的体积为准）。

从冰箱中取出并在冰浴中融化病毒，用培养基依次将病毒稀释至滴度：A:  $1 \times 10^8$  TU/mL，B:  $5 \times 10^7$  TU/mL，C:  $1 \times 10^7$  TU/mL。按照下表所示，将合适体积的病毒原液加入上述离心管中，轻轻混匀后将其放置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱内孵育 15~20 min（不要超过 30 min，中间可轻轻重悬），后将管中细胞及病毒混合液吸出到 24 孔板中，并补充培养液至 250  $\mu\text{L}$  继续感染，感染 6 h 后，补足培养液至正常培养体积 500  $\mu\text{L}$ ，保持细胞活性。感染后 24 h，观察细胞状态，可根据状态加入新的预热的完全培养基，若细胞较为敏感，可离心换液。

感染后 72 h，荧光显微镜观察细胞阳性率。对于带 GFP 报告基因的病毒，可通过荧光显微镜观测 GFP 表达效率。若病毒不表达荧光，通过 qPCR、WB 等方法进行检测目

的基因。

细胞数量	MOI 值	病毒稀释液			感染时完全培养基体积 / $\mu\text{L}$	正常培养基体积/ $\mu\text{L}$
		编号	滴度/TU/mL	体积/ $\mu\text{L}$		
$1 \times 10^5$	~	~	~	~	250	500
$1 \times 10^5$	1	C	$1 \times 10^7$	10	250	500
$1 \times 10^5$	5	B	$5 \times 10^7$	10	250	500
$1 \times 10^5$	10	B	$5 \times 10^7$	20	250	500
$1 \times 10^5$	20	B	$5 \times 10^7$	40	250	500
$1 \times 10^5$	50	A	$1 \times 10^8$	50	250	500
$1 \times 10^5$	100	A	$1 \times 10^8$	100	250	500

注：MOI=病毒滴度 (TU/mL)  $\times$ 病毒量 ( $\mu\text{L}$ )  $\times 10^{-3}$ ÷细胞数量

每孔病毒加入量 ( $\mu\text{L}$ ) =MOI $\times$ 细胞数量÷病毒滴度 (TU/mL)  $\times 1000$

注：慢病毒感染 4~6 h 补足至培养体积，感染后 24 h 换液。

### 正式实验：慢病毒感染悬浮细胞

细胞处理：按下表所示，根据需要的孔板确定细胞数量，将生长状态良好的悬浮细胞在 1.5 mL 离心管中低速离心收集，用适量预热的新鲜培养液重悬细胞沉淀（参考预实验中加入比例，不超过 200  $\mu\text{L}/10^5$  细胞）。

	底面积/ $\text{cm}^2$	悬浮细胞数/ $\times 10^4$	感染时培养基体积/mL	正常培养基体积/mL
10cm 皿	55	400~800	5	10
6 孔板	9.6	80~160	1	2
12 孔板	4.5	30~90	0.5	1
24 孔板	2	10~40	0.25	0.5
T25 瓶	25	150~400	2.5	5

病毒感染：感染前，从冰箱取出并在冰上融化病毒，根据前期摸索到的 MOI 加入合适数量的病毒原液。以 6 孔板感染  $1 \times 10^6$  Thp1 细胞为例：当预实验摸索到的 MOI 为 50 时，使用滴度为  $1 \times 10^8$  TU/mL 的病毒进行感染，向细胞重悬液中加入 500 $\mu\text{L}$  病毒液，轻轻混匀，可根据需要，同时加入 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 polybrene（有细胞毒性，浓度不宜过高）。放入 37  $^\circ\text{C}$  培养箱孵育 15~20 min，转入 6 孔板，同时补充培养液体积至 1 mL，继续培养，感染 6 h 后补足至正常培养体积 2 mL。感染 24 h 后，加入新鲜的完全培养基。若细胞状态较好，可 48 h 观察荧光，若需继续培养，再进行换液。

注：难转染的悬浮细胞，需采用平角离心转染法。将适量的病毒液加入对应细胞培养皿后，封口，或将细胞重悬于平底 EP 管中，放入平角离心机，低速  $1200 \times g$  常温离心约 1 h，后放进培养箱正常培养即可。

### 三、采用慢病毒构建稳转细胞株——Puromycin 抗性筛选

使用带有 Puromycin 抗性的病毒感染目的细胞后，可在目的细胞中表达 Puromycin 抗性基因，使用 Puromycin 药物处理，可以筛选出成功感染病毒的目的细胞。

筛选浓度范围为  $1 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ ，细胞种类及状态不同，Puromycin 的工作浓度各不相同，请查找相关文献并提前进行预实验，确定 Puromycin 的最适浓度。

预实验设计：将未侵染细胞按  $2 \times 10^5 \text{ cells/mL}$  铺板 24 孔板，当第二天细胞汇合度在 50~60% 时，更换含不同浓度的 Puromycin 药物的完全培养基（可查阅文献设置浓度梯度，或设置 0.3、0.5、1、2、4、6、8  $\mu\text{g/mL}$ ），48 h 后，观察细胞状态，选取能够杀死 90% 以上细胞的最低浓度进行后续实验。

筛选 Puromycin 抗性细胞：对于携带 Puromycin 抗性基因的病毒，在感染 48~72 h 后，感染效率达到 80% 以上时，可换上适当浓度的含 Puromycin 新鲜完全培养基进行药物筛选（具体以细胞状态而定，一般细胞汇合度在 60%~80%，且生长状态无异常时，参考预实验摸索到的 Puromycin 药物浓度进行药筛），得到稳定感染的细胞株。同时设置未经过病毒感染的空细胞作为对照组，加入等量等浓度的 Puromycin。加入药物后 48 h 观察细胞状态，当空细胞对照组死亡达到 90% 以上时，使用新鲜的完全培养基换掉含 Puromycin 的培养液继续培养。

药筛完成后，待细胞长满后可按适当比例传代培养，等扩增到一定数量后即可进行单克隆或多克隆稳定株筛选。

多克隆筛选：每 2 天换一次含 Puromycin 的完全培养液，每天观察细胞阳性率，筛选至几乎所有的细胞产生荧光，期间可正常进行细胞传代。

单克隆筛选：可采用有限稀释法，挑选出表达量适中的单克隆，扩增后进行冻存。