

金拓思慢病毒产品说明书

一、产品简介

慢病毒载体是一类重组逆转录病毒载体，由于其结构和功能的特点，慢病毒载体作为一种重要的基因转移工具应用于基因治疗和细胞分子生物学研究领域。区别于一般的逆转录病毒载体，它对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。该载体可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上，从而达到持久性表达。在感染能力方面可有效地感染神经元细胞、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，达到良好的基因治疗效果。我公司生产的重组慢病毒均以国际通用的第三代载体四质粒体系生产，通过重组改造后将含有目的基因的慢病毒骨架及其相应的作用元件组合为新质粒，并通过辅助质粒将病毒包装的元件组成重组病毒。通过自我灭活的方式，阻止病毒自我复制。保证了慢病毒使用过程中的良好生物安全性。

二、重要说明

2.1 安全操作说明

1. 应在Ⅱ级及以上级别生物安全柜中使用慢病毒产品。
2. 虽经过改造后病毒安全性极大提高，操作中仍需佩戴口罩、手套等安全防护措施以免产生潜在危害。
3. 操作中所有接触慢病毒试剂的样品、耗材、器皿等均需通过 84 消毒液（1:20）浸泡后，高温 121℃灭活 15min 以上。
4. 实验过程中有病毒液洒落的情况时，应用纸巾将病毒液吸干后喷洒 70 %乙醇，并将擦干的纸巾一并高温处理以免造成其它伤害、污染环境。

2.2 使用注意事项

所有慢病毒产品均通过干冰低温运输，请收到产品后立即转入-80℃冰箱保存。每次使用时提前取出病毒液放置在 4℃冰箱待融化，并保存于 4℃冰箱。每次融化后请尽快使用，病毒液应尽量避免反复冻融降低病毒滴度。

三、慢病毒制备与使用

3.1 实验材料

细胞：人贴壁细胞 293T

培养基：高糖DMEM 培养基

血清：胎牛血清

抗生素：青链霉素

转染试剂：Transfection-

mate **增强剂：**Polybrene

3.2 病毒制备方法

3.2.1 细胞准备

细胞复苏：

1. 将液氮保存细胞取出后，迅速放入 37℃水浴锅内，应及时轻柔摇动加快解冻速度。
2. 将完全溶解的细胞离心，1500rpm，3min。
3. 将离心后的细胞用 70 的酒精擦拭消毒，转移至超净工作台上，弃上清。取 1.5 ml DMEM 培养基重悬细胞，将细胞全部接入培养皿中。

细胞培养

1. 复苏后的细胞需传代 2-3 次，恢复细胞生长状态。
2. 准备生长状态良好的 293T 细胞，每盘接种细胞密度约为 50 %60 % 培养 24h 后，准备进行质粒转染。

3.2.2 转染液准备及转染

每 10cm 平皿细胞用量如下：

A 用 1.5ml Opti-MEM 培养基稀释质粒 DNA（穿梭质粒及 pGag/Pol、 pRev、 pVSV-G），轻轻混匀。

B 使用前轻轻摇匀 转染试剂，然后按比例取 24ul 转染试剂 在1.5ml Opti-MEM 培养基中稀释，室温孵育 5 分钟。注意：请在 25 分钟内进行下一步操作。

C 将前两步所稀释的 DNA 和 转染试剂 混合（使总体积约为 3ml），轻轻混匀，室温放置 20 分钟（溶液可出现浑浊）。注意：转染复合物常温下可在 6 小时内保持稳定。

D. 将 C 步混合转染液逐滴缓慢加入培养皿，轻轻混匀。

E. 37°C培养 18-48 小时后检测基因表达，转染 4-6 小时后可更换培养基。

注：转染步骤及所选试剂应根据个人实验不同进行优化。

3.2.3 病毒收集及浓缩

1. 将转染质粒后培养 72h 的细胞培养液收集到 15ml 离心管中，4°C，4000rpm，5min。
2. 收集将离心后的上清。将上清液过滤（0.45um）。
3. 过滤液将过滤液与另一空管配平，4°C，72000g/min，2h。
4. 弃上清，将离心管倒扣在无菌纸巾上约 10min。吸干剩余液滴后，在管底应当有可见沉淀。
5. 将沉淀重悬后，分 100ul/支。 -80°C待用。

3.2.4 滴度检测

所有病毒均以 293T 细胞检测滴度。

Day 1 在 24 孔板中铺入 1×10^5 密度 293T 细胞，细胞密度大约为 70% 左右。设置相应复孔以降低实验误差。

Day 2 取融化后的病毒液 10ul，用培养细胞的培养基对病毒液进行梯度为 1×、10×、100× 稀释。将相应浓度病毒液加入 Day 1 铺好的细胞中。

Day 3 对细胞进行换液培养。

1. 带有 GFP 或 RFP 荧光的细胞可以在转染病毒后 36-48h 进行荧光显微镜或流式细胞仪检测。统计带有荧光的细胞数量 (C)。

滴度 = $C \times 1000 / \text{加入的病毒体积 (ul)}$

2. 有抗性，如 Puro、Hygro 或其它抗性，可以病毒侵染 48h 后，加入相应抗生素进行药筛。以 Puro 为例，在加药 72h 后，可以对存活细胞计数 (C)。

滴度 = $C \times 1000 / \text{加入病毒体积 (ul)}$

注：

1. 通过荧光检测的方法确定病毒滴度时，由于荧光显微镜的检测灵敏度较低建议检测荧光时间不宜过早。推荐使用流式细胞仪进行分析，并设置复孔进行统计减少误差。
2. 通过抗性进行筛选时，请提前进行细胞抗生素半致死量预实验。推荐药筛传代两次后适当

增加抗生素浓度以确保去除假阳性克隆。

3. 由于每种细胞及不同病毒载体的差异，有可能导致荧光及抗性表达量和表达时间的差异。请根据实验情况确定实验具体操作步骤。

以上方法均为简易测量方法，得到的病毒滴度受单次试验误差影响较大。建议需要确定准确滴度值时，采用qPCR或壳蛋白免疫法设置复孔进行检测。

3.3 病毒使用

金拓思提供的重组 Lentivirus 颗粒是以 VSV-G 膜蛋白包裹，从而大大增加了病毒感染谱，但对不同组织细胞亲嗜性仍有差别，因此，有必要在使用 Lentivirus 颗粒之前请查阅有关文献，了解 Lentivirus 对靶细胞的亲嗜性、感染复数（MOI 值，MOI 是 multiplicity of infection 的缩写，含义是感染时病毒与细胞数量的比值，没有单位，其隐含的单位是 pfu number/cell。）及体内（in vivo）注射所需的病毒量，若无相应文献支持，则需要检测病毒对靶细胞的亲嗜性。

* MOI 的测定：其原理是基于病毒感染细胞是一种随机事件，遵循 Poisson 分布规律，可计算出感染一定比例的培养细胞所需的感染复数（MOI）。其公式为：

$$P = 1 - P(0), P(0) = e^{-m} \text{ 或 } m = -\ln P(0)。$$

P = 被感染细胞的百分率
 $P(0)$ = 未被感染细胞的百分率
 m = MOI 值

例如，如果要感染培养皿中 99% 的培养细胞，则：

$$P(0) = 1\% = 0.01$$

$$m = -\ln(0.01) = 4.6 \text{ pfu/cell}。$$

MOI 对应病毒体积的换算

通常 MOI 越高，病毒整合到染色体的数量以及目的蛋白的表达量越高。

对于分裂活跃的细胞，比如 Hela、293 细胞，MOI=1~3 时，80% 以上的细胞均表达目的基因。而对于非分裂细胞，比如原代细胞，感染效率较低。需要进行 MOI 梯度摸索实验，选择适合的 MOI 进行实验。

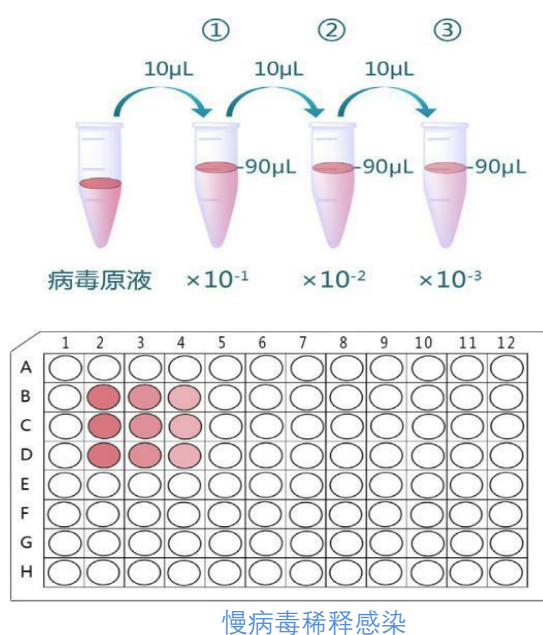
感染时细胞数（一般以传代计数细胞数 $\times 2$ 计算） $\times$ MOI = 病毒个数；

则加入的病毒体积数 = 病毒个数 / 病毒滴度。

比如第一天传代 10^5 细胞到 24 孔板一个孔，第二天长到 2×10^5 细胞，按照 MOI=20 计算，需加入病毒总量为 $2 \times 10^5 \times 20 = 4 \times 10^6$ ，按照慢病毒/逆转录病毒 1×10^8 TU/ml 的滴度，则加入的病毒体积数为 $(4 \times 10^6) / (1 \times 10^8 \text{ TU/ml}) = 4 \times 10^{-2} \text{ ml} = 40 \mu\text{l}$ 。

3.3.1 靶细胞预实验

1. 将慢病毒 NC 从 -80°C 冰箱取出后，置于冰上缓慢融化（切勿高温融化导致滴度降低）。
2. 实验前一天分别接种 $3\sim 5\times 10^3$ 个靶细胞于 96 孔培养板每孔中，所加培养基体积为 $100\ \mu\text{L}$ ，不同种类的细胞生长速度有所异，为保证有较好的实验结果，进行病毒感染时细胞的融合率 $40\%\sim 60\%$ ，因为 Lentivirus 表达时间较长，故在进行感染时细胞接种不宜过密；
3. 干扰预试验共分为二组，每组均有不同梯度的 MOI 值。第一组为正常情况下感染，也就是在完全培养基中直接加入病毒。第二组为感染时添加 $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Polybrene，Polybrene 在大部分细胞中可以有效的提高感染效率；
4. 感染前为细胞换液，吸去细胞上清，按不同的分组情况加入所需的培养基 $90\ \mu\text{L}$ ，每组三个孔；
5. 准备 2 个无菌的 EP 管，吸取 $10\ \mu\text{L}$ 的 $1\times 10^8\ \text{TU}/\text{mL}$ 的病毒（预先从 -80°C 取出在冰上融化）加入到第一个管子中，轻柔混匀，勿产生泡沫。同样从第一管中吸取 $10\ \mu\text{L}$ 的病毒到第二管中，混匀。这样就得到了三个不同梯度的病毒：原液，10 倍稀释，100 倍稀释；
6. 将三个不同梯度的病毒液，各取 $10\ \mu\text{L}$ 加到每组的三个孔中，计算可知，三个孔的 MOI 分别为 100，10，1。如果所用的病毒滴度未达到 $1\times 10^8\ \text{TU}/\text{mL}$ ，则相应增加病毒体积使得能够得到不同的 MOI；
7. 把细胞放回培养箱孵育
8. 8~12h 以后请观察细胞状态。如果细胞状态与未感染组无明显差异，表明慢病毒对细胞没有明显毒性作用，请不要换液，继续培养，24h 后更换为新鲜培养基；
9. 感染 72~96h 后，观察荧光表达情况。对于生长迟缓代谢慢的细胞，可以适当延长观察时间，中途可以换液保持细胞的良好状态；
10. 以上的操作是针对贴壁细胞设计的。悬浮细胞的区别主要在细胞的分盘上，它不需要提前一天分盘。操作时直接将细胞离心后悬浮在不同的培养基中，计数分盘后，即可加入病毒；
11. 通过首次实验和重复实验，确认目的细胞的感染方法和感染参数。



3.3.2 正式实验

通过预实验可以帮助确定使用重组 Lentivirus 颗粒感染目的细胞的优化条件，如细胞接种密度，是否需要添加 Polybrene，合适的 MOI 值等参数。正式实验前，调整并保持细胞的良好状态是非常重要的。有些对 Polybrene 敏感，这时候就不能添加 Polybrene 去增强感染效率。

Lentivirus 表达时间较长，但在一般代谢较旺盛的细胞（如 293T，BHK21 等）上，病毒感染 24h 后可以观察到 GFP 荧光；代谢比较缓慢的细胞（如原代培养细胞，神经干细胞，胚胎干细胞等）GFP 蛋白表达时间较长，感染后 72~96h 甚至更长时间才可以观察到 GFP 荧光。感染后的细胞可以连续培养一周，通过观察 GFP 的表达时间和表达强度来确定 Lentivirus 对目的细胞的感染情况。感染后期请根据细胞生长的情况对细胞进行及时换液和传代，以保证细胞良好的生长状态。

四、运输及储存

因温度对病毒液滴度影响很大，所有病毒液生产后均保存在-80℃冰箱内，通过加入干冰的方法进行低温运输。请收到病毒后立即转入-80℃冰箱保存，并于 6 个月内使用完毕。冰箱保存过程中应尽量避免长时间打开冰箱门，造成冰箱内温度升高降低病毒滴度。取出的病毒液请保存在 4℃冰箱内，尽快用完。每次冻融有可能引起至少一个数量级滴度降低。

五、常见问题及解决方案

1. 第一次使用慢病毒，不知道如何检测滴度计算 MOI 值以确定实验条件。

答：受滴度计算本身易引起误差影响，且病毒将目的片段插入基因组的位点随机。建议在 不影响细胞生长状态的条件下增加病毒使用量以便更快得到稳转细胞系。

2. 使用阴性对照病毒液进行滴度检测荧光亮度低或者有光细胞数量较少。

答：因细胞种类、GFP 表达量、检测时间点等各种情况不同有可能造成检测时的检测效果不佳。建议设置多次观察时间点（24-72h），设置复孔进行检测。细胞亮度有强有弱可能因为转入的病毒颗粒不同引起。此外，部分倒置显微镜的灵敏度不够，最好使用流式细胞仪检测荧光细胞数量。

3. 加入病毒液后细胞生长状态较差，死了很多细胞。

答：慢病毒对您的细胞可能产生一定的毒害。进入细胞的病毒颗粒数量较多时，会引起细胞生长状态变差甚至死亡。请减量或稀释后使用。

4. 转染细胞后感染效率低得到的阳性细胞较少，或者荧光强度偏低。

答：建议增加 MOI 值，即在不引起细胞死亡的前提下增加病毒液的使用量。使进入每个细胞的病毒颗粒数增加。

六、慢病毒 MOI 感染参数

注：不同实验室由于细胞的来源、代数和细胞状态等因素的影响，MOI 值也略有差异，以下数据是在细胞感染效率在 85-100%细胞状态良好的情况下获得的，仅供参考。

细胞系名称	细胞描述	MOI 值范围	能否添加 polybrene
K562	人白血病细胞	20 ~ 40	可
Jurkat	人白血病细胞株	50 ~ 80	不可
kasumi	人白血病细胞株	10 ~ 30	不可

NB4	人白血病细胞株	50 ~ 80	不可
U937	人单核细胞	20 ~ 40	可
THP-1	人单核细胞株	50 ~ 80	可
GBC-SD	人胆囊癌细胞株	30 ~ 50	不可
H929	人多发性骨髓瘤 症细胞系	100 ~ 150	不可
H1299	人非小细胞性肺 癌细胞	1 ~ 3	可

95D	人肺巨细胞癌	2 ~ 4	可
A549	人肺腺癌	20 ~ 40	可
SPC-A-1	人肺腺癌细胞	100 ~ 150	可
7402	人肝癌细胞	10 ~ 15	可
Hep 3B	人肝癌细胞	10 ~ 30	可
Hep G2	人肝癌细胞	10 ~ 30	可
SMMC-7721	人肝癌细胞	10 ~ 30	可
Huh-7	人肝癌细胞系	10 ~ 30	可
Hela	人宫颈癌细胞株	10 ~ 30	可
HOS	人骨肉瘤细胞系	20 ~ 40	可
Hep-2	人喉癌细胞株	10 ~ 30	可
HL-60	人急性髓系白血病细胞株	>100	可
HT-29	人结肠癌细胞	10 ~ 30	可

PKO	人结肠癌细胞	2 ~ 4	可
SW480	人结肠癌细胞株	10 ~ 30	可
DLD-1	人结直肠肿瘤细胞株	10 ~ 30	可
SK-OV-3	人卵巢癌细胞株	2 ~ 4	可
SHG-44	人脑胶质瘤细胞	10 ~ 30	可
U251	人脑胶质母细胞瘤	1 ~ 3	可
U87	人脑星型胶质母细胞瘤	1 ~ 3	可
293T	人胚肾上皮细胞	1 ~ 3	可
HUVEC-2C	人脐静脉血管内皮细胞	10 ~ 30	可
PC-3	人前列腺癌细胞	20 ~ 40	可
MDA-MB-231	人乳腺癌细胞	10 ~ 30	可
MCF-7	人乳腺癌细胞株	20 ~ 40	不可

Tca8113	人舌鳞状细胞癌	10 ~ 30	可
RPE	人视网膜色素上皮细胞	10 ~ 30	可
AGS	人胃癌细胞	100 ~ 150	可
BGC-823	人胃癌细胞	100 ~ 150	可
SGC-7901	人胃癌细胞	10 ~ 30	可
MKN-28	人胃癌细胞株	20 ~ 40	可
MKN-45	人胃低分化腺癌细胞株	20 ~ 40	可
BxPc-3	人胰腺癌细胞	20 ~ 40	可
CFPAC-1	人胰腺癌细胞	50 ~ 80	可
Panc-1	人胰腺癌细胞	2 ~ 4	可
HEC-1-B	人子宫内膜癌细胞株	2 ~ 4	可
NIH-3T3	小鼠成纤维细胞系	20 ~ 40	可

Raw264.7	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞	10 ~ 30 (感染后分化)	不可
CHO	中国仓鼠卵巢细胞	20 ~ 40	可
HSC-T6	大鼠肝星型细胞	10 ~ 30	不可
C6	大鼠脑胶质瘤细胞	>100	可
NRK	大鼠肾细胞	10 ~ 30	可