吉凯基因慢病毒包装试剂盒

Lenti-Easy Packaging System

产品说明书

Catalog Number: LPK001（10 preps）

上海吉凯基因化学技术有限公司 Shanghai Genechem Co., Ltd.
地址：上海张江高科技园区爱迪生路 332 号 电话：(86)21 51320189 传真：(86)21 51370635
Add：NO.332, Aidisheng Road, Zhangjiang Hi-Tech Park, Shanghai 201203 P.R. China Tel : (86) 21 51320189 Fax : (86) 21 51370635

欢迎订购吉凯基因产品

更多产品和服务请联系上海总部或各办事处业务员

cDNA 文库

RNAi 文库

过表达质粒/慢病毒/腺病毒

RNAi 质粒/慢病毒/腺病毒

工具细胞株

Talen 质粒

Knock-out 细胞株

Knock-out 小鼠

细胞功能学实验

HCS 筛选

组织芯片

免疫组化

地址：上海张江高科技园区爱迪生路 328 号 1 楼

邮编：201203

办公邮箱：service@genechem.com.cn

电话：8621 5132 0189

售前热线：800 720 0302

售后热线：400 621 0302

传真：8621 5137 0635

目　录

目　录.....3

1．产品组成.....1

2．储存条件.....1

3．您还需要准备的其他实验材料.....1

4．生物安全提醒.....2

5．慢病毒产品优势.....2

6．慢病毒系统介绍.....3

7．慢病毒包装流程介绍.....4

7.1 慢病毒包装流程示意图.....4

7.2 慢病毒载体（lentiviral vector）的制备.....4

7.3 细胞准备.....4

7.4 质粒转染.....5

7.5 病毒上清收集.....6

7.6 浓缩和纯化.....7

7.7 滴度测定.....7

7.7.1 荧光计数法测定滴度的操作方法.....8

7.7.2 定量 PCR 法检测整合到基因组 DNA 中的病毒序列.....10

7.7.3 p24 蛋白 ELSIA 试剂盒法测定慢病毒滴度.....11

7.7.4 qRT-PCR 试剂盒检测病毒样本中的基因组拷贝数.....12

8．如何使用慢病毒感染目的细胞.....13

8.1 慢病毒感染目的细胞预实验.....13

8.2 慢病毒感染目的细胞正式实验.....15

9．慢病毒的储存和运输.....17

10．可能会遇到的问题.....17

参考文献.....18

附录.....19

1．产品组成

Lenti-Easy Packaging Mix　250μl，1tube（可包装 10 个 100mm dish）

GFP Control Plasmid　20μl，1tube（用于测试，可包装 1 个 100mm dish）

2．储存条件

收到试剂盒后，请于-20℃保存，避免反复冻融，使用前于 4℃融化，如果需要多次使用，建议在第一次融化后分装保存。

3．您还需要准备的其他实验材料

1）表达目的基因慢病毒载体质粒（详见 7.2，第 4 页）

2）慢病毒包装用 293T 细胞株

3）细胞培养基及血清

4）质粒转染试剂

5）其他常用实验耗材（如 100mm 培养皿，50ml 离心管等）

4．生物安全提醒

吉凯基因慢病毒包装系统产生的慢病毒为“自杀”性病毒，即病毒感染目的细胞后不会再感染其他细胞，也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒。慢病毒中的毒性基因已经被剔除并被外源性目的基因所取代，属于假型病毒。

吉凯基因**建议不要构建编码病毒基因的慢病毒载体。**除非已经完全公认某个基因肯定没有致癌性，否则均不建议采用假型病毒进行生物学实验。

请在生物安全 II 级环境下包装和使用慢病毒，操作时请穿实验服，带口罩和手套。实验结束后，用肥皂和水清洗双手。

如需要离心，应使用密封性好的离心管，或者用 Parafilm 膜封口后离心，而且尽量使用组织或细胞培养室内的离心机。

废弃的含病毒的培养基中加入 84 消毒液（1:20 左右），浸泡 1 天后丢弃。接触过病毒的枪头，离心管，培养板等其他物品可用 84 消毒液稀释液处理，也可以用煮沸处理半小时或常规灭菌（121℃，20 min）。

5．慢病毒产品优势

1) 感染效率高：与传统的质粒转染相比，慢病毒感染细胞时无需转染试剂，且转染效率高。 （参见附录：图 1. 质粒转染与慢病毒感染效率比较）

2） 感染谱更广：慢病毒可以高效的感染神经细胞、肝细胞、心肌细胞、内皮细胞、干细胞、原代细胞等多种通常不容易转染的细胞。（参见附录：图 2. 慢病毒可以高效感染多种细胞）

3） 稳定表达： 相比瞬时转染，慢病毒载体可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上，并且可以稳定持续表达。 （参见附录：图 3. 慢病毒感染后的稳定表达）

6．慢病毒系统介绍

慢病毒（Lentivirus）载体是以人类免疫缺陷型病毒（HIV）为基础发展起来的基因治疗载体，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。利用慢病毒载体，可以研究启动子的调控、过表达特定基因或沉默特定基因（RNAi）等。

慢病毒表达载体包含了包装、转染、稳定整合所需要的遗传信息。为产生高滴度的病毒颗粒，需要在细胞中进行病毒的包装，包装好的假病毒颗粒分泌到细胞外的培养基中，离心取得上清液后，可以直接用于宿主细胞的感染，目的基因进入到宿主细胞之后，经过反转录，整合到基因组，从而高水平的表达效应分子。

吉凯基因慢病毒包装系统由一个包装质粒混合物（Lenti-Easy Packaging Mix）和一个慢病毒载体质粒（Lentiviral Vector）组成，包装质粒混合物中含有编码 HIV 病毒主要的结构蛋白的 gag 基因、编码病毒特异性的酶的 pol 基因，和编码调节 gag 和 pol 基因表达的调节因子 rev 基因，以及提供病毒包装所需要的单纯疱疹病毒来源的 VSVG 基因，慢病毒载体 Lentiviral Vector（图 3）中含有 HIV 的基本元件 5’LTR 和 3’LTR 以及其他辅助元件，例如 WRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)。

通常根据不同的实验目的针对慢病毒载体（Lentiviral Vector）改造以进行启动子活性研究、基因表达研究、基因沉默等研究。外源基因则通过载体中的多克隆位点插入慢病毒载体（Lentiviral Vector）中进行表达。

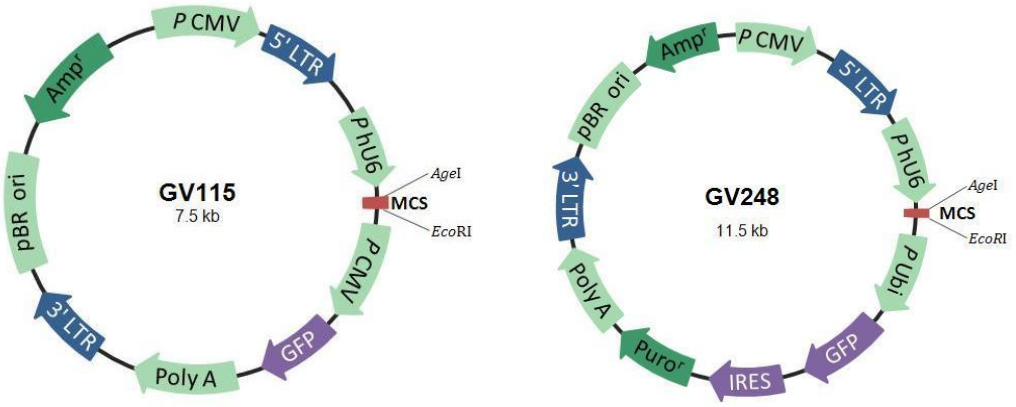


图 1.　两种常用的表达 shRNA 的慢病毒载体。

7．慢病毒包装流程介绍

7.1 慢病毒包装流程示意图

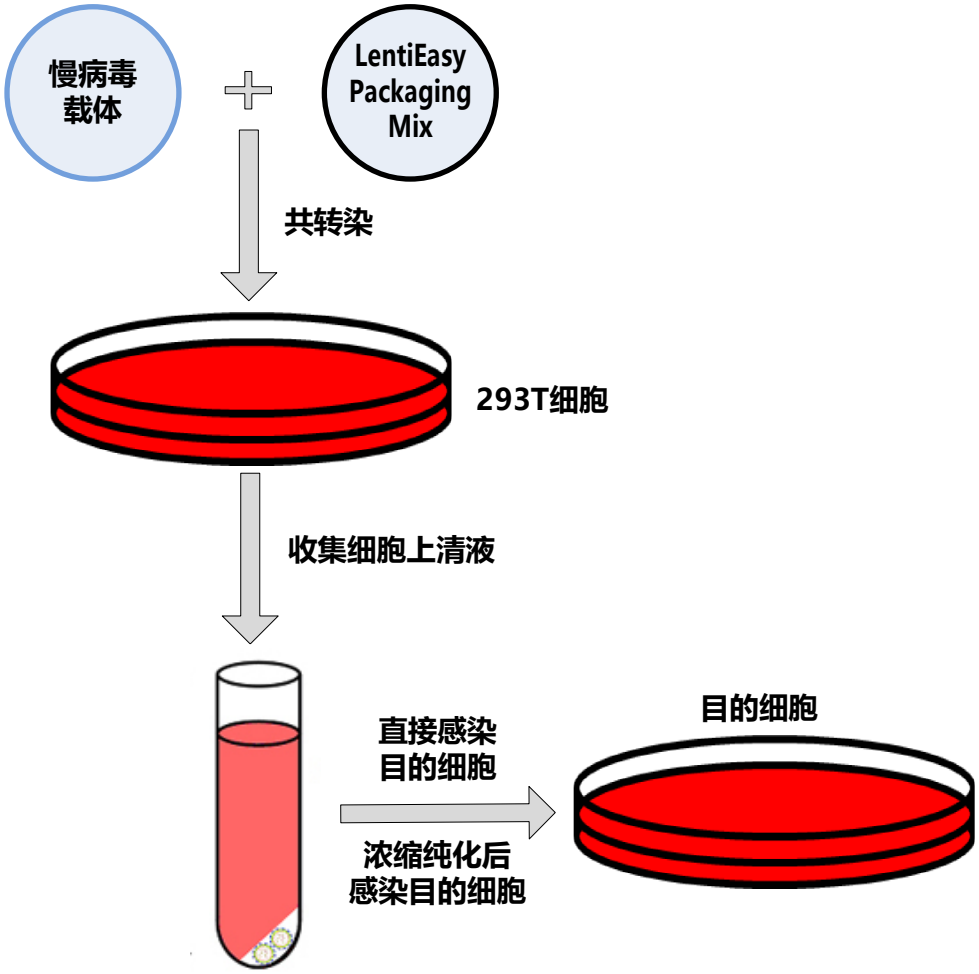


图 2. 慢病毒包装流程示意图

7.2 慢病毒载体（lentiviral vector）的制备

在进行慢病毒包装之前，您需要先获得您感兴趣的目的基因慢病毒载体，该载体可能表达目的基因、表达 shRNA 或表达 microRNA 等。吉凯基因提供多种慢病毒载体，有多种启动子，多种筛选标记，多种表达标签或报告基因可以选择，以满足您不同的实验需求，详情请致电咨询。（参见附录：表 1~表 4）

制备好慢病毒载体后，根据预期的病毒包装量（16μg / 100mm dish，Lipofectamine 2000 转染法），确定需要的质粒用量并进行质粒抽提。

注意：为获得高的转染效率，需要保证质粒的质量，建议采用高纯度质粒抽提试剂盒抽提质粒，质粒后的质粒 A260/A280 通常在 1.8～2.0 之间。

7.3 细胞准备

293T 细胞株是慢病毒的包装细胞，为贴壁依赖型成上皮样细胞，生长培养基为 DMEM（含 10% FBS）。市场上还有其他慢病毒包装细胞系，如 Invitrogen 公司的 293FT，Catalog number: R700-07；Cell Biolabs 公司的 293LTV Cell Line，Catalog number: LTV-100 等，但不同来源的细胞在慢病毒的包装效率上可能会有所差异。

开始病毒包装前 24h 需对 293T 细胞进行传代，传代操作如下：

1）弃去旧培养液，加入 5 ml 灭菌 PBS 溶液，轻轻晃动，洗涤细胞生长面，然后弃去 PBS 溶液。

2）用 2 ml 胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞。

3）以含 10%血清的培养基调整细胞密度为 5×10^6 细胞/10 ml，重新接种于 100 mm 细胞培养皿中，37 ℃，5% CO_2 继续培养，转染前细胞密度 80%左右。

接种于其他培养器皿中的细胞数，需要根据不同器皿的底面积调整接种的细胞量。

注意：细胞消化要充分，成团生长的细胞会影响转染效率。细胞状态对于病毒包装至关重要，因此需要保证良好的细胞状态和较少的传代次数。

7.4 质粒转染

将 Lenti-Easy Packaging Mix 和 GFP Control Plasmid（或目的基因慢病毒载体质粒）共转染入 293T 包装细胞中。

以下操作均以 100mm dish，转染试剂采用 Lipofectamine 2000 为例，其他转染试剂和转染时质粒用量需根据培养器皿的规格进行适当调整。

1) 转染前 2 h 将细胞培养基更换为 Opti-MEM 培养基。

2) 取 GFP Control Plasmid 20μl（或目的基因慢病毒载体 DNA 溶液 16μg）和 25μl Lenti-Easy Packaging Mix，与相应体积 （1455μl）的 Opti-MEM 混合均匀，总体积为 1.5 ml，在室温下温育 5 分钟。

3) 将 Lipofectamine 2000 试剂轻柔摇匀，取 60 μl Lipofectamine 2000 与 1440μl 的 Opti-MEM 混合均匀，总体积为 1.5 ml，在室温下温育 5 分钟。

4) 把稀释后的包装体系与稀释后的 Lipofectamine 2000 进行混合，轻轻地颠倒混匀（共 3ml），不要振荡。在室温下温育 20 分钟，以便形成 DNA 与 Lipofectamine 2000 稀释液的转染复合物。

5) 将转染体系混合物转移至 293T 细胞的培养液中，混匀，于 37 ℃, 5% CO_2 细胞培养箱中培养。

6) 培养 8 h 后倒去含有转染混和物的培养基，每盘细胞加入 10 ml 的 PBS 液，轻轻洗涤残余的转染混和物，然后倒去。

7) 每盘细胞中加入含 10% 血清的 DMEM 细胞培养基 12 ml，于 37 ℃ 、5% CO_2 培养箱内继续培养 48 小时。

注意：如果是首次包装慢病毒，建议先用我们提供的 GFP control plasmid 尝试一次包装（通常情况下，共转染后 24 后，293T 细胞会明显的皱缩成圆形，不同来源的 293T 细胞可能会有所差异，参见图 5）。

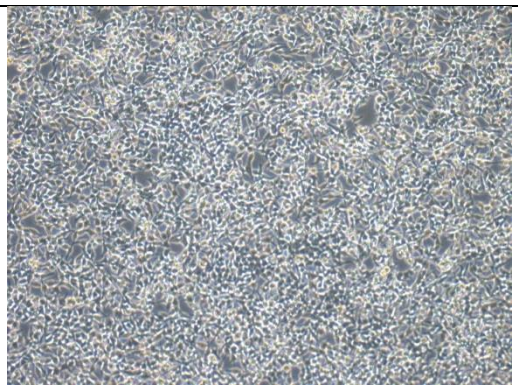
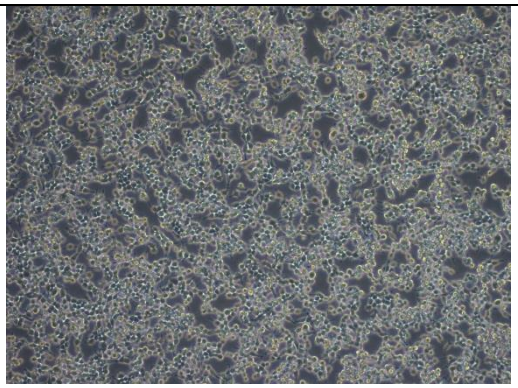
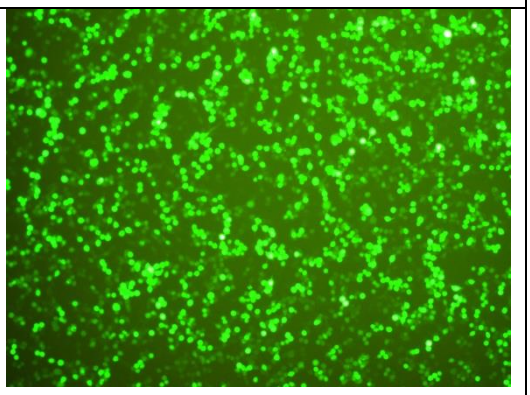
转染前	 明视野（正常生长的 293T 细胞）	荧光视野（无荧光表达）
转染后 24 小时	 明视野（细胞产生明显皱缩）	 荧光视野（较强的荧光表达）

图 3. Lenti-Easy Packaging Mix 和 GFP Control Plasmid 共转染 293T 细胞前后(图片仅供参考)。

7.5 病毒上清收集

1） 转染后 48~72h，收集细胞上清液，并根据细胞生长状况适当补充新鲜细胞培养基（10% FBS，DMEM）。

2）将收集的细胞上清液 1500rpm 离心 5 分钟，并用 0.22μm 的过滤膜过滤（通常使用低蛋白结合的 PES 膜，而不使用硝酸纤维素膜 nitrocellulose filter）。

3）过滤后的细胞上清液如果暂时不进行进一步处理，请及时分装并于-70℃以下储存。

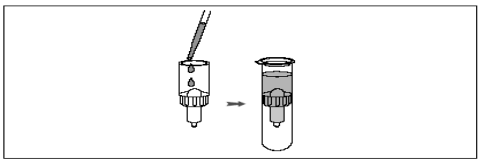
注意：目的基因慢病毒制备后，如果您的实验中有必要，同时还需要制备阴性对照病毒液或阳性对照病毒液，也可以通过吉凯基因订购对应对照病毒产品。

7.6 浓缩和纯化

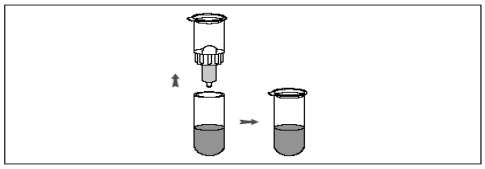
收集好的上清液经过浓缩和纯化后可以大大的提高病毒的滴度和纯度，因此能更有效地感染您的目的细胞。市面上有多种慢病毒浓缩纯化试剂盒可以使用。

下述内容简单介绍了一种使用超滤管进行浓缩纯化的方法：

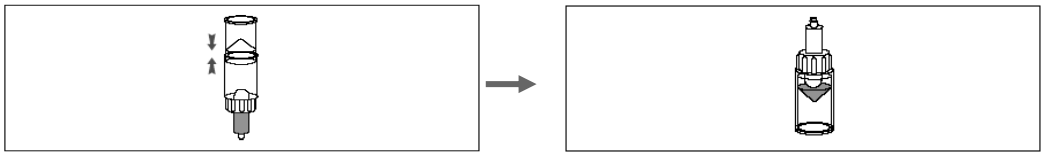
1）将过滤后的上清液加入到过滤杯中（20ml 规格的超滤浓缩管一般可以加 19 ml 的病毒上清液，Millipore，Centricon Plus-20），盖上盖子，密封。将过滤杯置于滤过液收集管中，同时做好平衡。



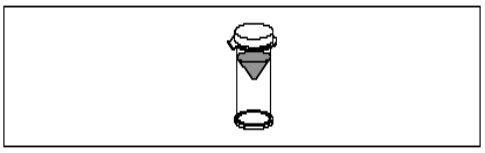
2）以 4000 × g 离心，直至需要的病毒浓缩体积（通常需要的时间为 10-15 分钟）。离心结束后，取出离心装置，将过滤杯和下面的滤过液收集杯分开。



3）将过滤杯倒扣在样品收集杯上。



4）以 1000 × g 离心 2 分钟（过高转速会导致样品损失）。样品收集杯中的即为病毒浓缩液，收集浓缩液，分装，于-70℃以下长期保存，取其中 1 支进行滴度检测。



7.7 滴度测定

经纯化和浓缩的慢病毒建议先进行滴度标定，再用于感染目的细胞。常用的慢病毒滴度测定方法有 4 种，分别是：

(1) 荧光计数法

(2) 定量 PCR 法检测整合到基因组 DNA 中的病毒序列

(3) p24 蛋白 ELISA 试剂盒检测法

(4) qRT-PCR 试剂盒检测法检测病毒样本中的基因组拷贝数

前两种方法检测的是病毒活性单位，后两种方法检测的是病毒的物理滴度（即不能区分具有感染能力的病毒颗粒和不具有感染能力的病毒颗粒）。但前两

种方法都需要病毒先感染细胞，检测过程一般需要 5~10 天，而后两种则可以在 1~2 天内完成。

荧光计数法主要适用于携带有 GFP、RFP、Cherry 等荧光蛋白标记的病毒滴度的检测，但不适合于融合 GFP、RFP、Cherry 的慢病毒的滴度检测。针对检测整合到基因组 DNA 中的病毒序列的定量 PCR 法则可以用于各种慢病毒的滴度检测。**需要说明的是：滴度检测方法不同，病毒滴度值可能有所差异。**

7.7.1 荧光计数法测定滴度的操作方法

1）测定前一天，为测定滴度所需的细胞铺板，96 孔板，每个孔加 5×10^3 个细胞，体积为 100μl。（吉凯基因公司用的 293T 细胞：贴壁生长，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）

2）感染前，对待检测的病毒样品进行 10 倍的梯度稀释。操作方法为：准备 8 个无菌的 Ep 管，每个管子中加入 10% FBS 的 DMEM 90μl，取待测定的病毒样品 11 μl 加入到第一个管中，混匀后，取 11 μl 加入到第二个管中，继续相同的操作直到最后一管。

3）选取所需的细胞孔，吸去 90μl 培养基。加入 90μl 稀释好的病毒溶液。放入培养箱培养，小心操作，不要吹起细胞。培养过程中适当更换培养基以维持细胞正常生长。

4）37℃，5% CO_2 培养 48 小时后，加入新鲜培养基 100 μl，再经过 24 小时候，更换新鲜培养基 150 μl。（小心操作，避免细胞被吹起）

5）96 小时后，观察荧光表达情况，统计荧光细胞个数或用 FACS 计数。若病毒本身只带有 Puromycin 筛选抗性，则感染后 48 小时加入抗性药物 Puromycin（Sigma-Aldrich, Cat. P9620），维持药物浓度在 5 μg/ml。继续培养 2 天，观察细胞生长状况，计算具有抗性的细胞数。

病毒加入量	明视野 100×	荧光视野 100×

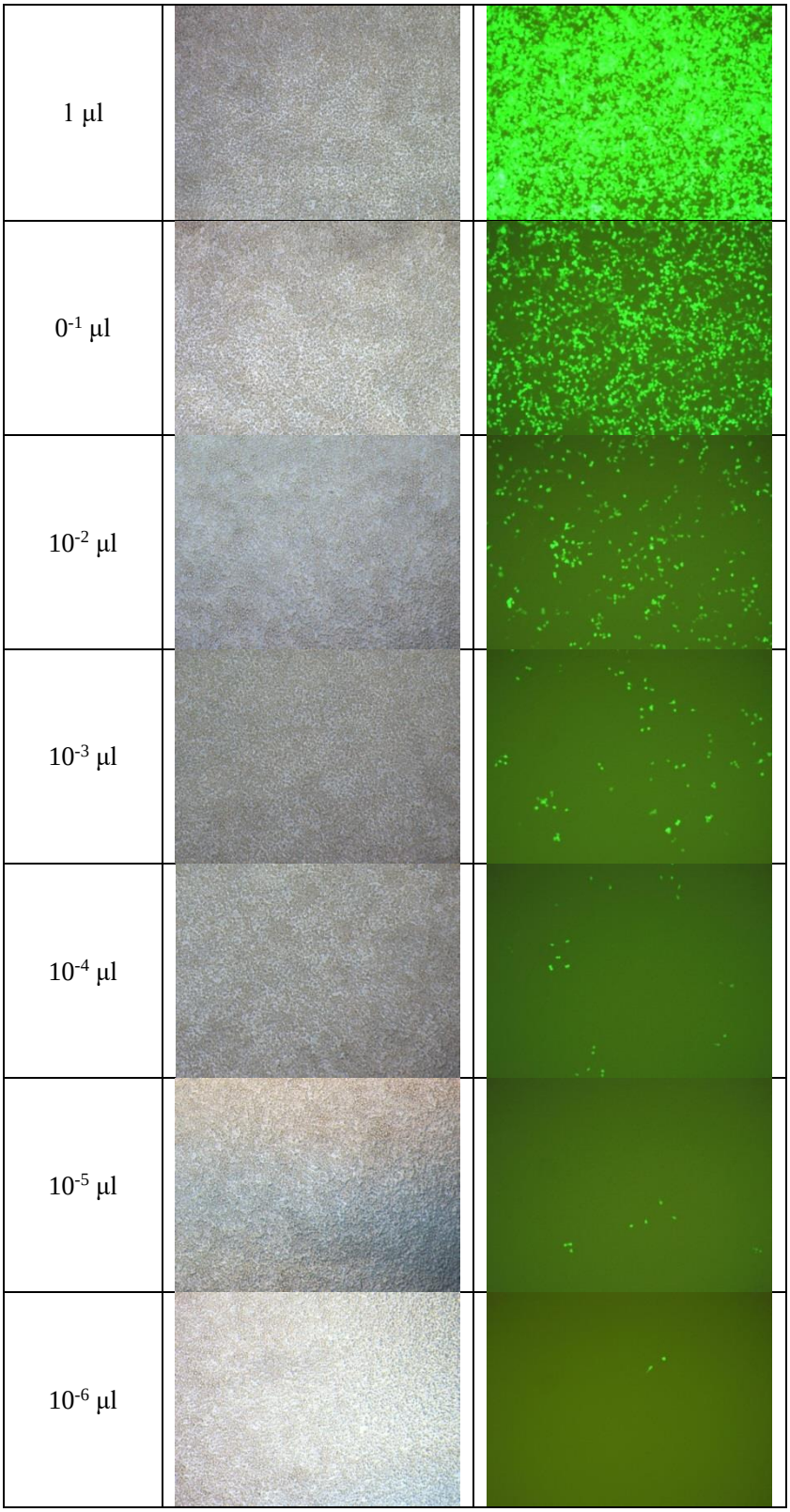


图 4：一组孔稀释法滴度测定过程中病毒感染 293T 细胞后的荧光照片（仅供参考）

滴度的计算:

根据以上荧光图片中 GFP 表达情况，在加入 10^{-6} μl 病毒原液的孔中观察到

2 个带有荧光的细胞，说明该孔中至少有 2 个病毒颗粒感染了细胞，则该病毒的滴度等于带有荧光的细胞数除以病毒原液量，本例子中就是 2/（10^{-6}）=2E+6，单位为 TU/μl，也就等于 2E+9 TU/ml。

该方法还可以用于检测带有 Puromycin 抗性标记的慢病毒的滴度（根据 Puromycin 抗性培养基下活细胞的数量来判断），如果在加入 10^{-5} μl 病毒原液的孔中观察到 3 个细胞存活，说明该孔中至少有 3 个病毒颗粒感染了细胞，则该病毒的滴度等于活的细胞数除以病毒原液量，即 3/（10^{-5}）=3E+5，单位为 TU/μl，也就等于 3E+8 TU/ml。

7.7.2 定量 PCR 法检测整合到基因组 DNA 中的病毒序列

1）样品制备

a） 检测前一天，对 293T 细胞传代，每个 24 孔中加 1 ×105 个细胞，体积为 500 μl；

b）按照孔稀释法测定滴度类似方法 10 倍梯度稀释样品；

c） 选取所需的细胞孔，吸去 90 μl 培养基。加入稀释好的病毒溶液。放入 37℃ 5%CO_2 培养箱中培养；

d）48 小时后，加入新鲜培养基 500 μl。小心操作，不要吹起细胞；

e）4 天后，抽提 RNA 准备做 RT-qPCR。

2）RNA 逆转录获 cDNA。

3）定量 PCR 检测，同时以 Actin 作为内参基因。

示例: 定量 PCR 法测定慢病毒滴度（目的慢病毒中含有 GFP 基因序列，检测过程以针对 GFP 序列设计扩增引物，同时以 Actin 作为内参），扩增曲线图参见图 5。

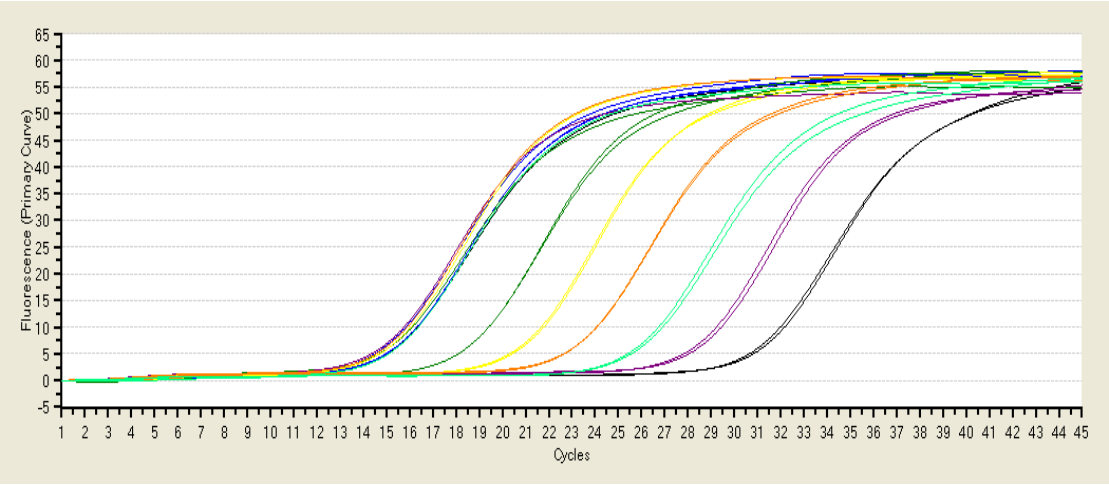


图 5. 定量 PCR 曲线图（仅供参考）

表 1.　定量 PCR 检测数据（仅供参考）

病毒加入量	Actin Ct 值	GFP Ct 值	GFP Ct 均值	△Ct(GFP)-△Ct(Actin)	△△Ct 组间差异
Control	16.05	31.69	31.785	15.735	0.000
		31.88			
1μl	15.53	16.02	16.015	0.485	15.250
		16.01			
10^{-1}μl	15.8	19.12	19.12	3.320	12.415
		19.12			
10^{-2}μl	15.75	21.49	21.43	5.680	10.055
		21.37			
10^{-3}μl	15.6	23.75	23.76	8.160	7.575
		23.77			
10^{-4}μl	16.08	26.44	26.525	10.445	5.290
		26.61			
10^{-5}μl	15.33	29.14	29.045	13.715	2.020
		28.95			

注：曲线颜色和样品颜色相同。

滴度计算：

加入不同病毒量的细胞样品，通过提取总 RNA 后反转录为 cDNA，然后进行定量 PCR 检测，通过比较 control 组和试验组的 Ct 值差异判断滴度值。通常情况下，认为 Ct 值差异 2 以上存在显著差异。

反转录反应所获得的 20 μl　cDNA 中只取了 1 μl 用于实时定量检测，所以该结果仅表示 1/20 样品的情况，所以在滴度计算时应该乘以系数 20。

在本次滴度检测中，10^{-5} μl 组样品检测到目的基因 GFP 的表达，且各组间 Ct 值差异明显（Ct 值相差 3 左右），所以认为在 10^{-5} μl 组样品中存在病毒颗粒。假定该组样品含有至少有 1 个病毒颗粒，则病毒的滴度为：

$1/(10^{-5}\ \mu l) \times 20 = 2.00E+6\ TU/\mu l = 2.00E+9\ TU/ml$

滴度值：>2.00E+9 TU/ml

7.7.3 p24 蛋白 ELSIA 试剂盒法测定慢病毒滴度

检测原理：采用固相酶联免疫吸附分析法（Enzyme-linked Immunosorbent Assay，ELISA）检测样品中的 HIV-1 p24 抗原。样品中 HIV-1 p24 抗原与固相抗 - p24 单克隆抗体和生物素标记的抗-p24 多克隆抗体通过免疫反应，形成固相抗 -p24 单克隆抗体—p24 抗原—抗-p24 多克隆抗体-生物素复合物；然后加入 HRP

（Horseradish Peroxidase，辣根过氧化物酶）标记的链亲和素，形成固相抗- p24 单克隆抗体—p24 抗原—抗-p24 多克隆抗体-生物素—链亲和素-HRP 复合物；加入 TMB-H_2O_2 底物溶液，HRP 催化 H_2O_2 氧化 TMB 生成蓝色的产物（最大吸收峰 655nm），加入终止液终止酶催化反应，生成黄色产物（最大吸收峰 450nm）。其吸光度与校准品和样品中的 HIV-1 p24 抗原浓度成正相关。通过建立标准样品曲线可得出样品中 HIV-1 p24 抗原浓度。

其主要步骤为（详细方法参见市售的 HIV-1 p24 ELISA 试剂盒）：

1）样品准备和稀释

2）标准曲线样品制备

3）样品检测

4）检测数据分析

值得注意的是，该方法最终得出的样品中 p24 蛋白的含量，单位为 pg/ml，是物理单位。

要区别于活性单位 TU/ml，因此，采用不同方法检测的病毒滴度在病毒感染细胞时根据滴度需要加入的病毒量也有所差异。

7.7.4 qRT-PCR 试剂盒检测病毒样本中的基因组拷贝数

检测原理：用特异性引物能够对以 HIV-1 为结构基础的慢病毒样品的 RNA 基因组的保守序列进行特异性扩增，通过 qRT-PCR 对产物进行实时监测。用标准品扩增得到的 CT 值绘制标准曲线，将待测病毒样本反应的 CT 值带入标准曲线，计算得到病毒样本中的 RNA 基因组拷贝数，即病毒颗粒数（copies/ml）。

关于 qRT-PCR 法测定病毒样品中 RNA 的方法操作步骤详细请参考对应的试剂盒说明书。

8．如何使用慢病毒感染目的细胞

虽然 VSVG 包膜蛋白能够感染的细胞种类较多，但是对不同的细胞和组织的亲嗜性仍有差别。在使用慢病毒之前请查阅相关文献，了解慢病毒对目的细胞的亲嗜性，复感染指数（MOI 值，MOI 是“multiplicity of infection”的缩写，中文为感染复数或者复感染指数，含义为感染时病毒和细胞数量的比值。在我们实验中将某个细胞达到 80%感染时所需的 MOI 值定义为这个细胞的 MOI 值。）以及在体（in vivo）注射所需要的病毒量。如果没有相关文献支持，则需要检测病毒对目的细胞的亲嗜性（参考 7.1 慢病毒感染目的细胞预实验）。实际上即使有文献支持，但因为不同实验时细胞代数，个体差异，细胞状态的关系，细胞实际的 MOI 和文献报道的往往会有差异，一般做正式实验前都需要安排感染预实验，以了解细胞所需 MOI 以及病毒对细胞状态和传代的影响。

8.1 慢病毒感染目的细胞预实验

1）如下试剂可能在感染预实验中用到：

a）已知滴度的慢病毒。

b）Polybrene （Catalog number: REVG0001）： 是常用的感染添加剂，使用浓度为 5-10 μg/ml，能显著提高病毒对细胞的接触并提高病毒的感染效率。使用过程中可以用 D-hanks，PBS 或培养基进行稀释。

c）Enhanced Infection Solution（Catalog number: REVG0002）：是吉凯开发的感染增强溶液，使用时用之替代培养基，然后加入病毒，也可以同时加入 polybrene。

2）感染预实验操作步骤

a）实验前一天，以每毫升 $3\sim5\times10^4$ 个目的细胞接种 96 孔培养板中的 12 个孔，体积为 90 μl。

注意：

细胞在感染慢病毒 3-4 天后才观察荧光，所以细胞接种不宜过密，建议细胞感染时细胞密度为 30%左右。

b） 慢病毒感染优化实验，分为四组，每组设置 3 个不同梯度的 MOI（100、10、1）：

A. 完全培养基，加病毒感染；

B. 含 5μg/ml Polybrene 的完全培养基，加病毒感染；

C. Enhanced Infection Solution，加病毒感染；

D.含 5μg/ml Polybrene 的 Enhanced Infection Solution，然后加病毒感染。

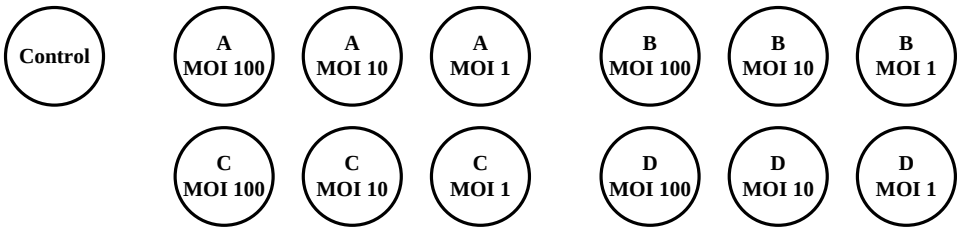


图 6.　感染预实验的分组

c）　稀释病毒：从-80℃冰箱取出病毒，放冰上融化。取适量病毒原液，加 Enhanced Infection Solution 稀释使其滴度为 1×10^8TU/ml，剩余病毒分装冻存。准备 2 个无菌的 1.5ml　EP 管，在每管中加入 45μl 的 Enhanced Infection Solution，吸取 5 μl 的 1×10^8 TU/ml 的病毒加入到第一个管中，轻柔混匀，勿使产生泡沫。同样从第一管中吸取 5 μl 的病毒到第二个管中，轻柔混匀。

d）在水平方向轻轻拍打培养板，使每个孔中的溶液都混合均匀，然后把培养板放回培养箱孵育。

e）培养 8-12 小时后观察细胞状态。如果细胞状态不好（如：背景比较脏或出现非污染性絮状物）,则立即将感染培养基更换为新鲜培养基；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，24 小时后更换为新鲜培养基。

f）细胞感染 3-4 天后，在荧光显微镜下观察荧光表达情况。对于生长缓慢的细胞，可以适当延长观察时间，中途可以换液，保持细胞活力。

g）通过观察细胞感染效果，确认目的细胞的感染条件和感染参数。感染效率=荧光蛋白表达的细胞数/同一视野中明场总细胞数×100%。

h）如果预实验中没有找到较高感染效率的感染条件和合适的 MOI，可以考虑重复实验或用适当的抗生素进行筛选。

注意：

以上的操作是针对贴壁细胞的。悬浮细胞的区别主要在细胞接种上，它不需要提前一天接种。实验前将细胞离心后悬浮在不同的培养基中，计数接种后，就可以加入病毒。

3）感染预实验示例 1：人脑胶质瘤细胞 U87（贴壁细胞）

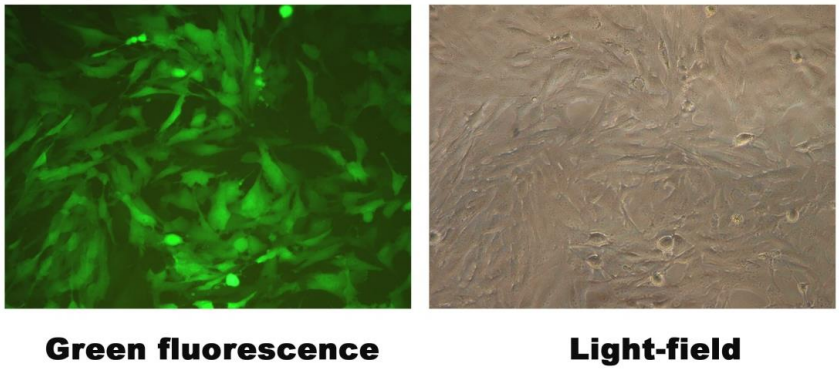


图 7.　MOI 为 5 的条件下，U251 被感染效果

预实验结论：

a）　U251 细胞在正常培养基中就容易被感染。

b）　在完全培养基中，MOI 为 1 时就能达到 80%以上的感染效率。

c) Enhanced Infection Solution 和 5 μg/ml 的 Polybrene 对提高感染效率作用不显著。

注意：

Lentivirus 表达时间较慢，一般代谢较旺盛的细胞（如 293T，BHK21 等）24 小时后可以观察到 GFP 荧光（或者 RFP 红色荧光）；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（RFP）蛋白表达所需时间较长，感染后 72-96 小时甚至更长时间可以观察到 GFP（RFP）荧光。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。

8.2 慢病毒感染目的细胞正式实验

一旦确定了最佳的感染条件和 MOI，就可以开始正式实验。正式实验时所用的细胞数往往比预实验多，这就会存在一个计算病毒用量的问题。放大的原则是保持细胞的密度，将培养基体积，所用病毒量按实际细胞数与预实验细胞数的比例放大。

由于存在不完全成比例的放大，再加上正式实验和预实验所用的细胞状态，细胞密度之间会有差异，病毒滴度和真实值之间的也会有差异，所以在正式实验目的细胞感染慢病毒时，在目的细胞 MOI 附近设置几个 MOI 值进行。在大批量细胞感染前，设置多个 MOI，小批量感染确认最佳参数是有必要的。

例如，目的细胞在 6 孔板感染，假设细胞预实验确定 MOI 为 10，则正式实

验中可以设计 MOI 分别为 5，10，15 等，加入 1×10^8 TU/mL 病毒分别为 10，20，30 μl，感染体系为 1 ml，感染条件则用最优的条件。感染后看荧光，选择感染效率和细胞状态最佳的一组进行收样，抽提 RNA 和后续检测。也可以将感染的细胞传代培养，看病毒感染是否会对细胞传代产生影响，这对于原代细胞就非常重要。这样确定的病毒用量，细胞密度用于进一步的实验就会非常有助实验成功。

实验中，细胞种板时也可以对细胞进行计数，根据感染时的细胞数和细胞 MOI 计算需要的慢病毒颗粒数，从而根据慢病毒滴度，确定加入慢病毒的体积（在大批量细胞感染前，设置多个 MOI、小批量感染以确认最佳感染参数也是有必要的）。

慢病毒感染目的细胞后需要 2～4 天的时间才能观察到慢病毒携带的基因表达。鉴于慢病毒感染细胞后基因表达时间较长，建议在细胞密度 30~40%且细胞状态良好时加入慢病毒，确保在感染后 4 天时细胞增长达到 90%～100%的密度。

对于某些原代细胞，由于细胞增长缓慢，可以在接种时提高细胞密度到 50%～60%，但要确保在感染后 4 天时细胞密度达到 90%～100%。

表 2.　1×10^8 TU/ml 病毒感染细胞所用培养基体积和病毒量参考

器皿	单孔底面积	正常培养体积	感染时体积	MOI=1 加病毒量	MOI=10 加病毒量	MOI=100 加病毒量
96 孔板	0.3 cm2	100 μl	100 μl	0.1 μl	1 μl	10 μl
48 孔板	0.6 cm2	200 μl	200 μl	0.2 μl	2 μl	20 μl
24 孔板	2 cm2	500 μl	500 μl	0.5 μl	5 μl	50 μl
12 孔板	4 cm2	1 ml	500 μl	1 μl	10 μl	100 μl
6 孔板	10 cm2	2 ml	1 ml	2 μl	20 μl	200 μl
T25 瓶	25 cm2	5 ml	2.5 ml	5 μl	50 μl	500 μl

9．慢病毒的储存和运输

慢病毒在-80℃低温冰箱中可以稳定保存，通常半年内滴度不会下降。

运输时，请用足量的干冰打包后快递。

10．可能会遇到的问题

1．病毒包装时质粒转染效率低?

转染效率和细胞状态、细胞密度、质粒质量、转染试剂都有较大关系，需要保证细胞的生长状态良好，细胞代次控制在 20 代以内，采用无内毒素的质粒大抽试剂盒进行质粒抽提。

2．病毒滴度低?

细胞的转染效率决定了细胞的产毒能力，务必保证高的转染效率（通常情况下，转染效率高的荧光表达较强，且细胞皱缩越明显，但需要避免转染过度导致细胞死亡）。

3. 反复冻融对病毒的滴度有影响吗?

反复冻融对病毒的滴度是有影响的，每次冻融会使病毒的滴度降低 10%左右，所以尽量避免反复冻融，必要的时候制备好病毒后小体积分装保存。

4．病毒如何稀释?

病毒从-80℃冰箱中拿出后，可以在冰浴上融化，4℃存放，存放于 4℃的病毒液建议在 3 天以内使用。如有需要稀释病毒，则可以加入适量的 Enhanced Infection Solution（Catalog number: REVG0002），混匀使用，也可以用目的细胞培养基进行稀释。

5．加入病毒后，目的细胞死亡很多，为何?

Lentivirus 可能对您的目的细胞有一定的毒性，请调整并降低感染的 MOI 值，并且在感染 4 小时或 8 小时或 12 小时后对细胞进行换液，用新鲜的完全培养液继续培养观察。

6．特殊大小的细胞怎样处理?

有的细胞特别大或特别小，特别是一些原代细胞，还有的细胞成团无法计数。对于这种细胞，从预实验开始就会有不同。预实验时，保持感染时细胞的密度达到 30~40%，即使细胞没有预定的 $3\sim5\times10^4$ 个/孔的数目，正式实验的细胞密度控

制在差不多的值。对于成团的如胰岛细胞，胚胎干细胞等，注意细胞团的数目和大小，以便以后的实验按比例放大。

7．为什么对照病毒和目的基因病毒感染细胞后荧光表达有差异?

这种差异往往出现在过表达慢病毒中，多数过表达慢病毒的元件结构为 promoter-gene-GFP 慢病毒，其中 gene 和 GFP 为融合表达形式，当 gene 越大时，融合 GFP 的表达就会越弱，这个是融合表达的一个特点。gene 大小为 0 的时候，即为对照 promoter-GFP 结构，其 GFP 表达最为强烈；在插入目的基因之后，相同病毒用量下，GFP 的荧光要明显弱于对照 GFP 慢病毒。同时 GFP 的强弱也会受到 gene 的功能的影响，比如基因分泌表达，则 GFP 可能随基因分别到细胞外，此时细胞内的 GFP 没有富集，通过显微镜观察时就非常弱，或者几乎难以看到，而对照的 GFP 却是正常表达的。如果 gene 有膜定位，最终观察到的仅细胞膜上一圈有荧光，其他地方没有荧光，此时荧光也会较弱，对照的 GFP 仍然是正常表达的。

8．悬浮细胞如何感染?

一种可以参考的感染方法：首先要保证细胞生长状态良好，最好先进行感染预实验，感染前按实验设计的组别将细胞按预定的数量和体积接种于在 EP 管中，然后加入病毒感染一个小时后，再将细胞置于孔板中按预实验中的最佳感染条件继续感染。

参考文献

1． Maurizio Federico, Lentivirus Gene Engineering Protocols (Methods in Molecμlar Biology) Humana Press; 1 edition, April 30, 2003．

2． Tiscornia G, Singer O, Verma IM． Production and purification of lentiviral vectors．Nat Protoc． 2006;1(1):241-5．

3． Sena-Esteves M, Tebbets JC, Steffens S, Crombleholme T,Flake AW． Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes． J Virol Methods 2004; 122:131–139．

4． Reiser J．Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors．Gene Ther． 2000 Jun;7(11):910-3．

附录

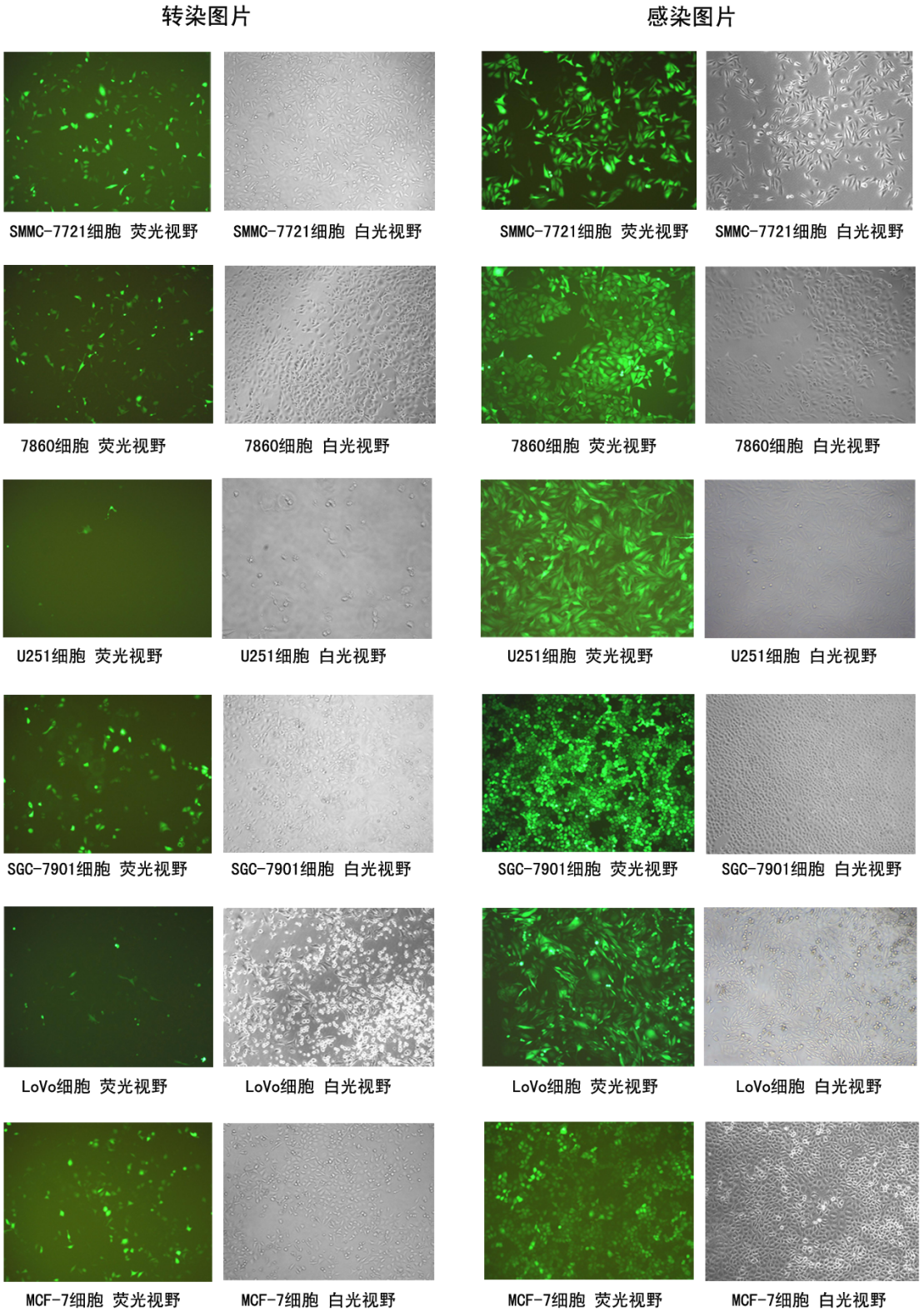


图 1. 质粒转染与慢病毒感染效率比较

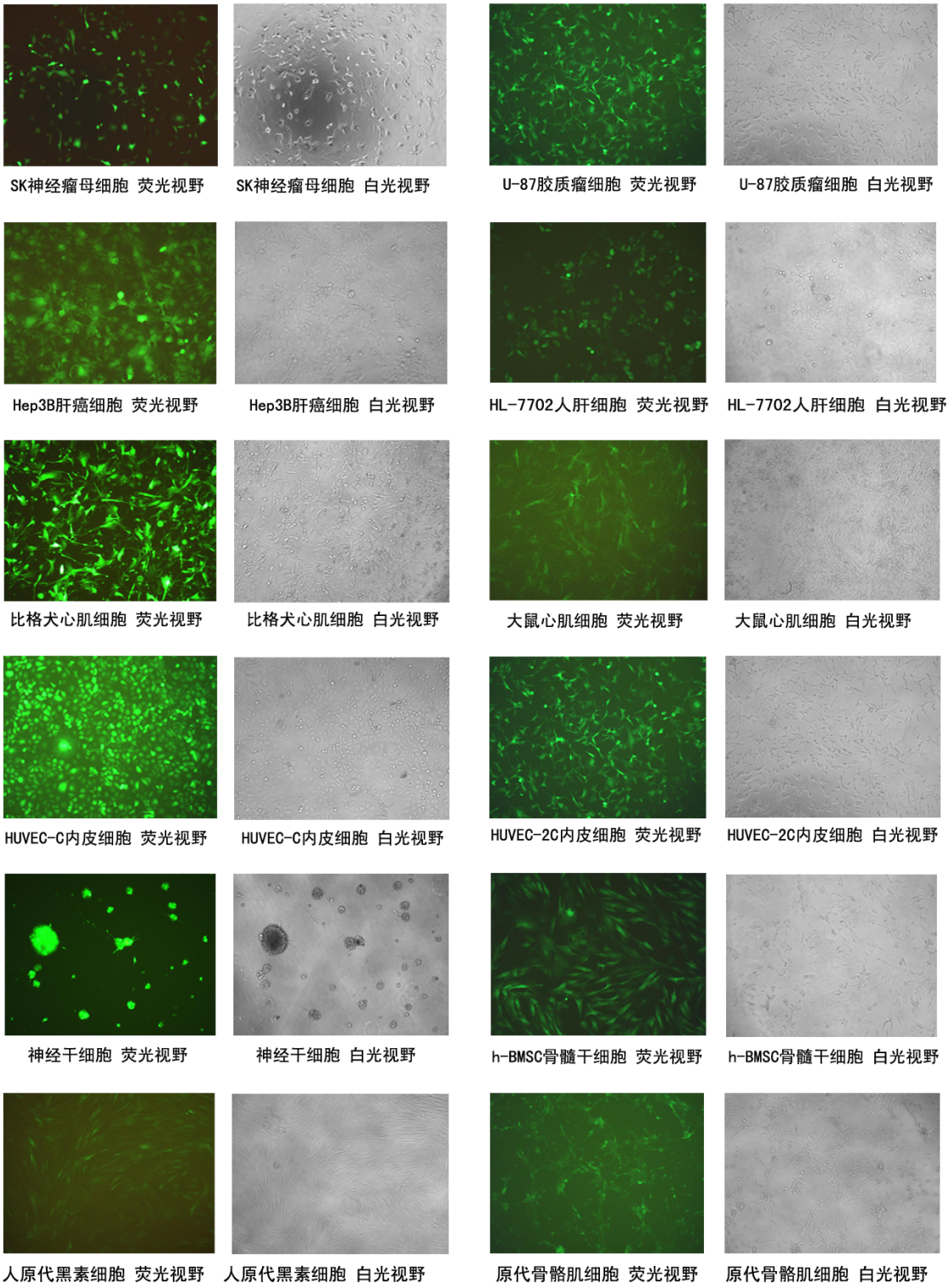


图 2. 慢病毒可以高效感染多种细胞

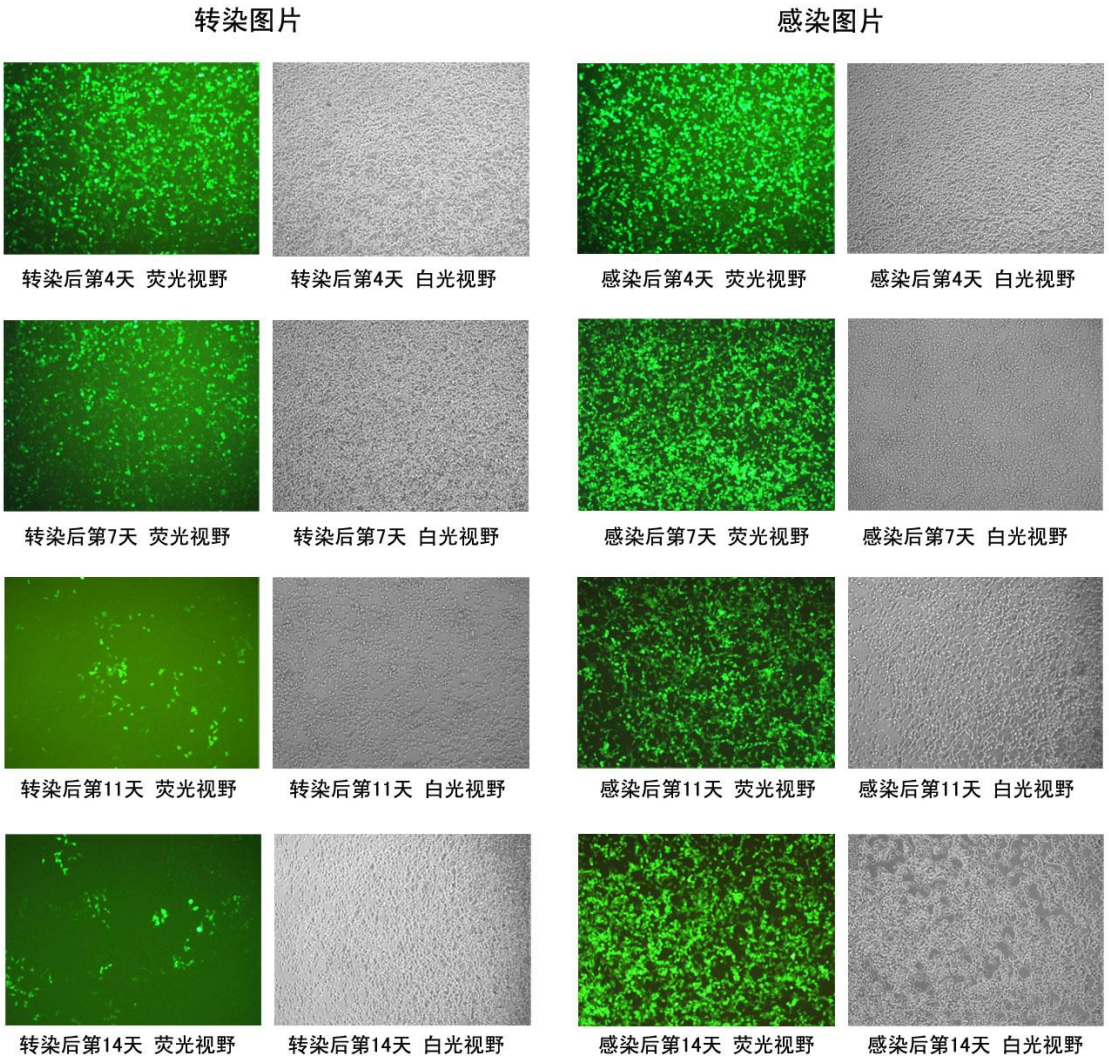


图 3. 慢病毒感染后的稳定表达

表 1.　常用的过表达慢病毒载体列表

载体编号	元件顺序	筛选抗性	荧光标记	亲和标签
GV208	Ubiquitin-MCS-EGFP	无	EGFP	无
GV287	Ubiquitin-MCS-3FLAG-SV40-EGFP	无	EGFP	3FLAG
GV218	pGC-FU-EGFP-IRES-Puromycin	Puromycin	EGFP	无
GV270	Ubiquitin-MCS-EGFP-3FLAG -IRES- Puromycin	Puromycin	EGFP	3FLAG
GV326	Ubiquitin -MCS-SV40-Cherry	无	Cherry	无
GV320	Ubiquitin-MCS-3FLAG-SV40-Cherry	无	Cherry	3FLAG
GV166	pGC-FU-3FLAG-IRES-Puromycin	Puromycin	无	3FLAG
GV341	Ubiquitin-MCS-3FLAG -SV40- Puromycin	Puromycin	无	3FLAG
GV260	Ubiquitin-MCS-Luciferase -IRES- Puromycin	Puromycin	Firefly -Luciferase	无
GV205	Ubiquitin-MCS-3FLAG	无	无	3FLAG

表 2.　常用的表达 shRNA 的慢病毒载体列表

载体编号	元件顺序	筛选抗性	荧光标记
GV115	hU6-MCS-CMV-EGFP	无	EGFP
GV118	U6-MCS- Ubiquitin-EGFP	无	EGFP
GV248	hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-Puromycin	Puromycin	EGFP
GV113	hU6-MCS-CMV-RFP	无	RFP
GV197	hU6-MCS-CMV- Cherry	无	Cherry
GV298	U6-MCS-Ubiquitin-Cherry-IRES-Puromycin	Puromycin	EGFP
GV112	hU6-MCS-CMV-Puromycin	Puromycin	无
GV173	mU6-MCS- Ubiquitin-Luciferase	无	firefly_Luciferase

表 3.　表达 microRNA 的慢病毒载体列表

载体编号	用途	元件顺序	筛选抗性	荧光标记
GV159	microRNA-down	H1-MCS-CMV-EGFP	无	EGFP
GV234	microRNA-down	hU6-MCS-CMV-EGFP	无	EGFP
GV273	microRNA-down	mU6-MCS-Ubi-EGFP	无	EGFP
GV234	microRNA-down	hU6-MCS-CMV-Puromycin	Puromycin	无
GV280	microRNA-down	hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES - Puromycin	Puromycin	EGFP
GV283	microRNA-down	mU6-MCS- Ubiquitin-Luciferase	无	firefly_Luciferase
GV209	microRNA-up	H1-MCS-CMV-EGFP	无	EGFP
GV327	microRNA-up	MCS-SV40-EGFP	无	EGFP
GV217	microRNA-up	Ubiquitin-EGFP-MCS	无	EGFP
GV229	microRNA-up	H1-MCS-CMV-Puromycin	Puromycin	无
GV309	microRNA-up	hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES - Puromycin	Puromycin	EGFP
GV281	microRNA-up	Ubiquitin-Luciferase-MCS-IRES -Puromycin	Puromycin	firefly_Luciferase

表 4.　Tet-on 诱导表达系统列表

载体编号	用途	元件顺序	筛选抗性	荧光标记
GV308	过表达	TetIIP-MCS-3FLAG- Ubiquitin -TetR-IRES-Puromycin	Puromycin	无
GV337	RNAi	TetIIGFP-MCS(MIR30)- Ubiquitin -TetR-IRES-Puromycin	Puromycin	EGFP
GV307	RNAi	TetIIP-Turbo-RFP-MCS(MIR30)- Ubiquitin -TetR-IRES-Puromycin	Puromycin	RFP
GV329	RNAi	TetIIP-MCS(MIR30)- Ubiquitin -TetR-IRES-Puromycin	Puromycin	无

更多载体可以查询吉凯基因网站 www.genechem.com.cn。