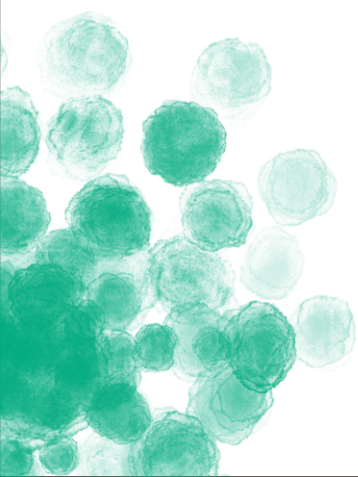




慢病毒 (rLV)

产品使用手册

Product User Manual



Brain Case
布林凯斯

1 rLV安全使用规范

- 慢病毒被视为二级生物安全等级的生物，建议在生物安全二级的条件下进行实验操作。
- 病毒操作时，务必穿着实验服，戴上手套和口罩。
- 建议在生物安全柜中进行病毒相关操作；若使用普通超净工作台操作病毒，切勿打开风机。操作病毒时须特别小心，不要产生气雾或飞溅。如果操作时生物安全柜有病毒污染，立即用70%乙醇或1%次氯酸钠溶液擦拭干净。
- 用显微镜观察细胞感染情况时，应遵从以下步骤：拧紧培养瓶或盖紧培养板。用70%乙醇清理培养瓶外壁后到显微镜处观察拍照，结束之前，用70%乙醇再次擦拭显微镜实验台。
- 实验完成后，接触过病毒的枪头，离心管，培养板，培养液等，务必使用以下任一方式进行病毒灭活：1%次氯酸钠溶液，2%戊二醛，70%乙醇，1%SDS溶液，或者于84消毒液浸泡过夜后弃去。
- 病毒操作完毕后，脱掉手套，用香皂和水清洗双手。

2 rLV存储与运输

- **存储：**病毒原液可放置于4℃进行短期保存（~1周内）；若需长期保存（~1年内），应放置于-80℃，但存放时间若超过6个月后，需重新检测病毒滴度。
- **稀释：**若需稀释病毒，先将病毒于冰浴融解后，使用PBS或培养目的细胞的无血清培养基进行稀释，混匀后分装于4℃保存，请尽量在三天内用完。
- **注意：**反复冻融会显著降低病毒滴度；因此在病毒使用过程中应尽量避免反复冻融，可在接受病毒后按照每次的使用量进行分装。

3 慢病毒（rLV）简介

慢病毒（Lentivirus）载体属于逆转录病毒科的一种单链RNA病毒，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。慢病毒具有广泛的宿主范围、可有效感染分裂期和非分裂期细胞，并能整合到宿主基因组上介导外源基因长期稳定表达等优点。目前慢病毒工具已被广泛作为基因递送的有效载体工具应用于体内外实验中。

慢病毒与其他病毒工具比较，具有以下优势：

- **表达时间长：**慢病毒通过将外源基因整合到宿主细胞基因组上，可实现目的基因长时间稳定的表达，不随着细胞分裂传代而丢失，是细胞实验的首选；
- **安全性高：**未发现致病性，已被用于CAR-T治疗作用于人体；
- **免疫原性低：**直接注射活体组织不易造成免疫反应，适用于动物实验；
- **宿主范围广：**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、干细胞等多种类型的细胞。

4 慢病毒 (rLV) 的生产

- 慢病毒的生产主要基于三质粒（核心质粒pLV-GOI/shRNA、辅助质粒psPAX2和pMD2G）共转染HEK293T细胞。其中核心质粒含有病毒的基本元件5'LTR和3'LTR以及外源目的基因。psPAX2质粒主要携带gag、pol、rev基因，分别编码病毒主要的结构蛋白、特异性的酶以及调节gag和pol基因表达的调节因子。pMD2G载体中含有vsvg基因，为病毒包装提供所需要的包膜蛋白。



图1 慢病毒包装流程图

4.1 rLV质粒构建

- 1) 根据实验目的和受试细胞选择不同的rLV载体。一般通过简单酶切-连接-转化-测序的方式将目的基因克隆至rLV表达载体，并验证载体表达功能。
- 2) 为了获得高质量、高浓度且低内毒素含量的质粒，通过柱离心法及去内毒素试剂进行质粒DNA纯化。

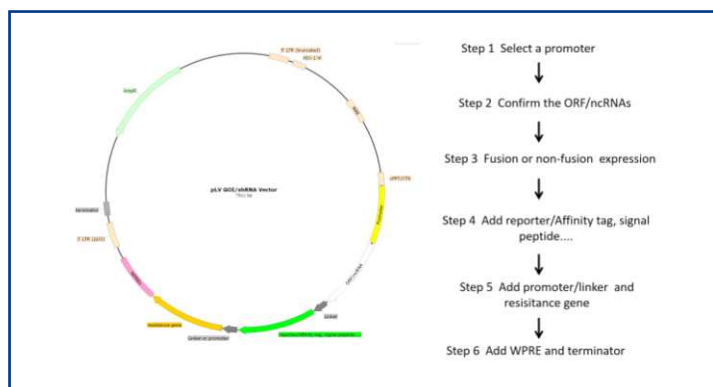


图2 慢病毒核心质粒构建流程图

4.2 病毒包装

● 细胞准备

从液氮灌中取出冻存细胞，迅速放入37°C水浴锅中复苏，离心后向细胞中加入新鲜培养基，37°C、5%CO₂条件下培养，每2-3天进行细胞传代；待细胞生长正常后转入10cm的培养皿中贴壁培养备用。

● 质粒转染

当细胞密度达到约80~90%的汇合率即可进行转染，将转染三质粒体系按一定比例配置后，使用转染试剂(PEI max)将质粒转染到准备好的293T细胞中，按照每皿1000μL体系进行转染及培养，转染6h后更换新鲜培养基。(转染条件参考PEI max转染试剂使用方法)

● 细胞培养

培养一天后，通过显微镜观察细胞转染情况。

● 病毒收毒及除杂

培养48hr后，收集病毒上清并更换新鲜培养基继续培养，72hr后收集病毒上清，0.45μm滤膜过滤。

● 病毒纯化及浓缩

将过滤后的病毒上清低温超速离心25000rpm，2.5h后，弃去上清，利用病毒保存液重悬病毒沉淀，4°C溶解并放置过夜。

● 病毒收集

收集病毒液并进行分装。

5 慢病毒 (rLV) 质量检测

5.1 滴度检测

- 慢病毒的滴度单位为TU/mL，指每毫升中含有的具有生物活性的病毒颗粒数，即感染并进入到靶细胞中的病毒基因组数。根据感染后目的基因的表达情况，可以换算单位体积中慢病毒的含量，即慢病毒的感染滴度。

1) 携带荧光标签的慢病毒滴度检测方法

- 细胞准备 (day 1)

将293T细胞接种于96孔板，约 $3 \sim 5 \times 10^4$ 个目的细胞/孔，37°C、5%CO₂条件下培养过夜，一般病毒感染时细胞的融合度约为70%左右为宜。

- 病毒稀释及感染 (day 2)

利用细胞培养液将待检测慢病毒原液进行10倍梯度稀释，一般设置6~8组稀释度的病毒。可根据实验实际情况提高或者降低稀释倍数，调整病毒稀释组数。将稀释的病毒分别加入到准备好的293T细胞中孵育过夜，每个稀释度重复3个孔。

- 更换培养液 (day 3)

病毒感染24小时内更换新鲜培养液后继续培养。

- 荧光计数及滴度计算 (day 5)

通过显微镜观察孔内带有荧光的细胞数，每个稀释度样品重复3次，计算3个复孔带有荧光的细胞数的平均值。按照下列公式计算慢病毒滴度。假设A为倒数第二个可观察到荧光孔的荧光细胞平均值，B为倒数第一个可观察荧光孔的荧光细胞平均值。

滴度 (TU/ml) = $(A + 10 \times B) \times 1000 / 2 / A$ 孔病毒量 (uL)

- 检测标准：滴度 $\geq 1.0 \times 10^8$ TU/mL

2) 无荧光标签的慢病毒滴度检测方法

- 细胞准备 (day 1)

将293T细胞接种于24孔板，约 $3 \sim 5 \times 10^4$ 个目的细胞/孔，37°C、5%CO₂条件下培养过夜，一般病毒感染时细胞的融合度约为70%左右为宜。

- 病毒稀释及感染 (day 2)

利用细胞培养液将待测慢病毒原液、已知TU的带荧光标签的慢病毒原液（实验对照组）分别进行10倍梯度稀释，一般设置3组稀释度的病毒。将稀释的病毒分别加入到准备好的293T细胞中孵育过夜，每个稀释度重复3个孔。

- 更换培养液 (day 3)

病毒感染24小时内更换新鲜培养液后继续培养。

- 基因组DNA提取及滴度计算 (day 5)

病毒感染72h后，收集细胞并进行基因组DNA的提取（可参考Takara基因组DNA提取试剂盒说明书）。利用特异性的引物进行荧光定量PCR实验，检测待测病毒样品的基因拷贝数，并利用对照组的基因拷贝数及TU值，换算无荧光标签的慢病毒滴度 (TU/mL) 值。每个样品重复3次，取3个复孔基因拷贝数平均值。按照下列公式计算慢病毒滴度。

滴度 (TU/mL) = (待测样品基因拷贝数/对照组样品基因拷贝数) * 对照组样品滴度

- 检测标准：滴度 $\geq 1.0 \times 10^8$ TU/mL

5.2 无菌检测

- 检测方法:将病毒样品加入96孔板的293T细胞, 37°C培养72h后, 显微镜检测细菌和真菌的生长情况。
- 检测标准:培养基需澄清透明, 细胞间隙无明显颗粒, 无任何细菌及真菌污染。

5.2 支原体检测

- 检测方法:利用支原体16SrRNA基因的保守区设计引物, 通过凝胶电泳和荧光定量检测病毒样品中是否有支原体的污染。
- 检测标准:PCR胶图无条带。

6 慢病毒 (rLV) —— 体外感染实验

慢病毒颗粒对不同的组织和细胞亲嗜性不同, 同时包含不同元件的慢病毒表达的荧光强度也有差异, 因此了解慢病毒对靶细胞的亲嗜性、感染复数 (MOI值) 等关键参数至关重要。MOI过低, 感染细胞效果差, MOI过高, 对细胞毒性大导致细胞畸形甚至死亡, 因此建议通过预实验检测病毒对靶细胞的亲嗜性以及合适的感染复数 (MOI值)。判断标准为感染细胞较多且细胞状态最好为最佳MOI。

- 1) 若有参考文献, 以参考值为中心设置感染梯度, 原则上参考值附近设置值较密集, 远离参考值的设置值较稀疏;
例如: 文献中某细胞株慢病毒MOI为15, 则设置MOI感染梯度参考为0、2、10、15、20、40、80。
- 2) 若无参考文献, 则以广谱参考MOI值0-300为参考, 原则上按照细胞分裂活跃程度设置MOI值;
例如: 易感染的细胞建议0、1、5、10、20; 原代细胞建议20、50、80、100、200, 每个梯度重复2-3次。

注: 设置梯度可依据实际实验条件酌情增加或减少梯度。另外由于慢病毒载体的基因组RNA需要反转录为DNA后, 才能插入细胞染色体后进行表达, 因此慢病毒感染细胞并培养48-72小时后才能检测目的基因的表达。

6.1 慢病毒感染目的细胞预实验(贴壁细胞)

以24孔培养板为例, 进行目的细胞和HEK293T细胞的感染预实验

实验前按照不同的MOI设置不同的感染孔, 并根据MOI和细胞数量计算所需要的病毒量, 如有必要可以使用PBS溶液或者无血清培养基稀释病毒原液。

例如, 感染 2×10^5 个目的细胞, MOI值设为10, 病毒滴度为 2.0×10^8 TU/ml, 则每孔病毒用量计算方法为: $\frac{2 \times 10^5 \times 10}{2 \times 10^8} = 0.01(\text{mL}) = 10 \mu\text{L}$

- 第一天
准备细胞: 将目的细胞接种于24孔板, 约 $3 \sim 5 \times 10^4$ 个目的细胞/孔, 铺板时细胞的融合率为50%左右, 每孔培养基体积为500 μL ; 病毒感染时细胞的融合度约为70%左右为宜。

● 第二天

病毒准备：按照设置的不同MOI值，利用培养液将慢病毒原液进行梯度稀释。可根据实验实际情况提高或者降低稀释倍数，设置更多MOI值。

感染目的细胞：在目的细胞和HEK293T细胞（对照细胞）中加入不同MOI值对应的病毒液，混匀后放于二氧化碳培养箱（37℃、2%CO₂）孵育过夜。

注：感染前细胞的状态对最终的感染效果影响较大，需保证加病毒之前细胞处于良好的生长状态。如果慢病毒感染靶细胞效率较低，可以尝试在第一次感染48小时后再次加入按照MOI计算所需病毒颗粒量对靶细胞进行复感，可能会提高靶细胞的感染效率。

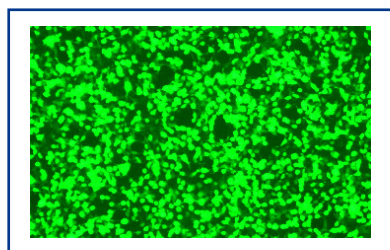
● 第三天

更换培养液：病毒感染24小时候后观察细胞状态，如果慢病毒对细胞有明显毒性作用而影响细胞生长状态，可以在加病毒24小时内更换新鲜培养液后继续培养（推荐8-12小时更换为宜）。第一次换液后，如果慢病毒对细胞没有明显毒性作用，按照正常培养条件培养换液。

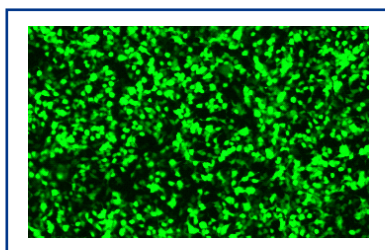
● 第五天

感染效率检测：在倒置荧光显微镜观察荧光，估计慢病毒感染目的细胞的效率；若目的载体上未携带荧光报告基因，可以通过Real-time RT-PCR检测目的基因的表达来评估感染效率。照正常培养条件培养换液。

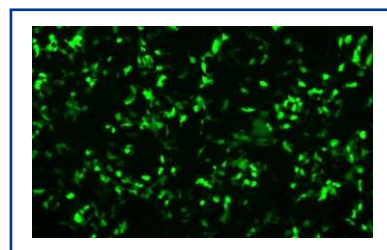
以病毒感染目的细胞72小时后荧光镜检情况举例：



MOI过高



MOI适中



MOI偏低

注意：对于分裂活跃的细胞（如倍增时间约24小时），转导后24小时内即可检测到转基因的表达，在转导后第48-96小时（第2-4天）表达量达到最大，转导5天后，表达水平通常会开始下降。对于分裂周期较长或者无分裂行为的细胞，高水平的转基因表达则通常会持续更长时间。如果您是第一次使用rLV转导哺乳动物细胞，建议您先进行时间摸索实验，以确定目的基因的最佳表达时间。

6.2 慢病毒感染目的细胞实验(贴壁细胞)

● 第一天

准备细胞：将目的细胞接种于24孔板，约 $3\sim 5\times 10^4$ 个目的细胞/孔，铺板时细胞的融合率为50%左右，每孔培养基体积为100 μl；病毒感染时细胞的融合度约为70%左右为宜。

● 第二天

病毒准备：按照预实验获取的合适MOI值，利用培养液将慢病毒原液进行标准稀释。病毒准备：按照设置的不同MOI值，利用培养液将慢病毒原液进行梯度稀释。

感染目的细胞：在目的细胞和HEK293T细胞（对照细胞）中加入合适MOI值对应的病毒液，混匀后放于二氧化碳培养箱（37℃、2%CO₂）孵育过夜。

注：感染前细胞的状态对最终的感染效果影响较大，应保证加病毒之前细胞处于良好的生长状态。

● 第三天

更换培养液：病毒感染24小时候后，更换新鲜培养液后继续培养（具体换液时间可参考预实验）。

● 第五天

感染效率检测：在倒置荧光显微镜观察荧光，评估慢病毒感染目的细胞的效率；若目的载体上未携带荧光报告基因，可以通过Real-time RT-PCR检测目的基因的表达来评估感染效率。

注意：感染悬浮或半悬浮细胞，需将细胞通过离心管进行低速离心，去掉大部分上清，然后加入适量的病毒液，轻轻吹打混匀5-10下，室温放置15min，然后将细胞和病毒液同时吸出转入培养皿中继续病毒感染过夜后换液即可。

对于极难感染的细胞，如DC(树突状细胞)等，可采用多次感染的方法，即感染24h后，直接二次加入病毒液进行重复感染，可显著提升感染效率。

7 细胞MOI值参考列表

由于不同细胞的代数、状态等因素有差异，因此MOI值也存在一定差异，以下数据仅供参考。

物种	细胞名称	细胞中文名	MOI
人	A431	人皮肤鳞癌细胞	5
人	A549	人非小细胞肺癌细胞	5
人	Astrocytes	人星形胶质细胞	1
小鼠	B16-F10	小鼠皮肤黑色素瘤细胞	5
人	BMM	人骨髓来源巨噬细胞	8
人	BxPC-3	人原位胰腺腺癌细胞	10
人	H3255	人肺癌细胞	10
人	HCT116	人结肠癌细胞	5
人	HeLa	人宫颈癌细胞	3
人	HEK293T	人胚肾上皮细胞	5
小鼠	Hepa1-6	小鼠肝癌细胞	3
人	HMVEC	人微血管内皮细胞	100
人	HT-29	人结肠癌细胞	3
人	HUVEC	人脐静脉上皮细胞	100
人	Jurkat	人急性T淋巴细胞白血病细胞	10
小鼠	LLC-1	小鼠Lewis肺癌细胞	6
人	LNCaP	人前列腺癌细胞	5
人	MM200	人黑色素瘤细胞	5

物种	细胞名称	细胞中文名	MOI
人	MM200	人黑色素瘤细胞	5
人	MCF-7	人乳腺癌细胞	2
人	MDA-MB-231	人乳腺癌细胞	1
人	MM-AN	人转移性黑色素瘤细胞	16
小鼠	MMC	小鼠乳腺癌细胞	4
人	MRC-5	人肺胚细胞	1
人	NB4	人白血病细胞	10
大鼠	PC12	大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞	20
人	SKOV-3	人卵巢癌细胞	15
人	U-2OS	人骨肉瘤细胞	5

8 稳转细胞株的筛选

稳转细胞株（稳定表达细胞株）指基于某一细胞株构建的持续过表达或干扰某特定基因的细胞株。稳转细胞株的目的基因质粒DNA整合到细胞染色体上，使细胞长期稳定表达该基因。稳转细胞株包括多克隆稳转细胞株和单克隆稳转细胞株。

8.1 抗生素工作浓度的筛选

以嘌呤霉素工作浓度的筛选为例：

- 1. 提前一天接种对应的细胞株于24孔板中，CO₂恒温培养箱中37°C 5%CO₂过夜培养；
- 2. 培养24h后，细胞密度在70%左右时加入不同梯度浓度嘌呤霉素；
- 3. 继续培养48h，显微镜下观察能够杀死全部细胞的最低嘌呤霉素浓度，即为其合适的工作浓度。

8.2 稳转细胞株的筛选

A. 多克隆稳转细胞株

- 1. 提前一天接种对应的细胞株于24孔板中，CO₂恒温培养箱中37°C 5%CO₂过夜培养；
- 2. 将浓缩后的慢病毒按照合适剂量（提前摸索MOI值）感染对应的细胞株；设置未感染病毒的细胞为实验对照组；
- 3. 感染48-72h后，细胞生长到70-90%的汇合度时，加入1/2-1/4工作浓度的嘌呤霉素进行抗性筛选；筛选48h后，对照组细胞死亡；
- 4. 实验组经过多次传代及筛选，镜检，连续3次传代发现细胞荧光覆盖率达到90%以上即为合格多克隆细胞株。

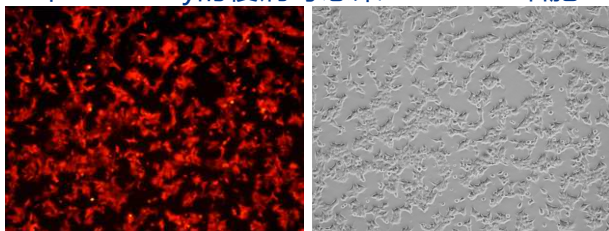
B. 单克隆稳转细胞株

单克隆细胞株是从多克隆细胞中经细胞克隆挑选得到的，由一个细胞扩增得到的细胞株。

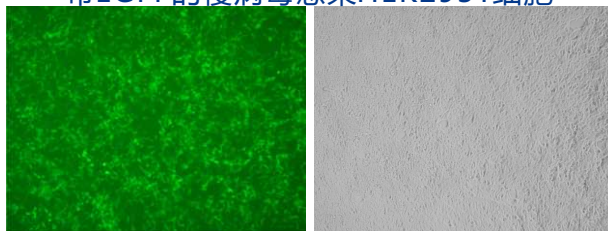
- 1. 对感染并筛选后的多克隆细胞进行消化后，按照细胞密度为1个/孔接种于96孔板中；
- 2. 镜检标记接种单个细胞的孔，待细胞扩增后继续选择加入1/2-1/4工作浓度的嘌呤霉素进行筛选；
- 3. 实验组经过多次传代及筛选，镜检，连续3次传代发现细胞荧光覆盖率达到90%以上即为合格单克隆细胞株。

9 慢病毒案例展示

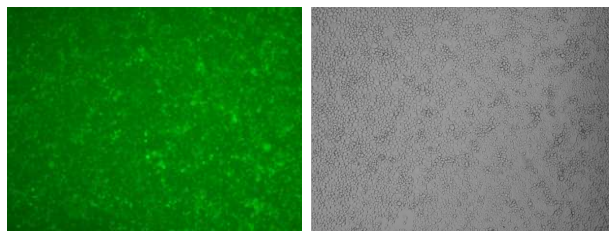
带mCherry的慢病毒感染HEK293T细胞



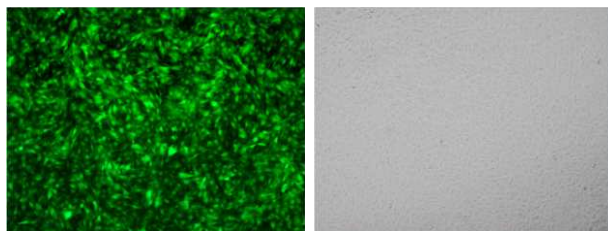
带EGFP的慢病毒感染HEK293T细胞



带EGFP的慢病毒感染Neuro2A的细胞

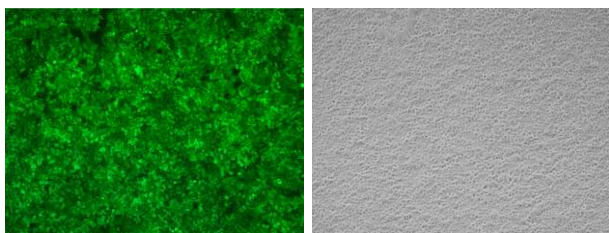


带EGFP的慢病毒感染BHK的细胞

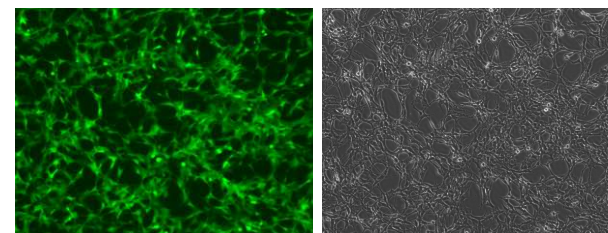


过表达慢病毒稳转株细胞构建

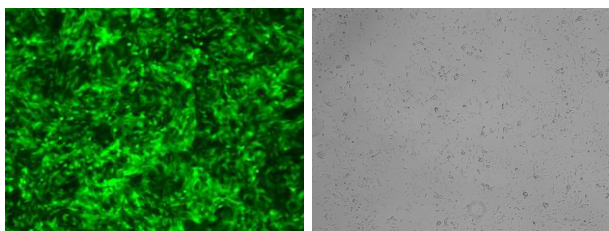
HEK293T细胞



Ht22细胞



SH-Y5H5细胞



公司地址：中国·深圳光明新区·卫光生命科学院
中国·武汉经济技术开发区·华中智谷
官方网站：www.braincase.cn
联系电话：18971216876
合作邮箱：support@braincase.cn



扫码关注布林凯斯



添加小布微信号