

# 金唯智慢病毒使用说明书

GENEWIZ Lentivirus Instruction Manual

## ■ 慢病毒使用说明

1. 产品说明及应用领域介绍 01
2. 慢病毒的储存与稀释 01
3. 产品滴度检测方法 01
4. 产品使用方法:贴壁细胞感染 03
  - 4.1 贴壁细胞感染预实验 03
  - 4.2 贴壁细胞感染实验 05
5. 常见问题 07

## ■ 慢病毒使用注意事项

附:实验室常用细胞系慢病毒感染MOI值列表 09



## 1 产品说明及应用领域介绍

慢病毒是逆转录病毒的一种，但区别于一般的逆转录病毒，慢病毒使用了VSVG外壳，增加了感染的细胞类型，包括分裂期细胞和非分裂期细胞、干细胞和原代培养的细胞等，利用慢病毒可以研究启动子调控、基因的过表达或者沉默。

- 适用于在难以转染的细胞中进行基因的过表达或干扰研究，如神经元细胞、悬浮细胞、干细胞等
- 适用于建立稳定表达目的基因的细胞株
- 适用于In vivo实验，包括稳定表达细胞株成瘤实验、瘤内注射、局部注射等

## 2 慢病毒的储存与稀释

- (1) 收到病毒后请置于-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（若需要，可根据细胞类型加入适量的终浓度的1x LV-Assistant）
- (3) 金唯智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或 $2E+8$  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

## 3 产品滴度检测方法

- (1) 实验前 24h，接种 HT1080 细胞于 96 孔板中，约  $5 \times 10^3$  个/孔，100  $\mu$ L/孔，于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 条件下培养；

(2) 实验前在显微镜下,对实验用细胞进行观察,确定细胞饱满、分布均匀、无污染后再进行后续实验。

(3) 病毒梯度稀释:

1. 取4个无菌的EP管,然后按照依次分别标记10  $\mu$ L、1  $\mu$ L、10<sup>-1</sup>  $\mu$ L、10<sup>-2</sup>  $\mu$ L;
2. 向每个EP管中加入 100  $\mu$ L的 4% FBS的 MEM培养基;
3. 取病毒原液 11  $\mu$ L加入到第一个EP管中,吹打混匀;
4. 从第一个EP管中吸取 11  $\mu$ L 的稀释液加入到第二个EP管中,吹打混匀;
5. 从第二个EP管中吸取 11  $\mu$ L 的稀释液加入到第三个EP管中,吹打混匀,继续相同的操作,直到稀释至最后一个EP管

(4) 稀释病毒加样:在96孔板上依次分别标记好病毒名称、稀释梯度和检测日期。小心地将原细胞培养液吸除,然后依次按标记加入100  $\mu$ L病毒稀释液;

(5) 在感染后24 h更换新鲜培养基。

(6) 感染72 h以后在荧光显微镜下观察荧光,选择感染效率低于100%的最高梯度(例如:加入1  $\mu$ L病毒液的梯度细胞感染效率接近100%,0.1  $\mu$ L感染效率没达到100%,则选择0.1  $\mu$ L进行计算),用台酚蓝染色计数,对活细胞进行计数,然后计算病毒滴度。

(7) 病毒滴度计算:目的慢病毒含有荧光筛选标记基因,因此可以根据计算感染效率低于100%的梯度的荧光细胞个数可以计算出该加入病毒量中的病毒数量,从而进一步推算出病毒滴度;

**慢病毒滴度计算:**  $(TU/mL) = MP \cdot N/n$  TU/mL

**数据解释:** M: 检测细胞慢病毒感染的MOI值 (HT1080的MOI=1);

N: 通过计数后活细胞数目; n: 加入病毒的体积 (mL); P: 通过荧光判断病毒感染效率;

实例:加入1  $\mu$ L病毒量后,通过荧光病毒感染效率100%;加入0.1  $\mu$ L病毒量后,通过荧光判断病毒感染效率约为20%,因此取0.1  $\mu$ L进行计数,通过计数计算活的细胞量为 $5 \times 10^4$ 个,病毒滴度计算公式:  $(TU/mL) = 1 \cdot 20\% \cdot 5 \times 10^4 / 0.1 \times 10^{-3} = 1 \times 10^8$  TU/mL;

荧光转染图见图1

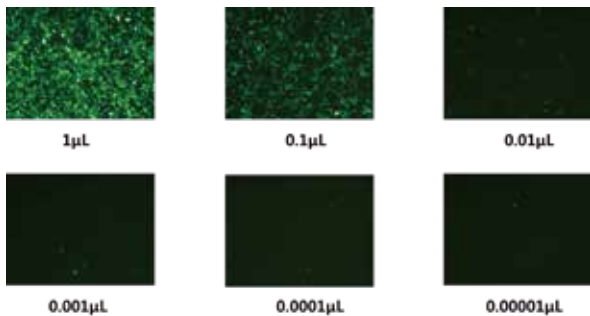


图1. 各个梯度荧光转染图

## 4 产品使用方法:贴壁细胞感染

### ■ 实验材料

**试剂:** LV-Assistant助感染试剂、细胞培养基

**耗材:** 细胞培养板、枪头、EP管、消毒酒精、手套

**仪器:** 移液枪

### 4.1 贴壁细胞感染预实验

慢病毒对细胞的感染条件及MOI可参考《实验室常用细胞系慢病毒感染MOI值列表》。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感染MOI和最佳的感染条件。

\* 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80%时的病毒数与细胞数的比值定义为该细胞的MOI值。

## ■ 实验步骤

为了确认合适的感染条件,按照不同培养条件将实验分为2组:

**A组:** 常规培养基+LV-Assistant 助感染试剂,观察LV-Assistant 是否可以提升感染效率

**Control组:** 常规培养基培养未感染细胞

### • 第一天:接种细胞

用完全培养基制备密度为 $3-5 \times 10^4$  cells/mL的细胞悬液,取100  $\mu$ L/孔加入96孔板中,共6个孔,37°C过夜培养,至细胞融合度为20%-30%左右。

### • 第二天:感染

1. 从冰箱中取出并在冰浴中融化病毒,用无血清培养基依次将病毒稀释至滴度: $1 \times 10^8$  TU/mL,  $1 \times 10^7$  TU/mL,  $1 \times 10^6$  TU/mL, 各50  $\mu$ L。
2. 吸去原有细胞培养基,按照表1更换培养基,加入病毒及LV-Assistant,混匀。

感染条件/病毒量	Control	A
MOI=1 $1 \times 10^6$ TU/mL	完全培养基:100 $\mu$ L	完全培养基:86 $\mu$ L 病毒:10 $\mu$ L LV-Assistant:4 $\mu$ L
MOI=10 $1 \times 10^7$ TU/mL	完全培养基:100 $\mu$ L	完全培养基:86 $\mu$ L 病毒:10 $\mu$ L LV-Assistant:4 $\mu$ L
MOI=100 $1 \times 10^8$ TU/mL	完全培养基:100 $\mu$ L	完全培养基:86 $\mu$ L 病毒:10 $\mu$ L LV-Assistant:4 $\mu$ L

表1. 贴壁细胞感染预实验感染条件

3. 继续培养。

### • 第三天:换液

感染24h后,吸去含病毒的培养液,更换为全新的完全培养基,继续培养。  
(如细胞形态发生变化,可提前换液)

- **第四天:继续培养**

中途可根据细胞生长状况进行换液,保持细胞活性。

- **第五天:确认感染效果**

感染72h后,可以通过荧光显微镜观察GFP表达效率,以判断感染效率。

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。参见图2。

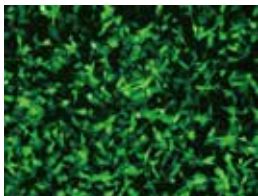


图2.1 MOI=100 慢病毒感染效果图

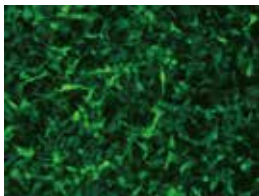


图 2.2 MOI=10 慢病毒感染效果图

对于携带Puromycin抗性基因的病毒,换上适当浓度的含Puromycin新鲜完全培养基,筛选稳定感染的细胞株。

## 4.2 贴壁细胞感染实验

### ■ 实验步骤

- **第一天:接种细胞**

按实验需要将细胞铺板,细胞数以第二天密度约50%-60%为宜,37°C培养过夜;

- **第二天:病毒感染**

(a) 对于LV-Assistant 可施加的细胞:准备完全培养基和 LV-Assistant 混合物, LV-Assistant 终浓度为摸索得到的最适终浓度。移去培养基并添加LV-Assistant /培养基混合物于每孔中;

(b) 对于不适用LV-Assistant 的细胞, 以上步骤省略, 直接进入下面步骤。感染前, 从冰箱取出并在37°C水浴中快速融化病毒, 吸去细胞原有培养基, 加入新鲜培养基, 再将病毒原液加入细胞中, 轻轻混匀。

- **第三天: 换液**

感染后第二天(约24 小时), 吸去含病毒的培养液, 换上新鲜的完全培养液, 继续37°C培养。

- **第四天: 继续培养**

中途可根据细胞生长状况进行换液, 保持细胞活性。

- **第五天: 结果观察**

感染后72 小时, 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。

**Puromycin 抗性筛选:** Puromycin 标准的施加终浓度范围为1~10 $\mu$ g/ml, 不同细胞Puromycin的工作浓度不同, 请查找相关文献, 另外请设不感染筛选对照(未经过病毒感染的野生型细胞), 加入等量等浓度的Puromycin。

对于携带Puromycin 抗性基因的病毒, 换上含适当浓度的Puromycin 的新鲜完全培养液, 筛选稳定转导的细胞株。每2-3 天换含Puromycin 的完全培养液一次, 至不感染筛选对照组细胞被Puromycin杀光, 然后根据实验需求进行下一步操作。

**注意:** 溶化的慢病毒颗粒要置于冰上。反复冻溶或长时间将病毒颗粒暴露于常温会使病毒效价降低。

## 5 常见问题

### 5.1 什么是MOI?

**MOI:** 中文意思为感染复数, 含义为感染时病毒颗粒数与细胞数量的比值。我们将实验过程中某个细胞感染80%时的病毒数与细胞数的比值定义为该细胞的MOI值。

### 5.2 LV-Assistant有什么用? 在感染时是否需要添加?

LV-Assistant是公司开发的助感染试剂。主要成分为非离子表面活性剂, 它可以通过提高细胞表面活性, 大大增加病毒与细胞的接触面积, 促进病毒更好的感染细胞, 本产品可以显著提高病毒感染效率且对细胞低毒性。除少数细胞生长状态会受LV-Assistant试剂的影响, 大部分细胞在感染时添加LV-Assistant是可以帮助提高感染效率的。

### 5.3 目的细胞可以被感染, 但是GFP表达强度比较低, 这个是因为什么?

目的细胞中GFP 荧光强度取决于感染细胞的病毒数目、细胞状态以及感染的时间等。一般慢病毒的表达高峰为感染后72-96小时, 根据细胞的代谢情况有提前或延迟。

Gene-GFP 融合慢病毒感染细胞后GFP 表达弱, 这是由多个因素引起的:  
**首先, 元件顺序:** Gene-GFP融合表达, GFP处于gene 3' 端, GFP蛋白水平的表达会受到目的基因的大小而变化, 通常接入的基因越大, GFP荧光越弱。  
**其次, 目的基因的功能影响GFP的表达。**对于核定位、膜定位、分泌类的蛋白与GFP融合表达, GFP观察荧光时会受到目的蛋白的功能的影响; 通常在同等基因大小条件下, 无定位趋势的目的gene-GFP融合蛋白的荧光强度要远高于具有定位趋势的基因表达。

#### 5.4 加入慢病毒之后,目的细胞死亡很多,这是为什么?

慢病毒可能对您的细胞有毒性,降低病毒量感染进行观察;感染时细胞状态差导致细胞死亡,调整细胞状态再次感染观察;病毒含有较多杂质,细胞耐受性不好导致死亡,更换批次病毒进行验证。

#### 5.5 为什么过表达慢病毒质粒转染293T的荧光很强而慢病毒感染293T的弱呢?

这是大多数客户都会常问的问题,转染和感染都是在293T中进行的,差异主要原因在于以下几点:

**首先,性质差异;**转染是带有目的基因的质粒DNA在转染试剂作用下强行进入细胞的过程,而感染是慢病毒颗粒和目的细胞相互作用,通过受体结合、细胞吞噬等过程,介导慢病毒基因组进入到细胞中;

**其次,表达环节不同;**转染的DNA进入细胞后,转录为mRNA,之后就可以翻译了;而慢病毒是RNA逆转录病毒,感染细胞后,先逆转录为DNA,再转录为mRNA,然后才是翻译,多了几个步骤;

**最后,拷贝数不同;**转染293T的基因拷贝数可以达到1000以上,而慢病毒感染293T的基因拷贝数大概在10左右,相差了有100倍左右。

## ■ 慢病毒使用注意事项

金唯智提供的慢病毒为复制缺陷型病毒，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。但该病毒仍然具有可能的潜在的生物学危险，我们建议不要使用编码已知或可能会致癌的基因的假型病毒，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。

**慢病毒使用时请参照以下内容进行实验：**

- (1) 病毒操作时请使用生物安全柜！如果使用普通超净工作台，请不要打开风机。
- (2) 进行慢病毒相关实验时请穿实验服，戴口罩和手套。
- (3) 操作病毒时请小心操作。如果超净工作台受到病毒污染，请使用酒精擦拭干净。
- (4) 将废弃的含有病毒的培养基溶液及耗材放进84消毒液中消毒，浸泡24小时后处理。固废也可以进行高温灭菌。
- (5) 实验结束后请用洗手液和水清洗双手。

### 附：实验室常用细胞系慢病毒感染MOI值列表

（不同实验室来源细胞株MOI会有所差别，本列表中数值仅作为实验室参考使用）

细胞名称	物种	细胞中文名	MOI值
5637	人	人膀胱癌细胞株	10
7402	人	人肝癌细胞	10
293T	人	人胚肾上皮细胞	1
5-8F	人	人鼻咽癌细胞株	100
95D	人	人肺巨细胞癌	2
A375	人	人黑色素瘤	10
A498	人	人肾癌细胞	100

细胞名称	物种	细胞中文名	MOI值
A549	人	人肺腺癌	20
A673	人	人横纹肌瘤细胞	10
AGS	人	人胃癌细胞	100
AsPC-1	人	人胰腺癌细胞株	10
BxPc-3	人	人胰腺癌细胞株	20
C666-1	人	人鼻咽癌	10
CFPAC-1	人	人胰腺癌细胞	50
CNE	人	人鼻咽癌细胞	10
CNE1-Y	人	人鼻咽癌细胞	100
COC1	人	人卵巢癌	>100
EC9706	人	人食管癌细胞	10
FL-18	人	人滤泡性淋巴瘤	20
H-125	人	人肺癌细胞	>100
H1299	人	人非小细胞性肺癌细胞	1
H929	人	人多发性骨髓瘤癌症细胞系	100
HaCaT	人	人永生化作表皮细胞	>100
h-BMSC	人	骨髓间充质干细胞	10
HCC-1937	人	人乳腺癌细胞株	50
HCCLM3	人	人肝细胞肝癌细胞系	20
HCT116	人	人结直肠癌细胞	10
HEC-1-A	人	人子宫内膜癌细胞株	1
Hela	人	人宫颈癌细胞株	10
Hep3B	人	人肝癌细胞株	10
HepG2	人	人肝癌细胞	10
Hep-2	人	人喉癌细胞株	10
HL-60	人	人急性髓系白血病细胞株	>100
HLE-B3	人	人晶状体上皮细胞系	1
h-MSC	人	人骨髓间充质干细胞	10
HOS	人	人骨肉瘤细胞系	20
HT-29	人	人结肠癌细胞	10
Huh-7	人	人肝癌细胞系	10
HUVEC-2C	人	人脐静脉血管内皮细胞	10
HUV-EC-C	人	人脐静脉内皮细胞	20

细胞名称	物种	细胞中文名	MOI值
Jurkat	人	人白血病细胞株	50
K562	人	人白血病细胞	20
kasumi	人	人白血病细胞株	10
KB	人	人口腔上皮癌	10
KM3	人	多发性骨髓瘤细胞	100
LOVO	人	人结肠腺癌细胞株	10
LNCAP	人	人前列腺癌细胞	5
MCF-7	人	人乳腺癌细胞株	20
MDA-MB-231	人	人乳腺癌细胞	10
MG-63	人	人成骨肉瘤细胞株	50
MGC-803	人	人胃癌细胞	50
MHCC-97-H	人	高转移性肝癌细胞株	5
MHCC-97-L	人	低转移性肝癌细胞株	5
MKN-28	人	人胃癌细胞株	20
MKN-45	人	人胃低分化腺癌细胞株	20
MRC-5	人	人胚肺成纤维细胞	10
panc-1	人	人胰腺癌细胞	2
PC-3	人	人前列腺癌细胞	20
RKO	人	人结肠癌细胞	2
RPE	人	人视网膜色素上皮细胞	10
Saos-2	人	人骨肉瘤细胞	10
SGC-7901	人	人胃癌细胞	10
SHG-44	人	人脑胶质瘤细胞	10
SK-BR-3	人	乳腺癌腹腔转移癌细胞株	50
SK-OV-3	人	卵巢癌细胞株	2
SMMC-7721	人	人肝癌细胞	10
SW1990	人	人胰腺癌	50
SW480	人	人结肠癌细胞株	10
SW620	人	人结肠癌细胞	100
T24	人	人膀胱癌	5
T-47D	人	人乳腺癌细胞	50
THP-1	人	人单核细胞株	50
U251	人	人脑胶质母细胞瘤	1

细胞名称	物种	细胞中文名	MOI值
U-2OS	人	人骨肉瘤细胞	3
U87	人	人脑星形胶质母细胞瘤	1
U937	人	人单核细胞	20
ZR-75-30	人	人乳腺癌细胞株	20
4T1	小鼠	小鼠乳腺癌细胞	>100
B16	小鼠	小鼠黑色素瘤细胞	>100
Hepa1-6	小鼠	小鼠肝癌细胞	100
JB6	小鼠	小鼠表皮细胞	>100
Lewis	小鼠	小鼠肺癌细胞	20
MDPC-23	小鼠	小鼠成牙本质细胞样细胞	>=100
MFC	小鼠	小鼠乳腺癌	80
MIN-6	小鼠	小鼠胰岛素细胞	100
NIH-3T3	小鼠	小鼠成纤维细胞系	20
Raw264.7	小鼠	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞	10(感染后分化)
BTT	T小鼠	T小鼠膀胱癌细胞	20
CHO	仓鼠	中国仓鼠卵巢细胞	20
BRL	大鼠	大鼠肝细胞	20
BRL-3A	大鼠	大鼠肝细胞	100
C6	大鼠	大鼠脑胶质瘤	>100
GH3	大鼠	垂体腺瘤细胞	100
H9C2	大鼠	大鼠胚胎心肌细胞株的一个亚克隆	20
HSC-T6	大鼠	大鼠肝星形细胞	10
IEC6	大鼠	大鼠肠上皮细胞株	10
MMQ	大鼠	大鼠肺泡巨噬细胞	1
NRK	大鼠	大鼠肾细胞	10
SHZ-88	大鼠	大鼠乳腺癌细胞	20
MV-1-LU	貂	貂肺泡上皮细胞株	10
VERO-E6	猴	非洲绿猴肾细胞	5

Solid science. Superior service.

科学严谨 服务卓越

GENEWIZ | 金唯智中国 苏州·北京·天津·广州·南京  
[www.genewiz.com.cn](http://www.genewiz.com.cn)  
[cell@genewiz.com.cn](mailto:cell@genewiz.com.cn)

**400-8100-669**



金唯智官方微信