# 慢病毒包装实验操作手册

（2022 版）

复百澳生物

## 一、 慢病毒载体简介

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，它对分裂期和非分裂期细胞均具有感染能力，并可以在体内较长期的表达且安全性高。我们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。

公司所用的慢病毒载体是在 Clonetech 公司的慢病毒包装系统上改进而来。包括载体质粒（PFV:PLVX）、辅助质粒 psPAX2（pHelper 1）和辅助质粒 pMD2G（pHelper2）三种质粒组成。载体质粒 PFV 载体中含有 HIV 的基本元件 5’LTR 和 3’LTR 以及其他辅助元件。通常根据不同的实验目的针对载体质粒进行改造来进行启动子活性研究、基因表达研究和 RNA 干扰等研究。pHelper 1 载体中含有 HIV 病毒的 gag 基因，编码病毒主要的结构蛋白；pol 基因，编码病毒特异性的酶；rev 基因，编码调节 gag 和 pol 基因表达的调节因子。pHelper 2 载体中含有单纯疱疹病毒来源的 VSV-G 基因，提供病毒包装所需要的包膜蛋白。

本手册为慢病毒载体的构建和病毒包装的通用操作流程，目的是为了方便大家交流使用，部分细节内容未能做到一一详述，敬请谅解。同时希望大家能够针对手册中的错误和问题，提出宝贵的意见。

## 二、 病毒包装服务流程

## 三、 实验试剂

| 试剂名称 | 试剂来源 | Cat.No. |
|---|---|---|
| DMEM | BI | 06-1055-57-1ACS |
| 胎牛血清 | BI | 04-001-1ACS |
| 转染试剂 | 自制 | FZ0001 |
| Opti-MEM | Gibco | 31985-070 |
| 胰蛋白酶 | Solarbio | T8150 |
| Pourmycin | Solarbio | PB230 |

## 四、 实验设备

| 仪器名称 | 仪器来源 | Cat.No. |
|---|---|---|
| 荧光显微镜 | OPTIKA | N-400LD |
| 二氧化碳培养箱 | Thermo | 311 型 |
| 生物安全柜 | Thermo | ECO 1.2 |
| 超速离心机 | Beckman | XPN-90 |
| 高速离心机 | Thermo | LYN x4000 |

## 五、 细胞株

HEK293T，慢病毒的包装细胞，为贴壁依赖型呈上皮样细胞，生长培养基为DMEM(含 10% FBS)。

## 六、 慢病毒包装实验操作步骤

### 1. 质粒转染与病毒上清收集

1) 转染前 24 h，用胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞，重新接种于 10 cm 细胞培养皿，37 ℃、5% $CO_2$ 培养箱内培养，待细胞密度达 70%～80%时即可用于转染；

2) 转染前 2 h 将更换细胞培养基培养；

3) 向一灭菌离心管中加入所制备的各 DNA 溶液(载体质粒 10 μ g， pHelper 1.0 载体 5μ g， pHelper 2.0 载体 5 μ g)，与相应体积的 Opti-MEM 混合均匀，调整总体积为 0.5 ml，在室温下温育 5 分钟。

4) 取 50 μl 转染试剂与 450μl Opti-MEM 混合，在室温下温育 5 分钟。

5) 把稀释后的 DNA 与稀释后的转染试剂混合，轻轻地颠倒混匀，不要振荡。

6) 混合后，在室温下温育 10 分钟。

7) 将上述转染混合物滴加到 293T 细胞培养液中，摇匀，于 37 ℃, 5% $CO_2$ 细胞培养箱中培养。

8) 培养 6~8 h 后倒去含有转染混和物的培养基，每盘细胞更换新鲜的培养基，37 ℃、5% $CO_2$ 培养箱内继续培养。

9) 转染后 24H，用显微镜观察含标签荧光(GFP/RFP)细胞的数量判定转染效率。

10) 确定转染成功后（荧光细胞比例 ≥70%），进行第一次收毒操作。收集细胞培养基于一个无菌 50ml 离心管中，4℃保存。更换新鲜的培养基，继续培养 24H。

11) 转染后 48H，进行二次收毒操作。 收获含病毒培养基于无菌 50ml 离心管，4℃保存。

2. **慢病毒浓缩与纯化**

1) 将收获的含病毒颗粒的培养基，经过 0.22μm 滤膜过滤并收集于无菌超速离心管中，配平、密封；

2) 超速离心 80,000g,离心 4H；

3) 弃去离心后上清，用 Virus store buffer 重悬沉淀；

4) 收集重悬液，再次经过 0.22um 滤膜过滤除菌，分装于无菌病毒管中；每个病毒管上贴好相应的标签，转于-80℃冰箱保存。

3. **慢病毒质量检测**

1) 物理检测

检测内容为观察病毒颜色、是否存在可见不溶性物质。

2) 无菌检测

将病毒加入 293T 细胞验证，正常培养 24 h 后镜检，无任何细菌及真菌污染情况，同时参照空细胞组，细胞间隙无颗粒存在，培养基澄清透明。

3) 滴度检测

a) 荧光法滴度检测

i. 实验前 24H， 接种 293T 细胞于 96 孔板中，约 $1*10^4$ 个/孔，50ul/孔，于 37℃，5% $CO_2$ 条件下培养;

ii. 实验前在显微镜下，对实验用细胞进行观察，确定细胞饱满、分部均匀、无污染后再进行后续实验。

iii. 病毒梯度稀释：

准备 1 个新的 96 孔板，由上至下分别标记为 10、1、$10^{-1}$、$10^{-2}$；

向每个孔中加入 90ul 的 2% FBS 的 DMEM 培养基；

取病毒原液 10ul 加入到第一个孔中（标记为 10），吹打混匀；

从第一个孔中吸取 10ul 的稀释液加入到第二个孔中（标记为 1），吹打混匀，继续相同的操作，直到稀释至最后一孔（标记 $10^{-2}$）；

iv. 稀释病毒加样

依次从标记标记为 $10^{-2}$ 孔到标记为 1 的稀释孔中，吸取 90ul 病毒缓慢加入含到含有检测细胞的 96 孔培养板中，加样完毕后， 标记好病毒名称、稀释梯度和检测日期。

v. 将检测的 96 孔培养板置于 37℃，5% $CO_2$ 条件下继续培养 72H，期间视培养基的颜色变化，补加培养基一次。

vi. 72H 后再显微镜下观察含有目的病毒标记的细胞数（GFP 或 RFP）计数病毒滴度。

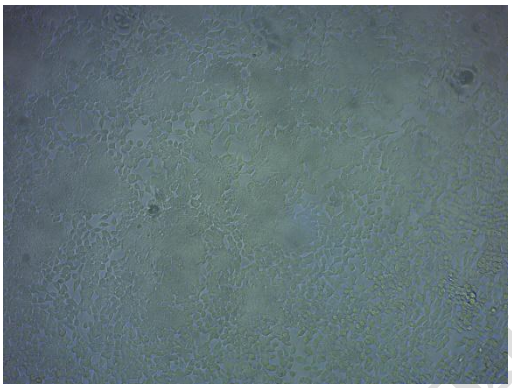
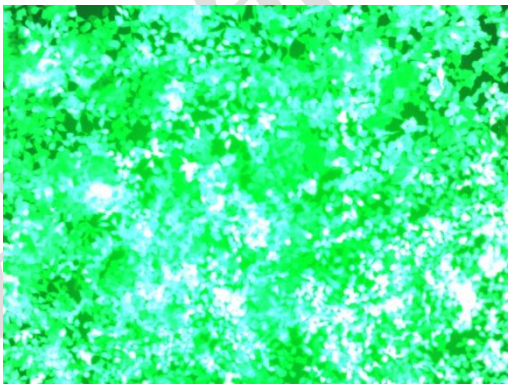
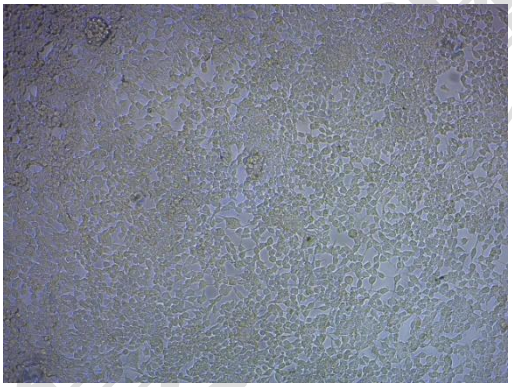
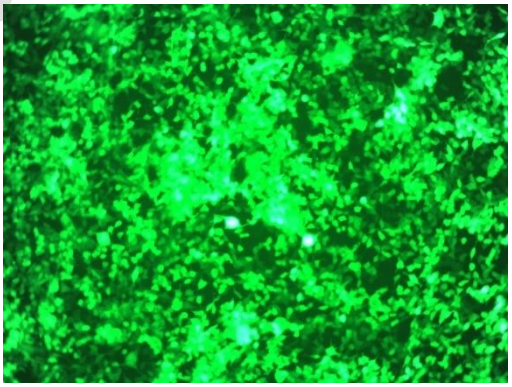
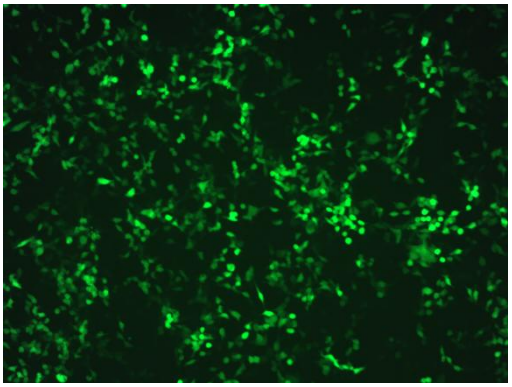
b) 药筛法滴度检测

1-5 步骤同荧光法滴度检测，如果载体带有嘌呤霉素抗性标签，在感染后 48H 加入抗性药物 Puromycin，维持药物浓度为 3μg/ml，继续培养至 72H，进行病毒滴度判定；如果载体带有潮霉素抗性标签，在感染后 72H 加入抗性药物 Hygromycin，维持药物浓度 300μg/ml，继续培养至 96H，进行病毒滴度判定; 如果载体带有杀稻瘟菌素抗性标签，在感染后 48H 加入抗性药物 Bslaticidin，维持药物浓度 20μg/ml，继续培养至 96H，进行病毒滴度判定。

**滴度计算示例 1：**

根据荧光图片中 GFP 表达情况， 以荧光细胞比例仅低于 100%孔的稀释梯度进行计算，并假定每个荧光细胞仅含有一个慢病毒拷贝，对细胞计数每孔细胞数 1E+5 个/孔。 那么，病毒滴度计算公式如下：

**滴度=50%*$10^5$/$10^{-1}$ul=5E+8TU/ml.**

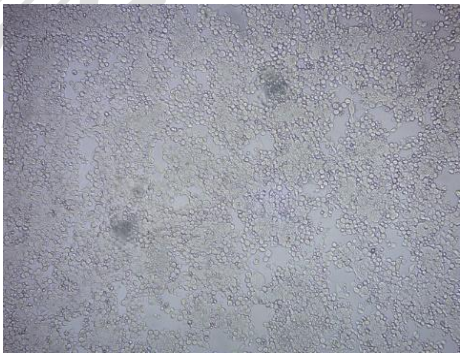
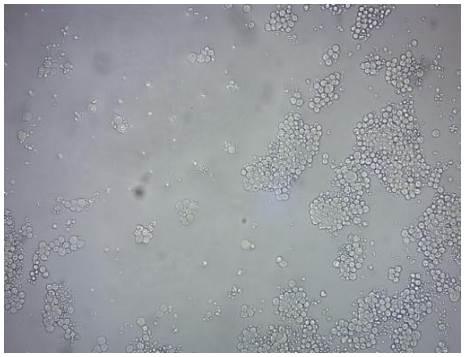
| 体积 | 100x 白光 | 100x 荧光 |
|---|---|---|
| 10ul |  |  |
| 1ul |  |  |
| $10^{-1}$ul | |  |

**滴度计算例 2：**

根据以下药筛图片中 细胞存活的情况， 以存活细胞比例仅低于 100%孔的稀释梯度进行计算，并假定每个存活细胞仅含有一个慢病毒拷贝，对细胞计数每孔细胞数 1E+5 个/孔。此计算方法下，以实验组与对照组细胞之间的比值进行滴度计算，但是要确保对照有细胞死亡 60%以上（对照组死亡越多，实验组的抗药能力越直观）。那么病毒滴度计算公式如下：

**滴度=60%*$10^5$/$10^{-1}$ul=6E+8TU/ml.**

**细胞示例图片：**

| | | |
|---|---|---|
| 病毒体积 | 10ul | 1ul |
| 细胞图片 100X 白光 | | |
| 病毒体积 | $10^{-1}$ul | CON |
| 细胞图片 100X 白光 |  |  |