

# 慢病毒产品使用说明书

(2022 版)

复百澳生物

## 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 VSV-G 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。

1. 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；
2. 适用于建立稳定表达目的基因的细胞株；
3. 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。

## 慢病毒的储存与稀释

收到病毒后请置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 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 $-80^{\circ}\text{C}$ 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 $-80^{\circ}\text{C}$ 。

使用病毒时，请将病毒从 $-80^{\circ}\text{C}$ 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或者加入适量的 1x LV-Enhance 稀释。

公司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  $2 \times 10^8 \text{ TU/ml}$ ，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。

## 慢病毒产品使用方法

### 1. 贴壁类细胞

- 1) 在感染前一天，把目的细胞种植在 96 孔板中，细胞数为  $3-5 \times 10^4$  个细胞/孔，100ul/孔；
- 2) 设计实验组：使用 1x LV-Enhance 将病毒进行稀释，稀释后滴度为  $1 \times 10^8 \text{ TU/ml}$ 、 $1 \times 10^7 \text{ TU/ml}$ 、 $1 \times 10^6 \text{ TU/ml}$ ；

- 3) 混匀后加入到孔板内培养，8-12 小时后观察细胞状态并更换为完全培养基；
- 4) 感染 3-4 天后，观察荧光表达情况（建议预实验使用带有荧光标记的病毒进行）。对于生长缓慢或代谢慢的细胞，可以适当延长感染时间再进行观察，中途可以进行换液，保持细胞的生长活性；
- 5) 通过感染效率，判定目的细胞的最适条件：

**病毒量=MOI x 铺板细胞数 x 1.3/病毒滴度**

注：

- a) 1.3 数值为细胞的生长速度，24 小时细胞数较铺板时的大概比值，细胞不同数值会存在一些差异。
- b) MOI 值也可根据相关文献数据进行实验。

通过预实验我们大概知道了慢病毒的使用条件，根据预实验中计算出的 MOI 值和感染条件进行正式实验。另外在进行正式实验时，细胞铺板浓度一般以 3 天左右长到 90%左右适宜，细胞初始密度根据不同的细胞进行灵活调整。

## 2. 悬浮类细胞

- 1) 保证细胞状态良好，细胞重悬后以每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板中，每孔体积为 90ul，三个重复。
- 2) 设计实验组：使用 1x LV-Enhance 将病毒进行稀释，稀释后滴度为  $1 \times 10^8$ TU/ml、 $1 \times 10^7$ TU/ml、 $1 \times 10^6$ TU/ml。
- 3) 混匀后加入到孔板内培养，8-12 小时后补加新鲜培养基并观察细胞状态。
- 4) 感染 3-4 天后，观察荧光表达情况。对于生长缓慢或代谢慢的细胞，可以适当延长感染时间再进行观察，中途可以进行换液，保持细胞的生长活性。
- 5) 通过感染效率，判定目的细胞的最适条件：

**病毒量=MOI x 铺板细胞数 x 1.3/病毒滴度**

注：

- a) 1.3 数值为细胞的生长速度，24 小时细胞数较铺板时的大概比值，细胞不同数值会存在一些差异。

b) MOI 值也可根据相关文献数据进行实验.

通过预实验我们大概知道了慢病毒的使用条件, 根据预实验中计算出的 MOI 值和感染条件进行正式实验。另外在进行正式实验时, 细胞铺板浓度一般以 3 天左右长到 90% 左右适宜, 细胞初始密度根据不同的细胞进行灵活调整。

## 常见问题

### 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。

### 2. LV-Enhance 有什么用?

LV-Enhance 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。

### 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, 目的基因的功能的影响 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。

### 4. 如何解决过表达慢病毒感染后荧光弱的问题呢? (针对 Gene-GFP 结构)

从慢病毒感染样品的 real time-PCR 检测结果来看，目的基因在 mRNA 水平的表达量较高，但是蛋白水平表达受到基因自身功能的影响，而导致难以观察到 GFP 荧光表达。

建议如下：少量细胞、高 MOI 感染。比如使用 96 well 或者 48 well。新的问题是，为了获得高 GFP 表达的细胞，病毒一定会过量的，而过量的病毒加入，会使得最终的结果的重复性变得很差。

### 5. 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。

### 6. 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：

#### ①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；

#### ②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；

#### ③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

Fubio 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：

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。

进行慢病毒相关实验时请穿实验服，戴口罩和手套。

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。

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。

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
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
细胞名称	物种	细胞中文名	MOI 值
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
Jurkat	人	人白血病细胞株	50
细胞名称	物种	细胞中文名	MOI 值
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
细胞名称	物种	细胞中文名	MOI 值
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
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
细胞名称	物种	细胞中文名	MOI 值
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	大鼠垂体瘤细胞（原代）	20
NR8383	大鼠	大鼠肺泡巨噬细胞	1
细胞名称	物种	细胞中文名	MOI 值
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