

中和抗体假病毒包装实验操作手册

(2022 版)

复百澳生物

一、中和抗体假病毒载体简介

公司利用慢病毒载体系统，构建了包括 2019 新型冠状病毒（SARS-COV-2）和 HIV 等病毒的中和抗体假病毒，其囊膜表面含有目标病毒的糖粘蛋白（Glycoprotein），病毒内包裹绿色荧光蛋白（zsGreen）或荧光素酶（Luciferase）的 RNA 序列。该病毒感染目的细胞 48-72H 后可以通过观察绿色荧光蛋白表达或检测荧光素酶的活性判定感染效率。

中和抗体假病毒包装系统含由载体质粒（PFV:PLVX）、辅助质粒 pHelper 1（psPAX2）和辅助质粒 pHelper 2 三种质粒组成。载体质粒 PFV 载体中含有慢病毒载体基本元件 5'LTR、3'LTR 及用于后续观测和检测的 zsGreen/Luciferase 基因序列。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 载体中含有目标病毒糖粘蛋白（Glycoprotein）基因。

本手册为中和抗体假病毒载体的构建和病毒包装的通用操作流程，目的是为了更方便大家交流使用，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

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, 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、 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 °C、5% CO₂ 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 μg, pHelper 1 载体 5μg, pHelper 2 载体 5 μg), 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 °C, 5% CO₂ 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 °C、5% CO₂ 培养箱内继续培养。
- 9) 转染后 24H，用显微镜观察含标签荧光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°C 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°C 保存。

2. 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°C 冰箱保存。

3. 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

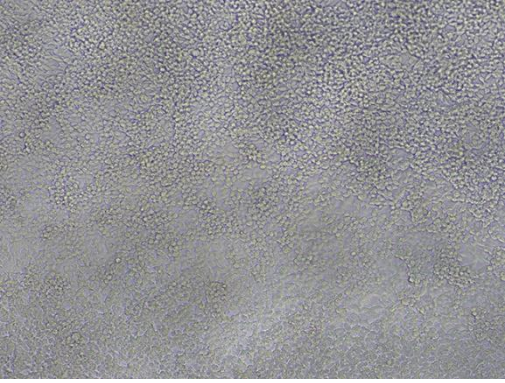
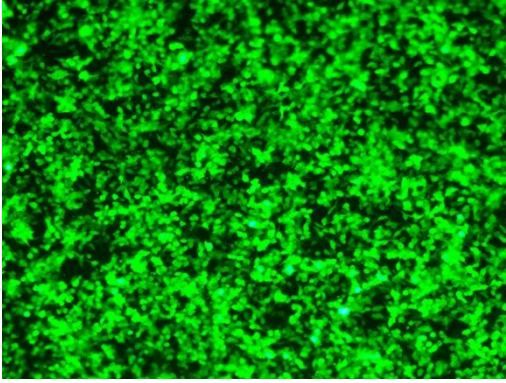
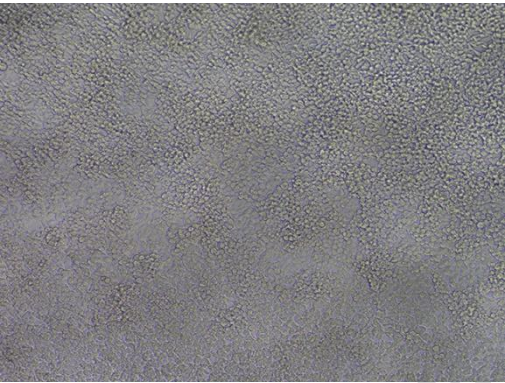
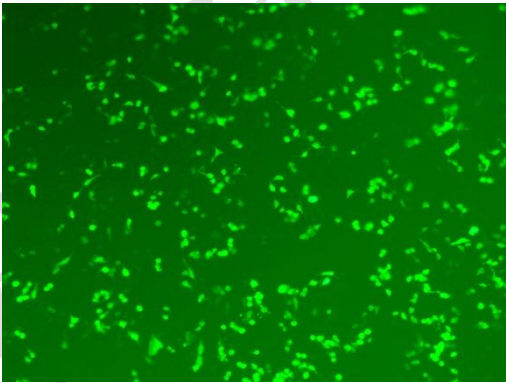
- i. 实验前 24H, 接种含相应病毒受体蛋白的 293T 细胞于 96 孔板中, 约 1×10^4 个/孔, 50ul/孔, 于 37°C , 5% CO_2 条件下培养;
- ii. 实验前在显微镜下, 对实验用细胞进行观察, 确定细胞饱满、分部均匀、无污染后再进行后续实验。
- iii. 病毒梯度稀释:
 准备 1 个新的 96 孔板, 由上至下分别标记为 10、1、 10^{-1} ;
 向每个孔中加入 90ul 的 2% FBS 的 DMEM 培养基;
 取病毒原液 10ul 加入到第一个孔中 (标记为 10), 吹打混匀;
 从第一个孔中吸取 10ul 的稀释液加入到第二个孔中 (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^{-1});
- iv. 稀释病毒加样
 依次从标记标记为 10^{-1} 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°C , 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计数病毒滴度。

滴度计算示例:

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 $1\text{E}+5$ 个/孔。那么, 病毒滴度计算公式如下:

$$\text{滴度} = 10\% * 10^5 / 1\text{ul} = 1\text{E}+7\text{TU/ml}.$$

体积	100x 白光	100x 荧光
----	---------	---------

10ul		
1ul		
10 ⁻¹ ul	