

# 和元公司慢病毒使用说明书

2013年(第三版)

## 一、慢病毒的储存与稀释:

1. 病毒的储存: 收到病毒液后检查病毒液是否溶解并将其保存于-80°C。

① 病毒可以存放于-80°C 6个月以上;但如果病毒储存时间超过6个月,建议在使用前重新测定病毒滴度。

② 反复冻融会降低病毒滴度,因此在病毒使用过程中应尽量避免反复冻融。为避免反复冻融,建议病毒第一次使用后,按照每次的使用量进行分装。

2. 病毒的稀释: 如果需要稀释病毒,请将病毒取出,并置于冰浴融解后,使用PBS(细胞培养级)或培养目的细胞的无血清培养基。混匀分装后4°C保存(请尽量在3天内用完)分装后使用。

## 二、MOI介绍:

MOI: 一般认为MOI是一个比值,没有单位,其隐含的单位是:病毒有效颗粒数/cell。也就是说平均感染每个细胞所使用的病毒颗粒数。

根据我们实验报告中提供的测定好的慢病毒的滴度(TU/ml),再根据MOI值(达到理想感染效果时病毒数与细胞数目的比例)和预感染的细胞数目(N),这样病毒液的用量就很容易计算了。

即: 所需病毒液的量(ml) = MOI \* N / 慢病毒滴度

## 三、慢病毒用于体外(In Vitro)实验:

感染原代细胞和细胞系。慢病毒对各种细胞和组织的亲嗜性不同,在使用慢病毒之前可以通过查阅相关文献,了解慢病毒对您的目的细胞的亲嗜性,MOI值以及在体内(In Vivo)注射所需要的病毒量。如果没有相关文献支持,可以通过感染预实验得到合适的MOI值(使用24孔板检测病毒对目的细胞的亲嗜性)。

### 慢病毒感染目的细胞预实验(MOI预实验):

1. 慢病毒感染目的细胞预实验注意事项:

① 测定慢病毒对目的细胞的亲嗜性时,需要同时设置对慢病毒亲嗜性较高的细胞(HEK293, 293T, HeLa)作为平行实验的对照细胞。

② 在进行慢病毒感染实验时,可以用完全培养基(培养目的细胞用)稀释;理论上,含有血清,双抗或者其他营养因子的完全培养基不影响慢病毒的感染效率。

③ 一般慢病毒单位为TU/ml,即每毫升中含有具有生物活性的病毒颗粒数。如:病毒滴度为 $>1 \times 10^8$  TU/ml 即每毫升病毒液中至少含有 $1 \times 10^8$ 个具有生物活性的慢病毒颗粒。

2. 以 24 孔培养板为例,进行目的细胞和 293T 细胞的感染预实验前,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。

第 1 天,准备细胞:在 24 孔培养板接种若干孔(根据实验安排所需),每个孔内接种  $3\sim 5\times 10^4$  个目的细胞,铺板时细胞的融合率为 30%左右,每孔培养基体积为 500  $\mu\text{l}$ ;进行病毒感染时细胞的融合度约为 30-50%左右。

第 2 天,准备病毒:取出 4°C 保存的病毒,使用掌上离心机离心 20 秒(使病毒液聚集到管底);如果是保存在 -80°C 的病毒需要先在冰上或者 4°C 融化后使用。亦可以根据实验室的实际情况将按照 MOI 准确计算好的慢病毒稀释到培养基中,并尽可能保证所获得的含有慢病毒的培养基的总体积为最小体积,以期获得最佳的感染效率。

第 2 天,感染目的细胞:病毒准备好之后,从培养箱中拿出细胞,首先观察细胞生长状态,如细胞状态较好则开始实验。

- a. 使用移液器吸取准确体积的病毒液加入准备好的培养基。
- b. 吸去培养皿中的培养基(如果细胞生长良好,密度适宜,则不用换液)。
- c. 在目的细胞和对照细胞中分别加入计算好的病毒液。
- d. 混匀后放于二氧化碳培养箱(37°C、5%CO<sub>2</sub>) 孵育过夜。

注:感染前细胞的状态好坏对最终的感染效果高低影响较大,所以务必保证加病毒之前细胞处于良好的生长状态。亦可以将预先准备好的培养基和慢病毒的混合液直接加入培养器皿中。慢病毒对目的细胞的感染效率较低,通过提高 MOI 值可以提高病毒的感染效率,但是当 MOI 高于 20 时,我们建议在培养基中加入 ploybrene (1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  左右) 来提高病毒的感染效率。Ploybrene 对神经元(neurons)、树突细胞(dendritic cells, DC)等一些细胞有毒害作用,加之前查阅相关文献确认。

第 3 天,更换培养液:一般在 12-20 小时候后将含有慢病毒的培养液更换成正常培养液;在感染后观察细胞状态,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 4 小时后,更换新鲜培养基。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 6 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;如果由于目的基因较大而造成选择的载体不能携带 Marker Gene 的,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:

有些慢病毒载体上带有 GFP 绿色荧光蛋白,使用者可以在病毒感染 72-96 小时后用倒置荧光显微镜观察 GFP 绿色荧光,以观察病毒对目的细胞的感染情况。如果慢病毒载体携带其他 Marker Gene 如 RFP\BFP 可以用荧光显微镜在对应的激发光波长下观察荧光表达的情况。

慢病毒表达时间较慢,荧光表达所需时间较长,建议感染后 72-96 小时后观测荧光表达。

感染后的细胞可以连续培养一周,通过观察荧光的表达时间和表达强度来确定慢病毒对目的细胞的感染情况。感染期间请根据细胞生长的情况对细胞进行及时换液,以保证细胞良

好的生长状态。

#### 四、悬浮细胞感染方法概要：

1. 根据细胞的量将细胞在 1.5ml 管中离心收集然后用 100-200ul 的无血清培养液稀释细胞沉淀，以细胞完全浸没在培养基中为准。
2. 按照 MOI 换算病毒颗粒数量，吸取病毒液加入细胞中，将 1.5ml 管放在 37℃ 培养箱中孵育 30 分钟。
3. 将管中混合溶液吸出加到培养皿中或孔里。
4. 加入足够量的新鲜培养液。
5. 12 小时后换液。
6. 96 小时后观察细胞感染效率。

#### 五、慢病毒使用安全使用规范

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，属于假型病毒因此没有毒性作用。但该病毒仍然具有可能的潜在的生物学危险，不建议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。使用时请参照如下所示进行实验：

1. 病毒操作时最好使用生物安全柜。如果使用普通超净工作台操作病毒，请不要打开排风机。
2. 病毒操作时请穿实验服，戴口罩和手套。
3. 操作病毒时特别小心不要产生气雾或飞溅。如果操作时超净工作台有病毒污染，请立即用 75%乙醇加 1%的 SDS 溶液擦拭干净。接触过病毒的枪头，离心管，培养板，培养液请于高压灭菌或 84 消毒液或 1%SDS 中浸泡过夜后弃去。
4. 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。离开显微镜实验台之前，用 75%乙醇清理显微镜实验台。
5. 如需要离心，应使用密封性好的离心管，或者用封口膜封口后离心，而且尽量使用组织培养室内的离心机。
6. 实验结束脱掉手套后，用肥皂和水清洗双手。