



百恩维生物

Biowit Technologies

专注 创新 诚信 和谐



慢病毒操作手册

仅供参考

深圳市百恩维生物科技有限公司

目录

一、慢病毒载体系统	3
二、慢病毒的优点	4
三、293T (Biowit 货号: C0002) 细胞培养	4
1. 293T 细胞培养特性	4
2. 293T 细胞完全培养液	5
3. 293T 细胞的复苏	5
4. 293T 细胞的传代	5
5. 293T 细胞的冻存	6
四、慢病毒包装	7
1. HET(Biowit 产品号: BW11002)转染 293T 细胞	7
五、慢病毒滴度测定 (荧光法)	8
六、慢病毒感染目的细胞预实验	9
七、慢病毒的储存、稀释	10
八、使用安全注意事项	11
九、慢病毒操作注意事项	11
附录	12

一、慢病毒载体系统

慢病毒(*Lentivirus*)属于逆转录病毒科(*Retroviridae*), 为 RNA 病毒, 如人免疫缺陷病毒(HIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、猿免疫缺陷病毒(SIV)、牛免疫缺陷病毒等。由于对 HIV-1 的研究最广泛最深入, 对其生物学特性最为了解, 因此 HIV-1 来源的慢病毒载体已成为其中的代表。

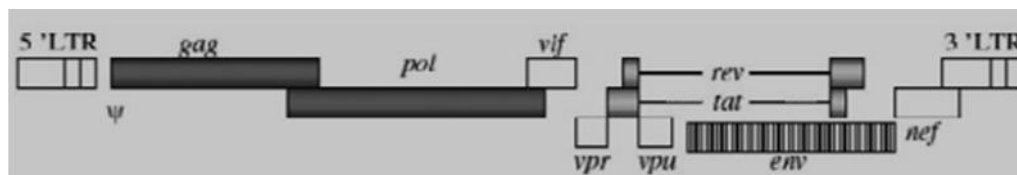


图 1 HIV-1 RNA 结构图

HIV-1 为双链 RNA 病毒, 共有 9 个基因, 如图 1 所示。gag、pol、env 3 个基因编码病毒的基本结构, tat、rev 为调节基因, vif、vpr、vpu、nef 4 个为辅助基因。其中, gag 基因编码病毒的核心蛋白, 包括基质蛋白、衣壳蛋白、核衣壳蛋白; pol 基因编码病毒复制所需的酶, 如反转录酶、整合酶、蛋白酶, env 基因编码病毒的包膜糖蛋白, 决定病毒感染宿主的靶向性。rev 编码的蛋白调节 gag、pol、env 的表达水平, tat 编码的蛋白参与 RNA 转录的控制。4 个辅助基因编码的蛋白则作为毒力因子参与宿主细胞的识别和感染。两端为长末端重复序列 (LTR), 内含复制所需的顺式作用元件, 如包装信号元件 Ψ 。

第一代慢病毒载体系统是以三质粒系统为代表, 该系统由包装质粒、包膜质粒及载体质粒 3 种质粒组成。包装质粒是 HIV-1 前病毒基因组 5'端 LTR 由巨细胞病毒早期启动子取代, 3'LTR 由 SV40 polyA 序列取代。包装成分分别构建在两个质粒上, 一个表达 gag 和 pol, 另一个表达 env。载体质粒携带了 5'端 LTR, 和全部 5'端非翻译区域, 另外还带有 rev 应答元件 (RRE)。包膜表达质粒使用水疱性口炎病毒糖蛋白 G 基因(VSV-G)用来代替了原病毒的 env 基因。

第二代慢病毒载体系统是在第一代的基础上进行改进, 在包装质粒中删除了 HIV 的所有辅助基因 (vif、vpr、vpu 和 nef 基因)。这些附属基因的去除并不影响病毒的滴度和感染能力, 同时增加了载体的安全性。

第三代慢病毒载体系统由四质粒代替原有的三质粒包装系统。将 Rev 基因单独放在一个包装质粒上。同时又增加了两个安全特性: 一是构建自身失活的慢病

毒载体，即删除了 U3 区的 3'LTR，使载体失去 HIV-1 增强子及启动子序列，即使存在所有的病毒蛋白也不能转录出 RNA；二是去除了 tat 基因，用异源启动子序列代替，这样原始的 HIV-1 基因组中的 9 个慢病毒载体中只保留了 3 个(gag、pol 和 rev)。因此第三代慢病毒载体系统更加安全。

百恩维生物用的就是第三代四质粒包装系统，安全可靠。

二、慢病毒的优点

1 宿主范围广 包装病毒时用 VSV-G 基因代替了原病毒的 env 基因，宿主范围更广，如神经元细胞、肝细胞、心肌细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、干细胞等多种类型的细胞。

2 感染能力强 慢病毒载体对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力，能感染绝大多数细胞，对一些难于转染的细胞，比如神经元细胞、干细胞或其它原代细胞有较好的感染效率。

3 具有整合能力 慢病毒载体可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上，从而达到持久性表达，因此可用于构建稳定表达目的蛋白/RNAi 的细胞株，也可以用于制备转基因动物。

三、293T（Biowit 货号：C0002）细胞培养

1. 293T 细胞培养特性

1.1 来源于 Biowit 公司的 293T 细胞（Biowit 货号：C0002）中插入了 SV40 T-抗原的温度敏感基因，具有易使用和易转染的特性。该细胞株对于高密度很敏感，当细胞超过 70%汇合时，一些细胞可能会丢失它们的表型。若细胞密度持续在 70%以下，293T 细胞则能连续培养 1~2 个月维持原有的细胞特性。

1.2 293T 细胞形态：呈成纤维细胞样并在培养瓶中贴壁形成单层细胞。

2. 293T 细胞完全培养液

DMEM +10%FBS +1% Pen-Strep。

3. 293T 细胞的复苏

3.1 把 293T 细胞从液氮中快速取出，并迅速放入 37℃ 水浴中快速晃动，使其在 1-2min 内完全融化。

3.2 在超净台内，用 70%乙醇将冻存管的盖沿擦拭干净。

3.3 将细胞转入 15 mL 无菌离心管中，加入 10 mL 完全培养基(预热)，1000 rpm 离心 4 分钟使细胞沉淀，弃上清，沉淀用 2mL 完全培养基重悬，把重悬液转入包含 12mL 完全培养基的 T75 培养瓶中培养。

3.4 放入 5% CO₂，37℃ 二氧化碳培养箱内培养。第二天观察细胞生长状态并进行换液。

3.5 每天进行细胞状态观察直至细胞汇合度在 80%-90%之间。

4. 293T 细胞的传代

细胞生长达到 80%-90%汇合度即可传代，不可生长过密。

4.1 在水浴锅中预热完全培养基、1×PBS、0.25%胰酶-0.04%EDTA，预热 20min 即可。

4.2 待细胞生长达到 80-90%汇合度时进行传代，轻轻的移除细胞上清培养液。

4.3 加入 1×PBS (T75 培养瓶加 6mL，T25 培养瓶加入 3mL)，轻轻的清洗细胞表面。

4.4 重复 4.3 步骤 2 次。

4.5 加入 0.25% 胰酶-0.04%EDTA (一般 T75 培养瓶加 2mL，T25 培养瓶加入 1mL)，轻轻的上下摇晃，室温下孵育直至 80%的细胞脱壁变圆。

注意：避免 0.25%胰酶-0.04%EDTA 加入时间过长，293T 细胞在 0.25%胰酶-0.04%EDTA 作用下，在 2min 之内能脱壁变圆。)

4.6 立即加入完全培养基终止细胞消化 (一般 T75 培养瓶加入 5mL，T25 加

入 3mL)。轻轻用吸管吹打细胞，使细胞完全脱落培养瓶。

注意：吹打细胞时，应轻轻的吹打细胞，勿大力吹打细胞以免细胞死亡。

4.7 把细胞转移至 15 mL 离心管中，1000 rpm 离心 4 分钟使细胞沉淀，弃上清，沉淀用 2 mL 完全培养基重悬，按照比例接入培养瓶中培养，补加培养基至培养瓶。（T75 培养瓶补至 15 mL，T25 培养瓶补至 6 mL。）

注意：293T 细胞传代比例在 1:2-1:10 之间。

4.8 放入 5% CO₂，37℃ 二氧化碳培养箱内培养。

5. 293T 细胞的冻存

建立细胞库时必须使培养的细胞汇合率低于 50%，以保证亚克隆的特定表型。

5.1 使完全培养基、1×PBS、0.25%胰酶-0.04% EDTA 平衡至室温。

5.2 轻轻的移除细胞上清培养液，加入 1×PBS（T75 培养瓶加 6 mL，T25 培养瓶加入 3mL），轻轻的清洗细胞表面。

5.3 重复 5.2 步骤 2 次。

5.4 加入 0.25%胰酶-0.04%EDTA（一般 T75 培养瓶加 2 mL，T25 培养瓶加入 1 mL），轻轻的上下摇晃，室温下孵育直至 80%的细胞脱壁变圆。

注意：避免 0.25%胰酶-0.04%EDTA 加入时间过长，293T 细胞在 0.25%胰酶-0.04%EDTA 作用下，在 2min 之内能脱壁变圆。

5.5 立即加入完全培养基终止细胞消化（一般 T75 培养瓶加入 5 mL，T25 加入 3 mL）。轻轻用吸管吹打细胞，使细胞完全脱落培养瓶。

注意：吹打细胞时，应轻轻的吹打细胞，勿大力吹打细胞以免细胞死亡。

5.6 把细胞悬液转移至 15mL 离心管中，1000 rpm 离心 4 分钟使细胞沉淀，弃上清，沉淀用适量的冻存液重悬，按照比例分装冻存管中，将冻存管放入冻存盒中，-80℃储存 24h。

注意：冻存液配制后应预冷至 4℃再使用。

5.7 第二天将冻存的细胞转入液氮罐中长期保存。

四、慢病毒包装

1. HET(Biowit 产品号: BW11002)转染 293T 细胞

- 1) 在转染的前一天，传代准备细胞：用 0.25%胰蛋白酶消化 293T 细胞，以含 10%血清的 DMEM 培养基调整细胞密度后，按照每 10cm 细胞培养皿接种 $6 \sim 8 \times 10^6$ cells 到 10cm 细胞培养皿中，置于 37℃，5% CO₂ 培养箱培养，16h~24h 后待细胞密度生长到 80%~90%时即可用于转染。
- 2) 第二天，在转染前 2~4h，用 5ml 不含 P/S 的完全培养基换液（DMEM+10% FBS）。
- 3) 按照以下实验步骤来进行转染：[请参考 HET 转染试剂盒说明书](#)

A、加入 500ul HET Buffer A 到一支洁净的 1.5ml EP 管中（可标记为 A 管）

B、在另一支洁净的 1.5ml EP 管中（可标记为 B 管），加入以下试剂，终体系为 500ul

试剂名称	试剂数量
载体质粒	5ul(1.0ug/ul)
包装质粒	15ul(1.0ug/ul)
HET Buffer B	50ul
ddH ₂ O	420ul

C、将 B 管中的 DNA 混合液缓缓逐滴加入到 A 管中，用移液器轻轻混匀 10min。

D、将混匀后的混合物室温静置 30min，然后将混合物逐滴均匀加入到 10cm 细胞培养皿中，轻微混匀。置于 37℃，5% CO₂ 培养箱中培养。

4) 第三天，即培养 12h~16h 后弃去培养基，用 10ml 新鲜的完全培养基换液（DMEM+10% FBS+P/S）。

5) 第四天，即换液后 24h，收集上清液，置于 4℃冰箱保存，然后加入 10ml 新鲜的完全培养基（DMEM+10% FBS+P/S）至 10cm 细胞培养皿中，置于 37℃，5% CO₂ 培养箱继续培养。

6) 第五天：再一次收集上清，与第一次收集的上清液混合，1000rpm 离心 5min，

弃去细胞碎片，上清液以 0.45 μm PVDF 滤器过滤至 50ml 圆底离心管中。

7) 4℃，50000g 高速离心 2h，离心后可用记号笔对病毒沉淀做好标记。

8) 小心弃去上清，晾干，按 200ul /10cm 培养皿的量加入 DMEM（不含血清、双抗）或者 PBS 重悬病毒沉淀，室温静置 2h，然后用移液器轻轻地吹匀（避免产生气泡），继续室温放置 30min，按每次使用的病毒量分装到洁净的 1.5ml EP 管中，-80℃ 冰箱保存。

五、慢病毒滴度测定（荧光法）

1. 在滴度测定的前一天取一块 48 孔板，按照每孔 3×10^4 cells 的密度接种 HEK 293 细胞。
2. 加 polybrene 到新鲜的完全培养基中（DMEM+10% FBS+P/S），使其终浓度为 8ug/ml。
3. 用含有 polybrene 的完全培养基 10 倍梯度稀释病毒，具体做法如下：取一个 96 孔板，每孔含有 90ul 培养基，第一个孔加入 10ul 待测病毒原液，混匀后吸取 10ul 病毒混合液至第二个孔（混匀时尽量不要产生气泡），如此稀释至第六个孔（即稀释 10^5 倍）。

Titer	1ul	0.1 ul	0.01 ul	0.001 ul	0.0001 ul
Virus Stock	5 or 10	10	10	10	10
Medium with 8ug/ml polybrene	45 or 90	90	90	90	90
Load volume	10	10	10	10	10

4. 各吸取 10ul 病毒稀释液到相对应的 48 孔板中，置于 37℃，5% CO₂ 培养箱培养过夜，16h~24h 后用新鲜的完全培养基换液（DMEM+10% FBS+P/S）。
5. 置于 37℃，5% CO₂ 培养箱培养 48h 后，用荧光显微镜计数荧光细胞数量（如果观察不清晰可以先用 PBS（pH7.4）换液后再进行观察）。一般情况下，在最高稀梯度 10^m 的孔数出现 N（N<10）个带荧光的细胞，则病毒滴度为 $N \times 10^m \text{ TU/ul}$ （ 10^m 为稀释倍数），即病毒滴度为 $N \times 10^{m+3} \text{ TU/ml}$ ，若 $N > 10$ ，则需要继续稀释。

六、慢病毒感染目的细胞预实验

感染培养原代细胞和建系细胞。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，感染复数（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感染复数（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：

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(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 1×10^8 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。

(1) 第一天，准备细胞：在 24 孔培养板接种若干孔，每个孔内接种 $3 \sim 5 \times 10^4$ 个目的细胞，每孔培养基体积为 100 μ l；进行病毒感染时细胞的融合度约为 50~60%左右。

(2) 第二天，准备病毒：取出 4℃ 保存的病毒，使用台式离心机离心 20 秒（使病毒完全悬于离心管底部即可）；如果是冻存在 -80℃ 的病毒需要先在冰上融化后使用。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。

(3) 第二天，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，如细胞状态较好则可以开始实验。

- 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 吸去培养器皿中的培养基（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℃、5% CO₂）孵育过夜。

注意：感染前细胞的状态好坏对最终的感染效果高低影响很大，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 polybrene（8μg/ml 左右）来提高病毒的感染效率。

(4) 第三天，更换培养液：一般在 24 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，可以最短在加病毒 4 小时候更换新鲜培养液后继续培养（建议在 8-12 小时更换为宜）。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。

(5) 感染 48~72 小时候，进行感染效率检测：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 PCR 检测目的基因的表达来评估感染效率。

七、慢病毒的储存、稀释

1. 病毒的储存：收到病毒液后在很短时间内即使用慢病毒进行实验，可以将病毒暂时放置于 4℃ 保存；如需长期保存请放置于 -80℃（病毒置于冻存管，并使用封口膜封口）。

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

② 反复冻融会降低病毒滴度：每次冻融会降低病毒滴度 10%；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，建议收到病毒后按照每次的

使用量进行分装。

2. 病毒的稀释：如果需要稀释病毒，请将病毒取出置于冰浴融解后，使用 PBS 缓冲液或培养目的细胞无血清培养基(含血清或含双抗不影响病毒感染)。混匀分装后 4℃ 保存(请尽量在三天内用完) 分装后使用。

八、使用安全注意事项

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 70%乙醇加 1% 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 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 70%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. 脱掉手套后，用肥皂和水清洗双手。

九、慢病毒操作注意事项

1. 需要使用去内毒素的质粒抽提试剂盒来抽提质粒，而且质粒 OD260/OD280 的比值在 1.8~2.0 之间。
2. 细胞生长状态对于病毒包装至关重要，因此需要保证良好的细胞生长状态和较少的细胞传代次数，细胞代数不要超过 20 代。
3. 在质粒转染时细胞培养基里面不要添加抗生素（如 P/S、G418 等）。
4. 病毒包装试剂盒应与 HET 高效转染试剂盒配套使用才能达到最佳的病毒包装效率；一般来说包装基因过表达的慢病毒其生物学滴度能够达到 $10^7 \sim$

10^8 TU/ml，而包装 RNAi 的慢病毒其生物学滴度能够达到 $10^8 \sim 10^9$ TU/mL。

5. 病毒切勿反复冻融，冻融次数尽量不要超过 3 次，每冻融一次大约有 10% 左右的病毒损失，应按每次使用的病毒量来分装然后冻存于 -80 度冻箱，保存时间尽量不要超过 6 个月。

附录

1. MOI 值：MOI 是 multiplicity of infection 的缩写，中文译为感染复数，实际的含义即为每个细胞被多少个有活力病毒所感染。各种细胞的最适 MOI 值有差别，请客户正式实验前先进行预实验摸索最适 MOI。

2. 细胞培养器皿的相关参数：

Flask/Dish	Surface (mm ²)	Cell seeding number	Media Volume
96 well plate	50	$0.5 \sim 1.0 \times 10^4$	100 μ l
48 well plate	100	$3.0 \sim 5.0 \times 10^4$	200 μ l
24 well plate	200	$5.0 \sim 7.0 \times 10^4$	500 μ l
12 well plate	401	$1.0 \sim 2.0 \times 10^5$	1.0 ml
6 well plate	962	5.0×10^5	2.0 ml
35mm	962	5.0×10^5	2.0 ml
60mm	2827	1.0×10^6	6.0 ml
100mm	7854	$4.0 \sim 6.0 \times 10^6$	10.0 ml

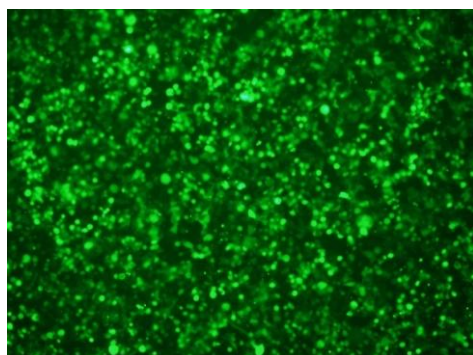
3. 百恩维生物推荐的慢病毒感染细胞系参数（仅供参考）：

慢病毒感染细胞系参数表

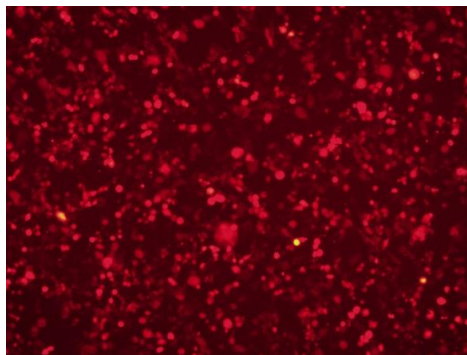
细胞名称	细胞类型及来源	MOI 参考值
293T	人胚胎肾细胞	1-5
SMMC-7721	人肝癌细胞	1-5
U251	人胶质瘤细胞	1-5
HLE-B3	人晶状体上皮细胞	1-5
H9c2(2-1)	大鼠心肌细胞	1-5
hFOB1.19	永生化人成骨细胞	2-10
95D	人高转移肺腺癌细胞	3-10

HSC-T6	永生化大鼠肝星型细胞	3-10
SKOV-3	人卵巢癌细胞	3-10
HUVEC	人脐静脉内皮细胞	5-10
U-20S	人骨癌细胞	5-10
HEC-1A	人子宫内膜癌细胞	5-10
MCF-7	人乳腺癌细胞	5-10
SGC-7901	人胃癌细胞	5-10
MDA-MB-231	人乳腺癌细胞	10-15
SHG-44	人胶质瘤细胞	10-15
SPC-A-1	人肺腺癌细胞	10-15
HepG-2	人喉表皮样癌细胞	20-30
SaoS-2	人成骨肉瘤细胞	20-30
CNE-1	人鼻咽癌细胞（高分化）	50-80
HL-60	人骨髓细胞白血病细胞	50-80
U937	人组织细胞淋巴瘤细胞	50-80
hMSC	人骨髓间充质干细胞	50-80
hSMC	人平滑肌细胞	50-80
hADSC	人脂肪干细胞	>100
PC-3	人前列腺癌细胞	>100
THP-1	人单核细胞	>100
Jurkat	人白血病细胞	>100

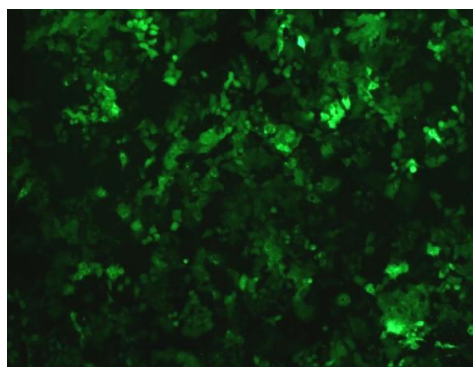
4. Biowit 慢病毒感染细胞实例：



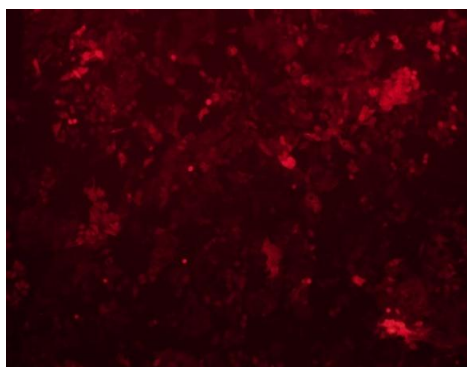
HEK293 细胞



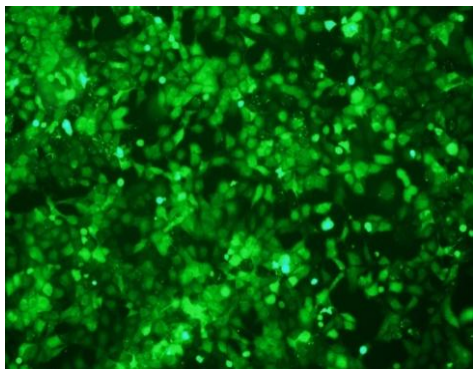
HEK293 细胞（tdTomato）



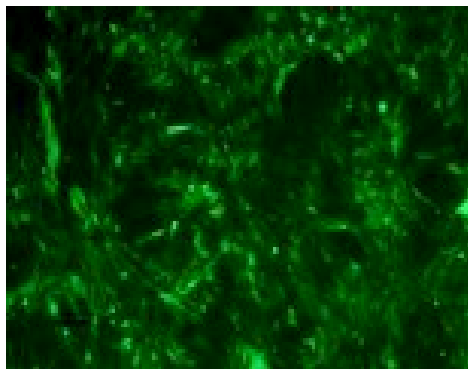
A549 细胞



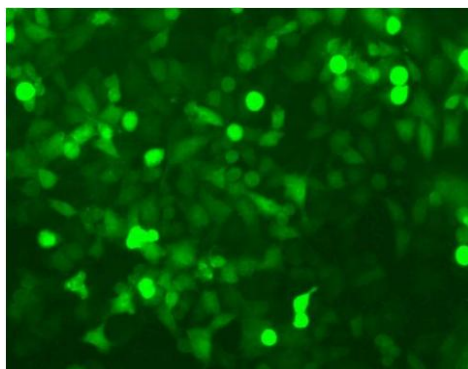
A549 细胞（tdTomato）



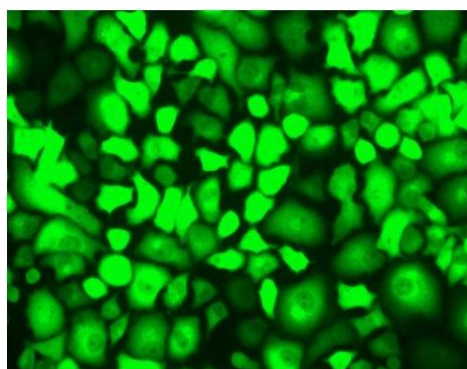
MCF-7 细胞



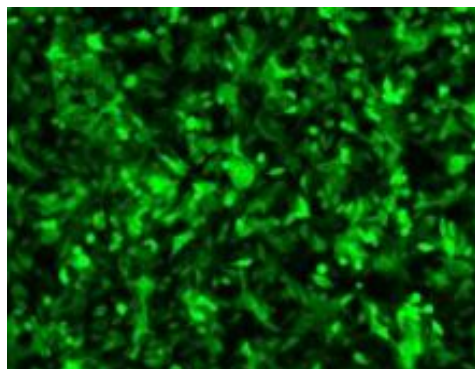
H9C2 细胞



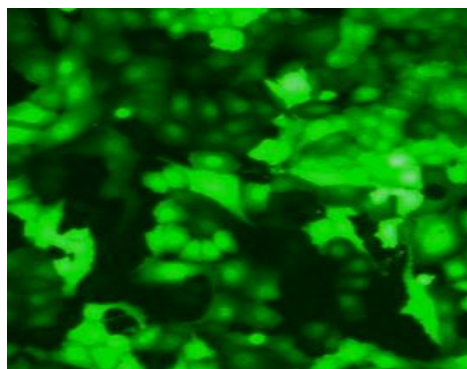
MGC-803



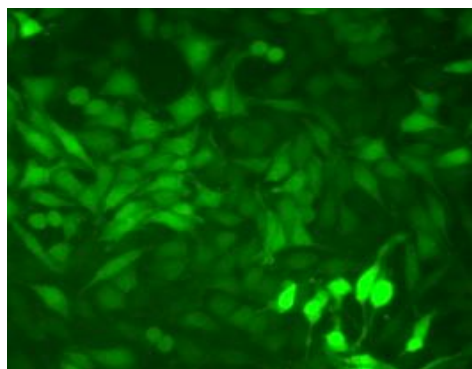
CNE2 细胞



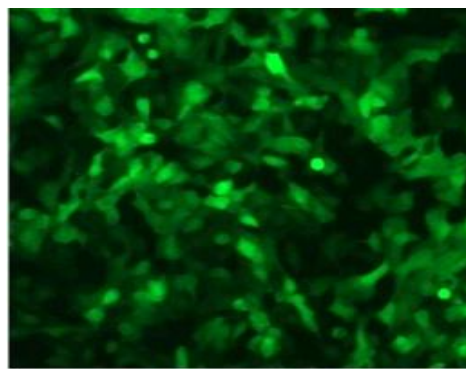
SW620 细胞



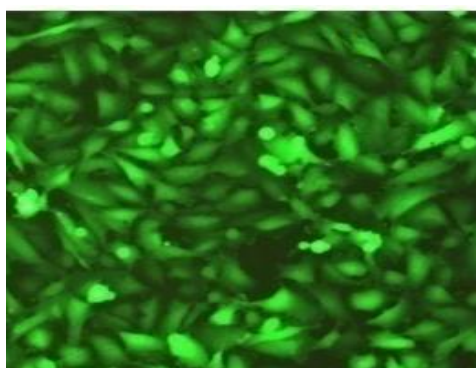
Hep G2



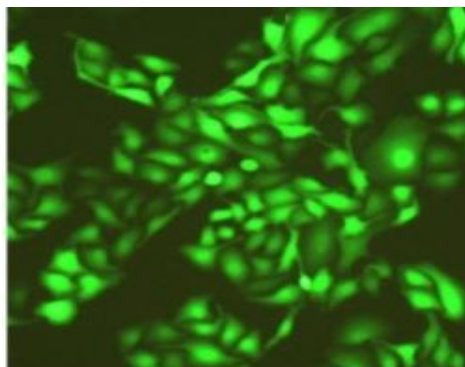
MKN-28



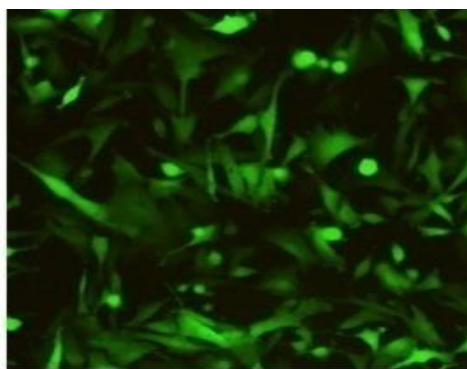
5637 细胞



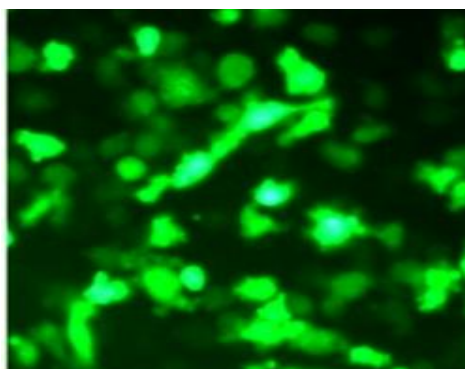
U-251 细胞



Hela 细胞



U-87 细胞



THP-1 细胞