

慢病毒包装 技术手册

LENTIVIRUS PACKAGE TECHNICAL MANUAL

技术引领医学转化 专业创造行业口碑

广州奥科生物医学科技有限公司

目录

一、技术背景.....	2
二、生物安全.....	2
2.1 安全性.....	2
2.2 实验室安全措施.....	3
三、流程描述.....	3
四、材料与仪器.....	3
4.1 实验材料.....	3
4.1.1 细胞株.....	3
4.1.2 质粒.....	4
4.1.3 试剂.....	4
4.2 实验耗材及仪器.....	4
4.2.1 耗材.....	4
4.2.2 仪器.....	4
五、具体步骤.....	4
5.1 细胞培养.....	4
5.1.1 活细胞计数.....	4
5.1.2 细胞株的冻存.....	4
5.1.3 细胞复苏.....	4
5.1.4 细胞传代.....	5
5.2 病毒包装.....	5
5.3 病毒收集.....	6
5.4 病毒滴度检测.....	6
六、使用方法.....	6
6.1 病毒滴度复核(有限稀释法测定).....	7
6.2 靶细胞感染预实验.....	8
6.3 最小致死浓度筛选.....	8
6.4 正式实验.....	9
七、运输和储存.....	9
八、常见问题及解决方案.....	9
九、成功案例介绍.....	10
9.1 贴壁细胞案例.....	10
9.1.1 实验材料与方法.....	10

9.1.2 实验材料及试剂.....	10
9.1.3 实验步骤.....	11
9.2 悬浮细胞案例.....	11
9.2.1 实验材料与方法.....	11
9.2.2 实验材料及试剂.....	11
9.2.3 实验步骤.....	11
十、附录.....	13
10.1 常见细胞慢病毒感染推荐参数.....	13
10.2 常用的培养器皿.....	14

慢病毒包装技术

一、技术背景

慢病毒载体是一类重组逆转录病毒载体，由于其结构和功能的特点，慢病毒载体作为一种重要的基因转移工具应用于基因治疗和细胞分子生物学研究领域。区别于一般的逆转录病毒载体，它对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。该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。在感染能力方面可有效地感染神经元细胞、肝细胞、心肌细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、干细胞等多种类型细胞，达到良好的基因治疗效果。慢病毒载体的研究发展很快，研究的也很深入，在美国已经开展了临床研究，效果非常理想，因此具有广阔的应用前景。

- ◆ 大大提高对于一些较难转染的细胞，如原代细胞、干细胞、不分裂的细胞等转导效率
- ◆ 目的基因整合到宿主细胞基因组的概率大大增加就快速获得高水平的表达
- ◆ 具有最低的细胞毒性，将免疫反应降到最低
- ◆ 能够插入较大的片段(≈3kb)

目前，慢病毒载体是以国际通用的第三代载体系统为基础，通过一定改建，构成四质粒体系。其中，转移载体(Transfer Vector)包含转移目的基因的慢病毒骨架及其包装产生相应基因组RNA的所有顺式作用元件，并且可以单一或多重组的稳定或条件诱导性表达转移基因或shRNA；另外，通过三个辅助质粒，提供病毒包装所需的反式作用因子，同时采用“自我灭活”修饰，阻止子代病毒自我复制和转移，从而确保产生的慢病毒具备良好的生物安全性。

二、生物安全

2.1 安全性

- 1) 删除了全部HIV-1的编码基因，在介导目的基因的表达时，没有任何HIV-1蛋白的表达；
- 2) 对5'和3' LTR分别进行了删除改造，5'LTR缺失U3，换上RSV Enhancer/promoter，使载体的复制不再依赖Tat；3'LTR删除U3，使其不再具有启动/增强活性，成为自灭活(Selfinactivating, SIN)载体；

- 3) 病毒包装必需的3个蛋白Gag/Pol、Rev、VSV-G(代替HIV-1的Env)分别独立放置在3个质粒上(pGag/Pol、pRev、pVSV-G), 且互相之间没有任何同源序列, 大大降低了复制型慢病毒(RCL)的产生几率;
- 4) 与MuLV等逆转录病毒载体相比, 慢病毒载体的整合更偏向于宿主细胞基因组的基因表达活跃区, 激活沉默的原癌基因的几率可能比逆转录病毒载体低;
- 5) 慢病毒载体未发现致肿瘤活性, 全世界有4千万人感染了HIV-1, 发生的整合事件不计其数, 但未出现一起致瘤事件, 而MuLV等逆转录病毒载体有致瘤活性;
- 6) 慢病毒的LTR的转录激活能力低于逆转录病毒, 激活原癌基因能力也较低。

2.2 实验室安全措施

慢病毒载体已经被全世界许多实验室应用, 没有出现过任何意外, 但仍具有潜在的产生复制型慢病毒(RCL)和致癌的风险, 操作者在实验中仍需要保持高度警惕! 所有操作均应尽量在BSL2级生物安全柜中进行, 并佩戴一次性口罩和手套, 尤其要避免病毒接触口、眼、鼻、耳、伤口等身体开放性区域, 避免产生气溶胶, Tip头一定要选择带有滤芯的。必须高度注意被污染的尖锐物品, 包括针头、注射器、载玻片、移液管、毛细玻璃吸管和解剖刀。每次实验后, 立即清理所有接触过病毒的器具, 均应高压消毒再进行下一步处理。显微镜台、生物安全柜台面等使用后, 用70%乙醇擦拭。意外洒落的含病毒的液体, 用卫生纸吸干后, 用0.6%次氯酸钠溶液浸泡被污染处1 h。装盛慢病毒载体的实验用品, 要单独放置, 标示清楚, 并标注“危险品”字样。尽量使用培养瓶, 使用培养板来感染病毒, 要防止意外洒落。对共用实验室的人员进行慢病毒安全培训或提示。

三、流程描述

制备编码慢病毒颗粒的重组病毒质粒及其三种辅助包装原件载体质粒, 分别进行高纯度无内毒素抽提, 通过转染试剂共转染293T细胞, 转染后6 h更换为完全培养基, 培养72 h后, 收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液, 对其浓缩, 得到高滴度的慢病毒浓缩液, 用于感染目的细胞。感染后的目的细胞可以通过慢病毒载体上的抗性基因和荧光融合蛋白进行筛选。

四、材料与仪器

4.1 实验材料

4.1.1 细胞株

293T细胞, 人胚肾细胞, 为贴壁依赖型成上皮样细胞, 常规培养使用含10% FBS的DMEM (含4.0 mM L-Glutamine, 100 U/mL Penicillin, 100 μ g/mL Streptomycin)中, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。

4.1.2 质粒

重组穿梭质粒和包装质粒pGag/Pol、pRev、pVSV-G, 采用高纯度质粒中量抽提试剂盒抽提质粒DNA, 质粒DNA溶于除菌的双蒸水中, 以紫外光吸收法测定其浓度及纯度, 保证所提质粒DNA的A₂₆₀/A₂₈₀在1.8 ~ 2.0之间。

4.1.3 试剂

DMEM(GIBCO), 胎牛血清 FBS(BI), 胰酶 Trypsin-EDTA Solution(GIBCO), 双抗(青霉素+链霉素)(GIBCO), HEPES(AMRESCO), Polybrene(Sigma)

4.2 实验耗材及仪器

4.2.1 耗材

10, 15 CM 培养皿, 50 mL 离心管(Corning), 过滤器(Sartorius Stedim), 96 孔板(Corning), 超滤管(Millipore)

4.2.2 仪器

二氧化碳培养箱, 生物安全柜, 台式高速冷冻离心机, 超速离心机, 荧光显微镜

五、具体步骤

5.1 细胞培养

5.1.1 活细胞计数

用无血清培养基把细胞悬液稀释到200 ~ 2000个/mL(一般稀释倍数为100倍), 在0.1 mL的细胞悬液中加入0.1 mL的0.4%的台盼蓝溶液。轻轻混匀, 数分钟后, 用血球计数板计数细胞。活细胞排斥台盼蓝, 因而染成蓝色的细胞是死细胞。

5.1.2 细胞株的冻存

- 1) 取培养2 ~ 3天生长旺盛的细胞, 用细胞培养液将细胞配成 $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ /mL。
- 2) 在1 mL细胞冻存管中加入0.5 mL细胞悬液, 0.4 mL小牛血清和0.1 mL二甲基亚砷(或甘油), 混匀后密封。置4 $^{\circ}$ C 1 h, -20 $^{\circ}$ C 2 h, 然后直接放入液氮中或置液氮蒸汽上过夜后浸入液氮中。

5.1.3 细胞复苏

- 1) 从液氮罐中取出细胞冻存管，应带防护眼睛和手套。
- 2) 迅速放入盛有37 °C水的水浴中，并不时摇动，尽快解冻。
- 3) 2000 rpm, 3 min离心。
- 4) 用70%酒精擦拭消毒后，移至净化台上，吸出上清液，加3 mL含10% FBS的DMEM培养基，吹打均匀，加入到6 CM培养皿中，置温箱培养。
- 5) 次日更换一次培养液后再继续培养。

5.1.4 细胞传代

- 1) 弃去旧培养液，加入5 mL灭菌PBS溶液，轻轻晃动，洗涤细胞生长面，然后弃去PBS溶液。
- 2) 加入2 mL胰酶消化液，消化1~2 min直到细胞完全消化下来。
- 3) 加入含10%胎牛血清和100 U/mL双抗的DMEM培养基5 mL，用刻度吸管吹打数次，将瓶壁上的细胞冲洗下来。
- 4) 混匀细胞后分至两个新的培养瓶中，继续培养。

5.2 病毒包装

- 1) 293T细胞在10 CM培养皿中培养至80~90%融合时，接种15 CM培养皿；
- 2) 倾去培养液，用1 mL D-Hank's Solution洗涤细胞两次；
- 3) 加入1 mL Trypsin-EDTA Solution，混匀后，37 °C放置2~3 min；
- 4) 小心吸去胰酶溶液，加入2 mL含10% FBS的DMEM培养液，吹打使细胞形成单细胞悬液；
- 5) 将细胞悬液接种15 CM培养皿，加入18 mL含10% FBS的DMEM培养液，混匀后37 °C 5% CO₂培养过夜；
- 6) 在一支无菌的5 mL离心管中加入1.5 mL无血清DMEM，按比例加入含客户目的序列的穿梭质粒和包装质粒(pGag/Pol、pRev、pVSV-G)，混匀，取另一支无菌的5 mL离心管，加入1.5 mL无血清DMEM，再加入300 μL RNAi-Mate，混匀，室温放置5 min后将两管混合，室温放置20~25 min；
- 7) 除去15 CM培养皿中的培养液，加入8 mL无血清的DMEM培养液；
- 8) 将转染混合物逐滴加入15 CM培养皿中，轻轻地前后摇晃培养皿以混匀复合物，在37 °C 5% CO₂培养箱中温育4~6 h；
- 9) 吸弃转染液，加入18 mL含10% FBS的DMEM培养液。37 °C 5% CO₂继续培养72 h。

5.3 病毒收集

- 1) 将培养皿中细胞上清液吸到50 mL离心管中, 4 °C, 4000 rpm, 4 min;
- 2) 低速离心后, 将离心管上清液倒入50 mL注射器内, 用0.45 μm过滤器过滤;
- 3) 滤液在离心机中进行超速离心, 4 °C, 20000 rpm, 2 h;
- 4) 将浓缩液收集分装至出货管中;
- 5) 分装的病毒液贴上标签, -80 °C冰箱保存。

5.4 病毒滴度检测

- 1) 293T细胞在10 CM Dish中培养至80~90%融合时, 弃去培养液, 用3 mL D-Hank's Solution 洗涤细胞两次;
- 2) 加1 mL Trypsin-EDTA Solution, 混匀后, 小心吸去胰酶溶液, 37 °C放置3~5 min;
- 3) 再加入2 mL含10% FBS的DMEM培养液, 吹打使细胞形成单细胞悬液;
- 4) 按 3×10^4 细胞/孔的浓度接种96孔板, 混匀后于37 °C 5% CO₂培养24 h;
- 5) 将慢病毒原液10 μL, 用10% FBS的DMEM培液十倍稀释3~5个梯度(根据细胞状态, 如有必要可加入终浓度为5 μg/mL的Polybrene);
- 6) 吸去96孔板中的培养液, 每孔加入100 μL稀释的病毒液, 同时设立空白对照组, 于37 °C 5% CO₂培养24 h;
- 7) 吸弃96孔板中的稀释病毒液, 每孔加入100 μL 10% FBS的DMEM培液, (根据细胞状态, 如有必要可分出1/3~1/5)于37 °C 5% CO₂继续培养72 h;
- 8) 通过荧光显微镜或FACS计数荧光细胞, 结合稀释倍数计算病毒滴度。(通过不同的检测方法, 滴度会有差异, 请在试验过程中注意生物安全要求。)

六、使用方法

Lentivirus在细胞水平使用的重组Lentivirus颗粒是以VSV-G膜蛋白包裹, 从而大大增加了病毒感染谱, 但对不同组织细胞亲嗜性仍有差别, 因此, 有必要在使用Lentivirus颗粒之前请查阅有关文献, 了解Lentivirus对靶细胞的亲嗜性、感染复数(MOI值, MOI是Multiplicity of infection的缩写, 含义是感染时病毒与细胞数量的比值, 没有单位, 其隐含的单位是pfu number/cell)及体内(In vivo)注射所需的病毒量, 若无相应文献支持, 则需要检测病毒对靶细胞的亲嗜性。

MOI的测定: 其原理是基于病毒感染细胞是一种随机事件, 遵循Poisson分布规律, 可计算出

感染一定比例的培养细胞所需的感染复数(MOI)。

其公式为： $P=1-P(0)$ ， $P(0)=e^{-m}$ 或 $m=-\ln P(0)$ 。

P =被感染细胞的百分率

$P(0)$ =未被感染细胞的百分率

m =MOI值

例如，如果要感染培养皿中99% 的培养细胞，则：

$P(0)=1\%=0.01$

$m=-\ln(0.01)=4.6$ pfu/cell。

6.1 病毒滴度复核(有限稀释法测定)

- 1) 滴度检测前一天,对293T细胞传代,96孔板每个孔加入约 $0.5\sim 10\times 10^3$ 个细胞,体积100 μL ;
- 2) 第二天,准备7~10个无菌EP管,在每个管中加入90 μL 的新鲜完全培养基(高糖DMEM+10% FBS);
- 3) 取待测定的病毒原液10 μL 加入到第一个管中,轻轻混匀后,取10 μL 加入到第二个管中,然后依次操作直到最后一管;
- 4) 选取所需的细胞孔,吸弃90 μL 培养液,然后将稀释好的病毒液,从低浓度到高浓度依次加入,放入37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养;
- 5) 48 h后,每孔加入100 μL 新鲜培养液,小心操作,不要吹起细胞;
- 6) 3~4天后,观察荧光表达情况,正常情况下,荧光细胞数随稀释倍数增加而相应减少,计数最后两个含有荧光细胞的孔中的荧光细胞个数,将得到的数值除以各自相应的稀释倍数,即可计算出病毒原液的滴度值(通常以倒数第二个孔中的读数值更为准确)。
- 7) 注释:

病毒滴度测定结果还依赖于本身实验系统,如293T细胞代数、细胞状态、荧光显微镜品质、相关实验试剂及实验人员操作技能,因此不同实验室测得滴度数值会有所差异(1~5倍),但基本不会影响正常实验流程;

病毒滴度($\text{BT}=\text{TU}/\text{mL}$, Transducing units) 计算公式: $\text{BT}=\text{TU}/\mu\text{L}=(\text{P}\cdot\text{N}/100\cdot\text{V})\cdot 1/\text{DF}$, $\text{P}=\%$
 $\text{GFP}+\text{Cells}$

N =转染时的细胞数, V =每孔加入病毒稀释液体积(μL)

DF =稀释因子(Dilution factor)=1(Undiluted)、 10^{-1} (diluted 1/10)、 10^{-2} (diluted 1/100)。

6.2 靶细胞感染预实验

- 1) 实验前一天分别接种 $3\sim 5\times 10^3$ 个靶细胞于96孔培养板每孔中,所加培养基体积为100 μL ,不同种类的细胞生长速度有所异,为保证有较好的实验结果,进行病毒感染时细胞的融合率40%~60%,因为Lentivirus表达时间较长,故在进行感染时细胞接种不密;
- 2) 干扰预试验共分为二组,每组均有不同梯度的MOI值。第一组为正常情况下感染,也就是在完全培养基中直接加入病毒。第二组为感染时添加5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Polybrene, Polybrene在大部分细胞中可以有效的提高感染效率;
- 3) 感染前为细胞换液,吸去细胞上清,按不同的分组情况加入所需的培养基90 μL ,每组三个孔;
- 4) 准备2个无菌的EP管,吸取10 μL 的 1×10^8 TU/mL的病毒(预先从 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 中取出,冰浴溶解)加入到第一个管子中,轻柔混匀,勿产生泡沫。同样从第一管中吸取10 μL 的病毒到第二管中,混匀。这样就得到了三个不同梯度的病毒:原液,10倍稀释,100倍稀释;
- 5) 将三个不同梯度的病毒液,各取10 μL 加到每组的三个孔中,计算可知,三个孔的MOI分别为100, 10, 1。如果所用的病毒滴度未达到 1×10^8 TU/mL,则相应增加病毒体积使得能够得到不同的MOI;
- 6) 把细胞放回培养箱孵育
- 7) 8~12 h以后请观察细胞状态。如果细胞状态与未感染组无明显差异,表明慢病毒对细胞没有明显毒性作用,请不要换液,继续培养,24 h后更换为新鲜培养基;
- 8) 感染72~96 h后,观察荧光表达情况。对于生长迟缓代谢慢的细胞,可以适当延长观察时间,中途可以换液保持细胞的良好状态;
- 9) 以上的操作是针对贴壁细胞设计的。悬浮细胞的区别主要在细胞的分盘上,它不需要提前一天分盘。操作时直接将细胞离心后悬浮在不同的培养基中,计数分盘后,即可加入病毒;
- 10) 通过首次实验和重复实验,确认目的细胞的感染方法和感染参数。

6.3 最小致死浓度筛选

嘌呤霉素盐酸盐用来筛选稳转株的工作浓度需要根据细胞类型、培养基、生长条件和细胞代谢率而变化,推荐使用浓度为0.1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对于第一次使用的实验体系建议通过最小致死浓度实验筛选出合适的浓度。

使用方法:

- 1) 细胞在6 CM培养皿中培养至80-90%融合时, 用3 mL PBS洗涤细胞两次, 加入3 mL含10% FBS的培养液, 吹打使细胞形成单细胞悬液。
- 2) 按 2×10^4 细胞/孔的浓度接种12孔板, 混匀后于37 °C 5% CO₂培养24 h, 预实验中加入Puromycin终浓度分别为0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5、2.0、2.5、3.0 μg/mL的培养基+10% FBS。
- 3) 维持Puromycin浓度, 隔天换液, 观察。连续4天, 选择能将细胞完全杀死的最低Puromycin浓度。

6.4 正式实验

通过预实验可以帮助确定使用重组Lentivirus颗粒感染目的细胞的优化条件, 如细胞接种密度, 是否需要添加Polybrene, 合适的MOI值等参数。正式实验前, 调整并保持细胞的良好状态是非常重要的。有些对Polybrene敏感, 这时候就不能添加Polybrene去增强感染效率。

Lentivirus表达时间较长, 但在一般代谢较旺盛的细胞(如293T, BHK21等)上, 病毒感染24 h后可以观察到GFP荧光; 代谢比较缓慢的细胞(如原代培养细胞, 神经干细胞, 胚胎干细胞等)GFP蛋白表达时间较长, 感染后72~96 h甚至更长时间才可以观察到GFP荧光。感染后的细胞可以连续培养一周, 通过观察GFP的表达时间和表达强度来确定Lentivirus对目的细胞的感染情况。感染后期请根据细胞生长的情况对细胞进行及时换液和传代, 以保证细胞良好的生长状态。若进行稳筛株的筛选则在瞬时侵染的基础上加最小致死浓度的Puromycin至少维持4天, 从而筛选稳筛株。

七、运输和储存

对于长距离运输, 应先将慢病产品保存在-80 °C, 再采用全程干冰运输, 以防滴度下降。慢病毒载体在-80 °C保存6个月, 滴度不会明显下降(保质期6个月)。建议保存6~12个月以上的样品, 进行实验前, 重新测一次滴度。应尽量避免反复冻融(小于3次)。

使用前请从-80 °C冰箱中取出病毒, 冰浴溶解。用不完的病毒可以暂时放在4 °C冰箱中, 若当天不能用完, 请立即存放于-80 °C冰箱中。

八、常见问题及解决方案

Q: 通常在转移载体中最大能够插入多大的目的基因序列?

A: 基于HIV基因骨架的原因, 通常插入的目的基因序列要小于4 kb, 否则会影响病毒滴度甚至基因表达。

Q: Lentivirus对目的细胞的感染效率很低, 如何提高病毒的感染效率?

A: 一般, 我们通过提高MOI值来提高病毒的转染效率, 必要时以在培养基中加入Polybrene(4~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)来提高病毒的感染效率。同时, 目的细胞良好的生长状态是获得正常感染效率的保证。

Q: 目的细胞可以被Lentivirus感染, 但是GFP荧光强度很弱, 为什么?

A: 目的细胞中GFP荧光轻度取决于病毒感染细胞的颗粒数、细胞本身的增殖状态、细胞类型以及观察时间等。一般来讲, 目的细胞感染病毒颗粒数越多, 细胞本身增殖越快, GFP荧光会越强。Lentivirus属于慢病毒, 一般在增殖较快的细胞中病毒感染72~96 h后, GFP基因表达才达到高峰。对于增殖较慢的细胞, GFP基因表达时间还会延长。

Q: 加入病毒后, 目的细胞死亡很厉害, 为什么?

A: Lentivirus可能对您的目的细胞有一定的毒性, 请调整并降低感染的MOI值, 并且在4 h, 8 h或者12 h后对细胞进行换液, 用新鲜的完全培养液继续培养观察。

Q: 慢病毒感染后多久检测细胞基因表达?

A: 慢病毒感染后一般72~96 h后检测基因表达, 对于生长迟缓代谢慢的细胞, 可以适当推迟检测时间, 中途换液保持细胞的良好状态。

九、成功案例介绍

9.1 贴壁细胞案例

9.1.1 实验材料与方法

9.1.1.1 细胞培养

Panc-1细胞, 常规培养使用含10% FBS(GIBCO)的DMEM 培养基(含1.5 mg/L-Glutamine, 100 U/mL Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin)中, 37 °C 5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。

9.1.1.2 病毒侵染

9.1.2 实验材料及试剂

DMEM培养基+ 10% FBS

PBS(Life Science Products&Services)

Trypsin-EDTA Solution (Gibco)

24孔板(Corning)

Lentivirus-NC病毒液(GenePharma, 1×10^9 TU/mL)

9.1.3 实验步骤

- 1) 将状态良好的Panc-1消化后重悬, 取适量细胞接种至24孔板中, 37 °C培养箱中过夜;
- 2) 取阴性对照病毒, 按1:10、1:100、1:1000 与DMEM培养基混合稀释, 总体积约500 μ L, 并加入终浓度5 μ g/mL Polybrene;
- 3) 吸去24孔板中原培养基, 换入阴性对照病毒梯度稀释液, 37 °C培养箱中培养;
- 4) 24 h后吸去阴性对照病毒稀释液, 换入500 μ L新鲜培养基, 37 °C培养箱中培养;
- 5) 48-96 h于荧光倒置显微镜下观察并记录结果。

9.2 悬浮细胞案例

9.2.1实验材料与方法

9.2.1.1 细胞培养

人红白血病细胞Kasumi-1, 常规培养使用含10% FBS(GIBCO)的RPMI 1640培养基(Hyclone)(含1.5 mg/L-Glutamine, 100 U/mL Penicillin, 100 μ g/mL Streptomycin)中, 37 °C 5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。

9.2.1.2 病毒侵染

9.2.2 实验材料及试剂

DMEM培养基+ 10% FBS

RPMI 1640培养基+10% FBS

D-Hank's Solution

96孔板(Corning)

24孔板(Corning)

Lentivirus-病毒液(GenePharma, 1×10^8 TU/mL)

9.2.3 实验步骤

- 1) 稀释病毒: 稀释液(靶细胞维持液培养基)400 μ L+终浓度5 μ g/mL Polybrene, 将慢病毒原液按1:20、1:10、1:5加入到稀释液中;
- 2) 24-well, 按 4×10^5 Cells/well(根据细胞种类调整), 1000 rpm 3 min, 取细胞沉淀。将Step 1中各份病毒稀释液分别与每份细胞沉淀重悬, 同时建立对照(Blank、Negative), 37 °C 5% CO₂中培养;

- 3) 12~24 h后离心移去细胞侵染后的病毒液, 加入0.5 mL完全培养液, 37 °C 5% CO₂过夜
- 4) 根据细胞状态和类型, 如果必要分出1/3~1/5, 加入0.5 mL完全培养液, 继续培养24~48 h ; 荧光倒置显微镜下观察结果。

十、附录

10.1 常见细胞慢病毒感染推荐参数

细胞系慢病毒感染参数			
细胞名称	ATCC NO.	细胞类型及来源	达到80%感染所需MOI
293T	CRL-11268	人胚胎肾细胞	<1
95D	—	人高转移肺腺癌细胞	3
CNE-1	—	人鼻咽癌细胞（高分化）	50
hADSC	—	人脂肪肝细胞	100
HEC-1B	HTB-113	人子宫内膜癌细胞	5
HepG-2	—	人肝癌细胞	20
hFOB1.19	—	永生化的成骨细胞	5
HL-60	CCL-240	人骨髓细胞白血病细胞	50
HLE-B3	—	人晶状体上皮细胞	1
hMSC	—	人骨髓间充质干细胞	50
hSMC	—	人平滑肌细胞	50
HUVEC	—	人脐静脉内皮细胞	5
Jurkat	TIB-152	人白血病细胞	>100
MCF-7	HTB-22	人乳腺癌细胞	5
MDA-MB-231	HTB-26	人乳腺癌细胞	10
SaoS-2	—	人成骨肉瘤细胞	20
SGC-7901	—	人胃癌细胞	20
SHG-44	—	人胶质瘤细胞	10
SKOV-3	HTB-77	人卵巢癌细胞	20
SMMC-7721	—	人肝癌细胞	20
SPC-A-1	—	人肺腺癌细胞	10
THP-1	TIB-202	人单核细胞	>100
U251	—	人胶质瘤细胞	1
U-20S	HTB-96	人骨癌细胞	5
U937	CRL-1593.2	人组织细胞淋巴瘤细胞	100
HSC-T6	—	永生化的大鼠肝星型细胞	3
PC-12	CRL-1721	人前列腺癌细胞	100
H9c2(2-1)	CRL-1446	大鼠心肌细胞	50
KM3	—	大鼠骨髓瘤细胞（B淋巴细胞）	50

原代培养细胞慢病毒感染参数			
细胞名称	种属	细胞类型及来源	达到 80%感染所需 MOI
甲状旁腺原代细胞	人	甲状旁腺组织	50
胚胎间骨髓核细胞	人	胚胎组织	5
血管平滑肌细胞	大鼠	血管平滑肌	>100
胶质细胞	大鼠	脑组织	5

10.2 常用的培养器皿

培养器皿	底面积(cm ²)	加培养液量(mL)	可获细胞量
96 孔培养板	0.32	0.1	0.5-2.0×10 ⁴
48 孔培养板	0.8	0.2	0.2-1×10 ⁵
24 孔培养板	1.9	1	0.5-2×10 ⁵
12 孔培养板	3.8	2	1-4×10 ⁵
6 孔培养板	9.6	2.5	3-8×10 ⁵
3.5cm 培养皿	9.6	3	3-8×10 ⁵
6cm 培养皿	28	5	1-3×10 ⁶
9cm 培养皿	49	10	2-5×10 ⁶
10cm 培养皿	55	10	3-8×10 ⁶
25cm 塑料培养瓶	25	5	5×10 ⁶
75cm 塑料培养瓶	75	15	2×10 ⁷
25cm 玻璃培养瓶	19	4	3×10 ⁶
100cm 玻璃培养瓶	37.5	10	6×10 ⁶
250cm 玻璃培养瓶	78	15	2×10 ⁷