

慢病毒操作手册-感染预实验、稳定株筛选

一、慢病毒使用安全注意事项

1、病毒操作时请穿实验服、戴手套、口罩和帽子，慢病毒为‘自杀’性病毒，即感染目的细胞后不会在感染其他细胞，也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒。

2、操作

2.1. 病毒操作时建议使用生物安全柜！如果 使用普通超净台，请不要打开排风机。

2.2 操作病毒时特别小心不要产生气雾或飞溅。

2.3 如果操作时生物安全柜有病毒污染，请立即用 70%的酒精或 0.06%次氯酸钠溶液擦拭干净

3、废弃物专门处理：6%次氯酸钠溶液浸泡 30min，或密封后高压灭菌后，丢入生物废物收集袋。

4、如不小心接触到皮肤请立即用大量肥皂水冲洗。

二、慢病毒的储存&稀释

1、储存条件及期限： -80℃ 12 个月，4℃ 可以保存一周，如需多次使用，请将慢病毒分装存后放于-80℃，避免反复冻融

2、慢病毒稀释：如实验需要请在使用前将慢病毒冰浴溶解，用完全培养基或 PBS 稀释。稀释后的病毒不建议再冻存。

3、慢病毒单位标识为 TU/ml，即每毫升慢病毒液中含有具有生物活性的慢病毒颗粒数。如：病毒滴度 1×10^8 TU/ml，即每毫升病毒液中含有 1×10^8 个具有生物活性的病毒颗粒。

三、贴壁细胞感染实验

1. 实验目的

确定慢病毒对细胞的感染 MOI 和最佳的感染条件，如感染试剂的选择，感染时的总体积感染后换液的时间，这些将为正式实验提供参考。MOI: 复感染指数，是指病毒对细胞的感染能力，MOI 越高，细胞越难被感染。通常把某株细胞有 80% 被感染时所用的病毒颗粒数和细胞数目的比值作为该株细胞的 MOI。

$$\text{MOI} = (\text{病毒滴度} \times \text{病毒体积}) / \text{细胞数目}$$

Day1: 接种细胞

细胞培养 16-24h，至细胞汇合度为 30%-40%，确保细胞状态最佳进行后续感染实验，并对细胞进行计数。（预实验可以设置 6 个孔，moi 设置 3 个梯度，每个梯度 2 个复孔）

注：原代细胞：如果细胞增长缓慢，可以在接种时提高细胞量，24h 后汇合度 50%-60%，确保在感染后 3 天时细胞汇合度达到 90%~100%；

非分裂细胞：如神经元细胞，接种后不再增殖，需要按照 80%的汇合度进行接种。

Day2: 感染

1. 从冰箱取出病毒，冰上缓慢融化。

2. 吸掉各孔中上清液，更换培养基，根据细胞计数病毒及相应感染增强液，混匀，继续培养。感染后 16h 用完全培养基进行换液，过程中观察细胞形态，发生变化时可以提前到 8h 换液，保持细胞正常生长。

3、感染预实验 moi 可以设置为;10、50、100，根据细胞计数，计算每个孔慢病毒细胞感染设置的 moi 条件需要加入的病毒体积（ $V_{\text{慢病毒}} = \text{moi} \times \text{细胞数} / \text{病毒实际滴度}$ ）

注：慢病毒滴度为公司包装病毒后实测的交付滴度，不同批次包装的病毒滴度不同，具体要看病毒报告中实测滴度。

4、助染试剂 Polybrene 起到助染作用，如使用请保持终浓度 $5 \mu\text{g/mL}$ 。

Day3-4: 继续培养

中途可根据细胞的生长状况进行换液，保持细胞活性。

Day5: 感染效果确认

感染约 72h，荧光表达丰度较高时，用显微镜观察。感染效率 80%左右，且细胞生长良好的组所对应的感染条件和 MOI 即可以作为后续感染正式实验的依据。

四、细胞感染常见问题

1. 如何确定向细胞中加入慢病毒的最佳时间？

慢病毒感染细胞后需要 3 天的时间才能观察到慢病毒携带的基因表达，应在细胞汇合度 30~40%时且细胞状态良好时加入慢病毒，确保在感染后 3 天时细胞增长达到 90%~100%的汇合度。

2. 用于慢病毒感染的细胞接种量是多少？

根据细胞增殖的速度调整细胞接种量，以保证在感染后 3 天左右细胞刚好快长满培养皿底部为宜。

针对大部分细胞系： 传代周期在 2-3 天，感染时细胞铺板的密度保持在 20-30%左右，则 72h 后细胞增殖后铺板密度约在 90%左右；

针对某些原代细胞： 由于细胞增长缓慢，可以在接种时提高汇合度到 50%~60%，但要确保在感染后 3 天时细胞汇合度达到 90%~100%；

针对非分裂细胞：如神经元细胞，接种后不再增殖，此时可以按照 80%的汇合度进行接种。

3. 慢病毒感染细胞后什么时候基因表达达到峰值？

慢病毒感染后大部分细胞 3 天左右 GFP 或目的基因表达达到峰值，但对于生长缓慢的细胞，达到峰值的时间会更长。

4. 加入慢病毒病毒后，细胞死亡很厉害，该如何处理？

这种情况是由于慢病毒对该细胞有一定的毒性作用，需要调整并降低感染的 MOI 值，并且在感染后 4 小时、8 小时、12 小时对细胞进行观察，若发现细胞状态变差时，则需要立刻对细胞进行换液操作，使用新鲜的完全培养液替换病毒感染培养液。

5.如何提高慢病毒对细胞的感染效率？

慢病毒对细胞的感染效率受多个因素影响，如细胞自身生长的状态，细胞数量，细胞被慢病毒感染的难易程度等。

因此保证细胞正常增殖，轮廓清晰，合适的细胞密度，选择最优的感染条件可以更好的保证感染效率。

对于悬浮细胞，可采用离心感染方法，减少病毒感染时的体积，从而提高感染效率。

如加入病毒后将细胞培养板密封，用平角转子离心机 1000g 离心 1h，再放回培养箱中正常培养。

6. 细胞能被慢病毒感染，但为何 GFP 荧光很弱？

GFP 慢病毒感染细胞后，细胞中荧光强度取决于病毒进入到细胞的颗粒数、细胞本身 的增殖状态、细胞类型、观察时间、GFP 基因前面的启动子活性等因素。 通常目的细胞感染慢病毒颗粒数越多，GFP 荧光会较强。慢病毒在增殖较快的细胞中感 染 72 小时后，GFP 蛋白表达才达到峰值；在增殖较慢的细胞中感染后，GFP 蛋白表达达 到峰值需要更长的时间。

GFP 基因接在强启动子后面时荧光表达强；GFP 接在弱启动子 后面时荧光表达较弱。

五、稳定株筛选实验

大部分细胞 puromycin 的工作浓度为 1~10μg/ml。

Puromycin 工作浓度筛选：

1.提前 24h 将细胞铺入 24 孔板，细胞量根据细胞生长状态及大小调节，在 24h 后，细胞密度在 70%左右；

2.细胞生长 24h 后，加入不同终浓度的 puromycin，如图所示；

3.再培养 48h，显微镜下观察，将全部杀死细胞的最低浓度的 puro 组作为工作浓度。

0μg/ml	0.5μg/ml	1μg/ml	1.5μg/ml	2μg/ml	2.5μg/ml
3μg/ml	3.5μg/ml	4μg/ml	4.5μg/ml	5μg/ml	5.5μg/ml
6μg/ml	6.5μg/ml	7μg/ml	7.5μg/ml	8μg/ml	8.5μg/ml
9μg/ml	9.5μg/ml	10μg/ml			

稳定株筛选：

慢病毒感染 48-72h 后（70-80%融合度），将细胞继续培养于含适当浓度 Puromycin 的培养液中，筛选 48h 后，空细胞加 puro 组全部死亡，我们认为感染病毒组剩下全部是阳性细胞，进行以下操作：

A. 混合克隆稳定株筛选

将 Puromycin 浓度减至维持浓度（筛选浓度的 1/2~1/4），继续对感染后的细胞进行筛选和扩增，同时收集细胞进行 qPCR 或 Western Blot 鉴定（鉴定目的基因表达水平），并将鉴定结果正常的细胞冻存保种。

B. 单克隆稳定株筛选

对感染并筛选后的细胞进行稀释培养，挑取单一细胞生长而成的细胞克隆，再进行扩大 培养，以获得性状单一、表达稳定的细胞株：

1. 将细胞消化后接种于 96 孔板中，接种的细胞密度为 1 个/孔；

2. 标记出具有单个细胞的孔等细胞扩增后用 puro 进行筛选；

3. 筛选完毕后，收集细胞进行 qPCR 或 Western Blot 鉴定，选择鉴定结果正常的单克隆细胞冻存保种。