



GenePharma

GenePharma
Recombinant Lentivirus
Operation Manual

吉玛重组慢病毒 操作手册

吉玛基因

股票代码：430601

www.genepharma.com

目 录

1 产品简介	1
2 生物安全	2
2.1 安全性	2
2.2 实验室安全措施	2
3 流程描述	4
4 材料与仪器	5
4.1 实验材料	5
4.2 实验耗材及仪器	5
5 具体步骤	7
5.1 细胞培养	7
5.2 病毒包装	8
5.3 病毒收集	8
5.4 病毒滴度检测	9
6 使用方法	10
6.1 病毒滴度复核（有限稀释法测定）	10
6.2 靶细胞感染预实验	13
6.3 最小致死浓度筛选	15
6.4 正式试验	16
7 运输和储存	17
8 常见问题及解决方案	18
9 吉玛成功案例	19
9.1 贴壁细胞案例	19
9.2 悬浮细胞案例	21
10 附录	23
10.1 常见细胞慢病毒感染推荐参数	23
10.2 常用的培养器皿	24
10.3 穿梭质粒图谱	25
10.4 包装质粒图谱	35

1 产品简介

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。

特点：

- 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
- 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（ $\approx 3\text{kb}$ ）

目前，我公司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合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。

01

产品简介

2 生物安全

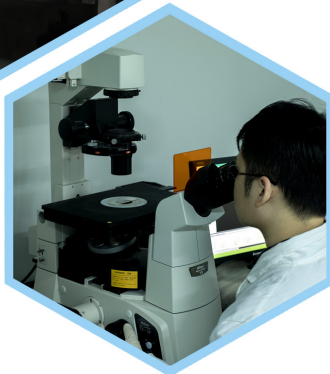
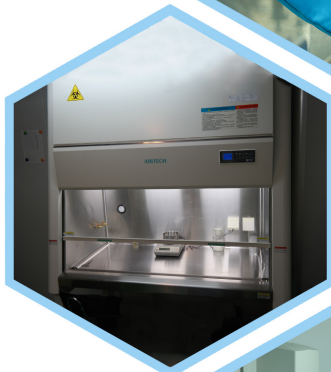
2.1 安全性

- ◆ 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；
- ◆ 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 (self-inactivating, SIN) 载体；
- ◆ 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；
- ◆ 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；
- ◆ 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；
- ◆ 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 1h。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。

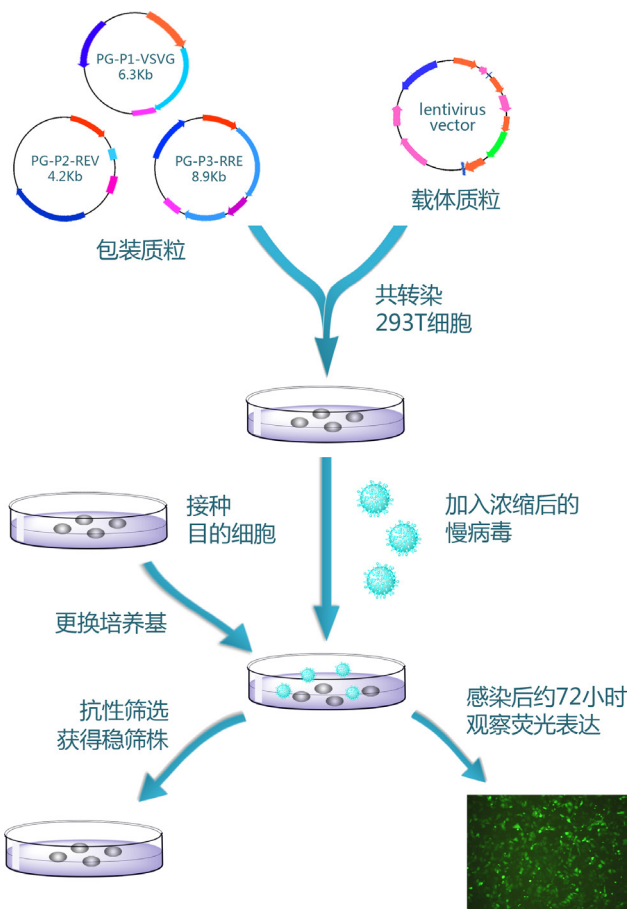


3 流程描述

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，用本公司的转染试剂 RNAi-Mate 共转染 293T 细胞，转染后 6h 更换为完全培养基，培养 72h 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。

04

流程描述



4 材料与仪器

4.1 实验材料

4.1.1 细胞株

293T, 人胚肾细胞, 为贴壁依赖型成上皮样细胞, 购自中国科学院细胞库, 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°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 由吉玛基因构建制备, 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

试剂名称	试剂来源	Cat No.
DMEM	GIBCO	12100-046
胎牛血清FBS	BI	04-001-1ACS
胰酶 Trypsin-EDTA Solution	GIBCO	25200-072
双抗 (青霉素)	GIBCO	15140-122
Hepes	AMRESCO	7365-45-9
RNAi-Mate 转染试剂	吉玛基因	G04001
Polybrene	Sigma	H9268

4.2 实验耗材及仪器

4.2.1 耗材

耗材名称	耗材来源	Cat No.
10 cm培养皿	Corning	430167
15 cm培养皿	Corning	430599
50 mL离心管	Corning	430828
过滤器	Sartorius Stedim	16533
96孔板	Corning	3599
超滤管	Millipore	UFC910024

4.2.2 仪器

仪器名称	仪器来源	型号
二氧化碳培养箱	日本三洋SANYO	MCO-15AC
生物安全柜	上海上净净化设备有限公司	BSC-II A2
台式高速冷冻离心机	长沙湘仪离心机仪器有限公司	TGL-20M
超速离心机	BECKMAN	A1330011
荧光显微镜	Nikon	TS100-F

06

材料与仪器

5 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% 的台盼兰溶液。轻轻混匀, 数分钟后, 用血球计数板计数细胞。活细胞排斥台盼兰, 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°C 1h, -20°C 2h, 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, 3min 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 5mL, 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 15cm 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 2~3min;
- 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 1.5mL 无血清 DMEM, 再加入 300 μ L RNAi-Mate, 混匀, 室温放置 5min 后将两管混合, 室温放置 20~25min;
- 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 4~6h;
- 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 72h。

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, 4000rpm, 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 μ m 过滤器过滤;
- 3) 滤液在离心机中进行超速离心, 4°C, 20000 rpm, 2h;
- 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 3~5min;
- 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 24h;
- 5) 将慢病毒原液 10 μ L, 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 μ g/mL 的 Polybrene) ;
- 6) 吸去 96 孔板中的培养液, 每孔加入 100 μ L 稀释的病毒液, 同时设立空白对照组, 于 37°C 5% CO₂ 培养 24h;
- 7) 吸弃 96 孔板中的稀释病毒液, 每孔加入 100 μ L 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 72h;
- 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。)

6 使用方法

Lentivirus 在细胞水平使用

10

使用方法

GenePharma 提供的重组 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：

$$P = 1 - P(0), P(0) = e^{-m} \text{ 或 } m = -\ln P(0)。$$

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：

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

$$m = -\ln(0.01) = 4.6 \text{ pfu/cell}。$$

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°C 5% CO_2 培养箱中培养；

- 5) 48h 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:

- ① 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;
- ② 病毒滴度 (BT = TU/mL, transducing units) 计算公式:
$$\text{TU}/\mu\text{L} = (P \times N / 100 \times V) \times 1/\text{DF}, \quad P = \% \text{ GFP}^+ \text{ cells}$$
$$N = \text{转染时的细胞数}, \quad V = \text{每孔加入病毒稀释液体积} (\mu\text{L})$$
$$\text{DF} = \text{稀释因子 (dilution factor)} = 1 (\text{undiluted}),$$
$$10^{-1} (\text{diluted } 1/10), \quad 10^{-2} (\text{diluted } 1/100).$$

常用慢病毒滴度检测方法比较

名称	原理	单位	特点	优缺点	与GFP荧光法相比
p24核心蛋白定量法	ELISA Kit	ng p24/mL LP/mL TU/mL (估计)	物理(颗粒)滴度	经典方法, 简单、重复性好	高估 $10^2 \sim 10^3$ 倍
RNA基因组定量法	RT-qPCR	Vg/mL	物理(核酸)滴度	精度高, 但对仪器和操作要求高	高估 $10^2 \sim 10^4$ 倍
GFP荧光计数法	FACS(流式细胞计数)	TU/mL	感染滴度	经典方法, 简单、重复性好	-
抗性克隆计数法	细胞克隆计数	TU/mL	感染滴度	克隆形成需约2周	低估5~10倍
DNA定量法	感染细胞后定量载体DNA	TU/mL	感染滴度	最接近真实感染滴度, 但不同细胞感染效率不同	约为RNA基因组定量法的1/1000
Dot-blot法	RNA dot-blot	RNA/mL	物理(核酸)滴度	简单, 但属于半定量	-

13

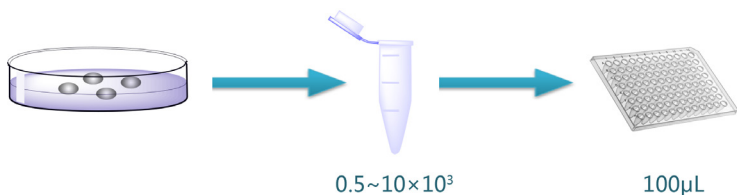
使用方法

6.2 靶细胞感染预实验

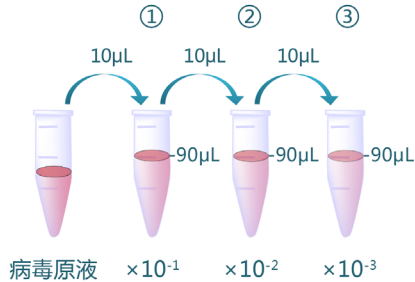
- 1) 实验前一天分别接种 $3 \sim 5 \times 10^3$ 个靶细胞于 96 孔培养板每孔中, 所加培养基体积为 100 μL , 不同种类的细胞生长速度有所异, 为保证有较好的实验结果, 进行病毒感染时细胞的融合率 40%~60%, 因为 Lentivirus 表达时间较长, 故在进行感染时细胞接种不宜过密;
- 2) 干扰预试验共分为二组, 每组均有不同梯度的 MOI 值。第一组为正常情况下感染, 也就是在完全培养基中直接加入病毒。第二组为感染时添加 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 Polybrene, Polybrene 在大部分细胞中可以有效的提高感染效率;
- 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 $1 \times 10^8 \text{ TU/mL}$ 的病毒（预先从 -80°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 $1 \times 10^8 \text{ TU/mL}$ ，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) 8~12h 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，24h 后更换为新鲜培养基；
- 8) 感染 72~96h 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。

Day 1 接种细胞



Day 2 病毒稀释感染



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

15

使用方法

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 $\mu\text{g/ml}$ 。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。

- 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% CO_2 培养 24 小时，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 $\mu\text{g/ml}$ 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 24h 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 72~96h 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。

7 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。

8 常见问题及解决方案

18

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 荧光强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 72~96h 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 4h, 8h 或者 12h 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 72~96h 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。

9 吉玛成功案例

9.1 贴壁细胞案例

实验材料与方法

一、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 μ g/mL Streptomycin) 中, 37°C 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。

二、病毒侵染

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)

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. 24h 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. 48-96h 于荧光倒置显微镜下观察并记录结果。

19

吉玛
成功
案例

实验结果与分析

侵染图片

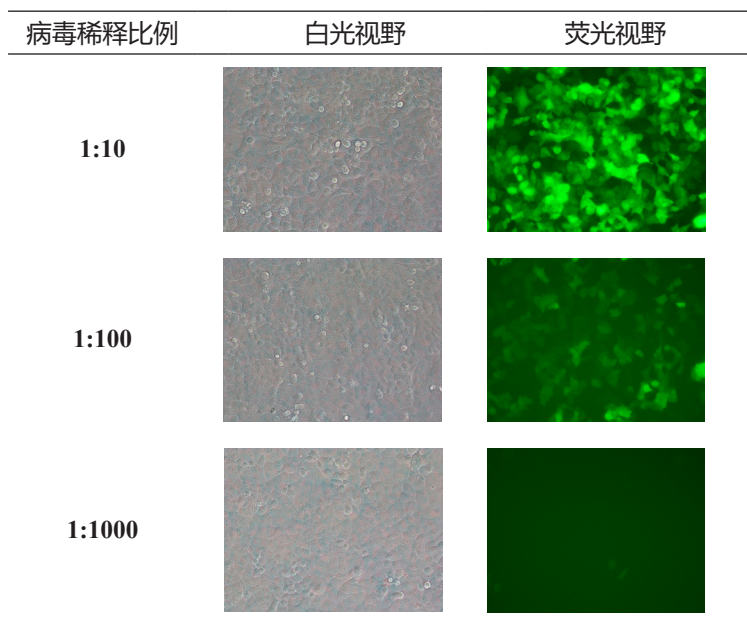


图 1. Panc-1 细胞 72h 侵染图片 (100×)

由图片得，阴性对照病毒与培养基 1:10 稀释侵染 72h，细胞侵染效率可大于 70%，建议按此比例进行正式实验。

20

吉玛
成功
案例

9.2 悬浮细胞案例

实验材料与方法

一、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。

二、病毒侵染

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)

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 3min, 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. 12~24h 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, 继续培养 24~48h; 荧光倒置显微镜下观察结果。

实验结果与分析

侵染图片

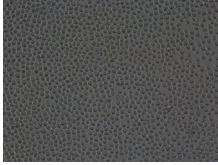
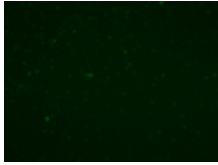
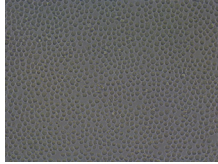
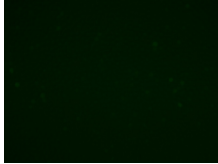
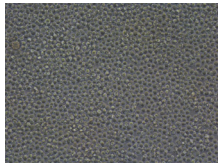
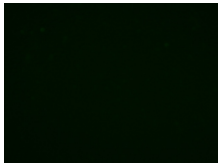
病毒稀释比例	白光视野	荧光视野
1:5		
1:10		
1:20		

图 1. Kasumi-1 细胞 72h 侵染图片 (200×)

由图片得，当慢病毒的滴度达到 1×10^8 TU/mL，按 1:5 稀释侵染，侵染效率即在 50% 左右，拟按此稀释比例进行下游实验

22

吉玛成功案例

10 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

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	—	永生化人成骨细胞	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

24

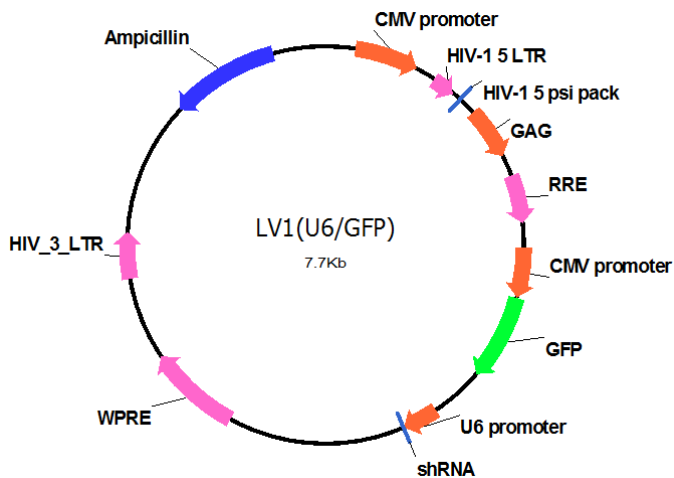
附录

10.2 常用的培养器皿

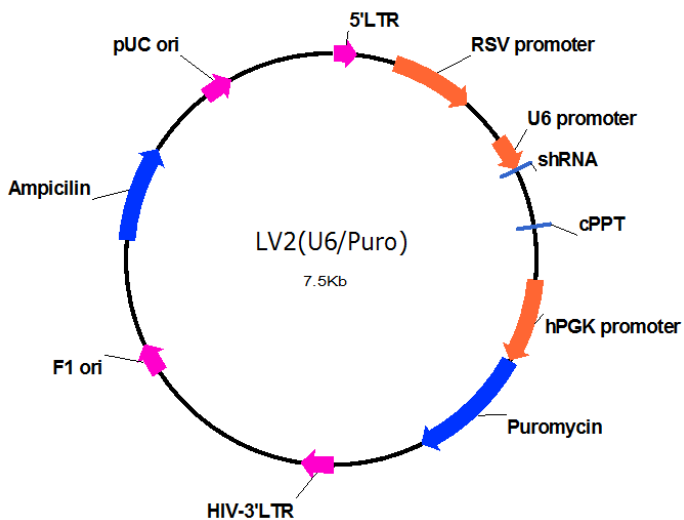
培养器皿	底面积(cm ²)	加培养液量(mL)	可获细胞量
96孔培养板	0.32	0.1	0.5-2.0×10 ⁴
48孔培养板	0.8	0.2	0.2-1×10 ⁵
24孔培养板	1.9	1	0.5-2×10 ⁵
12孔培养板	3.8	2	1-4×10 ⁵
6孔培养板	9.6	2.5	3-8×10 ⁵
3.5cm培养皿	9.6	3	3-8×10 ⁵
6cm培养皿	28	5	1-3×10 ⁶
9cm培养皿	49	10	2-5×10 ⁶
10cm培养皿	55	10	3-8×10 ⁶
25cm塑料培养瓶	25	5	5×10 ⁶
75cm塑料培养瓶	75	15-30	2×10 ⁷
25cm玻璃培养瓶	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

10.3 穿梭质粒图谱

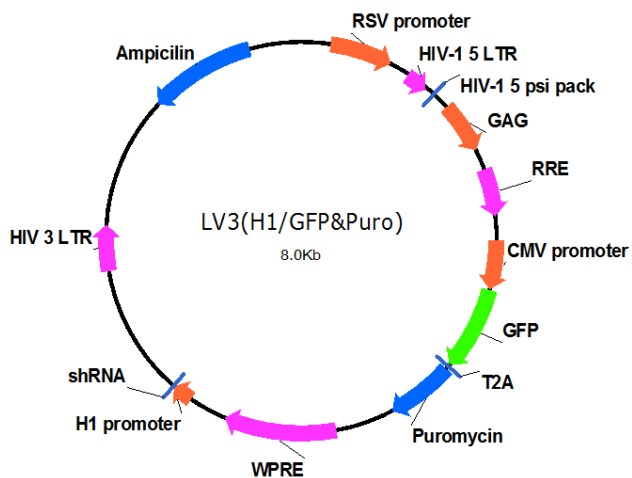
10.3.1 LV1 穿梭质粒



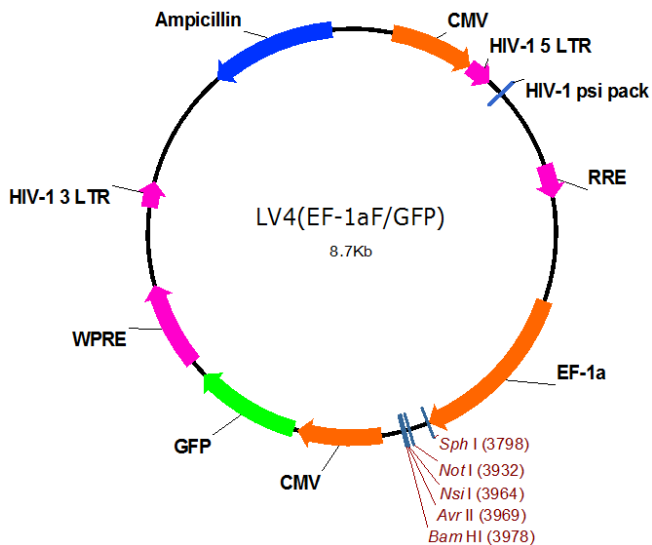
10.3.2 LV2 穿梭质粒



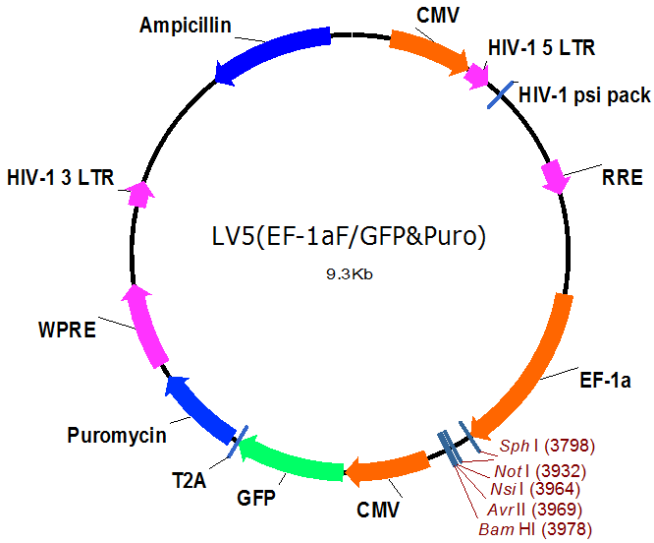
10.3.3 LV3 穿梭质粒



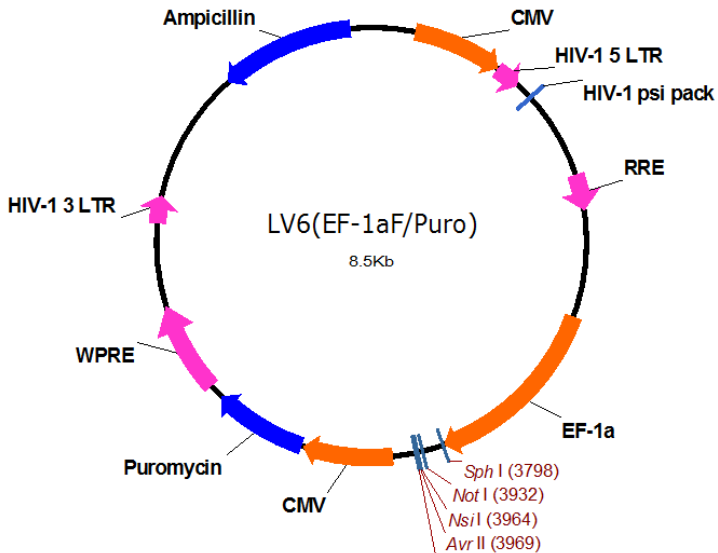
10.3.4 LV4 穿梭质粒



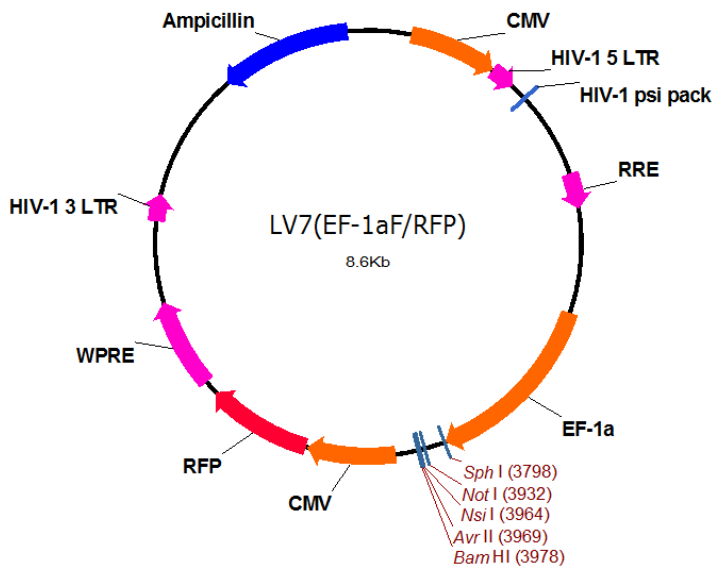
10.3.5 LV5 穿梭质粒



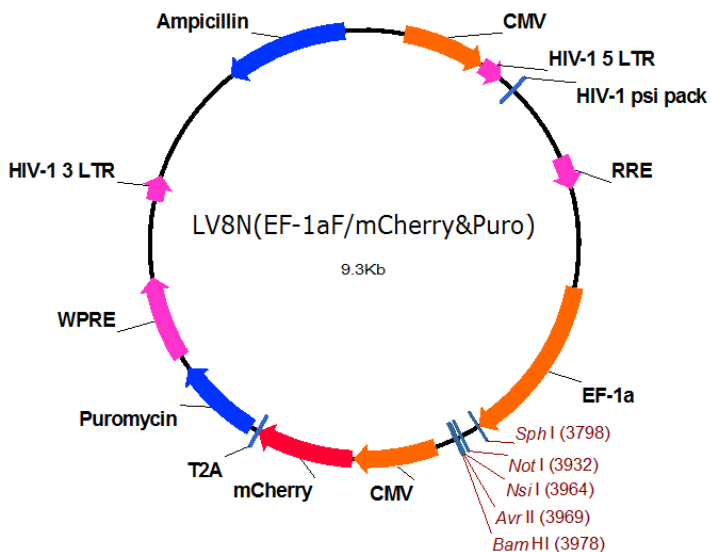
10.3.6 LV6 穿梭质粒



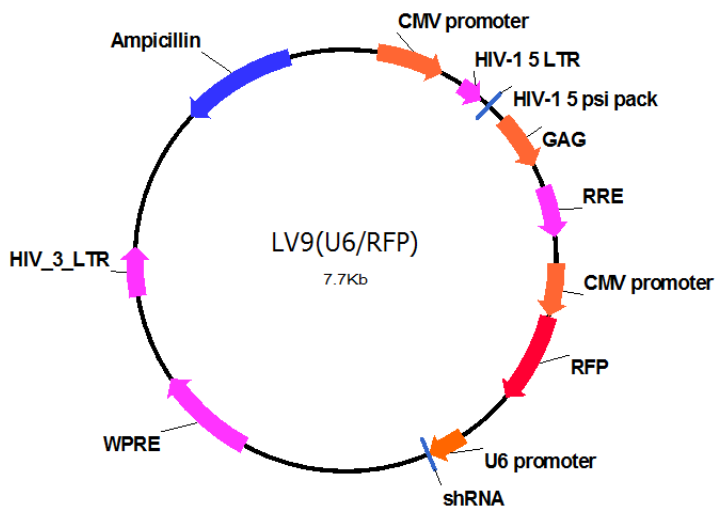
10.3.7 LV7 穿梭质粒



10.3.8 LV8N 穿梭质粒



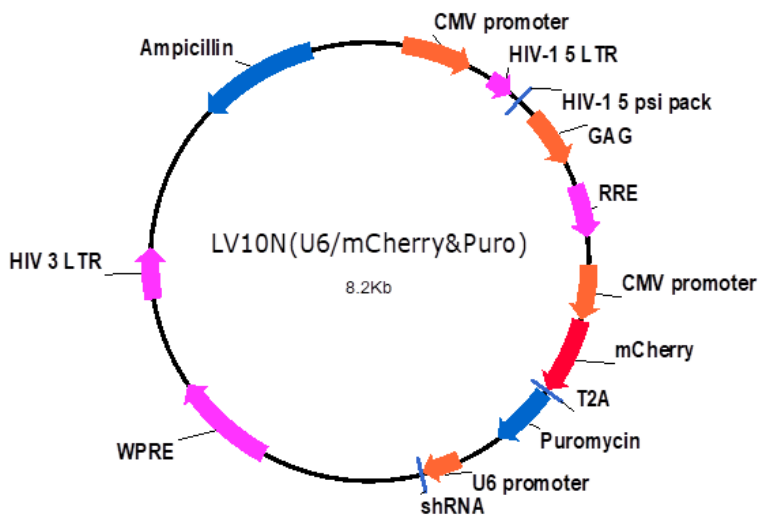
10.3.9 LV9 穿梭质粒



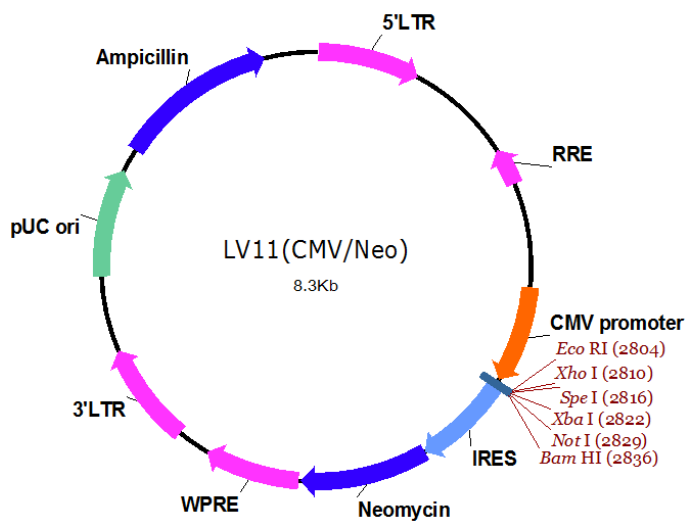
29

附录

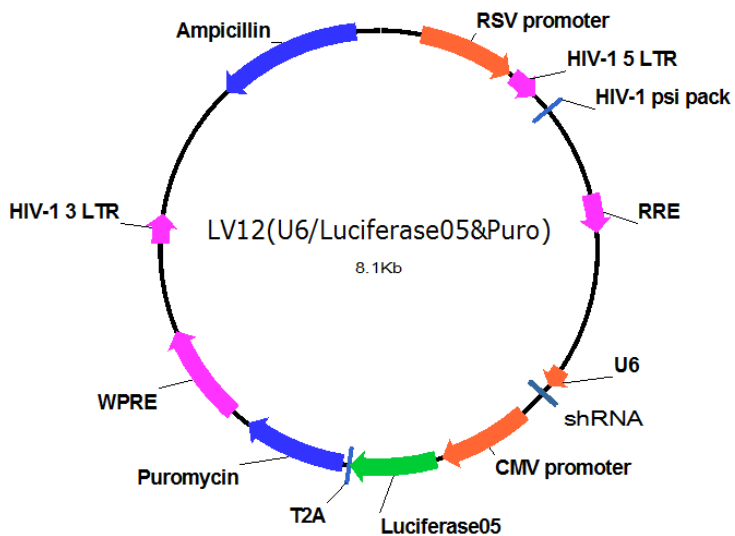
10.3.10 LV10N 穿梭质粒



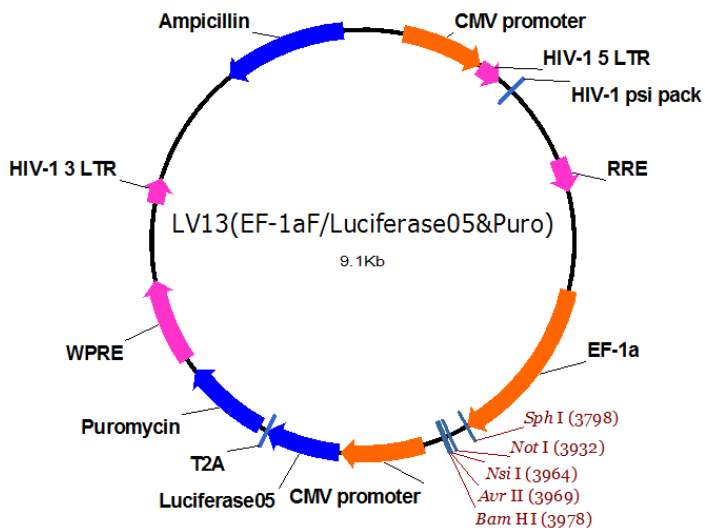
10.3.11 LV11 穿梭质粒



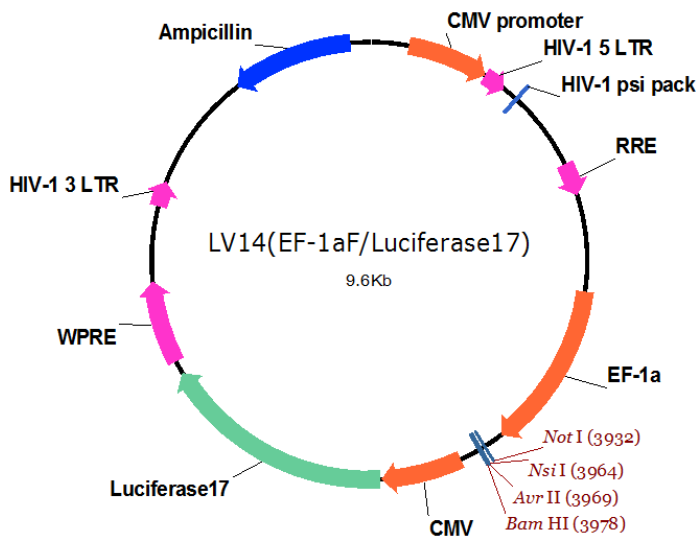
10.3.12 LV12 穿梭质粒



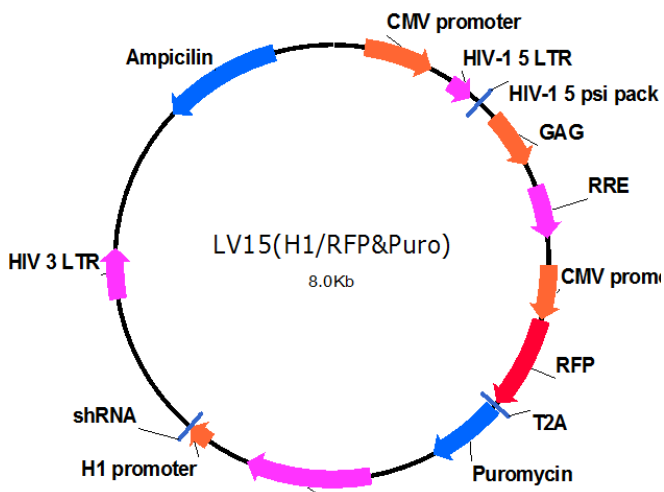
10.3.13 LV13 穿梭质粒



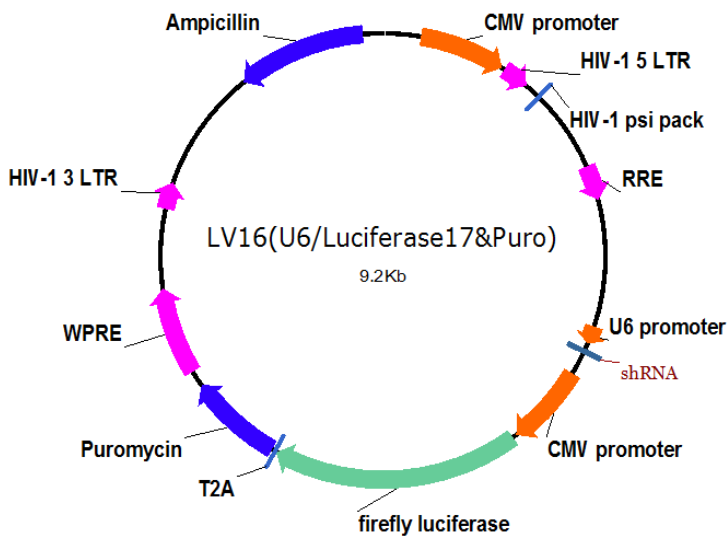
10.3.14 LV14 穿梭质粒



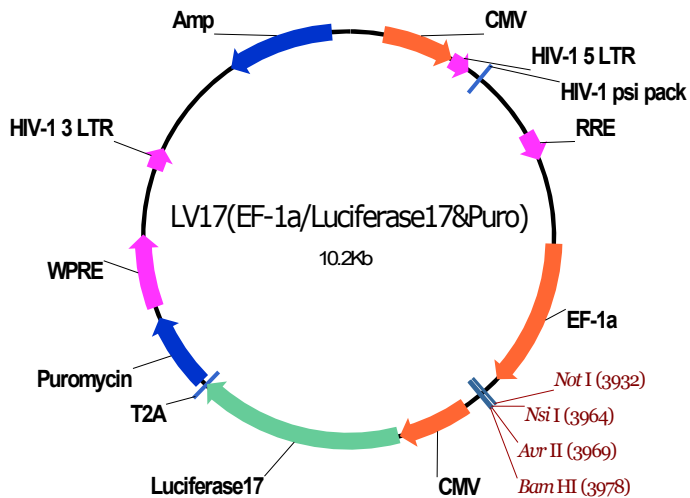
10.3.15 LV15 穿梭质粒



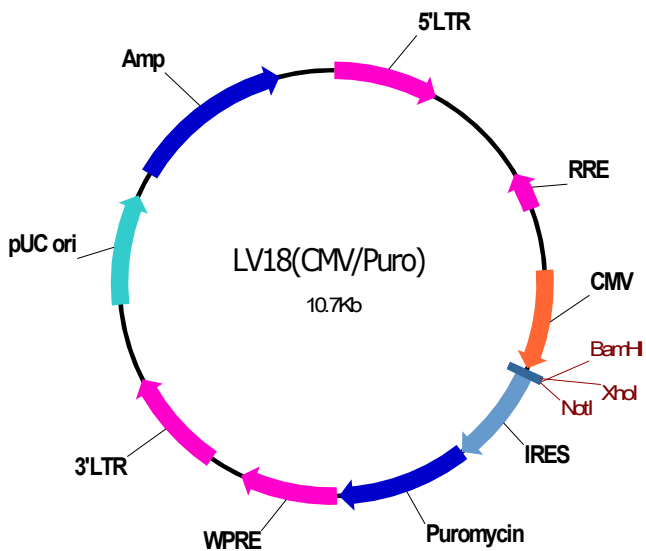
10.3.16 LV16 穿梭质粒



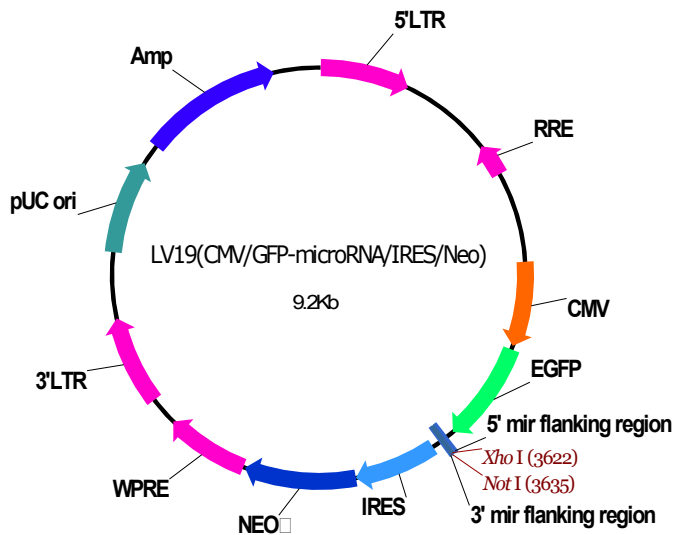
10.3.17 LV17 穿梭质粒



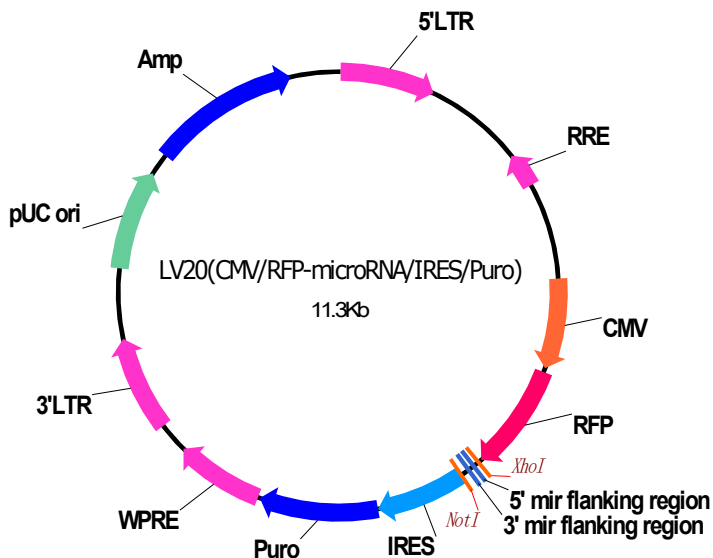
10.3.18 LV18 穿梭质粒



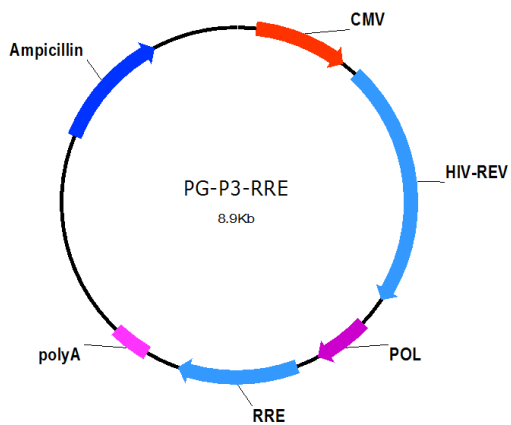
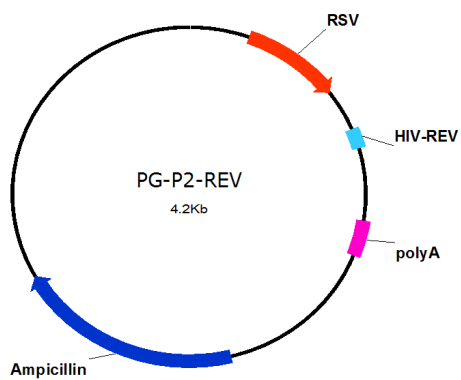
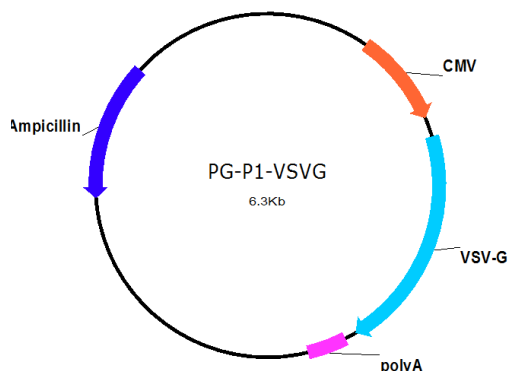
10.3.19 LV19 穿梭质粒



10.3.20 LV20 穿梭质粒



10.4 包装质粒图谱





上海吉玛制药技术有限公司

上海张江高科技园区哈雷路 1011 号

support@genepharma.com

021-51320195



苏州吉玛基因股份有限公司

苏州工业园区东平街 199 号

szsupport@genepharma.com

0512-86668828

