

慢病毒使用操作手册

1. 慢病毒安全使用规范

- 1.1 病毒操作时最好使用生物安全柜 (BL-2 级别), 如使用普通超净工作台操作病毒, 一定要关闭风机。
- 1.2 病毒操作时必须穿实验服, 戴口罩和手套, 尽量不要裸露双手及手臂的皮肤。。
- 1.3 操作病毒时必须特别小心, 不要产生气雾或飞溅。如果操作时超净工作台有病毒污染, 立即用 10%次氯酸钠溶液 (或 70%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, 培养液于 10%次氯酸钠溶液内浸泡 1h 以上后弃去。
- 1.4 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。
- 1.5 如需要离心, 应使用密封性好的离心管, 或者使用 parafilm 膜封口后离心, 而且尽量使用组织培养室内的离心机。
- 1.6 病毒操作完毕后, 脱掉手套, 用肥皂和水清洗双手。

2. 慢病毒的储存与稀释

- 2.1 **病毒的储存:** 收到慢病毒液后, 如果在一周内就使用的话, 可以将病毒置于 4℃保存; 如需长期保存需将病毒装入冻存管中置于-80℃冰箱 (注意: 病毒可以在-80℃保存 6 个月, 如果超过 6 个月, 建议使用前重新测滴度)。
- 2.2 **反复冻融对病毒的滴度:** 是有影响的, 每次冻融会使病毒的滴度降低 10%~50%左右, 所以尽量避免反复冻融, 建议分装成小体积的方便每次使用。所以我们前期对病毒进行了分装 (200 μL/tube), 收到后直接放置-80℃保存即可。
- 2.3 **病毒的稀释:** 客户如需稀释病毒, 可先将病毒冰浴融化, 再用完全培养基 (培养目的细胞用) 稀释混匀后 4℃保存 (不要使用振荡器), 为保证病毒滴度, 建议在一周内 (最好 3 天内) 使用完毕。如原病毒标记的滴度为 1×10^8 TU/mL, 取 10 μL 至 90 μL 的常规培养基中, 即可得到 1×10^7 TU/mL 滴度的病毒。

3. 慢病毒体外感染实验

3.1 预实验 (慢病毒感染靶细胞)

3.1.1 感染细胞最佳 MOI 的测定 ($MOI = [\text{病毒滴度 (TU/ml)} \times \text{病毒液体积}] \div \text{转染的细胞数}$)

公司提供的慢病毒为 VSVG 膜蛋白包裹的病毒。尽管与其他的膜蛋白相比, 它能够感染的细胞种类大大增加, 但对不同的细胞和组织的亲嗜性仍有差别。在使用慢病毒之前请查阅相关文献, 了解这种慢病毒对目的细胞的亲嗜性, MOI 值 (Multiplicity of Infection, 感染复数, 指每个细胞感染的病毒颗粒数) 以及体内 (in vivo) 注射所需的病毒量。如果没有相应文献的支持, 则需要检测病毒对目的细胞的亲嗜性。实际上即使有文献支持, 但因为不同实验、细胞代数、细胞状态等的关系, 细胞实际的 MOI 值和文献报道的往往会有差异。

通常对于如 H1299, U251, HeLa, 293 等分裂活性较高的细胞需要的 MOI 值较低 (1-4), 比如 HeLa、293 细胞, MOI=1 时, 80%以上的细胞均表达目的基因。而对于分裂活性较低的细胞, 如干细胞、DC 细胞, 原代细胞等, 需要的 MOI 值较高, 我们建议通过比较不同 MOI (比如 0、1、5、10、50、100 等), 选择适合的 MOI 进行实验。

一般做正式实验前都需要安排预实验，以了解细胞所需 MOI 值以及病毒对细胞状态的影响。大多数细胞的最佳 MOI 值一般在 10-40 范围。

以 96 孔培养板感染 293T 细胞为例，进行目的细胞和对照组细胞的感染预实验，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的病毒量。

Day1：细胞准备

目的细胞和平行对照组细胞（对慢病毒亲嗜性较高的细胞如 293T, Hela）以 1×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板中，每孔培养基的体积为 100 μ L，细胞数以第二天密度约 30~50% 左右为宜，37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

Day 2：病毒感染（1/2 小体积感染法）

我们推荐 1/2 小体积感染法，即病毒感染时，加入 1/2 体积新鲜培养液。

具体步骤如下。感染前，从冰箱取出病毒并在冰上慢慢融化，吸去细胞原有培养基，加入 1/2 体积新鲜培养基，96 孔板则加入 50 μ L 培养基，取值 MOI=3, 10, 30, 100，将病毒原液加入细胞中，对于需要加入 polybrene 的细胞，可同时加入适量 polybrene（Polybrene 在大部分细胞中可以有效提高感染效率），轻轻混匀（不要使用振荡器，勿产生气泡）。混匀后放于细胞培养箱（37 $^{\circ}$ C，5% CO₂）孵育过夜。加入慢病毒感染 4~6h 后补足至对应孔板正常培养体积（见表 1），96 孔板则补足至 100 μ L 培养体积

注：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。慢病毒对目的细胞的感染效率较低时，通过提高 MOI 值可以提高病毒的感染效率，但是当 MOI 值高于 20 时，我们建议在培养基中加入 Polybrene（具体浓度因不同的细胞而异，具体的请参考相关文献）来提高病毒的感染效率。

以病毒滴度为 1×10^8 TU/ml 为例，不同的 MOI 值加入的病毒量见下表。还可以根据实际实验需要设计更多的 MOI 值。

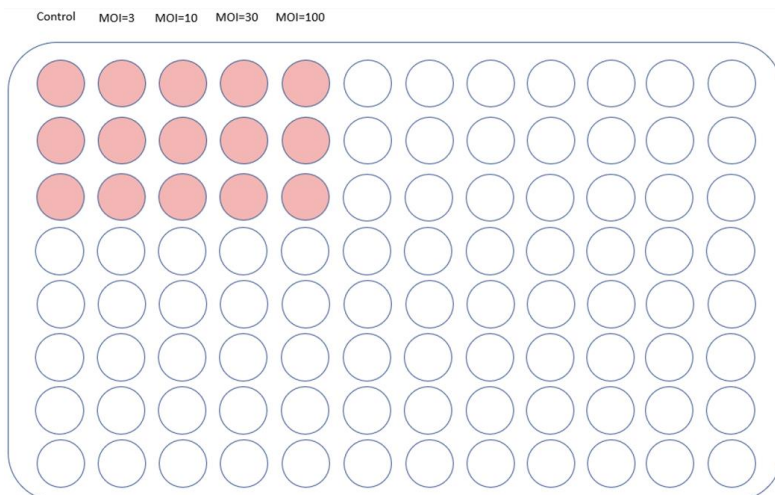


图 1 96 孔板示意图

注：1：保持细胞形态清晰、生长良好、无污染，为了减小误差，推荐平行感染 2~3 个复孔。

2：每孔加病毒量（ μ L）= MOI * 细胞数 / 病毒滴度（TU/mL） $\times$ 1000

孔板规格	单孔底面积	正常培养体积	感染时体积	MOI=3 加病毒量	MOI=10 加病毒量	MOI=100 加病毒量
96 孔板	0.3cm ²	100 μ L	50 μ L	0.3 μ L	1 μ L	10 μ L
48 孔板	0.6cm ²	200 μ L	100 μ L	0.6 μ L	2 μ L	20 μ L

24 孔板	2cm ²	500μL	250μL	1.5μL	5μL	50μL
12 孔板	4cm ²	1mL	500μL	3μL	10μL	100μL
6 孔板	10cm ²	2mL	1mL	6μL	20μL	200μL
T25 瓶	25cm ²	5mL	2.5mL	15μL	50μL	500μL
慢病毒感染4~6 h后补足至培养体积，感染24h后换液						

表 1 1×10^8 TU/mL 病毒感染细胞所用培养基体积和病毒量参考

Day 3: 细胞换液

慢病毒感染后第二天（约 24h）后将含有慢病毒的培养液更换成正常新鲜培养液：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 12~24 小时更换新鲜培养液后继续培养，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。

Day 4~6: 感染效率检测

感染 48h 后可荧光显微镜初步观察荧光，感染 72h 后，感染效率 80% 左右，且细胞生长状态良好的组，对应的感染条件和 MOI 以及 polybrene 的添加量即可作为后续感染参考的 MOI 值。对于生长缓慢的细胞，可适当延长观察时间。

注：如果病毒不带荧光，还可以通过目的基因的 qPCR、WB、免疫荧光、免疫组化等方法摸索最佳 MOI。

3.1.2 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，需要同时设置对照慢病毒亲嗜性较高的细胞（HEK293T, Hela 等）作为平行实验的对照细胞。
- ② 在进行慢病毒感染实验时，可以使用完全培养基（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。

3.1.3 Polybrene 的选择和浓度摸索

Polybrene 是一种常用的慢病毒感染增强剂（是一种带正电的多聚阳离子聚合物，与细胞表面的阴离子结合，可显著提高慢病毒对细胞的感染效率 10%~30%，使用过程中可以用 PBS 或者培养基稀释。

Polybrene 有一定的细胞毒性，不同细胞的敏感度不同，有的细胞对 Polybrene 的毒理反应明显，因此细胞感染时是否适合 Polybrene 以及浓度需要摸索：摸索范围 $1 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ 的浓度（多数细胞常用的使用浓度 $4 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ ），以 24h 内细胞无明显毒性反应为佳，可参考文献并进行预实验摸索。（对于 293 细胞，Polybrene 终浓度一般为 $6 \mu\text{g/mL}$ ）

注：1) 公司提供的 Polybrene 产品，用户可用以进行辅助感染。Polybrene 母液保存在 -20°C （可稳定保存一年），避免反复冻融 3 次以上，否则活性受影响。 4°C 可保存 2 周。

2) Polybrene 预实验请先以对照病毒进行摸索，部分细胞系 MOI 及 Polybrene 的使用见附录。

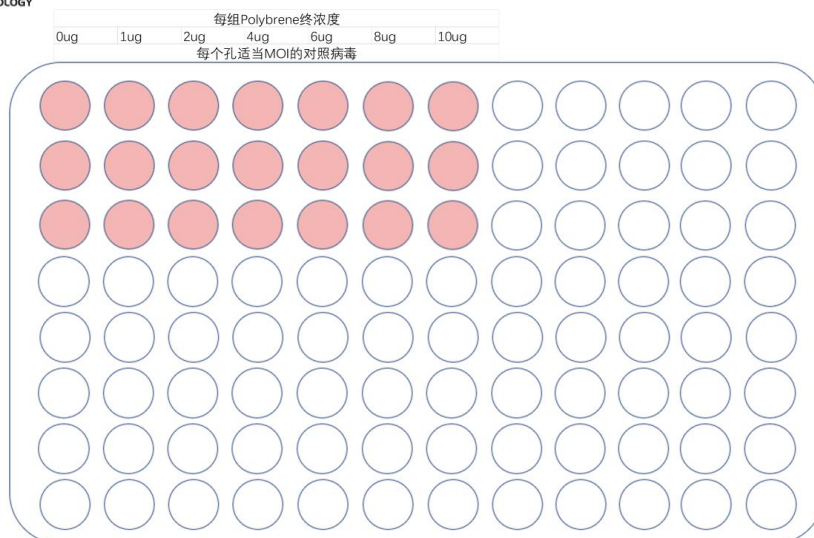


图 2 96 孔板示意图

注： 1： 保持细胞形态清晰、生长良好、无污染，为了减小误差，推荐平行感染 2~3 个复孔。

2： Polybrene 预实验可先使用对照病毒进行摸索。

3.2 正式实验（慢病毒感染靶细胞）

通过细胞预实验可以大致知道使用慢病毒感染目的细胞的优化条件，例如需不需要添加 Polybrene，MOI 值是多少？正式实验时所用的细胞数往往比预实验的多，这就会存在一个计算病毒用量的问题。放大的原则是保持病毒的浓度不变（具体依据不同的 MOI 值参考表 1 缩放）。（注意：细胞的种板密度跟最终的感染效果很有关系，通常感染细胞的聚合度为 30~50%左右。遇到生长较快或慢的细胞，聚合度应适当降低或增加，以使得感染后的细胞 3 天培养至 70%以上密度为宜。）

慢病毒载体是一个接近 100nm 大小的颗粒，在溶液上层中的病毒颗粒很少有机会接近细胞。感染时减少培养基的体积能提高病毒的感染效率。通常我们在感染 6 孔板时将培养基体积减少到 1mL，即当细胞的 MOI 值为 10 时，加入 20 μ L 的 1×10^8 TU/mL 病毒。同样，12 孔板时体积减少到 500 μ L、24 孔板减少到 250 μ L。

（不同孔板的病毒用量见表 1）由于存在不完全成比例的放大，再加上细胞状态，细胞聚合度不同，病毒滴度和真实值之间会有差异，所以如果需要大量的病毒感染细胞之前，还可以在选择 24 孔板再尝试一次感染。假设细胞的 MOI=10，病毒滴度时 1×10^8 TU/mL，细胞聚合度为 30~50%左右，病毒用量可设计为 25 μ L，15 μ L，10 μ L，感染体积 500 μ L，进一步筛选出更加优化的感染条件。

3.2.1 感染方法

A. 按实验需要将细胞铺板（比如 6 孔板）。细胞以第 2 天密度约 30~50%为宜。37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

B. 感染前，慢病毒从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出后冰浴融化，参考相关文献或者根据预实验得到的病毒感染的适当 MOI 值和 Polybrene 最终浓度。取适量的病毒原液+ Polybrene 加入到已含有 1mL 新鲜完全培养基的 ep 管中，稀释成所需 MOI 浓度和 Polybrene 浓度的病毒（假设预实验得到的细胞的 MOI 值为 10，Polybrene 最终浓度 5ug/mL，则 6 孔板感染时一个孔所需病毒为 1×10^8 TU/mL 病毒 20 μ L 以及 Polybrene 量 0.5 μ L（Polybrene 母液浓度 10mg/ml）。注

意：轻轻混匀（不要使用振荡器）。

（每孔加病毒量（ μL ）=MOI*细胞数/病毒滴度（TU/mL） $\times 1000$ ）

C. 吸去细胞原有培养基，沿孔壁将按照 MOI 稀释好的病毒液加入对应孔中，勿吹起细胞。轻轻摇匀。然后把培养板放回 37°C 培养箱孵育。

注：慢病毒对目的细胞感染效率较低时，可以通过提高 MOI 值来提高感染效率，但当 MOI 高于 20 时，一般建议添加 Polybrene（终浓度 1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，浓度因不同的细胞而异，具体的请参考相关文献）来提高病毒的感染效率。如果感染目的细胞是 Jurkat, kasumi, NB4, H929, GBC-SD, MCF-7 等，不建议添加 Polybrene；大部分原代细胞感染也不建议添加 Polybrene，以上仅供参考，具体详见附录。

注：融化的病毒置于冰上。反复冻溶或长时间将病毒颗粒暴露于常温会使病毒效价降低。

D. 感染 4~6h 后，可补充 1mL 完全培养基，37°C 过夜培养。

E. 感染 24 小时后，吸除含慢病毒的培养基，换为 2mL 新鲜的培养基，继续培养。

F. 继续培养 48-96 小时后，在荧光显微镜下观察荧光表达情况，也可根据需要收集细胞检测目的基因 qPCR 或者目的蛋白的表达。对于生长缓慢的细胞，可适当延长观察时间，以及细胞后续的相关检测。

注：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 12 ~ 24 小时更换新鲜培养液后继续培养，步骤 E 换液后，如果慢病毒对细胞没有明显毒性作用，后续按照细胞正常培养条件培养换液即可。

G. 如果慢病毒感染靶细胞效率较低，可以尝试在第一次感染 24~48 小时后根据细胞状态，再次加入按照 MOI 计算所需病毒颗粒量或者适当减少的病毒量对靶细胞进行复感，可能会提高靶细胞的感染效率。

4. 悬浮细胞的感染方法

A. 根据细胞的量将细胞在 1.5mL EP 管中低速离心收集然后用 100 ~ 200 μL 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。

B. 按照 MOI 换算病毒颗粒数量，吸取适量病毒液加入细胞中，轻轻吹打混匀 5-10 下，将 1.5mL EP 管放在 37°C 培养箱中孵育 20 分钟。（尽量不要超过 30 min，间隔 10 min 可以再吹打一次）

C. 将管中细胞和病毒液混合溶液吸出加到对应的培养皿中继续病毒感染过夜后换液即可。

D. 加入对应孔板感染病毒时所需的新鲜培养液（参考表 1）。

E. 24 小时后换液（若细胞耐受差，可提前至 12h 后换液）。

F. 96 小时后观察细胞阳性率。

注：1：对于难转染的悬浮细胞，可以采用平角离心转染法，将细胞种于平底 EP 管中，加入适量的病毒液/将适量的病毒液加入对应细胞培养皿后，封好口，放入平角离心机后，低速（1200g）常温离心约 1h，然后放入培养箱中正常培养即可。

2：对于极难感染的细胞，如 DC（树突状细胞）等，可采用多次感染的方法，即感染 24h 后，直接二次加入病毒液进行重复感染，可显著提升感染效率。

3：对于一些传代能力较差的原代细胞，如 BMSC 等，建议用滴度更高的腺病毒进行感染。

5. 构建慢病毒稳转株-抗性筛选（依据实验需求选做）

Puromycin 抗性筛选：对于携带 Puromycin 抗性的病毒，一般在感染 48-72h 后，需要加入 Puromycin 进行筛选。筛选浓度在 1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，不同的细胞所需的 Puromycin 浓度不同，

在筛选之前，需摸索能够杀死空细胞的最低 puromycin 浓度：可将细胞铺相应孔板，使第二天融合率约为 50~60%，24h 后更换含不同浓度 puromycin 的完全培养基（可先文献查询细胞的 puromycin 浓度，再设置合理的浓度梯度）。puromycin 梯度可设置为 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 μ g/mL 处理 48h），选取能够杀死 90%以上空细胞的最低浓度进行后续实验。（无此抗性不需要操作此步骤，或者实验不需要可忽略此步骤）

筛选时，请设置未感染病毒的空细胞对照实验组，并加入等量浓度的 puromycin。慢病毒感染 48-72h 后，感染效率约在 80%左右并且细胞汇合度在 60-70%时，以摸索到的 puromycin 浓度进行处理（具体以细胞状态而定，细胞状态稳定后加）。加 puromycin 后约 48h 观察对照组空细胞的死亡情况，若空细胞组细胞死亡率达 90%以上，撤掉 puromycin 换新鲜的培养基培养。后期可根据空细胞的生长速度进行定期药筛。

筛选细胞的放大培养：puromycin 筛完后，待细胞长满可按适当比例传代培养，等到扩增到一定的细胞数量后即可进行单克隆稳定株筛选或混合克隆稳定株筛选。

Cell line	Species	Puromycin(μ g/ml)
293 系列	Human	3
HeLa	Human	3
B16	Mouse	1-3
PC1.0	Hamster	10
MC3T3-E1	Mouse	10
H9C2	Rat	1
MCF-7	Human	1-3
MDA-MB-xxx	Human	1-3
HepG2	Human	2
HT1080	Human	1
A549	Human	1.5
H1299	Human	2
Human embryonic stem cells	Human	1

表 2 部分不同细胞稳转株筛选 Puromycin 推荐使用浓度

①多克隆筛选：每 2 天换一次含 Puromycin 的完全培养液，每天观察细胞荧光表达比例，筛选至几乎所有的细胞产生荧光为止，期间可进行细胞传代。最佳筛选时间 7-10 天。

②单克隆筛选：对于有单克隆需求的情况。可采用有限稀释法，挑选出表达量适中的单克隆，扩增后进行冻存。

四环素调控：对于四环素（Tetr）调控的慢病毒，在慢病毒感染 24h 后，加入 0.5~3 μ g/ml 四环素 诱导，一般 24h 后目的基因开始表达，72-96h 表达量出现峰值，并且随着四环素浓度增大，表达量上升。（无此抗性不需要操作此步骤，或者实验不需要可忽略此步骤）

附录 慢病毒 MOI 感染参数

以下数据是在细胞感染效率在 85-100%细胞状态良好的情况下获得的，仅供参考。

细胞系名称	细胞描述	MOI 值范围	能否添加 polybrene
K562	人白血病细胞	20~40	可
Jurkat	人白血病细胞株	50~80	不可
kasumi	人白血病细胞株	10~30	不可
NB4	人白血病细胞株	50~80	不可
U937	人单核细胞	20~40	可
THP-1	人单核细胞株	50~80	可
GBC-SD	人胆囊癌细胞株	30~50	不可
H929	人多发性骨髓瘤细胞系	100~150	不可
H1299	人非小细胞性肺癌细胞	1~3	可
95D	人肺巨细胞癌	2~4	可
A549	人肺腺癌	20~40	可
SPC-A-1	人肺腺癌细胞	100~150	可
7402	人肝癌细胞	10~15	可
Hep 3B	人肝癌细胞	10~30	可
Hep G2	人肝癌细胞	10~30	可
SMMC-7721	人肝癌细胞	10~30	可
Huh-7	人肝癌细胞系	10~30	可
Hela	人宫颈癌细胞株	10~30	可
HOS	人骨肉瘤细胞系	20~40	可
Hep-2	人喉癌细胞株	10~30	可
HL-60	人急性髓系白血病细胞株	>100	可
HT-29	人结肠癌细胞	10~30	可
PKO	人结肠癌细胞	2~4	可
SW480	人结肠癌细胞株	10~30	可
DLD-1	人结直肠肿瘤细胞株	10~30	可
SK-OV-3	人卵巢癌细胞株	2~4	可
SHG-44	人脑胶质瘤细胞	10~30	可
U251	人脑胶质母细胞瘤	1~3	可
U87	人脑星型胶质母细胞瘤	1~3	可
293T	人胚肾上皮细胞	1~3	可
HUVEC-2C	人脐静脉血管内皮细胞	10~30	可
PC-3	人前列腺癌细胞	20~40	可
MDA-MB-231	人乳腺癌细胞	10~30	可
MCF-7	人乳腺癌细胞株	20~40	不可
Tca8113	人舌鳞状细胞癌	10~30	可
RPE	人视网膜色素上皮细胞	10~30	可

AGS	人胃癌细胞	100~150	可
BGC-823	人胃癌细胞	100~150	可
SGC-7901	人胃癌细胞	10~30	可
MKN-28	人胃癌细胞株	20~40	可
MKN-45	人胃低分化腺癌细胞株	20~40	可
BxPc-3	人胰腺癌细胞	20~40	可
CFPAC-1	人胰腺癌细胞	50~80	可
Panc-1	人胰腺癌细胞	2~4	可
HEC-1-B	人子宫内膜癌细胞株	2~4	可
NIH-3T3	小鼠成纤维细胞系	20~40	可
Raw264.7	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞	10~30（感染后分化）	不可
CHO	中国仓鼠卵巢细胞	20~40	可
HSC- T6	大鼠肝星型细胞	10~30	不可
C6	大鼠脑胶质瘤细胞	>100	可
NRK	大鼠肾细胞	10~30	可

常见问题集锦：

1、什么是 MOI？如何通过 MOI 计算需要加入的病毒量？

MOI，感染复数，是指每个细胞感染的病毒数，通常需要 MOI 值越高的细胞越难被感染。一般把某株细胞有 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。

相关计算公式：每孔加病毒量（ μL ）=MOI*细胞数/病毒滴度（TU/mL） $\times$ 1000

MOI=（病毒滴度 $\times$ 病毒体积）/细胞数目

2、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 2~3 天可观察慢病毒携带的基因荧光表达情况，在细胞汇合度 30~50%且细胞状态良好时加入慢病毒，确保在感染后 2 天时细胞增长达到 70%以上的汇合度为佳。

3、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佳。

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 30~50%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 70~80%左右

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 100%的汇合度进行接种。

4、慢病毒感染细胞后什么时间基因表达达到峰值？

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

5、对照病毒或目的病毒感染细胞以后，细胞形态发生改变或者细胞死亡？

首先，确定病毒是否有污染，常见污染类型及处理方法：

- ① 细菌污染，病毒用 Millipore 的 0.22 μm 滤器过滤去除细菌；
- ② 真菌污染，病毒直接丢弃
- ③ 支原体污染，可用抗支原体试剂



芊陌生物慢病毒产品严格质检，确保慢病毒产品没有支原体污染。市场上有些慢病毒供应商为了降低成本缩短周期，削减支原体污染检测工序，不仅影响客户的实验成败，更给客户细胞房污染造成潜在影响。

④ 病毒纯度不够：与供应商联系确认慢病毒产品是否经过超速离心纯化！目前市场上很多低价慢病毒产品仅经过初步纯化，未使用超速离心机进行纯化；

芊陌生物慢病毒产品全部经过超速离心纯化，尤其适合对杂质敏感的细胞株！

其次，确定病毒感染 MOI 是否过高，降低 MOI 值，并在感染后的 4h、8h、12h 对细胞进行观察，若发现细胞状态变差时，则需要使用新鲜的完全培养液替换病毒感染培养液。

排除以上因素后细胞状态仍然不好，可**尝试增加血清含量**，观察细胞状态是否好转。

6、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种因素影响，如病毒活性、细胞自身的状态、MOI 值、感染时间等。

- ① 病毒活性，解冻病毒一定要在冰上进行，尽量避免反复冻融。 -80℃保存半年以上需要重新测滴度；
- ② 目的细胞，先进行预实验测试，看病毒载体是否合适感染目的细胞。一些难感染的细胞，如贴壁不好的细胞，原代细胞等适合用腺病毒；对于悬浮细胞，可采用离心感染的方法，减少病毒感染时的体积，从而提升感染的效率；
- ③ MOI 值，进行 MOI 梯度摸索实验，找出最优的 MOI 浓度；
- ④ 感染时间，慢病毒/逆转录病毒一般在感染后 24h 换液，太早换液会导致感染效率下降；换液太晚，则对细胞的损伤太大。感染后 48h 开始观察荧光，由于慢病毒表达时间较长，有的 72h、120h 才能看到荧光；
- ⑤ 助转剂，Polybrene 有一定的细胞毒性，不同细胞对 polybrene 的敏感度不同，可以用 1-10ug/mL 的范围筛选合适的浓度；

PS：慢病毒带 puromycin 抗性的可以用嘌呤霉素筛选，也可提高阳性细胞率。

7、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，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 前的启动子活性等因素。

GFP 基因荧光表达的强度与启动子的活性、目的细胞感染的病毒颗粒数呈正相关。慢病毒在增殖较快的细胞中感染 72~120 h，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久。GFP 基因接在强启动子后面时荧光表达较强，弱启动子则荧光表达较弱。

观察荧光时最好关掉室内灯光，只留荧光显微镜光源。

8、为什么过表达慢病毒比对照的荧光要暗？

每种病毒有自己的载体容量，基因的插入会影响位于其下游的荧光蛋白等基因的表达。

对照病毒或干扰病毒，由于没有插入基因或者插入基因非常短，荧光通常较强。而插入了较长基因之后，荧光的亮度会随着插入基因的长度以及特殊结构的存在等而减弱，尤其是出现高 GC 片段，由于影响了转录，荧光强度会大大降低。

其次，对照病毒相对滴度可能比较高一些，同等体积的病毒，对照的病毒量大，可能对细胞的影响大。

第三，有些病毒供应商对照和目的病毒的纯化工艺可能不一致，导致目的或者对照病毒对细胞毒性大。

芊陌生物所有病毒同样的纯化工艺，病毒无支原体污染，质控严格。

9、要曝光很长时间才能观察到荧光？

可能的原因有：

- ① 显微镜汞灯使用时间长，可以通过对照病毒排除，若对照较亮可排除显微镜问题；
- ② pH 值低，看培养基是否发黄，pH 值较低会导致绿色荧光淬灭

上海芊陌生物科技有限公司 南京芊陌生物科技有限公司

网址：www.qianmobio.com

③ 目的病毒光不亮, 插入目的基因后的病毒荧光强度会相较对照弱一些, 属于正常现象, 可加长曝光时间。

实验室病毒操作应急预案

病毒液体接触到皮肤或眼睛

- 1、脱掉污染的手套或者其他防护物, 立即用含 75%乙醇消毒液 (或者 0.2-0.5%的过氧乙酸、0.5~1g/L 有效氯消毒液、碘酒) 的棉球擦拭, 切不可用 84 消毒液, 以免灼伤皮肤。并且用大量清水冲洗, 至少 15 分钟。
- 2、如果遇到针头扎伤或者刀片割伤时, 第一时间处理伤口, 应立即用力捏住受伤部位, 向离心方向挤出伤口的血液, 不可来回挤压, 同时用流动水清洗伤口, 至少 15 分钟。
- 3、若感染性物质意外进入眼睛、口腔, 立即用大量流动清水或生理盐水冲洗, 至少 15 分钟。
- 4、病毒污染眼部或周围: 立刻用洗眼器或洗眼液冲洗眼部, 至少 15 分钟, 并到医院开具抗病毒眼药水。
- 5、经简单处理或消毒后, 务必立即前往急诊室就诊。保留完整适宜的医疗记录。
- 6、意外受伤或感染后必须在 24 小时内报告实验室管理人员, 并填写生物安全事件报告书。

病毒溢出污染离心机

- 1、遇病毒溢出污染离心机, 应立刻停止离心, 离开实验室, 开启实验室紫外灯 60 分钟。离心机一个小时后打开, 让病原物质沉降一下, 然后工作人员戴双重口罩或 N95 口罩, 用镊子和酒精擦拭污染部位。
- 2、处理完毕后, 脱弃外层手套, 再开紫外照射 60 分钟。填写意外事故登记表。

温馨提示: 如涉及到使用本公司产品发表文章请引用产品来源, QianMoBio Co. Ltd, shanghai, China, 上海芊陌生物科技有限公司。对于引用注释本公司产品发表的 SCI paper, 联系销售或者本公司, 可获取对应的科研奖励金。