

慢病毒使用说明书

一、准备工作

- 1、防护措施：穿好实验服，戴好一次性手套、口罩。
- 2、操作环境：生物安全柜或超净台。

二、病毒储存及解冻

- 1、收到病毒后请尽早使用，4°C只可短暂放置，-20°C可短期储存，-80°C可长期储存；
- 2、使用前解冻需在冰上或者4°C进行；
- 3、请勿反复冻融病毒，每次冻融会导致病毒滴度大幅下降，首次解冻可根据实验需求进行分装并储存于-80°C。储存时间超过6个月，建议使用前重新测定滴度。

三、病毒用量计算

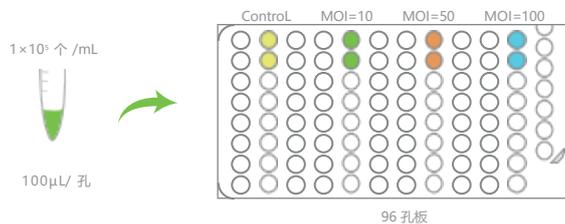
- 1、圣尔生物提供的慢病毒单位为TU/mL，即1mL慢病毒中具有生物活性的慢病毒颗粒数。如：病毒滴度为 $\geq 5 \times 10^8$ TU/mL，即1mL慢病毒中至少含有 5×10^8 个具有生物活性的病毒颗粒。
- 2、感染复数(MOI值)，是指用于感染细胞的活性病毒颗粒数与实际成功被感染的细胞数的比值。例如MOI=1，则1TU活性病毒可成功感染1个细胞；MOI=50，则需要50TU活性病毒才可成功感染1个细胞。
- 3、成功感染细胞所需病毒体积(μ L) = 细胞的MOI \times 细胞总数量 / 病毒滴度(TU/mL) $\times 1000$

由于感染细胞所加入病毒量不足会导致感染成功率较低，而加入病毒过量会导致细胞状态较差无法扩增，因此选取合适的病毒量对于成功感染细胞并获得状态较好的稳转株非常重要。然而不同类型细胞的MOI值不尽相同，而且同类型细胞在不同培养状态的MOI值也存在差异，因此进行感染预实验显得尤为重要。根据实际情况可进行如下标准感染预实验或快速感染预实验。

【标准感染预实验】

Day1：细胞接种

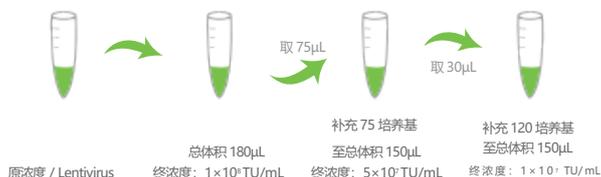
按图将细胞接种至96孔板，细胞量约为 1×10^4 个/孔，37°C培养约8h



Day2：病毒感染

1、用培养基稀释慢病毒至以下滴度：

- MOI=100: 1×10^8 TU/mL
- MOI=50: 5×10^7 TU/mL
- MOI=10: 1×10^7 TU/mL



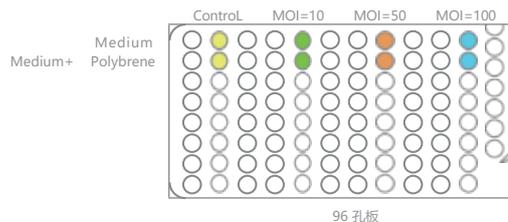
注：依据细胞感染难易程度，可按相同方法增设若干组，如：MOI=1、10、20、30、50、80、100等。

2、更换培养基，按下表依次加入慢病毒，混匀后37°C继续培养。

感染条件	Control	MOI=10 (1×10^4 TU/mL)	MOI=50 (5×10^4 TU/mL)	MOI=100 (1×10^5 TU/mL)
完全培养基	完全培养基: 100 μ L	病毒: 10 μ L 完全培养基: 100 μ L	病毒: 10 μ L 完全培养基: 100 μ L	病毒: 10 μ L 完全培养基: 100 μ L
完全培养基 +100 \times Polybrene	100 \times Polybrene: 1 μ L 完全培养基: 99 μ L	病毒: 10 μ L 100 \times Polybrene: 1 μ L 完全培养基: 89 μ L	病毒: 10 μ L 100 \times Polybrene: 1 μ L 完全培养基: 89 μ L	病毒: 10 μ L 100 \times Polybrene: 1 μ L 完全培养基: 89 μ L

Polybrene 用量可参考下表

细胞器皿	单孔底面积(cm^2)	接种体积	感染时体积	100 \times Polybrene 用量/孔
96孔板	0.32	100 μ L	100 μ L	1 μ L
24孔板	2	500 μ L	500 μ L	5 μ L
12孔板	4.5	1mL	500 μ L	5 μ L
6孔板	9.6	2mL	1mL	10 μ L
6cm培养皿	21	5mL	2.5mL	25 μ L
10cm培养皿	55	10mL	5mL	50 μ L



Day3-4：细胞培养

感染8~12h后换液，观察细胞形态，保持细胞正常生长，之后可正常换液传代。

Day5：感染效果确认

感染72h后用倒置荧光显微镜观察细胞荧光表达丰度，选择荧光效率80%以上，且细胞状态良好的组所对应的MOI值作为最佳MOI值。

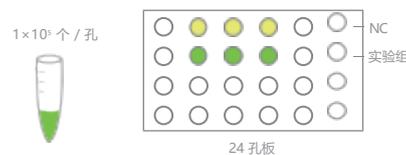
快速感染预实验

根据文献或者报道直找到同类型细胞的MOI值，根据该MOI值进行细胞铺板并待贴壁后根据公式计算后加入对应体积的病毒进行预实验，如感染效果较好可根据预实验加入量直接进行放大感染，如感染效果不好可在已感染细胞的基础上计数后重复感染直到感染成功。细胞培养及感染效果确认参照标准感染预实验。

【感染正式实验】

Day1：细胞接种

将细胞接种至24孔板，细胞量约为 1×10^5 个/孔，37°C培养约8h，至密度为50~60%。



Day2：病毒感染

根据预实验得到的最佳MOI值及病毒滴度，按照公式计算并加入相应的病毒体积。

Day3-4：细胞培养

感染8~12h后换液，观察细胞形态，保持细胞正常生长，之后可正常换液传代。

Day5：观察感染效率

感染72h后用倒置荧光显微镜观察细胞荧光表达丰度，进行后续实验。如病毒不带荧光标签，可在病毒感染后72h，加入相应的抗性药物(如Puromycin等)进行筛选。