

2021
重组慢病毒载体
使用手册

Discoverer of Chinese Innovative Drug Targets

中国创新药物靶标发现者

■ 慢病毒使用安全注意事项	02
■ 慢病毒的储存&稀释	03
■ 特殊细胞感染注意事项	04
■ 慢病毒的使用-贴壁细胞感染实验	05
■ 慢病毒的使用-贴壁细胞感染预实验	09
■ 慢病毒的使用-悬浮细胞感染实验	11
■ 慢病毒的使用-悬浮细胞感染预实验	15
■ 慢病毒感染常见问题	17
■ 附录1-稳定株筛选实验	20
■ 附录2-常见细胞MOI和感染条件	21
■ 附录3-慢病毒感染增强液HitransG A说明书	26
■ 附录4-慢病毒感染增强液HitransG P说明书	28
■ 附录5-Quick Protocol	30

▶ 慢病毒使用安全注意事项

慢病毒使用安全注意事项

吉凯基因提供的慢病毒为“自杀”性病毒，即病毒感染目的细胞后不会再感染其他细胞，也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒。慢病毒中的毒性基因已经被剔除并被外源性目的基因所取代，属于假型病毒。但该病毒仍然具有潜在的生物学危险，因此**使用慢病毒进行实验时请参照以下标准操作**：



A.

病毒操作时请穿实验服、戴手套、口罩和帽子



B.

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. 操作病毒时特别小心不要产生气雾或飞溅。
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。



C.

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。



D.

如不小心接触到皮肤请立即用大量肥皂水冲洗；实验结束后，用肥皂和水清洗双手。

慢病毒的储存&稀释

- A. 储存条件及期限：** -80°C 12个月
4°C 一周

如需多次使用，请将慢病毒分装存后放于-80°C，避免反复冻融

注：反复冻融会降低病毒滴度，因此在使用过程中应尽量避免。吉凯基因对病毒已经进行了分装（50ul/tube），收到后请直接放置-80°C 保存即可。

- B. 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。稀释后的病毒请立即使用，不建议再分装冻存。
- C. 吉凯基因提供的慢病毒单位标识为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：病毒滴度为 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。“TU”为“Transducing-Units”的缩写，中文为转导单位，表示可以感染并进入到目标细胞群中的病毒基因组数。**

► 特殊细胞感染注意事项

特殊细胞感染注意事项

A. 悬浮细胞

对于悬浮细胞，可采用离心感染方法提高感染效率。加入病毒之后，将培养板密封，用平角转子离心机1000g离心1h，再放回培养箱中正常培养。

B. 极难感染的细胞

对于极难感染的细胞，可采用多次感染的方法，即感染一次后，重新加入新鲜病毒再次感染，可显著提升感染效率。但需要注意调整两次感染间细胞状态。

C. 传代能力较差的原代细胞、非分裂细胞

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。

▶ 慢病毒的使用

贴壁细胞感染实验

贴壁细胞感染预实验

▶ 慢病毒的使用—贴壁细胞感染实验

慢病毒在原代细胞和细胞系水平的使用

实验材料

A. 试剂

HitransG A感染增强液（25x）、HitransG P感染增强液（25x）、细胞培养基

B. 耗材

细胞培养孔板、枪头、Ep管、75%消毒酒精、次氯酸钠溶液（84消毒液）、废液缸、口罩、手套

C. 仪器

1-10 μ l移液枪、20-200 μ l移液枪

HitransG A：

吉凯基因自主研发的病毒感染增强液。它的主要成分是一种新型的高分子非离子表面活性剂，同时也是一种细胞保护剂和促进吸收剂。它可以通过提高细胞表面活性，增加病毒与细胞的接触面积，促进病毒高效感染细胞，且对细胞毒性极低，适合敏感细胞使用。

HitransG P：

吉凯基因自主研发的病毒感染增强液。它的主要成分是一种阳离子聚合物，通过抑制细胞膜与病毒之间的电荷排斥，增加慢病毒对细胞的感染效率。本产品可以极大提高细胞感染效率，且细胞毒性显著低于Polybrene。我们建议将它替代 Polybrene使用。

由于不同细胞对慢病毒和感染试剂的耐受性，建议初次使用时，设置HitransG A、HitransG P平行对照组，以便选择最适合您细胞的感染增强液。

▶ 慢病毒的使用—贴壁细胞感染实验

贴壁细胞感染实验

如第一次使用慢病毒

A.感染条件及MOI可参考附录2《常见细胞MOI及感染条件》。由于细胞状态差异，实际MOI可能与参考MOI存在差异。建议先使用96孔板感染，校正MOI，再进行正式实验。

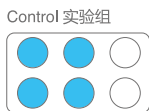
B.如未在《常见细胞MOI及感染条件》中找到待感染细胞，请先使用对照病毒进行感染预实验，摸索细胞最佳感染条件及MOI。

Day1：接种细胞

用完全培养基^[1]制备密度为 $3\sim 5\times 10^4$ 个/ml细胞悬液具体细胞密度可根据培养的细胞大小进行调节，并根据表1接种相应的细胞数到培养板中。37°C 培养16-24h，至细胞汇合度为20-30%，对于大部分细胞，我们通常认为培养24h后细胞数量是铺板数量的两倍。

*Special operation(MOI \geq 50时可选): 接种细胞后，加入终浓度1xHiTransG A共同孵育

$3\sim 5\times 10^4$ 个/ml



注意：保持细胞状态良好(形态清晰、生长正常、无任何污染)，为了减小误差，推荐平行感染2~3个复孔。

细胞培养容器	单孔底面积	接种体积	感染时体积	25x感染试剂用量/孔
96孔板	0.3cm ²	100μl	100μl	4μl
48孔板	0.6cm ²	200μl	200μl	8μl
24孔板	2cm ²	500μl	500μl	20μl
12孔板	4cm ²	1mL	500μl	20μl
6孔板	10cm ²	2mL	1mL	40μl
T25孔板	25cm ²	5mL	2.5mL	100μl

表1. 不同细胞培养体系推荐感染体积及感染试剂用量

Day2：感染

1.参考表1中的体积并注意预留加入病毒液体积

*感染条件可参考《常见细胞MOI及感染条件》

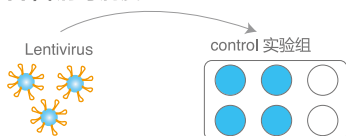
HiTransG A或HiTransG P感染液(可选)



感染液

注意：孔板底面积较大时(如6、12孔板)，为增加病毒与细胞接触的机率，可减少感染时体积。

2.根据细胞MOI及病毒滴度，加入相应病毒量，计算公式：**病毒体积 = (MOI × 细胞数目) / 病毒滴度**



*MOI可参考《常见细胞MOI及感染条件》

*病毒滴度请参见发货单或电子版报告

*如病毒滴度太高，每孔所加体积小于移液器量程，可先完全培养基将病毒稀释后加入

[1] 10%FBS DMEM,具体培养条件参考细胞说明书。

▶ 慢病毒的使用—贴壁细胞感染实验

病毒加入量	细胞数	MOI=1	MOI=10	MOI=100
96孔板	$\sim 1 \times 10^4$	0.1 μ l	1 μ l	10 μ l
48孔板	$\sim 2 \times 10^4$	0.2 μ l	2 μ l	20 μ l
24孔板	$\sim 5 \times 10^4$	0.5 μ l	5 μ l	50 μ l
12孔板	$\sim 1 \times 10^5$	1 μ l	10 μ l	100 μ l
6孔板	$\sim 2 \times 10^5$	2 μ l	20 μ l	200 μ l
T25孔板	$\sim 5 \times 10^5$	5 μ l	50 μ l	500 μ l

表2. 1×10^8 TU/ml病毒感染细胞所用的病毒量参考

3.37°C培养16h，更换为完全培养基，继续培养。(如细胞形态发生变化，可提前到8h换液，保持细胞正常生长)

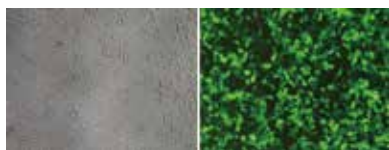
Day3-4: 继续培养

中途可对细胞换液，保持细胞活性。

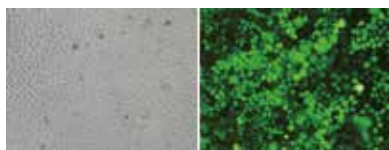
Day5: 观察感染效率

感染后约72h，观察感染效率。根据后续实验内容，选择合适时间点进行实验。可按照实际感染情况，校正MOI。

*对于携带Puromycin基因的病毒，如需要筛选稳定株，可参考附录1操作步骤。



▲ DU145 MOI=10 P液



▲ SGC-7901 MOI=10 A液

注意：

- 1.慢病毒表达时间：一般代谢旺盛的细胞(如293T)48h后即可观察到荧光，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(RFP)蛋白表达所需时间较长，感染后72-96h甚至更长时间才能观察到荧光
- 2.过表达慢病毒因载体中插入目的基因序列，可能荧光相比对照病毒稍弱
- 3.如载体中带有Cas9/dCas9等蛋白，其下游DNA 修复或者转录激活需要一定时间，建议感染后7-10d再继续下游实验

▶ 慢病毒的使用—贴壁细胞感染预实验

贴壁细胞感染预实验

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。

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

2. 实验步骤

为了确认合适的感染条件，按照不同培养条件将实验分为4组：

M组：完全培养基^[1]，观察常规培养条件下病毒对细胞的感染效果；

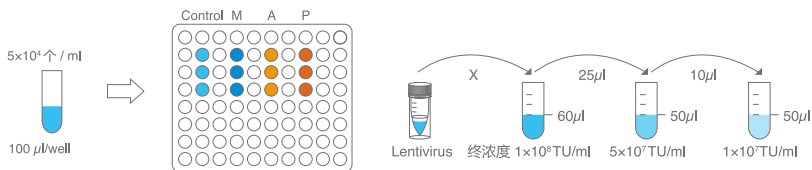
A组：完全培养基^[1]+HiTransG A组，观察HiTransG A是否可以提升感染效果；

P组：完全培养基^[1]+HiTransG P组，观察HiTransG P是否可以提升感染效果；

Control组：监控实验过程中细胞生长是否正常。

Day1：接种细胞

用完全培养基^[1]制备2ml密度为 $3\sim 5 \times 10^4$ 个/ml细胞悬液具体细胞密度可根据实验所用的细胞大小进行调节，取 $100\mu\text{l}$ 加入96孔板中，共12个孔，其中3个孔作为Control组， 37°C 培养16-24h，至细胞汇合度为20-30%。对于大部分细胞，我们通常认为培养24h后细胞数量是铺板时数量的两倍。



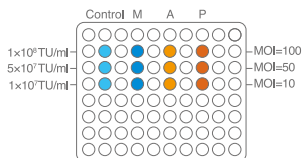
Day2：感染

1. 从冰箱取出病毒，冰上缓慢融化。用完全培养基依次将病毒稀释至滴度 $1 \times 10^8 \text{ TU/ml}$, $5 \times 10^7 \text{ TU/ml}$, $1 \times 10^6 \text{ TU/ml}$ ，稀释完成后每组最少 $35 \mu\text{l}$ 。

2. 吸掉各孔中上清液，按照表3更换培养基，加入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。

[1] 10%FBS DMEM,具体培养条件参考细胞说明书。

慢病毒的使用—贴壁细胞感染预实验



病毒量	control	M	A	P
MOI=10 1x10 ⁷ TU/ml	完全培养基： 100 μl	完全培养基：90 μl 病毒：10 μl	完全培养基：86 μl 病毒：10 μl A感染液：4 μl	完全培养基：86 μl 病毒：10 μl P感染液：4 μl
MOI=50 5x10 ⁷ TU/ml	完全培养基： 100 μl	完全培养基：90 μl 病毒：10 μl	完全培养基：86 μl 病毒：10 μl A感染液：4 μl	完全培养基：86 μl 病毒：10 μl P感染液：4 μl
MOI=100 1x10 ⁸ TU/ml	完全培养基： 100 μl	完全培养基：90 μl 病毒：10 μl	完全培养基：86 μl 病毒：10 μl A感染液：4 μl	完全培养基：86 μl 病毒：10 μl P感染液：4 μl

表3. 感染预实验实验分组和感染条件

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实验的依据，参见图1。

感染条件及MOI的选择原则

1. 细胞状态不受影响
2. 尽量用较少的病毒
3. 选择感染效率80%左右的感染条件作为最佳感染条件，下图为按照moi=1, 10, 100进行的预实验；根据吉凯的经验，我们目前建议设计moi=10, 50, 100的梯度

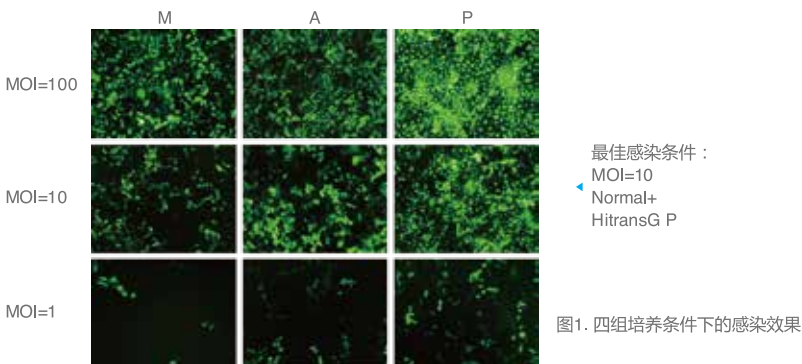


图1. 四组培养条件下的感染效果

注意：

慢病毒表达时间较慢，一般代谢较旺盛的细胞（如293T, BHK21等）48h后可以观察到GFP荧光（或者RFP红色荧光）；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（RFP）蛋白表达所需时间较长，感染后72-96h甚至更长时间可以观察到GFP（RFP）荧光。感染后期请根据细胞生长的情况对细胞进行换液或传代，以保证细胞良好的生长状态。

▶ 慢病毒的使用

悬浮细胞感染实验

悬浮细胞感染预实验

▶ 慢病毒的使用—悬浮细胞感染实验

慢病毒在体外培养原代细胞和细胞系水平的使用

实验材料

A. 试剂

HitransG A感染增强液（25x）、HitransG P感染增强液（25x）、细胞培养基

B. 耗材

细胞培养孔板、枪头、E_p管、75%消毒酒精、次氯酸钠液（84消毒液）、废液缸、口罩、手套

C. 仪器

1-10 μ l移液枪、20-200 μ l移液枪

HitransG A：

吉凯基因自主研发的病毒感染增强液。它的主要成分是一种新型的高分子非离子表面活性剂，同时也是一种细胞保护剂和促进吸收剂。它可以通过提高细胞表面活性，增加病毒与细胞的接触面积，促进病毒高效感染细胞，且对细胞毒性极低，适合敏感细胞使用。

HitransG P：

吉凯基因自主研发的病毒感染增强液。它的主要成分是一种阳离子聚合物，通过抑制细胞膜与病毒之间的电荷排斥，增加慢病毒对细胞的感染效率。本产品可以极大提高细胞感染效率，且细胞毒性显著低于Polybrene。我们建议将它替代 Polybrene使用。

由于不同细胞对慢病毒和感染试剂的耐受性，建议初次使用时，设置HitransG A、HitransG P平行对照组，以便选择最适合您细胞的感染增强液。

▶ 慢病毒的使用—悬浮细胞感染实验

悬浮细胞感染实验

如第一次使用慢病毒

A. 感染条件及MOI可参考附录2《常见细胞MOI及感染条件》。由于细胞状态差异，实际MOI可能与参考MOI存在差异。建议先使用96孔板感染，校正MOI，再进行正式实验。

B. 如未在《常见细胞MOI及感染条件》中找到待感染细胞，请先使用对照病毒进行感染预实验，摸索细胞最佳感染条件及MOI。

Day1: 接种细胞和感染

1. 接种细胞

用完全培养基^[1]制备2ml密度为 10^5 个/ml的细胞悬液，具体细胞密度可根据培养细胞大小进行调节，根据表4接种对应的细胞数到培养板中，并加入相应感染增强液。

*感染条件可参考《常见细胞MOI及感染条件》

HiTransG A或HiTransG P
感染液（可选）

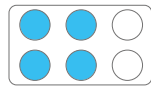


注意：保持细胞状态良好(形态清晰、生长正常、无任何污染)，为了减小误差，推荐平行感染2~3个复孔。

10^5 个/ml



control 实验组



2. 感染

根据细胞MOI及病毒滴度，加入相应病毒量，计算公式：**病毒体积=(MOI x 细胞数目)/病毒滴度**。37°C培养12-16h。

*MOI可参考《常见细胞MOI及感染条件》

*病毒滴度请参见发货单或电子版报告

*如病毒滴度太高，每孔所加体积小于移液器量程，可先用完全培养基将病毒稀释后加入

细胞培养容器	单孔底面积	接种体积	感染试剂用量/孔
96孔板	0.3cm ²	100μl	4μl
48孔板	0.6cm ²	200μl	8μl
24孔板	2cm ²	500μl	20μl
12孔板	4cm ²	1ml	20μl
6孔板	10cm ²	2ml	40μl
T25孔板	25cm ²	5ml	100μl

表4. 不同细胞培养体系推荐感染体积及感染试剂用量

[1] 10%FBS DMEM,具体培养条件参考细胞说明书。

▶ 慢病毒的使用—悬浮细胞感染实验

3. 感染后换液

将各孔中细胞收集到干净的1.5ml EP管中，以200g离心2min，去掉上清液，更换为完全培养基^[1]，轻轻混匀后放回培养板中继续培养。

病毒加入量	细胞数	MOI=1	MOI=10	MOI=100
96孔板	$\sim 1 \times 10^4$	0.1 μ l	1 μ l	10 μ l
48孔板	$\sim 2 \times 10^4$	0.2 μ l	2 μ l	20 μ l
24孔板	$\sim 5 \times 10^4$	0.5 μ l	5 μ l	50 μ l
12孔板	$\sim 1 \times 10^5$	1 μ l	10 μ l	100 μ l
6孔板	$\sim 2 \times 10^5$	2 μ l	20 μ l	200 μ l
T25孔板	$\sim 5 \times 10^5$	5 μ l	50 μ l	500 μ l

表5. 1×10^8 TU/ml病毒感染细胞所用的病毒量参考

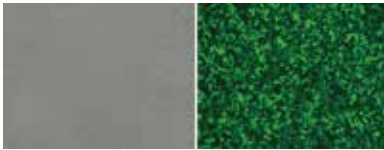
Day2-3: 继续培养

中途可以对细胞换液（方法同感染后换液），保持细胞活性。

Day4: 观察感染效率，进行后续实验

感染后约72h，观察感染效率。根据后续实验内容，选择合适时间点进行实验。可按照实际感染情况，校正MOI。

*对于携带Puromycin基因的病毒，如需要筛选稳定株，可参考附录1操作步骤



▲ K562 MOI=30 P液



▲ REH MOI=30 A液



◀ THP-1 MOI=30 A液

[1] 10%FBS DMEM,具体培养条件参考细胞说明书。

注意：

- 慢病毒表达时间:一般代谢较旺盛的细胞(如293T)48h后即可观察到荧光，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(RFP)蛋白表达所需时间较长，感染后72-96h甚至更长时间才能观察到荧光。
- 过表达慢病毒载体中插入目的基因序列，可能荧光相比对照病毒稍弱。
- 如载体中带有cas9/dcas9等蛋白，其下游DNA repair或者转录激活需要一定时间，建议感染后7-10d再继续下游实验。

▶ 慢病毒的使用—悬浮细胞感染预实验

悬浮细胞感染预实验

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，如接种的细胞量，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。

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

2. 实验步骤

为了确认合适的感染条件，按照不同培养条件将实验分为4组：

M组：完全培养基^[1]，观察常规培养条件下病毒对细胞的感染效果；

A组：完全培养基^[1]+HiTransG A组，观察HiTransG A是否可以提升感染效果；

P组：完全培养基^[1]+HiTransG P组，观察HiTransG P是否可以提升感染效果；

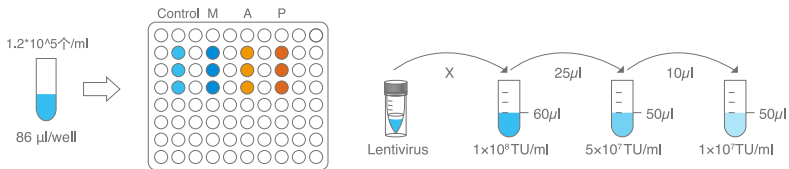
Control组：监控实验过程中细胞生长是否正常。

注意：悬浮细胞无需消化，接种后当天就可以进行感染。

Day1: 接种细胞和感染

1. 接种细胞

用完全培养基^[1]制备2ml密度为 1.2×10^5 个/ml的细胞悬液，具体细胞密度可根据培养细胞大小进行调节，取86 μ l/孔加入96孔板中，共12个孔，其中3个孔作为Control组。



2. 感染前准备

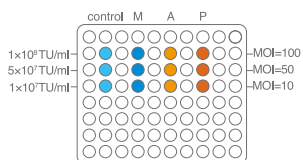
从冰箱取出病毒，冰上缓慢融化。用完全培养基依次将病毒稀释至滴度 1×10^8 TU/ml, 5×10^7 TU/ml, 1×10^6 TU/ml, 稀释完成后每组最少35 μ l。

3. 感染操作

按照表6向各孔中加入相应体积的溶液。感染后8~12h，向每孔中加入100 μ l完全培养基，保持细胞正常生长（请勿换液，以免损失细胞数量）。

[1] 10%FBS DMEM,具体培养条件参考细胞说明书。

▶ 慢病毒的使用—悬浮细胞感染预实验



病毒量	Control	M	A	P
感染条件	完全培养基： 14μl	完全培养基：4μl 病毒：10μl	病毒：10μl A感染液：4μl	病毒：10 μl P感染液：4 μl
MOI=10 1x10 ⁷ TU/ml				
MOI=50 5x10 ⁷ TU/ml	完全培养基： 14μl	完全培养基：4μl 病毒：10μl	病毒：10μl A感染液：4μl	病毒：10 μl P感染液：4 μl
MOI=100 1x10 ⁸ TU/ml	完全培养基： 14μl	完全培养基：4μl 病毒：10μl	病毒：10μl A感染液：4μl	病毒：10 μl P感染液：4 μl

表6. 感染预实验实验分组和感染条件

Day2-3：继续培养

中途可以对细胞补液，保持细胞活性。

Day4：感染效果确认

感染后72小时，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实验的依据，参见图2。

感染条件及MOI的选择原则

1. 细胞状态不受影响
2. 尽量用较少的病毒
3. 选择感染效率80%左右的感染条件作为最佳感染条件，下图为按照moi=1, 10, 100进行的预实验；根据吉凯的经验，我们目前建议设计moi=10, 50, 100的梯度

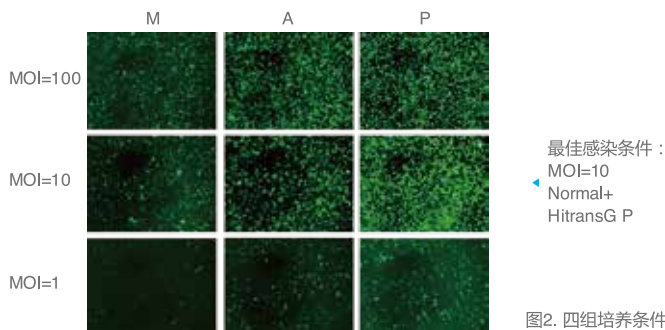


图2. 四组培养条件下的感染效果

注意：

慢病毒表达时间较慢，一般代谢较旺盛的细胞（如293T，BHK21等）48h后可以观察到GFP荧光（或者RFP红色荧光）；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（RFP蛋白表达所需时间较长，感染后72-96h甚至更长时间可以观察到GFP（RFP）荧光。感染后期请根据细胞生长的情况对细胞进行换液或传代，以保证细胞良好的生长状态。

- ▶ 细胞感染常见问题
- ▶ 附录1-稳定株筛选实验
- ▶ 附录2-常见细胞MOI和感染条件
- ▶ 附录3-慢病毒感染增强液HitransG A说明书
- ▶ 附录4-慢病毒感染增强液HitransG P说明书
- ▶ 附录5-Quick Protocol

► 细胞感染常见问题

1. 慢病毒如何稀释？

完全培养基、生理盐水、Hanks液、PBS液等将慢病毒稀释到需要的滴度。如原病毒标记滴度为 5×10^8 TU/ml，则取20 μ l病毒液加入到80 μ l的完全培养基中，即可得到 1×10^8 TU/ml的病毒。

2. A感染液有什么成分，怎么用？

A感染液是吉凯基因自主研发的一种感染增强液，可显著提升慢病毒的感染效率，且无细胞毒性。其主要成分HitransG是一种大的非离子型两性分子。

当使用完全培养基感染效果不佳时，可以在培养基中加入A感染液，工作浓度为1X（具体操作见感染实验部分）。

3. P感染液有什么作用？如何使用？

P感染液是吉凯基因自主研发的一种感染增强液，可显著提升慢病毒的感染效率，且无明显细胞毒性。它的主要成分是一种阳离子聚合物，通过抑制细胞膜与病毒之间的电荷排斥，增加慢病毒对细胞的感染效率。本产品可以极大提高细胞感染效率，且细胞毒性显著低于Polybrene。我们建议将它替代 Polybrene使用。

4. 什么是MOI？

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。

5. 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20~40%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。

6. 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。

► 细胞感染常见问题

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。

7. 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，但是对于生长缓慢的细胞，达到峰值的时间会更长。

8. 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。

9. 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。

10. 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。

▶ 附录1-稳定株筛选实验

大部分细胞puromycin的工作浓度为1~10 μ g/ml。部分细胞的参考用量可参见附录2《常见细胞MOI及感染条件》，请在筛选时设置未感染病毒的野生型细胞对照，加入等量浓度的Puromycin。

*如未在附件中找到您使用的细胞，请在正式实验前，先进行Puromycin梯度筛选预实验（确定能在2天杀死野生型细胞的最低Puromycin浓度）。

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。

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

▶ 附录2-常见细胞MOI和感染条件

* 以下细胞株均来自吉凯基因细胞库，已进行STR分型鉴定，类型明确，且没有交叉污染。由于不同实验室细胞代数、状态等因素，MOI值存在一定差异，以下数据仅供参考。

细胞名	细胞中文名	慢病毒感染MOI	感染条件	Puromycin参考值
5637	人膀胱癌细胞	10	HiTransG P	
22Rv1	人前列腺癌细胞	5	HiTransG P	
HEK-293	人胚肾细胞	5	HiTransG A	5.00 µg/ml
293T	人胚肾细胞	5	HiTransG P	2.00 µg/ml
786-O	人肾透明细胞腺癌细胞	5	HiTransG A	5.00 µg/ml
8305C	人甲状腺癌细胞	10	HiTransG P	
95-D	人高转移肺癌细胞	5	HiTransG P	
A-172	人胶质母细胞瘤细胞	5	HiTransG P	
A-375	人恶性黑色素瘤细胞	10	HiTransG A	
A549	人非小细胞肺癌细胞	10	HiTransG P	2.00 µg/ml
A-673	人横纹肌肉瘤细胞	10	HiTransG P	
ACC-2	人涎腺腺样囊性癌细胞	50	HiTransG P	
ACHN	人肾细胞腺癌细胞	15	HiTransG P	
AGS	人胃腺癌细胞	10	HiTransG A	
AN3 CA	人子宫内膜癌细胞	10	HiTransG P	
AsPC-1	人转移胰腺腺癌细胞	10	HiTransG P	
B-CPAP	人甲状腺癌细胞	10	HiTransG P	2.00 µg/ml
BEAS-2B	人正常肺上皮细胞	> 100	HiTransG P	
BEL-7402	人肝癌细胞	20	HiTransG P	2.00 µg/ml
BEL-7404	人肝癌细胞	10	HiTransG P	2.00 µg/ml
BGC-823	人胃腺癌细胞	20	HiTransG P	2.00 µg/ml
BxPc-3	人原位胰腺腺癌细胞	10	HiTransG P	1.00 µg/ml
C-33 A	人子宫颈癌	10	HiTransG A	
Ca Ski	人宫颈癌肠转移细胞	10	HiTransG P	

细胞名	细胞中文名	慢病毒感染 MOI	感染条件	Puromycin 参考值
Caki-1	人肾透明细胞癌皮肤转移细胞	20	HiTransG P	
CAL 27	人舌鳞癌细胞	10	HiTransG P	
CAL-62	人甲状腺癌细胞	10	HiTransG P	
Calu-6	人退行性癌细胞	5	HiTransG P	
Caov-3	人卵巢癌细胞	> 100	HiTransG P	
CFPAC-1	人胰腺癌细胞	50	HiTransG P	2.00 µg/ml
DLD-1	人结肠腺癌上皮细胞	10	HiTransG P	
DU 145	人前列腺癌细胞	10	HiTransG P	1.25 µg/ml
Eca-109	人食管癌细胞	10	HiTransG A	2.00 µg/ml
ES-2	人卵巢透明细胞癌	5	HiTransG P	
FaDu	人咽鳞癌细胞	10	HiTransG P	
GBC-SD	人胆囊癌细胞	10	HiTransG A	
H125	人肺癌细胞	20	HiTransG P	
HacaT	人永生表皮细胞	20	HiTransG P	2.00 µg/ml
HCT 116	人结肠癌细胞	10	HiTransG P	2.00 µg/ml
HCT-8	人盲肠癌细胞	10	HiTransG P	10.00 µg/ml
HEC-1-A	人子宫内膜腺癌细胞	10	HiTransG P	2.50 µg/ml
HEC-1-B	人子宫内膜腺癌细胞	10	HiTransG P	
Hela	人宫颈癌细胞	10	HiTransG P	2.00 µg/ml
Hep 3B	人肝癌细胞	5	HiTransG A	
Hep G2	人肝癌细胞	10	HiTransG A	2.00 µg/ml
HEp-2	人喉表皮样癌细胞	30	HiTransG P	2.50 µg/ml
HEY	人卵巢癌细胞	50	HiTransG P	
HEY-T30	人卵巢癌细胞	10	HiTransG A	
HFF-1	人皮肤成纤维细胞	20	HiTransG P	
hFOB 1.19	人SV40转染成骨细胞	10	HiTransG P	
HGC-27	人胃癌细胞（未分化）	10	HiTransG P	
HK-2	人肾近曲小管细胞	5	HiTransG A	

细胞名	细胞中文名	慢病毒感染 MOI	感染条件	Puromycin 参考值
HL-60	人原髓细胞白血病细胞	10	HiTransG A	
HO-8910	人卵巢癌细胞	10	HiTransG P	
HOS	人骨肉瘤细胞	20	HiTransG P	2.00 µg/ml
HS 683	人脑胶质瘤细胞	5	HiTransG P	
HT-1197	人膀胱癌细胞	10	HiTransG P	
HT-1376	人膀胱癌细胞	50	HiTransG P	
HT-29	人结肠癌细胞	10	HiTransG P	8.00 µg/ml
Huh-7	人肝癌细胞	5	HiTransG A	2.00 µg/ml
IMR-32	人神经母细胞瘤细胞	10	HiTransG A	
ishikawa	人子宫内膜癌细胞	20	HiTransG A	
J82	人膀胱移行细胞癌	10	HiTransG P	
JAR	人胎盘绒毛膜细胞株	10	HiTransG P	
Jeko-1	人套细胞淋巴瘤细胞	40	HiTransG P	
Jurkat	人白血病细胞	20	HiTransG P	3.00 µg/ml
K-562	人慢性髓原白血病细胞	30	HiTransG P	2.00 µg/ml
KB	人口腔表皮样癌细胞	50	HiTransG P	
KG-1	人白血病细胞	> 100	HiTransG P	
KLE	人子宫内膜癌细胞	10	HiTransG A	
LNCaP clone FGC	人前列腺癌细胞	10	HiTransG A	2.00 µg/ml
LoVo	人结肠癌细胞	50	HiTransG P	2.00 µg/ml
MCF7	人乳腺癌细胞	20	HiTransG P	1.00 µg/ml
MDA-MB-231	人乳腺癌细胞	10	HiTransG P	2.00 µg/ml
MDA-MB-468	人乳腺癌细胞	10	HiTransG P	
MG-63	人骨肉瘤细胞	50	HiTransG P	
MGC80-3	人胃癌细胞	10	HiTransG P	2.00 µg/ml
MNNG/HOS Cl #5	人骨肉瘤细胞	10	HiTransG P	
NAMALWA	人Burkitt's淋巴瘤细胞	50	HiTransG A	
NCI-H1299	人非小细胞性肺癌细胞	10	HiTransG P	2.00 µg/ml

细胞名	细胞中文名	慢病毒感染 MOI	感染条件	Puromycin 参考值
NCI-H1688	人经典小细胞肺癌细胞	10	HiTransG A	
NCI-H1975	人肺腺癌细胞	50	HiTransG A	2.00 µg/ml
NCI-H295R	人肾上腺皮质癌细胞	10	HiTransG P	
NCI-H460	人大细胞肺癌细胞	100	HiTransG P	
NCI-N87	人胃癌细胞	10	HiTransG P	
OVCAR3	人卵巢癌细胞	30	HiTransG P	
PANC-1	人胰腺癌细胞	10	HiTransG P	2.00 µg/ml
PC-3	人前列腺癌细胞	50	HiTransG P	2.00 µg/ml
Raji	人Burkitt's 淋巴瘤细胞	> 100	HiTransG P	
RBE	人肝胆管癌细胞	20	HiTransG P	
Reh	人急性非B非T淋巴细胞	30	HiTransG A	
RKO	人结肠腺癌细胞	5	HiTransG A	2.00 µg/ml
RL95-2	人子宫内膜癌细胞	30	HiTransG P	
RWPE-1	人正常前列腺上皮细胞	50	HiTransG P	
Saos-2	人骨肉瘤细胞	5	HiTransG P	
ScaBER	人膀胱鳞癌细胞	50	HiTransG P	
SH-SY5Y	人神经母细胞瘤细胞	20	HiTransG P	
SiHa	人宫颈鳞癌细胞	10	HiTransG P	2.50 µg/ml
SK-HEP-1	人肝癌细胞	30	HiTransG A	1.25 µg/ml
SK-MEL-28	人黑色素瘤细胞	10	HiTransG P	
SK-N-AS	人神经母细胞瘤细胞	10	HiTransG P	
SK-N-BE(2)	人神经母细胞瘤细胞	10	HiTransG P	
SK-N-SH	人SK神经母细胞瘤细胞	10	HiTransG P	
SK-OV-3	人卵巢癌细胞	5	HiTransG A	2.50 µg/ml
SMMC-7721	人肝癌细胞	10	HiTransG P	2.50 µg/ml
SW 1990	人胰腺癌细胞	20	HiTransG P	2.00 µg/ml
SW 780	人膀胱移行细胞癌	5	HiTransG P	
SW 982	人滑膜肉瘤细胞	30	HiTransG P	

细胞名	细胞中文名	慢病毒感染 MOI	感染条件	Puromycin 参考值
SW579	人甲状腺鳞癌细胞	10	HiTransG P	
SW620	人结肠癌细胞	20	HiTransG P	2.00 µg/ml
T24	人膀胱移行细胞癌细胞	10	HiTransG P	2.00 µg/ml
T-47D	人乳腺癌细胞	20	HiTransG A	
T84	人结肠腺癌肺转移细胞	20	HiTransG A	
TCCSUP	人膀胱癌细胞	5	HiTransG P	
TE-1	人食管癌细胞	10	HiTransG A	
THP-1	人急性单核细胞白血病细胞	30	HiTransG A	2.00 µg/ml
U-2 OS	人骨肉瘤细胞	10	HiTransG P	
U251	人胶质瘤细胞	5	HiTransG P	2.00 µg/ml
U-87 MG	人脑星形胶质母细胞瘤细胞	5	HiTransG P	2.00 µg/ml
UM-UC-3	人膀胱移行细胞癌	20	HiTransG P	

买病毒 上淘基因

多·快·好·省

吉凯淘基因小程序激活流程

淘基因小程序



做基因，找吉凯
更多优惠，扫码获取

1

微信小程序搜索【淘基因】
或关注【吉凯基因】公众号点击底部：淘基因



慢病毒

腺病毒

吉凯基因视频号，您身边的科研小助手

最新的科研资讯、最实用的实验操作技巧、最丰富高分文章解析、最热门的优惠活动资讯等，都在吉凯基因视频号。

扫码关注视频号，您身边最全面的科研小助手，助您科研畅通无阻。



2

进入小程序后，点击【我的】



3

点击顶部的【注册/登录】，
授权手机号后填写个人信息完成注册



腺相关病毒

质粒

试剂耗材等

序号	问题类型	产品类型	需要提供的数据 (详细要求请扫描表末二维码)
8	疑似污染问题	质粒、菌液类产品	填写《吉凯基因菌液质粒产品反馈表V2.0》
9	疑似污染问题	试剂类产品	照片
10	产品内外包装问题(标签、配发货单据、快递运输情况等)	所有产品	照片
<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;"> <p>扫描右侧 二维码</p> </div> <div style="text-align: center;">  </div> <div> <p>下载/查看文件：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.吉凯基因产品数据标准(详细标准) 2.吉凯基因病毒产品反馈表V2.0 3.吉凯基因菌液质粒产品反馈表V2.0 </div> </div>			

建议您提供**核心实验步骤**，同时如果您有其他实验结果可以反馈遇到的问题，也请您整理后一并提供给我们，我们将及时分析并快速解决您的问题。

10,000名科研人都在学习的 8大精品直播课

免费网络
视频课程

从国自然热点研究—课题设计—工具病毒产品选择—实验操作轻松搞定

扫码或添加微信号

GeneChemV

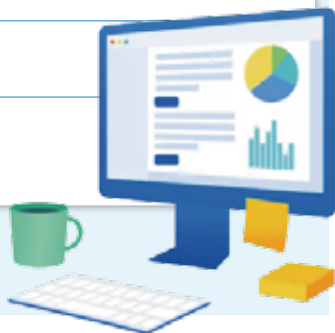
- 免费获取PPT及文献资料包
- 无限次免费观看课程
- 更有专业讲师群内实时答疑



· 热门课程主题 ·

01. 诺奖技术『**基因编辑**』的研究应用
02. 国自然热点——**非编码RNA**的研究策略与方法👍
03. 国自然热点『**环状RNA研究**』之实验设计及功能验证
04. **临床医生如何做好科研？**——23分心血管顶刊文章这样出炉👍
05. 如何利用『**过表达、RNAi、基因编辑**』有效调控基因表达👍
06. 细胞实验中如何**用好『慢病毒』**?👍
07. **神经环路**的研究策略及工具选择
08. 教会您如何**用好腺相关病毒AAV**👍

近20年病毒包装经验，年产病毒上万次
慢病毒、AAV、腺病毒、逆转录病毒、HSV等





联系地址：上海张江高科技园区爱迪生路326号

邮编：201203

邮箱：service@genechem.com.cn

客服电话：400-621-0302

www.genechem.com.cn